



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



ISIS TORRES SOUZA

**ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO NA  
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS EM EXTRATOS VEGETAIS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

MACEIÓ  
2013

ISIS TORRES SOUZA

**ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO NA  
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS EM EXTRATOS VEGETAIS POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Química Orgânica e sub-área Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart  
Santana

MACEIÓ  
2013

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

S729i Souza, Isis Torres.

Isolamento, quantificação e desenvolvimento de método na determinação de compostos em extratos vegetais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) / Isis Torres Souza. – 2013.  
134 f. : il.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 117-130.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Isolamento.  
3. Validação. 4. Compostos vegetais – Métodos analíticos. I. Título.

CDU: 543.641:543.54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

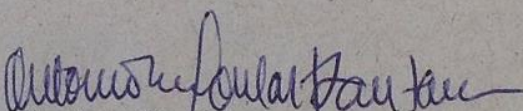


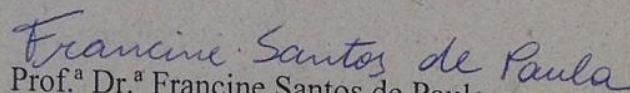
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

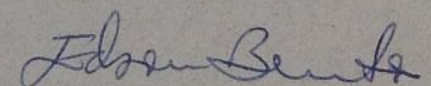
FOLHA DE APROVAÇÃO

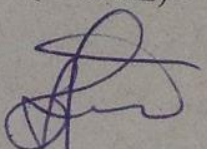
Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Isis Torres Souza, intitulada: "Isolamento, Quantificação e Desenvolvimento de Método na Determinação de Compostos em Extratos Vegetais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 25 de junho de 2013, às 9:00h, no Auditório do Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar da UFAL (Severinão).

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana  
Orientador (PPGQB/UFAL)

  
Prof.ª Dr.ª Francine Santos de Paula  
(IQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Edson de Souza Bento  
(PPGQB/UFAL)

  
Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
(Departamento de Química/UFPR)

Dedico à minha mãe Suely Torres e minha irmã  
Thaysa Torres pela dedicação, apoio, incentivo e  
estímulo.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa durante o mestrado.

Ao Instituto de Química e Biotecnologia, pela qualificação.

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

Ao Prof. Dr. Edson Bento, pela enorme contribuição com RMN e pelo carinho.

Aos Professores Msc. Walmilsson Santana (*in memoriam*) e Dra. Margarida Humberto, sempre lembrados, pela base fornecida e pelos ensinamentos de vida, por formarem não apenas profissionais.

Aos amigos de laboratório e de muitas horas Vanderson Barbosa, Ingrid Melo, Pedro Gregório, Paulo, Nadia Jelves, por dividir experiências e pelos grandes momentos que tivemos juntos.

Ao Daniel Lira da Silva pela amizade e pelas análises no equipamento de espectroscopia de infravermelho.

À Milena Duarte pela contribuição e ensinamentos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

As grandes amigas Fátima Brito e Carla Karine, pelo companheirismo nos momentos mais difíceis.

À Júnia Porto, por dividir suas experiências.

À amiga Érica Verena, que foi minha primeira professora de fitoquímica, que me ensinou os passos da vida acadêmica.

À Laís Pacheco, pela amizade de tantos anos.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, Cenira Monteiro, Mariana Gomes, Ihanara Lima, Mannoella Arcanjo, Edjane Vieira, Danielle de Lima, Daniel Moraes, Henrique Fonseca, Jaim Simões, João Gomes, Kirley Michelly, Wbyratan Luis, Sannyele, Domingos Lusitâneo, Núbia.

Aos grandes Aldy dos Santos e Margarida Teodoro, por sempre nos salvar nas horas mais desesperadoras.

Aos colegas de trabalho Júlio César, Daniel Inácio, Karin Christine, Cida Alves, Ana Paula, pela compreensão nos momentos difíceis.

Ao amigo e namorado Lucas Dias, pela paciência e companheirismo.

A minha família pelo apoio e confiança.

## RESUMO

O uso de técnicas cromatográficas na determinação e quantificação de compostos vegetais é cada vez mais frequente. Neste trabalho, utilizamos a cromatografia líquida de alta eficiência para identificação, por comparação, e quantificação dos ácidos ursólico e oleanólico em extratos de *Mansoa hirsuta* e *Zeyheria tuberculosa*, isolamento de compostos biologicamente ativos, em testes moluscidas, de *Simaba maiana* Casar, e o desenvolvimento e validação de método para quantificação do ácido tormêntico, que apresentou atividade antimalárica, em extratos de *Cecropia pachystachya* Trécul. Desta forma, o trabalho está descrito em três partes. Na primeira, obtivemos curvas analítica para quantificação simultânea de ácidos ursólico (AU) e oleanólico (AO), fornecendo coeficientes de determinação de 0,9998 (AU) e 0,9994 (AO). Encontrou-se  $446,19 \pm 2,43$  µg/mg de AU e  $151,50 \pm 0,35$  µg/mg de AO na partição clorofórmica das folhas de *Z. tuberculosa*, enquanto para a partição clorofórmica de *M. hirsuta* foram observadas as seguintes concentrações dos triterpenos:  $267,86 \pm 2,11$  µg/mg (AU) e  $50,90 \pm 1,03$  µg/mg (AO). Na parte seguinte, foi descrita atividade moluscida das subfrações clorofórmio e metanol, obtidas do extrato do caule de *Simaba maiana* Casar. Realizou-se isolamento, através de CLAE semi preparativa com a subfração clorofórmio, obtendo a furanocumarina prenilada Isoimperatorina, a qual foi elucidada estruturalmente após análises por espectroscopias de RMN, UV, IV e raio X. Já na terceira parte, foi descrita a extração do ácido tormêntico, assistida por ultrassom, da raiz de *C. pachystachya*, e os parâmetros avaliados foram granulometria, solvente, tempo e temperatura de extração, onde a melhor extração se deu utilizando acetona a 50 °C e 5 minutos, com partículas peneiradas em espessura de 0,149 mm (100 mesh). A granulometria foi o parâmetro estatisticamente mais influente. Com o método utilizado para quantificação das amostras por CLAE, o tempo de retenção do ácido tormêntico, em coluna C8 foi de 6,5 minutos. O método mostrou-se seletivo, linear, preciso, com limites de detecção e quantificação de 0,45 µg/mL e 1,37 µg/mL e exato após testes de recuperação. Com as três partes conseguiu-se descrever o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência aplicada à extratos vegetais com finalidades que vão desde identificação de um composto a processos mais trabalhosos como validação de método analítico.

**Palavras-chave:** CLAE. Quantificação. Isolamento. Validação.



## ABSTRACT

The use of chromatographic techniques for the determination and quantification of plant compounds is becoming increasingly common. In this work, we used high performance liquid chromatography for identification by comparison and quantification of ursolic and oleanolic acids in extracts of *Mansoa hirsuta* and *Zeyheria tuberculosa*, isolation of biologically active compounds in tests molluscicides of *Simaba maiana* Casar, and development and validation method for quantifying tormentic acid, which showed antimalarial activity in extracts of *Cecropia pachystachya* Trécul. Thus, the work was described into three parts. At first, calibration obtained curves for the simultaneous quantification of ursolic acid (UA) and oleanolic acid (AO) providing coefficients for determining 0,9998 (AU) and 0,9994 (OA). It was found  $446,19 \pm 2,43$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of AU and  $151,50 \pm 0,35$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of AO in chloroform partition the leaves of *Z. tuberculosa*, while for partition chloroform *M. hirsuta* were observed following concentrations of triterpenes:  $267,86 \pm 2,11$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (AU) and  $50,90 \pm 1,03$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (AO). In the next part, it was observed molluscicidal activity of extract subfractions chloroform and methanol obtained from the stem of *Simaba maiana* Casar. The isolation was performed by semi-preparative HPLC, subfraction in chloroform, obtaining the prenylated furanocoumarin Isoimperatorin, which was structurally elucidated after analyzes, NMR, UV, IR and X-rays. In the third part, the extraction of tormentic acid, ultrasound-assisted, from the root, of the *C. pachystachya* and evaluated parameters particle size, solvent, extraction time and temperature, where the best extraction was made using acetone at 50 °C during 5 minutes, with sieved particles in thickness from 0,149 mm (100 mesh). The particle size was statistically the most influential parameter. With the method used for quantification of samples HPLC, the retention time of tormentic acid in C8 column was 6,5 minutes. The method proved to be selective, linear, precise, with limits of detection and quantification of 0,45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 1,37  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and accurate tests after recovery. With three parts use of High Performance Liquid Chromatography applied to plant extracts for purposes ranging from the identification of a compound to more laborious processes such as validation of the analytical method.

**Keywords:** HPLC. Quantification. Isolation. Validation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos ácidos oleanólico e ursólico. ....	24
Figura 2 – Unidade básica dos terpenos. ....	26
Figura 3 – Unidades de isoprenos biologicamente ativas. ....	26
Figura 4 – Biossíntese dos terpenos. A – via MVA; B – via MEP. ....	28
Figura 5 – Formação dos terpenos. ....	29
Figura 6 – Formação do esqualeno. ....	30
Figura 7 – Ciclização do esqualeno. ....	31
Figura 8 – Formação dos ácidos ursólico e oleanólico. ....	32
Figura 9 – Cromatograma obtido para o extrato clorofórmio de <i>Mansoa hirsuta</i> indicando a presença dos ácidos em estudo, porém sem distinção dos picos. ....	40
Figura 10 – Cromatograma obtido para o extrato acetato de etila da <i>Mansoa hirsuta</i> indicando a ausência dos ácidos em estudo. ....	40
Figura 11 – Cromatograma obtido para o método A, reproduzido segundo literatura para quantificação de AU e AO (picos de AO e AU respectivamente). ....	42
Figura 12 – Cromatograma obtido para o método A sem uso do ácido na fase móvel (picos de AO e AU respectivamente). ....	42
Figura 13 – Cromatograma obtido para o método A com alteração de fluxo de 0,8 mL.min <sup>-1</sup> para 0,3 mL.min <sup>-1</sup> (picos de AO e AU respectivamente). ....	43
Figura 14 – Cromatograma obtido para a reprodução método B a 0,4 mL.min <sup>-1</sup> (picos de AO e AU respectivamente). ....	44
Figura 15 – Cromatograma obtido como o método B, com alteração de fluxo de 0,4 mL.min <sup>-1</sup> para 0,3 mL.min <sup>-1</sup> (picos de AO e AU respectivamente). ....	45
Figura 16 – Cromatogramas obtidos para AO e AU em fase móvel MeOH – Água (95:5), temperatura de 20 °C, $\lambda = 215$ nm e fluxo 0,3 mL.min <sup>-1</sup> . ....	46
Figura 17 – Curva analítica obtida para o ácido oleanólico (AO). ....	46
Figura 18 – Curva analítica obtida para o ácido ursólico (AU). ....	47
Figura 19 – Alcaloides do tipo cantinona encontrados em espécie da família Simaroubaceae. ....	53
Figura 20 – Primeiros quassinóides descritos na família Simaroubaceae. ....	54
Figura 21 – Exemplos de cumarinas. ....	55
Figura 22 – Biossíntese de cumarinas. ....	56
Figura 23 – Formação de psoraleno, ciclização direta. ....	57
Figura 24 – Formação de anel furano e pirano com intermediário epóxido. ....	57
Figura 25 – Ciclo da esquistossomose. ....	58
Figura 26 – Perfil cromatográfico obtido para a fração clorofórmio por CLAE analítico em coluna C18. ....	67

Figura 27 – Perfil cromatográfico obtido para a fração CHCl <sub>3</sub> – AcOEt 5%, por CLAE analítico em coluna C18.....	67
Figura 28 – Perfil cromatográfico obtido para a fração CHCl <sub>3</sub> – AcOEt 1:1, por CLAE analítico em coluna C18.....	68
Figura 29 – Perfil cromatográfico obtido para a fração MeOH, por CLAE analítico em coluna C18.....	68
Figura 30 – Cromatograma obtido para a fração clorofórmio para novo método de separação.....	69
Figura 31 – Cromatograma obtido para CLAE semi-preparativa do novo método de separação.....	70
Figura 32 – Cromatogramas de reinjeção de compostos após CLAE semi-preparativa. (A) SMC1; (B) SMC2; (C) SMC3 e (D) SMC4 .....	71
Figura 33 – Espectro na região Ultravioleta obtido para a amostra SMC2.....	72
Figura 34 – Espectro na região do Infravermelho (IV) por reflectância total atenuada (ATR) de SMC2.....	73
Figura 35 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de SMC2, solvente CDCl <sub>3</sub> .....	74
Figura 36 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de SMC2, com ampliação do multipeto em δ 5,539 ppm.....	75
Figura 37 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de SMC2, com ampliação do duplo dupeto em δ 8,159 ppm.....	75
Figura 38 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de SMC2, com ampliação do duplo dupeto em δ 6,953 ppm.....	76
Figura 39 – Partes da estrutura de SMC2 a partir de dados encontrados através de <sup>1</sup> H. (Valores de deslocamento em ppm).....	76
Figura 40 – Espectro de RMN 2D COSY de SMC2, solvente CDCl <sub>3</sub> .....	78
Figura 41 – Correlações <sup>n</sup> J <sub>(H-H)</sub> observadas no espectro 2D COSY de SMC2. <sup>3</sup> J <sub>(H-H)</sub> (verde), <sup>4</sup> J <sub>(H-H)</sub> (vermelho) e <sup>5</sup> J <sub>(H-H)</sub> (azul).....	79
Figura 42 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C de SMC2, solvente CDCl <sub>3</sub> .....	80
Figura 43 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C de SMC2, solvente CDCl <sub>3</sub> , ampliação da região com deslocamentos entre 135-170 ppm.....	80
Figura 44 – Espectro de RMN 2D HSQC de SMC2, solvente CDCl <sub>3</sub> .....	81
Figura 45 – Espectro de RMN 2D HMBC de SMC2, solvente CDCl <sub>3</sub> .....	82
Figura 46 – Espectro de RMN 2D HMBC de SMC2, solvente CDCl <sub>3</sub> , com expansão.....	82
Figura 47 – Correlações observadas no espectro 2D HMBC de SMC2.....	83
Figura 48 – Correlações observadas no espectro 2D NOESY de SMC2.....	83
Figura 49 – Isoimperatorina, SMC2.....	84
Figura 50 – Análise de raio X para SMC2.....	87
Figura 51 – Estrutura sugerida para SMC2 por análise em raio X.....	87

Figura 52 – Núcleos triterpenos pentacíclicos.....	96
Figura 53 – Estrutura ácido tormêntico. ....	97
Figura 54 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel 80% MeOH (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min <sup>-1</sup> . ....	106
Figura 55 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel 78% MeOH (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min <sup>-1</sup> . ....	106
Figura 56 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando fase móvel a 70% MeOH (isocrático), com fluxo 0,8 mL.min <sup>-1</sup> . ....	106
Figura 57 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel CH <sub>3</sub> COOH 0,1% em água (30%) e MeOH (70%) (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min <sup>-1</sup> . ....	107
Figura 58 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel CH <sub>3</sub> COOH 0,1% em água (25%) e MeOH (75%) (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min <sup>-1</sup> . ....	107
Figura 59 – Curva analítica obtida para o ácido tormêntico. ....	108
Figura 60 – Aparelhagem para extração, em ultrassom, do ácido tormêntico em raízes de <i>C. pachystachya</i> .....	109
Figura 61 – Gráfico de Pareto para efeitos padronizados. ....	111
Figura 62 – Gráfico de efeitos principais. ....	112
Figura 63 – Cromatograma do padrão de ácido tormêntico. ....	113
Figura 64 – Cromatograma obtido para o extrato fortificado com o padrão. ....	113
Figura 65 – Cromatogramas obtidos para algumas amostras.....	113
Figura 66 – Determinação gráfica da linearidade. Gráfico da razão sinal/concentração vs. log da concentração. ....	114

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Frações obtidas das folhas de <i>Mansoa hirsuta</i> . .....	35
Fluxograma 2 – Frações obtidas das folhas de <i>Zeyheria tuberculosa</i> . .....	35
Fluxograma 3 – Partição realizada com o extrato de <i>Simaba maiana</i> Casar. ....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quadro comparativo de metodologias testadas. ....	37
Tabela 2 – Amostras analisadas na quantificação de AU e AO. ....	38
Tabela 3 – Extratos de <i>Mansoa hirsuta</i> analisadas por CLAE-DAD.....	39
Tabela 4 – Resumo comparativo de modificação de método A na determinação de AU e AO. ....	41
Tabela 5 – Resumo comparativo de modificação de método B na determinação de AU e AO. ....	43
Tabela 6 – Amostras analisadas na quantificação de AU e AO com as massas utilizadas. ....	47
Tabela 7 – Resultados da quantificação de AO e AU por CLAE-DAD. ....	48
Tabela 8 – Subfrações do caule de <i>Simaba maiana</i> testadas frente ao <i>Biomphalaria glabrata</i> . ....	62
Tabela 9 – Resultados das CL <sub>10</sub> , CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> das subfrações de <i>Simaba maiana</i> Casar., utilizando o programa Probit versão 1.5. ....	65
Tabela 10 – Dados de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, HSQC, HMBC, COSY e NOESY. (δ, deslocamento químico, ppm; J, Hz) para SMC2. ....	85
Tabela 11 – Comparação dos dados obtidos por RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C com a literatura para SMC2. ....	86
Tabela 12 – Análises realizadas para otimização de corrida isocrática. ....	99
Tabela 13 – Extração assistida por ultrassom. (Peneira A: 100 mesh e B: 30 mesh) ....	101
Tabela 14 – Avaliação da exatidão. ....	104
Tabela 15 – Análises realizadas em testes para metodologia de análise de ácido tormêntico.....	105
Tabela 16 – Dados obtidos para construção da curva analítica a partir de padrão externo. Os valores são referentes à área sob o gráfico. ....	108
Tabela 17 – Quantificação realizada em extratos obtidos por ultrassom. ....	110
Tabela 18 – Determinação dos limites de detecção e quantificação a partir de parâmetros da curva analítica. ....	115
Tabela 19 – Avaliação da repetibilidade.....	115
Tabela 20 – Avaliação da precisão intermediária.....	115
Tabela 21 – Resultado do teste de recuperação.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\delta$	Deslocamento Químico
$\nu$	Estiramento
$\lambda$	Comprimento de onda
$\delta_{as}$	Deformação assimétrica
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\delta_s$	Deformação simétrica
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
AO	Ácido Oleanólico
ATR	Reflectância Total Atenuada (RTA)
AU	Ácido Ursólico
CCDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência combinada com densitometria
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
$\text{CH}_3\text{COOH}$	Ácido Acético
$\text{CHCl}_3$	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo
CLAE-DELS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de Massas
CLAE-FL	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
CLAE-FL	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por fluorescência
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta
CZE	Eletroforese capilar por zona
dd	Duplo duplete
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalila
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2 difenil-1-picrilhidrazila
DXP	Fosfato de desoxixilulose
EM	Espectrometria de Massas
EtOH	Etanol
FPP	Pirofosfato de farnesila
GC-EM	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranila
GPP	Pirofosfato de geranila
HMBC	Correlação espectroscópica heteronuclear a longa distância, bidimensional (do inglês "Heteronuclear Multiple Bond Correlation")
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HSQC	Correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional (do inglês "Heteronuclear Single Quantum Coherence")
Hz	Hertz
IPP	Pirofosfato de isopentenila
IR	Índice de refração
IV	Infravermelho
$J$	Constante de Acoplamento
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
m	Multiplete

MECC	Cromatografia eletrocínética capilar micelar
MeOH	Metanol
MEP	Fosfato de metileritritol
mg	Miligrama
MVA	Ácido mevalônico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
nm	Nanômetro
NOESY	Espectroscopia de Efeito Overhauser Nuclear (do inglês "Overhauser Nuclear effect spectroscopy")
ppm	Parte por milhão
PTA	Triterpeno pentacíclico
PVDF	Polifluoreto de vinilideno
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta



# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	20
<b>1 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO EM <i>MANSOA HIRSUTA</i> D.C. (BIGNONIACEAE) E <i>ZEYHERIA TUBERCULOSA</i> (VELL.) BUREAU (BIGNONIACEAE) .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Objetivos .....</b>	<b>23</b>
1.1.1 Objetivo Geral .....	23
1.1.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>1.2 Referencial Teórico.....</b>	<b>24</b>
1.2.1 Família Bignoniaceae - Caracterização Botânica .....	24
1.2.2 Biossíntese dos Terpenos.....	25
1.2.3 Ácido Ursólico (AU) E Ácido Oleanólico (AO) .....	33
<b>1.3 Metodologia.....</b>	<b>35</b>
1.3.1 Extratos Vegetais.....	35
1.3.2 Análises Cromatográficas .....	36
1.3.3 Perfil Cromatográfico dos Extratos Vegetais .....	36
1.3.4 Escolha do Método .....	36
1.3.4.1 Método Final .....	37
1.3.5 Curva Analítica.....	37
1.3.6 Amostras.....	38
<b>1.4 Resultados e Discussão.....</b>	<b>39</b>
1.4.1 Perfil Cromatográfico dos Extratos Vegetais .....	39
1.4.2 Escolha do Método .....	41
1.4.3 Curva Analítica.....	45
1.4.4 Quantificação.....	47
<b>1.5 Considerações Finais .....</b>	<b>50</b>
<b>2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA, ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO DO CAULE DE <i>SIMABA MAIANA CASAR</i>. (SIMAROUFACEAE).....</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Objetivos .....</b>	<b>52</b>
2.1.1 Objetivo Geral .....	52
2.1.2 Objetivos Específicos.....	52
<b>2.2 Referencial Teórico.....</b>	<b>53</b>
2.2.1 Família Simaroubaceae – Caracterização Botânica .....	53
2.2.2 Biossíntese de Cumarinas .....	54
2.2.3 Esquistossomose.....	58
<b>2.3 Metodologia.....</b>	<b>60</b>

2.3.1	Preparação do Extrato Vegetal .....	60
2.3.2	Atividade Moluscicida.....	61
2.3.3	Preparo para Análises Cromatográficas.....	62
2.3.4	Perfil Cromatográfico das Subfrações .....	62
2.3.5	Isolamento em CLAE Semi-Preparativo .....	63
2.3.6	Verificação de Pureza das Amostras Obtidas .....	63
2.3.7	Elucidação Estrutural .....	64
<b>2.4</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>65</b>
2.4.1	Atividade Moluscicida.....	65
2.4.2	Análises Cromatográficas .....	66
2.4.2.1	Perfil cromatográfico .....	66
2.4.2.2	Isolamento em coluna semi-preparativa .....	70
2.4.2.3	Substâncias isoladas .....	71
2.4.3	Elucidação Estrutural .....	71
2.4.3.1	Espectroscopia na região do Ultravioleta (UV) .....	72
2.4.3.2	Espectroscopia da região do Infravermelho (IV).....	73
2.4.3.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	74
2.4.3.4	Raio X.....	86
<b>2.5</b>	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>88</b>
<b>3</b>	<b>DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO TORMÊNTICO EM EXTRATOS DE <i>CECROPIA PACHYSTACHYA</i> TRÉCUL. (URTICACEAE) .....</b>	<b>89</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>90</b>
3.1.1	Objetivo Geral .....	90
3.1.2	Objetivo Específico .....	90
<b>3.2</b>	<b>Referencial Teórico.....</b>	<b>91</b>
3.2.1	O Gênero <i>Cecropia</i> .....	91
3.2.2	A Espécie <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul. ....	94
3.2.3	Ácido Tormêntico .....	95
3.2.4	Extração.....	97
<b>3.3</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>99</b>
3.3.1	Desenvolvimento do Método por CLAE .....	99
3.3.2	Obtenção de Curva Analítica .....	99
3.3.3	Extração do Ácido Tormêntico .....	100
3.3.4	Validação .....	102
3.3.4.1	Especificidade e Seletividade .....	102
3.3.4.2	Linearidade .....	102
3.3.4.3	Limites de detecção e quantificação (LD e LQ) .....	102
3.3.4.4	Precisão .....	103

3.3.4.5 Exatidão .....	104
<b>3.4 Resultados e Discussão</b> .....	<b>105</b>
3.4.1 Desenvolvimento do Método por CLAE .....	105
3.4.2 Curva Analítica.....	107
3.4.3 Extração.....	108
3.4.3.1 Otimização da Extração de Ácido Tormêntico .....	111
3.4.4 Validação .....	112
3.4.4.1 Especificidade e seletividade.....	112
3.4.4.2 Linearidade .....	114
3.4.4.3 Limites de detecção e quantificação (LD e LQ) .....	114
3.4.4.4 Precisão .....	115
3.4.4.5 Exatidão .....	116
<b>3.5 Considerações Finais</b> .....	<b>117</b>
PERSPECTIVAS .....	118
REFERÊNCIAS .....	119

## INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo. Sendo assim, é comum o uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades, já que esses vegetais são fonte de compostos bioativos, os quais servem de modelo para produção de fármacos (GUERRA; NODARI, 2007).

Os vegetais são considerados matrizes complexas que contem uma enorme quantidade de metabólitos secundários. O conhecimento a respeito desses compostos expandiu-se com o avanço da tecnologia e a cromatografia é a principal técnica empregada no isolamento desses compostos.

A técnica de cromatografia baseia-se na separação de analitos, os quais podem interagir de forma diferente com a fase estacionária ou e a fase móvel, sendo que, esse processo ocorre através de um equilíbrio dinâmico (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) desenvolveu-se a partir de teorias aplicadas à cromatografia gasosa, entretanto ganhou espaço devido à vasta empregabilidade da técnica. Além disso, a amostra a ser analisada deve apenas ser solúvel na fase móvel, não necessitando ser volatilizada, como na cromatografia gasosa. A CLAE emprega coluna empacotada, ou seja, preenchida com micropartículas, as quais são responsáveis pela melhor separação quando comparada à cromatografia líquida clássica. (CASS; DEGANI, 2011).

Para o presente trabalho foram utilizadas quatro espécies vegetais, que apresentaram atividades promissoras. O estudo baseou-se na exploração da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com a qual realizou-se identificação por comparação com padrão, isolamento, purificação e quantificação de compostos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006), além controle de pureza de compostos isolados (FERNANDES et al., 2009).

Sendo assim, o trabalho está descrito em três capítulos. Em cada um deles trabalhou-se com diferentes plantas para explorar a técnica CLAE de forma diversificada.

No primeiro capítulo descreve-se a identificação (por comparação) e quantificação dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico em extratos de *Mansoa hirsuta* e *Zeyheria tuberculosa*, ambas da família Bignoniaceae. Essas plantas foram selecionadas pois, fazem parte do projeto do Milênio do Semiárido. A fração em

acetato de etila das folhas de *M. hirsuta* apresentou-se ativa quanto à inibição da linfoproliferação e reduziu a produção de óxido nítrico (SILVA, 2010). A partição clorofórmica das folhas de *Z. tuberculosa* apresentou-se ativa apenas quanto à inibição da linfoproliferação (SANTOS, 2009). Nas duas plantas foram isolados os ácidos ursólico e oleanólico. Para Silva (2010) e Santos (2009) os triterpenos pentacíclicos são os responsáveis pelas atividades.

No segundo capítulo, foi descrito a utilização de teste moluscicida para, através de CLAE em coluna semi-preparativa, descrever o isolamento bioguiado de compostos ativos do caule de *Simaba maiana* Casar. (Simaroubaceae), frente ao molusco *Biomphalaria glabrata*. Em estudos anteriores, as primeiras frações obtidas apresentaram boa atividade moluscicida, entanto a atividade não foi avaliada nas subfrações seguintes até obtenção do composto isolado. A elucidação estrutural ocorreu através do uso de técnicas espectroscópicas de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e raio X.

O ácido tormêntico, que é responsável pela atividade antimalárica na espécie *Cecropia pachystachya* Trécul. (Urticaceae), foi isolado em estudos anteriores por cromatografia em coluna aberta. No capítulo três, descreve-se o estudo para otimização na extração, por ultrassom, do triterpeno. As amostras extraídas foram quantificadas por CLAE e o método adotado validado, avaliando parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

---

**1 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS URSÓLICO E OLEANÓLICO EM *MANSOA HIRSUTA* D.C. (BIGNONIACEAE) E *ZEYHERIA TUBERCULOSA* (VELL.) BUREAU (BIGNONIACEAE)**

---

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo Geral

Quantificar os ácidos ursólico e oleanólico em extratos vegetais por CLAE.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Verificar a presença dos triterpenos ácidos ursólico (AU) e oleanólico (AO), através de perfil cromatográfico nos extratos das folhas de *Mansoa hirsuta*.

Avaliar metodologias, descritas em literatura, na determinação de AU e AO por CLAE-UV em espécies vegetais e propor modificações nesses métodos.

Quantificar os ácidos ursólico e oleanólico em extratos de *Mansoa hirsuta* e de *Zeyheria tuberculosa* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

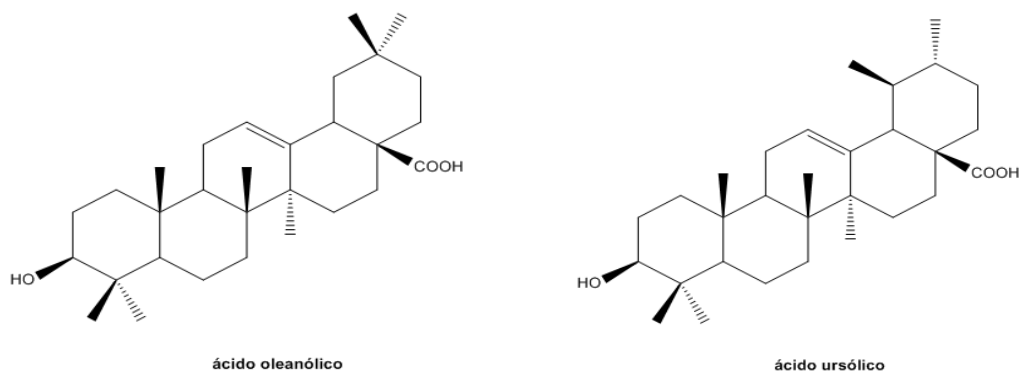
## 1.2 Referencial Teórico

### 1.2.1 Família Bignoniaceae - Caracterização Botânica

A família Bignoniaceae compreende mais de 100 gêneros e 800 espécies distribuídas nas regiões tropicais, sendo mais encontrada no continente americano (MACHADO; GREGÓRIO; GUIMARÃES, 2006). Entre essas espécies estão plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras. No Brasil, plantas dessa família ocorrem no Cerrado, Mata Atlântica e região Amazônica (PAULETTI; BOLZANI; YOUNG, 2003). Conhecida por família videira trompete, muitas espécies são ornamentais, utilizadas na construção civil, carpintaria ou construção de instrumentos musicais (CHOUDHURY et al., 2011). Os jacarandás, ipês amarelo e roxo são as plantas mais conhecidas da família (PAULETTI; BOLZANI; YOUNG, 2003).

Muitas plantas da família Bignoniaceae são utilizadas na medicina popular brasileira contra a febre, reumatismo, diarreia, câncer, e infecções microbianas (PIO CORRÊA; PENNA, 1969 apud ROCHA et al., 2004). Desta família foram isolados naftoquinonas, lignanas, triterpenos e flavonoides (ROCHA et al., 2004). Dentre os estudos realizados com espécies da família Bignoniaceae foi isolado o ácido ursólico nas folhas de *Arrabidaea samydoides* (PAULETTI; BOLZANI; YOUNG, 2003), em *Jacaranda decurrens* Cham., (CARVALHO et al., 2006), *Newbouldia laevis*, *Markhamia acuminata* e *Spathodea campanulata* (GORMANN; SCHREIBER; KOLODZIEJ, 2003). Além do ácido ursólico, foi encontrado outro triterpeno, o ácido oleanólico (SANTOS, 2009; SILVA, 2010) (Figura 1).

**Figura 1 – Estruturas químicas dos ácidos oleanólico e ursólico.**





Encontrada na Mata Atlântica brasileira, a *Mansoa hirsuta* D.C., apresenta atividade antifúngica, anti-hipertensiva e diurética. Alguns autores atribuem o nome popular de Cipó d'alho à espécie (LEMOS, 2004; SILVA, 2010; ZOGHBI et al., 2009). Segundo Silva (2010), a fração acetato de etila das folhas inibiu a produção de óxido nítrico (57,92 %) e a linfoproliferação (99,92 %). Foram isolados da planta os triterpenos ácidos ursólico e oleanólico, os esteroides estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e lupeol. Estudos indicaram ainda que o extrato etanólico das folhas de *Mansoa hirsuta* apresentou inibição da enzima conversora de angiotensina (54% de inibição a 0,33 mg/mL), que tem princípio terapêutico para o tratamento da hipertensão (BRAGA et al., 2000).

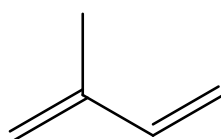
Muito utilizada na construção civil, em atividades agropecuárias e em paisagismos a espécie *Zeyheria tuberculosa*, também é conhecida como Ipê felpudo, bolsa-de-pastor, camarucu, bucho-de-boi, ipê bóia, ipê cabeludo, ipê cumbuca, ipê preto, ipê tabaco, ipê una, velame-do-mato, saco-de-carneiro (INOUE; SARZI, 2008; LUZ; FERREIRA, 1985). Encontrada no Brasil em área de Mata Atlântica de São Paulo a Pernambuco (SANTOS, 2009), apresentou bons resultados no tratamento de câncer, doenças de pele e atividade antifúngica (BASTOS et al., 2009).

### 1.2.2 Biossíntese dos Terpenos

Carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos são considerados metabólitos primários por serem essenciais a vida, os metabólitos secundários, por outro lado, não são necessariamente essenciais, porém, atuam de forma a garantir vantagens na sobrevivência (SANTOS, 2007). Para Gottlieb (apud SANTOS, 2007, p. 404), “os metabólitos primários são os fornecedores de matéria-prima e de energia para a formação dos metabólitos secundários”, entretanto, fatores genéticos, ecológicos e fisiológicos interferem na produção desses metabólitos em espécies vegetais.

A maior parte dos metabólitos secundários, inclusive os terpenos, é formada por uma unidade base, o isopreno (Figura 2). Os terpenoides resultam da modificação do terpeno através de rearranjo de grupos metila ou adição de oxigênio (ZWENGER; BASU, 2008), ocorrendo em quase todos os alimentos naturais e são caracterizados pela natureza lipofílica de suas estruturas (WAGNER; ELMADFA, 2003).

**Figura 2 – Unidade básica dos terpenos.**

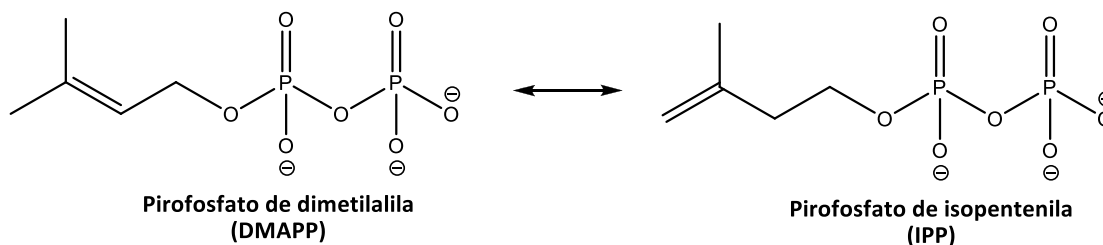


**isopreno**

Fonte: Autor, 2013.

Uma das maneiras de classificar os terpenos é de acordo com o número de unidades de isoprenos em que a molécula pode ser hipoteticamente dividida. Os monoterpenos (C<sub>10</sub>) são formados por duas unidades isoprênicas, os sesquiterpenos (C<sub>15</sub>) por três unidades isoprênicas, os diterpenos (C<sub>20</sub>) quatro unidades, triterpenos (C<sub>30</sub>) seis unidades e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) formados por oito unidades isoprênicas (ZWENGER; BASU, 2008; DAVIS; CROTEAU, 2000). Sabe-se que as unidades isoprênicas biologicamente ativas são na verdade os isômeros interconvertíveis pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e o pirofosfato de isopentenila (IPP) (Figura 3) (HUMPHREY; BEALE, 2006; DEWICK, 2009).

