

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

**ÓLEO VOLÁTIL E ANTIOXIDANTES DE FOLHAS DE
VIOLA MICHELII HECKEL (MYRISTICACEAE)**

ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

Manaus/AM

2005

ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

**ÓLEO VOLÁTIL E ANTIOXIDANTES DE FOLHAS DE *VIROLA MICHELII*
HECKEL (MYRISTICACEAE)**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação da Universidade do
Estado do Amazonas, para obtenção do
grau de Mestre em Biotecnologia e
Recursos Naturais.**

Orientador: Prof. Dr. Massayoshi Yoshida

Manaus

2005

ZELINA ESTEVAM DOS SANTOS TORRES

**Óleo Volátil e Antioxidantes de Folhas de *Virola michelii* Heckel
(Myristicaceae)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE DO
ESTADO DO AMAZONAS – UEA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Ciências Biológicas I

DATA DA APROVAÇÃO: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Massayoshi Yoshida
IQ-USP
(Orientador e Presidente)

Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro
Depto. Química-UFAM
(Membro)

Dra. Cecília Verônica Nunez
INPA/ UEA
(Membro)

DEDICATÓRIA

A minha **mãe**, por acreditar em mim e pela sua fortaleza como mulher, mãe e esposa. Pelas vitórias e derrotas que me ensinastes a aceitar.

Ao meu grande **pai**, por tudo que me ensinaste principalmente pelo seu caráter invejável de justiça e honestidade e por todo seu amor me dedicado.

“Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire entendimento; pois melhor é o lucro que ela dá do que o lucro da prata, e a sua renda do que o ouro.”

Provérbios 3 (13 e 14).

Agradecimento Especial:

- Ao meu orientador Dr. Massayoshi Yoshida que muito me ensinou não só pela orientação do trabalho, mas como pessoa humana na sua simplicidade e, no entanto, tão rico de conhecimentos.
- Ao Dr. Sergio Massayoshi Nunomura pela paciência, dedicação, senso de justiça e por estar sempre pronto a ajudar.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter dado saúde, força e fé para desenvolver este trabalho.

Aos meus pais Dibe e Gedeon Santos (*in memoriam*) pela minha criação, educação e tudo quem eu sou.

Ao meu esposo Eduardo pela sua compreensão, dedicação e companheirismo em todos os momentos de nossa convivência; por nosso amor e felicidade.

Aos meus filhos **Gabriel** e **João Henrique**, que constituem a razão da minha felicidade e realização como mãe.

Aos meus irmãos Ricardo, Gedeon Filho e Evandro Santos pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

A Lílian Gibson, pelas palavras de incentivo e dedicação.

A Christiane Santos pela compreensão e interesse em ajudar sempre.

À D. Janete e Jorge Torres pela compreensão em todos os momentos de dificuldades.

A minha equipe 33 – Equipe Nossa Senhora Mãe do Infinito Amor pela compreensão, incentivo e orações.

Ao Conselheiro Espiritual da equipe 33, o Padre Carlos Góes pelas orações e palavras de fé.

Aos meus colegas de turma Caroline Oliveira, Simone Carvalho, Cleuner Freitas, Paulo Magalhães, Amílcar Ferreira e Carlos Carneiro pelos momentos de estudo.

À doutoranda Ana Frazão Teixeira, que muito me ajudou na realização da minha dissertação, pela amizade e pelos momentos de alegria.

Ao doutorando Carromberth Carioca Fernandes pelo incentivo.

À doutoranda Ana Cristina pelo apoio nos momentos de dificuldades.

A Dra. Cecília Verônica Nunez e ao Dr. Luiz Rubens Piedade pelo apoio.

A Universidade do Estado do Amazonas – UEA pela criação do curso de Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais, em especial, a Sr^a Iselma da Silva Teixeira (Secretária do MBT) e a Dra. Marlene Freitas da Silva (*in memoriam*), pela dedicação e empenho em atender aos anseios dos alunos.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, pela realização da análise do óleo volátil e pela obtenção dos espectros de RMN e, em especial, ao Luiz Carlos Roque pela incansável colaboração.

A Universidade de São Paulo – USP em especial, a doutoranda Ingrid Elida Collantes Díaz pela realização dos espectros de RMN.

Ao Laboratório de Pesquisas e Ensaio de Combustíveis - LAPEC da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pela realização dos Espectros de Massas.

A Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais - CPPN coordenação da qual faço parte como servidora e desenvolvo minhas análises laboratoriais pela liberação para o mestrado.

Aos colegas Técnicos da CPPN pela amizade e convívio.

A todos servidores da CPPN pelo apoio.

Aos alunos do PIBIC e Pós-Graduação da Coordenação (CPPN), pela amizade.

Ao Dr. Ézio Sargentini, Coordenador da CPPN na época da minha liberação, pelos diálogos de incentivo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela oportunidade e incentivo em qualificar seus funcionários.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

AGRADEÇO

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico de *Virola michelii* Heckel conhecida como ucuúba-preta, que ocorre na Amazônia, cujas folhas têm sido usadas na medicina popular como emplastos à quente sobre a pele, para reduzir infecções causadas por fungos.

As folhas frescas fragmentadas de *Virola michelii*, submetidas a uma hidrodestilação, forneceram um óleo volátil, que analisado pelo sistema cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas permitiu a identificação de um monoterpene e dezessete sesquiterpenos.

O extrato etanólico das folhas de *V. michelii* submetido ao fracionamento por partição de solventes em acetato de etila e metanol/água rendeu frações, que por evaporação do solvente, deram origem aos respectivos resíduos. Estes, submetidos a técnicas cromatográficas, permitiram o isolamento de três substâncias, sendo duas lignanas furofurânicas, “eudesmina” {rel-(1S,2R,5R,6S)-2,6-di-(3,4-dimetoxifenil)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano} e “filigenol” {rel-(1S,2S,5R,6R)-6-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-2-(3,4-dimetoxifenil)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano} e um fitosterol, o β -sitosterol.

A elucidação estrutural foi baseada na interpretação dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C e espectro de massas.

As lignanas furofurânicas isoladas foram submetidas a testes para atividades antioxidantes com o radical DPPH em ensaio fotométrico. A substância filigenol se mostrou mais ativa que a substância eudesmina, em ensaio que empregou como padrão a quercetina.

SUMMARY

This work describes the phytochemical study of *Virola michelii* Heckel that occur in the Amazon Region popularly known as ucuúba-preta and its leaves are used in the popular medicine as hot poultice on the skin, to treat infections caused by fungus.

The fresh smashed leaves of *Virola michelii* submitted to the hydrodistillation afforded a volatile oil, which analyzed through coupled system gas chromatograph to mass spectrometer evidenced the occurrence of one monoterpene and of seventeen sesquiterpenes.

The ethyl alcohol extract of *V. michelii* leaves was fractionated by ethyl acetate and aqueous methanol partition, followed by solvent evaporation of the fractions, yielded the respective residues. The ethyl acetate residue submitted to chromatographic techniques, allowed the isolation of three compounds, two furofuran lignan, “eudesmin” (rel-(1S,2R,5R,6S)-2,6-di-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane) and “phillygenol” rel-(1S,2S,5R,6R)-6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane and one phytosterol, the β -sitosterol.

The structural determination was based on the interpretation of the ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra and mass spectra.

The isolated furofuran lignans were submitted to test for antioxidant activity with DPPH radical followed by photometric detection. It was observed that the phillygenol was more active than eudesmin, in the assay which quercetin was used as standard.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
SUMMARY	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE ESQUEMAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE TABELAS	xi
SUMÁRIO	xii
INTRODUÇÃO	1
1.1 Família Myristicaceae	2
1.2 Trabalhos Realizados Anteriormente com Myristicaceae	3
1.3 Lignóides em Myristicaceae	5
1.3.1 Metabólitos secundários encontrados em <i>Virola</i>	11
1.4 <i>Virola michelii</i> Heckel	12
1.4.1 Descrição Botânica	12
1.4.2. Distribuição Geográfica	13
1.4.3. Uso Popular	14
1.4.4. Composição Química de <i>V. michelii</i> Heckel	14
1.4.4.1. Cascas do caule	14
1.4.4.2. Sementes	15
1.4.4.3. Folhas	16

1.5 Atividades Biológicas de <i>V. michelii</i>	21
1.6 Ensaio de Avaliação da Atividade Antioxidante	22
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Materiais, Equipamentos e Instrumentos Utilizados	24
3.2. Material Utilizado em Fitoquímica.....	26
3.3 Coleta de Material Vegetal	27
3.4 Processamento de Material Vegetal	27
3.5 Partição do Extrato Hexânico	28
3.5.1 Partição do Extrato Etanólico	29
3.5.2. Isolamento das Lignanas Furofurânicas das Folhas de <i>V. michelii</i>	31
3.5.3 CCDP da Fração FP1	31
3.5.4. CCDP da Fração FP3	32
3.5.5 CCDP da Fração FP5	33
3.6 Estudo do Óleo Volátil de <i>V. michelii</i>	35
3.6.1. Extração do Óleo das Folhas de <i>V. michelii</i>	36
3.7 Análise da Atividade Antioxidante em CCD	37
3.7.1 Análise da Atividade Antioxidante em Espectrofotômetro	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Óleo Volátil de <i>V. michelii</i>	39
4.2. Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas	45
4.2.1 Lignana FP5-3	45
4.2.2 Lignana FP5-2	55
4.2.3 Esteróide FP3-1	67
4.3 Resultados da Atividade Antioxidante	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	deslocamento químico
DPPH	2,2 – difenil- 1- picril- hidrazila
μg	micrograma
μL	microlitro
$[\text{M}^+]$	íon molecular
AcOEt	acetato de etila
CC	coluna cromatográfica
CCD	cromatografia em camada delgada
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CG	cromatografia gasosa
CG/EM	cromatografo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas
COSY	“Correlated Spectroscopy”
CS_{50}	capacidade seqüestrante de inibição em 50%
<i>d</i>	dubleto
DCM	diclorometano
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo, duplo dubleto
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
DP	desvio padrão
EA	extrato aquoso
EM	espectro de massas
Ext.	extrato
Fr.	fração
Gu	guaiacila (4-hidroxi-3-metoxifenila)
HBBD	Hydrogen Broad Bandening Decoupled
Hex	Hexano

IR	índice de retenção
<i>J</i>	constante de acoplamento
<i>m</i>	massa
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	razão massa/carga íon
MeOH	metanol
NP/PEG	reagente natural products/poliethylene glycol
OMe	metoxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	partes por milhão
Ref.	Referência
R_F	fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>s</i>	singleto
<i>s/</i>	singleto largo
<i>t</i>	tripleto
TMS	tetrametilsilano
UV-VIS	Ultravioleta-visível
Ve	veratril (3,4-dimetoxifenila)

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de acoplamento Oxidativo de álcool coniferílico	7
Esquema 2: Obtenção dos extratos por extração em Soxhlet	28
Esquema 3: Partição do Extrato Hexânico	29
Esquema 4: Partição do Extrato Etanólico	29
Esquema 5: CCD Preparativa da fração FP1	32
Esquema 6: CCD Preparativa da fração FP3	32
Esquema 7: CCD Preparativa da fração FP5.....	33
Esquema 8: Fluxograma da Extração do óleo das Folhas de <i>V. michelii</i>	36
Esquema 9: Procedimento Geral do Trabalho Fitoquímico.....	34
Esquema 10: Estrutura do DPPH.....	37
Esquema 11: Fragmentações da substância designada FP5-3 (eudesmina)	53
Esquema 12: Fragmentações da substância FP5-2 (filigenol)	65
Esquema 13: Fracionamento do extrato e resultados de ensaio com DPPH	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica de <i>Virola michelii</i> árvore de <i>V. michelii</i>	13
Figura 2: Detalhes de <i>Virola michelii</i>	15
Figura 3: Frutos de <i>V. michelii</i>	15
Figura 4: Folhas de <i>V. michelii</i>	16
Figura 5: Placa em CCD com revelador DPPH	37
Figura 6: Cromatograma do óleo de <i>Virola michelii</i>	40
Figura 7: Acima espectro de massas do cromatograma do óleo essencial de <i>V. michelii</i> correspondente ao composto biciclogermacreno e abaixo o espectro do padrão do biciclogermacreno da Biblioteca Nist 62.....	41
Figura 8: Estrutura da eudesmina (FP5-3)	45
Figura 9: Espectro de Massas da substância eudesmina	46
Figura 10: Espectro de RMN de ^1H do FP5-3 (300 MHz, CDCl_3)	47
Figura 11: Ampliação da região aromática da substância FP5-3 (500 MHz em CDCl_3)	48
Figura 12: Ampliação da região de δ 4,1 a 4,9 ppm (RMN ^1H , 500 MHz e CDCl_3)	49
Figura 13: Ampliação da região de δ 4,1 a 4,9 ppm (RMN ^1H , 500 MHz e CDCl_3)	49
Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C (HBBD e DEPT 135) da substância FP5-3 (125 MHz e CDCl_3).....	51
Figura 15: Alguns isômeros de lignanas furofurânicas simétricas	54

Figura 16: Possibilidades configuracionais de lignanas furofurânicas	54
Figura 17: Estrutura da substância FP5-2 (filigenol)	55
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da substância FP5-2 (500 MHz e CDCl_3).....	56
Figura 19: Ampliação da região aromática de RMN ^1H de filigenol (500 MHz e CDCl_3)	57
Figura 20: Espectro de RMN ^1H com ampliação do na região de 5,6 e 4,0 ppm (500 MHz e CDCl_3).....	58
Figura 21: Ampliação da região de δ 2,9 e 4,2 ppm do espectro de RMN de ^1H de FP5-2 ..	58
Figura 22: Espectro de gCOSY para FP5-2 (500 MHz, CDCl_3).....	60
Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C do filigenol (CDCl_3 ; 125 MHz)	63
Figura 24: Espectro de massas da substância filigenol.....	65
Figura 25: Configuração do anel furofurânico de FP5-2.....	66
Figura 26. Estrutura da substância β -sitosterol	67
Figura 27. Ampliação do espectro de RMN ^1H na região de δ 2,30 a 0,20	68
Figura 28 - Espectro de RMN de ^1H do β -sitosterol (CDCl_3 ; 300 MHz)	69
Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C do β -sitosterol (CDCl_3 ; 75 Hz).....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Determinação de CS_{50} da quercetina	73
Gráfico 2: Determinação da CS_{50} do extrato etanólico	74
Gráfico 3: Determinação da CS_{50} da fração hidroalcoólica	75
Gráfico 4: Determinação da CS_{50} da fração AcOEt	76
Gráfico 5: Determinação da CS da fração 5	77
Gráfico 6: Determinação da CS_{50} da eudesmina	78
Gráfico 7: Determinação da CS_{50} do filigenol	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição de flavonóides em Myristicaceae	5
Tabela 2: Lignanas biologicamente ativas	9
Tabela 3: Substâncias isoladas e derivadas de <i>Virola michelii</i>	17
Tabela 4: Análise de frações com diferentes reveladores	30
Tabela 5: Substâncias identificadas por CG-EM no óleo volátil de <i>V. michelii</i>	39
Tabela 6: Dados de RMN de ¹ H da substância FP5-3 e eudesmina	50
Tabela 7: Dados de RMN de ¹³ C da substância FP5-3 (75 MHz) e da eudesmina	52
Tabela 8: Correlações observadas no espectro de gCOSY (500 MHz, CDCl ₃) de FP5-258	
Tabela 9: Dados de RMN de ¹ H da substância FP5-2 , filigenol e silvatesmina.....	61
Tabela 10: Dados de RMN de ¹³ C da substância FP5-2 e do filigenol	64
Tabela 11: Dados de RMN de ¹ H da substância FP3-1 comparado com a literatura ...	68
Tabela 12: Dados de RMN de ¹³ C da substância FP3-1 comparado com a literatura...	71
Tabela 13: Ensaio da atividade antioxidante da quercetina com DPPH	73
Tabela 14: Ensaio da Atividade antioxidante do extrato etanólico com DPPH	74
Tabela 15: Ensaio da Atividade Antioxidante da fração hidroalcoólica com DPPH.....	75
Tabela 16: Ensaio da atividade antioxidante da fração AcOEt com DPPH	76
Tabela 17: Atividade Antioxidante da Fração 5 com DPPH	77
Tabela 18: Atividade Antioxidante da Substância eudesmina com DPPH	78
Tabela 19: Atividade Antioxidante da Substância filigenol com DPPH	79
Tabela 20: Resultados da CS ₅₀ dos extratos, frações e substâncias isoladas	80

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é estimado que aproximadamente 88% da população de países em desenvolvimento fazem uso da medicina tradicional, principalmente de extratos de plantas (CARVALHO et al., 2004). As substâncias sintéticas além de serem mais caras, às vezes não são bem toleradas pelo organismo humano. Assim as plantas medicinais têm sido mais procuradas e aceitas por parte da população, pois são menos agressivas ao organismo, e ainda, mais econômicas, trazendo com isso, um benefício à população.

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, ou seja, as plantas medicinais e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos, que naquela época pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular.

No início do século passado, esses recursos começaram a ser estudados com os instrumentos científicos da época e se estabeleceu, gradativamente, a utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos” que podem ser denominados produtos naturais ou metabólitos secundários de plantas.

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos da excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Hoje já se sabe que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas no mecanismo de defesa contra herbívoros e microorganismos, na proteção contra raios UV, na atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, na alelopatia (interação planta-planta) e também na elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (WINK, 1990).

Freqüentemente são obtidos moléculas com novos mecanismos de ação a partir de produtos naturais as quais, graças aos avanços tecnológicos são isolados através de técnicas cromatográficas e suas estruturas elucidadas, empregando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Gasosa (CG) associada à Espectrometria de Massas (EM).

O presente trabalho tem como objetivo contribuir ao aproveitamento racional e auto-sustentável da biodiversidade amazônica, visando desenvolver produtos biotecnológicos (medicamentos ou insumos) com base na composição química estabelecida através de elucidação estrutural das substâncias isoladas.

1.1. Família Myristicaceae

A família Myristicaceae compreende 18 gêneros e aproximadamente 400 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo – Ásia, Madagascar, África e América do Sul e Central. 5 gêneros são endêmicos das Américas: *Virola*, *Iryanthera*, *Compsonera*, *Osteophloeum*, e *Dialyanthera* (Rodrigues, 1980).

Segundo Rodrigues (1980), *Virola* é um gênero circunscrito apenas à flora neotropical. Dos seis gêneros de Myristicaceae próprios da América, é o mais amplamente disperso. Sua distribuição vai da Guatemala e Antilhas Menores à Bolívia e Brasil Meridional (Rio Grande do Sul) e da costa ocidental da Colômbia e Equador. O maior número de espécies está na bacia amazônica. O termo “virola”, escolhido por Aublet para denominação do seu novo *taxon*, foi tirado do nome vulgar de *Virola sebifera*, usado pelos índios *Sinemari* da Guiana Francesa. O gênero *Virola* será o de interesse para o estudo proposto.

1.2 Trabalhos Realizados Anteriormente com Myristicaceae

As primeiras investigações fitoquímicas em Myristicaceae da América do Sul se basearam nas informações etnobotânicas onde espécies como *V. theiodora*, *V. calophylla* e *V. elongata* foram descritas como fontes para a preparação de rapés alucinogênicos e venenos de flechas por tribos indígenas da Amazônia. A literatura registra ainda a utilização de várias partes da planta com a finalidade medicinal (AGURELL et al. 1969; SCHULTES, 1979; SCHULTES & HOLMSTED, 1971, MACRAE & TOWERS, 1984; GOTTLIEB, 1979).

Estudos fitoquímicos nestas espécies revelaram à presença de alcalóides triptamínicos e lignanas, respectivamente como as substâncias responsáveis pelos efeitos alucinogênicos e antifúngicos. Desde então, diversas classes de metabólitos secundários têm sido reveladas nas diferentes partes da planta. Flavonóides, como flavanas e 1,3-diarilpropanóides, são restritos à madeira do tronco de várias espécies de *Virola* (GOTTLIEB et al., 1973; KIJJOA et al., 1981). Os diarilpropanóides virolano e virolanol foram detectados em *V. multinervia*, *V. venosa*, *V. divergens*, *V. melinonii*, *V. pavonis* e *V. surinamensis*, e, considerados como ausentes em *V. calophylla*, *V. elongata* e *V. multicostata* (GOTTLIEB et al., 1973).

A partir de 1976, Gottlieb e Yoshida começaram a desenvolver no Laboratório de Química de Produtos Naturais da USP trabalhos fitoquímicos com madeiras dos troncos,

folhas e frutos, de espécies de Myristicaceae, e, descreveram como metabólitos secundários principais os lignóides, constituídos de lignanas e de neolignanas. Tais espécies são árvores, que ocorrem com grande frequência na Amazônia. Constatação importante é o acúmulo de lignóides em concentrações muito elevadas nos frutos quando comparadas àquelas observadas nos tronco ou em folhas (LOPES et al., 1983; KATO et al., 1990; KATO et al., 1992).

Segundo dados etnobotânicos os índios Waiãpi tratam os doentes acometidos de malária, por inalação de componentes voláteis de folhas de *V. surinamensis* coletadas em determinadas épocas do ano. Os óleos foram obtidos de folhas coletadas em diferentes estações do ano e em diferentes horas do dia, e, analisados através do sistema cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. Os resultados mostraram variações sazonais e circadianas de seus constituintes. Observou-se que o nerolidol, um constituinte do óleo essencial da plântula na concentração de 100 µg/mL interrompeu 100% a passagem de trofozoíta do *Plasmodium falciparum* para o estágio de esquizonte (LOPES et al., 1997, 1999-b).

Quanto à função de metabólitos secundários nas sementes de Myristicaceae, existem evidências indiretas relacionadas à atividade antioxidante para ácidos graxos saturados e insaturados. Das sementes dos gêneros *Iryanthera* tem sido isolado tocotrienóis, que apresentaram atividade antioxidante superior a vitamina E (BARROS, 1993). Os flavonóides isolados de *I. sagotiana* também apresentaram atividade antioxidante (DAVINO et al., 1998).

Os extratos das folhas, dos talos e das raízes de *Virola surinamensis* forneceram através de fracionamento por Chromatotron seguido de Cromatografia Líquida Preparativa de Alta Eficiência (CLAE), os compostos sitosterol, estigmasterol, jruenolídeo E, *epi*-jruenolídeo C, galbelgina, veraguensina, irieliptina B, virolina, biochanina A, α ,2-diidrox-

4,4-dimetoxidiidrochalcona, 7-hidroxi flavona, ácido 9-(3,4-metilenodioxifenil)-nonanóico e ácido 13-(3,4-metilenodioxifenil)-tridecanóico (LOPES et al., 2004).

Segundo Valderrama (2000), a distribuição de flavonóides em Myristicaceae mostrada na tabela 1, tem aumentado durante duas últimas décadas e diferentes tipos de flavonóides têm sido isolados.

Tabela 1
Distribuição de flavonóides em Myristicaceae

Espécie de Myristicaceae	Flavonóides
<i>I. polyneura</i>	Chalconas
<i>I. polyneura</i> , <i>V. surinamensis</i> , <i>V. carinata</i>	Flavanonas
<i>V. flexuosa</i> ; <i>V. venosa</i> ; <i>V. surinamensis</i> ; <i>V. michelii</i> .	Flavonas
<i>I. sagotiana</i> ;	Diidroflavonois
<i>Otoba parvifolia</i>	Flavonóis Flavanas
<i>V. elongata</i> ; <i>M. fragrans</i>	Flavananol
<i>Virola</i> , <i>Iryanthera</i> e <i>Knema</i>	1,3-diarilpropanos 1,3-diaril-2-propanóis Diidrochalconas Isoflavonas pterocarpanos

1.3 Lignóides

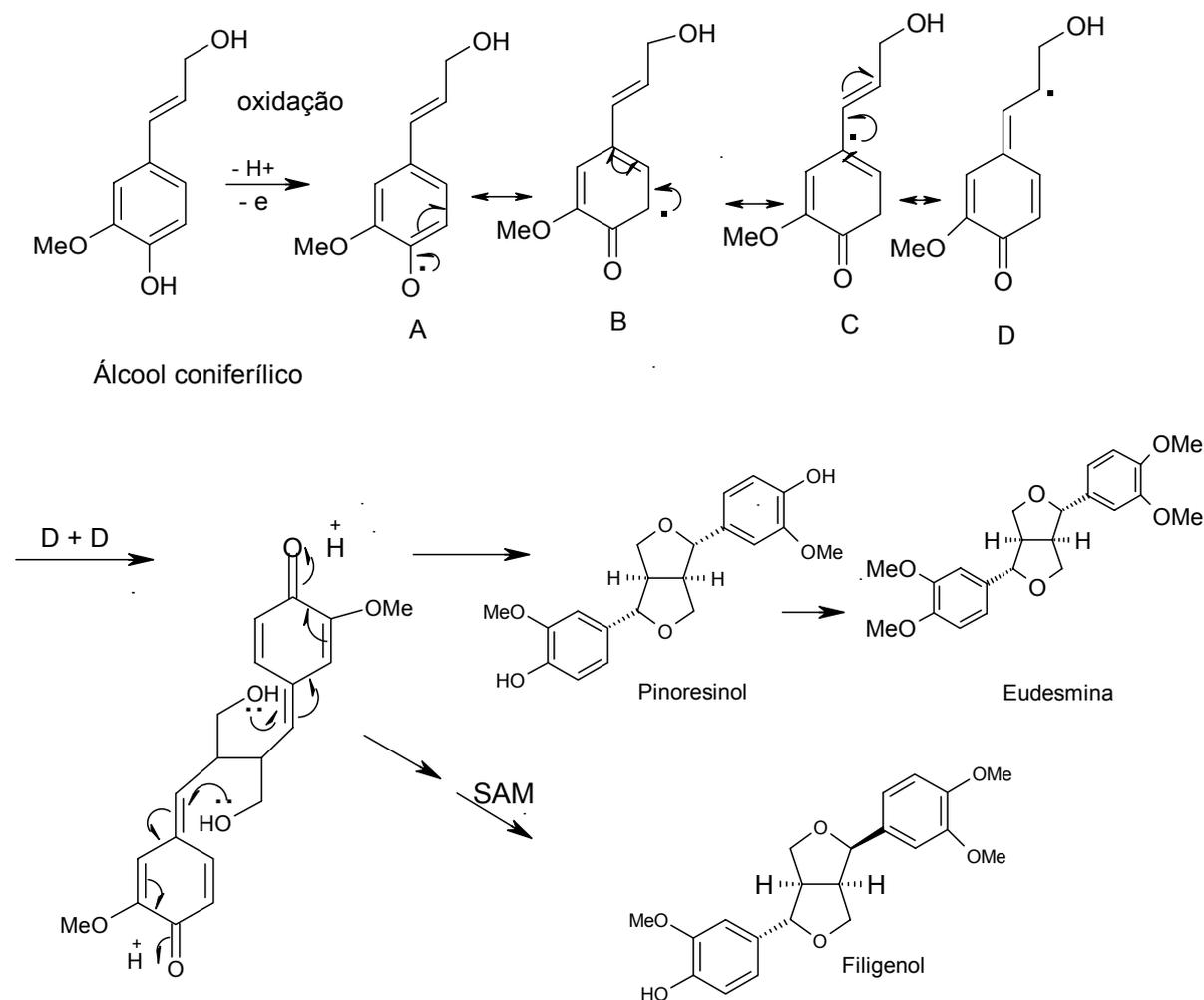
Espécies de Myristicaceae acumulam uma grande variedade de lignóides, que despertam grandes interesse, não apenas devido a sua grande diversidade estrutural, mas principalmente devido à variedade de atividades biológicas a eles atribuídos (MACRAE, 1984; AYRES & LOIKE, 1990). Segundo Gottlieb (1988), lignóides são arilpropanóides oligoméricos, que possuem atividades aleloquímicas nas plantas nas quais ocorrem, e, ação farmacológica no homem, fato que já levou a aplicações terapêuticas importantes. Através

dos trabalhos com plantas da Amazônia, especialmente de espécies de Myristicaceae e Lauraceae, a química das neolignanas ficou internacionalmente conhecida (ROMOFF & YOSHIDA, 1997).

