



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E
INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS
POLIFENÓLICOS E TRITERPÊNICOS EM EXTRATOS OBTIDOS A
PARTIR DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E TALOS DE *CARAIPA
DENSIFOLIA* MART.**

CLEONI VIRGINIO DA SILVEIRA

**FORTALEZA-CEARÁ
2010**

CLEONI VIRGINIO DA SILVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS
POLIFENÓLICOS E TRITERPÊNICOS EM EXTRATOS OBTIDOS A
PARTIR DAS FOLHAS, CASCAS, FRUTOS E TALOS DE *CARAIPA*
DENSIFOLIA MART.**

Tese de doutorado submetida à coordenação do
Curso de Pós Graduação em Química como
requisito parcial para obtenção do Título de Doutor
em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará – UFC
Coorientador: Dr. Robert Wyn Owen
Instituto Alemão de Pesquisa do Cancer – DKFZ - Alemanha

Fortaleza - Ceará
2010

S587c Silveira, Cleoni Virginio da
Caracterização e quantificação dos compostos polifenólicos e
triterpênicos em extratos obtidos a partir das folhas, cascas, frutos e talos de
caraipa densifolia mart. / Cleoni Virginio da Silveira, 2010.
105 f; il. color.enc.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Co-orientador: Prof. Dr. Robert Wyn Owen
Área de concentração: Química dos produtos naturais
Tese (doutorado)-Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.
Depto. De Química orgânica e inorgânica, Fortaleza, 2010.

1.Cucumerinas 2. Caraipa densifolia 3. Composto fenólicos
I. Trevisan, Maria Tereza Salles (orient.) II. Owen, Robert Wyn (Co-orient.)
III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Química
IV. Título

CDD 540

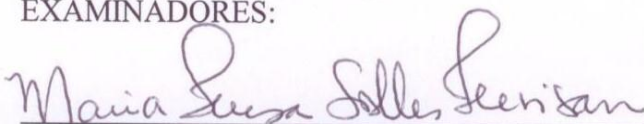
Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



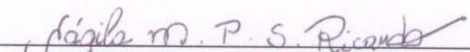
Cleoni Virginio da Silveira

TESE APROVADA EM: 21/05/2010

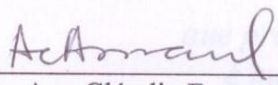
EXAMINADORES:



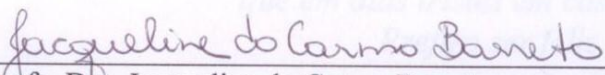
Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará - UFC



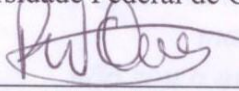
Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo
Universidade Federal do Ceará - UFC



Profa. Dra. Ana Cláudia Fernandes Amaral
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ



Profa. Dra. Jacqueline do Carmo Barreto
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG



Prof. Dr. Robert Wyn Owen
Centro Alemão de Pesquisa do Cancer – DKFZ - Alemanha

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver.
[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito,
não sou o que deveria ser, não sei o que irei ser,
mas, graças a Deus, não sou o que eu era.[...]"*

Martin Luther King

DEDICO ESTE TRABALHO...

“A Deus que sempre me iluminou com a sua luz divina dando sabedoria e discernimento para vencer todos os obstáculos em caminho para que eu sempre tomasse a melhor decisão e por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas que me ajudaram de muitas formas no desenvolvimento desse trabalho.”;

Aos meus pais Corina e Manoel (in memoriam); aos meus irmãos Cleody, Cleofas, Cleodice e Cleonilton; pela paciência, apoio e amor;

Aos meus parentes, muito obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Instituto Federal de São Gabriel da Cachoeira- Amazonas e os Professores, especialmente Pedro, Paulo, Andrea, Madalena, Katia, Tércisio, Leonor, Ariádina, Marino, Siebra e Ivamilton. Pelo companheirismo em todas as fases desse trabalho, pelo exemplo de perseverança, dedicação e amizade.

A Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan pela orientação, apoio, paciência, amizade, dedicação e muita força de vontade em fazer um bom trabalho.

Ao Dr. Robert Wyn Owel por todo apoio, críticas sugestões e orientação.

A Prof^a. Goretti de Vasconcelos Silva por valiosas colaborações e sugestões.

Agradecimentos

Aos colegas de turma 2006, por todo apoio nos momentos difíceis de estudo, companheirismo pelas gargalhadas que tornavam impossível não rir também, principalmente aos amigos Carol, Amélia, Lucia, Juliana, Jeison, Diego, Ricardo, Elayne, Elenir, Edângelo, Leandro, Írville, Jackeline, Manu, Amélia, Francy, Madalena, Zeca, Benício, marilac, Sales e Rogério pelo modo sempre gentil e educado que sempre respondeu aos questionamentos.

À Universidade Federal do Ceará, CAPES e o DAAD pelo apoio financeiro, que permitiram a realização deste trabalho.

Aos amigos que muito admiro, Tereza Cristina, Luciana, Elenir, Paulinha, Beto, Liduina Prima, Lucinha Prima, Neumiza e Lena, pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos do laboratório da Universidade de Heidelberg-DKFZ-Alemanha que realizaram as análises espectroscópicas Herr Gerd Woürtele e Roswitha Haubner.

À Dra. Beate Pfundstein pela dedicação e ajuda principalmente quando eu tentava explicar e falar alemão corretamente riso.

Aos amigos que fiz em Heidelberg Rafael, Pedro, Francisca que contribuíram muito na integração e adaptação ao modo alemão.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação por sua dedicação.

A todas pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

RESUMO

Trinta e três substâncias foram detectadas em diferentes extratos das folhas, frutos, talos e cascas de *Caraipa densifolia* Mart. Os compostos fenólicos foram identificados preliminarmente e quantificados por CLAE-ESI-EM após cromatografia em coluna Sephadex LH-20. Estruturas dos compostos, purificada por CLAE semi-preparativa, foram ainda caracterizados por nano-ESI-EM-EM. A presença de ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico, ácido clorogênico, ácido neoclorogênico, galato de metila, ácido p-cumároil quinato, epicatequina, procainidina dímero B2, procianidina trímero C1, ácido siríngico, 1, 2, 3, 6 - tetragalato glicosídeo, 1, 3, 4, 6-tetragalato glicosídeo, corilagina, ácido elágico, ácido metil elágico raminosídeo, quercetina-3-O-raminosídeo, dois apigenina-C-glicosídeos (vitexina e isovitexina), mais três apigenina, cucumerina A, cucumerina B e cucumerina C) e dois luteolina-C-glicosídeos (orientina e isorientina) são relatados nesta espécie, pela primeira vez. Já identificados anteriormente nesta espécie os seguintes terpenóides: lupeol, lupenona, ácido betulínico, betulina, friedelina. Sendo inédito na espécie *Caraipa*, friedelinol, β -sitosterol, estigmasterol, as vitaminas (α -tocoferol e γ -tocoferol), identificados em extratos das folhas de *Caraipa densifolia* Mart. foram identificados e quantificados por CG-EM. As informações obtidas nesse trabalho trazem contribuições relevantes para o conhecimento das várias formulações geralmente utilizadas na medicina popular e indústrias farmacêuticas, representando uma etapa importante para um estudo de um fitoterápico. O ensaio da capacidade antioxidante dos extratos FST, FSD e FSH revelou uma significativa atividade, obtendo assim, melhor atividade antioxidante o extrato FST com $IC_{50} 2,1 \text{ mg/mL}$. Os extratos com melhor inibição da enzima Acetilcolinesterase em concentração de 2 mg/mL , aplicados $2,5 \mu\text{L}$. das foram FH, TSH, CSH, FSM e FM. O teste moluscicida com caramujo da *Biomphalaria glabrata* aplicado aos extratos FH e FM, resultou índice de mortalidade 100% para FH em 24h e 60% e 80% para FM em 48h.

ABSTRACT

Thirty three secondary plant substances were detected in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia* Mart. Phenolic compounds were preliminarily identified and quantitated by HPLC-ESI-MS after column chromatography on Sephadex LH-20. Structures of the compounds, purified by semi-preparative HPLC, were further characterized by nano-ESI-MS-MS. The presence of gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, chlorogenic acid (plus an isomer), methyl gallate, *p*-coumaric acid quinate, epicatechin, procyanidin dimer B₂, procyanidin trimer C₁, syringic acid, 1, 2, 3, 6-tetragallate glucoside, 1, 3, 4, 6-tetragallate glucoside, corilagin, ellagic acid, methyl ellagic acid rhamnoside, quercetin-3-*O*-rhamnoside, two apigenin-*C*-glycosides (vitexin and isovitexin), three further apigenin, cucumerin A, cucumerin B and cucumerin C, two luteolin-*C*-glycosides (orientin and isoorientin) are reported in this species for the first time. In addition, the previously reported following terpenoids, lupeol, lupenone, betulinic acid, betulin, friedelin and a previously non-characterized terpenoid in this species, friedelinol were identified and quantitated by GC-MS. A previously identified sterol was β -sitosterol along with stigmasterol in this species for the first time. The vitamins α -tocopherol and γ -tocopherol were also identified in extracts of the leaves of *Caraipa* species for the first time. Information obtained in this study provide significant contributions to the knowledge of the various formulations commonly used in folk medicine and pharmaceutical industry, representing an important step towards a study of a phytotherapeutic. The test of antioxidant capacity of extracts FST, FSD and FSH showed a significant activity, thereby obtaining better antioxidant extract FST with IC₅₀ 2, 1mg/mL. The extracts with the best inhibition of Acetylcholinesterase in concentration 2mg/mL applied 2.5 μ L. were of FH, TSH, CSH, FSM and FM. The molluscicidal test with the snail *Biomphalaria glabrata* extracts applied to FH and FM resulted mortality rate 100% for FH in 24 and 60% and 80% for FM in 48 hours.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xv
LISTA DE FLUXOGRAMA	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
 CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	1
 CAPÍTULO II	
2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	3
2.1 Considerações botânicas sobre a família Clusiaceae	3
2.2-Considerações botânicas sobre o gênero <i>Caraipa</i> Aubl.....	5
2.3-Considerações botânicas sobre a espécie <i>Caraipa densifolia</i> Mart.....	5
 CAPÍTULO III	
3. PARTE EXPERIMENTAL	8
3.1 Material e Métodos	8
3.1.1 Suportes para cromatografia	8
3.1.2. Outros aparelhos	11
3.2. Material Botânico	12
3.3 Obtenção dos extratos brutos	13
3.3.1 Tratamento cromatográfico dos extratos das cascas	15
3.3.2 Tratamento cromatográfico dos extratos das Folhas	17
3.3.3 Tratamento cromatográfico dos extratos dos Talos e Frutos	18
3.4 Ensaio antioxidante hipoxantina / xantina oxidase	19
3.4.1 Ensaio - inibição da enzima acetilcolinesterase.....	20
3.4.2 Teste com caramujo da <i>Biomphalaria glabrata</i>	21
 CAPÍTULO IV	
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Identificação dos Compostos	22
4.1.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos	22
4.2. Identificação e Quantificação dos Compostos Triterpenóides por CG-EM.	36

4.2.1 Determinação estrutural de CSH2b2	43
4.2.2. Determinação estrutural de CSH3e.....	49
4.3 Ensaio Antioxidante Hipoxantina /Xantina Oxidase	55
4.4. Ensaio - Inibição da Enzima Acetilcolinesterase.....	56
4.5. Teste com caramujo da Biomphalaria glabrata.....	57
 CAPÍTULO V	
5. ANEXOS	70 -90
 CAPÍTULO VI	
6. CONCLUSÕES.....	91
 CAPÍTULO VII	
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92-97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. A distribuição geográfica da família Clusiaceae	4
FIGURA 2. Árvore Tamaguaré (<i>Caraipa densifolia</i>)	7
FIGURA 3. Localização da coleta do material botânico de <i>Caraipa densifolia</i>	12
FIGURA 4. Material vegetal: (a) exsicata; (b) folhas e talos; (c) cascas de <i>Caraipa densifolia</i>	12
FIGURA 5. Cromatograma dos compostos do extrato metanólico das folhas de <i>C. densifolia</i>	23
FIGURA 6. Cromatograma dos compostos do extrato metanólico das frutos de <i>C. densifolia</i>	23
FIGURA 7. Cucumerinas A,B e C	33
FIGURA 8. Cromatograma do extrato hexânico das folhas de <i>C. densifolia</i> por CG-EM. ...	38
FIGURA 9. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CSH2b2	46
FIGURA 10. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CSH2b2	47
FIGURA 11. Espectro de RMN ¹³ C [(CDCl ₃), 125 MHz] de CSH2b2	47
FIGURA 12. Expansão do espectro de RMN ¹³ C [(CDCl ₃), 125 MHz] de CSH2b2	48
FIGURA 13. Espectro de RMN ¹³ C – DEPT 135° de CSH2b2	48
FIGURA 14. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CSH3e	52
FIGURA 15. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de CSH3e.....	52
FIGURA 16. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de CSH3e	53
FIGURA 17. Expansão do espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de CSH3e	53
FIGURA 18. Espectro de RMN ¹³ C - DEPT 135° de CSH3e.....	54
FIGURA 19. Inibição da atividade da xantina oxidase pelos extratos FST, FSD e FSH ...	55
FIGURA 20. <i>Schistosoma mansoni</i> (verme)	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Os rendimentos das frações obtidas por soxhlet e dos chás por infusão, decocção e por tintura.....	14
TABELA 2. Compostos do extrato metanólico das folhas de <i>Caraipa densifolia</i> Mart.	24
TABELA 3. Compostos do extrato metanólico dos frutos de <i>Caraipa densifolia</i> Mart.	28
TABELA 4. Rendimentos dos compostos fenólicos por extração das folhas de <i>C. densifolia</i>	31
TABELA 5. Rendimentos dos compostos fenólicos e polifenólicos por soxhlet com metanol dos.....	32
TABELA 6. Rendimentos dos compostos polifenólicos por extração da casca e talo de <i>Caraipa</i>	34
TABELA 7. Fragmentação dos compostos fenólicos e polifenólicos por CLAE-ISE-EM e Nano-ISE-EM dos extratos das folhas e frutos <i>Caraipa</i>	35
TABELA 8. Rendimentos dos triterpenoides, esteroides e vitaminas por extração em soxhlet em	36
TABELA 9. Estrutura dos compostos nos extratos hexânicos das folhas de <i>C. densifolia</i>	39
TABELA 10. Fragmentação dos compostos triterpenóides, esteróis e vitaminas identificados por CG-EM de <i>Caraipa densifolia</i> Mart.	42
TABELA 11. Deslocamentos químicos em ppm de carbono 13 (δ) [(CDCl ₃), 125 MHz] para CSH2b2, com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros, utilizando a técnica RMN ¹³ C-DEPT 135°.....	44
TABELA 12. Dados das absorções de RMN ¹³ C (δ) [(CDCl ₃), 125 MHz] de CSH2b2 em... 45	45
TABELA 13. Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ)[(CDCl ₃), 125 MHz] para CSH3e.....	50
TABELA 14. Dados das absorções de RMN ¹³ C (δ) [(CDCl ₃), 125 MHz] de CSH3e em	51
TABELA 15. Resultado da inibição das frações da enzima acetilcolinesterase.....	57
TABELA 16. Resultados dos experimentos com caramujo da <i>Biomphalaria glabrata</i>	58

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Esquema do ensaio antioxidante hipoxantina/xantina oxidase.....	19
--	----

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 1 - Fracionamento do extrato obtido a partir das cascas de <i>C. densifolia</i> .	16
FLUXOGRAMA 2 - Fracionamento do extrato obtido a partir das folhas adultas de <i>C. densifolia</i>	17
FLUXOGRAMA 3 - Fracionamento do extrato obtido a partir dos talos e frutos de <i>C. densifolia</i>	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CC	- cromatografia em coluna
CCD	- cromatografia em camada delgada
CG-EM	-cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas
CLAE-ISE-EM	- cromatografia líquida de alta eficiência-ionização por spray de elétrons acoplado a espectrometria de massas
DAD	- detector de arranjo de diodos
EM	- espectro de massas
IV	- infravermelho
J	- constante de acoplamento (em hertz)
m	- multiplete
m/z	- relação massa / carga íon
ppm	- partes por milhão
RMN ^1H	- ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	- ressonância magnética nuclear de carbono
NANO/IES-EM	- espectrometria de massa com ionização “eletrospray”
DHBA	- ácido diidroxibenzóico
IC ₅₀	- concentração inibitória em 50% da célula
s	- simpleto
sl	- simpleto largo
t_R	- tempo de retenção
UV	- ultravioleta
δ	- deslocamento químico

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, os interesses voltam-se novamente para a Amazônia. Desta vez, atraídos por sua biodiversidade, seu imenso banco genético, sua gigantesca diversidade de fauna, flora e minerais. É nesse laboratório natural que, há centenas de anos, os povos indígenas, habitantes primevos da Amazônia, vêm fazendo uso da flora e desenvolvendo empiricamente técnicas de cura para diversas doenças. Essa prática vem sendo transmitida de geração para geração, perpetuando, dessa forma, o etnoconhecimento. O conhecimento sobre as plantas medicinais é importante para o desenvolvimento de produtos fitoterapêuticos, que podem contribuir muito para a preservação da qualidade de vida e para a erradicação de diversas doenças (SILVEIRA, 2003).

A Amazônia destaca-se como fonte promissora de novos constituintes químicos por ser considerada uma das regiões detentoras de maior densidade do planeta, apresentando uma incrível variedade de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. Entretanto, mesmo possuindo um considerável número de espécies vegetais, poucas são submetidas a uma investigação química e menor ainda é a porcentagem referente ao estudo da potencialidade farmacológica.

A importância da espécie *Caraipa densifolia* Mart para a medicina popular está associada a relatos feitos por comunidades localizadas em pontos distintos na Amazônia, no Peru e na Colômbia (NELSON *et al.*, 1976). A seiva (resina avermelhada) obtida da casca e a infusão das folhas são utilizadas pela medicina popular no tratamento de dermatoses.

Conhecer as substâncias capazes de causar o efeito medicinal popularmente difundido é uma preocupação que deve ser considerada para garantir a eficácia e segurança do uso de tais drogas.

O levantamento bibliográfico ao banco de dados *Chemical Abstract*, *SciFinder Scholar* e *Web of Science* revelou raríssimos estudos fitoquímicos para a espécie *Caipara densifolia*, assim também como em todas as espécies pertencentes ao gênero. Porém foi possível encontrar vários trabalhos relacionados com a atividade biológicas para as espécies pertencentes a família Clusiaceae, encontramos 375 citações, onde várias classes de compostos estão presentes em diversas espécies.

Esta tese traz uma breve descrição botânica da espécie estudada, uma pesquisa bibliográfica sobre a composição química dos exemplares da família Clusiaceae é muito estudada que antes era conhecida como Gutifereae.

Desde a década de 30 até o presente momento, a análise farmacológica dos extratos das partes da planta, além da descrição dos processos de isolamento e identificação dos compostos encontrados.

Os objetivos deste trabalho são:

- 1) avaliar os perfis fitoquímicos, por meio do estudo de folhas, cascas, talos e frutos de *Caraipa densifolia* Mart., as substâncias identificadas nos extratos;
- 2) investigar o potencial antioxidante;
- 3) verificar os extratos promissores do índice de mortalidade do caramujo (*Biomphalaria glabrata*), que é o hospedeiro da *Schistosoma mansoni*, a responsável pela esquistossomose;
- 4) O índice de inibição da enzima acetilcolinesterase, utilizando os extratos da referida espécie.

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 Considerações botânicas sobre a família Clusiaceae

A família Clusiaceae (Lindl.) possui aproximadamente 50 gêneros e 1200 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais do globo. Entretanto, alguns gêneros se desenvolvem com grande facilidade nas regiões norte de zonas temperadas. Esta família engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, derivados químicos de interesse farmacêutico e tintas. A maioria das espécies está distribuída em três gêneros: *Hypericum* L. (350 spp), *Clusia* L. (200 spp) e *Garcinia* L. (200 spp). Clusiaceae apresenta em sua constituição química, compostos como: benzofenonas, floroglucinóis, flavonóides, xantonas, cumarinas, antraquinonas, esteróides, terpenos e compostos fenólicos de suas diversas espécies.

De acordo com a classificação filogenética, Clusiaceae Lindley pertence à ordem Malpighiales Martius e é considerada monofilética com base em sinapomorfias químicas e anatômicas; o nome tradicional para a família, Guttiferae, significa “portando goma”, em referência à secreção de coloração variada, característica do grupo (JUDD *et al.*, 1999). Nesta família ocorrem aproximadamente 50 gêneros de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo com apenas um gênero atingindo as regiões temperadas, cerca de 1200 espécies (JOLY, 1993) (Fig. 01, p. 4). As espécies dessa família são predominantemente lenhosas e possuidoras de látex na maioria de seus tecidos, possuem hábitos bastante variados, podendo ser plantas arbóreas, epífitas, hemiepífitas ou, ocasionalmente, lianas (OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Segundo JOLY, a família Clusiaceae é constituída por:

“Plantas primariamente lenhosas, arbóreas ou arbustivas, lactescente, ou não, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas isoladas, ou reunidas em inflorescência. Flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial. Sépalas e pétalas em número variável, de 12 a 14. Androceu variado, composto por 4 a muitos estames, livres ou formando grupos ou soldados em tubo. Ovário súpero formado por

1 a 15 carpelos, soldados entre si, multilocular ou com um só lóculo e com muitos óvulos. Fruto em geral seco, capsular septicida ou septífraga, ou ainda drupáceo ou baciforme. ” (JOLY, 1993).

Clusiaceae circunscreve diversas plantas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, derivados químicos de interesse farmacêutico, tintas e madeiras nobres como por exemplo, *Calophyllum* (HUTCHINSON, 1969). No Brasil, a família possui aproximadamente 19 gêneros, sendo que os mais representativos são: *Kielmeyera* Mart. & Zucc. (pau-santo), *Caraipa* Aubl, *Patonia* R. Wight (obacuri), *Clusia*L., *Rheedia* L. e *Calophyllum* L (ARQUIMEDES, 2005).



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Mapa-m%C3%BAndi>

Figura 1. A distribuição geográfica da família Clusiaceae

2.2-Considerações botânicas sobre o gênero *Caraipa* Aubl.

No Brasil, as espécies do gênero *Caraipa* são conhecidas popularmente por diversos nomes tais como: Tamaguaré, Caraipa, Camaçari, Tamacoaré, Tamacuarí dentre outros. Em muitas espécies do gênero as árvores chamam a atenção por suas flores brancas e perfumadas, sua seiva (resina avermelhada) obtida da casca. O látex, chamado "óleo de tamacoaré" extraído do tronco de certas espécies é usado na medicina popular para tratamento de várias doenças de pele, úlcera de córnea e reumatismo, e as sementes, como antihelmíntico. As glândulas grandes no ápice do conectivo produzem um óleo muito aromático que atrai abelhas coletoras de pólen.

O gênero *Caraipa* é constituído por 60 espécies, que de acordo com KUBITZKI, apresentam-se como:

“Plantas lenhosas, perenifólias com glândulas produtoras de látex presente; folhas alternas, margem inteira perenifólias, pecíolo relativamente curto. Inflorescência terminal ou axilar panículas ou racemos. Flores bissexuais, com fragrância, constituída por 5 sépalas, pétalas contorcida, amarela ou esbranquiçada. Estames numerosos, persistente após a floração; filamentos delgados, mais ou menos livre. Ovários sincárpico, súpero, 3-locular, poucos óvulos por carpelo, estilete simples. Fruto cápsula lenhosa, com 1-3 sementes com ala estreita na maior parte achatada, muitas vezes assimétricos ou curvos, exocarpo frequentemente separando do endocarpo” (KUBITZKI, 1998)

2.3-Considerações botânicas sobre a espécie *Caraipa densifolia* Mart.

Árvore de médio e grande porte que chama a atenção por suas flores brancas e perfumadas, predominante nas matas das várzeas, com sua madeira, de cor parda violáceo, presta-se para a marcenaria e a construção civil por ser considerada forte e durável. Utilizada também na indústria para fabricação de tintas, gomas e pigmentos além de fornece celulose para a fabricação de papel (MABBERLEY, 1987). A importância dessa espécie na medicina popular está associada a relatos feitos por comunidades localizadas em pontos distintos na Amazônia, no Perú e na Colômbia (MENDELSON, H. NELSON, R 1976). A seiva obtida

da casca e a infusão das folhas são utilizadas, na medicina popular, no tratamento de dermatoses como as impigens (*Tinea corporea*) causadas por fungos hematófitos, pano branco (*Pitiriase versicolor*) causado pelo fungo lipofílico *Malassezia fufur* e também contra reumatismo e ferimentos, o tronco exsuda um bálsamo-resina utilizado contra doenças da pele (sarna, herpes), hanseníase, furúnculos e por inseto (ALCIDES et al., 2003). Do embrião pode ser extraído um princípio ativo, eficiente no tratamento de parasitas intestinais, porém sua administração deve ser feita com extrema cautela, em virtude do seu alto poder tóxico (Fig. 02, p. 7) (NELSON, 2003).

De acordo com KUBITZKI, *Caraipa densifolia* apresentam-se como:

“Árvore 3-30 m de altura, folhas 5,5-14 × 2,5-4,5 cm, com 9-14 pares de nervuras secundárias, pecíolo 2-5 (-8) mm de comprimento; cápsulas 17-20 mm de comprimento. Cresce na areia e mato, a base de afloramentos graníticos, gramínea savanas arbustivas, apresenta-se também em matas ciliares, 50-500 (1400 m altitude), difundida em floresta da Bolívia e Amazonas.” (KUBITZKI, 1998).



Foto: Cleoni,2006.

Figura 2. Árvore Tamaguaré (*Caraipa densifolia*)

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Material e Métodos

As análises das folhas, frutos, talos e cascas de *Caraipa densifolia* Mart. *ssp densifolia* envolveram a utilização de diferentes técnicas físico-químicas para a avaliação dos constituintes. Os rendimentos das frações obtidas por soxhlet e dos chás por infusão, decocção e tintura estão apresentados na tabela 1 (p. 14) e foram submetidos a diferentes métodos qualitativos e quantitativos.

3.1.1 Suportes para cromatografia

- As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram feitas em cromatoplasas MERCK PL, Si 60 F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura com suporte em alumínio (20 x 20 cm), alumínio (20 x 20 cm) F₂₅₄ com 0,2 mm de espessura, MERCK (40 – 65) µm e celulose (20 x 20 cm) com 0,2 mm de espessura, MERCK. A revelação das cromatoplasas em camada fina foi feita por exposição à lâmpada ultravioleta de 254 e 365 nm e/ou mediante borrifação com a seguinte solução: vanilina clorídrica, 200 mg de vanilina foram adicionados, sob resfriamento em banho de gelo, 1 mL de HCl concentrado. O volume da solução resultante foi completado para 10 mL com etanol.

- Cromatografia em Coluna (CC)

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro, utilizando como fase estacionária Si 60 – MERCK (partículas de 0,063-0,200mm), SEPHADEX LH-20 (PHARMACIA).

- Cromatografia em Coluna Sephadex.

Os resíduos secos, após suspensão em etanol absoluto, foram imobilizados em Sephadex LH-20. Em seguida, adicionados a uma coluna de vidro (30 x 2,5 cm) preenchida com Sephadex LH-20 suspensa em etanol a nível de 5 cm do topo. O extrato imobilizado foi adicionado ao volume livre da coluna. Depois de acomodado no material gel, o fracionamento foi conduzido por sucessivas adições de metanol (0, 5, 10, 20, 30, 50 e 100%) em etanol (250 mL). Volumes de 250 mL das frações foram recolhidas e o solvente foi removido por evaporação rotativa sob vácuo à 40°C. As frações secas(m=2g), foram suspensas em metanol

(5,0 mL) e diluídas, quando necessário, antes da análise por CLAE. As frações contendo relevantes substâncias foram purificadas por CLAE-semi-preparativa para novas análises espectroscópicas.

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)-semi-preparativa.

A separação das frações polifenólicas identificadas foi realizada em um cromatógrafo líquido HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com um 250 x 10 mm (5 μ) coluna C-18 (Latek, Eppenheim, Alemanha). Para a separação dos compostos individuais dos extratos, a fase móvel consistiu-se de 0,2% de ácido acético em água (solvente A) e acetonitrila (solvente B), utilizando os seguintes solventes em gradiente ao longo de um tempo total de execução de 50 minutos: inicialmente 95%A por 2 minutos; seguido de 75%A por 8 minutos; 60%A–10 minutos; 50%A–10 minutos; finalizando o tempo total de análise a 0% A. A velocidade de fluxo da fase móvel foi de 3 mL/min. Os picos eluídos a partir da coluna foram coletados em um Agilent HP 220 Microplacas Sampler. Cada fração purificada foi agrupada e o solvente removido por liofilização.

Preparação da amostra: 1) Solução de CHCl_3 : MeOH(1:1) , adicionar em cada fração 4,0mg/mL; 2) Adicionar 2 mL da fração em cada vidrinho padronizado elevados ao CLAE.

- Cromatografia líquida de alta eficiência - espectrometria de massa com ionização de spray de elétrons (CLAE-ESI-EM).

A análise das frações foi conduzida por CLAE Agilent 1100, acoplada a um único detector seletivo de massa quadrupolo Agilent (HP 1101; Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18, 5 μ , 250 mm x 4 mm (i.d.) (Phenomenex Ltd, Aschaffenberg, Alemanha). As frações secas dos diferentes extratos, obtidos por cromatografia através de uma coluna Sephadex LH-20, foram suspensas em metanol (4,0 mg/mL). Volume de 1,0 mL foi adicionado a um tubo de plástico de microcentrífuga e centrifugado a 14500 rpm. O sobrenadante (10,0 μ L) foi diretamente injetado no CLAE. O precipitado foi dissolvido em DMSO (1,0 mL) e novamente 10,0 μ L foram injetados no CLAE. A fase móvel consistiu-se de 2% de ácido acético em água (solvente A) e metanol (solvente B) com o seguinte gradiente: inicialmente 95%A por 2 minutos; seguido de 75%A por 8 minutos; 60%A–10 minutos; 50%A–10 minutos; finalizando o tempo total de análise a 0%A. Detecção de compostos fenólicos foi por meio de absorção UV (A) em 278 e 340 nm à temperatura ambiente. Espectros de massa, no modo do

íon negativo, foram gerados nas seguintes condições: tensão de fragmentação de 100 V, tensão capilar de 2500 V, pressão de nebulização de 30 psi, gás de secagem à temperatura de 350°C, massa na faixa de 00– 1500 D. A curva dos padrões foi obtida sob condições similares na faixa de concentração de 0–4 mM. O controle do instrumento e de manipulação dos dados foi realizado com o mesmo software analítico que o utilizado para as análises de CLAE.

- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).

A análise foi realizada utilizando uma cromatografia de massa HP 5973 acoplada a um detector seletivo do cromatógrafo gasoso HP 5890. Antes de CG-EM, extratos secos de hexano foram suspensos em metanol (4,0 mg/mL). Aliquotas de 100 µL foram transferidas para um tubo de vidro teste e o solvente removido sob fluxo de nitrogênio antes da derivatização por adição de BSTFA (bis(trimetilsilício)tri-fluoroacetamida) a 60°C por 30 minutos. Os volumes de 1µL das amostras foram injetados no cromatógrafo gasoso. A separação dos analitos foi obtida em coluna capilar HP 5MS (30 m x 0,25mm I.D, 0,25 µm, película de espessura). Gás hélio foi utilizado como gás de transporte com velocidade linear de 0,9 mL/s. A temperatura inicial do forno foi de 100°C, seguindo aquecimento na faixa de 100-270°C a 4°C/min, finalizando com a 270°C por 20 minutos. A temperatura do injetor do CG foi 250°C. A linha de transferência de temperatura foi realizada a 280°C. Os parâmetros do espectrômetro de massa no modo EI foram: fonte iônica de temperatura: 230°C; energia eletrônica: 70 eV; corrente de filamento: 34,6.µA, multiplicador de voltagem eletrônica: 1200 V. As curvas padrões foram geradas em condições semelhantes no intervalo de 0-50 µg/mL.

As análises cromatográficas: CLAE-ISE-EM, nano-ISE-EM e CG-EM foram realizadas na central analítica da Divisão de Oncologia Preventiva, National Center Tumor Cancer Research Center, Heidelberg-Alemanha.

- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C)

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) foram obtidos em espectrômetros Bruker, modelo Avance DRX-300 e modelo DRX-500, do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará, operando na frequência do hidrogênio e do carbono a 500 MHz.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), em que as multiplicidades das absorções em RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: singlete (*s*), dubleto (*d*), tripleto (*t*), quarteto (*q*) e multiplete (*m*).

As amostras analisadas foram dissolvidas em solventes deuterados - clorofórmio (CDCl_3) e metanol (CD_3OD) - e foram descritas através da convenção: C (carbono desidrogenados), CH (carbonos metínicos), CH_2 (carbonos metilênicos) e CH_3 (carbonos metílicos).

- Reagentes

Ácido acético, dimetil sulfóxido (DMSO), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), hipoxantina, ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrila, metanol e a enzima xantina oxidase foram compradas da Merck (Darmstadt, Alemanha). K_2HPO_4 e KH_2PO_4 foram obtidos da Serva (Heidelberg, Alemanha). Ácido salicílico e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram comprados da Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha) e o ácido ascórbico foi obtido da Sigma Chemie (Deisenhofen, Alemanha). Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho eram de pureza P.A. ou para HPLC. Todas as soluções foram elaboradas a partir de água bidestilada.

3.1.2. Outros aparelhos

- Evaporador Rotatório

Os solventes foram eliminados das frações e dos extratos, sob pressão reduzida, com evaporadores rotativos da Buchi B-480 e TECNAL, em banho-maria, com temperatura controlada.

- Liofilizador: SARANA; E-C-MICROMODULYO, bomba: Modelo n° VP80 24Kg, VALUPUMP.

- Centrífuga HETTICH; RPM 13500.

3.2. Material Botânico

As cascas, folhas, talos e frutos de *Caraipa densifolia* Mart utilizados para estudo foram coletados 27 de agosto 2006 na – Ilha de Santa Luzia a 3 Km de São Gabriel da Cachoeira-Amazonas-Brasil (Fig. 3) as 16:00 h. A coleta foi realizada em uma árvore de grande porte, 30 metros de altura, na época da floração (germinação) e sob solo igapó. A exsicata foi identificada pelo Dr. José Eduardo Lahoz S. Ribeiro do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA. O referencial da espécie encontra-se depositado no Hérbario do INPA: (nº 222-218) (Fig. 4).

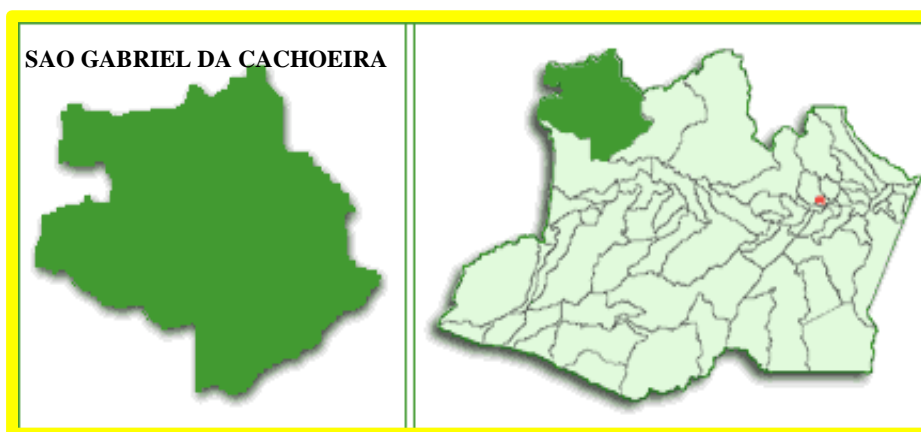
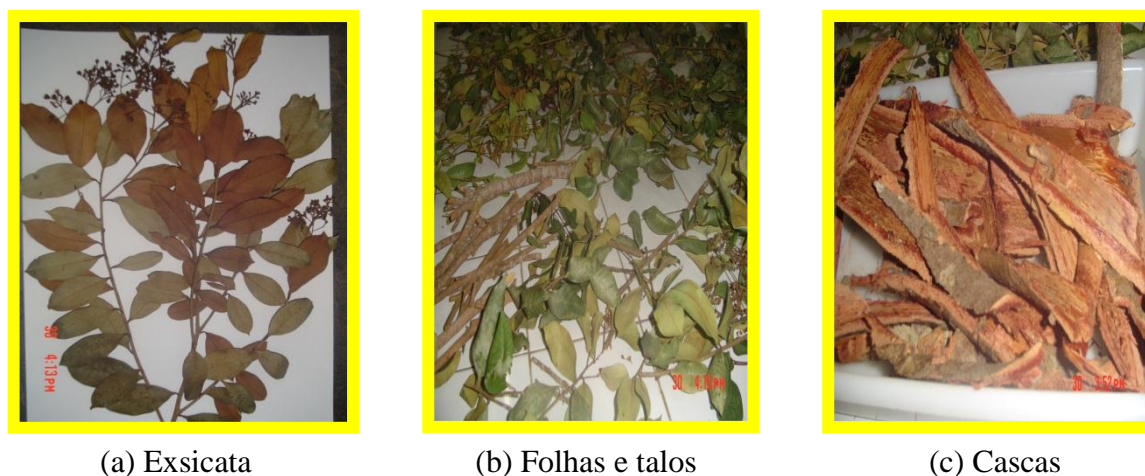


Figura 3. Localização da coleta do material botânico de *Caraipa densifolia*



(a) Exsicata

(b) Folhas e talos

(c) Cascas

Figura 4. Material vegetal: (a) exsicata; (b) folhas e talos; (c) cascas de *Caraipa densifolia*.

3.3 Obtenção dos extratos brutos

O material botânico foi desidratado na temperatura ambiente e triturado e, após trituração, foi possível obter os seguintes pesos e suas respectivas codificações: **FS** (folhas secas) m = 30 g, **F** (frutos secos) m = 30 g, **CS** (cascas secas) m = 1400 g e **TS** (talos secos) m = 310 g. Todas as partes vegetais, (m=30g) foram submetidos à extração sequencial em Soxhlet, com hexano (250mL) e metano (250mL), por 3h. O filtrado foi concentrado à pressão reduzida, obtendo-se os extratos das folhas, frutos, cascas e talos que foram codificados em: **FSH** (folha seca hexano) m = 1,3 g; **FSM** (folha seca metanol) m = 6,3 g; **FH** (fruto hexano) m = 3,4 g; **FM** (fruto metanol) m = 7 g; **CSH** (casca seca hexano) m = 101 g; **CSM** (casca seca metanol) m = 36,5 g; **TSH** (talo seco hexano) m = 6,4 g; **TSM** (talo seco metanol) m = 21,19 g.

Uma outra parte do material botânico desidratado (folhas, cascas e talos) foi submetido aos seguintes processos de extração:

- **Tintura** - As folhas secas m = 11,5 g foram cortadas com tesouras e transferidas para um erlenmeyer com adição de 100mL a 70% de etanol, ficando em repouso durante 24h. Após essas 24h, procedeu-se à evaporação por pressão reduzida. O extrato obtido foi codificado como **FST** (folha seca tintura) m = 7,64 g.
- **Infusão** - As folhas secas m = 11,5 g foram passadas no moinho e transferidas para um erlenmeyer com adição de 200 mL de água fervente. Após repouso de 24h, a mistura foi filtrada, liofilizada e o sólido resultante codificado como **FSI** (folha seca, chá por infusão) m = 755,5 mg.
- **Decocção** - As folhas, as cascas e os talos secos (m = 11,5 g de cada) foram cortados com tesouras e transferidos para um béquer separadamente. A água foi aquecida em erlenmeyer até a ebulição. Logo após, o material vegetal foi adicionado. Após 15 minutos em ebulição e um repouso de 24h, o decocto foi filtrado e liofilizado. Os sólidos resultantes codificados como: **FSD** (folha seca, chá por decocção) m = 1,0 g, **TSD** (Talo seco, chá por decocção) m = 839,5 mg e **CSD** (casca seca, chá por decocção) m = 952,5 mg.

As frações obtidas por soxhlet e os chás por infusão, decocção e por tintura apresentam os rendimentos em (%), como se observa na tabela 1.

Tabela 1. Os rendimentos das frações obtidas por soxhlet e dos chás por infusão, decocção e por tintura.

PARTE DA PLANTA	CÓDIGO	QUANT. DO MATERIAL SECO	MASSA DO EXTRATO	RENDIMENTO (%)
Fruto seco hexano	FH	30,45 g	3,4 g	11,2%
Fruto seco metanol	FM	30,45 g	7,0 g	23%
Folha seca hexano	FSH	30 g	1,3 g	4,4%
Folha seca metanol	FSM	30 g	6,3 g	21%
Casca seca hexano	CSH	1400 g	101 g	7,3%
Casca seca metanol	CSM	1400 g	36,5 g	2,6%
Talo seco hexano	TSH	310 g	6,4 g	2,1%
Talo seco metanol	TSM	310 g	21,2 g	6,9%
Folha seca tintura	FST	11,5 g	7,64 g	66,5%
Folha seca, chá por infusão	FSI	11,5 g	0,76 g	6,6%
Folha seca, chá por decocção	FSD	11,5 g	1,0 g	8,7%
Casca seca, chá por decocção	CSD	11,5 g	0,95 g	8,3%
Talo seco, chá por decocção	TSD	11,5 g	0,84 g	7,3%

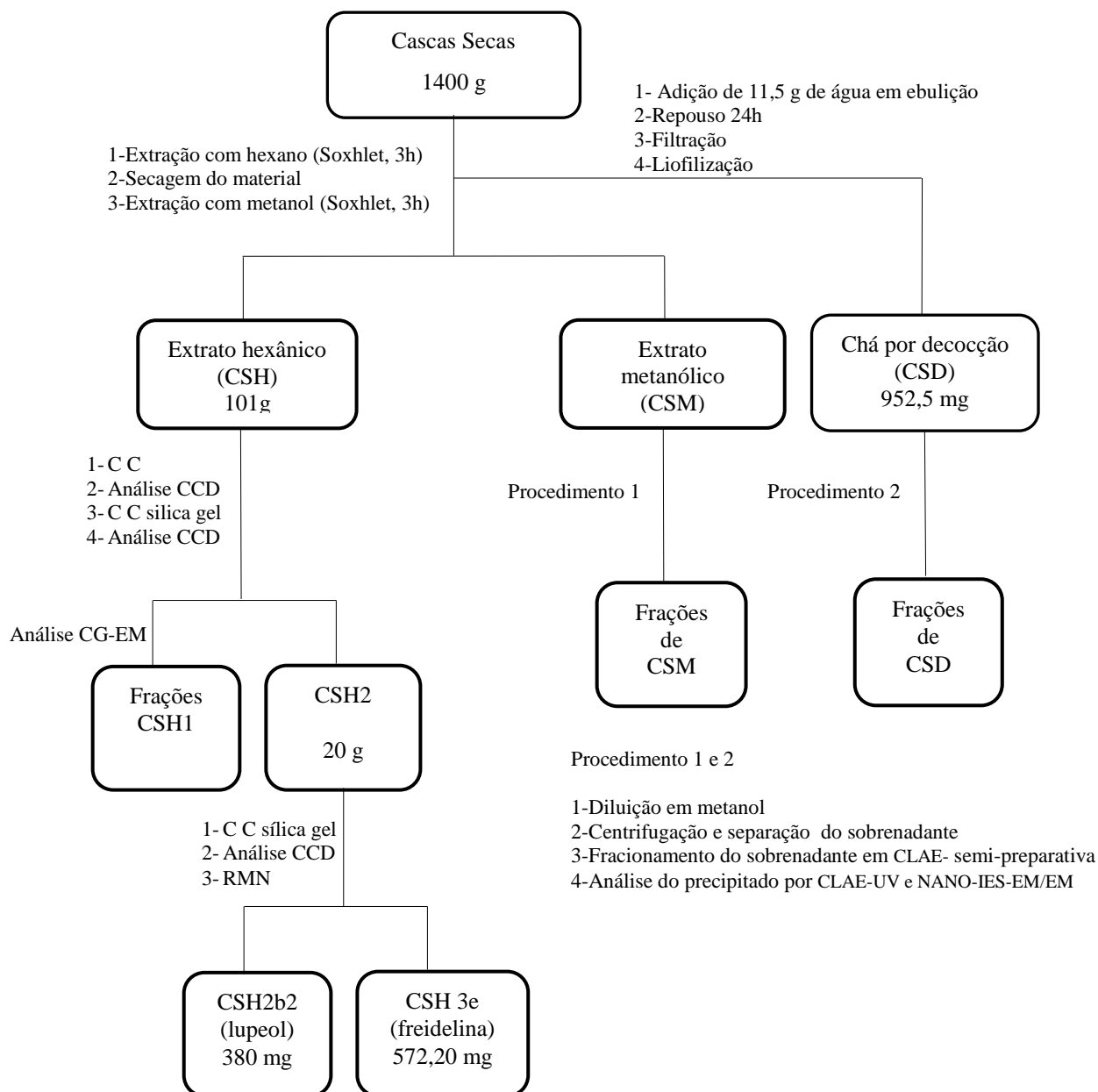
As frações obtidas por soxhlet e os chás por infusão, decocção e por tintura foram analisados por cromatografia de camada fina, com os seguintes sistemas de solventes: [Hexano:AcOEt (7:3); (3:7); (1:1)]. As cromatoplacas foram reveladas com exposição da lâmpada ultravioleta (254 e 365nm) e com vanilina clorídrica. A coloração roxa obtida após a aplicação de vanilina clorídrica foi o indicativo da presença de triterpenos e compostos polifenólicos, enquanto a coloração amarelo-clara representativa de flavonóides.

3.3.1 Tratamento cromatográfico dos extratos das cascas

Após a obtenção do extrato hexânico (CSH, m = 62 g) das cascas de *Caraipa densifolia*, a fração hexânica foi submetida ao fracionamento por uma coluna (filtrante) cromatográfica 5cm x 50cm, utilizando, como fase estacionária, gel de sílica 60 (0,0063-0,200mm) (70-230 Mesh) e, como fase móvel, hexano 100%, diclorometano 100%, acetato de etila 100% e metanol 100%, nessa ordem crescente de polaridade. Após análise em CCD, as frações semelhantes foram reunidas, originando, dentre outras, as seguintes subfrações CSH1 (m = 11 g) e CSH2 (m = 20 g). Para CSH1 obedeceu-se ao seguinte procedimento: foi solubilizado em CHCl₃:MeOH (1:1) 4,0 mg/mL; transferiu-se 100 µL para um tubo de 15 mL; adicionou-se gás nitrogênio por 4 min e em seguida 100 µL MSTFA (Metil-N (Trimetilsilil)trifluoroacetamida) na fração CSH; aqueceu-se a temperatura de 60°C, por 30 minutos e transferiu-se 100 µL para os frascos padrões e finalmente analisou-se por CG-EM.

A fração, CSH 2 m = 20 g, que apresentou manchas bem definidas foi submetida a cromatografia em coluna (CC), (3,5 cm x 44,0 cm), utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,0063-0,200 mm) (70-230 Mesh), com os seguintes sistemas de solventes: Hexano 100%; Hex/CHCl₃ (9:1); (8:2); (7:3); (5:5); (4:6); (3:7); (2:8); CHCl₃ 100%; HCl₃/AcOEt (9:1); (8:2); (5:5); AcOEt 100%; AcOEt/MeOH (8:2)(5:5); MeOH 100%. Obteve-se um total de 127 subfrações, as quais foram concentradas por evaporação sob pressão reduzida e analisadas em CCD. As frações semelhantes foram reunidas, originando dentre outras duas subfrações puras codificadas CSH2b2 m = 380 mg e CSH3e m = 572,2 mg. As cromatoplasmas das referidas frações foram reveladas em UV (250 e 365 nm) e borrifadas com vanilina clorídrica. Após serem reveladas com vanilina clorídrica, apresentaram coloração amarelo-clara e roxo-escuro, típicas de triterpenos. As mesmas foram submetidas a análises por Ressonância Magnética Nuclear.

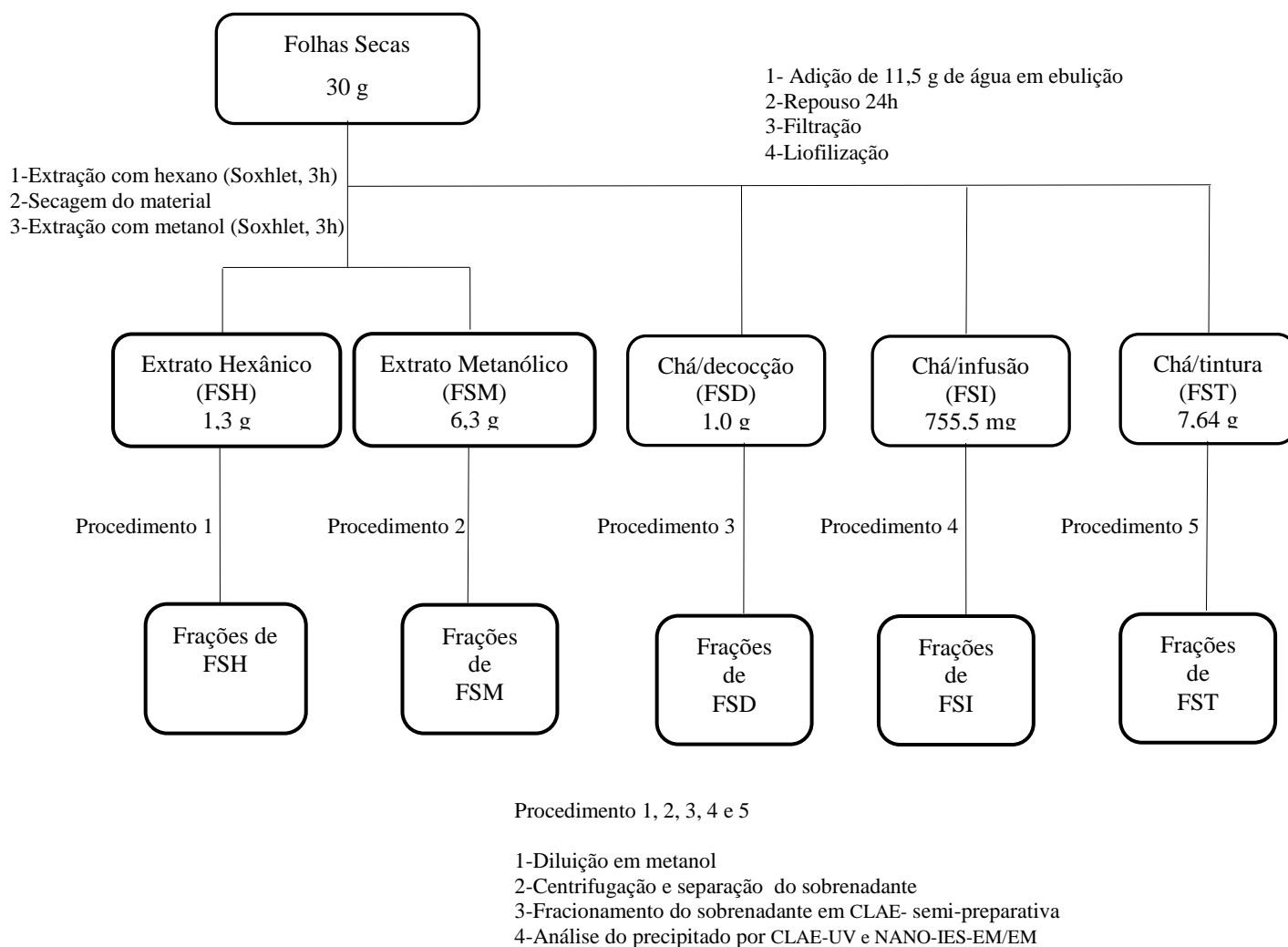
Do extrato obtido por extração metanólica (CSM) e por decocção (CSD) preparou-se uma solução 4,0 mg/mL de CHCl₃:MeOH (1:1) transferindo-se 2 mL para os frascos padronizados a fim de serem analisados por CLAE-UV e nano-ISE-EM (Fluxograma 1, p. 28).



Fluxograma 1. Fracionamento do extrato obtido a partir das cascas de *C. densifolia*

3.3.2 Tratamento cromatográfico dos extratos das Folhas

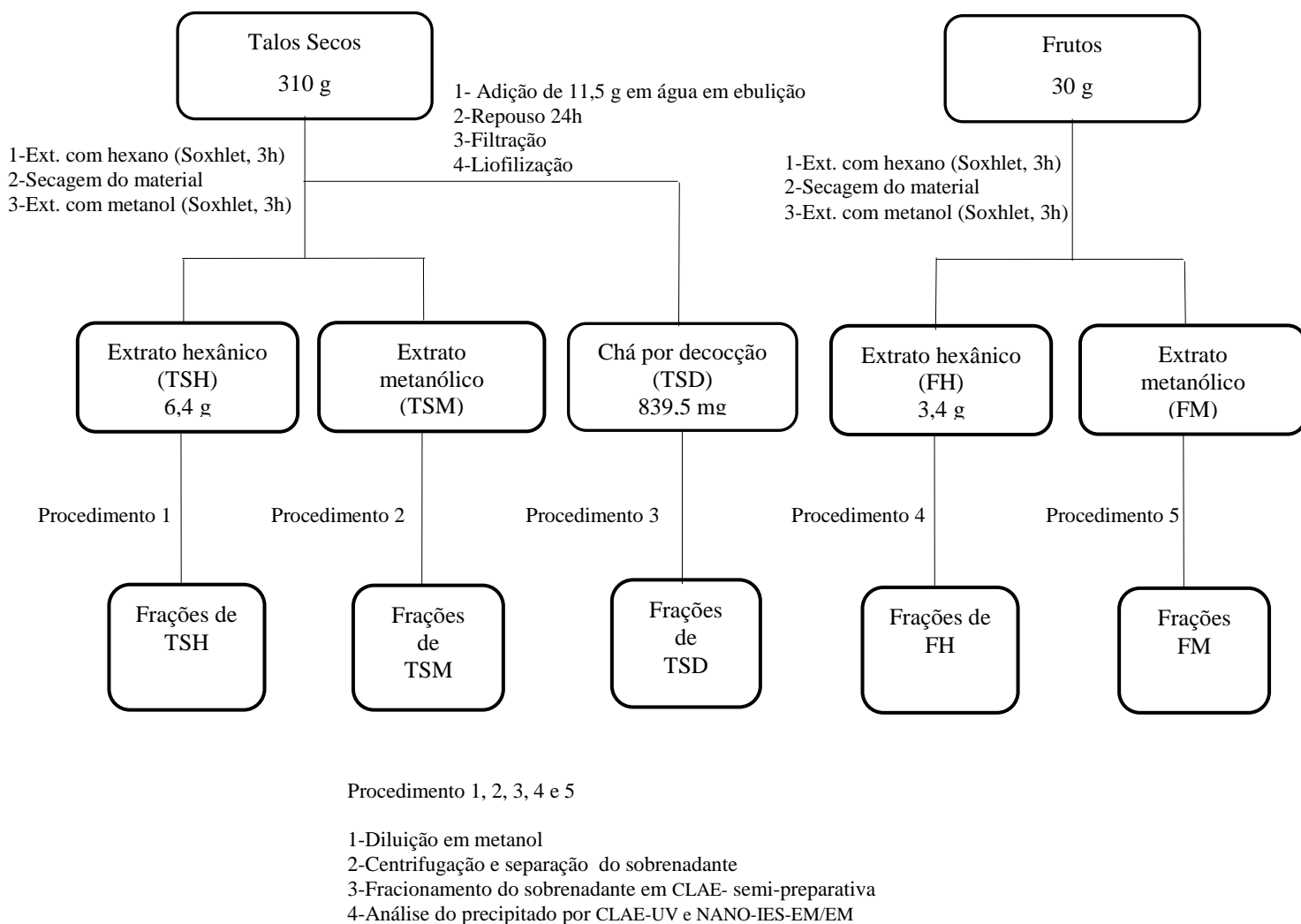
O extrato hexânico e metanólico das folhas de *Caraipa densifolia* assim com os chás obtidos por decocção, infusão e tintura foram fracionados por CLAE-semi-preparativa e suas subfrações foram analisadas por espectrometria de massas obedecendo o mesmo procedimento do extrato metanólico e por decocção das cascas (Fluxograma 2).



Fluxograma 2. Fracionamento do extrato obtido a partir das folhas adultas de *C. densifolia*.

3.3.3 Tratamento cromatográfico dos extratos dos Talos e Frutos.

Do extrato obtido por extração hexânica e metanólica dos talos e frutos em Soxhlet e por decocção dos frutos preparou-se uma solução 4,0 mg/mL de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1), centrifugou-se, separou-se o sobrenadante transferindo-se 2 mL para os frascos padronizados afim de serem analisados por CLAE-semi-preparativa suas subfrações por nano-ISE-EM. (Fluxograma 3).

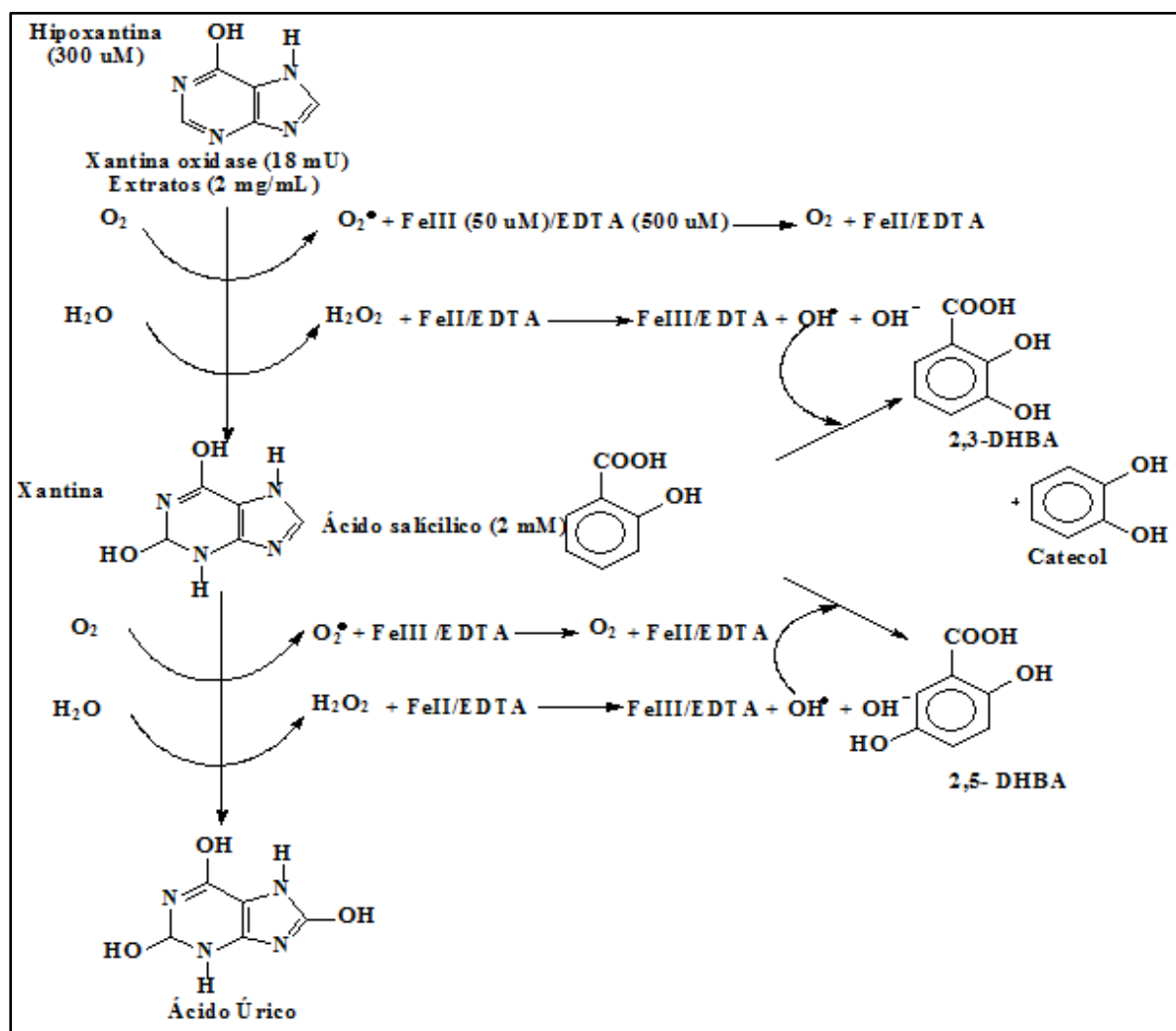


Fluxograma 3. Fracionamento do extrato obtido a partir dos talos e frutos de *C. densifolia*

3.4 Ensaio antioxidante hipoxantina / xantina oxidase

O método utilizado para o “Screening” da atividade antioxidante das frações codificadas FST (folha seca tintura), FSD (folha seca, chá por decocção), FSI (folha seca, chá por infusão) e FSH (folha seca hexano), representado no quadro 1, foi a hidroxilação do ácido salicílico por espécies reativas de oxigênio. Neste caso, os radicais hidroxila competem com o ácido salicílico como substrato ou por doação de próton ao radical hidroxila que representa a forma clássica de atividade antioxidante de muitos compostos polifenólicos. Esse método, denominado hipoxantina/xantina oxidase, é baseado no método desenvolvido por Owen *et al.* (2000). A detecção dos produtos (ácido 2,5-diidroxi benzóico e ácido 2,3-diidroxi benzóico) produzidos pelo ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico foi determinada a partir de curvas padrão dos respectivos difenóis.

Quadro 1. Esquema do ensaio antioxidante hipoxantina/xantina oxidase



Para o ensaio da hipoxantina/xantina oxidase, as quantidades das frações FST (folha seca tintura), FSD (folha seca, chá por decocção) e FSI (folha seca, chá por infusão) variam de 10 µL a 500 µL de uma solução 4,0 mg/mL de cada fração dissolvida no tampão. Foram adicionadas a tubos Eppendorf de 1,0 mL, contendo o mesmo tampão. 5,0 µL de uma diluição 1:5 de enzima xantina oxidase em NH₄SO₄ (3,20 µL) foi adicionada a estes tubos e a reação foi iniciada. Os tubos foram incubados por três horas a 37 °C. Após a incubação, foram adicionados 10 µL de HCl (ácido clorídrico) concentrado a fim de parar a reação; 20 µL da mistura reacional foi analisada por CLAE.

A análise da mistura reacional em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi conduzida no aparelho Hewlett-Packard (HP) 1090, da seguinte forma: o detector UV foi ajustado a 325 nm para a detecção dos produtos da reação (ácidos 2,5-diidroxibenzoico e 2,3-diidroxibenzoico) produzidos pelo ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS) ao ácido salicílico. A fase móvel utilizada consistiu de solução aquosa 2% de ácido acético (solvente A) e metanol (solvente B), seguindo os gradientes e tempo de eluição total de 45 min: inicialmente 95%A:5%B por dois minutos, 75%A:25%B por oito minutos, 60%A:40%B por dez minutos, 50%A:50%B por dez minutos e 0%A:100%B até o tempo final do experimento. A taxa de fluxo da fase móvel foi 1,0 mL/min. As quantidades de difenóis produzidos foram calculadas a partir de curvas padrões de ambos os difenóis-ácidos 2,5-diidroxibenzoico e 2,3-diidroxibenzoico- construídas a partir de cromatogramas obtidos a 325 nm, em concentrações de 0 a 1 mmol/L. O tratamento dos dados foi realizado com um software HP Chemstation em um PC.

3.4.1 Ensaio - inibição da enzima acetilcolinesterase

As frações codificadas FH (fruto seco hexano), FM (fruto seco metanol), FSH (folha seca hexano), FSM (folha seca metanol), CSH (casca seca hexano), CSM (casca seca metanol), TSH (talo seco hexano), FST (folha seca tintura), FSI (folha seca, chá por infusão), CSD (casca seca, chá por decocção), TSD (talo seco, chá por decocção) foram submetidas ao ensaio com a enzima acetilcolinesterase. As seguintes soluções foram preparadas: 1) 50 mM Tris/HCl pH 8; 2) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0.1% de Albumina sérica bovina (BSA) fração V; 3) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0.1 M de NaCl e 0.02 M de MgCl₂.6H₂O; 4) 3 mM de Ácido 5,5'-Ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB ou reagente de Ellman); 5) 15 mM de Iodeto de acetilcolina (ACTI); 6) 1 mM de Ácido 5,5'-Ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB ou reagente de Ellman) e 7) 1 mM de Iodeto de acetiltiocolina (ACTI).

