

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
Centro de Ciências da Natureza
Programa de Pós Graduação em Química

Jessica Sara de Sousa Macêdo Oliveira

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE
***Simaba ferruginea* A. St.-Hil.**

Dissertação de Mestrado

TERESINA - PI
2017

Jessica Sara de Sousa Macêdo Oliveira

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE
Simaba ferruginea A. St.-Hil.**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química, área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

TERESINA - PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCN

O49i Oliveira, Jessica Sara de Sousa Macêdo.
Investigação química e potencial biológico de *Simaba ferruginea* A. St.-Hil. / Jessica Sara de Sousa Macêdo Oliveira – Teresina, 2017.
192 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2017.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariana Helena Chaves.

1. Química Orgânica. 2. *Simaba ferruginea*. 3. Flavonoides.
I. Título.

CDD 547

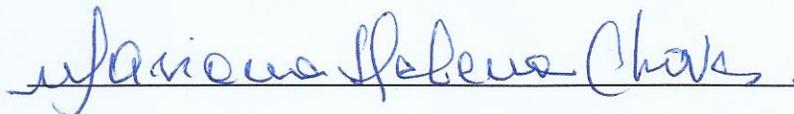
Jessica Sara de Sousa Macêdo Oliveira

CONSTITUINTES QUÍMICOS E POTENCIAL BIOLÓGICO DE
***Simaba ferruginea* A. St.-Hil.**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Química, na área de concentração de Química Orgânica.

Data da aprovação: 26 / 05 / 2017

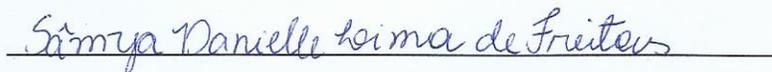
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Mariana Helena Chaves
Universidade Federal do Piauí
(Orientadora e Presidente)



Prof. Dr. João Marcos Batista Junior
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar



Profa. Dra. Sâmia Danielle Lima de Freitas
Universidade Federal do Piauí - UFPI

TERESINA-PI

2017

Dedico este trabalho aos meus pais, José Maria F. de Macêdo e Maria da Conceição F. S. Macêdo, aos meus irmãos, Jessianne Saiara de S. Macêdo, Jessielly Sâmilla S. Macêdo e Jefferson Sillas de S. Macêdo e ao meu esposo, Eduardo da S. Oliveira, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e apoio indispensáveis em todos os momentos.

“ Entregue o teu caminho ao Senhor; confia nele, e Ele tudo fará. ” (Salmos 37:5)

“ O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ” (José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por Sua presença em minha vida, pela força, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus amados pais, José Maria F. de Macêdo e Conceição F. de S. Macêdo e irmãos Jessianne Saiara de S. Macêdo, Jessielly Sâmilla S. Macêdo e Jefferson Sillas de S. Macêdo, pelo amor dedicado, pelas orações, confiança e compreensão.

Ao meu amor Edu, pelo carinho, companheirismo, cuidado, compreensão, apoio e paciência.

Aos meus tios, primos, a toda minha família pelo carinho constante e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus sogros, irmã Nascimento e irmão Raimundo, meus cunhados, Édipo, Hítalo, Camila e Ana Paula, pelo carinho, compreensão, orações e apoio;

À Profa. Dra. Mariana Helena Chaves pela orientação, oportunidade, amizade, paciência e conhecimentos transmitidos.

À minha amiga-irmã Genilda, pela amizade, confiança e carinho.

Às minhas amigas Bruna Nery, Lourdes Cristina e Anna Thaise, que juntas integramos o amado e eterno “quarteto”, pelo companheirismo, conhecimentos compartilhados, amizade e carinho desde a graduação.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), Elcilene, Lucivania, Jaelson, Márcia, Luanda, Lildes, Renato, João Paulo, Amauri, Jéssica, Amanda, Leonardo, Evaldo, Yngryd, Pedro e Adonias pela amizade, carinho, ótima convivência, ajuda valiosa no dia a dia e momentos de descontração.

Ao Renato Pinto, pela amizade, parceria e grande contribuição na realização deste trabalho.

À Lucivania Rodrigues, pela amizade, contribuições e pela grande ajuda, principalmente nas etapas finais do trabalho.

À Isabela Cristhina G. Costa, pela imensa ajuda e solicitude na realização das análises de RMN e $[\alpha]_D$.

Aos amigos Buana, Armênio, Luis Paulo e Arquelau que o LPN também me proporcionou.

Aos colegas da graduação, “os bacharéis 08” e do mestrado do biênio 2014-2016, especialmente, Manu, pelo apoio, incentivo e amizade.

À Steffane Quaresma, pela amizade, grande ajuda e paciência na realização das análises de RMN.

Aos colegas Tiago e Mikael, pela solicitude nas inúmeras vezes que precisei de água Milli-Q.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao Prof. Dr. Sidney Gonçalo de Lima e a Profa. Dra. Sâmya Danielle Lima de Freitas, por terem aceitado o convite para fazer parte da minha banca de qualificação e pelas grandes contribuições.

Ao Prof. Dr. João Marcos Batista Júnior, por ter aceito o convite para fazer parte da minha banca de dissertação e pela colaboração.

Aos professores do departamento de Química, pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes pela oportunidade do meu primeiro contato com a pesquisa na Iniciação Científica e a Profa. Dra. Maria das Graças Lopes Citó, por serem exemplos, pelos ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Davi da Silva, pela amizade e grande contribuição no meu primeiro trabalho de Iniciação Científica, como co-orientador.

Ao Prof. Dr. Gerardo Magela e a Profa. Dra. Mônica, pela colaboração.

À Profa. Dra. Ruth Raquel Soares de Farias pela disposição na coleta e identificação da espécie em estudo.

À Profa. Isabele Rodrigues Nascimento da UNESP de Araraquara, pela análise de $[\alpha]_D$.

Aos Laboratórios de Ressonância Magnética Nuclear (LAUREMN-UFPI) e Laboratório da UNESP de Araraquara, pela realização das análises de RMN.

Ao Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LAPNNEX-UFPI) pelas análises de inibição da acetilcolinesterase.

Ao Laboratório do departamento de Farmácia-UFC pelas análises de atividade larvicida.

Ao Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE-UFC) pelas análises de citotoxicidade;

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e estiveram comigo ao longo desta trajetória. Muito obrigada!

RESUMO

OLIVEIRA, J. S. S. M. (2017). Investigação química e potencial biológico de *Simaba ferruginea* A. St.-Hil. Teresina. 192p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Piauí.

Simaba ferruginea A. St.-Hil. (Simaroubaceae) é uma espécie endêmica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como calunga ou féo da terra. Este trabalho relata os constituintes químicos isolados e identificados no extrato etanólico das folhas, a quantificação de quercitrina e ácido elágico nos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf) e folhas (EEFSf) e frações diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) do extrato etanólico das folhas desta espécie. Adicionalmente foi avaliado o potencial biológico dos extratos e frações. Os compostos isolados a partir do EEFSf foram um quassinóide (**1**), canferol (**2**), canferol-3-O- α -L-ramnosídeo (afzelina) (**3**), quercetina (**4**), quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercitrina) (**5**), (+)-siringaresinol (**6**), ácido elágico (**7**), α -glicose (**8**) e β -glicose (**9**). Métodos para quantificação de quercitrina e ácido elágico por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos foram desenvolvidos com base na Resolução RE nº 899/2003 da ANVISA. As curvas analíticas foram construídas com os padrões de quercitrina (8-70 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido elágico (20-90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e apresentaram boa linearidade ($r=0,999$) e seletividade. O maior teor de quercitrina foi encontrado na FAEFSf (105,4 mg g^{-1} de fração), seguida da FDFSf e EEFSf, enquanto que o maior teor de ácido elágico foi obtido na FDFSf (100,38 mg g^{-1} de fração), seguida dos EEFSf, EEPSf e EEGSf. No ensaio de sequestro do radical DPPH, o EEFSf e a FAEFSf apresentaram os maiores percentuais de atividade antioxidante, com CE_{50} de $32,67 \pm 0,63 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $42,00 \pm 3,20 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, correlacionando-se positivamente com os teores de fenóis e flavonoides totais. Todos os extratos e frações apresentaram atividade fotoprotetora, sendo o EEFSf e a FAEFSf os mais ativos. Com exceção do EEGSf, os demais extratos e frações apresentaram indicativo de inibição da enzima acetilcolinesterase. Todos os extratos foram inativos frente às larvas de *Aedes aegypti*. EEGSf e EEPSf apresentaram citotoxicidade moderada frente à linhagem de célula SF-295 (glioblastoma). O EEGSf foi ativo mais especificamente frente uma única linhagem celular, a HCT-116 (cólon). Este é o primeiro relato destas atividades biológicas investigadas em *S. ferruginea*, bem como, da ocorrência dos compostos **2**, **6** e **7** no gênero *Simaba*, dos compostos **3**, **4**, **8** e **9** na família Simaroubaceae e do composto **1** na literatura.

Palavras-chave: *Simaba ferruginea*. Quantificação. Flavonoides. Quassinóide. Atividade antioxidante. Atividade fotoprotetora.

ABSTRACT

OLIVEIRA, J. S. S. M. (2017). Chemical research and biological potential of *Simaba ferruginea* A. St.-Hil. Teresina. 192p. Master's thesis - Post-Graduate Programme in Chemistry. Federal University of Piauí.

Simaba ferruginea A. St.-Hil. (Simaroubaceae) is an endemic specie from the Brazilian cerrado popularly known as calunga or féo da terra. This work reports the chemical constituents isolated and identified in the ethanolic extract from the leaves; the quantification of quercetin and ellagic acid in the ethanolic extract of branches (EEBSf), petioles (EEPSf) and leaves (EELSf), as well as dichloromethane (FDFSf), ethyl acetate (FEAFSf) and aqueous (FAFSf) fractions of the ethanolic extract from leaves of this species. In addition, the biological potential of the extracts and fractions was evaluated. The compounds isolated from EELSf were a quassinoid (1), kaempferol (2), kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranoside (afzelin) (3), quercetin (4), quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside (quercitrin) (5), (+)-syringaresinol (6), ellagic acid (7), α -glucose (8) and β -glucose (9). Methods for quantification of quercitrin and ellagic acid by high efficiency liquid chromatography with diode array detector were developed according to ANVISA Resolution RE n^o 899/2003. The analytical curves were constructed with the quercitrin (8-70 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and ellagic acid (20-90 $\mu\text{g mL}^{-1}$) standards which showed a good linearity ($r=0,999$) and selectivity. The highest level of quercitrin was found in FEAFSf (105,4 mg g^{-1} of fraction) followed by FDFSf and EELSf, whereas the highest level of ellagic acid was observed in FDFSf (100,38 mg g^{-1} of fraction), followed by EELSf, EEPSf and EEBSf. In the DPPH radical sequestration assay, EELSf and FEAFSf showed the highest percentages of antioxidant activity, with EC_{50} of $32.67 \pm 0.63 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $42.00 \pm 3.20 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively, correlating positively with phenols and total flavonoids levels. All extracts and fractions presented fotoprotector activity, with EELS and FEAFSf being the most active. With the exception of EEBSf, the other extracts and fractions showed indicative of inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. All extracts were inactive against *Aedes aegypti* larvae. EEBSf and EEPSf showed moderate cytotoxicity against cell lines SF-295 (glioblastoma). The fraction EEBSf was active more specifically against a single cell line, the HCT-116 (colon). This is the first report of these biological activities for *S. Ferruginea* as well as the occurrence of compounds 2, 6 and 7 in the *Simaba*, compounds 3, 4, 8 and 9 in the Simaroubaceae family, and that of compound 1 in the literature.

Keywords: *Simaba ferruginea*. Quantification. Flavonoids. Quassinoid. Antioxidant activity. Photoprotective activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rota biossintética dos quassinoides.....	7
Figura 2 - Esqueletos básicos dos quassinoides.....	8
Figura 3 - Estruturas dos quassinoides cedifilina, quassimarina e simalikalactona D.....	8
Figura 4 - Estrutura do quassinóide bruceantina.....	9
Figura 5 - Fórmulas estruturais dos quassinoides isolados em espécies do gênero <i>Simaba</i>	20
Figura 6 - Fotos da espécie <i>Simaba ferruginea</i> A. St.-Hil.....	24
Figura 7 - Constituintes químicos das folhas e rizomas de <i>Simaba ferruginea</i> A. St.-Hil.....	25
Figura 8 - Cromatograma do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i> . $\lambda=255$ nm. coluna C-18, fase móvel: MeOH-H ₂ O/AcOH (1%), gradiente exploratório: 0-50min, 5-100% MeOH; 50-53min, 100% MeOH, vazão da fase móvel de 1,0 mL min ⁻¹	46
Figura 9 - Cromatogramas do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i> . $\lambda=255$ nm; coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50% de B; 30-35min, 50-90% de B; 35-40min, 90% de B; 40-45min, 90-20% de B; vazão de 1,0 mL min ⁻¹ . a) MeOH-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 1), b) MeOH/ACN(1:1)-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 2) e c) ACN-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 3).....	48
Figura 10 - Cromatogramas do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i> . $\lambda=255$ nm; coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B; 30-32min, 50% de B; 32-37min, 50-20% de B; 37-40min, 20% de B; vazão de 1,0 mL min ⁻¹ . a) MeOH-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 1), b) MeOH/ACN (1:1)-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 2) e c) ACN-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 3)	51
Figura 11 - Cromatogramas dos extratos etanólicos de <i>S. ferruginea</i> . 1 - folhas, 2 - pecíolos e 3 - galhos.....	63

Figura 12 - Cromatogramas das frações de partição do extrato etanólico das folhas <i>S. ferruginea</i> . 1 - fração hexânica, 2 - fração diclorometano, 3 - fração acetato de etila e 4 - fração aquosa.....	63
Figura 13 - Espectros UV-Vis dos extratos etanólicos das folhas (EEFSf), pecíolos (EEPSf) e galhos (EEGSf) de <i>S. ferruginea</i> (100 µg mL ⁻¹)	64
Figura 14 - Espectros UV-Vis das frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) do extrato etanólico das folhas (EEFSf) de <i>S. ferruginea</i> (100 µg mL ⁻¹)	65
Figura 15 - Espectros UV-Vis das frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf) do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i> (100 µg mL ⁻¹) e β-caroteno (40 µg mL ⁻¹)	65
Figura 16 - Cromatogramas: a) extrato etanólico dos galhos (EEGSf); b) extrato etanólico dos pecíolos (EEPSf); c) extrato etanólico das folhas (EEFSf); d) fração diclorometano (FDFSf); e) fração acetato de etila (FAEFSf); f) fração aquosa (FAFSf) das folhas de <i>S. ferruginea</i> . Coluna C-18, Fase Móvel: MeOH-H ₂ O/AcOH (1%), vazão da fase móvel de 1,0 mL min ⁻¹ ; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, λ=255 nm.....	67
Figura 17 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i> (EEFSf); (b) co-injeção do EEFSf com o padrão quercitrina (Q, t _R =30,5min). Coluna C-18, fase móvel: MeOH-H ₂ O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, λ=255 nm.....	69
Figura 18 - Cromatogramas: (a) fração diclorometano das folhas de <i>S. ferruginea</i> (FDFSf); (b) co-injeção da FDFSf com o padrão quercitrina (Q, t _R =30,5min). coluna C-18, fase móvel: MeOH-H ₂ O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, λ=255 nm.....	70
Figura 19 - Cromatogramas: (a) fração acetato de etila das folhas de <i>S. ferruginea</i> (FAEFSf); (b) co-injeção da FAEFSf com o padrão quercitrina (Q, t _R =30,5min).	

coluna C-18, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, λ=255 nm.....70

Figura 20 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* (EEFSf); (b) co-injeção do EEFSf com o padrão ácido elágico (AE, t_R=16min). coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, λ=253 nm.....71

Figura 21 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico dos pecíolos de *S. ferruginea* (EEPSf); (b) co-injeção do EEPSf com o padrão ácido elágico (AE, t_R=16min). coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, λ=253 nm.....71

Figura 22 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico dos galhos de *S. ferruginea* (EEGSf); (b) co-injeção do EEGSf com o padrão ácido elágico (AE, t_R=16min). Coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN(1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, λ=253 nm.....72

Figura 23 - Cromatogramas: (a) fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (FDFSf); (b) co-injeção da FDFSf com o padrão ácido elágico (AE, t_R=16min). Coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, λ= 253 nm.....72

Figura 24 - Principais correlações HMBC do composto **1**.....76

Figura 25 - Proposta de conformação do composto **1**.....77

Figura 26 - Espectro de RMN ¹H do composto **1** (CDCl₃, 600 MHz)79

Figura 27 - Expansão (δ 0,8-3,2) do espectro de RMN ¹H do composto **1** (CDCl₃, 600 MHz).....80

Figura 28 - Expansão (δ 2,8-4,7) do espectro de RMN ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 600 MHz).....	81
Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 1 (CDCl_3 , 150 MHz).....	82
Figura 30 - DEPT 135° do composto 1 (CDCl_3 , 150 MHz).....	83
Figura 31 - DEPT 90° do composto 1 (CDCl_3 , 150 MHz).....	84
Figura 32 - Mapa de contorno HSQC do composto 1 (CDCl_3 , 600 e 150 MHz).....	85
Figura 33 - Expansão do mapa de contorno HSQC do composto 1 (CDCl_3 , 600 e 150 MHz).....	86
Figura 34 - Mapa de contorno HMBC do composto 1 (CDCl_3 , 600 e 150 MHz).....	87
Figura 35 - Expansão do mapa de contorno HMBC do composto 1 (CDCl_3 , 600 e 150 MHz)	88
Figura 36 - Espectro de RMN ^1H do composto 2 (CD_3OD , 400 MHz).....	91
Figura 37 - Expansão (δ 4,2-8,8) do espectro de RMN ^1H do composto 2 (CD_3OD , 400 MHz).....	92
Figura 38- Espectro de RMN ^{13}C do composto 2 (CD_3OD , 100 MHz).....	93
Figura 39 - DEPT 135° do composto 2 (CD_3OD , 100 MHz).....	94
Figura 40 - Principais correlações HMBC do composto 3	96
Figura 41 - Espectro de RMN ^1H do composto 3 (CD_3OD , 600 MHz).....	99
Figura 42 - Expansão (δ 4,0-8,0) do espectro de RMN ^1H do composto 3 (CD_3OD , 600 MHz).....	100
Figura 43 - Expansão (δ 0-4,0) do espectro de RMN ^1H do composto 3 (CD_3OD , 600 MHz).....	101
Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 3 (CD_3OD , 150 MHz).....	102
Figura 45 - Mapa de contorno COSY do composto 3 (CD_3OD , 150 MHz).....	103

Figura 46 - Expansão do mapa de contorno COSY do composto 3 (CD ₃ OD, 150 MHz)	104
Figura 47 - Mapa de contorno HSQC do composto 3 (CD ₃ OD, 600 e 150 MHz)....	105
Figura 48 - Mapa de contorno HSQC do composto 3 . Expansões das regiões δ 5,2-8,1 (a) e δ 0-6,0 (b) (CD ₃ OD, 600 e 150 MHz).....	106
Figura 49 - Mapa de contorno HMBC do composto 3 (CD ₃ OD, 600 e 150 MHz)....	107
Figura 50 - Mapa de contorno HMBC do composto 3 . Expansões das regiões (a) δ 5,0-8,2 ppm e (b) δ 0-6,0 ppm (CD ₃ OD, 600 e 150 MHz).....	108
Figura 51 - Principais correlações HMBC do composto 4	110
Figura 52 - Espectro de RMN ¹ H do composto 4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz).....	112
Figura 53 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz).....	113
Figura 54 - Mapa de contorno HSQC do composto 4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz).....	114
Figura 55 - Expansão do mapa de contorno HSQC do composto 4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz).....	114
Figura 56 - Mapa de contorno HMBC do composto 4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz).....	115
Figura 57 - Expansão do mapa de contorno HMBC do composto 4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 e 150 MHz).....	115
Figura 58 - Espectro de RMN ¹ H do composto 5 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	119
Figura 59 - Expansão (δ 3,6-7,5) do espectro de RMN ¹ H do composto 5 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	120
Figura 60 - Expansão (δ 4,3-2,9) do espectro de RMN ¹ H do composto 5 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	121
Figura 61 - Espectro RMN de ¹³ C do composto 5 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	122

Figura 62 - DEPT 135° do composto 5 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	123
Figura 63 - DEPT 90° do composto 5 (CD ₃ OD, 100 MHz)	124
Figura 64 - Espectro de RMN ¹ H do composto 6 (CDCl ₃ , 400 MHz)	127
Figura 65 - Expansão (δ 2,5-8,2) do espectro de RMN ¹ H do composto 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	128
Figura 66 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	129
Figura 67 - Expansão (δ 19,5-150) do espectro de RMN ¹³ C do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	130
Figura 68 - DEPT 135° do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz)	131
Figura 69 - DEPT 90° do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz)	132
Figura 70 - Espectro de IV (KBr) do composto 7	135
Figura 71 - Espectro de RMN ¹ H do composto 7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz)	136
Figura 72 - Espectro de RMN ¹³ C do composto 7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	137
Figura 73 - DEPT 135° do composto 7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 100 MHz)	138
Figura 74 - Espectro de RMN ¹ H da mistura 8+9 (CD ₃ OD, 400 MHz).....	141
Figura 75 - Expansão (δ 3,0-5,3) do espectro de RMN ¹ H da mistura 8+9 (CD ₃ OD, 400 MHz)	142
Figura 76 - Espectro de RMN ¹³ C da mistura 8+9 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	143
Figura 77- Expansão (δ 58-78) do espectro de RMN ¹³ C da mistura 8+9 (CD ₃ OD, 100 MHz)	144
Figura 78 - DEPT 135° da mistura 8+9 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	145
Figura 79 - Expansão (δ 59-77) do DEPT 135° da mistura 8+9 (CD ₃ OD, 100 MHz).....	146
Figura 80 - Espectros UV-Vis dos padrões. a) quercitrina; b) ácido elágico.....	147

Figura 81 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos galhos de *S. ferruginea* (EEGSf) com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, $\lambda=255\text{ nm}$149

Figura 82 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos pecíolos de *S. ferruginea* (EEPSf) com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, $\lambda=255\text{ nm}$149

Figura 83 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* (EEFSf) com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, $\lambda=255\text{ nm}$150

Figura 84 - Sobreposição do cromatograma da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (FDFSf) com o padrão quercitrina ($t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, $\lambda=255\text{ nm}$150

Figura 85 - Sobreposição dos cromatogramas da fração acetato de etila das folhas de *S. ferruginea* (FAEFSf) com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, $\lambda=255\text{ nm}$151

Figura 86 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos galhos de *S. ferruginea* (EEGSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B. fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 20 µL, $\lambda=253\text{ nm}$151

Figura 87 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos pecíolos de <i>S. ferruginea</i> (EEPSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B; fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H ₂ O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção: 20 µL, $\lambda=253\text{ nm}$	152
Figura 88 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i> (EEFSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B. fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H ₂ O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção: 20 µL, $\lambda=253\text{ nm}$	152
Figura 89 - Sobreposição dos cromatogramas da fração diclorometano das folhas de <i>S. ferruginea</i> (FDFSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H ₂ O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção: 20 µL, $\lambda=253\text{ nm}$	153
Figura 90 - Sobreposição dos cromatogramas da fração acetato de etila das folhas de <i>S. ferruginea</i> (FAEFSf) com os padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H ₂ O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min ⁻¹ , volume de injeção: 20 µL, $\lambda=253\text{ nm}$	153
Figura 91 - Sobreposição dos espectros de UV-Vis dos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i> com o padrão quercitrina (Q). a) extrato das folhas (EEFSf); b) fração diclorometano das folhas (FDFSf); c) fração acetato de etila das folhas (FAEFSf).....	154
Figura 92 - Sobreposição dos espectros de UV-Vis dos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i> com o padrão ácido elágico (AE). a) extrato dos galhos (EEGSf); b) extrato dos pecíolos (EEPSf); c) extrato das folhas (EEFSf) e d) fração diclorometano das folhas (FDFSf).....	154
Figura 93 - Curva analítica quercitrina obtida a 255 nm.....	156
Figura 94 - Curva analítica do ácido elágico obtida a 253 nm.....	156
Figura 95 - Estabilização do radical livre DPPH por uma espécie antioxidante AH.....	163

Figura 96 - (a) Percentual de atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e controles positivos rutina e BHT. (b) Percentual do EEFSf e frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) das folhas de <i>S. ferruginea</i> e dos controles positivos rutina e BHT. Tempo de reação com DPPH: 30min.....	164
Figura 97 - Reação de redução do com o molibidênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico.....	167
Figura 98 - Complexos formados entre o flavonoide e o cloreto de alumínio.....	167
Figura 99 - Fator de Proteção Solar (FPS) <i>in vitro</i> dos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i> na concentração de 100 mg L ⁻¹	171
Figura 100 - Reação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE).....	173
Figura 101 - Reação de redução do MTT a cristais de formazano.....	174

LISTA DE QUADROS, ESQUEMAS E TABELAS

Quadro 1 - Quassinoides isolados no gênero <i>Simaba</i> e suas atividades biológicas.....	12
Esquema 1 - Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i> (EEFSf)	31
Esquema 2 - Fluxograma de fracionamento cromatográfico de PS.....	36
Esquema 3 - Obtenção e fracionamento cromatográfico dos grupos DF7, DF23 e DF44 procedentes da fração diclorometano (FDFSf) do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i>	45
Tabela 1 - Massa e rendimento dos extratos de <i>S. ferruginea</i>	29
Tabela 2 - Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da parte solúvel (PS) proveniente da extração líquido-líquido do EEFSf.....	33
Tabela 3 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo PS-46.....	34
Tabela 4 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo PS-57.....	35
Tabela 5 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do subgrupo PS-57-10	35
Tabela 6 - Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da fração diclorometano das folhas de <i>S. ferruginea</i> (FDFSf)	38
Tabela 7 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF7.....	39
Tabela 8 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de gel de sílica do subgrupo DF7-11.....	39
Tabela 9 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF23.....	40

Tabela 10 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de gel de sílica do grupo DF23-29.....	41
Tabela 11 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de gel de sílica do subgrupo DF23-29-18	41
Tabela 12 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF36.....	42
Tabela 13 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF44	43
Tabela 14 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF48.....	44
Tabela 15 - Condições cromatográficas usadas para análise dos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i> . MeOH-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 1), MeOH/ACN(1:1)-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 2), ACN-H ₂ O/AcOH (1%) (Fase móvel 3), vazão da fase móvel: 1,0 mL min ⁻¹	47
Tabela 16 - Composição das fases móveis utilizadas para obtenção do perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de <i>S. ferruginea</i>	47
Tabela 17 - Função normalizada do produto utilizado no cálculo do FPS.....	59
Tabela 18 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC (600 e 150 MHz, δ/ppm, J/Hz, CDCl ₃) do composto 1	78
Tabela 19 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (400 e 100 MHz, δ/ ppm, J/Hz, CD ₃ OD) do composto 2	90
Tabela 20 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC (600 e 150 MHz, δ/ppm, J/Hz, CD ₃ OD) do composto 3	98
Tabela 21 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (600 e 150 MHz, δ/ppm, J/Hz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 4	111
Tabela 22 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (400 e 100 MHz, δ/ppm, J/Hz, CD ₃ OD) do composto 5	118

Tabela 23 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (400 e 100 MHz, δ/ppm, J/Hz, CDCl ₃) do composto 6	126
Tabela 24 - Dados de RMN ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 7	134
Tabela 25 - Dados de RMN ¹³ C (400 MHz, CD ₃ OD,) para a mistura (8+9)	140
Tabela 26 Índice de similaridade dos picos presentes nos extratos etanólico dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e frações diclorometano (FDFSf) e acetato de etila (FAEFSf) do EEFSf de <i>S.ferruginea</i>	148
Tabela 27 - Faixa de linearidade, equações de regressão das curvas analíticas e coeficientes de correlação da quercitrina e ácido elágico.....	157
Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para a quercitrina (λ=255 nm)	157
Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para o ácido elágico (λ=253 nm)	157
Tabela 30 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para quercitrina (255nm) e ácido elágico (253 nm)	158
Tabela 31 - Teores de quercitrina e ácido elágico nos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e frações diclorometano (FDFSf) e acetato de etila (FAEFSf) das folhas de <i>S. ferruginea</i>	160
Tabela 32 - Percentual de atividade antioxidante dos extratos, frações de <i>S. ferruginea</i> e dos padrões rutina e BHT	165
Tabela 33 - Teores de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FLAT) e concentração eficiente (CE ₅₀) dos extratos e frações das folhas de <i>S. ferruginea</i>	169
Tabela 34 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf) e folhas (EEFSf) de <i>S. ferruginea</i> , na concentração de 10 µg mL ⁻¹	175

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- λ - comprimento de onda
- δ_H - deslocamento químico do hidrogênio
- δ_C - deslocamento químico do carbono-13
- %AA - porcentagem de atividade antioxidante
- Abs - absorvância
- AcOEt - acetato de etila
- ACN - acetonitrila
- AcOH - ácido acético
- Ach - neurotransmissor acetilcolina
- AchE - enzima acetilcolinesterase
- AE - ácido elágico
- ANOVA - análise de variância
- ATCI - Iodeto de acetiltiocolina
- BHT- butilhidroxitolueno
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CCDC - camada delgada comparativa
- CE_{50} - concentração eficiente necessária para reduzir a concentração inicial em 50%
- CL_{50} - concentração letal média
- CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-DAD- cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
- COSY - *Correlation spectroscopy*
- DEPT - *Distortionless enhancement by polarization transfer*
- DPPH - radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- DP - desvio padrão
- DTNB - ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) - reagente de Ellman
- FT - Fenóis Totais
- FLAT - flavonoides totais
- FPS - fator de proteção solar
- ER - equivalente de rutina

- EAG - equivalente de ácido gálico
- EEFSf - extato etanólico das folhas de *Simaba ferruginea*
- EEPSf - extato etanólico dos pecíolos de *S. ferruginea*
- EEGSf - extato etanólico dos galhos de *S. ferruginea*
- FHFSf - fração haxânica das folhas de *S. ferruginea*
- FDFSf - fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea*
- FAEFSf - fração acetato de etila das folhas de *S. ferruginea*
- FAFSf - fração aquosa das folhas de *S. ferruginea*
- *gl* - graus de liberdade
- HCT-116 - linhagem celular do cólon-humano
- HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
- HMBC - *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*
- *J* - constante de acoplamento
- IV - infravermelho
- LD - limite de detecção
- LQ - limite de quantificação
- MQ - média quadrática
- MeOH - metanol
- MTT - [brometo de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (sal de tetrazólio)
- *nq* - não quantificável
- *nt* - não testada
- PC3 - linhagem celular da próstata - humano)
- Q - quercitrina
- *r* - coeficiente de correlação linear
- *R_f* - fator de retenção
- RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
- RMN ¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
- SF-295 - linhagem celular do glioblastoma - humano
- SQ - soma quadrática
- TMS - tetrametilsilano
- *t_R* - tempo de retenção
- UV-Vis - ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Família Simaroubaceae	4
3.2 Gênero <i>Simaba</i>	5
3.3 Quassinoides	6
3.3.1 Revisão bibliográfica dos quassinoides do gênero <i>Simaba</i> e suas atividades biológicas	9
3.4 <i>Simaba ferruginea</i>	24
4 PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1 Reagentes e solventes	26
4.2 Equipamentos	27
4.2.1 Espectroscopia e Absorção molecular	27
4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho	27
4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	27
4.2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	28
4.2.5 Análise de rotação específica, $[\alpha]_D$	28
4.3 Material vegetal	28
4.4 Preparação dos extratos	28
4.5 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas	29

4.6 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) dos extratos e frações.....	29
4.7 Perfis dos extratos e frações obtidos por espectroscopia de absorção molecular	30
4.8 Fracionamento cromatográfico da PS.....	32
4.8.1 Fracionamento do grupo PS-46.....	33
4.8.2 Fracionamento do grupo PS-57	34
4.9 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato etanólico das folhas	37
4.9.1 Fracionamento do grupo DF7.....	38
4.9.2 Fracionamento do grupo DF23.....	40
4.9.3 Fracionamento do grupo DF36.....	42
4.9.4 Fracionamento do grupo DF44.....	42
4.9.5 Fracionamento do grupo DF48.....	43
4.10 Desenvolvimento do método para obtenção dos perfis e quantificação de ácido elágico e quercitrina em extratos e frações de <i>S. ferruginea</i>	46
4.10.1 Desenvolvimento do método cromatográfico	46
4.10.2 Perfis cromatográficos.....	49
4.10.3 Co-injeção com os padrões quercitrina e ácido elágico	50
4.11 Quantificação de quercitrina e ácido elágico em extratos e frações de <i>S. ferruginea</i>)	52
4.11.1 Condições cromatográficas	52
4.11.2 Preparação das amostras para quantificação	53
4.11.3 Parâmetros avaliados na quantificação de quercitrina e ácido elágico.....	53

4.11.3.1 Seletividade	54
4.11.3.2 Linearidade	54
4.11.3.3 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	54
4.12 Avaliação do potencial biológico dos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i>	56
4.12.1 Atividade antioxidante	56
4.12.2 Determinação do teor de Fenóis Totais (FT)	57
4.12.3 Determinação do teor de Flavonoides Totais (FLAT)	58
4.12.4 Atividade fotoprotetora.....	58
4.12.5 Atividade anticolinesterásica	59
4.12.6 Atividade larvicida	60
4.12.7 Citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais	60
4.13 Análise estatística	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1 Perfil químico dos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i>	62
5.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)	62
5.1.2 Espectrofotometria de absorção molecular	64
5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	66
5.2 Fórmulas estruturais dos compostos isolados e identificados no extrato etanólico das folhas do extrato etanólico de <i>S. ferruginea</i>	73
5.3 Identificação estrutural dos compostos isolados de <i>S. ferruginea</i>	74
5.3.1 Elucidação estrutural do composto 1.....	74
5.3.2 Identificação estrutural do composto 2.....	89
5.3.3 Identificação estrutural do composto 3.....	95

5.3.4 Identificação estrutural do composto 4.....	109
5.3.5 Identificação estrutural do composto 5.....	116
5.3.6 Identificação estrutural do composto 6.....	125
5.3.7 Identificação estrutural do composto 7.....	133
5.3.8 Identificação estrutural do composto 8+9.....	139
5.4 Desenvolvimento de método de quantificação de quercitrina e ácido elágico em extratos e frações de <i>S. ferruginea</i>	147
5.4.1 Seletividade	147
5.4.2 Linearidade.....	155
5.4.3 Limites de detecção e quantificação	158
5.4.4 Teores de quercitrina e ácido elágico nos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i>	158
5.5 Avaliação do potencial biológico dos extratos e frações de <i>S. ferruginea</i>	161
5.5.1 Atividade antioxidante.....	161
5.5.2 Determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais	166
5.5.3 Atividade fotoprotetora.....	169
5.5.4 Atividade anticolinesterásica	172
5.5.5 Atividade larvicida	173
5.5.6 Citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais	174
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	176
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas há muitos anos pelo homem como recurso terapêutico para a prevenção, tratamento e cura de diversos tipos de doenças. O conhecimento tradicional sobre o uso das plantas é amplo e, muitas vezes, é a única alternativa disponível de certas comunidades, principalmente nos países menos desenvolvidos (GIRALDI e HANAZAKI, 2010; MACIEL et al., 2002; RODRIGUES et al., 2015; SANTOS et al., 2008).

Os relatos populares quanto ao uso e benefícios de plantas medicinais são primordiais para o desenvolvimento de pesquisas fitoquímicas e farmacológicas, a fim de determinar cientificamente o potencial das espécies vegetais, garantindo a eficácia e segurança terapêutica (AZIZ et al., 2017; SANTOS et al., 2008).

O uso popular de plantas medicinais no Brasil é bastante relevante, em decorrência da grande diversidade de espécies vegetais e da riqueza étnico-cultural do país (SANTOS et al., 2008). Dentre algumas espécies vegetais com indicação de uso popular no Brasil estão a erva-cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown; Verbenaceae) que apresenta propriedades sedativa, antitérmica e anti-inflamatória; mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.; Chenopodiaceae), que apresenta efeitos cicatrizante, digestivo e antireumático; hortelã (*Mentha piperita* L.; Lamiaceae), que tem ação analgésica, antiviral, anti-inflamatória, expectorante e descongestionante; boldo (*Peumus boldus* Mol.; Monimiaceae) que é usado contra distúrbios hepáticos, além de apresentar propriedades diuréticas e estomacais; e a babosa (*Aloe vera* L.; Xanthorrhoeaceae) que é utilizada como cicatrizante, no combate de hemorroidas e dores estomacais (CARTAXO et al., 2010; FÉLIX-SILVA et al., 2012; GOIS et al., 2016).

