



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

LUIZA MARIA GOMES DE SENA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Cecropia*
*pachystachya***

FORTALEZA

2016

LUIZA MARIA GOMES DE SENA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Cecropia*
pachystachya

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Química.

Orientadora Didática: Profª. Drª. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.
Orientador Profissional: Dr. Kirley Marques Canuto.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S477c Sena, Luiza Maria Gomes de.

Caracterização química de extratos das folhas de *Cecropia pachystachya* / Luiza Maria Gomes de Sena. – 2016.

73 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Kirley Marques Canuto.

Coorientação: Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

1. *Cecropia pachystachya*. 2. Metabólitos secundários. 3. Flavonoides. 4. Atividade anti-inflamatória. I. Título.

CDD 540

LUIZA MARIA GOMES DE SENA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *CECROPIA*
PACHYSTACHYA

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Química.

Aprovada em: 06 / 07 / 16

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Otília Deusdênia Liola Pessoa (Orientador Didático-Pedagógico)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr. Kirley Marques Canuto (Orientador Profissional)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA

Ms. Ana Karine Oliveira da Silva
Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais – LAFIPLAM II (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Hélia e Luiz.

Às minhas irmãs, Fabiana, Juliana e Karina.

Às minhas sobrinhas, Julya, Bianca e Cecília.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Jesus, primeiramente, por toda a força que me proporcionou, uma vez que apenas Ele sabe todo o caminho que percorri até hoje. A Virgem Maria, minha mãe, por toda a proteção nesta caminhada.

Aos meus pais, Hélia e Luiz, pelo imenso apoio e dedicação a mim e minha formação acadêmica. Não existem palavras para expressar o quanto grata sou a vocês.

Às minhas irmãs, Fabiana, Karina e Juliana, pelo apoio e por todas as briguinhas também. Às minhas sobrinhas, Julya, Bianca e Cecília, que mesmo sem entender a dimensão do meu trabalho sempre ajudaram a me distrair de todas as obrigações. Incluo também minhas primas/irmãs, Naty, Bia e Bárbara.

À professora Drª Otília pelo total apoio ao projeto que desenvolvi. Por toda a paciência em me receber em seu laboratório e dedicação em me ensinar sempre algo novo.

Ao pesquisador, Dr Kirley, por ter aceitado ser meu orientador profissional e me recepcionado na EMBRAPA. Sou muito grata ao senhor.

À Ms. Karine por ter me acompanhado durante um período da iniciação científica e por ser membro da banca avaliadora deste trabalho.

À Universidade Federal do Ceará por ter proporcionado toda a minha formação. Essa instituição é minha segunda casa, onde me sinto totalmente acolhida.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) por ter me acolhido e proporcionado ambiente favorável para que meu trabalho fosse desenvolvido.

Aos meus grandes amigos Patrícia, Juliana, Katielle, Caio, Robson, Willy, Alan, Lucas, Grazy, Renato, Mateus, e todos os outros não aqui citados, mas que possuem tamanha importância, que suportaram meu estresse nesses últimos meses.

Aos meus amigos também monografistas, Amanda, Igor, Davi, Thiago e Lícia, por toda a força que fornecemos uns aos outros. Amanda fofa, jamais esquecerei nossas “bads” e momentos aleatórios também. Não sou boa com as palavras, mas você entendeu.

Aos meus colegas do PET e LAFIPLAM I/II por fazerem parte da minha história dentro da UFC.

“Nenhum vento lhe é favorável quando não se sabe a que porto se deseja chegar. “ (Anônimo)

RESUMO

O gênero *Cecropia* possui cerca de 60 espécies distribuídas em toda a América do Sul, com maiores ocorrências no Brasil, Peru e Argentina. A espécie *Cecropia pachystachya* (torém) é bastante difundida no Sul e Sudeste do Brasil sendo amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas respiratórios tais como asma, bronquite, tosse, além de ser utilizada no controle da hipertensão arterial e como anti-inflamatória. As principais classes de compostos identificados nesta espécie são compostos fenólicos (flavonoides e taninos) e terpenos. No presente trabalho foram investigados quimicamente dois tipos de extratos das folhas do torém. Partindo do extrato aquoso, foram obtidas duas frações após sucessivos fracionamentos cromatográficos em gel de dextrana (Sephadex LH-20). Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , e Espectrometria de Massas (EM) permitiram identificá-las como sendo os flavonoides glicosilados 6-C-galactosil-6”- O - β -galactopiranosilapigenina e o 6-C-galactosil-6”- O - β -galactopiranosil-3’-metoxiapigenina, ambos descritos pela primeira vez para esta espécie. O extrato etanólico apresentou maior atividade anti-inflamatória *in vivo* quando comparado com o extrato aquoso, com base nisso foi feita a caracterização do mesmo por Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-QTOF-MS), conduzindo à identificação de 8 compostos: rutina, orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina, 6-C-galactosil-6”- O - β -galactopiranosilapigenina, ácido gálico e ácido arjunólico. Embora sejam compostos conhecidos, rutina, ácido gálico e ácido arjunólico estão sendo descritos pela primeira vez para a espécie. A atividade anti-inflamatória foi atribuída a presença dos flavonoides orientina e isoorientina.

Palavras-chave: *Cecropia pachystachya*. Metabólitos secundários. Flavonoides. RMN. UPLC-QTOF-MS. Atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

The *Cecropia* genus consists of about 60 species distributed for all South America, most of them with occurrence in Brazil, Peru and Argentina. The *Cecropia pachystachya* (ambay) specie is usually found in southern and southeastern Brazil. The ambay is broadly used in folk medicine for treatment of asthma, bronquites, cough, high blood pressure, and as an anti-inflammatory. The principal compounds identified in this specie are phenolic compounds (as flavonoids and tannins) and terpenes. In this work were chemically investigated two different types of leaves extract (of ambay). In the aqueous extract were obtained two fractions after successive chromatographic fractionation with gel of dextran (Sephadex LH-20). Analysis by Nuclear Magnetic Resonance (NMR ^1H and ^{13}C) and Mass Spectrometry (MS) allow to identify them as glycosylated flavonoids namely the apigenin 6-C-galactosyl-6''- O - β -galactopyranoside and 3'-Methoxyapigenin 6-C-galactosyl-6''- O - β -galactopyranoside, both described for the first time in this specie. The ethanolic extract showed greater *in vivo* anti-inflammatory activity than the aqueous extract, because of this the characterization of the ethanolic extract was done by Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS) lead to identification of 8 compounds: rutin, orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin, apigenin 6-C-galactosyl-6''- O - β -galactopyranoside, gallic acid, arjunolic acid. Despite of them are depicted in literature, rutin, gallic acid and arjunolic acid are described for the first time in ambay. The anti-inflammatory activity was attributed to the presence of flavonoids orientin and isoorientin.

Keywords: *Cecropia pachystachya*. Secondary metabolites. Flavonoids. NMR. UPLC-QTOF-MS. Anti-inflammatory activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore do torém localizada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará.....	16
Figura 2 - Folha do torém.....	17
Figura 3 - Estrutura do 2-metil-1,3-butadieno (isopreno).....	18
Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonoides.....	19
Figura 5 - Estrutura dos triterpenos isolados e identificados no gênero <i>Cecropia</i>	22
Figura 6 - Estrutura das substâncias fenólicas isoladas do gênero <i>Cecropia</i>	23
Figura 7 - Estrutura dos flavonoides de esqueleto flavona e flavonol isolados de <i>Cecropia</i>	23
Figura 8 - Estrutura dos flavonoides de esqueleto de flavan-3-ol isolados de <i>Cecropia</i>	24
Figura 9 - Estrutura das flavolignanas isoladas do gênero <i>Cecropia</i>	24
Figura 10 - Estruturas das proantocianidinas identificadas no gênero <i>Cecropia</i>	25
Figura 11 - Estrutura do ácido clorogênico e escopoletina.....	25
Figura 12 - Modelo esquemático de um cartucho utilizado na extração em fase sólida.....	30
Figura 13 - Estrutura simplificada dos cinco componentes básicos de um espectrômetro de massa.....	33
Figura 14 - Mecanismo de Ionização por Electrospray.....	34
Figura 15 - Esquema de um analisador quadrupolo.....	35
Figura 16 - Fluxoframa descrevendo o procedimento de extração e de isolamento de substâncias das folhas de <i>C. pachystachya</i>	40
Figura 17 - Deslocamento químico de ^1H para a substância I obtida da fração F ₂₇₋₂₉	42
Figura 18 - Deslocamento químico de ^{13}C para a substância I obtida da fração F ₂₇₋₂₉	43
Figura 19 - Correlações obtidas por HMBC e HSQC para a substância I	43
Figura 20 - Valores de deslocamento químico de ^1H para a substância II obtida da fração F ₂₄₋₂₉	47
Figura 21 - Valores de deslocamento de ^{13}C para a substância II	47
Figura 22 - Algumas correlações de carbono e hidrogênio obtidas pelo HMBC e HSQC para a substância II obtida da fração F ₂₄₋₂₆	48
Figura 23 - Estrutura da aglicona Crisoeriol.....	50
Figura 24 - Cromatograma obtido em UPLC para o EECP-FMA.....	52
Figura 25 - Fragmentação da unidade de glicose presente nos compostos 18, 19, 20 e 21, onde R é a aglicona.....	55

Figura 26 - Modelo geral de fragmentação de 6''- <i>O</i> -glicosil- <i>C</i> -glicosil flavonas, onde R é a aglicona.....	55
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies do gênero <i>Cecropia</i> e seus principais usos na medicina popular.....	27
Tabela 2 - Dados RMN ^1H e ^{13}C para a fração F ₂₇₋₂₉ segundo as correlações obtidas através de espectros COSY, HSQC e HMBC.....	44
Tabela 3 - Comparativo entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância I e a 6-C-galactosil-6''- <i>O</i> - β -galactopiranosilapigenina.....	45
Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para as substâncias majoritárias contidas na fração F ₂₄₋₂₆ segundo as correlações obtidas através de espectros COSY, HSQC e HMBC.....	49
Tabela 5 - Comparativo entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C do anel B para a substância II e Crisoeriol.....	50
Tabela 6 - Dados dos espectros de massas obtidos a partir do EECP-FMA.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SPE	Solid Phase Extraction
EA	Extrato Aquoso
EAM	Extrato Aquoso após extração com Metanol
EECP	Extrato Etanólico <i>Cecropia pachystachya</i>
EECP-FMA	Extrato Etanólico <i>Cecropia pachystachya</i> – Fase Metanol-Água
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1.Considerações botânicas sobre o gênero <i>Cecropia</i> e espécie <i>Cecropia pachystachya</i>	15
2.2Perfil químico do gênero <i>Cecropia</i>	17
2.2.1Metabólitos secundários	17
2.2.2.Substâncias identificadas no gênero <i>Cecropia</i>	20
2.3.Perfil químico da espécie <i>Cecropia pachystachya</i>	26
2.4.Uso na medicina popular e propriedades farmacológicas da espécie.....	26
2.5. Extração em Fase Sólida (SPE) - Tratamento da amostra	29
2.6.Técnicas cromatográficas.....	30
2.6.1.Cromatografia Líquida por Exclusão Molecular.....	31
2.6.2.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> , HPLC).....	31
2.6.3.Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i> , UPLC).....	32
2.7.Espectrometria de massas	32
2.8.Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
3.OBJETIVOS	37
3.1.Objetivo Geral.....	37
3.2.Objetivos Específicos	37
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1.Preparo dos extratos aquoso e etanólico	38
4.2.Fracionamentos Cromatográficos	38
4.3.Análises por RMN de ^1H e ^{13}C	39
4.4.Extração em Fase Sólida.....	39
4.5.Espectrometria de massas	40
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1.Extrato aquoso (EA)	41
5.1.1.Determinação estrutural da fração F ₂₇₋₂₉	41
5.1.2.Determinação estrutural da Fração F ₂₄₋₂₆	46
5.2.Extrato etanólico	51
5.2.1.Caracterização do EEFMA por UPLC-QTOF-MS	51
6.CONCLUSÃO	57

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	64
ANEXO A – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD ₃ OD) PARA A FRAÇÃO F ₂₇₋₂₉	64
ANEXO B – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (150 MHz, CD ₃ OD) PARA A FRAÇÃO F ₂₇₋₂₉	64
ANEXO C – ESPECTRO DE RMN ^1H x ^1H - COSY (600 x 600 MHz, CD ₃ OD) DA FRAÇÃO F ₂₇₋₂₉	65
ANEXO D –ESPECTRO DE RMN HSQC ^1H x ^{13}C (600 x 150 MHz, CD ₃ OD) DA FRAÇÃO F ₂₇₋₂₉	65
ANEXO E–ESPECTRO DE RMN HMBC ^1H x ^{13}C (600 x 150 MHz, CD ₃ OD) DA FRAÇÃO F ₂₇₋₂₉	66
ANEXO F–ESPECTRO DE MASSAS DE F ₂₇₋₂₉ (ESI $^-$)	66
ANEXO G – ESPECTRO RMN ^1H (600 MHz, CD ₃ OD) DE F ₂₄₋₂₆	67
ANEXO H – ESPECTRO DE MASSAS DE F ₂₄₋₂₆ (ESI $^-$)	67
ANEXO I – ESPECTRO DE RMN ^1H x ^1H – COSY (600MHz x 600MHz, CD ₃ OD) DE F ₂₄₋₂₆	68
ANEXO J: ESPECTRO DE RMN HSQC ^1H x ^{13}C (600MHz x 150MHz, CD ₃ OD) DE F ₂₄₋₂₆	68
ANEXO K: ESPECTRO DE RMN HMBC ^1H x ^{13}C (600MHz x 150MHz, CD ₃ OD) DE F ₂₄₋₂₆	68
ANEXO L – ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 1 CARACTERÍSTICO PARA RUTINA NO EECP-FMA.....	69
ANEXO M – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 2 CARACTERÍSTICO PARA ORIENTINA/ISOORIENTINA NO EECP-FMA	69
ANEXO N – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 3 CARACTERÍSTICO PARA VITEXINA/ISOVITEXINA NO EECP-FMA	70
ANEXO O – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 4 CARACTERÍSTICO PARA 6-C-GALACTOSIL-6”-O- β -GALACTOPIRANOSILAPIGENINA NO EECP-FMA	70
ANEXO P – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 5 CARACTERÍSTICO PARA ÁCIDO GÁLICO NO EECP-FMA	71
ANEXO Q – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 6 CARACTERÍSTICO PARA ÁCIDO ARJUNÓLICO NO EECP-FMA	71
ANEXO R – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD ₃ OD) PARA O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO.....	72
ANEXO S – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD ₃ OD) PARA A FASE AQUOSA DO SPE	72
ANEXO T – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD ₃ OD) PARA A FASE ORGÂNICA DO SPE (EECP-FMA)	73

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios sob diferentes aspectos e importâncias, fornecendo não somente alimentos e abrigo, como também servindo para o tratamento e cura de diversos males. Cerca de 75% da população mundial utiliza a medicina tradicional, especialmente quanto ao uso de plantas, nos cuidados com a saúde (COSTA, 2009).

Mesmo a revolução na indústria farmacêutica tendo sido impulsionada pela produção de fármacos sintéticos, os medicamentos que empregam substâncias de origem natural produzidas a partir do metabolismo secundário das plantas nunca deixaram de possuir importância clínica e econômica (COSTA, 2009).

No Brasil, embora o mercado farmacêutico esteja entre os maiores do mundo, o consumo dos medicamentos é desigual. Segundo o Ministério da Saúde, 15% da população (classes A e B) consomem 48% da produção de fármacos, enquanto que apenas 40% da população possui condições financeiras para adquirir medicamentos (CALIXTO, 2003). Diante de tal conjuntura, o uso de plantas medicinais adquire importância ímpar na saúde brasileira, uma vez que permite o tratamento de várias doenças.

O gênero *Cecropia* – conhecido popularmente como embaúba – é composto por cerca de 60 espécies distribuídas entre o sul do México e o norte da Argentina. No Brasil são encontradas 26 espécies (BERG, 2005), dentre elas a espécie em estudo, *C. pachystachya* Trécul (torém), que é uma planta nativa brasileira, não endêmica, distribuída em quase todo o território brasileiro, sendo seus domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (COPPETEC – UFRJ).

Diversos são os usos populares do torém, que vão desde a utilização industrial até o uso como fitoterápico, tanto na medicina tradicional quanto na medicina popular. O material vegetal utilizado da planta é principalmente as folhas, além das cascas e brotos (BERG, 2005). As folhas são bastante utilizadas na medicina popular no tratamento da hipertensão arterial, hepatite, enxaquecas, coqueluche, afecções respiratórias (tosse e asma), e como diurético (UCHÔA, 2010).

Estudos farmacológicos específicos demonstraram várias atividades encontradas nos mais diversos extratos dessa planta, tais como efeitos hipoglicêmico, anti-inflamatório (SCHINELLA, 2008), cicatrizante (DUQUE *et al.*, 2015), antiedema (PACHECO, 2014),

ansiolítico e antidepressivo (ORTMANN *et al.*, 2016), antioxidante (MORAIS *et al.*, 2013), atividade leishmanicida (CRUZ, 2013) e antimalária (UCHÔA, 2010).

Tendo como base todo escopo científico citado anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo o estudo e a caracterização química de dois tipos de extratos de *C. pachystachya* (torém), extrato aquoso e etanólico, de forma que fosse possível traçar o perfil de metabólitos secundários e tentar relacionar a atividade anti-inflamatória *in vivo* apresentada pelo extrato etanólico com substâncias presentes no mesmo. A caracterização foi realizada através de tais como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e cromatografia a líquido, tanto em coluna aberta quanto com o uso de sistemas como Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência (UPLC) acoplada a Espectrometria de Massa (HPLC-QTOF-MS). Os experimentos relacionados a atividade anti-inflamatória foram realizados em parceria com o Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Considerações botânicas sobre o gênero *Cecropia* e espécie *Cecropia pachystachya*

Primeiramente descrito na família Moraceae, o gênero *Cecropia* foi reclassificado no final da década de 1970, passando a integrar uma nova família, Cecropiaceae (BERG, 1978). Embora essa proposição tenha sido adotada por muitos investigadores e seja empregada ainda nos dias atuais, estudos taxonômicos recentes, com abordagens morfológicas e filogenéticas, sugerem outra classificação para o gênero *Cecropia*, incluindo-o na família Urticaceae (SYSTIMA, 2002).

O gênero *Cecropia* é composto por cerca de 60 espécies distribuídas entre o sul do México e o norte da Argentina. No Brasil, encontramos 26 espécies, as quais *Cecropia glaziovii* Sneth. e *Cecropia pachystachya* Trécul são as duas espécies mais comuns, especialmente no sul e sudeste (BERG, 2005). A espécie *C. pachystachya* é uma planta nativa brasileira, não endêmica, distribuída também entre o Norte, Nordeste e Centro-Oeste, onde seus domínios fitogeográficos são Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (COPPETEC – UFRJ).

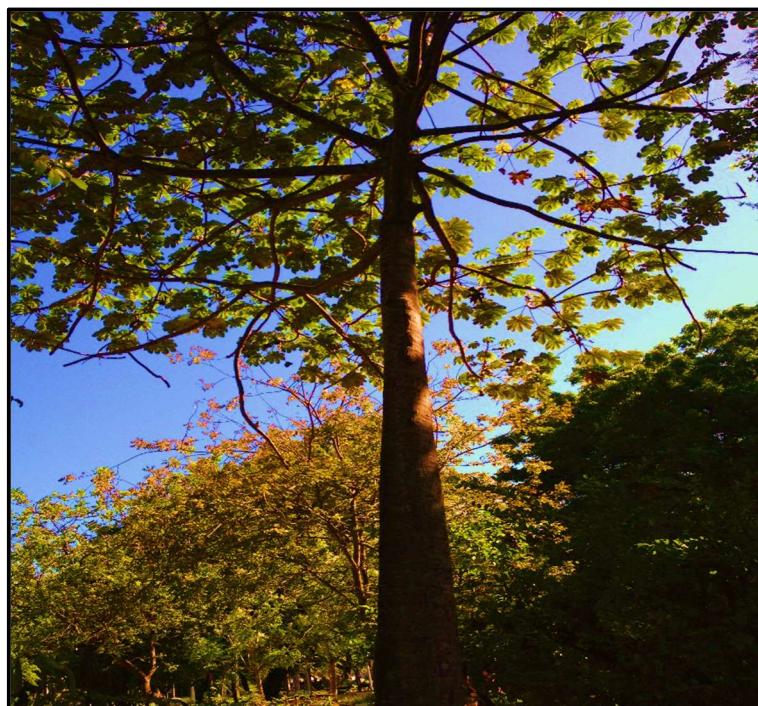
No território brasileiro as árvores pertencentes ao gênero neotropical *Cecropia* são conhecidas popularmente como embaúbas. Outros nomes populares são: imbaúba, umbaúba e embaúva, todas derivadas da palavra tupi “ambaíba”, que significa “tronco oco”, uma referência aos caules ocos destas espécies onde formigas costumam se abrigar e proteger a planta contra predadores (POTT, 1994; BERG 2005). O nome também significa “árvore que não serve para construir” (UCHÔA, 2010). Nos demais países da América Latina, as espécies são denominadas popularmente como guarumbo, yarumo, torém, ambaí, entre outros. Na língua inglesa, são descritas principalmente como ambay e trump-tree. Essas denominações populares apresentam ainda variações conforme a coloração das inflorescências, como por exemplo, embaúba-vermelha (*C. glaziovii*), embaúba-branca (*C. palmata*) e embaúba-prateada (*C. pachystachya*) (BERG, 2005; PIO-CORRÊA, 1978).

O gênero *Cecropia* apresenta características de plantas pioneiras, como a abundante produção, larga dispersão e dormência de sementes; dependência da luz solar direta para a germinação; intolerância à sombra. As plantas são altas por se desenvolverem rapidamente, apresentam ciclo de vida curto (25 a 50 anos) e maturidade precoce (FALCÃO, 2002; BROKAW, 1998).

As embaúbas geralmente alcançam de 5 a 15 metros de altura, têm as folhas dispostas em espiral e os galhos arranjados em forma de candelabro. A atuação destas espécies é muito importante no processo de regeneração natural da vegetação em áreas que foram totalmente desmatadas e usadas para agricultura ou pastagem. Os morcegos e pequenas aves frugívoras, ainda comuns das florestas, sendo os animais os principais responsáveis por espalhar as sementes de embaúba pelas florestas (BERG, 2005; CARAUTA *et al.*, 1996; CARAUTA, 1996).

As embaúbas são classificadas como dióicas, ou seja, as flores femininas e masculinas encontram-se separadas em indivíduos distintos. Em espécies dióicas, os espécimes masculinos tendem a investir os recursos no crescimento vegetativo, enquanto que os espécimes femininos o fazem na reprodução e na defesa química, o que pode provocar diferenças no perfil e na concentração de metabólitos secundários entre os indivíduos de sexos diferentes. A espécie em estudo, *C. pachystachya*, é do sexo feminino (BERG, 2005; CARAUTA, 1996). Nas Figuras 1 e 2, são apresentadas as fotos da árvore torém e suas folhas (parte medicinal da planta).

Figura 1 - Árvore do torém localizada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará.



Fonte: Sena, L. M. G.

Figura 2 - Folha do torém.