Lignóides são micromoléculas, cujo esqueleto básico é formado pelo grupo fenilpropânico $(C_6-C_3)_n$, sendo n restrito a poucas unidades, 1, 2 ou 3. Sua ocorrência na natureza se limita a plantas vasculares que possuem o tecido enriquecido por ligninas, macromoléculas dotadas de um esqueleto em $(C_6, C_3)_n$, n abrangendo usualmente muitas unidades, de 4 até talvez 5000 (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

As ligninas, polímeros de fenilpropanóides altamente ramificados, conferem rigidez ao material vegetal. Depois da celulose é a substância orgânica mais abundante nos vegetais. Formam de 15-35% da matéria seca dos troncos de Gimnospermas e Angiospermas arbóreas, além de serem constituintes da parede celular de tecidos associados a caule, folha e raiz de todas as plantas vasculares, inclusive herbáceas. (CROTEAU, KUTCHAN & LEWIS, 2000). Essas lignanas de acordo com sua definição podem ser unidas por diferentes números de acoplamento (ex: 8, 8'; 8, 5'), e que lhes confere crescente importância de compostos com propriedades fisiológicas e farmacológicas (LEWIS et al., 1984).

A origem biossintética de lignóides e ligninas resulta do acoplamento oxidativo radicalar de unidades de ácido cinâmico ou seus derivados (álcoois cinâmílicos, propenilfenóis e alilfenóis) (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984) (Esquema 1).



Esquema 1- Reação de acoplamento oxidativo de álcool coniferílico.

As lignanas e neolignanas, dímeros de fenilpropanóides, são geralmente opticamente ativas implicando no envolvimento de sistemas enzimáticos nas etapas biossintéticas, ao contrário dos fragmentos racêmicos obtidos através da degradação de ligninas. Investigações recentes têm demonstrado que o acoplamento oxidativo de unidades de álcool coniferílico em lignanas como o (+)-pinoresinol, em *Forsythia intermédia* é estereoespecífico (DAVIN et al., 1997).

Em muitos casos, lignóides estão envolvidos no sistema defensivo das plantas. Existem evidências de que a lignana ácido nordiidroguaiarético tem a função de proteger algumas espécies do gênero *Larrea* contra herbívoros, contra transpiração excessiva e

como filtro à luz UV (RHOADES, 1977). Esta neolignana é conhecida como uma das mais potentes substâncias antioxidantes *in vitro*.

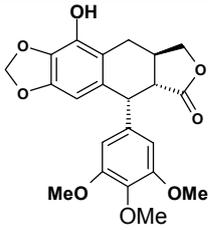
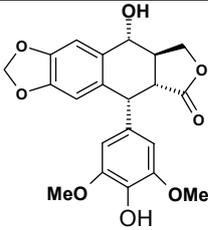
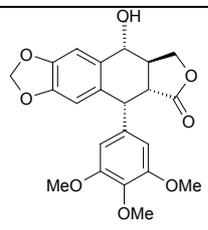
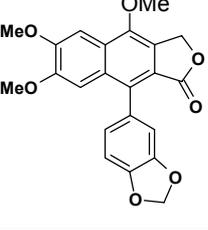
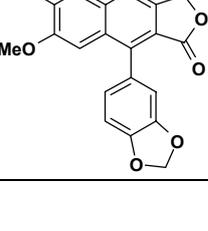
Lignanas e neolignanas apresentam ainda importantes atividades farmacológicas. A lignana (+)-pinoresinol possui atividade contra cAMP fosfodiesterase *in vitro* (Nikaido et al., 1981). A atividade estimulante do ginseng (*Acanthopanax senticosus* Harms) é atribuída a lignana diglicosilada (NISHIBE et al., 1990) e as lignanas (-)-arctigenina e (-)-trachelogenina possuem potente atividade anti-HIV (SHROEDER et al., 1990). Neste contexto, cabe ressaltar a atividade anticancerígena do etoposídeo, derivado semissintético da podofilotoxina (JACKSON & DEWICK, 1985; WARD, 1997). Mais recentemente, a atividade antagonista do fator de agregação de plaquetas (anti-PAF) foi descrita para diversas lignanas e neolignanas (PAN et al., 1987).

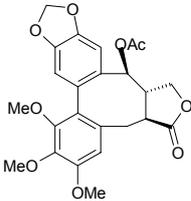
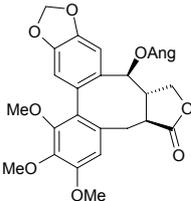
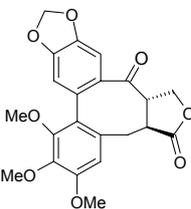
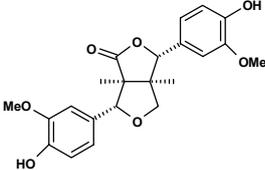
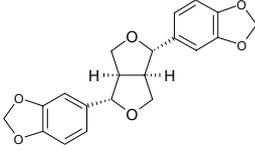
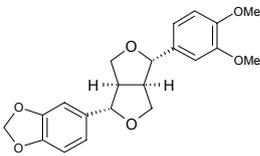
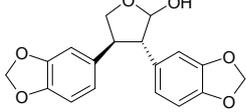
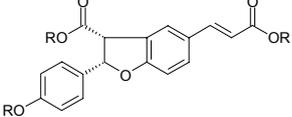
O elevado número de lignanas e neolignanas distribuído no reino vegetal leva à suposição de que as propriedades biológicas dessas substâncias sejam essenciais ao desenvolvimento do próprio vegetal e ao controle deste sobre a vida e seu meio. Segundo Gottlieb (1982), os lignóides são indicadores do processo evolutivo em Angiospermas e desempenham um papel na adaptação ecológica e que há evidências de que esse grupo de substâncias esteja envolvido em interações planta-fungos, insetos ou com outras plantas. Sabe-se que as neolignanas se acumulam em madeiras como resposta a ferimentos mecânicos ou ao ataque de microorganismo.

Entre os mais importantes grupos de metabolismo vegetal destacam-se tradicionalmente os alcalóides, os terpenóides e talvez ainda os flavonóides. Apenas em épocas mais recentes, os lignóides começaram a ocupar um lugar de destaque, pois, são de utilidade não só para as plantas que as produzem, como para o homem que as extrai ou sintetiza (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984). Com respeito às propriedades farmacológicas dos

lignóides para o homem, encontram-se alguns registros na literatura que estão relacionados na tabela 2.

Tabela 2
Lignanas biologicamente ativas (GOTTLIEB & YOSHIDA, 1984).

LIGNANAS - OCORRÊNCIAS	ESTRUTURAS	ATIVIDADES
<p>podofilotoxina <i>Podophyllum emodi</i> e <i>P. peltatum</i> (Berberidaceae); <i>Juniperus chinensis</i> e <i>J. virginiana</i> (Cupressaceae) <i>Linum album</i> (Linaceae)</p>		<p>Antimitótica Antineoplásica</p>
<p>α-peltatina <i>Asarum canadense</i> (Aristolochiaceae)</p>		<p>Antineoplásica</p>
<p>β-peltatina <i>Dophylleia cymosa</i> e <i>P. peltatum</i> (Berberidaceae) <i>Linum album</i> (Linaceae)</p>		<p>Antineoplásica</p>
<p>justicidina-A <i>Justicia hayatai</i> (Acanthaceae)</p>		<p>ictiotóxica</p>
<p>justicidina-B <i>Justicia hayatai</i> (Acanthaceae)</p>		<p>ictiotóxica</p>

LIGNANAS E OCORRÊNCIAS	FÓRMULAS	ATIVIDADE
<p>esteganacina <i>Steganataenia araliacea</i> (Araliaceae)</p>		<p>Antileucêmica Antineoplásica</p>
<p>esteganagina <i>Steganataenia araliacea</i> (Araliaceae)</p>		<p>Antineoplásica</p>
<p>esteganona <i>Steganataenia araliacea</i> (Araliaceae)</p>		<p>Antineoplásica</p>
<p>4-oxo-pinoresinol <i>Aegilops ovata</i> (Poaceae)</p>		<p>Inibidora de germinação</p>
<p>sesamina <i>Sesamum</i> spp. (Pedaliaceae)</p>		<p>Sinergística de inseticidas</p>
<p>cobusina <i>Magnolia kobus</i> (Magnoliaceae)</p>		<p>Inibidor de crescimento de <i>Bombyx mori</i></p>
<p>cubebina <i>Piper cubeba</i> (Piperaceae)</p>		<p>Antisséptico urinário</p>
<p>hordatina <i>Hordeum vulgare</i> (Poaceae)</p>		<p>antifúngico</p>

1.3.1. Metabólitos Secundários Encontrados em *Viola*

O interesse pelo estudo fitoquímico das espécies de Myristicaceae foi despertado no final do século XIX pela beleza da planta *Myristica fragrans* e ainda pelo uso popular de sua amêndoa (noz-moscada) e, algumas vezes, do seu arilo, na culinária e em propósitos medicinais (WEIL, 1965).

Vários constituintes foram ultimamente isolados e identificados nas espécies do gênero *Viola*, tais como triptamina, diarilpropanóides (virolanos, virolanóis, lignanas e neolignanas), cromonas, flavonóides (flavanas, flavonóis, isoflavonas, pterocarpanos e flavonas), estilbenos e esteróides (β -sitosterol e estigmasterol) (SANTOS, 2004).

O interesse pelo gênero *Viola* foi despertado na década de cinquenta, com a descoberta de que várias espécies deste gênero eram usadas pelos índios da Amazônia como fontes de narcóticos alucinógenos (SCHULTES, 1971).

A partir de um estudo realizado com a espécie *Viola surinamensis* por Yoshida et al. (1999), foi possível identificar duas lignanas tetraidrofurânicas, veraguensina e grandisina, que apresentaram significativa atividade antichagásica em ensaios *in vitro* com cepas do *Trypanosoma cruzi*; superior até a violeta de genciana, droga atualmente empregada.

As neolignanas surinamensina e violina isoladas de *V. surinamensis* e *V. pavonis* e seus análogos sintéticos foram submetidas a testes biológicos anti-leishmania *in vitro* e *in vivo* e se mostraram ativas com boa inibição contra *Leishmania donovani* através das neolignanas isoladas (BARATA et al., 2000).

1.4 *Virola michelii* Heckel

1.4.1 Descrição Botânica

A espécie *Virola michelii* (figura 1) é uma árvore que atinge 30 m de altura, com tronco até 50 cm de diâmetro à altura do peito; raminhos estriados, quando novos pardo-puberulentos, passando a glabros e enegrecidos ou cinéreos com a idade. Pecíolo fortemente canaliculado, essencialmente glabro, 1-2 mm de diâmetro, 4-10 mm de comprimento (RODRIGUES, 1980).

Lâmina foliar cartácea, estreitamente elíptica ou oblonga ou obovado-elíptica, 90-180 mm de comprimento, 25-60 mm de largura, atenuada ou aguda na base, subaguda ou subobtusamente cuspidada no ápice, puberulenta na face inferior (tricomos pardacentos, séssil-estrelados, 4-6 ramificados, cerca de 0,1 mm de diâmetro, esparsa e uniformemente distribuído, persistente); nervura mediana levemente imersa ou quase plana na face superior, saliente na inferior, 13-22 nervuras secundárias de cada lado, em geral levemente ascendentes, planas ou fortemente impressas na face superior, elevadas na inferior; vênulas normalmente obscuras, raras vezes planas ou promínulas (RODRIGUES, 1980).

Inflorescência masculina com 1 ou 2-ramosas, 20-90 mm de comprimento, uniformemente ferrugíneo ou pardacento-puberulentas (tricomos séssil-estrelados muitos pequenos, logo decíduos nos raminhos, persistentes nas flores); pedúnculo até 25 mm de comprimento, levemente achatado, brácteas oblongas, puberulentas, 3-5 mm de comprimento, logo decíduas; 5-15 flores por fascículo; os pedúnculos mais novos ligeiramente túrgidos distalmente, pedicelos tênues, até 3 mm de comprimento; perianto carnoso, 2,0-3,5 mm de comprimento, 3-lobado quase até a base com os lóbulos oblongos e obtusos; androceu, 1,5-1,7 mm de comprimento, andróforo tênue, 0,8-1 mm de comprimento; 3 anteras, 0,5-0,7 mm de comprimento, soldadas até o ápice e obtusas (RODRIGUES, 1980).

A inflorescência feminina é mais compacta do que a masculina. Possui fascículo com 2-4 flores; pedicelos grossos; estigma levemente oblíquo. Infrutescência de 40-60 mm de comprimento, uniforme e inteiramente pardo-puberulenta (tricomas ramificado desde a base), os raminhos passando a glabrescentes com a idade; frutos persistentes puberulentos, 1-4 maduros por infrutescência, pedicelados (pedicelos grossos de 3-9 mm de comprimento), elipsóides, na maturidade com 25-40 mm de comprimento, 17-27 mm de largura, nitidamente carinados de um lado e de muitas vezes lisos do outro, arredondados ou curtamente estipados na base, obtusos ou levemente apiculados no ápice; pericarpo lenhoso de 3-4 mm de espessura; arilo vermelho laciniado quase até a base; sementes elipsóides, lisas (RODRIGUES, 1980).

1.4.2. Distribuição Geográfica de *Viola michelii*

Sua época de floração se dá nos meses de julho a setembro e frutifica entre novembro e janeiro (RODRIGUES, 1980). Sua distribuição geográfica (Figura 1) está basicamente na região Norte nos estados do Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará e Roraima e fora do Brasil, estende-se até a Guiana Francesa e Suriname (RODRIGUES, 1980 e MOBOT, 2005).

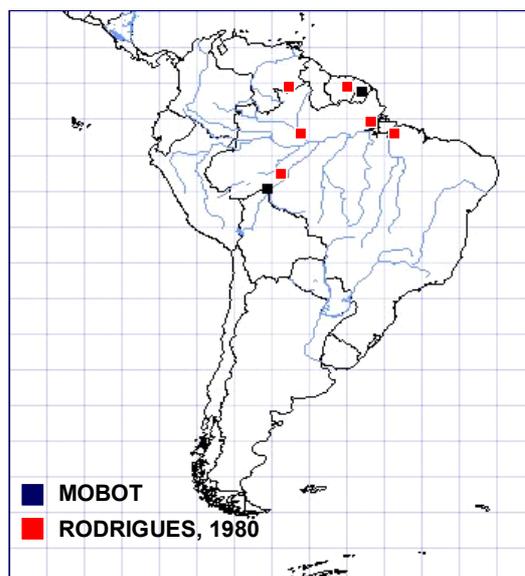


Figura 1- Distribuição geográfica de *Viola michelii*

Esta espécie pertence a matas de terra firme, tem como sinonímia: *V. melinonii* e seus nomes vulgares são: Ucuúba-da-Guiana, ucuuba-preta, ucuuba-branca, ucuúba-da-mata, ucuúba-de-terra-firme, ucurubarana, ucuuba, cigari.

1.4.3. Uso Popular

A madeira tem uso na construção de interiores, podendo ser utilizada também em compensados, a semente produz óleo ou sebo similar ao da “ucuúba-da-várzea” (*V. surinamensis*). Segundo a medicina popular a *V. michelii* é usada no tratamento de coceiras e infecções, além de emplastos à quente sobre a pele.

Nesta espécie, o arilo é comido por macaco aranha (*Ateles paniscus*), considerado um dos principais dispersores desta espécie (VAN ROOSMALEN, 2003), por tucanos (*Ramphastos* sp.) e por juparás (Kinkajous ou macacos-de-noite). Alguns marsupiais *Didelphis marsupialis*, *Philander opossum*, *Caluromys philander*, *Marmosa cinérea*, *Marmosa murina* alimentam-se somente do arilo maduro sem engolir a semente. A semente imatura é alimento de roedores como *Echimyis armatus* e o porco-espinho (*Coendu prehensilis*).

1.4.4 Composição Química de *V. michelii* Heckel

1.4.4.1 Cascas do Caule

Nas cascas do caule de *Virola michelii* (figura 2), foram detectados os alcalóides *N,N*-dimetilriptamina (**1**) e *N,N*-dimetil-5-metoxitriptamina (**2**), através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Estes alcalóides são responsáveis pela atividade alucinogênica de algumas espécies de *Virola*. Também foram isolados e identificados β -sitosterol (**13**) e a lignana (+)-eudesmina (**15**) (Tabela 3) (SANTOS, 2004).

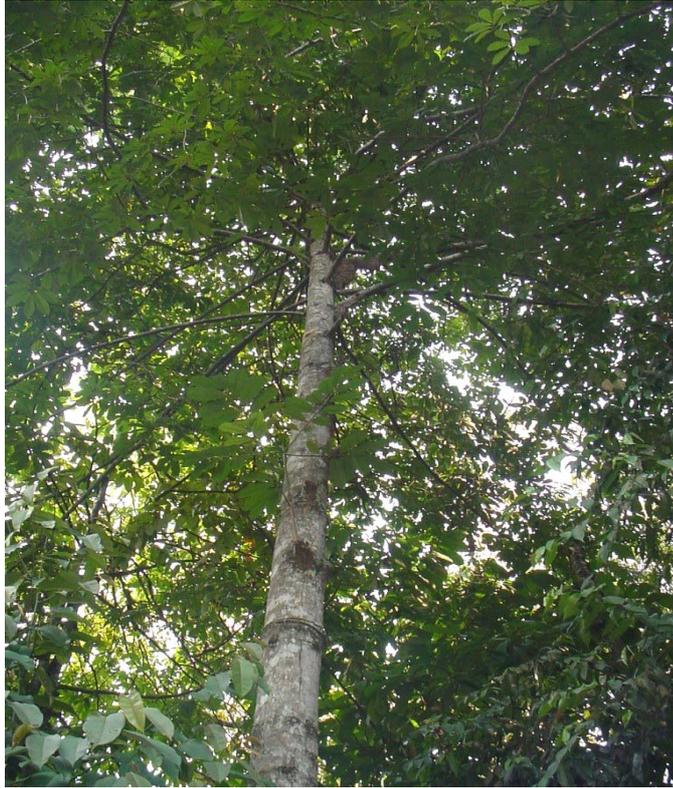


Figura 2: Detalhes de *V. michelii*

1.4.4.2 Sementes

Das sementes de *V. michelii* foram isoladas: (+)-sesamina (3), (+)-fargesina (4), (+)-filigenol (5), (-)-hinoquinina (6), (-)-kusuno-quinina (7), (-)-dimetilmatairesinol (8), lignana (9), éter dimetílico do (+)-lariciresinol (10), (-)-di-hidrocubebina (11), e (-)-3',4'-dimetoxi-3',4'-desmetilenodioxycubebina (12) (VIDIGAL, et al., 1995) (Tabela 3).



Figura 3: Frutos de *Virola michelii*

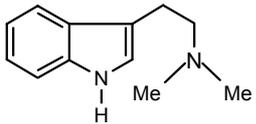
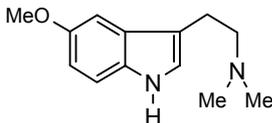
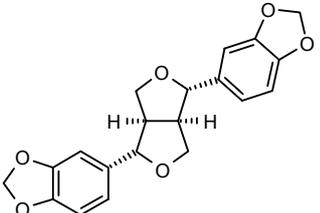
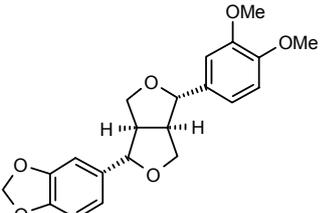
1.4.4.3 Folhas

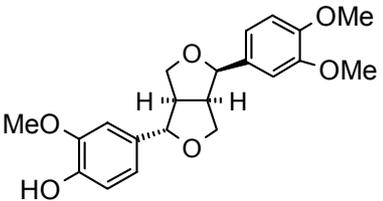
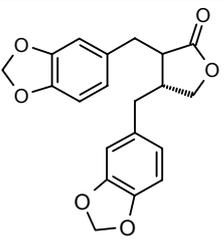
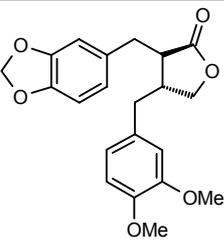
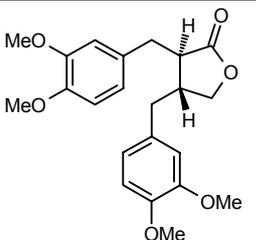
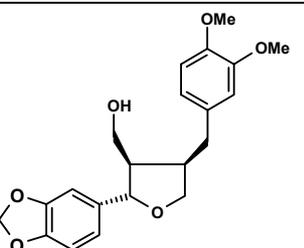
Das folhas de *V. michelii* (figura 4), foram isolados a lignana (+)-eudesmina (**15**) e o fitoesteroide β -sitosterol (**13**), que também estão presentes nas cascas do caule; e, quatro flavonas: a 3'-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (titonina) (**14**), a 7,3,4'-trimetoxiflavona (**16**), a 7,4'-dimetoxiflavona (**17**) e a 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**18**). A partir da flavona titonina (**14**) foram obtidos os derivados sintéticos metilado (**16**), etilado (**19**) e acetilado (**20**) (Tabela 3) (SANTOS, 2004).

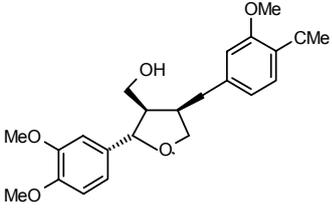
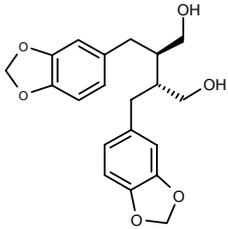
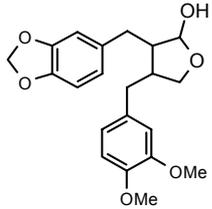
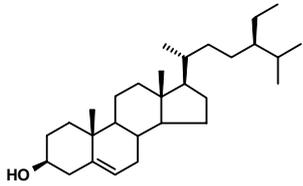
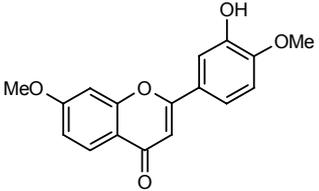
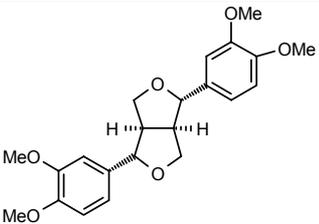


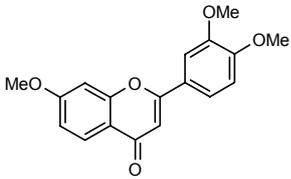
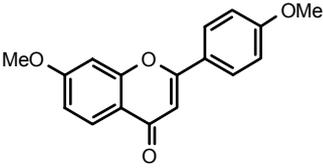
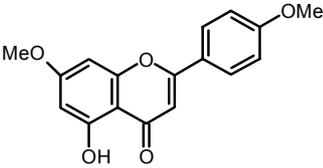
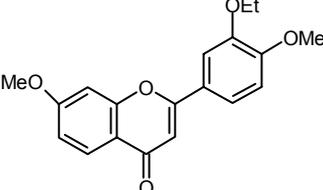
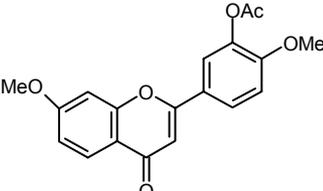
Figura 4: Folhas de *V. michelii*

Tabela 3
Substâncias isoladas e derivadas de *Virola michelii* (SANTOS, 2004).

Nº	Substâncias	Nome	Parte da planta	Atividade Biológica
1		<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	Casca do caule	Atividade alucinógena de algumas espécies de <i>Virola</i>
2		<i>N,N</i> -dimetil-5-metoxi-triptamina	Casca do Caule	Atividade alucinógena de algumas espécies de <i>Virola</i>
3		(+)-sesamina	Sementes	Antioxidante
4		(+)-fargesina	Sementes	-

Nº	Substâncias	Nome	Parte da planta	Atividade Biológica
5		(+)-filigenol	Sementes	-
6		(-)-hinoquinina	Sementes	-
7		(-)-kusuno-quinina	Sementes	-
8		(-)-dimetilmatairesinol	Sementes	-
9		9-hidroxi-3,4-metilenodioxi- 3',4'-dimetoxi-8,8',7,0,9'- lignana	Sementes	-

Nº	Substâncias	Nome	Parte da planta	Atividade Biológica
10		Éter dimetílico de (+)-lariciresinol	Sementes	-
11		(-)-di-hidro-cubebina	Sementes	-
12		(-)-3',4'-dimetoxi- 3',4' desmetilenodioxycubebina	Sementes	-
13		β - sitosterol	Folhas	-
14		titionina	Folhas	Atividade antiinflamatória e analgésica
15		(+) -eudesmina	Folhas	-

Nº	Substâncias	Nome	Parte da planta	Atividade Biológica
16		7,3',4'-trimetoxiflavona	Folhas	--
17		7,4'-dimetoxiflavona	Folhas	-
18		5-hidroxi-7,4'- dimetoxiflavona	Folhas	-
19		3'-O-etiltitonina	Folhas	-
20		3'-O-acetiltitonina	Folhas	-

1.5 Atividades Biológicas de *V. michelii*

Os extratos brutos hexânico e diclorometânico das cascas e folhas de *V. michelii* mostraram atividade nos ensaios antimicrobianos frente às cepas de *Candida tropicalis* (fungo), *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (bactérias). Nas folhas as substâncias majoritárias isoladas (+)-eudesmina e titonina mostraram atividade frente aos microorganismos, indicando que são outras as substâncias responsáveis pelas atividades apresentadas pelos extratos e frações purificadas e que se encontram em baixas concentrações, porém, das 13 cepas de fungos testadas somente *C. tropicalis*, foi inibida, e das 7 bactérias testadas, só *S. aureus* e *S. epidermidis* sofreram inibição (CARVALHO, 2004).