**Figura 3 – Unidades de isoprenos biologicamente ativas.**



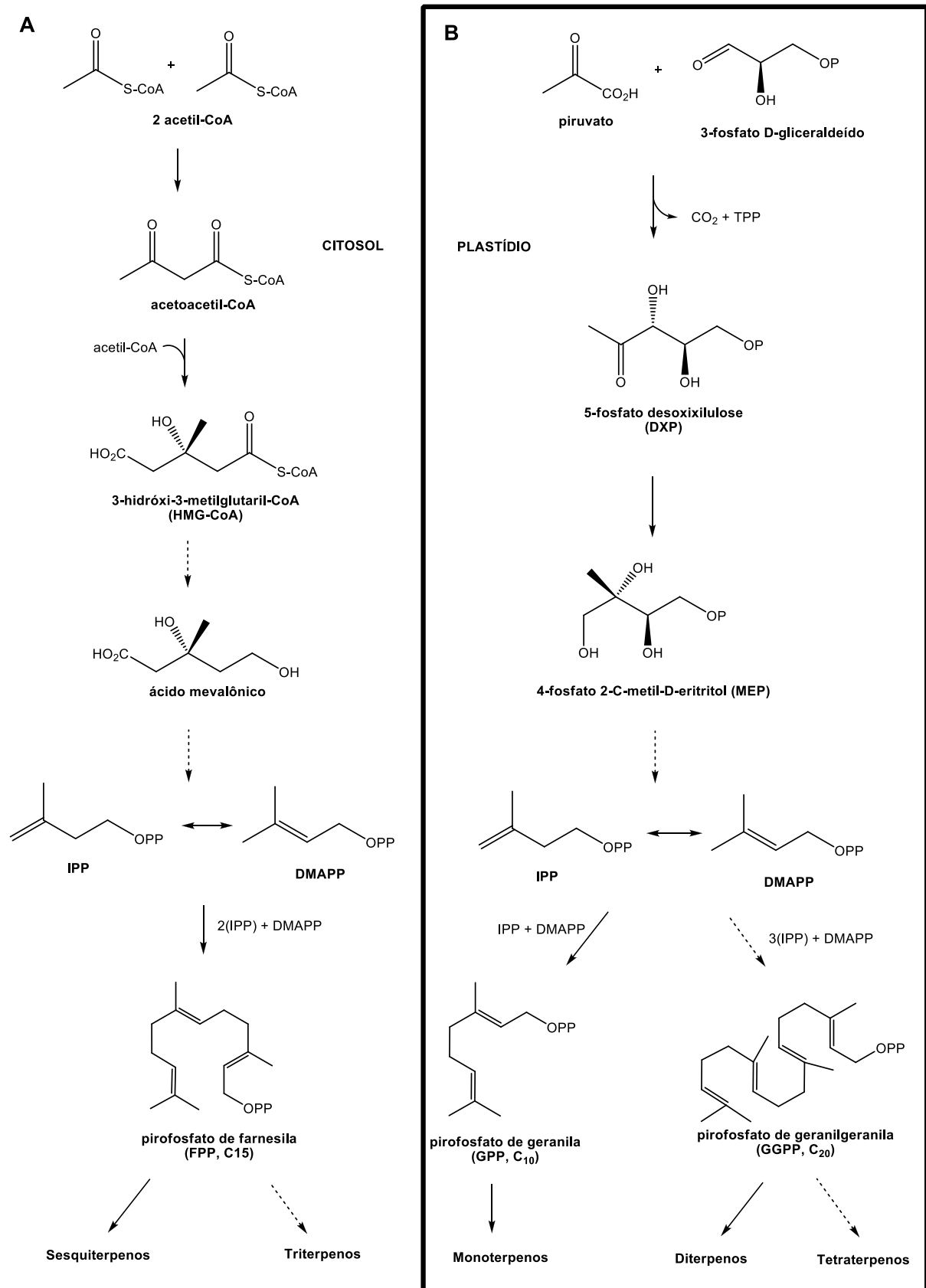
Fonte: HUMPHREY; BEALE, 2006.

Por muito tempo acreditou-se que a única via de produção desses precursores dos terpenos fosse a via acetato-mevalonato (via do ácido mevalônico – MVA), entretanto, descobriu-se que ocorre formação desses compostos também pelo 4-fosfato 2-C-metil-D-eritritol (fosfato de metileritritol – MEP), conforme ilustrado na Figura 4 (p. 26) (DEWICK, 2009; DAVIS; CROTEAU, 2000). A nomenclatura “via MEP” é preferida, evitando confusões com outras rotas biossintéticas, entretanto, pode ser chamada também de via mevalonato independente ou via fosfato de desoxixilulose (DEWICK, 2009).

Na via MVA (Figura 4A) três moléculas de acetil-coenzima A são utilizadas, duas delas geram o acetoacetil-CoA, por condensação de Claisen, e a outra é incorporada formando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que é reduzido por NADPH, formando o ácido mevalônico, que após pirofosforilação, descarboxilação e desidratação gera o pirofosfato de isopentenila (IPP). A partir dessa via, que ocorre no citosol, são formados os sesquiterpenos e os triterpenos (AEDO, 2007; DEWICK, 2009; JAKIEMI, 2008).

Os monoterpênicos, diterpenos e tetraterpenos são formados na via MEP, que ocorre nos plastídios (Figura 4B) (DAVIS; CROTEAU, 2000). Através da condensação do 3-fosfato gliceraldeído e do piruvato forma-se o fosfato de desoxixilulose (DXP), o passo seguinte é a redução e formação do 4-fosfato 2-C-metil-D-eritritol (MEP), gerando, em seguida, o pirofosfato de isopentenila (IPP) (HUMPHREY; BEALE, 2006).

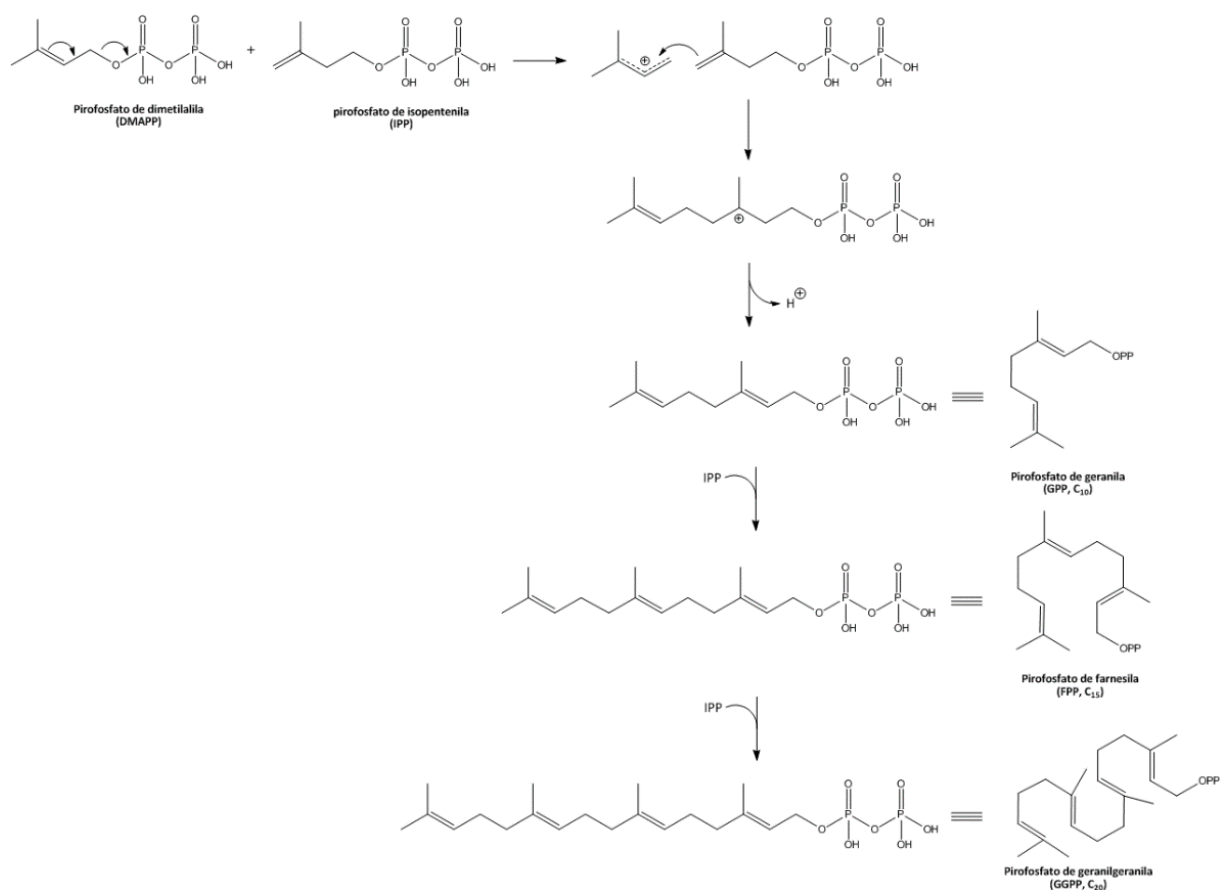
Figura 4 – Biossíntese dos terpenos. A – via MVA; B – via MEP.



Fonte: DAVIS; CROTEAU, 2000.

Após a eliminação da porção pirofosfato de DMAPP há a formação do cátion, que é atacado pela dupla ligação do IPP, ocorrendo a formação do pirofosfato de geranila (GPP) (Figura 5), de onde surgem os monoterpênicos, uma molécula com 10 átomos de carbono. Após nova inserção de uma molécula de IPP forma-se o pirofosfato de farnesila (FPP), responsável pela geração dos sesquiterpênicos. Na sequência temos um composto de 20 carbonos, o pirofosfato de geranilgeranila (GGPP), da qual formam-se os diterpênicos. Já os triterpênicos e tetraterpênicos são formados após dimerização de FPP e GGPP, respectivamente (JAKIEMIU, 2008; HUMPHREY; BEALE, 2006). As preniltransferases são as enzimas responsáveis pela condensação “cabeça-cauda” de IPP com DMAPP, GPP e FPP na formação dos terpenos (DAVIS; CROTEAU, 2000).

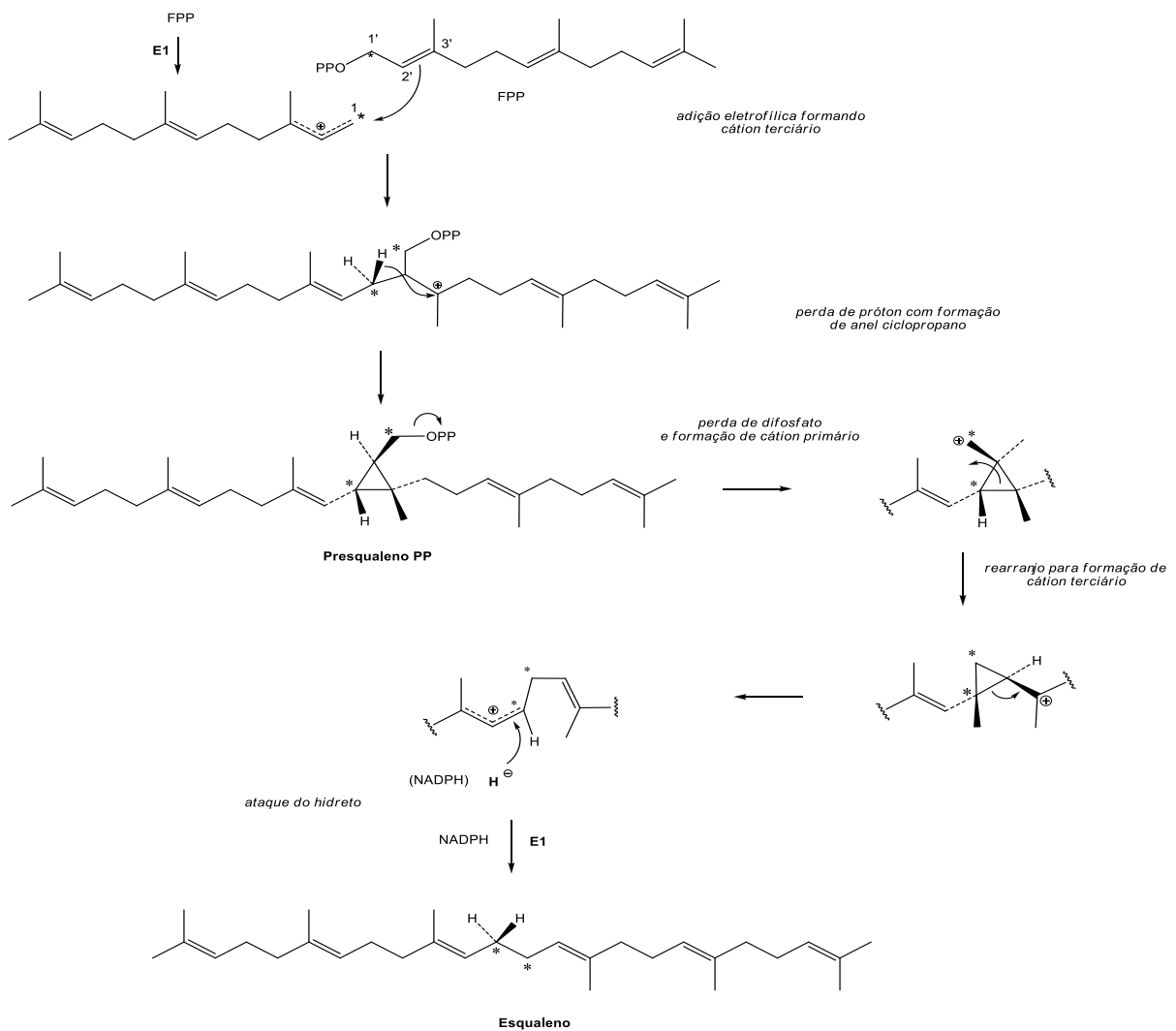
**Figura 5 – Formação dos terpenos.**



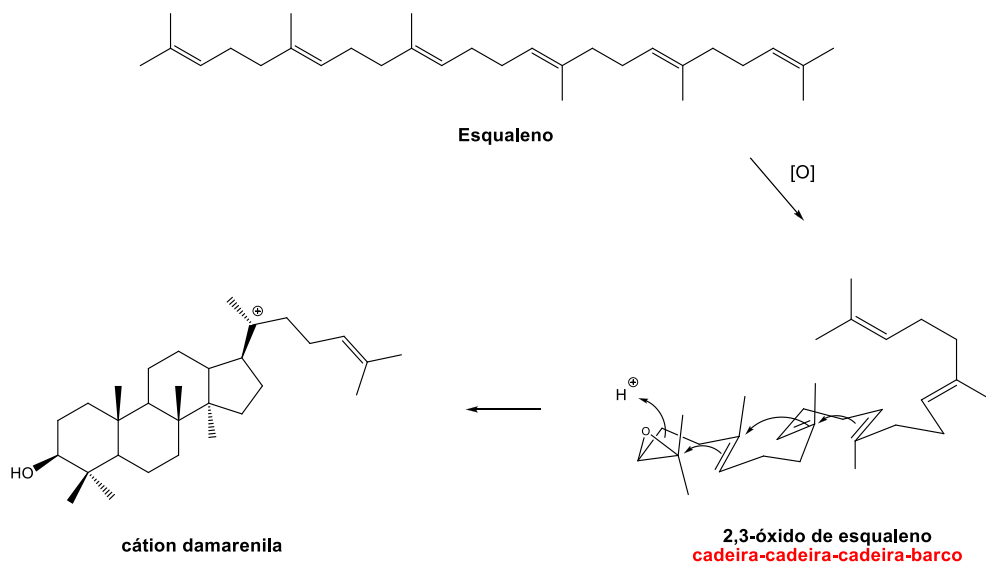
Fonte: DAVIS; CROTEAU, 2000.

O esqualeno é formado pela condensação “cauda-cauda” de duas moléculas de FPP e é a partir dele que os triterpenos são obtidos no citosol (Figura 6) (DINIZ, 2006; HUMPHREY; BEALE, 2006). Para a formação desses a ciclização da molécula acontece via 2,3-óxido de esqualeno, que é produzido após oxidação do esqualeno catalisada por esqualeno epoxidase. Quando o óxido de esqualeno adquire a conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco forma-se o cátion damarenila (Figura 7) (DEWICK, 2009), que dá origem aos diferentes triterpenos pentacíclicos, cujo mecanismo envolve a formação de carbocátions intermediários (GUINDA et al., 2010).

**Figura 6 – Formação do esqualeno.**



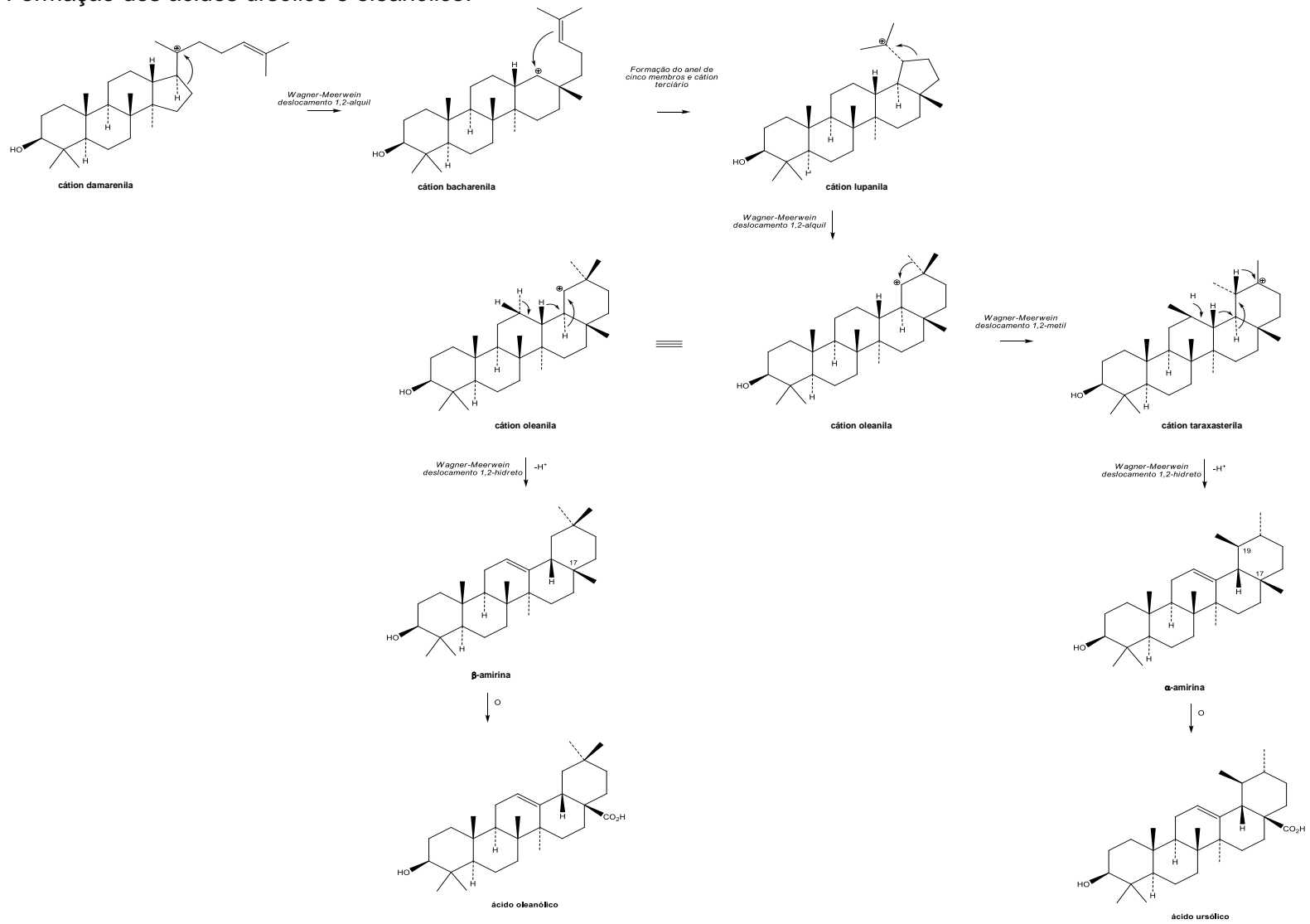
**Figura 7 –** Ciclização do esqualeno.



Fonte: HUMPHREY; BEALE, 2006.

Após rearranjos forma-se o cátion bacharenila, seguido da formação do anel de cinco membros (cátion lupanila), uma expansão do anel (cátion oleanila), de onde são formados a  $\alpha$ -amirina e a  $\beta$ -amirina. Os derivados correspondentes são o ácido ursólico e ácido oleanólico, os quais tem o grupo metila de C-17 oxidado a um ácido carboxílico (Figura 8) (DEWICK, 2009).

**Figura 8 – Formação dos ácidos ursólico e oleanólico.**



Fonte: DEWICK, 2009.



### 1.2.3 Ácido Ursólico (AU) E Ácido Oleanólico (AO)

Os ácidos ursólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-urs-12-en-28-oico) e oleanólico (ácido 3 $\beta$ -hidroxi-olea-12-en-28-oico) são encontrados em abundância nos alimentos e plantas medicinais (CALIGIANI et al., 2013; KONTOGIANNI et al., 2009). Esses triterpenos pentacíclicos (PTA) são os mais estudados e normalmente encontrados juntos na mesma planta (XU; SU; ZANG, 2012). No uso de tratamentos clínicos, normalmente é utilizada uma mistura desses compostos bioativos, obtendo-se melhor efeito (LIU, 2005).

A espécie *Swertia mileensis* teve seu primeiro estudo registrado em 1975, devido ao seu uso no tratamento de inflamações do fígado. Dessa planta, foi isolado o ácido oleanólico, e posteriormente comprovada sua atividade. O ácido ursólico foi também obtido de *Sambucus chinensis* Lindl., *Solanum incanum* L., *Tripterospermum taiwanense*, apresentando também efeito hepatoprotetor (LIU, 1995).

Os triterpenos pentacíclicos, que são isômeros de posição continuam sendo bastante estudados. São similares não só na estrutura química como também nos efeitos farmacológicos. Dentre as atividades são relatadas anti-inflamatória (BARICEVIC et al., 2001; SCHWAIGER et al., 2011) e nefroprotetora (PAI et al., 2012) atribuídas ao ácido ursólico. Atividade anti-HIV verificada para o ácido oleanólico (KASHIWADA et al., 1998). Estudos relataram os dois compostos como sendo responsáveis pelas atividades antioxidante (BAI et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; WANG et al., 2010), antimicrobiana (GBARGUIDI et al., 2005), tripanocida (ABE et al., 2002), anti-hipertensiva e antidisrítimica (SOMOVA; SHODE; MIPANO, 2004), inibição da produção de óxido nítrico (YANG et al., 2007) e a proliferação de células cancerígenas, além de induzir a apoptose (CHAKRAVARTI et al., 2012; HARMAND et al., 2005; WANG et al., 2011). Em adição, apresentaram atividade antiglicante e supressão na formação de carboximetilisina (YIN; CHAN, 2007) além de estudos ressaltarem a baixa toxicidade desses triterpenos (LIU et al., 1995).

Apesar das inúmeras atividades atribuídas, os ácidos ursólico e oleanólico apresentam baixa biodisponibilidade devido à pouca solubilidade em água. Chen et al. (2011) estudaram então a formulação de nanopartículas para uso clínico.

Dentre os métodos de análises para os ácidos ursólico e oleanólico descritos na literatura os mais comuns são os cromatográficos como CLAE-UV (CARVALHO et

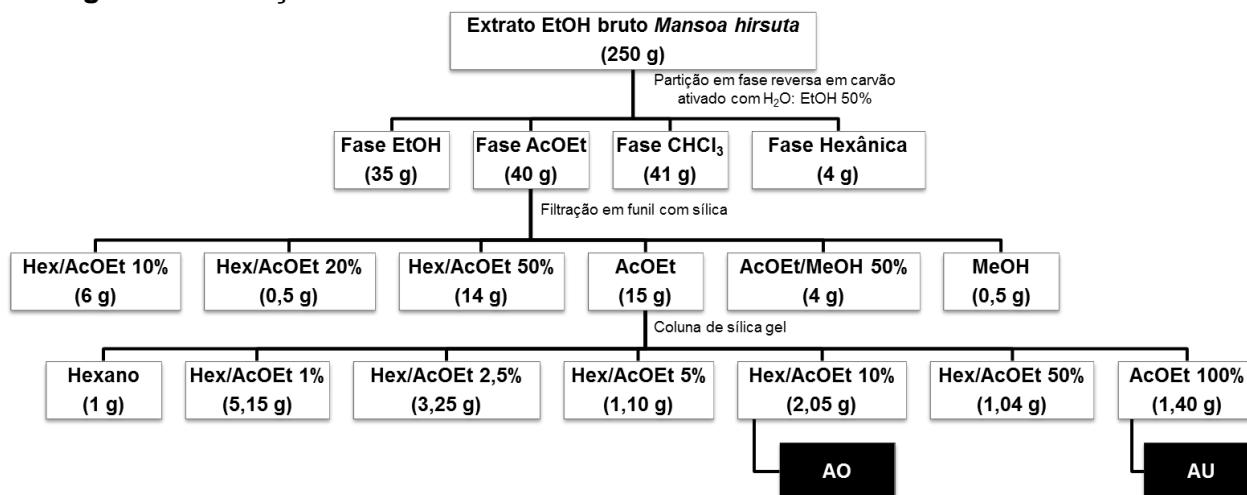
al., 2009; GBARGUIDI et al., 2005), CLAE-EM (BARICEVIC et al., 2009), CLAE-DELS-EM (GUO et al., 2010), CLAE-FL (LI et al., 2011), CG-DIC (GUINDA et al., 2010; JANICSÁK et al., 2006) CG-EM (CALIGIANI et al., 2013;), Cromatografia de contracorrente em alta velocidade (FRIGHETTO et al., 2008), cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC) (LIU et al., 2003), cromatografia em camada delgada de alta eficiência combinada com densitometria (CCDAE) (WÓJCIAK-KOSIOR, 2007), são também citados a eletroforese capilar por zona (CZE) (YANG et al., 2007), Ressonância magnética nuclear uni e bidimensional - RMN (KONTOGIANNI et al., 2009; SANTOS, 2009) e RAMAN (YU et al., 2007). Ácido ursólico (AU) e ácido oleanólico (AO) apresentam baixa absorção na região do UV e similaridade nas estruturas, por isso sua determinação simultânea torna-se complicada e procedimentos com derivatização têm sido utilizados.

## 1.3 Metodologia

### 1.3.1 Extratos Vegetais

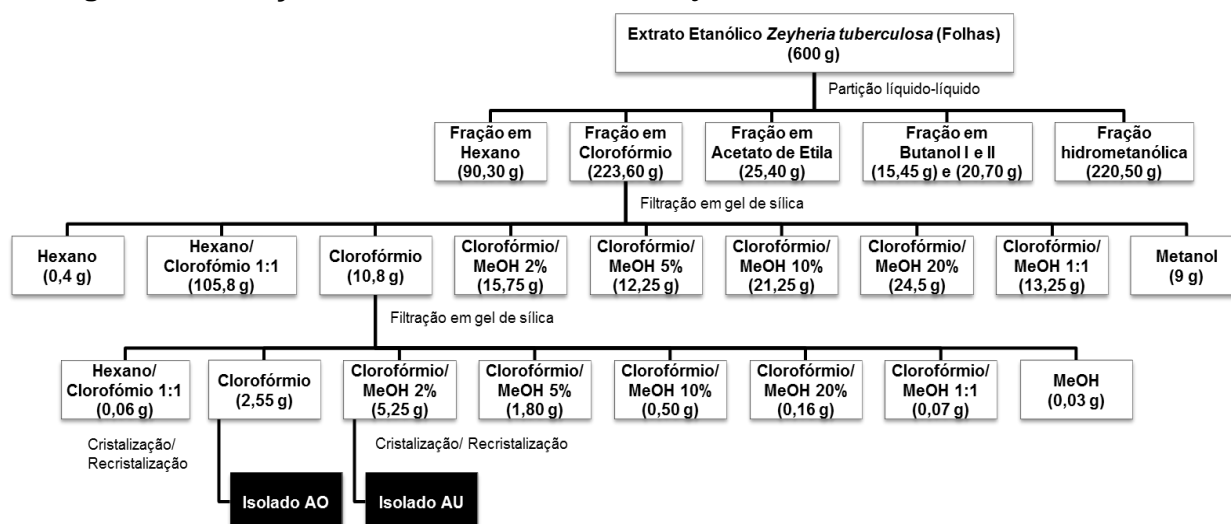
Os extratos etanólicos e partições de *Mansoa hirsuta* analisados foram obtidos do fracionamento realizado por Daniel de Melo Silva (SILVA, 2010). Quanto aos extratos e partições de *Zeyheria tuberculosa*, foram obtidos por Maria Amélia Lima dos Santos (SANTOS, 2009). Ambos realizados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – LPqRN. Abaixo estão os fluxogramas do fracionamento realizado em cada espécie.

**Fluxograma 1 – Frações obtidas das folhas de *Mansoa hirsuta*.**



Fonte: Adaptado de Silva, 2010.

**Fluxograma 2 – Frações obtidas das folhas de *Zeyheria tuberculosa*.**



Fonte: Adaptado de Santos, 2009.

Para a obtenção da subfração hexânica do caule de *Zeyheria tuberculosa*, apenas uma partição líquido-líquido com hexano foi realizada a partir do extrato bruto etanólico.

### 1.3.2 Análises Cromatográficas

Foi utilizado cromatógrafo líquido Shimadzu (Japão) equipado com bomba LC-10ADvp, controladora SCL-10Avp, degaseificador DGU-14A e detector UV SPD-M20A. Injetor manual Rheodyne 7725(i) acoplado a um alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ .

### 1.3.3 Perfil Cromatográfico dos Extratos Vegetais

As amostras de *Mansoa hirsuta* foram analisadas em gradiente, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A eluição iniciou-se em 5% MeOH, aumentando gradativamente a concentração de solvente orgânico até atingir 100% MeOH, num tempo de 60 minutos. A concentração de 100% MeOH foi mantida por mais 10 minutos, resultando num tempo total de análise de 70 minutos, com taxa de mudança de 1,58%.  $\text{min}^{-1}$ . O fluxo usado foi 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Essas análises, entretanto, foram realizadas apenas com o material das folhas de *Mansoa hirsuta*, após filtração em membrana MILLIPORE Millex – HV 0,45  $\mu\text{m}$ , PVDF (Polifluoreto de vinilideno).

### 1.3.4 Escolha do Método

Dentre os métodos descritos em literatura, foram testados os sugeridos por Xia et al. (2012) e Xu, Su e Zang (2012), para quantificação simultânea de triterpenos. O resumo encontra-se na Tabela 1.

As análises foram realizadas em coluna Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ). As injeções foram realizadas com microseringa HAMILTON (50  $\mu\text{L}$ ) após filtração das amostras. Para as análises cromatográficas foram utilizados água ultrapura obtida em equipamento MILLIPORE Simplicity UV, ácido acético Dinâmica P.A., metanol (VETEC ou J.T.Baker) e acetonitrila (VETEC) grau HPLC. Os últimos filtrados em sistema SUPELCO com membrana de nylon 0,45  $\mu\text{m}$  x 47 mm.

**Tabela 1 – Quadro comparativo de metodologias testadas.**

	<b>MÉTODO A</b> <b>Xia et al. (2012)</b>	<b>MÉTODO B</b> <b>Xu, Su e Zang (2012)</b>
<b>Coluna</b>	Zorbax Extend C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)	Alltech Apollo C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)
<b>Fase móvel</b>	ACN – 0,5% CH <sub>3</sub> COOH em água (90:10)	MeOH – Água (95:5)
<b>Fluxo</b>	0,8 mL.min <sup>-1</sup>	0,4 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Temperatura forno</b>	27 °C	20 °C
<b>Comprimento de onda (<math>\lambda</math>)</b>	210 nm	215 nm

Fonte: Autor, 2013.

O primeiro método testado (método A) utiliza acetonitrila e 0,5% de uma solução ácido acético em água (90:10) como fase móvel. Verificou-se então a viabilidade do uso do ácido, já que tanto para uso de ácido como tampão é necessária maior cautela com a coluna cromatográfica. Antes do uso de fase com ácido a coluna foi lavada com água ultrapura, o mesmo aconteceu ao término da análise. Em seguida, o solvente orgânico foi selecionado para limpeza, evitando assim deposição de sais na coluna o que diminui seu tempo de uso. O segundo método utiliza metanol e água numa proporção de 95:5, como fase móvel, sem alteração de pH.

#### 1.3.4.1 Método Final

Para as análises cromatográficas foi utilizada coluna Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m), como fase móvel MeOH grau HPLC (A) e água Milli-Q (B) a uma proporção de 95:5 (v/v) a um fluxo de 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura do forno foi ajustada para 20°C. Os sinais foram observados a um comprimento de onda de 215 nm. Os tempos de retenção registrados foram 29,6 minutos para o ácido oleanólico e 32,1 minutos para o ácido ursólico.

#### 1.3.5 Curva Analítica

Os padrões de ácido ursólico (AU) e ácido oleanólico (AO), foram devidamente pesados em balança analítica e preparada solução estoque a 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, novas soluções de 25, 50, 100 e 200  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (soluções de trabalho) foram preparadas a

partir da primeira e então analisadas por CLAE-DAD em triplicata, conforme metodologia escolhida, obtendo-se curva analítica para cada composto.

### 1.3.6 Amostras

Os extratos vegetais descritos na Tabela 2 foram pesados, solubilizados em metanol, filtrados em filtro de seringa MILLIPORE Millex com membrana HV 0,45 µm, PVDF (Polifluoreto de vinilideno) acoplada a seringa de 10 mL HAMILTON, transferidos para balões volumétricos de 10 mL, completando-se o volume e em seguida analisados em CLAE-DAD.

Os valores considerados para efeitos de cálculo foram os valores das concentrações das soluções de cada amostra.

**Tabela 2 – Amostras analisadas na quantificação de AU e AO.**

<b>AMOSTRAS</b>	<b>PARTE DA PLANTA</b>	<b>CÓDIGO</b>
Partição hexânica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPH
Partição clorofórmica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPC
Partição acetato de etila <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPA
Partição butanólica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPB
Partição hidrometanólica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPM
Extrato bruto <i>Z. tuberculosa</i>	caule	ZEBC
Partição hexânica <i>Z. tuberculosa</i>	caule	ZPHC
Extrato bruto <i>M. hirsuta</i>	folha	MHEB
Partição hexânica <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPH
Partição clorofórmica <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPC
Partição acetato de etila <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPA
Partição hidrometanólica <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPM

Fonte: Autor, 2013.

## 1.4 Resultados e Discussão

### 1.4.1 Perfil Cromatográfico dos Extratos Vegetais

As quatorze amostras das folhas de *M. hirsuta* foram analisadas visando obter o perfil cromatográfico e com esse, características dos compostos presentes. Dessa forma realizou-se uma pré-seleção e ainda avaliação da presença de interferentes e dos triterpenos, conforme Tabela 3.

**Tabela 3 – Extratos de *Mansoa hirsuta* analisadas por CLAE-DAD.**

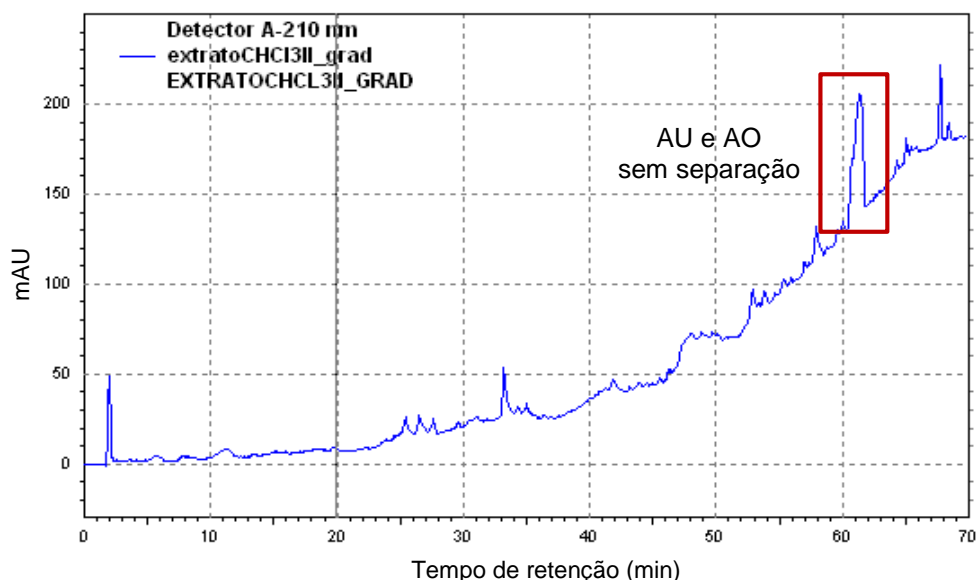
Nº	Fração	Presença de AU/AO
01	Extrato aquoso partição	-
02	Extrato AcOet	-
03	Extrato AcOet e filtração AcOet	-
04	Extrato MeOH filtração AcOet	-
05	Extrato AcOet II	-
06	Extrato CHCl <sub>3</sub> I	✓
07	Extrato CHCl <sub>3</sub> II	✓
08	Filtração fração AcOet	✓
09	Extrato bruto alcóolico	✓
10	Extrato EtOH folhas	✓
11	Filtração da parte AcOet_AcOetMeOH	✓
12	M.hirsuta (folha) extrato AcOet	-
13	Partição L.L. H <sub>2</sub> O	-
14	M.hirsuta AcOet	-

Fonte: Autor, 2013.

✓ presença; - ausência

Após injeção dos padrões, nas mesmas condições, foi possível identificá-los num tempo de retenção aproximado de 61 minutos, não havendo distinção dos picos de AU e AO. A análise mostrou ainda, a característica mais apolar dos padrões, o que condiz com os dados apresentados na literatura para os métodos de quantificação desses compostos. Os ácidos ursólico e oleanólico mostraram-se presentes nos extratos bruto, clorofórmicos (Figura 9) e filtrações da fração acetato de etila, conforme Tabela 3.

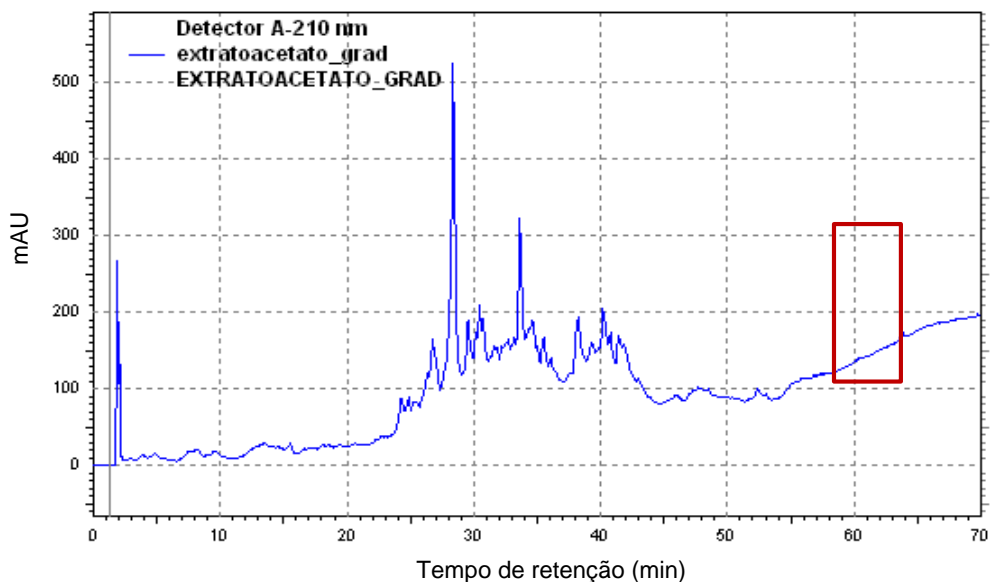
**Figura 9 – Cromatograma obtido para o extrato clorofórmio de *Mansoa hirsuta* indicando a presença dos ácidos em estudo, porém sem distinção dos picos.**



Fonte: Autor, 2013.