Fonte: Sena, L. M. G.

Diversos são os usos populares das espécies de *Cecropia*. As cascas são utilizadas na indústria do curtume do couro, devido ao seu elevado teor de taninos. O caule é usado como instrumento de sopro, sendo a madeira dos troncos utilizada para a confecção de caixas, pequenas jangadas, além de servir como matéria-prima para obtenção da celulose. As folhas têm uso medicinal e são empregadas também como lixas, para o acabamento de objetos de madeira (BERG, 2005).

2.2. Perfil químico do gênero *Cecropia*

2.2.1. Metabólitos secundários

O metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal e, por isso, esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos. Apesar de nem sempre ser necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, o metabolismo secundário desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Uma das principais funções dos compostos gerados são os mecanismos de defesa das plantas. Assim, os metabólitos secundários agem como defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiontes. Possuem também ação protetora em relação a

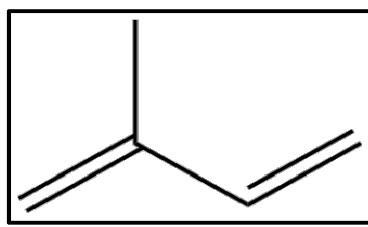
mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição aos raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (PERES, 2004).

Terpenos e compostos fenólicos (principalmente flavonoides) são as principais classes de metabólitos secundários encontrados em plantas do gênero *Cecropia*.

- **Terpenos**

Até o ano de 2008 aproximadamente 25 mil tipos diferentes de compostos terpênicos foram catalogados. Os terpenos ou terpenóides são compostos que ocorrem em todas as plantas, sendo formados a partir do ácido mevalônico, no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto. Estes compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural (JAKIEMIU, 2008) derivados da fusão de unidades isoprênicas (Figura 3) de cinco carbonos.

Figura 3 - Estrutura do 2-metil-1,3-butadieno (isopreno).



Fonte: TAIZ E ZEIGER, 2004.

Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos que os constituem: hemiterpenóides (C_5), monoterpenóides (C_{10}), sesquiterpenóides (C_{15}), diterpenóides (C_{20}), triterpenóides (C_{30}), tetraterpenóides (C_{40}) e politerpenóides ($C_{>40}$) (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

- **Compostos fenólicos: ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico e cinâmico**

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, sendo elas simples ou complexas. Possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Tais substâncias estão amplamente distribuídas no reino vegetal e nos micro-organismos, fazendo também parte do metabolismo animal (CARVALHO *et al.*, 2000).

Podem ser formados através de duas rotas biogenéticas: pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos ou pela via do acetato-polimalato que inicia com acetil-

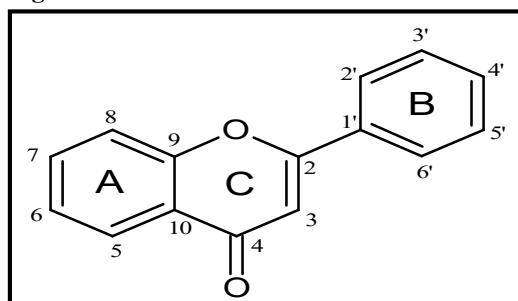
coenzima A e malonil-coenzima A, onde a origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa forma, pela via do ácido chiquímico obtém-se compostos com grupos hidroxilas em posição *ortho*, as quais se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em posição *meta* (CARVALHO *et al.*, 2000).

• Flavonoides

Os flavonoides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, principalmente em angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural. O termo “fenólico” ou “polifenol” se dá devido ao fato de possuírem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, metoxilas, glicosídeos e outros) (ZUANAZZI, 2000).

Podem-se encontrar flavonoides em diversas formas estruturais, entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguido de uma linha (‘) para o núcleo B (ZUANAZZI, 2000), como mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonoides.



Fonte: Adaptada de ZUANAZZI, 2000.

Os flavonoides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Tal forma conjugada também é conhecida como heterosídeo. Quando o metabólito (flavonoide, antraquinonas, terpenos, etc.) encontra-se

sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo frequentemente denominada de forma livre (ZUANAZZI, 2000).

Devido ao grande número de flavonoides existentes e suas diversas classes, serão destacadas apenas a subclasse de flavonoides identificados na espécie em estudo (ZUANAZZI, 2000).

- **Flavonas e flavonóis**

Como os flavonóis são flavonas substituídas na posição C-3 (núcleo fundamental, Figura 4) por uma hidroxila, essas duas classes são em geral classificadas juntas. As flavonas e flavonóis naturais são frequentemente oxigenados, substituídos com hidroxilas e/ou metoxilas. A maioria das substâncias identificadas destas classes apresentam-se nas plantas sob forma conjugada, com um ou mais açúcares ligados aos grupos hidroxilas por uma ligação hemiacetal facilmente destruída por hidrólise ácida. (ZUANAZZI, 2000)

Essa ligação denominada glicosídica pode ocorrer através de uma hidroxila, normalmente nas posições C3 ou C7, originando os chamados *O*-heteroglicosídeos ou através de um átomo de carbono, em especial nas posições C6 ou C8, originando os *C*-heteroglicosídeos (HARBORNE, 2000).

2.2.2. Substâncias identificadas no gênero *Cecropia*

Entre as 60 espécies descritas no gênero *Cecropia*, apenas 11 apresentam relatos sobre a composição química, sendo elas *C. adenopus*, *C. catharinensis*, *C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. obtusa*, *C. obtusifolia*, *C. pachystachya*, *C. palmata*, *C. peltata*, *C. lyratiloba* e *C. purpurascens* (COSTA, 2009).

As substâncias descritas com maior frequência são substâncias fenólicas derivadas do ácido benzóico e do ácido cinâmico, flavonoides, flavolignanas, taninos condensados (procianidinas) e terpenóides (triterpenos) (COSTA, 2009; JOSÉ-CHAGAS, 2013).

Dentre os terpenóides são relatados os ácidos ursólico (1) (SCHINELLA, 2008), oleanólico (2), maslínico (3), pomólico (4), tormêntico (5) (UCHÔA, 2010) e derivados [2-acetil-tormêntico (6) e 3-acetil-tormêntico (7)], arjunólico (8) e isoarjunólico (9), além das substâncias α -amirina (10), 19- α -hidroxi- α -amirina (11), *trans-phytol* (12) e β -sitosterol (13).

(JOSÉ-CHAGAS, 2013). As estruturas de todas as substâncias descritas acima encontram-se na Figura 5 (p. 22).

Com relação às substâncias fenólicas foram isolados os ácidos protocatecuico (**14**), cafeico (**15**), 5-*O*-cafeoilquínico (**16**) e gálico (**17**) (JOSÉ-CHAGAS, 2013), conforme mostrado na Figura 6 (p. 23).

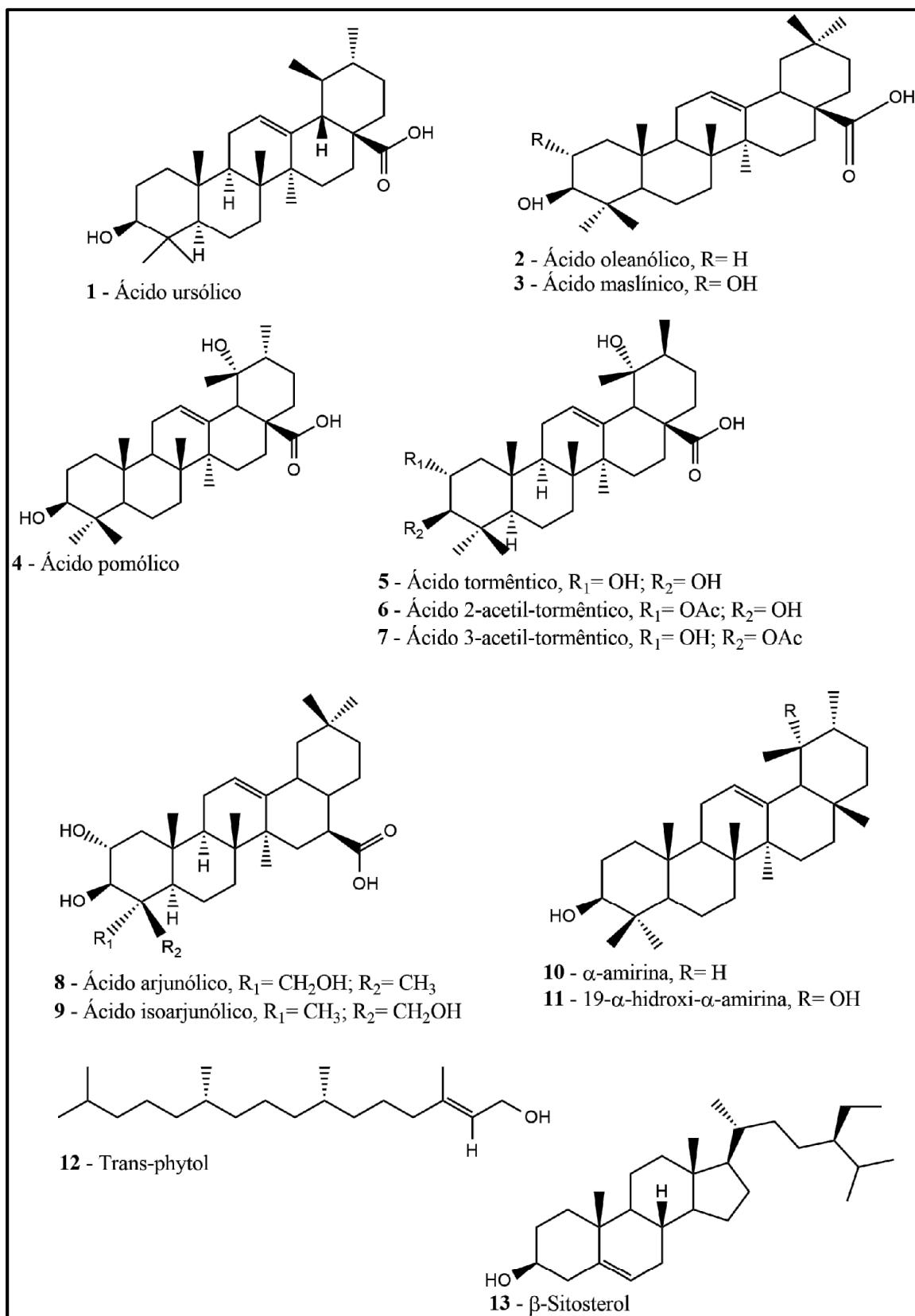
Entre os flavonoides, são relatados orientina (**18**), isoorientina (**19**) e isovitexina (**20**) para a espécie *C. glaziovii* e *C. lyratiloba*, orientina e isoorientina para *C. hololeuca* e *C. adenopus*, isoorientina e isovitexina para *C. pachystachya* e isoorientina para *C. obtusifolia*. É relatada ainda a presença de vitexina (**21**) e rutina (**22**) para *C. adenopus*. Especificamente para *C. lyratiloba* foram identificadas também a C-glicosilflavona, 6-C-galactosil-6”-*O*- β -galactopiranosilapigenina (**23**), enquanto *C. glaziovii* e *C. pachystachya* apresentam o flavonoide *O*-heterosídeo, isoquericitrina (**24**) (COSTA, 2009; BRANGO-VANEGAS, 2014). As estruturas das substâncias citadas anteriormente encontram-se na Figura 7 (p. 23).

Com relação aos flavonoides com esqueleto de flavan-3-ol ou catequinas, foram relatadas a presença de catequina (**25**) e epicatequina (**26**), além da presença das flavolignanas cinchonaína la α -catecol (**27**) e cinchonaína lb β -catecol (**28**) (COSTA, 2009). As estruturas das catequinas e das flavolignanas encontram-se nas Figuras 8 e 9 (p. 24), respectivamente.

Também é relatada a presença de taninos condensados, os quais são oligômeros ou polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe de taninos também é denominada como proantocianidina (SANTOS, 2000). As principais proantocianidinas identificadas no gênero *Cecropia* são procianidina B2 (**29**) e C1 (**32**) em *C. glaziovii*, *C. hololeuca* e *C. pachystachya*, além do ácido protocatecuico (**14**) nas duas últimas espécies. Recentemente foram identificadas também as procianidinas B3 (**30**) e B5 (**31**) em *C. glaziovii* (COSTA, 2009). As estruturas das proantocianidinas encontram-se na Figura 10 (p. 25).

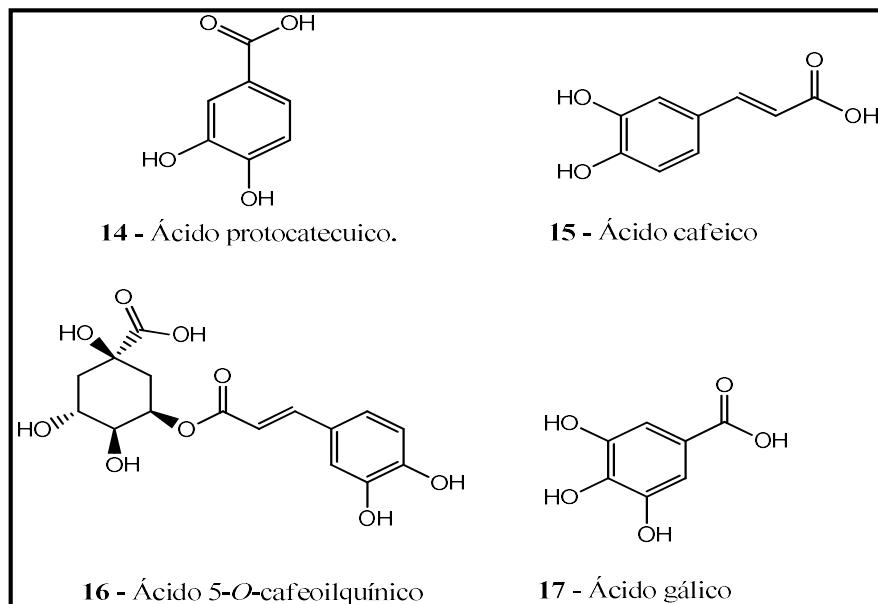
Outros compostos descritos em espécies de *Cecropia* são o ácido clorogênico (**33**) (PACHECO, 2014) em *C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. obtusifolia*, *C. pachystachya* e *C. peltata* e escopoletina (**34**) em *C. palmata* (COSTA, 2009) (Figura 11, p. 25).

Figura 5 - Estruturas dos triterpenos isolados e identificados no gênero *Cecropia*.



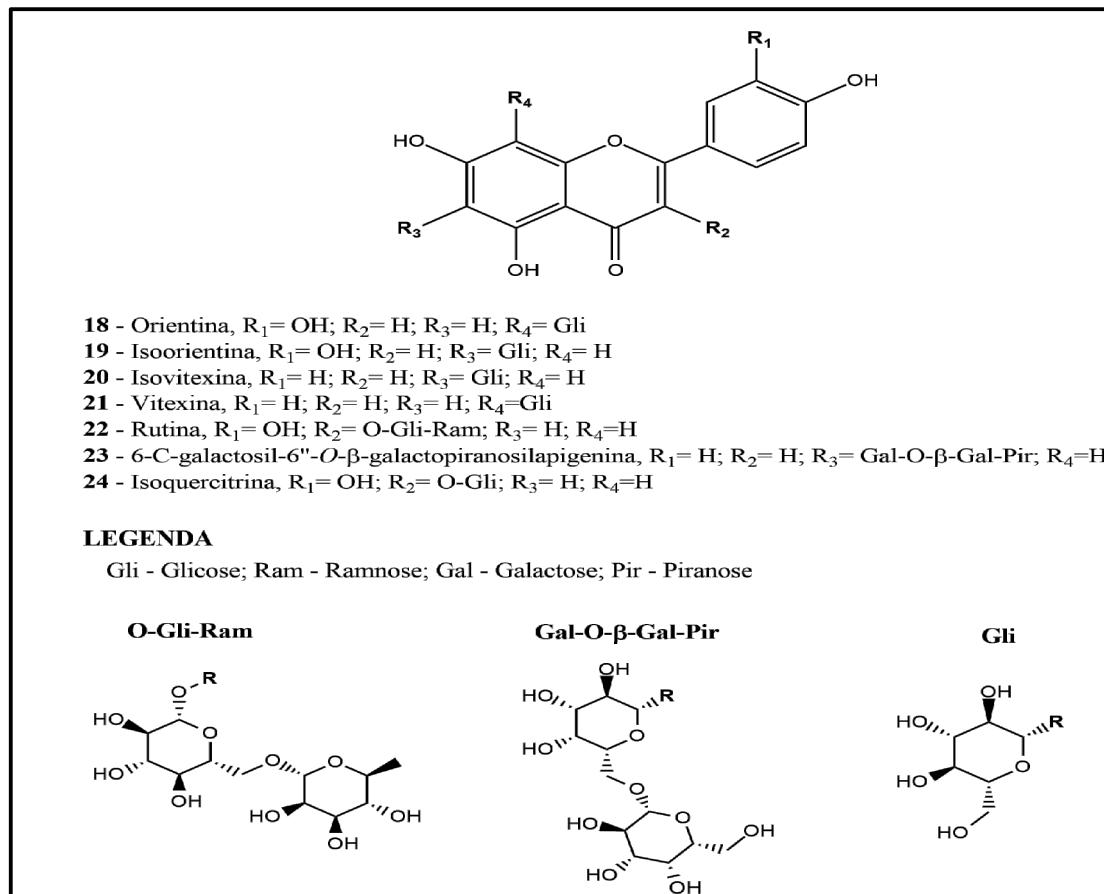
Fonte: Adaptado de SCHINELLA, 2008; JOSÉ-CHAGAS, 2013; UCHÔA, 2010.

Figura 6 - Estruturas das substâncias fenólicas isoladas do gênero *Cecropia*.



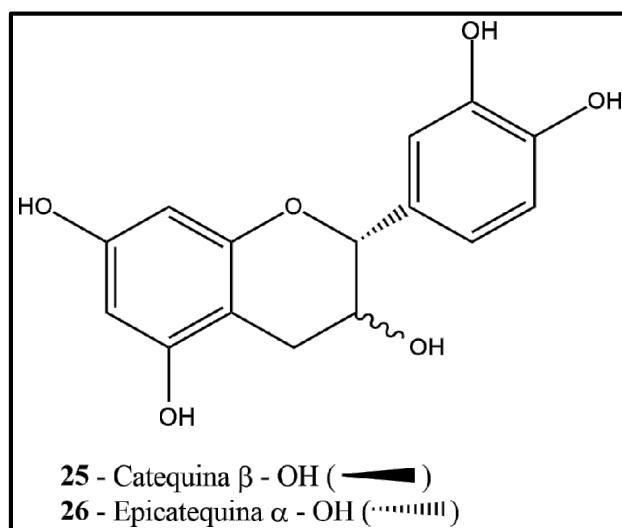
Fonte: Adaptado de JOSÉ-CHAGAS, 2013.

Figura 7 - Estrutura dos flavonoides de esqueleto flavona e flavonol isolados de *Cecropia*.



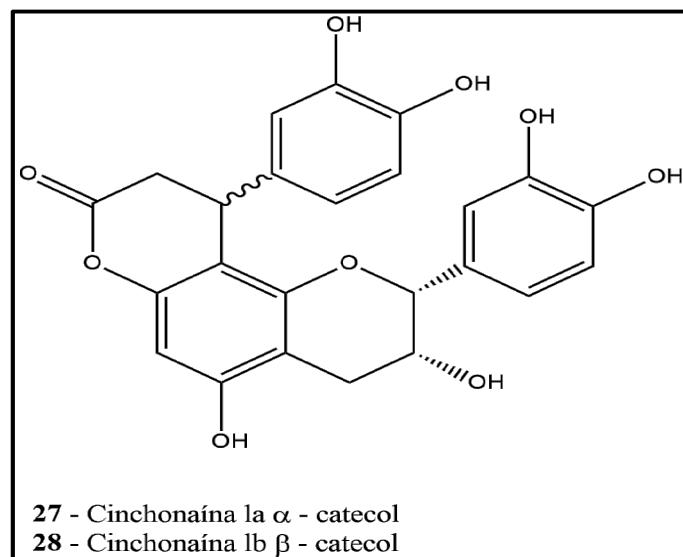
Fonte: Adaptado de COSTA, 2009; BRANGO-VANEGAS, 2014.

Figura 8 - Estrutura dos flavonoides de esqueleto de flavan-3-ol isolados de *Cecropia*.



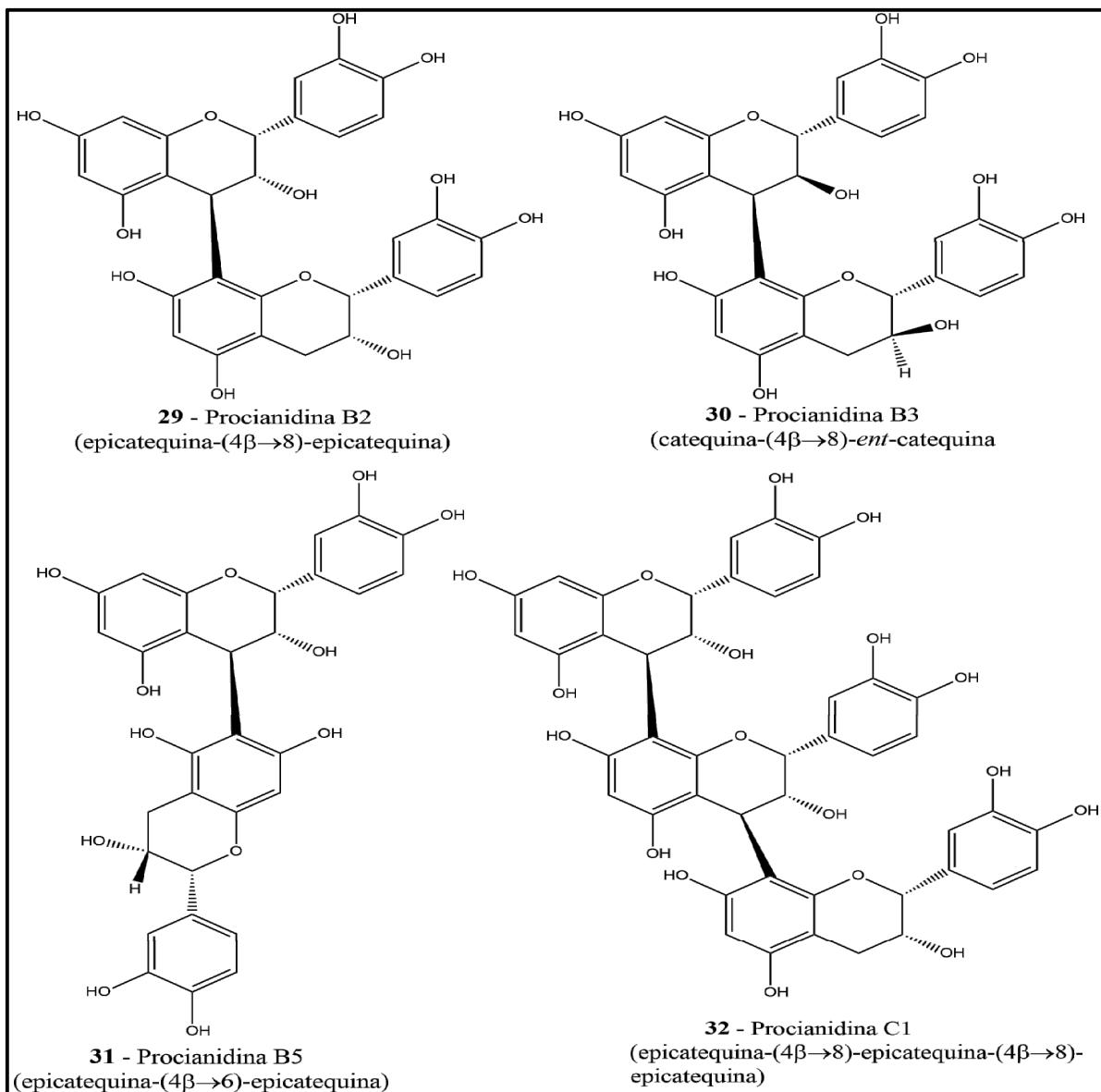
Fonte: Adaptado de COSTA, 2009.