A enzima AChE liofilizada foi dissolvida na solução tampão (1) para preparar uma solução estoque 1000 U/mL, deixando-se na solução por 20 min, depois sob agitação por mais um período de 10-15 min, para obtenção de uma solução homogênea. Para as diluições posteriores, utilizou-se a solução tampão (2).

As frações (1.5 - 2.5 µL) foram aplicadas em CCD, DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0.2 mm Merck. Borrifou-se a placa com as soluções (6) + (7), deixando 3 min. Após secar, borrifou-se a enzima 3 U/mL e, em 10 min, apareceu a coloração amarela, mas onde houve inibição da enzima, observou-se um halo branco. Em 20 - 30 minutos a coloração desapareceu. Como controle positivo foi usado o carbacol, conforme metodologia descrita por (RHEE *et al.* 2001). Concentração das frações 2 mg/ mL aplicados 2,5 µL.

3.4.2 Teste com caramujo da *Biomphalaria glabrata*

As frações codificadas FH (fruto seco hexano) e FM (fruto seco metanol) foram submetidas ao bioensaio com caramujo *Biomphalaria glabrata*, com a utilização da seguinte metodologia: adição do composto em 2 copos distintos, cada copo contendo 5 caramujos (*Biomphalaria glabrata*); cada copo com 125 mL da solução; observações realizadas a cada 24 horas; após as primeiras 24 horas, realizou-se a troca da solução por água e um pedaço de alface para os caramujos sobreviventes e os que morreram foram retirados; controle: Branco = H₂O; negativo = H₂O + Cremofor; Positivo= Niclosamida (3 ppm) e temperatura ambiente em média de 25°C.

Estes experimentos foram realizados no laboratório de bioensaios do Departamento de Química da Universidade Federal de Alagoas, que possui uma criação de caramujos da espécie *B. glabrata*, oriundos da região do Barreiro de Cima, na cidade de Belo Horizonte-MG, e gentilmente cedidos pelo Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ de Belo Horizonte.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos Compostos

As análises iniciais por CCD, CC e CG-EM por CLAE-ISE-EM guiaram os fracionamentos e isolamentos das substâncias subsequentes e serviram de critério para a escolha da metodologia utilizada no trabalho. Os procedimentos encontram-se na parte experimental, páginas 22-35.

4.1.1. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

A identificação dos compostos fenólicos foi determinada pela comparação dos índices de retenção com o banco de dados. As frações metanólicas das folhas e frutos foi realizada através do aparelho CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM, em condições descritas na parte experimental, página 21. As substâncias identificadas foram quantificadas utilizando uma curva padrão de padrões autênticos, que possibilitou a identificação das seguintes substâncias nas folhas (Tab. 2, p. 22-27): **1.** ácido gálico; **2.** ácido 3,4-diidroxibenzoico; **3.** ácido neoclorogênico; **4.** galato de metila; **5.** *p*-coumaroil quinato; **6.** ácido clorogênico; **10.** ácido siríngico; **11.** orientina; **12.** isorientina; **13.** vitexina; **14.** isovitexina; **18.** cucumerina C; **19.** cucumerina A; **20.** cucumerina B.

As substâncias presentes nos frutos (Tabela 3, p.28) foram: **1.** ácido gálico; **2.** 3, 4-ácido diidroxibenzoico; **7.** corilagina; **8.** 1,2,3,6-tetragalato glicosídeo; **9.** 1,3,4,6-tetragalato glicosídeo; **11.** orientina; **12.** isorientina; **13.** vitexina; **14.** isovitexina; **15.** ácido elágico; **16.** quercetina-*O*-raminosídeo; **17.** ácido metil elágico raminosídeo; **18.** cucumerina C.

Os cromatogramas dos extratos das folhas e dos frutos (Fig. 5 e 6, p. 23) apresentam os picos de retenção das substâncias majoritárias detectadas a comprimentos de ondas 278 e 340 nm, detectadas: cucumerinas A e C (**19** e **18**); apigenina-C-glicosídeos (**13**.vitexina e **14**. isovitexina); ácido 3,4-diidroxibenzoico; luteolina-C-glicosídeo (**11**.orientina e **12**.isorientina). Em menor quantidade, detectamos **2.** 3,4- ácido diidroxibenzoico; **6.** ácido clorogênico; **3.** ácido neoclorogênico; **5.** *p*-coumaroil quinato; **10.** ácido siríngico; **1.** ácido gálico; **4.** ácido galato de metila. Encontraram-se ainda quantidades apreciáveis de compostos

elagitaninas, incluindo **7**. corilagina; de **17**. ácido metil elágico raminosídeo (galotaninas sob a forma de dois isômeros); de **8**. 1,2,3,6-tetragalato glicosídeo e de **9**. 1,3,4,6-tetragalato glicosídeo, juntamente com os flavonóides **16**. quercetina-*O*-raminosídeo (Tabela 4 e 5, p. 32). Já as frações da casca e do talo em metanol produziram quantidades muito inferiores de compostos polifenólicos de catequinas e procianidinas. As massas e íons dos compostos encontram-se na tabela 9, página 46.

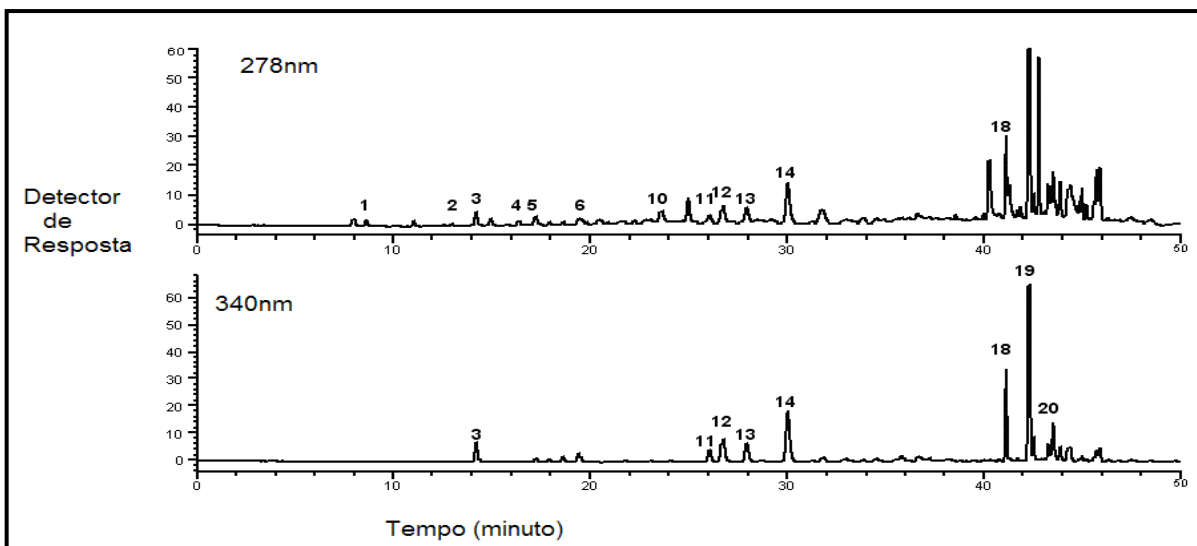


Figura 5. Cromatograma dos compostos do extrato metanólico das folhas de *C. densifolia*.

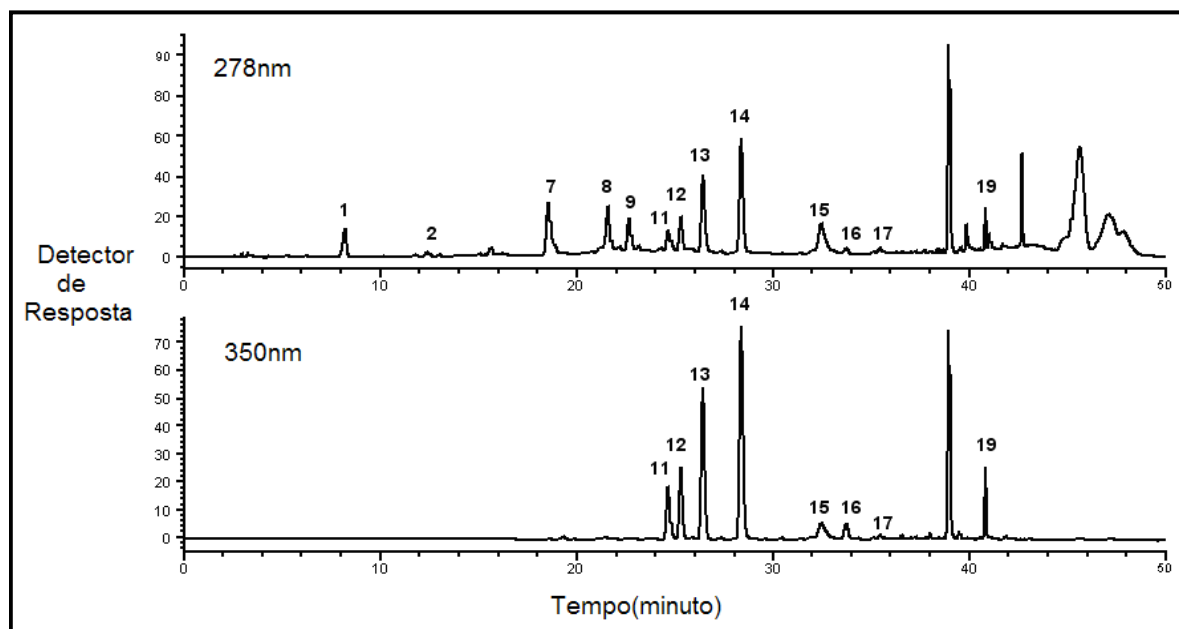
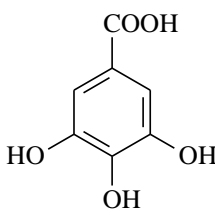
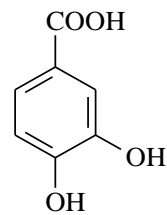
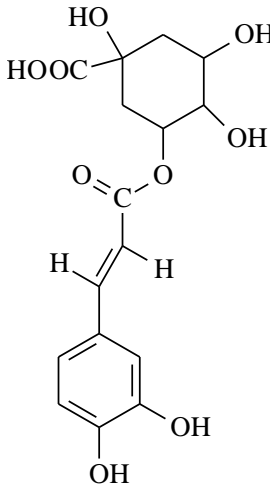
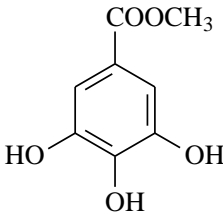


Figura 6. Cromatograma dos compostos do extrato metanólico das frutas de *C. densifolia*.

A partir do tempo de retenção observado nos extratos metanólicos das folhas e dos frutos, foi possível detectar algumas substâncias coincidentes entre elas: ácido gálico; ácido

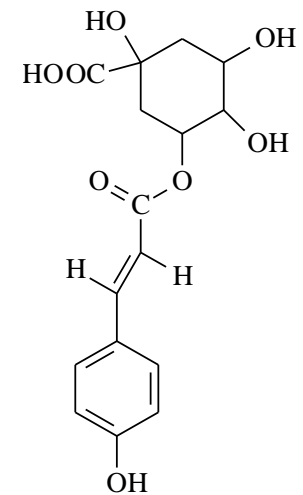
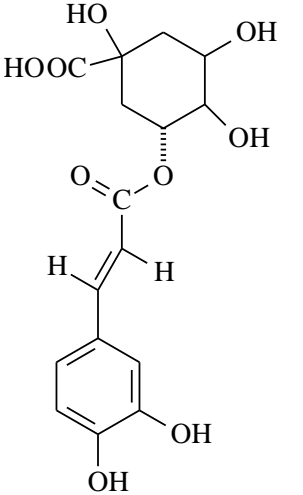
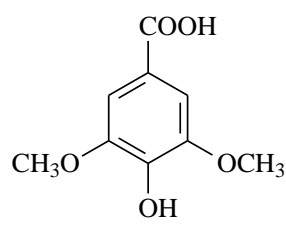
3,4-diidroxibenzoico; cucumerina C e vitexina. Já as substâncias diferentes são: corilagina; 1,2,3,6-tetragalato glicosídeo; 1,3,4,6-tetragalato glicosídeo; ácido elágico; quercetina-*O*-raminosídeo e ácido metil elágico raminosídeo. As estruturas dos compostos encontram-se na tabela 4 e 5, página 32.

Tabela 2. Compostos do extrato metanólico das folhas de *Caraipa densifolia* Mart.

Pico (278-350nm)	t _R	Composto	Estrutura
1	8,57	Ácido gálico	
2	12,25	ácido 3,4-diidroxibenzoico	
3	14,02	Ácido neoclorogênico	
4	16,04	Galato de metila	

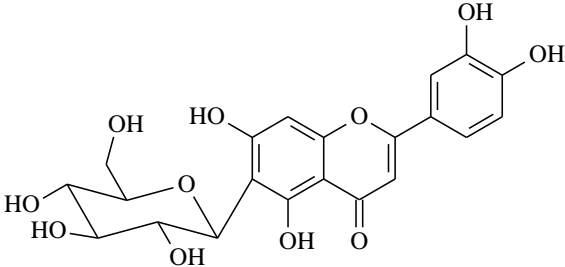
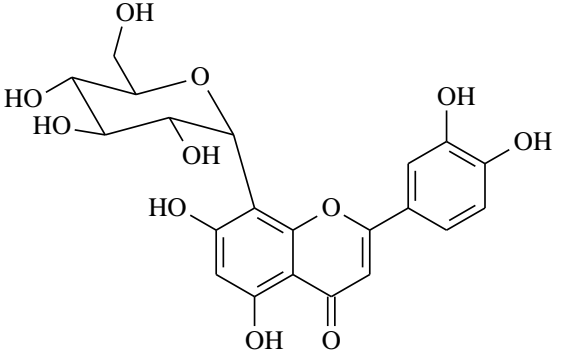
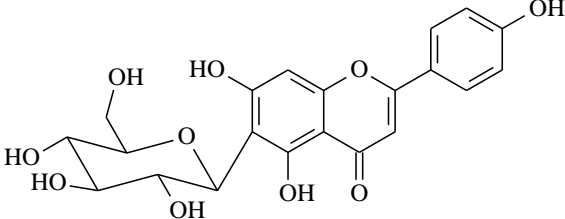
t_R = Tempo de retenção

Tabela 2. Continuação.

Pico (278-350nm)	t _R	Composto	Estrutura
5	16,86	<i>p</i> -Coumaroil quinato	
6	18,85	Ácido Clorogênico	
10	23,62	Ácido siríngico	

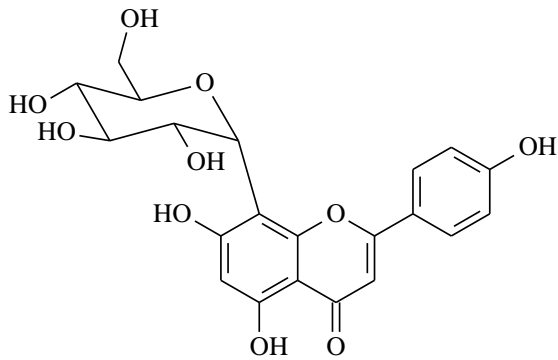
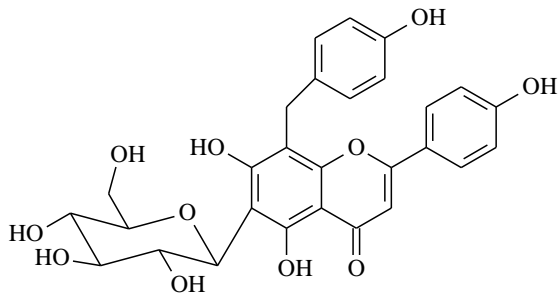
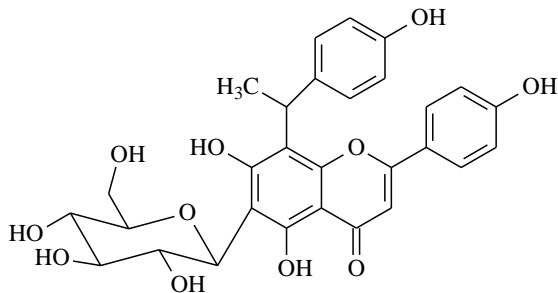
t_R = Tempo de retenção

Tabela 2. Continuação.

Pico (278-350nm)	t _R	Composto	Estrutura
11	25,28	Orientina	
12	25,96	Isoorientina	
13	27,08	Vitexina	

t_R = Tempo de retenção

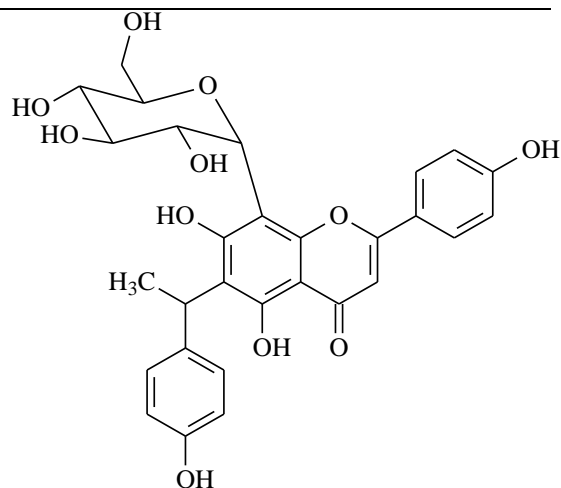
Tabela 2. Continuação.

Pico (278- 350nm)	t _R	Composto	Estrutura
14	29,14	Isovitexina	
18	41,02	Cucumerin C	
19	42,21	Cucumerina A	

20

42,51

Cucumerina B

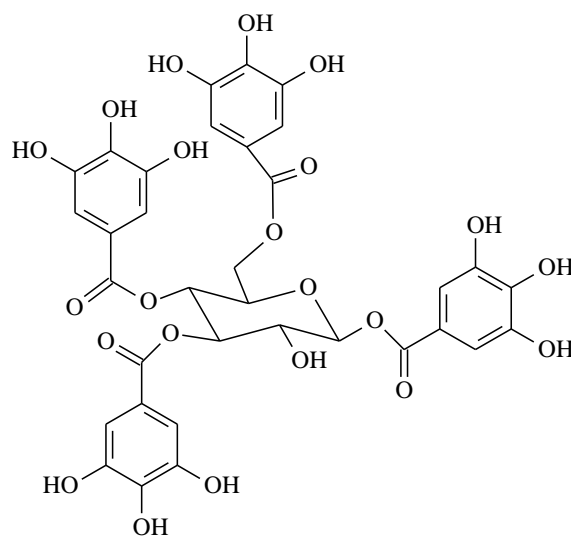


t_R = Tempo de retenção

Tabela 3. Compostos do extrato metanólico dos frutos de *Caraipa densifolia* Mart.

Pico (278-350nm)	t_R	Composto	Estrutura
7	18,57	Corilagina	
8	21.60	1,2,3,6-tetragalato glicosídeo	

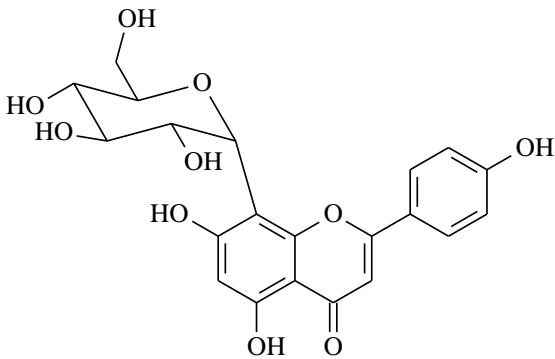
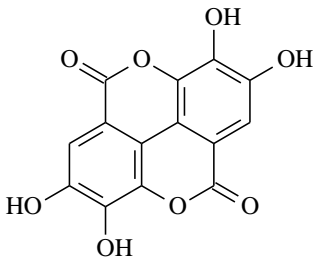
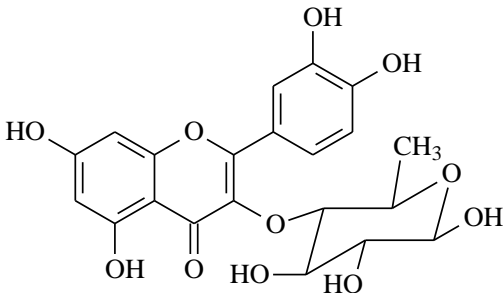
9 22,68 1,3,4,6-tetragalato glicosídeo



t_R = Tempo de retenção

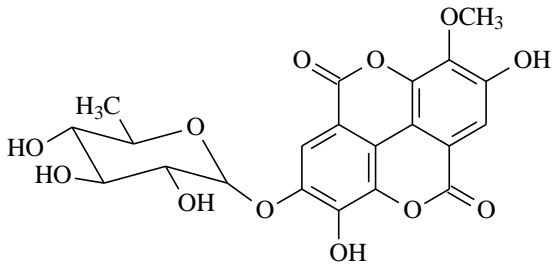
Tabela 3. Continuação.

Pico (278-350nm)	t_R	Composto	Estrutura
11	24,67	Orientina	
12	25,30	Isoorientina	
13	26,43	Vitexina	

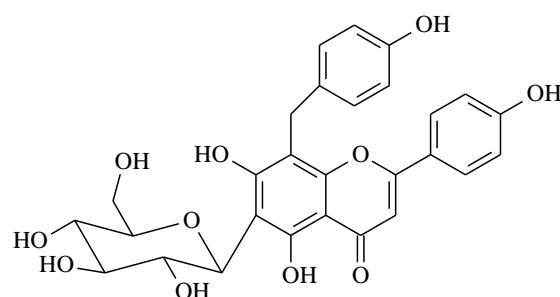
14	28,38	Isovitexina	
15	32,44	Ácido elágico	
16	33,72	Quercetina-O-raminosídeo	

t_R = Tempo de retenção

Tabela 3. Continuação.

Pico (278-350nm)	t_R	Composto	Estrutura
17	35,59	Ácido metil elágico raminosídeo	

18 40,82 Cucumerina C

 t_R = Tempo de retenção

Este é o primeiro relato de compostos polifenólicos em *Caraipa densifolia* Mart. No total foram detectados e caracterizados 23 polifenóis. Muitos são comuns a outras espécies vegetais, mas a presença de fitoalexinas como os C-glicosídeos (vitexina e orientina) é rara.

Os perfis de polifenólicos das folhas e frutos de *Caraipa densifolia* Mart (Tabela 5 e 6, p. 32 e 34) apresentaram como compostos majoritários as fitoalexinas. Algumas das plantas que produzem essas fitoalexinas que estão associadas a um ambiente com elevado teor de água. Isto as torna particularmente susceptíveis à infecção por fungos. Uma vez que o habitat natural de *Caraipa densifolia* Mart. é a floresta tropical da bacia amazônica, onde as raízes é a base das árvores e estão submersas na água, talvez não seja surpreendente que a planta tenha gerado resistência à infecções fúngicas pela biossíntese de fitoalexinas. As vitexinas e isovitexinas são relatadas como substâncias que possuem atividades antiinflamatórias, antioxidantes e antitumorais justificando assim o uso de *Caraipa densifolia* Mart. no tratamento de doenças da pele (CHOI, 2006).

Tabela 4. Rendimentos dos compostos fenólicos por extração das folhas de *C. densifolia*.

Compostos	t_R	Soxhlet (metanol)	Tintura	Infusão	Decocção
Acido gálico	8,57	0,11	n.d.	0,06	0,16
3,4- Ácido diidroxibenzoico	12,25	3,77	4,97	0,12	0,14
Acido clorogênico	14,02	0,71	2,39	0,23	0,55
Metil galato	16,04	0,13	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Coumaroil quinato	16,86	0,65	2,58	0,37	0,66
Ácido neoclorogênico	18,85	0,33	1,67	0,33	0,64
Ácido sirígico	23,62	1,93	0,72	n.d.	n.d.
Orientina	25,28	1,28	3,63	0,27	0,48
Isoorientina	25,96	2,19	7,54	0,44	0,84
Vitexina	27,08	1,21	1,93	0,21	0,43

Isovitexina	29,14	2,72	7,32	0,37	0,76
Cucumerin C	41,02	3,88	13,45	n.d.	n.d.
Cucumerin A	42,21	5,41	12,81	n.d.	n.d.
Cucumerin B	42,51	0,60	3,07	n.d.	n.d.
Total (g/kg)		24,92	57,36	2,40	4,66

t_R = Tempo de retenção n.d = Não detectado

Tabela 5. Rendimentos dos compostos fenólicos e polifenólicos por soxhlet com metanol dos frutos de *Caraipa densifolia* Mart.

Compostos	t_R	Total (g/kg)
Acido gálico	8,22	0,74
3, 4-ácido diidroxibenzoico	12,25	1,42
Corilagina	18,57	6,16
1,2,3,6-tetragalato glicosídeo	21,60	6,99
1,3,4,6-tetragalato glicosídeo	22,68	5,00
Orientina	24,67	2,32
Isoorientina	25,30	2,82
Vitexina	26,43	4,04
Isovitexina	28,38	5,96
Acido Elágico	32,44	3,03
Quercetina- <i>O</i> -raminosídeo	33,72	1,05
Ácido metil elágico raminosídeo	35,59	0,79
Cucumerina C	40,82	1,43
Total		4,73

t_R = tempo de retenção

De especial relevância é o estudo de McNally *et al.* (2003), que também identificou vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina no tecido foliar das plantas *Cucumis sativus*, resistentes ao fungo (*Podosphaera xanthii* (*syn. Sphaerotheca fuliginea*, *Schlechtend: Fr., Pollaci*)). Além disso, dois novos flavonóides C-glicosídeos, derivados majoritários, vitexina-6-(4-hidroxi-1-etilbenzeno) (cucumerina A) e isovitexina-8-(4-hidroxi-1-etilbenzeno) (cucumerina B), também foram isolados e identificados por McNally *et al.* (2003). Também foram detectados esses compostos muito raros nas folhas e frutos de *Caraipa densifolia* Mart., sendo isolado e identificado 6-*C-p*-hidroxibenzoilvitexina, que havia sido relatado anteriormente apenas nos frutos do *Citrillus colocynthis* Schrad. (ABOU-ZAID *et al.*, 2001). A substância cucumerina C foi nomeada devido à sua semelhança com cucumerinas A e B, como se observa na representação da figura 13, abaixo.

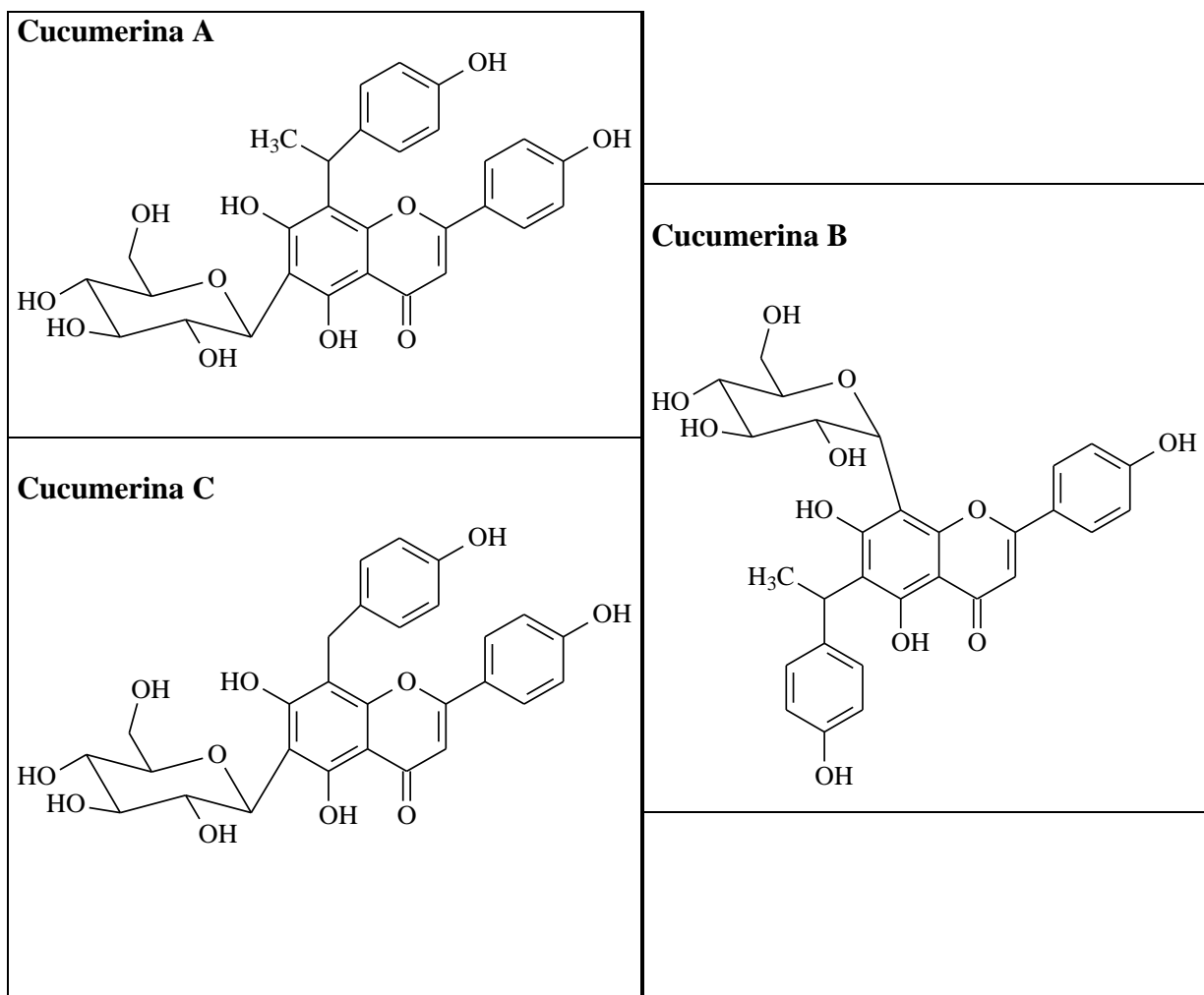


Figura 7. Cucumerinas A,B e C

Utilizando procedimentos tradicionais como tintura, chás por infusão e por decocção, de acordo com as metodologias descritas no procedimento experimental (p. 25), a produção total (Tab. 4, p. 25) de compostos fenólicos e polifenólicos de uma tintura (57,36 g/kg), infusão (2,40 g/kg) e decocção (4,66 g/kg) das folhas foram: 136%; 90% e 79%, em comparação com a extração soxhlet com metanol. Os perfis dos compostos polifenólicos na tintura e decocção foram muito semelhantes aos por extração em soxhlet. O rendimento por infusão foi pequeno e também refletido em todo o espectro dos polifenóis.

A extração das cascas por Soxhlet em metanol, tabela 9, revelaram pequenas quantidades de epicatequina e procianidina B2. Um maior rendimento de procianidinas foi

detectado no extrato metanólico do talo (6,18 g/kg), mas neste caso a decocção apresentou um rendimento inferior a 3,43g/kg.

Tabela 6 - Rendimentos dos compostos polifenólicos por extração da casca e talo de *Caraipa densifolia* Mart .

Compostos	t_R	Casca (metanol)	Casca (decocção)	Talo (metanol)	Talo (decocção)
Procianidina dímero B ₂ (22)	16,27	0,09	0,32	1,28	1,05
Procianidina trímero C ₁ (23)	17,97	n.d.	n.d.	3,79	2,38
Epicatequina (21)	19,34	0,08	0,34	1,11	n.d.
Total (g/kg)		0.17	0.66	6.18	3.43

t_R = tempo de retenção

n.d = não detectado

Os cromatogramas analíticos (CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM) e espectros de massa dos extratos metanólicos dos frutos e folhas estão apresentados em anexas páginas (60-80).

Tabela 7. Fragmentação dos compostos fenólicos e polifenólicos por CLAE-ISE-EM e Nano-ISE-EM dos extratos das folhas e frutos *Caraipa densifolia* Mart.