Segundo Carvalho (2004), foram demonstradas em animais de laboratório, as atividades antiinflamatórias utilizando o modelo de edema de pata de rato induzida por carragenina, e analgésica utilizando o teste de contorções induzidas por ácido acético, dos extratos brutos hexânico e diclorometânico das folhas de *V. michelii*.

Carvalho (1999), em estudos fitoquímicos das folhas de *V. michelii* levou ao isolamento da flavona titonina (7,4'-dimetoxi-3'-hidroxiflavona), que submetida à teste de atividade antiinflamatória e analgésica em ratos levou a resultados satisfatórios quanto à atividade antiinflamatória, sugerindo que a respectiva flavona tem uma excelente ação antiinflamatória.

Lima et al. (1993), através de análises dos extratos brutos das folhas de *V. michelii* em hexano e em cloreto de metileno, constataram uma forte atividade antimicrobiana.

No trabalho realizado por Sartorelli (1998) é descrito o isolamento de duas ciclolignanas do tipo 2,7'(galbulina e 4-hidroxi-5,3',4'-trimetóxi), cinco lignanas diarilbutânicas hidroxiladas na posição 7 (oleiferina-B,3,4,3',4'-tetrametoxilignana, oleiferina-F, oleiferina-G

e oleiferina-H) e uma lignana furânica (verrucosina) analisadas dos arilos da *V. oleifera* e também foram avaliadas para atividades antifúngicas contra *Cladosporium cladosporoides* e *C. sphaerospermum*.

1.6 Ensaio de Avaliação da Atividade Antioxidante

As espécies reativas de oxigênio são reconhecidas como responsáveis por um grande número de doenças, assim como pelo processo de envelhecimento. Os radicais livres constituem um alvo interessante para o desenvolvimento de novas drogas. Neste contexto, os antioxidantes de origem natural merecem atenção especial, pois as plantas sintetizam um grande número de metabólitos capazes de captar os radicais livres. (POTTERAT, 1997).

O efeito prejudicial da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio – EROS no sistema biológico inclui peroxidação lipídica das membranas e danos oxidativos dos ácidos nucléicos e carboidratos. Os radicais livres derivados do oxigênio parecem ter a tendência de iniciar a promoção da carcinogênese. O sistema de defesa oriundo de antioxidantes é crucial para a sobrevivência dos organismos (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 1999).

Por conseqüência da formação de radicais livres, as plantas ao longo do tempo evolutivo, assim como também os organismos animais, foram dotados de distintas defesas antioxidantes (DA), para comparar os efeitos deletérios associados à constante formação de ERO. No interior da fisiologia das plantas, as suas defesas antioxidantes podem ser afetadas por inúmeros fatores estressantes, como intensa iluminação, deficiência mineral, vento, seca, oscilações da temperatura, sazonalidade, xenobiontes, entre outros (YUNES e CALIXTO, 2001).

A atividade antioxidante, muito freqüente em substâncias fenólicas, se constitui num teste preliminar para uma variedade de atividades específicas de interesse terapêutico, que uma substância pode apresentar. Assim, substâncias citotóxicas, hepatoprotetoras, anti-

rugas, protetoras solares, anticancerígenas, anti-HIV, etc., são alguns exemplos, subseqüentes a propriedades antioxidantes.

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com aqueles substratos oxidáveis, significativamente retardam a oxidação desse substrato ou inibem a oxidação deste substrato em diferentes níveis da seqüência oxidativa (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Segundo Middleton (2000), os melhores antioxidantes conhecidos são as vitaminas A, E, e o β -caroteno e estas substâncias tem sido revisadas pelo seu possível papel na prevenção do câncer e doenças cardiovasculares.

2. OBJETIVOS

O trabalho proposto teve como objetivo contribuir para a quimiosistemática da família Myristicaceae aumentando o acervo de metabólitos e suas atividades biológicas descritos para a espécie *Virola michelii*, através de análise dos constituintes do óleo volátil e do extrato das folhas. Pretendeu-se ainda avaliar a atividade antioxidante dos metabólitos isolados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais, Equipamentos e Instrumentos Utilizados.

- Evaporador rotatório FISATOM 802;
- Balança analítica marca Mettler-Toledo, modelo AB204, capacidade de 210 g;
- Balança semi-analítica, modelo BG 200, marca QUIMIS;
- Liofilizador CHRIST, modelo Beta 1-8 K;
- Lavadora ultra-sônica, modelo USC 1400, marca UNIQUE;
- Pipetas automáticas, modelos P 100 e P 1000, marca Eppendorf;
- Câmara de revelação de CCD com lâmpadas de UV a 254 e 366 nm;
- Cromatógrafo Gasoso modelo HP 6890 Plus, marca Agilent, equipado com sistema a “dual-column” (coluna polar Innowax com 30 m x 0,32 mm e filme de 0,25 μm ; coluna

apolar HP-5 com 30 m x 0,320 mm e filme de 0,25 μm), com dois detetores de ionização de chama e foi utilizado hidrogênio como gás de arraste;

- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas do CBA, marca Shimadzu, modelo GC/MS–QP2010, IE 70 eV, coluna apolar DB-5MS 25 m x 0,25 mm e filme de 0,25 μm . Utilizou-se o hélio como gás de arraste;
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram registrados em Espectrômetro Varian DPX-300 do Instituto de Química da Universidade de São Paulo IQ-USP/SP, operando respectivamente a 300 e 75 MHz. O solvente utilizado foi CDCl_3 , e o padrão usado como referência interna foi o TMS;
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram registrados em Espectrômetro VARIAN, Modelo INOVA 500 de 11,7 T, do CBA, operando respectivamente a 500 e 125 MHz. O solvente utilizado foi CDCl_3 , e o padrão usado como referência interna foi o TMS;
- Os espectros de massas foram registrados no CG/EM da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Espectrômetro de Massas Íon Trap 2000, Sistema Saturno 2100 T, marca VARIAN modelo 3900, IE 70 eV, coluna apolar VF-5ms LB (5% fenil e 95% dimetil polisiloxano) de 30 m x 25 mm e filme de 0,25 μm , utilizando para arraste o gás hélio;
- Espectrofotômetro de ultravioleta/visível, modelo 800 XI, com intervalo espectral de 190-1100 nm, marca FEMTO.

3.2. Material Utilizado em Fitoquímica

- A qualidade dos solventes orgânicos utilizados variou de acordo com a finalidade. Na preparação dos extratos e técnicas cromatográficas utilizou-se solventes destilados no Laboratório. Na extração de substâncias adsorvidas à sílica e nas etapas de purificação por cromatografia em camada delgada comparativa empregou-se solventes de grau P.A. (Merck) ou bidestilados após secos (CaCl_2);
- Para as análises das frações obtidas por cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas de sílica gel 60 F254 em alumínio e placas de fase reversa RP-18 F254S de marca Merck;
- A cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) foi realizada em cromatoplasmas de vidro de tamanho 20 x 20 cm e espessura de 1,5 mm. As mesmas foram preparadas usando-se cerca de 80 g de sílica gel 60 PF₂₅₄ da MERCK disperso em 150 mL de água destilada e espalhada em 5 placas, que após evaporação da água à temperatura ambiente, ativou-se em estufa a 100 °C durante 1 hora;
- Na cromatografia em coluna filtrante (CC) o adsorvente utilizado foi sílica gel 60 com partículas de 63-200 μm da Merck;
- As revelações de cromatoplasmas, após as eluições, foram efetuadas em cuba de vidro saturadas com vapores de iodo, pela irradiação na região do UV (254 e 366 nm), e ainda, borrifado com anisaldeído/aquecimento ou NP/PEG ou FeCl_3 aquoso (10%) (Wagner & Blatt, 1996);

- Os reveladores empregados para detectar compostos antioxidantes foram as soluções de β -caroteno em diclorometano na concentração de 0,3 mg/mL e de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, 90%) em MeOH na concentração de 0,2 mg/mL.

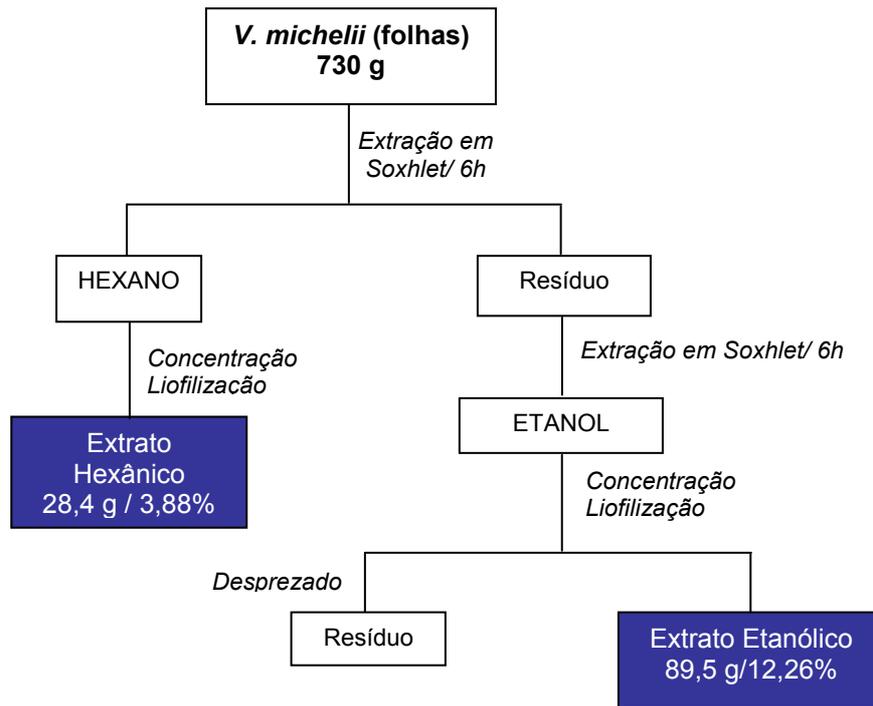
3.3 Coleta de Material Vegetal

As folhas de *Virola michelii* de um espécimen, localizado no Campus I do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foram coletadas no mês de dezembro de 2004. Após a sua identificação uma exsicata foi depositada no Herbário do INPA sob o número 215688. Parte das folhas coletadas foi seca a temperatura ambiente e posteriormente moída obtendo-se 2.200 g de material. A outra parte das folhas frescas (1.650 g) foi fragmentada e submetida à destilação por arraste a vapor (Esquema 8).

3.4 Processamento de Material Vegetal

Parte de folhas moídas (730 g) foram extraídas em Soxhlet com hexano, e, posteriormente com etanol durante 6 horas em cada solvente. Após as extrações as soluções foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida, obtendo-se 28,4 g de extrato hexânico e de 89,5 g de extrato etanólico (Esquema 2).

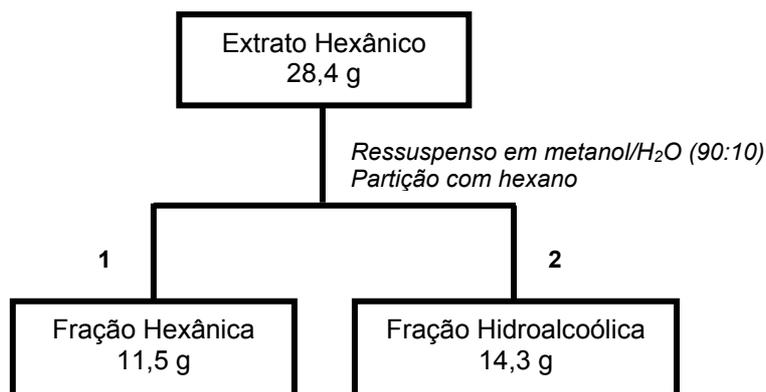
Os extratos brutos hexânico e etanólico obtidos foram ressuspensos em metanol/água e submetidos a partições com hexano e acetato de etila resultando em quatro frações. O fluxograma geral do procedimento empregado para a realização deste trabalho é mostrado no esquema 9.



Esquema 2: Obtenção de extratos empregando Soxhlet

3.5 Partição do Extrato Hexânico

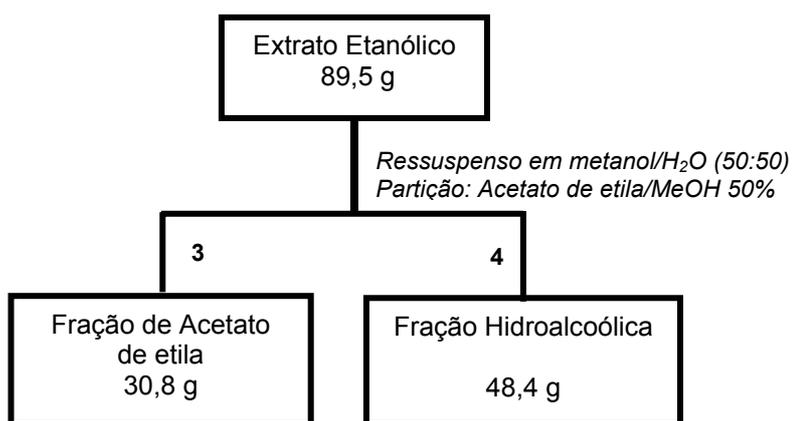
O extrato hexânico foi ressuspenso em metanol 90% e, então, extraiu-se 4 vezes com hexano. As fases hexânicas e hidroalcoólicas resultantes foram concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se os resíduos das frações hexânica (1) e hidroalcoólica (2) (Esquema 3).



Esquema 3: Partição do Extrato Hexânico

3.5.1 Partição do Extrato Etanólico

O extrato etanólico foi ressuspensão em metanol/água 50% e, extraiu-se 4 vezes com acetato de etila. As frações resultantes foram concentradas em evaporador rotatório, obtendo-se os resíduos das frações de acetato de etila (3) e fração hidroalcoólica (4) (Esquema 4).



Esquema 4: Partição do Extrato Etanólico

Comparou-se por cromatografia em camada delgada todas as frações obtidas, a fim de escolher a fração a ser trabalhada.

As frações foram submetidas à cromatografia com diferentes eluentes e gradientes de eluição e reveladas em iodo, FeCl_3 , anisaldeído, NP/PEG, β -caroteno e DPPH, sendo os dois últimos para verificar a atividade antioxidante, como anteriormente referido.

As placas de cromatografia comparativa revestidas com sílica-gel G foram ativadas a 100°C por 15 minutos. Após aplicação do extrato ou das frações, a cromatoplaça foi desenvolvida com diversos sistemas de solventes. A revelação foi efetuada com uma solução em diclorometano de β -caroteno e em metanol de DPPH. As placas, após pulverização com a solução, foram expostas à luz, permanecendo coradas com manchas alaranjadas ou amareladas com β -caroteno e manchas brancas ou levemente amareladas com o revelador DPPH, quando continham substâncias com atividade antioxidante.

A fração acetato de etila foi selecionada para dar seguimento ao trabalho uma vez que nas análises em CCD comparativa, mostrou a presença de manchas bem definidas, além de apresentar atividade antioxidante (Tabela 4). Os compostos de interesse devem ser de média polaridade por estarem nesta fração.

Tabela 4
Análise de frações com diferentes reveladores

Fração	Eluentes	Reveladores			
		FeCl_3	β -caroteno	NP/PEG	DPPH
1 (hexano) Ext. Hexânico	Hex:AcOEt (9:1)	-	+	-	++
2 (hidroalc.) Ext.Hexânico	Éter: AcOEt (9:1)	-	+	-	+
3 (AcOEt) Ext. Etanólico	CHCl_3 : MeOH (9:1)	-	++	+	++
4 (hidroalc.) Ext. etanólico	MeOH:AcOEt:HOAc(1%) (6,75: 0,75: 2,5)	+	+	++	++

Legenda: - não revelou nada / + fraco / ++ médio / +++ forte

3.5.2. Isolamento das Lignanas Furofurânicas das Folhas de *V. michelii*

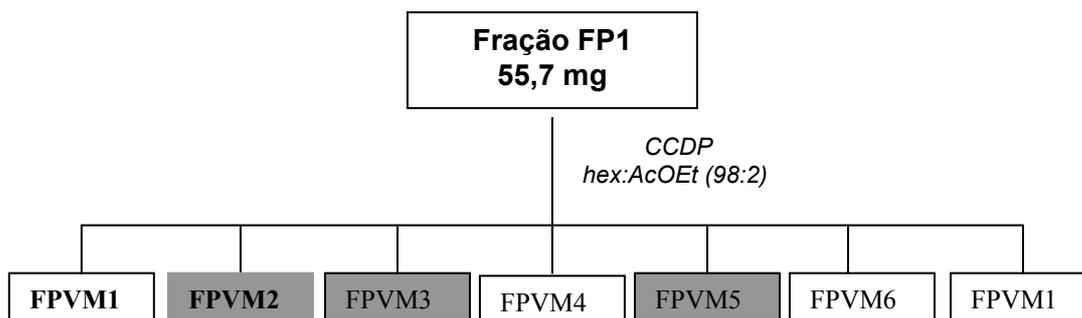
O resíduo da fração (3) (Esquema 7) do acetato de etila (30,8 g) foi submetido à cromatografia em coluna e eluída com CHCl_3 , $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 95:5, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 7:3 e MeOH, coletando-se um volume de 500 mL para cada fração, totalizando 13 frações.

Após diversos sistemas de eluição em CCD comparativa das 13 frações coletadas, as frações 1, 3 e 5 foram escolhidas para fracionamento posterior por apresentarem atividade antioxidante, constatada através de reveladores.

3.5.3 CCDP da Fração FP1

A fração FP1 (55,7 mg) foi submetida à CCDP com hexano:AcOEt (98:2) em uma cuba para placa de 20 x 20 cm e contendo 200 mL do sistema eluente. Foram preparadas três placas preparativas para a purificação e originou 7 frações: PVM0, PVM1, PVM2, PVM3, FPVM4, FPVM5, FPVM6 (Esquema 5).

Essas frações foram submetidas à CCD comparativa e as frações FPVM2 (13,7 mg), FPVM3 (15,3 mg) e FPVM5 (2,3 mg) foram escolhidas para a obtenção do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C . Após análise dos espectros, observou-se a natureza complexa da mistura e pelas quantidades disponíveis, estas frações foram deixadas para um fracionamento posterior.

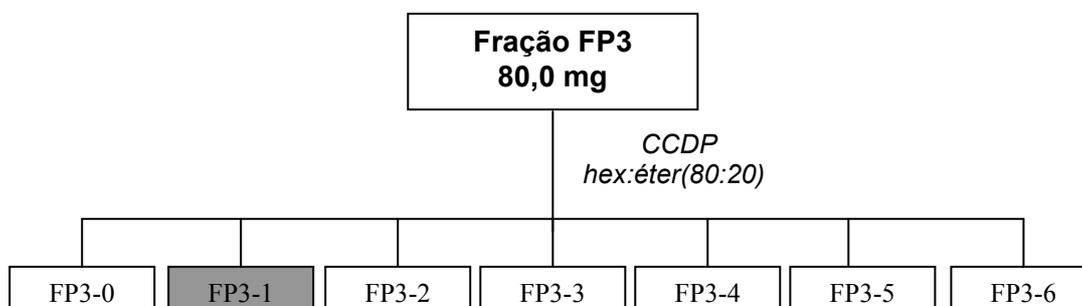


Esquema 5: CCD Preparativa da fração FP1

3.5.4. CCDP da Fração FP3

A fração FP3 (80,0 mg) foi submetida à CCDP com hexano:éter (80:20) em uma cuba para placa de 20 x 20 cm e contendo 200 mL do sistema eluente. Foram utilizadas quatro placas para a respectiva separação que originou 7 frações: FP3-0, FP3-1, FP3-2, FP3-3, FP3-4, FP3-5, FP3-6 (Esquema 6).

Essas frações foram submetidas em CCD comparativa e foram selecionadas as frações FP3-1 (3,2 mg), FP3-2 (2,6 mg) e FP3-3 (3,5 mg) para registro de espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C . A análise dos espectros revelou a presença do β -sitosterol na fração FP3-1

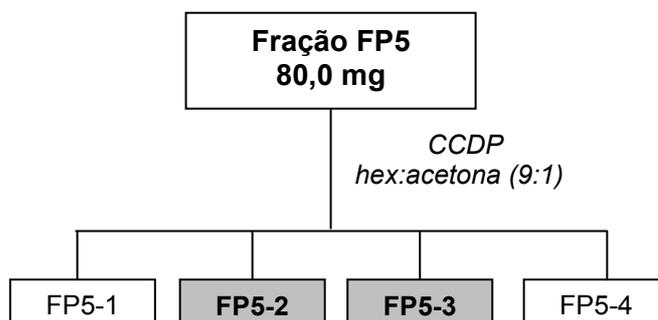


Esquema 6: CCD Preparativa da fração FP3

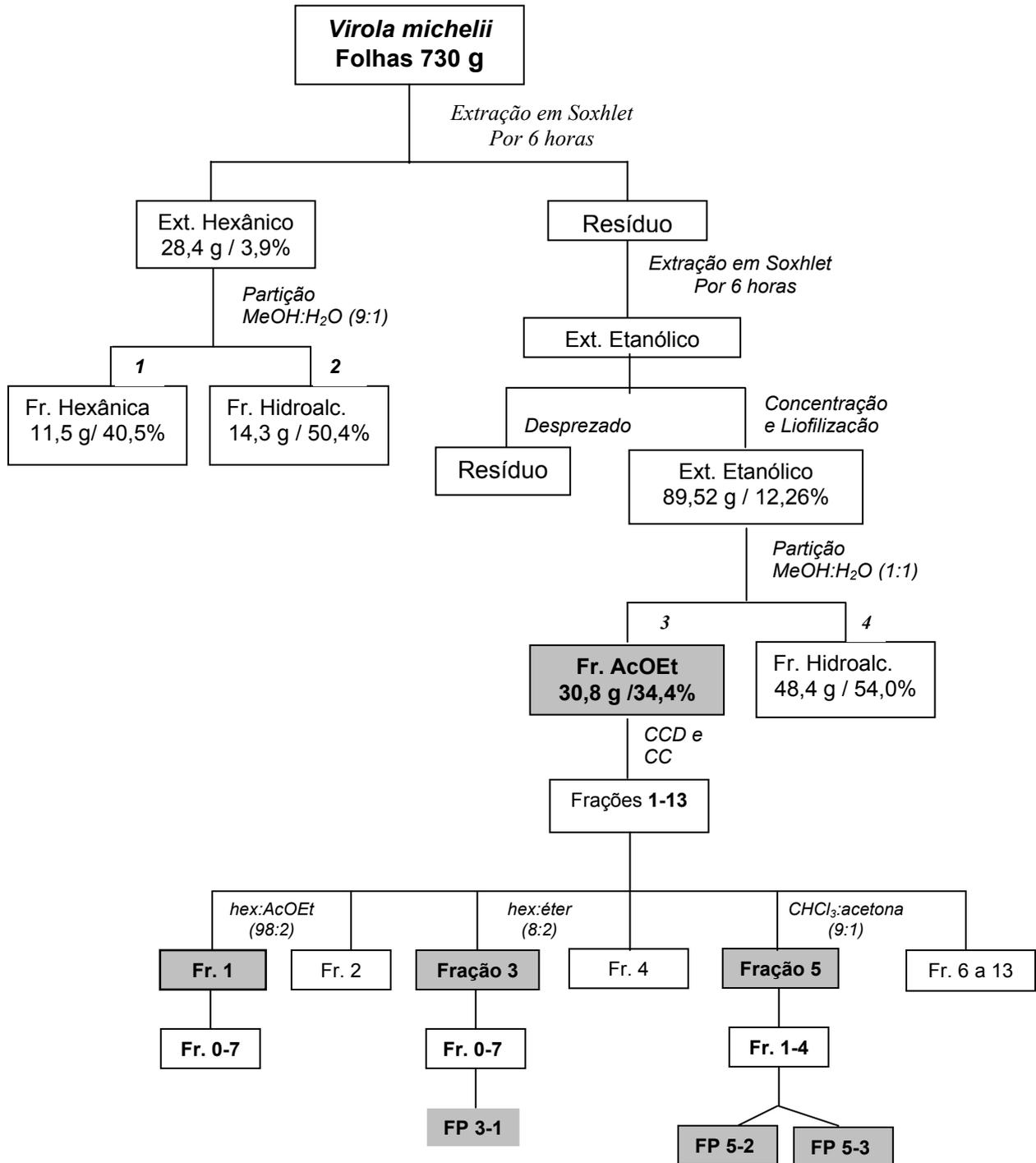
3.5.5 CCDP da Fração FP5

A fração FP5 (80,0 mg) foi submetida a CCDP com clorofórmio:acetona (9:1) em uma cuba para placa de 20 x 20 cm contendo 200 mL do eluente. Foram preparadas quatro placas para a respectiva análise e originou 4 frações: FP5-1, FP5-2, FP5-3 e FP5-4 (Esquema 9).

Essas frações foram submetidas em CCD comparativa e foram selecionadas as frações FP5-2 (4,8 mg), FP5-3 (27,9 mg) e FP5-4 (21,4 mg) para análise em RMN de ^1H e de ^{13}C . Os espectros de RMN revelaram a presença das substâncias filigenol (FP5-2) e eudesmina (FP5-3) nas frações analisadas.



Esquema 7: CCD Preparativa da fração FP5



Esquema 9: Procedimento Geral do Trabalho Fitoquímico

3.6 Estudo do Óleo Volátil de *Virola michelii*

As folhas frescas de *V. michelii* foram coletadas em Dezembro de 2004 no Campus do INPA. O material foi imediatamente fragmentado e submetido à hidrodestilação, durante 3 h (arraste a vapor d'água), empregando-se o aparelho do tipo Clevenger (esquema 8). O óleo volátil obtido, após separar-se da água, foi seco com Na₂SO₄ anidro, obtendo-se um óleo incolor com aroma agradável e com massa de 153,2 mg. O óleo volátil obtido foi submetido a análise cromatográfica (CCD), a fim de se verificar a presença de algum constituinte fixo.

O óleo volátil obtido foi submetido à análise em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas. A análise foi realizada em um sistema Cromatógrafo a Gás (mod. CG-2010) acoplado ao Espectrômetro de Massas (mod. QP-2010) (CG-EM) da Shimadzu, operando para ionização com Impacto de Eletron (EI) à 70 eV, temperatura do injetor de 240 °C, fluxo de gás na coluna 1 mL/min, gás de arraste o hélio, modo de injeção o split com uma razão de 1/20, volume injetado o 1µL, coluna capilar DB-5MS (25m x 0,25mm e filme de 0,25µm). A programação da temperatura foi de 100 °C (1 min), incremento de 3 °C/min até 115 °C, seguido de incremento de 1 °C/min até 135 °C e posterior incremento de 10 °C/min até 240 °C.