Figura 9 - Estruturas das flavolignanas isoladas do gênero *Cecropia*.



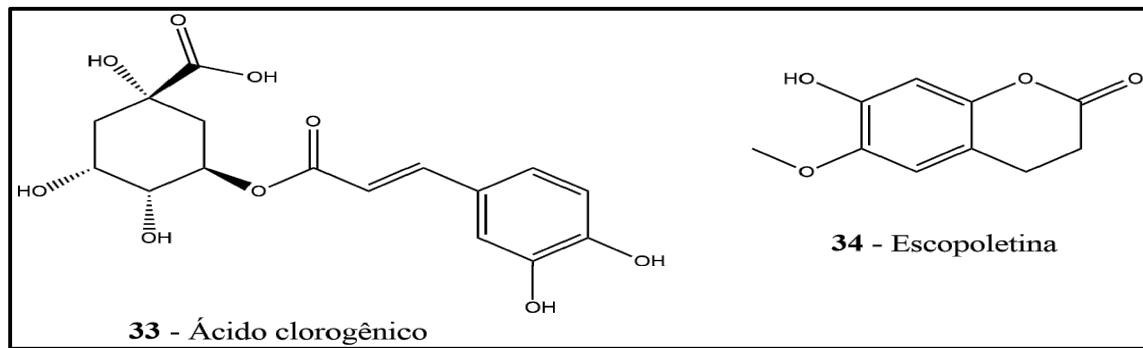
Fonte: Adaptado de COSTA, 2009.

Figura 10 - Estruturas das proantocianidinas identificadas no gênero *Cecropia*.



Fonte: Adaptado de COSTA, 2009.

Figura 11 - Estrutura do ácido clorogênico e escopoletina.



Fonte: Adaptado de PACHECO, 2014; COSTA, 2009.

2.3. Perfil químico da espécie *Cecropia pachystachya*

Devido ao seu grande uso na medicina popular, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos para determinar o perfil de metabólitos secundários da espécie *C. pachystachya*, entretanto tais estudos fitoquímicos ainda são escassos (SCHINELLA, 2008). Algumas classes de compostos foram relatados para a espécie, sendo isolados e identificados compostos fenólicos, terpenos, taninos e flavonoides em sua maioria.

Até o presente momento poucos trabalhos relataram a presença de terpenos na espécie. Nesta classe de metabólitos secundários as principais substâncias isoladas são terpenos da classe dos triterpenos. Os triterpenos β -sitosterol (13), α -amirina (10), ácidos ursólico (1), ácido tormêntico (5) e pomólico (4) foram isolados do extrato das folhas da espécie (SCHINELLA, 2008), assim como o álcool diterpênico *trans-phytol* (12) (UCHÔA, 2010).

Os ácidos protocatecuico (14) e 5-*O*-cafeoilquínico (16), derivados do ácido benzoíco, bem como o ácido clorogênico (33), que é um heterosídeo do ácido cinâmico, também foram identificados na espécie (JOSÉ-CHAGAS, 2013).

Existem muitos estudos do perfil de compostos fenólicos da espécie, sendo os flavonoides as principais substâncias presentes. Dentre essas substâncias podemos citar os flavonoides *C*-heterosídeos orientina (18), isoorientina (19), vitexina (21), isovitexina (20) e os flavonoides *O*-heterosídeos isoqueritrina (24) e rutina (22) (BRANGO-VANEGAS, 2014; COSTA, 2011; GAZAL *et al.*, 2014).

Taninos condensados foram isolados e identificados na espécie, sendo eles as proantocianidinas B2 (29) e C1 (32). Além destes, os flavonoides com esqueleto de flavan-3-ol catequina (25) e epicatequina (26), que são as unidades monoméricas dos taninos condensados, também foram reportadas na espécie. (COSTA, 2009)

2.4. Uso na medicina popular e propriedades farmacológicas da espécie

É importante ressaltar que o gênero *Cecropia* possui diversos usos na medicina popular, na qual basicamente o “chá” (extrato aquoso a quente) das folhas é empregado para tratar diversas enfermidades. (COSTA, 2009). Apenas 10 espécies do gênero *Cecropia* apresentam estudos etnofarmacológicos (COSTA, 2009). A Tabela 1 mostra as espécies e o uso na medicina popular de cada uma.

Tabela 1 - Espécies do gênero *Cecropia* e seus principais usos na medicina popular.

Espécie	Uso
<i>C. adenopus</i>	Folhas: Diurético, controle da hipertensão arterial, tosse, asma, bronquite, tratamento de resfriados crônicos e diabetes <i>mellitus</i> . Raiz: Diurético (HIKAWCZUK, 1998).
<i>C. catharinensis</i>	Folhas: Tratamento de corrimento, asma, bronquite, pressão alta, inflamações, diurético, cardiotônico e anti-espasmódico (SIMÕES, 1998).
<i>C. glaziovii</i>	Planta: Diurético, fortificante do coração, anti-inflamatório, antidiabético, combate a afecções respiratórias (asma e tosse) e tratamento da hipertensão arterial (ROCHA, 2007).
<i>C. hololeuca</i>	Folhas: diurético, energético, tônico, emenagogo, no tratamento de pressão alta, de amenorreia, de leucorréia e de afecções respiratórias (PIO-CORRÊA, 1978).
<i>C. obtusa</i>	Folhas, caule e casca do caule: Tratamento de doenças coronarianas, reumatismo e como tranquilizante (COSTA, 2009).
<i>C. obtusifolia</i>	Folhas: Controle da hipertensão arterial, no tratamento de artrite, reumatismo, diabetes <i>mellitus</i> , tranquilizante, hipoglicêmica e anti-inflamatória (PÉREZ-GUERRERO, 2001).
<i>C. palmata</i>	Folhas: Diurético, antileucorreico e possui efeito hipoglicêmico.
<i>C. peltata</i>	Folhas, caule e casca: Tratamento de doenças coronarianas, reumatismo e tranquilizante (COSTA, 2009).
	Folhas: Tratamento de bronquite e resfriados, combate ao mal de Parkinson, pressão alta, malária e tosse.
<i>C. peltata</i>	Látex: Tratamento de úlceras gangrenosas e cancerosas e verrugas.
	Folhas e raízes: Tratamento de diabetes mellitus tipo 2.
	Planta: Combate à asma e infecções fúngicas (PIO-CORRÊA, 1978).
<i>C. purpurascens</i>	Planta: Tratamento contra leishmaniose (COSTA, 2009).
	Folhas: Controle da hipertensão arterial, doenças hepáticas, enxaquecas, coqueluche, tosse e asma, diurético e fortificante do coração.
<i>C. pachystachya</i>	Folhas e cascás: Tratamento de tosse, asma e como expectorante.

Com relação a espécie em estudo, *C. pachystachya*, diversos usos medicinais são relatados principalmente das folhas, além das cascas e brotos.

C. pachystachya é utilizada na medicina popular por várias tribos Guaranis da América do Sul (SCHINELLA, 2008) onde as folhas e a casca, como já citados anteriormente, são utilizadas como expectorante, antitússigeno, no tratamento da asma, como hipoglicêmico (ARAGÃO *et al.*, 2013), diurético, tônico, anti-hemorrágica (UCHÔA, 2010), no tratamento de doenças hepáticas, coqueluche e fortificante do coração (COSTA, 2009).

Apesar do número limitado de estudos que buscam comprovar as atividades da planta, encontram-se no mercado farmacêutico alguns medicamentos que possuem extratos de “*Cecropia*” em sua composição, como por exemplo Poconéol® gotas (Plantes et Médicines, França), também uma preparação homeopática indicada para o tratamento de estados infecciosos ou com ação antitussígena, a qual empregam em sua composição extrato de *Cecropia palmata*, entre outras matérias-primas vegetais. (COSTA, 2009)

Com relação às propriedades farmacológicas, existe um número significante de estudos sobre a atividade de extratos produzidos da espécie *C. pachystachya*. O efeito hipoglicêmico e anti-inflamatório é bastante evidente no extrato metanólico das folhas (SCHINELLA, 2008). Estudos anteriores reportaram atividade anti-inflamatória do extrato hexânico das folhas, cuja substância mais abundante era o β-sitosterol, sendo atribuída tal atividade a esse composto (HIKAWCZUK, 1998). Outro estudo relatou maior eficácia do extrato diclorometano das folhas no tratamento de inflamações, relacionando o ácido pomólico como principal substância responsável pela atividade anti-inflamatória (SCHINELLA, 2008). Em um outro estudo, géis produzidos a partir do extrato acetato de etila das folhas promoveram aceleração no processo de cicatrização de feridas em ratos (DUQUE *et al.*, 2015).

O extrato metanólico das folhas também apresentou alto efeito antiedematogênico, sendo tal propriedade resultante da combinação entre a atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato (PACHECO, 2014). O extrato etanólico das folhas mostrou halo de inibição da enzima acetilcolinesterase, além de um alto poder antioxidante e sequestrante de radicais livres, sendo tal atividade relacionada ao alto teor de compostos fenólicos presentes no extrato (MORAIS *et al.*, 2013) em especial os C-glicosilflavonoides (ORTMANN *et al.*, 2016).

Além de todas as atividades relatadas anteriormente, outros estudos descritos na literatura mostram que *C. pachystachya* possui efeitos no sistema nervoso central, incluindo

efeitos ansiolítico e antidepressivo (ORTMANN *et al.*, 2016; COSTA, 2011) bem como atividade leishmanicida (CRUZ, 2013).

Os extratos etanólicos de diversas partes de torém (raiz, caule e folhas) mostraram atividade antimalária *in vivo* considerável possuindo pouca toxicidade e consequentemente um bom índice de seletividade, tornando a planta um promissor fitoterápico contra malária, devido principalmente à presença dos terpenóides ácido tormêntico e β -sitosterol (UCHÔA, 2010).

Um outro estudo *in vivo* mostrou que o extrato etanólico das folhas reduziu a inflamação nos rins, melhorando suas funções, sendo a espécie *C. pachystachya* um potencial fitoterápico no tratamento de doenças renais crônicas (MAQUIAVELI, 2014).

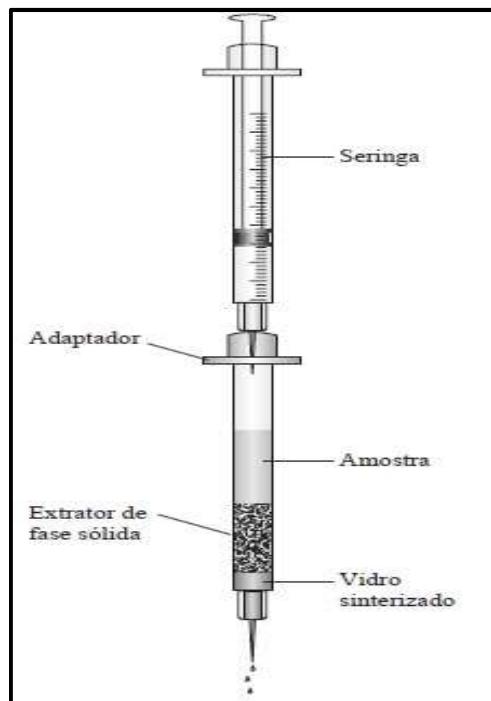
2.5. Extração em Fase Sólida (SPE) - Tratamento da amostra

Na química de produtos naturais a redução e/ou eliminação de interferentes para que o sinal da substância de interesse seja maximizado é um dos principais desafios. Quando se tratam de extratos vegetais, a extração em fase sólida (SPE) ou extração líquido-sólido reduz grande parte dos interferentes presente nos mesmos, fazendo com que concentrações muito baixas de analito sejam detectados e identificados por métodos como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por exemplo (SKOOG *et al.*, 2007; JARDIM, 2010).

As técnicas de SPE empregam membranas, pequenas colunas descartáveis na forma de seringas ou cartuchos. Um composto orgânico hidrofóbico recobre a mesma ou está quimicamente ligado à sílica granulada formando a fase sólida extratora (adsorvente). Octadecil (C₁₈) ligado à sílica é um dos adsorventes mais comumente empregados.

O sistema típico de um cartucho para extrações em fase sólida é apresentado na Figura 12 (SKOOG *et al.*, 2007). Basicamente a amostra é colocada no cartucho e aplica-se pressão através de uma seringa ou por uma linha de ar ou nitrogênio. Como dito anteriormente, o vácuo também pode ser empregado para passar a amostra pelo extrator. As moléculas orgânicas são extraídas da amostra e concentradas na fase sólida onde podem ser, posteriormente, desalojadas por um solvente orgânico como o metanol, por exemplo. Tais componentes podem ser concentrados na fase sólida através da extração utilizando um grande volume de água como eluente. Após a passagem de água para remover as moléculas polares (como açúcares) é possível fazer a remoção das substâncias de interesse utilizando pequenos volumes de solvente orgânico (SKOOG *et al.*, 2007).

Figura 12 - Modelo esquemático de um cartucho utilizado na extração em fase sólida.



Fonte: SKOOG *et al.*, 2007.

2.6. Técnicas cromatográficas

A cromatografia é amplamente utilizada como um dos métodos de separação, identificação e quantificação de espécies químicas em diversas áreas do conhecimento que abrangem das ciências até as indústrias.

A cromatografia consiste num método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura sendo realizada através da distribuição dos mesmos em duas fases ao qual estão em contato íntimo (COLLINS, 2006). De maneira geral, uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Ao passo que a fase móvel é eluída, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases de tal forma que cada um deles seja seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em diferentes migrações desses componentes (COLLINS, 2006).

Desde o surgimento do termo “cromatografia”, atribuído pelo botânico russo Mikhael Semenovich Tswett em 1906 (COLLINS, 2006), diferentes técnicas cromatográficas foram surgindo e se aperfeiçoando com o decorrer do tempo. No presente trabalho, três técnicas cromatográficas foram utilizadas como ferramentas de separação e identificação de espécies

químicas. São elas: Cromatografia Líquida por Exclusão Molecular; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC); e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Do inglês *Ultra-Performance Liquid Chromatography*, UPLC ou *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC).

2.6.1. Cromatografia Líquida por Exclusão Molecular

A cromatografia por exclusão, também conhecida como “peneira molecular”, promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas a serem separadas entre as duas fases, são elas a fase móvel presente dentro dos poros da fase estacionária e a fase móvel externa aos poros. Tais fases líquidas dependem da estrutura estacionária que contém poros de tamanho controlado (ROTHSCHILD, 2006).

Tal técnica tem propriedades bastante desejáveis uma vez que é relativamente simples, possui estabilidade em solventes e temperatura, além de versatilidade tendo em vista que é possível separar substâncias com massas molares abaixo de 1.000 Da ou de vários milhões modificando apenas a matriz da fase estacionária (ROTHSCHILD, 2006).

Os géis de dextrana (polímeros de glicose) foram os primeiros adsorventes estudados e por possuírem boas propriedades cromatográficas, mantém sua liderança no mercado. Um destes géis bastante difundido atualmente é o Sephadex. Fabricada pela empresa Pharmacia, na Suécia, é um material muito estável quimicamente. O Sephadex LH-20 é um hidroxipropil derivado da dextrana com ligações cruzadas, que pode ser usado com solventes orgânicos polares ou misturas aquosas contendo os mesmos (COLLINS, 2011).

2.6.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) faz parte de uma família de técnicas de separação e é ideal quando se deseja separar misturas que contêm um grande número de compostos similares (JARDIM *et al*, 2006). Ela utiliza altas pressões de forma que força o solvente a passar entre colunas fechadas que contêm partículas ultrafinas o que proporciona separações com alta resolução (HARRIS, 2010).

Como dito anteriormente, a coluna empregada na CLAE é fechada e reaproveitável, tornando possível centenas de separações individuais utilizando a mesma coluna. Tais colunas

são muito eficazes, entretanto oferecem grande resistência à vazão da fase móvel. Por essa razão, faz-se necessário empregar uma bomba de alta pressão que faz com que a fase móvel migre a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada de forma a resultar em operações mais reproduzíveis que tornam as análises mais precisas. Vários tipos de detectores podem ser acoplados à saída da coluna proporcionando um registro contínuo da composição da amostra, que pode ser utilizado para identificar e/ou quantificar os componentes da amostra (JARDIM *et al.*, 2006).

2.6.3. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*Ultra-Performance Liquid Chromatography, UPLC*)

O UPLC segue os mesmos princípios do HPLC e traz uma nova dimensão para a espectrometria de massas (PEREZ *et al.* 2004). O mesmo opera com partículas cromatográficas de $2\mu\text{m}$ e o sistema deste tipo de cromatografia líquida pode atingir pressões entre 6.000 e 15.000 psi, provocando um aumento considerável na resolução do cromatograma quando comparado ao convencional HPLC, que utiliza partículas bem maiores. Ainda em comparação ao HPLC, análises por UPLC também aumentam a razão sinal/ruído e limitam a largura do pico. Devido a isso, ela beneficia a determinação de um enorme número de metabólitos (ZHAO, 2014).

Atualmente o uso do UPLC acoplado a um espectrômetro de massas com analisador quadrupolo–tempo de voo (do inglês *Quadrupole-Time of light, Q-Tof*) tem acrescentado uma grande contribuição para o estudo de metabólitos (PEREZ *et al.* 2004).

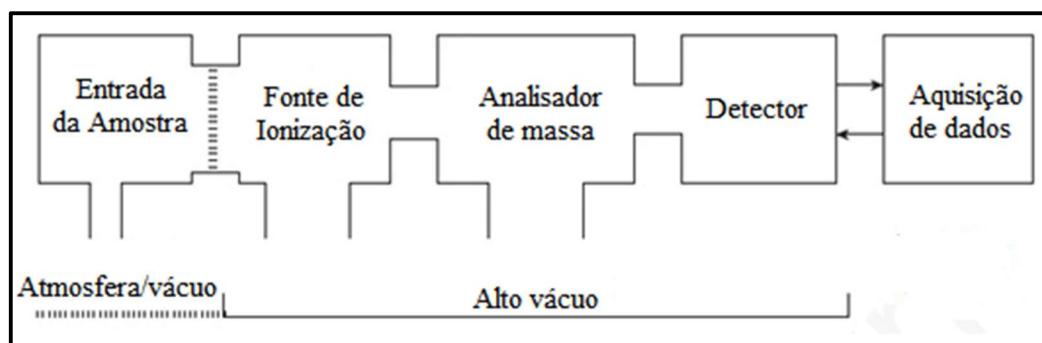
2.7. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas estuda as massas dos átomos ou das moléculas ou ainda dos fragmentos moleculares. De maneira geral, para que o espectro de massa seja obtido, espécies gasosas desordenadas de uma fase condensada são ionizadas e os íons são acelerados por um campo elétrico e separadas de acordo com a razão massa/carga (m/z) (HARRIS, 2010).

A Figura 13 (p. 33) mostra um esquema simples de um espetrômetro de massa, o qual é composto por basicamente cinco unidades. A primeira delas é a unidade de introdução da amostra que conduz a amostra do ambiente laboratorial (1atm) para pressões mais baixas dentro do equipamento. A etapa seguinte é a fonte de ionização, onde as moléculas da amostra

são transformadas em íons em fase gasosa. Os íons são acelerados por um campo eletromagnético e separados baseado em sua razão m/z pelo analisador de massa. Os íons são, então, contados pelo detector e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados sendo o espectro de massa um gráfico do número de íons detectados como função de sua razão m/z (PAVIA, 2010).

Figura 13 - Estrutura simplificada dos cinco componentes básicos de um espectrômetro de massa.



Fonte: Adaptado de PAVIA, 2010.

A espectrometria de massas pode ser acoplada por meio de uma interface especial à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS ou simplesmente LC-MS). Dessa forma, as substâncias que eluem da coluna do HPLC são detectadas pelo espectrômetro de massas, e seus respectivos espectros de massas podem ser visualizados, analisados e comparados a espectros padrão encontrados na biblioteca digital contida no instrumento (PAVIA, 2010).

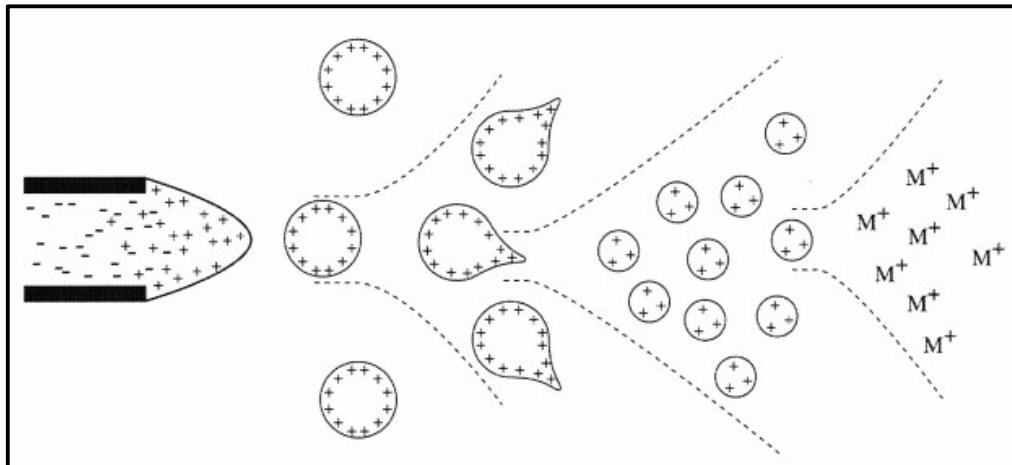
A fonte de ionização é o dispositivo que permite a ocorrência do processo de ionização dos analitos antes de sua entrada no analisador de m/z (DALMÁZIO, 2007).

A fonte de ionização utilizada no presente trabalho foi a Ionização por Electrospray (EI ou do inglês *Electrospray Ionization* – ESI) uma vez que tal fonte torna possível a realização de diversos estudos de processos químicos e bioquímicos que ocorrem em fase líquida e que podem conter espécies pouco voláteis e/ou termicamente instáveis. Enquanto algumas técnicas promovem extensiva fragmentação do analito devido a quantidade de energia fornecida, a ESI é mais branda produzindo espécies que não são dissociadas (DALMÁZIO, 2007) (Figura 14, p. 34).