Compostos	Massa	CLAE- ISE -EM		Nano-ISE-EM	
		[M-H] ⁺	[2M-H] ⁺	[M-H] ⁺	Fragmentos íons (<i>m/z</i> %)
1	170,02	169,0	339,2	169,0 (35)	125 (100)
2	154,03	153,1	307,1	152,9 (4)	109 (100)
3	354,10	353,1	707,0	353,1 (52)	191 (100), 179 (2), 161 (2)
4	184,04	183,0	n.d.	183,0 (21)	168 (15), 124 (100)
5	338,10	337,1	n.d.	337,1 (37)	191 (100), 163 (5)
6	354,10	353,1	707,1	353,1 (52)	191 (100), 179 (2), 161 (2)
7	634,08	633,0	1267,0	633,1 (29)	481 (16), 463 (13), 301 (100), 275 (14), 169 (1)
8	788,11	787,2	n.d.	787,1 (16)	635 (1), 617 (100), 465 (5), 449 (2), 313 (1), 295 (1), 169 (3)
9	788,11	787,1	n.d.	787,1 (98)	635 (39), 617 (100), 465 (37)
10	198,05	197,1	395,2	197,1 (12)	182 (100), 167 (32), 123 (22), 97 (23)
11	432,11	431,0	863,1	431,2 (24)	341 (10), 323 (2), 311 (100), 283 (9), 269 (1)
12	432,11	431,1	863,1	431,2 (25)	341 (37), 323 (4), 311 (100), 283 (9), 269 (2)
13	448,10	447,0	895,1	447,1 (18)	357 (35), 327 (100), 285 (5)
14	448,10	447,0	895,1	447,2 (12)	357 (33), 327 (100), 285 (3)
15	302,01	301,0	n.d.	301,1 (28)	300 (54), 284 (50), 200 (54), 273 (35), 145 (100), 117 (41)
16	448,08	447,1	895,1	447,1 (15)	301 (42), 300 (100)
17	462,07	461,0	n.d.	461,2 (27)	315 (100), 300 (11)
18	538,15	537,0	1075,1	537,2 (6)	443 (11), 417 (33), 399 (22), 375 (100), 331 (12), 307 (2)
19	552,16	551,0	1103,1	551,2 (28)	457 (1), 431 (3), 413 (2), 389 (9), 375 (100), 331 (7), 307 (1)
20	552,16	551,0	1103,0	551,2 (28)	457 (1), 431 (3), 413 (2), 389 (9), 375 (100), 331 (7), 307 (1)
21	290,08	289,0	579,0	289,1 (58)	245 (73), 203 (100), 151 (38), 125 (55), 109 (63)
22	578,14	577,1	1155,2	577,1 (20)	451 (19), 425 (46), 407 (100), 289 (81), 125 (16)
23	866,20	865,1	n.d.	865,2 (100)	739 (7), 713 (24), 695 (29), 577 (52), 575 (41), 451(20), 425 (23), 407 (21), 289 (11), 287 (35), 125 (7)

n.d. = Não detectado

4.2. Identificação e Quantificação dos Compostos Triterpenóides por CG-EM.

A identificação dos compostos triterpenoides foram determinados pela comparação dos índices de retenção com o banco de dados. Os extratos hexânicos das folhas, frutos, talos e cascas por CG-EM foi realizada em extratos contendo a parte vegetal suspensa em metanol (4,0 mg/mL) de acordo as condições descritas na parte experimental, página 19 . Os cromatogramas analíticos (CG-EM) e espectros de massa dos extratos hexânicos das folhas, frutos, talos e cascas estão apresentados em anexos nas páginas 60 a 80.

A quantificação das substâncias individuais de triterpenoides, esteroides e vitaminas, seguindo a extração em soxhlet em hexano nos extratos das folhas, frutos, talos e cascas determinados por CG-EM (Tabela 8) revelou quantidades apreciáveis de triterpenóides. Os principais triterpenóides detectados foram: lupeol, lupenona, ácido betulínico, betulina, friedelina e friedelinol. Uma quantidade substancial de α -tocoferol e γ -tocoferol foram detectados no extrato hexânico das folhas. Nos extratos das folhas, frutos e talos foram identificados β -sitosterol, conhecido na espécie, e estigmasterol, relatado pela primeira vez.

Tabela 8. Rendimentos dos triterpenoides, esteroides e vitaminas por extração em soxhlet em hexano de *Caraipa densifolia* Mart por CG-EM.

Compostos	t_R (min.)	Folha	Fruto	Casca	Talo
Lupeol (24)	59,00	0,12	0,25	2,16	0,75
Lupenona (25)	57,52	0,33	0,40	0,11	0,12
Ácido Betulínico (26)	70,80	n.d.	n.d.	12,35	3,33
Betulina (27)	68,67	n.d.	n.d.	1,26	0,26
Friedelina (28)	64,75	0,34	0,18	0,36	0,26
Friedelinol (29)	63,74	0,06	n.d.	n.d.	n.d.
β -sitosterol (30)	56,88	6,26	5,25	n.d.	1,35
Estigmasterol (31)	54,43	0,31	0,45	n.d.	0,27
α -Tocoferol (32)	48,67	0,99	n.d.	n.d.	n.d.
γ -Tocoferol (33)	45,90	0,22	n.d.	n.d.	n.d.
Total		8,65	6,53	16,24	6,34

t_R = Tempo de retenção

n.d. = Não detectado

As substâncias presentes nos extratos hexânicos (Tabela 10, p.42) foram quantificadas utilizando padrões autênticos no intervalo 0-50 µg/mL. Os extratos das folhas (8,65 g/kg) eram constituídos por triterpenoides (0,85 g/kg, 10%); esteróis (6,57 g/kg; 76%) e vitaminas (1,21 g/kg; 14%). O triterpenoide majoritário foi a friedelina, com 0,34 g/kg, o esteróide majoritário foi o β -sitosterol, com 6,26 g/kg, enquanto a vitamina majoritária foi a α -tocoferol com 0,99 g/kg. Os extratos do fruto (6,53 g/kg) e talo (6,34 g/kg) continham triterpenoides com 0,83 g/kg (13%) e com 4,72 g/kg (74%); continham também esteroides com 5,70 g/kg (87%) e com 1,62 g/kg (26%), respectivamente. O triterpenoide majoritário detectado no fruto foi a lupenona, com 0,40 g/kg; entretanto, no talo, foi o ácido betulínico, com 3,33 g/kg. O esteroide majoritário detectado foi o β -sitosterol nos frutos (5,25 g/kg) e no talo (1,35 g/kg). Os extratos da casca continham apenas triterpenoides (16,24 g/kg), predominando o ácido betulínico 12,35 g/kg (76%).

No cromatograma representado na figura 8, (p.38) é possível observar os compostos identificados como triterpenoides, esteróis e vitaminas dos extratos hexânicos das folhas, com as numerações das substâncias e seus devidos tempos de retenção e abundância: **1.** γ -tocoferol; **2.** α -tocoferol; **3.** estigmasterol; **4.** β -sitosterol; **5.** lupenona; **6.** lupeol; **7.** friedelinol; **8.** friedelina; **9.** ácido betulínico. As massas e íons dos compostos encontram-se na tabela 13, p.54. Já as estruturas das substâncias estão presentes na tabela 11, p. 50 e 51. Em anexos nas páginas (70-90) os cromatogramas analíticos (CG-EM) e espectros UV dos extratos hexanos das cascas.

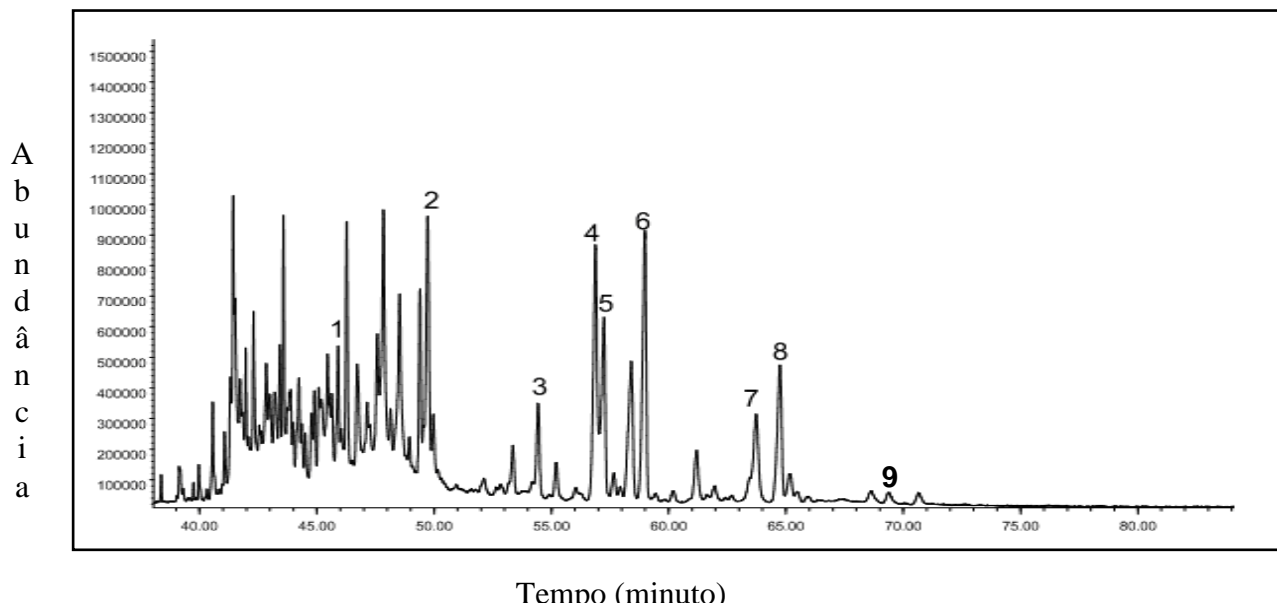
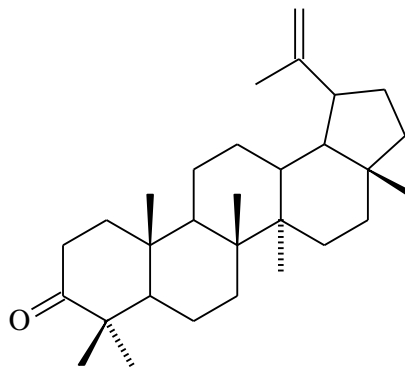


Figura 8. Cromatograma do extrato hexânico das folhas de *C. densifolia* por CG-EM.

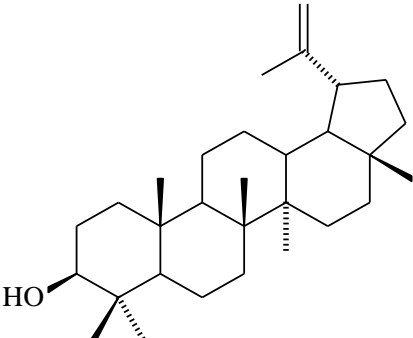
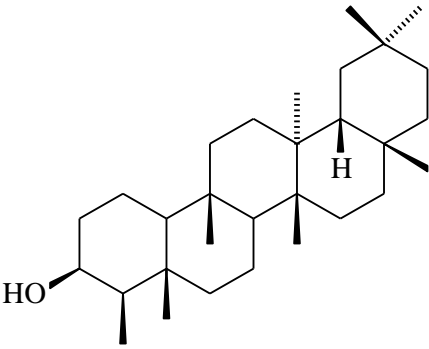
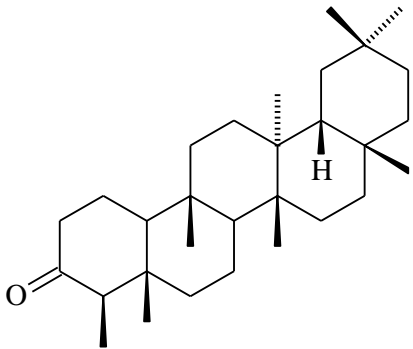
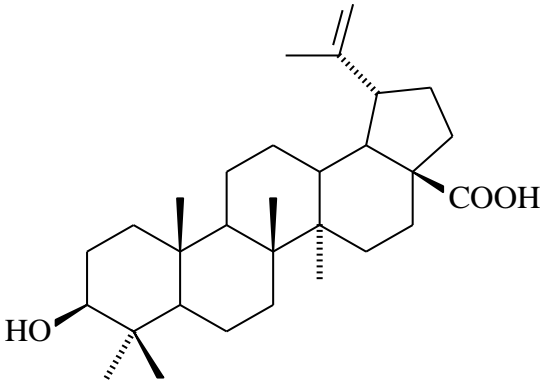
Tabela 9. Estrutura dos compostos nos extratos hexânicos das folhas de *C. densifolia*.

Pico	t _R	Composto	Estrutura
1	45,90	γ -Tocoferol (33)	
2	48,67	α -Tocoferol (32)	
3	54,43	Estigmasterol (31)	
4	56,88	β -sitosterol (30)	
5	57,52	Lupenona (25)	



t_R = tempo de retenção

Tabela 9. Continuação

Pico	t_R	Composto	Estrutura
6	59,00	Lupeol (24)	
7	63,74	Friedelinol (29)	
8	64,75	Friedelina (28)	
9	68,67	Ac. Betulínico	

t_R = tempo de retenção

Tabela 10. Fragmentação dos compostos triterpenóides, esteróis e vitaminas identificados por CG-EM de *Caraipa densifolia* Mart.

Compostos	TMS grupos	M ⁺ • (calc.)	M ⁺ • (obs.)	Fragmentos ions ^a (m/z)
Lupeol (24)	1	498	498(16)	483(6), 455(1), 408(4), 393(7), 369(14), 203(33), 189(69), 73(100) ^b
Lupenona (25)	0	424	424(36)	409(20), 313(26), 205(96), 189(43) 121(67), 179(8), 109(96), 95 (94), 81(93), 67(83), 55(100)
Acid. betulínico (26)	2	600	600(3)	585(4), 510(1), 495(1), 483(4), 320(9), 292(10), 189(43), 129 (23), 73(100)
Betulina (27)	2	586	586(1)	571(0.5), 496(17), 483(16), 383(11), 203(31), 189(39), 129(29), 73(100)
Friedelina (28)	0	426	426(14)	411(7), 273(24), 245(17), 205(20), 123(60), 109(67), 95(84), 69(100)
Friedelinol (29)	1	500	500(6)	485(14), 410(6), 395(6), 347(17), 237 (50), 109(73), 95(100)
β -Sitosterol (30)	1	486	486(9)	471(7), 396(56), 381(23), 357(61), 218(36), 129(100)
Stigmasterol (31)	1	484	484(23)	469(4), 394(23), 255(29), 129(66), 83(100)
α -Tocoferol (32)	1	502	502(93)	277(4), 237(54), 73(100)
γ -Tocoferol (33)	1	488	488(64)	263(6), 223(44), 131(24), 73(100)

^a Intensidade relativa de M⁺• e (%) dos fragmentos de íons.

^b Pico base em negrito

Os triterpenoides foram detectados anteriormente no talo e casca de *Caraipa densifolia* Mart. (GUNASEKERA *et al.*, 1983). A presença das vitaminas α -tocoferol e γ -tocoferol nas folhas de *Caraipa densifolia* Mart é também relatada pela primeira vez. A presença de α -tocoferol é especialmente notável. Tem-se estimado que esta vitamina em particular tem fortes propriedades quimiopreventivas do câncer (JIANG *et al.*, 2000).

O perfil dos triterpenoides e esteróis nas diferentes partes botânicas de *Caraipa densifolia* Mart. é variável, mas muito similar ao descrito anteriormente por Gunasekera *et al.* (1983). No entanto, não se conseguiu detectar simiarenol ou taxerona, mas se detectou, nesta espécie, friedelinol junto com o estigmasterol pela primeira vez. A casca de *Caraipa densifolia* Mart aparenta ser uma fonte rica de lupeol e ácido betulínico. Esses dois triterpenoides vêm ganhando crescente interesse por serem agentes quimiopreventivos do câncer (CHATURVEDI *et al.*, 2008). O ácido betulínico tem apresentado uma variedade de atividades biológicas, dentre outras, antibacteriana, antimalárica, antielmíntica, antimicobacteriana, antioxidante, incluindo a inibição do vírus da imunodeficiência humana-HIV (YOGESHWARI; SRIRAM, 2005; MUKHERJEE *et al.*, 2006).

4.2.1 Determinação estrutural de CSH2b2

O lupeol foi o primeiro composto isolado em maior concentração para as cascas, talos, frutos e folhas de *Caraipa densifolia* Mart. A determinação estrutural foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H , da fração CSH2b2, conforme descrito na parte experimental (p. 26).

O espectro de RMN ^1H [(CDCl_3), 500 MHz] (Fig. 14, p.52) de CSH2b2 apresentou sinais de hidrogênios vinílicos em δ_{H} 4,57 e 4,69, referentes aos hidrogênios da dupla terminal. A absorção em δ_{H} 3,19 do hidrogênio carbinólico indica a presença da β -configuração, e os sinais em δ_{H} 0,76 a 1,68 são referentes as metilas (SILVA, 2004).

No espectro de RMN ^{13}C [(CDCl_3), 125 MHz] (Fig. 13, p.48) de CSH2b2, observa-se os sinais δ_{C} 109,3 e δ_{C} 151,2, evidenciando a dupla terminal. O sinal em δ_{C} 79,0 corresponde ao carbono metínico carbinólico, os sinais na região δ_{C} 14,4 a 27,8 são atribuídos as metilas (SILVA, 2004).

Analisando os dados de RMN ^{13}C [(CDCl_3) , 125 MHz] (Fig. 16, p.53) e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 18, p. 54), foi possível organizar as tabela 13, nas quais constam separadamente os valores de sete carbonos metílicos (7- CH_3), onze metilênicos (11- CH_2), seis metínicos (6- CH), seis carbonos não hidrogenados (6-C) e as absorções de todos os carbonos, em ordem, mostrando trinta linhas espectrais de carbono, uma forte indicativa de tratar-se de absorções características de triterpenos pentacíclicos de esqueleto lupano (ALBUQUERQUE, 2002; MAHATO, 1994; DENISE, 2005; FALCÃO, 2003).

Tabela 11. Deslocamentos químicos em ppm de carbono 13 (δ) [(CDCl_3) , 125 MHz] para CSH2b2, com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros, utilizando a técnica RMN ^{13}C -DEPT 135°.

C	CH	CH ₂	CH ₃	TOTAL
151,2 ³	79,2 ¹	109,6 ²	28,2	
43,2	55,6	40,2	18,6	
43,1	50,7	38,9	18,3	
41,1	48,6	35,8	16,4	
38,3	48,2	34,5	16,2	
37,4	37,9	30,1	15,6	
		27,7	14,8	
		27,7		
		25,4		
		21,2		
		18,6		
C₆O	C₆H₆	C₁₁H₂₂	C₇H₁₈	C₃₀H₄₆O

1 – C-OH

2 – $\text{CH}_2=$

3 – $\text{C}=\text{C}$.

Com esses dados foi possível determinar a fórmula molecular, partindo de $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O} + \text{H}$, de uma hidroxila, obtendo-se $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}$. Diante da fórmula, calculou-se o grau de insaturação do alcano original $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$, que fornece $\text{C}_{30}\text{H}_{60}$. Assim tem-se que $\text{H}_{60} - \text{H}_{48} = 14$; dividindo por 2, têm-se 6 insaturações. Esses dados estão em concordância com os dados dos espectros, pois essas insaturações correspondem a cinco anéis (característicos do esqueleto pentacíclico), uma dupla ligação $\text{C}=\text{C}$.

Tabela 12. Dados das absorções de RMN ^{13}C (δ) [(CDCl_3), 125 MHz] de CSH2b2 em comparação com os dados da literatura [MAHATO, 1994];

Carbono	δ_{C} Literatura	δ_{C} CSH2B2
1	38,7	38,9
2	27,4	27,3
3	78,9	79,2
4	38,8	38,3
5	55,3	55,6
6	18,3	18,6
7	34,2	34,5
8	40,8	41,1
9	50,4	50,7
10	37,1	37,4
11	20,9	21,2
12	25,1	25,4
13	38,0	37,9
14	42,8	43,1
15	27,4	27,7
16	35,5	35,8
17	43,0	43,2
18	48,2	48,6
19	47,9	48,2
20	150,9	151,2
21	29,8	30,1
22	40,0	40,2
23	28,0	28,2
24	15,4	15,6
25	16,1	16,4
26	15,9	16,2
27	14,5	14,8
28	18,0	18,3
29	109,3	109,6
30	19,3	18,6

Com os dados obtidos e comparando-se com a literatura (SILVA, 2004; MAHATO, 1994; FOTIE, 2006; SOUZA, 2001) (Tabela 14, p. 51), a fração CSH2b2 pode ser identificada como ácido lup-20(29)-en-3 β -ol (Lupeol), composto com efeitos cardioprotetor (SUDHARSAN, 2005), antimalária, anticâncer e antitumoral (FOTIE, 2006; MOHAMMAD, 2005; MOHAMMAD, 2001).

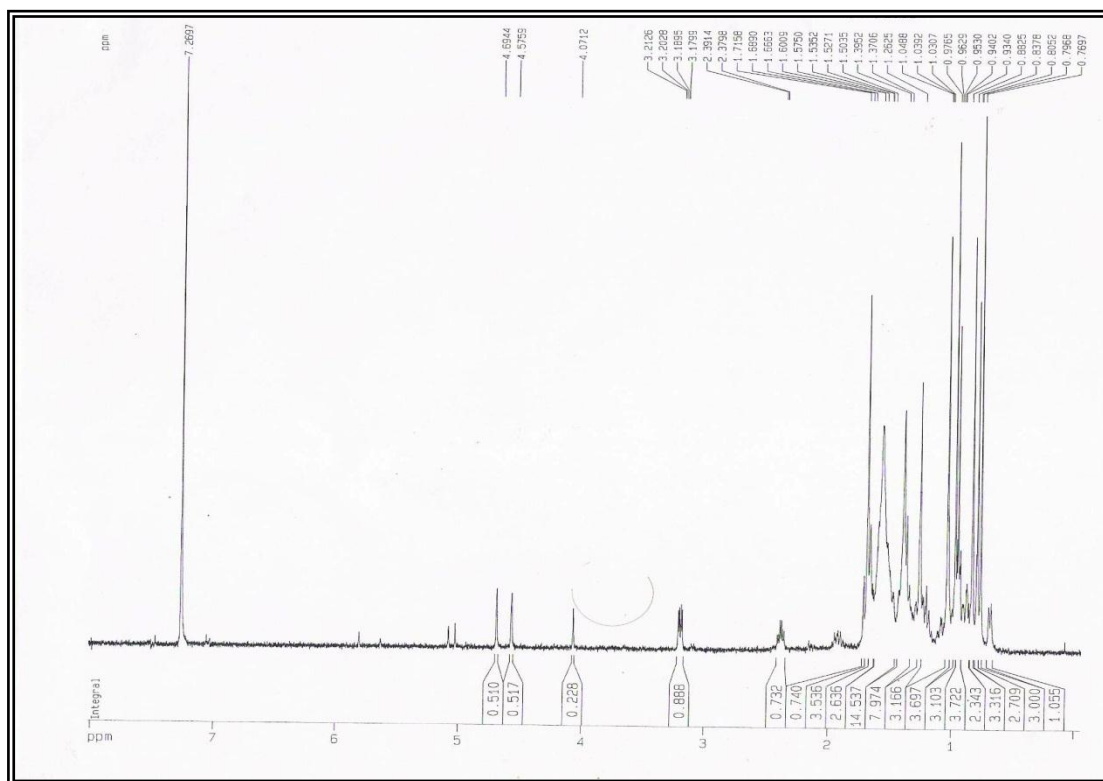
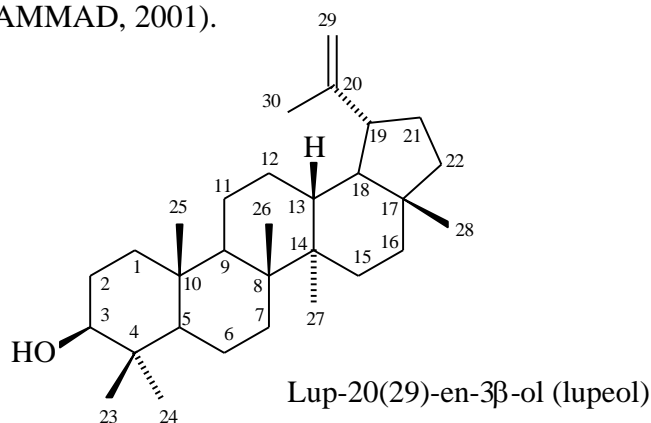


Figura 9. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CSH2b2

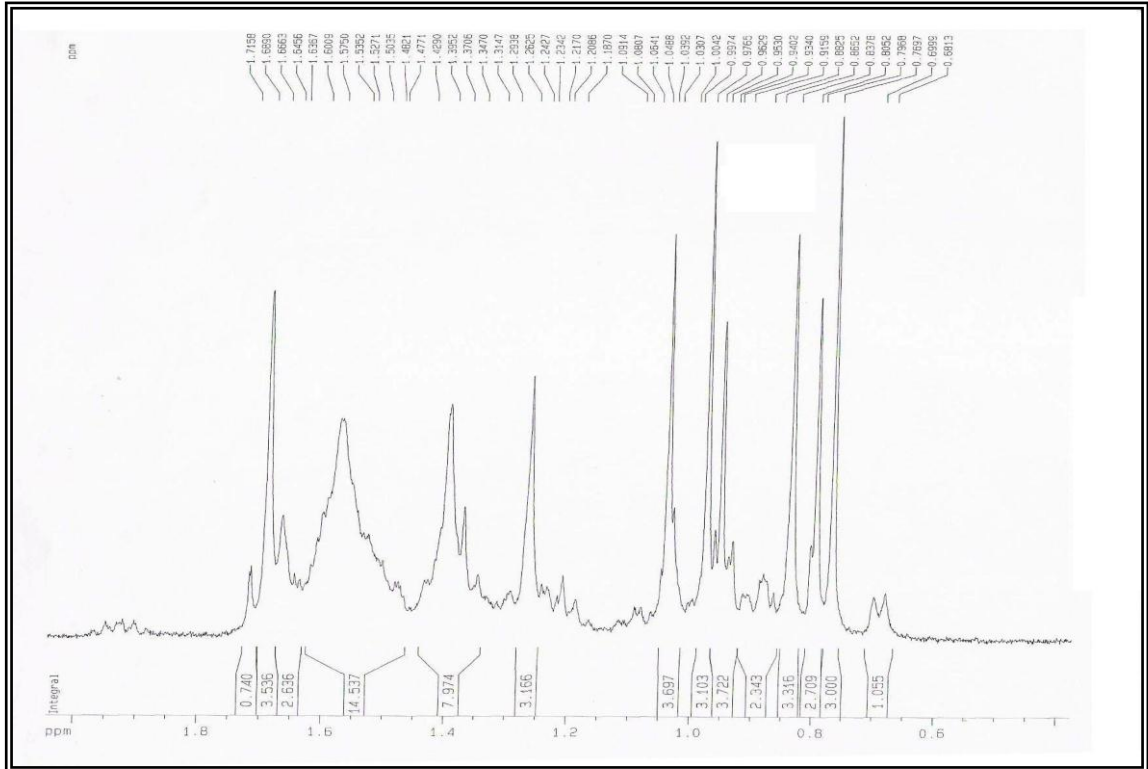


Figura 10. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de CSH2b2

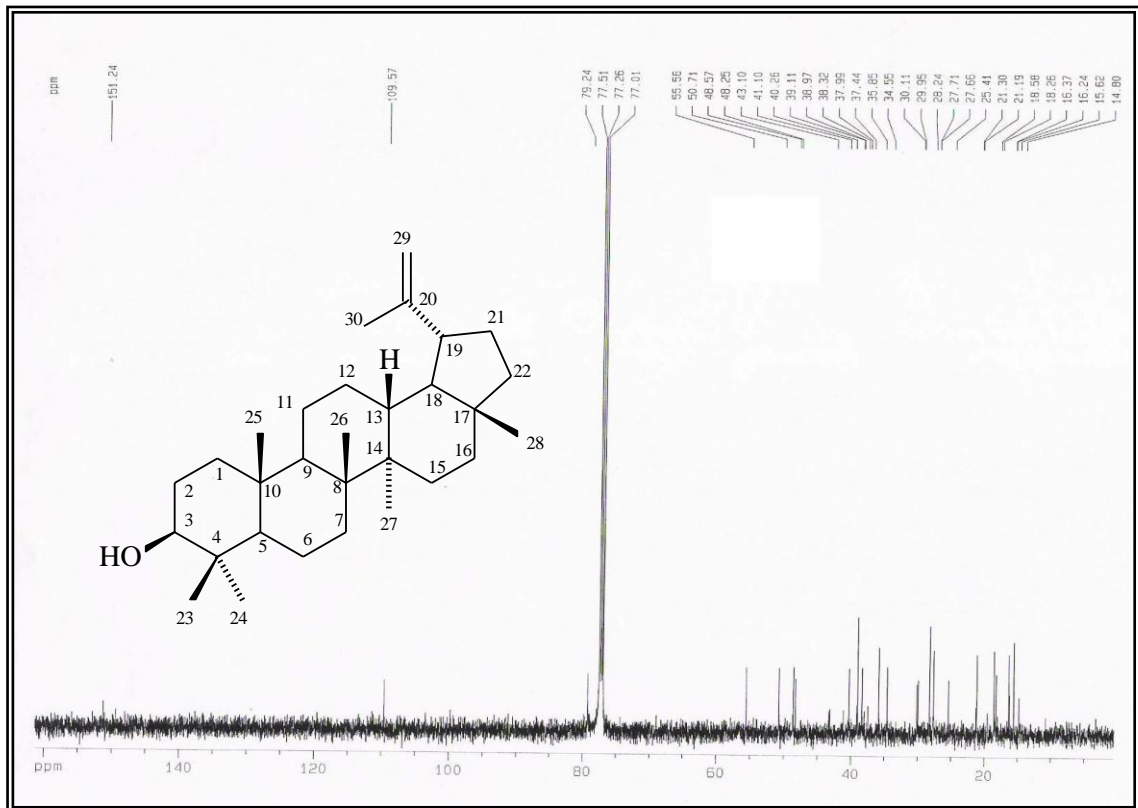


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C [CDCl_3 , 125 MHz] de CSH2b2

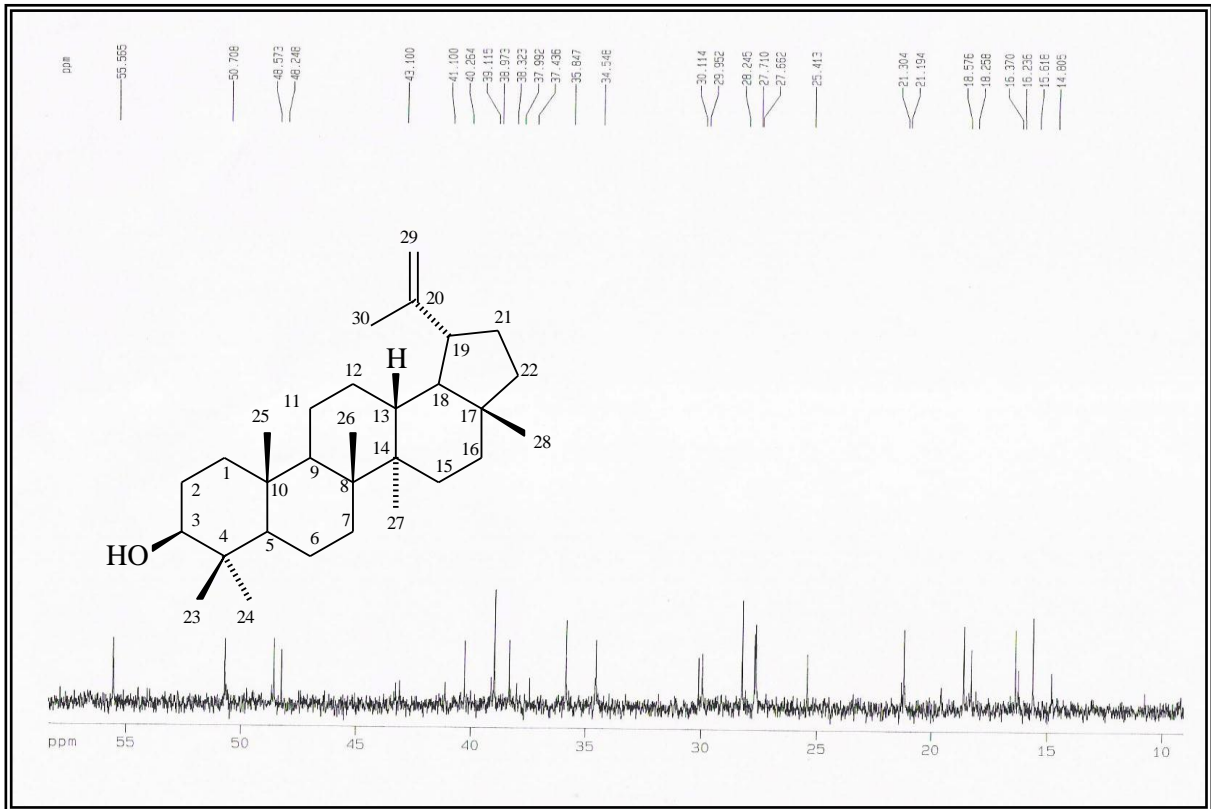


Figura 12. Expansão do espectro de RMN ^{13}C [(CDCl_3), 125 MHz] de CSH2b2

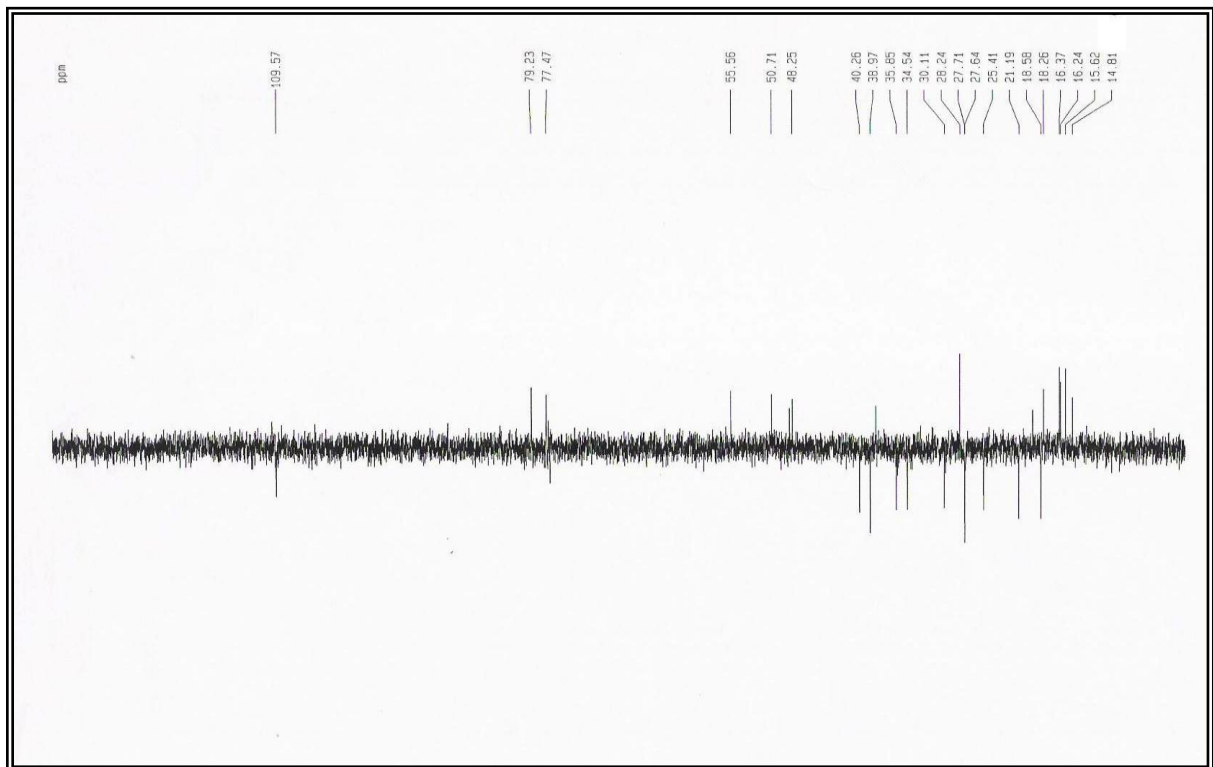


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C – DEPT 135° de CSH2b2

4.2.2. Determinação estrutural de CSH3e

O tratamento cromatográfico da fração CSH3e do extrato hexânico das cascas de *Caraipa densifolia* Mart. forneceu um sólido branco amorfo, com uma faixa de fusão 258,7-261,3 °C. Por meio do teste de Lieberman-Burchard (MATOS, 1998), foi possível verificar que esse sólido apresentou características de um triterpeno.