Na Figura 10 encontra-se representado o cromatograma obtido para o extrato acetato, que não possui os triterpenos em estudo.

**Figura 10 – Cromatograma obtido para o extrato acetato de etila da *Mansoa hirsuta* indicando a ausência dos ácidos em estudo.**



Fonte: Autor, 2013.



#### 1.4.2 Escolha do Método

Dentre os métodos observados na literatura para quantificação dos triterpenos por CLAE, observou-se uso de fases móveis bastante diferenciadas, com uso de acetonitrila e tampão fosfato (KONTOGIANNI et al., 2009), ácidos fosfórico (WANG; WANG; GUO, 2008) e acético (XIA et al., 2012; CARVALHO et al., 2009). Entretanto, pouca diferença quanto ao perfil dos cromatogramas pôde ser observada. No geral, a diferença média do tempo de retenção dos padrões foi de apenas 1 minuto, e verificada pouca distinção entre as bases dos picos referentes a estes. O estudo baseou-se não só na quantificação dos compostos como também na modificação do método, com o intuito de maior separação dos padrões e assim, melhor quantificação.

As metodologias foram escolhidas não apenas pela simplicidade da fase móvel, mas também pelas discussões propostas pelos autores destas. Apenas duas metodologias foram selecionadas, testadas e ligeiramente modificadas.

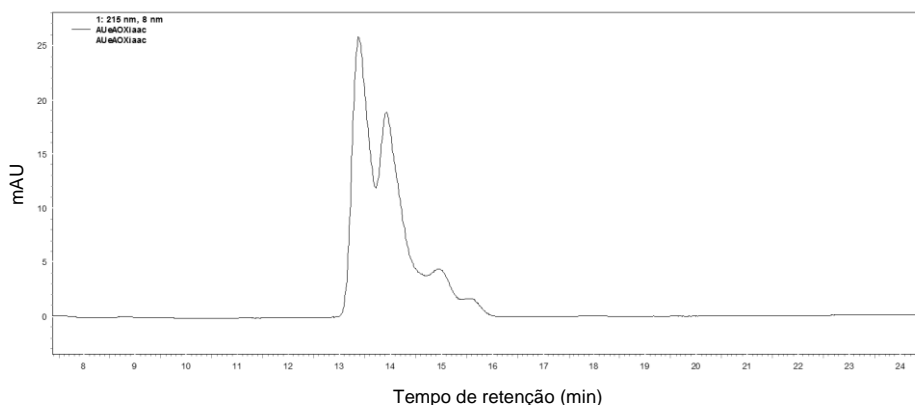
A Tabela 4 ilustra as condições e modificações realizadas no método A. O uso do ácido acético foi avaliado quanto à separação dos picos. O método modificado foi realizado ainda sem a presença do ácido na fase móvel.

**Tabela 4 – Resumo comparativo de modificação de método A na determinação de AU e AO.**

	<b>MÉTODO A</b> Xia et al. (2012)	<b>Reprodução</b> <b>Método A</b>		<b>Modificação</b> <b>Método A</b>
<b>Coluna</b>	Zorbax Extend C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)	Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)		Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)
<b>Fase móvel</b>	ACN – 0,5% CH <sub>3</sub> COOH em água (90:10)	ACN – 0,5% CH <sub>3</sub> COOH em água (90:10)		ACN – H <sub>2</sub> O (90:10)
<b>Temperatura forno</b>		27 °C		
<b>Comprimento de onda (λ)</b>		210 nm		
<b>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	0,8	0,8	0,3	0,8
<b>Retenção AO (min)</b>	~ 11,5	13,37	35,65	13,45
<b>Retenção AU (min)</b>	~ 12,5	13,92	37,07	14,00

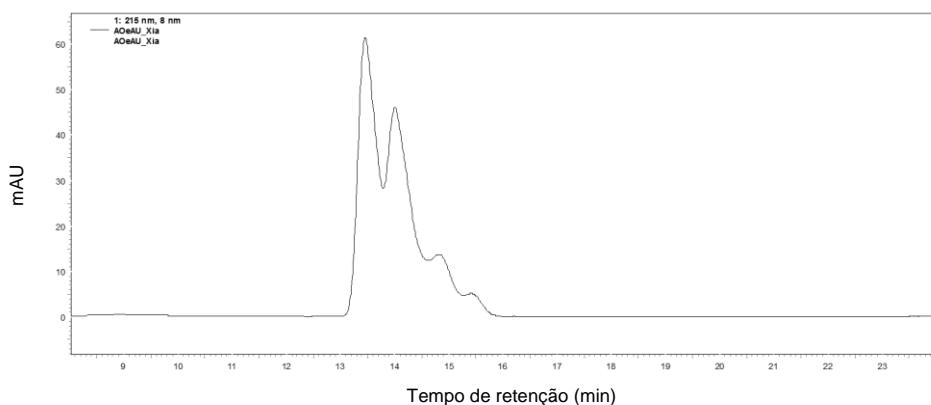
Fonte: Autor, 2013.

**Figura 11 – Cromatograma obtido para o método A, reproduzido segundo literatura para quantificação de AU e AO (picos de AO e AU respectivamente).**



Fonte: Autor, 2013.

**Figura 12 – Cromatograma obtido para o método A sem uso do ácido na fase móvel (picos de AO e AU respectivamente).**



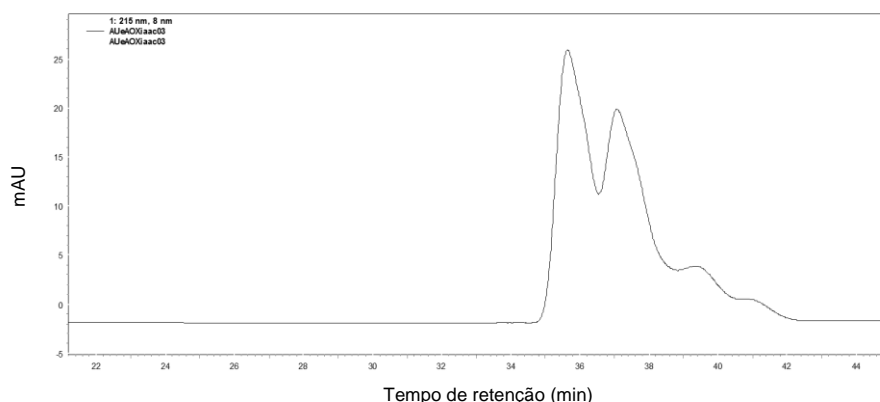
Fonte: Autor, 2013.

Não houve diferença entre os cromatogramas obtidos com e sem ácido acético na fase móvel (Figuras 11 e 12), os picos referentes aos triterpenos permanecem juntos, sem possibilidade de realização de quantificação.

Segundo Harris (2008), a função do ácido na coluna é reagir com os átomos de oxigênio carregados negativamente na superfície da sílica, fazendo com que estes não se liguem à amostra e dessa forma teríamos picos mais resolvidos.

Na tentativa de separação utilizando os mesmos solventes propostos pelo método, alterou-se o fluxo bruscamente de  $0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (Figura 13). Ainda que realizada a mudança do fluxo da fase móvel não constatamos a separação dos picos referentes aos ácidos ursólico e oleanólico e, além disso, o tempo de retenção para a mudança mostrou-se inviável.

**Figura 13 – Cromatograma obtido para o método A com alteração de fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> para 0,3 mL.min<sup>-1</sup> (picos de AO e AU respectivamente).**



Fonte: Autor, 2013.

Após avaliar o uso de ácido e verificar que não há diferença nos cromatogramas, e ainda que, o uso deste requer maior cuidado com a manutenção da coluna analisou-se o segundo método.

De maneira análoga ao que se realizou para o método A, realizou-se com o método B, onde, utilizamos apenas metanol e água (95:5) como fase móvel. Como modificação, fez-se apenas alteração do fluxo de corrida cromatográfica de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> para 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. O resumo encontra-se na Tabela 5.

**Tabela 5 – Resumo comparativo de modificação de método B na determinação de AU e AO.**

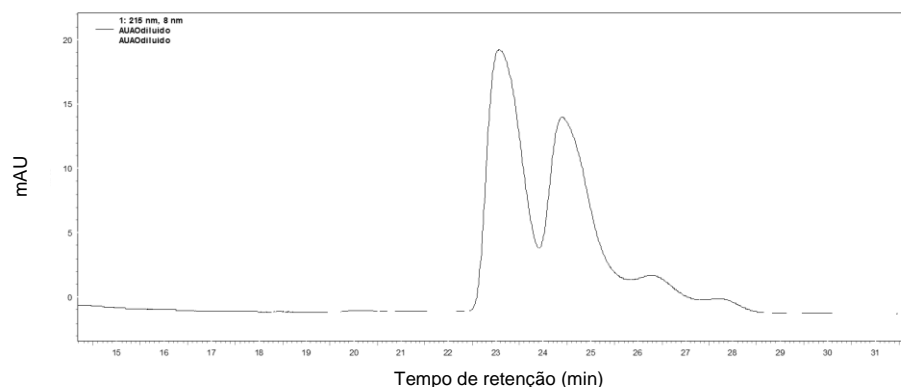
	<b>MÉTODO B</b> Xu, Su e Zang (2012)	<b>Reprodução</b> <b>Método B</b>	<b>Modificação</b> <b>Método B</b>
<b>Coluna</b>	Alltech Apollo C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)	Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)	Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5µm)
<b>Fase móvel</b>		MeOH – Água (95:5)	
<b>Temperatura forno</b>		20 °C	
<b>Comprimento de onda (λ)</b>		215 nm	
<b>Fluxo (mL.min<sup>-1</sup>)</b>	0,4	0,4	0,3
<b>Retenção AO (min)</b>	20,58	22,30	29,61
<b>Retenção AU (min)</b>	21,57	23,69	32,13

Fonte: Autor, 2013.

Na Figura 14 está representado o cromatograma obtido para a reprodução do método B, observa-se que os picos apresentam-se mais separados quando

comparados ao método A, entretanto, com a desvantagem de maior tempo necessário para a análise.

**Figura 14 – Cromatograma obtido para a reprodução método B a 0,4 mL.min<sup>-1</sup> (picos de AO e AU respectivamente).**

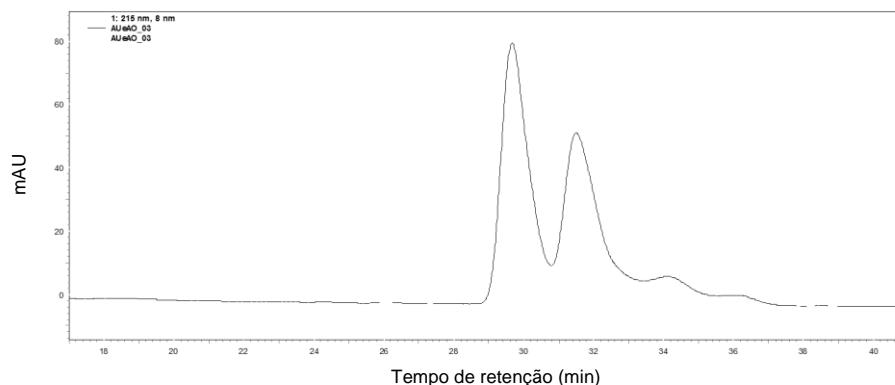


Fonte: Autor, 2013.

O fluxo da fase móvel foi alterado de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> para 0,3 mL.min<sup>-1</sup> (Figura 15), e verifica-se uma separação maior dos picos referentes aos triterpenos. A diferença aplicada ao fluxo não deve influir na quantificação, já que para procedimentos validados faz-se estudo de robustez, onde a metodologia é submetida a pequenas variações de fluxo. Para os autores da metodologia, o fluxo e a temperatura são os parâmetros que conseguem afetar a separação dos picos de AU e AO, não havendo diferença significativa quando alterados: fase móvel, pH ou a adição de par iônico (XU; SU; ZANG, 2012).

Apesar de ser necessário um maior tempo para eluição dos triterpenos no método adaptado, para análises quantitativas isto é recomendado, devido a melhor separação dos picos e uma melhor determinação da área. Com a alteração do fluxo conseguiu-se uma variação de tempo de retenção de 2,52 minutos entre os ácidos ursólico e oleanólico.

**Figura 15 – Cromatograma obtido como o método B, com alteração de fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup> para 0,3 mL.min<sup>-1</sup> (picos de AO e AU respectivamente).**



Fonte: Autor, 2013.

Os fluxos empregados para obtenção dos cromatogramas dos métodos A e B foram bastante diferentes. No método A o fluxo adotado foi 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, enquanto no método B utilizou-se 0,4 mL.min<sup>-1</sup>, havendo no último caso um maior tempo de retenção dos compostos em estudo. Isso ocorre devido a força de cada solvente empregado.

A escolha do método B ocorreu devido ao melhor desempenho na separação, com vantagens de uso de metanol, que é um solvente mais barato, e além disso, não utiliza o ácido acético para alteração de pH da fase móvel, o que despenderia maior tempo nas análises devido ao procedimento de limpeza da coluna cromatográfica.

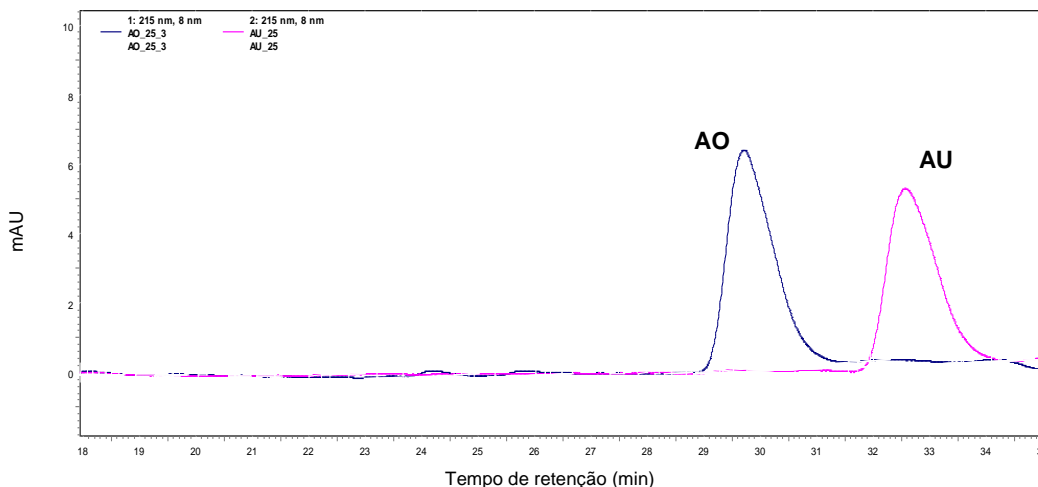
O uso da temperatura a 20°C para o método selecionado proporcionou uma maior estabilidade aos terpenos, já que segundo Yang, Yu et al. (2007) em temperaturas mais elevadas ocorre degradação desses compostos.

Apesar de não testar metodologias mais diversificadas, com o uso de diferentes solventes orgânicos nas fases bem como o uso de ácido em um dos métodos indicou o comportamento dos picos referentes aos compostos de ácido ursólico e ácido oleanólico.

#### 1.4.3 Curva Analítica

Abaixo, Figura 16, estão representados os cromatogramas, sobrepostos, de cada ácido, os quais foram utilizados para obtenção de curva analítica.

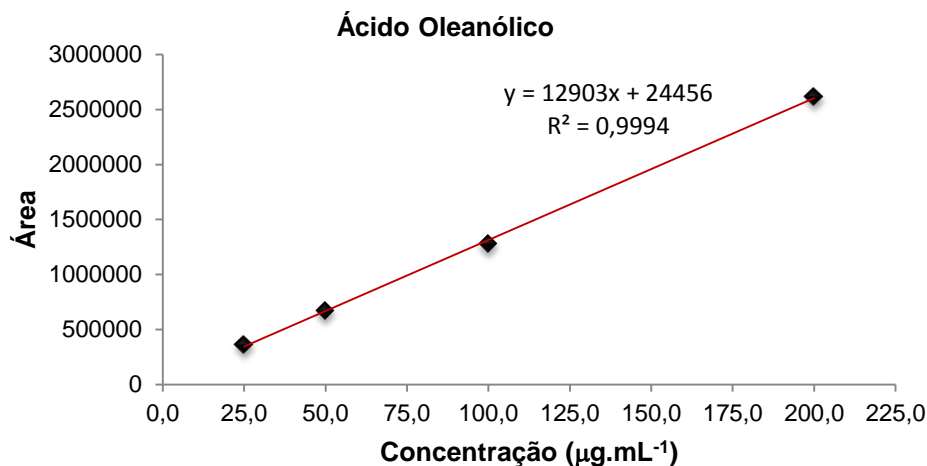
**Figura 16 – Cromatogramas obtidos para AO e AU em fase móvel MeOH – Água (95:5), temperatura de 20 °C,  $\lambda = 215$  nm e fluxo 0,3 mL.min<sup>-1</sup>.**



Fonte: Autor, 2013.

As curvas analíticas para cada triterpeno estão representadas nas Figuras 17 e 18. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o ácido oleanólico foi 0,9994, com limite de detecção (LD) 1,3320  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e limite de quantificação (LQ) 4,0365  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

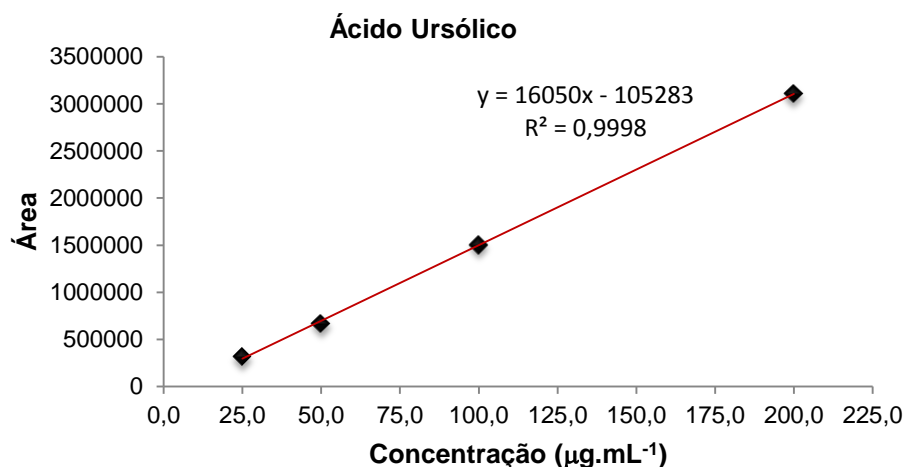
**Figura 17 – Curva analítica obtida para o ácido oleanólico (AO).**



Fonte: Autor, 2013.

Já para a curva do ácido ursólico encontrou-se o coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9998$ , limite de detecção de 2,6229  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e limite de quantificação 7,9482  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os valores de LD e LQ para as duas substâncias foram atribuídos a partir dos parâmetros das curvas.

**Figura 18 – Curva analítica obtida para o ácido ursólico (AU).**



Fonte: Autor, 2013.

#### 1.4.4 Quantificação

As metodologias utilizadas por Carvalho et al. (2009), Zou et al. (2007) e Gbaguidi et al. (2005) utilizaram o extrato etanólico na quantificação em vegetais dos mesmos triterpenos. Xia et al. (2012) verificaram que não houve diferença significativa entre as extrações realizadas em metanol ou etanol a partir do material triturado.

Após a obtenção da curva analítica, os extratos vegetais foram analisados. Para isso foram pesados e suas massas descritas na Tabela 6. Os resultados obtidos para a quantificação seguem representados na Tabela 7.

**Tabela 6 – Amostras analisadas na quantificação de AU e AO com as massas utilizadas.**

AMOSTRAS	PARTE DA PLANTA	CÓDIGO	m (g)
Partição hexânica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPH	0,0123
Partição clorofórmica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPC	0,0048
Partição acetato de etila <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPA	0,0115
Partição butanólica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPB	0,0122
Partição hidrometanólica <i>Z. tuberculosa</i>	folha	ZTPM	0,0140
Extrato bruto <i>Z. tuberculosa</i>	caule	ZEBC	0,0115
Partição hexânica <i>Z. tuberculosa</i>	caule	ZPHC	0,0108
Extrato bruto <i>M. hirsuta</i>	folha	MHEB	0,0074
Partição hexânica <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPH	0,0102
Partição clorofórmica <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPC	0,0104
Partição acetato de etila <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPA	0,0105
Partição hidrometanólica <i>M. hirsuta</i>	folha	MHPM	0,0213

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 7 – Resultados da quantificação de AO e AU por CLAE-DAD.**

<b>Amostra</b>	<b>AO (µg/mg)</b>	<b>AU (µg/mg)</b>
ZTPH	24,18 ± 0,80	137,72 ± 2,90
ZTPC	151,50 ± 0,35	446,19 ± 2,43
ZTPA	nd	94,61 ± 2,41
ZTPB	nd	nd
ZTPM	nd	nd
ZEBC	nd	nd
ZPHC	qb	qb
MHEB	6,07 ± 0,15	48,71 ± 2,62
MHPH	29,63 ± 1,01	72,35 ± 1,73
MHPC	50,90 ± 1,03	267,86 ± 2,11
MHPA	qb	qb
MHPM	nd	nd

Fonte: Autor, 2013.

nd – não detectado; qb – quantidade de substância muito baixa

Os resultados obtidos para a quantificação seguem descritos em µg/mg de extrato, após realizada conversão das unidades. Das frações analisadas as que apresentaram maior concentração dos triterpenos AU e AO foram as frações em clorofórmio das folhas de *Z. tuberculosa* (ZTPC) e *M. hirsuta* (MHPC).

Não foram encontrados os triterpenos nas frações butanólica e hidrometanólica das folhas de *Z. tuberculosa*, no extrato bruto do caule da mesma planta nem na partição hidrometanólica de *M. hirsuta*.

Para a fração em clorofórmio de *Zeyheria tuberculosa* encontrou-se 446,19 µg/mg e 151,50 µg/mg de ácido ursólico e oleanólico, respectivamente. Já para a mesma fração de *Mansoa hirsuta* os valores encontrados foram 267,86 µg/mg e 50,90 µg/mg para ácido ursólico e oleanólico, respectivamente. Na partição acetato quantidades muito baixas dos compostos foram encontradas. Esses resultados de quantificação reafirmam o obtido pelo perfil cromatográfico no item 1.4.1, que mostra a presença desses ácidos no extrato clorofórmico e ausência no extrato em acetato.

Santos (2009) quantificou os ácidos ursólico e oleanólico em extratos de *Z. tuberculosa* por RMN uni e bidimensionais. Dentre a família Bignoniaceae o estudo realizado por Gormann, Schreiber e Kolodziej (2004) mostrou as quantidades dos ácidos ursólico e oleanólico, respectivamente, em *Newbouldia laevis* 37,9% e 14,5%, *Markhamia acuminata* 36,6% e 23,1% e para *Spathodea campanulata* 1,8% e 6,7%, sendo a determinação realizada em GC-MS e GC-FID.



Baricevic et al. (2001) ao analisar, por CLAE-UV-EM, as folhas de *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) encontrou no extrato clorofórmico 480 µg/mg de ácido ursólico, quantidade próxima a encontrada em nosso estudo na partição clorofórmica.

Além da composição diferenciada para as espécies existentes na natureza, há ainda diferença no procedimento de retirada dos metabólitos da planta. Para o nosso estudo utilizou-se extração a frio, porém, em alguns casos a extração é realizada em ultrassom ou à quente. Observou-se que muitas quantificações são realizadas a partir do material seco seguido de extração. O presente estudo aconteceu no extrato bruto etanólico e nas partições realizadas a partir desse.

## 1.5 Considerações Finais

A partir do perfil cromatográfico obtido para as frações das folhas de *Mansoa hirsuta*, foi possível verificar a presença dos triterpenos pentacíclicos, ácido ursólico e oleanólico, nos extratos bruto, clorofórmico e na filtração acetato de etila.

Foram testadas metodologias descritas em literatura na quantificação dos triterpenos por CLAE. Os métodos foram reproduzidos e levemente modificados conforme necessidade para obtenção de uma melhor qualidade de separação. Estas modificações, entretanto, não devem interferir na validação realizada.

O uso de ácido acético não influenciou na separação dos picos referentes aos compostos em estudo, contudo aplicando metodologia com ácido na fase móvel é necessário maior cuidado com a coluna cromatográfica. A melhor separação foi obtida quando o fluxo foi modificado de  $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para  $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , utilizando-se o método em que a fase móvel é metanol/água (95:5).

As curvas obtidas apresentaram ótimos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) 0,9994 (AO) e 0,9998 (AU). As quantidades encontradas para o ácido ursólico e oleanólico foram, respectivamente,  $446,19 \pm 2,43 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$  e  $151,50 \pm 0,35 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$  por extrato da partição clorofórmica das folhas de *Z. tuberculosa*. No extrato bruto do caule de *Z. tuberculosa* não conseguiu-se detectar os triterpenos. Já na partição em clorofórmio de *M. hirsuta* foram encontrados  $267,86 \pm 2,11 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$  e  $50,90 \pm 1,03 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$  para ácido ursólico e oleanólico (por quantidade de extrato), respectivamente.

---

**2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA, ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO  
ESTRUTURAL DE COMPOSTOS PRESENTES NO EXTRATO DO CAULE DE  
*SIMABA MAIANA CASAR*. (SIMAROUFACEAE)**

---

## 2.1 Objetivos

### 2.1.1 Objetivo Geral

Isolamento de compostos do caule de *Simaba maiana* Casar, com atividade moluscicida, por CLAE semi-preparativa.

### 2.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar atividade moluscicida de subfrações do extrato etanólico do caule de *Simaba maiana* Casar.

Isolar compostos biologicamente ativos, frente ao *Biomphalaria glabrata*, de extratos do caule de *S. maiana* Casar.

Elucidar a estrutura dos compostos isolados de *Simaba maiana* Casar através das técnicas espectroscópicas na região Ultravioleta, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), raio X e Infravermelho.

## 2.2 Referencial Teórico

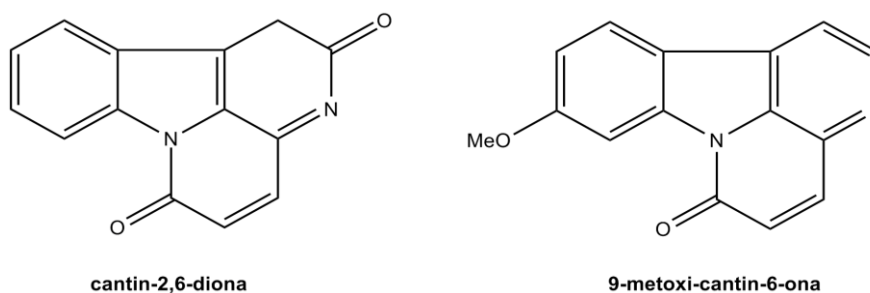
### 2.2.1 Família Simaroubaceae – Caracterização Botânica

Representada por cerca de 32 gêneros e 170-200 espécies, a família Simaroubaceae apresenta distribuição pantropical, encontradas na América, Ásia e oeste da África. No Brasil os gêneros encontrados são *Quassia* e *Picrolemma*, na região Amazônica; *Picrasma* e *Castela*, na região Sul; *Simaba* e *Simarouba* em quase todas as regiões (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011).

Relatos antigos descrevem a curiosidade em estudar essa família devido à presença de substância amargas em quase todas as espécies (CAVALCANTE, 1983). Os compostos amargos foram chamados “quassinas”, que hoje chamamos de quassinóides, substâncias encontradas quase que exclusivamente na família Simaroubaceae, sendo considerados marcadores taxonômicos. Dentre as atividades desse grupo de substâncias estão antiparasitária, fago-inibidora, inseticida, fitotóxica, antimalárica e antitumoral (ALMEIDA et al., 2007).

*Simaba* é o segundo maior gênero da família com cerca de 50 espécies no território brasileiro. Os metabólitos mais encontrados são quassinóides e alcaloides do tipo cantinona. Entretanto, outros compostos também têm sido citados como triterpenoides, cumarinas e esteroides (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011; CAVALCANTE, 1983). Os alcaloides cantin-2,6-diona e 9-metoxi-cantin-6-ona (Figura 19) foram isolados de *Simaba polyphylla* (Simaroubaceae) (MESQUITA-SAAD; CABRAL, 1997; SARAIVA et al., 2006).

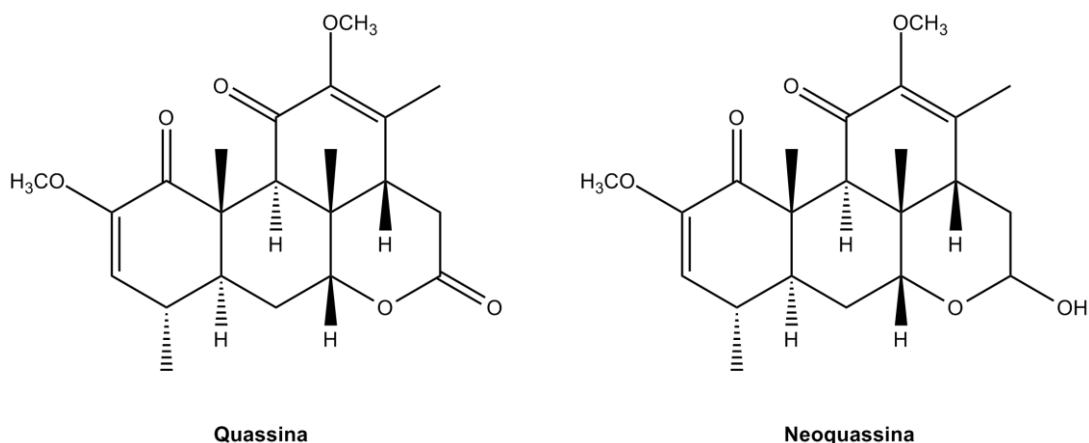
**Figura 19 – Alcaloides do tipo cantinona encontrados em espécie da família Simaroubaceae.**



Fonte: Autor, 2013.

Os primeiros quassinóides relatados na família Simaroubaceae foram quassina e neoquassina (Figura 20) (ALMEIDA et al., 2007).

**Figura 20 – Primeiros quassinóides descritos na família Simaroubaceae.**



Fonte: Autor, 2013.

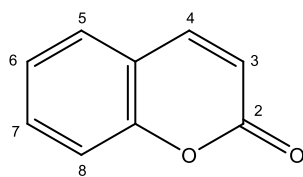
A partir de estudos realizados no extrato e frações do caule de *Simaba maiana* Casar., verificou-se uma baixa atividade antioxidante pelo método do DPPH, atividade citotóxica e atividade moluscicida frente ao *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. O extrato bruto do caule apresentou inibição da linfoproliferação, não sendo ativo, porém, quanto às atividades leishmanicida e tripanocida (CAMBUI, 2012).

Conhecida como “pratudo”, “paratudo” e “pau-pra-tudo” a *Simaba maiana* Casar. é utilizada para tratar processos inflamatórios e segundo a população baiana para todos os males (ALBUQUERQUE et al., 2007; CAVALCANTE, 1983; CAMBUI, 2012).

### 2.2.2 Biossntes de Cumarinas

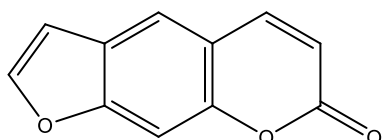
Conhecidas por possuírem um núcleo 2H-1-benzopiran-2-ona, as cumarinas são encontradas em vegetais, fungos e bactérias. A cumarina mais simples é a 1,2-benzopirona (GRAY; WATERMAN, 1978; KUSTER; ROCHA, 2007). O grupo prenila pode aparecer como substituinte em várias posições, inclusive em C6 e C8, originando as piranocumarinas ou furanocumarinas lineares e angulares (Figura 21) (KUSTER; ROCHA, 2007).

**Figura 21 – Exemplos de cumarinas.**

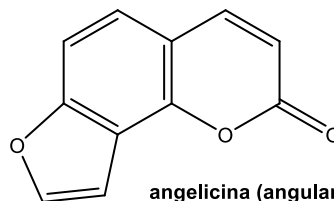


cumarina (1,2-benzopirona)

**FURANOCUMARINAS**

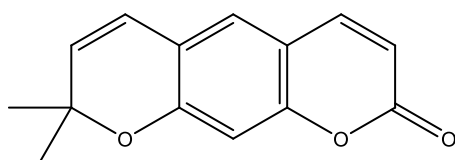


psoraleno (linear)

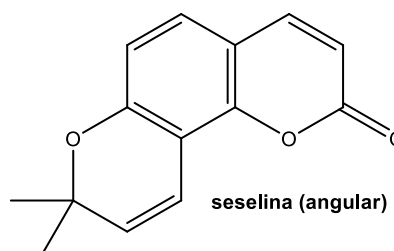


angelicina (angular)

**PIRANOCUMARINAS**



xantiletina (linear)



seselina (angular)

Fonte: KUSTER; ROCHA, 2007.

As cumarinas têm como precursor o ácido cinâmico e encontram-se principalmente nas famílias Apiaceae, Rutaceae, Astareceae, Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleacea (KUSTER; ROCHA, 2007; OWITI, 2011).

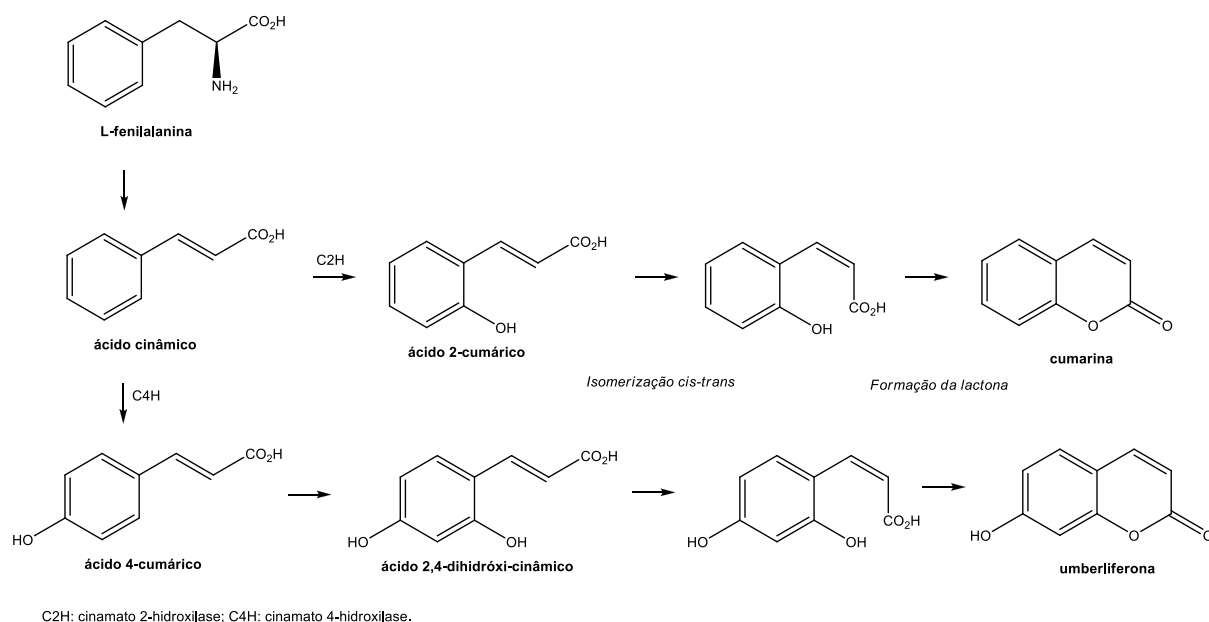
Nas plantas as cumarinas são produzidas, aparentemente, como resposta a lesão mecânica, ataque de insetos ou inoculação com fungos, já que apresenta atividades antimicrobiana, anti alimentar e propriedades inibitórias de germinação (KUSTER; ROCHA, 2007; VIEIRA, 2010).

O uso de derivados da 4-hidróxicumarina como anticoagulantes iniciou-se após investigação de hemorragia em gado alimentado com trevo-de-cheiro-amarelo (*Melilotus officinalis* Lam.) (KUSTER; ROCHA, 2007). O Warfarin é um derivado da cumarina que é utilizado como veneno contra ratos e ainda como medicamento no tratamento da trombose venosa e embolia. As furanocumarinas lineares, devido aos seus efeitos tóxicos, foram consideradas indesejáveis em alimentos vegetais. Atuam, entretanto, como pesticidas naturais na defesa das plantas (CHRISTENSEN; BRANDT, 2006).

A enzima fenilalanina amonialiase é responsável por catalisar a desaminação da L-fenilalanina produzindo o ácido cinâmico, do qual são derivadas as cumarinas (KUSTER; ROCHA, 2007; VIEIRA, 2010) (Figura 22).

A hidroxilação do ácido cinâmico ocorre inicialmente *para* em relação a cadeia lateral. A hidroxilação subsequente deveria proceder *orto* ao substituinte, entretanto, em cumarinas, a hidroxilação tanto do ácido cinâmico como do ácido 4-cumárico ocorre *orto* a cadeia lateral. As enzimas responsáveis são a cinamato 2-hidroxilase, para a formação do ácido 2-cumárico e a cinamato 4-hidroxilase, na formação do ácido 4-cumárico (DEWICK, 2009).