A pesquisa na área de produtos naturais tem se intensificado pela busca de novos fármacos capazes de tratar diversos tipos de doenças, como o câncer (SENTHILKUMAR et al., 2014; SUN et al., 2016), depressão (LÓPEZ-RUBALCAVA e ESTRADA-CAMARENA, 2016), obesidade (CERCATO et al., 2015), diabetes (ELEKOFEHINTI, 2015), malária, dentre outras (VIEGAS Jr; BOLZANI e BARREIRO, 2006; MATTE et al, 2015). O estudo de plantas medicinais tem resultado no isolamento e identificação de moléculas bioativas e na obtenção de novos fármacos, como, por exemplo, a artemisinina e quinina, obtidas de *Artemisia annua* L. (Asteraceae) e *Cinchona officinalis* (Rubiaceae), respectivamente, usadas

no tratamento de malária e o paclitaxel, obtido de várias espécies do gênero *Taxus* (Taxaceae), utilizado no tratamento de câncer (CRAGG e NEWMAN, 2013).

Neste contexto, objetivando contribuir para o conhecimento do potencial de plantas medicinais, a espécie *Simaba ferruginea* (Simaroubaceae) foi selecionada para investigação química e biológica de seus galhos, pecíolos e folhas, em função de poucos estudos químico e/ou biológico com esta espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química e o potencial biológico dos galhos, pecíolos e folhas de *Simaba ferruginea* St.-Hil (Simaroubaceae).

2.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos etanólicos dos galhos, pecíolos e folhas da espécie *S. ferruginea*
- Fracionar o extrato etanólico das folhas por meio de extração líquido-líquido
- Obter os perfis químicos dos extratos e frações obtidas, por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do UV-Vis e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
- Isolar, identificar e/ou elucidar as estruturas dos constituintes das folhas de *S. ferruginea*
- Quantificar os teores de ácido elágico e quercitrina nos extratos etanólicos dos galhos, pecíolos e folhas e frações diclorometano, acetato de etila e aquosa das folhas de *S. ferruginea*
- Determinar os teores de fenóis e flavonoides totais dos extratos e frações
- Investigar as atividades antioxidante, fotoprotetora, anticolinesterásica, larvicida frente a *Aedes aegypti* e citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas dos extratos e frações

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Família Simaroubaceae

A família Simaroubaceae é botanicamente semelhante às famílias Rutaceae, Meliaceae e Burseraceae, principalmente à Rutaceae, no que diz respeito à composição química, anatomia da madeira e falta de canais de resina na casca e nos estames livres, entretanto, diferencia-se das demais, pela ausência de cavidades secretoras, que contém óleos aromáticos nas folhas e partes florais. Outra particularidade é a presença de quassinoides, quase exclusivos da família Simaroubaceae (ALVES et al., 2014)

A família Simaroubaceae era inicialmente composta por seis subfamílias: Surianoideae, Kirkioideae, Irvingioideae, Picramnioideae, Alvaradoidea e Simarouboideae. No entanto, com base em evidências morfológica e anatômica, cinco dessas subfamílias foram removidas, permanecendo apenas a Simarouboideae, que é composta por 170-200 espécies de arbustos ou árvores, com ocorrência pantropical, distribuídas em 32 gêneros, sendo encontradas na América tropical, Ásia e Oeste da África (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011; MUHAMMAD et al., 2004; SIMÃO et al., 1991).

No Brasil, ocorrem seis gêneros da família Simaroubaceae (*Simaba* Aubl., *Simarouba* Aubl., *Quassia* L., *Picrolemma* Hook.f., *Castela* Turpin e *Picrasma* Blume), distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais (FORZZA et al., 2010; NUNOMURA et al., 2012). Os gêneros *Simaba* e *Simarouba* são encontrados em quase todas as regiões do país, enquanto *Quassia* e *Picrolemma* têm maior ocorrência na região Amazônica e os gêneros *Castela* e *Picrasma* estão presentes na região Sul do Brasil (ALMEIDA et al., 2007). Na região Nordeste, encontram-se quatro gêneros e 13 espécies, sendo o gênero *Simaba* Aubl o mais diversificado (BURIL; TOMAS; ALVES, 2014).

Espécies da família Simaroubaceae são utilizadas na medicina tradicional em diversos países do mundo, principalmente no tratamento de câncer, disenteria, malária e febre, como, por exemplo, *Castela texana* (México), *Brucea javanica* e *Ailanthus altíssima* (China), *Simaba guianensis* e *S. ferruginea* (Brasil) e *Brucea antidysenterica* (África) (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011; MUHAMMAD et al., 2004).

As atividades antimaláricas, antiúlcera, antinociceptiva, inseticida, antiparasitária, antiviral, citotóxica, anticâncer, fitotóxica, amebicida, antituberculose e anti-inflamatória têm sido confirmadas em espécies de Simaroubaceae. O elevado potencial biológico da família é atribuído principalmente à presença de quassinoides (ALMEIDA et al., 2007; ALVES et al., 2014; BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011; GUO et al., 2005).

A família Simaroubaceae é caracterizada principalmente pela presença de quassinoides e alcaloides do tipo cantinona, sendo os quassinoides considerados os marcadores taxonômicos da família. Flavonoides, triterpenos, esteroides, cumarinas e antraquinonas são exemplos de outras classes de substâncias isoladas de plantas da família (ALVES et al., 2014; ARRIAGA et al., 2002; BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011).

3.2 Gênero *Simaba*

O gênero *Simaba* Aubl. (Simaroubaceae), sinônimas *Aruba* Aublet, *Zwingera* Schreber, *Phyllostemma* Neck e *Homololepis* Turcz. (CAVALCANTE, 1983; PIRANI e THOMAS, 2016), é o segundo maior da família, com aproximadamente 35 espécies distribuídas na América do Sul, superado apenas pelo gênero *Picramnia* que contém 40 espécies (NUNOMURA et al., 2012; SIMÃO et al., 1991). No Brasil, são encontradas 22 espécies (12 endêmicas) e duas subespécies não endêmicas distribuídas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011; FORZZA et al., 2010; PIRANI e THOMAS, 2016).

Embora haja uma variedade de espécies no gênero, poucas foram estudadas quimicamente, dentre as quais estão a *S. ferruginea*, *S. cedron*, *S. orinocensis*, *S. cuspidata*, *S. cuneata*, *S. multiflora*, *S. guianensis*, *S. polyphylla*, *S. africana* e *S. undulata* (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011; NUNOMURA et al., 2012).

Diversos metabólitos secundários pertencentes às classes dos quassinoides, alcaloides, esteroides, triterpenos, cumarinas, antraquinonas e flavonoides já foram isolados em plantas do gênero *Simaba*, sendo os quassinoides, triterpenos e alcaloides os mais frequentes (BARBOSA; BRAZ-FILHO; VIEIRA, 2011). As atividades antimalárica, citotóxica, antitumoral, antiviral, antimicrobiana e antiúlcera têm sido confirmadas em plantas deste gênero (ALMEIDA et al., 2007; NUNOMURA et al., 2012).

Um estudo de prospecção científica e tecnológica do gênero *Simaba* Aubl. (Simaroubaceae) revelou a existência de cinco patentes, das quais três estão relacionadas à fabricação de composições cosméticas ou farmacêuticas, envolvidas no tratamento de despigmentação da pele, incluindo vitiligo (SOUSA; OLIVEIRA; CHAVES, 2016).

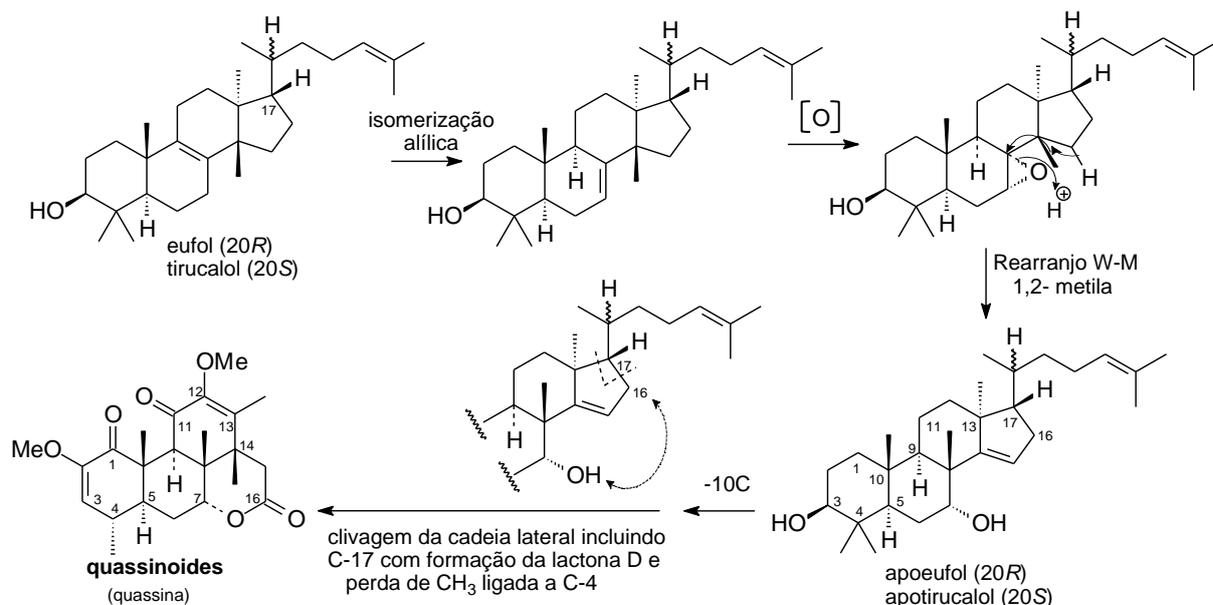
3.3 Quassinoides

Os quassinoides são metabólitos secundários e marcadores quimiotaxonômicos da família Simaroubaceae. Estas substâncias são caracterizadas pelo sabor amargo. Os primeiros quassinoides estruturalmente elucidados foram isolados a partir da espécie *Quassia amara*, sendo nomeados de quassina e neoquassina, termos que deram origem ao nome dessa classe de compostos (GUO et al., 2005; VIEIRA e BRAZ-FILHO, 2006).

A presença de quassinoides é um parâmetro importante de classificação taxonômica da família Simaroubaceae. Desta forma, alguns gêneros foram excluídos, por não apresentar quassinóide, como o *Picramnia* que, após estudos fitoquímicos, foi incluído na família Picramniaceae (ALMEIDA et al., 2007).

Quimicamente, os quassinoides são triterpenos biodegradados com elevado padrão de oxigenação. São derivados de triterpenos da série eufol/tirucalol, com perda de 5-10 átomos de carbonos incluindo uma das metilas de C-4 (Figura 1). Além disto, contém lactonas em seus esqueletos básicos e, geralmente, possuem apenas uma ligação dupla (ALMEIDA et al., 2007, DEWICK, 2002).

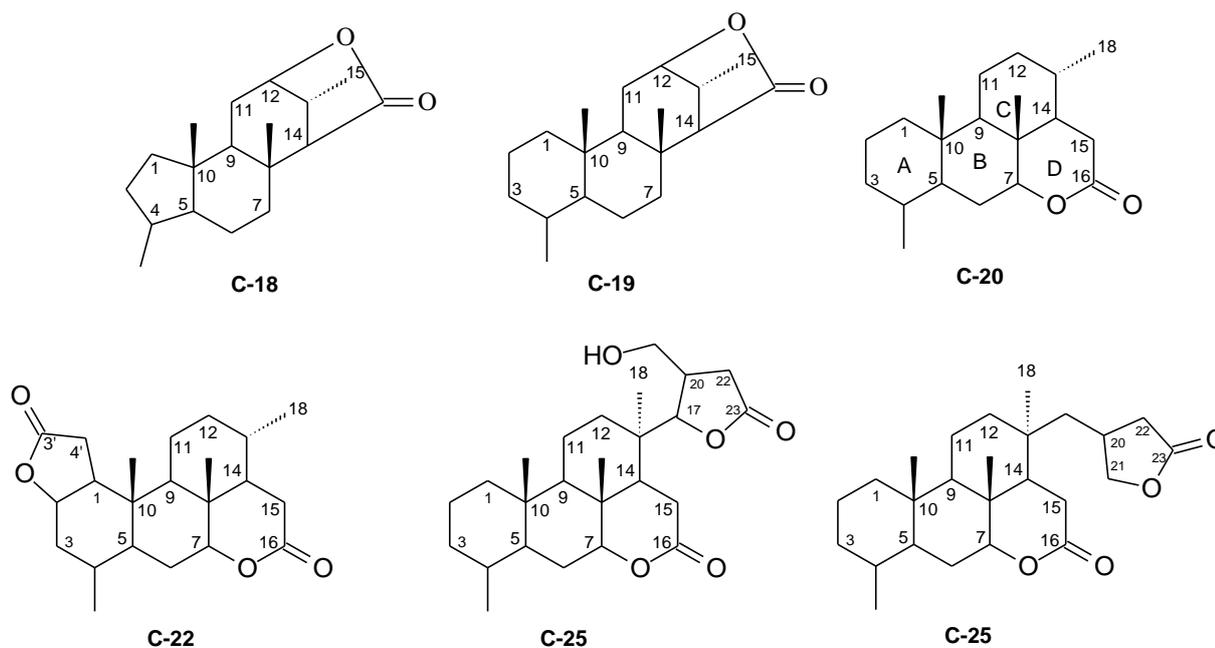
Figura 1 - Rota biossintética dos quassinoides



Fonte: Adaptada de Dewick (2002)

Estruturalmente, os quassinoides estão divididos em cinco grupos, de acordo com o esqueleto básico: C₁₈ (lauricolactano), C₁₉ (cedrolidano), C₂₀ (quassolidano), C₂₂ (picrolemano) e C₂₅ (simarolidano), sendo o esqueleto quassolidano o de maior ocorrência na família, seguido do cedrolidano. Os esqueletos lauricolactano, picrolemano e simarolidano são os menos frequentes (Figura 2). Além disso, tais substâncias possuem diferentes grupos funcionais oxigenados em suas estruturas, exceto nas posições C-5 e C-9 e também grupos metílicos nas posições C-4 e C-10 (ALMEIDA et al., 2007; GUO et al., 2005; VIEIRA e BRAZ-FILHO, 2006).

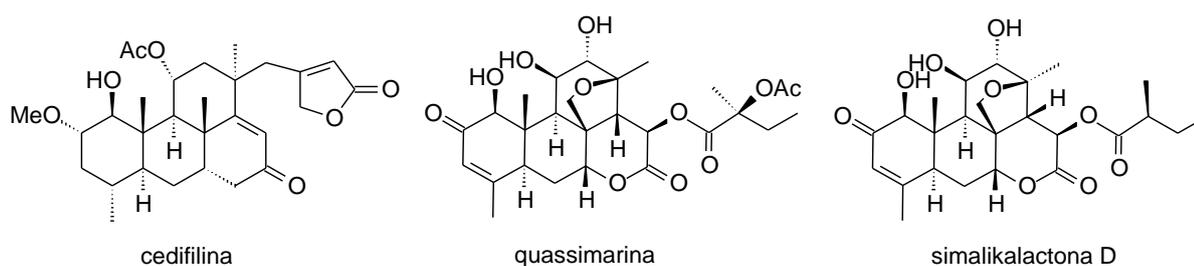
Figura 2 - Esqueletos básicos dos quassinoides



Fonte: Adaptada ALMEIDA et al., 2007

O estudo mais recente sobre a ocorrência de quassinoides em espécies de Simaroubaceae mostrou que o maior número destes compostos foi isolado no gênero *Brucea*, seguido de *Ailanthus*, *Eurycoma*, *Quassia*, *Castela*, *Picrasma*, *Simaba*, *Simarouba* e *Picrolemma*. Além disso, foi verificada a presença de quassinoides em espécies de outras famílias, como a cedifilina, isolada na espécie *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae), e os quassinoides quassimarina e simalikalactona D (**2**), isolados em *Leitneria floridana* (Leitneriaceae) (Figura 3) (ALMEIDA et al., 2007; MULHOLLAND et al., 2003; XU et al., 2000).

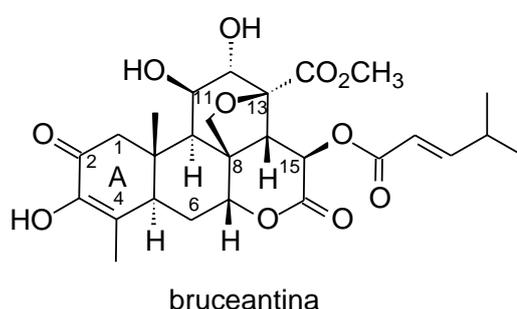
Figura 3 - Estruturas dos quassinoides cedifilina, quassimarina e simalikalactona D



Os testes biológicos com os quassinoides se intensificaram após a confirmação de atividade antileucêmica exibida pela bruceantina (Figura 4), isolada da espécie *Brucea antidysenterica* (KUPCHAN et al., 1975). Este composto, logo após, foi incluído no tratamento quimioterápico (ALMEIDA et al., 2007). Estudos posteriores possibilitaram a descoberta de vários outros quassinoides bioativos, sendo considerados os principais responsáveis pelo elevado potencial biológico das plantas de Simaroubaceae. Compostos pertencentes à classe dos quassinoides apresentam atividades antimalárica, antiúlcera, antinociceptiva, inseticida, antiparasitária, antiviral, citotóxica, anticâncer, fitotóxica, amebicida, antituberculose, anti-inflamatória, entre outras (ALVES et al., 2014; VIEIRA e BRAZ-FILHO, 2006).

As atividades biológicas apresentadas pelos quassinoides, principalmente a citotóxica e a antimalárica, devem-se a algumas especificidades em suas estruturas, como as observadas na estrutura da bruceantina (Figura 4): (a) um esqueleto de quatro anéis, sendo uma lactona no anel D; (b) uma ponte oximetilênica entre C-8 e C-11 ou entre C-8 e C-13, no anel C; (c) uma cetona α,β -insaturada em C-2 e a presença de um grupo hidroxila livre no anel A; (d) um grupo éster em C-15 e/ou C-6 (ALMEIDA et al., 2007).

Figura 4 - Estrutura do quassinóide bruceantina



3.3.1 Revisão bibliográfica dos quassinoides do gênero *Simaba* e suas atividades biológicas

Os resultados obtidos na revisão do gênero *Simaba* mostraram um total de 39 quassinoides isolados e identificados em nove espécies: *S. africana*, *S. cedron*, *S. cuneata*, *S. cuspidata*, *S. guianensis*, *S. multiflora*, *S. orinocensis*, *S. subcymosa* e *S. undulata*. As espécies *S. cedron* e *S. multiflora* apresentaram o maior número,

com 19 e 10, respectivamente. Em *S. cuneata*, *S. cuspidata* e *S. undulata* foram relatados dois quassinoides em cada.

Não foram encontrados na literatura registros da ocorrência de quassinoides para as espécies *S. ferruginea*, *S. cavalcantei*, *S. docensis*, *S. floribunda*, *S. glabra*, *S. insignis*, *S. intermedia*, *S. maiana*, *S. monophylla*, *S. obovata*, *S. orinocensis*, *S. paraenses*, *S. pohliana*, *S. polyphylla*, *S. salubris*, *S. suaveolens*, *S. suffruticosa*, *S. trichilioides* e *S. warmingiana*.

Os quassinoides de *Simaba* apresentam esqueleto básico C₁₉, C₂₀ e C₂₅, sendo que o esqueleto C₂₀ foi o predominante, com 22 compostos, como a quassina (**1**), chaparrinona (**15**) e chaparrina (**16**), conforme mostrado na Figura 5. Na espécie *S. cedron*, foram isolados quassinoides com os três tipos de esqueletos, obtidos principalmente a partir da fração clorofórmica da madeira (HITOTSUYANAGI et al., 2001; JACOBS et al., 1987; MORETTI et al., 1994; OZEKI et al., 1998).

Os quassinoides de *Simaba* foram isolados principalmente a partir da fração clorofórmica de diversas partes da planta, tais como: cascas da raiz e caule, madeira, galhos, folhas, sementes e frutos. Nas folhas, sementes, frutos e galhos, os quassinoides são menos frequentes.

Nas folhas e sementes de *S. cedron* foram isolados os quassinoides C₁₉ cedronina (**3**) e 7-epicedronina (**5**) (JACOBS et al., 1987). Um estudo com os galhos de *S. cuneata* possibilitou o isolamento de dois quassinoides C₂₅, o (20*R*)-simarolida (**21**) e (20*S*)-simarolida (**22**) (VIEIRA et al., 1999).

Os quassinoides C₂₀ simalikalactona D (**2**) e chaparrinona (**16**) foram relatados em cinco e quatro espécies, respectivamente, sendo obtidos a partir da casca da raiz e madeira. No entanto, a simalikalactona D (**2**) também foi obtida do fruto de *S. multiflora* (CABRAL; McCHESNEY; MILHOUS, 1993).

Diversos quassinoides isolados de *Simaba* foram testados quanto ao potencial biológico e exibiram ação antimalárica, citotóxica, antileucêmica, antiviral e antineoplásica. Simalikalactona D (**2**) e cedronolactona A (**19**) isolados da madeira de *S. cedron* exibiram elevada atividade citotóxica. Os demais compostos isolados de *S. cedron* também apresentaram atividade citotóxica, no entanto foram menos ativos (OZEKI et al., 1998). Além disso, foi relatada a ação antiviral para simalikalactona D (**2**) isolada de *S. africana* (APERS et al., 2002)

Os quassinoides simalikalactona D (**2**) e orinocinolida (**33**), obtidos da casca da raiz de *S. orinocensis*, foram ativos frente à *Plasmodium falciparum* D6 e W2,

apresentando elevado potencial antimalárico (MUHAMMAD et al., 2004). Gutolactona (**27**) e cedronina (**3**) isolados da casca de *S. guianensis* e *S. cedron*, respectivamente, também apresentaram significativa atividade antimalárica (CABRAL; McCHESNEY; MILHOUS, 1993; MORETTI et al., 1994)

Os quassinoides C₂₀ 6- α -senecioiloxichaparrinona (**25**), 6- α -senecioiloxichaparrina (**29**) e 13,18-dehidro-6 α -senecioiloxichaparrina (**30**) foram isolados de *S. multiflora* e exibiram potente atividade antileucêmica, bem como, os quassinoides C₂₅ guanepolida (**20**) e simarinolida (**34**) obtidos de *S. orinocensis* (ARISAWA et al., 1983; MORETTI et al., 1986; POLONSKY et al., 1981; WANI et al., 1978). Além disso, os quassinoides C₂₀, 6- α -tigloiloxichaparrina (**23**) e 6- α -tigloiloxichaparrinona (**24**), isolados da casca do caule de *S. cuspidata*, apresentaram atividade antineoplásica (POLONSKY et al., 1980). Desta forma, dentre os quassinoides de *Simaba*, simalikalactona D (**2**) foi o composto mais bioativo, apresentando atividades antimalárica, citotóxica e antiviral.

Vale ressaltar que algumas atividades biológicas de quassinoides de *Simaba* foram relatadas somente quando estes foram isolados de espécies de outros gêneros, conforme observado para glaucarubolona (**15**) (OKANO; FUKAMIYA; LEE, 2000), chaparrinona (**16**) (FRANÇOIS et al., 1998; OKANO; FUKAMIYA; LEE, 2000), chaparrina (**17**) (OKANO; FUKAMIYA; LEE, 2000), 6- α -tigloiloxilchapparrinona (**24**) (KAUR et al., 2009), 15-desacetilundulatona (**38**) (FRANÇOIS et al., 1998), glaucarubinona (**39**) (O'NEILL et al., 1988) e quassina (**1**) (MISHRA et al., 2010), os quais apresentaram atividade antimalárica.

Os quassinoides 6- α -tigloiloxilchapparrinona (**24**) e glaucarubinona (**39**) exibiram atividades citotóxica (MESQUITA et al., 2009; WANG et al., 2013) e anticancerígena (DIYABALANAGE et al., 2011; JIN et al., 2008). Cedronina (**3**) (COOMBES et al., 2005) e 15-desacetilundulatona (**38**) (LUMONADIO et al., 1991) demonstraram efeito antitumoral.

A quassina (**1**) e glaucarubolona (**15**) apresentaram atividades larvicida (EVANS e RAJ, 1991) e antiparasitária (ALMEIDA et al., 2007), respectivamente. Chaparrinona (**16**) e chaparrina (**17**) têm ação inseticida (KUBO; MURAI; CHAUDHURI, 1992), enquanto chaparrina (**17**) apresenta também efeito amebicida (CALZADO-FLORES et al., 2000).

O Quadro 1 apresenta os quassinoides de *Simaba* e suas respectivas atividades biológicas e a Figura 5 apresenta as fórmulas estruturais.

Quadro 1 - Quassinoides isolados no gênero *Simaba* e suas atividades biológicas

Espécie	Quassinoides	Parte da planta	Amostra	Atividade Biológica	Referência
<i>S. africana</i>	Quassina (1)	Casca da raiz	Fração CHCl ₃	Antimalárica	Apers et al. (2002) Mishra et al. (2010)
		Raiz	Extrato MeOH	-	Lumonadio e Vanhaelen (1986)
	Simalikalactona D (2)	Casca da raiz	Fração CHCl ₃	Antiviral	Apers et al. (2002)
		ni	ni	Antimalárica	Cabral; McChesney; Milhous (1993)
<i>S. cedron</i>	Cedronina (3)	Casca do caule	ni	Antimalárica	Moretti et al. (1994)
		Folhas	Fração CHCl ₃	Antitumoral	Jacobs et al. (1987) Lumonadio et al. (1991)
		Sementes	Fração CHCl ₃	-	Jacobs et al. (1987)
	Cedronolina (4)	Casca do caule	ni	na	Moretti et al. (1994)

Quadro 1 - Continuação

<i>S. cedron</i>	7-epicedronina (5)	Folhas	Fração CHCl ₃	-	Jacobs et al. (1987)
		Sementes			
	1,4-dehidrocedronolactona A (6)	ni	ni	ni	Barbosa; Braz-Filho; Vieira, (2011)
	Cedronolactona D (7)	Madeira	Fração CHCl ₃	Citotóxica	Ozeki et al. (1998)
	Cedronolactona B (8)				
	Cedronolactona C (9)				
	Ailanguassina A (10)				
	Poliandrol (11)				
	Cedronolactona E (12)	Madeira	Fração BuOH	-	Hitotsuyanagi et al. (2001)
Glaucarubolol (13)	ni	ni	ni	Barbosa; Braz-Filho; Vieira, (2011)	

Quadro 1 – Continuação

<i>S. cedron</i>	Glaucarubol (14)	Madeira	Fração CHCl ₃	Citotóxica	Ozeki et al. (1998)
	Glaucarubolona (15)	Madeira	Fração CHCl ₃	Citotóxica Antimalárica Larvicida	Ozeki et al. (1998) Okano; Fukamiya; Lee (2000) Evans e Raj (1991)
	Chaparrinona (16)	Madeira	Fração CHCl ₃	Citotóxica Inseticida	Ozeki et al. (1998) Okano; Fukamiya; Lee (2000) Kubo; Murai; Chaudhuri (1992)
	Chaparrina (17)	Madeira	Fração CHCl ₃	Citotóxica Inseticida Amebicida	Ozeki et al. (1998) Okano; Fukamiya; Lee (2000) Kubo; Murai; Chaudhuri (1992) Calzado-Flores et al. (2000)
	Samaderina Z (18)	Madeira	Fração CHCl ₃	Citotóxica	Ozeki et al. (1998)
	Cedronolactona A (19)				

Quadro 1 – Continuação

<i>S. cedron</i>	Simalikalactona D (2)	Madeira	Fração CHCl ₃	Citotóxica	Ozeki et al. (1998)
	Guanepolida (20)				
<i>S. cuneata</i>	(20 <i>R</i>)-Simarolida (21)	Galhos	Extrato MeOH	-	Vieira et al. (1999)
	(20 <i>S</i>)-Simarolida (22)				
<i>S. cuspidata</i>	6- α -tigloiloxichaparrina (23)	Casca do caule	Fração CHCl ₃	Antineoplásica	Polonsky et al. (1980)
	6- α -tigloiloxichaparrinona (24)	Casca do caule	Fração CHCl ₃	Antineoplásica Antimalárica Citotóxica	Polonsky et al. (1980) Kaur et al. (2009) Wang et al. (2013)
<i>S. guianensis</i>	Simalikalactona D (2)	Casca	Extrato EtOH	Antimalárica	Cabral; McChesney; Milhous (1993)

Quadro 1 – Continuação

<i>S. guianensis</i>	Chaparrinona (16)				Barbosa; Braz-Filho; Vieira, (2011)
	6- α - Senecioloixichaparrinona (25)	ni	ni	ni	
	Holacantona (26)				
	Gutolactona (27)	Casca	Extrato EtOH	Antimalárica	Cabral; Mc Chesney; Milhous (1993)
<i>S. multiflora</i>	Simalikalactona D (2)	Fruta	ni	Antimalárica	Cabral; Mc Chesney; Milhous (1993)
	Chaparrinona (16)	Madeira	Extrato EtOH	-	Arisawa et al. (1983)
		ni	ni	na	Wani et al. (1978)
	Chaparrina (17)	ni	ni	ni	Barbosa; Braz-Filho; Vieira, (2011)
	6- α -Tigloiloixichaparrinona (24)	Raiz	Fração CH ₂ Cl ₂	Anticancerígena	Carter et al. (1993) Jin et al. (2008)

Quadro 1 – Continuação

<i>S. multiflora</i>	6- α - Senecioiloxichaparrinona (25)	ni	ni	Antileucêmica	Wani et al. (1978)
		Madeira	Extrato EtOH	Antileucêmica	Arisawa et al.(1983)
		Casca do caule	Fração CHCl ₃	-	Polonsky et al. (1982)
	6- α -Hidroxi-chaparrinona (28)	Raiz	Fração CH ₂ Cl ₂	-	Carter et al. (1993)
	6- α -Senecioiloxichaparrina (29)	Casca do caule	Fração CHCl ₃	-	Polonsky et al. (1982)
		Madeira	Extrato EtOH	Antileucêmica	Arisawa et al. (1983)
	13,18-Dehidro-6 α - senecioiloxichaparrina (30)	Fruta	ni	Antileucêmica	Moretti et al. (1986)
	12-Dehidro-6 α - senecioiloxichaparrina (31)	Fruta	ni	na	Moretti et al. (1986)

Quadro 1 - Continuação

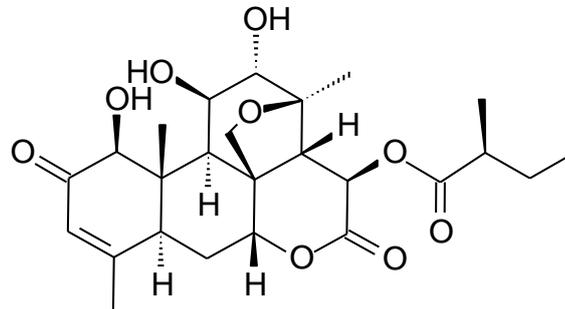
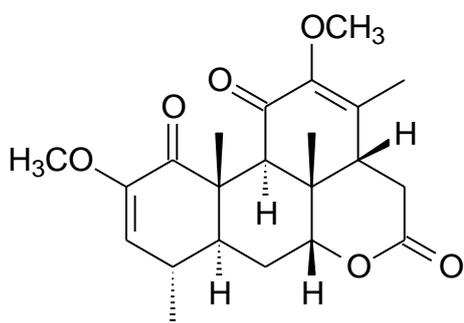
<i>S. multiflora</i>	Karinolida (32)	Casca do caule	Fração CHCl ₃	-	Polonsky et al. (1982)
<i>S. orinocensis</i>	Simalikalactona D (2)	Casca da raiz	Fração CHCl ₃	Antimalárica	Muhammad et al. (2004)
	Guanepolida (20)	Casca da raiz	Fração CHCl ₃	Antileucêmica	Polonsky et al. (1981)
	(20 <i>R</i>)-Simarolida (21)	Casca da raiz	Fração CHCl ₃	-	Polonsky et al. (1981)
	Orinocinolida (33)	Casca da raiz	Fração CHCl ₃	Antimalárica	Muhammad et al. (2004)
	Simarinolida (34)	Casca da raiz	Fração CHCl ₃	Antileucêmica	Polonsky et al. (1981)
	Soulameolida (35)	Casca da raiz	ni	ni	Barbosa; Braz-Filho; Vieira, (2011)
	Picrasina A (36)				

Quadro 1 - Continuação

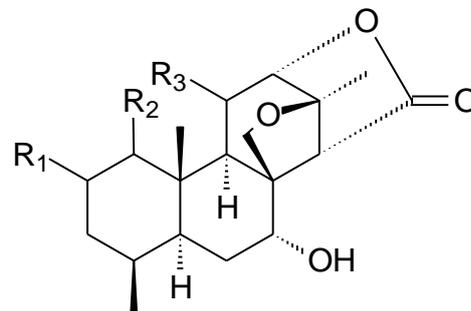
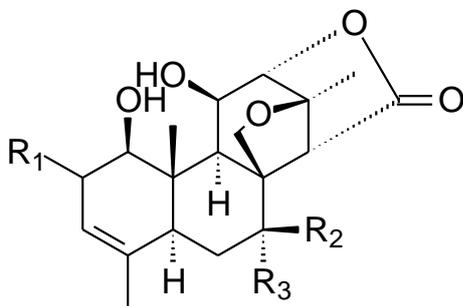
<i>S. subcymosa</i>	Cedronina (3)	Casca da raiz	Extrato MeOH	-	Sousa et al. (2005)
	Chaparrinona (15)	Casca da raiz	Extrato MeOH	Antimalárica	Sousa et al. (2005) François et al. (1998)
	(20R)-Simarolida (21)	Casca da raiz	Extrato MeOH	-	Sousa et al. (2005)
	Cimosanina (37)				
<i>S. undulata</i>	15-Desacetilundulatona (38)	Caule Casca da raiz	ni	Antimalárica Antitumoral	Barbosa; Braz-Filho; Vieira, (2011) François et al. (1998) Lumonadio et al. (1991)
	Glaucarubinona (39)	Caule Casca da raiz	ni	Antimalárica Citotóxica Anticancerígena	Barbosa; Braz-Filho; Vieira, (2011) O'Neill et al. 1988 Mesquita et al. (2009) Diyabalanage et al. (2011)

ni = não informado a parte da planta e/ou tipo de amostra; na= não ativo

Figura 5 - Fórmulas estruturais dos quassinoides isolados em espécies do gênero *Simaba*



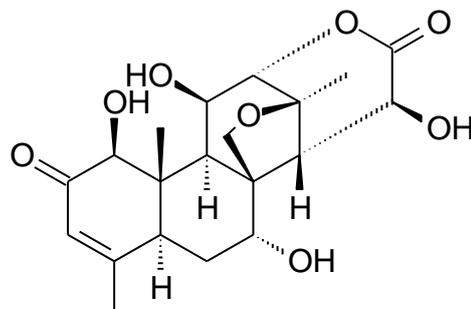
2



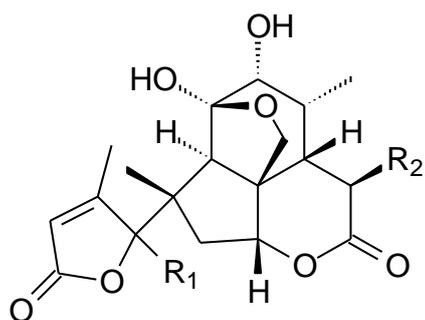
3: $\text{R}_1 = \text{O}$; $\text{R}_2 = \text{H}$; $\text{R}_3 = \text{OH}$

4: $\text{R}_1 = \text{OH}$; $\text{R}_2 = \text{H}$; $\text{R}_3 = \text{OH}$

5: $\text{R}_1 = \text{O}$; $\text{R}_2 = \text{OH}$; $\text{R}_3 = \text{H}$



7

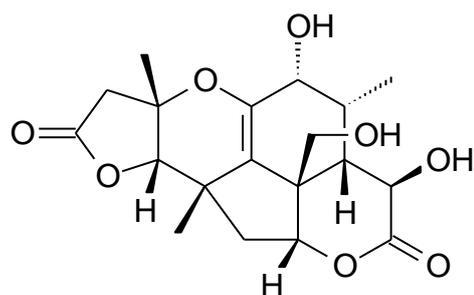


8: $R_1 = \alpha\text{-H}$; $R_2 = \text{H}$

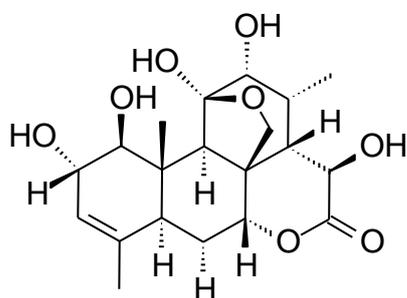
9: $R_1 = \alpha\text{-H}$; $R_2 = \text{OH}$

10: $R_1 = \beta\text{-H}$; $R_2 = \text{H}$

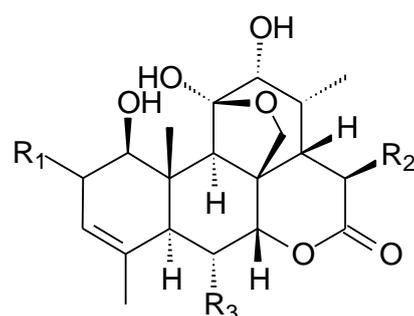
11: $R_1 = \beta\text{-H}$; $R_2 = \text{OH}$