Uma importante característica do ESI é a habilidade de produzir íons multiplamente carregados partindo de grandes moléculas com vários sítios ionizáveis, podendo ser formadas

espécies protonadas $[M+nH]^{n+}$, desprotonadas $[M-nH]^{n-}$, cationizadas $[M+Na]^+$ ou anionizadas $[M+Cl]^-$, por exemplo (DALMÁZIO, 2007).

Figura 14 - Mecanismo de Ionização por Electrospray.



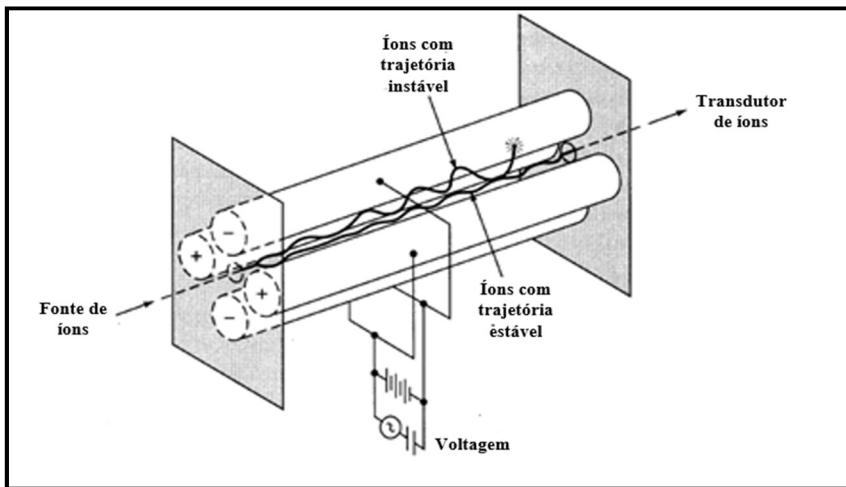
Fonte: HO et al., 2003.

Com relação aos tipos de analisadores de massas, no presente trabalho foi utilizado um UPLC com analisador quadrupolar acoplado a um analisador de tempo de voo (UPLC-QTOF-MS).

Um analisador de massa quadrupolar é composto de quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons, mantidas sob uma voltagem de corrente contínua (CC) e uma radiofrequência (RF) que geram um campo eletrostático oscilante na região entre as mesmas (Figura 15, p. 35). Instrumentos de massa de quadrupolo são de baixa resolução e incapazes de oferecer uma composição exata da amostra (PAVIA, 2010).

O analisador de massas por tempo de voo (TOF) proporciona a obtenção de espectros de alta resolução (HARRIS, 2010). O mesmo baseia-se na ideia simples de que as velocidades de dois íons, criados no mesmo instante, com a mesma energia cinética, variarão conforme a massa dos íons, sendo íons mais leves mais rápidos. A resolução de massa do instrumento TOF é proporcional ao tempo de voo do íon, portanto quanto maiores os tubos internos, maiores são as resoluções conseguidas (PAVIA, 2010).

Figura 15 - Esquema de um analisador quadrupolo.



Fonte: PAVIA, 2010.

2.8.Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um dos mais importantes métodos espectroscópicos para a química orgânica, uma vez que permite a determinação da estrutura de muitas substâncias. Muitos núcleos podem ser estudados por diferentes técnicas de RMN, sendo o hidrogênio (^1H) e o carbono (^{13}C) os mais comumente observados. A espectroscopia de RMN foi desenvolvida por físico-químicos no final da década de 1940 para estudar as propriedades de núcleos atômicos. Em 1951, os químicos perceberam que também poderiam usar tal método para a determinação de estruturas de substâncias orgânicas (PAVIA, 2010).

Para compreender o RMN é necessário ter em mente alguns conceitos. Alguns núcleos possuem estados de spin de $+1/2$ e $-1/2$. Tais núcleos giratórios carregados geram um campo magnético e seus spins nucleares são orientados randomicamente. Ao serem submetidos a um campo magnético externo, os núcleos giram e tendem a alinhar-se a favor ou contra o campo de maior magnetismo. Mais energia é necessária para um próton alinhar-se contra o campo do que a favor dele. Prótons que se alinham a favor do campo estão no estado de spin α de menor energia e prótons que se alinham contra o campo estão em estado de spin β de maior energia. O número de núcleos que encontram-se no estado de menor energia é maior do que os que se encontram em maior energia. A diferença nas populações é muito pequena (aproximadamente 20 em um milhão de prótons), mas é o suficiente para formar a base da espectroscopia de RMN. A diferença de energia (ΔE) entre os estados energéticos de spin depende da intensidade do campo magnético aplicado (B_0). Quando a amostra é submetida a

um pulso de radiação (radiofrequência, rf) cuja energia corresponde ao ΔE , os spins são excitados a níveis energéticos maiores. Utiliza-se radiofrequência uma vez que não é necessária muita energia para excitar os spins. Quando os núcleos sofrem relaxamento (retornam ao nível de origem) eles emitem sinais eletromagnéticos cuja frequência depende do ΔE entre os estados energéticos. O espectrômetro de RMN detecta esses sinais e os apresenta como um registro da frequência do sinal versus sua intensidade. A posição na qual um sinal aparece no espectro de RMN é chamada de deslocamento químico (δ), que consiste na medida da distância entre o sinal observado e o sinal do tetrametilsilano (TMS). O TMS é utilizado como referência pelo fato de seus prótons apresentarem uma frequência muito baixa com relação a maioria dos outros sinais. O sinal do TMS é usado para definir a posição zero na escala e o deslocamento químico é determinado pela medida da distância do sinal do TMS (em Hz) dividido pela frequência operacional do instrumento (MHz). O deslocamento químico possui unidades de partes por milhão (ppm) da frequência operacional (PAVIA, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar quimicamente os extratos aquoso e etanólico das folhas de *Cecropia Pachystachya* visando relacionar o perfil de metabólitos secundários do extrato etanólico com a atividade anti-inflamatória apresentada pela espécie.

3.2. Objetivos Específicos

- Preparar extratos das folhas de *C. pachystachya*;
- Fracionar os extratos através de técnicas cromatográficas tais como cromatografia líquida em coluna aberta e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC);
- Caracterizar os extratos utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massas;
- Tentar relacionar alguns dos componentes presentes no extrato etanólico com a atividade anti-infamatória descrita previamente para a espécie.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo dos extratos aquoso e etanólico

Folhas da espécie *Cecropia Pachystachya* (torém) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos, localizado na Universidade Federal do Ceará, em setembro de 2015 e março de 2016. Para o preparo dos extratos aquoso e etanólico, respectivamente. As folhas (1,14 Kg) foram secas a temperatura ambiente (25-30 °C) durante 5 dias. Após a secagem, as folhas foram trituradas a seco. Uma amostra de 100 g de folha seca e triturada foi adicionada a um bêquer que continha 700 mL de água deionizada. O conteúdo foi aquecido até a ebulação. Após 15 min fervendo, o aquecimento foi cessado. A mesma amostra passou por mais duas extrações seguindo a mesma metodologia descrita. O extrato aquoso a quente foi liofilizado num liofilizador Martin Christ Alpha 1-2 LD plus (Christ®) e a massa total de extrato obtido foi de 11, 2 g. Após isso, foi realizada uma extração com 200 mL de metanol P.A. (Vetec) durante 30 min sob agitação magnética, em triplicata. O conteúdo solubilizado foi filtrado em papel de filtro e posteriormente evaporado à pressão reduzida com o auxílio de um rotaevaporador da marca IKA® RV 10, a 40 °C, resultando em um sólido de cor marrom (6,7 g), denominado EA-M.

Uma amostra de 106,2 g de folha triturada foi utilizada para o preparo do extrato. Em um erlenmeyer de 1 L o material foi deixado submerso em álcool etílico P.A., (Dinâmica), durante 48h. Após isso o extrato foi evaporado à pressão reduzida com o auxílio de um rotaevaporador da marca IKA® RV 10, a 40 °C. O extrato foi feito em duplicata utilizando-se 1,8 L de etanol e obtendo-se massa total de 11,8 g de extrato, sendo denominado EECP.

4.2. Fracionamentos Cromatográficos

Uma amostra de 2,9 g da fração EAM foi solubilizada em metanol/água 10% e submetida a um fracionamento cromatográfico por exclusão molecular em uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro e 60 cm de comprimento acondicionada com gel de dextrana Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals), utilizando-se metanol/água 10% como fase móvel. Foram obtidas 5 frações, sendo elas: F₁=21,9mg; F₂=34mg; F₃=236mg; F₄=185,4mg e F₅=41,4mg.

A fração F₃ (236 mg) foi solubilizada em metanol/água 10% e recromatografada em coluna de Sephadex LH-20, rendendo 29 frações. Após análise em cromatoplacas (eluentes: metanol e acetato de etila combinados em proporções crescentes de polaridade) de gel de sílica

60 (\varnothing – 5-40 μm) sobre alumínio (Merck) (Cromatografia de Camada Delgada – CCD), previamente reveladas por aspersão com solução alcoólica de vanilina sulfúrica, as alíquotas coletadas foram reunidas em 8 frações: F₁₋₁₂=22,4 mg; F₁₃₋₁₅=19 mg; F₁₆₋₁₉=61,7 mg; F₂₀=20,9 mg; F₂₁₋₂₃=23,4 mg; **F₂₄₋₂₆=23,4 mg**; **F₂₇₋₂₉=8,8 mg**; e F₃₀₋₃₅=6,1 mg. As frações de interesse para o presente trabalho foram F₂₄₋₂₆ e F₂₇₋₂₉ uma vez que mostraram maior pureza.

4.3. Análises por RMN de ^1H e ^{13}C

As frações F₂₄₋₂₆ e F₂₇₋₂₉ foram analisadas por RMN. Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ^1H) e equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”. As amostras foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 5 mg das frações em 600 μL de metanol deuterado com 0,17mg/mL de TSP-d4. Os experimentos uni e bidimensionais de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC foram realizados para ambas as amostras.

4.4. Extração em Fase Sólida

As Extrações em Fase Sólida (SPE) do extrato etanólico de *C. pachystachya* (EECP) foram realizadas em cartuchos de fase reversa (C18) de 5 g da marca Phenomenex. Foram pesados 250 mg do extrato e dissolvidos em 3 mL de metanol. A solução foi homogeneizada em aparelho de ultrassom (Unique®) por 5 min.

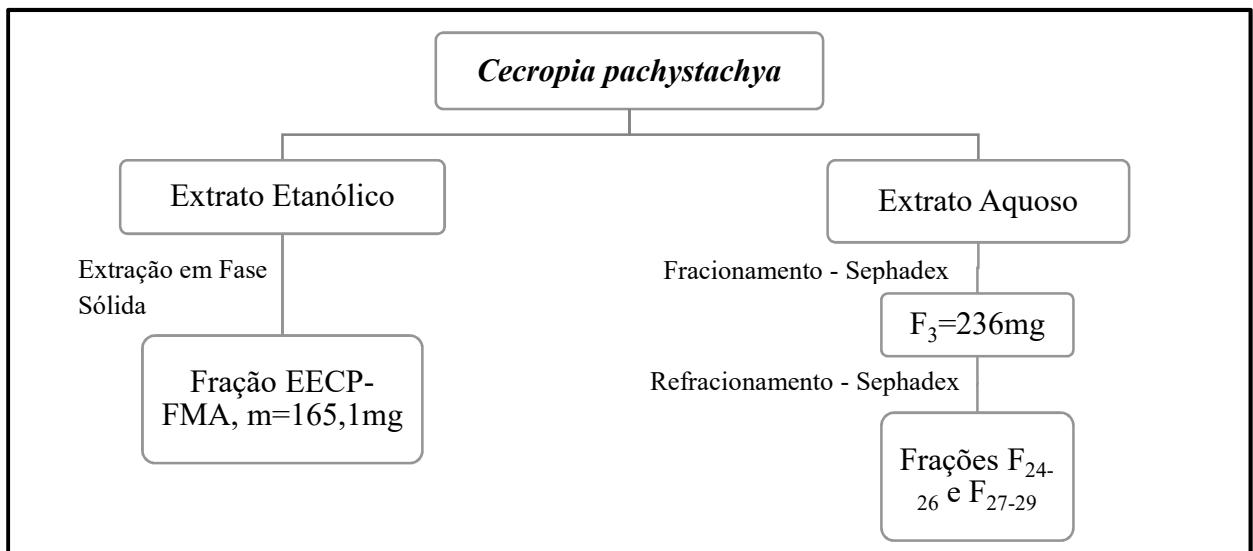
O uso dos cartuchos foi precedido por ativação do adsorvente com 20 mL de metanol, seguida da adição de 20 mL de água Milli-Q. Posteriormente aplicou-se a solução com a amostra e em seguida 20 mL de água Milli-Q. A fase aquosa foi coletada, e posteriormente, o cartucho foi eluído com 80 mL da mistura MeOH/H₂O (80:20 v/v) e a fase orgânica (fase de interesse) foi coletada num béquer de 100 mL. Para a limpeza do cartucho utilizou-se 30 mL de metanol. Tal procedimento foi realizado doze vezes, resultando em 165,1 mg de fração orgânica, após rotaevaporação seguida de liofilização.

4.5. Espectrometria de massas

Os experimentos de UPLC-QTOF-MS (/MS) foram realizados num sistema Waters Acquity de Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo-de-Voo (QTOF, Waters) equipado com uma interface electrospray (ESI). As corridas foram realizadas em coluna C18 Waters Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura constante de 40 °C, fases móveis água Milli-Q (A) e acetonitrila (B) ambos com 0,1% v/v de ácido fórmico (pH≈3,0). As amostras foram submetidas a um gradiente variando de: 0-15 min 2-95% de B; 15,1-17 min 100% de B; 17,1-19,1 min 2% de B. O fluxo foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção de 5 µL. As amostras foram injetadas nos modos de ionização positivo (ESI⁺) e negativo (ESI⁻) e adquiridos na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás de dessolvatação de 500L/h, cone de extração de 0,5 V. A voltagem capilar para o modo ESI⁻ foi de 2,6 kV e para o modo ESI⁺ 3,2 kV. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

Os espectros das frações F₂₄₋₂₆ e F₂₇₋₂₉ foram obtidos apenas no modo de ionização negativo, enquanto que para a fração EECP-FMA (Extrato Etanólico *Cecropia pachystachya* – Fração Metanol/Água, relativo a fração orgânica obtida do SPE) foram obtidos espectros no modo de ionização negativo e positivo.

Figura 16 - Fluxograma descrevendo o procedimento de extração e de isolamento de substâncias das folhas de *C. pachystachya*.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extrato aquoso (EA)

O extrato aquoso não apresentou um bom rendimento (11,2%), entretanto forneceu material suficiente para os fracionamentos posteriores. Devido ser o extrato bruto, com muitas impurezas, macromoléculas e contaminantes polares solubilizados em água, era esperado que o fracionamento do extrato aquoso apresentasse baixo rendimento. O rendimento do segundo fracionamento foi relativamente alto (76,10%), caracterizando uma boa eficiência no processo, garantindo assim que poucas substâncias ficaram adsorvidas na fase estacionária.

O rendimento do extrato etanólico (11,1%) foi similar ao do extrato aquoso. A Extração em Fase Sólida (SPE) apresentou rendimento muito baixo (5,5%) uma vez que muito material ficou retido na fase estacionária. Os fatores que motivaram o uso do SPE como método de tratamento do extrato encontram-se na seção 5.2.1.

5.1.1. Determinação estrutural da fração F₂₇₋₂₉

As separações cromatográficas em Sephadex LH-20 do extrato aquoso das folhas de *C. pachystachya* forneceram um sólido castanho viscoso designado F₂₇₋₂₉ (8,8 mg).

O espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD, p. 61) mostrou sinais em δ 7,83 e 6,92 (d, J=8,4 Hz, 2H) correspondentes a hidrogênios aromáticos de um sistema *para*-dissubstituído. Os simpletos em δ ¹H 6,44 (H-8) e δ 6,57 (H-4) corresponderam a hidrogênios aromáticos. Nessa substância uma unidade de açúcar está ligada ao carbono 6 do anel A e outra está ligada ao carbono 6'' da primeira unidade citada. A presença de um duplo em δ 4,94 (d, J=9,6 Hz) e outro sinal distorcido em δ 4,29, estão associados aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos 1'' e 1''', respectivamente. Os valores de deslocamentos de ¹H dos 14 hidrogênios glicosídicos restantes estão na região de δ ¹H 4,3 a 2,7 (Figura 17, p. 42).

O espectro de RMN de ¹³C (150 MHz, CD₃OD) apresentou sinais em δ 123,0 (1C, 1'); δ 129,2 (2C, 2' e 6'); δ 117,0 (2C, 3' e 5') e δ 162,9 (1C, 4') correspondentes a um sistema *para*-dissubstituído do anel B (Figura 18, p. 43). O sinal em δ 183,6 corresponde a carbonila na posição 4, pertencente ao anel C. Os sinais δ 167,0 e δ 163,3 correspondem aos carbonos aromáticos oxigenados 5 e 7, respectivamente, localizados no anel A. O carbono 6, ligado a unidade de açúcar, apresentou deslocamento em δ 109,3, sendo o mais protegido do anel A. No intervalo de aproximadamente δ ¹³C 80 a 60 foram observados 11 carbonos pertencentes às

unidades de açúcar, sendo 6 deles ligados diretamente a uma hidroxila. O carbono anomérico 1''' apresentou deslocamento fora da faixa citada anteriormente, em δ 106,6 (ver Tabela 2, p. 44).

Os acoplamentos observados nos experimentos HSQC e COSY foram essenciais para definir o conjunto de sinais pertencentes a cada unidade de açúcar. O espectro HMBC (Figura 19, p. 43) permitiu identificar a ligação entre a aglicona e a unidade de açúcar, que foi caracterizada pelo acoplamento do hidrogênio glicosídico em δ 4,94 com os carbonos em δ 163,3 (C-5); δ 109,3 (C-6); e δ 167,0 (C-7). Outras correlações vistas no espectro HMBC estão representadas na Figura 19 (p. 43).

Dessa forma, a estrutura da substância I foi identificada como 6-C-galactosil-6''-O- β -galactopiranosilapigenina (**23**) (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Tal afirmação foi corroborada com a comparação dos deslocamentos de RMN ^1H e ^{13}C encontrados para o composto **23** na literatura (Tabela 3, p. 45). O composto **23** foi reportado anteriormente apenas para o gênero *Cecropia*, sendo inédita na espécie em estudo.

O espectro de massas de alta resolução no tempo de retenção de 4,234 min, forneceu a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{15}$ (ESI $^-$, referente a molécula desprotonada), m/z 593,1508 ([M-H] $^-$) e com erro de 0,3 ppm, corroborando com a estrutura proposta anteriormente.

Figura 17 - Estrutura química numerada da substância I com valores de deslocamentos químicos de ^1H .

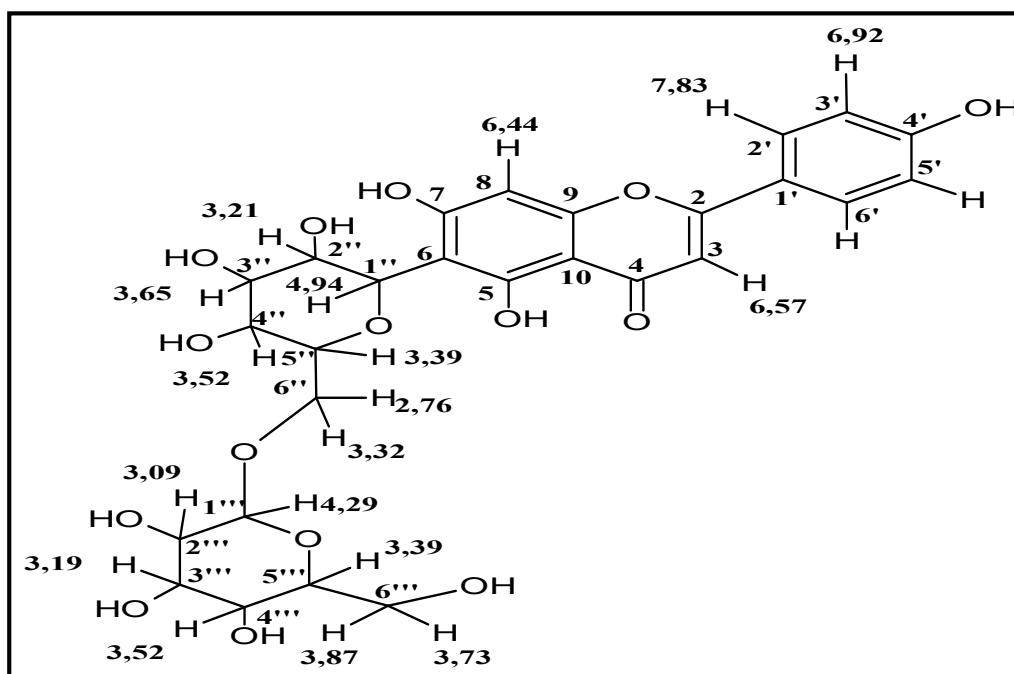


Figura 18 - Estrutura química da substância I com valores de deslocamentos de ^{13}C .

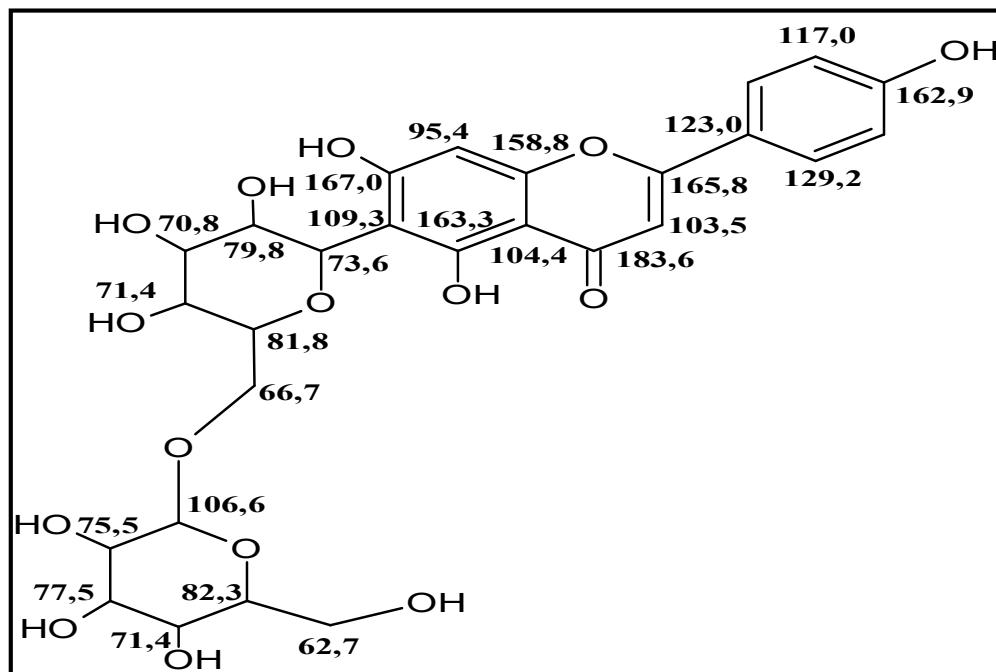


Figura 19 - Estrutura química da substância I com correlações ^1H - ^{13}C observadas no espectro HMBC.