A identificação de componentes foi baseada em comparações de seus índices de retenção ou Índice de Kovats, levando-se em consideração os padrões de hidrocarbonetos para DB-5 (ADAMS, 1995) e de fragmentações no espectro de massas usando NIST 62 e biblioteca de espectros Wiley (MCLAFFERTY & STAUFFER, 1989).

Segue a equação para calcular o Índice de Retenção:

$$IR_K = 100. n ((TR_{subs} - TR_{hidant}) / (TR_{hidpost} - TR_{hidant})) + 100. n^{\circ} C_{hidant}$$

Onde:

IR_K = Índice de Retenção de Kovats;

n = Diferença entre o número de carbonos imediatamente anterior e posterior a substância que se quer determinar;

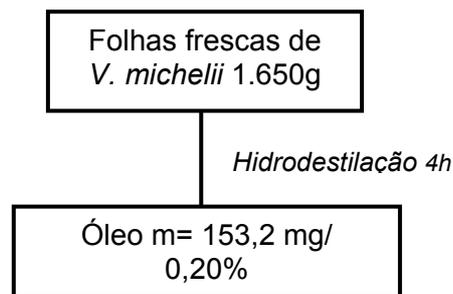
TR_{subs} = Tempo de retenção da substância presente na amostra do óleo essencial;

TR_{hidant} = Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior;

$TR_{hidpost}$ = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior

$n^{\circ} C_{hidant}$ = Número de carbonos do hidrocarboneto anterior

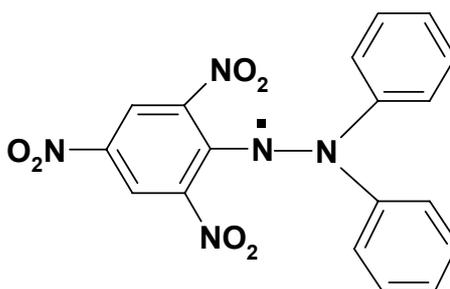
3.6.1. Extração do óleo das Folhas de *V. michelii*



Esquema 8: Fluxograma da Extração do óleo das Folhas de *V. michelii*

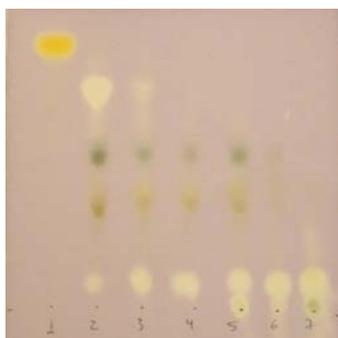
3.7 Análise da Atividade Antioxidante em CCD

A atividade antioxidante foi analisada utilizando-se o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que é um radical livre e estável a temperatura ambiente (Esquema 10) e que produz uma solução violeta em metanol e que é reduzido pela presença de um composto antioxidante levando a descoloração da solução metanólica. O uso de DPPH se constitui em um meio rápido e fácil para avaliar os antioxidantes (MENSOR et al., 2001).



Esquema 10: Estrutura do DPPH

A redução do radical DPPH permite determinar a atividade antioxidante. O teste biológico é relativamente simples: extratos, frações ou produtos puros a serem testados são aplicados em placa de cromatografia em camada delgada e realiza-se a separação cromatográfica com um sistema de solventes apropriado. Após evaporação do solvente, a CCD é vaporizada com uma solução metanólica de 0,2 mg/mL de DPPH. As atividades antioxidantes são reveladas na forma de manchas amareladas ou esbranquiçadas sobre fundo violeta (Figura 5) e que, a atividade antioxidante varia de acordo com a intensidade da mancha na placa (CUENDET et al., 1997).



DPPH Hex: AcOEt (7:3)

Figura 5: Placa em CCD com revelador DPPH

3.7.1 Análise da Atividade Antioxidante em Espectrofotômetro

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através do ensaio de capacidade de seqüestro (CS) de radicais com o reagente DPPH. A solução de DPPH foi preparada adicionando-se 0,2 mg/mL em MeOH na qual é adicionada 1 mL desta solução a 2,5 mL das amostras a serem analisadas. A mistura foi deixada por 30 min à temperatura ambiente, na ausência de luz. Foi preparado um branco, para cada amostra a ser analisada, que consistiu em 1 mL de MeOH puro com 2,5 mL da amostra, enquanto o controle de 1 mL da solução de DPPH com 2,5 mL de MeOH (sem amostra). Após os 30 min, os valores da absorbância foram medidos a 518 nm. Esses valores foram convertidos em percentual de capacidade sequestrante descrito na equação abaixo.

$$\text{CS (\%)} = 100 - [(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{controle}}].$$

Os valores da CS_{50} foram calculados pela regressão linear dos gráficos de CS (%) versus concentração ($\mu\text{g/mL}$) (CHANG et al., 2002). Como controle positivo foi utilizado a quercetina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Óleo Volátil de *Virola michelii*

O rendimento obtido de óleo, a partir de folhas frescas, foi de 0,20%. Uma solução diluída do óleo foi submetida à análise no sistema cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) que identificou os constituintes do óleo volátil apresentados na Tabela 5.

Tabela 5
Substâncias identificadas por CG-EM no óleo volátil de *V. michelii*

Pico	Substâncias identificadas	% Área	IR _{Calc.}	IR _{Lit}
1	linalol*	0,45	-	1098
3	α -copaeno	4,92	1372	1376
4	β -bourboneno	0,40	1380	1384
5	β -elemeno	3,32	1386	1391
6	α -cis-bergamoteno	0,92	1415	1415
8	α - <i>trans</i> - bergamoteno	1,31	1427	1436
9	aromadendreno	3,49	1431	1439
10	α -humuleno	0,57	1447	1454
12	9- <i>epi</i> -(E) cariofileno	8,42	1472	1467
13	β -selineno	1,62	1480	1485
14	Viridifloreno	5,88	1482	1493
15	biciclogermacreno	36,63	1487	1494
16	α -muuroleno	2,21	1491	1499
19	γ -cadineno	2,93	1511	1513
20	(E)-nerolidol	2,06	1558	1564
22	Óxido de cariofileno	6,74	1574	1581
29	<i>epi</i> - α -murolol	1,02	1642	1641
31	α -cadinol	2,77	1653	1653
Total de 18 substâncias identificadas		85,66%		

Consta na figura 6, um cromatograma de íons totais, com o registro de 31 picos. Destes 18 constituintes foram identificados: um monoterpreno e 17 sesquiterpenos dos quais 13 compostos não são oxigenados e 4 compostos são oxigenados. O óleo volátil de *V. michelii* difere muito dos relatos sobre a composição do óleo volátil de *V. surinamensis*, onde o número de monoterpenos é maior e acumula ainda fenilpropanóides (LOPES et al., 1997), ausentes nesta espécie.

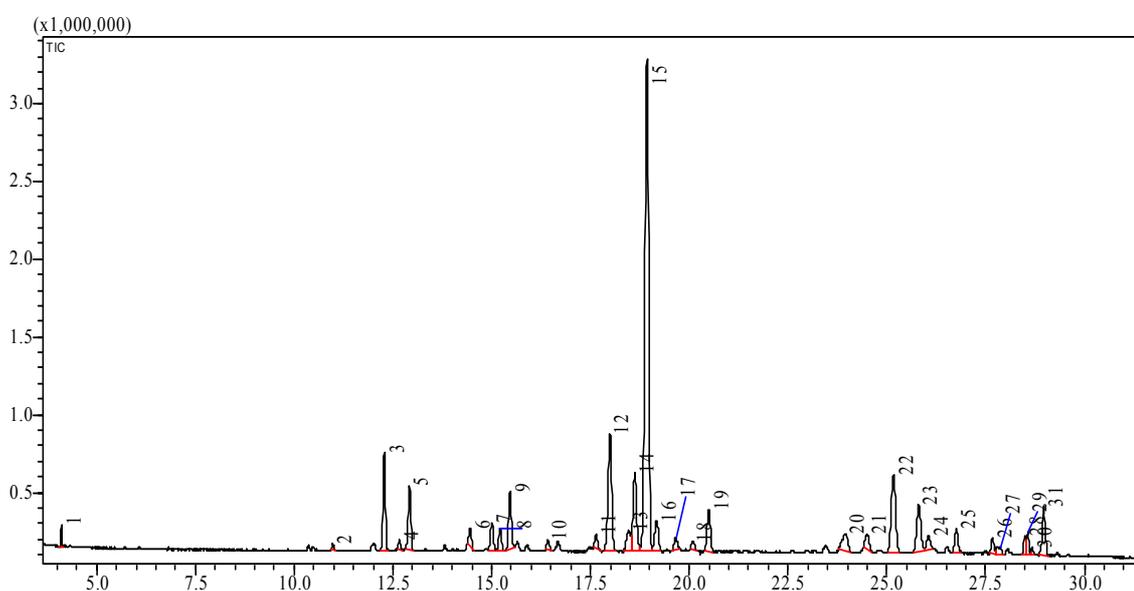


Figura 6: Cromatograma do óleo de *Virola michelii*.

As substâncias identificadas representam 85,7% do total de constituintes do óleo volátil. Destaca-se na composição a predominância de biciclogermacreno (figura 6), 9-*epi*-(*E*)-cariofileno e óxido de cariofileno, que juntos totalizam 51,7%.

A identificação do composto biciclogermacreno foi baseada nos dados da literatura (ADAMS, 1995) e nos dados obtidos na análise por CG-EM (figura 7).

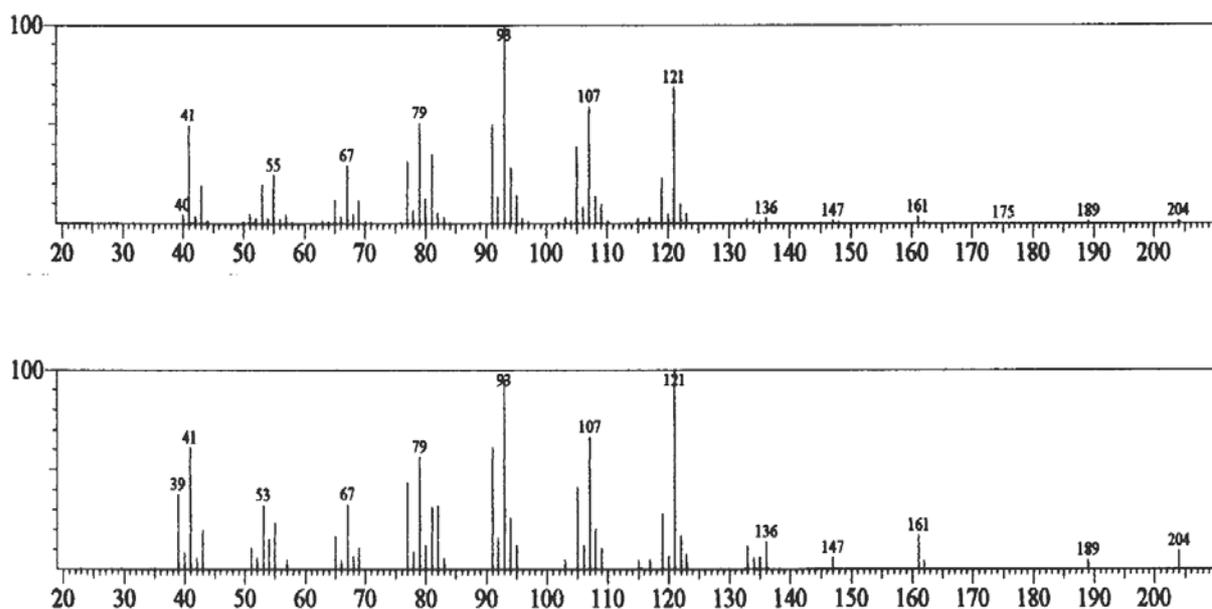
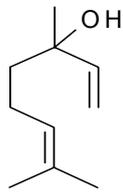


Figura 7: Acima espectro de massas do cromatograma do óleo essencial de *V. michelii* correspondente ao composto biciclogermacreno e abaixo o espectro do padrão do biciclogermacreno da Biblioteca Nist 62.

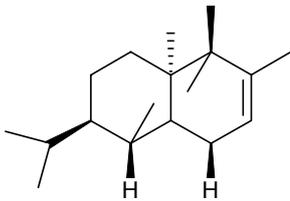
Como especificado na tabela 4, foram calculados os índices de retenção dos constituintes dos óleos e comparados com os índices de retenção da literatura. Posteriormente, foram analisados e comparados os espectros de massas da Biblioteca NIST, cujos índices de retenção eram próximos do observado sendo assim, a identificação foi baseada na semelhança dos espectros de massas do constituinte do óleo com o espectro da biblioteca.

Algumas substâncias constituintes do óleo volátil apresentam atividades biológicas descritas na literatura, como o linalol (**1**) que possui atividade larvicida e bactericida (SIMAS et al., 2004), além de fixador de perfume. O α - humuleno (**10**) é conhecida por apresentar atividade antibacteriana (DÍAZ et al., 2003) e antifúngica (BENEVIDES, YOUNG e BOLZANI, 2000), e, o óxido de cariofileno (**22**) possui também as duas atividades antimicrobianas (BAILAC et al., 2000; BENEVIDES, YOUNG e BOLZANI, 2000).

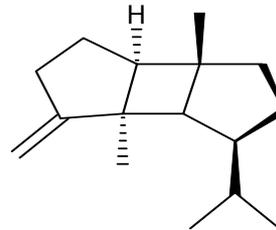
Seguem as estruturas de substâncias identificadas no óleo volátil de *Virola michelii*.



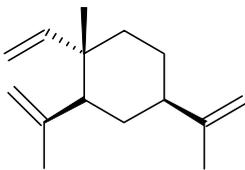
linalol 1



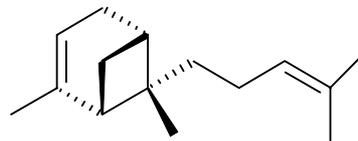
α -copaeno (3)



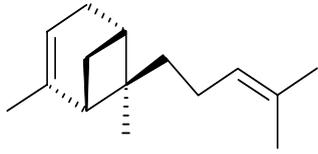
β -bourboreno (4)



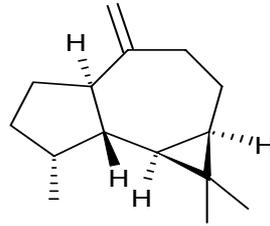
β -elemeno (5)



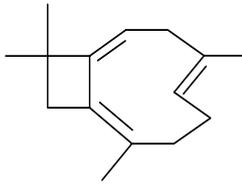
α -cis-bergamoteno (6)



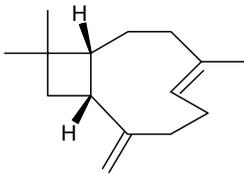
α - *trans* bergamoteno (8)



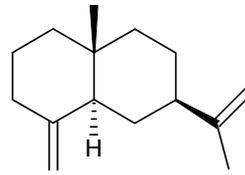
aromadendreno (9)



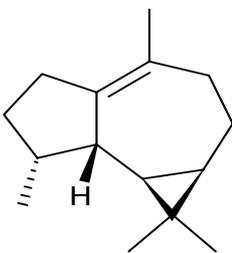
α - humuleno (10)



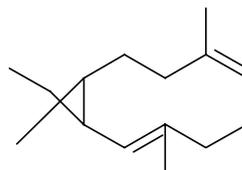
9- *epi*-(E)- cariofileno (12)



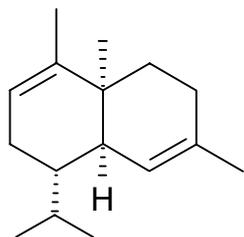
β - selineno (13)



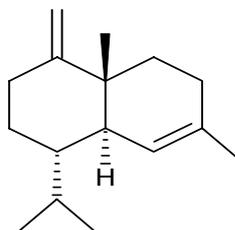
viridifloreno (14)



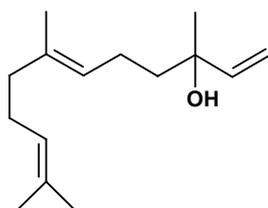
biciclogermacreno (15)



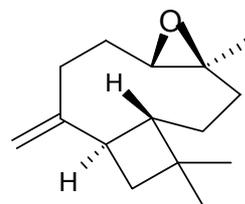
α -muroleno (**16**)



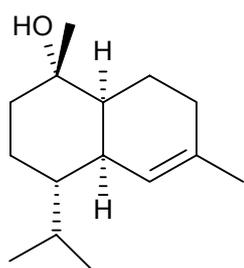
γ cadineno (**19**)



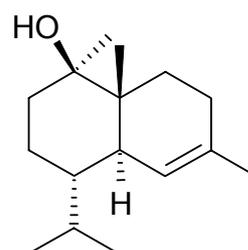
(*E*) – nerolidol (**20**)



óxido de cariofileno (**22**)



epi - α - murolol (**29**)



α - cadinol (**31**)

4.2 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas

4.2.1. Lignana FP5-3

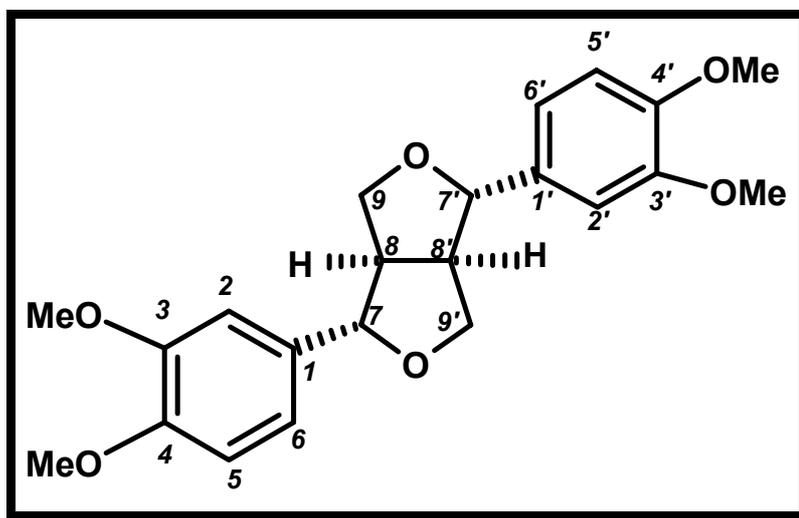


Figura 8: Estrutura de eudesmina (FP5-3)

A purificação da fração AcOEt levou ao isolamento de um esteróide e de duas lignanas furofurânicas. A elucidação da estrutura do constituinte FP5-3 (figura 8) foi realizada mediante análise dos dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e de EM, comparadas com dados publicados na literatura (IIDA et al., 1982) e (AGRAWAL & THAKUR, 1985).

O espectro de massas de FP5-3 (figura 9) apresenta o pico de íon molecular em m/z de 386 e com os números de átomos de hidrogênios e de carbono obtidos através dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_6$.

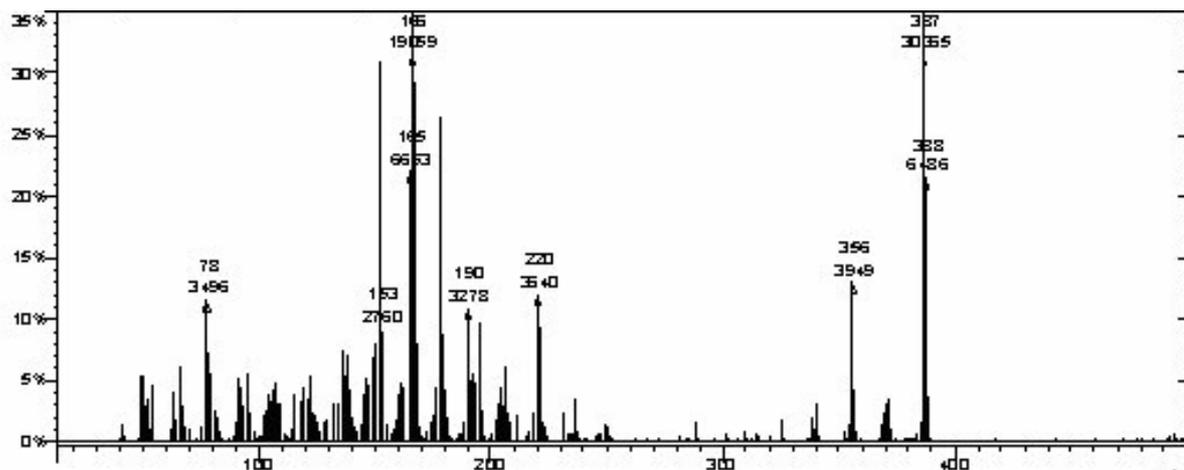


Figura 9: Espectro de massas da substância eudesmina

O espectro de RMN de ^1H da substância FP5-3 (figura 10) registra um conjunto de sinais na região de hidrogênios aromáticos entre δ 6,91 e δ 6,83 com integração para 3 hidrogênios correspondendo a um anel aromático trissubstituído (figura 11). Observou-se ainda, a presença de 2 singletos, um em δ 3,88 e outro em δ 3,90 com integração para 3 hidrogênios em cada sinal, que foram atribuídos a duas metoxilas. Com base na fórmula molecular proposta, concluiu-se que a molécula possui dois anéis aromáticos e uma simetria na molécula, pois o número de átomos observados correspondem a um número de átomos menor da fórmula.

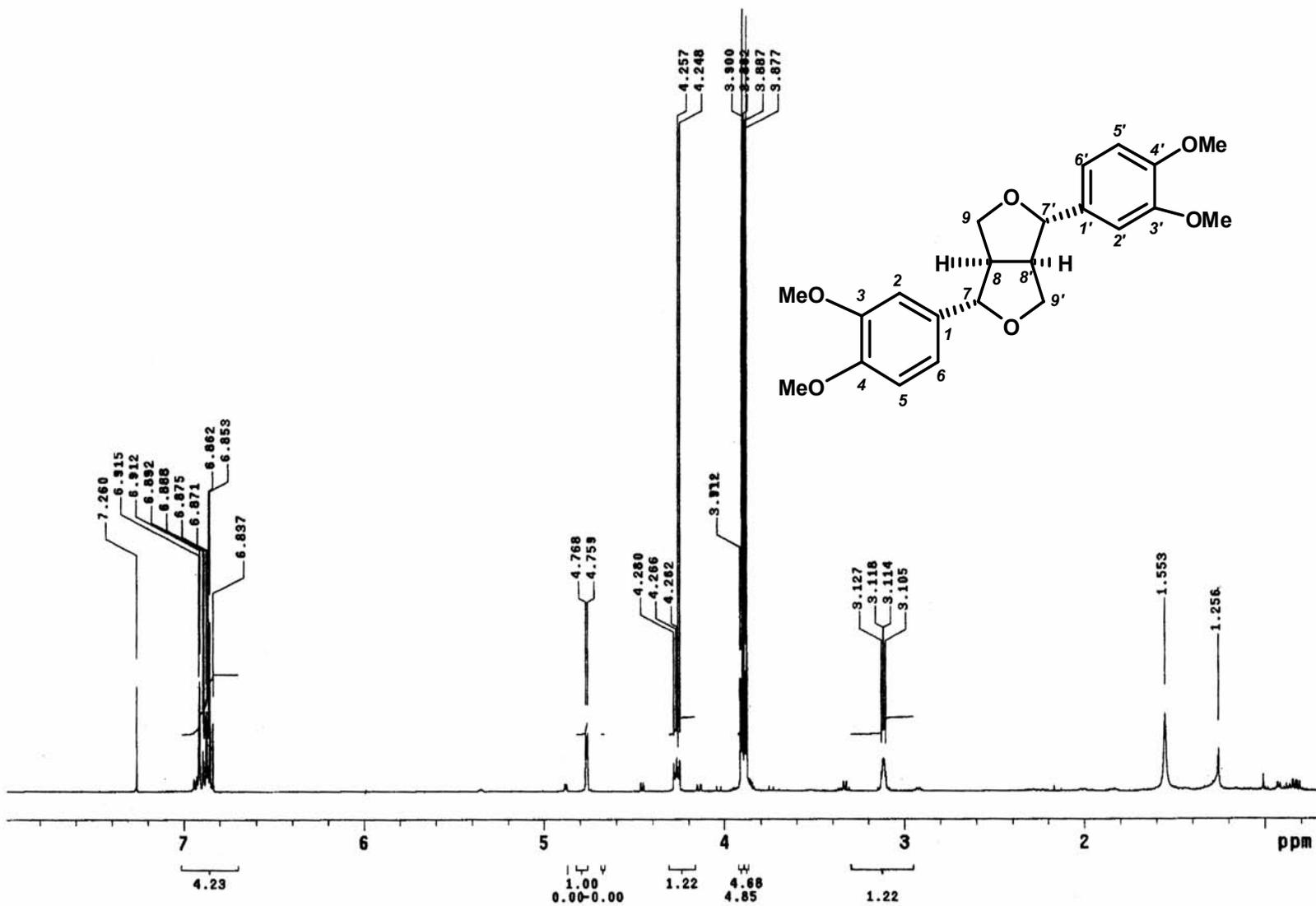


Figura 10: Espectro de RMN de ^1H da substância FP5-3 (500 MHz em CDCl_3).

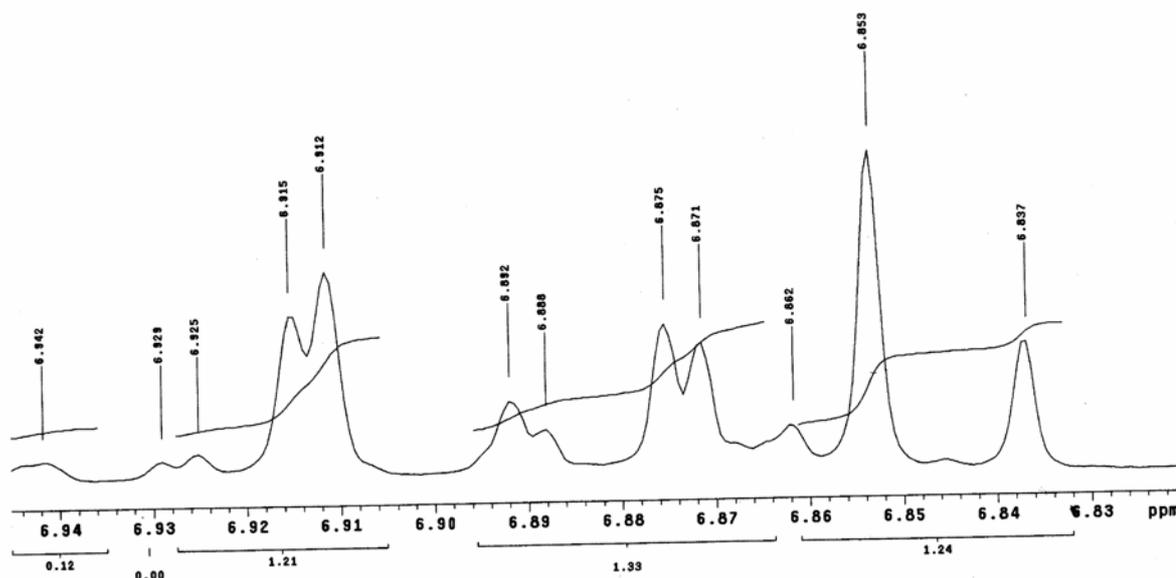


Figura 11: Ampliação da região aromática da substância FP5-3 (500 MHz em CDCl_3).