**Figura 22 – Biossíntese de cumarinas.**



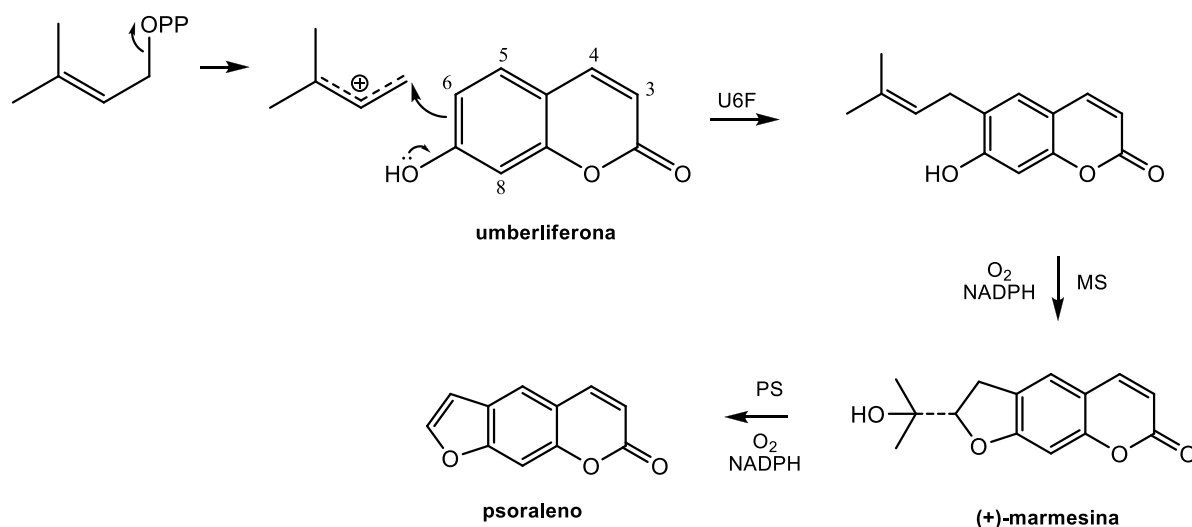
Fonte: Adaptado de Dewick, 2009 e Vieira, 2010.

Os ácidos 2-cumárico e 2,4-dihidroxi-cinâmico sofrem uma isomerização na cadeia lateral, assumindo uma configuração *cis* (menos estável). A conjugação da molécula permite que a isomerização *cis-trans* ocorra de maneira muito rápida, o que não seria favorável no caso de uma dupla isolada (DEWICK, 2009).

Furanocumarinas e piranocumarinas são os principais derivados da cumarina (OWITI, 2011). O pirofosfato de dimetilalila alquila na posição *orto* ao anel de umberliferona (Figura 23), que após ciclização no anel gera marmesina, seguida da ação da psoraleno sintase é formado o psoraleno (DEWICK, 2009). A marmesina é o principal precursor das furanocumarinas lineares (CHRISTENSEN; BRANDT, 2006).



**Figura 23 – Formação de psoraleno, ciclização direta.**

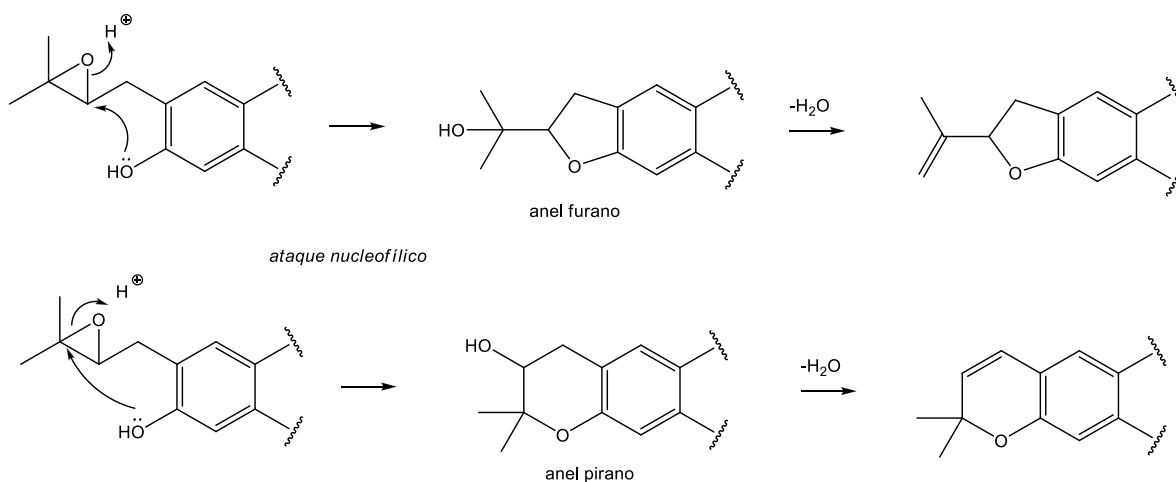


U6F: umbeliferona 6-feniltransferase; MS: marmesina sintase; PS: Psoraleno sintase

Fonte: DEWICK, 2009.

Para o processo de ciclização acreditava-se na existência de um intermediário epóxido, levando a formação de um anel furano ou pirano, por ataque nucleofílico ao epóxido (Figura 24), entretanto investigações realizadas com sistemas enzimáticos não comprovaram a existência do epóxido, levando a crer que ocorre a ciclização direta. (DEWICK, 2009).

**Figura 24 – Formação de anel furano e pirano com intermediário epóxido.**



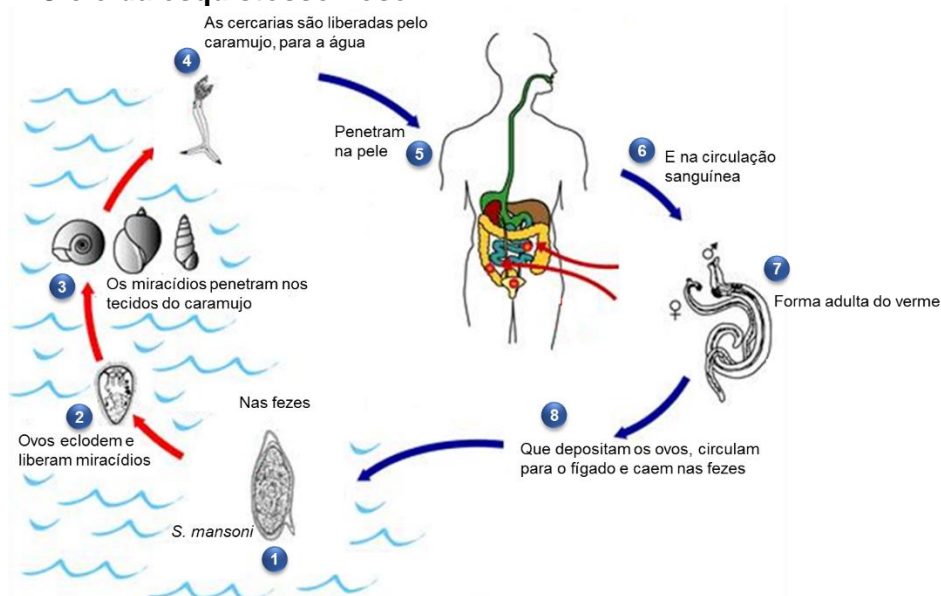
Fonte: DEWICK, 2009.

### 2.2.3 Esquistossomose

A esquistossomose mansônica (barriga d'água) é uma doença endêmica causada pelo *Schistosoma mansoni* e transmitida por moluscos do gênero *Biomphalaria*, que atuam como hospedeiros intermediários, os quais são necessários e indispensáveis para o desenvolvimento do ciclo da doença (MASSARA et al., 2012). Das três espécies brasileiras (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*), a *B. glabrata* é a de maior importância, devido aos altos índices de infecção, eficiência na transmissão da doença e extensa distribuição geográfica (CARVALHO et al., 2005; SILVA et al., 2008). No Brasil, a doença encontra-se distribuída desde o Maranhão até Minas Gerais (CARVALHO, 2012).

A doença que acomete lugares com deficiente saneamento básico e falta de higienização sanitária da população, é indicadora do nível socioeconômico e ainda apresenta alta incidência do Brasil (PALMEIRA et al., 2010). A contaminação ocorre a partir de águas naturais, em que houve deposição de ovos do *S. mansoni*, através das fezes do hospedeiro infectado (Figura 25). Os ovos eclodem e ocorre liberação de larvas ciliadas (miracídeos), que encontram o caramujo (hospedeiro intermediário). No período de quatro a seis semanas esses liberam as cercarias, infectando o homem, que adquire a esquistossomose. Cinco semanas depois da infecção o homem pode excretar os ovos, recomeçando o ciclo (OLIVEIRA; VILA NOVA; ASSIS, 2012).

**Figura 25 – Ciclo da esquistossomose.**



Fonte: Adaptado de Souza (2013).

Para controlar a esquistossomose são utilizados programas públicos de tratamentos quimioterápicos, conscientização da população e uso de moluscidas (LEYTON et al., 2005). Algumas substâncias já foram testadas contra espécies do gênero *Schistosoma*, apesar de eficazes apresentaram efeitos colaterais. Atualmente, os fármacos utilizados no tratamento da esquistossomose são Oxaminiquine e Praziquantel, entretanto não apresentam resultados satisfatórios no tratamento da esquistossomose mansônica aguda a algumas vezes resistência (SILVA et al., 2012). O método mais eficiente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é a associação da quimioterapia com o uso de moluscidas. A niclosamida é considerada substância padrão por ser eficiente no controle dos caramujos, entretanto apresenta custo elevado e fácil decomposição sob ação da luz (SANTOS et al., 2010).

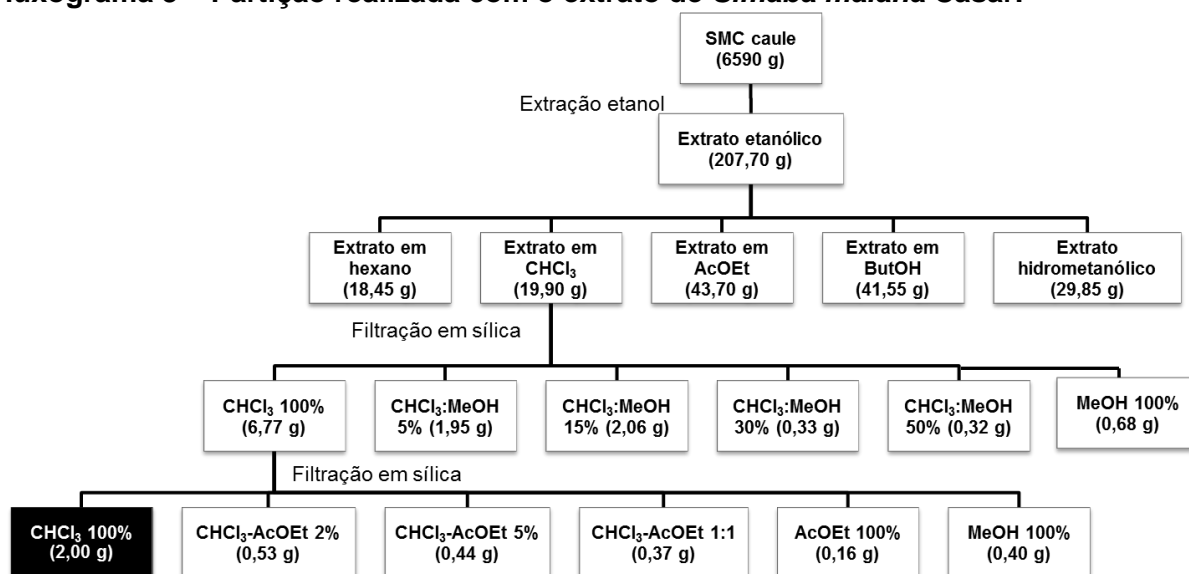
Contudo, o uso de produtos sintéticos têm preocupado estudiosos, já que, os caramujos podem desenvolver resistência às substâncias utilizadas, além de apresentarem baixa seletividade e efeitos danosos ao ecossistema. Por este motivo, o uso de moluscidas de origem vegetal tem despertado o interesse, já que são substâncias facilmente biodegradáveis (CARVALHO et al., 2005; LEYTON et al., 2005).

## 2.3 Metodologia

### 2.3.1 Preparação do Extrato Vegetal

O extrato etanólico do caule de *Simaba maiana* Casar foi obtido no LPqRN por Érica Verena Figueirêdo Cambui, após identificação da planta por comparação a partir de exemplar registrado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe nº 0461. Em seguida foi realizado processo de partição líquido-líquido em hexano ( $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ ), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), acetato de etila ( $\text{AcOEt}$ ) e  $n$ -butanol ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ). A fração clorofórmica (17,55 g) filtrada em gel de sílica (350 g) e desta obtida uma nova fração clorofórmica (6,77 g; 38,58%), a qual (5,5 g) foi submetida a mais uma filtração em gel de sílica (30 g), de onde foram obtidas as subfrações  $\text{CHCl}_3$  100%,  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  2%,  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  5%,  $\text{CHCl}_3\text{-AcOEt}$  1:1,  $\text{AcOEt}$  100% e  $\text{MeOH}$  100%, conforme Fluxograma 3.

**Fluxograma 3 – Partição realizada com o extrato de *Simaba maiana* Casar.**



Fonte: Adaptado de Cambui, 2012.

Todas as subfrações obtidas foram analisadas em CLAE-DAD, a subfração  $\text{CHCl}_3$  100% foi submetida a isolamento por cromatografia semi-preparativa (CLAE-DAD), posteriormente das frações coletadas foram obtidos os espectros de RMN.

### 2.3.2 Atividade Moluscicida

Os ensaios para avaliação da atividade moluscicida foram realizados pela MSc. Carla Pereira, no Laboratório de Bioensaios do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN), IQB-UFAL, onde é mantida uma criação de caramujos não infectados por trematódeos da espécie *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda, Planorbidae), os quais são descendentes de exemplares da região do Barreiro de Cima, periferia de Belo Horizonte, Minas Gerais.

O ensaio da atividade moluscicida consistiu na imersão do caramujo em uma solução aquosa a 0,1% de DMSO e em soluções dos extratos sob investigação nas concentrações a serem testadas, por 24 horas (SANTOS; SANTANA, 1999).

Nos ensaios, realizados em triplicata, foram utilizados cinco caramujos por copo, com diâmetro entre 13-18 mm. Após esse período, os moluscos foram lavados, introduzidos em água desclorada e alimentados, havendo troca da água a cada 24 horas, permanecendo sob observação por mais 72 horas, com registro e retirada dos caramujos mortos, que foram identificados pela descoloração, hemorragia, deterioração dos tecidos do corpo e odor característico.

As amostras, bem como as concentrações testadas, seguem descritas na Tabela 8. Foi utilizada, como controle positivo, solução com niclosamida a 3 ppm, como controle negativo DMSO (0,1%) e como branco água desclorada.

A alimentação diária das espécies animais consistiu de alface fresca (*Lactuca sativa*), lavadas com uma solução de ácido acético 0,05 a 0,1% e, ração para rato enriquecida a 10% de carbonato de cálcio. Os caramujos foram mantidos a temperatura de 20-25°C em aquários de vidro contendo água desclorada e sistema de arejamento por bombas, com limpeza realizada a cada 15 dias.

O extratos foram testados em concentração inicial de 100 ppm chegando em 0,5 ppm (Tabela 8). Os resultados foram analisados para cálculo das concentrações letais para 10% (CL<sub>10</sub>), 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>), pela análise de regressão Probit, utilizando o programa SAEG.

**Tabela 8 – Subfrações do caule de *Simaba maiana* testadas frente ao *Biomphalaria glabrata*.**

FRAÇÃO	CONCENTRAÇÕES TESTADAS
Clorofórmio	100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 0,5 ppm
Clorofórmio – Acetato 5%	100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 0,5 ppm
Clorofórmio – Acetato (1:1)	100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 0,5 ppm
Metanol	100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 0,5 ppm

Fonte: Autor, 2013.

### 2.3.3 Preparo para Análises Cromatográficas

As corridas cromatográficas analíticas foram realizadas com solventes ultrapuros. Na fase móvel foi utilizada água Milli-Q, obtida em equipamento MILLIPORE Simplicity UV e metanol grau HPLC J.T. Baker, filtrado em membrana de nylon 0,45  $\mu\text{m}$  x 47 mm com sistema SUPELCO, próprio para filtração de solventes. As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido Shimadzu (Japão), bomba LC-10ADvp, controladora SCL-10Avp, degaseificador DGU-14A e detector SPD-M20A. Injetor manual Rheodyne 7725(i). Coluna C18 (Shimadzu, Japão) (150 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ ), ou Coluna C8 (Shimadzu, Japão) (150 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ ), acoplados a alça de amostragem de 20  $\mu\text{L}$ .

Todas as amostras, antes de injetadas nos cromatógrafo, foram filtradas em filtro de seringa MILLIPORE Millex - HV 0,45  $\mu\text{m}$  PVDF (Polifluoreto de vinilideno).

### 2.3.4 Perfil Cromatográfico das Subfrações

As subfrações Clorofórmio, Clorofórmio-Acetato 5%, Clorofórmio-Acetato (1:1) e Metanol (Fluxograma 3, p. 57) foram submetidas à análise por gradiente de solventes em cromatógrafo líquido de alta eficiência. Das subfrações restantes tem-se  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt 2%, a qual passou por procedimentos cromatográficos realizados por Érica Verena Figueirêdo Cambui (CAMBUI, 2012) e AcOEt 100% com pequena quantidade de material (0,16 g).

O gradiente consistiu em concentração inicial de 5% de metanol, chegando ao fim da análise com 100% de metanol, num tempo de 60 min, permanecendo nessa condição mais 10 min, resultando numa corrida para obtenção de perfil cromatográfico com tempo total de 70 min. O fluxo adotado foi de 1,0 mL.  $\text{min}^{-1}$  e  $\lambda = 300 \text{ nm}$ .

Uma nova corrida em gradiente foi então realizada com a subfração Clorofórmio 100%, já que os compostos presentes na amostra apresentaram maior tempo de retenção, ou seja, menor polaridade, logo, um novo gradiente foi desenvolvido.

### 2.3.5 Isolamento em CLAE Semi-Preparativo

Para o isolamento de compostos em cromatógrafo utilizou-se MeOH P.A. Vetec bidestilado. A montagem do sistema dispensou a filtração para esse caso, entretanto, todos os solventes foram levados a banho ultrassom por 10 a 15 minutos. Os solventes utilizados são levados ao banho ultrassom para eliminação de bolhas de ar que possam interferir no desempenho cromatográfico. Utilizou-se cromatógrafo Shimadzu (Japão) equipado com duas bombas LC-6AD, controladora SCL-10AD, degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, detector SPD-M10Avp, coluna Shimadzu C18 (250 x 20 mm), injetor manual Rheodyne 7725(i) acoplado a alça de amostragem de 2 mL, com corrida em gradiente binário 60% - 100% B (30 min) após corrida isocrática 100% B (10 min) (A - Água ultrapura, B - Metanol P.A. VETEC bidestilado), totalizando 40 minutos em um fluxo de 10,0 mL.min<sup>-1</sup> e  $\lambda = 300$  nm. O tempo para acondicionamento foi 20 min, entre as corridas.

Uma alíquota da subfração CHCl<sub>3</sub> (~ 150 mg) foi solubilizada em MeOH grau HPLC (2 mL) e em seguida injetada manualmente em cromatógrafo líquido.

O procedimento foi repetido por quatro vezes, com recolhimento de 09-15 frações, por corrida, na tentativa de isolar compostos mais puros.

### 2.3.6 Verificação de Pureza das Amostras Obtidas

As amostras coletadas no item 2.3.5 foram reinjetadas no cromatógrafo líquido para comprovação da separação, realizada em corrida isocrática (40:60 - Água:MeOH), fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup> a 300 nm, com coluna Shimadzu C8 (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m).

### 2.3.7 Elucidação Estrutural

Após verificação da pureza, por CLAE em coluna C8, as amostras foram identificadas como SMC1, SMC2, SMC3 e SMC4 e levadas para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no Laboratório de RMN do Queen Mary University of London.

Através do detector de arranjo de diodos (DAD), foi possível obter os espectros de Ultravioleta durante as corridas cromatográficas.

As amostras SMC1 e SMC2 foram analisadas também em Espectrômetro na região do Infravermelho (IV), com Transformada de Fourier acoplado a dispositivo amostrador por reflectância total atenuada (ATR) GladiATR Diamond ATR.

Os espectros de RMN unidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), obtidos em  $\text{CDCl}_3$ , foram adquiridos em equipamento Bruker Avance 400, e processados com o software TopSpin versão 2.1, utilizando-se o sinal do TMS como referencial interno.

Para análise de raio X foi utilizado difratômetro Bruker, modelo APEX II Duo.



## 2.4 Resultados e Discussão

### 2.4.1 Atividade Moluscicida

Os ensaios moluscicidas com espécies vegetais são realizados com o intuito de utilização de produtos alternativos no controle dos caramujos da espécie em estudo, já que a transmissão da doença depende da existência dos hospedeiros intermediários.

Cambui (2012) realizou estudo da atividade moluscicida com os extratos brutos da casca da raiz, raiz, casca do caule e caule de *S. maiana* Casar. Realizou ainda testes com as frações da partição hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidrometanólica do caule, sendo o extrato clorofórmico ativo, com 66,6% de morte a uma concentração de 100 ppm, sendo proveniente dessa fração as subfrações testadas (Tabela 9).

Com os resultados das subfrações testadas nas concentrações de 100 a 0,5 ppm foi possível calcular CL<sub>90</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>10</sub> (Tabela 9).

**Tabela 9 – Resultados das CL<sub>10</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> das subfrações de *Simaba maiana* Casar., utilizando o programa Probit versão 1.5.**

	Clorofórmio	Clorofórmio - Acetato 5%	Clorofórmio - Acetato 1:1	Metanol
<b>CL<sub>10</sub> (ppm)</b>	9,62	7,02	10,95	4,44
<b>CL<sub>50</sub> (ppm)</b>	27,66	28,85	107,97	16,82
<b>CL<sub>90</sub> (ppm)</b>	79,54	118,62	1064,79	63,68

\*Água 0% de morte, DMSO 0% de morte e niclosamida 100% de morte.

Fonte: Autor, 2013.

As subfrações com maiores atividades foram Clorofórmio e Metanol, com as menores concentrações letais, as quais apresentaram 100% de morte a uma concentração de 100 ppm. As subfrações Clorofórmio-Acetato 5% e Clorofórmio-Acetato 1:1 obtiveram as maiores concentrações letais. Os extratos foram avaliados segundo a CL<sub>90</sub> (concentração letal a 90% da população estudada). Segundo Hostettman et al. (1982) os extratos são considerados bioativos quando CL<sub>90</sub> for inferior a 400 ppm, entretanto, segundo a OMS, a atividade é considerada significativa quando CL<sub>90</sub> for inferior a 100 ppm (WHO, 1965; WHO, 1983).

De acordo com os parâmetros atribuídos, as subfrações Clorofórmio ( $CL_{90} = 79,54$  ppm; < 100 ppm) e Metanol ( $CL_{90} = 63,68$  ppm; < 100 ppm) apresentaram-se ativas, enquanto que as subfrações Clorofórmio-Acetato 5% ( $CL_{90} = 118,62$  ppm; > 100 ppm) e Clorofórmio-Acetato (1:1) ( $CL_{90} = 1064,79$  ppm; > 100 ppm e > 400 ppm) inativas. Os valores da  $CL_{90}$  da niclosamida, que é o moluscicida sintético padrão recomendado pela OMS, variam de 0,15 ppm a 0,60 ppm (SOUZA; MENDES, 1991).

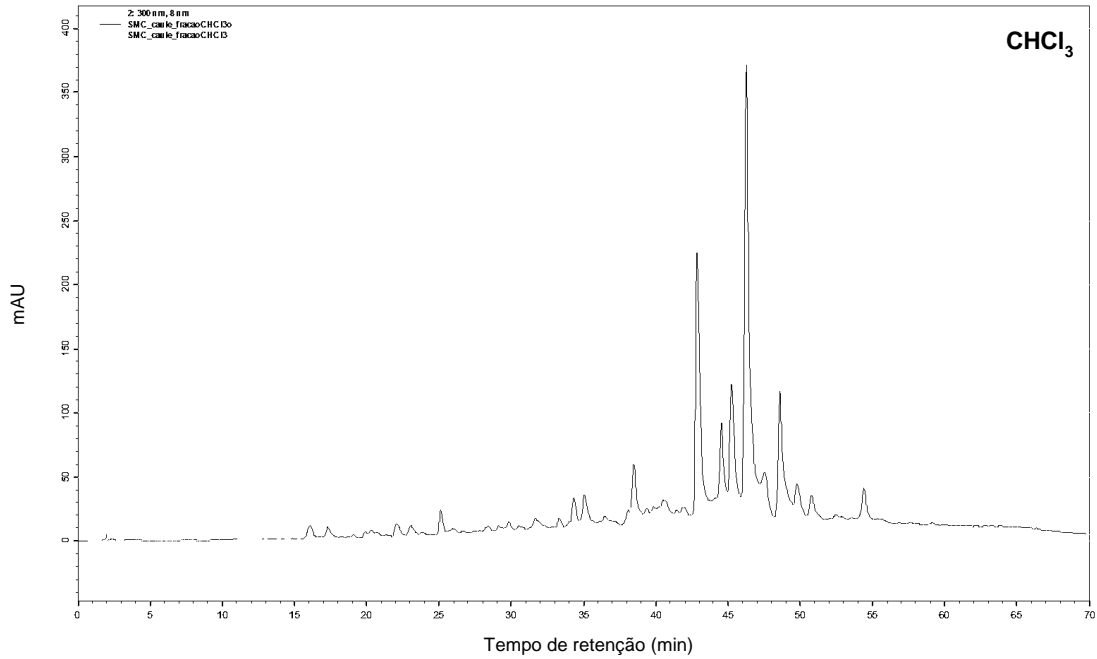
## 2.4.2 Análises Cromatográficas

### 2.4.2.1 Perfil cromatográfico

As subfrações injetadas em CLAE analítico, para verificação de perfil cromatográfico foram provenientes do extrato etanólico do caule, obtido por extração a frio, de *S. maiana* Casar após processos de filtração em sílica.

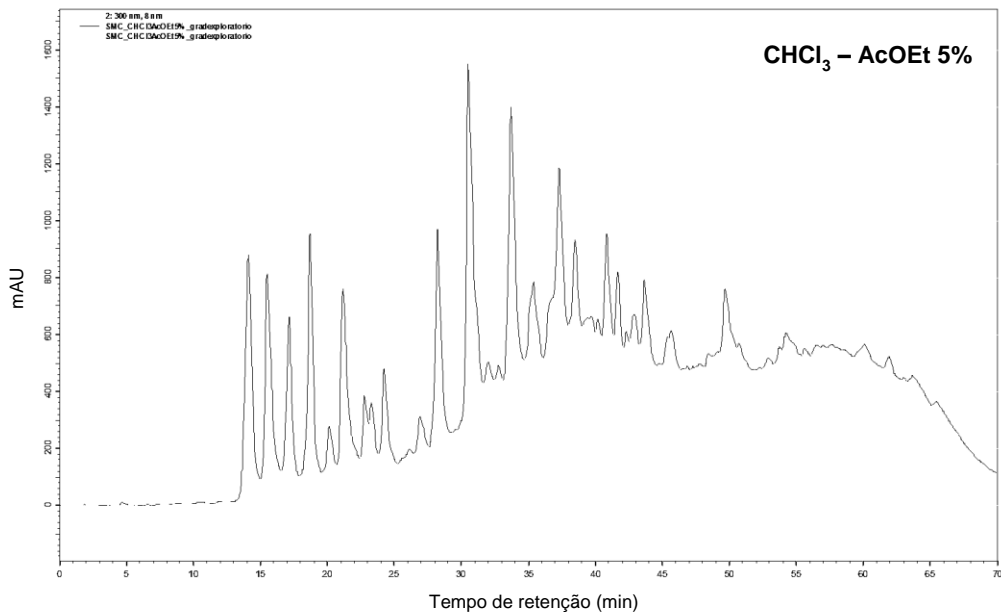
O perfil das amostras é obtido a partir de uma varredura quanto à polaridade possível em colunas de fase reversa. O gradiente é iniciado com 5% de Metanol, (maior polaridade, 95% de água Milli-Q), até 100% de Metanol, num intervalo de 60 min (taxa de mudança de 1,58% a cada minuto de corrida), tempo adequado para uma mudança de polaridade lenta. Os cromatogramas das subfrações estão representados nas Figuras 26-29.

**Figura 26 – Perfil cromatográfico obtido para a fração clorofórmio por CLAE analítico em coluna C18.**



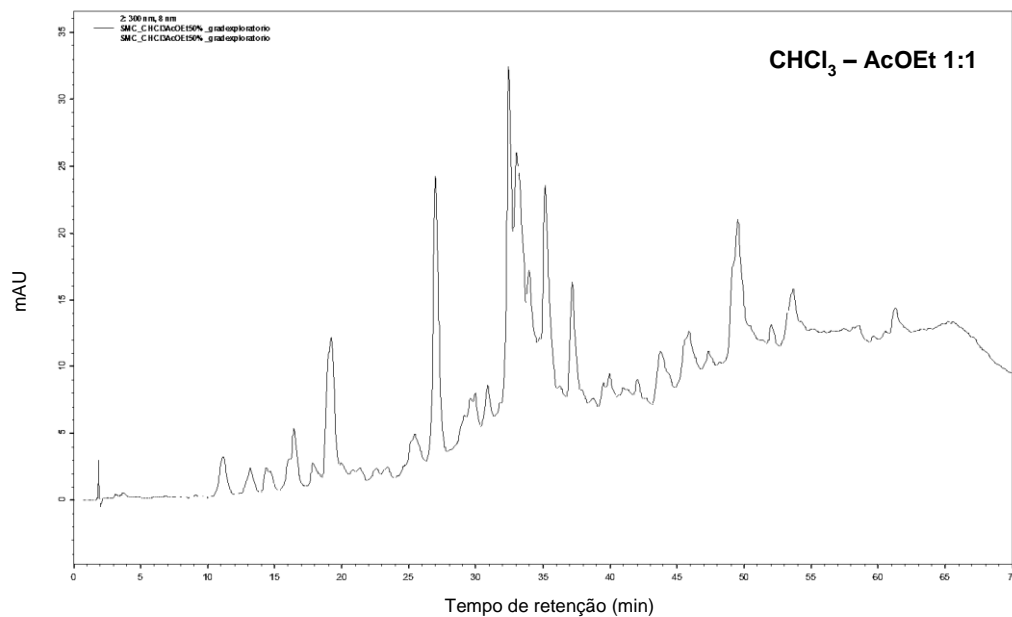
Fonte: Autor, 2013.

**Figura 27 – Perfil cromatográfico obtido para a fração CHCl<sub>3</sub> – AcOEt 5%, por CLAE analítico em coluna C18.**



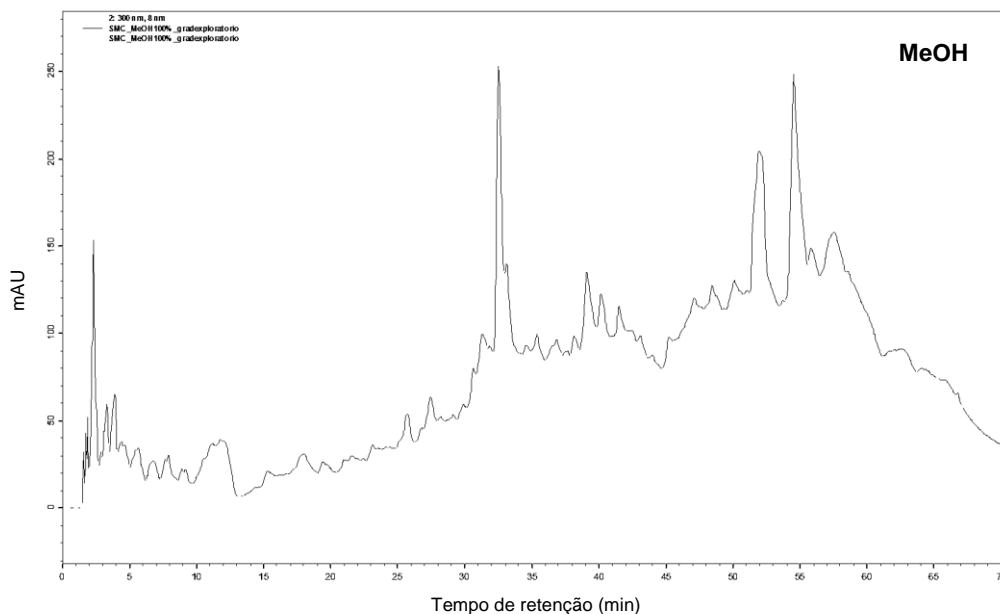
Fonte: Autor, 2013.

**Figura 28** – Perfil cromatográfico obtido para a fração  $\text{CHCl}_3$  – AcOEt 1:1, por CLAE analítico em coluna C18.



Fonte: Autor, 2013.

**Figura 29** – Perfil cromatográfico obtido para a fração MeOH, por CLAE analítico em coluna C18.



Fonte: Autor, 2013.

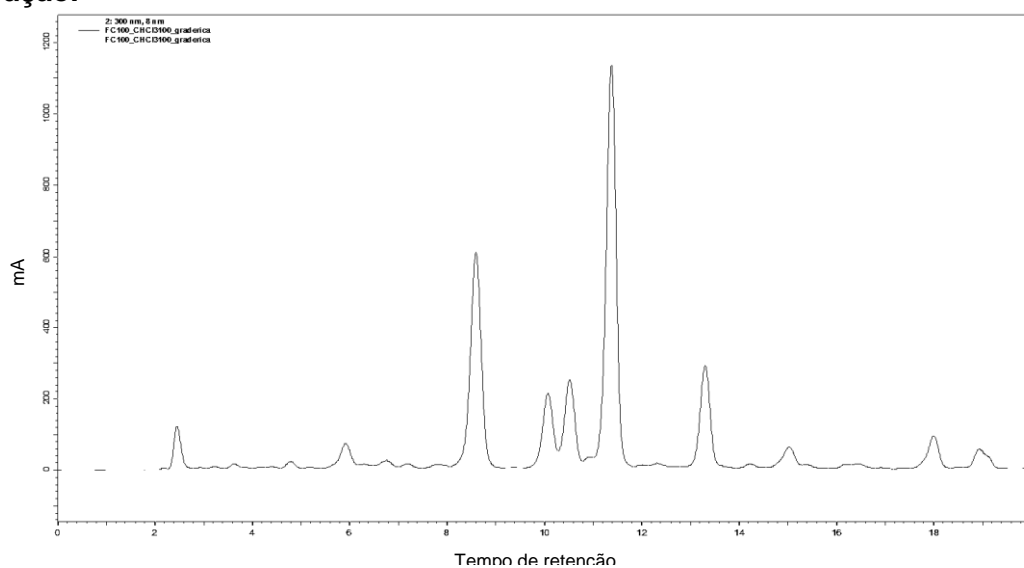
Os picos registrados na subfração Clorofórmio, ativa quanto a atividade moluscicida ( $\text{CL}_{90} = 79,54$  ppm), encontram-se concentrados em tempo entre 40 e 50 minutos, sugerindo a existência de compostos biologicamente ativos, nessa região, para a atividade testada, já que para a subfração Clorofórmio-Acetato 5%, inativa,

(CL<sub>90</sub> = 118,62 ppm) os compostos permanecem no mesmo intervalo de tempo, entretanto outros compostos também são observados no cromatograma. Na fração Clorofórmio-Acetato 1:1 (CL<sub>90</sub> = 1064,79 ppm) os picos são ainda presentes, em proporção bem menor quando comparados as primeiras subfrações. Para a subfração Metanol (CL<sub>90</sub> = 63,68 ppm) outro padrão de picos é mostrado, sugerindo compostos diferentes dos observados nas frações anteriores, que também são biologicamente ativos frente ao *B. glabrata*.

A subfração CHCl<sub>3</sub> apresentou-se com menor quantidade de picos, a 300 nm, dentro de uma região mais definida, com substâncias menos polares, entretanto, os picos apresentaram-se muito próximos. E, por essas características somadas à sua atividade, a amostra foi escolhida para o isolamento dos compostos.

A verificação de polaridades das substâncias – perfil cromatográfico - é importante para definir o passo seguinte em corridas cromatográficas, este dependerá exclusivamente da interpretação do analista. A amostra “CHCl<sub>3</sub>” foi submetida a uma nova corrida para separação dos picos (Figura 30). Como o perfil cromatográfico desta fração apresentou compostos com tempos de retenção acima de 40 min, o novo gradiente escolhido foi 60% - 100% B (A - Água ultrapura, B – Metanol grau HPLC – taxa de 2%. min<sup>-1</sup>), durante 20 min. Obtendo-se então um cromatograma com todos os compostos de interesse, ajustado ao tempo proposto. Seguiu-se então para o passo de isolamento em CLAE semi-preparativa.

**Figura 30 – Cromatograma obtido para a fração clorofórmio para novo método de separação.**



Fonte: Autor, 2013.

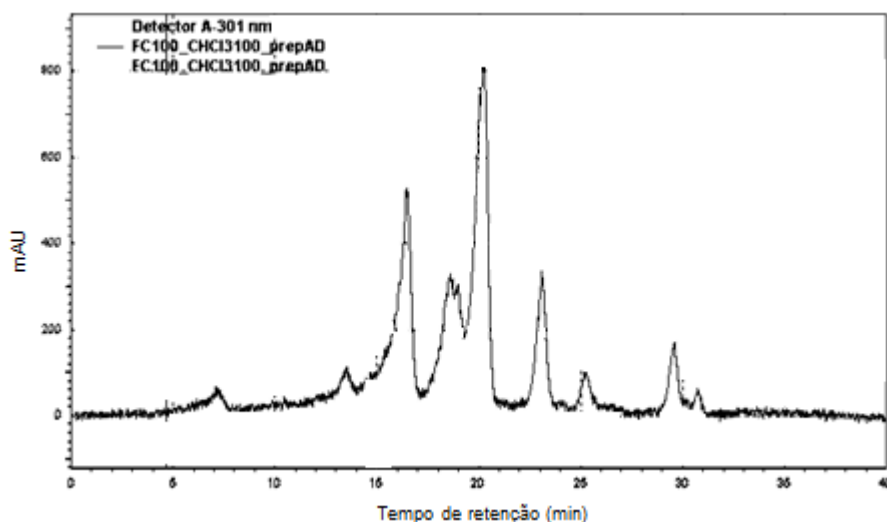
#### 2.4.2.2 Isolamento em coluna semi-preparativa

Tendo em vista que na cromatografia em coluna aberta não foi possível o isolamento de substâncias na planta em estudo, optamos pelo uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o isolamento.