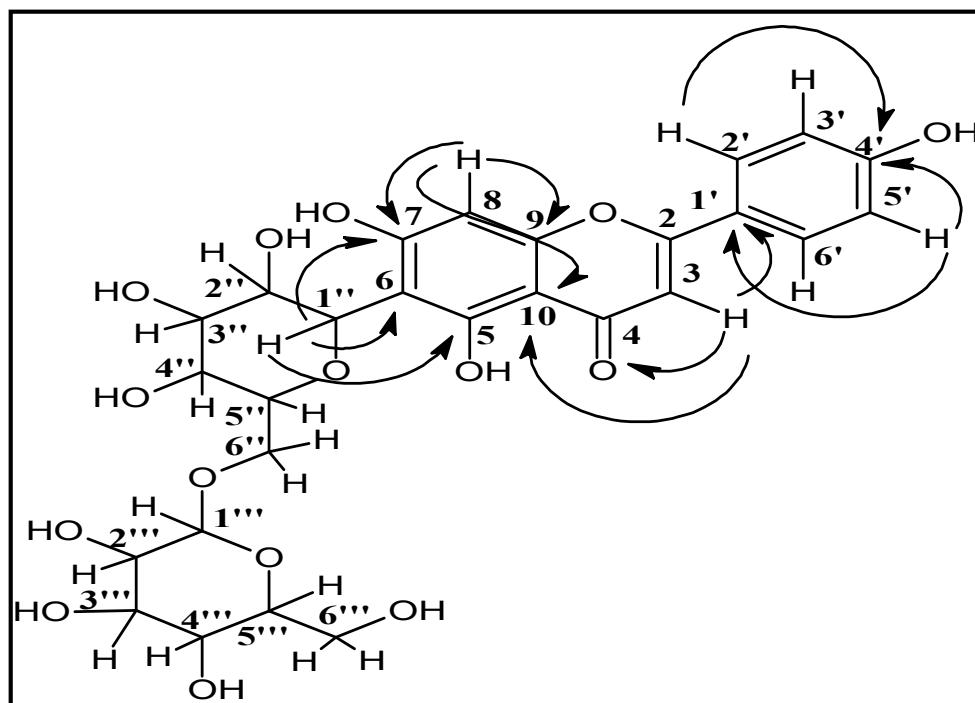


Tabela 2 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a fração F₂₇₋₂₉ segundo as correlações obtidas através de espectros COSY, HSQC e HMBC.

#C	δ C (ppm)	δ H (ppm) (int.,	HMBC	COSY
		MeOD		
		multiplic., J em Hz		
2	165,8	-	7,83; 6,57	
3	103,5	6,57 (1H, s)		
4	183,6	-	6,57; 6,44	
5	163,3	-	4,94	
6	109,3	-	6,44; 4,94	
7	167,0	-	6,44; 4,94	
8	95,4	6,44 (1H, s)		
9	158,8	-	6,44	
10	104,4	-	6,57; 6,44	
1'	123,0	-	6,92; 6,57	
2', 6'	129,2	7,83 (2H, d, J= 8,4 Hz)	7,83	
3', 5'	117,0	6,92 (2H, d, J= 8,4 Hz)	6,92	
4'	162,9	-	7,83; 6,92	
1''	73,6	4,94 (1H, d, J= 9,6 Hz)		
2''	79,8	3,21	3,32; 3,19; 2,76	2,76
3''	70,8	3,65	4,94	
4'',	71,4	3,52	3,87; 3,65	3,39; 3,32
4'''				
5''	81,8	3,39	4,94; 3,65	3,52
6''	66,7	3,32; 2,76		3,32; 3,21
1'''	106,6	4,29	3,32; 3,09; 2,76	3,09
2'''	75,5	3,09		
3'''	77,5	3,19	3,32; 3,09; 2,76	
5'''	82,3	3,39	3,87	3,73; 3,52
6'''	62,7	3,87; 3,73		3,87; 3,73; 3,39

Tabela 3 - Comparativo entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância **I** e a 6-C-galactosil-6''-O- β -galactopiranosilapigenina (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Fração F₂₇₋₂₉ – MeOD			6-C-galactosil-6''-O-β-galactopiranosilapigenina (23) – DMSO-d₆	
#C	δ C (ppm)	δ H (ppm)	δ C (ppm)	δ H (ppm)
2	165,8	-	164,5	-
3	103,5	6,57	102,7	6,7
4	183,6	-	181,9	-
5	163,3	-	161,2	-
6	109,3	-	108,0	-
7	167,0	-	164,5	-
8	95,4	6,44	93,0	6,4
9	158,8	-	156,4	-
10	104,4	-	103,2	-
1'	123,0	-	121,1	-
2', 6'	129,2	7,83 (2H, d, J= 8,4 Hz)	128,5	7,9
3', 5'	117,0	6,92 (2H, d, J=8,4 Hz)	115,9	6,9
4'	162,9	-	161,9	-
1''	73,6	4,94 (1H, d, J= 9,6 Hz)	74,2	4,6 d, J=9,7 Hz, 1H
2''	79,8	3,21	76,2	2,80
3''	70,8	3,65	69,3	3,30
4''	71,4	3,52	70	3,00
5''	81,8	3,39	81,6	3,01
6''	66,7	3,32; 2,76	65,7	2,95 (2H)
1'''	106,6	4,29	105,9	4,1 d, J= 7,9 Hz, 1H
2'''	75,5	3,09	71,2	2,80
3'''	77,5	3,19	78,3	2,80
4'''	71,4	3,65	71,3	2,90
5'''	82,3	3,39	80,9	3,30
6'''	62,7	3,87; 3,73	61,4	3,60; 3,20

5.1.2. Determinação estrutural da Fração F₂₄₋₂₆

Cromatografias em Sephadex LH-20 do extrato aquoso das folhas de torém permitiram a obtenção de um sólido castanho resinoso designado F₂₄₋₂₆ (23,4 mg).

De acordo com os espectros de RMN, a fração continha uma mistura de duas substâncias majoritárias, uma vez que os sinais de deslocamento químico de ¹H e ¹³C duplicados. A comparação entre os sinais de RMN de ¹H e ¹³C permitiu verificar que uma delas é a substância I, discutida anteriormente, e a outra é, possivelmente, um derivado da substância I com uma metoxila adicional (substância II). A Tabela 4 (p. 49) compara todos os dados de RMN de ¹H e ¹³C das substâncias I e II. Com relação aos anéis A e C e as unidades de galactose (açúcar presente da substância I), os deslocamentos tanto de carbono quanto de hidrogênio das duas substâncias são semelhantes entre si e semelhantes com a literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2002). A maior diferença está no anel B, uma vez que a substância I possui o sistema *para*-dissubstituído, enquanto que o composto II possui o anel B trissubstituído.

O duploto em δ H 7,50 (1H, J= 8 Hz) corresponde a um hidrogênio aromático. Os dupletos distorcidos em δ 7,47 e 6,93 correspondem aos hidrogênios 2' e 4', respectivamente. Um simpleto com integração para 3H em δ H 3,90 está relacionado aos hidrogênios da metoxila. O espetro de RMN de ¹³C mostrou um sinal em δ 56,6 que evidencia a presença do carbono metoxilado. Devido o anel B ser trissubstituído, todos os carbonos apresentam deslocamentos químicos diferentes, sendo eles δ C 123,4 (C-1'), δ 110,5 (C-2'), δ 149,5 (C-3'), δ 152,2 (C-4'), δ 116,8 (C-5') e δ 121,6 (C-6').

Os deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C, bem como algumas correlações observadas nos experimentos de HSQC e HMBC encontram-se nas Figuras 20, 21 e 22 (p. 47-48), respectivamente.

Figura 20 - Estrutura química numerada da substância **II** com valores de deslocamento químico de ^1H .

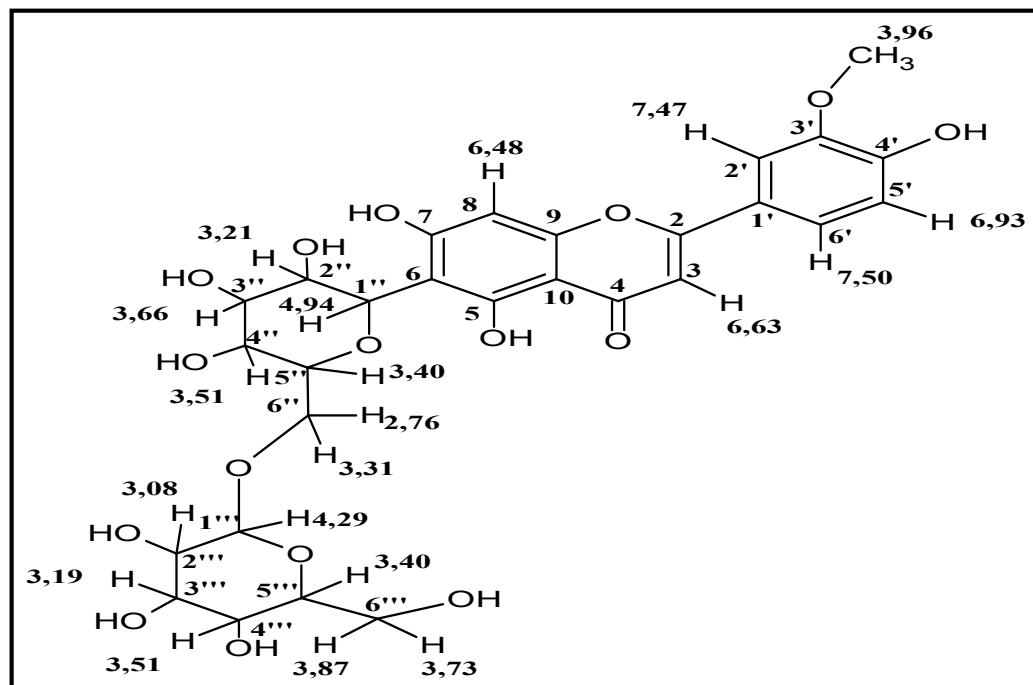


Figura 21 - Estrutura química da substância **II** com valores de deslocamento de ^{13}C .

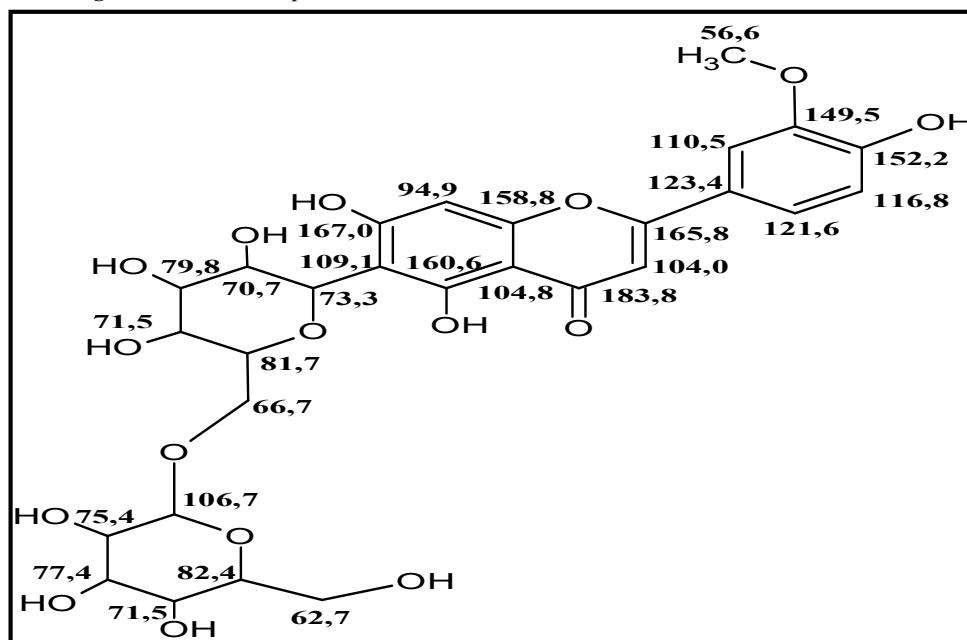


Figura 22 - Algumas correlações de carbono e hidrogênio observadas no espectro HMBC para a substância II.

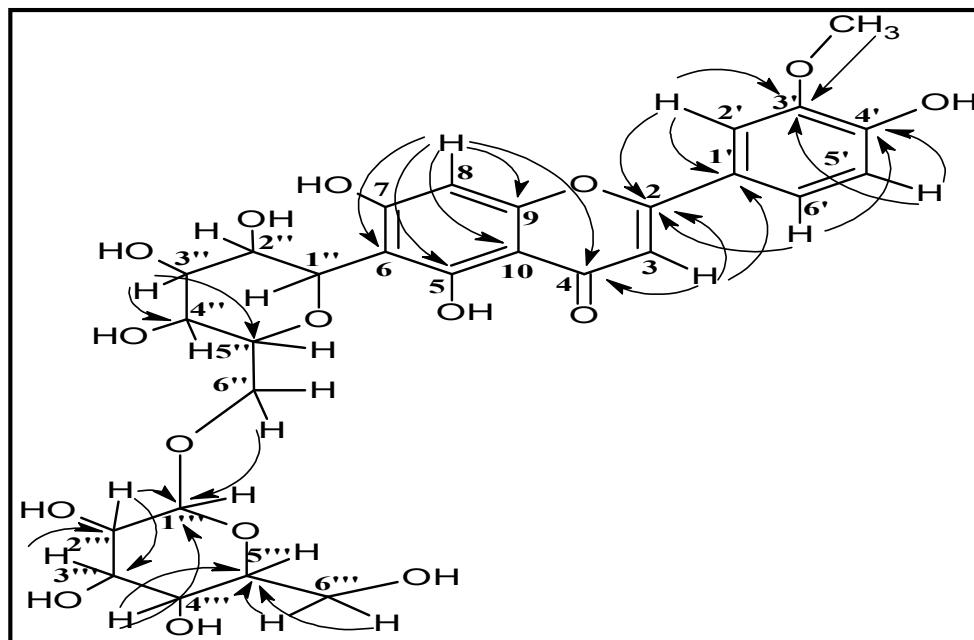


Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para as substâncias majoritárias contidas na fração F₂₄₋₂₆ segundo as correlações obtidas através de espectros COSY, HSQC e HMBC.

Substância I - F_{27,29} - MeOD				Substância II - Fração F₂₄₋₂₆ - MeOD		
#C	δ C (ppm)	δ H (ppm)	HMBC	δ C (ppm)	δ H (ppm)	HMBC
2	166,2	-	7,84; 6,60	165,8	-	7,50; 7,47; 6,63; 6,48
3	103,6	6,60 (1H)		104,0	6,63 (1H)	
4	183,8	-	6,60; 6,48	183,8	-	6,63; 6,48
5	163,1		6,48	160,6		6,48
6	109,1	-	6,48	109,1	-	6,48
7	167,0			162,2		
8	94,9	6,48 (1H)		94,9	6,48 (1H)	
9	158,8	-	6,48	158,8	-	6,48
10	104,8	-	6,60; 6,48	104,8	-	6,63; 6,48
1'	123,1	-	6,93;	123,4	-	7,47; 6,93; 6,63
2'	129,3	7,84 (2H, J=8)	7,84	110,5	7,47 (1H)	
3'	116,8	6,93 (2H, J=8)	6,93	149,5	-	7,47; 6,93; 3,96
4'	162,9	-	7,84; 6,93	152,2	-	7,50; 7,47; 6,93
5'	116,8	6,93 (2H, J=8)	6,93	116,8	6,93 (1H)	6,93
6'	129,3	7,84 (2H, J=8)	7,84	121,6	7,50 (1H, J=8)	
1''	73,3	4,94		73,3	4,94	
2''	79,8	3,21	3,31; 3,19;	79,8	3,21	3,31; 3,19; 2,76
			2,76			
3''	70,7	3,66		70,7	3,66	
4''	71,5	3,51	3,87; 3,66	71,5	3,51	3,87; 3,66
5''	81,7	-	3,66	81,7	-	3,66
6''	66,7	3,31; 2,76		66,7	3,31; 2,76	
1'''	106,7	4,29	3,51; 3,31;	106,7	4,29	3,51; 3,31; 3,08; 2,76
			3,08; 2,76			
2'''	75,4	3,08	3,19	75,4	3,08	3,19
3'''	77,4	3,19	3,31; 3,08;	77,4	3,19	3,31; 3,08; 2,76
			2,76			
4'''	71,5	3,51	3,87; 3,662	71,5	3,51	3,87; 3,66
5'''	82,4	3,40	3,87; 3,73;	82,4	3,40	3,87; 3,73; 3,51
			3,51			
6'''	62,7	3,87; 3,73		62,7	3,87; 3,73	
OMe	-	-	-	56,6	3,96 (3H, s)	-

A substância Crisoeriol (**33**) (Figura 23) é uma aglicona metoxilada na posição 3'. Ela foi utilizada para ratificar a estrutura da substância **II** uma vez que seus deslocamentos químicos de carbono no anel B são bastante similares (AGRAWAL, 1989) (Ver tabela 5).

Figura 23 - Estrutura da aglicona Crisoeriol (**33**).

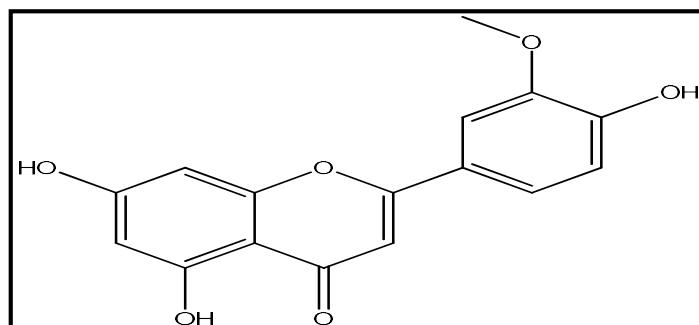


Tabela 5 - Comparativo entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C do anel B para a substância **II** e Crisoeriol.

Substância II - Fração F ₂₇₋₂₉ - MeOD		Crisoeriol – DMSO-d ₆
#C	δ C (ppm)	δ C (ppm)
OMe	56,6	56,2
1'	123,4	122,6
2'	110,5	112,7
3'	149,5	149,4
4'	152,2	147,9
5'	116,8	116,0
6'	121,6	122,2

No espectro de massas da fração F₂₄₋₂₇ foram observados dois picos característicos no tempo de retenção 4,462 min, um com m/z 623,1608 ([M-H]⁻) e outro com m/z 593,1554 ([M-H]⁻). Estas massas foram compatíveis com as formulas moleculares C₂₈H₃₂O₁₆ (erro -0,6 ppm) e C₂₇H₃₀O₁₅ (erro 8,1 ppm), as quais foram atribuídas às substâncias **II** e **I**, respectivamente. A substância **II** foi identificada como o composto 6-C-galactosil-6"-O- β -galactopiranosil-3'-metoxiapigenina, sendo descrita pela primeira vez na espécie *C.*

pachystachya. Todos os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e de Massas para ambas as frações podem ser encontrados nos ANEXOS deste trabalho (p. 64-68).

5.2. Extrato etanólico

5.2.1. Caracterização do EEFMA por UPLC-QTOF-MS

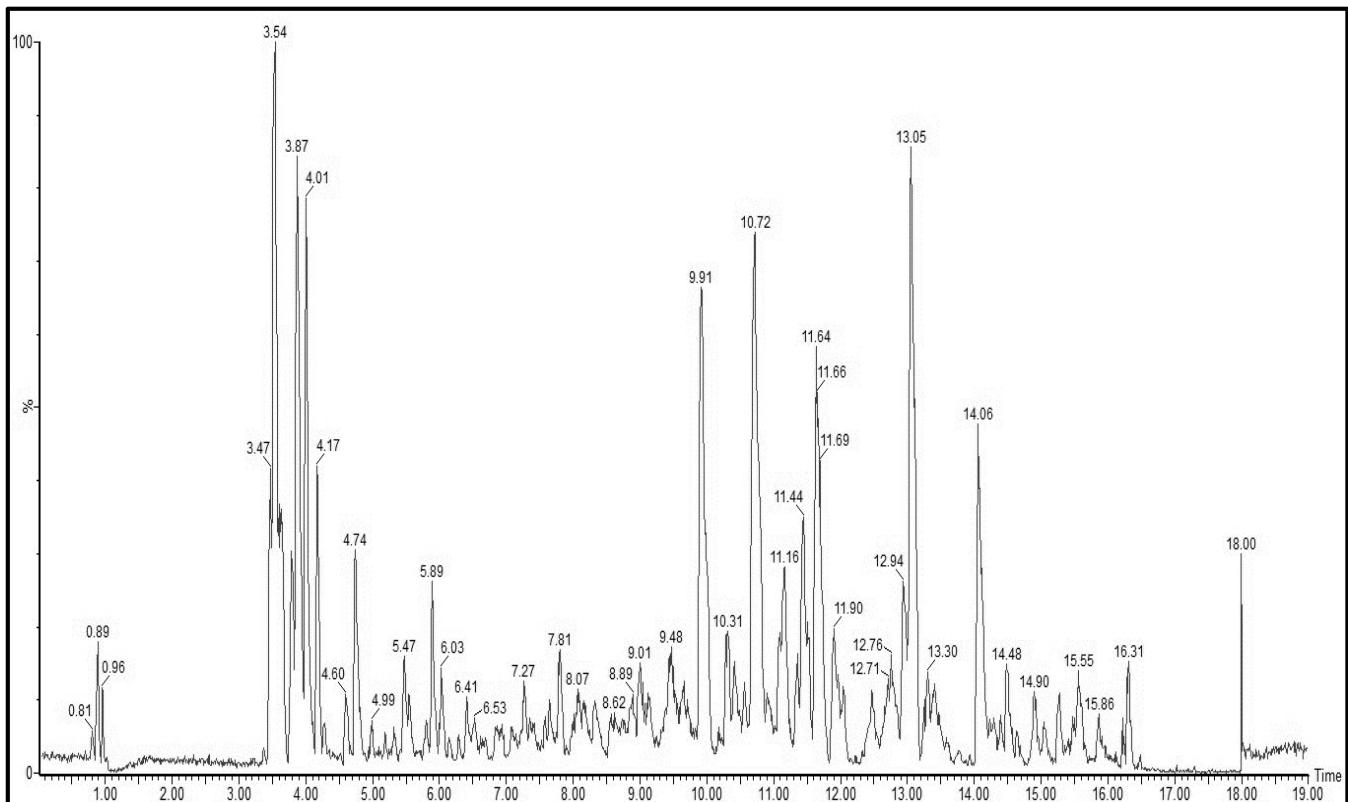
A espécie *C. pachystachya* apresenta alguns estudos que relacionam os extratos de suas folhas com propriedades anti-inflamatórias. Os extratos estudados no presente trabalho (aquoso e etanólico) foram testados quanto a atividade anti-inflamatória, em parceria com o Departamento de Morfologia da UFC. O extrato etanólico apresentou maior atividade anti-inflamatória em ensaios *in vivo*, por isso uma caracterização do mesmo fez-se necessária para tentar identificar quais substâncias poderiam ser responsáveis por tal atividade.