A partir da ampliação da região dos hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ^1H (figura 11) foi possível observar a presença de um padrão de substituição 1, 3, 4. Os sinais em δ 6,91 (*d*, $J=2,0$ Hz), 6,88 (*dd*, $J=2,0$ e 8,5 Hz) e δ 6,84 (*d*, $J=8,0$ Hz) foram atribuídos como sendo de H-2/H-2', H-6/H-6', H-5/H-5', respectivamente.

Nos espectros na região entre δ 2,6 a 3,5 (figura 12) e 4,1 a 4,9 (figura 13), destacam-se as absorções em δ 4,76 (2H, *d*, $J=4,5$ Hz), δ 4,26 (2H, *dd*, $J=6,5$ e 9,0 Hz), δ 3,84-3,86 (2 H, *m*) e δ 3,11 (2H, *dddd*, $J=9,5; 4,5; 4,5$ e 2,0 Hz), que sugerem a presença de um sistema furofurânico, pois as absorções observadas são compatíveis com os hidrogênios H-7/H-7', H-8/H-8', H-9/H-9 e H-9/H-9', do referido anel. Na figura 13 observam-se as absorções dos hidrogênios oxibenzílicos em δ 4,76 (2H, *d*, $J=4,5$ Hz) e dos hidrogênios oximetilênicos em δ 4,26 (2H, *dd*, $J=6,5$ e 9,0 Hz).

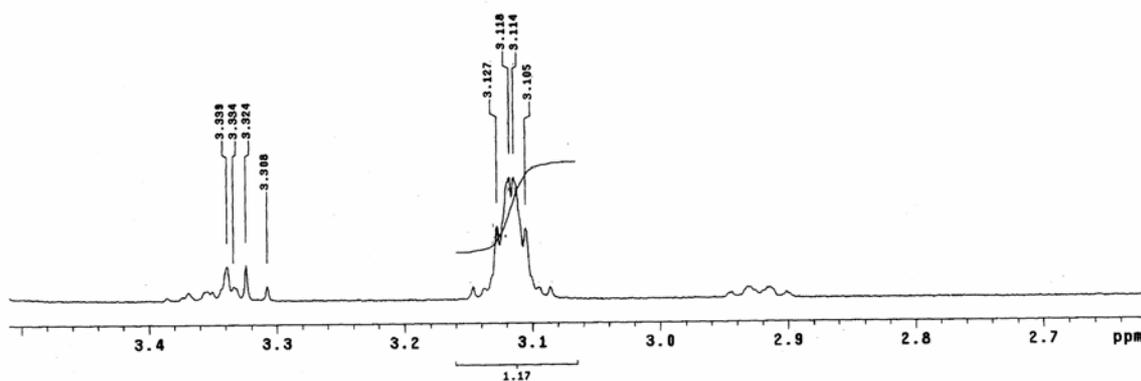


Figura 12: Ampliação da região de δ 4,1 a 4,9 ppm (RMN ^1H , 500 MHz em CDCl_3).

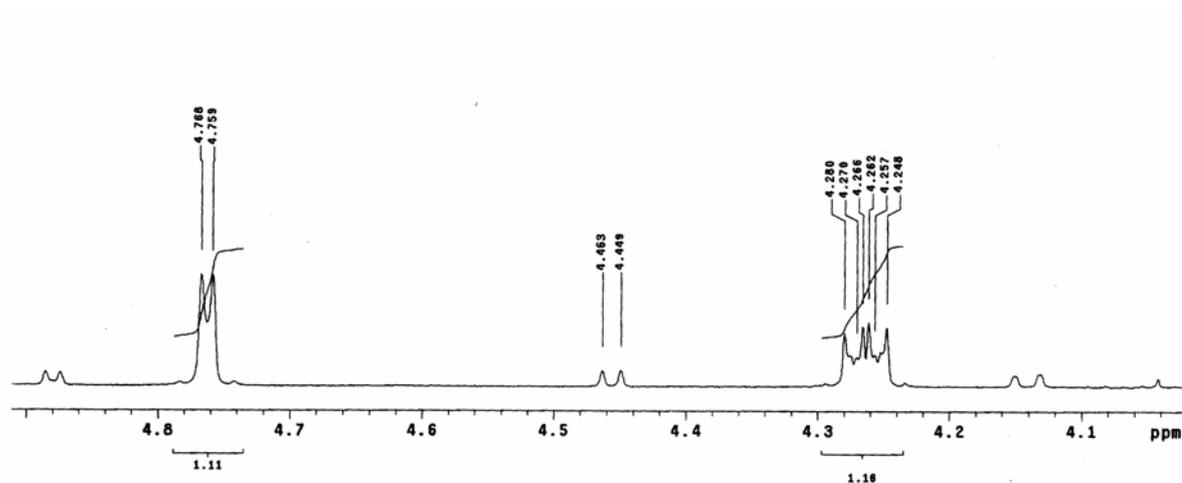


Figura 13: Ampliação da região de δ 4,1 a 4,9 ppm (RMN ^1H , 500 MHz em CDCl_3).

Os dados de RMN de ^1H desta lignana furofurânica foram comparados com aqueles descritos para a substância eudesmina (IIDA et al., 1982) como consta na tabela 6 e mostrou-se estar de acordo.

Tabela 6
 Dados de RMN de ^1H da substância **FP5-3** e eudesmina (IIDA et al, 1982)

H	FP5-3 (CDCl_3 , 500 MHz)	eudesmina (CDCl_3 , 200MHz)
2,2'	6,91 (2H, <i>d</i> , J=2,0 Hz)	6,84 – 6,92 (6H, <i>m</i>) Ar.
5,5'	6,84 (2H, <i>d</i> , J=8,0 Hz)	6,84 – 6,92 (6H, <i>m</i>) Ar.
6,6'	6,88 (2H, <i>dd</i> , J=8,5 e 2,0 Hz)	6,84 – 6,92 (6H, <i>m</i>) Ar.
7,7'	4,76 (2H, <i>d</i> , J=4,5 Hz)	4,76 (2H, <i>d</i> , J= 4Hz)
8,8'	3,11 (2H, <i>dddd</i> , J= 9,5; 4,5; 4,5 e 2,0 Hz)	3,12 (2 H, <i>m</i>)
9,9'a	4,26 (2H, <i>dd</i> , J=6,5 e 9,0 Hz)	4,26 (2H, <i>dd</i> , J= 7 e 9 Hz)
9,9'b	3,84-3,86 (2 H, <i>m</i>)	3,86-3,96 (2H, <i>m</i>)
4 MeO	3,88 (6H, <i>s</i>) e 3,90 (6H, <i>s</i>)	3,86 e 3,90 (12H, <i>s</i>)

δ (deslocamento químico) (numero de hidrogênios, multiplicidade e J em Hz)

Nos espectros de RMN de ^{13}C (figura 14) de FP5-3 observou-se como esperado a presença de 6 sinais para os 12 carbonos aromáticos, segundo a fórmula molecular proposta, confirmando a natureza simétrica da molécula. Os sinais em δ 148,7, δ 149,3, δ 109,3, δ 111,1, δ 118,3 e δ 133,6, em conjunto com os sinais em δ 55,9 e δ 56,0 são coerentes com a presença de um anel aromático dimetoxilado, nas posições 3/3' e 4/4'. O espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (figura 14) não registra os sinais em δ 148,7, δ 149,3 e δ 133,6, comprovando que os mesmos correspondem a sinais de carbonos quaternários.

O esqueleto furofurânico foi comprovado no espectro de RMN de ^{13}C (HBBDD/DEPT) (figura 14), pela presença dos sinais em δ 71,8 típicos de carbono metilênico carbinólico (C9/C9'); em δ 54,2 de carbono metínico (C8/C8') e em δ 85,8 de carbono metínico oxibenzílico (C7/C7').

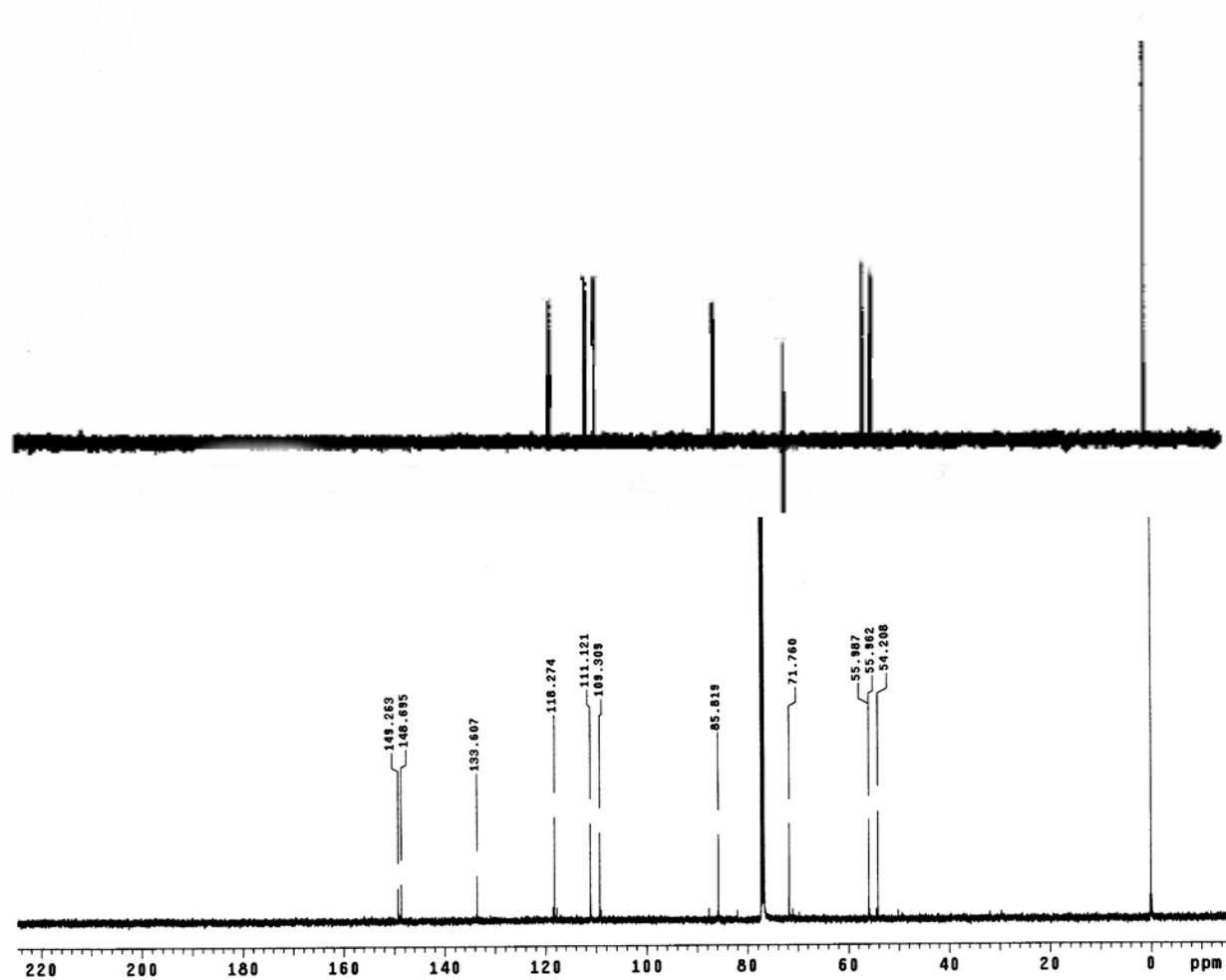


Figura 14: Espectro de RMN de ^{13}C (HBBSD e DEPT 135) da substância FP5-3 (125 MHz em CDCl_3).

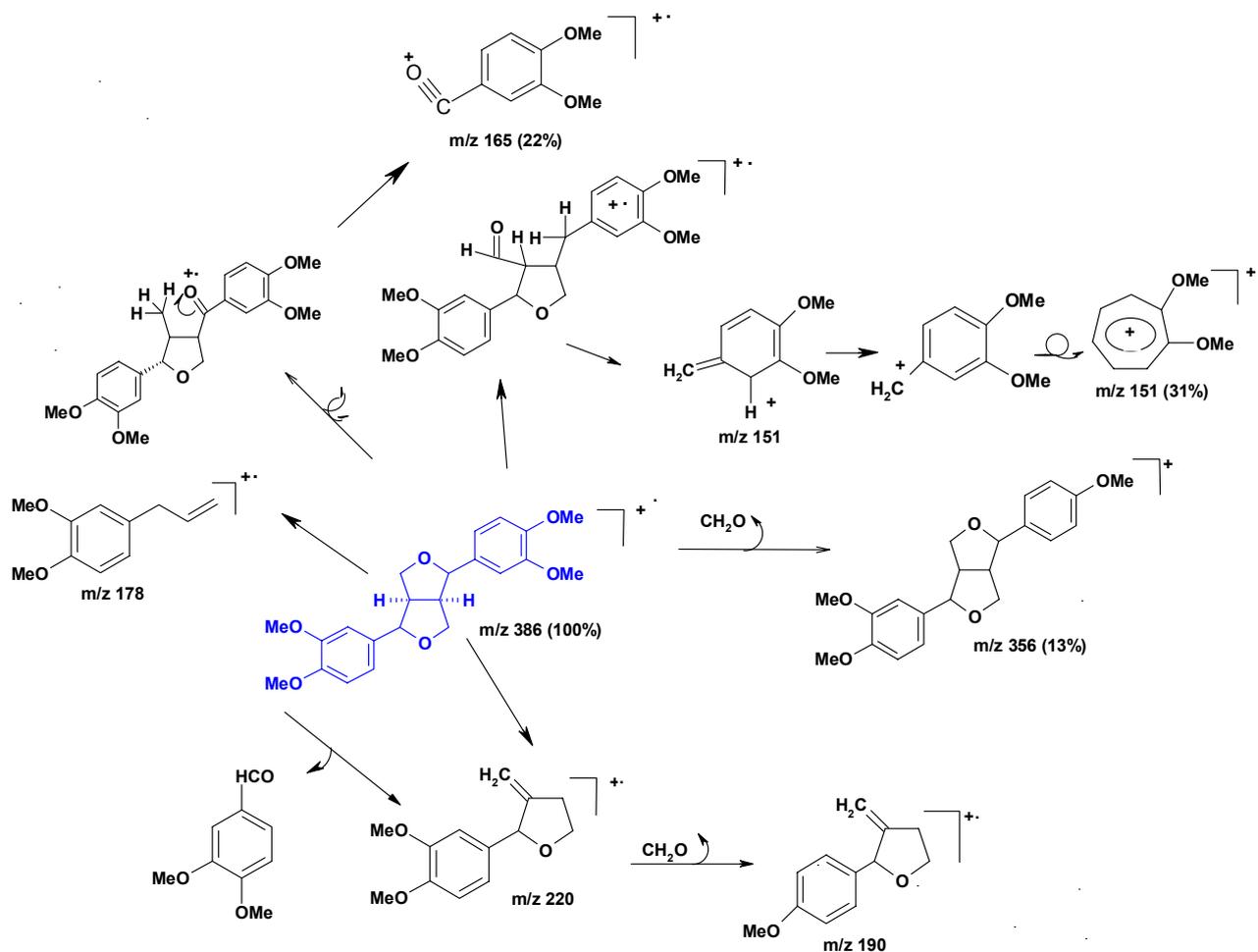
Tabela 7Dados de RMN de ^{13}C da substância FP5-3 e eudesmina (AGRAWAL & THAKUR, 1985)

CARBONO	FP5-3 (CDCl₃, 125 MHz)	multiplicidade	eudesmina (CDCl₃)
1,1'	133,6	C	134,0
2,2'	109,3	CH	109,1
3,3'	148,7	C	148,8
4,4'	149,3	C	149,5
5,5'	111,1	CH	111,4
6,6'	118,3	CH	118,4
7,7'	85,8	CH/CH ₃	85,8
8,8'	54,2	CH/CH ₃	54,3
9,9'	71,8	CH ₂	71,7
OCH ₃ - 3,3'	55,9	CH ₃ /CH	55,6
OCH ₃ - 4,4'	56,0	CH ₃ /CH	55,8

 δ (deslocamento químico)

De acordo com a tabela 7, os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (AGRAWAL e THAKUR, 1985), confirmando-se a identidade de FP5-3 com a eudesmina.

O EM apresentou um íon molecular com m/z 386 (100%), como anteriormente referido, e os seus principais íons fragmentários de m/z 165 (22%), m/z 151 (31%) e m/z 356 (13%), podem ser racionalizados com a fragmentação proposta para a eudesmina no esquema 11.



Esquema 11: Fragmentações da substância designada FP5-3 (eudesmina)

Segundo Agrawal e Thakur (1985), existem duas possibilidades estruturais para as lignanas furofurânicas que conferem simetria ao esqueleto furofurânico, que são os isômeros I e II (Figura 15). Na estrutura I, os deslocamentos dos carbonos 7,7' variam em torno de $\delta 85,8 \pm 0,1$, enquanto que para a estrutura II, esse valor em torno de $\delta 87,0 \pm 0,2$. Dessa forma, baseando-se nos deslocamentos químicos observados para os carbonos metínicos oxibenzílicos 7,7', para a substância FP5-3 de $\delta 85,8$, confirmou-se a estrutura como a I e não II.

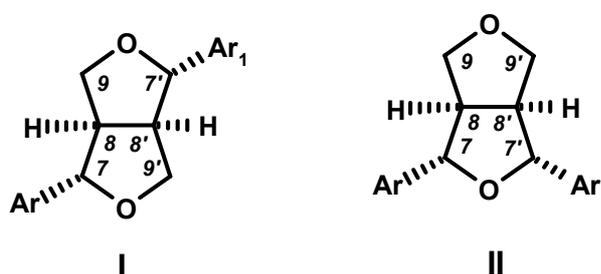


Figura 15: Alguns isômeros de lignanas furofurânicas simétricas.

Lignanas do tipo furofurânicas podem apresentar diferentes configurações em torno dos carbonos 7, 7' e 8, 8' conforme descrito por Pelter & Ward (1976), (figura 16).

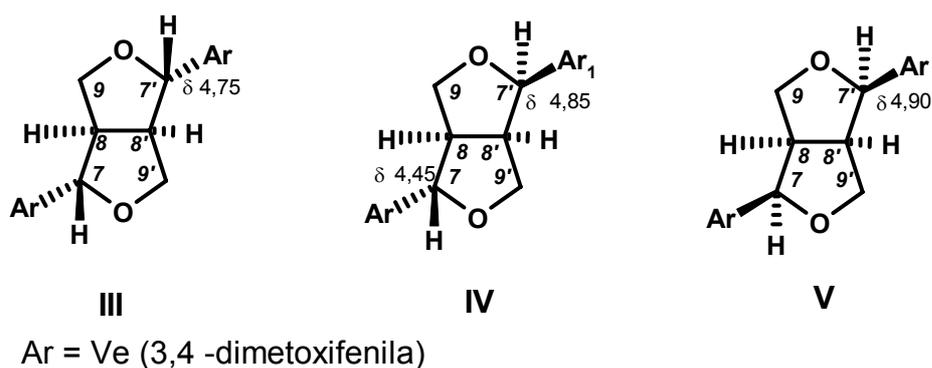


Figura 16: Possibilidades configuracionais de lignanas furofurânicas

Em relação aos hidrogênios 7,7', o sinal observado em $\delta 4,76$ de FP5-3 foi de fundamental importância para determinação da configuração relativa. Este valor corresponde ao de lignanas que apresentam os anéis aromáticos em posição equatorial (III), confirmando a estrutura da eudesmina.

4.2.2 Lignana FP5-2

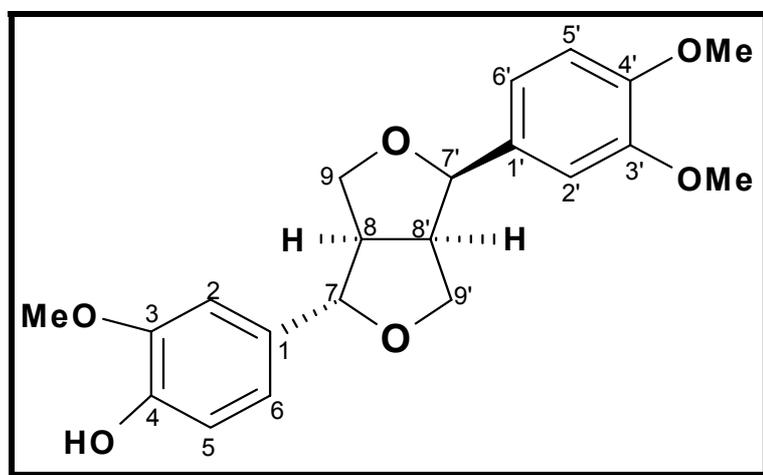


Figura 17. Estrutura da substância FP5-2 (filigenol)

O espectro de massas de **FP5-2** apresenta o pico do íon molecular em m/z 372 (Figura 17), que associado ao número de átomos de C e de H, observados nos respectivos espectros de RMN possibilitaram a proposição da fórmula molecular $C_{21}H_{24}O_6$.

O espectro de RMN de 1H (figura 18) registra a presença de 6 hidrogênios aromáticos no intervalo de δ 6,83-6,94 (figura 19), referentes a dois anéis aromáticos possivelmente trissubstituídos.

O espectro de RMN de 1H mostra ainda a absorção de três grupos metoxílicos aromáticos em δ 3,90 (3H, s), δ 3,91 (3H, s) e δ 3,86 (3H, s). O quarto grupo oxigenado foi atribuído a presença de uma hidroxila fenólica observado em δ 5,58 (1H, s). Esses dados permitem sugerir a presença de um anel 3,4-di-metoxifenílico e um outro, 4-hidróxi-3-metoxifenílico para FP5-2 (Figura 18).

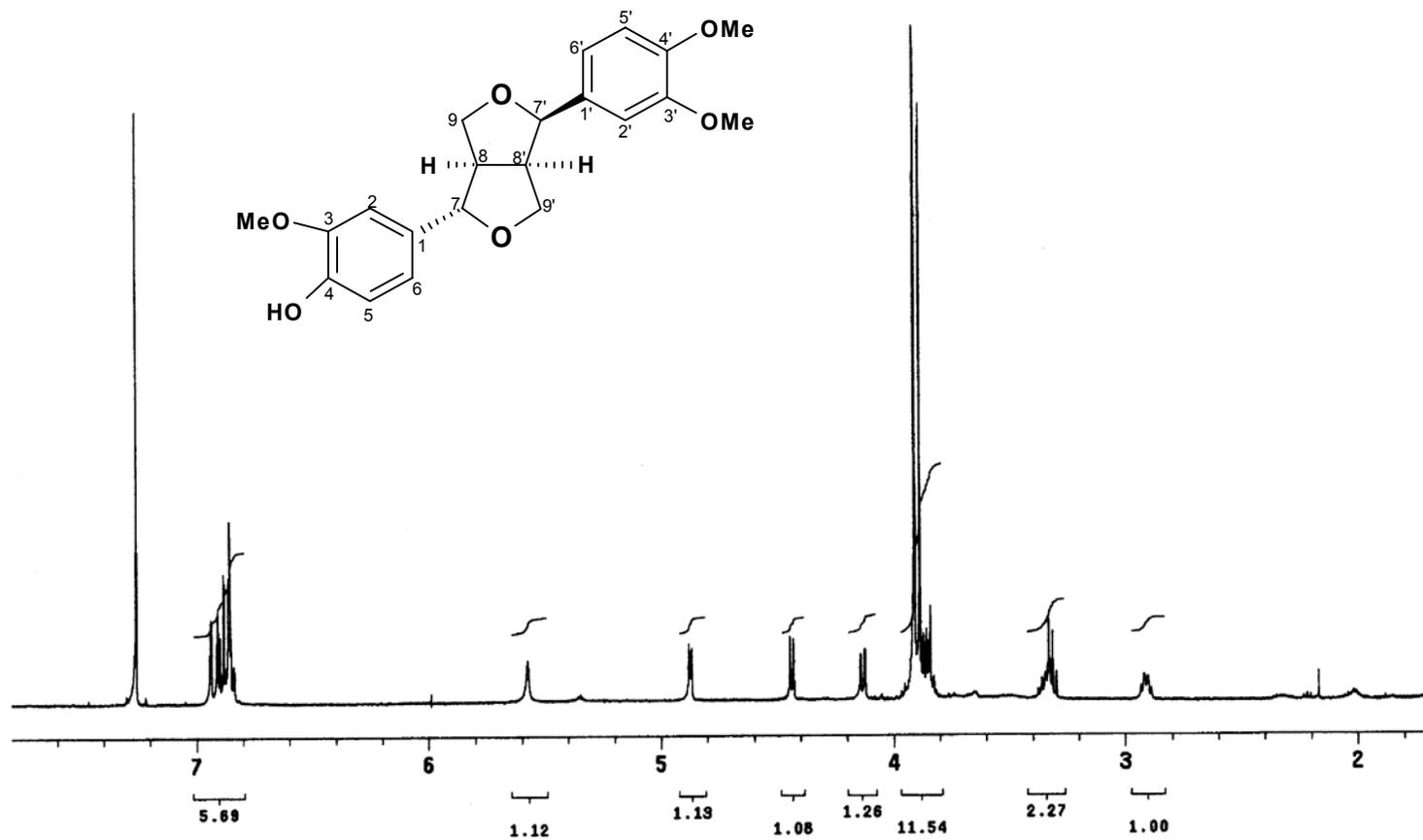


Figura 18: Espectro de RMN de ¹H da substância FP5-2 (500 MHz e CDCl₃)

A ampliação na região dos hidrogênios aromáticos auxiliada por registro à temperatura de 40 °C (figura 19) apresenta uma boa resolução dos sinais. Entre δ 6,83-6,95, absorvem os sinais em δ 6,94 (*d*, $J=1,5$ Hz, H-2), em δ 6,91 (*d*, $J=2$ Hz, H-2'), em δ 6,89 (*d*, $J=8$ Hz, H-5'), δ 6,87 (*dd*, $J=8$ e 1,5 Hz, H-6), δ 6,85 (*d*, $J=8$ Hz, H-5), δ 6,85 (*dd*, $J=8$ e 2 Hz, H-6').