12



13



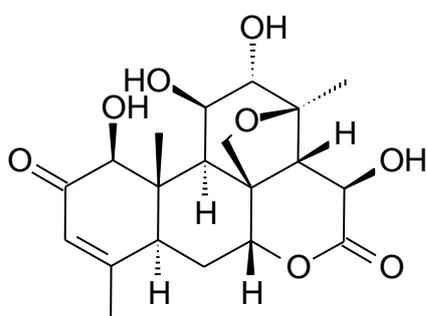
14: $R_1 = \alpha\text{-OH}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$

15: $R_1 = \text{O}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$

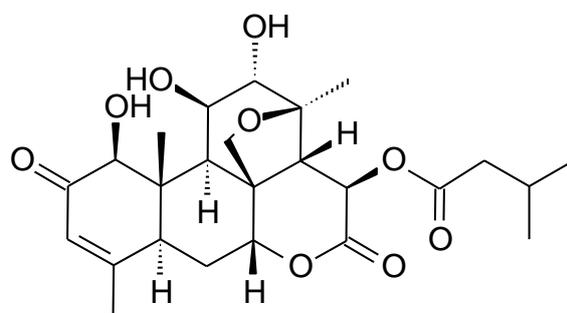
16: $R_1 = \text{O}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$

17: $R_1 = \alpha\text{-OH}$; $R_2 = R_3 = \text{H}$

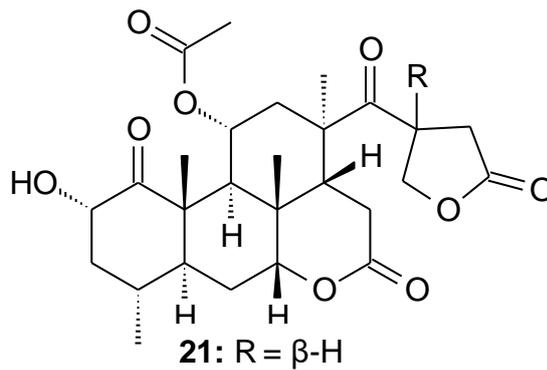
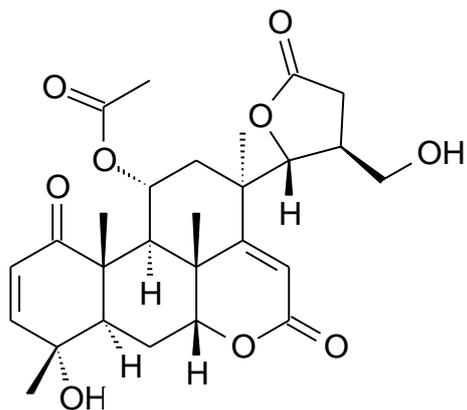
28: $R_1 = \text{O}$; $R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{OH}$



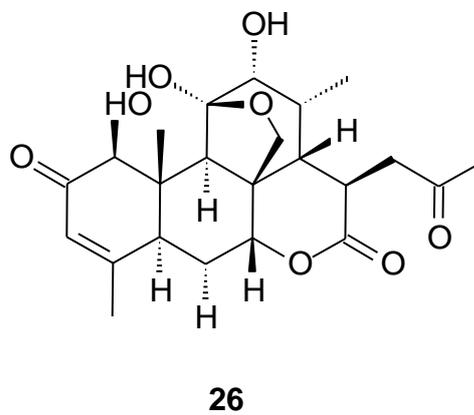
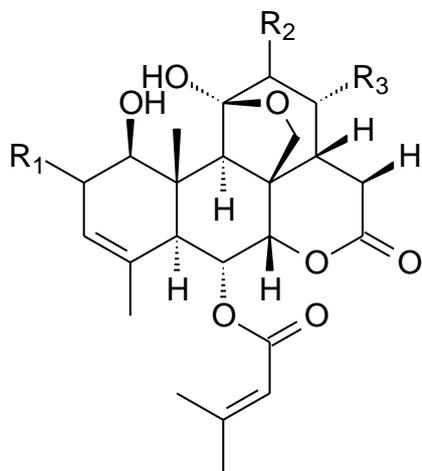
18



19



22: R = α -H



23: R₁ = α -OH; R₂ = OH R₃ = CH₃

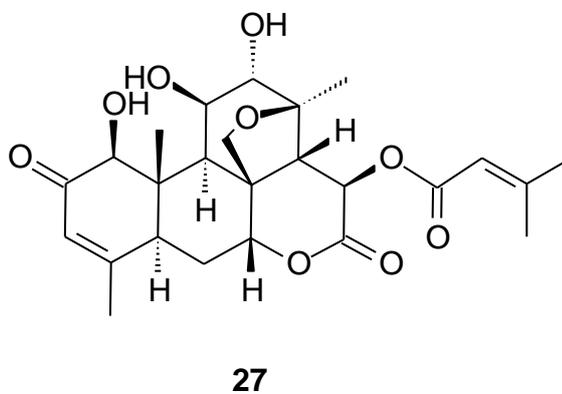
24: R₁ = O; R₂ = OH R₃ = CH₃

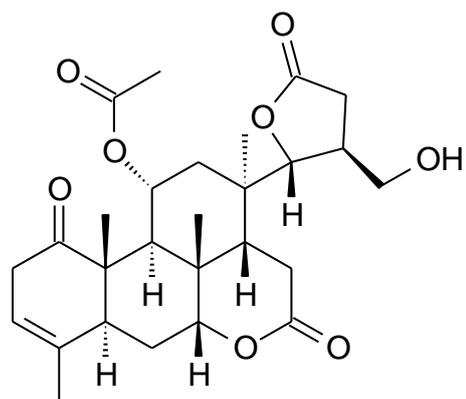
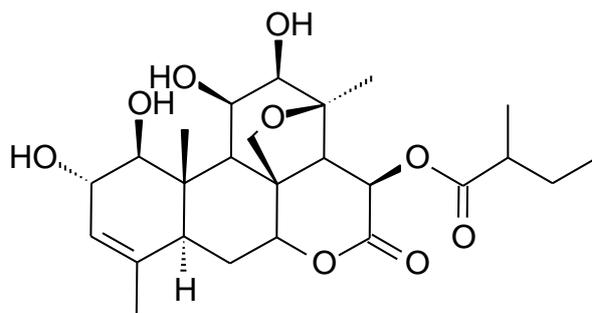
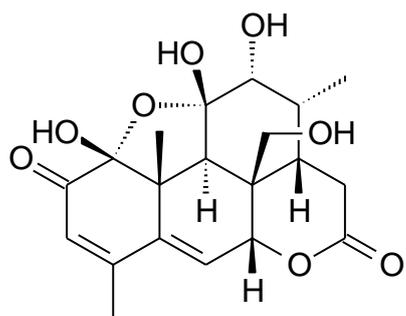
25: R₁ = O; R₂ = OH R₃ = CH₃

29: R₁ = α -OH; R₂ = OH R₃ = CH₃

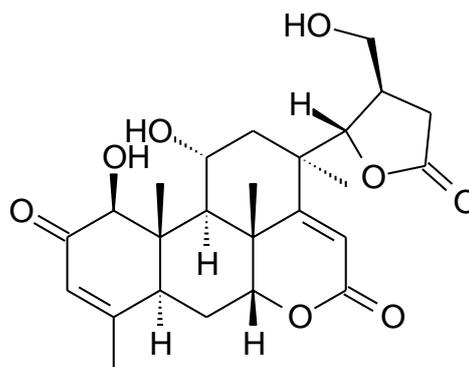
30: R₁ = α -OH; R₂ = OH R₃ = CH₂

31: R₁ = α -OH; R₂ = O; R₃ = CH₃

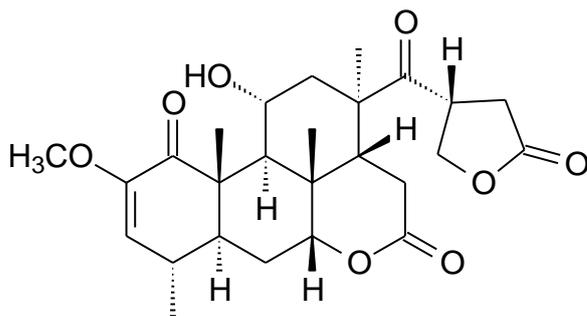




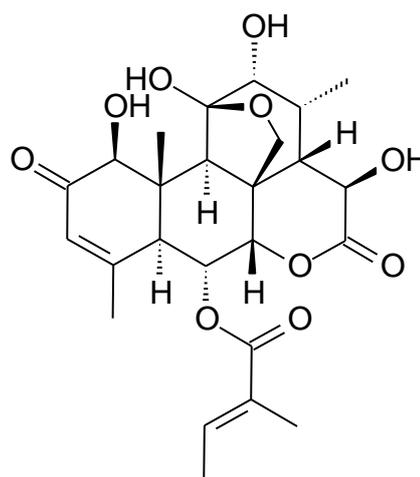
34



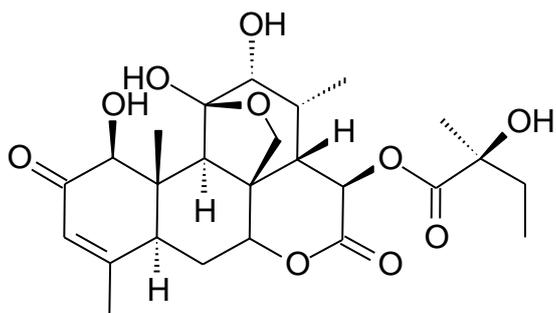
35



36



38



39

3.4 *Simaba ferruginea*

A espécie *Simaba ferruginea* A. St.-Hil (Figura 6), conhecida popularmente como “calunga”, “calunga ferruginea” e “féo da terra”, é um arbusto endêmico e nativo do cerrado brasileiro. Ocorre nas regiões Norte (Tocantins), Nordeste (Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais) (FORZZA et al., 2010; NOLDIN et al., 2005; PIRANI e THOMAS, 2016).

Figura 6 - Fotos da espécie *Simaba ferruginea* A. St.-Hil.



Fonte: Ruth R. S. Farias

Simaba ferruginea é bastante empregada na medicina tradicional, o decocto do rizoma e das cascas do caule, por exemplo, são utilizados no tratamento de úlceras gástricas, diarreia, febre, contra hidropisia, reumatismo e obesidade (CUNHA et al., 2008; NOLDIN, 2005, NOLDIN et al., 2005; SIMÃO et al., 2014).

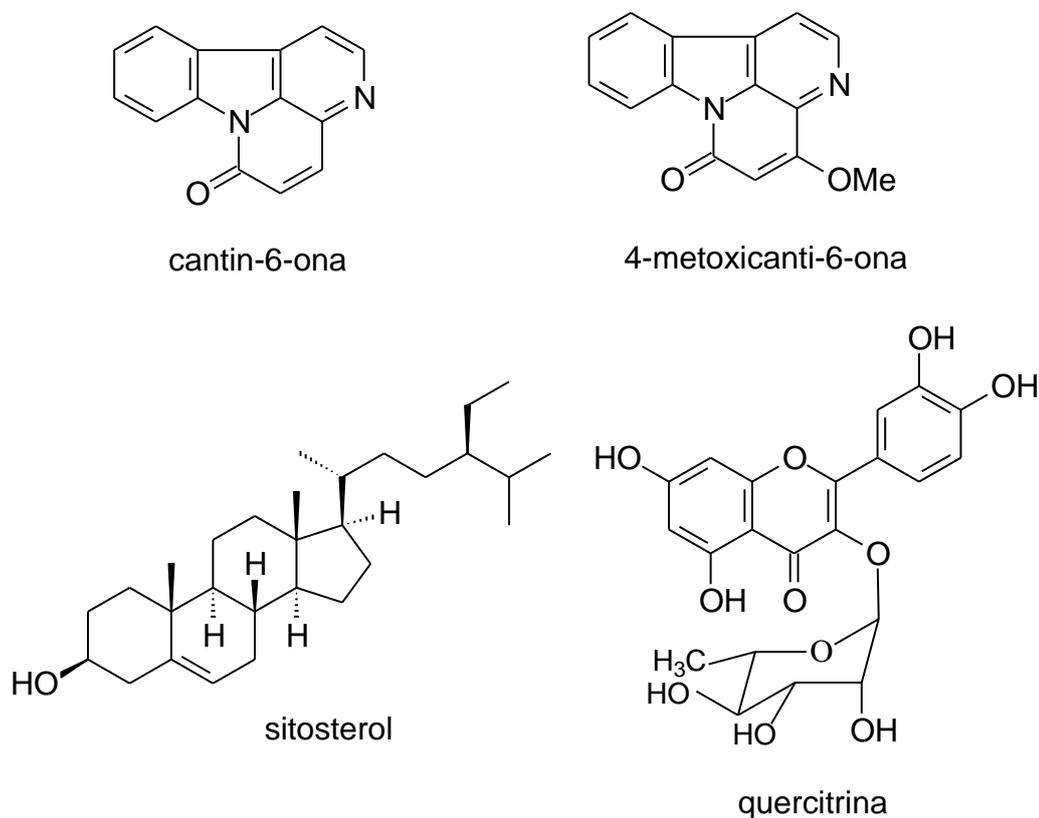
Vanzeler et al. (2015) avaliaram de modo preliminar, o efeito do extrato hidroalcoólico do rizoma no tratamento de ratas wistar prenhes e, embora aparentemente não tenha apresentado toxicidade, não indica o uso desta planta por mulheres grávidas.

Investigações fitoquímicas com o rizoma de *S. ferruginea* possibilitaram o isolamento dos alcaloides cantin-6-ona e 4-metoxicantin-6-ona a partir dos extratos diclorometano, metanólico e fração clorofórmica, oriunda do fracionamento do extrato metanólico (ALMEIDA et al., 2011; CUNHA et al., 2008; NOLDIN et al., 2005). Em outro estudo, Noldin (2005) isolou o esteroide sitosterol e o flavonoide

quercitrina a partir dos extratos hexânico e acetato de etila das folhas, respectivamente (Figura 7).

Estudos farmacológicos com o rizoma de *S. ferruginea* comprovaram diversas atividades. O extrato metanólico e a fração alcaloídica apresentaram atividades antiúlcera e antinociceptiva, enquanto que a fração diclorometano apresentou apenas atividade antiúlcera (ALMEIDA et al., 2011; NOLDIN, 2005; NOLDIN et al., 2005). O extrato etanólico exibiu potencial antifúngico e antimicrobiano (SILVA JUNIOR et al., 2009). Noldin (2005) relatou ainda a atividade antiúlcera nas folhas.

Figura 7 - Constituintes químicos das folhas e rizomas de *Simaba ferruginea* A. St.-Hil.



4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados na preparação dos extratos, partição e análises em cromatografia em camada delgada (CCD), como o etanol, hexano, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio e metanol foram de grau analítico (Synth).

As placas para CCD foram preparadas por aplicação manual da suspensão de gel de sílica 60 G (Macherey-Nagel) em água destilada (1:2) sobre lâminas de vidro (9,5 x 5,9 cm). Em seguida, foram ativadas a 110 °C em estufa por um período de 1h.

O fracionamento cromatográfico em coluna foi realizado utilizando gel de sílica (0,060-0,200 mm) da Acros Organics e Sephadex LH-20 (Aldrich). As substâncias foram reveladas nas cromatoplasmas por nebulização com solução de sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) preparada por dissolução de 2,1 g de sulfato cérico (Vetec) em 15 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) (Chemco) e, posteriormente, foi diluído com 800 mL de água destilada.

Nas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) clorofórmio-*d* (CDCl_3), metanol-*d*₄ (CD_3OD) e dimetilsulfóxido-*d*₆ ($\text{DMSO-}d_6$) deuterados foram utilizados como solventes e tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

Nas análises de Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados metanol, acetonitrila, ácido acético grau HPLC (J. T. Baker), dimetilsulfóxido (TEDIA) e água ultra pura (18 Ω) obtida em sistema Milli-Q Plus. Foram utilizados também padrões de quercitrina e ácido elágico. A quercitrina, grau HPLC e pureza de 99,6%, foi obtida no LPN-UFPI (Laboratório de Produtos Naturais – Universidade Federal do Piauí) e o ácido elágico, com pureza de 97,0%, é da Alfa Aesar.

Na avaliação do teor de flavonoides, fenóis totais e atividade antioxidante foram utilizados o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e butilhidroxitolueno (BHT) (Sigma), reagente de Folin-Ciocalteu e piridina (Merck), cloreto de alumínio (Fluka Analytical), ácido acético glacial (Vetec) e carbonato de sódio (Synth).

4.2 Equipamentos

Os galhos, pecíolos e folhas de *S. ferruginea* foram moídos em moinho de facas (Marconi). Os extratos, frações e subfrações foram concentrados em evaporadores rotativos sob pressão reduzida (Laborota 4000 Heidolph e Hei-Vap Precision Heidolph). A água residual foi retirada em liofilizadores (Micro Modulyo Edwards e Modulyod Freeze Dryer da Thermo Electron Corporation).

As massas das amostras foram pesadas em balanças modelos KN 4000 da Knwaagen (precisão \pm 0,0001 kg) e 210A da Bel Mark (precisão \pm 0,0001g) e solubilizadas com auxílio de banho de ultrassom Cleanner Thournton (Marconi). As placas cromatográficas foram ativadas em estufa EL-1.3 (Odontobras) e reveladas sob aquecimento em placa aquecedora 509T (Fisaton).

4.2.1 Espectroscopia e Absorção molecular

As medidas de absorção molecular obtidas nas análises de perfis na região do UV-Vis e atividade antioxidante dos extratos e frações de *S. ferruginea* foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 (PerkinElmer), utilizando-se cubetas de quartzo e de vidro com 1,0 cm de caminho óptico.

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho

O espectro de absorção na região do infravermelho, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , foi registrado em espectrofotômetro (Nicolet Impact 400) utilizando o brometo de potássio (KBr) como agente dispersante.

4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico dos extratos e frações e a quantificação da quercitrina e ácido elágico foram feitos em cromatógrafo (Shimadzu®) equipado com bomba LC-20AT, injetor automático SIL-20AHT, detector de arranjo de fotodiodo SPD-M20A, forno para coluna CTO-20A, pré-coluna C-18 Shim-pack 6-SIL, coluna C18 Shim-pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm e partícula de 5,0 μm .

As amostras analisadas foram submetidas a um pré-tratamento (*clean up*) em cartucho de extração em fase sólida (SPE) Strata C18-E da Phenomenex de dimensões 1000 mg/6 mL). Todos os extratos e padrões foram filtrados em disco filtrante de 30 mm e poro de 0,45 μm , da Phenomenex.

4.2.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) obtidos para os compostos isolados das folhas de *S. ferruginea* foram registrados em espectrômetros Varian INOVA-modelo 400, operando a 400 MHz para o ^1H e 100 MHz para o ^{13}C da Bruker Ascend-600, operando a 600 MHz para o ^1H e 150 MHz para o ^{13}C .

4.2.5 Análise de rotação específica, $[\alpha]_D$

A medida de rotação óptica específica, $[\alpha]_D$ do composto **6** foi feita em polarímetro digital Perkin Elmer® 341LC, com filtro de sódio e cela de quartzo com caminho óptico de 1,00 dm. A temperatura empregada foi de 23,4 °C, o comprimento de onda de 589 nm e concentração de 1 mg mL⁻¹.

4.3 Material vegetal

Os galhos, pecíolos e folhas de *S. ferruginea* St. Hil. foram coletados em agosto de 2013, na fazenda Castanho, município de Jerumenha-Piauí (latitude sul = 7° 02' 29,5"; longitude oeste = 43° 24' 58,3"; altitude de 236 m). A espécie foi botanicamente identificada pela bióloga Ruth Raquel Soares de Farias (Pesquisadora-bioTEN e AbioTEN). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí – UFPI, com o número de registro TEPB 30117.

4.4 Preparação dos extratos

As folhas, pecíolos e galhos de *S. ferruginea* foram separados, secados à temperatura ambiente e moídos em moinho de facas, obtendo-se 1381 g, 273 g e 286 g, respectivamente. Os materiais vegetais obtidos foram submetidos à extração por maceração exaustiva com etanol 98%, com filtração do sobrenadante a cada quatro dias. Os filtrados foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida e aquecimento entre 40 e 45 °C. A água residual foi removida em liofilizador, fornecendo os extratos etanólicos das folhas (EEFSf), pecíolos (EEPSf) e galhos (EEGSf), conforme mostra a Tabela 1. Os extratos foram armazenados sob refrigeração.

Tabela 1 - Massa e rendimento dos extratos de *S. ferruginea*

Material vegetal	Massa (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Folha	1381	389	28
Pecíolo	273	21	8
Galho	286	15	5

4.5 Extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas

O EEFSf (200 g) foi suspenso em 600 mL de uma mistura de MeOH/H₂O (1:1, v:v) e submetida a extração líquido-líquido. A fase hidroalcoólica foi extraída com hexano (10 x 200 mL), diclorometano (7 x 200 mL) e acetato de etila (7 x 200 mL). Esse procedimento foi realizado por duas vezes, resultando nas frações hexânica (FHFSf, 40 g, 20%), diclorometano (FDFSf, 4 g, 2%), acetato de etila (FAEFSf, 109 g; 55%) e aquosa (FAFSf, 47 g; 23%) (Esquema 1). Os solventes orgânicos foram removidos em evaporador rotativo à pressão reduzida e aquecimento entre 40 °C e 45 °C e a água foi removida por liofilização.

Durante o processo de partição, um precipitado (ppt, 3,5 g) foi formado na interfase das fases hexânica e hidroalcoólica, sendo separado e suspenso em MeOH a quente, fornecendo um sólido branco amorfo (1,5 g). A análise do ppt por espectroscopia na região do infravermelho (IV), RMN ¹H e ¹³C possibilitou a identificação do composto **7**. A parte solúvel (PS, 2 g) em MeOH foi concentrada em evaporador rotativo e submetida a fracionamento em coluna de gel de sílica (Esquema 1).

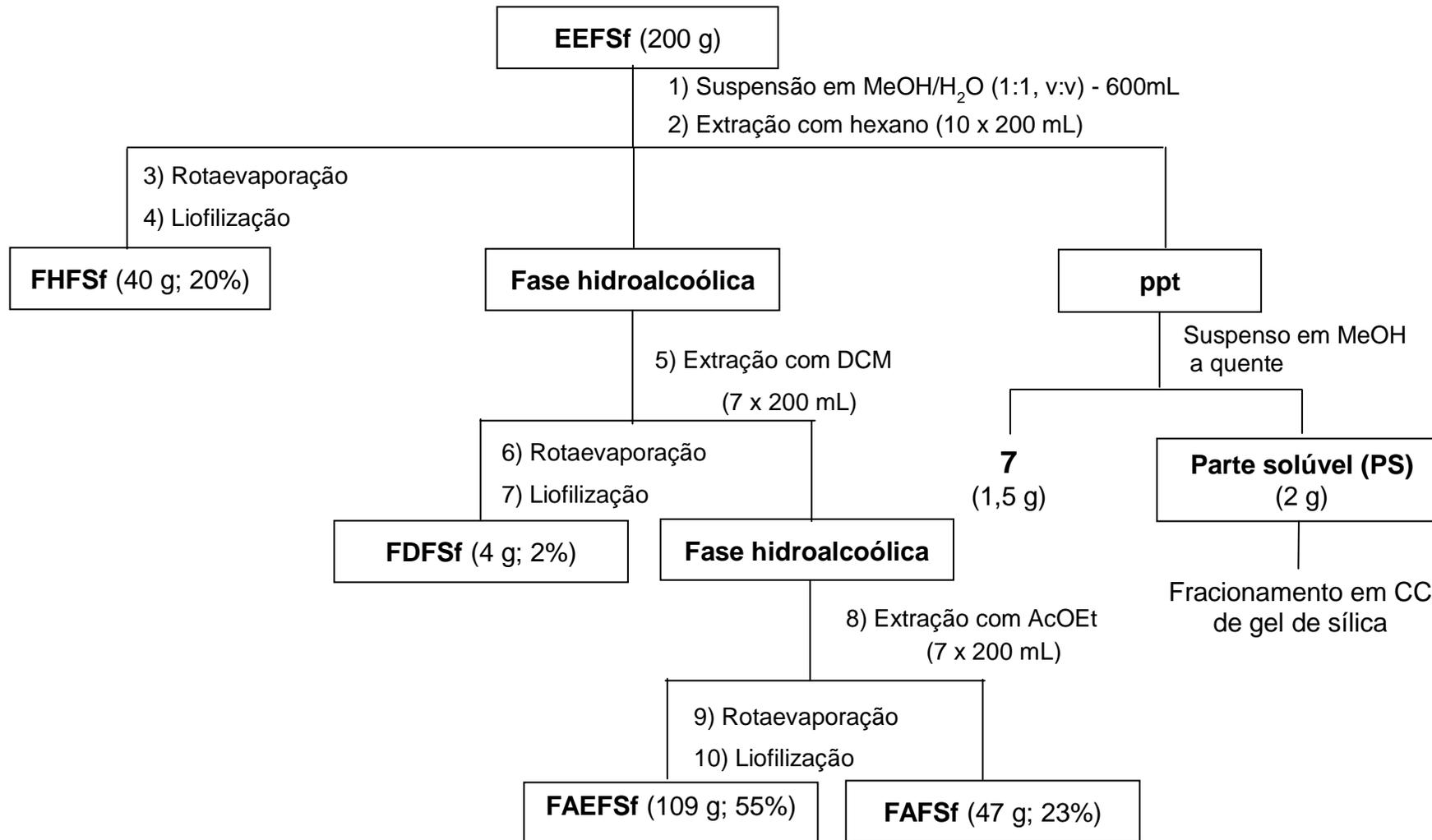
4.6 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) dos extratos e frações

Os extratos e frações de *S. ferruginea* foram dissolvidos em CHCl₃ e MeOH (30 mg mL⁻¹) e analisados por CCDC. Alíquotas de 2 µL das soluções foram aplicadas nas placas cromatográficas e as substâncias eluídas em hexano/AcOEt (8:2), clorofórmio/metanol (9:1) e clorofórmio/metanol/água (65:30:5). A revelação das cromatoplasmas foi feita utilizando solução de sulfato cérico.

4.7 Perfis dos extratos e frações obtidos por espectroscopia de absorção molecular

Para análise por espectrofotometria na região do UV-Vis foram preparadas soluções estoque em metanol de cada extrato e fração, na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e solução metanólica de β -caroteno ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os espectros para todas as amostras foram obtidos por varredura na faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm, usando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico.

Esquema 1 - Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* (EEFSf)



4.8 Fracionamento cromatográfico da PS

A parte solúvel (PS, 2 g) em MeOH, obtida da suspensão do precipitado formado na partição do extrato etanólico das folhas (EEFSf) (Esquema 2) foi submetida a fracionamento em coluna de gel de sílica (2,5 cm x 45 cm, 80 g), eluída com a mistura dos solventes clorofórmio e metanol em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 95 frações de 100 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotativo, analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas em 15 grupos (Tabela 2), de acordo com a cor e o fator de retenção (R_f). As cromatoplasmas contendo as frações do grupo PS-46 apresentaram manchas amarelas, características de flavonoides, enquanto que para as frações do grupo PS-57 apareceram manchas roxas e marrons, típicas de isoprenoides, sendo então purificados em coluna de Sephadex LH-20.

Tabela 2 - Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da parte solúvel (PS) proveniente da extração líquido-líquido do EEFSf

Grupo	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)
PS-1	1-3	CHCl ₃	8,6
PS-4	4	CHCl ₃	13,6
PS-5	5-8	CHCl ₃	8,3
PS-9	9-11	CHCl ₃ /MeOH (98:2)	7,9
PS-12	12-13	CHCl ₃ /MeOH (98:2)	9,1
PS-14	14-30	CHCl ₃ /MeOH (95:5)	59,1
PS-31	31-42	CHCl ₃ /MeOH (9:1)	73,9
PS-43	43-45	CHCl ₃ /MeOH (9:1)	20,4
PS-46	46-54	CHCl ₃ /MeOH (9:1)	102,8
PS-55	55-56	CHCl ₃ /MeOH (8:2)	57,3
PS-57	57-67	CHCl ₃ /MeOH (8:2)	460,7
PS-68	68-69	CHCl ₃ /MeOH (7:3)	119,1
PS-70	70-75	CHCl ₃ /MeOH (6:4)	266,2
PS-76	76-88	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	448,9
PS-89	89-95	MeOH 100%	263,3
			Total: 1,92 g

4.8.1 Fracionamento do grupo PS-46

O grupo PS-46 (46-52; 102,8 mg) ao ser analisado por CCD usando CHCl₃/MeOH (7:3) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou mancha de coloração amarelada. O grupo PS-46 foi então submetido a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída com MeOH (100%), fornecendo 40 frações, que foram reunidas em 8 subgrupos (Tabela 3, Esquema 2).

Tabela 3 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo PS-46

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
PS-46-1	1-7	5,4
PS-46-8	8-10	8,5
PS-46-11	11-13	12,5
PS-46-14	14-19	7,9
PS-46-20	20	1,9
PS-46-21	21-25	50,0
PS-46-26	26-33	1,8
PS-46-34	34-40	13,1
		Total= 101,1mg

O subgrupo PS-46-21 (21-25, 50 mg) foi obtido como um sólido amarelo e a cromatoplaça eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) apresentou coloração amarela. A análise de RMN de ^1H e de ^{13}C em comparação com dados da literatura resultou na identificação do composto **5** (Esquema 2).

4.8.2 Fracionamento do grupo PS-57

O grupo PS-57 (57-67; 460,7 mg) apresentou manchas de coloração marron e roxa na cromatoplaça eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:5:1) e revelada com solução de sulfato cérico. Uma alíquota de 150 mg desse grupo foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída com MeOH (100%), fornecendo 30 frações, as quais foram reunidas em 5 subgrupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo PS-57

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
PS-57-1	1-6	3,8
PS-57-7	7-9	12,5
PS-57-10	10-12	55,5
PS-57-13	13-22	26,0
PS-57-23	23-30	50,0
		Total= 147,8 mg

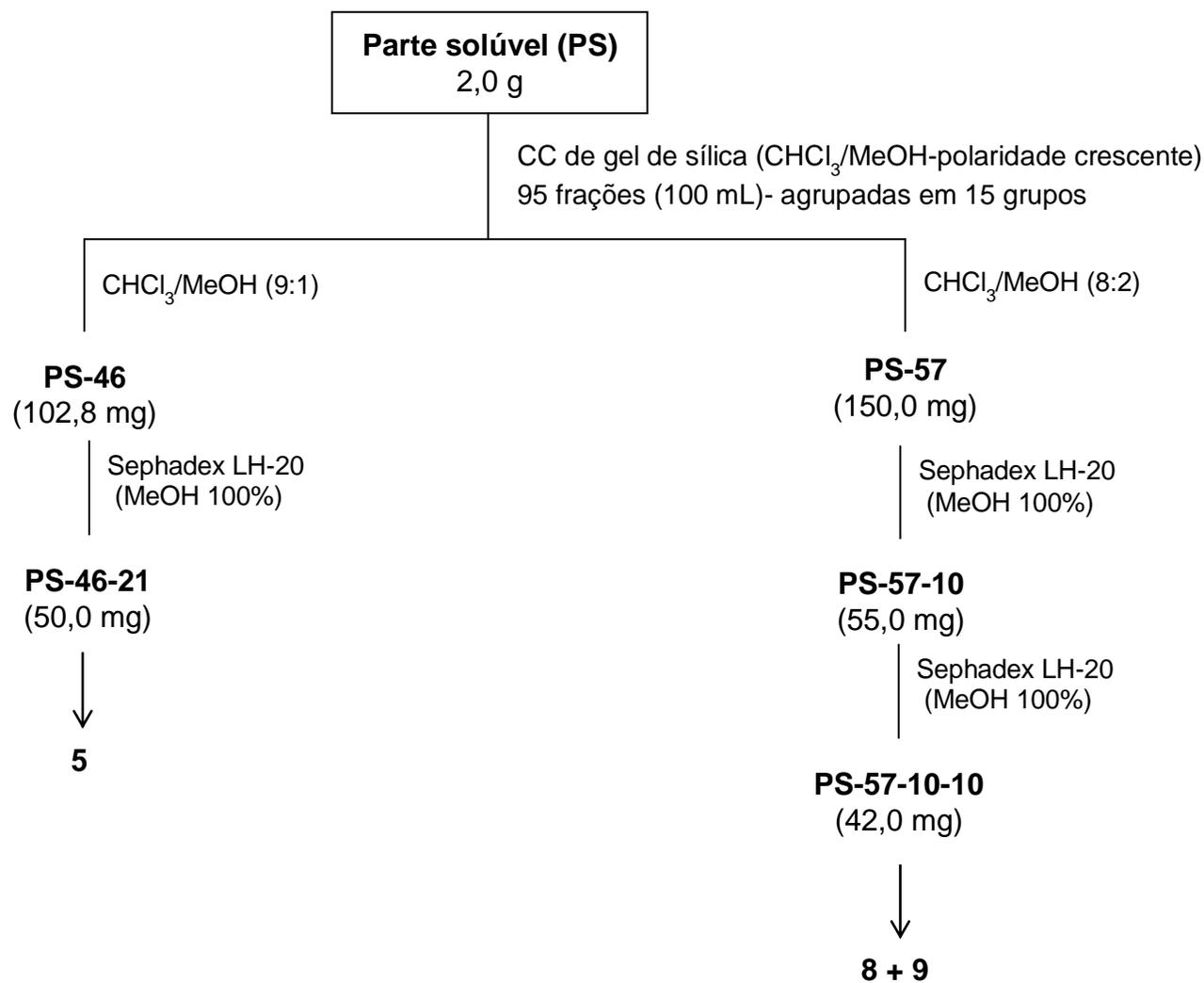
O subgrupo PS-57-10 (10-12, 55 mg) após análise por CCD foi purificado em coluna de Sephadex LH-20, eluída com MeOH (100%) obtendo-se 20 frações que foram reunidas em 3 subgrupos (Tabela 5).

Tabela 5 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do subgrupo PS-57-10

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
PS-57-10-1	1-9	9,5
PS-57-10-10	10-14	42,0
PS-57-10-15	15-20	3,0
		Total= 54,5 mg

O subgrupo PS-57-10-10 (10-14, 42 mg, líquido viscoso) foi analisado por RMN de ^1H e ^{13}C , que em comparação com dados da literatura resultou na identificação da mistura dos compostos **8** e **9** (Esquema 2).

Esquema 2 - Fluxograma de fracionamento cromatográfico de PS



4.9 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano do extrato etanólico das folhas

A fração diclorometano (3,8 g) proveniente da partição do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* foi fracionada por cromatografia em coluna de gel de sílica (2,5 cm x 45 cm, 116 g) utilizando a mistura de clorofórmio/metanol (v:v) como eluente, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 62 frações de 100 mL. As frações foram concentradas em evaporador rotativo, analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas em 15 grupos (Tabela 6), de acordo com a cor e o fator de retenção (R_f). Os grupos DF7, DF23, DF36, DF44 e DF48 mostraram-se promissores para dar continuidade ao fracionamento, sendo purificados em coluna de Sephadex LH-20 e coluna de gel de sílica.

Tabela 6 - Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (FDFSf)

Grupo	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)
DF1	1-6	CHCl ₃	66,7
DF7	7-9	CHCl ₃	178,0
DF10	10-15	CHCl ₃ /MeOH (98:2)	208,1
DF16	16	CHCl ₃ /MeOH (98:2)	83,7
DF17	17-18	CHCl ₃ /MeOH (98:2)	505,3
DF19	19-22	CHCl ₃ /MeOH (98:2)	322,2
DF23	23-27	CHCl ₃ /MeOH (98:2)	218,0
DF28	28-31	CHCl ₃ /MeOH (95:5)	341,0
DF32	32-35	CHCl ₃ /MeOH (95:5)	158,4
DF36	36-38	CHCl ₃ /MeOH (95:5)	125,0
DF39	39-43	CHCl ₃ /MeOH (9:1)	534,0
DF44	44-47	CHCl ₃ /MeOH (9:1)	165,0
DF48	48-53	CHCl ₃ /MeOH (9:1)	257,0
DF54	54-59	CHCl ₃ /MeOH (8:2)	118,0
DF63	60-62	MeOH (100%)	399,6
			Total = 3,68 g

4.9.1 Fracionamento do grupo DF7

O grupo DF7 (7-9; 178 mg) ao ser analisado por CCDC usando CHCl₃/MeOH (95:5) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador apresentou manchas de coloração roxas. Este grupo de frações foi purificado em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano/CH₂Cl₂ (1:4), fornecendo 35 frações que após análise por CCDC foram reunidas em 8 grupos (Tabela 7; Esquema 3).

Tabela 7 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF7

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF7-1	1-6	62,5
DF7-7	7-10	38,3
DF7-11	11-12	14,5
DF7-13	13-17	19,2
DF7-18	18-21	7,7
DF7-22	22-25	3,1
DF7-26	26-29	3,4
DF7-30	30-35	12,0
		Total= 160,7 mg

A cromatoplaça do subgrupo DF7-11 (11-12; 14,5 mg) eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5) apresentou uma mancha de coloração roxa, sendo, em seguida, filtrada em pipeta Pasteur com gel de sílica, eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em ordem crescente de polaridade, rendendo 10 frações que foram reunidas em três subgrupos. O subgrupo DF7-11-5 (5-7; 4,0 mg) obtido como um sólido branco apresentou coloração roxa na CCDC (Tabela 8, Esquema 3). A análise de RMN ^1H e ^{13}C em comparação com dados da literatura permitiu a identificação do composto **6**.