Partindo do extrato etanólico, optou-se por realizar uma extração em fase sólida, uma vez que tal método mostrou-se bastante eficaz na remoção de interferentes, como moléculas bastante polares, tais como açúcares, que poderiam comprometer as análises. Os espectros de RMN de ^1H para as frações obtidas por SPE podem ser visualizados nos anexos deste trabalho (p. 72-73). Foi possível observar que o extrato etanólico bruto possuía bastantes impurezas. A amostra foi limpa com a passagem de água, uma vez que a mesma retirou grande parte dos contaminantes e a fração de interesse, EECP-FMA, adquiriu um aspecto bastante límpido.

O cromatograma obtido em UPLC do EECP-FMA apresentou bastantes picos (Figura 24, p. 52). A partir da análise dos espectros de massas (ESI^- e ESI^+) do EECP-FMA, foi possível observar alguns picos característicos e interessantes, mas apenas no modo de ionização negativo. Todos os espectros de massas obtidos nesta sessão encontram-se nos anexos deste trabalho (p. 69-71).

A Tabela 6 (p. 53) expõe os dados obtidos a partir dos espectros de massas no modo negativo. Foram observados picos aos quais as massas podem ser relacionadas a oito substâncias previamente descritas para a espécie e para o gênero. O pico observado no tempo de retenção de 3,51 min, com m/z 609,1453 foi relacionado a Rutina (22) (LIN, 2007).

Figura 24 - Cromatograma obtido no UPLC para o EECP-FMA.



O pico com m/z 447,0904 pode estar relacionado tanto com a Orientina (**18**) quanto com a Isoorientina (**19**), ou com essas duas substâncias (BELTRÁN-DEBÓN, 2011). Os fragmentos observados no ESI⁻ condizem com o padrão de fragmentação dessas substâncias bem como o pico com m/z 449,1074 ($t_r=3,43$ min, F.M.= $C_{21}H_{21}O_{11}$, erro -2,2 ppm) observado no modo ESI⁺. O pico com m/z 431,0987 pode estar relacionado com a Vitexina (**21**) e/ou Isovitetexina (**20**) e tal afirmação foi corroborada com as fragmentações observadas no modo ESI⁻ e com o pico m/z 433,1127 ($t_r=3,84$ min, F.M.= $C_{21}H_{21}O_{10}$, erro -1,8 ppm) observado no modo ESI⁺ (BELTRÁN-DEBÓN, 2011).

Os fragmentos observados no modo negativo que indicam a presença dos compostos **18**, **19**, **20** e **21** podem ser atribuídos a quebras sucessivas da unidade de glicose ligada a estes compostos. Apenas pelo padrão de fragmentação não foi possível diferenciar Orientina de Isoorientina e Vitexina de Isovitetexina, uma vez que a principal diferença entre estes compostos é a posição ao qual a unidade de glicose está ligada. Para a Orientina e Vitexina a unidade de açúcar está ligada na posição 8 enquanto que para a Isoorientina e Isovitetexina está ligada ao carbono 6. A Figura 25 (p. 55) mostra o padrão de fragmentação padrão no ESI⁻ da unidade de glicose. O primeiro fragmento é relativo a perda de 90 Da ($C_3H_6O_3$), relacionado a

um tipo de fragmentação da glicose, e a outra fragmentação é a perda de 120 Da ($C_4H_8O_4$) (WU *et al.*, 2013). No espectro de massas relacionado a Orientina/Isoorientina, os picos com m/z 357,0621 ($C_{18}H_{13}O_8$, erro 3,1) e 327,0489 ($C_{17}H_{11}O_7$, erro -4,9) correspondem às quebras de glicose. No espectro relacionado a Vitexina/Isovitetexina, os picos 341,0675 ($C_{18}H_{13}O_7$, erro 4,1) e 311,0539 ($C_{17}H_{11}O_6$, erro -5,5) também estão associados a tais quebras (WU *et al.*, 2013).

O pico em m/z 593, 1520 ($t_r = 4,21$ min, $C_{27}H_{29}O_{15}$, erro 2,5 ppm) no modo ESI⁻ pode estar relacionado ao composto 6-C-galactosil-6"-O- β -galactopiranosilapigenina (**23**), o mesmo composto descrito na primeira parte desta discussão, uma vez que o pico em m/z 311,0539, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{11}O_6$, e erro -5,5, pode estar relacionado à perda de 282 Da (162+120), correspondente a fragmentação das unidades de açúcar (Figura 26, p. 55) (FERRERES, 2007). Não foram observados picos característicos desse composto no modo positivo de ionização.

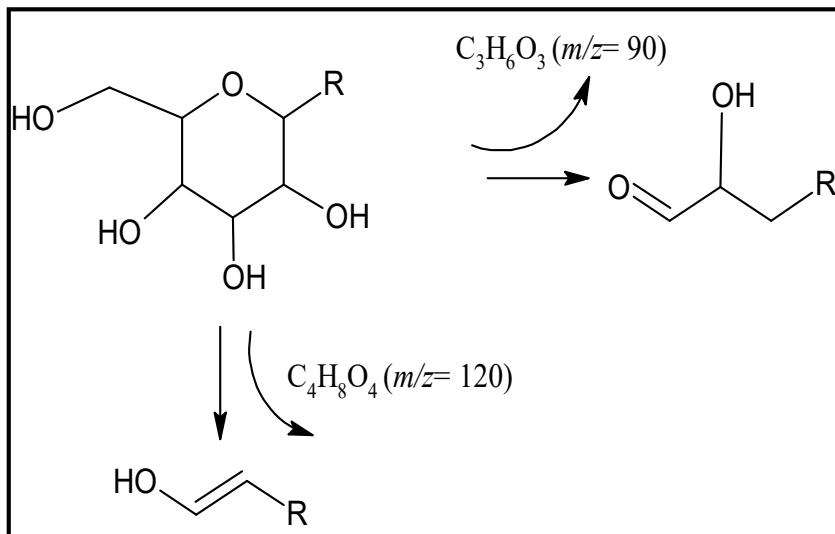
No tempo de retenção 4,54 min, o pico com m/z 169,0125 ($C_7H_5O_5$, erro -7,1 ppm) pode estar relacionado ao ácido gálico (**17**). Tal composto foi anteriormente descrito apenas para o gênero *Cecropia*, entretanto apenas um estudo tentou identificar o mesmo no torém, não obtendo êxito (JOSÉ-CHAGAS, 2013). Não foi possível afirmar com certeza a presença deste composto no extrato uma vez que apenas o pico $[M-H]^-$ foi identificado, não sendo encontrado nenhum outro fragmento característico tanto no modo ESI⁻ quanto no ESI⁺ (ABU-REIDAH, 2014).

O fragmento em m/z 487,3428 ($C_{30}H_{47}O_5$, erro 0,8 ppm) no tempo de retenção 6,44 min pode estar relacionado ao triterpeno ácido arjunólico (**8**), uma vez que seu fragmento $[M-H]^-$ possui esta massa. Tal composto foi descrito apenas para o gênero e não para a espécie, o que não torna impossível a sua presença neste extrato. Assim como o ácido gálico, também não é possível afirmar a presença do ácido arjunólico uma vez que apenas um pico foi identificado no espectro de massa ESI⁻, não sendo detectado picos característicos no modo ESI⁺ (XIA, 2015).

Tabela 6 - Dados dos espectros de massas obtidos a partir do EECP-FMA.

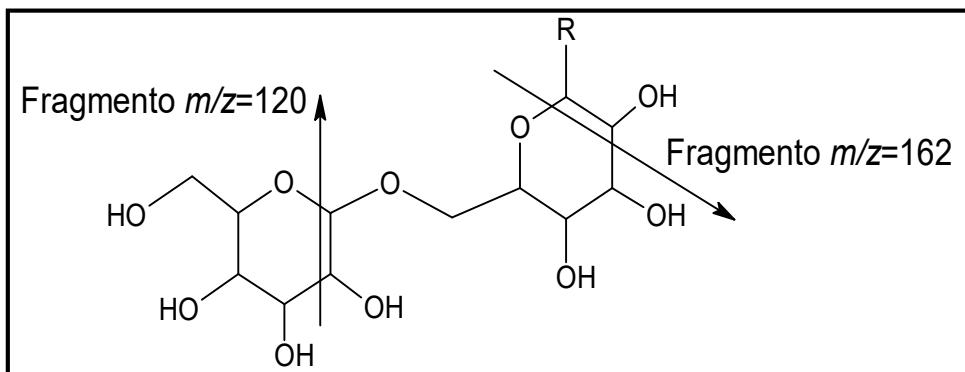
Pico	t_r (min)	[M-H] ⁻ Observada	[M-H] ⁻ Calculada	Erro (ppm)	Fragmentos Íons (ms/ms)	Fórmula molecular	Substância proposta	Referência
1	3,51	609,1453	609,1456	-0,5		$C_{27}H_{30}O_{16}$	Rutina (22)	LIN, 2007
2	3,86	447,0904	447,0927	-5,1	357,0621; 327,0489	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Orientina (18)	WU <i>et al.</i> , 2013
2	3,86	447,0904	447,0927	-5,1	357,0621; 327,0489	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Isoorientina (19)	BELTRÁN-DEBÓN, 2011
3	4,18	431,0987	431,0978	2,1	341,0675; 311,0539	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Vitexina (21)	WU <i>et al.</i> , 2013
3	4,18	431,0987	431,0978	2,1	341,0675; 311,0539	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Isovitetexina (20)	BELTRÁN-DEBÓN, 2011
4	4,21	593,1520	593,1506	2,5	311,0566	$C_{27}H_{30}O_{15}$	6-C-galactosil-6"-o- β -galactopiranosilapigenina (23)	FERRERES, 2007
5	4,54	169,0125	169,0137	-7,1		$C_7H_6O_5$	Ácido gálico (17)	ABU-REIDAH, 2014
6	6,44	487,3428	487,3424	0,8		$C_{30}H_{48}O_5$	Ácido arjunólico (8)	XIA, 2015

Figura 25 - Fragmentação da unidade de glicose presente nos compostos **18, 19, 20 e 21**, onde R é a aglicona.



Fonte: WU *et al.*, 2013.

Figura 26 - Modelo geral de fragmentação de 6''-O-glicosil-C-glicosil flavonas, onde R é a aglicona.



Fonte: FERRERES, 2007.

Estudos anteriores comprovaram a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das folhas de torém, relacionando o mesmo com propriedades inibidoras da ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), enzimas responsáveis pela inflamação nos tecidos (HONG, 2001). É comprovado que um alto nível de espécies antioxidantas pode contribuir com mecanismos fitopatológicos associados ao efeito anti-inflamatório. Muitas drogas anti-inflamatórias têm mostrado recentemente possuírem atividade antioxidante e/ou mecanismos de eliminação de radicais livres como parte de sua ação anti-inflamatória (PACHECO, 2014). Dessa forma, a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico pode ser atribuída aos flavonoides C-glicosilados Orientina e Isoorientina identificados no mesmo (ARAGÃO, 2013).

Os flavonoides geralmente ficam armazenados em vacúolos nos tecidos de flores, folhas, caules ou raízes e estão relacionados aos processos de proteção contra os raios UV, crescimento e desenvolvimento, defesa contra herbívoros e patógenos, e atração de polinizadores e dispersores de sementes (JOSÉ-CHAGAS, 2013). O extrato etanólico das folhas de torém apresentou uma atividade antioxidante considerável uma vez que foi capaz de sequestrar 50% dos radicais livres presentes no estudo, sendo tal atividade relacionada ao alto teor de fenóis presentes no mesmo (MORAIS, 2013).

Tais dados citados anteriormente corroboram ainda mais para a presença dos flavonoides Orientina e Isoorientina no EECP-FMA, uma vez que o extrato etanólico estudado foi o que apresentou maior atividade anti-inflamatória.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho foram de extrema importância para os estudos fitoquímicos acerca da espécie *C. pachystachya*, uma vez que partindo do extrato aquoso foi possível identificar duas substâncias, sendo uma delas, 6-C-galactosil-6''-O- β -galactopiranosilapigenina, previamente descrita na literatura para o gênero *Cecropia* e a outra, 6-C-galactosil-6''-O- β -galactopiranosil-3'-metoxiapigenina, possivelmente uma substância inédita para o gênero e espécie, entretanto esta última ainda está em fase de estudo. Partindo do extrato etanólico foi possível identificar a provável presença de 8 substâncias, sendo elas Rutina, Orientina, Isoorientina, Vitexina, Isovitetexina, 6-C-galactosil-6''-O- β -galactopiranosilapigenina, Ácido Gálico e Ácido Arjunólico, todas previamente descritas para o gênero. Tendo em vista que o extrato etanólico possuiu maior atividade anti-inflamatória *in vivo*, essa atividade pode estar relacionada a possível presença dos flavonoides Orientina e/ou Isoorientina, que possuem atividade anti-inflamatória reportada previamente na literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 166, p.179-191, jun. 2014.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. 1. ed. Holanda: Elsevier, 1989.
- ARAGÃO, D. M. O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J. C.; GARCIA, R. M. G., SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Estados Unidos, v. 128, p. 629-633, jan. 2010.
- ARAGÃO, D. M. O.; LIMA, I. V. A.; SILVA, J. M.; BELLOZI, P. M. Q.; COSTA, J. C.; CARDOSO, G. M. M.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SCIO, E. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, Estados Unidos, v. 27, n. 6, p. 926–930, 2013.
- BELTRÁN-DEBÓN, R.; RULL, A.; RODRÍGUEZ-SANABRIA, F.; ISWALDI, I.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; ARAGONÈS, G.; CAMPS, J.; ALONSO-VILLAVERDE, C.; MENÉNDEZ, J. A.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A.; JOVEN, J. Continuous administration of polyphenols from aqueous rooibos (*Aspalathus linearis*) extract ameliorates dietary-induced metabolic disturbances in hyperlipidemic mice. **Phytomedicine**, Estados Unidos, v. 18, p. 414-424, mar. 2011.
- BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. ***Cecropia, Flora Neotropica***. Nova York: The New York Botanical Garden, v. 94, 2005.
- BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. **Flora Neotropica Monograph**. Nova York: The New York Botanical Garden, v. 94, mai. 2005.
- BERG, C.C. Cecropiaceae a new family of the Urticales. **TAXON**, Holanda, v. 27, p. 39-44, fev. 1978.
- BRANGO-VENEGAS, J.; COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A; ARÉVALO-FERRO, C.; CASTELLANOS, L. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quórum sensing inhibitors. **Phytomedicine**, Estados Unidos, v. 21, p. 670-675, jan. 2014.
- CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, n.3, p. 37-9, 2003.
- CARAUTA, J. P. P. Índice de Moráceas do Brasil. **Albertoa**, Espírito Santo, v. 4, p. 145, 1996.
- CARAUTA, J. P. P.; ROMANIUC-NETO, S.; SASTRE, C. Índice de Moráceas do Brasil. **Albertoa**, Espírito Santo, v. 4, p. 77, 1996.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, p. 433-5450, 2000.

COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, Brasil, v. 3, n. 2, p. 107-114, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. São Paulo: Editora Unicamp, 2006.

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

COPPETEC – UFRJ. **REFLORA**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora>>. Acesso em: 25 mai 2016.

COSTA, G. M. **Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* SNETH e *Cecropia pachystachya* TRÉCUL**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasil, v. 22, nº 6, p. 1096-1102, jun. 2011.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. Em: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JOVES, R. Biochemistry & Molecular biology of plants. Rockville: American Society of Plant Physiologists. p. 1250-1318, 2000.

CRUZ, E. M.; SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; ALVES, E. S. S.; LUCON, J. F.; REIS, M. B. G.; TOLEDO, C. E. M.; CRUZ, F. G.; VANNIER-SANTOS, M. A. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, Estados Unidos, v. 89, p. 71-77, mai. 2013.

DALMÁZIO, I. **Aplicação da Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray no Monitoramento de Processos Oxidativos Avançados de Interesse Ambiental: Degradação de Fármacos, Avaliação de Sistemas Oxidativos e Oxidação do Isopreno**. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2007.

DUQUE, A. P. N.; PINTO, N. C. C.; MENDES, R. F.; SILVA, J. M.; ARAGÃO, D. M. O.; CASTAÑON, M. C. M. N.; SCIO, E. *In vivo* wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Estados Unidos, v. 68, n. 1, p. 128–138, out. 2016.

FALCÃO, V. Riqueza em perigo. **Pesquisa FAPESP**, Brasil, v. 79, p. 62-63, set. 2002.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Estados Unidos, v. 1161, p. 214-223, jun. 2007.

GAZAL, M.; ORTMANN, C. F.; MARTINS, F. A.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; CAMPOS, A. M.; STEFANELLO, F. M.; KASTER, M. P.; GHISLENI, G.; REGINATTO, F. H.; LENCINA, C. L. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, Estados Unidos, v. 108, p. 10-17, ago. 2014.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Estados Unidos, v. 55, p. 481-504, nov. 2000.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 8 ed. Nova York: W. H. Freeman and Company, 2010.

HIKAWCZUK, V. J.; SAAD, J. R.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GIORDANO, O. S. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **Anales de la Asociación Química Argentina**, Argentina, v. 86, p. 167, 1998.

HO, C. S.; LAM, C. W. K.; CHAN, M. H. M.; CHEUNG, R. C. K.; LAW, L. K.; LIT, L. C. W.; NG, K. F.; SUEN, M. W. M.; TAI, H. L. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Principles and clinical applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, Estados Unidos, v. 24, p. 3-12, fev. 2003.

HONG, J.; SMITH, T. J.; HO, C.; AUGUST, D. A.; YANG, C. S. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. **Biochemical Pharmacology**, Estados Unidos, v. 62, p. 1175-1183, mar. 2001.

HUBER, U.; MAJORS, R. E. **Principles in preparative HPLC**. Disponível em:< <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5989-6639EN.pdf>>. Acesso em: 13 de Jun de 2016. Agilent Technologies Inc., Alemanha, 2007.

JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris L.*). 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, Brasil, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Em: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. São Paulo: Editora Unicamp, 273-398, 2006.

JOSÉ-CHAGAS, F. N.; VIANNA FILHO, M. D. M.; PESSÔA, L. M.; COSTA, S. S. Aspectos químicos e ecológicos de espécimes masculinos e femininos de *Cecropia Loefl.*(Urticaceae). **Revista Virtual de Química**, Brasil, v. 6, nº 2, p. 432-452, dez. 2013.

LIN, L.; HARNLY, J. M. A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 55, p. 1084-1096, jan. 2007.

MAQUIAVELI, C. C.; SILVA, E. R.; ROSA, L. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; LUCON, J. F.; SILVA, C. G. A., CASARINI, D. E.; RONCHI, F. A.; COIMBRA, T. M. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Estados Unidos, v. 158, p. 49-57, out. 2014.

MORAIS, S. M.; LIMA, K. S. B.; SIQUEIRA, S. M. C.; CAVALCANTI, E. S. B.; SOUZA, M. S. T.; MENEZES, J. E. S.; TREVISAN, M. T. S. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Brasil, v. 15, n. 4, p. 575-582, mar. 2013.

NØRBÆK, R.; BRANDT, K.; KONDO, T. Identification of flavone C-glycosides including a new flavoniod chromophore from Barley leaves (*Hordeum vulgare L.*) by improved NMR techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 1703-1707, abr. 2000.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 64p, 2003.

OLIVEIRA, R. R.; MORAES, M. C. C.; CASTILHO, R. O.; VALENTE, A. P.; CARAUTA, J. P. P.; LOPEZ, D.; KAPLAN, M. A. C. High-speed countercurrent chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. **Phytochemical analysis**, Estados Unidos, v. 14, p. 96-99, mai. 2002.

ORTMANN, C. F.; RÉUS, G. Z.; IGNÁCIO, Z. M.; ABELAIRA, H. M.; TITUS, S. E.; DE CARVALHO, P.; ARENT, C. O.; DOS SANTOS, M. A. B.; MATIAS, B. I.; MARTINS, M. M.; DE CAMPOS, A. M.; PETRONILHO, F.; TEIXEIRA, L. J.; MORAIS, M. O. S.; STRECK, E. L.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. Enriched Flavonoid Fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul Leaves Exerts Antidepressant-like Behavior and Protects Brain Against Oxidative Stress in Rats Subjected to Chronic Mild Stress. **Neurotoxicity Research**, Nova York, jan. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12640-016-9596-6>>. Acesso em: 16 Jun. 2016.

PACHECO, N. R.; PINTO, N. C. C.; SILVA, J. M.; MENDES, R. F.; COSTA, J. C.; ARAGÃO, D. M. O.; CASTAÑON, M. N.; SCIO, E. *Cecropia pachystachya*: A species with expressive *in vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidante effects. **Biomed Research International**, New York, v. 2014, p. 1-10, abr. 2014.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G. **Introdução a Espectroscopia**. 4.ed. São Paulo: Cengage Learning. 2010.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10, 2004.

- PEREZ, J. C.; PLUMB, R.; GRANGER, J. **A new paradigm for metabolism studies: UPLC/Q-Tof.** Disponível em: <<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000953en.pdf>>. Acesso em: 14 de jun de 2016. Waters Corporation, Milford, Estados Unidos).
- PÉREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M. D.; ORTIZ, R.; SOTOMAYOR, M. A.; FERNÁNDEZ, M. A. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Estados Unidos, v. 76, n. 3, p. 279-284, ago. 2001.
- PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 200-212, 1978.
- POTT, A.; POTT, V. **Plantas do Pantanal.** 1 ed. Distrito Federal: Embrapa, CPAP, 1994.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia.** São Paulo: Premier, 327p, 1997.
- ROCHA, F. F.; LIMA-LANDMAN, M. T.; SOUCCAR, C.; TANAE, M. M.; LAPA, A. J. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneath and its constituents *in vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, Estados Unidos, v. 14, p. 396-402, mai. 2007.
- ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. Em: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. São Paulo: Editora Unicamp, 139-166, 2006.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, p. 517-544, 2000.
- SCHINELLA, G.; AQUILA, S.; DADE, M.; GINER, R.; RECIO, M. C.; SPEGAZZINI, E.; BUSCHIAZZO, P.; TOURNIER, H.; RÍOS, J. L. Anti-inflammatory apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Medica**, Nova York, v. 74, p. 215-220, jan. 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Editora UFRGS, p. 97, 1998.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis.** 6. ed. Stanford: Thomson, v. I, 2007.
- SYSTIMA, K. J.; MORAWETZ, J.; PIRES, J. C.; NEPOKROEFF, M.; CONTI, E.; ZJHRA, M.; HALL, J. C.; CHASE, M. W. Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry and phylogenetics based on RBCL, TRNL-F and NDHF sequences. **American Journal of Botany**, Reino Unido, v. 89, p. 1531-1546, set. 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

WU, L.; ZHANG, X.; XU, X.; ZHENG, Q.; YANG, J.; DING, W. Characterization of aromatic glycosides in the extracts of *Trollius* species by ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedicinal Analysis**, Estados Unidos, v. 75, p. 55-63, nov. 2012.