Após verificação, em escala analítica, da melhor condição da amostra em análise, repetimos o gradiente em escala semi-preparativa, aumentando o tempo de análise, de 20 min para 30 min, visto que, com maior quantidade injetada de amostra (2 mL) perde-se um pouco a sensibilidade do equipamento. Além disso, acrescentamos 10 min em corrida isocrática - 100% MeOH, para uma limpeza da coluna, permitindo que após a corrida seja novamente reestabelecida a condição inicial para nova injeção.

As frações coletadas em erlenmeyers foram as correspondentes aos picos observados (Figura 31). O objetivo de conseguir quantidade suficiente de substância para elucidação estrutural e teste moluscicida, levou a seguidas quatro corridas para o isolamento.

**Figura 31 – Cromatograma obtido para CLAE semi-preparativa do novo método de separação.**



Fonte: Autor, 2013.

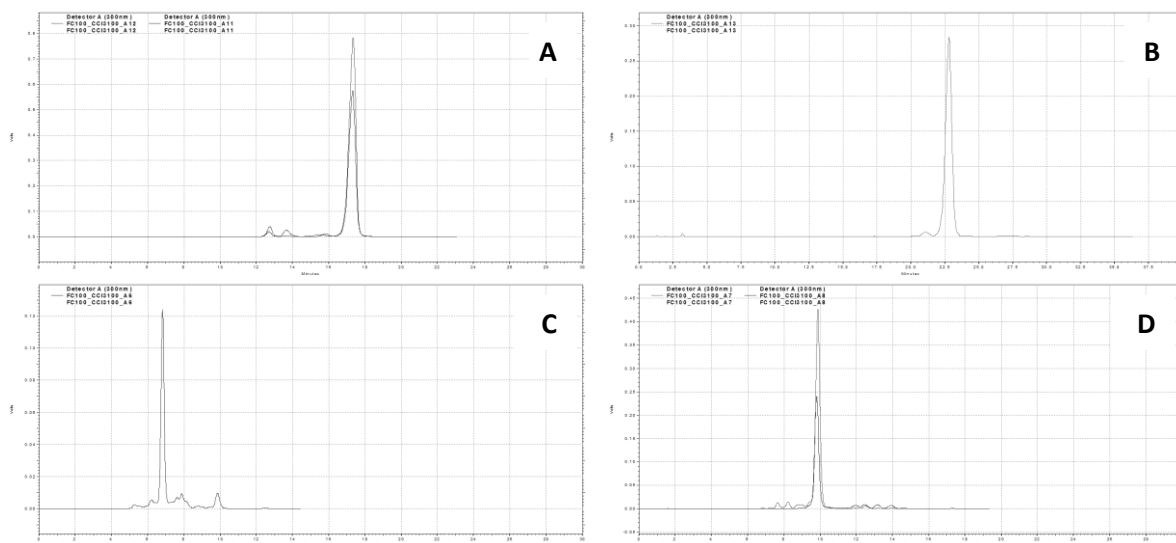
### 2.4.2.3 Substâncias isoladas

Todas as frações coletadas foram injetadas, coluna analítica C8, em corrida isocrática (40:60 – Água:MeOH), fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, comparadas e reunidas as semelhantes, conforme tempo de retenção, além disso verificadas quanto a pureza, já que o fracionamento foi realizado manualmente. As frações isoladas foram identificadas como SMC1, SMC2, SMC3 e SMC4.

Após isolamento das amostras em sistema semi-preparativo é importante verificar a pureza das frações recolhidas, para, se necessário, realizar procedimento de purificação.

Na Figura 32 (A), (B), (C) e (D) encontram-se os cromatogramas das substâncias isoladas, SMC1, SMC2, SMC3 e SMC4, respectivamente.

**Figura 32 – Cromatogramas de reinjeção de compostos após CLAE semi-preparativa. (A) SMC1; (B) SMC2; (C) SMC3 e (D) SMC4**



Fonte: Autor, 2013.

### 2.4.3 Elucidação Estrutural

A substância codificada como SMC1 foi analisada por RMN uni e bidimensionais, verificando que se trata da furanocumarina Felopterina encontrada também na subfração CHCl<sub>3</sub>:ACOEt 2%, conforme descrito por Cambui (2012). De maneira análoga ocorreu com a SMC3, descrita como alcaloide furoquinolínico

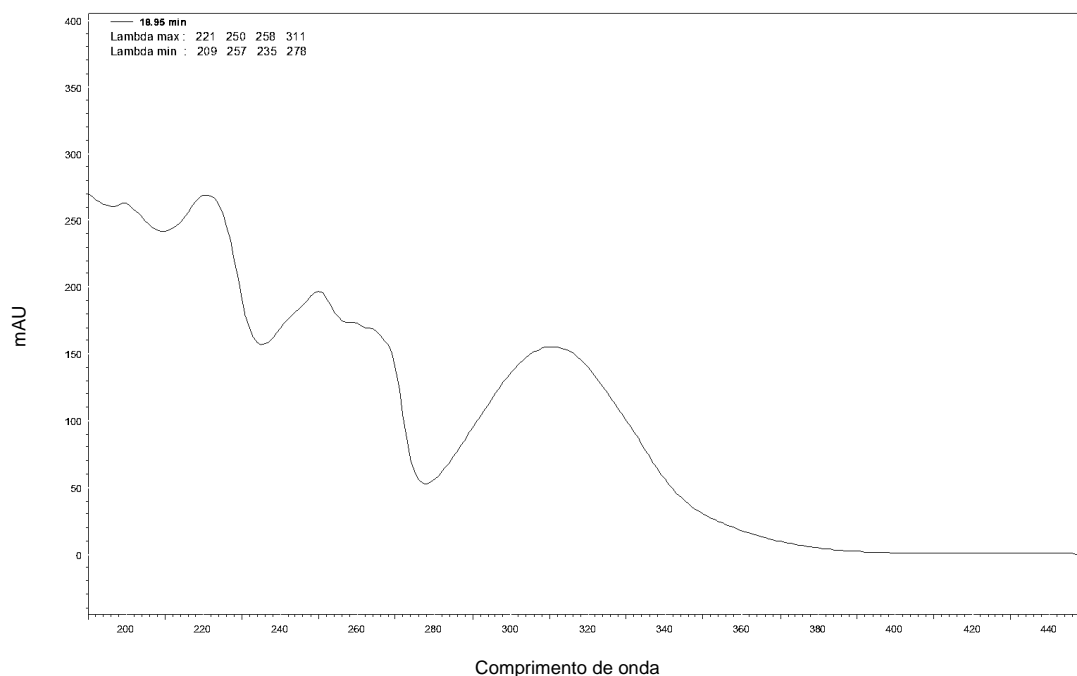
Esquimianina. A substância SMC4 não foi isolada em quantidade suficiente para obter espectros RMN de boa intensidade de sinal.

A substância SMC2 passou por análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopias de Ultravioleta (UV), Infravermelho (IV) e raio X.

#### 2.4.3.1 Espectroscopia na região do Ultravioleta (UV)

Para a molécula SMC2 isolada, os comprimentos de onda máximo observados em MeOH foram 221 nm, 250 nm e 311 nm conforme Figura 33.

**Figura 33 – Espectro na região Ultravioleta obtido para a amostra SMC2.**



Fonte: Autor, 2013.

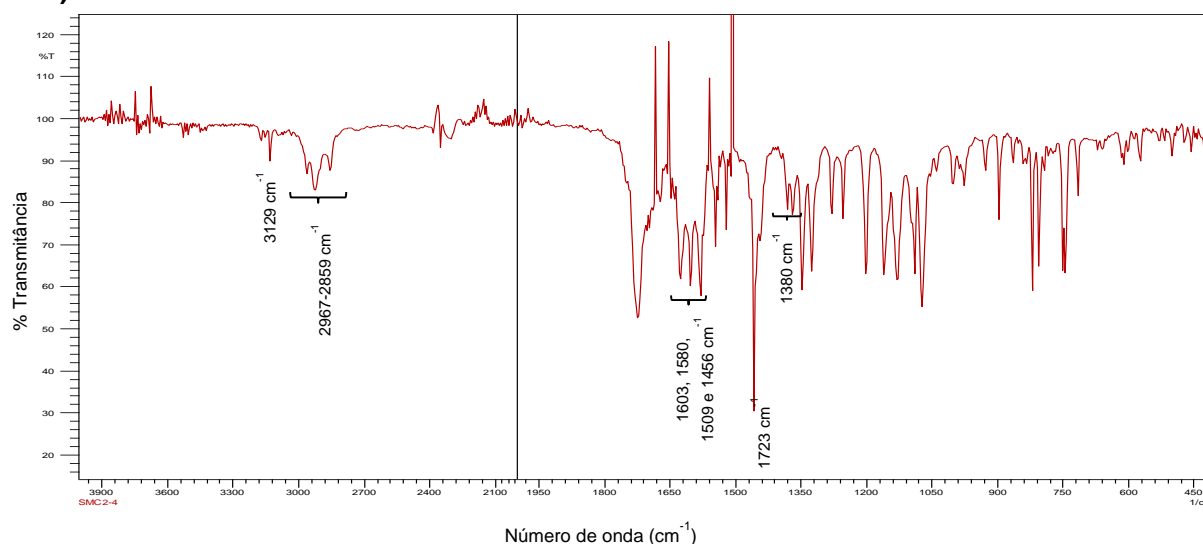
Espectros de ultravioleta similares obtidos por Yang et al., 2000 e Liu, Li e Sun, 2004 referem-se a uma furanocumarina linear. Moon et al., 2011 encontrou  $\lambda_{\text{máx}}$  MeOH 221, 249 e 309 nm e Cho et al. (2006), de maneira similar, 220, 249 e 309 nm também para a furanocumarina.



### 2.4.3.2 Espectroscopia da região do Infravermelho (IV)

Na Figura 34 encontra-se o espectro na região do Infravermelho obtido para o composto codificado como SMC2.

**Figura 34 – Espectro na região do Infravermelho (IV) por reflectância total atenuada (ATR) de SMC2.**



Fonte: Autor, 2013.

A banda de absorção equivalente ao estiramento  $\nu(\text{C-O})$  de carbonila é observada em  $1723 \text{ cm}^{-1}$ .

As bandas de absorção entre  $2967\text{-}2859 \text{ cm}^{-1}$  são características de estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) e estiramento assimétrico ( $\nu_{as}$ ) de C-H. Em  $1380 \text{ cm}^{-1}$  e  $1369 \text{ cm}^{-1}$  refere-se a  $\delta_s(\text{C-H})$  de metila, duas bandas de absorção sugerem a existência de dois grupos metila ligados ao mesmo carbono.

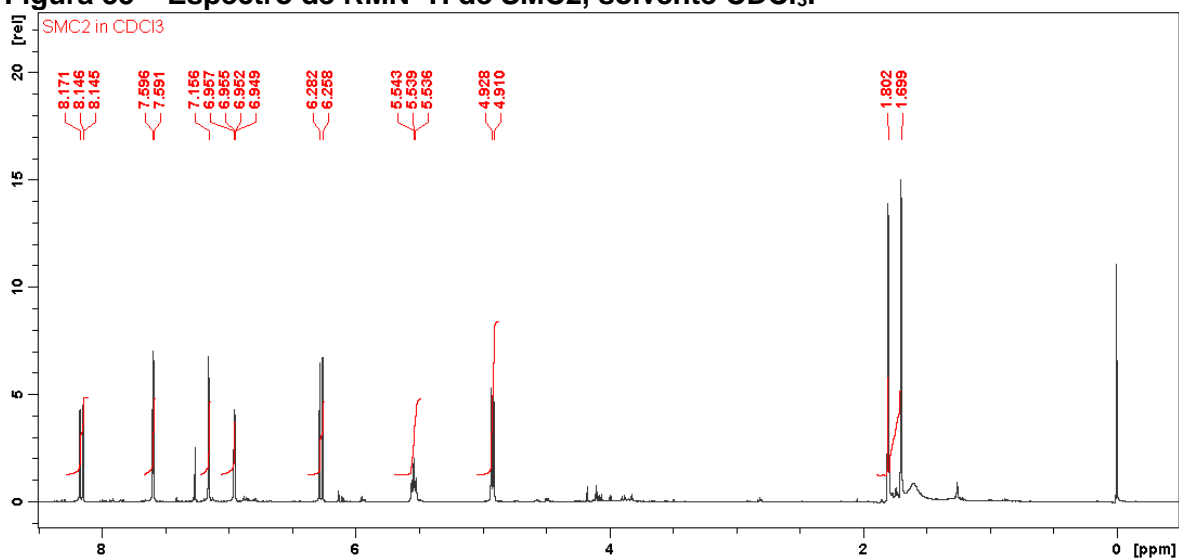
A presença da banda de estiramento  $\nu(\text{C-H})$  em  $3129 \text{ cm}^{-1}$  sugere a presença de insaturação, que é confirmada com a banda em  $1625 \text{ cm}^{-1}$  referente ao  $\nu(\text{C=C})$ , em  $819 \text{ cm}^{-1}$  uma banda de média intensidade  $\delta_{as}(\text{C=C})$  sugere que o padrão de substituição seja de dupla ligação trissubstituída. Bandas de estiramento de aromático substituído  $\nu(\text{C=C})$  também são observadas em  $1603 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1580 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1509 \text{ cm}^{-1}$  e  $1456 \text{ cm}^{-1}$ .

As bandas presentes sugerem uma cumarina, já que Nielsen e Lemmich (1964) sugeriram as bandas de absorção características de cumarinas como  $1719\text{-}1736$ ,  $1624$ ,  $1584$ ,  $1495$  e  $1459 \text{ cm}^{-1}$  para a nossa molécula teríamos  $1723$ ,  $1625$ ,  $1580$ ,  $1509$  e  $1456 \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

No espectro de  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  (Figuras 35-38), são observados nove sinais. Em  $\delta$  5,539 ppm (1H, m) sugere-se um hidrogênio ligado a carbono  $\text{sp}^2$ , um duplete em  $\delta$  4,918 ppm (2H,  $J = 7,07$  Hz), que indica uma aproximação do hidrogênio com átomo eletronegativo, devido ao efeito de desblindagem. A primeira constante de acoplamento ( $J$ ) observada para o multipeto foi 7,07 Hz, que coincide com a observada para o sinal em  $\delta$  4,918 ppm, indicando uma proximidade entre os carbonos ligados a esses hidrogênios ( $\delta$  5,539 ppm e  $\delta$  4,918 ppm). Também foram observados dois simpletos em  $\delta$  1,699 ppm e em  $\delta$  1,802 ppm (3H cada) referindo-se a metilas ligadas a carbono desprotonado. O conjunto acima sugere a presença de grupo prenila ligada a um átomo eletronegativo, possivelmente oxigênio.

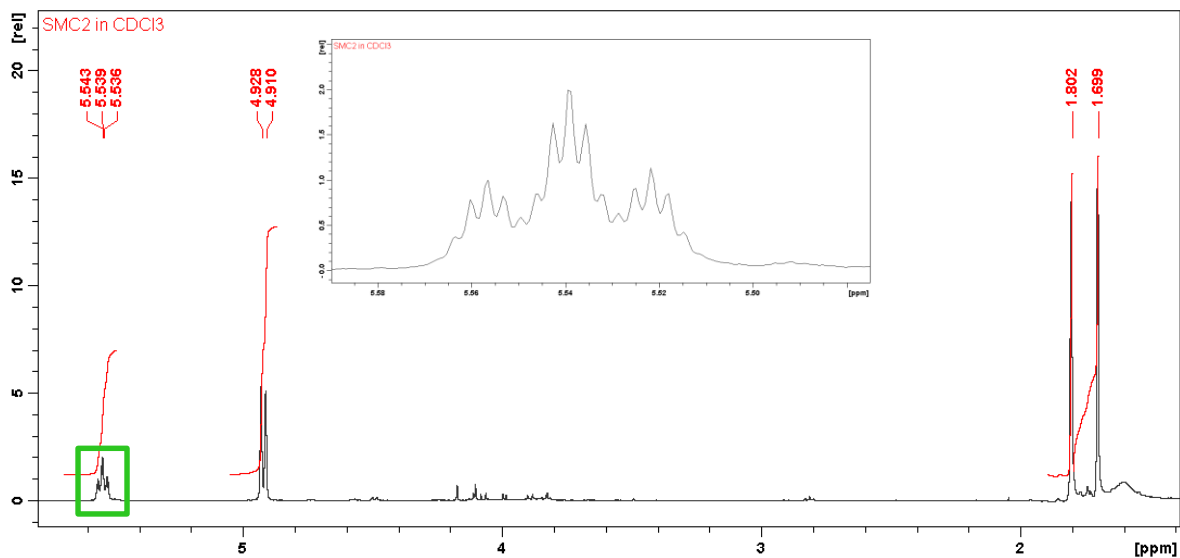
**Figura 35 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SMC2, solvente  $\text{CDCl}_3$ .**



Fonte: Autor, 2013.

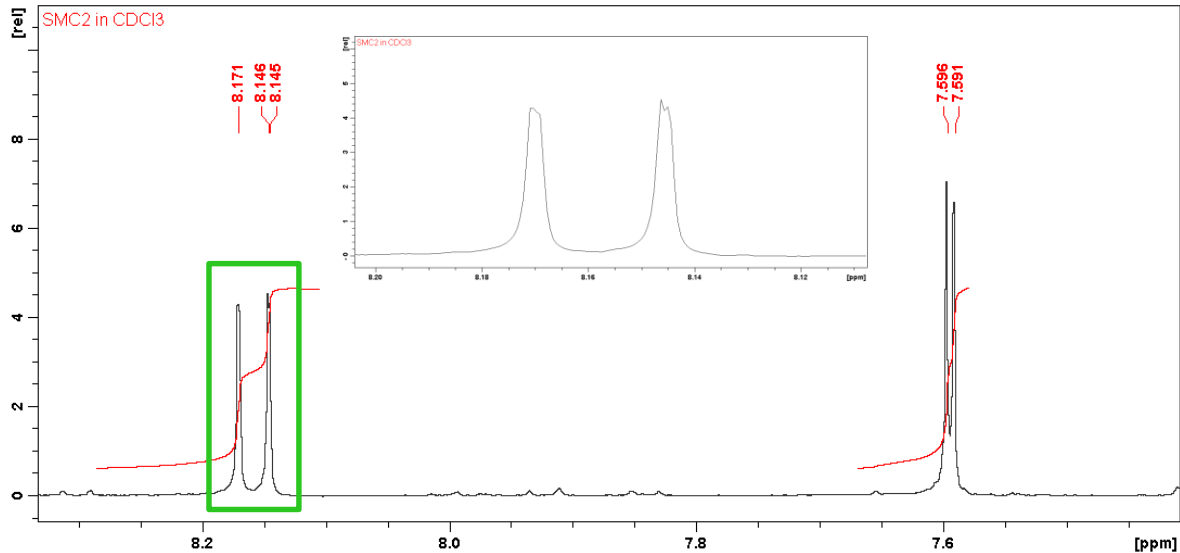
Foram observados ainda (Figuras 36 - 38) cinco sinais para hidrogênios aromáticos: dois duplos dupletos em  $\delta$  8,159 ppm (1H,  $J = 9,85$ ; 0,50 Hz) e  $\delta$  6,953 ppm (1H,  $J = 2,30$ ; 1,00 Hz), dois dupletos em  $\delta$  7,593 ppm (1H,  $J = 2,30$  Hz) e em  $\delta$  6,270 ppm (1H,  $J = 9,85$  Hz) e ainda um sinal em  $\delta$  7,156 ppm (1H, t,  $J = 0,50$  Hz).

Figura 36 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SMC2, com ampliação do multipeto em  $\delta$  5,539 ppm.



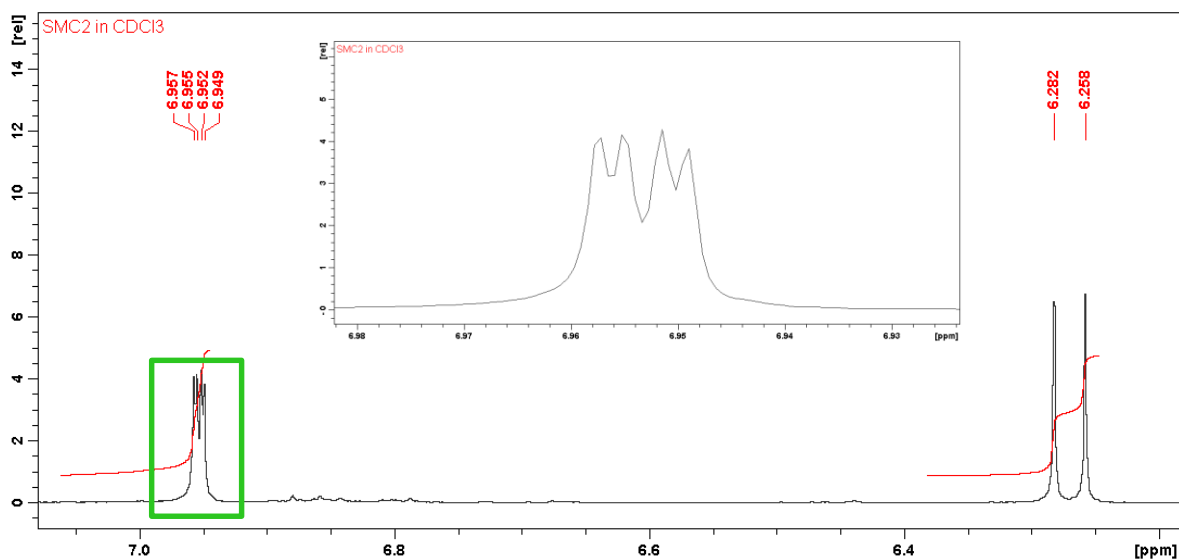
Fonte: Autor, 2013.

Figura 37 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SMC2, com ampliação do duplo duplete em  $\delta$  8,159 ppm.



Fonte: Autor, 2013.

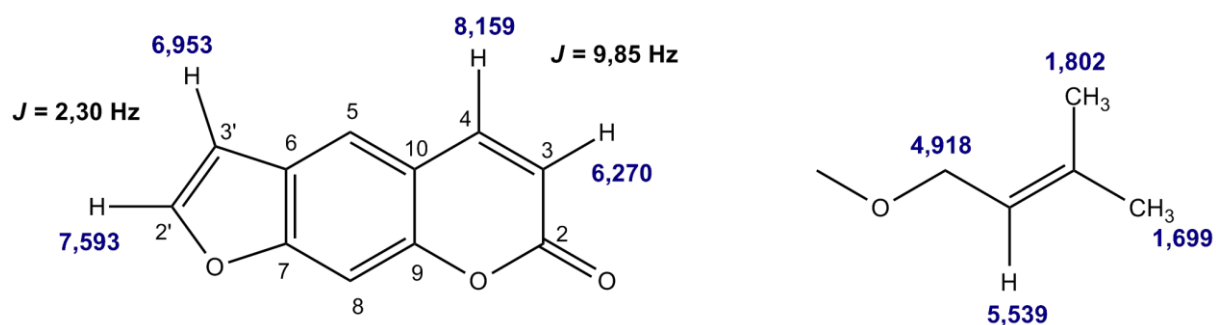
**Figura 38 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de SMC2, com ampliação do duplo duplete em δ 6,953 ppm.**



Fonte: Autor, 2013.

O valor da primeira constante de acoplamento registrada para δ 8,159 ppm (1H,  $J = 9,85; 0,50$  Hz) e δ 6,270 ppm (1H,  $J = 9,85$  Hz), sugere acoplamento em *orto* o qual é comparado com o observado em anel pirona de cumarinas e furanocumarinas (CHO et al., 2006). O duplete em δ 7,593 ppm (1H,  $J = 2,30$  Hz) e o duplo duplete em δ 6,953 ppm (1H,  $J = 2,30; 1,00$  Hz) são sinais característicos ainda de sistemas aromáticos, o valor da constante de acoplamento retoma aos valores de anel furano. A partir dos dados apresentados sugere-se uma furanocumarina e um grupo prenila ligado a um átomo eletronegativo, restando definir qual a posição da prenila (H-5 ou H-8) (Figura 39).

**Figura 39 – Partes da estrutura de SMC2 a partir de dados encontrados através de <sup>1</sup>H. (Valores de deslocamento em ppm).**

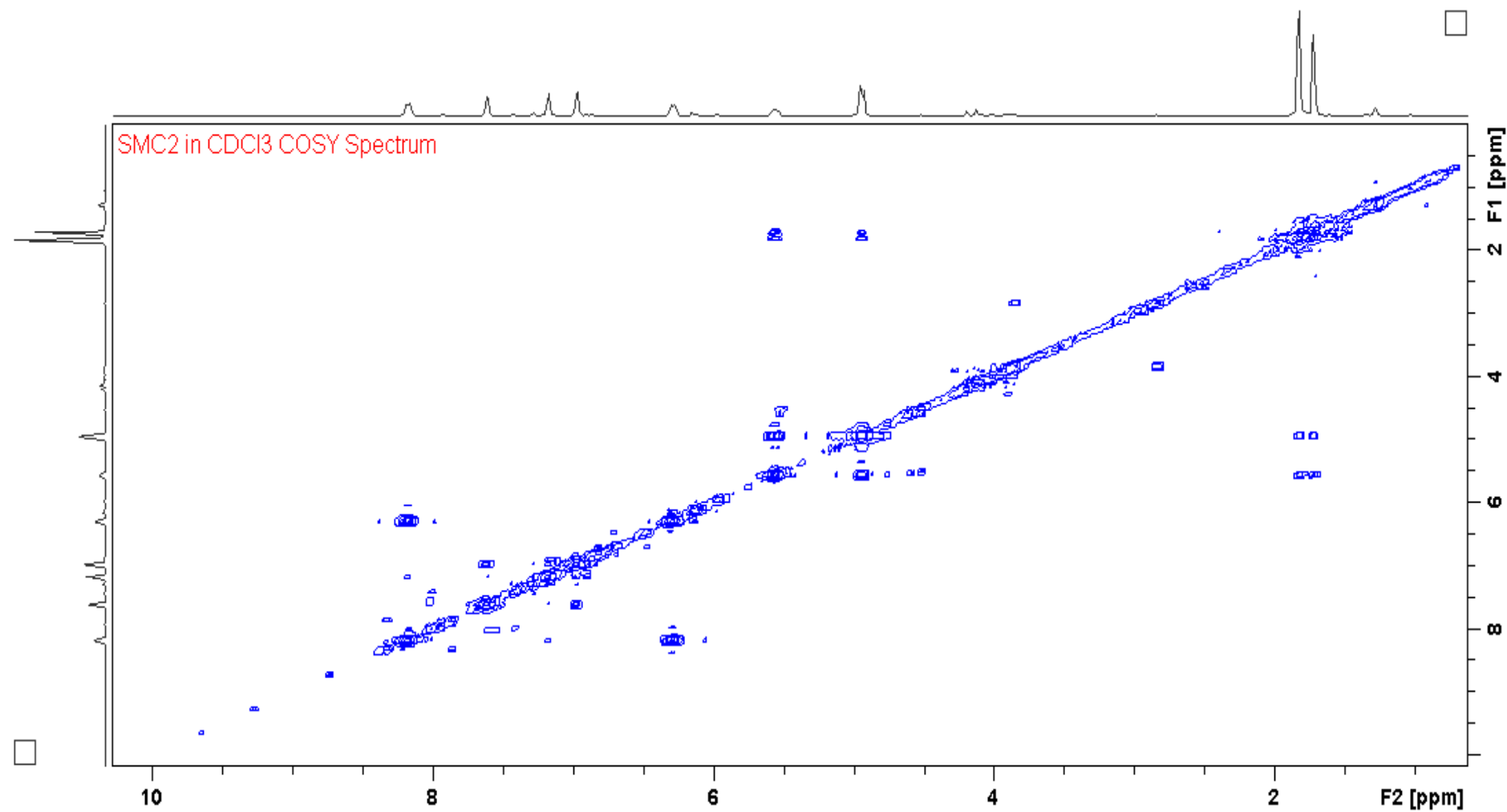


Fonte: Autor, 2013.

O duplo duplete, observado no espectro de  $^1\text{H}$  em  $\delta$  8,159 ppm (1H,  $J = 9,85$ ; 0,50 Hz) e o duplete em  $\delta$  6,270 ppm (1H,  $J = 9,85$  Hz) foram atribuídos aos H-4 e H-3 do anel pirona. Caso C-5 fosse protonado os valores aproximados de H-4 e H-3 seriam de  $\delta$  7,90 ppm e  $\delta$  6,50 ppm, segundo Pavia et al. (2010). A desblindagem do hidrogênio em H-4 ocorre devido à ausência do hidrogênio em C-5 (PEREL'SON; SHEINKER; SYROVA, 1971; BAEK et al., 2000; CHO et al., 2006). Possivelmente, a prenha com o átomo de oxigênio está ligada ao C-5, e o sinal observado em  $\delta$  7,156 ppm (1H, t,  $J = 0,50$  Hz) refere-se ao H-8.

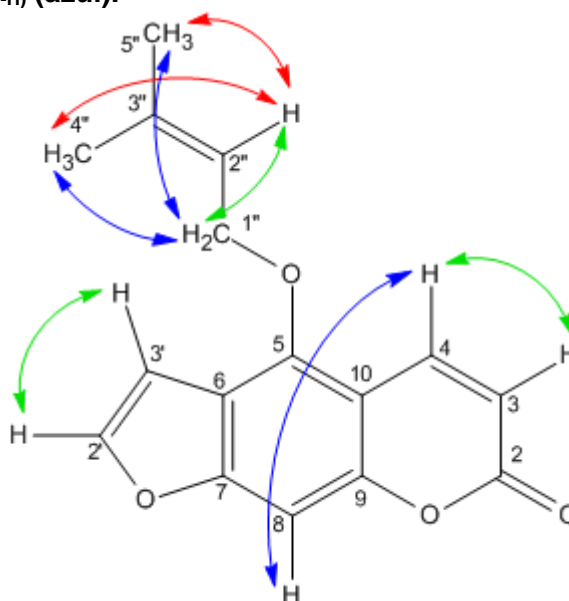
Para o espectro bidimensional COSY (Figura 40), observamos correlações homonucleares H-H a 2-3 ligações. São observadas correlações entre os hidrogênios do sistema aromático:  $\delta$  6,270 ppm com  $\delta$  8,159 ppm ( $^3J$ ), bem como para  $\delta$  7,593 ppm e  $\delta$  6,953 ppm; entre  $\delta$  8,159 ppm (H-4) e  $\delta$  7,156 ppm (H-8) também existe correlação homonuclear (Figura 41). Segundo Baek et al. (2000) é possível, em furanocumarinas lineares, o acoplamento a longa distância ( $^5J$ ) entre H-8 e H-4, H-2' ou H-3', o valor da constante para o acoplamento entre H-3' e H-8 deve ser entre 0,5 e 1,0 Hz (BERLINCK, 2013). Para H-1'' temos correlação com H-5'' e H-4'' ambos  $^5J$  e H-2'' ( $^3J$ ). H-2'' acopla com H-5'' e H-4'', ambos  $^4J$ .

Figura 40 – Espectro de RMN 2D COSY de SMC2, solvente CDCl<sub>3</sub>.



Fonte: Autor, 2013.

**Figura 41 – Correlações  $^nJ_{(H-H)}$  observadas no espectro 2D COSY de SMC2.  $^3J_{(H-H)}$  (verde),  $^4J_{(H-H)}$  (vermelho) e  $^5J_{(H-H)}$  (azul).**

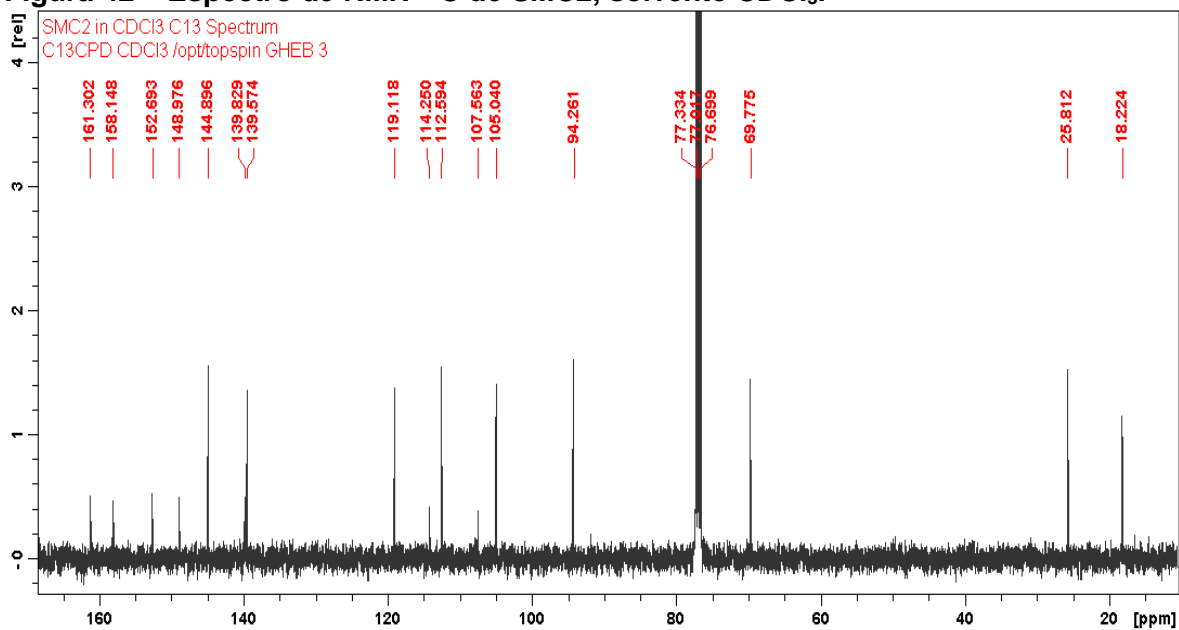


Fonte: Autor, 2013.

O sinal em  $\delta$  5,539 ppm (1H, t) refere-se ao hidrogênio metínico de H-2'', enquanto o duplete em  $\delta$  4,918 ppm (2H,  $J = 7,07$  Hz), refere-se a H-1'', cujo valor de deslocamento deixa clara a ligação com oxigênio, causando a desblindagem do hidrogênio. Os simpletos  $\delta$  1,699 ppm e  $\delta$  1,802 ppm (3H cada) são atribuídos a H-5'' e H-4''. O sinal registrado em  $\delta$  7,156 ppm (1H, t) de hidrogênio aromático atribuído a H-8 confirma a interação com H-4, observada pelo desdobramento do sinal, além da correlação observada no espectro COSY.

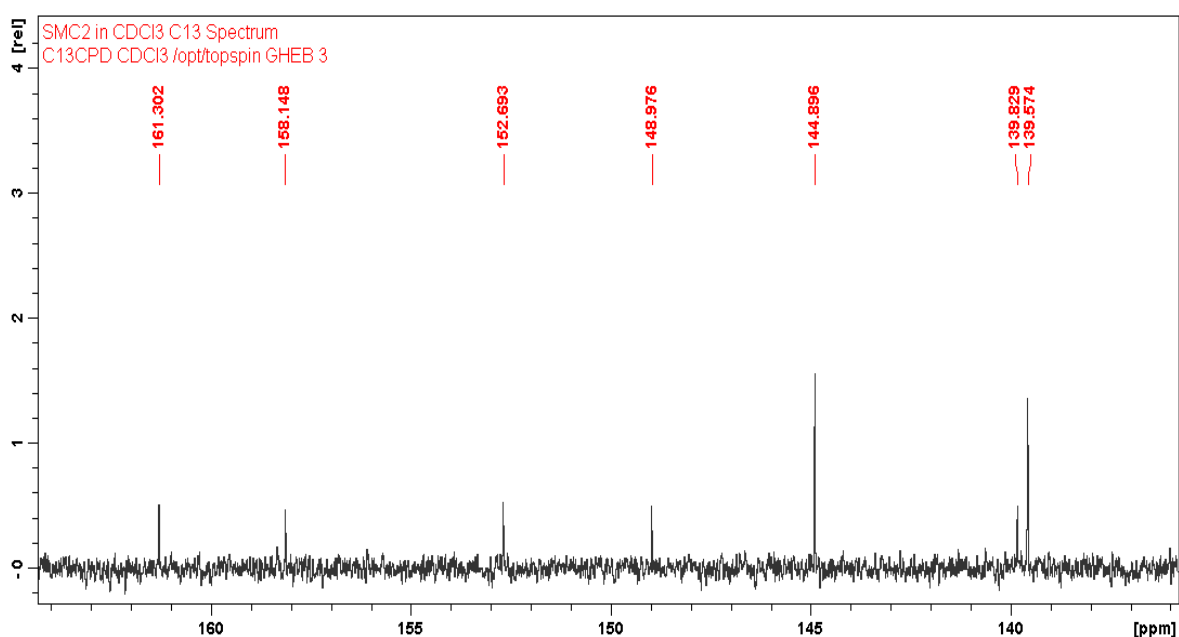
A partir dos dados obtidos em RMN  $^{13}C$  (Figura 42) verificamos a presença de 16 átomos de carbono, incluindo um carbono de carbonila em  $\delta$  161,30 ppm.

Figura 42 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de SMC2, solvente  $\text{CDCl}_3$ .



Fonte: Autor, 2013.

Figura 43 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de SMC2, solvente  $\text{CDCl}_3$ , ampliação da região com deslocamentos entre 135-170 ppm.