Tabela 8 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de gel de sílica do subgrupo DF7-11

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF7-11-1	1-4	7,1
DF7-11-5	5-7	4,0
DF7-11-8	8-10	3,1
		Total= 14,2 mg

4.9.2 Fracionamento do grupo DF23

O grupo DF23 (23-27; 218 mg) ao ser analisado por CCD, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou manchas de coloração roxa e rósea. Este grupo foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente diclorometano/acetona (1:4), fornecendo 39 frações, as quais foram reunidas em 7 subgrupos (Tabela 9; Esquema 3).

Tabela 9 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF23

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF23-1	1-5	17,9
DF23-6	6-17	48,5
DF23-18	18-28	24,1
DF23-29	29-34	95,0
DF23-35	35-36	7,5
DF23-37	37-38	5,4
DF23-39	39	19,0
		Total = 217,4 mg

As cromatoplasmas eluídas $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e reveladas com solução de sulfato cérico, contendo os subgrupos DF23-29 (29-34; 95 mg) e DF23-37 (37-38; 7,5 mg), apresentaram manchas de coloração rósea e roxa para DF23-29 e amarela para DF23-37. A análise de DF 23-37 por RMN ^1H e ^{13}C em comparação com dados da literatura permitiu a identificação do composto **2**.

O subgrupo DF23-29 (95 mg) foi submetido a fracionamento em coluna gel de sílica (1,0 x 40 cm, 2,8 g) usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ como eluente, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 24 frações que, após análise por CCDC foram reunidas em cinco subgrupos, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de gel de sílica do subgrupo DF23-29

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF23-29-1	1-8	4,0
DF23-29-16	16-17	3,0
DF23-29-18	18-20	48,0
DF23-29-21	21	8,3
DF23-29-22	22-24	29,0
		Total = 92,3 mg

O subgrupo DF23-29-18 (48 mg) quando analisado por CCD utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) como eluente, apresentou coloração rósea, sendo em seguida, filtrada em pipeta Pasteur com gel de sílica, eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em ordem crescente de polaridade, rendendo 16 frações que foram reunidas em cinco subgrupos após análise por CCDC (Tabela 11 e Esquema 3).

O subgrupo DF23-29-18-8 (24 mg) foi obtido como sólido amorfo e a análise por RMN ^1H e ^{13}C em comparação com dados da literatura permitiu a elucidação estrutural do composto **1**.

Tabela 11 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de gel de sílica do subgrupo DF23-29-18

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF23-29-18-1	1-3	2,0
DF23-29-18-4	4-77	3,0
DF23-29-18-8	8-12	24,0
DF23-29-18-13	13-14	8,4
DF23-29-18-15	15-16	9,6
		Total = 47,0 mg

4.9.3 Fracionamento do grupo DF36

O grupo DF36 (36-38; 125,0 mg) apresentou manchas de coloração amarela, roxa e rósea na cromatoplaça eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85:15) e revelada com solução de sulfato cérico. Este grupo foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída com MeOH (100%), fornecendo 26 frações, as quais foram reunidas em seis subgrupos (Tabela 12).

Tabela 12 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF36

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF36-1	1-3	10,0
DF36-4	5-6	15,4
DF36-7	8-10	70,0
DF36-11	11-23	10,2
DF36-24	24-25	3,6
DF36-26	26	14,8
		Total = 124,0 mg

O subgrupo DF36-24 (24-25; 3,6 mg) foi obtido como um sólido amarelo. Sua análise por CCDC, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador mostrou uma mancha de coloração amarelada (Esquema 3). A análise por de RMN ^1H e ^{13}C e a comparação com dados da literatura revelou que se tratava do composto **4**.

4.9.4 Fracionamento do grupo DF44

O grupo DF44 (44-47; 165 mg) apresentou manchas de coloração amarela, roxa e rósea na cromatoplaça eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85:15) e revelada com solução de sulfato cérico. Este grupo foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída com MeOH (100%), fornecendo 24 frações, as quais foram reunidas em cinco subgrupos (Tabela 13).

Tabela 13 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF44

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF44-1	1-4	38,1
DF44-5	5-7	89,8
DF44-8	8-15	20,5
DF44-16	16-17	6,2
DF44-18	18-24	7,4
		Total = 162,0 mg

O subgrupo DF44-16 (16-17; 6,2 mg) foi obtido como um sólido amarelo. Sua análise por CCDC, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador mostrou uma mancha de coloração amarelada (Esquema 3). A análise por de RMN ^1H e ^{13}C e a comparação com dados da literatura revelou que se tratava do composto **3**.

4.9.5 Fracionamento do grupo DF48

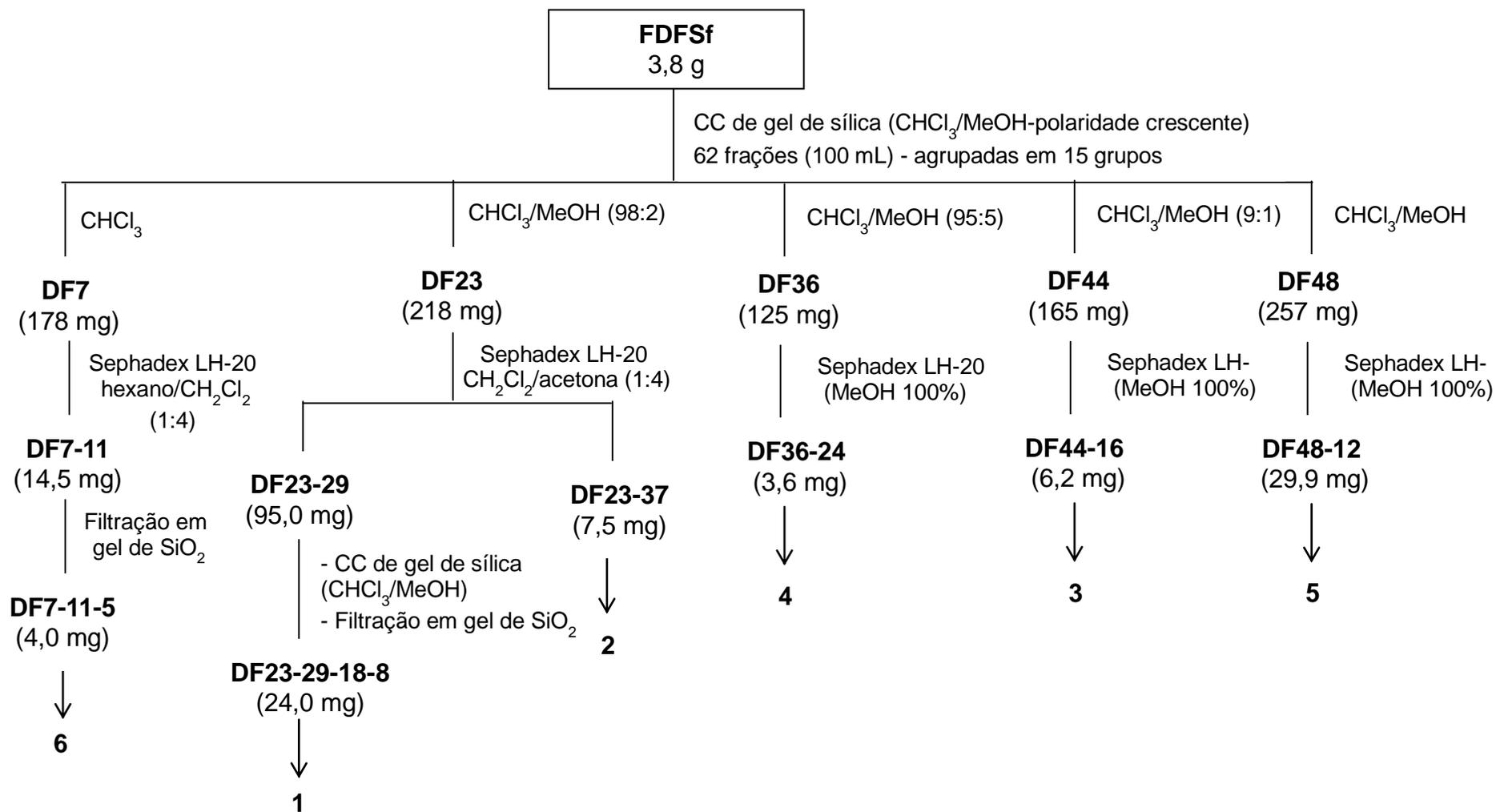
O grupo DF48 (48-53; 257 mg) apresentou manchas de coloração roxa e amarela na cromatoplaça eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3) e revelada com solução de sulfato cérico. Este grupo foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, eluída com MeOH (100%), fornecendo 23 frações, as quais foram reunidas em sete subgrupos (Tabela 14).

Tabela 14 - Agrupamento das frações provenientes do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF48

Subgrupo	Frações recolhidas	Massa (mg)
DF48-1	1-2	55,0
DF48-3	3	16,0
DF48-4	4-7	97,3
DF48-8	8-11	49,4
DF48-12	12-14	29,9
DF48-15	15-17	1,9
DF48-18	18-23	4,0
		Total = 253,5 mg

O subgrupo DF48-12 (12-14; 29,9 mg) foi obtido como um sólido amorfo. A análise por CCDC, usando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador mostrou uma mancha de coloração amarelada. Ao ser comparada com o padrão quercitrina foi verificado que este composto também se tratava do composto **5** (Esquema 3).

Esquema 3 - Obtenção e fracionamento cromatográfico dos grupos DF7, DF23, DF36, DF44 e DF48 procedentes da fração diclorometano (FDFSf) do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*

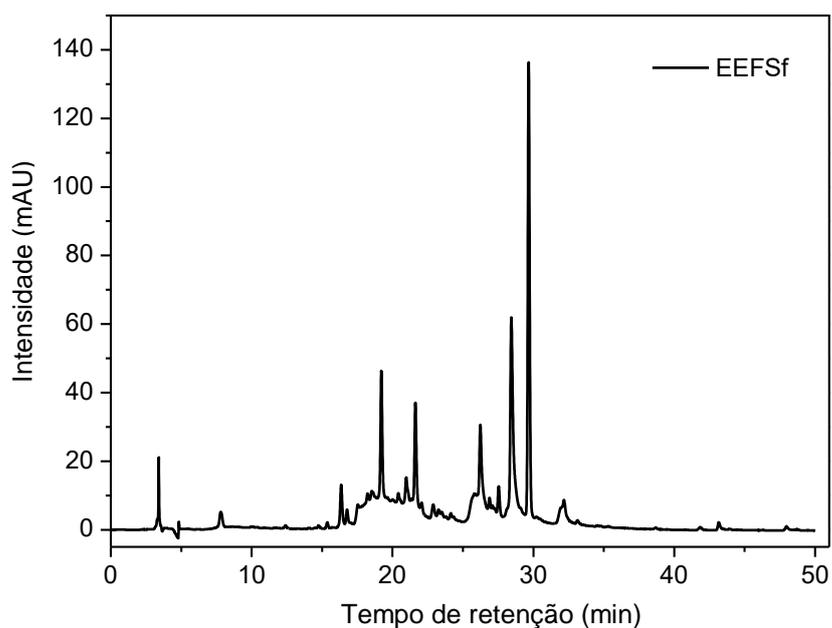


4.10 Desenvolvimento do método para obtenção dos perfis e quantificação de ácido elágico e quercitrina em extratos e frações de *S. ferruginea*

4.10.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

O desenvolvimento do método cromatográfico foi realizado utilizando o extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* ($2,5 \text{ mg mL}^{-1}$), iniciado com o seguinte gradiente exploratório de eluição para fornecer o *fingerprint* (impressão digital) da extrato: 0-50min, 5-100% de B; 50-53min, 100% de B. A fase móvel foi constituída de $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (1%, v/v) (solvente A) e MeOH (solvente B), com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e comprimento de onda de 200 a 450 nm , temperatura do forno da coluna de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. O cromatograma foi obtido no comprimento de onda de 255 nm (Figura 8).

Figura 8 - Cromatograma do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*. $\lambda=255 \text{ nm}$. coluna C-18, fase móvel: MeOH- $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (1%), gradiente exploratório: 0-50min, 5-100% MeOH; 50-53min, 100% MeOH, vazão da fase móvel de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$



A partir do gradiente exploratório inicial e baseado na metodologia de Ferreres et al. (2012), foi testado o gradiente I (Tabela 15), com três fases móveis, conforme mostra a Tabela 16.

Tabela 15 - Condições cromatográficas usadas para análise dos extratos e frações de *S. ferruginea*. MeOH-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 1), MeOH/ACN(1:1)-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 2), ACN-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 3), vazão da fase móvel: 1,0 mL min⁻¹

Gradiente	Condições cromatográficas
I	0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B
II	0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B

B: solvente orgânico MeOH, ACN ou MeOH/ACN; A: H₂O/AcOH (1%)

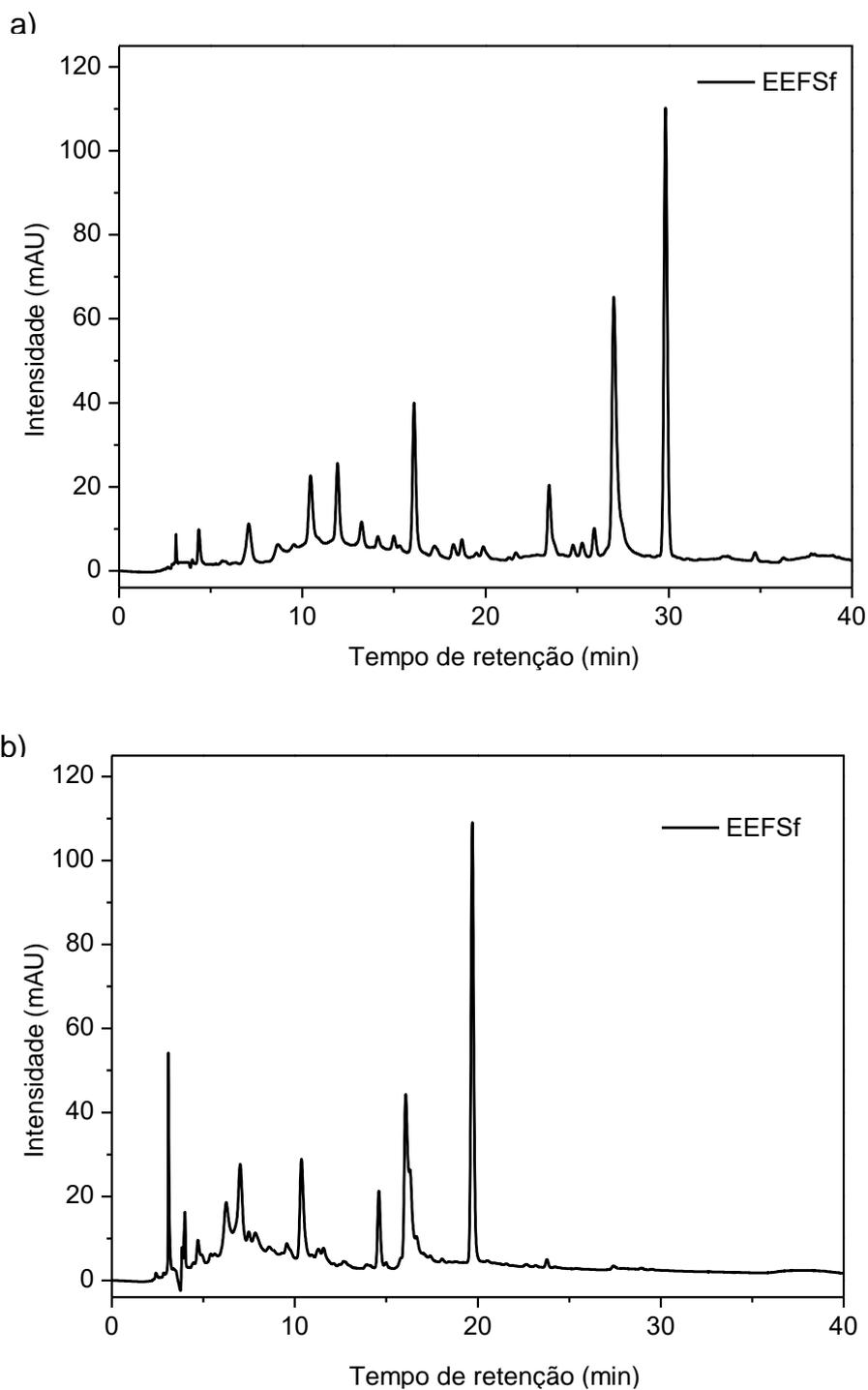
Tabela 16 - Composição das fases móveis utilizadas para obtenção do perfil cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*

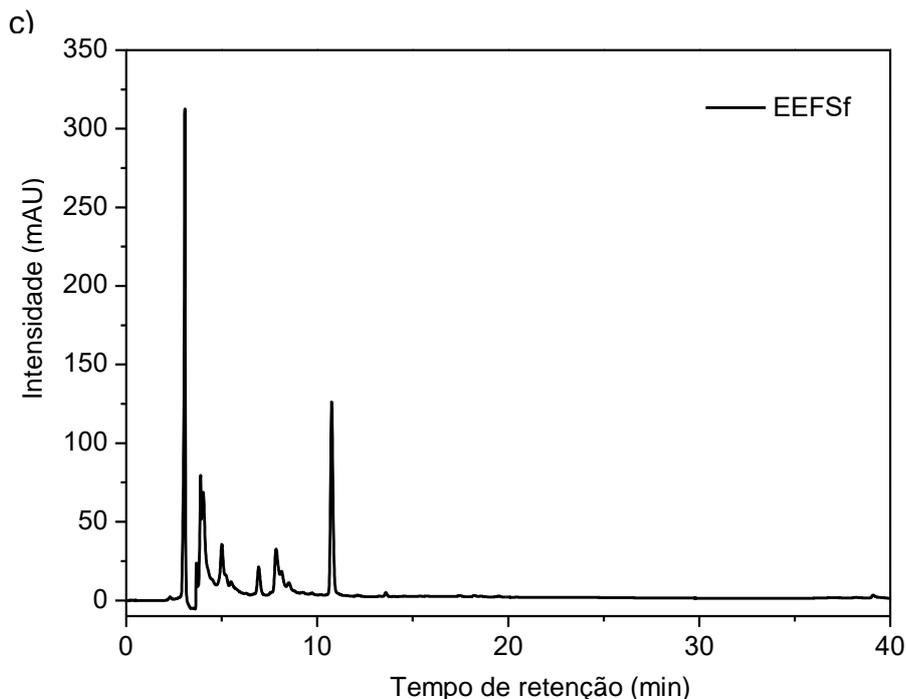
Fase móvel	Solventes da fase móvel	
	A	B
1	H ₂ O/AcOH (1%, v/v)	MeOH
2	H ₂ O/AcOH (1%, v/v)	MeOH/ACN (1:1)
3	H ₂ O/AcOH (1%, v/v)	ACN

AcOH: ácido acético, ACN: acetonitrila

Os cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 255 nm com as três fases móveis são mostrados nas Figuras 9a-9c. O gradiente I (Tabela 15) usando a fase móvel 1 (Tabela 16), apresentou a melhor separação e foi considerado adequado para obtenção dos perfis, conforme a Figura 9a.

Figura 9 - Cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*. $\lambda=255$ nm; coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50% de B; 30-35min, 50-90% de B; 35-40min, 90% de B; 40-45min, 90-20% de B; vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. a) MeOH-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 1), b) MeOH/ACN(1:1)-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 2) e c) ACN-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 3)





4.10.2 Perfis cromatográficos

Os extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e as frações diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) da partição do extrato etanólico das folhas foram analisados por CLAE para obtenção de seus perfis cromatográficos.

As amostras foram submetidas a um pré-tratamento (*clean up*), usando uma alíquota de 10 mg das amostras dissolvida em 2,0 mL da mistura de MeOH/H₂O (1:1) e aplicada em cartucho de extração em fase sólida C-18, ambientado com o mesmo solvente e eluída com 23,0 mL de MeOH/H₂O (1:1). Uma alíquota de 10 µL do eluato foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) utilizando coluna de fase reversa, C-18, modo analítico, vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹. O gradiente I (Tabela 15) da fase móvel 1 (Tabela 16) foi utilizado nesta análise.

4.10.3 Co-injeção com os padrões quercitrina e ácido elágico

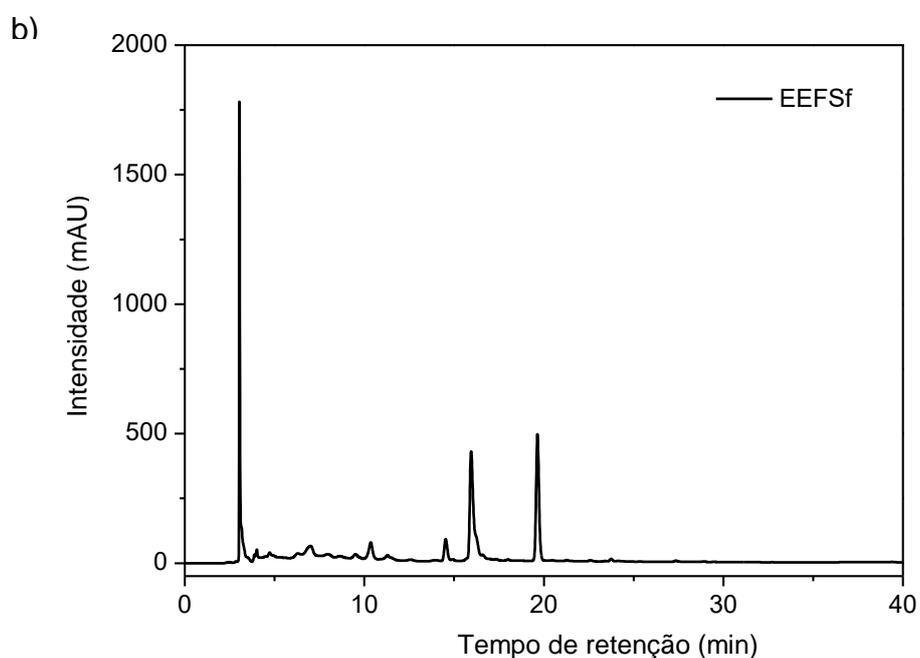
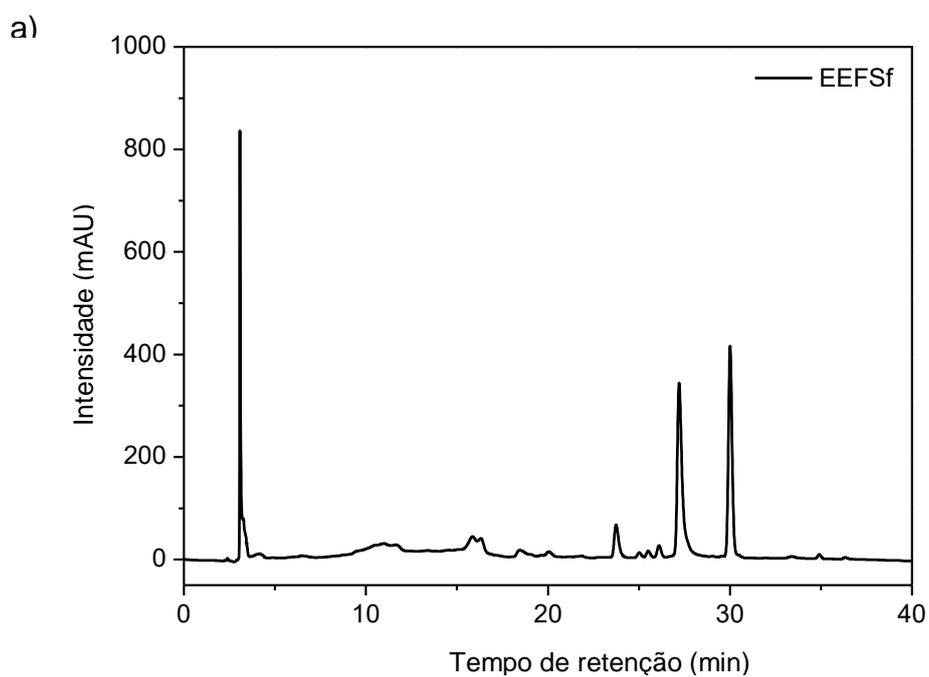
Considerando a presença significativa de quercitrina (5) nas folhas e de ácido elágico (7) nas folhas, galhos e pecíolos de *S. ferruginea*, os padrões quercitrina ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ácido elágico ($90 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram co-injetados com os extratos e frações. Uma alíquota de $200 \mu\text{L}$ de cada padrão foi adicionada separadamente a $1,0 \text{ mL}$ das amostras.

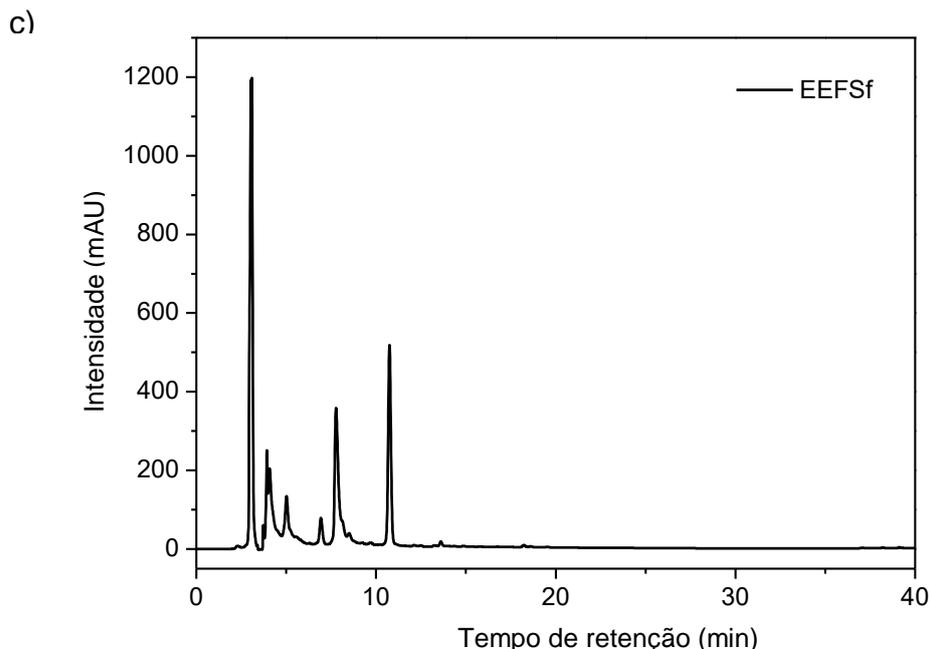
A quercitrina foi co-injetada nas amostras dissolvidas em MeOH/H₂O (1:1), no entanto, como o ácido elágico não é totalmente solúvel neste solvente, foi co-injetado nas amostras dissolvidas em DMSO/MeOH (2:1). Assim, uma alíquota de 10 mg das amostras foi dissolvida em $2,0 \text{ mL}$ da mistura de DMSO/MeOH (2:1) e aplicada em cartucho de extração em fase sólida C-18, ambientado com o mesmo solvente e eluída com $23,0 \text{ mL}$ de DMSO/MeOH (2:1). Em seguida, o eluato foi concentrado para o volume de $5,0 \text{ mL}$. Uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ do eluato foi analisada por CLAE-DAD, usando condições descritas no item 4.11.2.

Com o uso de DMSO/MeOH (2:1), fez-se necessário averiguar o seu efeito sobre o perfil dos cromatogramas. Para isto, o extrato etanólico das folhas (EEFSf), dissolvido em DMSO/MeOH (2:1) foi novamente injetado sob as condições descritas na Tabela 16. A fase móvel 2 constituída de H₂O/AcOH (1%, v/v) (solvente A) e MeOH/ACN (1:1) (solvente B) forneceu a melhor resolução, menor custo benefício e tempo (Figura 10b).

Além disso, para a co-injeção das amostras com o ácido elágico, o gradiente I de eluição foi otimizado para reduzir o tempo de análise, obtendo-se assim o gradiente II (Tabela 15). Os cromatogramas obtidos para o EEFSf eluídos com as três fases móveis (Tabela 16), no comprimento de onda de 255 nm são apresentados nas Figuras 10a-10c.

Figura 10 - Cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*. $\lambda=255$ nm; coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B; 30-32min, 50% de B; 32-37min, 50-20% de B; 37-40min, 20% de B; vazão de 1,0 mL min⁻¹. a) MeOH-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 1), b) MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 2) e c) ACN-H₂O/AcOH (1%) (Fase móvel 3)





4.11 Quantificação de quercitrina e ácido elágico em extratos e frações de *S. ferruginea*

4.11.1 Condições cromatográficas

A quantificação de quercitrina nos extratos e frações de *S. ferruginea* foi realizada utilizando o gradiente I de H₂O/AcOH (1%) (Solvente A) e MeOH (Solvente B) e para a quantificação de ácido elágico, utilizou-se o gradiente II de H₂O/AcOH (1%) (Solvente A) e MeOH/ACN(1:1) apresentados nas Tabelas 14 e 15. A temperatura do forno foi de 40 °C, vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção foi de 10 µL para a quercitrina e 20 µL para o ácido elágico.

A seleção dos comprimentos de onda para quantificação dos compostos fenólicos quercitrina e ácido elágico foi realizada por monitoramento da faixa de comprimento de onda de 200 a 450 nm a partir da injeção dos padrões autênticos de quercitrina e ácido elágico. Os espectros UV-Vis fornecidos pelo detector de arranjo de diodo indicaram os máximos de absorção de 255 e 350 nm para a quercitrina e 253 e 366 nm para o ácido elágico. Diante disso, as curvas analíticas foram construídas a partir da área das bandas da quercitrina e ácido elágico, nos comprimentos de onda de 255 nm e 253 nm, respectivamente.

4.11.2 Preparação das amostras para quantificação

O preparo dos extratos e frações de *S. ferruginea* foi adaptado da metodologia empregada por Pereira et al. (2004). Para a quantificação da quercitrina, alíquotas de 10 mg dos extratos e frações foram inicialmente solubilizadas em 2,0 mL de MeOH/H₂O (1:1), utilizando-se banho ultrassônico por 3min para melhor dissolução. Em seguida, as soluções das amostras foram filtradas em algodão e o filtrado foi aplicado em cartucho de extração de fase sólida (1,0 x 3,5 cm-Strata-Phenomenex, C18-E), previamente condicionado com 5,0 mL de MeOH e posteriormente 5,0 mL de H₂O. As amostras foram eluídas com 23,0 mL de MeOH/H₂O (1:1) e, posteriormente, o eluato foi filtrado em disco filtrante com poros de 0,45 µm e seu volume ajustado para 25 mL.

A preparação das amostras para a quantificação do ácido elágico foi feita de forma semelhante como descrito para quercitrina, no entanto, os extratos e frações foram solubilizados e eluídos com DMSO/MeOH (2:1), devido a pouca solubilidade do ácido elágico em MeOH/H₂O (1:1). O cartucho foi condicionado com 5,0 mL de MeOH e posteriormente 5,0 mL de DMSO. Após concentração em evaporador rotativo, o eluato teve seu volume ajustado para 5,0 mL de DMSO/MeOH (2:1), para todas as amostras, exceto, para a fração diclorometano das folhas (FDFSf) que foi necessário realizar uma diluição posterior para o volume de 25 mL. Em seguida, os eluatos foram filtrados em disco filtrante com poros de 0,45 µm. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e analisadas por CLAE-DAD.

4.11.3 Parâmetros avaliados na quantificação de quercitrina e ácido elágico

A quantificação da quercitrina e ácido elágico foi realizada nos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf) e folhas (EEFSf), e frações diclorometano (FDFSf) e acetado de etila (FAEFSf) das folhas de *S. ferruginea*. Estes compostos não foram detectados na fração aquosa do EEFSF. Os parâmetros utilizados no desenvolvimento do método foram: seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação. Estes parâmetros foram avaliados conforme as recomendações da regulamentação RE nº 899/2003, estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

4.11.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas dos extratos e frações de *S. ferruginea* com os dos padrões de referência quercitrina e ácido elágico. Os índices de similaridade foram calculados pelo *software LabSolution* a partir da sobreposição dos espectros na região do UV-Vis dos padrões de referência com os espectros de compostos correspondentes a bandas nos cromatogramas dos extratos e frações (KERKHOFF et al., 2016).

4.11.3.2 Linearidade

O método de padronização externa foi utilizado para obtenção das curvas analíticas na forma $y=ax+b$, onde y é área do pico e x é a concentração do padrão em $\mu\text{g mL}^{-1}$. O padrão de referência quercitrina (Q) foi dissolvido em MeOH/H₂O (1:1) e filtrado em disco filtrante, com poros de 0,45 μm , obtendo-se solução estoque de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e, a partir desta, foram preparadas soluções em triplicata, nas concentrações de 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 e 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O padrão ácido elágico (AE) foi dissolvido em DMSO/MeOH (2:1) e filtrado em disco filtrante obtendo-se solução estoque de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e, a partir desta, foram preparadas soluções em triplicata, nas concentrações de 20, 30, 45, 60, 75 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de correlação (r) obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas construídas com os padrões de referências (ANVISA, 2003). O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para verificar o ajuste do modelo linear.

4.11.3.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir dos parâmetros da curva analítica por meio das Equações 1 e 2, respectivamente, onde s é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação da curva analítica (ANVISA, 2003).

$$LD = \frac{(s \times 3,3)}{S}$$

Equação 1

$$LQ = \frac{(s \times 10)}{S}$$

Equação 2

4.12 Avaliação do potencial biológico dos extratos e frações de *S. ferruginea*

4.12.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) dos extratos etanólicos das folhas (EEFSf), pecíolos (EEPSf) e galhos (EEGSf); e frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) do EEFSf foi determinada pelo método espectrofotométrico baseado no sequestro do radical livre DPPH (SOUSA et al., 2007).

Soluções estoques dos extratos e frações ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas dissolvendo 12,5 mg das amostras em 10 mL de MeOH e, posteriormente, diluídas para as concentrações de 200, 150, 100, 50 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução estoque de DPPH também foi preparada em MeOH, com concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL de solução das amostras com 2,7 mL da solução de DPPH) foram realizadas em triplicata, a 516 nm, no 1º, 5º e 10º minuto de análise, a cada 10min até 30min de reação. A mistura de 2,7 mL de metanol e 0,3 mL da solução das amostras foi utilizada como branco. A rotina foi utilizada como controle positivo e avaliada nas mesmas concentrações.

A determinação da concentração de DPPH das amostras foi realizada pela equação da curva analítica $A = 33,227c + 1,0607$, construída com o DPPH, onde "A" é a absorvância no comprimento de onda de 516 nm e "c" é a concentração do DPPH. O coeficiente de correlação linear (r) da curva foi de 0,9997.

Os percentuais de atividade antioxidante (%AA) e DPPH remanescente ou residual (%DPPHrem) das amostras foram determinado a partir dos valores de absorvâncias nas diferentes concentrações testadas, no tempo de 30min. A %AA foi obtida, utilizando a Equação 3:

$$\%AA = \frac{Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, Abs_{DPPH} , é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH; $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra) e Abs_{branco} é a absorvância do branco (MeOH + amostra).

O percentual de DPPH remanescente ou residual (%DPPHrem) foi determinado conforme a Equação 4:

$$\%DPPH_{rem} = \frac{(DPPH)_{t=30}}{(DPPH)_{t=0}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde, $(DPPH)_{t=30}$ é a absorvância da mistura reacional de DPPH e amostra após 30min de reação, e $(DPPH)_{t=0}$ é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH.

A concentração eficiente (CE_{50}) das amostras foi determinada a partir da curva exponencial de primeira ordem do %DPPHrem *versus* as concentrações das amostras. A CE_{50} é a concentração da amostra capaz de reduzir em 50% a concentração do radical livre DPPH (SOUSA et al., 2007).

4.12.2 Determinação do teor de Fenóis Totais (FT)

O teor de fenóis totais dos extratos e frações de *S. ferruginea* foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu como descrito por Sousa et al. (2007).

Soluções metanólicas das amostras foram preparadas na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Uma alíquota de $100 \text{ }\mu\text{L}$ dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e adicionados $500 \text{ }\mu\text{L}$ do reagente Folin-Ciocalteu, $5,0 \text{ mL}$ de água destilada e agitou-se por um minuto. Em seguida, adicionou-se $2,0 \text{ mL}$ da solução aquosa de carbonato de sódio 15% (m/v), com posterior agitação por 30 segundos. O volume foi completado com água destilada.

Após duas horas de reação, fez-se a leitura da absorvância das amostras em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 750 nm . Para o branco realizou-se o mesmo procedimento, no entanto, utilizou-se $100 \text{ }\mu\text{L}$ de metanol em vez da solução da amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

A determinação do teor de fenóis totais foi feita por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva analítica construída com padrão ácido gálico ($10 \text{ a } 350 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e expressa por: $A = 0,1185c - 0,0453$, onde "A" é a absorvância e "c" é a concentração, com coeficiente de correlação linear igual a 0,999. O teor de FT foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g^{-1} de amostra).

4.12.3 Determinação do teor de Flavonoides Totais (FLAT)

O teor de flavonoides totais (FLAT) dos extratos e frações de *S. ferruginea* foi determinado pelo método colorimétrico baseado na reação de complexação com cloreto de alumínio (FERREIRA et al., 2014).