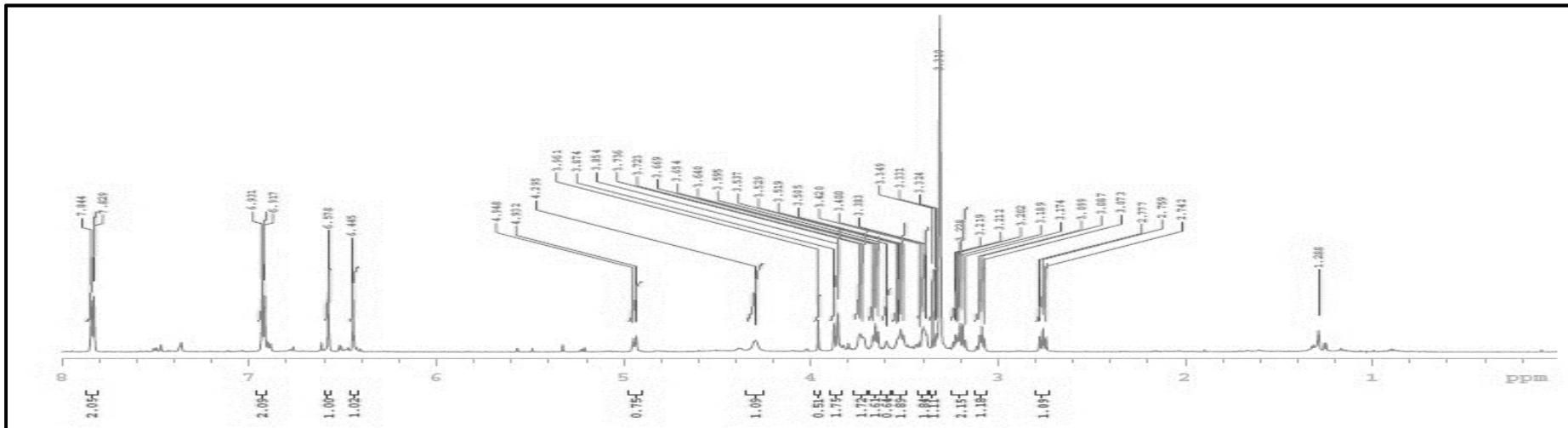
XIA, B.; BAI, L.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; XUE, M. Structural analysis of metabolites of asiatic acid and its analogue modecassic acid in zebrafish using LC/IT-MSⁿ. **Molecules**, Suíça, v. 20, p. 3001-3019, fev. 2015.

ZHAO, Y. Y.; WU, S. P.; ZHANG, Y.; LIN, R. C. Ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a sensitive and powerful technology in lipidomic. **Chemico-biological Interactions**, Estados Unidos, v. 220, p. 181-192, jul. 2014.

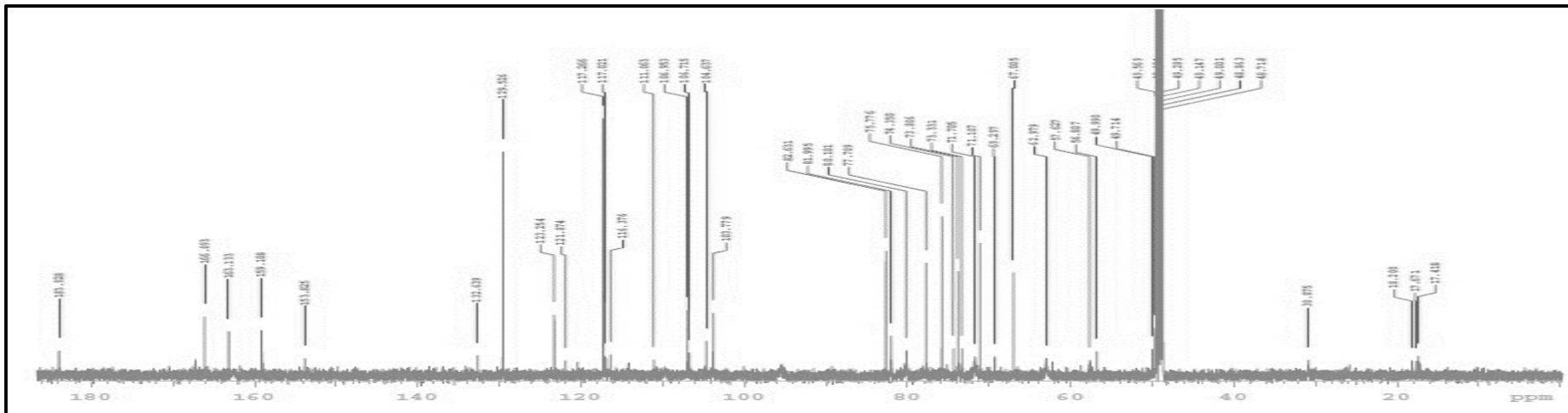
ZUANAZZI, J. A. S. **Flavonoides**. Em: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, p. 489-516, 2000.

ANEXOS

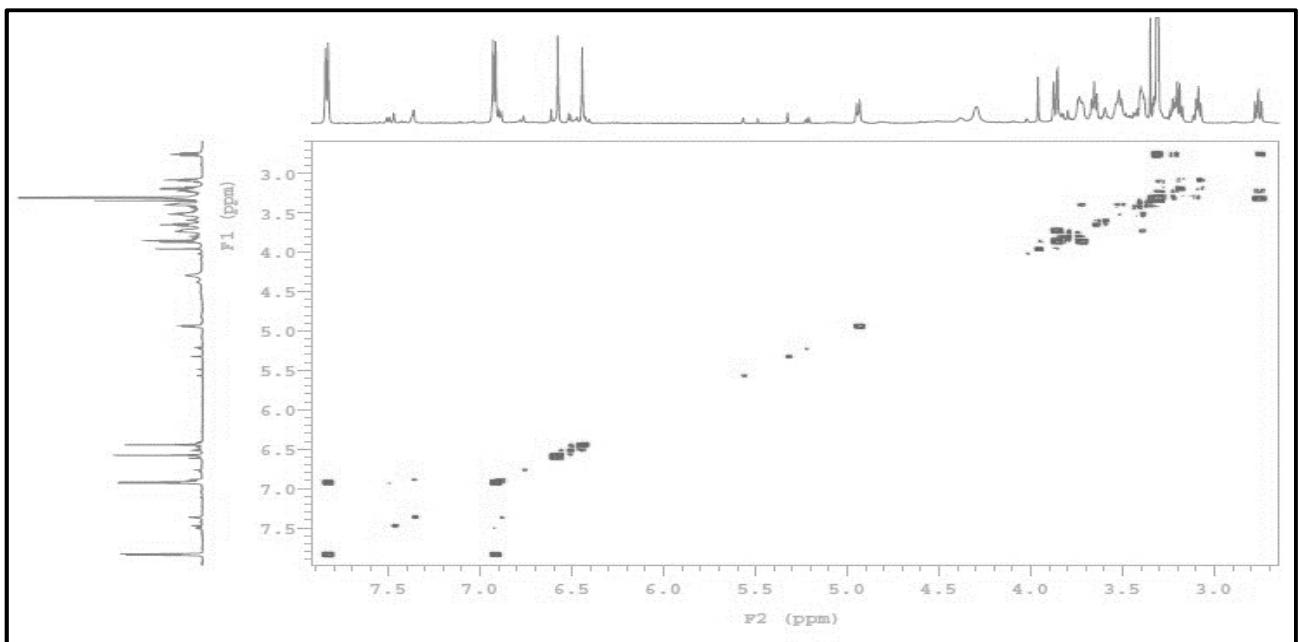
ANEXO A – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD₃OD) PARA A FRAÇÃO F₂₇₋₂₉



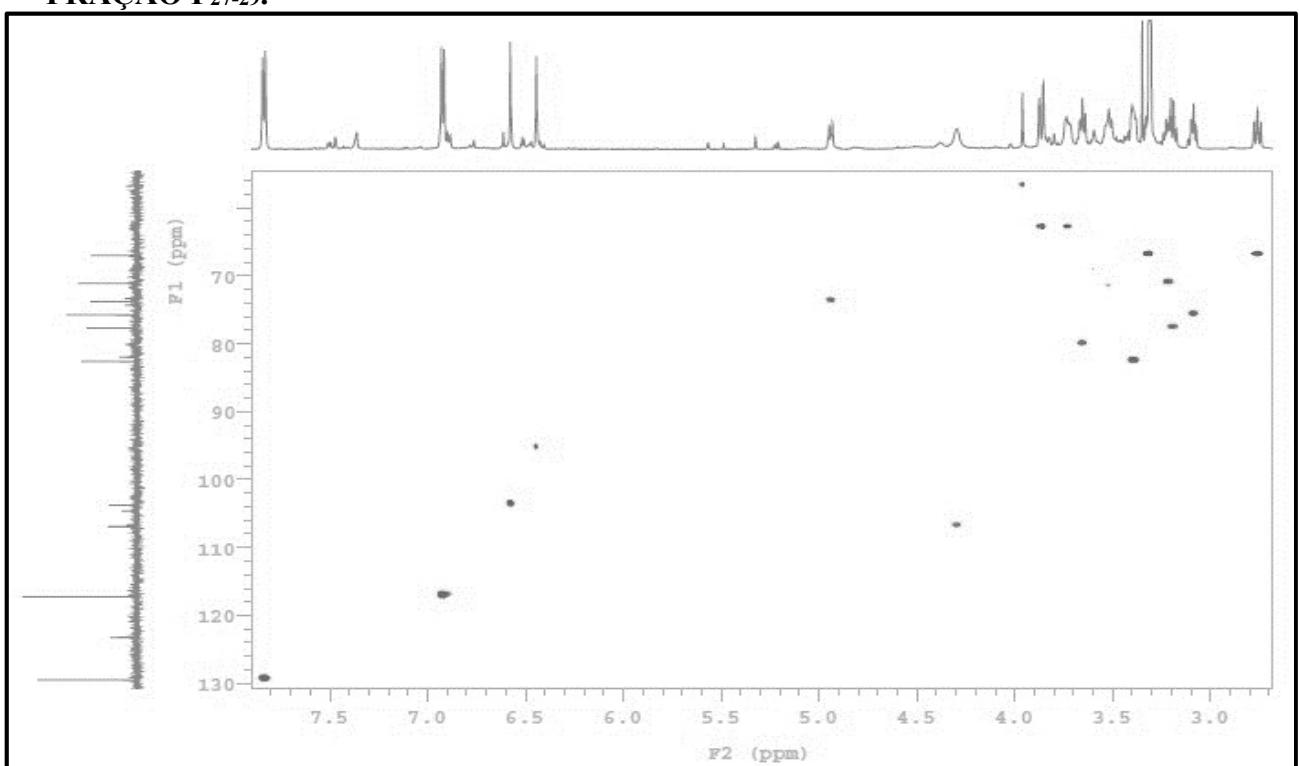
ANEXO B – ESPECTRO DE RMN ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) PARA A FRAÇÃO F₂₇₋₂₉



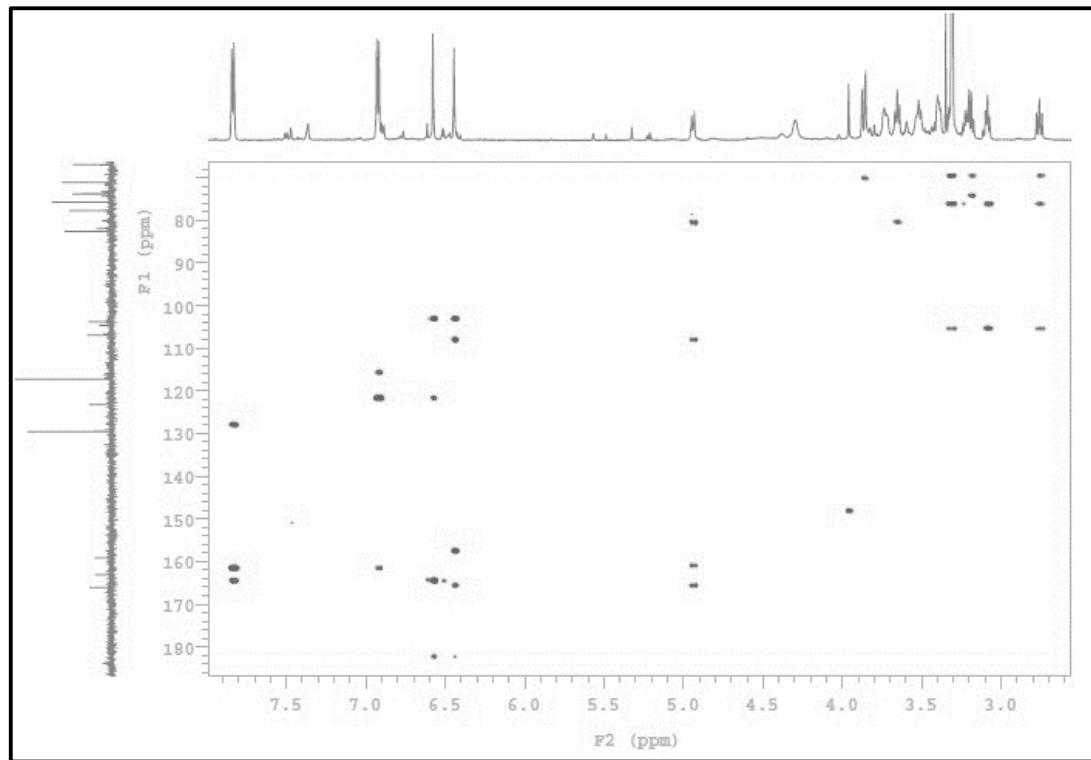
ANEXO C – ESPECTRO DE RMN ^1H x ^1H - COSY (600 x 600 MHz, CD₃OD) DA FRAÇÃO F₂₇₋₂₉.



ANEXO D –ESPECTRO DE RMN HSQC ^1H x ^{13}C (600 x 150 MHz, CD₃OD) DA FRAÇÃO F₂₇₋₂₉.

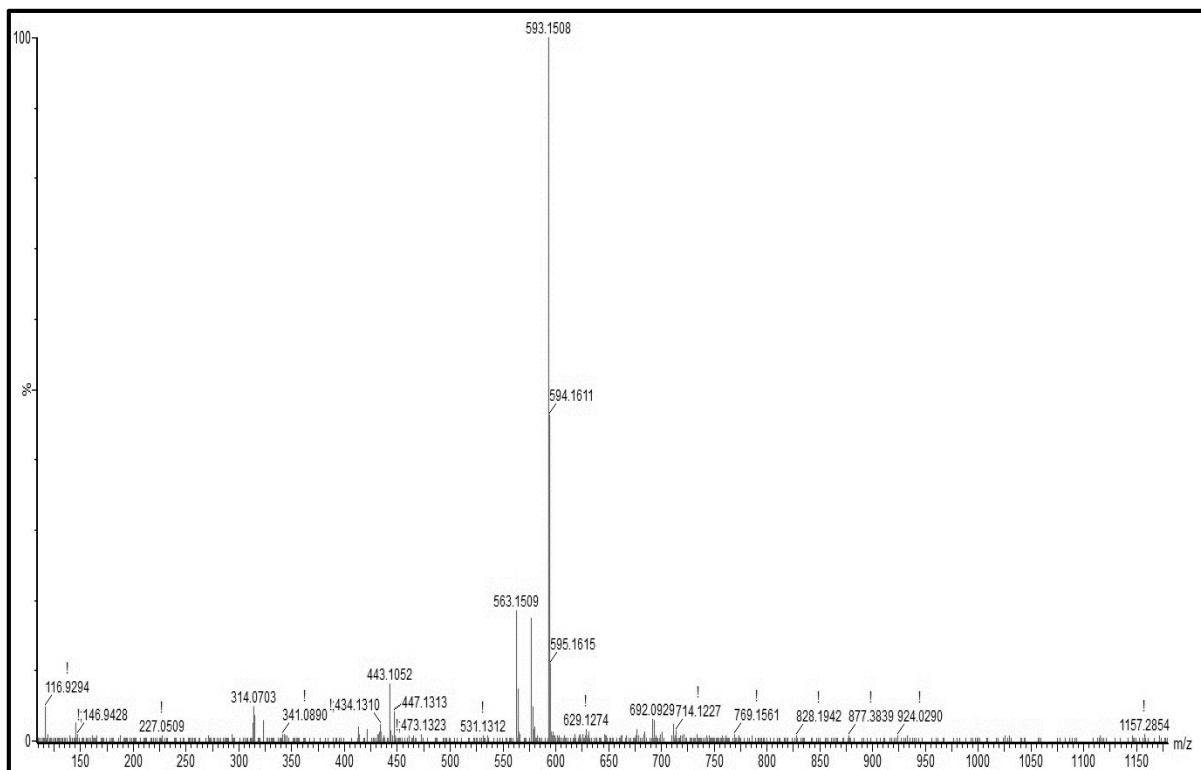


ANEXO E—ESPECTRO DE RMN HMBC ^1H x ^{13}C (600 x 150 MHz, CD₃OD) DA

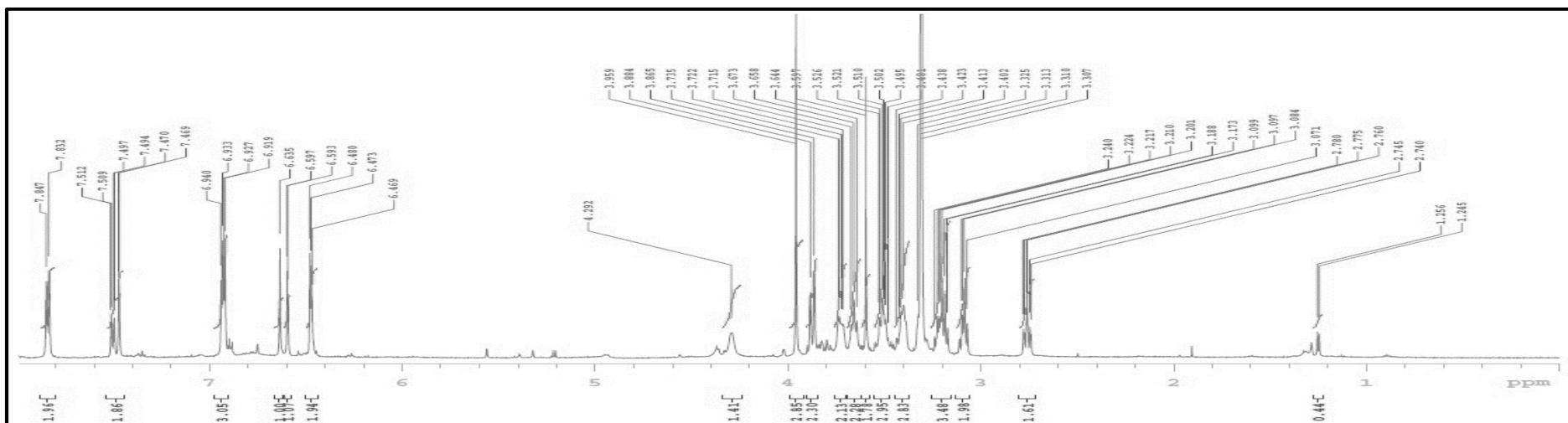


FRAÇÃO F₂₇₋₂₉

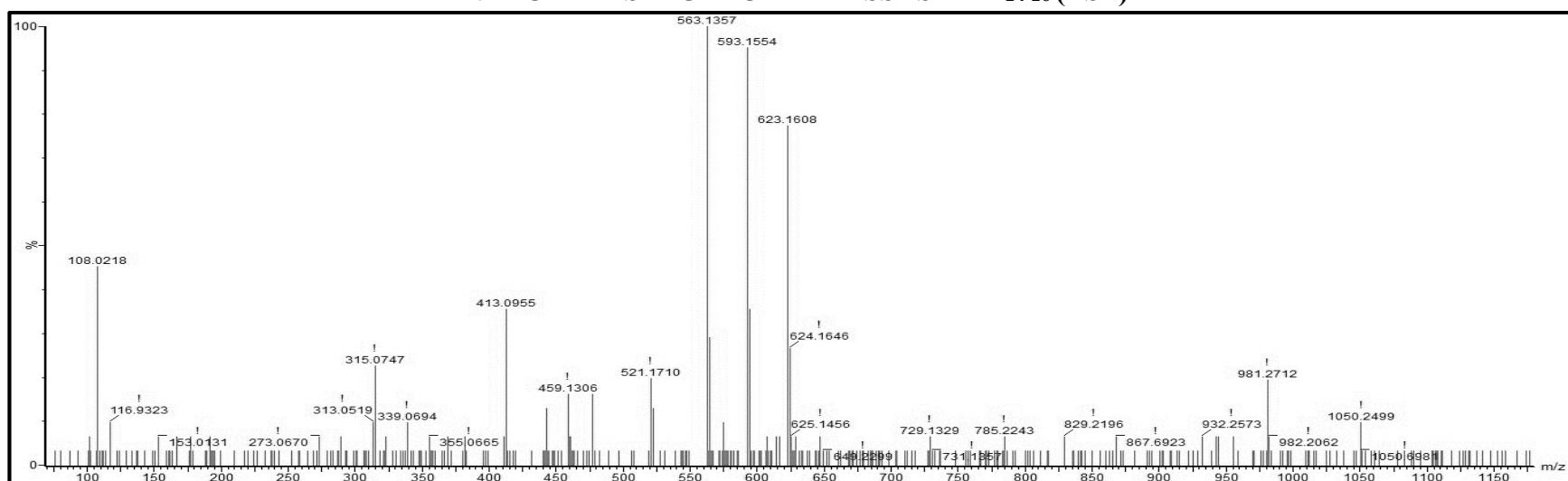
ANEXO F—ESPECTRO DE MASSAS DE F₂₇₋₂₉ (ESI⁺)



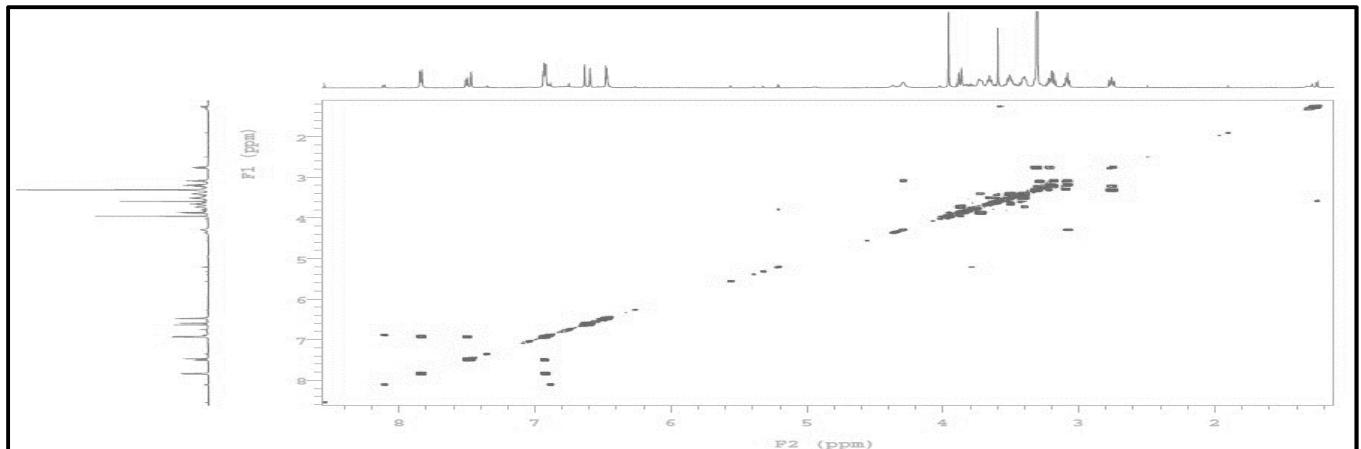
ANEXO G – ESPECTRO RMN ^1H (600 MHz, CD₃OD) DE F₂₄₋₂₆