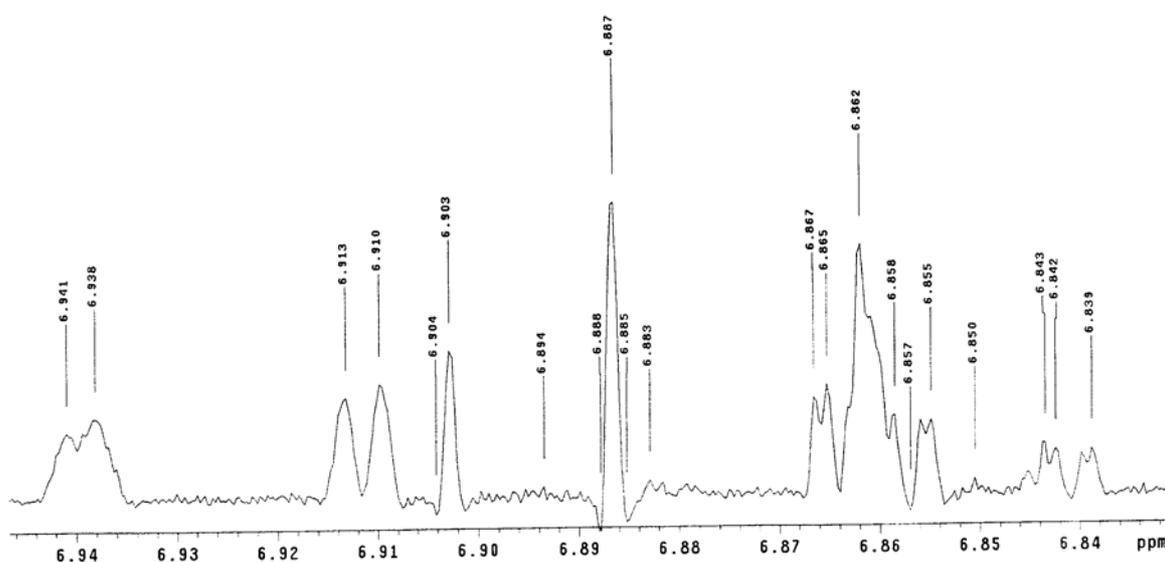


Figura 19: Ampliação da região aromática de RMN ^1H de filigenol (500 MHz e CDCl_3).

Os hidrogênios do esqueleto furofurânico podem ser observados pelas absorções no espectro de RMN de ^1H dos sinais δ 4,88 (*d*, $J= 5,5$ Hz, H-7'), δ 4,44 (*d*, $J= 7,0$ Hz, H-7), δ 4,13 (*d*, $J= 9,5$ Hz, H-9a), δ 3,85 (*m*, H-9b, H-9'a), δ 3,32 (*m*, H-8', H-9'b) e 2,91 (*m*, H-8) (figura 20 e 21).

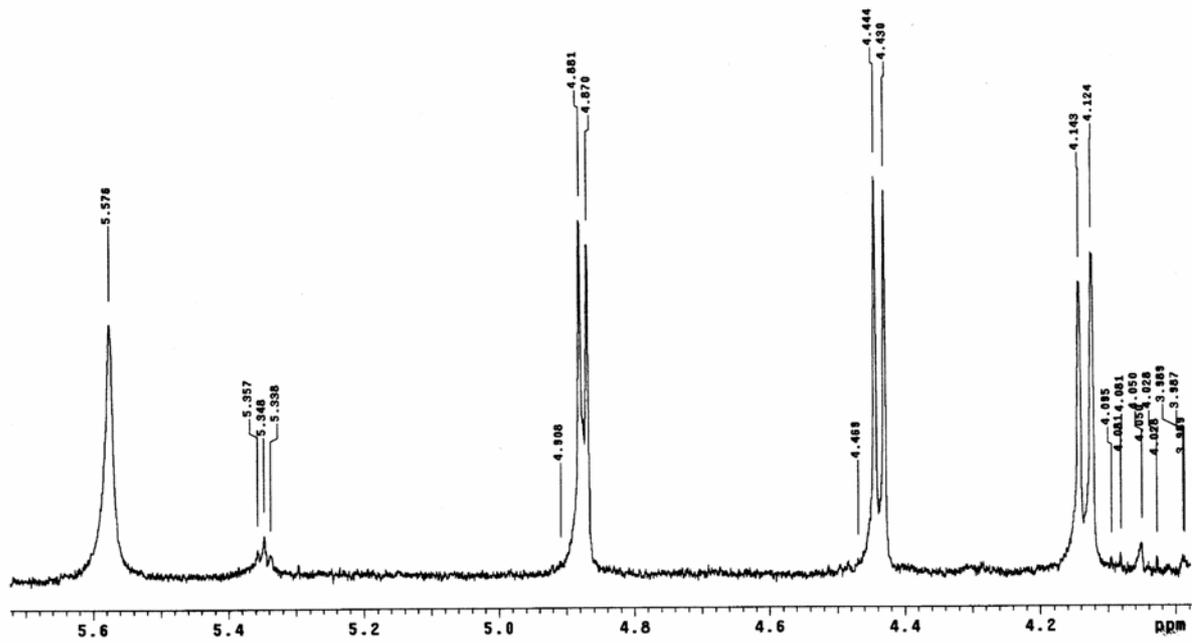


Figura 20: Espectro de RMN ^1H com ampliação da região de 5,6 e 4,0 ppm (500 MHz e CDCl_3).

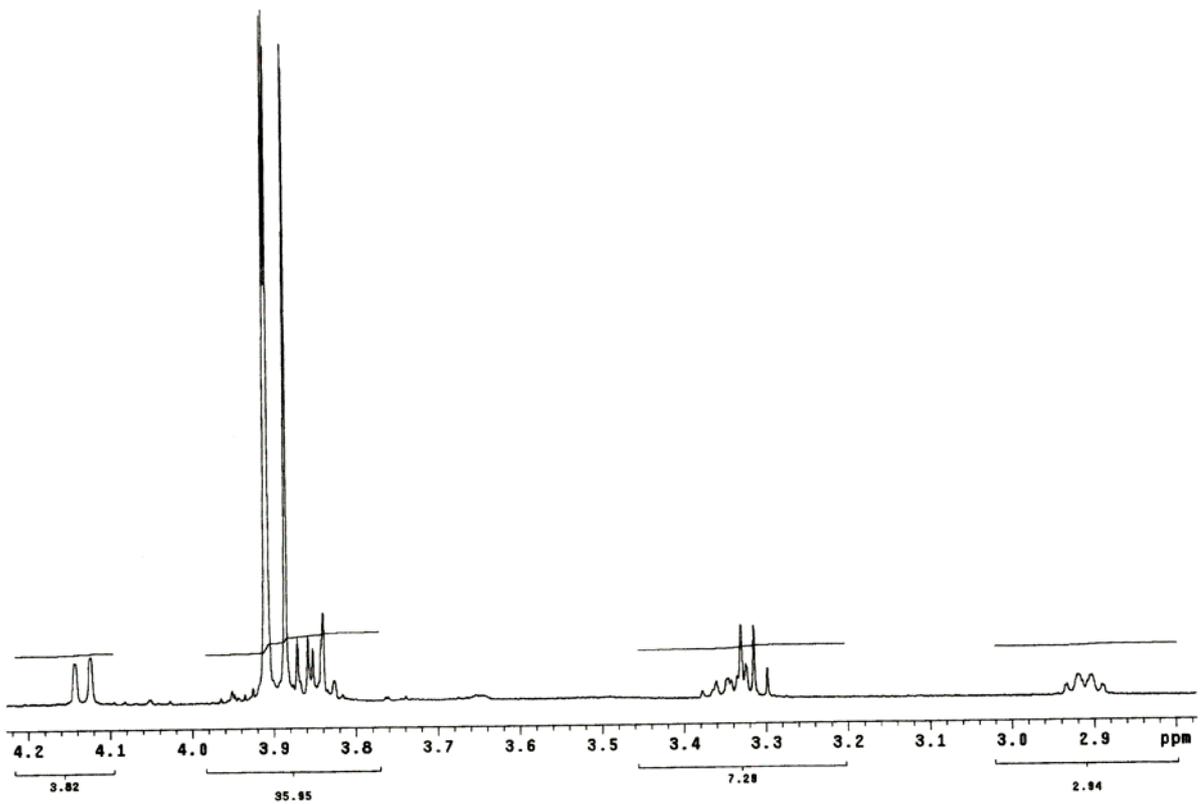


Figura 21: Ampliação da região de δ 2,9 e 4,2 ppm do espectro de RMN de ^1H de FP5-2.

A atribuição dos hidrogênios do sistema furofurânico foi realizada com base na análise do espectro de gCOSY (figura 22). As correlações observadas (tabela 8) indicaram correlações consistentes com um sistema de spin H7-H8-H9a-H9b, H7'-H8'-H9'a-H9'b, além de correlação entre os hidrogênios H8-H8', mostrando se tratar de uma lignana furofurânica.

Tabela 8
Correlações observadas no espectro de RMN ¹H gCOSY (500 MHz, δ , CDCl₃)

Hidrogênios	FP5-2	gCOSY
H-7	4,44	(H-8)
H-7'	4,88	(H-8')
H-8	2,91	(H7), (H8'), (H-9a), (H9b)
H-8'	3,32	(H7'), (H8), (H-9'a), (H9'b)
H-9a	4,13	(H-8), (H9b)
H-9'a	3,85	(H-8'), (H9'b)
H-9b	3,85	(H8), (H-9a)
H-9'b	3,32	(H8'), (H-9'a)

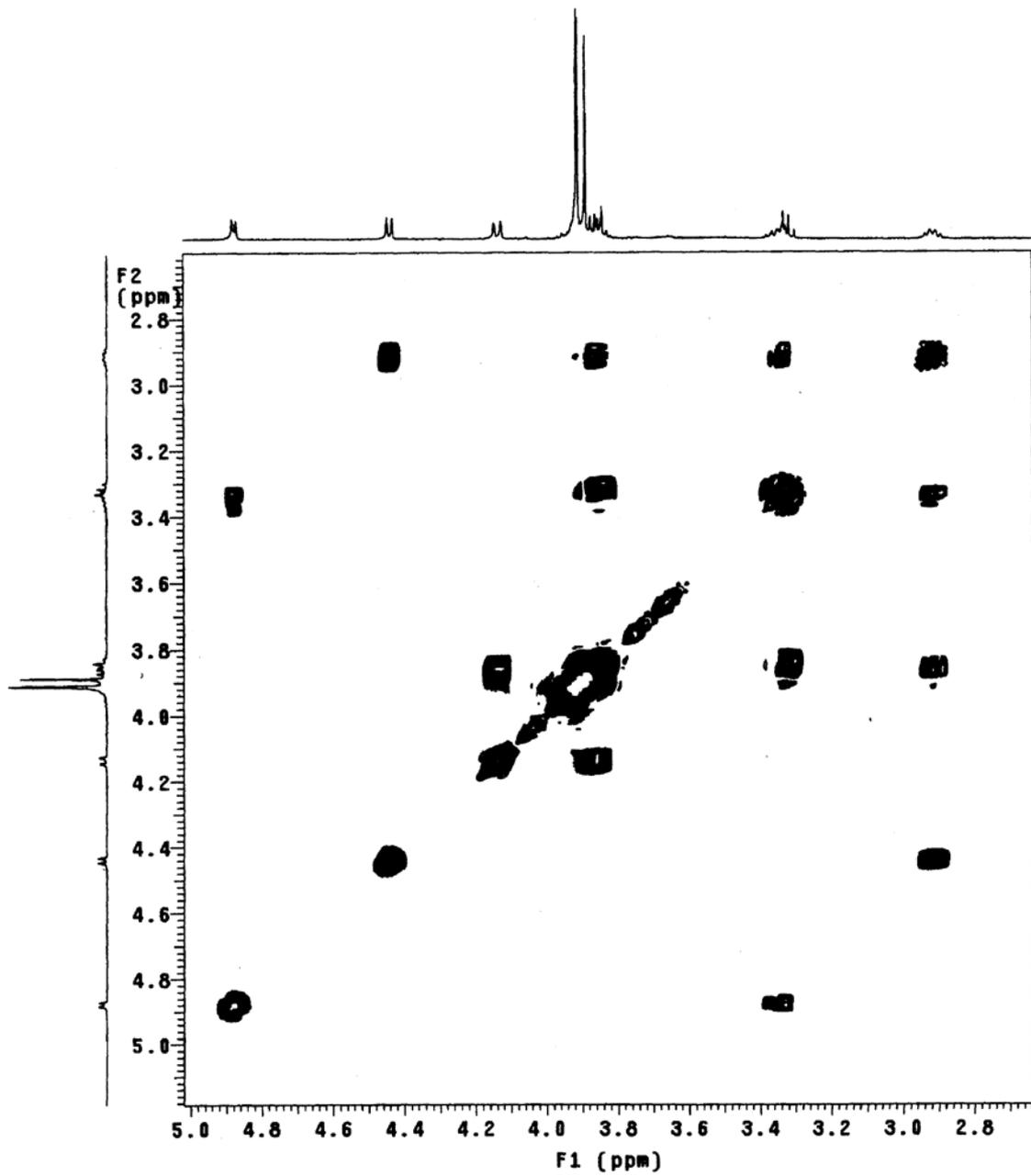


Figura 22: Espectro de gCOSY para FP5-2 (500 MHz, CDCl₃).

Na tabela 9 são apresentados os dados de RMN de ^1H de FP5-2 tabelados e comparados com os dados de filigenol e silvatesmina descritos na literatura.

Tabela 9
Dados de RMN de ^1H da substância **FP5-2**, filigenol (IIDA et al., 1982) e silvatesmina (BANERJ & PAL, 1982).

H	FP5-2 (δ , CDCl_3 , 500 MHz)	filigenol (δ , CDCl_3 , 100 MHz)	silvatesmina (δ , CDCl_3 , 270 MHz)
2	6,94 (1H, <i>d</i> , J= 1,5 Hz)	-	6,8–7,0 (6H, <i>m</i>) Ar.
2'	6,91 (1H, <i>d</i> , J=2 Hz)		
5	6,85 (1H, <i>d</i> , J= 8 Hz)	-	6,8–7,0 (6H, <i>m</i>) Ar.
5'	6,89 (1H, <i>d</i> , J= 8 Hz)		
6	6,87 (1H, <i>dd</i> , J= 8 e 1,5 Hz)	-	6,8–7,0 (6H, <i>m</i>) Ar.
6'	6,85 (1H, <i>dd</i> , J= 8 e 2 Hz).		
7	4,44 (1H, <i>d</i> , J= 7 Hz)	4,42 (1H, <i>d</i> , J= 7 Hz)	4,43 (1H, <i>d</i> , J= 7,3Hz)
7'	4,88 (1H, <i>d</i> , J= 5,5Hz)	4,48 (1H, <i>d</i> , J= 5 Hz)	4,88 (1H, <i>d</i> , J= 5,4Hz)
8	2,91 (1H, <i>m</i>)	2,90 (1H, <i>m</i>)	2,85 (1H, <i>m</i>)
8'	3,32 (2H, <i>m</i>)	3,2-3,4 (2H, <i>m</i>)	3,85 (2H, <i>m</i>)
9a	4,13 (1H, <i>d</i> , J= 9,5 Hz)		4,13 (1H, <i>dd</i> , J= 9,8Hz)
9'a	3,85 (2H, <i>m</i>)	3,6-4,2 (3H, <i>m</i>)	3,85 (2H, <i>m</i>)
9b	3,85 (2H, <i>m</i>)		3,85 (2H, <i>m</i>)
9'b	3,32 (2H, <i>m</i>)	3,6-4,2 (3H, <i>m</i>)	3,26-3,40 (2H, <i>m</i>)
MeO-3, MeO-3'	3,90 (3H, <i>s</i>) 3,91 (3H, <i>s</i>)	3,84-3,88 (2X OMe)	3,91 e 3,90 (6H, <i>s</i>)
MeO-4'	3,86(3H, <i>s</i>)	-	3,86 (6H, <i>s</i>)
OH (C-4)	5,58 (1H, <i>s</i>)	5,56 (1H, <i>s</i>)	5,55 (1H, <i>s</i>).

δ em ppm .

Uma diferença inicial observada nos espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 10) de FP5-3 e de FP5-2, na região de absorção dos carbonos alifáticos consistiu no número de sinais. No caso da eudesmina, dada a simetria da molécula, observou-se um número de sinais menor; enquanto a FP5-2 apresentou todos os carbonos da molécula. Os deslocamentos químicos observados para os carbonos induzem que FP5-2 pertence também à classe de lignanas furofurânicas.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23) também pôde se observar dois anéis trissubstituídos e dioxigenados, referentes a um anel 3,4-di-metoxifenílico e outro 4-hidróxi-3-metoxifenílico para FP5-2.

O sistema furofurânico pôde ser confirmado pela presença dos carbonos oximetilênicos δ 71,0/69,7 (C9'/C9), dos carbonos metínicos em δ 54,5/50,1 (C8/C8') e dos carbonos oxibenzílicos em δ 87,7/82,0 (C7'/C7).

Os sinais observados foram tabelados (tabela 10) e comparados com os dados da literatura (AGRAWAL & THAKUR, 1985) para o filigenol e mostraram estar de acordo com os dados publicados.

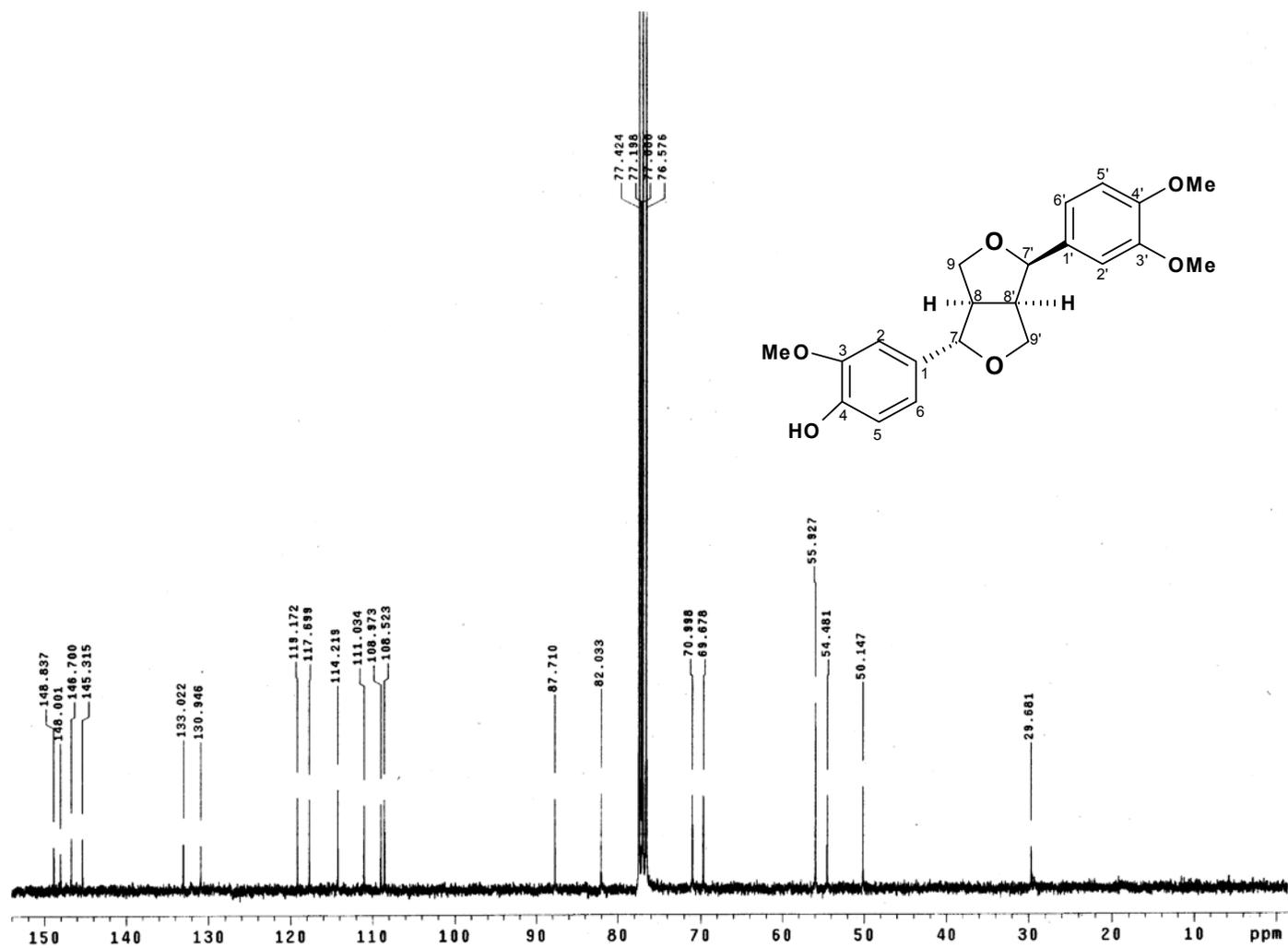


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3).

Tabela 10Dados de RMN de ^{13}C da substância **FP5-2** e do filigenol (AGRAWAL e THAKUR, 1985)

Carbono	FP5-2 (75 MHz, CDCl_3)	filigenol
1	133,0	133,1
1'	131,0	131,0
2	109,0	109,1
2'	108,5	108,6
3	148,8	148,9
3'	146,7	146,8
4	148,0	148,1
4'	145,3	145,4
5	111,0	111,2
5'	114,2	114,3
6	119,2	119,2
6'	117,7	117,8
7	87,7	87,8
7'	82,0	82,1
8	54,5	54,5
8'	50,1	50,2
9	71,0	71,7
9'	69,7	69,7
MeO-3,3' e 4'	55,9	55,9

 δ valores em ppm

Os possíveis íons fragmentários correspondentes às relações m/z encontram-se no esquema 12 e estão de acordo com a estrutura do filigenol.

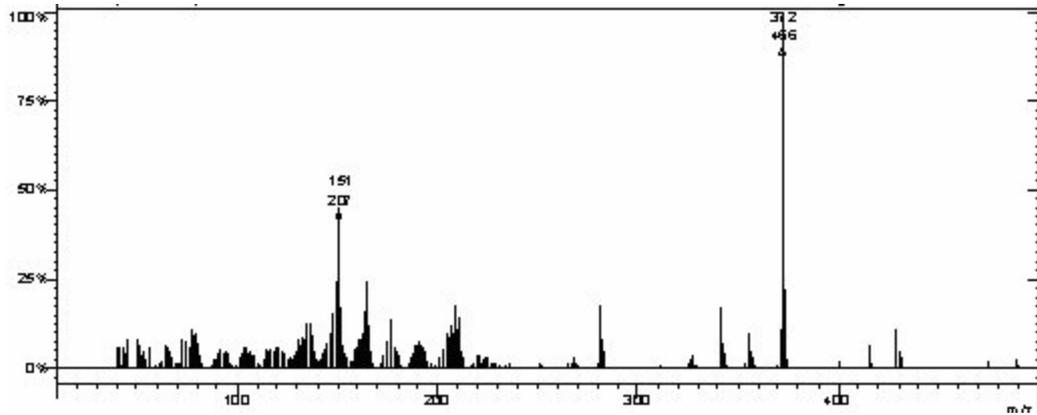
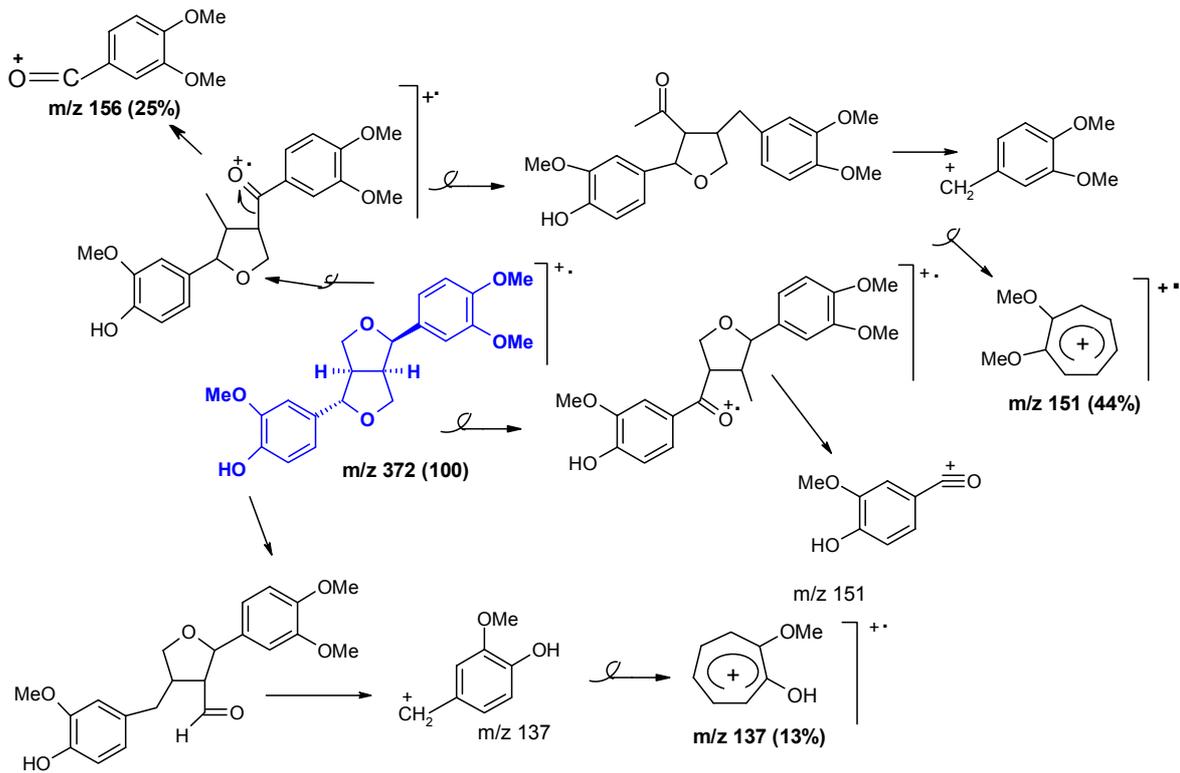
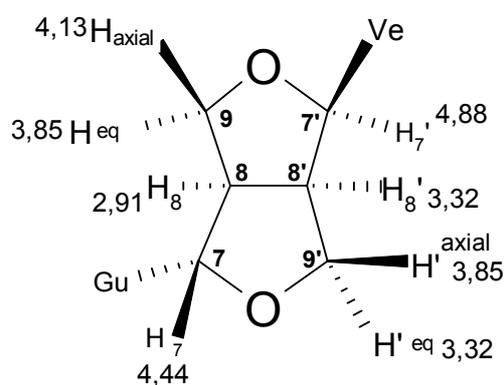


Figura 24: Espectro de massas da substância filigenol



Esquema 12. Fragmentações da substância filigenol

A análise configuracional do anel furofurânico foi baseada nos deslocamentos químicos dos hidrogênios 7,7' (AGRAWAL e THAKUR, 1985), como discutido para FP5-3. Os sinais observados em δ 4,44 e δ 4,88 de FP5-2 (figura 25), estão próximos da configuração IV mostrado na Figura 16. Uma vez estabelecido que um dos grupos aromáticos encontra-se em pseudo-axial e o outro em pseudo-equatorial, foi pesquisado nos dados da literatura, qual o anel que se encontrava em pseudo-axial.