Soluções metanólicas de cloreto de alumínio ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), piridina (20% v/v) e das amostras ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas. Uma alíquota de $300 \mu\text{L}$ da solução dos extratos e frações foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e adicionados $240 \mu\text{L}$ de ácido acético glacial, 4,0 mL de solução de piridina e 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio. O volume foi completado com água destilada.

Após trinta minutos de reação, fez-se a leitura da absorvância das amostras em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 420 nm. Para o branco realizou-se o mesmo procedimento, no entanto, utilizou-se $300 \mu\text{L}$ de metanol em vez da solução da amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

A determinação do teor de flavonoides totais foi feita por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva analítica construída com o padrão rutina nas concentrações de 3,0 a $21 \mu\text{g mL}^{-1}$ e expressa por: $A = 0,02618c - 0,00717$, onde "A" é a absorvância e "c" é a concentração, com coeficiente de correlação linear igual a 0,999. O teor de FLAT foi expresso em miligramas de equivalente de rutina por grama de amostra (mg ER g^{-1} de amostra).

4.12.4 Atividade fotoprotetora

A atividade fotoprotetora *in vitro* dos extratos etanólicos das folhas, pecíolos e galhos de *S. ferruginea* foi avaliada por espectrofotometria na região do UV- Vis. Soluções etanólicas dos extratos foram preparadas nas concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg mL^{-1} . A varredura espectrofotométrica das amostras foi realizada na faixa de comprimento de onda entre 200 e 450 nm, com intervalos de 5 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. As análises foram realizadas em triplicata (OLIVEIRA et al., 2013; SAYRE et al., 1979).

Os cálculos para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) foram realizados de acordo com os intervalos de comprimento de onda apresentados na Tabela 17 e pela substituição das absorvâncias encontradas na Equação 5.

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda) \quad \text{Equação 5}$$

Onde: EE (λ) = espectro do efeito eritemal; I (λ) = espectro de intensidade solar; Abs (λ) = absorvância do produto da proteção solar; FC = fator de correção que é igual a 10.

Tabela 17 - Função normalizada do produto utilizado no cálculo do FPS

Comprimento de onda (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

Fonte: Adaptada de SAYRE et al., 1979.

4.12.5 Atividade anticolinesterásica

A análise qualitativa de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) dos extratos e frações de *S. ferruginea* foi realizada de acordo com o método de Ellman et al. (1961) modificado por Rhee et al. (2001). Soluções das amostras e do controle positivo cafeína foram preparadas em metanol, na concentração de 10,0 mg mL⁻¹. Alíquotas de 1,5-2,5 μ L de cada amostra foram aplicadas em placa cromatográfica de gel de sílica, eluída em CHCl₃/MeOH (9:1). Após a eluição da placa, a atividade inibitória foi avaliada utilizando o revelador baseado no método de Ellman et al. (1961).

A placa foi pulverizada com 1 mM DTNB [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)] e 1 mM ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) em tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 8) até a

saturação do reagente. Depois de seca (após 3-5min) a placa foi pulverizada com a enzima AchE (5 units/ mL) em solução tampão. O teste de inibição da enzima acetilcolinesterase é considerado positivo se houver a presença de manchas brancas sob fundo amarelo na cromatoplaça após o período de cinco minutos. A cafeína foi utilizada como controle positivo. Estas atividades foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais e Neuroquímica Experimental (LAPNNEX-UFPI) sob a supervisão do Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa.

4.12.6 Atividade larvicida

A atividade larvicida foi avaliada nos extratos etanólicos das folhas, pecíolos e galhos de *S. ferruginea*. Alíquotas de 1, 2, 5 e 10 mg dessas amostras foram dissolvidos em 0,3 mL de dimetilsulfóxido e transferidas para béqueres de 50 mL. Posteriormente, foram adicionadas 50 larvas de *Aedes aegypti* no terceiro estágio larval com 19,7 mL de água. Após 24 horas de exposição nas soluções, foi feita a contagem de larvas mortas e calculada a CL₅₀ (concentração letal para 50% das larvas). O mesmo procedimento foi realizado com o branco (água e DMSO). A análise foi feita em triplicata (FURTADO, 2005; OLIVEIRA et al., 2002). Este ensaio foi realizado no Departamento de Farmácia-UFC, sob a supervisão do Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

4.12.7 Citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais

A atividade citotóxica *in vitro* dos extratos etanólicos das folhas, pecíolos e galhos de *S. ferruginea* foi avaliada pelo método MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] frente a três linhagens de células tumorais HCT-116 (côlon - humano), PC3 (próstata - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano) cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). Os extratos foram preparados na concentração de 10 µg mL⁻¹.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Em seguida, foram plaqueadas em placas de 96 cavidades na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens PC3 e SF-295, 0,7 x 10⁵ cél/mL para a linhagem HCT-116. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C, e, em seguida, centrifugadas para remoção do

sobrenadante. Adicionou-se 150 μ L da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3h (BURIOL et al., 2009).

A absorvância das amostras foi determinada a 595 nm em espectrofotômetro de placa, após a dissolução do precipitado em 150 μ L de DMSO. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo (BURIOL et al., 2009). Esta análise foi realizada no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental (LOE - UFC) sob a supervisão do Profa. Dra. Claudia Pessoa.

4.13 Análise estatística

Os resultados obtidos na determinação dos teores de fenois e flavonoides totais, atividade antioxidante, quantificação de quercitrina e ácido elágico e atividades fotoprotetora, larvicida e citotóxica foram apresentados como a média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média (DP). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando $p<0,05$, aplicando-se ANOVA e comparações múltiplas pelo teste de *Tukey*.

A construção das curvas analíticas e o tratamento dos dados de quantificação foram feitas usando os *softwares* *LC Solutions* e *Microcal Origin 8.0*. O tratamento dos dados do potencial antioxidante e fotoprotetor foi realizado usando o programa *Microcal Origin 8.0*. Os experimentos de citotoxicidade *in vitro* frente às linhagens de células tumorais humanas foram analisados usando o programa *GraphPad Prism*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil químico dos extratos e frações de *S. ferruginea*

5.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

As placas cromatográficas dos extratos etanólicos das folhas (EEFSf), pecíolos (EEPSf), galhos (EEGSf) e frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) do EEFSf foram eluídas com hexano/acetato de etila (8:2), clorofórmio/metanol (9:1) e clorofórmio/metanol/água (65:30:5) e reveladas com solução de sulfato cérico. Os cromatogramas obtidos são mostrados nas Figuras 11 e 12.

Com base na análise das cromatoplas contendo os extratos etanólicos das folhas, pecíolos e galhos eluídas nos três sistemas de solventes, verificou-se a presença de manchas alaranjadas, roxas e azuis, principalmente com o eluente Hex/AcOEt (8:2). Essas manchas são características de substâncias de natureza isoprênica (terpenoides e esteroides) que apresentam baixa polaridade. Além disso, a cromatoplas eluída com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) apresentou manchas amarelas, evidenciadas principalmente para o extrato etanólico das folhas e podem ser atribuídas a substâncias pertencentes a classe dos flavonoides. Com base nesses resultados, o EEFSf foi considerado o mais promissor para dar continuidade ao fracionamento (Figura 11).

Após a partição do extrato etanólico das folhas, a análise em CCDA das frações permitiu verificar a presença de manchas roxas, alaranjadas e azuis para a fração hexânica quando eluída com Hex/AcOEt (8:2) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), bem como para a fração diclorometano quando eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1), evidenciando que os isoprenoides ficaram concentrados nessas frações (Figura 12). Para a fração acetato de etila foi possível observar manchas amarelas nas cromatoplas eluídas com $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5), indicando que os compostos flavonoidicos estão presentes nessa fração (Figura 12). Além disso, ao revelar as placas com o reagente Dragendorff, houve o aparecimento de manchas alaranjadas para a fração diclorometano, características de compostos pertencentes à classe dos alcaloides. Com base nos perfis cromatográficos a fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* mostrou-se mais favorável a dar prosseguimento ao fracionamento.

Figura 11 - Cromatogramas dos extratos etanólicos de *S. ferruginea*. 1- folhas, 2- pecíolos e 3- galhos

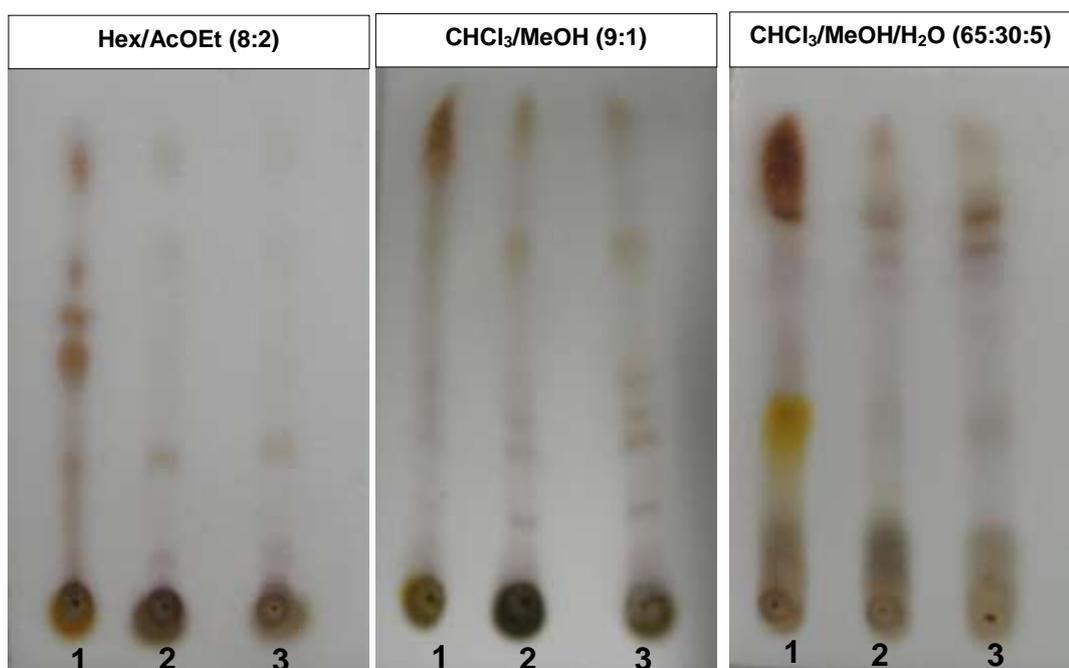
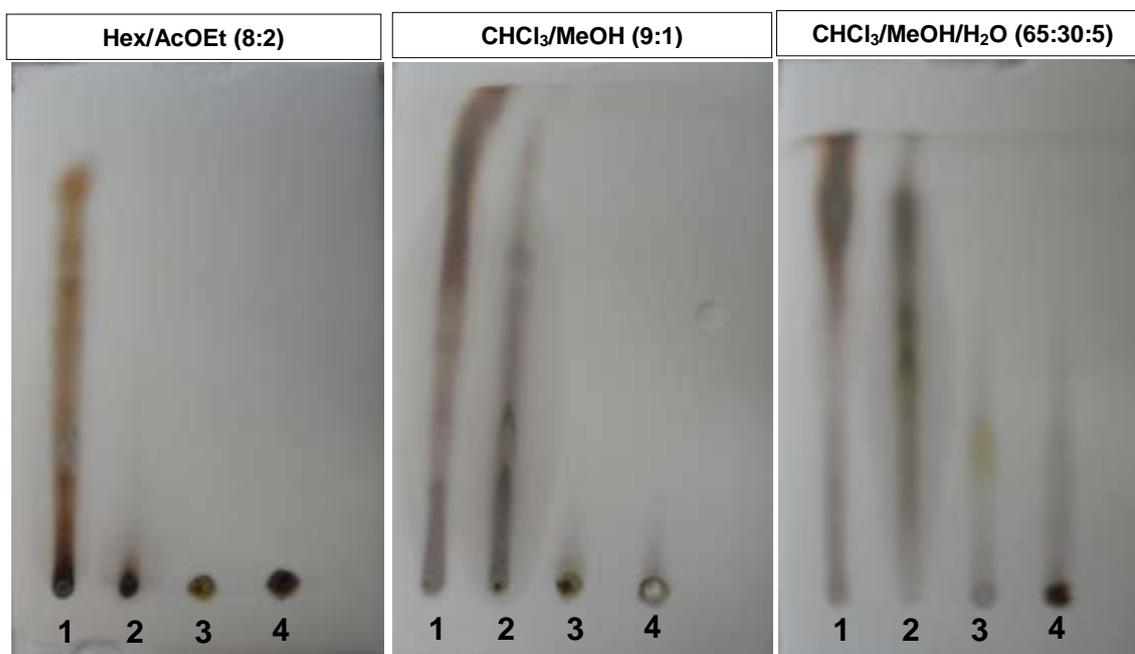


Figura 12 - Cromatogramas das frações de partição do extrato etanólico das folhas *S. ferruginea*. 1- fração hexânica, 2 - fração diclorometano, 3 - fração acetato de etila e 4 - fração aquosa



5.1.2 Espectrofotometria de absorção molecular

Os extratos etanólicos das folhas (EEFSf), galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf) e as frações diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) do EEFSf apresentaram absorções em torno de 255 nm e 360 nm (Figuras 13 e 14), região característica de compostos pertencentes a classes de flavonoides (LANDIM et al., 2013; VECHIA et al., 2016), bem como outros compostos fenólicos, como, por exemplo, o ácido elágico (AMAKURA et al., 2000; BALA et al., 2006).

O extrato etanólico das folhas e as frações hexânicas e diclorometano deste extrato exibiram no espectro de UV-Vis absorções em 410 e 660 nm, que são típicas de clorofila e derivados e, geralmente estão presentes em extratos e frações apolares de folhas (Figuras 13 e 14) (MAESTRIN et al., 2009).

As frações hexânica e diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (Figura 15) apresentaram perfis semelhantes ao do β -caroteno, com absorções entre 400 e 500 nm, sugerindo a presença de carotenoides nessas frações (XAVIER et al., 2012).

Figura 13 - Espectros UV-Vis dos extratos etanólicos das folhas (EEFSf), pecíolos (EEPSf) e galhos (EEGSf) de *S. ferruginea* ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)

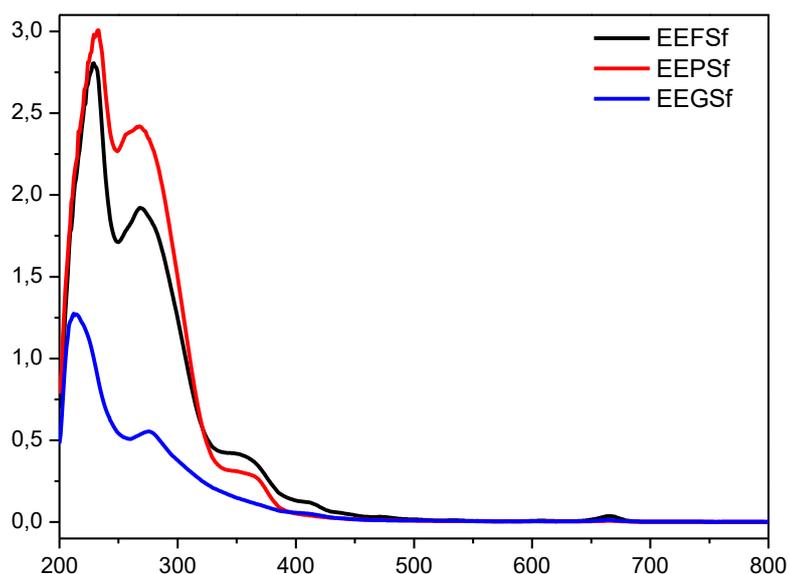


Figura 14 - Espectros UV-Vis do extrato etanólico das folhas (EEFSf) e das frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) de *S. ferruginea* ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)

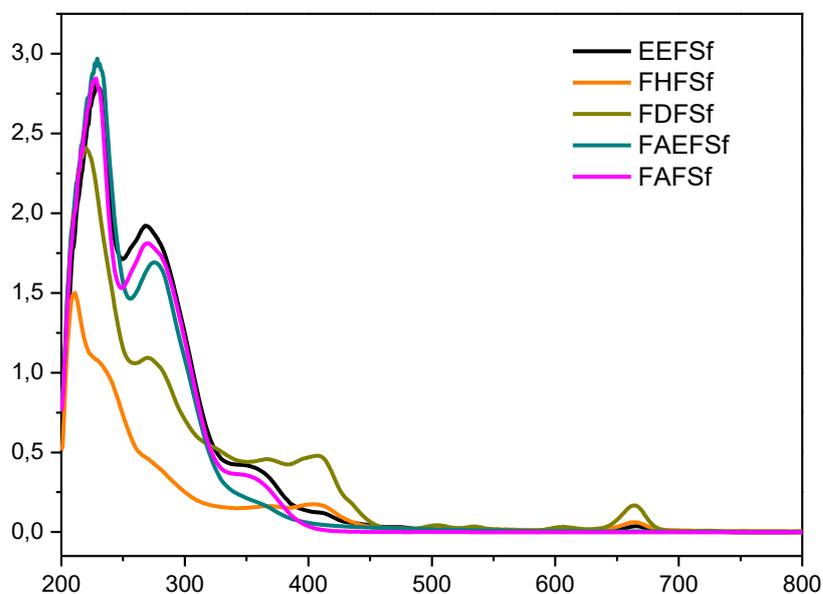
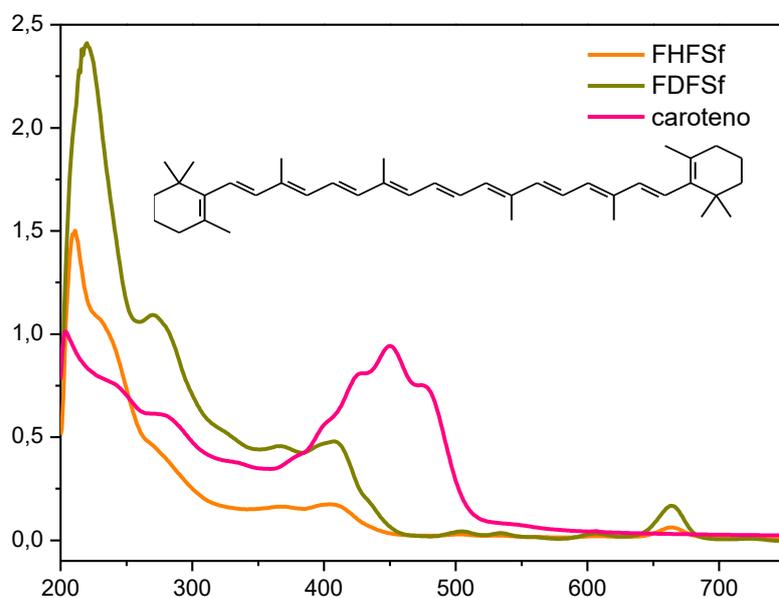


Figura 15 - Espectro UV-Vis das frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf) do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e β -caroteno ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$)



5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

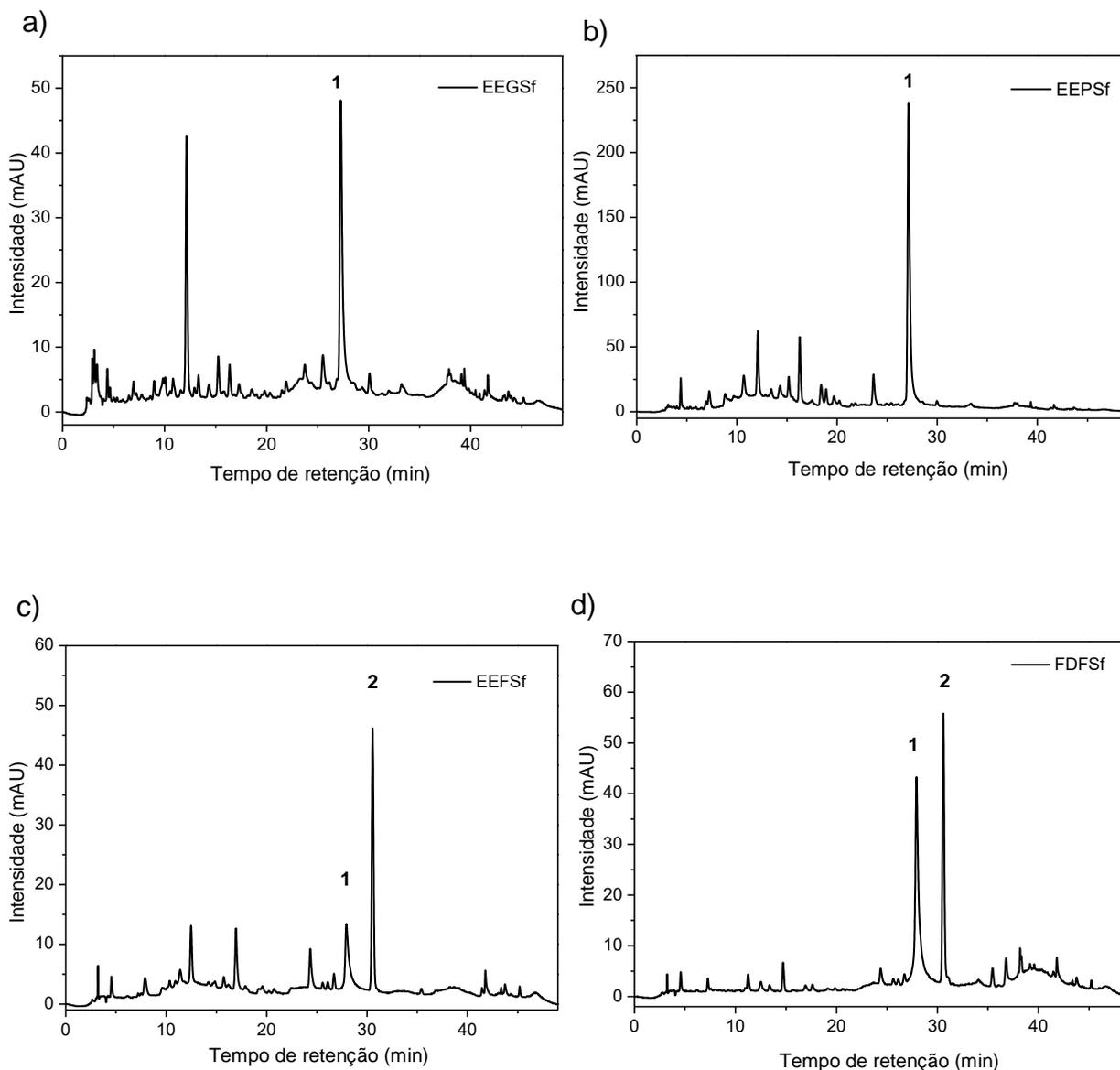
Os cromatogramas dos extratos e frações de *S. ferruginea* apresentados nas Figura 16a-16f foram obtidos por CLAE-DAD, utilizando o gradiente I (Tabela 15) com fase móvel de MeOH-H₂O/AcOH (1%) (Tabela 16).

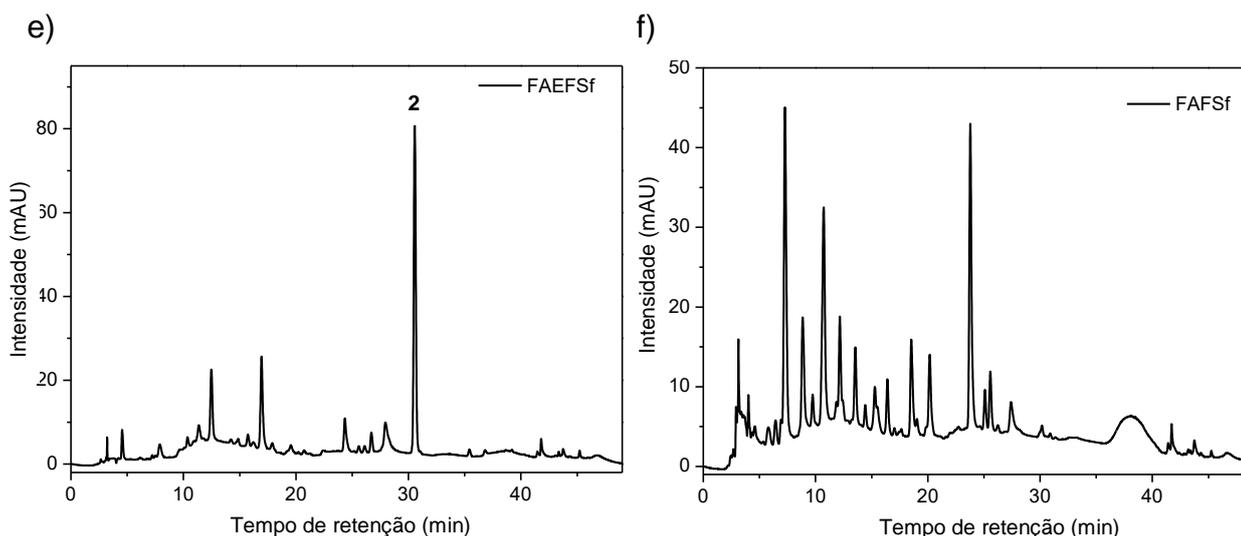
No cromatograma do extrato etanólico dos galhos (Figura 16a) foram observadas duas bandas referentes aos compostos majoritários, com tempos de retenção de 10,5 e 27,0min (banda 1), sendo este último o composto majoritário também no extrato etanólico dos pecíolos (Figura 16b).

Para o extrato etanólico das folhas (Figuras 16c) e fração acetato de etila (Figura 16e), foi observada uma banda mais intensa em 30,5min (banda 2), enquanto que na fração diclorometano das folhas (Figura 16d), as bandas com tempos de retenção 27,0 e 30,5min (bandas 1 e 2) correspondem aos constituintes majoritários desta fração.

O cromatograma da fração aquosa (Figura 16f) apresentou um maior número de bandas, entretanto, para nenhuma delas, o tempo de retenção correspondeu aos compostos majoritários dos extratos e frações diclorometano e acetato de etila.

Figura 16 - Cromatogramas: a) extrato etanólico dos galhos (EEGSf); b) extrato etanólico dos pecíolos (EEPSf); c) extrato etanólico das folhas (EEFSf); d) fração diclorometano (FDFSf); e) fração acetato de etila (FAEFSf); f) fração aquosa (FAFSf) das folhas de *S. ferruginea*. Coluna C-18, Fase Móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, $\lambda=255$ nm





Os compostos ácido elágico e quercitrina foram isolados a partir do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*. Para verificar se as bandas nos tempos de retenção de 27,0min e 30,5min correspondiam a estes compostos, padrões autênticos de ácido elágico e quercitrina foram co-injetadas com os extratos e frações de *S. ferruginea*.

A co-injeção de quercitrina (Q) e ácido elágico (AE) foi realizada somente nas amostras, as quais apresentaram indicativo da presença desses compostos, evidenciado pelos tempos de retenção e absorções no espectro de UV-Vis. Desta forma, a quercitrina foi co-injetada com o extrato etanólico e frações diclorometano e acetato de etila das folhas, enquanto que o ácido elágico foi co-injetado com os extratos etanólicos dos galhos, pecíolos, folhas e fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea*.

Os cromatogramas obtidos para as amostras co-injetadas com a quercitrina foram obtidos utilizando o gradiente I (Tabela 15) com fase móvel de MeOH-H₂O/AcOH (1%), enquanto para as amostras co-injetadas com ácido elágico, utilizou-se o gradiente II (Tabela 15) com fase móvel de MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%). Logo, as bandas nos tempos de retenção 27,0min e 30,5min (Figuras 17-19), correspondem às bandas em 16,0min e 19,5min, respectivamente (Figuras 20-23).

Nos cromatogramas de co-injeção dos padrões de quercitrina (Figuras 17b-19b) e ácido elágico (Figuras 20b-23b) com os extratos e frações de *S. ferruginea*, foi possível observar a intensificação das bandas dos compostos majoritários.

A banda 1 com tempo de retenção de 27,0min (Figuras 17-19) e 16,0min (Figuras 20-23) são correspondentes ao ácido elágico, um dos compostos majoritários dos extratos etanólicos dos pecíolos e galhos, e presentes também no

extrato etanólico e fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea*, enquanto que a banda 2 em $t_R=30,5\text{min}$ (Figuras 17-19) e $19,5\text{min}$ (Figuras 20-23) são referentes ao flavonoide quercitrina, sendo então o constituinte majoritário do extrato etanólico das folhas e frações diclorometano e acetato de etila de *S. ferruginea*.

Figura 17 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* (EEFSf); (b) co-injeção do EEFSf com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão de $1,0\text{ mL min}^{-1}$; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, $\lambda=255\text{ nm}$

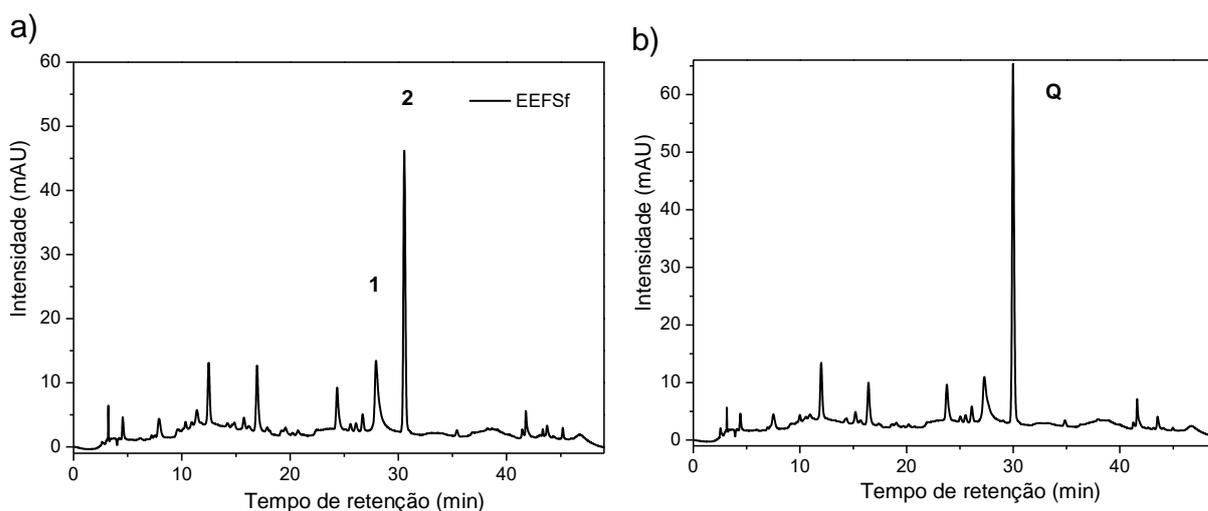


Figura 18 - Cromatogramas: (a) fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (FDFSf); (b) co-injeção da FDFSf com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5$ min). coluna C-18, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, $\lambda=255$ nm

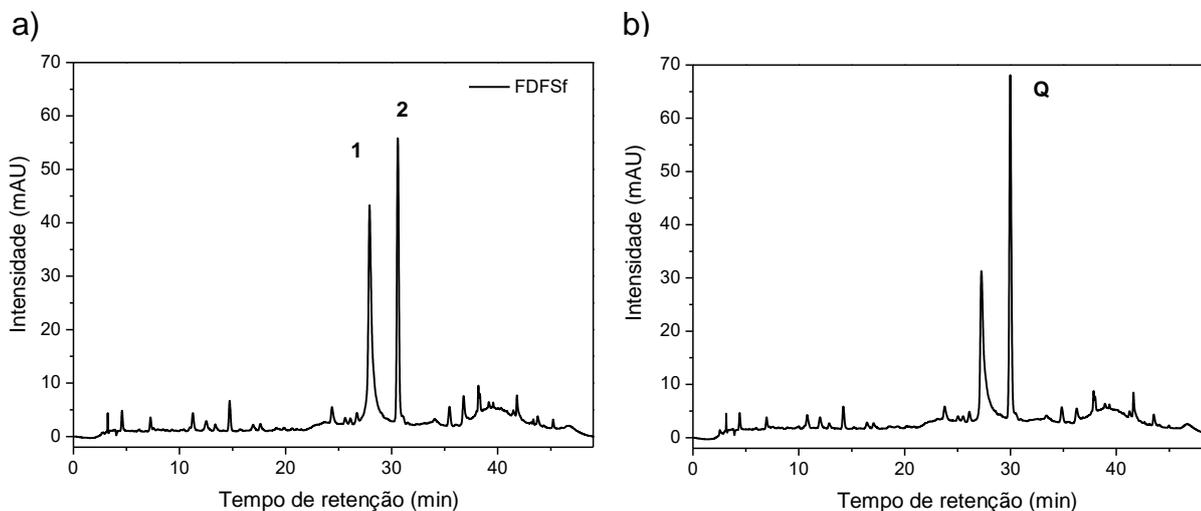


Figura 19 - Cromatogramas: (a) fração acetato de etila das folhas de *S. ferruginea* (FAEFSf); (b) co-injeção da FAEFSf com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5$ min). coluna C-18, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente I: 0-30min, 20-50% B; 30-35min, 50-90% B; 35-40min, 90% B e 40-45min, 90-20% B; 45-49, 20% B, $\lambda=255$ nm

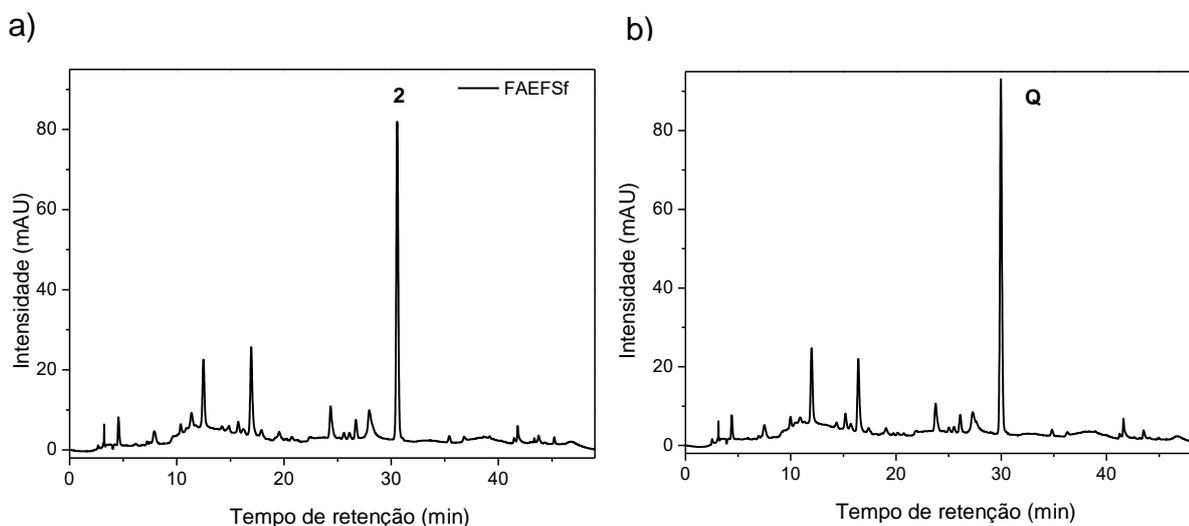


Figura 20 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* (EEFSf); (b) co-injeção do EEFSf com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, $\lambda=253\text{ nm}$

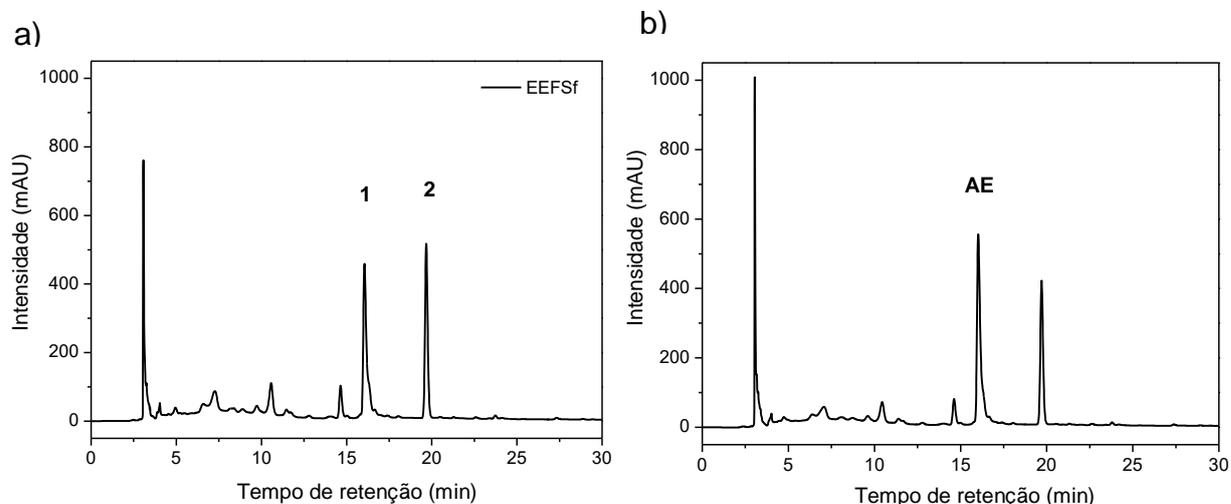


Figura 21 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico dos pecíolos de *S. ferruginea* (EEPSf); (b) co-injeção do EEPSf com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, $\lambda=253\text{ nm}$