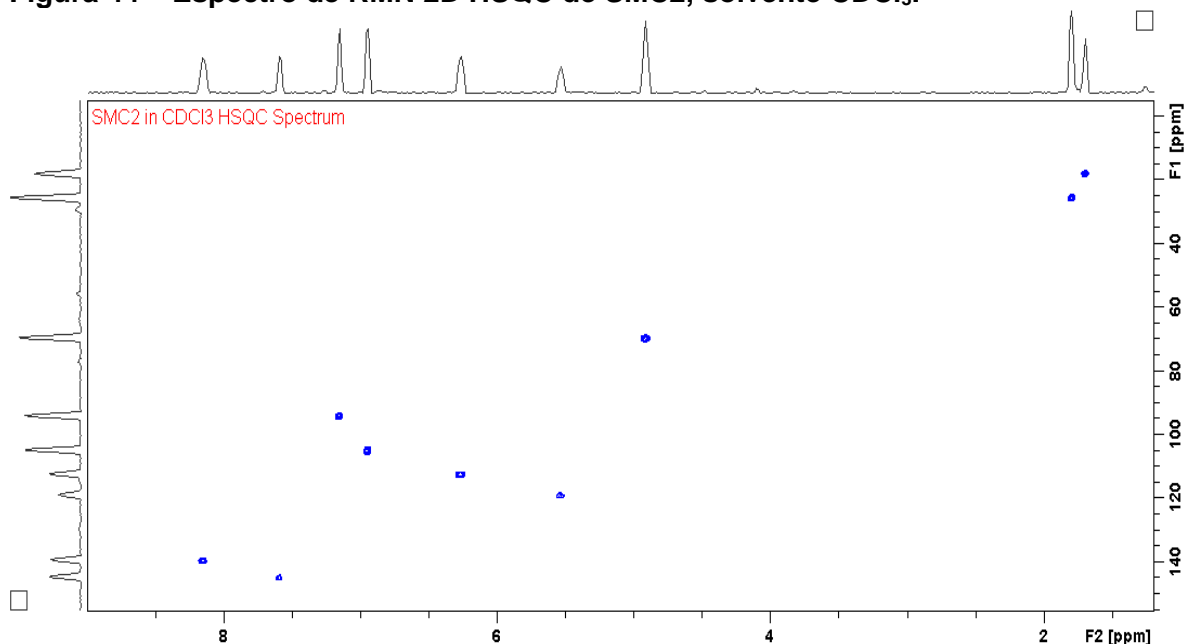
Fonte: Autor, 2013.

Entretanto, somente através do espectro HSQC (Figura 44) as correlações diretas foram atribuídas. Foi detectado que carbonos metílicos em  $\delta$  18,22 ppm e  $\delta$  25,81 ppm, estão ligados, respectivamente, aos hidrogênios em  $\delta$  1,70 ppm e  $\delta$  1,80 ppm. Observou-se que carbono metilênico  $\delta$  69,77 ppm encontra-se ligado ao



hidrogênio em  $\delta$  4,91 ppm. Os carbonos metínicos dos anéis aromáticos apresentam as seguintes conexões diretas com seus hidrogênios: em  $\delta$  94,26 ppm ( $\delta$  7,15 ppm),  $\delta$  105,04 ppm ( $\delta$  6,95 ppm),  $\delta$  112,59 ppm ( $\delta$  6,26 ppm),  $\delta$  139,57 ppm ( $\delta$  8,15 ppm) e  $\delta$  144,89 ppm ( $\delta$  7,59 ppm) e o carbono da dupla ligação em  $\delta$  119,11 ppm ( $\delta$  5,54 ppm). Foi possível identificar ainda os carbonos desprotonados  $\delta$  107,56 ppm,  $\delta$  114,25 ppm,  $\delta$  139,82 ppm,  $\delta$  148,97 ppm,  $\delta$  152,69 ppm e  $\delta$  158,14 ppm.

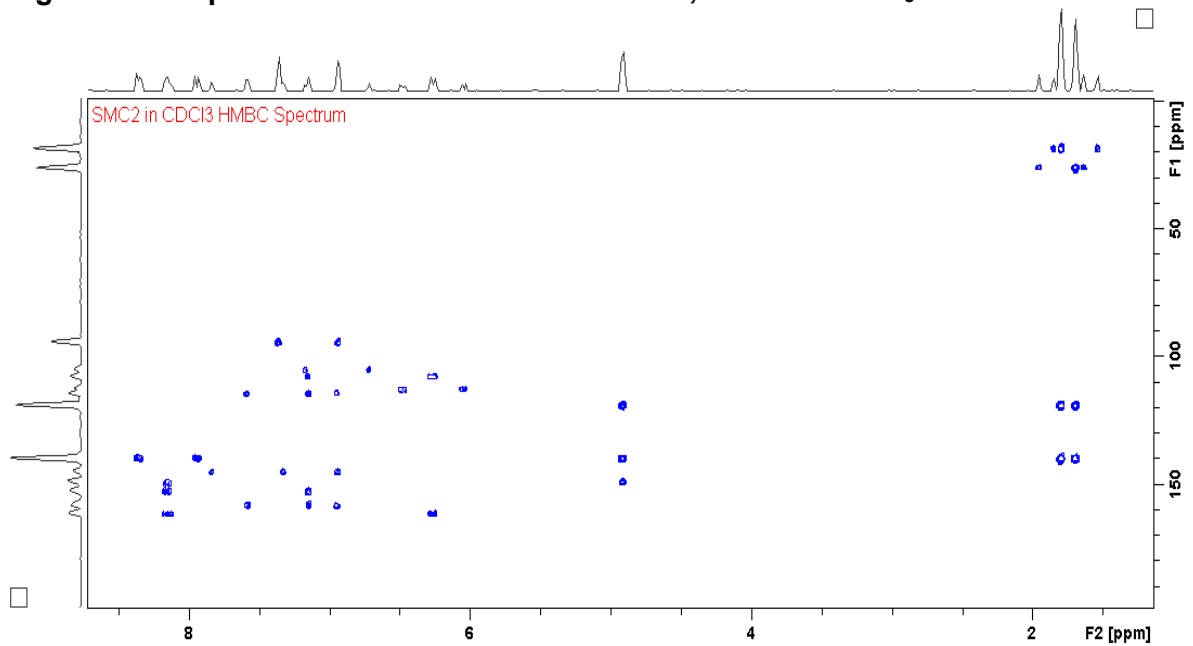
**Figura 44 – Espectro de RMN 2D HSQC de SMC2, solvente CDCl<sub>3</sub>.**



Fonte: Autor, 2013.

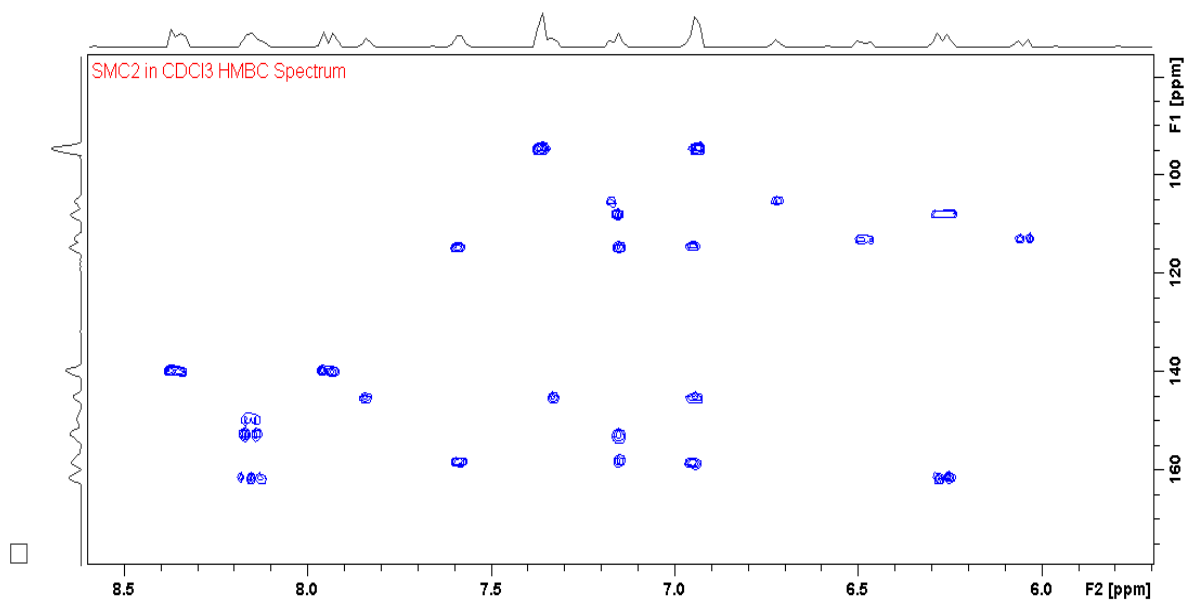
Através do espectro HMBC (Figuras 45 e 46) foi possível observar correlações a longa distância  $^nJ_{C-H}$ . C-5 apresenta correlação com H-1'' e H-4, ambos a 3 ligações, C-6 com H-3' ( $^2J$ ), H-8 ( $^3J$ ) e H-2' ( $^3J$ ), C-7 com H-3' ( $^3J$ ), H-8 ( $^2J$ ) e H-2' ( $^3J$ ). Ainda no anel benzênico temos C-9, próximo a H-8 (7,156 ppm,  $^2J$ ) e H-4 ( $\delta$  8,159 ppm,  $^3J$ ) e C-10 próximo a H-3 ( $\delta$  6,270 ppm,  $^3J$ ) e H-8 ( $\delta$  7,156 ppm,  $^3J$ ). No anel furano C-2'' mostra correlação com H-3' ( $^2J$ ). Para a prenila observa-se as seguintes correlações: C-2'' com H-5'' ( $^3J$ ), H-4'' ( $^3J$ ) e H-1'' ( $^2J$ ), C-3'' com H-5'' ( $^2J$ ), H-4'' ( $^2J$ ) e H-1'' ( $^3J$ ), já C-4'' com H-5'' ( $^3J$ ) e C-5'' com H-4'' ( $^3J$ ). As correlações estão ilustradas na Figura 47.

Figura 45 – Espectro de RMN 2D HMBC de SMC2, solvente CDCl<sub>3</sub>.



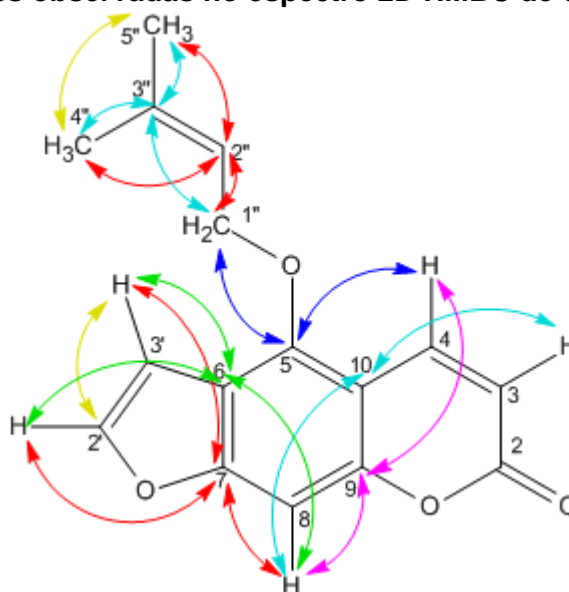
Fonte: Autor, 2013.

Figura 46 – Espectro de RMN 2D HMBC de SMC2, solvente CDCl<sub>3</sub>, com expansão.



Fonte: Autor, 2013.

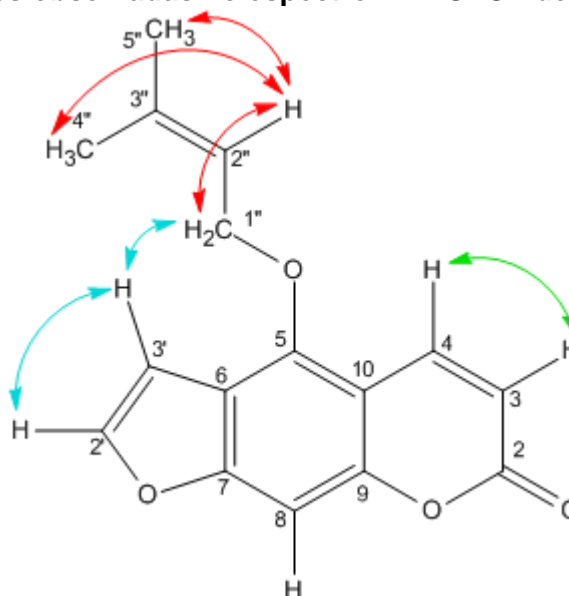
**Figura 47 – Correlações observadas no espectro 2D HMBC de SMC2.**



Fonte: Autor, 2013.

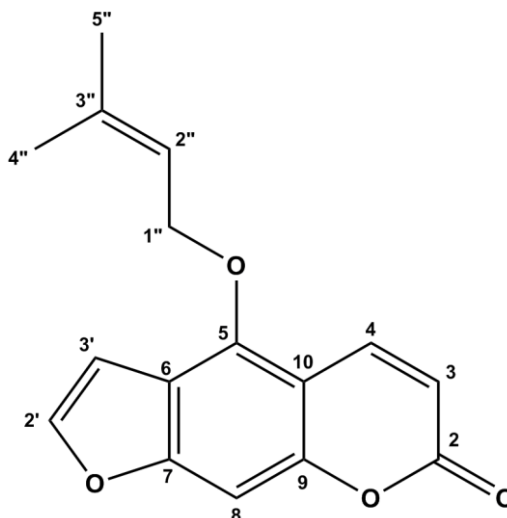
Os sinais observados através do espectro NOESY apresentam correlações homonucleares espaciais e estão ilustradas na Figura 48. A correlação apresentada entre H-3' e H-1'' confirma a substituição da prenila em C-5, confirmando a estrutura proposta, uma furanocumarina denominada Isoimperatorina (Figura 49).

**Figura 48 – Correlações observadas no espectro 2D NOESY de SMC2.**



Fonte: Autor, 2013.

Figura 49 – Isoimperatorina, SMC2.



Fonte: Autor, 2013.

A substância isolada isoimperatorina têm demonstrado atividade anti-inflamatória, antiespasmódica (SHI et al., 2013), efeito analgésico (CHEN; TSA; WU, 1995), hepatotetor contra a AFB1 (Aflatoxina B1), inibindo significativamente o efeito citotóxico da toxina (POKHAREL et al., 2006). Apresentou potencial no tratamento de doenças do sistema nervoso central (LILI et al., 2013) e para reduzir a ansiedade (KUMAR et al., 2013). Trata-se de uma cumarina em crescente estudo, encontrada principalmente em plantas das famílias Umbelliferae, como *Angelica dahurica* (WANG; CHEN; HE, 2007), *Angelica archangelica* (KUMAR et al., 2013), *Angelica pubescens* (CHEN; TSA; WU, 1995), *Apium graveolens* (GARG; GUPTA; SHARMA, 1979) *Radix angelical dahuricae* (CHEN et al., 2013) e *Cicuta virosa* (TIAN; ZANG; XU, 2013) e família Rutaceae como em *Ruta graveolens* (SAMPAIO, 2012), *Poncirus trifoliata* (POKHAREL et al., 2006), *Skimmia japonica* (ATKINSON; BOYD; GRUNDON, 1974) e *Cneoridium dumosum* (DREYER; LEE, 1969).

Na Tabela 10 está o resumo dos dados, encontrados através dos espectros de RMN para o composto codificado como SMC2.

**Tabela 10 – Dados de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC, COSY e NOESY. (δ, deslocamento químico, ppm; J, Hz) para SMC2.**

H/C	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	HMBC	COSY		NOESY	
			δ <sup>1</sup> H	δ <sup>1</sup> H	δ <sup>1</sup> H	δ <sup>1</sup> H	δ <sup>1</sup> H
2	161,30	-					
3	112,59	6,270 (1H, d, J = 9,85 Hz)		6,270 (H-3)	8,159 (H-4)	6,270 (H-3)	
4	139,57	8,159 (1H, dd, J = 9,85 Hz; J = 0,50 Hz)		8,159 (H-4)	6,270 (H-3); 7,156 (H-8)	8,159 (H-4)	6,270 (H-3)
5	148,97	-	4,918 (H-1''); 8,159 (H-4)				
6	114,25	-	6,953 (H-3'); 7,156 (H-8); 7,593 (H-2')				
7	158,14	-	6,953 (H-3'); 7,156 (H-8); 7,593 (H-2')				
8	94,26	7,156 (1H, t, J = 0,50 Hz)		7,156 (H-8)	8,159 (H-4)		
9	152,69	-	7,156 (H-8); 8,159 (H-4)				
10	107,56	-	6,270 (H-3); 7,156 (H-8)				
2'	144,89	7,593 (1H, d, J = 2,30 Hz)	6,953 (H-3')	7,593 (H-2')	6,953 (H-3')	7,593 (H-2')	6,953 (H-3')
3'	105,04	6,953 (1H, dd, J = 2,30 Hz; J = 1,00 Hz)		6,953 (H-3')	7,593 (H-2')	6,953 (H-3')	4,918 (H-1'')
1''	69,77	4,918 (2H, d, J = 7,07 Hz)		4,918 (H-1'')	1,699 (H-5''); 1,802 (H-4''); 5,539 (H-2'')	4,918 (H-1'')	1,699 (H-5'')
2''	119,11	5,539 (1H, m, J = 7,07 Hz)	1,699 (H-5''); 1,802 (H-4''); 4,918 (H-1'')	5,539 (H-2'')	1,699 (H-5''); 1,802 (H-4''); 4,918 (H-1'')	5,539 (H-2'')	1,802 (H-4''); 4,918 (H-1'')
3''	139,82	-	1,699 (H-5''); 1,802 (H-4''); 4,918 (H-1'')				
4''	25,81	1,802 (3H, s)	1,699 (H-5'')	1,802 (H-4'')	4,918 (H-1''); 5,539 (H-2'')	1,802 (H-4'')	
5''	18,22	1,699 (3H, s)	1,802 (H-4'')	1,699 (H-5'')	4,918 (H-1''); 5,539 (H-2'')	1,699 (H-5'')	

Fonte: Autor, 2013.

Confirmados os dados obtidos com a estrutura proposta, devido às correlações obtidas com os espectros bidimensionais, os dados foram então comparados aos encontrados na literatura (Tabela 11).

**Tabela 11 – Comparação dos dados obtidos por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com a literatura para SMC2.**

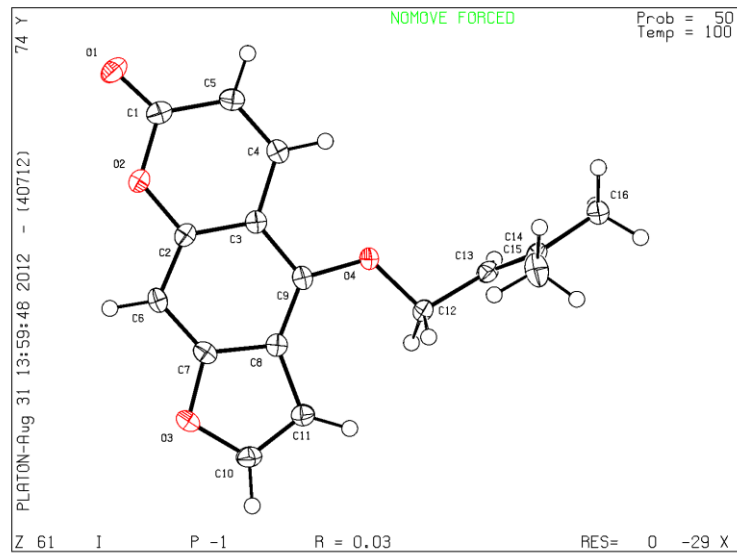
H/C	SMC2 ( $\text{CDCl}_3$ )		Cho et al., (2006) (500/75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )		Moon et al., (2011) (400/100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm)
2	-	161,30	-	161,26	-	161,5
3	6,270 (1H, d, $J=9,85$ )	112,59	6,27 (1H, d, $J=9,76$ )	112,55	6,27 (1H, d, $J=10$ )	112,8
4	8,159 (1H, dd, $J=9,85$ ; $J=0,50$ )	139,57	8,15 (1H, d, $J=9,76$ )	139,55	8,15 (1H, d, $J=10$ )	139,8
5	-	148,97	-	148,95	-	149,2
6	-	114,25	-	114,20	-	114,4
7	-	158,14	-	158,12	-	158,3
8	7,156 (1H, t, $J=0,50$ )	94,26	7,16 (1H, s)	94,21	7,16 (1H, s)	94,4
9	-	152,69	-	152,66	-	152,9
10	-	107,56	-	107,52	-	107,7
2'	7,593 (1H, d, $J=2,30$ )	144,89	7,60 (1H, d, $J=2,45$ )	144,87	7,60 (1H, d, $J=2,4$ )	145,1
3'	6,953 (1H, dd, $J=2,30$ ; $J=1,00$ )	105,04	6,96 (1H, d, $J=2,45$ )	105,02	6,96 (1H, d, $J=2,4$ )	105,3
1''	4,918 (2H, d, $J=7,07$ )	69,77	4,92 (2H, d, $J=6,99$ )	69,74	4,92 (2H, d, $J=7,2$ )	69,9
2''	5,539 (1H, m, $J=7,07$ )	119,11	5,54 (1H, m)	119,09	5,54 (1H, m)	119,3
3''		139,82		139,80		140,1
4''	1,802 (3H, s)	25,81	1,81 (3H, s)	25,79	1,80 (3H, s)	26,1
5''	1,699 (3H, s)	18,22	1,71 (3H, s)	18,20	1,70 (3H, s)	18,5

Fonte: Autor, 2013.

#### 2.4.3.4 Raio X

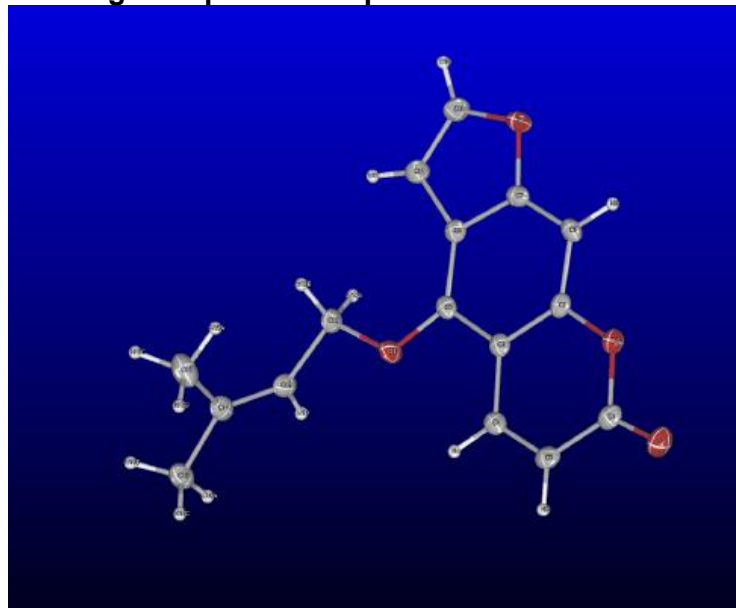
Para fins de confirmação estrutural foi realizada análise em equipamento de raio X. Os resultados obtidos encontram-se nas Figura 50 e Figura 51, mostrando a molécula da furanocumarina Isoimperatorina.

**Figura 50 – Análise de raio X para SMC2.**



Fonte: Autor, 2013.

**Figura 51 – Estrutura sugerida para SMC2 por análise em raio X.**



Fonte: Autor, 2013.

## 2.5 Considerações Finais

Após procedimentos cromatográficos e filtração em gel de sílica obteve-se as subfrações clorofórmio, clorofórmio-acetato 5%, clorofórmio-acetato 1:1 e metanol do caule de *Simaba maiana* Casar.

A subfração metanol apresentou-se ativa frente ao molusco *B. glabrata*, com CL<sub>50</sub> 16,82 ppm e CL<sub>90</sub> 63,68. Entretanto, a subfração clorofórmio, também ativa, com CL<sub>50</sub> 27,66 ppm e CL<sub>90</sub> 79,54 ppm, foi a selecionada para isolamento devido ao melhor perfil cromatográfico apresentado após análise por CLAE. As subfrações clorofórmio-acetato 5% e clorofórmio-acetato 1:1 não foram ativas para esse estudo.

A partir da subfração clorofórmio foram isolados, através de CLAE semi-preparativa, quatro compostos nomeados SMC1, SMC2, SMC3 e SMC4. Os isolados SMC1 e SMC3 já encontrados em estudos anteriores na mesma planta, foram identificados como a furanocumarina Felopterina e o alcaloide Esquimianina, respectivamente. A comparação foi realizada através dos espectros de RMN uni e bidimensionais. Não foi possível caracterizar SMC4 devido à pequena quantidade isolada e a não obtenção de espectros de RMN de boa resolução.

Para a substância denominada SMC2 foram realizadas análises por espectroscopias de ultravioleta (UV), infravermelho (IV), raio X e ressonância magnética nuclear (RMN), caracterizando-se como a furanocumarina linear Isoimperatorina.



---

**3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO TORMÊNTICO EM EXTRATOS DE *CECROPIA PACHYSTACHYA* TRÉCUL. (URTICACEAE)**

---

### **3.1 Objetivos**

#### **3.1.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e validar metodologia para quantificação, por CLAE, do ácido tormêntico no extrato de *Cecropia pachystachya* Trécul.

#### **3.1.2 Objetivo Específico**

Avaliar a extração do ácido tormêntico, por ultrassom, da raiz de *Cecropia pachystachya* Trécul.

Quantificar o ácido tormêntico na espécie *C. pachystachya*.

Validar o método de quantificação de ácido tormêntico por CLAE.

## 3.2 Referencial Teórico

### 3.2.1 O Gênero *Cecropia*

A procura por plantas para o tratamento das chamadas doenças tropicais levou a descoberta de muitas espécies ativas, dentre elas as do gênero *Cecropia*. Este gênero consiste de aproximadamente 100 espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, principalmente Argentina, Brasil, México e Paraguai (BERG; ROSSELLI, 2005; LUENGAS-CAICEDO et al., 2007; COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011; LI et al., 2013; PIO-CORRÊA, 1978).

O gênero *Cecropia*, inicialmente incluído na família Moraceae, manteve-se nessa família por conveniência, segundo Burger (1977), já que *Cecropia* estava “(...) mais estreitamente relacionado com o gênero de Urticaceae do que a outro Moraceae.” No fim da década de 70 passou a fazer parte da família Cecropiaceae, a partir de estudos realizados por Berg (1978), a nova família foi considerada intermediária entre Moraceae e Urticaceae (CARAUTA, 1980; LUENGAS-CAICEDO et al., 2007). Entretanto, após comparações morfológicas e estudos de DNA das plantas comprovaram que o gênero relaciona-se com a família Urticaceae (LUENGAS-CAICEDO et al., 2007; COSTA, 2009; SYTSMA et al., 2002).

As espécies deste gênero são conhecidas por diversos nomes populares, dentre eles, embaúba, imbaúba, umbaúba, embaúva, referente a “ambaíba” do tupi, que significa “tronco oco”. Na Colômbia e Equador “guarumo” e “yarumo”. No Peru “youngol” (BURGUER, 1977; LUENGAS-CAICEDO et al., 2007; COSTA, 2009).

A maioria das espécies é mirmecófila, habitadas por formigas principalmente do gênero *Azteca*, que ocupam os entrenós ocos (SPOSITO, 1994), entretanto, alguns autores não acreditam na relação mutualística onde a planta é beneficiada pela proteção contra herbívoros e as formigas com alimento. Santos (2000) afirma maior sobrevivência e expectativa de *C. glaziovii* que *C. holbleuca*, onde a última não vive em associação com formigas.

A nomenclatura das espécies do gênero *Cecropia* é atribuída ainda conforme a coloração das inflorescências: embaúba-vermelha (*C. glaziovii*), embaúba-branca (*C. palmata*) e embaúba-prateada (*C. pachystachya*) (COSTA, 2009; ROMANIUC NETO; GAGLIOTI; GUIDO, 2009).

O uso na medicina tradicional está associado, de maneira geral, nos tratamentos de doenças respiratórias, pressão arterial alta, controle da glicemia, no tratamento de diabetes mellitus e também como diurético (MORS et al., 2000; COSTA, 2009; LORENZI; MATOS, 2008; DI STASI et al., 2002).

Dentre as espécies do gênero *C. glaziovii* Sneth. e *C. pachystachya* Trécul. são abundantes na região Sul do país (COSTA, 2009). Algumas espécies serão brevemente descritas quanto a etnofarmacologia, atividades farmacológicas e constituintes químicos. No tópico seguinte será discutido um pouco mais a respeito de *Cecropia pachystachya* Trécul. já que o estudo foi realizado a partir desta espécie.

- *Cecropia peltata*

Na medicina popular é utilizada no tratamento de leucorréia e úlceras (FENNER et al., 2006), combate ao Mal de Parkinson, malária, combate a tosse (COSTA, 2009). As folhas são utilizadas contra tosse, bronquite e resfriado (DI STASI et al., 2002). Foi encontrado o ácido clorogênico em extratos da planta (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

- *Cecropia hololeuca* Miq.

Esta espécie não vive em associação com formigas (SPOSITO; SANTOS, 2001). Na medicina popular a espécie é utilizada como diurética, energética, no tratamento da leucorréia, afecções respiratórias, combate a asma, pressão alta (COSTA, 2009), diarreia, prostatite e cistite. Apresentou atividade antimicrobiana frente a *E. coli* enteropatogênica (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2011). Para essa espécie foram encontradas as substâncias orientina e isoorientina, catequina, epicatequina, procianidinas B2 e C1, além do ácido clorogênico (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

- *Cecropia schreberiana* Miq.

Foram encontrados triterpenoides como ácido pomólico, ácido tormêntico,  $\alpha$ -amirina e ácido arjunólico. Flavonas como vitexina, orientina e isoorientina. Além de Catequina, epicatequina, cinchonaina e procianidinas (LI et al., 2013).

- *Cecropia catharinensis* Cuatrecasas

As folhas são utilizadas popularmente no tratamento de bronquite, asma, insuficiência cardíaca além do uso como diurético e para lavagens vaginais. Foram isolados flavonoides das folhas e cumarinas nos caules e folhas (SIMÕES et al., 1989). Os triterpenos ácido o-acetilursólico, lupeol, ácido oleanólico, ácido  $2\alpha$ -acetóxi- $3\beta$ , $19\alpha$ -diidroxi-urs-12-eno-28-óico, ácido  $2\alpha$ , $3\beta$ , $19\alpha$ -triidroxi-urs-12-eno-28-óico, ácido  $2\alpha$ -acetoxi, $3\beta$ , $19\alpha$ -diidroxi-urs-12-eno-28-óico, ácido  $2\alpha$ , $3\alpha$ , $19\alpha$ -triidroxi-urs-12-eno-28-óico, as lactonas  $2\alpha$ -acetoxi, $3\alpha$ , $19\alpha$ -diidroxi-11,12-epoxi-13,16-ursanolactona e  $3\alpha$ -acetóxi, $2\alpha$ , $19\alpha$ -diidróxi,11,12-epoxi-13,16-ursanolactona também foram descritos nessa espécie (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

- *Cecropia glaziovii* Sneth.

Usada tradicionalmente como anti-hipertensivo, cardiotônico, diurético e antiasmático (LUENGAS-CAICEDO et al., 2007), anti-hiperlipidêmico (BERINGHS et al., 2013). Sua atividade anti-hipertensiva foi comprovada a partir do extrato aquoso das folhas, possivelmente devido a presença de flavonoides e proantocianidinas (LUENGAS-CAICEDO et al., 2007), devido aos mesmos constituintes foi atribuída atividade antioxidante (LUENGAS-CAICEDO, 2005). Estudos farmacológicos indicaram efeito antiasmático (BERINGHS et al., 2013) e ansiolíticos (ROCHA; LAPA; LIMA, 2002). Grandes quantidades de ácido clorogênico e ácido caféico foram encontrados no extrato hidroalcoólico das folhas (BERINGHS et al., 2013) isovitexina, orientina e isoorientina (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011) isoquercitrina, catequina, epicatequina e procianidinas B2, B3, B5 e C1.

- *Cecropia obtusifolia*

As folhas dessa espécie são utilizadas no tratamento de diabetes mellitus (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011), combate à pressão alta, em inflamações, como calmante, no tratamento de artrite e reumatismo (COSTA, 2009). Isolados ácidos palmítico, esteárico vanílico e clorogênico, além de isoorientina (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

- *Cecropia lyratiloba*

Das raízes dessa espécie foram isolados ácido euscáfico, ácido tormêntico, ácido 2 $\alpha$ - e 2 $\beta$ -acetil-tormêntico (STANGE et al., 2009), em outras partes da planta identificados a isovitexina, orientina e isoorientina (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

### 3.2.2 A Espécie *Cecropia pachystachya* Trécul.

Pertencente à família Urticaceae (SYTSMA et al., 2002), *Cecropia pachystachya* Trécul. (syn.; *Cecropia adenopus* Mart. ex Miq.) (BERG; ROSSELLI, 2005) é uma espécie pioneira, utilizada na recomposição de área florestal, heliófita (desenvolve sem necessidade de sombra) encontrada em beira de matas e clareiras, em regiões de Cerrado e Mata Atlântica. Possui baixa taxa de germinação, apesar de aves e mamíferos atuarem como indutores de germinação (BOCCHESI; OLIVEIRA; LAURA, 2008). No território brasileiro está presente desde o Rio Grande do Norte até Santa Catarina. As árvores variam de 5 a 10 m de altura, com tronco de 15 a 20 cm de diâmetro, sendo ramificado apenas na região superior (ALVES, 2009; SIMÕES; MIGUZZI, 2009). Batista et al. (2008) avaliaram a tolerância da espécie a períodos de inundação atribuindo a uma satisfatória produção energética.

No Brasil é conhecida popularmente como umbaúba, umbabeira, pau-de-lixia, embaúba, imbaúba ou árvore-da-preguiça, assim denominada já que a preguiça (*Bradypus* sp.) se alimenta de seus frutos. Formigas, principalmente do gênero *Azteca*, beneficiam a planta por remover seus herbívoros, recebendo alimento e abrigo (NISHI; ROMERO, 2007). Folhas e frutos são utilizados na medicina popular

contra tosse, bronquite, asma, hipertensão e diabetes, o suco das raízes empregado como diurético (ARAGÃO et al., 2010; CRUZ et al., 2013; SIMÕES; MIGUZZI, 2009).

Em estudo realizado por Simões e Miguzzi (2009) as frações hexânica, acetato de etila, n-butanóica e clorofórmica apresentaram um excelente potencial antioxidante em ensaios realizados com DPPH. Verificaram a presença de taninos e derivados de cumarina, além disso o extrato não apresentou toxicidade em testes de *Artemia salina*. Velásquez et al. (2003) também comprovaram a atividade antioxidante, nesse caso, no extrato metanólico da planta. Oliveira e Miguzzi (2011) relatam a maior atividade da fração acetato de etila em testes frente ao radical DPPH.

Os extratos de *C. pachystachya* apresentaram atividade antimalárica (UCHÔA et al., 2010), leishmanicida (CRUZ et al., 2013), antioxidante, anti-inflamatória, comprovado o efeito hipoglicemiante (ARAGÃO et al., 2010), efeito cardiotônico e sedativo (CONSOLINI et al., 2006)

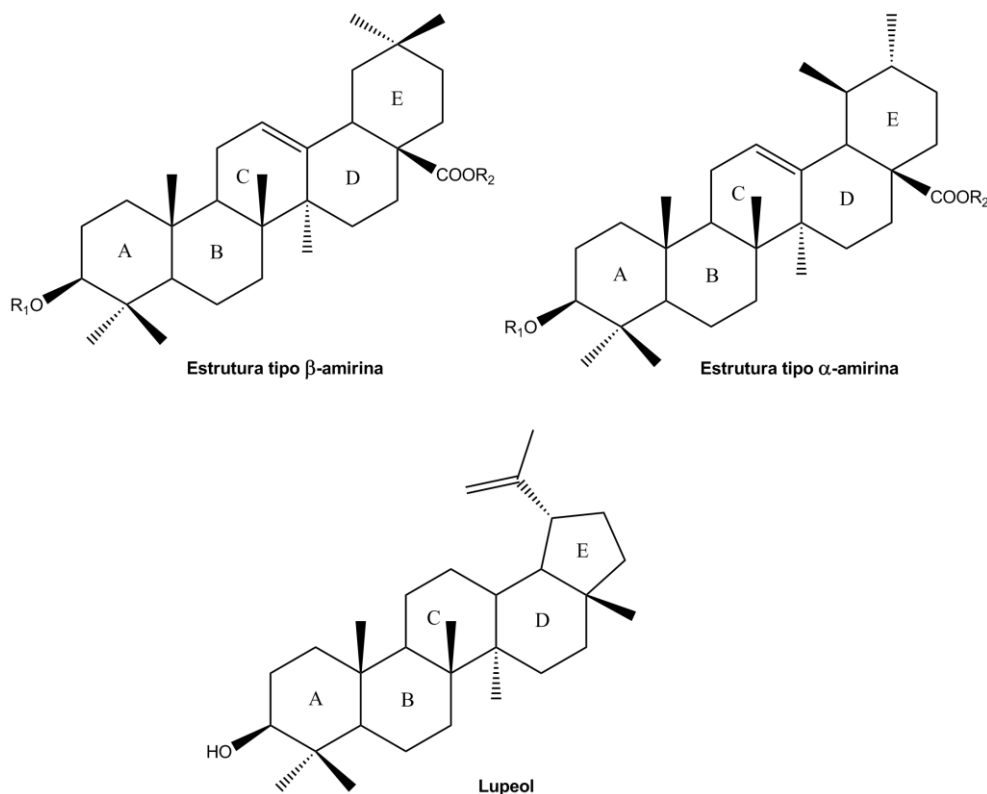
Ainda foram isolados  $\beta$ -sitosterol, ácido tormêntico (UCHÔA et al., 2010), ácido clorogênico (ARAGÃO et al., 2010), ácido oleanólico, ácido pomólico além de isovitexina, orientina, isoorientina, isoquercitrina, catequina, epicatequina e procianidinas B2 e C1 (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). Na casca foram encontrados ceropina e ácido tânico (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

Alguns estudos desenvolvidos com a espécie *C. pachystachya*, em nosso laboratório promoveram o isolamento e a identificação do princípio ativo para atividade antimalárica. Visando o grande potencial desta espécie e de seus constituintes, o objetivo deste trabalho foi quantificar, por CLAE, o princípio ativo (ácido tormêntico) presente na raiz de *C. pachystachya*, através da extração realizada por ultrassom.