A análise dos dados de RMN ^1H [(CDCl₃), 500 MHz] (Fig. 14, p. 52) possibilitou verificar os sinais característicos para os hidrogênios metílicos em 0,7-1,2 ppm δ_{H} : 0,73 (s); 0,87 (s); 0,89 (s); 0,96 (s); 1,00 (s); 1,01 (s); 1,05 (s) e 1,18 (s). Também foi possível observar os sinais para hidrogênios metínicos em: δ_{H} 2,25 (q); δ_{H} 1,54 (m); δ_{H} 1,38 (m) e δ_{H} 1,55 (m). Verificou-se ainda um grande número de hidrogênios na forma de multipletos ligados a carbonos sp^3 , característico dos terpenos, tais como: δ_{H} 2,29 (m); δ_{H} 1,47 (m); δ_{H} 1,35 (m) e δ_{H} 1,29 (m).

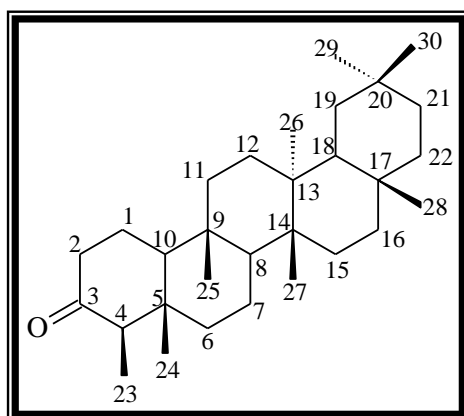
Analisando os dados de RMN ^{13}C [(CDCl₃), 125 MHz] (Fig. 17, p. 53) e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 18, p. 54), foi possível organizar as tabelas 13 e 14 (p. 50-51), respectivamente) nas quais constam separadamente os valores de oito carbonos metílicos (8-CH₃), onze metilênicos (11-CH₂), quatro metínicos (4-CH) e sete carbonos não-hidrogenados (7-C).

Verificou-se também, pela análise dos dados de RMN ^{13}C , absorção característica de carbono carbonílico em δ_{C} 213,4; em δ_{C} 28,4; δ_{C} 30,2; δ_{C} 37,7; δ_{C} 38,5; δ_{C} 39,9 e δ_{C} 42,3; para carbonos não-hidrogenados; e em δ_{C} 43,0; δ_{C} 53,3; δ_{C} 58,4 e δ_{C} 59,7; para carbonos metínicos. Foi possível observar as absorções características de carbonos metilênicos na região de δ 18,4-41,7 ppm (18,4; 22,5; 30,7; 32,6; 33,0; 35,5; 35,8; 36,2; 39,4; 41,5 e 41,7); em δ_{C} 7,0; δ_{C} 14,8; δ_{C} 18,1; δ_{C} 18,8; δ_{C} 20,4; δ_{C} 32,3 e δ_{C} 35,2). Observaram-se trinta linhas espectrais de carbono, um forte indicativo de tratarem-se de absorções características de triterpenos pentacíclicos.

Tabela 13. Deslocamentos químicos de carbono-13 (δ)[(CDCl₃), 125 MHz] para CSH₃e com padrão de hidrogenação obtido pela comparação dos espectros utilizando a técnica RMN ¹³C DEPT 135°.

7 C	4 CH	11 CH ₂	8 CH ₃
213,4	59,7	41,7	35,2
42,3	58,4	41,5	32,3
39,9	53,3	39,4	32,0
38,5	43,0	36,2	20,4
37,7		35,8	18,8
30,2		35,5	18,1
28,4		33,0	14,8
		32,6	7,0
		30,7	
		22,5	
		18,4	

A comparação com os dados obtidos com a literatura consultada (MAHATO, 1994), possibilitou identificar como CSH₃e friedelan-3-ona (freidelina).



Friedelan-3-ona (freidelina);

Tabela 14. Dados das absorções de RMN ^{13}C (δ) [(CDCl_3) , 125 MHz] de CSH3e em comparação com os dados da literatura (MAHATO, 1994).

Carbono	δ_{C} Literatura	δ_{C} CSH3e
1	22,3	22,5
2	41,5	41,7
3	213,2	213,4
4	58,2	58,4
5	42,1	42,3
6	41,3	41,5
7	18,2	18,4
8	53,1	53,3
9	37,4	37,7
10	59,5	59,7
11	35,6	35,8
12	30,5	30,7
13	39,7	39,9
14	38,3	38,5
15	32,8	32,6
16	36,0	36,2
17	29,9	30,2
18	42,8	43,0
19	35,3	35,5
20	28,2	28,4
21	32,4	33,0
22	39,2	39,4
23	6,8	7,0
24	14,6	14,8
25	17,9	18,1
26	20,2	20,4
27	18,6	18,8
28	32,0	32,0
29	31,8	32,3
30	35,0	35,2

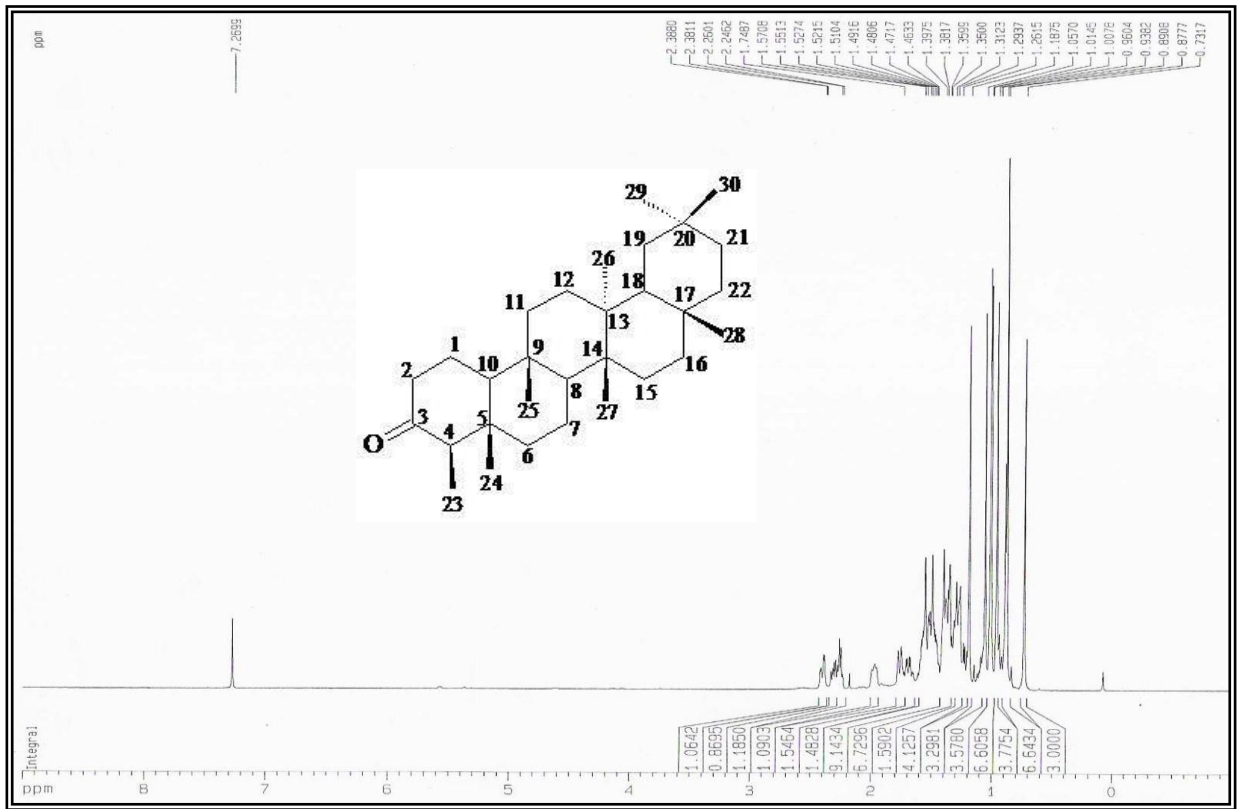


Figura 14. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CSH3e

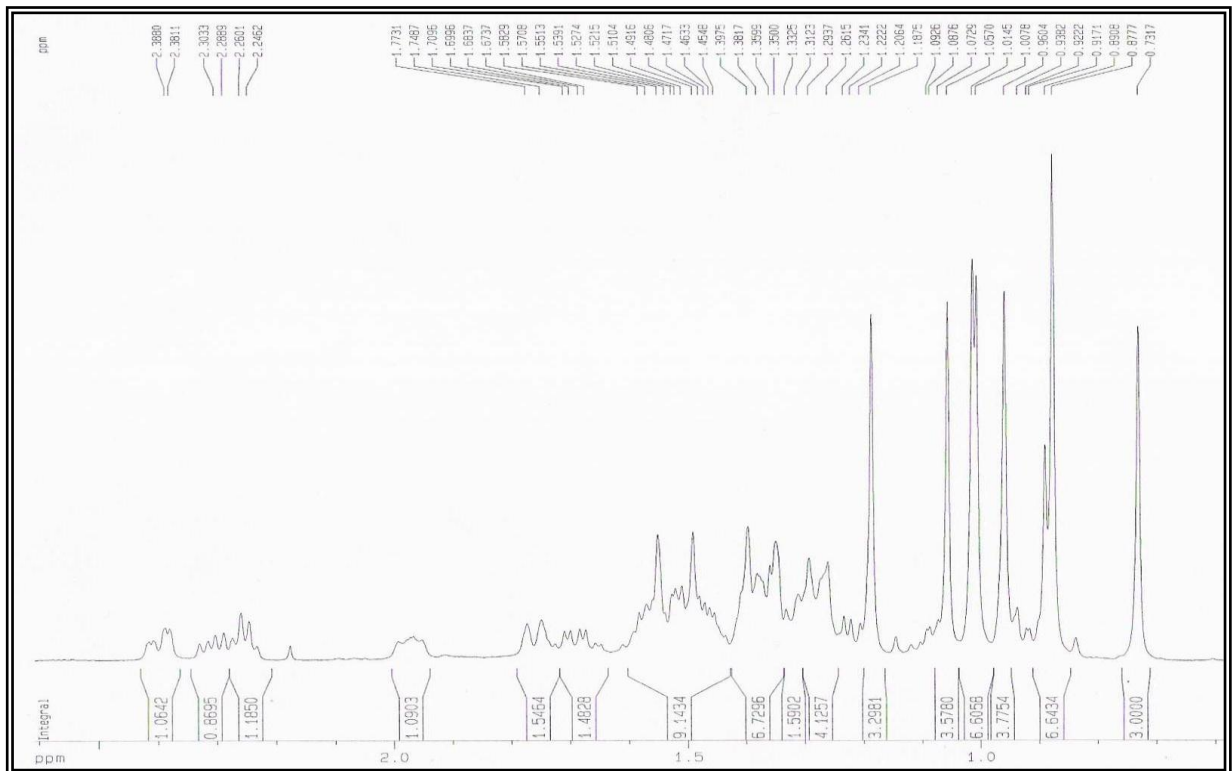


Figura 15. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de CSH3e

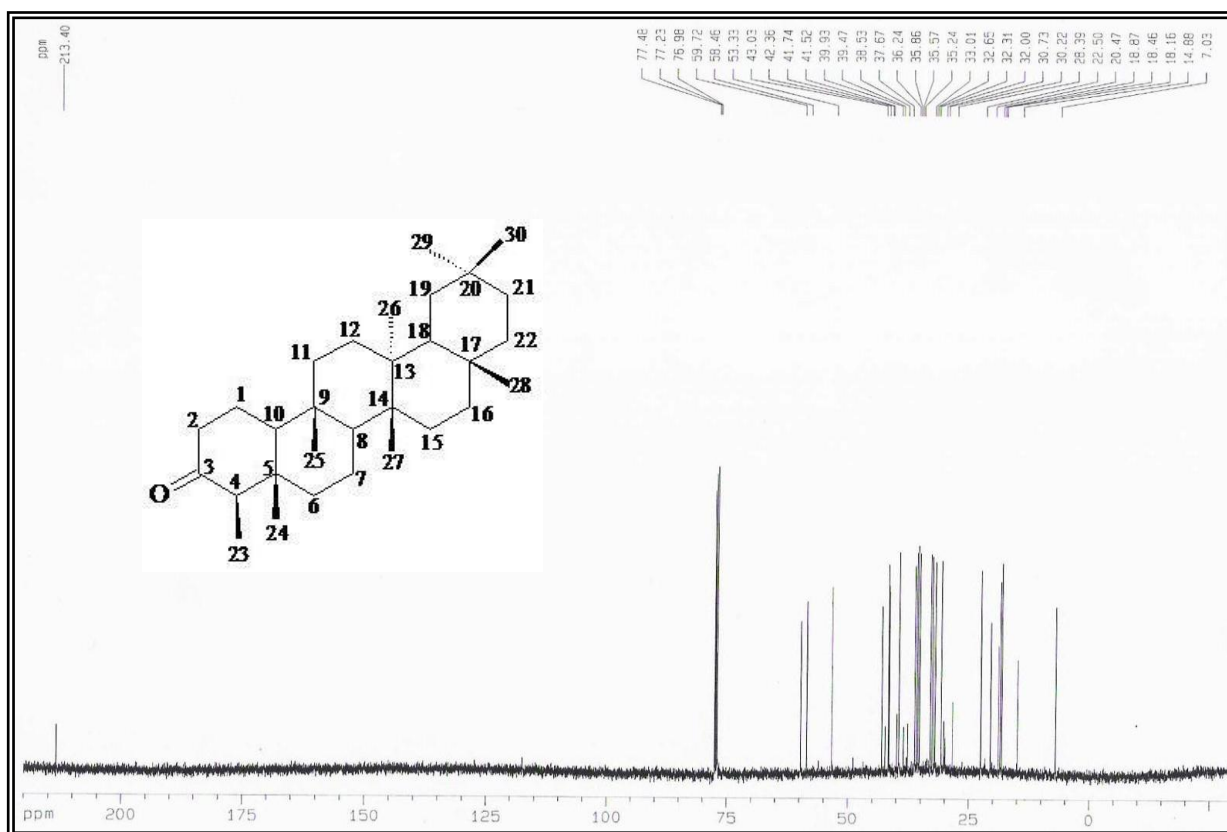


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de CSH3e

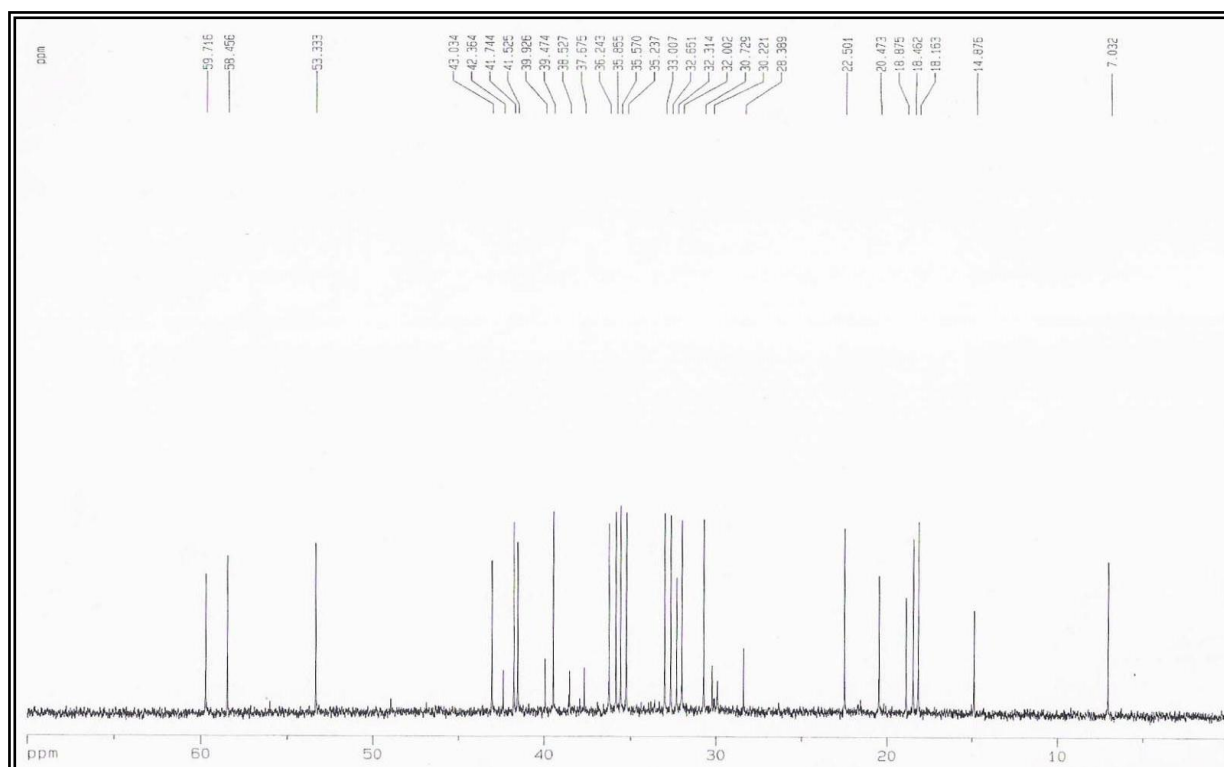


Figura 17. Expansão do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de CSH3e

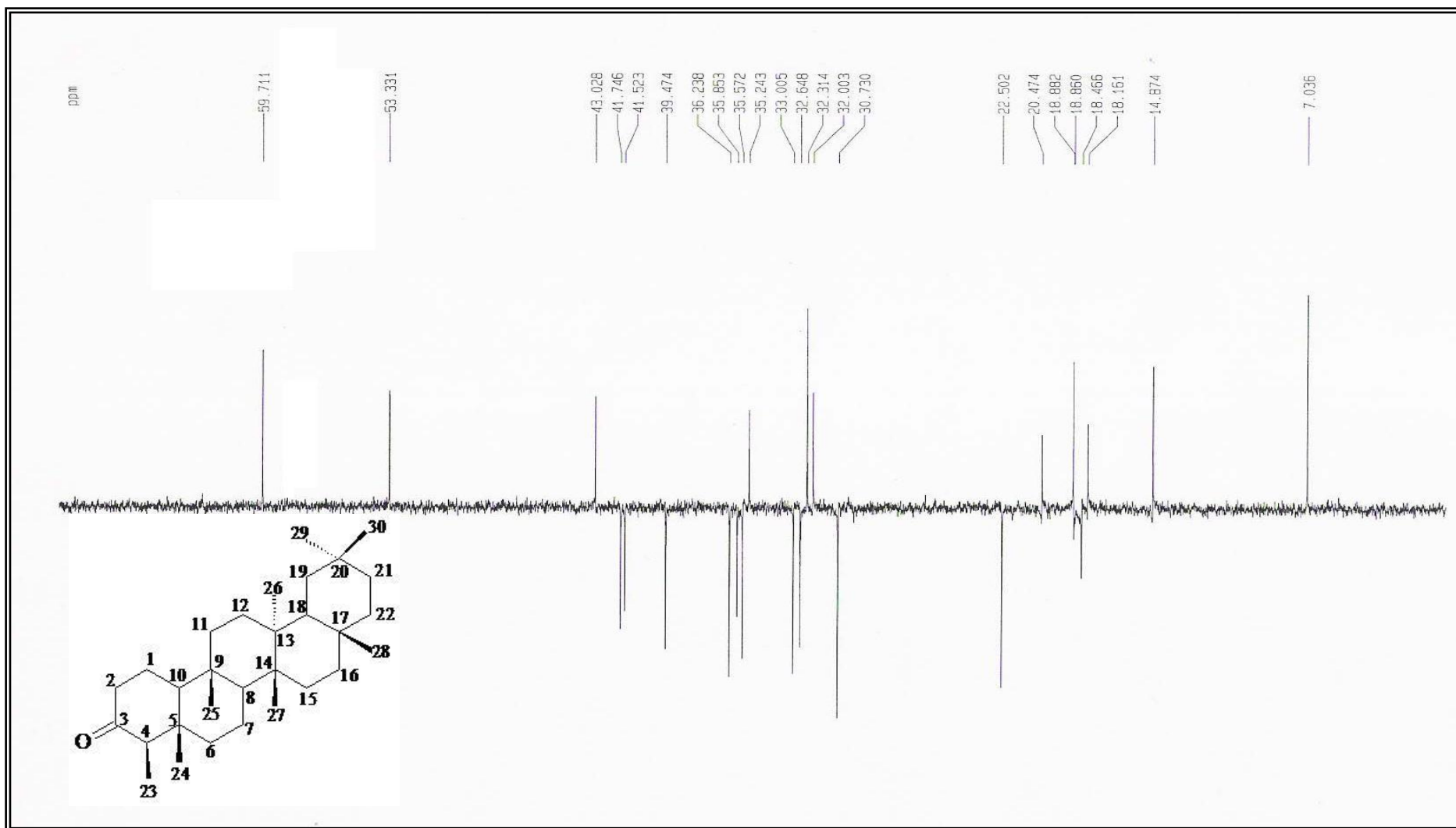


Figura 18. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT 135° de CSH3e

4.3 Ensaio Antioxidante Hipoxantina /Xantina Oxidase

Os extratos FST (folha seca tintura), FSD (folha seca, chá por decocção), FSI (folha seca, chá por infusão) e FSH (fruto seco hexano) foram analisados quanto ao seu potencial antioxidante de acordo com a metodologia descrita em material e métodos, na página 29. Cada extrato foi testado a uma concentração de 4 mg/mL. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

A detecção dos produtos (ácido 2,5-diidroxibenzóico e ácido 2,3-dihidroxibenzóico) produzidos pelo ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido salicílico foi realizada a partir de cromatogramas obtidos e analisados em detector UV, em 325 nm. Com base nos cromatogramas de CLAE-UV obtidos para o ensaio, foram calculadas as percentagens de difenóis produzidos em função da concentração dos extratos (0 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL, 100 µL, 250 µL, 500 µL).

O gráfico abaixo representa (Figura 19), em percentual por volume (µL), a inibição da formação da espécie DHBA frente aos extratos FST, FSD e FSH, que competem com ácido salicílico como substrato para oxidação ou inibem a atividade oxidante da enzima xantina oxidase. A atividade antioxidante do extrato FST apresentou resultado mais significativo. O extrato FSI não apresentou atividade antioxidante.

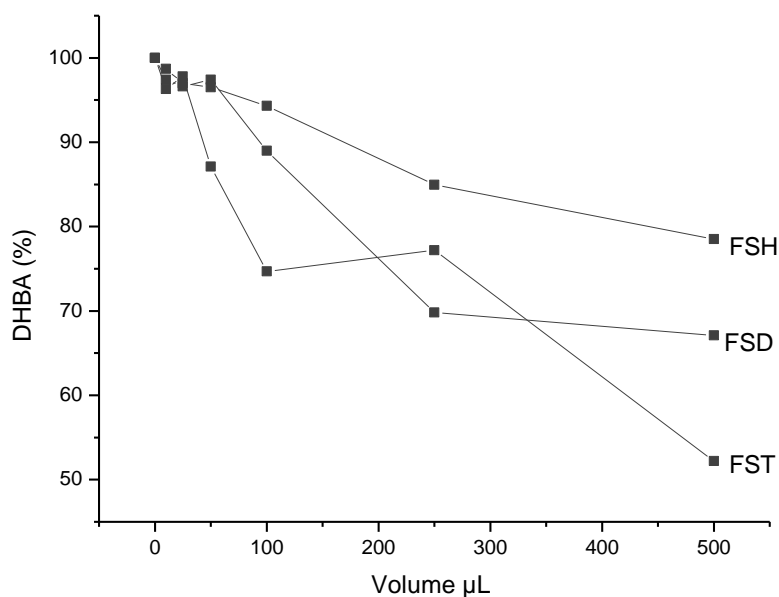
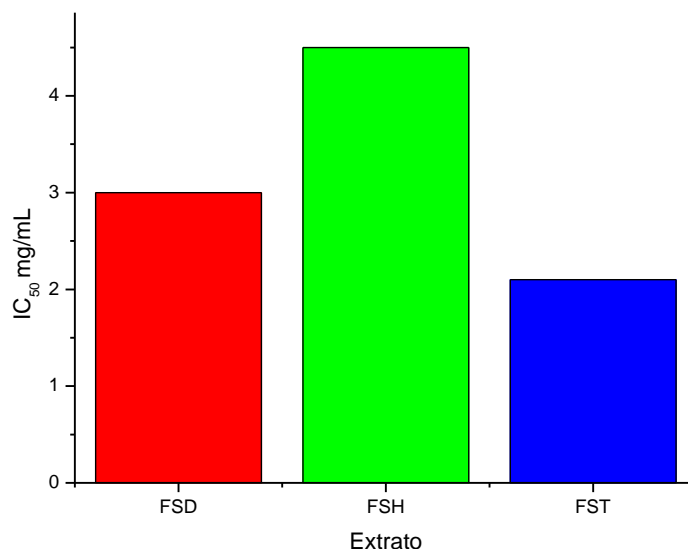


Figura 19. Inibição da atividade da xantina oxidase pelos extratos FST, FSD e FSH no ensaio da hipoxantina/xantina oxidase

O gráfico abaixo representa os valores IC_{50} dos extratos FST (IC_{50} 2,1mg/mL), FSD (IC_{50} 3,0 mg/mL) e FSH (IC_{50} 4,5mg/mL). Quanto menor a barra no gráfico, maior o potencial antioxidante do extrato. Sendo assim, o extrato FST possui melhor capacidade antioxidante.



4.4. Ensaio - Inibição da Enzima Acetilcolinesterase

As frações codificadas FH (fruto seco hexano), FM (fruto seco metanol), FSH (folha seca hexano), FSM (folha seca metanol), CSH (casca seca hexano), CSM (casca seca metanol), TSH (talo seco hexano), FST (folha seca tintura), FSI (folha seca, chá por infusão), CSD (casca seca, chá por decocção), TSD (talo seco, chá por decocção) foram submetidas ao ensaio da Enzima Acetilcolinesterase. A metodologia está delineada na parte experimental (Páginas 31-32), conforme descrito por Rhee *et al.* (2001). As concentrações das frações foram de 2 mg/ mL, sendo aplicados 2,5 μ L. A análise dos resultados, após a aplicação das soluções ACTI (Iodeto de Acetilcolina), DTNB(5,5'-Ditiobis-2-nitrobenzóico) e da enzima, permitiu observar que, quando houve inibição da enzima, apareceu um halo branco, confirmando a atividade da inibição da referida enzima. As frações com melhores inibições foram FH, TSH, CSH, FSM e FM. Na tabela 15, p. 57, estão apresentados os resultados.

Tabela 15. Resultado da inibição das frações da enzima acetilcolinesterase

FRAÇÃO	TAMANHO DO HALO (mm)
CONTROLE (Carbachol)	21
FH	18
FM	10
FSH	0,5
FSM	11
CSH	13
CSM	0,6
TSH	15
FST	0,4
FSI	0,7
CSD	0,7
TSD	0,6

5.5. Teste com caramujo da *Biomphalaria glabrata*

A esquistossomose mansônica ou barriga d'água, como é popularmente conhecida, é uma doença infecto-parasitária causada pelo *Schistosoma mansoni*. Os caramujos *Biomphalaria* são hospedeiros intermediários do verme. Esses moluscos são de água doce e vivem em águas paradas ou com fraca correnteza. No Brasil, acredita-se que sua introdução se deu através do tráfico de escravos africanos que traziam consigo o parasita. A presença de hospedeiros intermediários suscetíveis (*Biomphalaria*) permitiu a instalação desta espécie no território brasileiro. De todas as espécies de interesse médico - *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. hematobium*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* - apenas o *S. mansoni* (Fig. 20) foi encontrado no Brasil e está completamente adaptado ao meio (NOVAES *et al.*, 1999; NEVES *et al.*, 2004).