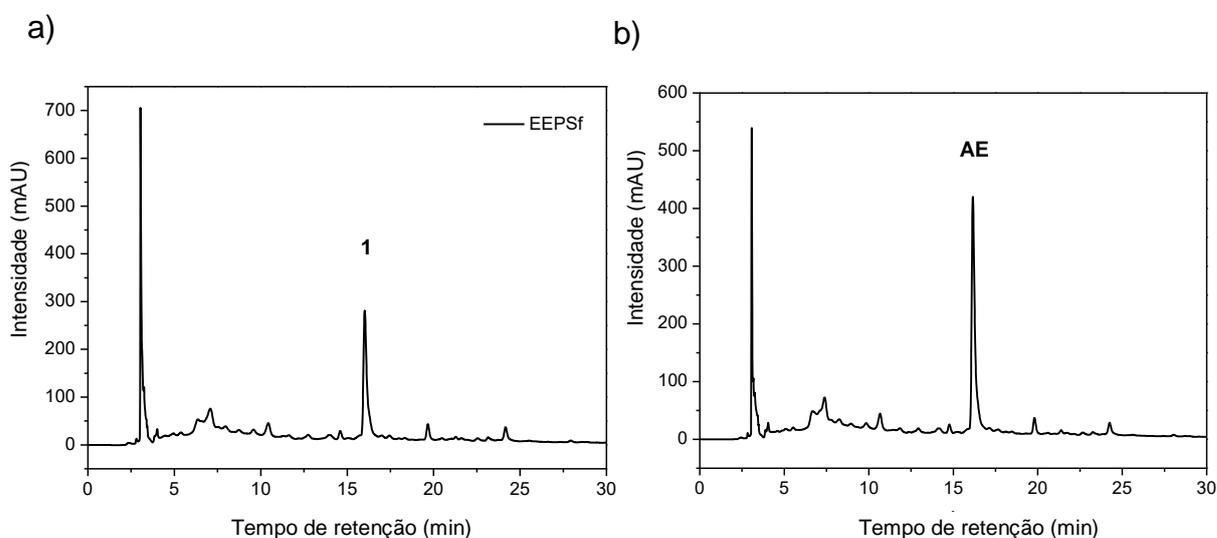


Figura 22 - Cromatogramas: (a) extrato etanólico dos galhos de *S. ferruginea* (EEGSf); (b) co-injeção do EEGSf com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN(1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, $\lambda=253\text{ nm}$

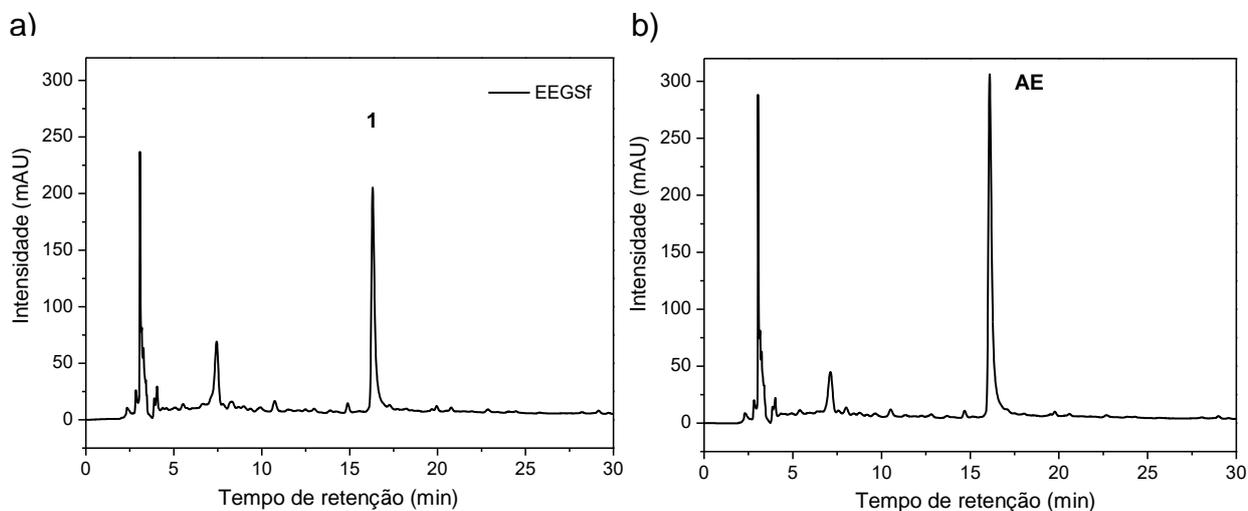
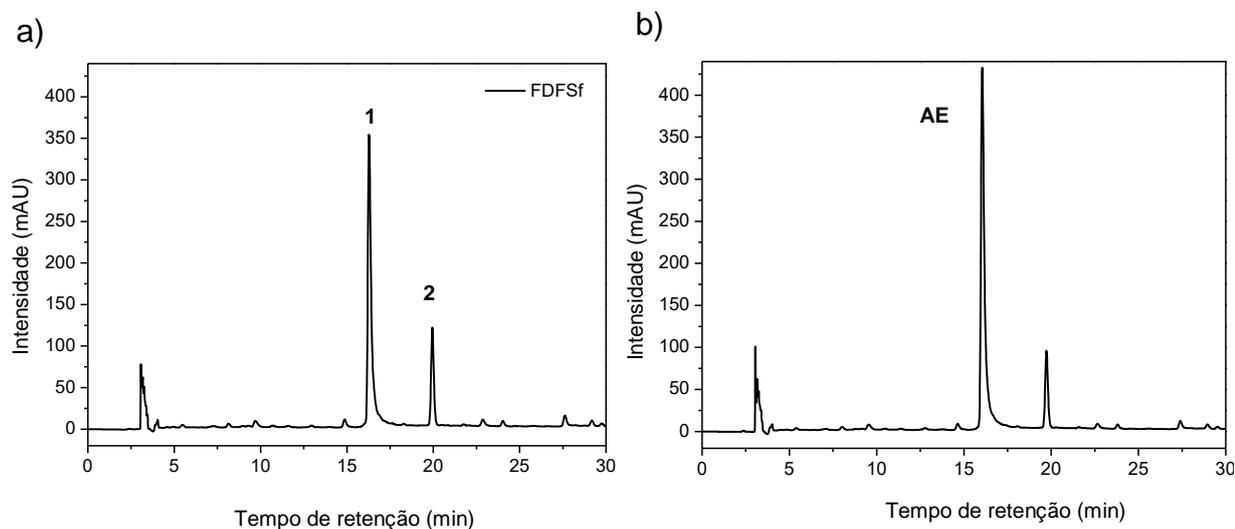
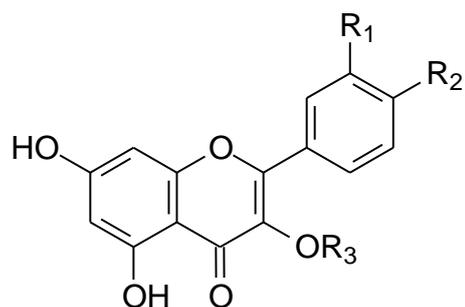
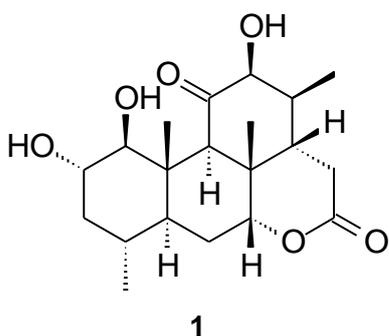


Figura 23 - Cromatogramas: (a) fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (FDFSf); (b) co-injeção da FDFSf com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹; gradiente II: 0-30min, 20-50% B; 30-32min, 50% B; 32-37min, 50-20% B; 37-40min, 20% B, $\lambda=253\text{ nm}$



5.2 Estruturas dos compostos isolados, identificados e/ou elucidados no extrato etanólico das folhas do extrato etanólico de *S. ferruginea*

O fracionamento cromatográfico por técnicas convencionais (Esquemas 1 e 2), seguido de análise das frações por meio de métodos espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura possibilitou identificar e/ou elucidar nove compostos no extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*. As estruturas destes compostos incluem um quassinóide (**1**), canferol (**2**), canferol-3-O- α -L-ramnosídeo (afzelina) (**3**), quercetina (**4**), quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercitrina) (**5**), (+)-siringaresinol (**6**), ácido elágico (**7**), α -glicose (**8**) e β -glicose (**9**).

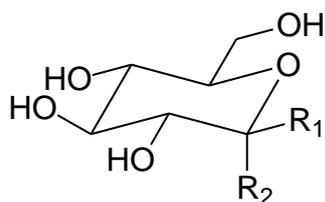
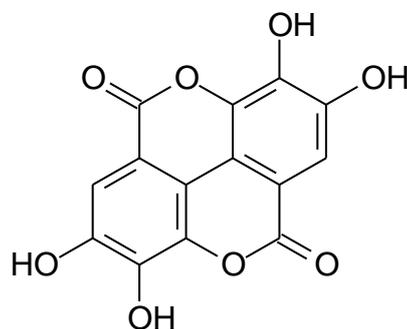
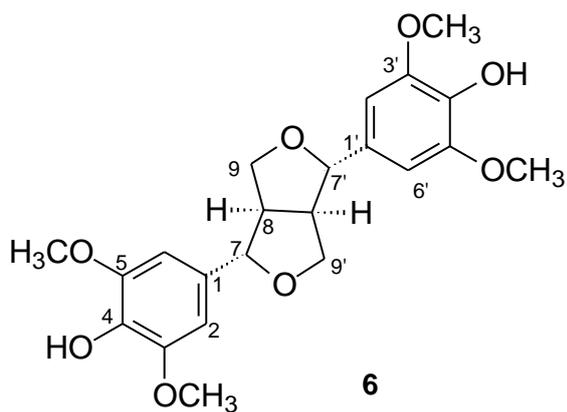


2: $R_1 = R_3 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$

3: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{Rham}$

4: $R_1 = R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{H}$

5: $R_1 = R_2 = \text{OH}$; $R_3 = \text{Rham}$

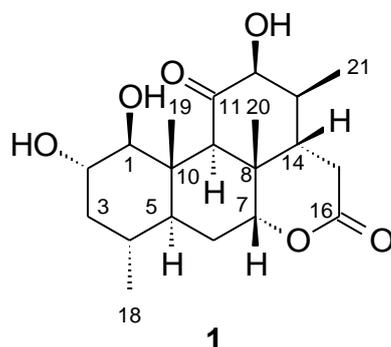


8: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$

9: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$

5.3 Identificação estrutural dos compostos isolados de *S. ferruginea*

5.3.1 Elucidação estrutural do composto 1

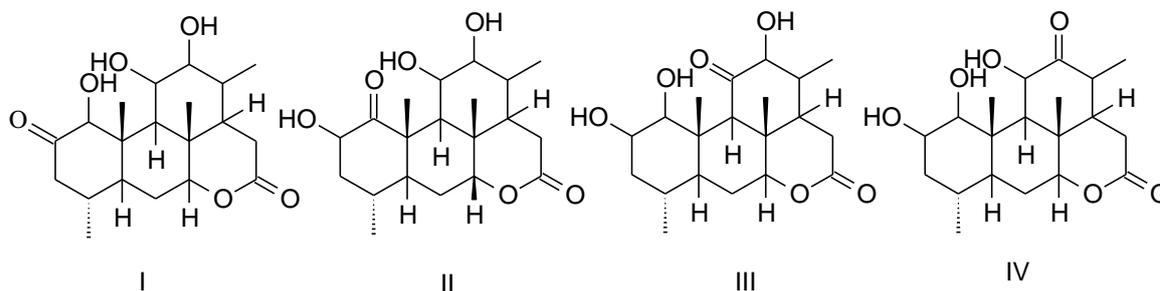


O composto **1** (24 mg) foi isolado como um sólido amorfo proveniente do fracionamento em coluna de Sephadex do subgrupo DF23-29 obtido a partir da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (Esquema 3, p. 45).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 29) apresentou 20 sinais mais intensos. A análise dos espectros de RMN ^{13}C , DEPT 135° e DEPT 90° (Figuras 29-31) possibilitou identificar um sinal de carbonila de cetona (δ_{C} 216,3), um sinal de carbonila de δ -lactona (δ_{C} 171,7), dois sinais de carbonos quaternários (δ_{C} 40,4 e δ_{C} 41,4), cinco sinais de carbonos metínicos (δ_{C} 28,1, 43,7, 48,9, 34,8 e 45,3), quatro sinais de carbonos oximetínicos (δ_{C} 85,4, 70,4, 82,9 e 81,2), três sinais de carbonos metilênicos (δ_{C} 41,3, 25,8 e 29,0) e quatro sinais de carbonos metílicos (δ_{C} 19,5, 11,3, 23,2 e 13,4), os quais permitiram sugerir a fórmula molecular como $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_6$, que tem IDH igual a seis, correspondente a quatro anéis e duas carbonilas. Esta análise sugere que o composto **1** pertence à classe dos quassinoides, com esqueleto quassolidano (Figura 2, p. 8), que tem vinte carbonos, quatro metilas, quatro anéis, sendo um de δ -lactona (ALMEIDA et al., 2007).

O espectro de RMN de ^1H (Figuras 26-28) mostrou dois sinais de metilas em carbono quaternário em δ_{H} 1,07 (s, Me-20) e δ_{H} 1,25 (s, Me-19), dois sinais de metilas em carbono terciário em δ_{H} 0,87 (d, $J=6,4$ Hz, Me-18) e δ_{H} 1,09 (d, $J=7,1$ Hz, Me-21) e um simpleto largo em δ_{H} 4,25 (H-7) característico de hidrogênio oximetínico de δ -lactona (YOSHIKAWA et al., 1993). Estes dados sugeriram quatro possibilidades de isômeros constitucionais mudando a posição da carbonila de cetona (I, II, III e IV). A presença de um simpleto em δ_{H} 3,35, atribuído ao H-9

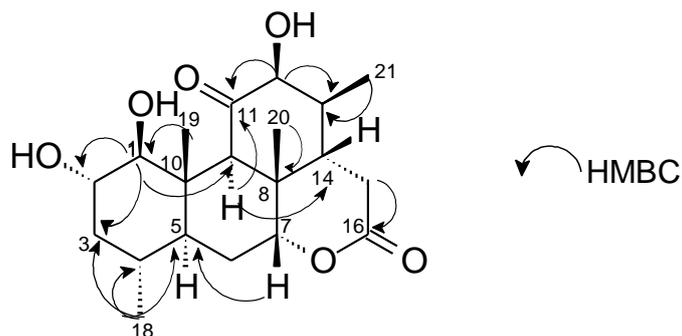
sugeriu a localização da carbonila em C-11 (Kubo, Murai e Chaudhuri, 1993), e, conseqüentemente, permitiu definir a estrutura III para o composto 1.



O mapa de contorno HSQC (Figuras 32 e 33; Tabela 18) apresentou correlações dos hidrogênios aos respectivos carbonos. As principais correlações observadas para o composto 1 foram as dos hidrogênios das metilas com seus respectivos carbonos, como H-18 (δ_H 0,87) com C-18 (δ_C 19,5), H-19 (δ_H 1,25) com C-19 (δ_C 11,3), H-20 (δ_H 1,07) C-20 (δ_C 23,2) e H-21 (δ_H 1,09) com C-21 (δ_C 13,4). Além disso, os sinais de H-7 (δ_H 4,25) e H-9 (δ_H 3,35) correlacionaram com os sinais referentes à C-7 (δ_C 82,9) e C-9 (δ_C 48,9), respectivamente.

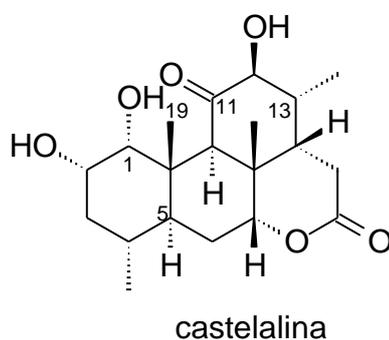
O mapa de contorno HMBC (Figuras 34 e 35; Tabela 18) apresentou correlações à longa distância como a de H-18 (δ_H 0,87) com C-3 (δ_C 41,3), C-4 (δ_C 28,1) e C-5 (δ_C 43,7), de H-19 (δ_H 1,25) com C-1 (δ_C 85,4), C-9 (δ_C 48,9) e C-10 (δ_C 41,4), de H-20 (δ_H 1,07) com C-7 (δ_C 82,9), C-8 (δ_C 40,4), C-9 (δ_C 48,9) e C-14 (δ_C 45,3), de H-21 (δ_H 1,09) com C-13 (δ_C 34,8). Outras correlações foram observadas como de H-1 (δ_H 3,00) com C-2 (δ_C 70,4), C-3 (δ_C 41,3), C-9 (δ_C 48,9) e C-19 (δ_C 11,3), de H-7 (δ_H 4,25) com C-5 (δ_C 43,7) e C-9 (δ_C 48,9), de H-9 (δ_H 3,35) com C-1 (δ_C 85,4), C-8 (δ_C 40,4), C-11 (δ_C 216,3), C-14 (δ_C 45,3), C-19 (δ_C 11,3) e C-20 (δ_C 23,2), de H-12 (δ_H 3,79) com C-11 (δ_C 216,3), C-13 (δ_C 34,8) e C-14 (δ_C 45,3) e de H-15 (δ_H 2,64) com C-8 (δ_C 40,4) e C-16 (δ_C 171,7).

Figura 24 - Principais correlações HMBC do composto 1



As correlações dos mapas de contorno HSQC e HMBC permitiram atribuir os sinais de carbonila de cetona em δ_C 216,3 e de carbonila de lactona em δ_C 171,7 a C-11 e C-16, respectivamente. Os quatro sinais de carbonos oximetínicos em δ_C 85,4, 70,4, 82,9 e 81,2 foram atribuídos a C-1, C-2, C-7 e C-12, respectivamente, enquanto os sinais de carbonos metílicos (δ_C 19,4, 11,3, 23,2 e 13,4) são referentes a Me-18, Me-19, Me-20 e Me-21 (Tabela 18).

A análise dos mapas de contorno HSQC e HMBC (Tabela 18; Figuras 31-34) corroboraram com a estrutura do composto 1, entretanto, a comparação dos dados de RMN ^{13}C com os relatados por Kubo, Murai e Chaudhuri (1993) para o quassinóide castelalina mostrou diferenças em alguns valores de deslocamento químico, sobretudo para C-1, C-5, C-11, C-13 e C-19.



A diferença de deslocamento químico observada para C-1 ($\Delta\delta = +11,1$ ppm) em comparação aos dados relatados por Kubo, Murai e Chaudhuri (1993) para a castelalina, associada ao valor da constante de acoplamento observada para H-1 ($d, J = 9,1$ Hz) sugeriu uma relação diaxial de H-1 com H-2, e, conseqüentemente uma configuração oposta para C-1 (1β -OH). Além disso, a configuração 1β -OH também corrobora com a desblindagem de C-5 ($\Delta\delta = +5,6$ ppm), que resultou da perda do

efeito γ -gauche de OH em C-1 sobre C-5, como também, resultou em um efeito γ -gauche de 1β -OH ($\Delta\delta = -4,2$) sobre C-19 (Figura 25).

A diferença de deslocamento químico observada para C-13 ($\Delta\delta = -5,1$ ppm) em comparação aos dados relatados por Kubo, Murai e Chaudhuri (1993) para a castelalina, associada ao valor da constante de acoplamento ($J_{H_{13-12}} = 4,7$ Hz) sugeriu uma relação *quasi* equatorial-axial entre H-13 e H-12, e, conseqüentemente, uma configuração oposta para C-13 (13β -CH₃). Adicionalmente, a configuração 13β -CH₃ resultou na desblindagem de C-11 ($\Delta\delta = +5,3$ ppm), devido a perda do efeito γ -gauche de C-21 sobre C-11 (Figura 25). Ao se confirmar por NOESY, a estereoquímica proposta, o composto **1** será um quassinóide inédito.

Figura 25 - Proposta de conformação do composto **1**

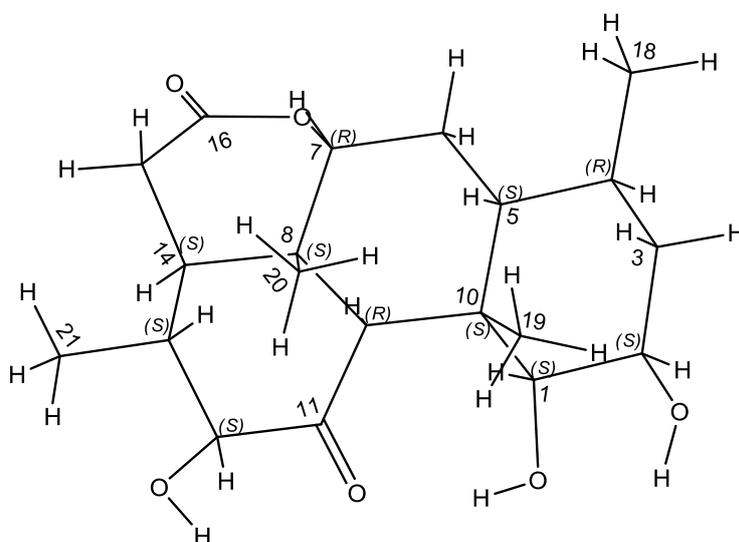


Tabela 18 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (600 e 150 MHz, δ /ppm, J/Hz, CDCl_3) do composto 1

C	Tipo de carbono	1		HMBC $^n J_{\text{CH}}$		Castelalina*
		δ_{C}	δ_{H}	$^2 J_{\text{CH}}$	$^3 J_{\text{CH}}$	
1	HC-O	85,4	3,0 (d, $J=9,1$)		H-9/H-19	74,3
2	HC-O	70,4	3,64 (m)		H-1	68,0
3	CH_2	41,3	1,93 (dd, $J=12,4$ e $3,0$)		H-1/H-18	38,9
4	CH	28,1	1,53 (m)	H-18		29,7
5	CH	43,7	1,21 (m)		H-7/H-18	38,1
6	CH_2	25,8	1,65 (d, $J=2,4$)			27,2
7	HC-O	82,9	4,25 (sl)		H-20	84,8
8	C	40,4		H-9/H-20	H-15	40,5
9	CH	48,9	3,35 (s)		H-1/H-7/ H-19/H-20	48,3
10	C	41,4		H-19		41,7
11	C=O	216,3		H-9/H-12		211,0
12	HC-O	81,2	3,79 (d, $J=4,7$)			77,9
13	CH	34,8	2,25 (m)	H-12/ H-21		39,9
14	CH	45,3	1,74 (m)		H-9/H-12/ H-20	46,3
15	CH_2	29,0	2,64 (dd, $J=19,4$ e $6,5$)		H-13	28,3
16	C=O	171,7		H-15		173,1
18	CH_3	19,5	0,87 (d, $J=6,4$)	-	-	20,1
19	CH_3	11,3	1,25 (s)	H-1/H-9		15,5
20	CH_3	23,2	1,07 (s)			24,4
21	CH_3	13,4	1,09 (d, $J=7,1$)			15,2

*Dados em CD_3OD relatados por Kubo, Murai e Chaudhuri (1993)

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 600 MHz)

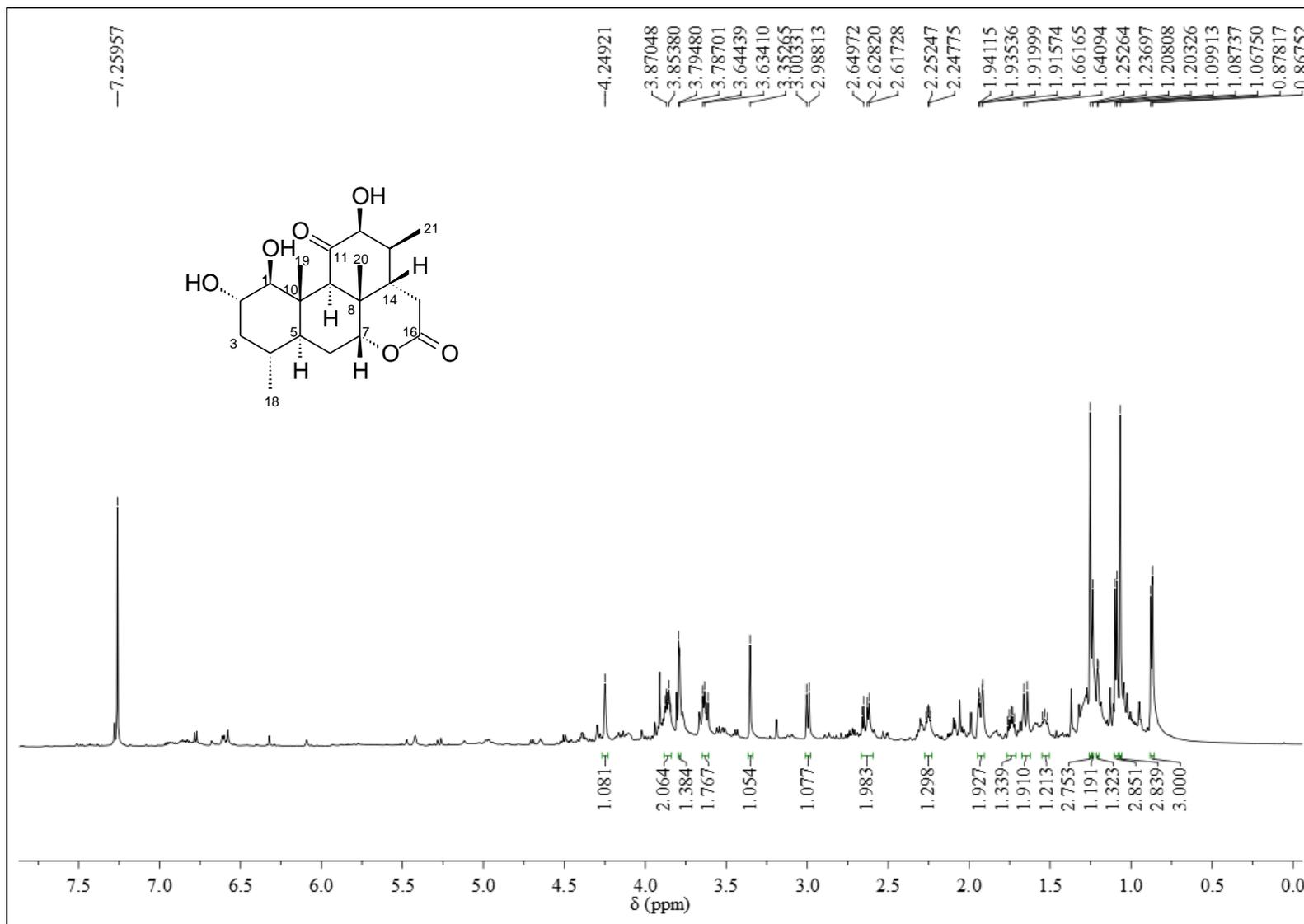


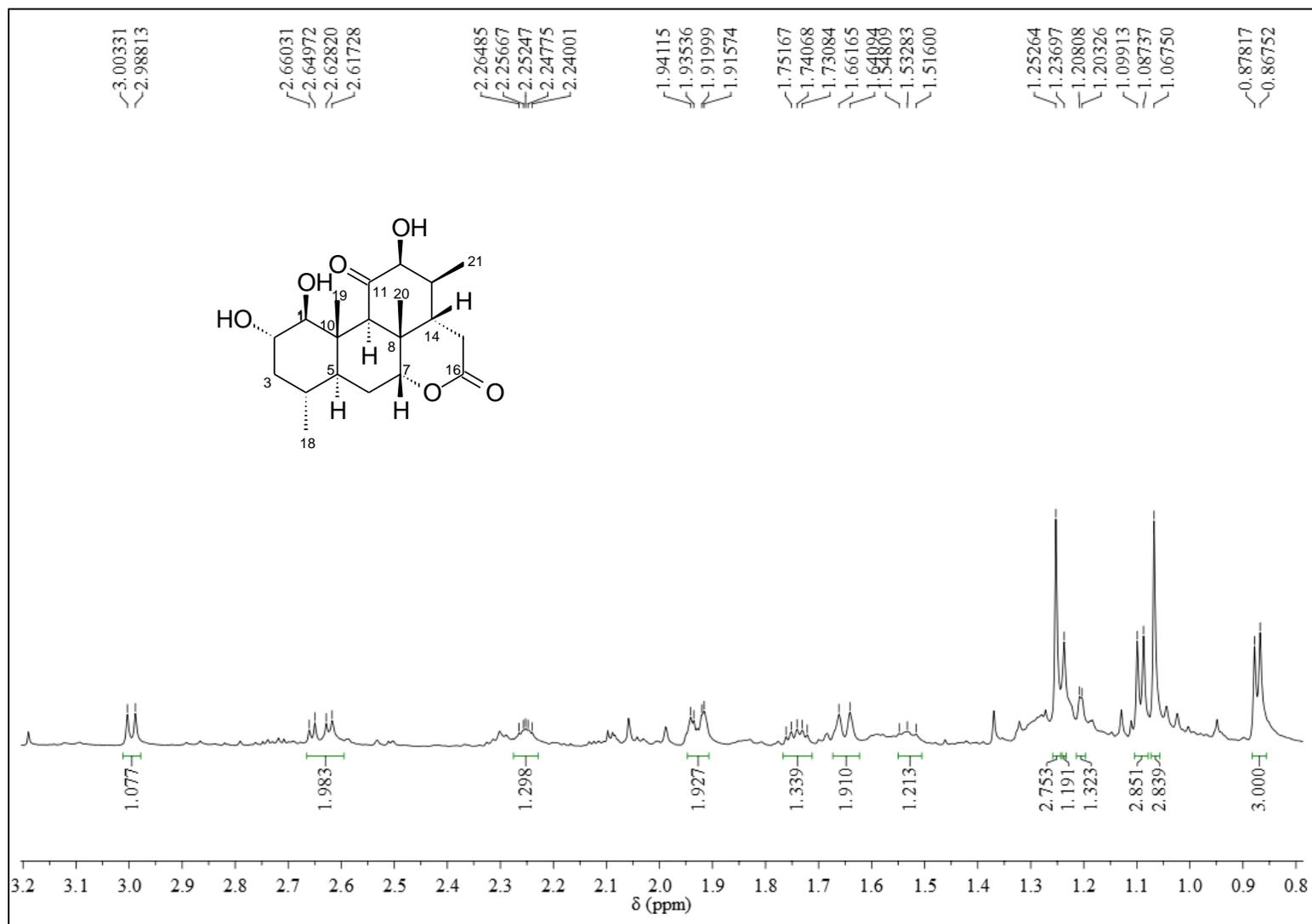
Figura 27 - Expansão (δ 0,8-3,2) do espectro de RMN ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 600 MHz)

Figura 28 - Expansão (δ 2,8-4,7) do espectro de RMN ^1H do composto 1 (CDCl_3 , 600 MHz)

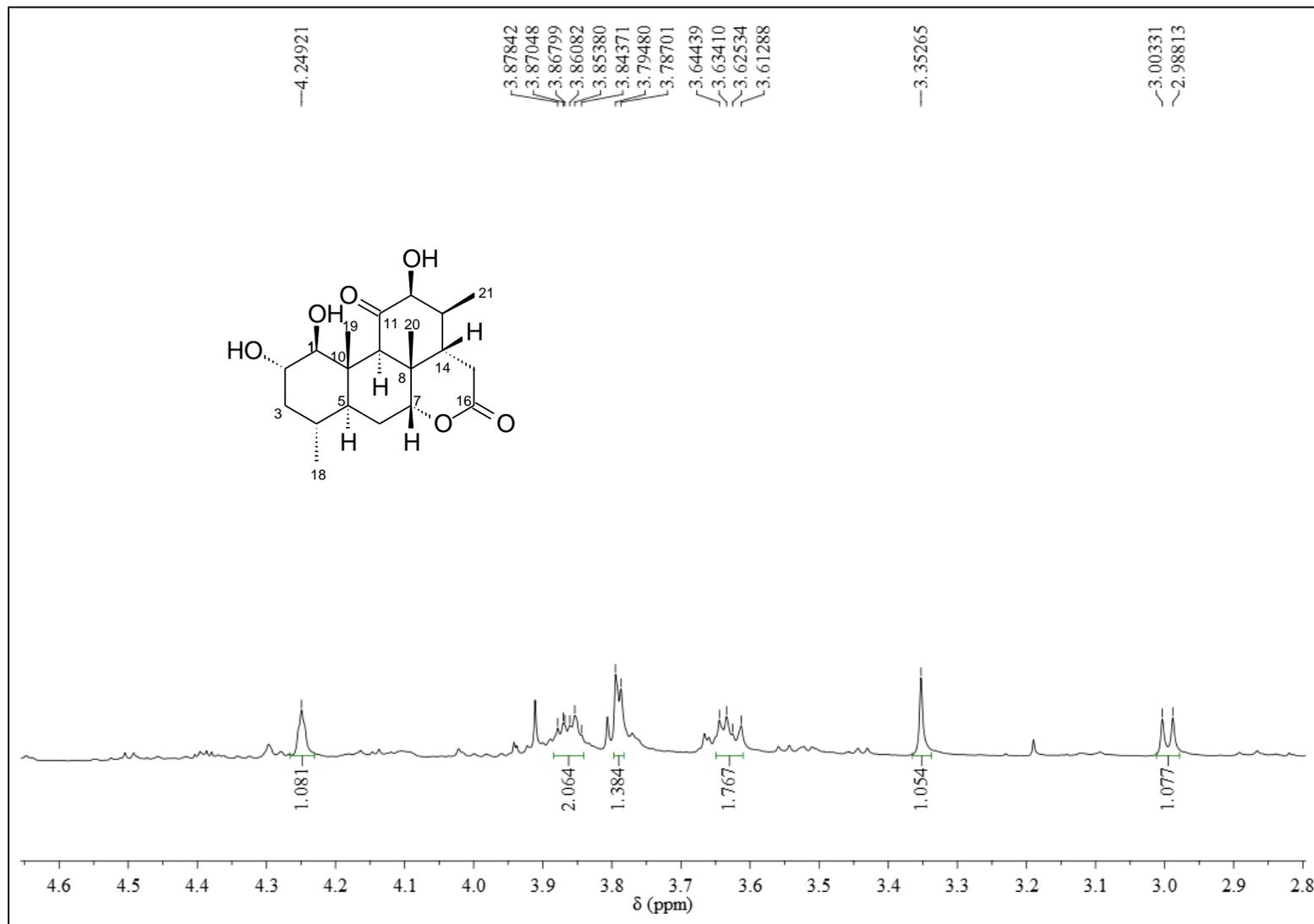


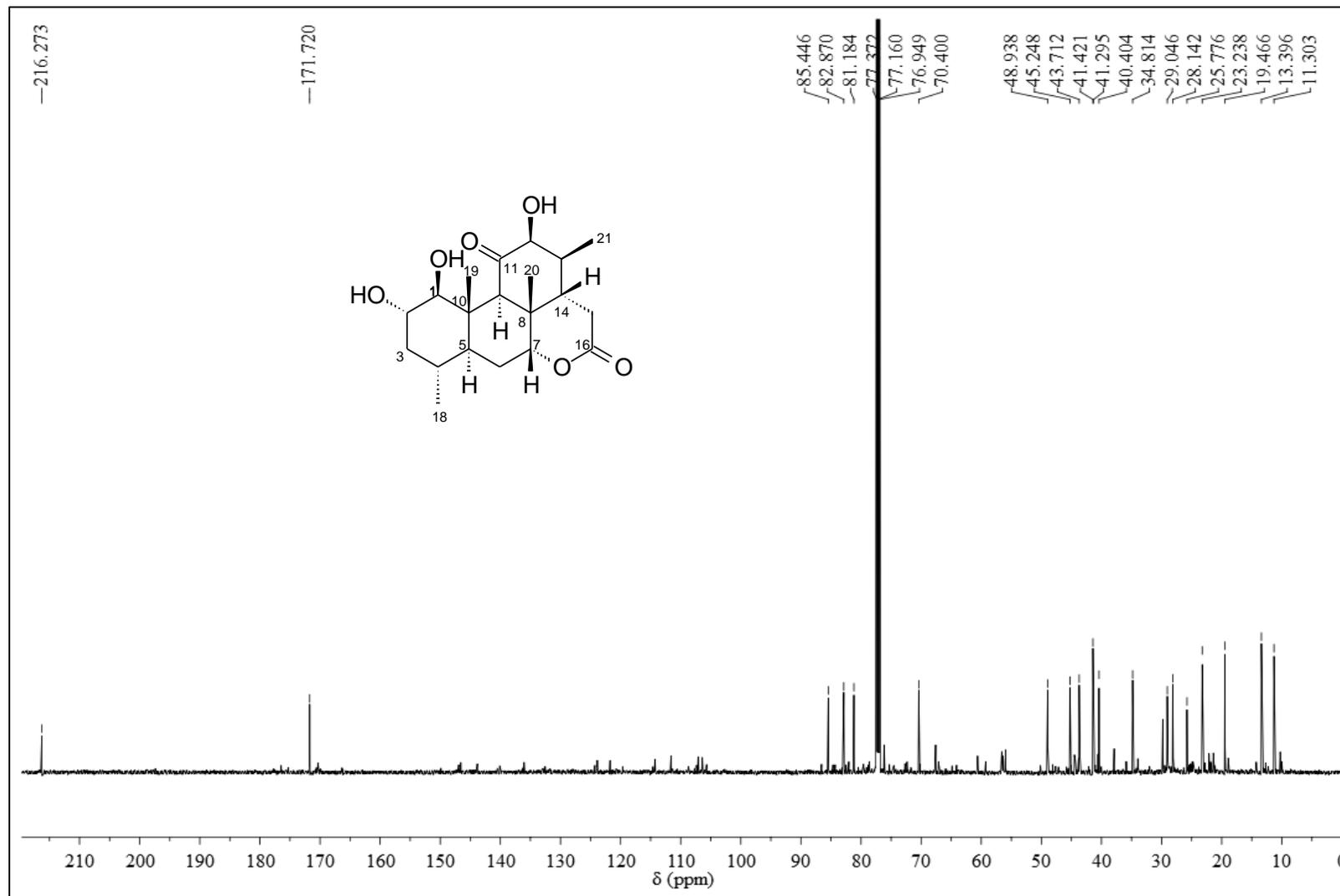
Figura 29 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 1 (CDCl_3 , 150 MHz)