### 3.2.3 Ácido Tormêntico

Segundo seu esqueleto, os triterpenos pentacíclicos podem estar inseridos em três grupos:  $\alpha$ -amirina (ursanos),  $\beta$ -amirina (oleananos) e lupeol (Figura 52) (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

Figura 52 – Núcleos triterpenos pentacíclicos.

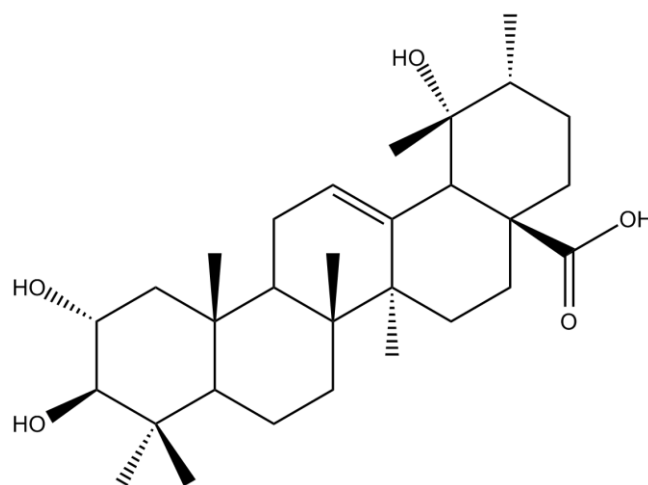


Fonte: Adaptado de Schenkel; Gosmann; Athayde (2007).

O ácido tormêntico (Figura 53) é um triterpeno pentacíclico, isolado de plantas como *Perilla frutescens* (MA et al., 2009), *Myrianthus arboreus* (OJINNAKA; OKOGUN; OKORIE, 1980), *Eriobotrya japonica* (HO et al., 2008), *Rosa rugosa* (AN et al., 2011), *Vochysia divergens* (BORTALANZA et al., 2002) e *Eriope blanchetii* (DAVID et al., 2001). Dentro do gênero *Cecropia* foi isolado de *C. schereberiana* Miq. (LI et al., 2013) e *C. lyratiloba* (STANGE et al., 2009). O composto apresentou efeito antialodínico, antinocepcivo (BORTALANZA et al., 2002), anti-inflamatório (AN et al., 2011), antiaterogênico (FOGO et al., 2009) podendo impedir o crescimento de células cancerosas (MURAKAMI et al., 2002).



**Figura 53 – Estrutura ácido tormêntico.**



Fonte: Autor, 2013.

### 3.2.4 Extração

Extração em vegetais deve ser realizada a partir de solventes seletivos, através de procedimentos estabelecidos para separação de frações ou substâncias farmacologicamente ativas (MELECCHI, 2005). O solvente, a temperatura, o tamanho da partícula do material e o tempo de extração são os fatores que influenciam na obtenção do material de interesse (CAICEDO, 2005).

O solvente determina o grupo de compostos a ser extraído. Devem ser consideradas as propriedades extrativas (eficiência e seletividade), estabilidade das substâncias extraídas, disponibilidade, custo, além da baixa toxicidade. A solubilidade dos compostos é influenciada pela temperatura, entretanto algumas substâncias são instáveis à altas temperaturas, o que inviabiliza o uso do calor. O tempo de extração depende da rigidez do tecido e do tamanho do material (CAICEDO, 2005; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

Na extração assistida por ultrassom são geradas ondas sonoras, em frequência superior à da capacidade humana, que criam uma variação de pressão. Ocorre um aumento da permeabilidade das paredes celulares, produção de bolhas abaixo do ponto de ebulição (cavitação), estresse dinâmico e mecânico (JACQUES, 2005).

Alguns benefícios da extração assistida por ultrassom são: aumento da transferência de massa devido ao alargamento dos poros da parede celular, o que

resulta em maior eficiência combinada ao menor tempo de extração, quebra das células vegetais e aumento na penetração do solvente (JACQUES, 2005).

### 3.3 Metodologia

#### 3.3.1 Desenvolvimento do Método por CLAE

O triterpeno pentacíclico ácido tormêntico foi isolado no LPqRN (Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – UFAL) por Valdiléia Teixeira Uchôa, após processos de separação e purificação em cromatografia em coluna aberta do extrato de *C. pachystachya*.

Para o desenvolvimento da metodologia de quantificação utilizou-se cromatógrafo líquido Shimadzu (Japão), bomba LC-10ADvp, controladora SCL-10Avp, degaseificador DGU-20A3 e detector SPD-10Avp (204 nm) e uma coluna C8 (Shimadzu, Japão) (150 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m), com uso de ácido acético P. A. (Dinâmica), água ultrapura e metanol (J.T.Baker) grau HPLC, como fase móvel, o volume injetado foi 20  $\mu$ L.

Para todas as análises cromatográficas obteve-se água ultrapura em equipamento MILLIPORE Simplicity UV e o metanol (grau HPLC) filtrado em sistema SUPELCO com membrana de nylon SUPELCO 0,45  $\mu$ m x 47 mm.

A corrida isocrática foi otimizada levando em consideração o tempo de retenção do pico referente ao ácido tormêntico, ajustando os parâmetros para obtenção de pico simétrico e com boa separação. As análises seguiram conforme Tabela 12.

**Tabela 12 – Análises realizadas para otimização de corrida isocrática.**

<b>Solvente A (%)</b>	<b>Solvente B (%)</b>	<b>Fluxo</b>
Água (20%)	MeOH (80%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>
Água (22%)	MeOH (78%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>
Água (30%)	MeOH (70%)	0,8 mL.min <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub> COOH 0,1% em água (30%)	MeOH (70%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>
CH <sub>3</sub> COOH 0,1% em água (25%)	MeOH (75%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>

Fonte: Autor, 2013.

#### 3.3.2 Obtenção de Curva Analítica

O padrão de ácido tormêntico foi solubilizado em MeOH (grau HPLC) obtendo uma concentração de 5000  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (solução estoque) da qual, após diluições, as soluções de trabalho obtidas (20, 50, 75, 100 e 200  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) foram injetadas em cromatógrafo líquido, em triplicata.

O gráfico foi construído através de aplicativo Microsoft Excel® 2010, plotando os valores obtidos das áreas sob os cromatogramas *versus* concentração de ácido tormêntico ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), obtendo dessa forma coeficiente de correlação e equação da reta.

As análises, em cromatógrafo líquido foram realizadas em coluna C8 (150 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ ),  $\lambda = 204$  nm, volume de injeção 20  $\mu\text{L}$  e detector UV-Vis. A fase móvel utilizada nessa etapa foi 0,1% ácido acético em água – 25% (A) e MeOH – 75% (B).

### 3.3.3 Extração do Ácido Tormêntico

A espécie *Cecropia pachystachya* Trécul. (Urticaceae) foi coletada no município de Marechal Deodoro, Alagoas e levada ao Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais - LPqRN, da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, onde foi seca a temperatura ambiente e triturada. Foram analisados extratos do tronco, casca da raiz e raiz, obtendo melhores resultados, em quantidade de ácido tormêntico, com o extrato da raiz, sendo testada metodologia de extração assistida por ultrassom, sugerida pelo prof. Brás Heleno de Oliveira - UFPR.

Para extração foi utilizado um planejamento fatorial com  $2^4$ , em duplicata, totalizando 32 experimentos. Sendo avaliados parâmetros de granulometria, solvente, tempo e temperatura de extração, conforme Tabela 13.

**Tabela 13 – Extração assistida por ultrassom. (Peneira A: 100 mesh e B: 30 mesh)**

<b>Amostra</b>	<b>Peneira</b>	<b>Solvente</b>	<b>Tempo(Min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	A	Acetona	5	25
2	A	Acetona	20	25
3	A	EtOH	5	25
4	A	EtOH	20	25
5	B	Acetona	5	25
6	B	Acetona	20	25
7	B	EtOH	5	25
8	B	EtOH	20	25
9	A	Acetona	5	50
10	A	Acetona	20	50
11	A	EtOH	5	50
12	A	EtOH	20	50
13	B	Acetona	5	50
14	B	Acetona	20	50
15	B	EtOH	5	50
16	B	EtOH	20	50

Fonte: Autor, 2013.

A raiz de *C. pachystachya* foi triturada e peneirada – peneiras GRANUTEST de (A) 100 mesh (0,149 mm) ou (B) 30 mesh (0,59 mm) – pesada (500 mg), submetida em seguida à extração em ultrassom (UltraCleaner 1400 UNIQUE, com sistema acoplado a banho circulador com refrigeração Thermo Haake B3) com 20 mL de solvente (álcool etílico P.A. Vetec ou acetona P.A. Dinâmica), em um tempo de extração de 5 ou 20 minutos a uma temperatura de 25 ou 50°C, obtendo assim, 16 amostras para cada replicata. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo – marca Büchi® modelo R-200 (Büchi, EUA), com banho para aquecimento marca Büchi® modelo B-490 e banho maria ultratermostático digital microprocessado (CIENLAB, CE-250) – até obtenção de material seco, em seguida, solubilizados em metanol (grau HPLC), filtrados em membrana 0,45 µm MILLIPORE Millex - HV 0,45 µm, PVDF (Polifluoreto de vinilideno) e analisados, em duplicata, por CLAE (CELEGHINI; YARIWAKE; LANÇAS, 2007).

As quantificações das frações extraídas foram realizadas, por CLAE, após construção de curva analítica pelo método do padrão externo (item 3.3.2), onde é possível realizar comparação das áreas do padrão isolado em laboratório, com as áreas do material obtido na extração. Áreas estas que são diretamente proporcionais à concentração.

### 3.3.4 Validação

Para validar o método foram utilizadas as normas estabelecidas pela ANVISA através da RDC de nº 899 de 2003, onde estabelece que a validação é necessária para “demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida”.

#### 3.3.4.1 Especificidade e Seletividade

Um método será considerado seletivo desde que seja capaz de medir o composto em estudo mesmo na presença de interferentes (BRASIL, 2003).

A seletividade foi observada por comparação dos perfis cromatográficos do padrão e do extrato de *C. pachystachya*, verificando a inexistência de possíveis interferentes co-eluído com o pico referente ao ácido tormêntico.

#### 3.3.4.2 Linearidade

Determinada a partir da curva analítica com padrão externo, permite comparar as áreas das amostras com as áreas obtidas das soluções padrão.

Construiu-se a curva analítica conforme o item 3.3.2. As concentrações utilizadas para construção da curva atendem ao critério adotado pela ANVISA no uso de concentrações entre 80% e 120% para determinação quantitativa de matérias-primas.

Para verificação da faixa linear foi construído gráfico de resposta relativa (área/concentração) x log concentração (RIBANI et al., 2004).

#### 3.3.4.3 Limites de detecção e quantificação (LD e LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não quantificada, nas condições experimentais estabelecidas. Enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 1996).

Os LD e LQ podem ser calculados de três maneiras diferentes: método visual, relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. Entretanto o método baseado nos parâmetros da curva analítica é o mais recomendado em validação cromatográfica já que é estatisticamente mais confiável (RIBANI et al., 2004). Podem ser calculados pelas equações abaixo:

$$LD = 3,3 \times DP/IC \quad \text{(Equação 1)}$$

$$LQ = 10 \times DP/IC \quad \text{(Equação 2)}$$

O desvio padrão (DP) da resposta pode ser originário da estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da reta, já IC é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

#### 3.3.4.4 Precisão

Segundo Brasil (2003) a precisão avalia a dispersão dos valores obtidos em relação à média. Ela é medida através do desvio padrão relativo. É considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

No ensaio de repetibilidade as análises devem ser realizadas no mesmo equipamento, pelo mesmo analista e no mesmo dia.

Para a precisão intermediária os valores são avaliados em dias diferentes (dois dias, no mínimo), analistas diferentes ou em equipamento diferente.

A reprodutibilidade, ou precisão intra-laboratorial, analisa os dados obtidos em laboratórios diferentes.

Normalmente é expressa em desvio padrão relativo, segundo a equação 3.

$$DPR = DP/ CMD \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: DPR: desvio padrão relativo

DP: desvio padrão

CMD: concentração média determinada

Para o nosso estudo foram realizadas apenas os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária com dois analistas em diferentes dias.

### 3.3.4.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Deve ser investigada após a determinação da especificidade, linearidade e precisão do método (BRASIL, 2003).

Para avaliação da exatidão uma das formas é a análise pelo método da adição de padrão e esta calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. Deve ser verificada por, no mínimo, nove determinações (três níveis de concentração, em triplicata) (BRASIL, 2003).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

Para o presente estudo, avaliou-se a exatidão conforme Tabela 14. Onde foram utilizadas diferentes concentrações do padrão, fortificado com 50 µL de extrato obtido (amostra) a uma concentração 233,19 µg.mL<sup>-1</sup>, avaliando, dessa forma o percentual de recuperação adicionado.

**Tabela 14 – Avaliação da exatidão.**

	<b>Concentração Padrão (V = 200 µL) (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Amostra (V = 50 µL) (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração Final (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	20,0	233,19	62,638
<b>2</b>	50,0	233,19	86,638
<b>3</b>	75,0	233,19	106,638
<b>4</b>	100,0	233,19	126,638
<b>5</b>	200,0	233,19	206,638

Fonte: Autor, 2013.



### 3.4 Resultados e Discussão

#### 3.4.1 Desenvolvimento do Método por CLAE

Após verificar na literatura a existência de metodologias com uso de detectores evaporativos de espalhamento de luz (DELS) e índice de refração (IR) na análise do ácido tormêntico, verificamos a possibilidade do uso de detector UV e uso do solvente MeOH na fase móvel, de forma a não haver interferentes com os extratos obtidos para quantificação, já que na detecção de triterpenos utilizamos baixos comprimentos de onda. Abaixo (Tabela 15) estão os tempos de retenção obtidos conforme as fases móveis testadas.

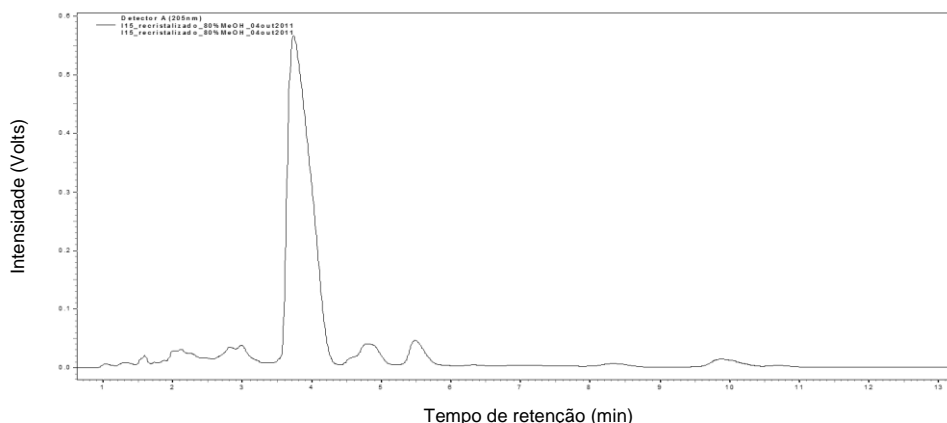
**Tabela 15 – Análises realizadas em testes para metodologia de análise de ácido tormêntico.**

<b>Solvente A</b>	<b>Solvente B</b>	<b>Fluxo</b>	<b>T<sub>R</sub> (min)</b>
Água (30%)	MeOH (70%)	0,8 mL.min <sup>-1</sup>	10,0 (largo)
CH <sub>3</sub> COOH 0,1% em água (30%)	MeOH (70%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>	11,0
CH <sub>3</sub> COOH 0,1% em água (25%)	MeOH (75%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>	6,5
Água (22%)	MeOH (78%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>	5,5
Água (20%)	MeOH (80%)	1,0 mL.min <sup>-1</sup>	3,6

Fonte: Autor, 2013.

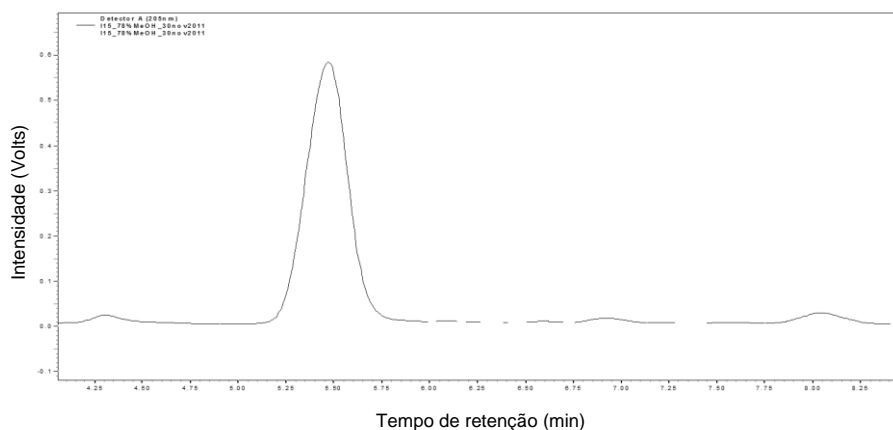
Os cromatogramas estão representados nas Figuras 54-58. Numa concentração de 80% de MeOH (Figura 54) na fase móvel o pico referente ao ácido tormêntico elui muito rápido, indicando não ter a interação necessária com a fase estacionária. A 78% MeOH (Figura 55), com a diminuição da força do solvente o tempo de retenção torna-se maior, mas ainda não suficiente. Entretanto é possível observar o alargamento do sinal numa concentração de fase móvel de 70% MeOH a um fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> (Figura 56). Melhores resultados foram conseguidos ao adicionar 0,1% de CH<sub>3</sub>COOH na fase água (Figuras 57 e 58), os picos mostram-se simétricos e finos, permitindo a realização mais exata de quantificação. O tempo de retenção foi fator determinante na escolha do método. Tendo em vista que a 75% MeOH com 0,1% de ácido acético na fase móvel o pico elui com 6,48 minutos, mais amostras poderão ser analisadas em menor tempo, logo esta fase móvel foi escolhida.

**Figura 54 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel 80% MeOH (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.**



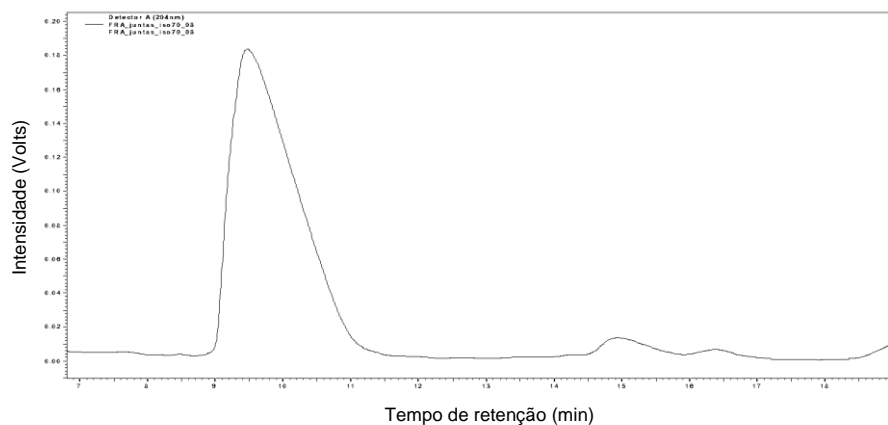
Fonte: Autor, 2013.

**Figura 55 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel 78% MeOH (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.**



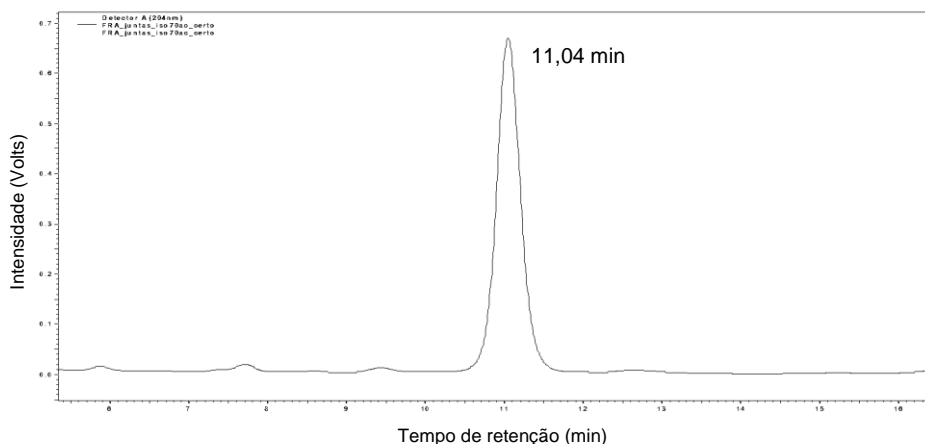
Fonte: Autor, 2013.

**Figura 56 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando fase móvel a 70% MeOH (isocrático), com fluxo 0,8 mL.min<sup>-1</sup>.**



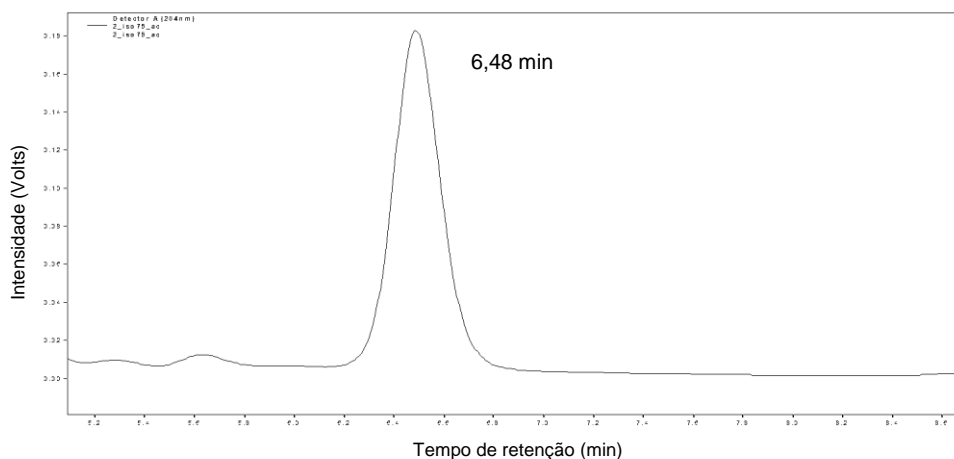
Fonte: Autor, 2013.

**Figura 57 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel CH<sub>3</sub>COOH 0,1% em água (30%) e MeOH (70%) (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.**



Fonte: Autor, 2013.

**Figura 58 – Cromatograma obtido para o ácido tormêntico utilizando a fase móvel CH<sub>3</sub>COOH 0,1% em água (25%) e MeOH (75%) (isocrático), com fluxo 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.**



Fonte: Autor, 2013.

Seguiu-se então, para quantificação do ácido tormêntico em extratos de *C. pachystachya*. As análises foram realizadas com fase móvel 0,1% ácido acético em água a 25% (A) e 75% de MeOH (B).

### 3.4.2 Curva Analítica

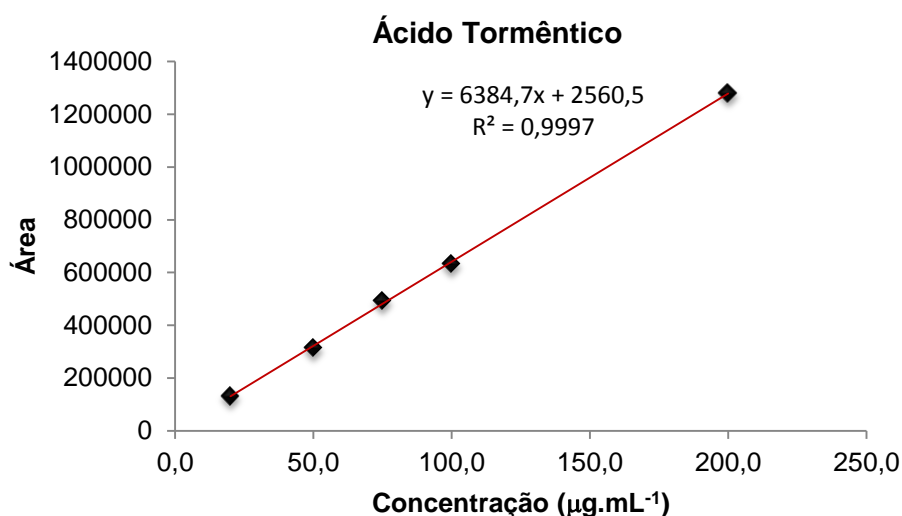
A curva analítica foi obtida conforme 3.3.2, em triplicata e está apresentada na Figura 59. O coeficiente de determinação encontrado foi  $R^2 = 0,9997$ . As áreas obtidas encontram-se na Tabela 16.

**Tabela 16 – Dados obtidos para construção da curva analítica a partir de padrão externo. Os valores são referentes à área sob o gráfico.**

<b>Concentração (µg/mL)</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>Média</b>	<b>CV (%)</b>
20,0	131916	132060	132173	<b>132049,7</b>	<b>0,10</b>
50,0	316994	312600	314725	<b>314773</b>	<b>0,70</b>
75,0	494953	494985	488870	<b>492936</b>	<b>0,71</b>
100,0	631560	631555	638716	<b>633943,7</b>	<b>0,65</b>
200,0	1280203	1280311	1280424	<b>1280313</b>	<b>0,01</b>

Fonte: Autor, 2013.

**Figura 59 – Curva analítica obtida para o ácido tormêntico.**



Fonte: Autor, 2013.

### 3.4.3 Extração

O sistema para extração em ultrassom foi montado conforme mostrado na Figura 60. Utilizou-se balão próprio para extração com aparelhagem para refrigeração evitando evaporação dos solventes, o que diminuiria a quantidade de material extraído.

**Figura 60 – Aparelhagem para extração, em ultrassom, do ácido tormêntico em raízes de *C. pachystachya*.**



Fonte: Autor, 2013.

O procedimento de extração e as análises, em CLAE, foram realizados em duplicata.

Os melhores resultados foram obtidos com a raiz de *C. pachystachya* após análise de extratos do tronco, casca da raiz e raiz. Ojinnaka, Okogun e Okorie (1980) isolaram o ácido tormêntico da raiz de outra espécie de Urticaceae, *Myrianthus arboreus*.

A extração assistida por ultrassom vêm ganhando cada vez mais espaço devido aos resultados obtidos em menor tempo quando comparados a outros métodos de extração. Caicedo (2005) avaliou processos extrativos por percolação e por sonicação de flavonoides em extratos de folhas de *C. glaziovii* afirmando que a extração com uso de ultrassom é “(...) tanto ou mais eficiente que a percolação e, (...) menos demorada”.

O uso do etanol ocorreu devido a ser um solvente utilizado com frequência em extração, já que extrai todos os tipos de compostos além de ser barato e não tóxico. O uso de acetona reporta o isolamento do mesmo composto de estudo realizado por Menezes (1997), que a partir do extrato em acetona identificou, através de CG-EM, o ácido tormêntico nas partes aéreas de *Marsypianthes chamaedrys*.

Abaixo (Tabela 17) seguem descritos os valores obtidos de ácido tormêntico após análise dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE.

**Tabela 17 – Quantificação realizada em extratos obtidos por ultrassom.**

Amostra	Peneira	Solvente	Tempo (Min)	Temp. (°C)	Concentração média (mg/g)	Desvio
1	A	Acetona	5	25	<b>3,06225</b>	0,043794
2	A	Acetona	20	25	<b>2,645145</b>	0,010933
3	A	EtOH	5	25	<b>3,320296</b>	0,021105
4	A	EtOH	20	25	<b>3,015623</b>	0,02716
5	B	Acetona	5	25	<b>1,001465</b>	0,003464
6	B	Acetona	20	25	<b>0,946709</b>	0,00614
7	B	EtOH	5	25	<b>0,890061</b>	0,007957
8	B	EtOH	20	25	<b>1,015565</b>	0,00407
9	A	Acetona	5	50	<b>3,396325</b>	0,020046
10	A	Acetona	20	50	<b>3,042609</b>	0,008949
11	A	EtOH	5	50	<b>2,954353</b>	0,019663
12	A	EtOH	20	50	<b>2,405704</b>	0,020717
13	B	Acetona	5	50	<b>0,885737</b>	0,009519
14	B	Acetona	20	50	<b>1,05458</b>	0,014131
15	B	EtOH	5	50	<b>1,162921</b>	0,011788
16	B	EtOH	20	50	<b>1,063833</b>	0,013775

Peneira A: 100 mesh e B: 30 mesh

Fonte: Autor, 2013.

Os maiores valores obtidos, em quantidade de ácido tormêntico, foram com a peneira de menor granulometria, enfatizando os extratos obtidos com acetona a 50°C em 5 minutos, bem como em etanol a 25°C a 5 minutos. O pior desempenho foi obtido quando o material utilizado teve maior granulometria e a extração realizada com acetona, a 50°C por 5 minutos.

Nota-se, portanto, que um maior tempo não contribuiu para uma extração mais eficiente. Para quase todos os casos o tempo de 5 minutos foi suficiente para obtenção de maiores concentrações de ácido tormêntico. Celeghini, Yariwake e Lanças (2007) afirmam que a escolha do tempo de extração deve ser feita reacionalmente, já que é possível obter resultados semelhantes em períodos mais curtos. Os autores levam em conta ainda a possibilidade de degradação de compostos em maior exposição ao ultrassom.

O fator temperatura não deixou muito claro onde poderia interferir, tendo em vista que para alguns extratos melhorou o desempenho de extração e para outros diminuiu a concentração do ácido extraído.

Ma et al. (2009) obteve percentuais de 0,43% a 0,61% em folhas de *Perilla frutescens* (Lamiaceae) ao quantificar o ácido tormêntico, por CLAE-DELS, após extração em fase sólida, em coluna C18, utilizando acetonitrila e água como fase

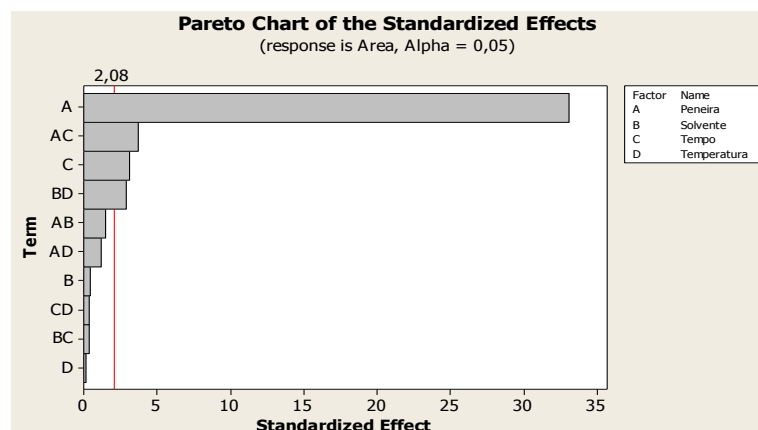
móvel, enquanto Ho et al. (2008) utilizaram o CLAE acoplada a detector de índice de refração (IR).

### 3.4.3.1 Otimização da Extração de Ácido Tormêntico

A extração foi desenvolvida utilizando planejamento fatorial, com avaliação de 4 parâmetros (peneira, solvente, tempo e temperatura), totalizando 16 experimentos em duplicata.

A Figura 61 ilustra que o efeito da peneira é estatisticamente o mais importante, seguido da pequena influência do tempo além das interações (peneira X tempo e solvente X temperatura), sendo a temperatura o parâmetro de menor impacto.

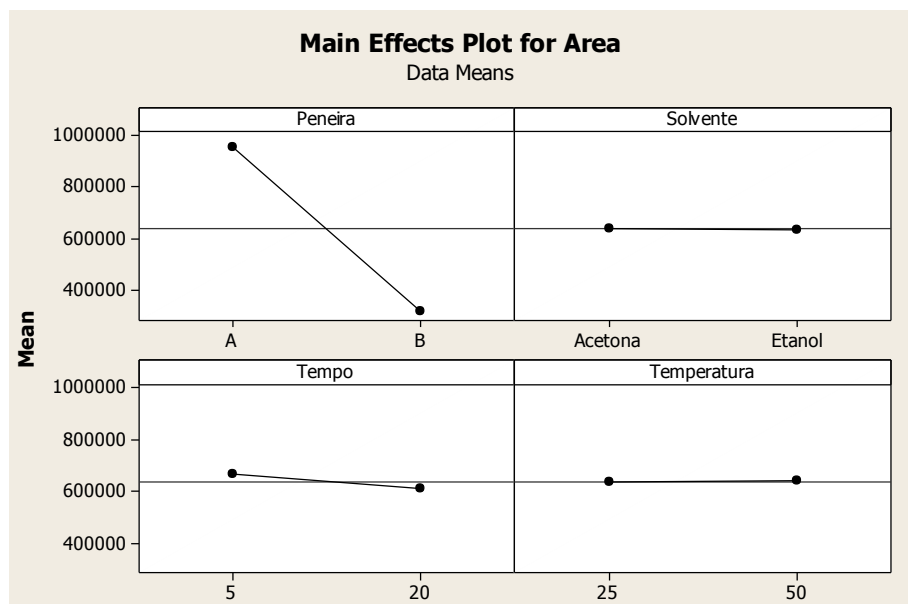
**Figura 61 – Gráfico de Pareto para efeitos padronizados.**



Fonte: Autor, 2013.

A Figura 62 ilustra o gráfico de efeitos principais, mostrando quais parâmetros são direta ou inversamente proporcionais aos valores obtidos, onde se observa que a peneira utilizada é o fator mais significativo na eficiência da extração do ácido tormêntico, notando-se que a menor granulometria favorece mais na extração em função do aumento da área superficial. Para os solventes e temperaturas utilizados não houve diferença significativa.

**Figura 62 – Gráfico de efeitos principais.**



Fonte: Autor, 2013.

O tamanho da partícula influenciou diretamente a eficiência de extração. Segundo Falkenberg, Santos e Simões (2007) raízes e caules de plantas possuem os tecidos muito compactados (xilema), então “(...) quanto mais rígido for o material, menor deve ser sua granulometria.” Fato que foi observado claramente ao realizar a extração das raízes de *C. pachystachya*.

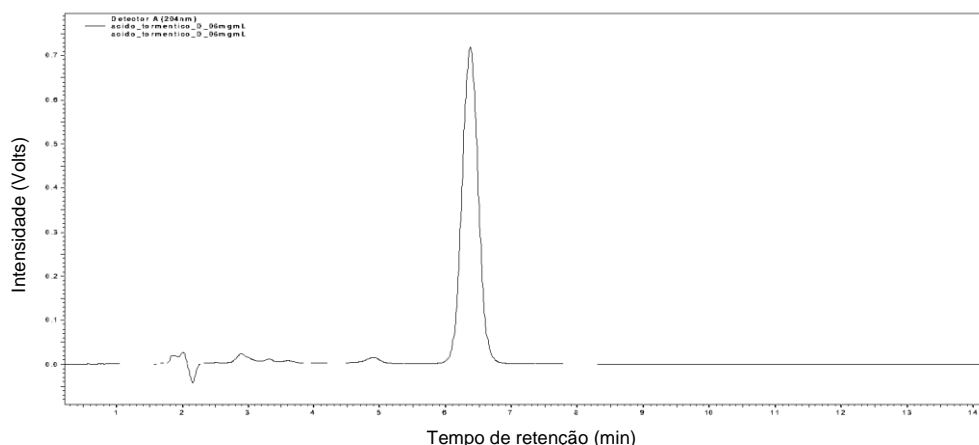
### 3.4.4 Validação

#### 3.4.4.1 Especificidade e seletividade

Abaixo seguem os cromatogramas do padrão (Figura 63), padrão + extrato (Figura 64) e apenas amostra (Figura 65). Não houve presença de interferentes nem co-eluição de outros compostos. Dessa forma, o método mostrou-se seletivo.

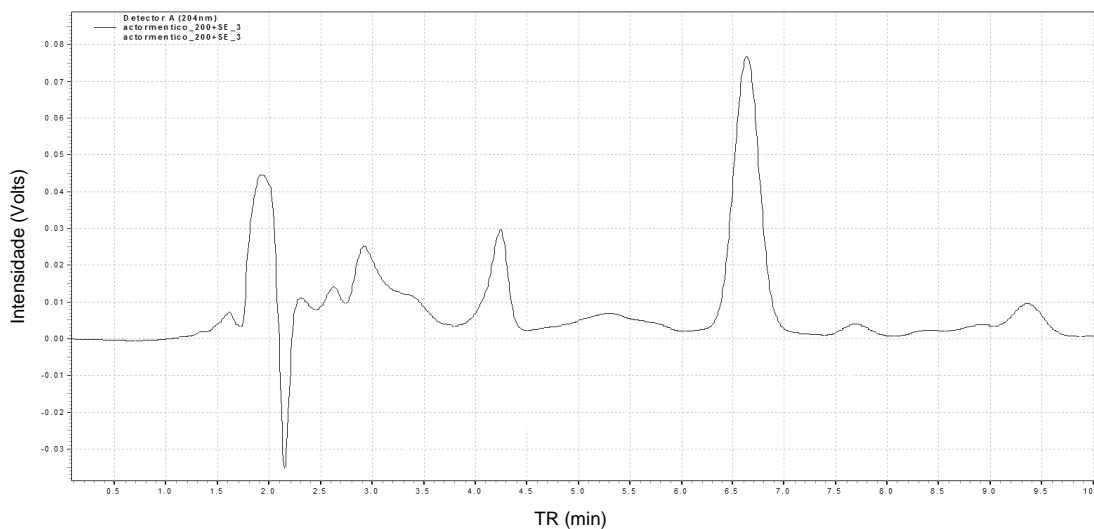


**Figura 63 – Cromatograma do padrão de ácido tormêntico.**



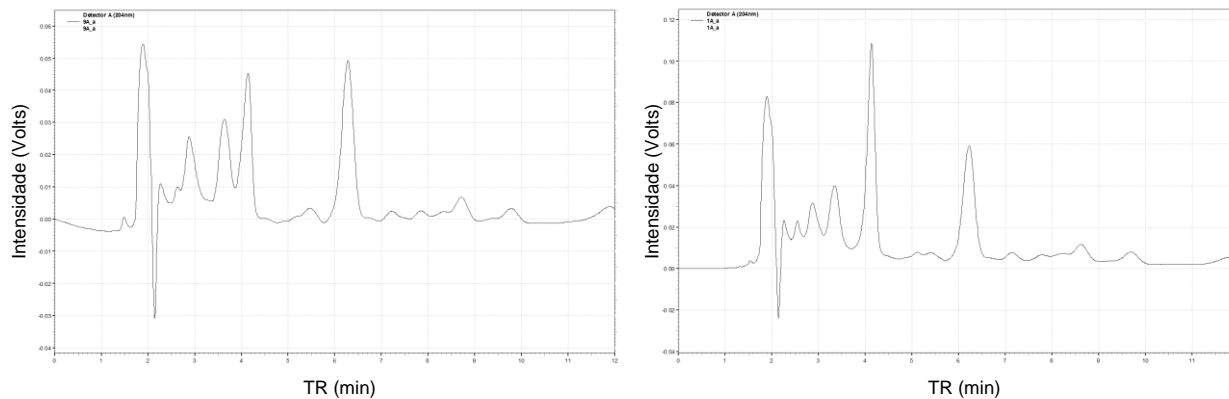
Fonte: Autor, 2013.