Figura 20. *Schistosoma mansoni* (verme)

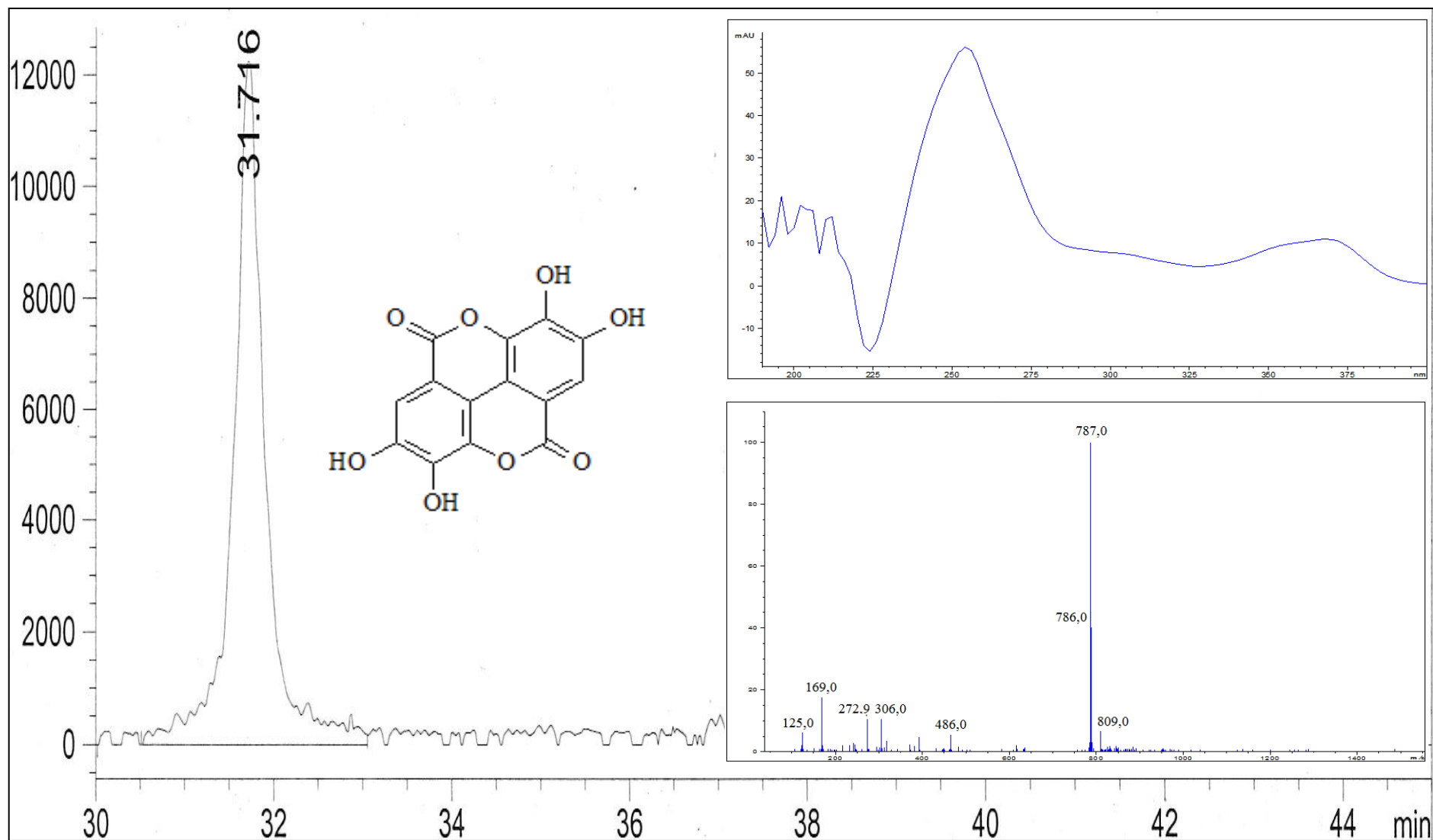
As frações codificadas FH (fruto seco hexano) e FM (fruto seco metanol) foram submetidas ao teste com caramujo da *Biomphalaria glabrata*. A metodologia está descrita na parte experimental (p. 21). A análise dos resultados, após a aplicação da solução de 125 mL em cada copo contendo 5 caramujos, permitiu verificar que, em FH, os índices de mortalidade em 24h foram de 100% e, na fração FM, os índices de mortalidade em 48h foram de 60% e 80%. Os resultados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16. Resultados dos experimentos com caramujo da *Biomphalaria glabrata*

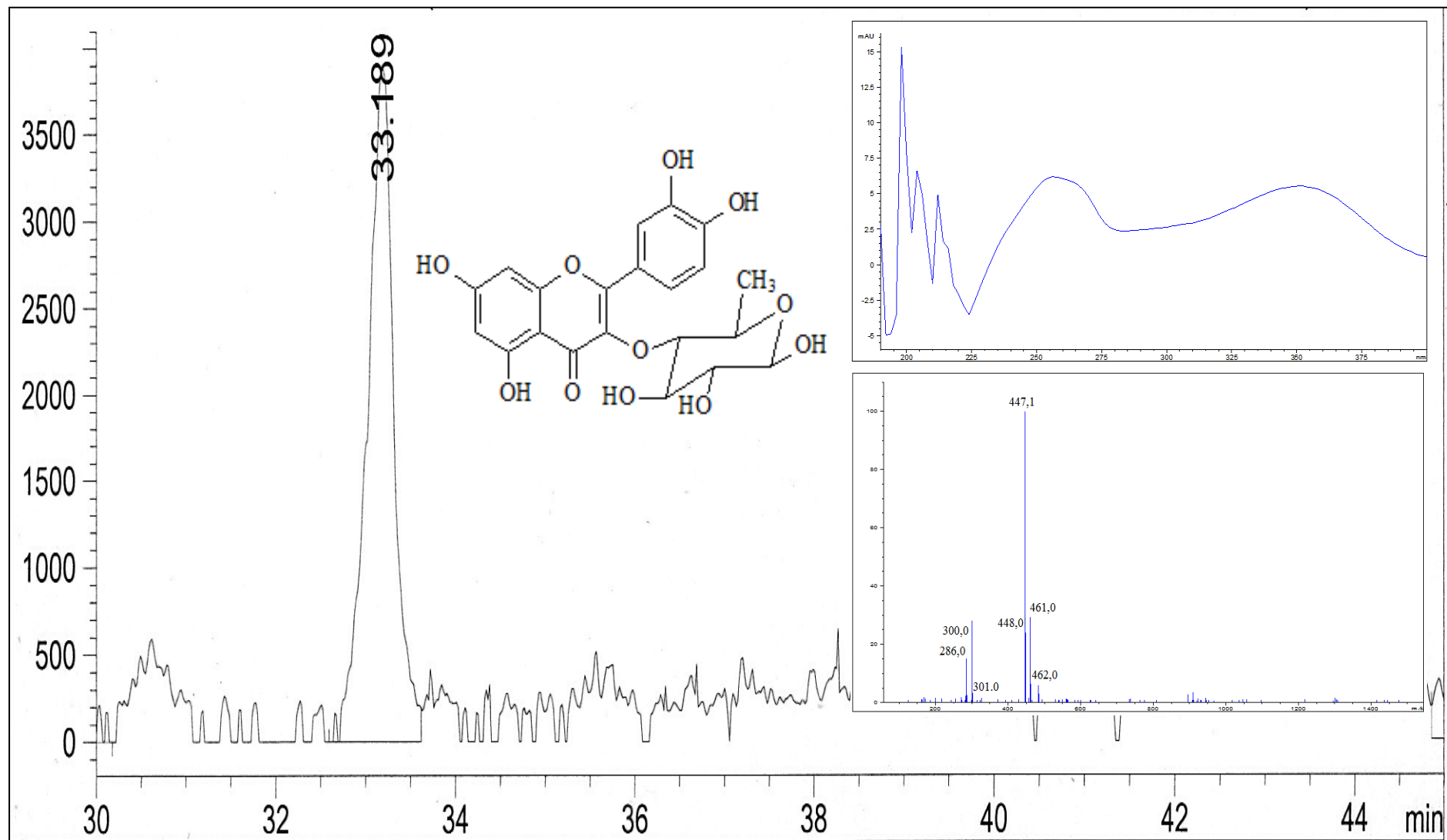
AMOSTRA	COPO	CONCENTRAÇÃO (ppm)	MORTALIDADE (HORAS)					MORTALIDADE (%)
			0	24	48	72	96	
FH	1	100	0	5	0	0	0	100
	2	100	0	5	0	0	0	100
FM	1	100	0	0	3	0	0	60
	2	100	0	0	4	0	0	80
BRANCO	1		0	0	0	0	0	0
	2		0	0	0	0	0	0
NEGATIVO	1		0	0	0	1	0	20
	2		0	0	0	0	0	0
POSITIVO	1	3	0	5	0	0	0	100
	2	3	0	5	0	0	0	100

Em estudos realizados com extratos da casca do tronco e galhos de *C. densifolia* Mart. (Theaceae), verificou-se fraca atividade anticancerígena (ED_{50} 1,5 μ g/mL), mas não foi possível continuar ou acompanhar esta atividade em posterior fracionamento. (GUNASEKERA, *et al.*, 1982).

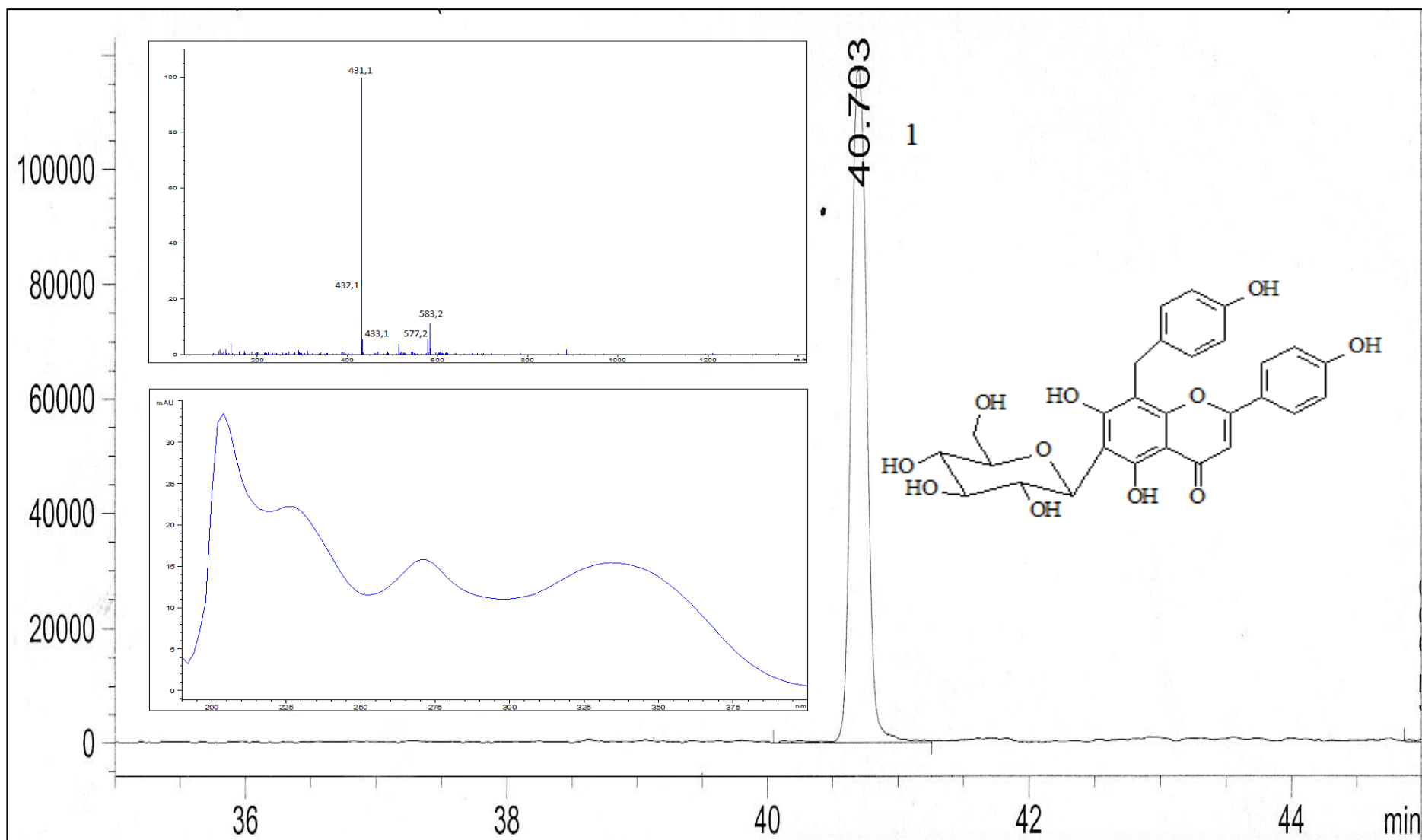
5. ANEXOS



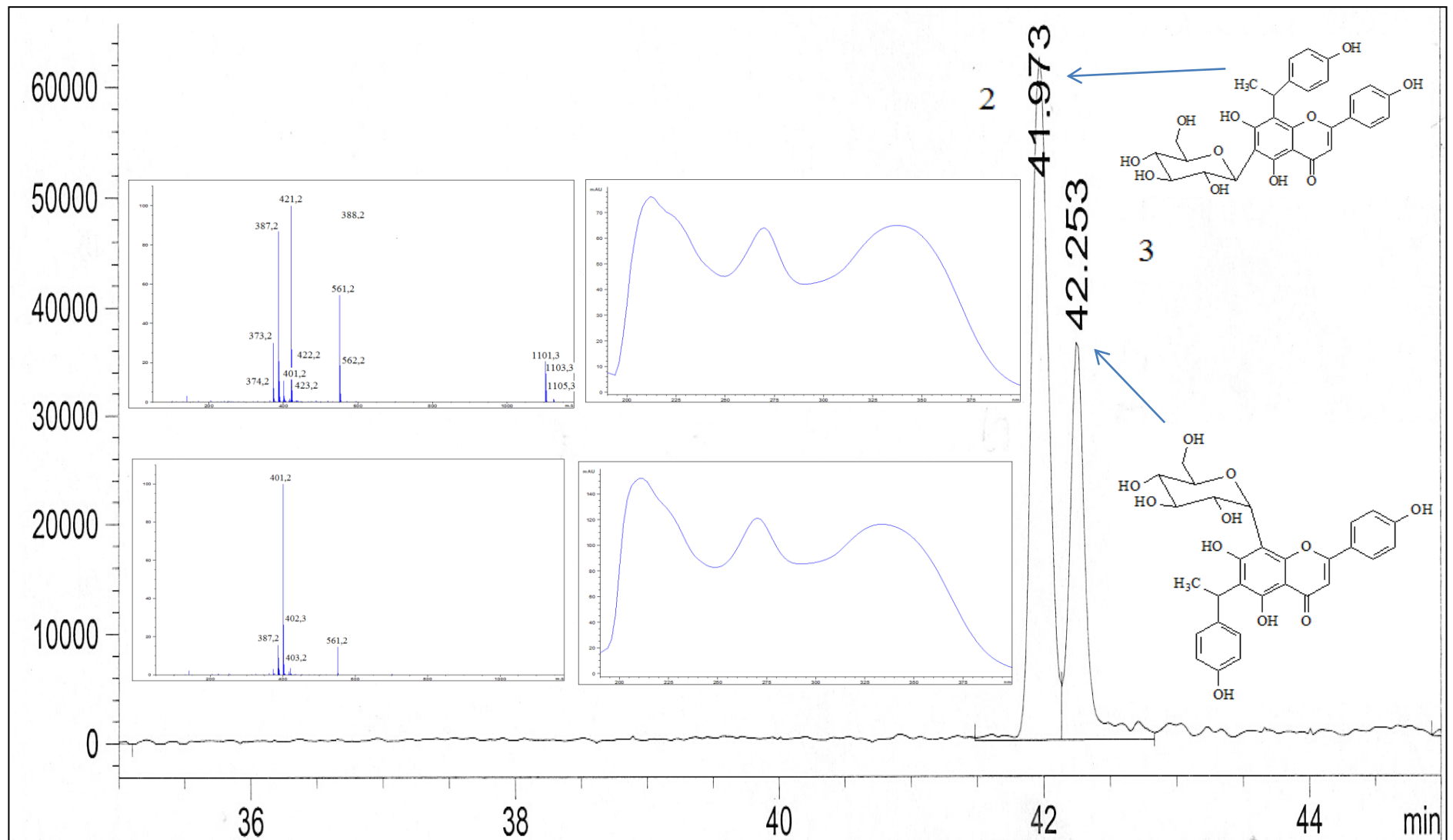
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: **1**. Ácido elágico.



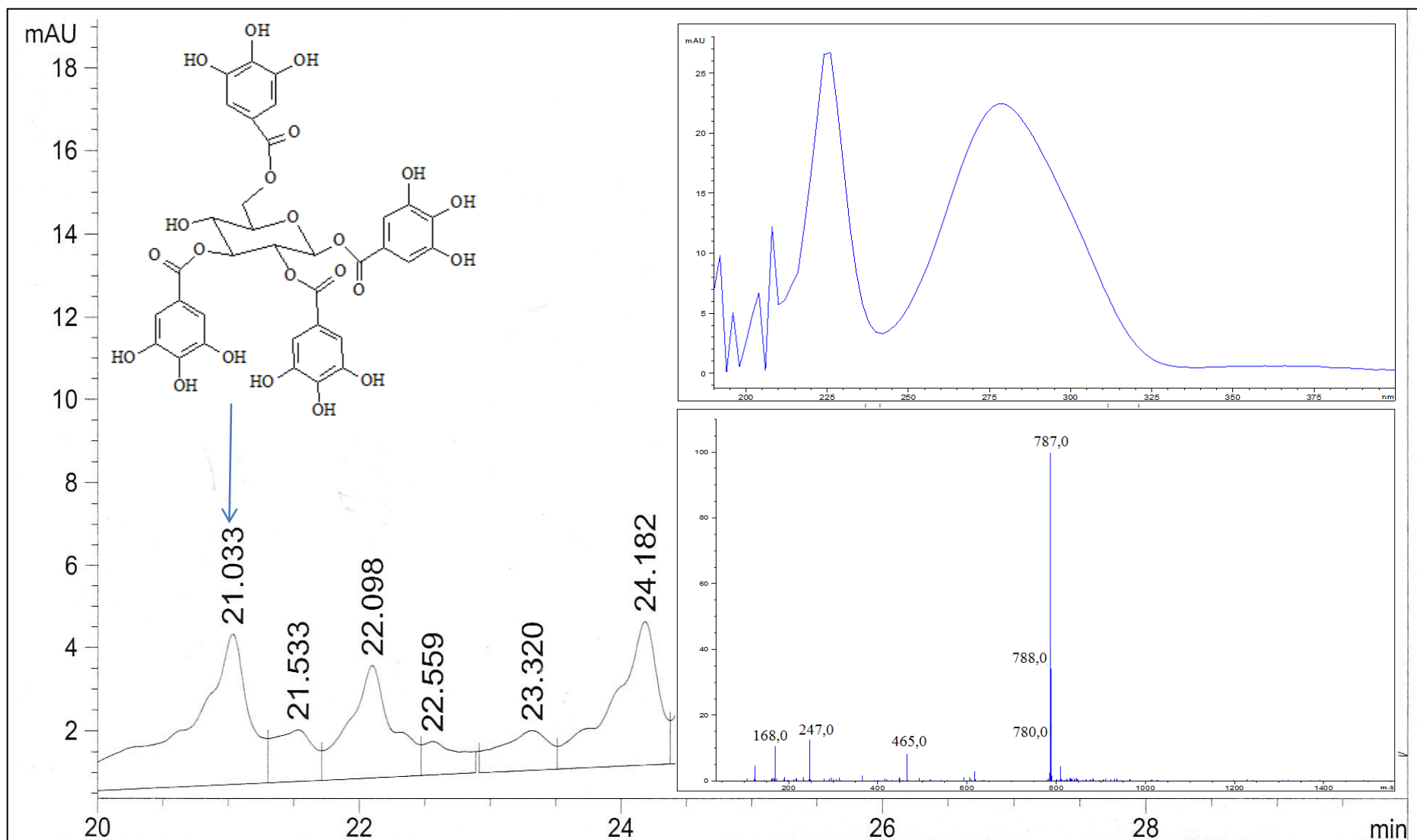
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: 2. Quercetina-*O*-ramosídeo.



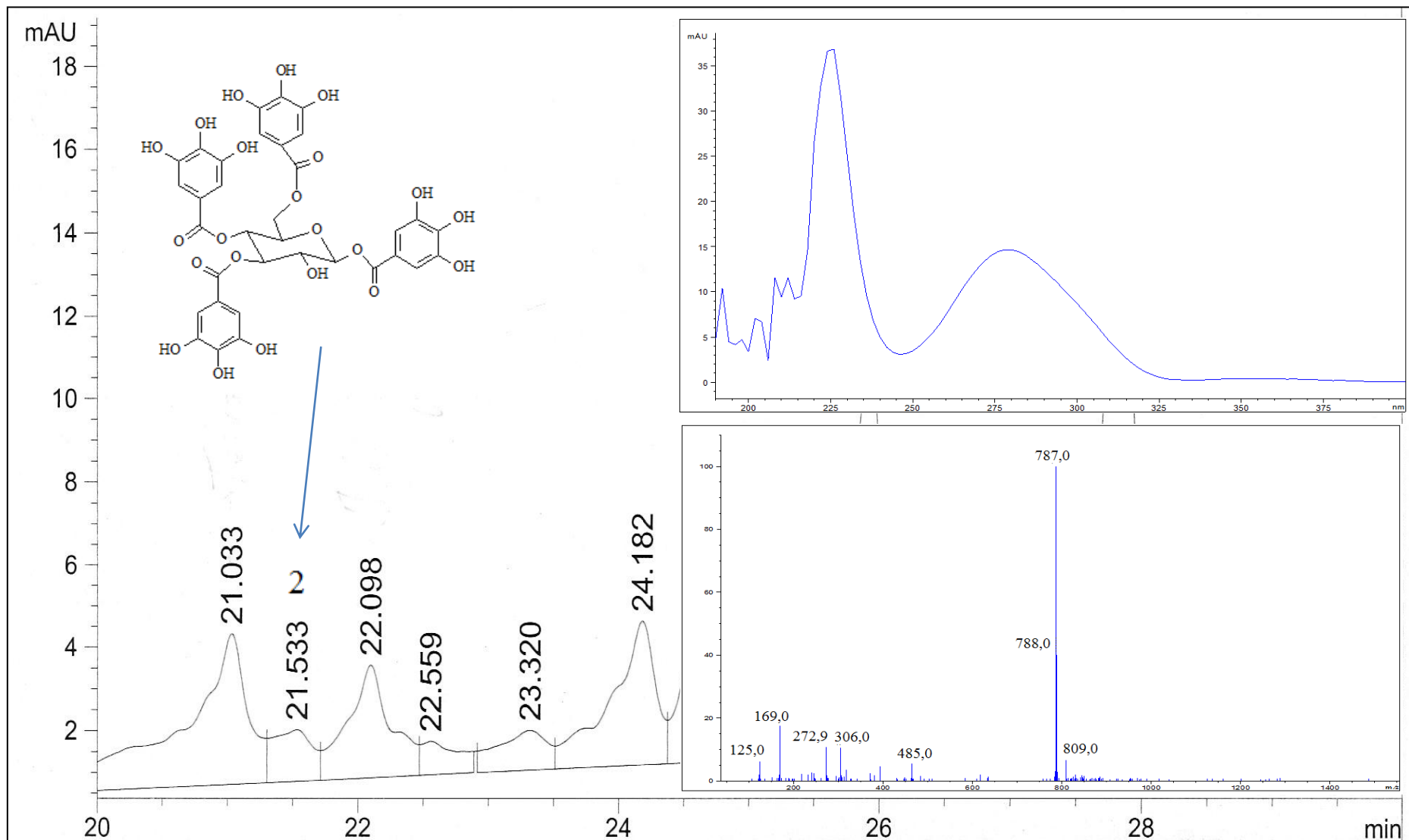
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico das folhas: **1**. Cucumerina C.



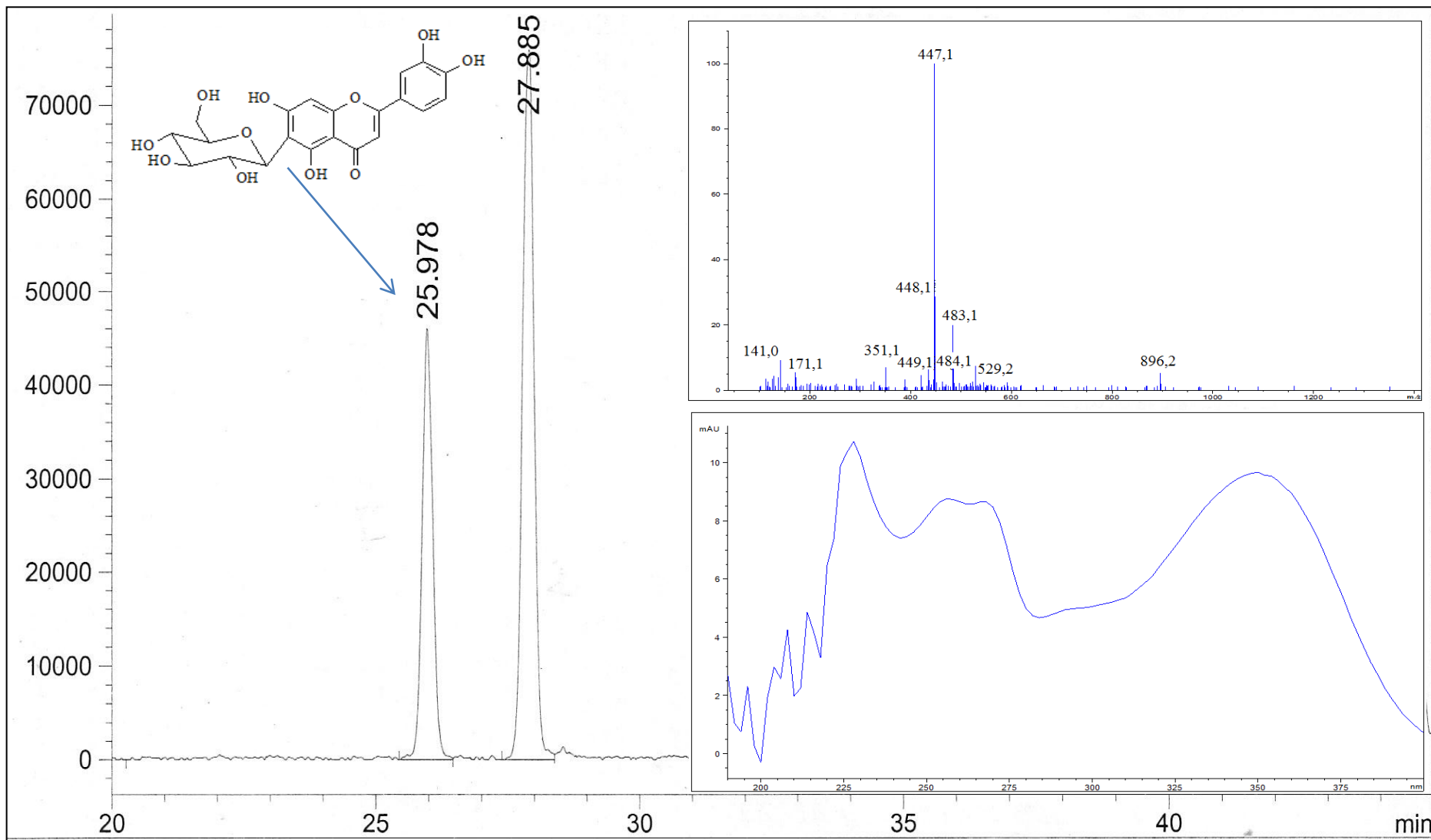
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico das folhas: **2**. Cucumerina A; **3**. Cucumerina B.



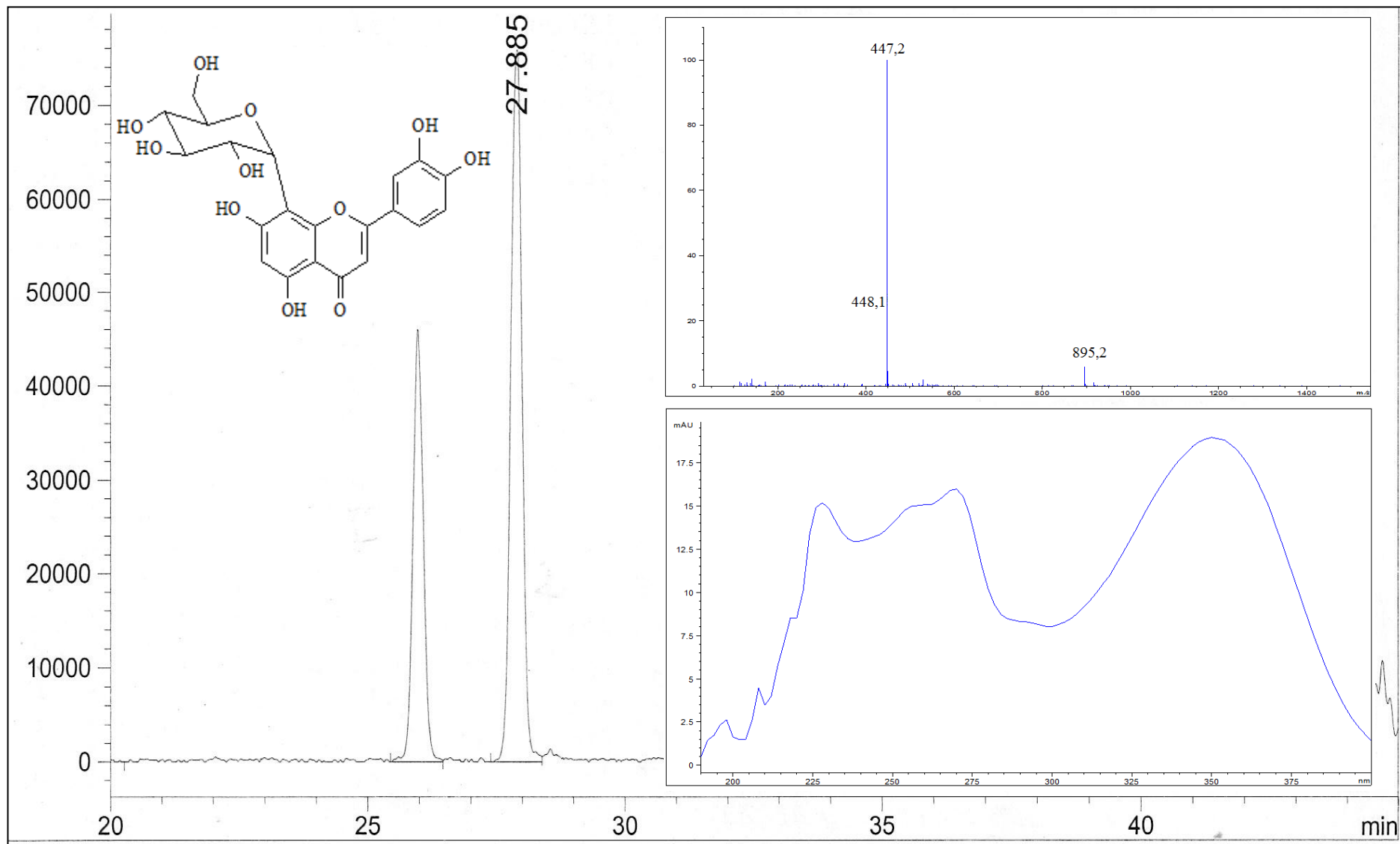
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: **1.** 1,2,3,6-tetragalato glicosídeo.