Figura 30 - DEPT 135° do composto 1 (CDCl₃, 150 MHz)

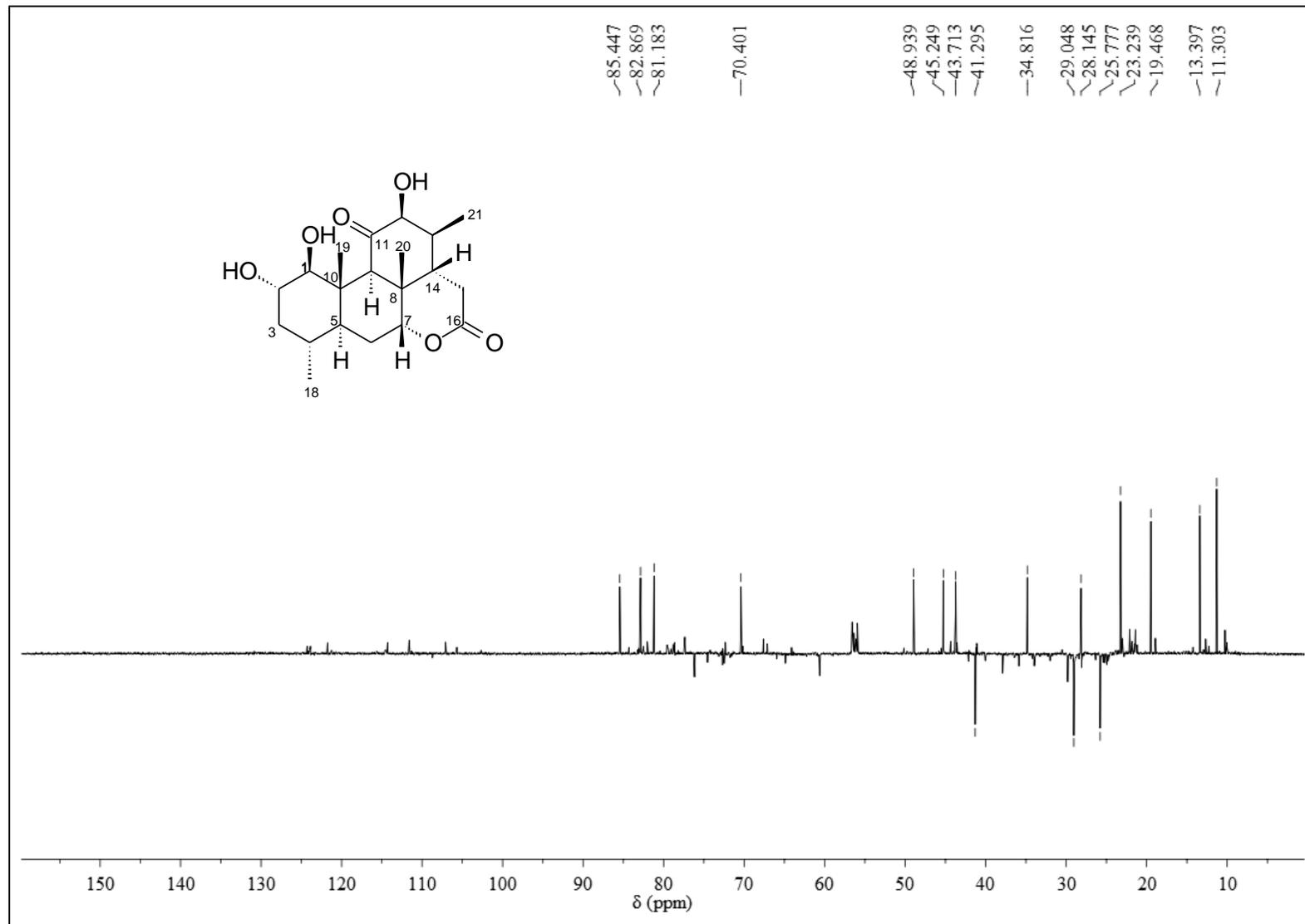


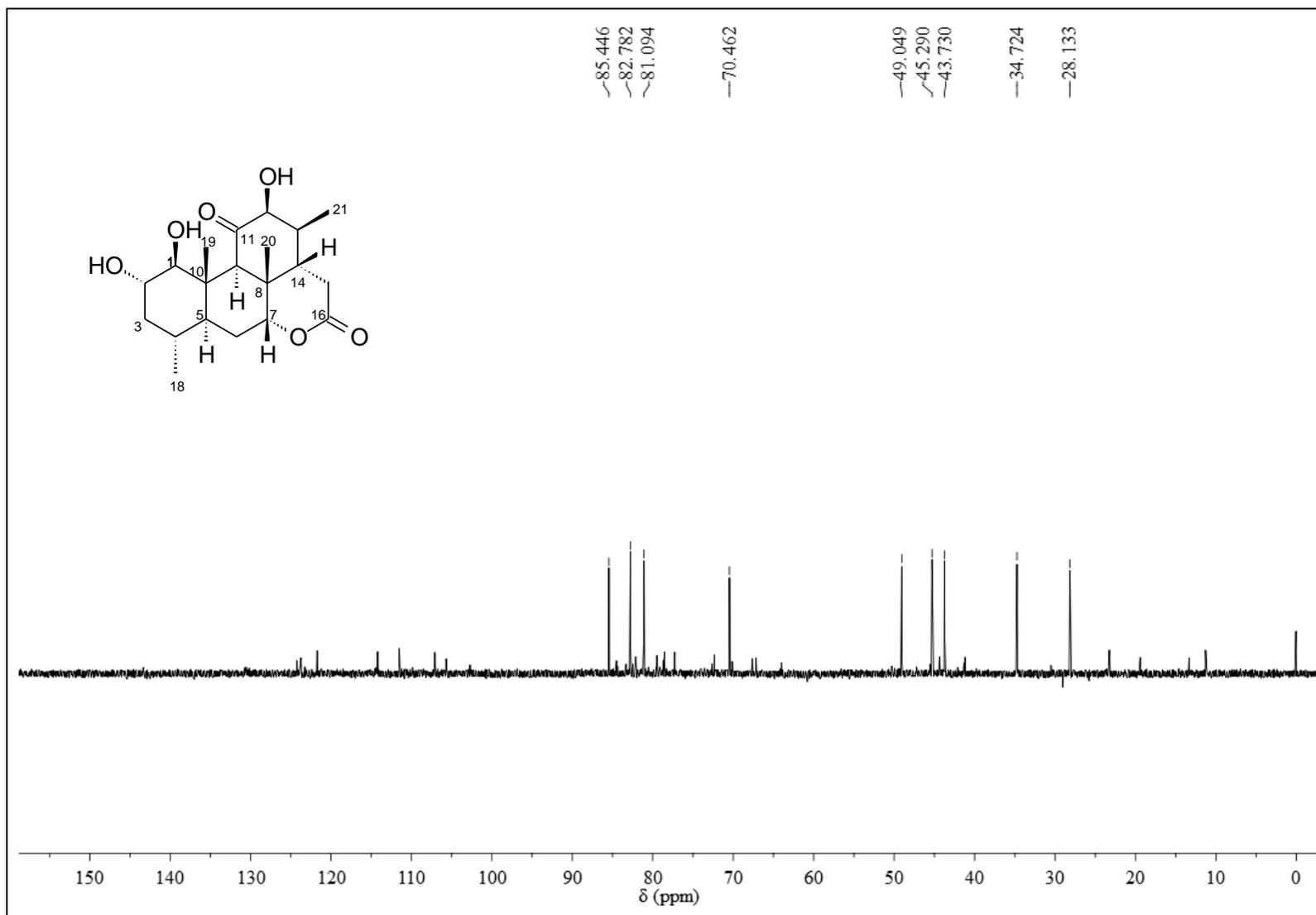
Figura 31 - DEPT 90° do composto 1 (CDCl₃, 150 MHz)

Figura 32 - Mapa de contorno HSQC do composto 1 (CDCl₃, 600 e 150 MHz)

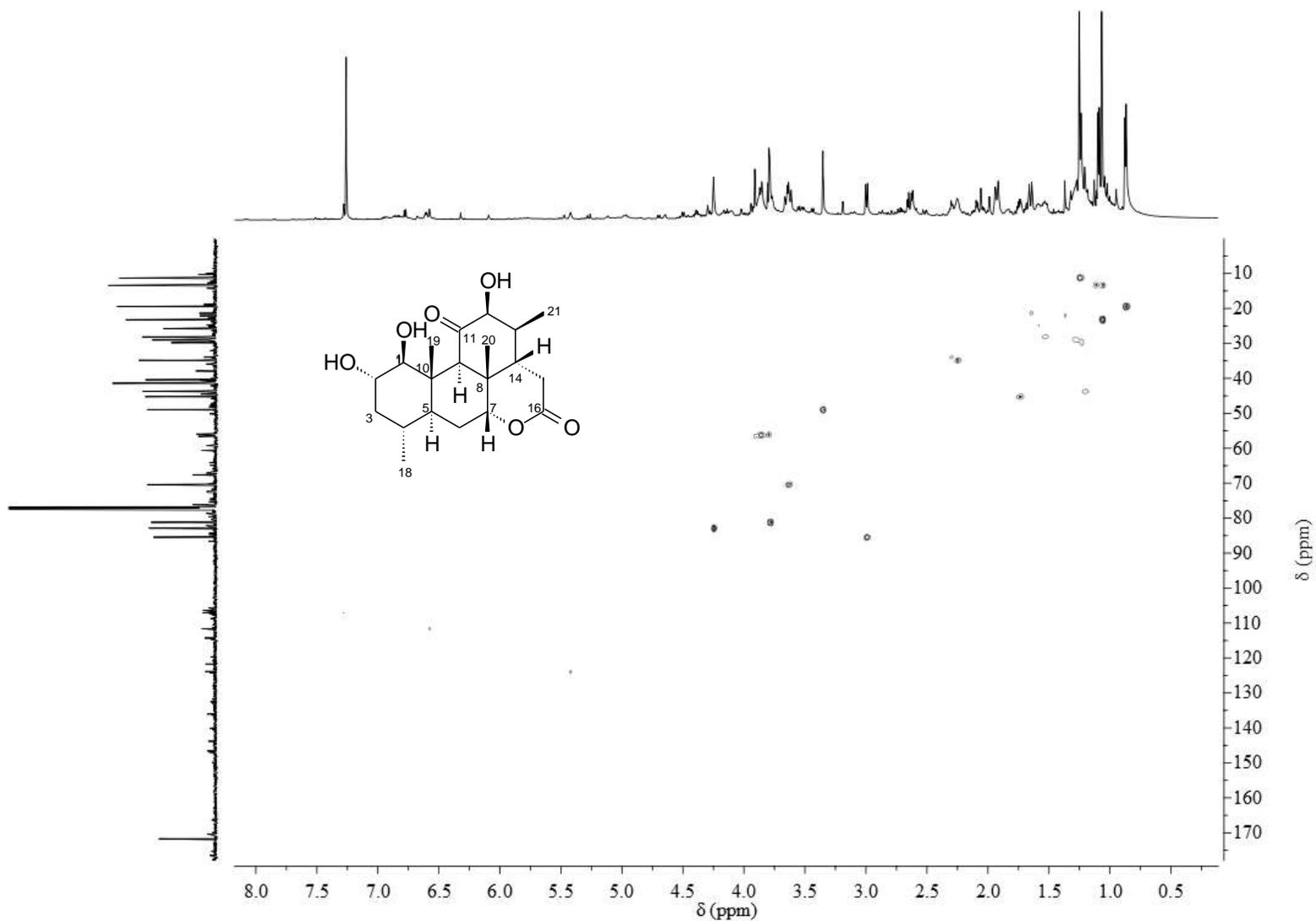


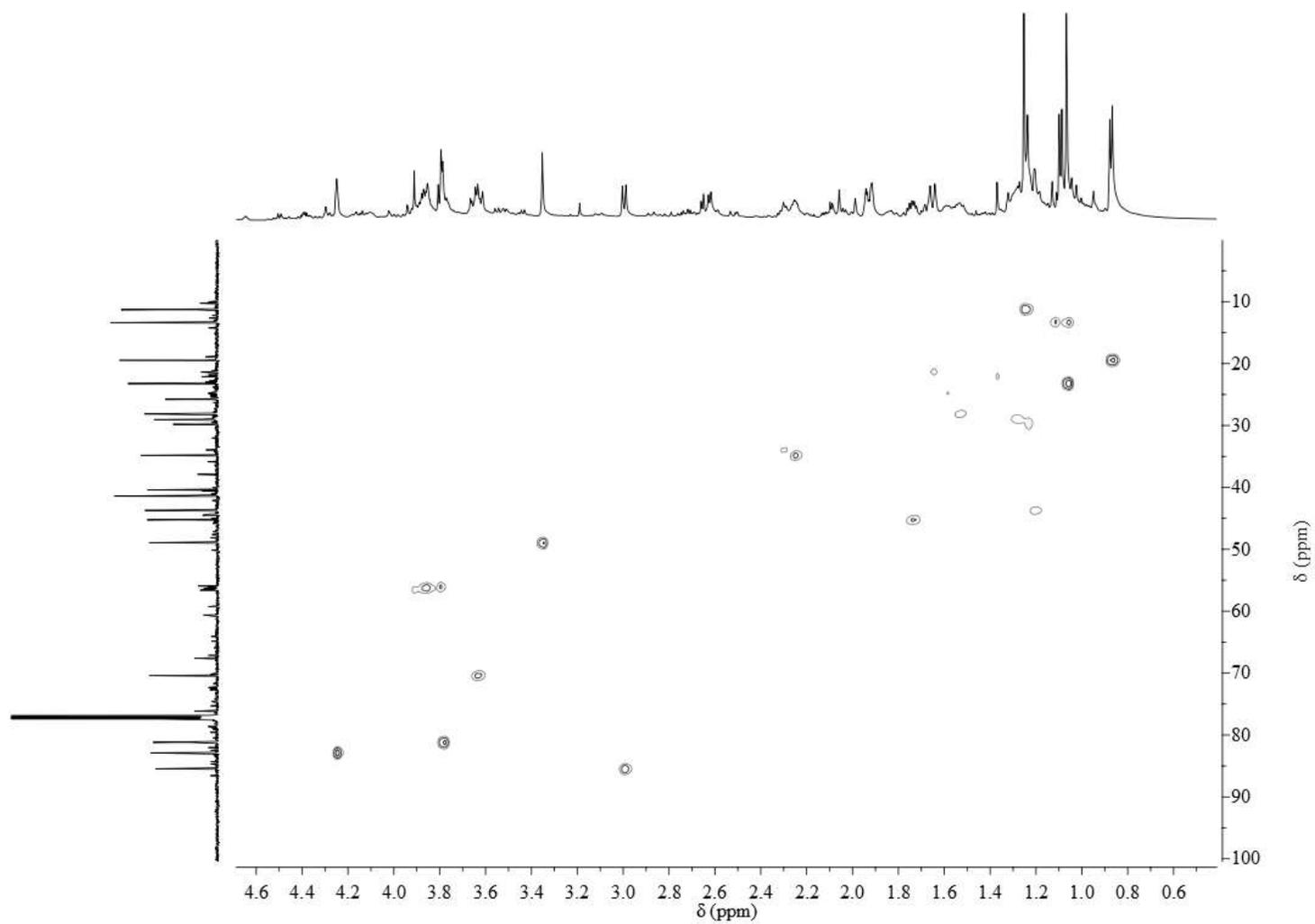
Figura 33 - Expansão do mapa de contorno HSQC do composto 1 (CDCl₃, 600 e 150 MHz)

Figura 34 - Mapa de contorno HMBC do composto 1 (CDCl₃, 600 e 150 MHz)

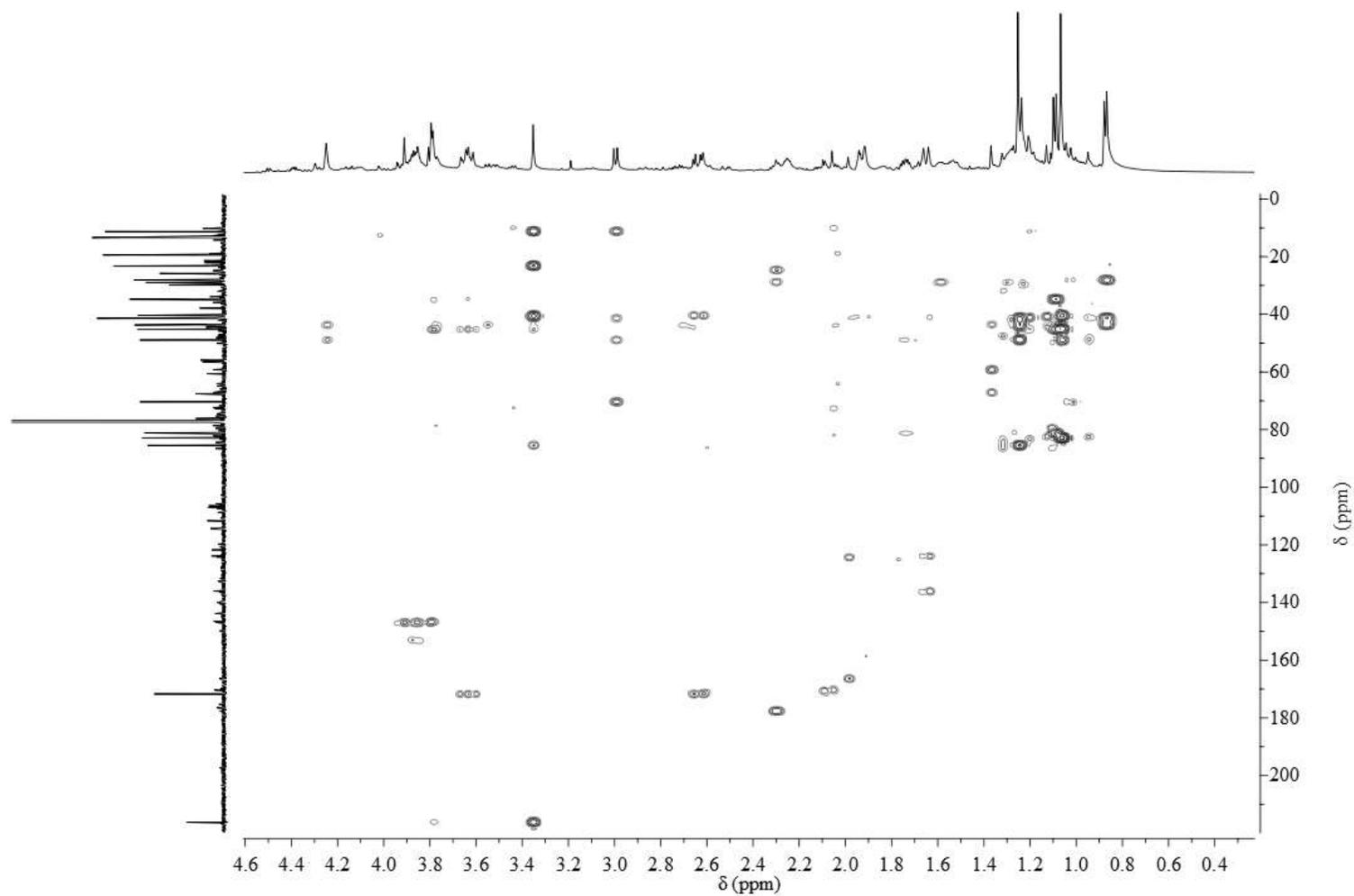
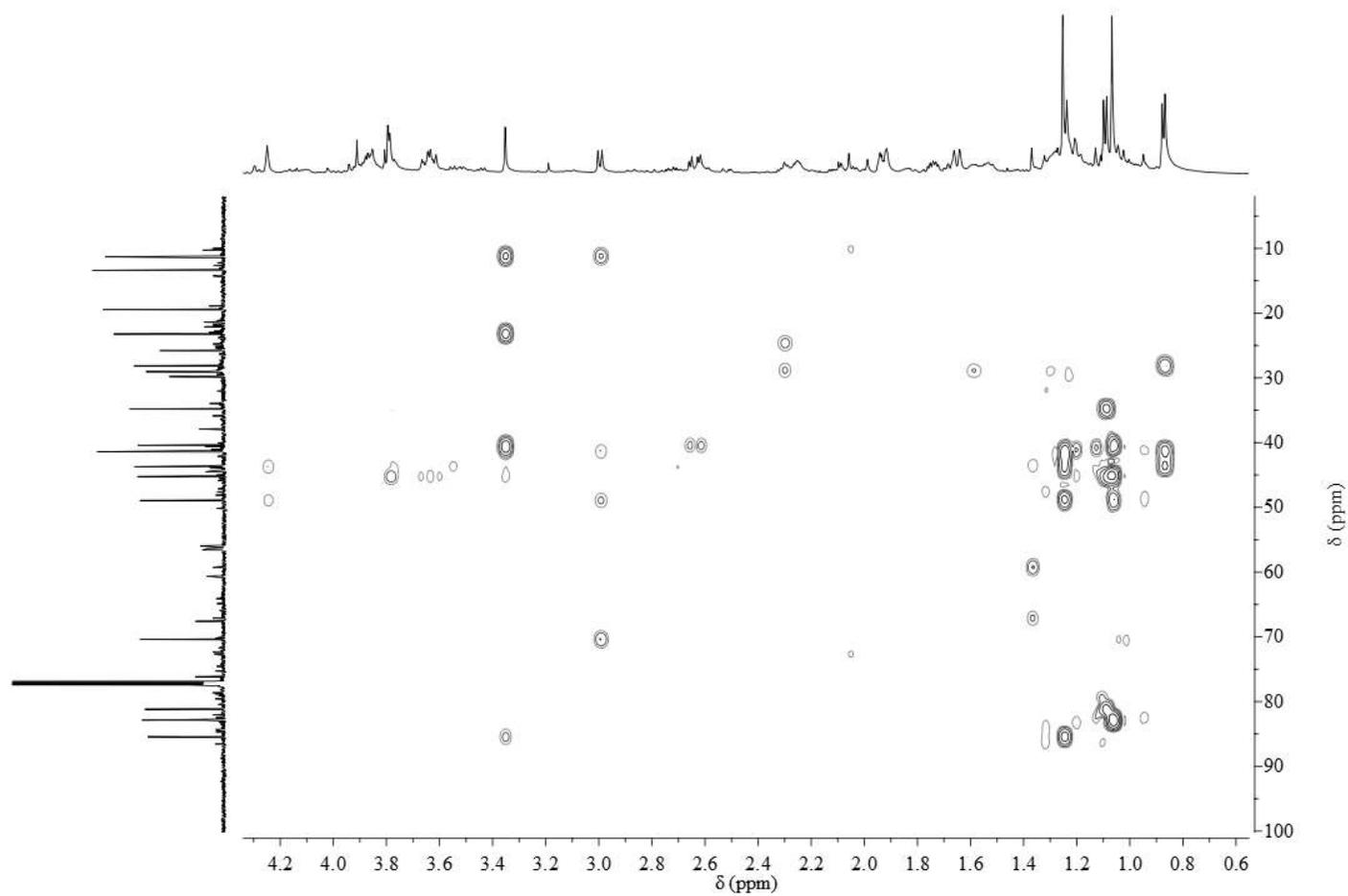
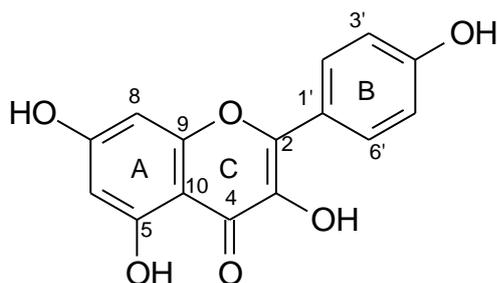


Figura 35 - Expansão do mapa de contorno HMBC do composto **1** (CDCl₃, 600 e 150 MHz)

5.3.2 Identificação estrutural do composto 2



2

O composto **2** (7,5 mg) foi isolado como um sólido de coloração amarelada e solúvel em metanol obtido do fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 do subgrupo DF23 proveniente da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (Esquema 3, p. 45).

O espectro de RMN ^1H (Figuras 36 e 37; Tabela 19) apresentou sinais característicos de flavonoides, observados na região de anel aromático. Os dois dupletos em δ_{H} 6,19 ($J=2,1$ Hz) e δ_{H} 6,41 ($J=2,1$ Hz), característicos de hidrogênios posicionados *meta* são atribuídos a H-6 e H-8 do anel A. Os dupletos em δ_{H} 6,91 ($J=9,0$ Hz, H-3'/H-5') e δ_{H} 8,09 (d, $J=9,0$ Hz, H-2'/H-6') sugerem uma estrutura de anel aromático 1,4-dissubstituído, referente ao anel B.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 38 e Tabela 19) mostrou treze sinais na região de δ_{C} 94,4-177,4. A análise do DEPT 135° (Figura 39) possibilitou afirmar a existência de oito sinais de carbonos quaternários, quatro de carbonos metínicos e a ausência de carbonos metilênicos. Os sinais intensos em δ_{C} 116,3 (C-3'/C-5') e 130,7 (C-2'/C-6') correspondentes a dois carbonos cada, confirmaram a existência do anel aromático 1,4 dissubstituído (anel B). Os sinais em δ_{C} 99,3 e 94,4 foram atribuídos a C-6 e C-8, respectivamente, e em δ_{C} 177,4, a carbonila em C-4.

Os dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° (Figuras 36-39, Tabela 19) em comparação com os relatados por Itoh et al. (2009) e Lin et al. (2014), permitiu identificar o composto **2** como o flavonoide canferol, anteriormente isolado das frutas e raízes de *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) (ARRIAGA et al., 2002). No entanto, este é o primeiro relato de isolamento e identificação de canferol no gênero *Simaba*.

O canferol (**2**) apresenta ação anticâncer (KASHYAP et al., 2017), antidiabética (LUO et al., 2015), antialérgica (OH et al., 2013), neuroprotetora (FILOMENI et al., 2012), antimicrobiana (VALLE et al., 2016), anti-inflamatória, antioxidante e anticardiovascular (DEVI et al., 2015).

Tabela 19 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, δ / ppm, J/Hz, CD_3OD) do composto **2**

C	Tipo de carbono	2		Canferol*
		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	
2	C	148,1		148,5
3	C	137,1		135,4
4	C	177,4		177,4
5	C	160,6		161,5
6	CH	99,3	6,19 (d, $J=2,1$)	100,2
7	C	165,6		166,1
8	CH	94,4	6,41 (d, $J=2,1$)	94,8
9	C	162,5		159,0
10	C	104,5		104,3
1'	C	123,7		122,7
2'	CH	130,7	8,09 (d, $J=9,0$)	132,2
3'	CH	116,3	6,91 (d, $J=9,0$)	117,2
4'	C	158,3		158,4
5'	CH	116,3	6,91 (d, $J=9,0$)	117,2
6'	CH	130,7	8,09 (d, $J=9,0$)	132,2

*Dados em CD_3OD relatados por Lin et al. (2014)

Figura 36 - Espectro de RMN ¹H do composto 2 (CD₃OD, 400 MHz)

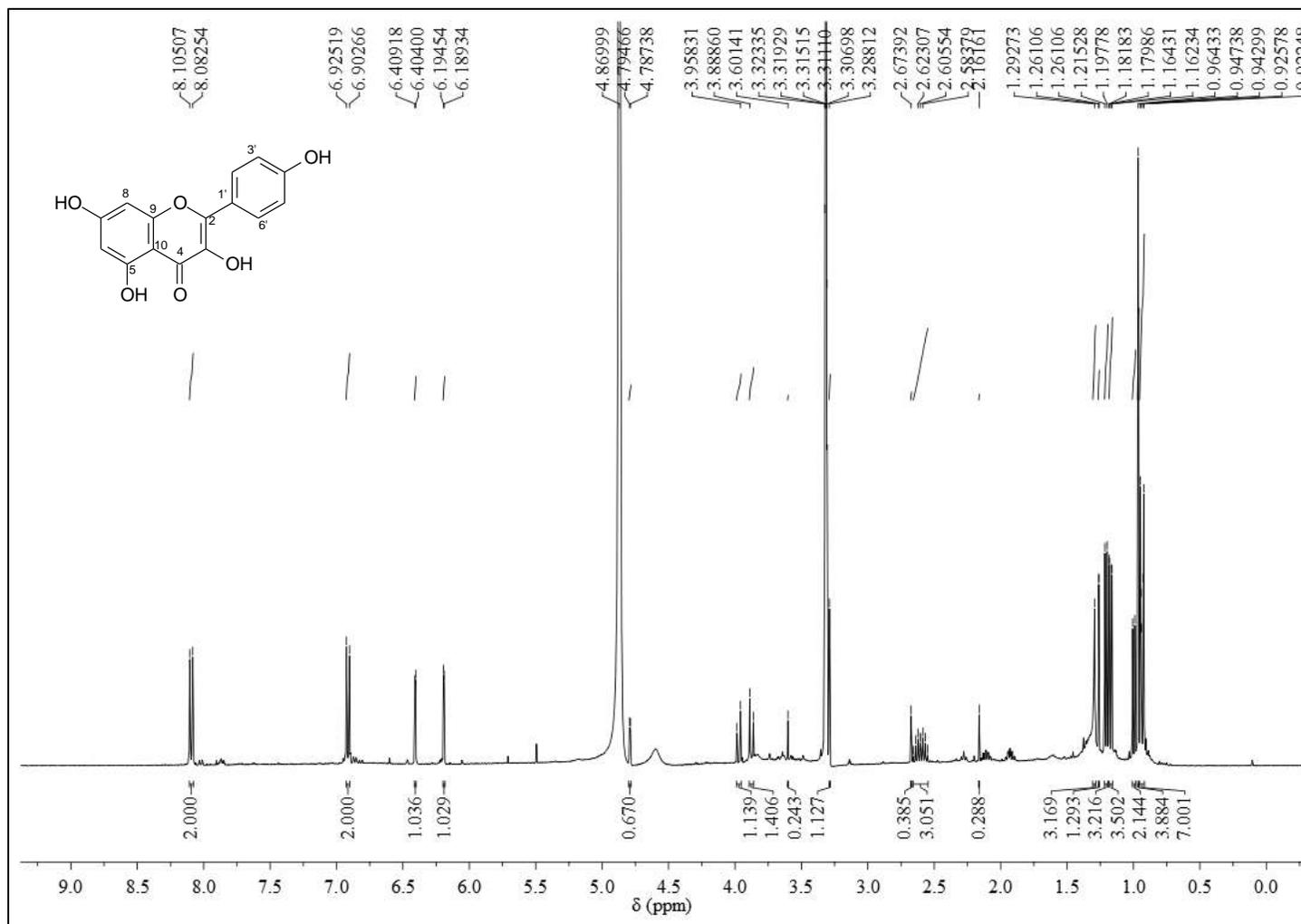


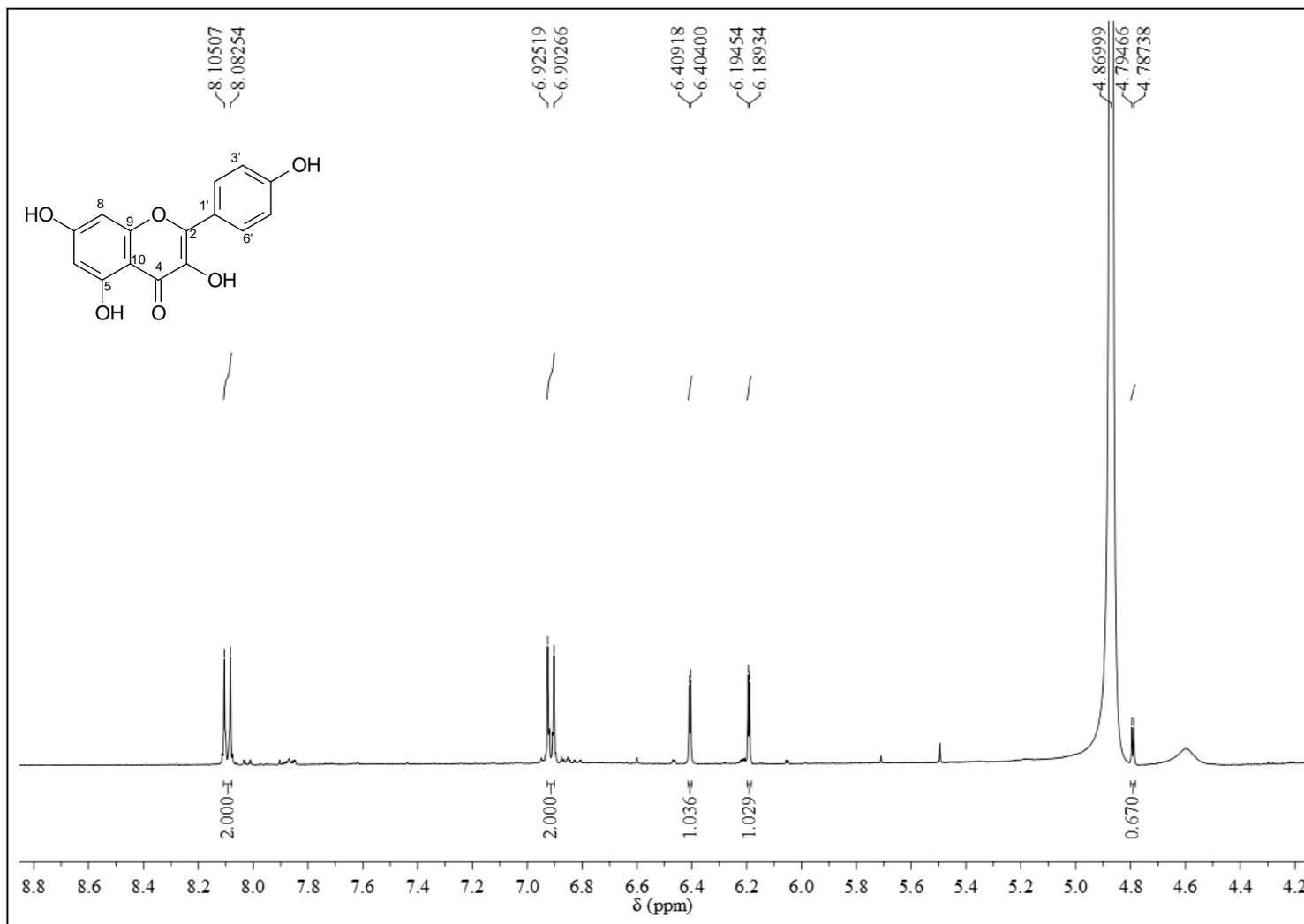
Figura 37 - Expansão (δ 4,2-8,8) do espectro de RMN ^1H do composto **2** (CD_3OD , 400 MHz)

Figura 38 - Espectro de RMN ¹³C do composto 2 (CD₃OD, 100 MHz)