Gu=guaiacila (4-hidroxi-3-metoxifenila)
Ve=veratrila (3,4-dimetoxifenila)

Figura 25: Configuração do anel furofurânico de FP5-2.

Os dados descritos identificaram a substância FP5-2 como sendo o filigenol, que possui a constituição dos grupos substituintes do furofurano de 3,4-dimetoxifenila (veratrila) em pseudo-axial e o grupo 4-hidroxi-3-metoxifenila (guaiacila) em pseudo-equatorial (figura 25) (PELTER & WARD, 1976).

Segundo a literatura existem outras denominações para a substância FP5-2. Além de filigenol e filigenina (IIDA et al., 1982) há também silvatesmina (BANERJI & PAL, 1982; SU et al., 1999 e MIAO et al., 2004).

4.2.3. Esteróide FP3-1

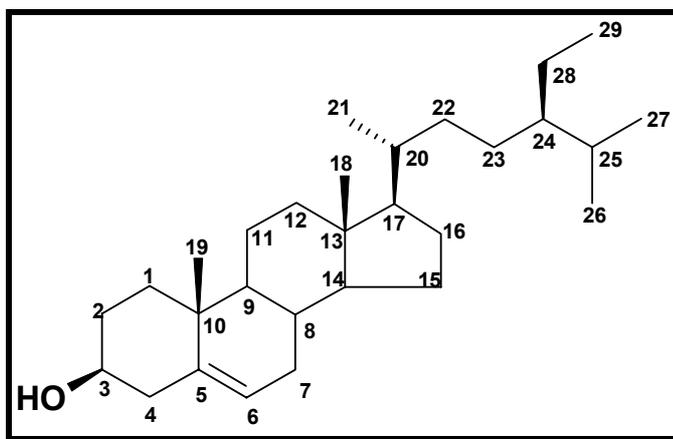


Figura 26. Estrutura da substância β -sitosterol

O espectro de RMN de ^{13}C (figura 29) da substância isolada FP3-1 apresenta sinais na região de carbonos olefínicos C_5 e C_6 que absorvem em δ 140,7 e δ 121,7 que sugerem pertencer a β -sitosterol ou estigmasterol, dois esteróides muito freqüentes em espécies vegetais. A ausência de sinais de outros carbonos olefínicos no espectro de RMN de ^{13}C e a presença de sinais de carbonos sp^3 em δ 33,9 e δ 26,0 de C_{22} e C_{23} (tabela 12) excluem a identidade do esteróide FP3-1 com o estigmasterol. A tabela 12 compara os deslocamentos químicos observados para o FP3-1 com os dados de β -sitosterol descritos na literatura (DE-EKNAMKUL & POTDUANG, 2003).

O espectro de RMN de ^1H do β -sitosterol (figuras 27 e 28) e tabela 11 mostra um conjunto de sinais de metilas singletos, dubletos e tripleto entre δ 0,69 e δ 1,02: δ 0,69 (3H-18, s); δ 1,02 (3H-19, s); δ 0,82 (3H-27, d); δ 0,84 (3H-26, d); δ 0,93 (3H-21, d) e δ 0,85 (3H-29, t). A tabela 11 contém deslocamentos químicos observados para os grupos metílicos de FP3-1 comparados com os dados de literatura para o β -sitosterol (RUBINSTEIN et al., 1976).

Tabela 11
 Dados de RMN de ^1H da substância FP3-1 comparado com
 a literatura (RUBINSTEIN et al., 1976).

Hidrogênio	FP3-1 (CDCl_3) e 300 MHz	β -sitosterol (CDCl_3) e 220 MHz
C-18	0,69 (3H, s)	0,68
C-19	1,02 (3H, s)	1,01
C-21	0,93 (3H, d)	0,92
C-26	0,84 (3H, s)	0,83
C-27	0,82 (3H, d)	0,81
C-29	0,85 (3H, t)	0,84

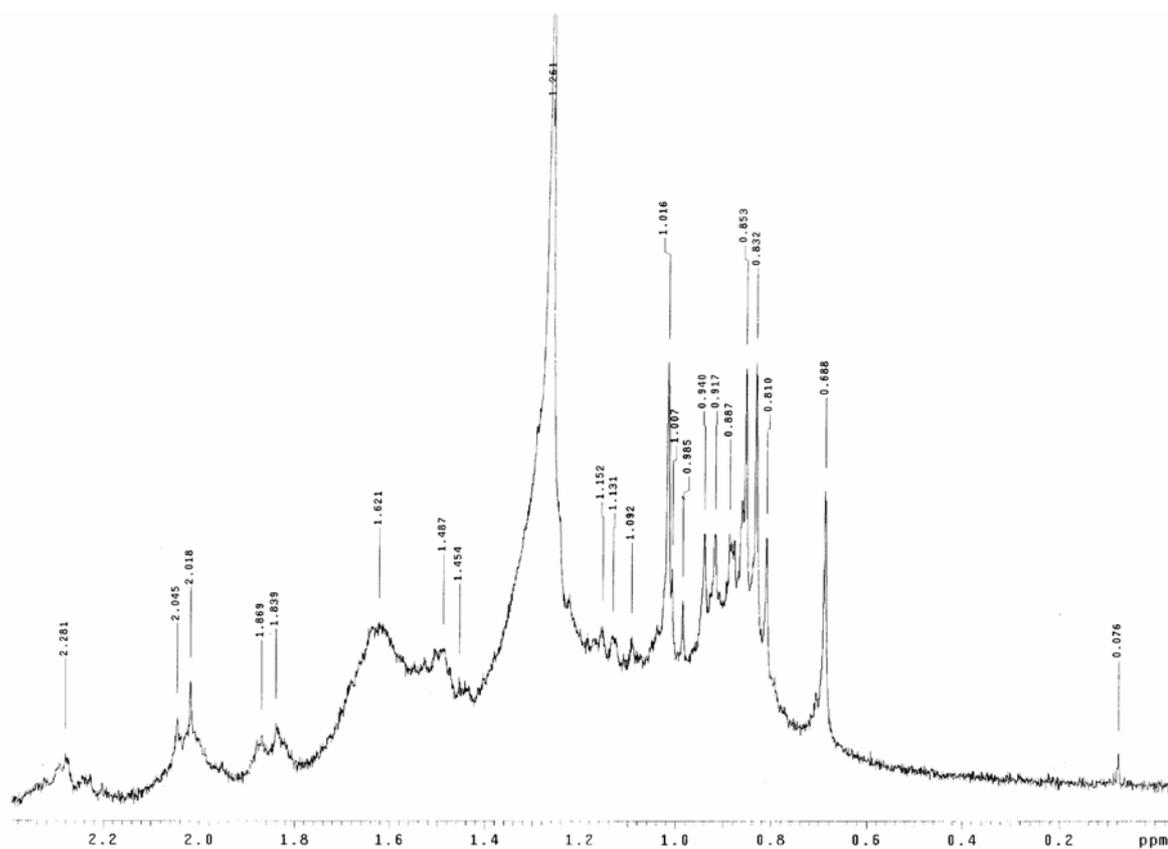


Figura 27: Ampliação do espectro de RMN ^1H na região de δ 2,30 a 0,20

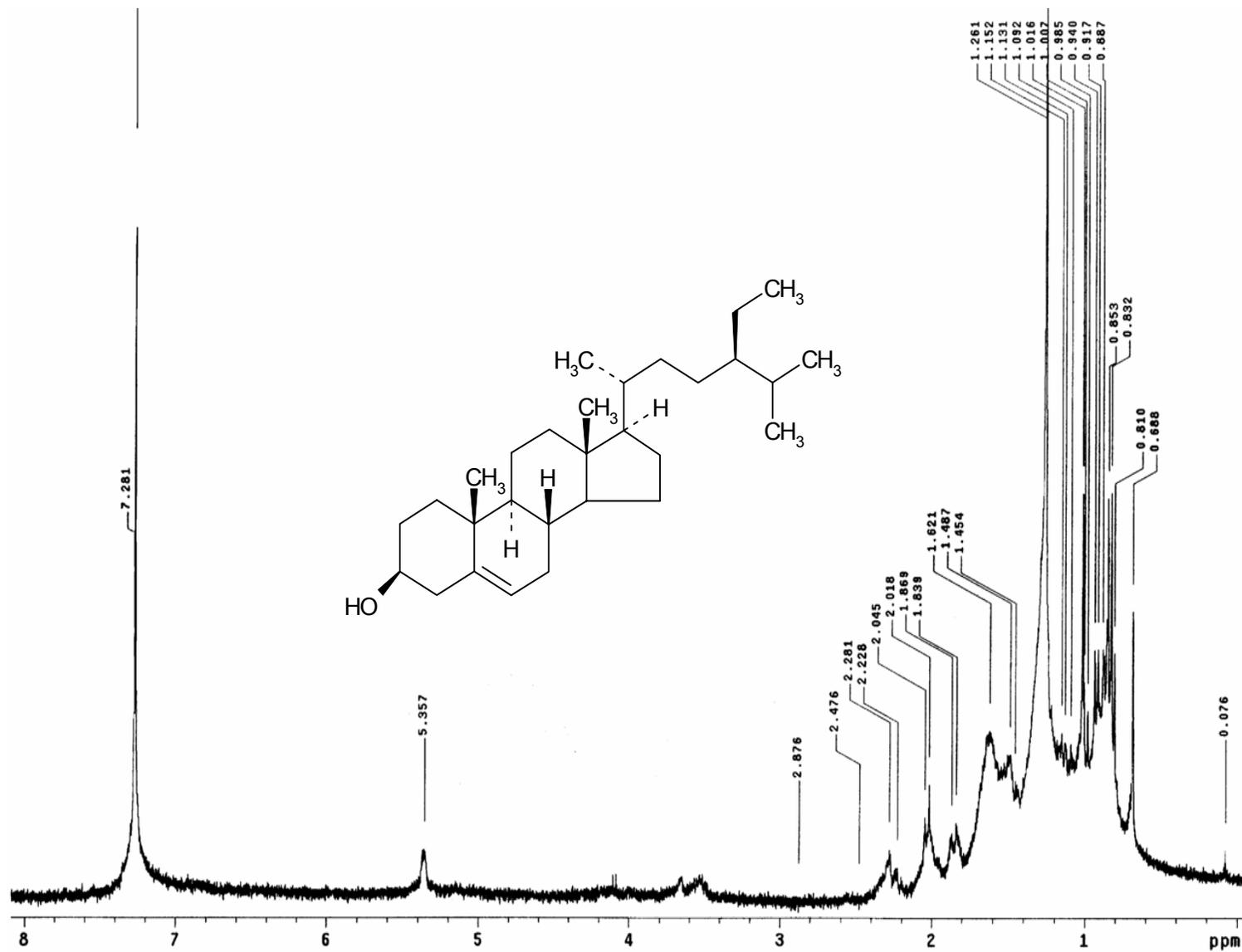


Figura 28 - Espectro de RMN de ¹H do β -sitosterol (CDCl₃ e 300 MHz)

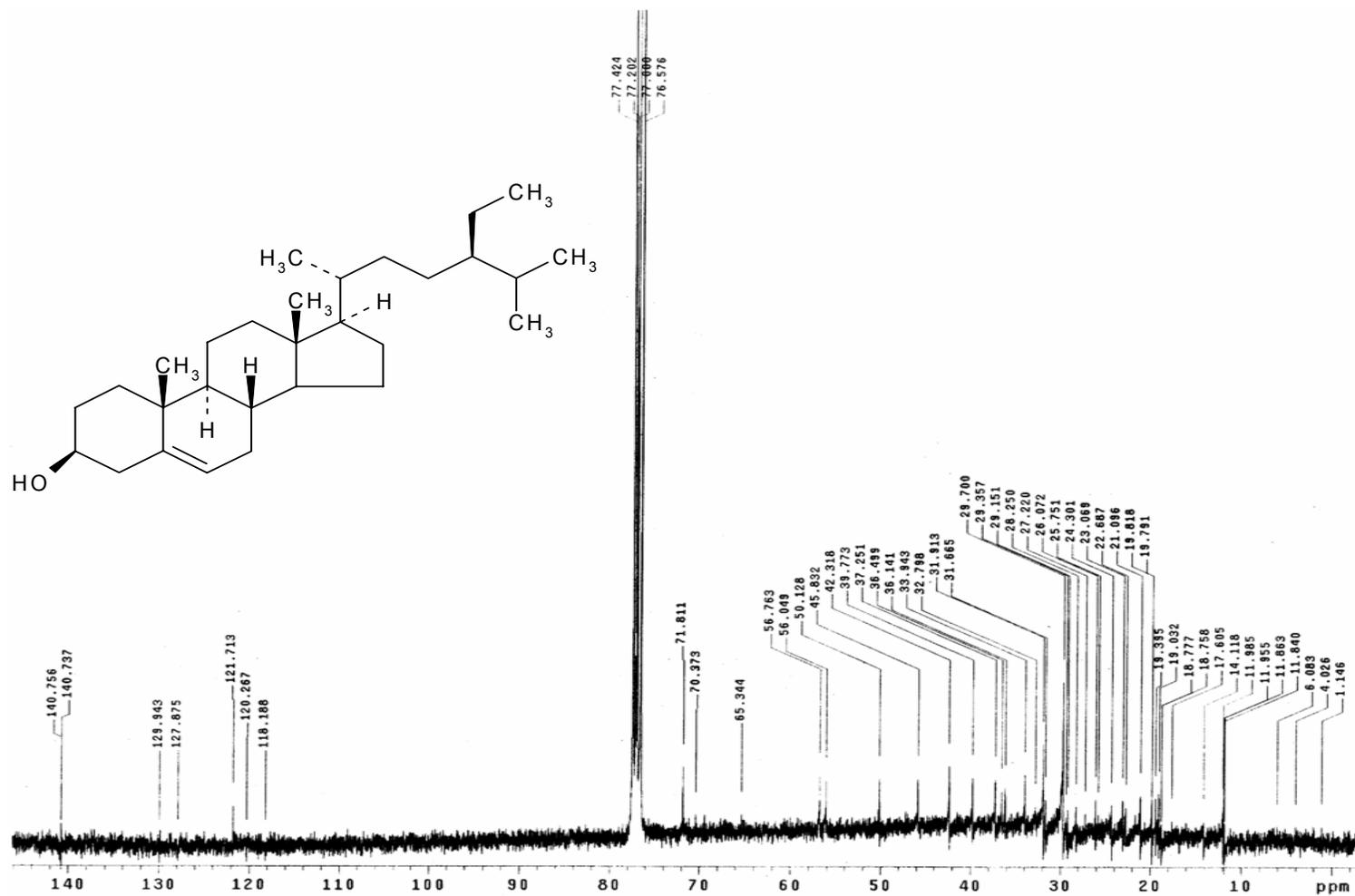
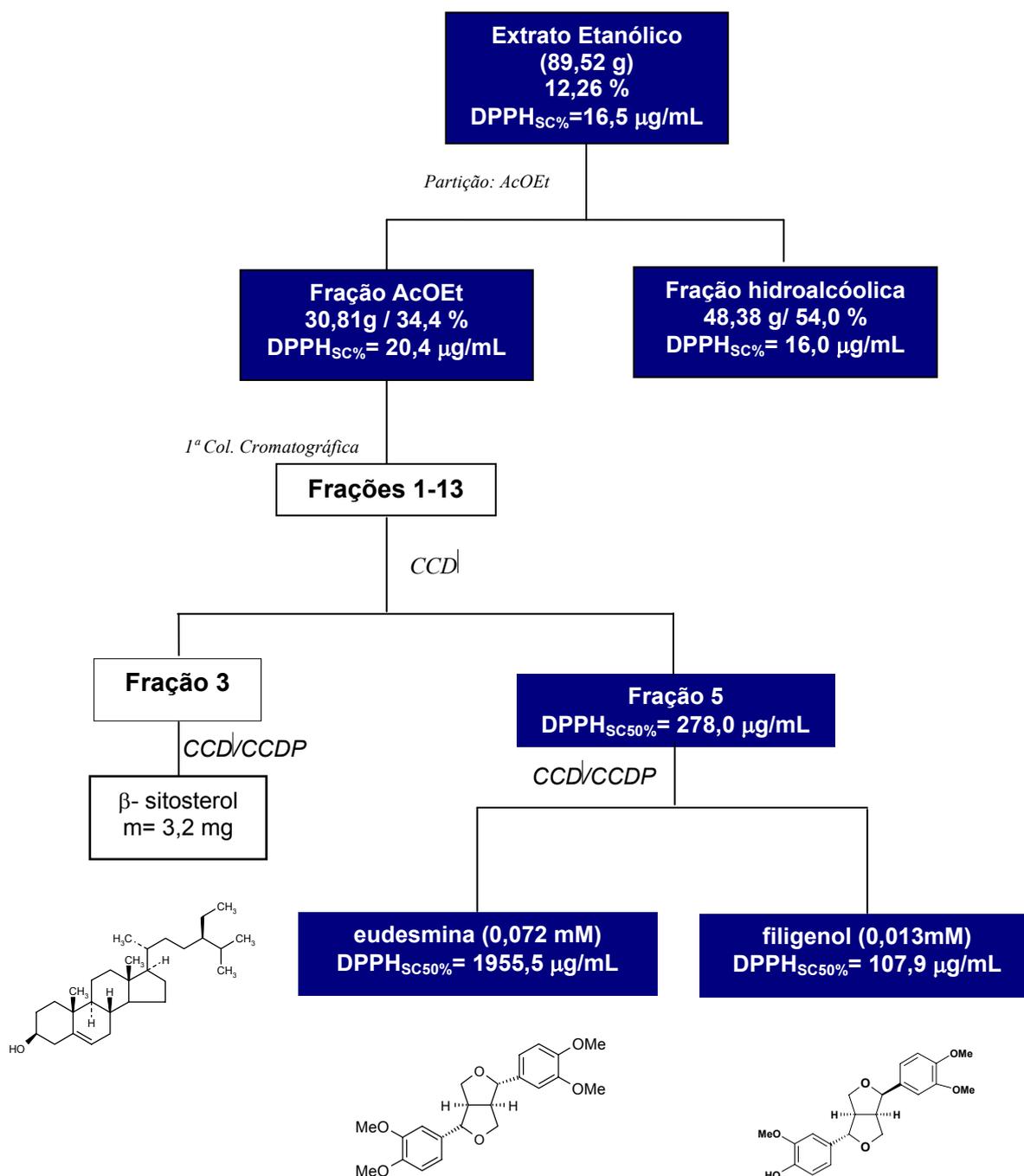


Figura 29 - Espectro de RMN de ^{13}C do β -sitosterol (CDCl_3 e 75 Hz).

Tabela 12
 Dados de RMN de ^{13}C da substância **FP3-1** comparado com a literatura
 (DE-EKNAMKUL & POTDUANG, 2003).

Carbono	FP3-1 (δ , 75 MHz; CDCl_3)	β -sitosterol (δ , 125 MHz, CDCl_3)
1	37,2	37,2
2	31,6	31,7
3	71,8	71,8
4	42,2	42,3
5	140,7	140,7
6	121,7	121,7
7	31,9	31,9
8	31,9	31,9
9	50,1	50,1
10	36,5	36,5
11	21,1	21,1
12	39,7	39,7
13	42,3	42,3
14	56,7	56,7
15	24,3	24,3
16	28,2	28,2
17	56,0	56,0
18	11,8	11,8
19	19,4	19,4
20	36,1	34,1
21	18,8	18,7
22	33,9	33,9
23	26,0	26,1
24	45,8	45,8
25	29,1	29,1
26	19,8	19,8
27	19,0	19,0
28	23,0	23,1
29	11,9	11,9

4.3. Resultados da Atividade Antioxidante



Esquema 13: Fracionamento do extrato e resultados de ensaio com DPPH.

O Esquema 13 mostra o procedimento seguido para a preparação do extrato, o fracionamento por partição de solvente ou por técnicas cromatográficas. O esquema apresenta ainda os resultados obtidos com DPPH do extrato bruto, das frações e das substâncias isoladas.

Tabela 13
Ensaio da atividade antioxidante da quercetina com DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância (nm)	%CS
1,0	1,740	1,71
2,0	1,515	14,52
5,0	1,108	37,70
10,0	0,368	79,84

Branco = 0,014 e Controle = 1,756

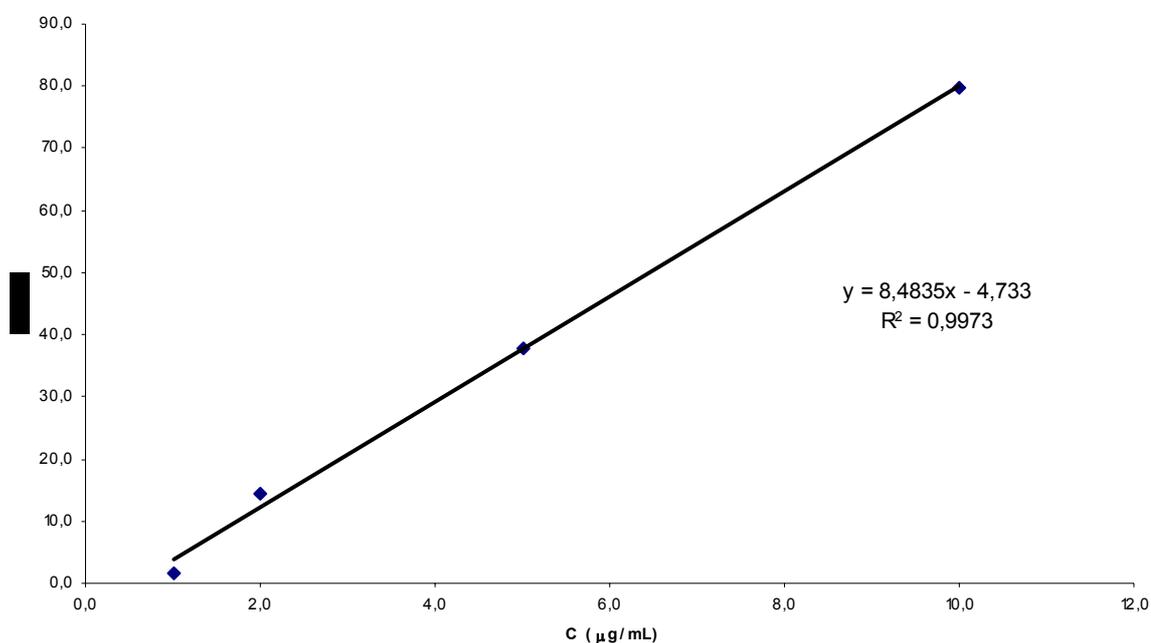


Gráfico 1: Determinação de CS_{50} da quercetina

Na tabela 13 e no gráfico 1 estão apresentados os valores da concentração e da capacidade de seqüestro do padrão quercetina. O valor obtido de CS_{50} foi de 5,3 $\mu\text{g/mL}$.

O cálculo da equação da reta foi realizado mediante a equação $y = ax + b$, onde: $Y = 50$ (CS_{50}), a = coeficiente angular, b = coeficiente linear e x = concentração a encontrar para inibir 50%. Ex: $50 = 8,4835x - 4,733 \Leftrightarrow x = 5,3 \mu\text{g/mL}$

Tabela 14
Ensaio da Atividade antioxidante do extrato etanólico com DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Branco	(CS%)
2,0	1,932	-0,008	4,99
4,0	1,791	0,004	12,49
8,0	1,555	-0,001	23,80

Controle = 2,042

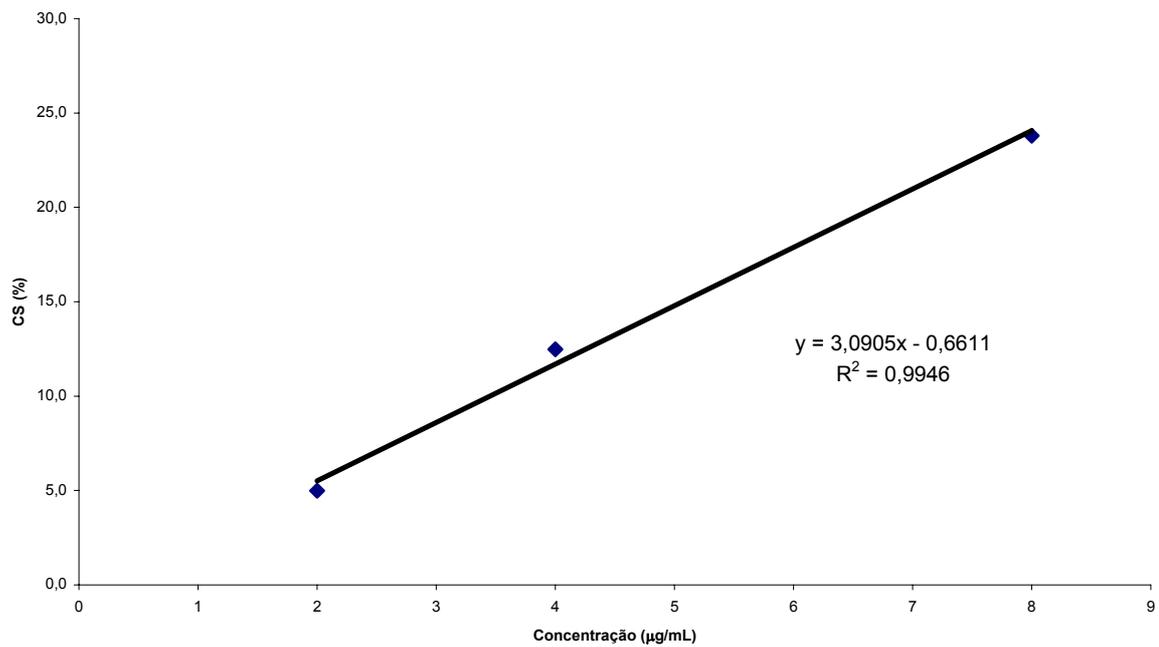


Gráfico 2: Determinação da CS_{50} do extrato etanólico

A partir dos valores descritos na tabela 14 foi obtido o gráfico acima, a partir do qual obteve-se o valor de CS_{50} de $16,0 \mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico.