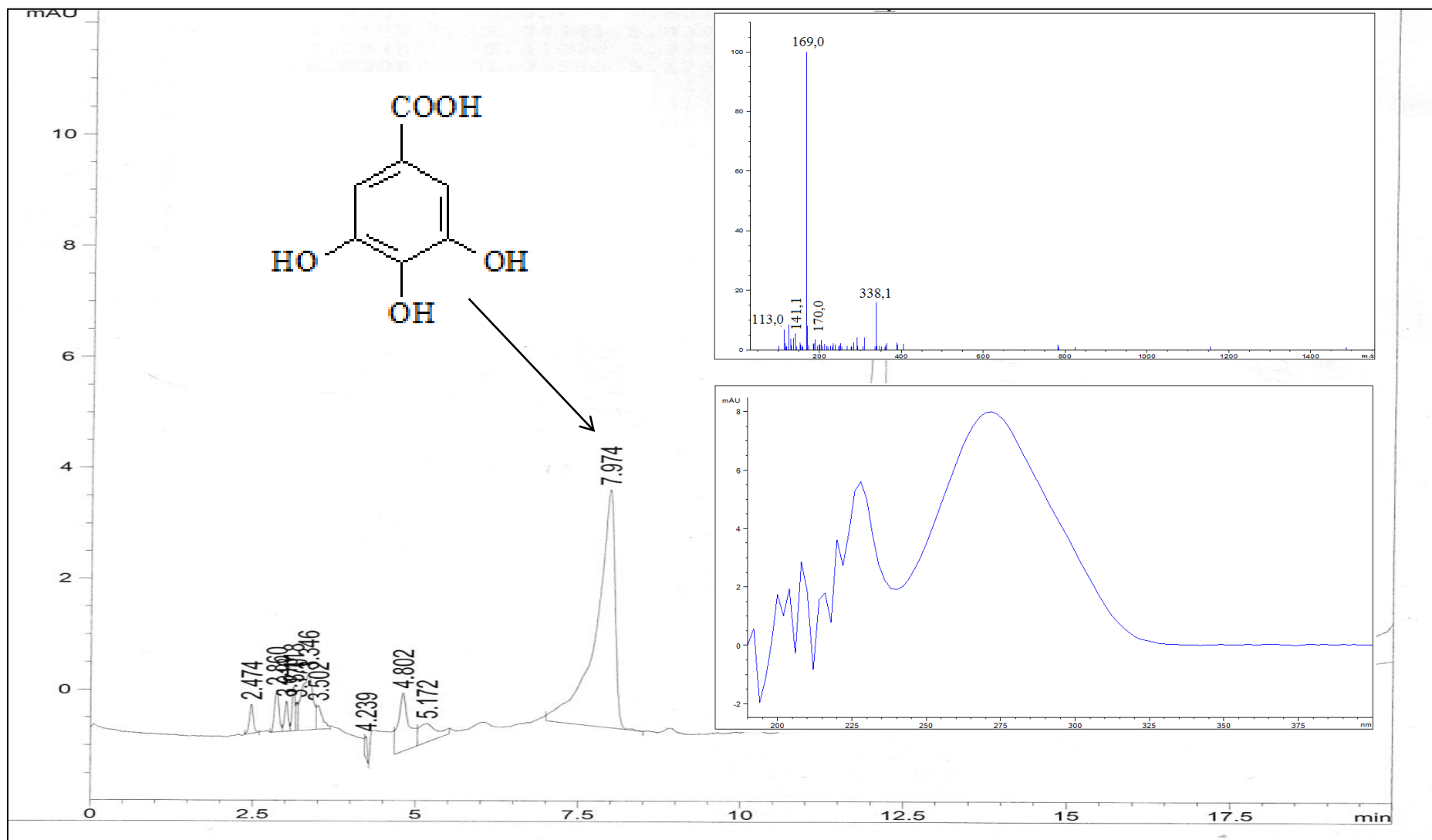
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: **2**. 1,3,4,6-tetragalato glicosídeo.



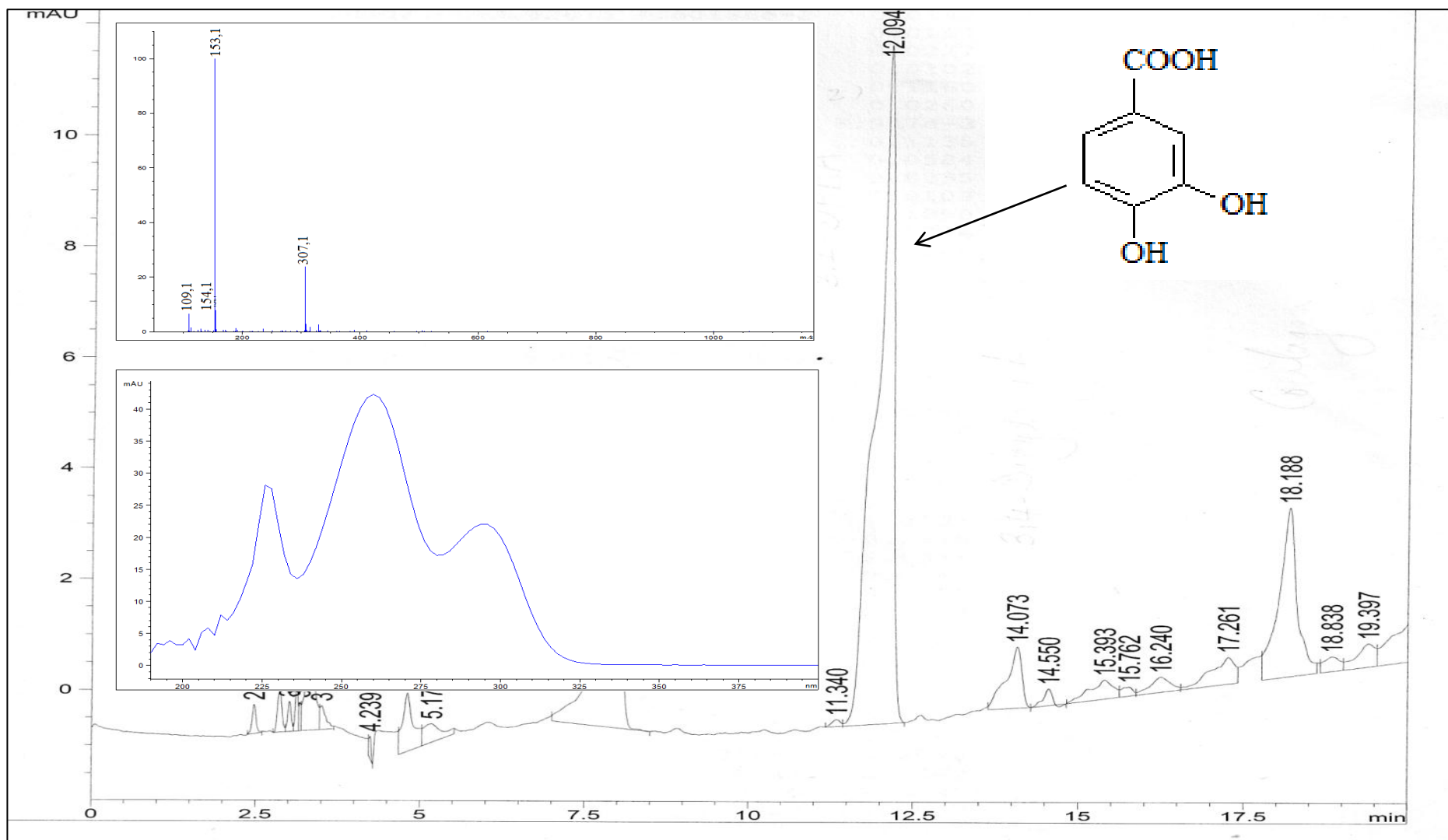
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico das folhas: Orientina.



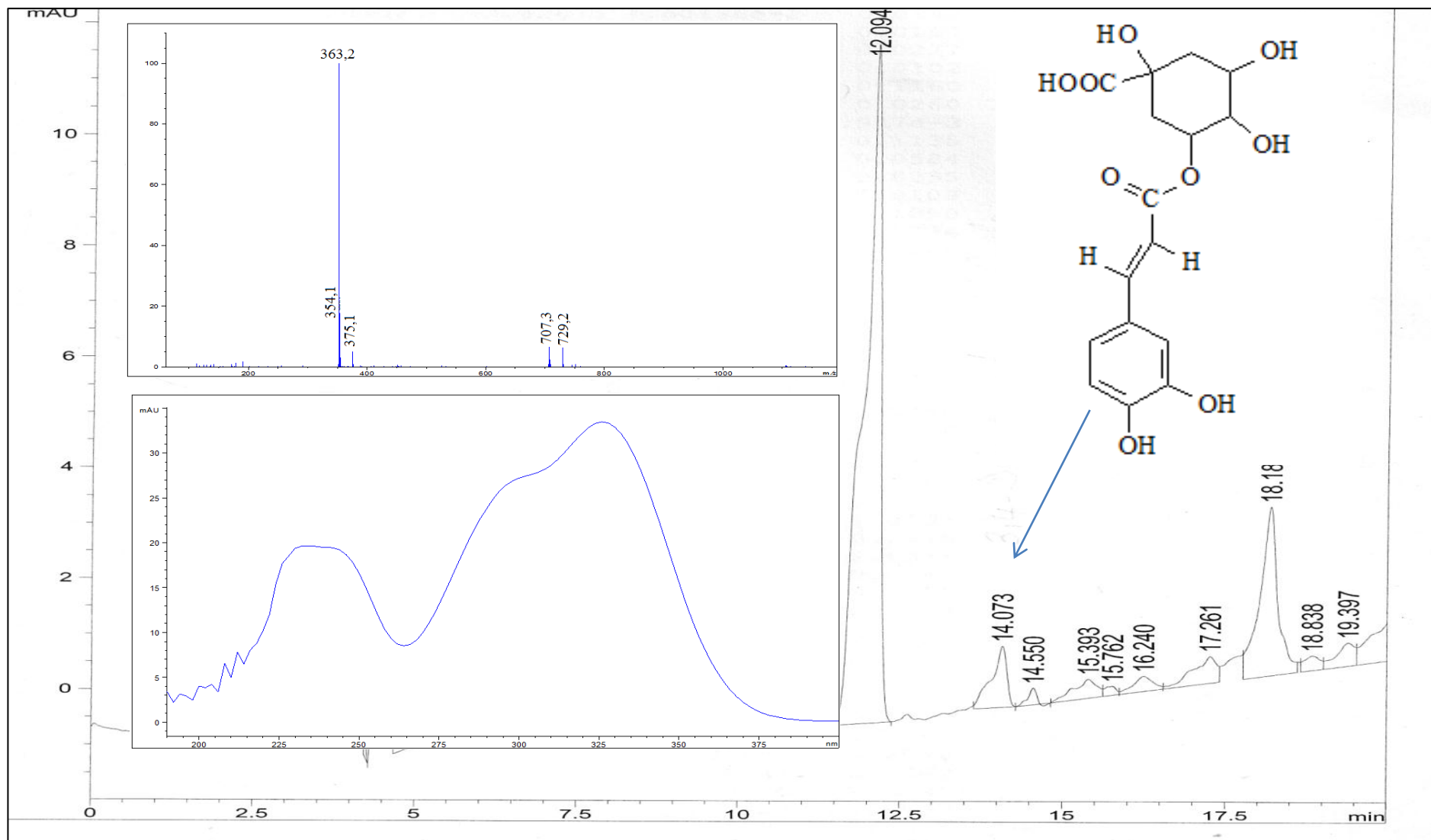
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico das folhas: Isoorientina.



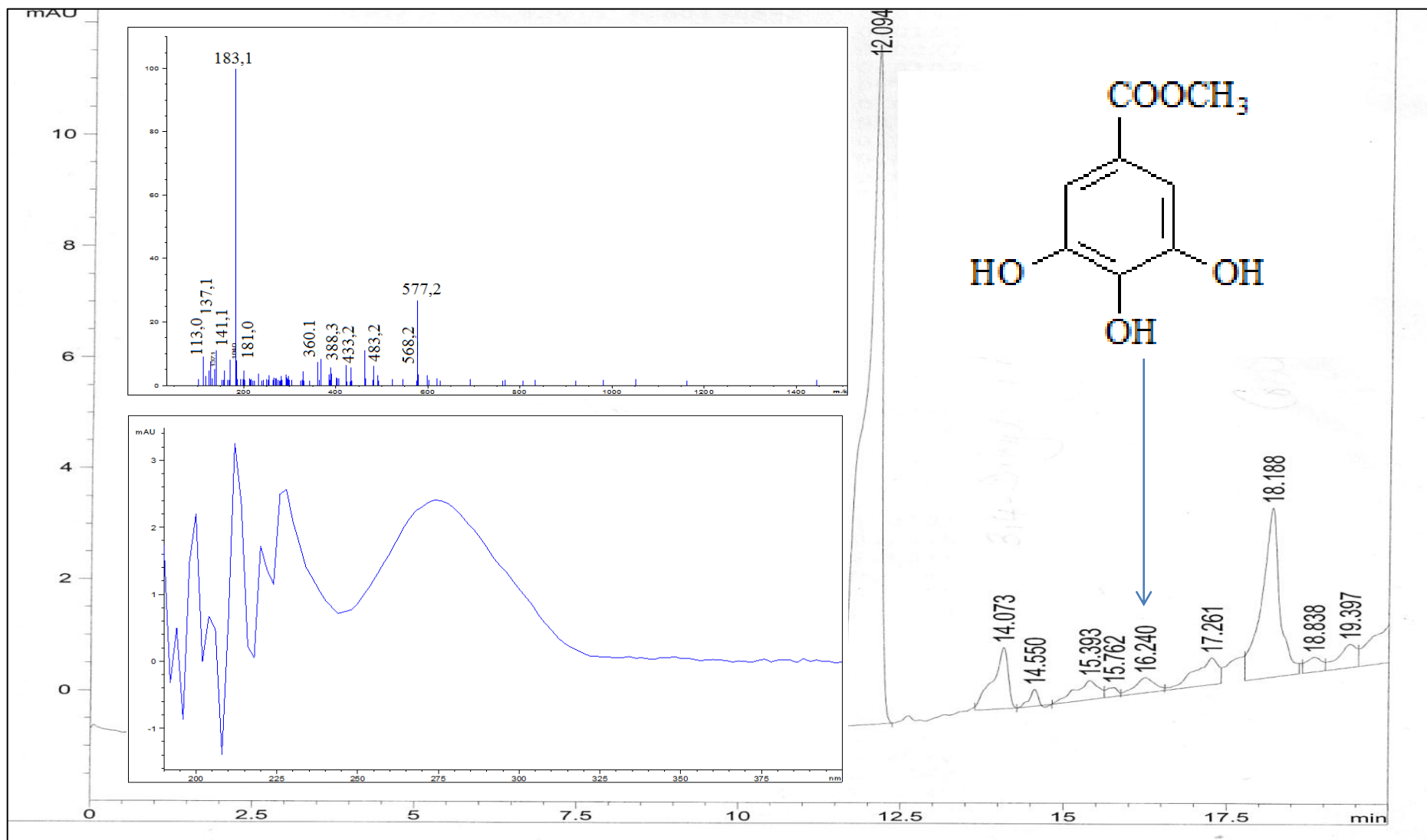
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: Ácido gálico.



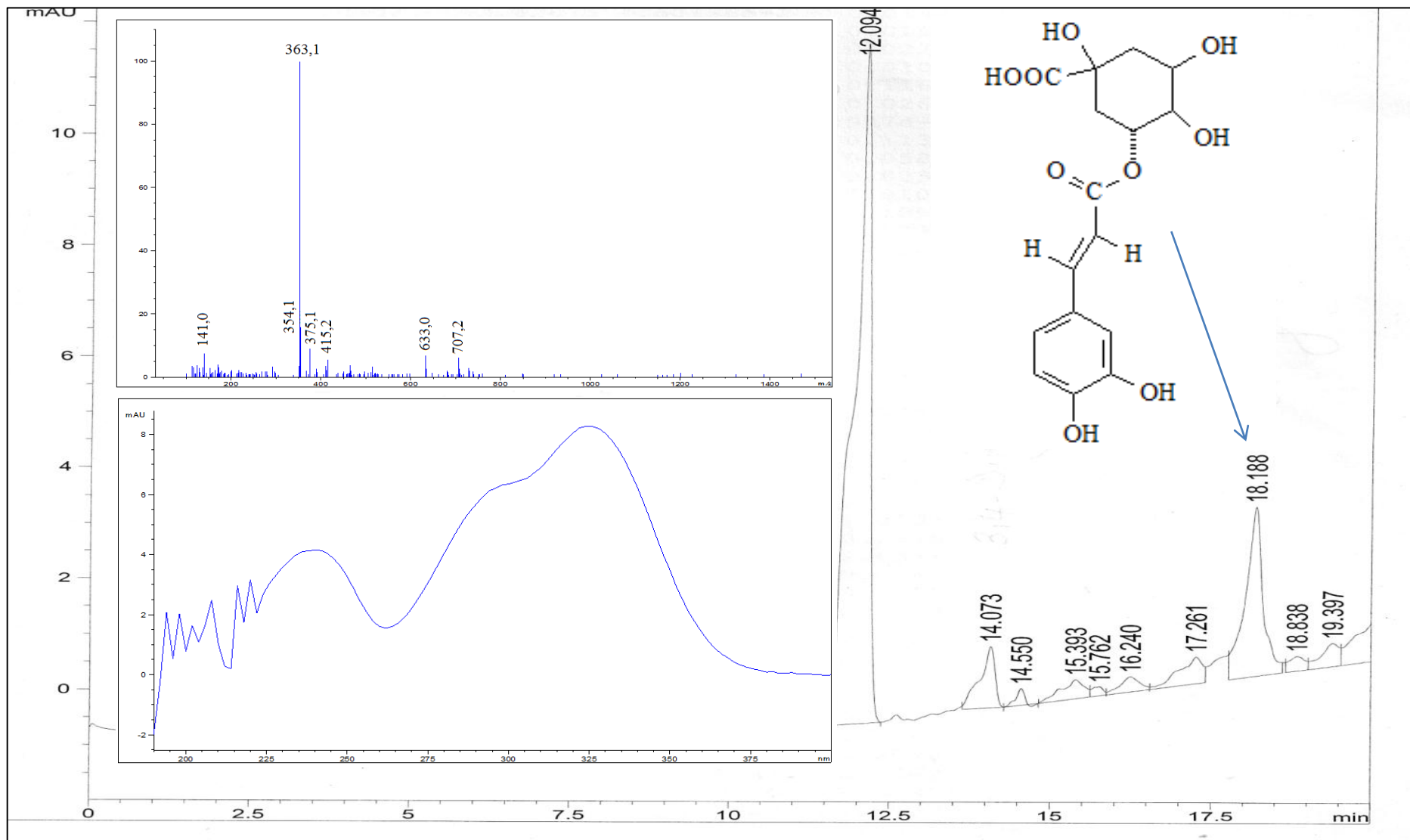
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: Ácido 3,4-diidroxibenzoico.



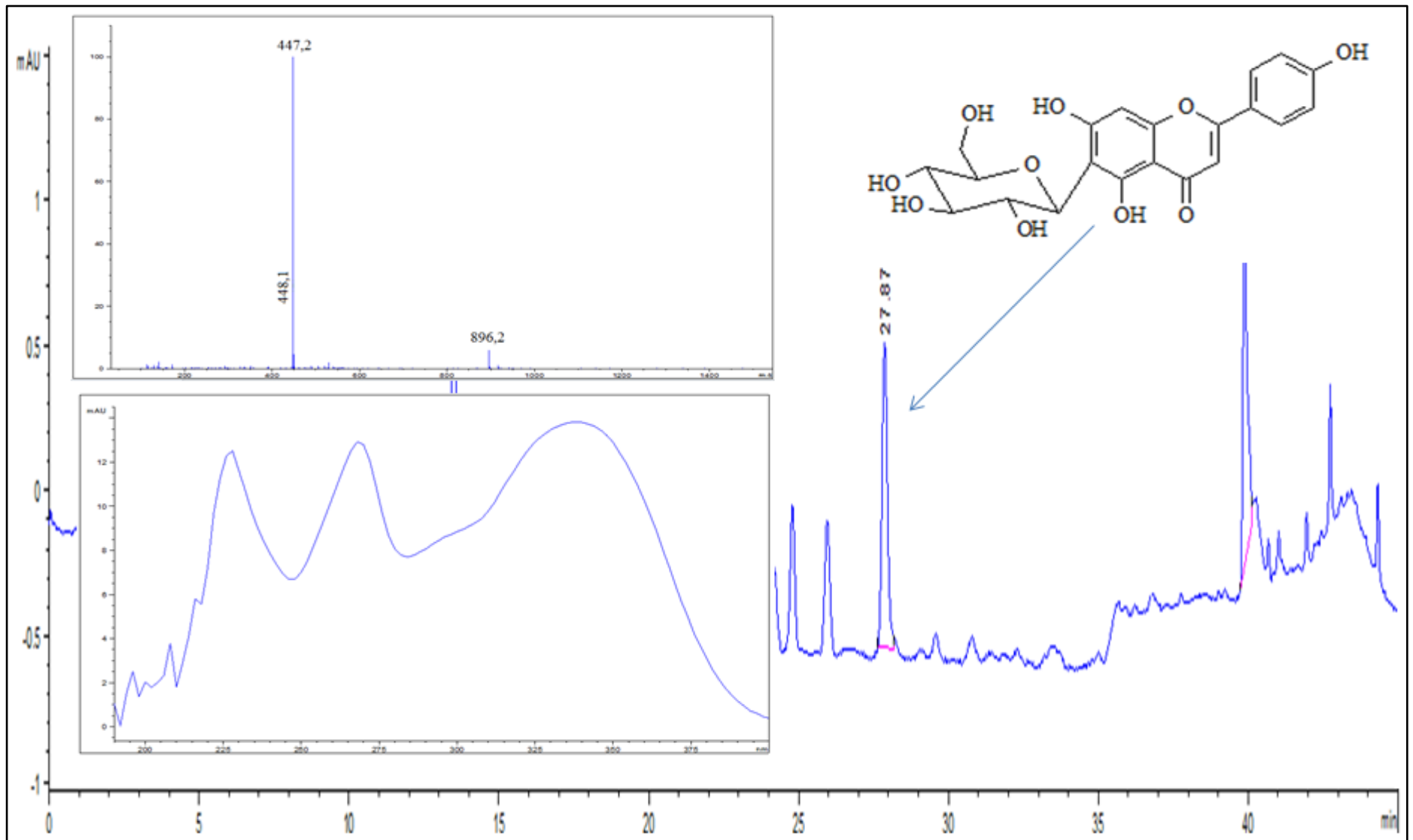
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: Ácido neoclorogênico.



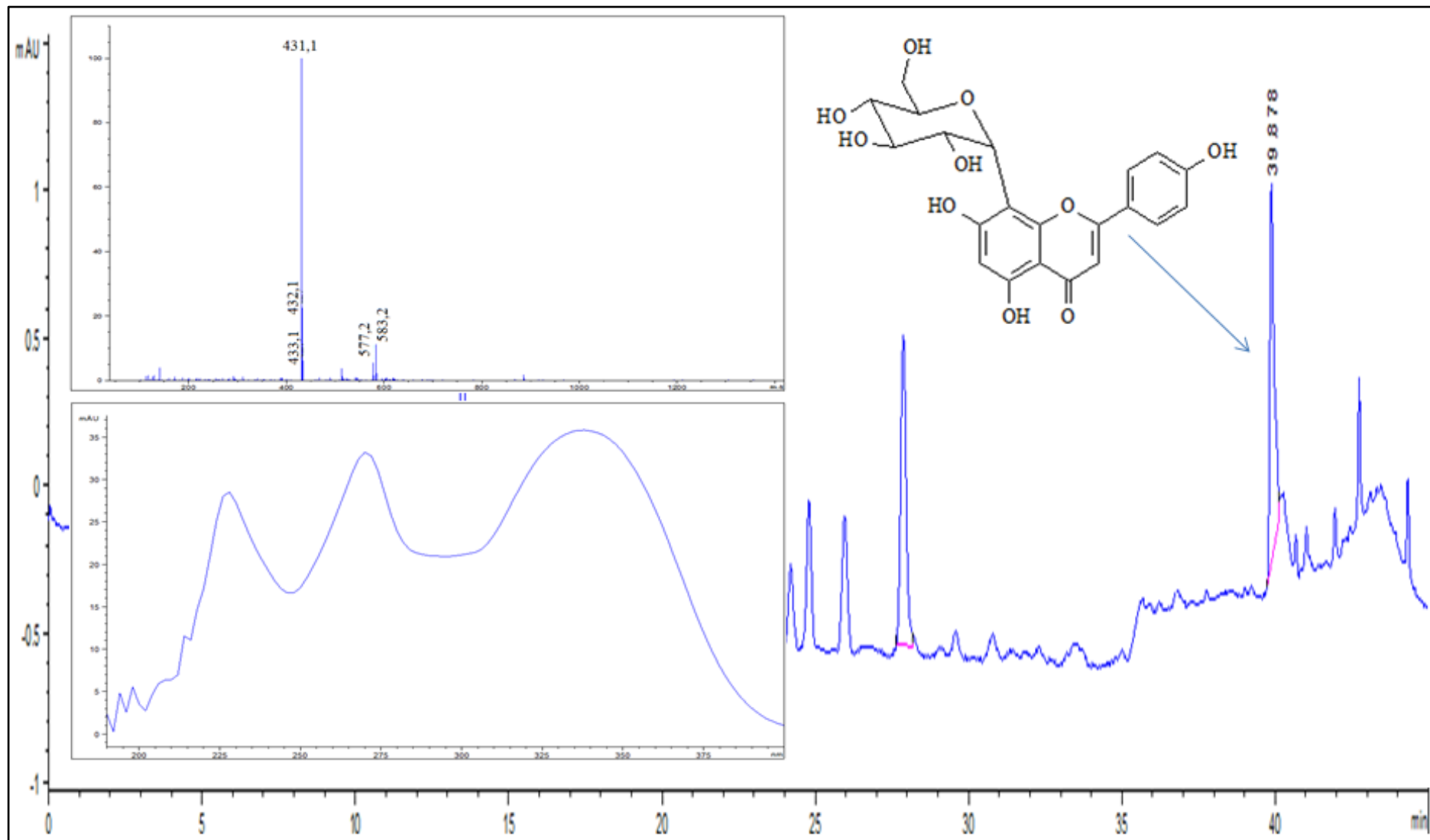
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: Galato de metila.



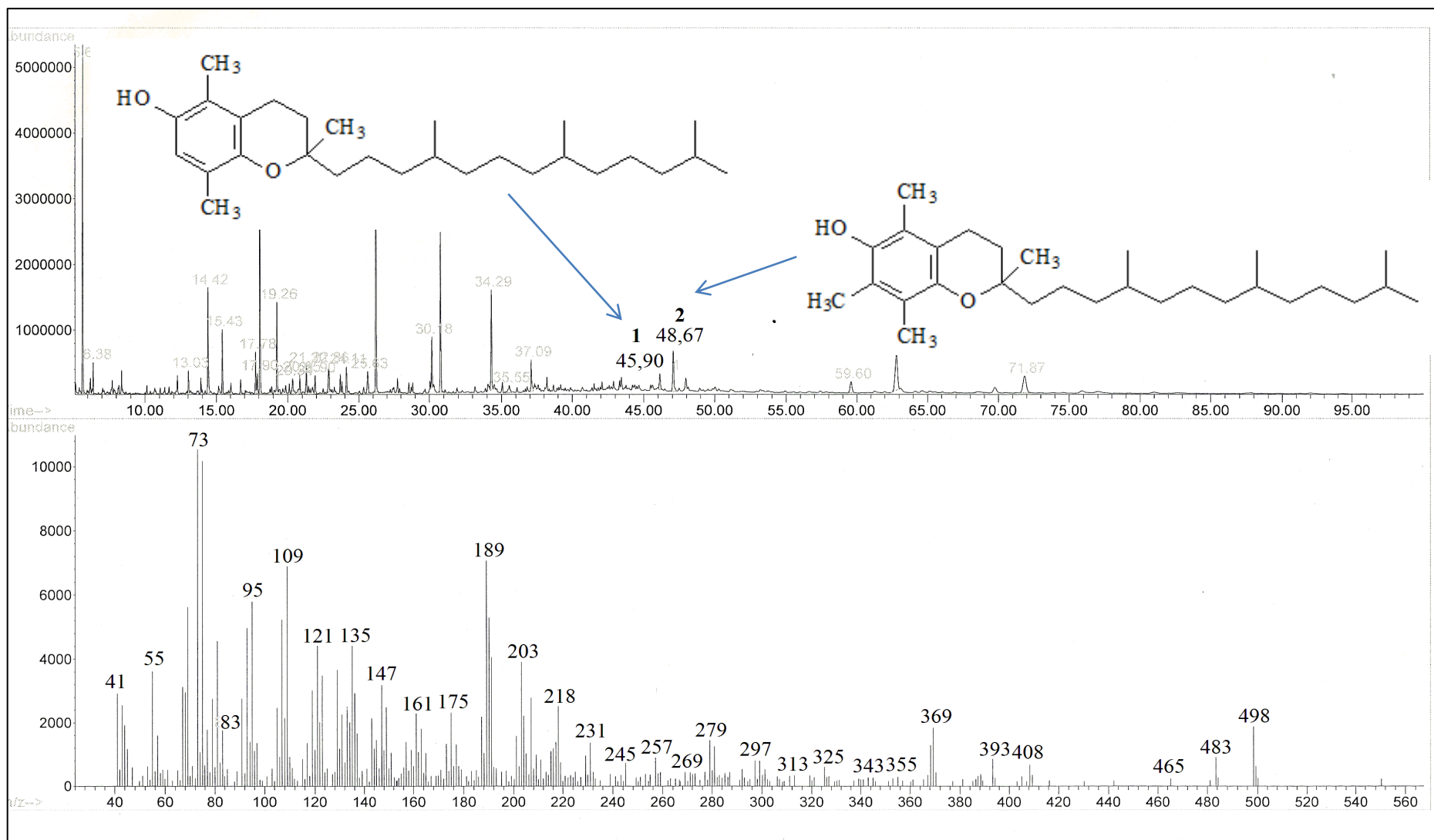
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM do extrato metanólico dos frutos: Ácido Clorogênico.



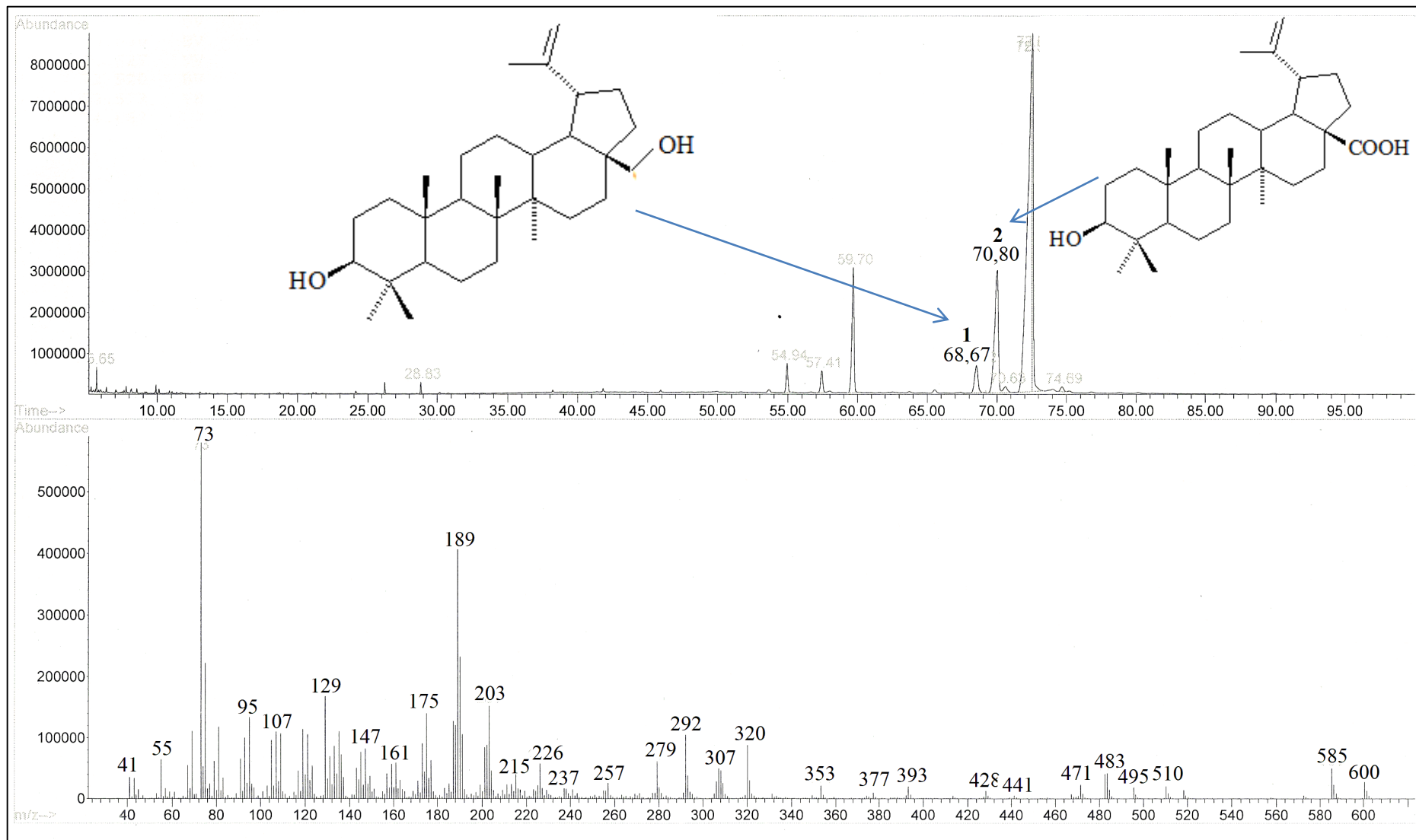
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM chá por decocção das folhas: Vitexina.