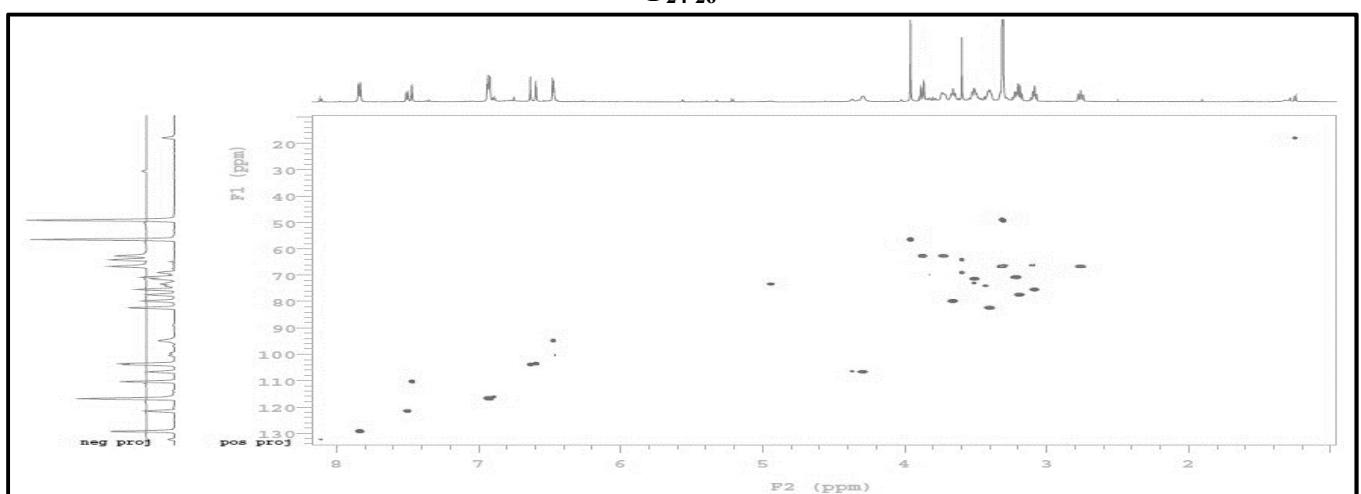
ANEXO H – ESPECTRO DE MASSAS DE F₂₄₋₂₆ (ESI⁻)



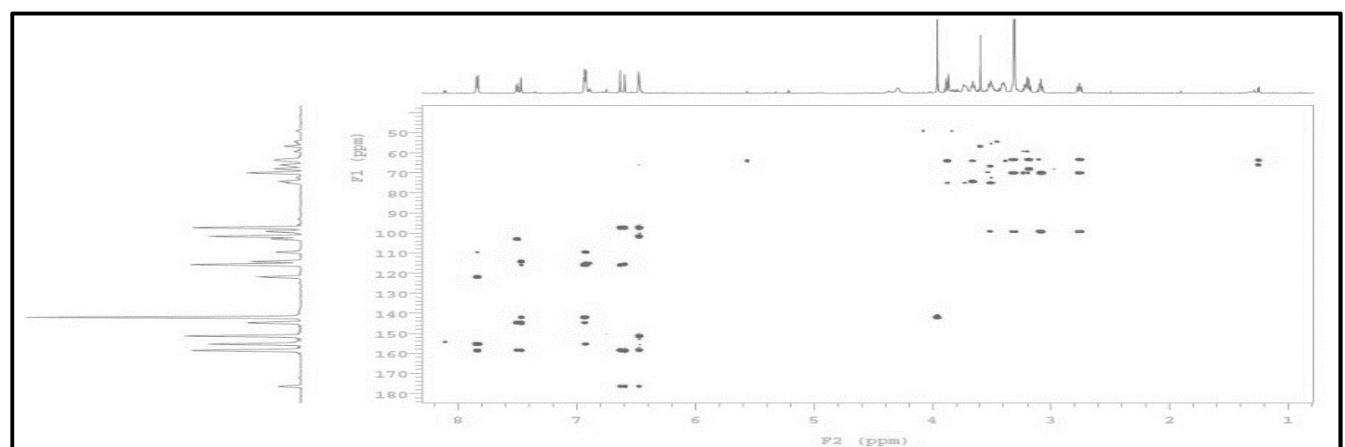
ANEXO I – ESPECTRO DE RMN ^1H x ^1H – COSY (600MHz x 600MHz, CD₃OD) DE F₂₄₋₂₆



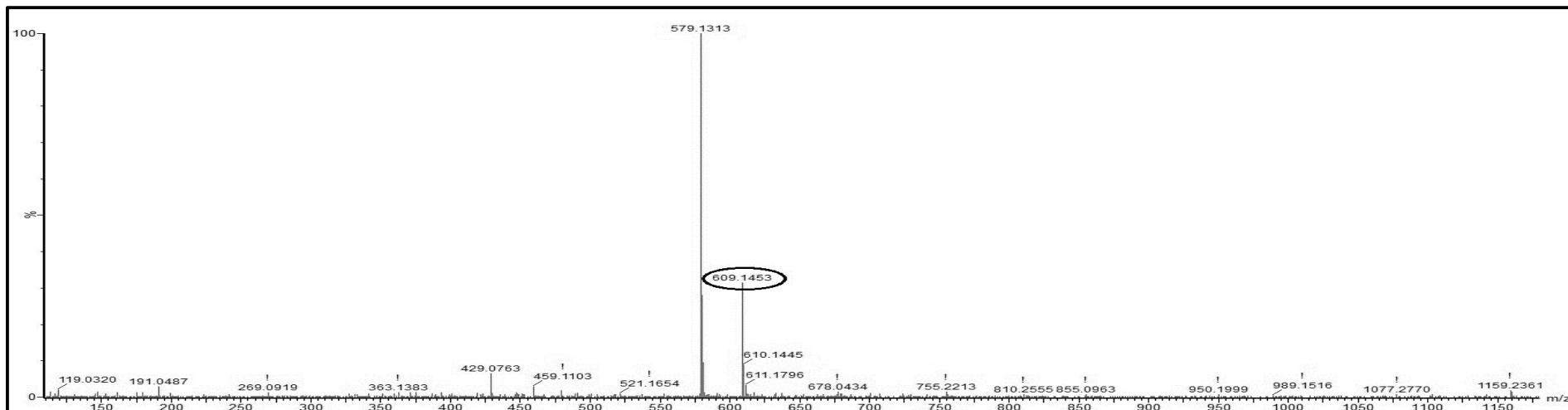
ANEXO J: ESPECTRO DE RMN HSQC ^1H x ^{13}C (600MHz x 150MHz, CD₃OD) DE F₂₄₋₂₆



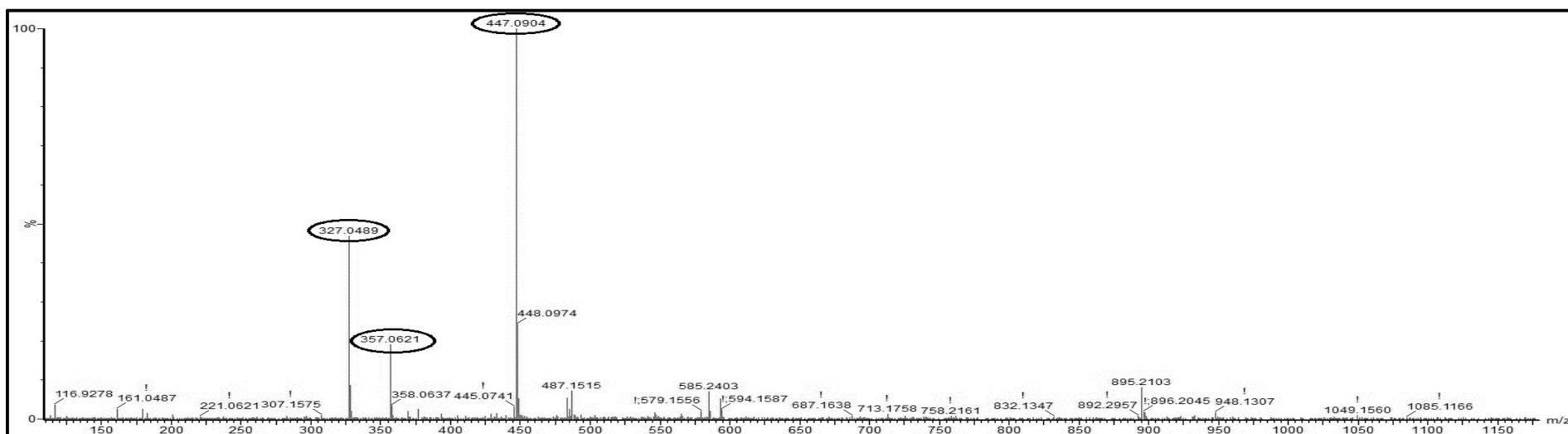
ANEXO K: ESPECTRO DE RMN HMBC ^1H x ^{13}C (600MHz x 150MHz, CD₃OD) DE F₂₄₋₂₆



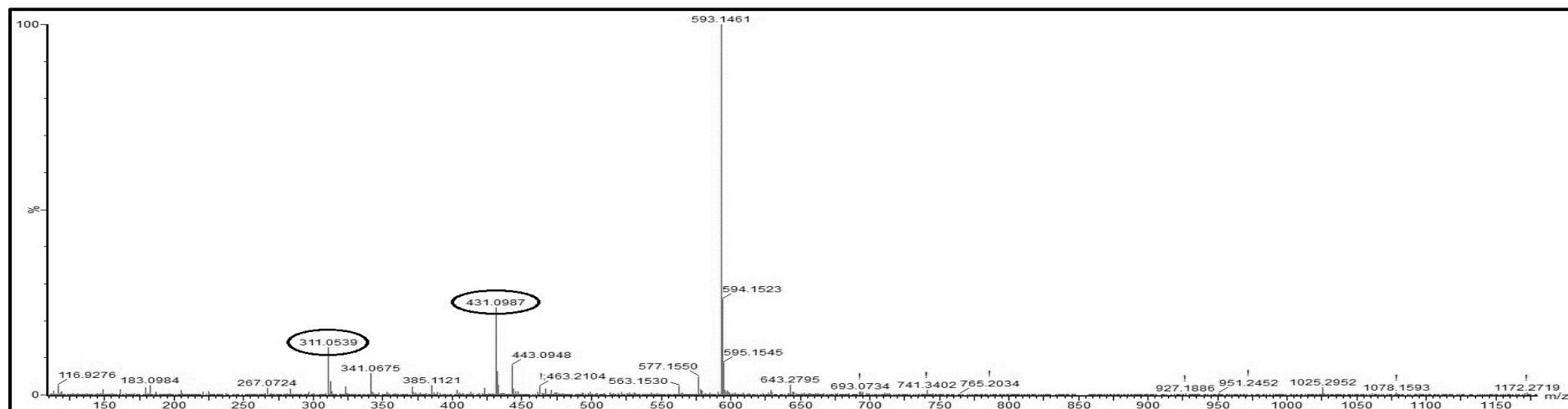
ANEXO L – ESPECTRO DE MASSAS DO PICO 1 CARACTERISTICO PARA RUTINA NO ECP-FMA



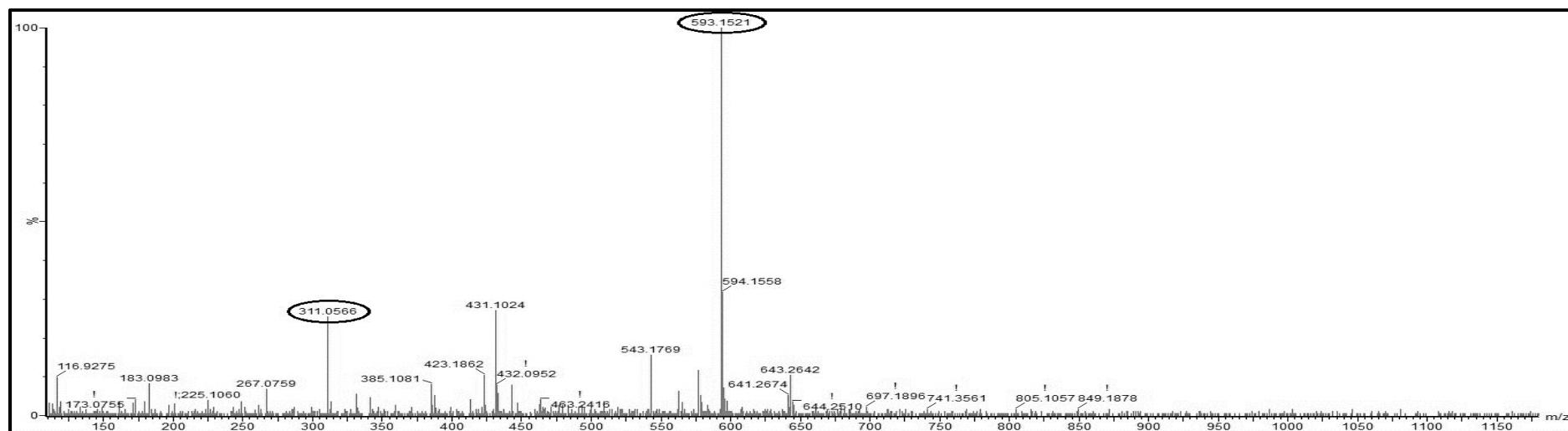
ANEXO M – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 2 CARACTERISTICO PARA ORIENTINA/ISOORIENTINA NO ECP-FMA



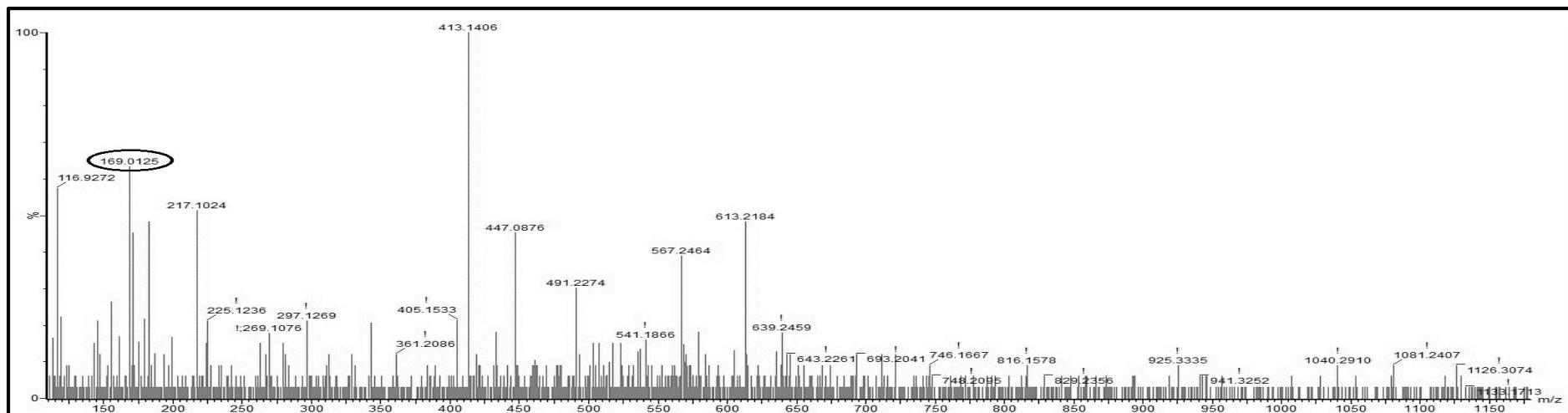
ANEXO N – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 3 CARACTERISTICO PARA VITEXINA/ISOVITEXINA NO EECP-FMA



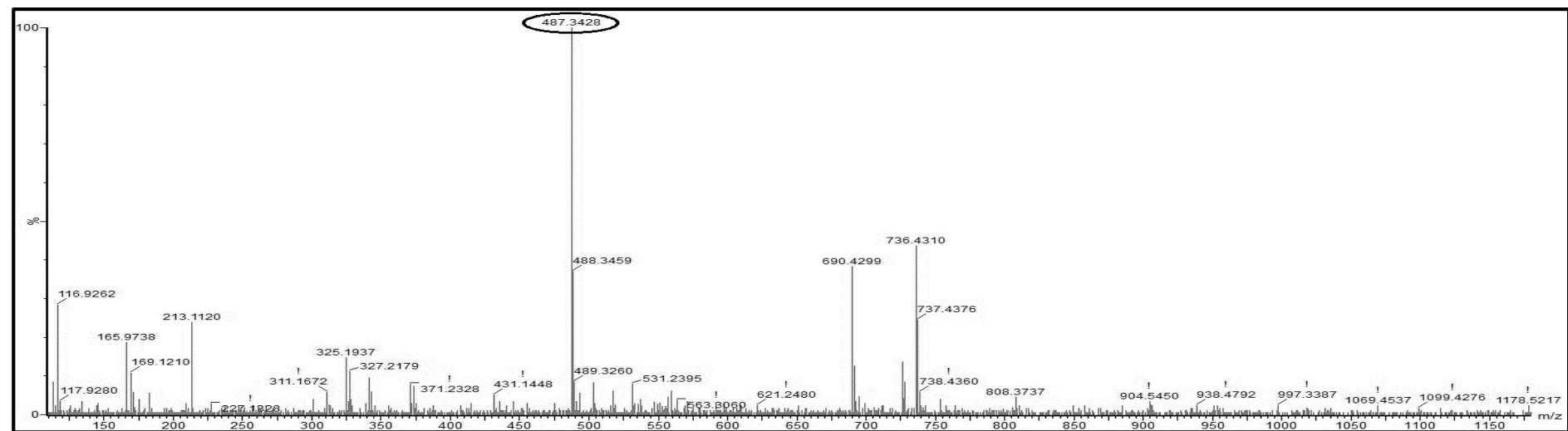
ANEXO O – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 4 CARACTERISTICO PARA 6-C-GALACTOSIL-6"-O- β -GALACTOPIRANOSILAPIGENINA NO EECP-FMA

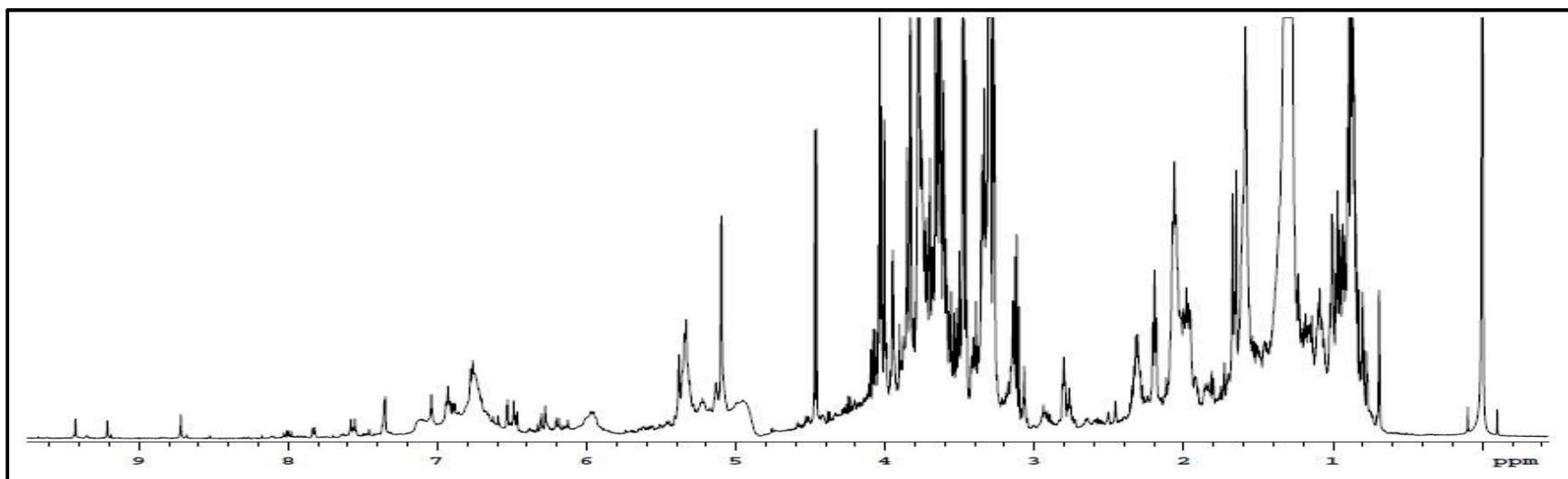
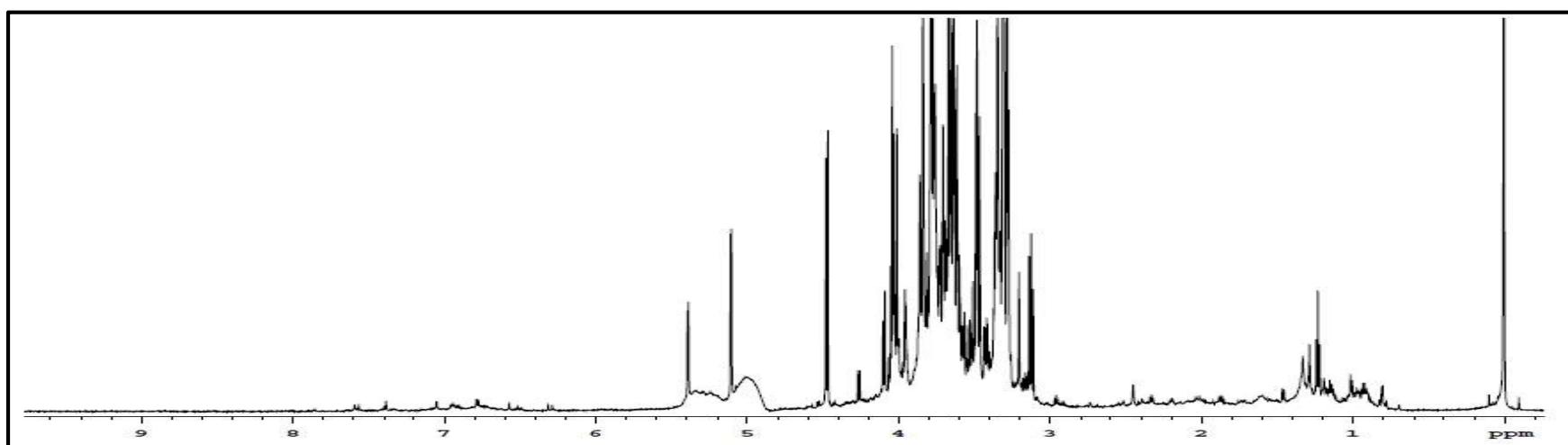


ANEXO P – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 5 CARACTERISTICO PARA ÁCIDO GÁLICO NO EECP-FMA



ANEXO Q – ESPECTRO DE MASSA DO PICO 6 CARACTERISTICO PARA ÁCIDO ARJUNÓLICO NO EECP-FMA



ANEXO R – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD₃OD) PARA O EXTRATO ETANÓLICO BRUTO**ANEXO S – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD₃OD) PARA A FASE AQUOSA DO SPE**

ANEXO T – ESPECTRO DE RMN ^1H (600 MHz, CD_3OD) PARA A FASE ORGÂNICA DO SPE (EECP-FMA)