**Figura 64 – Cromatograma obtido para o extrato fortificado com o padrão.**



Fonte: Autor, 2013.

**Figura 65 – Cromatogramas obtidos para algumas amostras.**



Fonte: Autor, 2013.

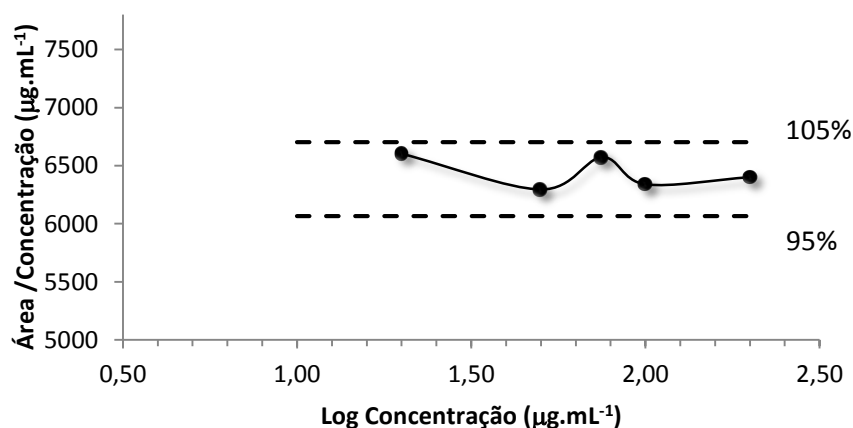
### 3.4.4.2 Linearidade

O método de padrão externo é normalmente utilizado em amostras sem grande tratamento, onde uma curva analítica é construída a partir de concentrações conhecidas (CASS; DEGANI, 2011).

O coeficiente de determinação obtido foi  $R^2 = 0,9997$  e o coeficiente de correlação  $R = 0,9998$ , onde o critério mínimo da ANVISA é de  $R = 0,99$ , apresentando ótima correlação entre os pontos. Para o INMETRO o coeficiente deve ser superior a 0,90 e pelo FDA 0,999. Em relação a todos os exigidos o coeficiente obtido é superior (FDA, 2001; INMETRO, 2003).

Para avaliar a linearidade do método um gráfico de resposta relativa (área/concentração) x log concentração foi construído (Figura 66) nesse gráfico foram aplicadas duas linhas correspondentes a faixa desejada para aceitabilidade dos dados (95 e 105%), nota-se que todos os pontos obtidos encontram-se na faixa especificada, garantindo uma faixa linear de trabalho de 20 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Figura 66 – Determinação gráfica da linearidade. Gráfico da razão sinal/concentração vs. log da concentração.**



Fonte: Autor, 2013.

### 3.4.4.3 Limites de detecção e quantificação (LD e LQ)

Os valores encontrados para LD e LQ foram 0,45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 1,37  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente e os dados utilizados para chegar nesses resultados estão representados na Tabela 18.

**Tabela 18 – Determinação dos limites de detecção e quantificação a partir de parâmetros da curva analítica.**

Faixa ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	DP	IC	r	LD	LQ
20,0 – 200,0	876,52	6384,75	0,9998	0,45	1,37

Fonte: Autor, 2013.

#### 3.4.4.4 Precisão

A precisão foi avaliada em repetibilidade (intra-corridas) e em precisão intermediária (intercorridas).

A repetibilidade avaliada num mesmo dia, com a mesma instrumentação e mesmo analista, pode ser determinada por, no mínimo, nove determinações em três níveis de concentração. Foi então realizada em quadruplicata, com  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (concentração baixa),  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (concentração média) e  $180 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (concentração alta). Os resultados estão na Tabela 19.

**Tabela 19 – Avaliação da repetibilidade.**

	Avaliação repetibilidade (n = 4)		
	30 $\mu\text{g/mL}$	80 $\mu\text{g/mL}$	180 $\mu\text{g/mL}$
<b>Média</b>	29,9630	79,1291	182,0856
<b>Desvio Padrão</b>	0,0592	0,4201	1,9822
<b>C.V. (%)</b>	0,20	0,53	1,09

Fonte: Autor, 2013.

Para a precisão intermediária os dados foram obtidos com analista diferente (Analista 2) em dias diferentes.

**Tabela 20 – Avaliação da precisão intermediária.**

	30mg/mL			80mg/mL			180mg/mL		
	Dia 1 Analista 1	Dia 2 Analista 2	Dia 3 Analista 1	Dia 1 Analista 1	Dia 2 Analista 2	Dia 3 Analista 1	Dia 1 Analista 1	Dia 2 Analista 2	Dia 3 Analista 1
	29,9537	30,1241	30,0906	79,6541	79,9529	78,6520	183,0434	177,1871	183,9044
	29,9474	30,1170	29,7040	79,1508	78,7341	79,5665	183,6969	180,4575	181,7522
	30,0456	29,7789	30,0849	78,6277	78,8944	78,8251	179,2240	177,3338	182,5977
	29,9050	29,9690	30,0854	79,0836	78,6540	79,3253	182,3779	183,1643	183,7518
<b>Média</b>	<b>29,9629</b>	<b>29,9973</b>	<b>29,9912</b>	<b>79,1291</b>	<b>79,0589</b>	<b>79,0922</b>	<b>182,0855</b>	<b>179,5357</b>	<b>183,0015</b>
<b>Desvio Padrão</b>	0,0592	0,1622	0,1915	0,4201	0,6044	0,4260	1,9822	2,8508	1,0169
<b>C.V. (%)</b>	<b>0,20</b>	<b>0,54</b>	<b>0,64</b>	<b>0,53</b>	<b>0,76</b>	<b>0,54</b>	<b>1,09</b>	<b>1,59</b>	<b>0,56</b>

Fonte: Autor, 2013.

De acordo com resolução da ANVISA, não são admitidos valores de coeficiente de variação superiores a 5%. Em nossa avaliação o maior valor foi 1,59% estando dentro da faixa aceitável. O método mostrou-se, portanto, preciso tanto no teste de repetibilidade como em precisão intermediária. O ensaio não foi realizado para o terceiro nível de precisão, a reprodutibilidade.

#### 3.4.4.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, utilizando o padrão e os extratos obtidos em 3.3 como impurezas. O resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 21.

**Tabela 21 – Resultado do teste de recuperação.**

Área	[ ] teórica	[ ] experimental	Recuperação (%)
375862,3	62,638	58,46819	<b>93,34</b>
521004,7	86,638	81,20102	<b>93,72</b>
658114	106,638	102,6757	<b>96,28</b>
788396,3	126,638	123,0811	<b>97,19</b>
1283676	206,638	200,6539	<b>97,10</b>

Fonte: Autor, 2013.

Os valores aceitáveis para o percentual de recuperação devem estar entre 70 e 120%. O método mostrou-se exato, com percentuais entre 93,34 a 97,19%. Segundo Ribani et al. (2004), o ensaio de recuperação é o método mais adotado, devido à dificuldade na obtenção de materiais de referência certificados.

### 3.5 Considerações Finais

Uma nova metodologia foi desenvolvida na determinação e quantificação do triterpeno ácido tormêntico por CLAE, utilizando água acidificada e metanol como fase móvel. O tempo de retenção do ácido tormêntico foi 6,5 minutos.

A raiz de *C. pachystachya* passou por processo de extração assistida por ultrassom. Após avaliação de granulometria, solvente, tempo e temperatura de extração, a maior quantidade do triterpeno ( $3,396 \text{ mg.g}^{-1}$ ) foi conseguida utilizando acetona a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. O parâmetro que mais influenciou estatisticamente foi a granulometria, onde com menor tamanho de material conseguiu-se melhor extração de ácido tormêntico. Os efeitos de tempo, temperatura e solvente foram muito menores.

O processo de validação seguiu as normas da ANVISA para matérias-primas. Foram avaliados parâmetros de seletividade e especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. O método mostrou-se seletivo, linear na faixa de trabalho escolhida, já que obteve um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9998, com limites de detecção e quantificação de  $0,45 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $1,37 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , preciso e exato após testes de recuperação.

## PERSPECTIVAS

- Identificar compostos, através de análises por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS), responsáveis pela atividade moluscicida de *S. maiana* Casar;
- Isolar outros compostos biologicamente ativos, das subfrações de *S. maiana* Casar, acompanhado de testes de toxicidade;
- Após escolhida e validada a metodologia de análise de ácido tormêntico em extratos de *C. pachystachya*, quantificar o triterpeno em extratos de raiz, casca da raiz, caule e folhas, bem como nas subfrações obtidas.
- Realizar análise metabolômica, através de LC-MS, das espécies estudadas *M. hirsuta*, *Z. tuberculosa*, *S. maiana* Casar. e *C. pachystachya* Trécul.

## REFERÊNCIAS

- ABE, Fumiko et al. Ursolic Acid as a Trypanocidal Constituent in Rosemary. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 11, 1485-1487, 2002.
- AEDO, Jenny Rosário Niño de Guzmán. **Atividade de álcool, aldeído e ácido perílico contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis***. 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino de et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p.325-354, 3 dez. 2007.
- ALMEIDA, Maria Mozarina Beserra et al. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Quim. Nova**, v. 30, n. 4, p.935-951, 2007.
- ALVES, Sherlilton da Silva. A importância da espécie *Cecropia pachystachya* na recomposição florestal da mata atlântica. **In: IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**, Belém: CONNEPI, 2009.
- AN, Hyo-Jin et al. Tormentonic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- $\alpha$  expression through inactivation of the nuclear factor-kb pathway in RAW 264.7 macrophages. **International Immunopharmacology**, v. 11, p.504-510, 2011.
- AQUINO NETO, Francisco Radler de; NUNES, Denise da Silva e Souza. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Editora Interciência Ltda, 2003.
- ARAGÃO, Danielle M. O. et al. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 128, p.629-633, 2010.
- ARAGÃO, Nádia Machado de; VELOSO, Márcia Cristina da Cunha; ANDRADE, jailson Bittencourt de. Validação de Métodos Cromatográficos de Análise – Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “Química Verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**. v. 31, n. 9. 2009.

ATKINSON, Edward; BOYD, Derek R.; GRUNDON, Michael F.. Coumarins of *Skimmia Japonica*. **Phytochemistry**, v. 13, p.853-855, 1974.

BAEK, Nam-In et al. Furanocoumarins from the Root of *Angelica dahurica*. **Arch Pharm Res**, v. 23, n. 5, p.467-470, 2000.

BAI, Xinpeng et al. Antioxidant and protective effect of an oleanolic acid enriched extract of *A. deliciosa* root on carbon tetrachloride induced rat liver injury. **Asia Pac J Clin Nutr**, 16 (Suppl 1):169-173, 2007.

BARBOSA, Lara Fonseca; BRAZ-FILHO, Raimundo; VIEIRA, Ivo José Curcino. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Simaba* (Simaroubaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 2163-2178, 2011.

BARICEVIC, D. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75 125-132, 2001.

BASTOS, Maria Lysete A. et al. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. **Annals Of Clinical Microbiology And Antimicrobials**, v. 8, n. 16, 2009.

BATISTA, Claudia Universal Neves et al. Tolerância à inundação de *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae): aspectos ecofisiológicos e morfoanatômicos. **Acta Bot. Bras.**, v. 22, n. 1, p.91-98, 2008.

BERG, C. C. Cecropiaceae, a new family of Urticales. **Taxon**, v. 27, n. 1, p.39-44, 1978.

BERG, Cornelis C.; ROSSELLI, Pilar Franco. *Cecropia*. In: \_\_\_\_\_. **Flora Neotropica**. The New York Botanical Garden, New York, v. 94, 2005.

BERINGHS, André O. et al. Technological development of *Cecropia glaziovii* extract pellets by extrusion-spheronization. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p.160-168, 2013.

BERLINCK, Roberto. **Ressonância Magnética Nuclear: Análise de Compostos Orgânicos**. Disponível em: <<http://www.qopn.iqsc.usp.br/files/2008/05/cursormn3.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2013.



BOCCHESE, Ricardo Anghinoni; OLIVEIRA, Ademir Kleber Morbeck de; LAURA, Valdemir Antônio. Germinação de sementes de *Cecropia pachystachya* Trécul (Cecropiaceae) em padrões anteriores e posteriores à passagem pelo trato digestório de aves dispersoras de sementes. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 8, n. 2, p.19-26, 2008.

BORTALANZA, Léslei B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 453, p.203-208, 2002.

BRAGA, F. Castro et al. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. **Phytomedicine**, v. 7, n. 3, p.245-250, 2000.

BRASIL, **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o “Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Brasília - DF, 02 de Junho de 2003.

BURGER, William. Family #52, Moraceae. In: \_\_\_\_\_. **Flora Costaricensis**. Fieldiana Botany. v. 40, p.94-215, 1977.

CALIGIANI, Augusta et al. A simple GC–MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. **Food Chemistry**, v. 136, 735-741, 2013.

CAMBUI, Érica Verena Figueirêdo. **Isolamento de compostos e atividades biológicas de *Simaba maiana* Casar. e análise funcional de citocromos P450 envolvidos na biossíntese de monoterpenóides em *Arabidopsis thaliana***. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2012.

CAMPANA, Priscilla R. V.; BRAGA, Fernão C.; CORTES, Steyner F. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C.. **Phytomedicine**, n. 16, p. 456-461, 2009.

CARAUTA, Jorge Pedro Pereira. Moraceae - Notas Taxonômicas. **Rodriguesia**, n. 53, p.109-116, 1980.

CARVALHO, Cristiane Alves de et al. Atividade antioxidante de *Jacaranda decurrens* Cham., Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(2B): 592-598, Abr./Jun, 2009.

CARVALHO, Gardênia Braz Figueiredo de. **Identificação e seleção de antígenos do *Schistosoma mansoni* potenciais candidatos a comporem um teste de diagnóstico para esquistossomose**. 2012. 73 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Curso de Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2012.

CARVALHO, O. S. et al. Desenvolvimento de um sistema de informações para o estudo, planejamento e controle da esquistossomose no Estado de Minas Gerais. In: **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, 12., 2005, Goiânia. Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia: Inpe, 2005. p. 2083-2085.

CASS, Quezia B.; DEGANI, Ana Luiza Gusmão. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação**. São Carlos: Edufscar, 2011.

CAVALCANTE, Paulo Bezerra. **Revisão taxonômica do gênero *Simaba* Aubl. (Simaroubaceae) na América do Sul**. Publicações Avulsas do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, n. 37, p. 5-85, 1983.

CELEGHINI, R. M.S; YARIWAKE, J.H.; LANÇAS, F.M.. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. por maceração com ultra-som e análise quantitativa por CLAE/UV e fluorescência. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 9, n. 2, p.61-66, 2007.

CHAKRAVARTI, Bandana et al. *In vitro* anti-breast cancer activity of ethanolic extract of *Wrightia tomentosa*: Role of pro-apoptotic effects of oleanolic acid and urosolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, 72–79, 2012.

CHAVES, Sérgio Augusto de Miranda; REINHARD, Karl J. Paleopharmacology and Pollen: Theory, Method, and Application. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p.207-211, 2003.

CHEN, Meiwan et al. Recent advances in nanoparticle formulation of oleanolic acid. **Chinese Medicine**, v. 6, n. 20, 2011.

CHEN, YF; TSAI, HY; WU, TS. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. **Planta Med.**, v. 61, n. 1, p.2-8, 1995.

CHEN, Yuetao et al. Traditional Chinese medicine for the treatment of primary dysmenorrhea: How do Yuanhu painkillers effectively treat dysmenorrhea? **Phytomedicine**, v. 20, p.1095-1104, 2013.

CHO, Y. H. et al. New cosmetic agents for skin whitening from *Angelica dahurica*. **J. Cosmet. Sci**, v. 57, p.11-21, 2006.

CHOUHURY et al. Phytochemistry of the Family Bignoniaceae- A review. **Biological and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 145-150, 2011.

CHRISTENSEN, Lars P.; BRANDT, Kirsten. Acetylenes and Psoralens. In: CROZIER, Alan; CLIFFORD, Michael N.; ASHIHARA, Hiroshi. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Blackwell Publishing, 2006. p. 137.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

CONSOLINI, Alicia E. et al. 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, Geison M.; SCHENKEL, Eloir P.; REGINATTO, Flávio H. Chemical and pharmacological aspects of the Genus *Cecropia*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p.913-920, 2011.

COSTA, Geison Modesti. **Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. e *Cecropia pachystachya* Trécul.**, Dissertação (Mestre em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2009.

CRUZ, Ebenézer de Mello et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942213000368>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

DAVID, Juceni P. et al. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Quim. Nova**, v. 24, n. 6, p.730-733, 2001.

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

DEWICK, Paul M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3rd Edition. Great Britain: A John Wiley and Sons Publication, 2009, p. 187 – 310.

DEWICK, Paul M. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In: \_\_\_\_\_. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3rd Edition. Great Britain: A John Wiley and Sons Publication, 2009, p. 137 – 184.

DREYER, David L.; LEE, Alson. Constituents of *Cneoridium dumosum* (nutt.) Hook. F. **Phytochemistry**, v. 8, p.1499-1501, 1969.

DI STASI, L.C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p.69-91, 2002.

DINIZ, Lúcio Ricardo Leite. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke sobre a função renal**. 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

FALKENBERG, Miriam de B.; SANTOS, Rosana Isabel dos; SIMÕES, Cláudia Maria O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 2007.

FENNER, Raquel et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p.369-394, 2006.

FERNANDES, Renata dos Santos et al. Validação do método de extração e quantificação de 7-hidróxi-4',6-dimetóxi-isoflavona em culturas de células em suspensão e calos de *Dipeteryx odorata*. **Eclética Química**. V. 34, n. 1, p. 13-18. 2009.

FOGO, Anelize S. et al. Tormentic acid reduces vascular smooth muscle cell proliferation and survival. **European Journal Of Pharmacology**, v. 615, p.50-54, 2009.

Food And Drug Administration (FDA). **Technical review guide: validation of chromatographic methods**. Rockville, 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em: 12 abril 2013.

FRANCO, Luzia. **Desenvolvimento e validação de metodologias para o controle de qualidade de derivados de *Pelargonium sidoides* D.C.** 2009. 111 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FRIGHETTO, Rosa T.S. et al. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography. **Food Chemistry**, v. 106, 767–771, 2008.

GARG, S. K.; GUPTA, S. R.; SHARMA, N. D.. Coumarins from *Apium graveolens* seeds. **Phytochemistry**, v. 18, p.1580-1581, 1979.

GBAGUIDI, Fernand et al. HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity on *Dermatophilus congolensis*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, 990–995, 2005.

GUERRA, Miguel Pedro; NODARI, Rubens Onofre. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 2007.

GONÇALVES, Airton Luiz; ALVES FILHO, Antonio; MENEZES, Hercules. Antimicrobial effects of some brazilian medicinal plants against intestinal disorders. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p.153-160, 2011.

GORMANN, Rainer; SCHREIBER, Lukas; KOLODZIEJ, Herbert. Cuticular wax profiles of leaves of some traditionally used African Bignoniaceae. **Z. Naturforsch**, 59c, p. 631-635, 2004.

GRAY, Alexander I.; WATERMAN, Peter G.. Coumarins in the rutaceae. **Phytochemistry**, v. 17, p.845-864, 1978.

GUINDA, Ángeles et al. Pentacyclic Triterpenoids from Olive Fruit and Leaf. **J. Agric. Food Chem**, v. 58, 9685–9691, 2010.

GUO, Sheng et al. Characterization of Triterpenic Acids in Fruits of *Ziziphus* Species by HPLC-ELSD-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, 6285–6289, 2010.

HARMAND, Pierre-Olivier et al. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. **Int. J. Cancer**, v. 114, 1–11, 2005.

HARRIS, Daniel C. O Processo Analítico. In: \_\_\_\_\_. **Análise Química Quantitativa**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008, p. 1–9.

HO, Hui-Ya et al. Analysis of Bioactive Triterpenes in *Eriobotrya japonica* LINDL. by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal Of Food And Drug Analysis**, v. 16, n. 6, p.41-45, 2008.

HOSTETTMANN, K.; KIZU, H.; TOMIMORI, T. Molluscicidal properties of various saponins. **Planta Medica**, v. 44, p. 34-35, 1982.

HUMPHREY, Andrew J.; BEALE, Michael H. Terpenes. In: CROZIER, Alan; CLIFFORD, Michael N.; ASHIHARA, Hiroshi. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2006, p. 47 – 101.

INOUE, Ariana Mika; SARZI, Isabele. Crescimento e Composição química de mudas de *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bureau produzidas em diferentes soluções de fertirrigação. **IF Sér. Reg**, n. 36, p. 13-17, jul. 2008.

Instituto nacional de metrologia normalização e qualidade Industrial (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2003. Disponível em:  
[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf).  
Acesso em: 12 abril 2013.

International Conference on Harmonisation (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Methodology - Q2B**. 1996.

JACQUES, Rosângela Assis. **Caracterização Química da Erva Mate (*Ilex paraguariensis*): Aplicação de diferentes processos de extração e influência**

**das condições de plantios sobre a composição química.** 2005. 139 f. Tese (Doutor em Química) - Departamento de Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JAKIEMIU, Elizabete Aparecida Ruzza. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).** 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JANICSÁK, Gábor et al. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 392-396, 2006.

KASHIWASA, Yoshiki et al. Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid, Pomolic Acid, and Structurally Related Triterpenoids. **J. Nat. Prod.**, v. 61, 1090-1095, 1998.

KONTOGIANNI, Vassiliki G. et al. Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy—Comparison with HPLC methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 188–195, 2009.

KUMAR, Dinesh et al. Coumarins from *Angelica archangelica* Linn. and their effects on anxiety-like behavior. **Progress In Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 40, p.180-186, 2013.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromanas e xantonas. In: Simões, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 2007.

LEMOS, Jesus Rodrigues. Composição Florística Do Parque Nacional Serra Da Capivara, Piauí, Brasil. **Rodriguésia**, v. 85, n. 55, p.55-66, 2004.

LEYTON, V. et al. Atividade moluscicida de princípios ativos de folhas de *Lycopersicon esculentum* (Solanales, Solanaceae) em *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Planorbidae). **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, v. 95, n. 2, p. 213-216, 2005.

LI, Jun et al. Triterpenoids and flavonoids from *Cecropia schreberiana* Miq. (Urticaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 48, p.96-99, 2013.

LILI, Wan et al. *In vitro* permeability analysis, pharmacokinetic and brain distribution study in mice of imperatorin, isoimperatorin and cnidilin in *Radix Angelicae Dahuricae*. **Fitoterapia**, v. 85, p.144-153, 2013.

LIU, Haixing et al. MECC determination of oleanolic acid and ursolic acid isomers in *Ligustrum lucidum* Ait. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 479-485, 2003.

LIU, Jie. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

LIU, Renmin; LI, Aifeng; SUN, Ailing. Preparative isolation and purification of coumarins from *Angelica dahurica* (*Fisch. ex Hoffm*) *Benth, et Hook. f* (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography. **Journal Of Chromatography A**, n. 1052, p.223-227, 2004.

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

LUENGAS-CAICEDO, Pilar Ester et al. Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* Sneth. leaves from native and cultivated specimens. **Z. Naturforsch**, v. 62c, p.701-709, 2007.

LUENGAS-CAICEDO, Pilar Ester. **Contribuição para a padronização de extratos de folhas de *Cecropia glaziovii* Snethl.: estudos de variação sazonal e intra-específica de flavonóides e proantocianidinas, de metodologias de extração e de atividade vasorelaxante**. 2005. 266 f. Tese (Doutor em Ciências Farmacéuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

LUZ, Horacio de Figueredo; FERREIRA, Mario. Ipê felpudo (*Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur.): Essência nativa pioneira com grande potencial silvicultural. **Ipef**, n. 31, p.13-21, 1985.

MA, Yin Hai et al. Determination of Triterpenoids in *Perilla frutescens* by High Performance Liquid Chromatography Based on Matrix Solid Phase Dispersion. **Asian Journal Of Chemistry**, v. 21, n. 4, p.2739-2744, 2009.

MACHADO, Silvia Rodrigues; GREGÓRIO, Elisa A.; GUIMARÃES, Elza. Ovary Peltate Trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): Developmental



Ultrastructure and Secretion in Relation to Function. **Annals of Botany**, v. 97, p.357-369, 2006.

MASSARA, Cristiano Lara et al. Ocorrência de moluscos do gênero *Biomphalaria* em parques da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 4, p.471-479, 2012.

MELECCHI, Maria Inês Soares. **Caracterização Química de extratos de *Hibiscus tiliaceus* L: Estudo comparativo de método de extração**. 2005. 197 f. Tese (Doutor em Química) - Departamento de Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MENEZES, F.S. ***Raphiodon echinus* e *Marsypianthes chamaedrys* (Lamiaceae): Aspectos químicos e farmacológicos**. Rio de Janeiro, Dissertação de Doutorado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

MESQUITA-SAAD, Lenise Socorro B. de; CABRAL, José Augusto da Silva. Cantinona de *Simaba polyphylla* (CAVALCANTE) THOMAS (SIMAROUBACEAE). **Acta Amazonica**, v. 27, n. 4, p.269-272, 1997.

MOON, Lidiya et al. Isoimperatorin, cimicifugae Rhizome inhibit TNF- $\alpha$ -induced VCAM-1 expression in human endothelial cells: Involvement of PPAR- $\gamma$  upregulation and PI3K, ERK1/2, and PKC signal pathways. **Journal Of Ethnopharmacology**, n. 133, p.336-344, 2011.

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

MURAKAMI, Chikako et al. Novel anti-inflammatory compounds from *Rubus sieboldii*, triterpenoids, are inhibitors of mammalian DNA polymerases. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1596, p.193-200, 2002.

NIELSEN, Bent Eichstedt; LEMMICH, John. Constituents of Umbelliferous Plants. IV. The Coumarins of *Peucedanum palustre* L. The Structure of a New Coumarin. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 18, n. 6, p.1379-1383, 1964.

NISHI, Aline H.; ROMERO, Gustavo Q.. Condicionalidade no mutualismo *Cecropia pachystachya* (Cecropiaceae) – *Azteca* sp.: influência da variação espacial e da ontogenia da planta hospedeira. In: **anais do VIII congresso de ecologia do Brasil**, Caxambu, 2007.

OJINNAKA, Chukwunonye M.; OKOGUN, Joseph J.; OKORIE, Dominic A.. Triterpenes acids from *Myrianthus arboreus*. **Phytochemistry**, v. 19, p.2482-2483, 1980.

OLIVEIRA, Manoel Garcia de; MINGUZZI, Sandro. Quantificação de fenóis totais e índice de inibição de radicais livres das folhas da *Cecropia pachystachya* Trec. (umbaúba). **Anais do 9º Encontro de Iniciação Científica - ENIC**, Mato Grosso do Sul, v. 1, n. 1, 2011.

OLIVEIRA, V. M.; VILA NOVA, M. X.; ASSIS, C. R. D.. Doenças tropicais negligencia das na região nordeste do Brasil. **Scire Salutis**, Aquidabã, v.2, n.2, p.29-48, 2012.

OWITI, Alex Oselu. **Desenvolvimento de um método para caracterização do extrato hidroetanólico de folhas de *mikania lindleyana* DC. Por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2011. 72 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

PAI, Preethi G. et al. Nephroprotective Effect of Ursolic Acid in a Murine Model of Gentamicin-Induced Renal Damage. **ISRN Pharmacology**, Article ID 410902, 6 pages. 2012.

PALMEIRA, Danylo César Correia et al. Prevalência da infecção pelo *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p.313-317, 2010.

PAULETTI, Patrícia Mendonça; BOLZANI, Vanderlan da Silva; YOUNG, Maria Claudia Marx. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (BIGNONIACEAE). **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: LTC, 2010.

PEREL'SON, M. E.; SHEINKER, Yu. N.; SYROVA, G. P.. NMR Spectra of natural coumarin derivatives: II. Furanocoumarins. **Khimiya Prirodnikh Soedineii**, n. 5, p.576-583, 1971.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 1978.

POKHAREL, Yuba Raj et al. Potent protective effect of isoimperatorin against aflatoxin B1-inducible cytotoxicity in H4IIE cells: bifunctional effects on glutathioneS-transferase and CYP1A. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 12, p.2483-2490, 2006.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. Vol. 27, N. 5, 771-780, 2004.

ROCHA, Alessandra Duarte et al. Antifungal Constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 463-467, 2004.

ROCHA, FF; LAPA, AJ; LIMA, TC de. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovii* Sneth in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 1-2, p.183-190, 2002.

RODRIGUEZ, Marili Villa Nova et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Construindo a história dos produtos naturais**. v. 7, outubro 2006.

ROMANIUC NETO, Sergio; GAGLIOTI, André Luiz; GUIDO, Bárbara Melissa de Oliveira. Urticaceae Juss. do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, n. 1, p.193-205, 2009.

SAMPAIO, Olívia Moreira. **Estudo de metabólitos secundários de *Ruta graveolens* como inibidores da fotossíntese**. 2011. 217 f. Tese (Doutor Em Química) - Ufscar, São Carlos, 2012.

SANTOS, A. F. dos; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicide activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. **Phytotherapy Research**, v. 13, p.660, 1999.

SANTOS, Flavio A. M.. Growth and leaf demography of two *Cecropia* species. **Revta Brasil. Bot.**, São Paulo, v. 23, n. 2, p.133-141, jun. 2000.

SANTOS, Maria Amélia Lima dos. **Elucidação estrutural e quantificação por RMN H<sup>1</sup> dos princípios ativos do extrato das folhas de *Zeyheria tuberculosa* (VELL) BUREAU (BIGNONIACEAE)**. 2009. 111 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

SANTOS, Natália Cardoso et al. Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **Revista Brasileira de Biociência**, v. 8, n. 4, p.324-329, 2010.

SANTOS, Rosana Isabel dos. 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.

SARAIVA, Rita de Cássia Guedes et al. Triterpenos e alcalóide tipo cantinona dos galhos de *Simaba polyphylla* (CAVALCANTE) W.W. THOMAS (SIMAROUBACEAE). **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p.264-268, 2006.

SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; ATHAYDE, Margareth Linde. Saponinas. In: Simões, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC. Porto Alegre/ Florianópolis, 2007.

SCHWAIGER, Stefan et al. Identification and pharmacological characterization of the anti-inflammatory principal of the leaves of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 704–709, 2011.

SHI, Xiaowei et al. Identification of in vitro and in vivo metabolites of isoimperatorin using liquid chromatography/mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, p.357-365, 2013.

SILVA, Daniel de Melo. **Perfil Metabolômico e Farmacológico da *Mansoa hirsuta* D.C. (BIGNONIACEAE)**. 2010. 133 p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Alagoas, 2010.

SILVA, Keyla Emanuelle Ramos et al. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p.9-16, 2012.

SILVA, Nyéssia Fernanda de Sousa et al. Bioensaio de atividade moluscicidas adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arq. Ciên. Vet. Zool.**, Umuarama, v. 11, n. 2, p.179-181, 2008.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 3ª ed. Porto Alegre: Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, 1989. 174 p.

SIMÕES, Vanessa do Nascimento; MINGUZZI, Sandro. Estudo fitoquímico e testes biológicos das folhas da *Cecropia pachystachya* Trec. **Anais do 7º Encontro de Iniciação Científica - ENIC**, Mato Grosso do Sul, v. 1, n. 1, 2009.

SOMOVA, L.I.; SHODE, F.O.; MIPANDO, M. Cardiotoxic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl Maslin ate and uvaol. **Phytomedicine**, v. 11, p. 121–129, 2004.

SOUZA, Cecília Pereira de; MENDES, Nelymar Martineli. Repovoamento de criadouros de *Biomphalaria glabrata* após tratamento com niclosamida. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 33, n. 4, p.297-302, 1991.

SOUZA, Doralice de. **Manual das doenças transmitidas por água e alimentos: ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/IFN\\_Esquistoso.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/IFN_Esquistoso.htm)>. Acesso em: 10 maio 2013.

SPOSITO, Tereza C.; SANTOS, Flavio A. M.. Scaling of stem and crown in eight *Cecropia* (Cecropiaceae) species of Brazil. **American Journal Of Botany**, p. 939-949. 2001.

SPOSITO, Tereza Cristina Souza. **Arquitetura e alometria de três espécies de *Cecropia* (Cecropiaceae) da Região Sudeste do Brasil**. 1994. 90 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

STANGE, Victor S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios in vivo e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 2, n. 19, p.637-642, 2009.

SYTSMA, Kenneth J. et al. Urticalean Rosids: Circumscription, Rosid Ancestry, And Phylogenetics Based On RBCL, TRNL-F, and NDHF Sequences. **American Journal Of Botany**, p. 1531-1546. 2002.

TIAN, Yong-Qing; ZHANG, Zhi-Xiang; XU, Han-Hong. Laboratory and field evaluations on insecticidal activity of *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. **Industrial Crops And Products**, v. 41, p.90-93, 2013.

UCHÔA, Valdiléia T. **Estudo fitoquímico e farmacológico das espécies *Ximenia americana* L. e *Cecropia pachystachya* Tréc.** 2009. 247f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2009.

UCHÔA, Valdiléia Teixeira et al. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, p.82-91, 2010.

VELAZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p.91-97, 2003.

VIEIRA, Lucas Campos Curcino. **Síntese de uma coleção de cumarinas, possíveis inibidores da enzima acetilcolinesterase.** 2010. 141 f. Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

WAG, Xin et al. Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, p. 328–337, 2010.

WAGNER, Karl-Heinz Wagner; ELMADFA, Ibrahim. Biological Relevance of Terpenoids: Overview Focusing on Mono-, Di- and Tetraterpenes. **Ann Nutr Metab**, v. 47, p. 95–106, 2003.

WANG, Sicen; CHEN, Qinhua; HE, Langchong. Development and validation of a gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of isoimperatorin in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution study. **Journal Of Chromatography B**, v. 852, p.473-478, 2007.

WANG, Huahong; WANG, Zhezhi; GUO, Wubao. Comparative determination of ursolic acid and oleanolic acid of *Macrocarpium officinalis* (Sieb. et Zucc.) Nakai by RP-HPLC. **Industrial Crops And Products**, v. 28, p.328-332, 2008.

WANG, Xuemei et al. Ursolic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis of Cancer Cells In Vitro and In Vivo. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 419343, 8 pages, 2011.

WEI, Yun; ITO, Yoichiro. Preparative isolation of imperatorin, oxypeucedanin and isoimperatorin from traditional Chinese herb “bai zhi” *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth. et Hook using multidimensional high-speed counter-current chromatography. **Journal Of Chromatography A**, n. 1115, p.112-117, 2006.

WHO (World Health Organization). Memoranda - molluscicide screening and evaluation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 33, n. 4, p. 567-581, 1965.

WHO (World Health Organization). Reports Of The Scientific Working Group On Plant Molluscicides. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 6, p. 927-929, 1983.

WÓJCIAK-KOSIOR, Magdalena. Separation and determination of closely related triterpenic acids by high performance thin-layer chromatography after iodine derivatization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 337-340, 2007.

XIA, En-Qin et al. Ultrasound-assisted extraction of oleanolic acid and ursolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 772-776, 2012.

XU, Xiao-Hong; SU, Qing; ZANG, Zhi-He. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 238-240, 2012.

YANG, Fuquan et al. Preparative isolation and purification of notopterin and isoimperatorin from *Notopterygium forbesii* Boiss (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter-current chromatography. **Journal Of Chromatography A**, n. 883, p.67-73, 2000.

YANG, Ping et al. Determination of free isomeric oleanolic acid and ursolic acid in *Pterocephalus hookeri* by capillary zone electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1331-1334, 2007.

YANG, Yu et al. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, Issues 1-2, 262-267, June 2007.

YANG, Zhi-Gang et al. Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and Their Nitric Oxide Production-Inhibitory and DPPH Radical-Scavenging Activities. **Chem. Pharm., Bull.** v. 55, n. 1, p. 15-18, 2007.

YIN, Mei-Chin; CHAN, Kung-Chi. Nonenzymatic Antioxidative and Antiglycative Effects of Oleanolic Acid and Ursolic Acid. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 7177-7181, 2007.

YU, MML et al. Raman Microspectroscopic Analysis of Triterpenoids Found in Plant Cuticles. **Applied Spectroscopy**, v. 61, n. 1, p. 32-37, 2007.

ZHOU, Chunhua et al. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl. by HPLC. **Biomedical Chromatography**, v. 21, p. 755–761, 2007.

ZOGHBI, Maria Das Graças Bichara et al. The genus *Mansoa* (Bignoniaceae): a source of organosulfur compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 3, n. 19, p.795-804, 2009.

ZWENGER, Sam; BASU, Chhandak. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 001-007, February 2008.