Tabela 15
Ensaio da Atividade Antioxidante da fração hidroalcolica com DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Branco	CS (%)
5	1,237	-0,001	20,03
10	1,051	-0,001	32,04
15	0,841	0,002	45,80
20	0,571	-0,009	62,53

Controle = 1,548

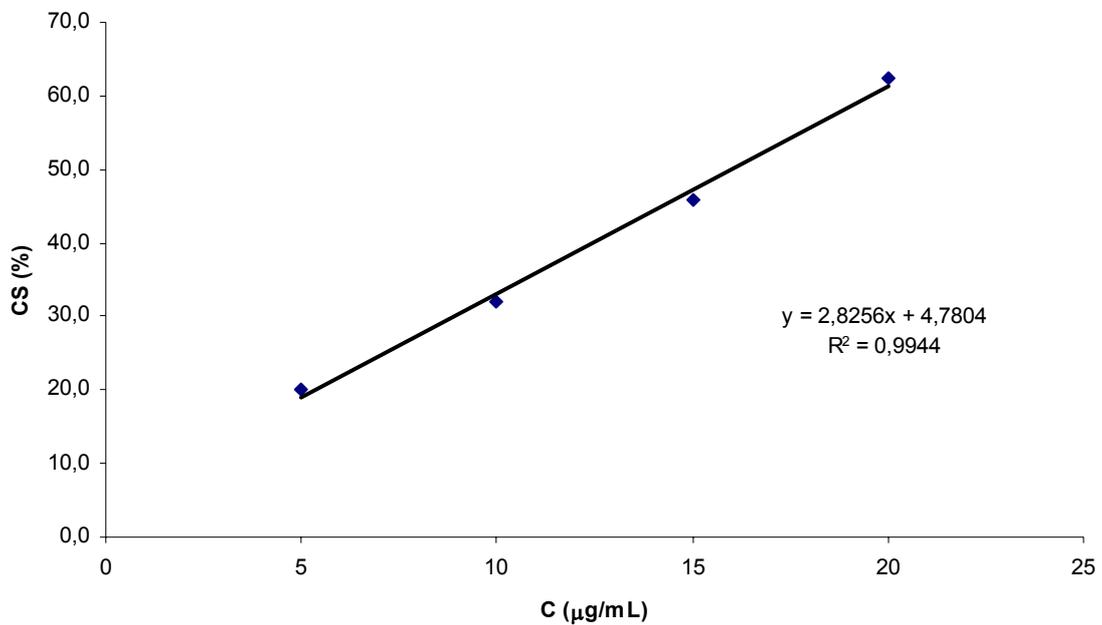


Gráfico 3: Determinação da CS_{50} da fração hidroalcolica

O valor de CS_{50} para a fração hidroalcolica obtido foi de 16,0 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 16
Ensaio da atividade antioxidante da fração AcOEt com DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Branco	CS(%)
10	0,980	0,004	28,86
20	0,686	-0,004	49,71
40	0,157	0,009	89,21

Controle = 1,372

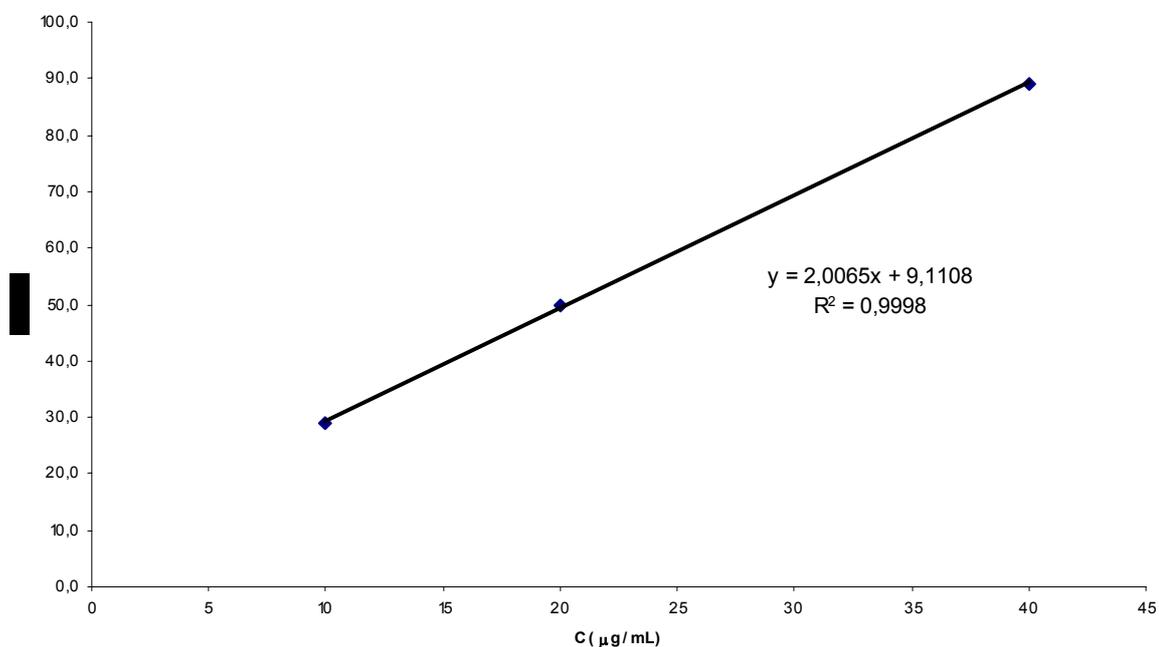


Gráfico 4: Determinação da CS_{50} da fração AcOEt

O valor obtido para CS_{50} da fração de acetato de etila no ensaio de DPPH foi de 20,4 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 17
Atividade Antioxidante da Fração 5 com DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Branco	CS(%)
50,0	1,547	0,045	11,59
100,0	1,364	0,062	23,37
200,0	1,145	0,13	40,26
300,0	0,982	0,173	52,38

Controle = 1,699

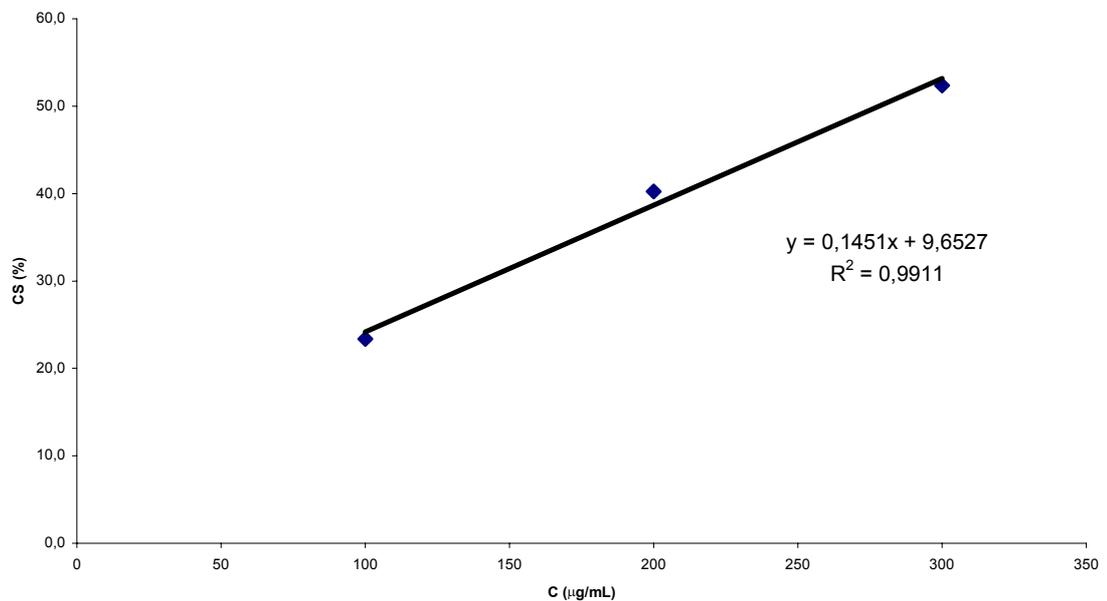


Gráfico 5: Determinação da CS_{50} da fração 5

O valor de CS_{50} obtido para a fração 5 foi de 278,0 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 18
Atividade Antioxidante da Substância eudesmina com DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Branco	CS%
50	1,607	0,004	1,717
100	1,584	-0,002	2,759
200	1,541	0,003	5,702

Controle= 1,631

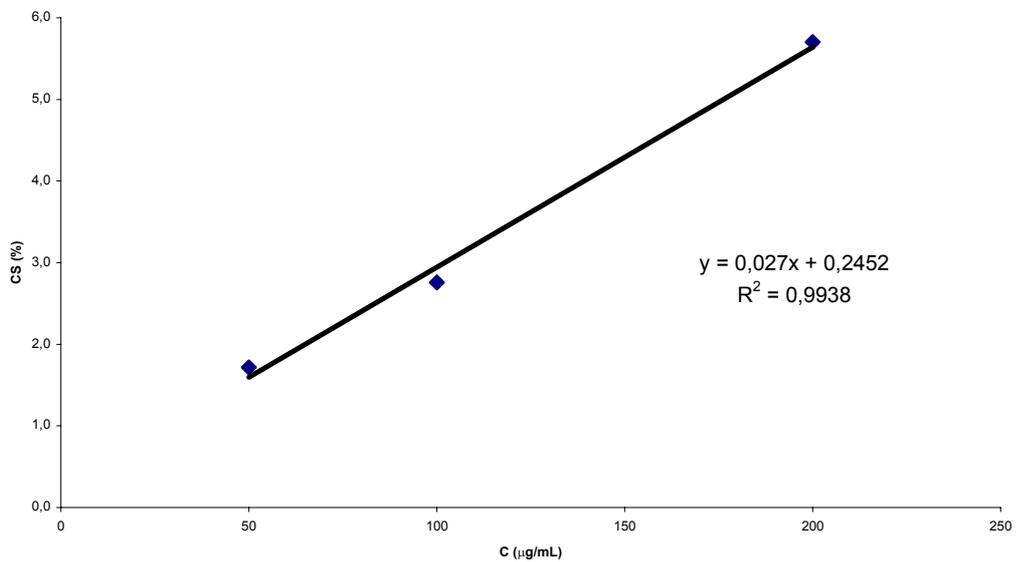


Gráfico 6: Determinação da CS_{50} da eudesmina

O valor de CS_{50} obtido para a eudesmina no ensaio do DPPH foi de 1.955,5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 19
Atividade Antioxidante da Substância filigenol com DPPH

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Branco	SC%
100	0,530	0,020	69,52
200	0,347	0,012	79,98
300	0,226	0,035	88,58

Controle = 1,673

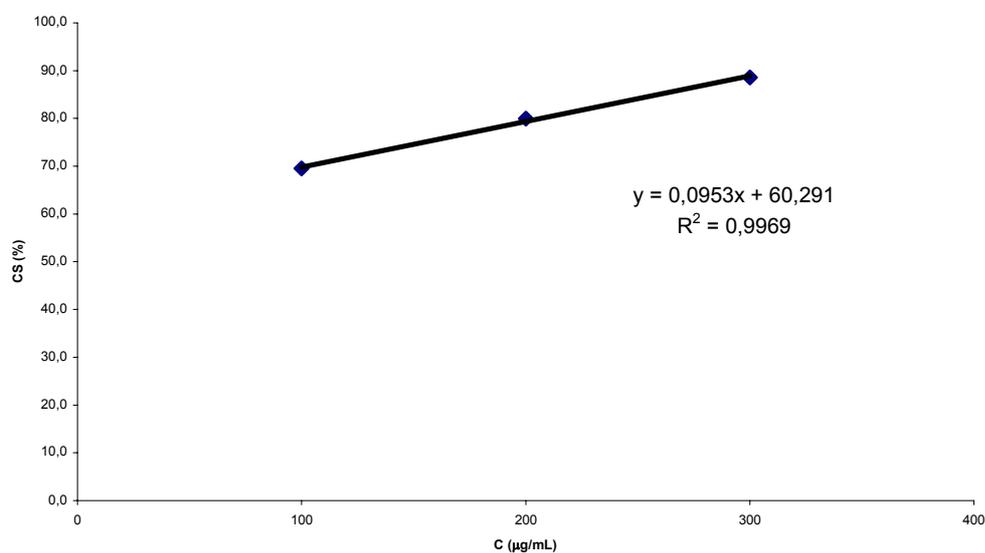


Gráfico 7: Determinação da CS_{50} do filigenol

O valor obtido da CS_{50} para o filigenol no ensaio do DPPH foi de 107,9 $\mu\text{g/mL}$.

Segundo a equação da reta ($y = ax + b$), o coeficiente linear apresentou um valor elevado possivelmente, devido interferências ocasionadas por impurezas na amostra.

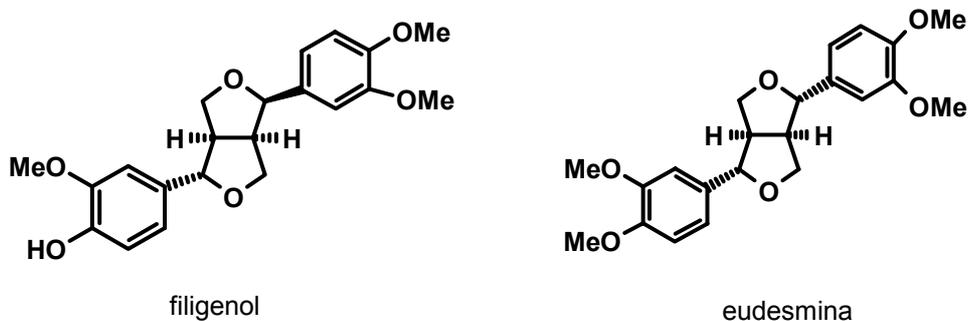
Tabela 20
Resultados da CS_{50} dos extratos, frações e substâncias isoladas.

CS_{50} em relação às amostras com DPPH nas folhas de <i>V. michelii</i>	
Extratos/frações/substâncias	CS_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato etanólico	16,5
Fração acetato de etila	20,4
Fração hidroalcolólica	16,0
Fração 5	278,0
eudesmina	1.955,5
filigenol	107,9
quercetina	5,3

Como representado do Esquema 13, o extrato etanólico apresentou CS_{50} de 16,5, que quando fracionado com acetato de etila resultou na fração de acetato com atividade CS_{50} 20,4 e a fração hidroalcolólica com CS_{50} 16,00. Como pode ser observado na tabela 20 o valor CS_{50} de quercetina é cerca de 3 vezes menor que a fração mais ativa do extrato etanólico das folhas de *Virola michelii*.

Porém, a análise por CCD mostrou uma facilidade maior no isolamento de constituintes a partir da fração de acetato de etila, que também apresentava uma atividade antioxidante próxima da fração hidroalcolólica. A fração de acetato de etila submetida à coluna cromatográfica forneceu frações, onde a fração 5 quando submetida ao ensaio de atividade antioxidante mostrou menor atividade, de CS_{50} 20,4 para CS_{50} 278. Contudo, a análise da fração 5 por CCD evidenciou a presença de compostos fenólicos, por isso submeteu-se esta fração à purificação por CCDP, que permitiu o isolamento de eudesmina e filigenol.

Um novo ensaio mostrou que o filigenol, substância que se distingue da eudesmina por apresentar uma hidroxila fenólica, possui atividade antioxidante muito maior que a eudesmina que apresenta os átomos de oxigênio eterificados com grupos metílicos.



Interpretando os resultados, parece que ocorrem substâncias polares com atividades antioxidantes na fração de acetato de etila, que podem ser as mesmas que ocorrem na fração hidroalcoólica. Essas substâncias possivelmente se perdem durante o processo de fracionamento em coluna cromatográfica, possivelmente pela retenção em sílica gel, pois uma das frações precursoras analisadas perdeu sua atividade antioxidante em mais de dez vezes após esta operação de purificação.

Do fracionamento e isolamento de constituintes, o fato positivo é a comprovação de que substâncias fenólicas são mais fáceis de serem oxidadas, como o filigenol, que possui hidroxila fenólica e apresenta atividade antioxidante maior do que a eudesmina, onde os grupos oxigenados do anel estão eterificados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi realizado pela primeira vez o estudo do óleo volátil das folhas de *Virola michelii*, que mostrou a ocorrência de um monoterpreno, dezessete sesquiterpenos e a ausência de fenilpropanóides, fato esse não observado nos estudos realizados com outras espécies de *Virola*.

O fracionamento do extrato etanólico das folhas por diferentes técnicas cromatográficas das frações obtidas ou de seus resíduos forneceu duas lignanas furofurânicas, o filigenol e a eudesmina; e um fitoesteróide, o β -sitosterol.

Também foi inédita a determinação da atividade antioxidante de extratos, frações e substâncias isoladas desta espécie. O extrato etanólico e as frações obtidas por partição, entre acetato de etila e solução hidroalcoólica, apresentaram atividade antioxidante no ensaio espectrofotométrico quantitativo com o reagente DPPH. Contudo, o trabalho fitoquímico desenvolvido com a fração de acetato de etila resultou no isolamento de substâncias menos ativas para ensaios antioxidantes, indicando a possibilidade de existir outras substâncias mais ativas em quantidades reduzidas ou substâncias que atuam como sinergistas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publ Corp., Carol Stream, IL, pp. 469. 1995.

AGRAWAL, P. K.; TAKUR, R. S. ^{13}C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives, **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 23, p. 389, 1985.

AGURELL, S., HOLMSTEDT, B., LINDGREN, J.-E.; SCHULTES, R. E. Alkaloids in Certain Species of *Virola* and other South American Plants of Ethnopharmacologic Interest. **Acta Chemica Scandinavia**. v. 23, p. 903, 1969.

AYRES, D. C.; LOIKE, J. D. Lignans - **Chemical, Biological and Clinical Properties**. p. 402. Cambridge: University Press, 1990.

BAILAC, P. N.; DELLACASA, A. D.; BERNASCONI, H.; FIRPO, N. H.; PONZI, M. I. Composición del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Eupatorium patens*. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, p. 207-211, 2000

BANERJI, A.; PAL, S. Constituents of *Piper sylvaticum*: Structure of Sylvatesmin. **Journal of Natural Products**. V. 45, p. 672-675, 1982.

BARATA, L. E. S., SANTOS, L. S., FERRI, P. H., PHILLIPSON, J. D. PAINE, A.; CROFT, S. L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**. v. 55, p. 589-595, 2000.

BARROS, S. B. M.; ISHII, I.; SILVA, D. H. S.; YOSHIDA, M. Antioxidant Properties of tocotrienols isolated from *Iryanthera grandis*. In: IV International Symposium on Orthomolecular Medicine, São Paulo. **Abstracts-Free Radicals in Aging and Disease**, p. 34, 1993.

BENEVIDES, P. J. C.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Composição química e atividade antifúngica do Óleo essencial de *Psychotria spectabilis* L. (RUBIACEAE). **Resumos**. 23^A

Reunião Anual da Sociedade Brasileiras de Química, 2000. Poços de Caldas, MG, PN-0131. Disponível em <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0131.html>>. Acesso em 18 de Dezembro de 2004.

CARVALHO, J. C. T, FERREIRA, L. P., SANTOS, L. S., CORRÊA, M. J. C., CAMPOS, L. M. O., BASTOS, J. K., SARTI, S. J. Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivatives from *Virola michelli* Heckel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 173-177, 1999.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CHANG, W. Choi; SEI, C. Kim; SOON, S. Hwang; BONG, K. C.; HYE, J. A.; LEE, M.Y.; PARK, S.H.; KIM, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**. v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, W.; GRUISSEM, R.; JONES, R.; (Eds.) American Society of Plant Physiologists. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Cap. 24, p. 1292-1302, 2000.

CUENDET, M., HOSTETTMANN, K., POTTERAT, O., DYANTMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fragraea blumei*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, p. 1144, 1997.

DAVIN, L. B.; WANG, H-B; CROWELL, A. L.; BEDGAR, D. L.; MARTIN, D. M.; SARKANEN, S.; LEWIS, N. G. Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center. **Science**. v. 275, p. 306-366, 1997.

DAVINO, S. C.; BARROS, S.; BARROS, S. B. M.; SILVA D. H. S.; YOSHIDA, M. Antioxidant Activity of *iryranthera sagotiana* Leaves. **Fitoterapia**. v. 69, p. 185-6, 1998.

De-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**. v. 62, p. 389-398, 2003.

DÍAZ, L.H; RODRÍGUES JORGE, M.; GARCÍA, D.; ALEA, J.P. Actividad antidermatofítica *in vitro* de aceites esenciales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 2003, vol. 8, no. 02. Disponível em < http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_2_03/pla04203.htm >. Acesso em: 13 jan. 2005.

GOTTLIEB, O. R., Loureiro, A. A., Carneiro, M. S. & Rocha, A. I. Distribution of diarylpropanoids in amazonian *Virola* species. **Phytochemistry**. v. 12, p. 1830, 1973.

GOTTLIEB, O.R. Chemical studies on Medicinal Myristicaceae from Amazonia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, p. 309-323, 1979.

GOTTLIEB, O.R. **Micromolecular evolution, systematics and ecology, an essay into a novel botanical discipline**. p.170. Heidelberg: Springer, 1982.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides com atenção especial à química das lignanas. **Química Nova**. v. 7, p. 250-273, 1984.

GOTTLIEB, O. R. Lignóides de Plantas Amazônicas: investigações biológicas e químicas. **Acta Amazônica**. v.18, p. 333-344, Suplemento, 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERRIDGE, J. M. C., eds. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford: Clarendon Press, 1999.

IIDA, T.; NAKANO, M.; ITO, K. Hydroperoxysesquiterpene na lignan constituents of *Magnolia kobus*. **Phytochemistry**. v. 21, p. 673-675, 1982.

KATO, M.J., YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Lignoids and arylalkanones from fruits of *Virola elongata* **Phytochemistry**. v. 29, p. 1799-1810, 1990.

KATO, M.J., YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Flavones and lignans in flowers, fruits and seedlings of *Virola venosa*. **Phytochemistry**. v. 31, p. 283, 1992.

KIJJOA, A.; GIESBRECHT, A.M.; GOTTLIEB, O.R.; GOTTLIEB, H.E. 1,3-diaryl-propanes and propan-2-ols from *Virola* species. **Phytochemistry**. v. 20, p. 1385, 1981.

JACKSON, D.E. & DEWICK, P.M. Tumour-inhibitory aryltetralin lignans from *Podophyllum pleianthum*. **Phytochemistry**. v. 24, p. 2407, 1985.

LEWIS, N.G.; KATO, M.J.; LOPES, N. & DAVIN, L.B. Lignans: Diversity, Biosynthesis and Function. **Chemistry of the Amazon**, American Chemical Society, cap. 13, p. 136-167, 1994.

LIMA, E.O., MAIA, R.F., SANTOS, L.S., MATOS, A.L.S. Atividade antimicrobiana das cascas e folhas de *Virola michelii* Heckel (Myristicaceae). **Anais da 16ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química** – Caxambu- MG, QB-10. 1993.

LOPES, L. M. X.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Dibenzylbutyrolactone lignans from *Virola sebifera*. **Phytochemistry**. v. 22, p. 1516, 1983.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. de A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**. v. 46, p. 689, 1997.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. de A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART A. R.; KATZIN, A. M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 67, p. 313, 1999b.

LOPES, N.P.; SANTOS, P.A.; KATO, M. J.; YOSHIDA M. New butenolides in plantlets of *Virola surinamensis* (Myristicaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 52, p. 1255-1257, 2004.

MACRAE, W.D.; TOWERS, G.N.N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**. v. 23, p. 1207, 1984.

MC LAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D. **The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data**. New York: John Wiley Sons, 1989.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, p.127-130, 2001.

MIAO, JINLING; et al., Studies on the reaction of sylvatesmin and lantbeside with oxidizing free radical. **Radiation Physics And Chemistry**. v. 69, p. 25-29, 2004.

MIDDLETON JR., E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids en Mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**. v. 52, p. 673-751, 2000.

MOBOT: Missouri Botanical Garden. W³ Tropicos. Disponível em: <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>> Acesso em: 09 de set. 2005.

NIKAIDO, T.; OHMOTO, T.; KINOSHITA, T.; SANKAWA, U. Nishibe, S. & Hisada, S. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by lignans. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 29, p. 3586, 1981.

NISHIBE, S.; KINOSHITA, H.; TAKEDA, H.; OKANO, G. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 38, 1763, 1990.

PAN, J.-X.; HENSENS, O. D.; ZINK, D.L.; CHANG, M. N.; HWANG, S.-B. Lignans with platelet activating factor antagonist activity from *Magnolia biondii*. **Phytochemistry**. v. 26, p. 1377, 1987.

PELTER, A.; WARD, R. S.; RAO, E. V.; SASTRY, K. V. General methods for the assignment of stereochemistry for 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octanes lignan. **Tetrahedron**. v. 32, p.2783, 1976.

POTTERAT, O. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. **Current Organic Chemistry**. v. 1, p. 415, 1997.

RIBEIRO, J. E. L. DA S. [et al.]. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia central. Manaus - INPA, 1999.

RHOADES, D. H. Integrated antiherbivore, antidesiccant and ultraviolet screening properties of creosotebush resin. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 5, p. 281, 1977.

RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola* Aublet (Myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazônica**. v. 10, p. 1, 1980.

ROMOFF, P.; YOSHIDA, M. Chemical Constituents from Myristicaceae. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**. v. 49(5/6), p. 345-353, 1997.

RUBINSTEIN, I.; GOAD, L. J.; CLAGUE, A. D. H.; MULHEIRU, L. J. The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. **Phytochemistry**. v. 5, p. 195-200, 1976.

SANTOS, L.S. Ucúba preta – *Virola michelii* Heckel. In: CARVALHO, J.C.T. (Editor), Fitoterápicos – Anti-inflamatórios. p. 431-442. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

SARTORELLI, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal lignans from the arils of *Virola* oleifera. **Phytochemistry**. v. 47, p. 1003-1006, 1998.

SCHULTES, R. E. The Amazonia as a Source of new Economic Plants. *Economic Botany*. v. 33., p. 257-258, 1979.

SCHULTES, R. E.; HOLMSTED, B. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. *Plants of South América*. **Lloydia**. v. 34, p. 61, 1971.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous plants of the northwest amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, p. 165-192, 1979.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M. Produtos Naturais para o controle da transmissão da dengue e atividade larvicida de

Myroxylon balsamum (Óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. **Química Nova**. v. 27, p. 46-49, 2004.

SU, BAONING. [et al.]. Lignans and Phenylpropanoid Glycosides from *Lancea tibetica* and Their Antitumor Activity. **Planta Médica**. v. 65, p. 558-561, 1999.

VALDERRAMA, J. C. M. Distribution of flavonoids in the Myristicaceae. **Phytochemistry**. v. 55, p. 505-511, 2000.

VAN ROOSMALEN, Marc G. M. **Myristicaceae**. Disponível em: <<http://amazonflora.com/Myristicaceae.pdf>>. Acesso em: 20 fev.2005.

VIDIGAL, M. C. R.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Lignans from kernels of *Virola michellii* Heckel. **Phytochemistry**. v. 40, p. 1259-126, 1995.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plants Drug Analysis: A thin layer chromatography Atlas**. 2 ed. 384 p. New York: Springer, 1996.

WARD, R.S. Lignans, neolignans and related compounds. **Natural Products Reports**. v. 14 (1), p. 43-47, 1997.

WEIL, A.T. Nutmeg as Narcotic. **Economic Botany**. v. 19, p. 194. 1965.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: Charlwood, B.V.; Rhodes, M.J.C. (ed.). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990.

YOSHIDA, M.; KATO, M. J.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. **Processo de obtenção das lignanas tetraidrofurânicas veraguensina e grandisina, atividade antichagásica e seu uso como antichagásico**. INPI, Br n. PI 99033472-7, 18 ago.1999.

YUNES, R.A; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Moderna Química Medicinal**. S.l.: Ed. Argos, 2001.