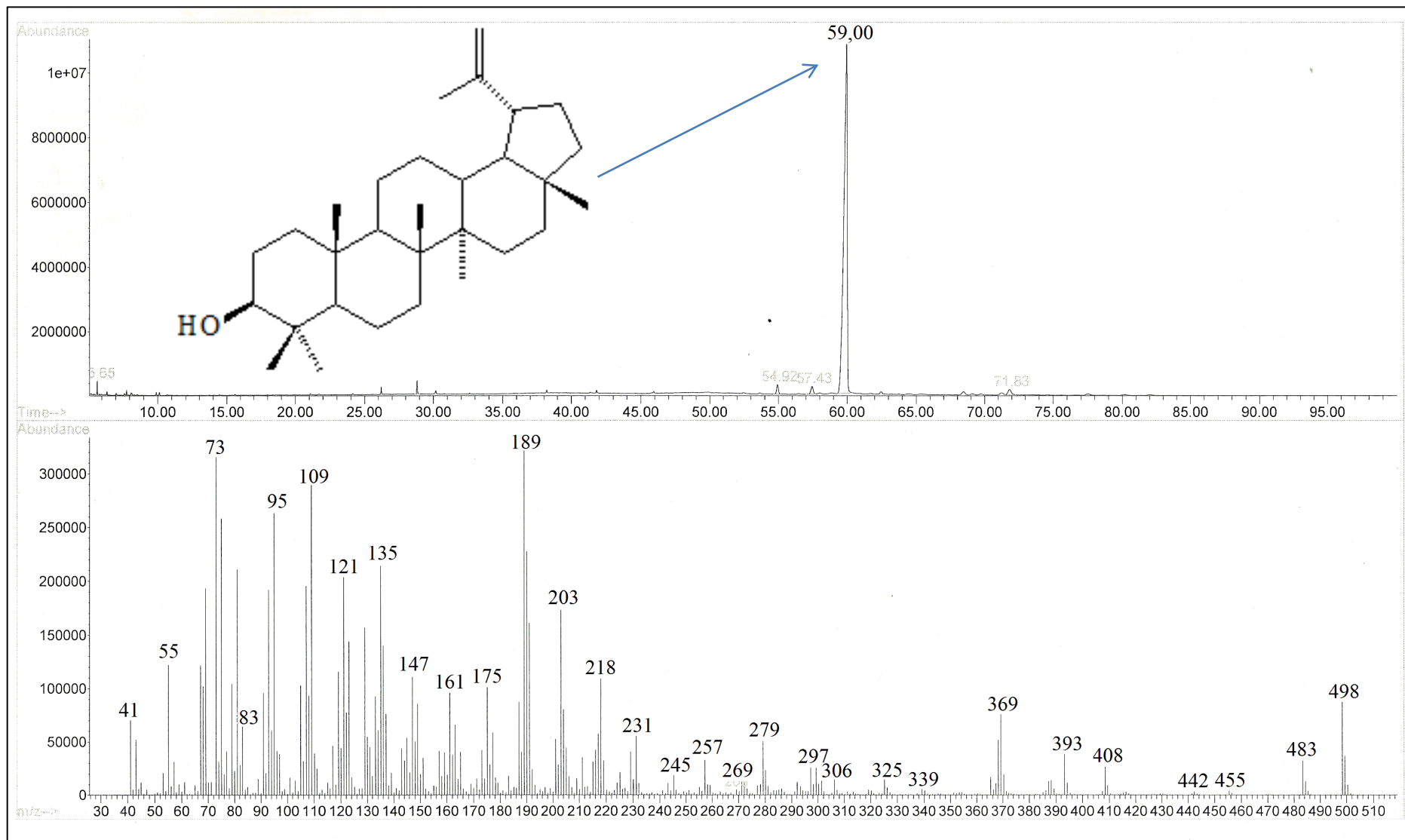
Cromatograma CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM chá por decocção das folhas: Isovitexina.



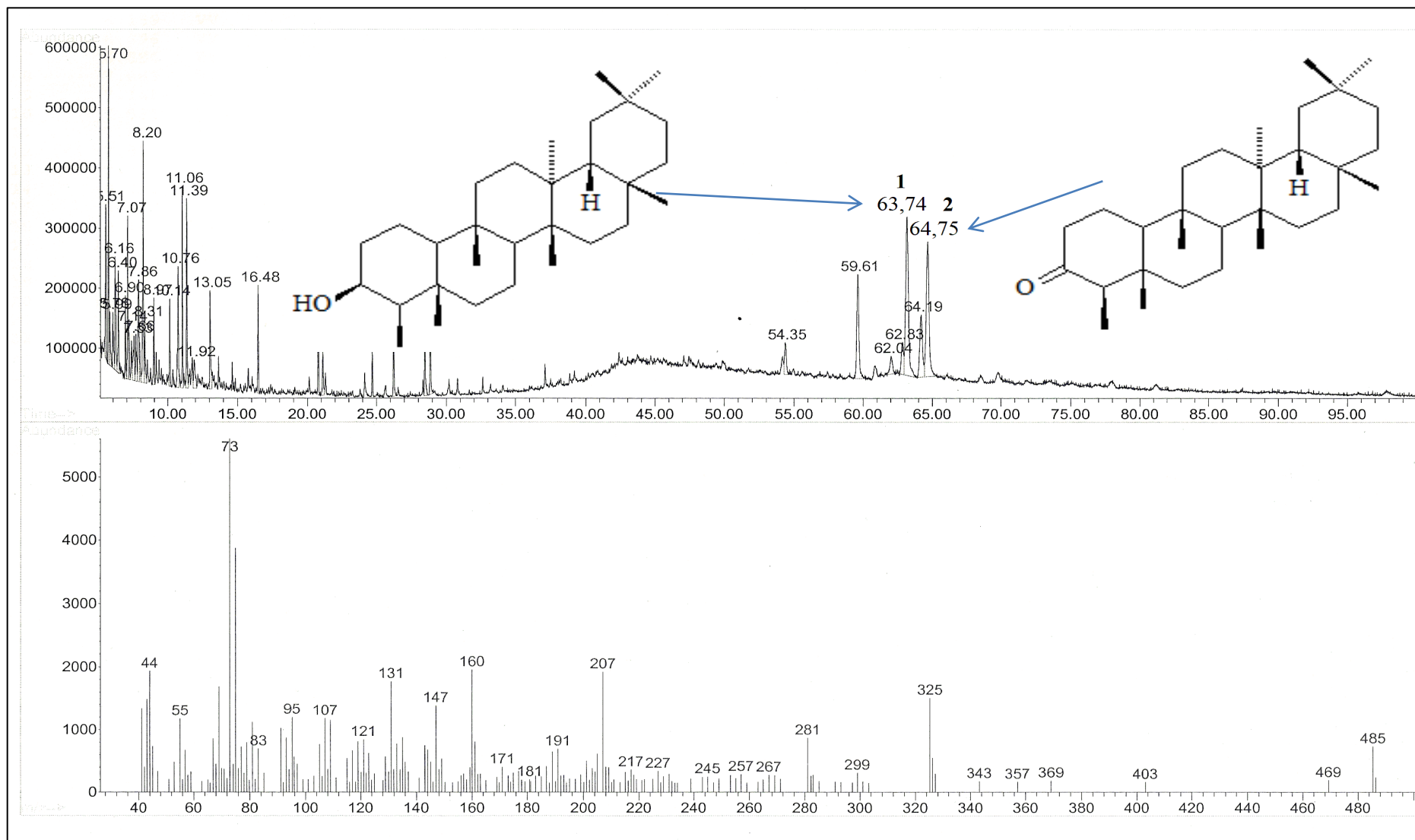
Cromatograma CG-EM da fração CSH (Casca seca hexano): **1.** α - Tocoferol; **2.** γ - Tocoferol.



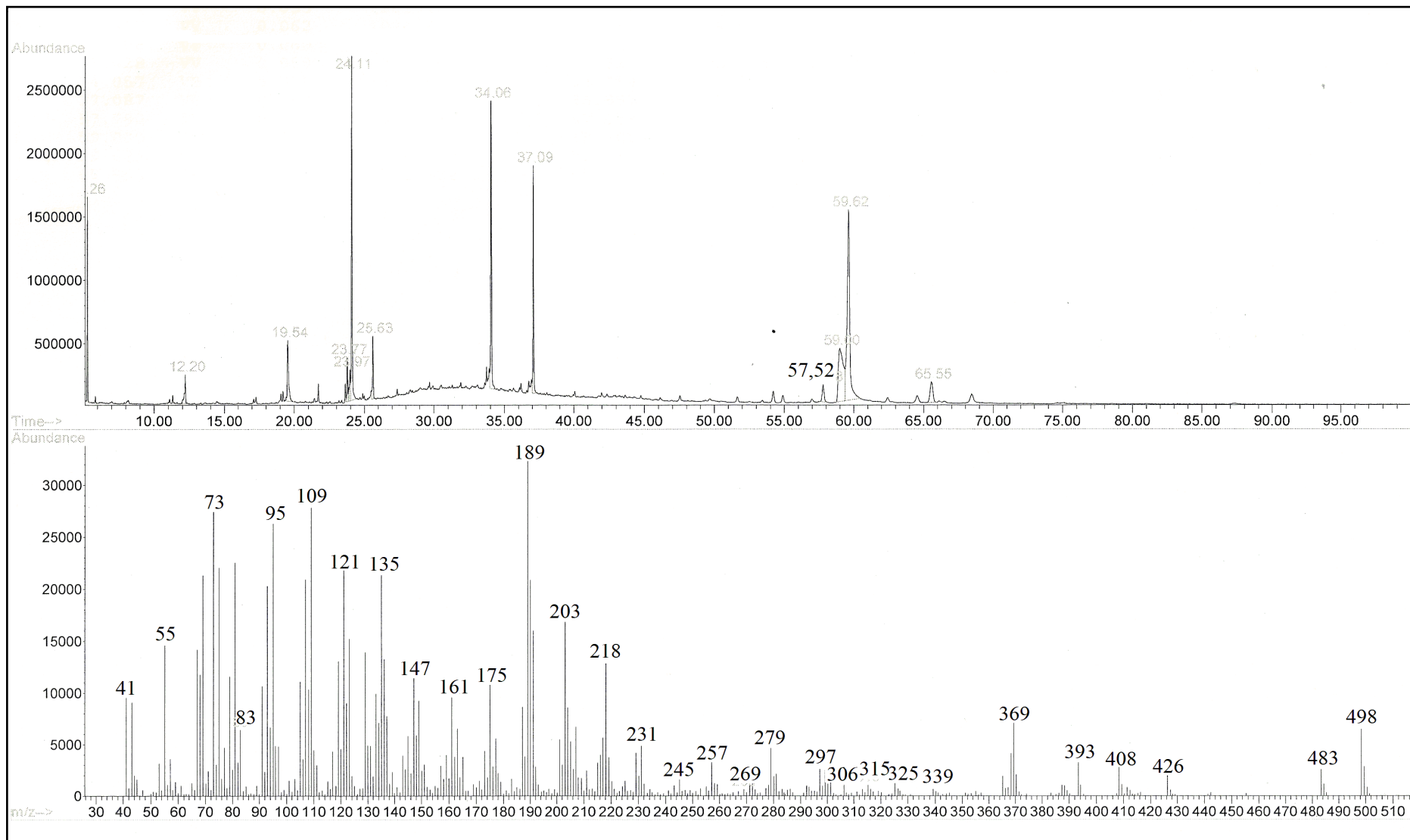
Cromatograma CG-EM da fração CSH2.B (Casca seca hexano): **1**. Betulina; **2**. γ Ácido Betulínico.



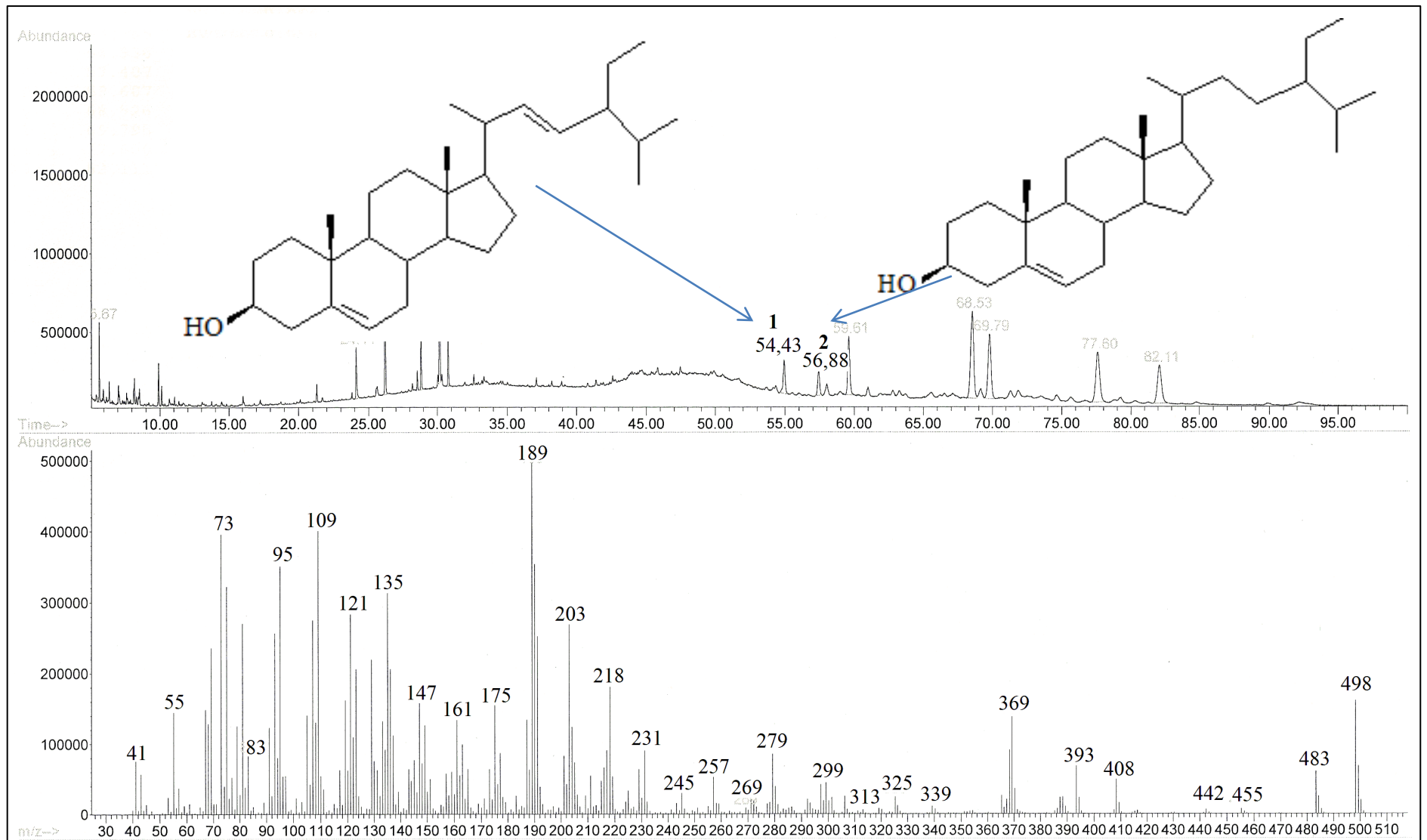
Cromatograma CG-EM da fração CSH3 (Casca seca hexano): Lupeol.



Cromatograma CG-EM da fração CS2a.5 (Casca seca hexano): 1. Friedelinol; 2. Friedelina.



Cromatograma CG-EM da fração TSD 3 (Talo seco, chá por decoção): Lupenona.



Cromatograma CG-EM da fração CSHX (Casca seca hexano): **1**. Estigmasterol ; **2**. β – sitosterol.

6. CONCLUSÕES

A partir do estudo fitoquímico das folhas, frutos, talos e cascas de *Caraipa densifolia* Mart. *spp densifolia* a espécie botânica da Amazônia com ampla utilização na medicina popular, foi possível identificar e quantificar os compostos triterpenoides, fenólicos e polifenólicos. Foram detectadas trinta e três substâncias isolados por CLAE-ISE-EM e nano-ISE-EM e CG-EM.

Este é o primeiro relato de compostos polifenólicos na espécie *Caraipa densifolia* Mart. de árvores amazônicas. No total foram detectados e caracterizados 23 polifenóis que foram identificados e quantificados por CLAE. Muitos são comuns a outras espécies vegetais, mas a presença de fitoalexinas, como os C-glicosídeos de vitexina e orientina é rara.

Foram identificados em outros trabalhos nesta espécie os seguintes triterpenoides: lupeol, lupenona, ácido betulínico, betulina, friedelina. Sendo inédito na espécie *caraipa*; friedelinol, β -sitosterol, estigmasterol, as vitaminas (α -tocoferol e γ -tocoferol), identificados em extratos das folhas, todos identificados e quantificados por CG-EM.

Os ensaios da capacidade antioxidante dos extratos FST, FSD e FSH revelaram uma significativa atividade, obtendo assim, melhor atividade antioxidante para extrato FST com IC₅₀ 2,1 mg/mL.

Os extratos com melhor inibição da enzima Acetilcolinesterase foram FH, TSH, CSH, FSM e FM.

O teste larvicida com caramujo da *Biomphalaria glabrata* aplicado aos extratos FH e FM, resultou índice de mortalidade 100% para FH em 24h e 60% e 80% para FM em 48h.

As informações obtidas nesse trabalho trazem contribuições relevantes para o conhecimento das várias formulações geralmente utilizadas na medicina popular e indústrias farmacêuticas, representando uma etapa importante para um estudo de um fitoterápico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ZAID, M. M.; LOMBARDO, D. A.; KITE, G. C.; GRAYER, R. J.; VEITCH, N. C. Acylated flavone C-glycosides from *Cucumis sativus*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 167-172, 2001.

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OIRUMA, H.; KASAHARA, Y.; Triterpene Alcohols from the Flowers of Compositae and their Anti-inflammatory Effects. **Phytochemistry**. v. 43 n.6, p.1255-1260, 1996.

ALBUQUERQUE, I. L.; **Contribuição ao Estudo Químico de Plantas do Nordeste: *Ocimum gratissimum* Lineu.**2002. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química Orgânica) Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – Universidade Federal do Ceará – Ce. UFC, 2002.

ALCIDES, L. S.; ILMAR, B. G.; DÉLCIO, D. M.; ANELISE, M. R.; LUIZ, C. M. **Ensaio Microbiológico dos Extratos e Frações da *Vismia Guianensis*. Clusiaceae. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- SBQ.**PN-181. 2003.

ARQUIMEDES, G. J.; Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farm. Bonaerense**. V. 24, n. 3, p. 371-6, 2005.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A. & PHILLIPSON, J. D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v. 53, p. 583-600, 2001.

BARROSO, G. M.. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. LTC/EDUSP. Editora da Universidade de São Paulo. v.1, 1978.

BLATT,C.T.; CHAVEZ,D; CHAI,H.; GRAHAM,J.G.; CABIESES,F.; FARNSWORTH,N.R.; CORDEL,G.A.; PEZZUTO,J.M.; KINGHORN,A.D. *Phyther. Res.* 16 (4), 320 (2002).

CHATURVEDI, P.; AJAY. P.; SURINDER, K. B. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. **The FASEB Journal**. v. 22, p. 966-981, 2008.

CHEN,J.J.; LEE,H.H.; DUH,C.Y.Y CHEN,I.S. **Planta Med.** 71 (10), 970 (2005).

CHOI, H. J.; EUN, J. S.; KIM. B.G.; KIM, S.Y.; JEON, H.; SOH, Y. Vitexin, na HIF-1 alpha a inhibitor, há antimetastatic potencial in PC 12 cells. **Mol Cell**. v. 22, p. 291-299, 2006.

CRUZ, F. G. & TEIXEIRA, J. S. R. Polyisoprenilated benzophenones with a tricyclo [4.3.1.1] undecane skeleton from *Clusia obdeltifolia*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 15, p. 504-508, 2004.

CUESTA-RUBIO, O.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N.; CASTRO, H.V.; RASTRELLI, L. & AQUINO, R. A polyisoprenilated benzophenone from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**. v. 62, n. 7, p.1013-1015,1999.

DE LIMA, R. A.; GOTTIEB, O.R. Xanthones from *Caraipa densiflora*. **Phytochemistry**. v.11, n. 7, p. 2307-2309, 1972.

DENISE, Z. L. B., **Biotransformação por fungos do ácido betulínico e derivados**. 2005. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Orgânica) Departamento de Química Orgânica – Universidade Federal do Paraná – Ce. UFPR, 2005.

DUMONTET,V.; VAN HUNG,N.; ADELIN,M.T.; RICHE,C. CHIARONI,A.; SEVENET,T.; GUERRITTE,F. **J. Nat. Prod.** 63, 327 (2000).

FALCÃO, D. Q.; **Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul**. 2003. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, 2003.

FOTIE, J.; BOHLE, D. S.; LEIMANIS, M. L.; GEORGES, E. RUKUNGA, G.; NKENGFAK, A. E. J. **Nat Prod.** v. 69, n. 62, 2006.

FUGLEVAND, G. JACKSON, J. A. & JENKINS, G. I. UV-B, UV-A and blue light signal transduction pathway interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**. v. 8, p. 2347-2357, 1996.

GABRIEL, S. J.; GOTTLIEB, O. R.; LIMA, R. A. DE; MESQUITA, A. A. L. The chemistry of Brazilian Guttiferae. Part 36. Constituents of Amazonian species. Itaguai, Brazil: Inst. Ciencias Exatas, Univ. Federal Rural do Rio de Janeiro. **Acta Amazonica**. v. 7, n. 2, p. 289-291, 1977.

GOTTLIEB, O. R. & KAPLAN, M. A. C. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência hoje**. v. 61, p. 17-29, 1990.

GOTTLIEB, O. R. & STEFANI, G. M. The chemistry of Brazilian Guttiferae. XIX. Xanthones from *Kielmeyera excelsa*. **Phytochemistry**. v. 9, n. 2, p. 453-454. 1970.

GUNASEKERA, S. P.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. 3 β -hydroxy-28-*p*-coumaroyloxy-lup-20(29)-en-27-oic acid from *Caraipa densifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 46, p. 118-122, 1983.

GUPTA, M. B.; BHALLA, T. N.; TANGRI, K. K.; BHARGAVA, K. P. Biochemical Study of the Anti-inflammatory Activity of α and β -Amyrin Acetate. **Biochemical Pharmacology**. v. 20, p. 401-405, 1969.

HADDAD,A.Q.; VENKATESWARAN,V.; VISWANATHAN,L.; TEAHAN,S.J.; FLESHNER,N.E.; KLOTZ,L.H. **Prostate Cancer P.D.** [Epub ahead of print] (2005).

HAHLBROCK, J. B. Flavonoids In: CONN, E. E. **The biochemistry of plants. A comprehensive treatise**. 1981. Academic Press. Nova Iorque. p. 425-591. 1981.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. Londres. Chapman and Hall. p. 288. 1984.

HUTCHINSON, J. **Evolution and phylogeny of flowering plants; Dicotyledons: facts and theory**. London and New York: Academic Press. 1969.

- ISMAIL, N.; ALAM, M. **Fitoterapia**. 72 (6), 676 (2001).
- JIANG, Q.; ELSON-SCHWAB, I.; COURTEMANCHE, C; AMES, B. N. Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 11494-11499. 2000.
- JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A. & STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A phylogenetic approach**. 1999. Sundersland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1999.
- KO,H.H.; LU,Y.H.; YANG,S.Z.; WON,S.J.; LIN,C.N. **J. Nat. Prod.** 68 (11), 1692 (2005).
- KUBITZKI, K., HOLST, B. K. **Flora of the Venezuelan Guayana**. St. Louis. Missouri Botanical Garden Press. vol. 4, p. 252-258, 1998.
- KUPCHAN, S. M., STREELMAN, D. R. & SNEDEN, A. T. Psorospermim, a new antileukemic xanthone from *Psorospermum febrifugum*. **Journal of Plant Products**. v. 43, p. 296-391, 1980.
- KWEIFIO-OKAI, G.; BIRD, D.; FIELD, B.; AMBROSE, R.; CARROL, A. R.; SMITH, P.; VALDES, R. Antiinflammatory Activity of a Ghanaian Antiarthritic Herbal Preparation III. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 46, p. 7-15, 1995.
- LIN, H. Y.; SHEN, S. C.; CHEN, Y. C. **J. Cell. Physiol.** 202, p.579(2005).
- LIU,J.J.; HUANG, T.S.; CHENG, W.F.J. **Int. J. Cancer**. 106 (4), 559 (2003).
- LOKVAN, J.; BRADDOCK, J. F.; REICHARDT, P. B. & CLAUSEN, T. P. Two polyisoprenilated benzophenone from trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry**. v. 55, p. 29-34. 2000.
- LÓPEZ-LÁZARO,M.; MARTIN-CORDERO,C.; CORTEZ,F.; PINERO,J; AYUSO,M.J. **Z. Naturforsch [C]**. 55 (1-2), 40 (2000).
- MABBERLEY, D.J. **The plant book**. 1987. Cambridge University Press, Cambridge. 1987.
- MAHATO, S. B. KUNDU, A. P.; C NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**. vol. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.
- MAHATO, S. B.; NANDY, A. K.; ROY, G. **Triterpenoids Phytochemistry**, v. 31, n.7, p. 2199-2249, 1992.
- MALINI, M. M.; BASKAR, R.; VARALAKSHMI. Effect of Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, on Urinary Enzymes in Hyperoxaluric rats. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 48, p. 211-220, 1995.

- MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N. **J. Agric. Food Chem.** 50, 5837 (2002).
- MATOS, F.J.A.; **Introdução a Fitoquímica Experimental.** 1998. Fortaleza, Edições UFC, 1998.
- McNALLY, D. J.; WURMS, K.V; LABBE, C.; QUIDEAU, S; BELANGER, R. R. Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1280-1283, 2003.
- MENDELSON, H. NELSON, R. α -Amyrin cinnamate from *Himatanthus articulata*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 7. n. 146, 1976.
- MOHAMMAD, R. M.; ADSAY, N. V.; PHILIP, P.A.; PETTIT, G. R.; VAITKEVICIUS, V. K. AND SARKAR, F. H. Bryostatin 1 induces differentiation and potentiates the antitumor effect of Auristatin PE in a human pancreatic tumor (PANC-1) xenograft model. **Anticancer Drugs**, v. 12, p. 735–740, 2001.
- MOHAMMAD, S.; SATWINDERJEET K.; MEE-HYANG, K.; VAQAR, M. A.; FARRUKH, A.; HASAN, M. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway. **Carcinogenesis**. v. 26, n.11, p.1956–1964, 2005.
- MUKHERJEE, R.; KUMAR, V.; SRIVASTAVA, S. K.; AGARWAL, S.K.; BURMAN, A. C. Anticancer Agents Med. **Chem.** v. 6, n. 271, 2006.
- NELSON, R.; FERRIGNI, V.; HASEGAWA, M. α -amyrin cinnamate from *Himatanthus articulata*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 7. n. 146, 1976.
- NEVES, R. H.; COSTA-SILVA, M.; MARTINEZ, E. M. Phenotypic plasticity in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Schistosomatidae) evidenced by brightfield and confocal laser scanning microscopies. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p.131-136, 2004.
- NOVAES, M. R. C. G.; SOUZA, J. P.; ARAÚJO, H. C. Síntese do antihelmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Quim. Nova**, v. 22, n. 1, p.5-10, 1999.
- OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. L. M.; BITTRISH, V. & MARSAIOLI, A. J. Two polyisoprenilated benzophenones from floral resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**. v. 50, p. 1073-1079. 1999.
- OLIVEIRA, C. M. A.; PORTO, A. M.; BITTRICH, I. V. & MARSAIOLI, A. J. Floral resin of *Clusia* spp.: chemical composition and biological function. **Tetrahedron Letters**, v. 37(36), p. 6427-6430, 1996.
- OWEN, R.W.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. **Reprinted from GUT**, v. 46, n. 2, 2000. p. 225-232.
- PERES, V.; NAGEM, T. J.; DE OLIVEIRA, F. F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. **Phytochemistry**. v.55, n.7, p. 683-710, 2000.
- PICCINELLI, A.L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M. B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, M. BARONE, V. & RASTRELLI, L. Structural revision of clusianone e 7-epi-

clusianone and anti- HIV activity of isoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**. v. 61, p. 8206-8211, 2005.

PIETTA, P.G. *J. Nat. Prod.* 63, 1035 (2000).

POUGET,C.; LAUTHIER,F.; SIMON,A.; FAGNERE,C.; BASLY,J.P.; DELAGE,C.; CHULIA,A.J. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 11, 3095 (2001).

REYES, M. H.; BASUALDO, M. C.; LOZADA, L.; ESTRADA, M. J.; SOLER, C. & HILPA, R. R. HIV-1 Inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, n. 6, p. 916-920, 2004.

RHEE, I. K.; VAN DER MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORT, R.; **J. Chromatogr. A**. v. 915, n. 217, 2001.

SARATH. P.; GUNASEKERA, G. A.; CORDELL, N. R.; 3 β -Hydroxy-28-*p*-Coumaroyloxy-lup-20(29)-en-27-oic Acid From *Caraipa Densifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 46, n.1, p.118-122,1983.

SARWAT, S. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin. **Pharmacological Research**. v. 43, n. 2, p.127-134, 2001.

SHEU,Y.W.; CHIANG,L.C.; CHEN,I.S., CHEN, Y.C.; TSAI,I.L. *Planta Med.* 71, 1165 (2005).

SHIY.Q.; FUKAI,T.; SAKAGAMI,H.; CHANG,W.J.,YANG.P.Q.; WANG,F.P.; NOMURA,T. *J. Nat. Prod.* 64 (2), 181 (2001).

SILVA, O. A.; **Estudo Químico e Avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* MART et ZUCC (TILIACEAE)**. 2004. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química Orgânica) Departamento de Química – Universidade Estadual de Maringá – SP, 2004.

SILVEIRA, C. V. **Avaliação dos perfis químicos das formulações obtidas a partir das folhas e casca de *Himatathus sucuba***.2003. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal do Amazonas, 2003.

SONODA, M.; NISHIYAMA,T.; MATSUKAWA,Y.;MORIYASU, M. **J. Ethnopharmacol.** 91 (1),65 (2004).

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. S.; GALOTTA, A. I. A. Q. e SANTOS, M. P. S; Constituintes químicos de *Austavia augusta* L. (Lecythidaceae). **Quim. Nova**, v. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

SUDHARSAN, P. T.; MYTHILI, Y.; SELVAKUMAR, E.; VARALAKSHMI, P.; Cardioprotective effect of pentacyclic triterpene, lupeol and its ester on cyclophosphamide-induced oxidative stress. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, p. 313-318, 2005.

SUFFRENDINI, I. B.; PACIENCIA, M. L. B.; NEPOMUCENO, D. C.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts–Clusiaceae. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 287-290, 2006.

TEIXEIRA, J.S.R. & CRUZ, F.G. Polyisoprenilated benzophenones derivatives from *Clusia obdeltifolia*. **Tetrahedron Letters**. v. 46, p. 2813-2816, 2005.

THOISON, O.; CUONG, D. D.; GRAMAIN, A.; CHIARONI, A.; van HUNG, N. & SÉVENET, T. Further rearranged prenylxanone and benzophenones from *Garcinia bracteata*. **Tetraheron Letters**. v. 61, p. 8529-8535, 2005.

TUNDIS, R.; DEGUIN, B.; LOIZZO, M. R.; BONESI, M.; STATTI, G.A.; TILLEQUIN, F.; MENICHINI, F. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 1, 15 (2005).

VAN DEN BERG, M. E. *Plantas Mediciniais na Amazônia/Contribuição ao Seu Conhecimento Sistemático*. Belém:CNPq, p. 223, 1982.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L. A. Plant-Derived Leading Compounds for Chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. **Planta Medica**. v. 64, p. 97-109, 1998.

YOGESWARI, P; SRIRAM, D. **Curriculo Medicine Chemistry**, v.12, p.6-657, 2005.