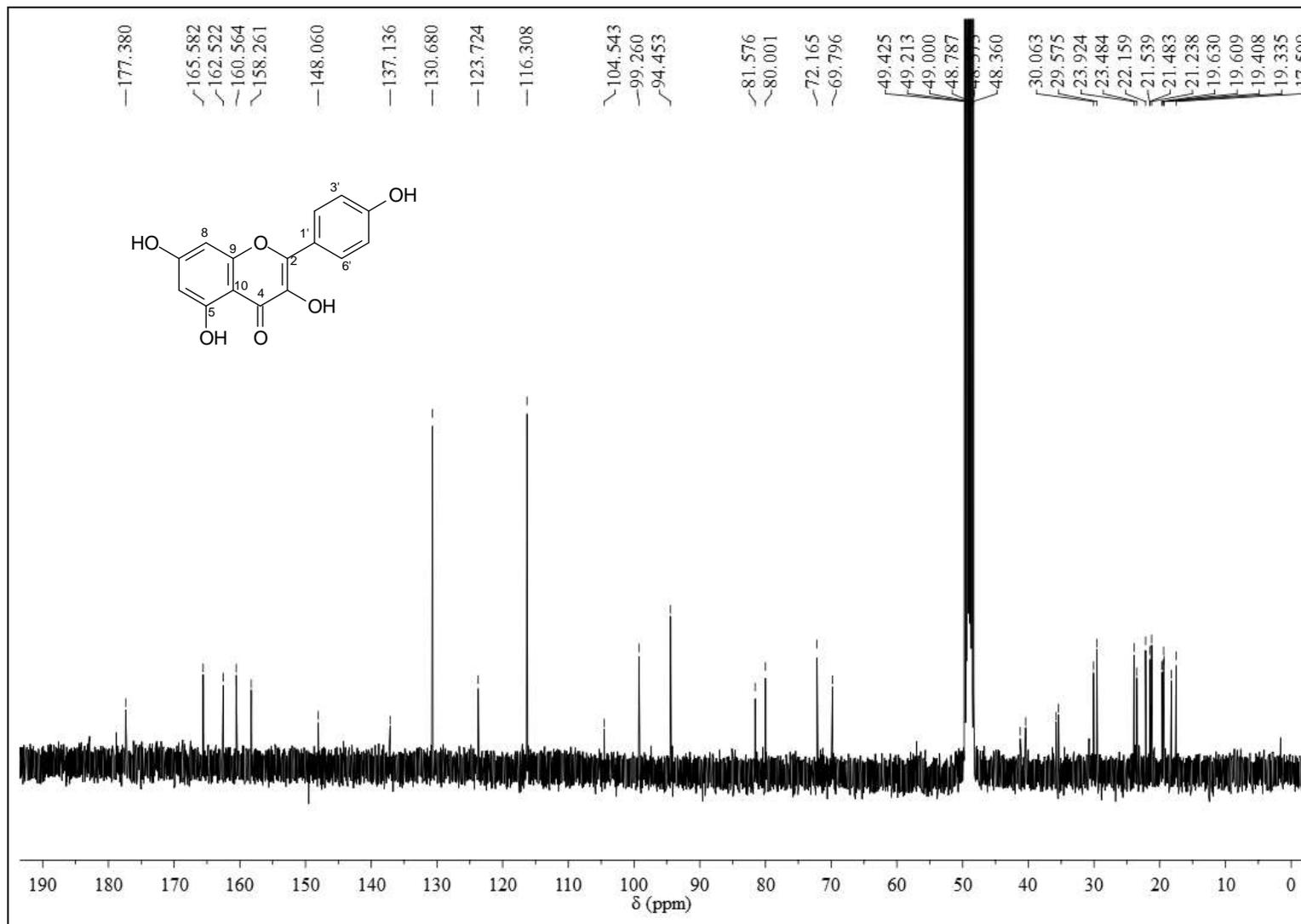
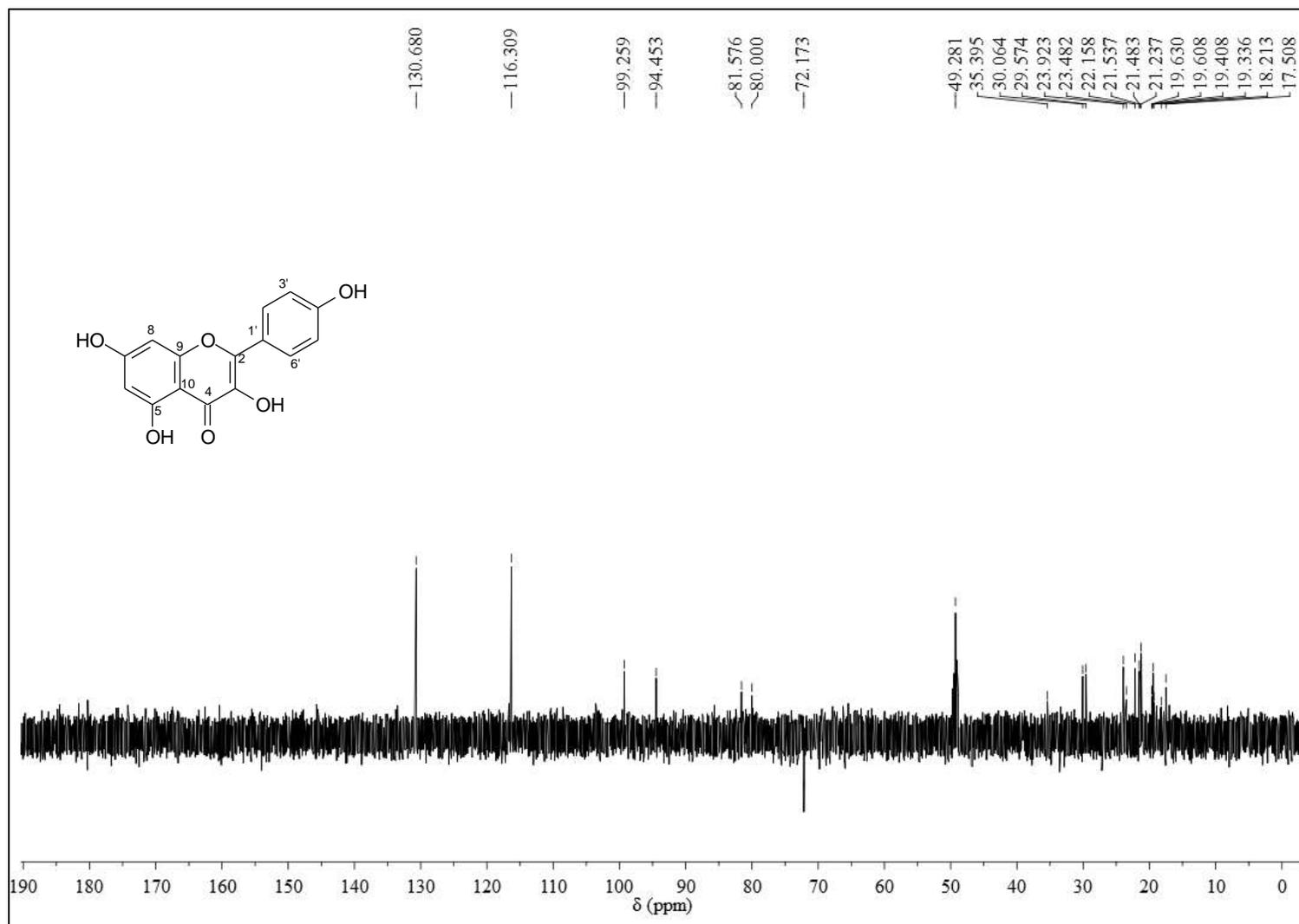
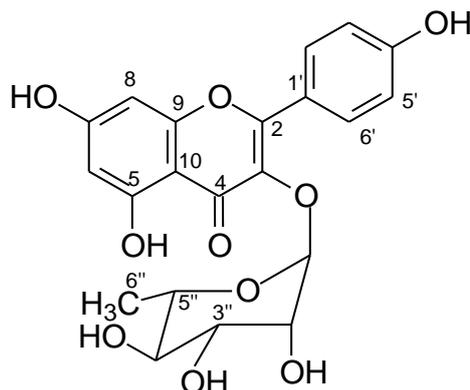


Figura 39 - DEPT 135° do composto **2** (CD₃OD, 100 MHz)

5.3.3 Identificação estrutural do composto 3



3

O composto **3** (6,2 mg) foi isolado como um sólido de coloração amarelada, solúvel em metanol, sendo obtido do fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 do subgrupo DF44, proveniente da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (Esquema 3, p. 45).

O espectro de RMN ^1H (Figuras 41-43, Tabela 20) do composto **3** apresentou sinais semelhantes aos do composto **2**, como os dupletos em δ_{H} 6,19 ($J=2,0$ Hz) e δ_{H} 6,36 ($J=2,0$ Hz) atribuídos a H-6 e H-8 do anel A e os dupletos em δ_{H} 6,93 ($J=8,8$ Hz, H-3'/H-5') e δ_{H} 7,75 (d, $J=8,8$ Hz, H-2'/H-6') correspondentes aos hidrogênios do anel B. Adicionalmente, foram observados sinais entre δ_{H} 3,0-4,3, característicos de hidrogênios de unidades de açúcar. Os dupletos em δ_{H} 0,92 ($J=5,7$ Hz) e 5,36 ($J=1,6$ Hz), atribuídos aos hidrogênios da metila (H-6'') e anomérico H-1'', respectivamente, sugeriram a presença de unidade α -ramnosídica.

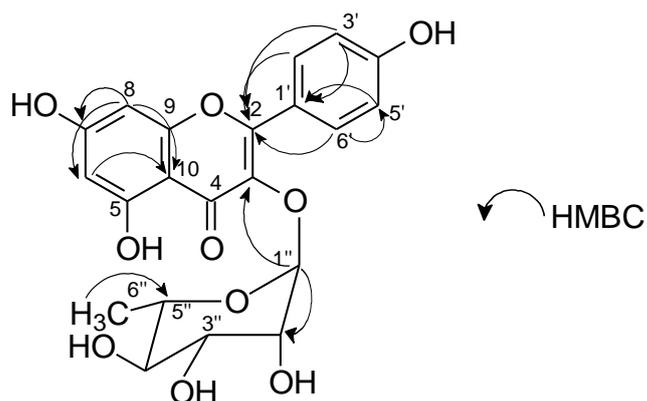
O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44, Tabela 20) apresentou 19 sinais, sendo treze deles correspondentes aos carbonos da aglicona e semelhantes aos sinais do composto **3**. Além disso, o espectro mostrou ainda cinco sinais na região de δ_{C} 71,8-73,1 que juntamente com o sinal em δ_{C} 17,6, atribuído ao carbono metílico (C-6'') confirmaram a presença de unidade α -ramnosídica. O sinal em δ_{C} 179,5 é referente à carbonila em C-4.

O mapa de contorno COSY (Figuras 45 e 46), mostrou correlações de H-2'/H-6' (δ_{H} 7,75) com H-3'/H-5' (δ_{H} 6,93), de H-2'' (δ_{H} 4,22) com H-1'' (δ_{H} 5,36) e H-3'' (δ_{H} 3,72), de H-4'' (δ_{H} 3,33) com H-3'' (δ_{H} 3,72) e H-5'' (δ_{H} 3,32) e de H-5'' (δ_{H} 3,32) com H-6'' (δ_{H} 0,92).

O mapa de contorno HSQC (Figuras 47 e 48, Tabela 20) apresentou correlações dos hidrogênios aos respectivos carbonos. As principais correlações observadas para o composto **3** foram de H-2'/H-6' (δ_H 7,75) com C-2'/C-6' (δ_C 131,9), de H-3'/H-5' (δ_H 6,93) com C-3'/C-5' (δ_C 116,5). Além disso, os sinais de H-6 (δ_H 6,19) e H-8 (δ_H 6,36) correlacionaram com os sinais referentes à C-6 (δ_C 99,8) e C-8 (δ_C 94,8), respectivamente.

O mapa de contorno HMBC (Figuras 40, 49-50, Tabela 20) apresentou correlações à longa distância de H-6 (δ_H 6,19) com C-5 (δ_C 163,1), C-7 (δ_C 165,8), C-8 (δ_C 94,8) e C-10 (δ_C 105,9) e de H-8 (δ_H 6,36) com C-6 (δ_C 99,8), C-7 (δ_C 165,8), C-9 (δ_C 158,5) e C-10 (δ_C 105,9). Outras correlações foram observadas, como a de H-2'/6' (δ_H 7,75) com C-2 (δ_C 159,3) e C-3'/5' (δ_C 116,5), bem como de H-3'/5' (δ_H 6,93) com C-1' (δ_C 122,6) e C-2 (δ_C 159,3). A correlação entre H-1'' (δ_H 5,36) com C-3 (δ_C 136,1), definiu a posição do açúcar ligado a aglicona, evidenciando que a ramnose está ligada a C-3.

Figura 40 - Principais correlações HMBC do composto **3**



Os dados de RMN 1H , ^{13}C , HSQC e HMBC (Tabela 20) obtidos para o composto **3** com os relatados por Chen et al. (2004) e Miranda et al. (2012), permitiram identificar o flavonoide canferol-3-O- α -L-ramnosídeo, conhecido como afzelina. Este é o primeiro relato do isolamento do canferol-3-O- α -L-ramnosídeo na família Simaroubaceae.

O flavonoide afzelina (**3**) apresenta ação antimalárica frente à *Plasmodium falciparum* (LIU et al., 2007), antiasmática (ZHOU e NIE, 2015), anticancerígena (ZHU et al., 2015) e anti-hipertensiva (HANSEN et al., 1996). Adicionalmente, Shin

et al. (2013) verificou elevado potencial antioxidante, anti-inflamatório, anti-UV de afzelina, além da capacidade de proteger a pele humana de danos induzidos por UVB por uma combinação de absorção de UV e atividades celulares.

Tabela 20 - Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC (600 e 150 MHz, δ/ppm , J/Hz , CD_3OD) do composto **3**

C	Tipo de carbono	3		HMBC $^n J_{\text{CH}}$		Canferol-3-O- α -L-ramnosídeo*
		δ_{C}	δ_{H}	$^2 J_{\text{CH}}$	$^3 J_{\text{CH}}$	
2	C	159,3			H-2'/H-6'	158,5
3	C	136,1			H-1''	136,2
4	C	179,5				179,5
5	C	163,1		H-6		163,1
6	CH	99,8	6,19 (d, $J=2,0$)		H-8	99,8
7	C	165,8		H-6/H-8		165,8
8	CH	94,8	6,36 (d, $J=2,0$)		H-6	94,7
9	C	158,5		H-8		159,2
10	C	105,9			H-6/H-8	105,9
1'	C	122,6			H-3'/H-5'	122,6
2',6'	CH	131,9	7,75 (d, $J=8,8$)	H-3'/H-5'		131,9
3',5'	CH	116,5	6,93 (d, $J=8,8$)	H-2'/H-6'		116,5
4'	C	161,5				161,5
1''	CH	103,4	5,36 (d, $J=1,6$)	H-2''		103,4
2''	CH	72,0	4,22 (dd, $J=1,6$ e $3,3$)			71,9
3''	CH	72,1	3,72 (dd, $J=3,3$ e $8,9$)			72,2
4''	CH	73,1	3,33 (m)	H-3''		73,1
5''	CH	71,8	3,32 (m)	H-6''		71,8
6''	CH_3	17,6	0,92 (d, $J=5,7$)			17,6

*Dados em CD_3OD relatados por Chen et al. (2004)

Figura 41 - Espectro de RMN ¹H do composto **3** (CD₃OD, 600 MHz)

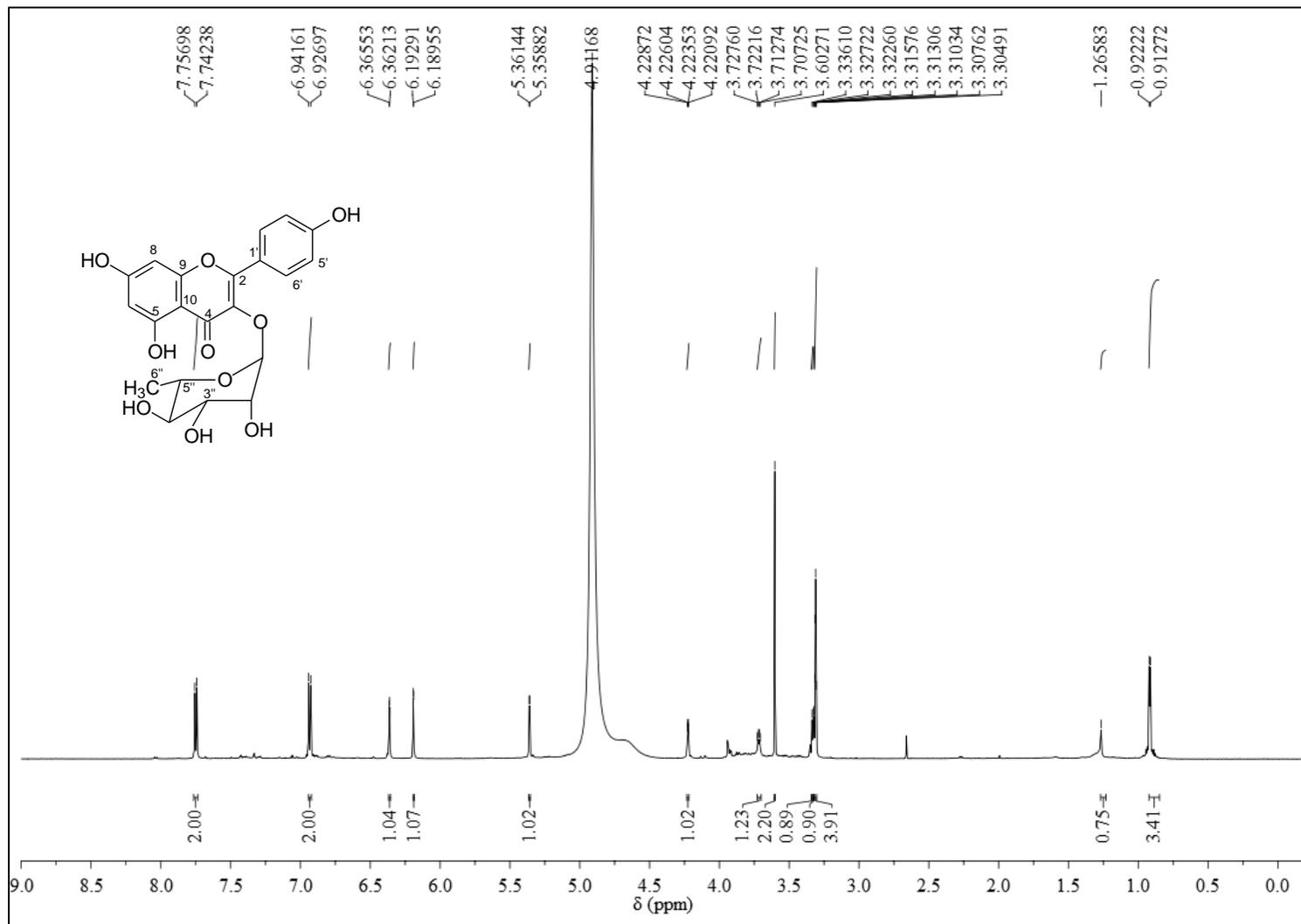


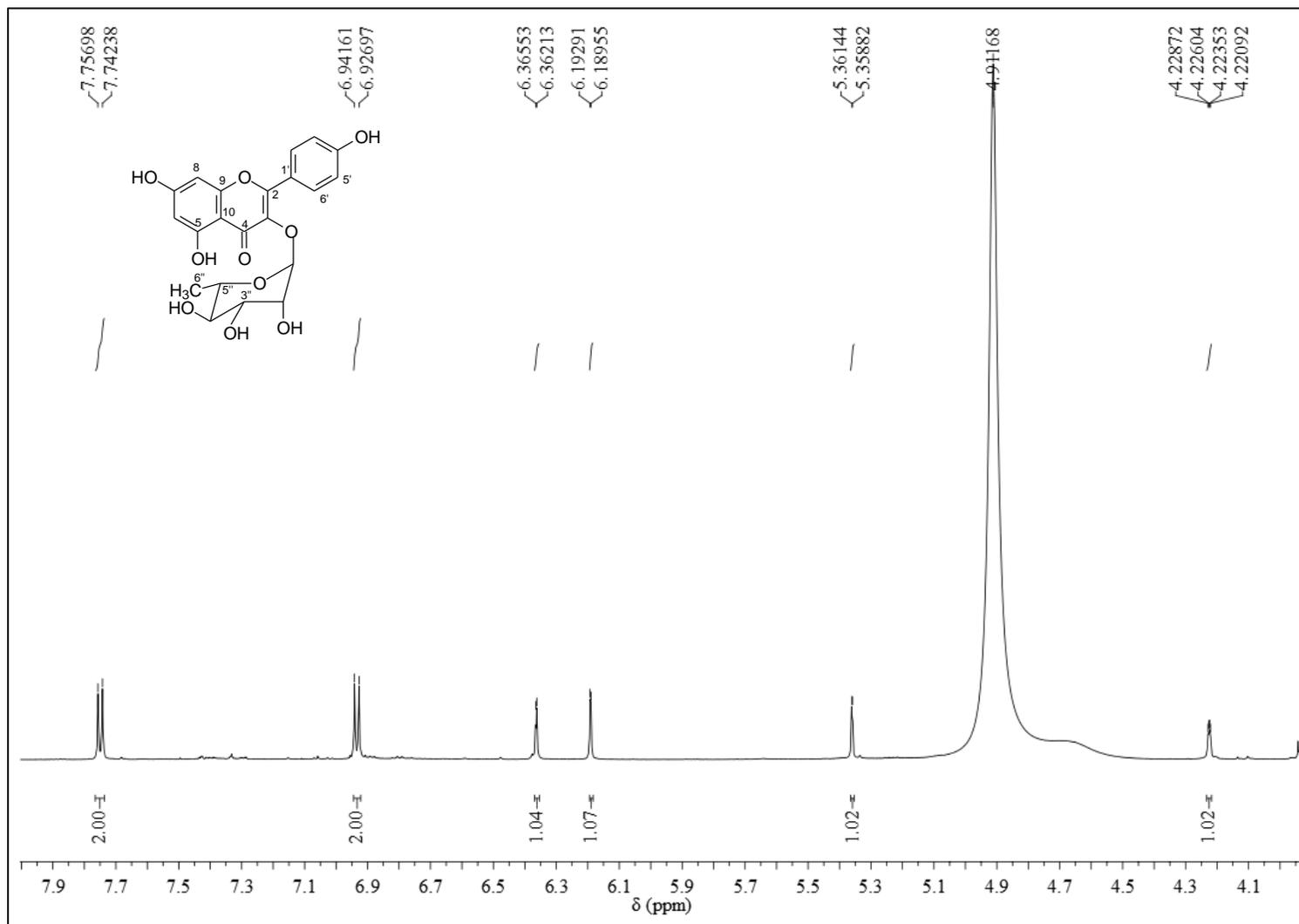
Figura 42 - Expansão (δ 4,0-8,0) do espectro de RMN ^1H do composto **3** (CD_3OD , 600 MHz)

Figura 43 - Expansão (δ 0-4,0) do espectro de RMN ^1H do composto **3** (CD_3OD , 600 MHz)

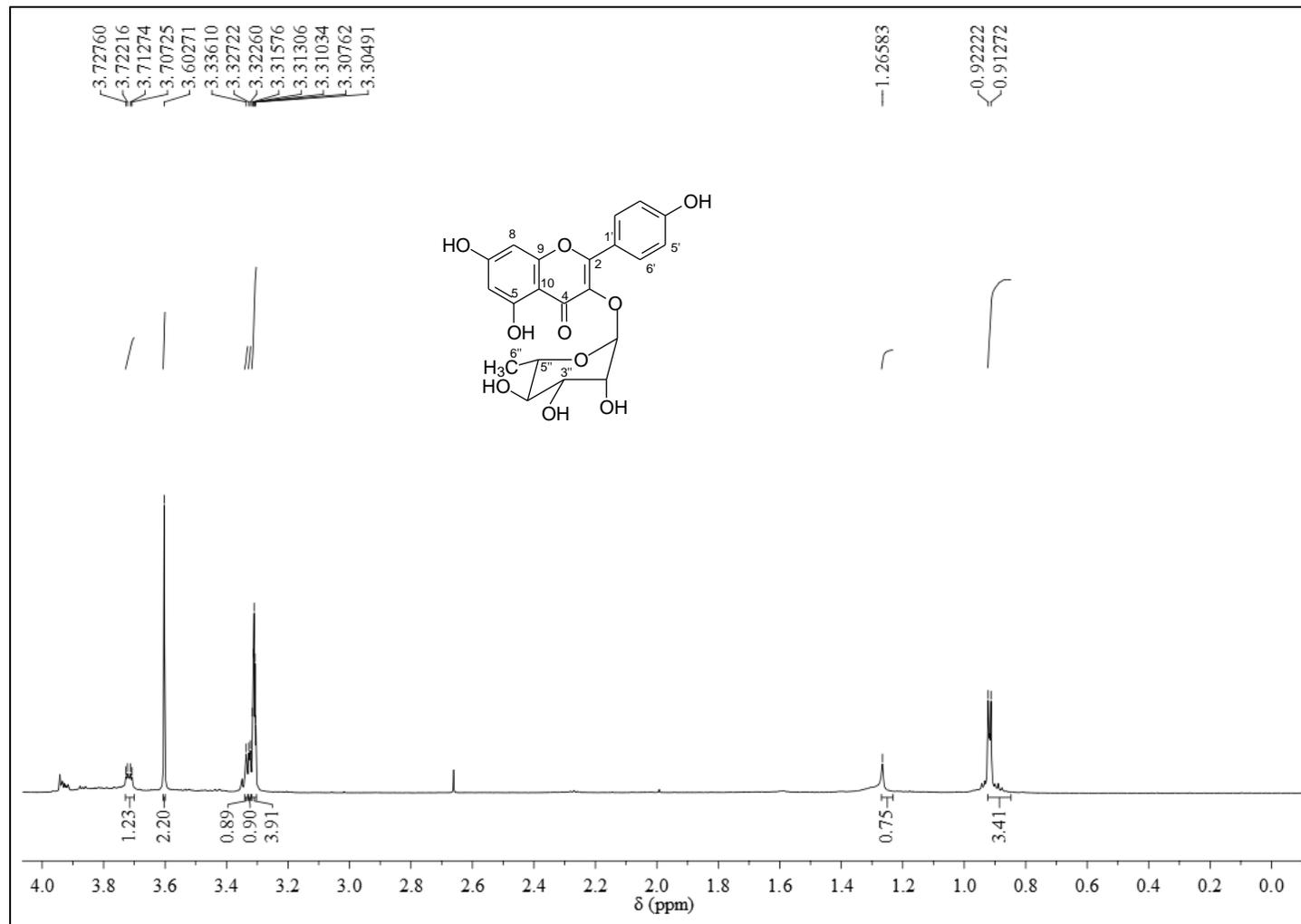


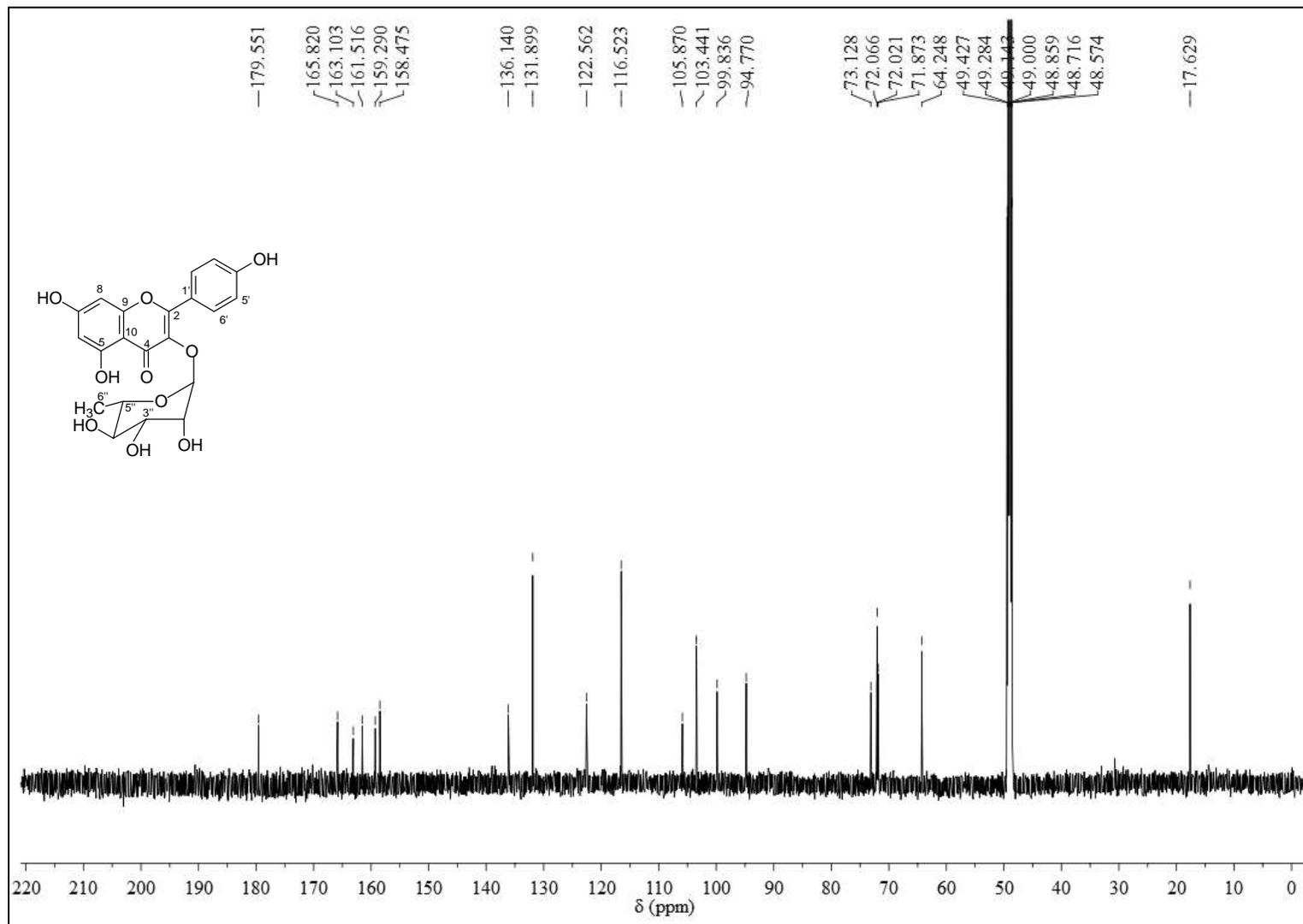
Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **3** (CD_3OD , 150 MHz)

Figura 45- Mapa de contorno COSY do composto **3** (CD₃OD, 150 MHz)

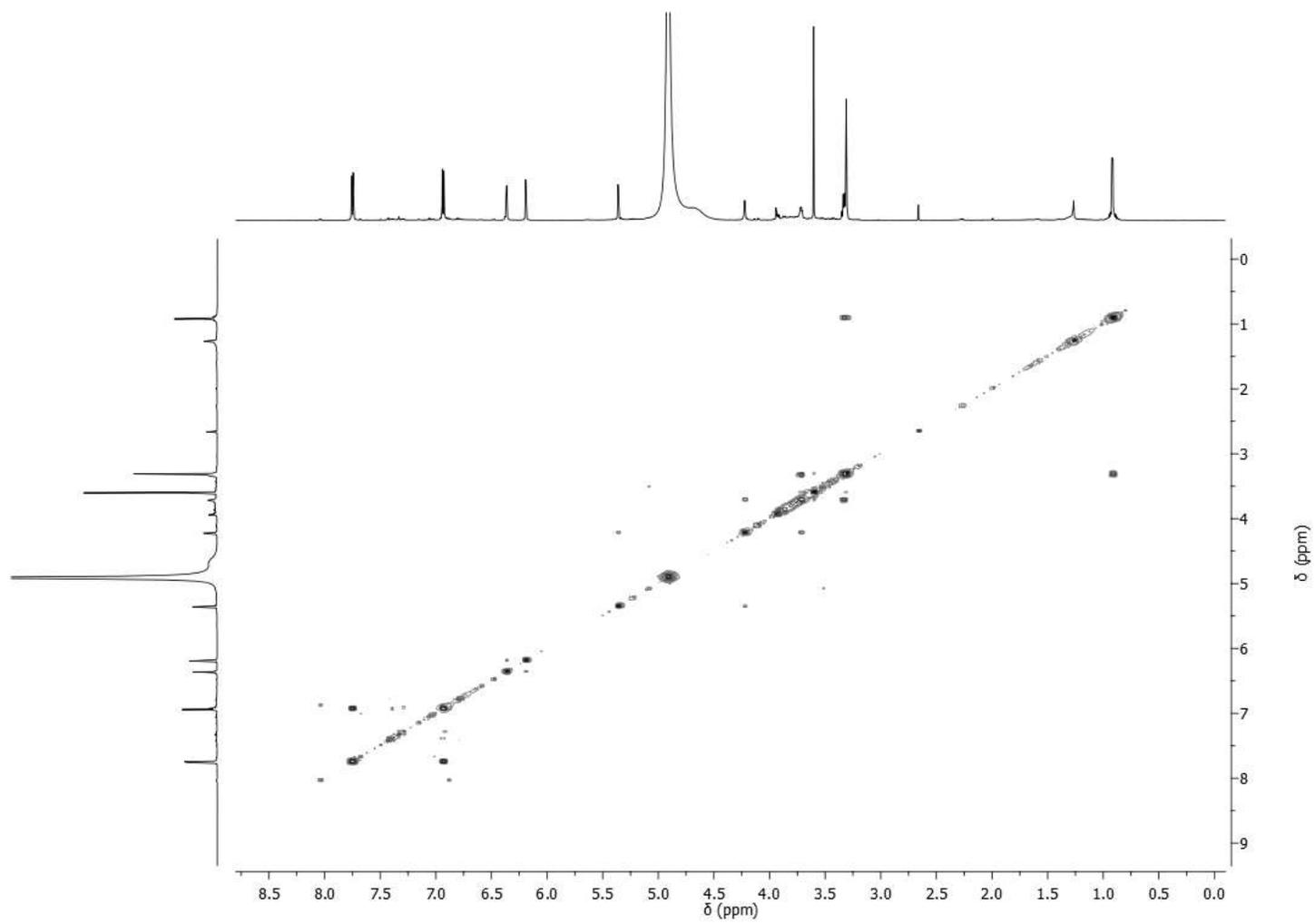


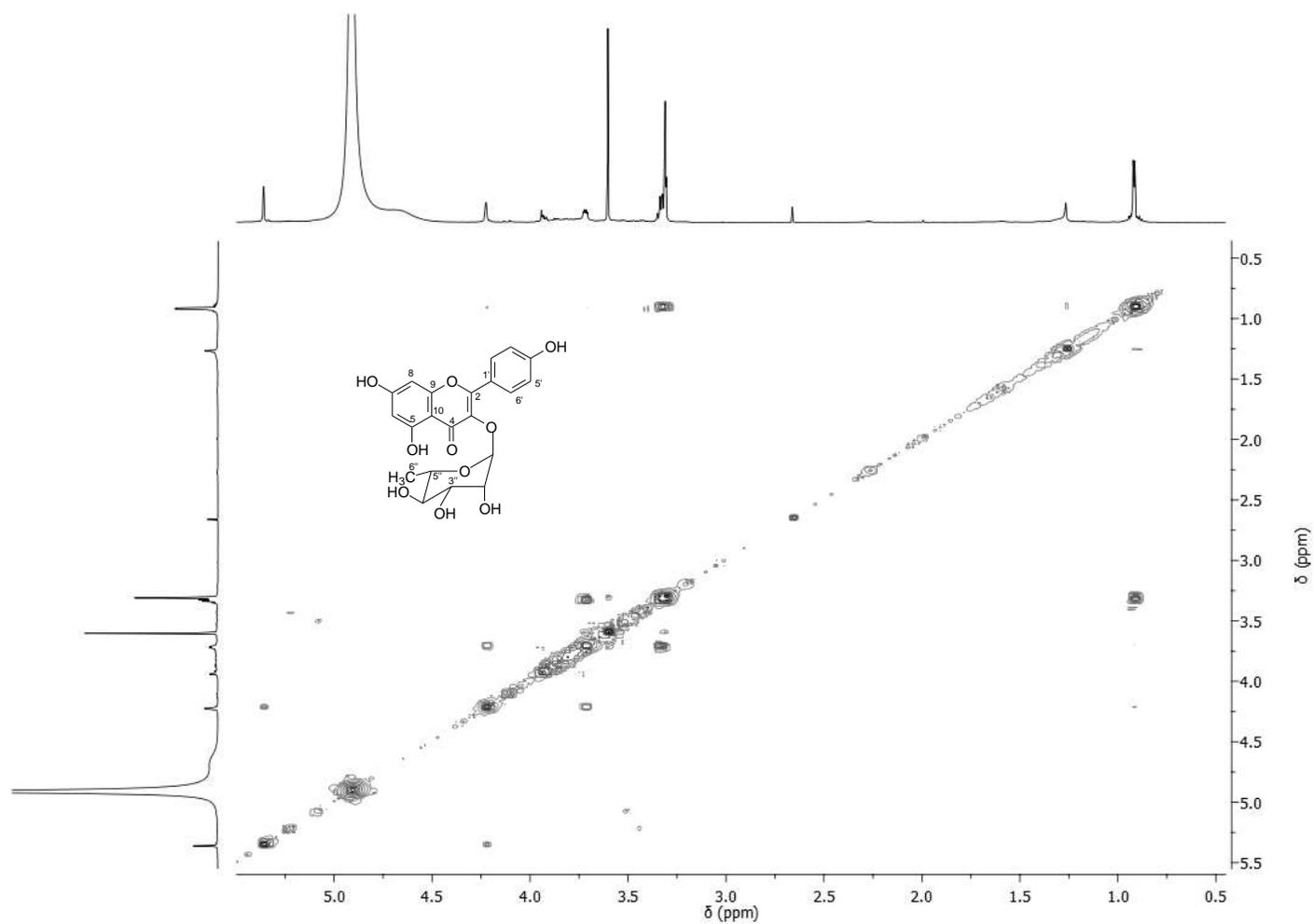
Figura 46 - Expansão do mapa de contorno COSY do composto **3** (CD₃OD, 150 MHz)

Figura 47 - Mapa de contorno HSQC do composto **3** (CD₃OD, 600 e 150 MHz)

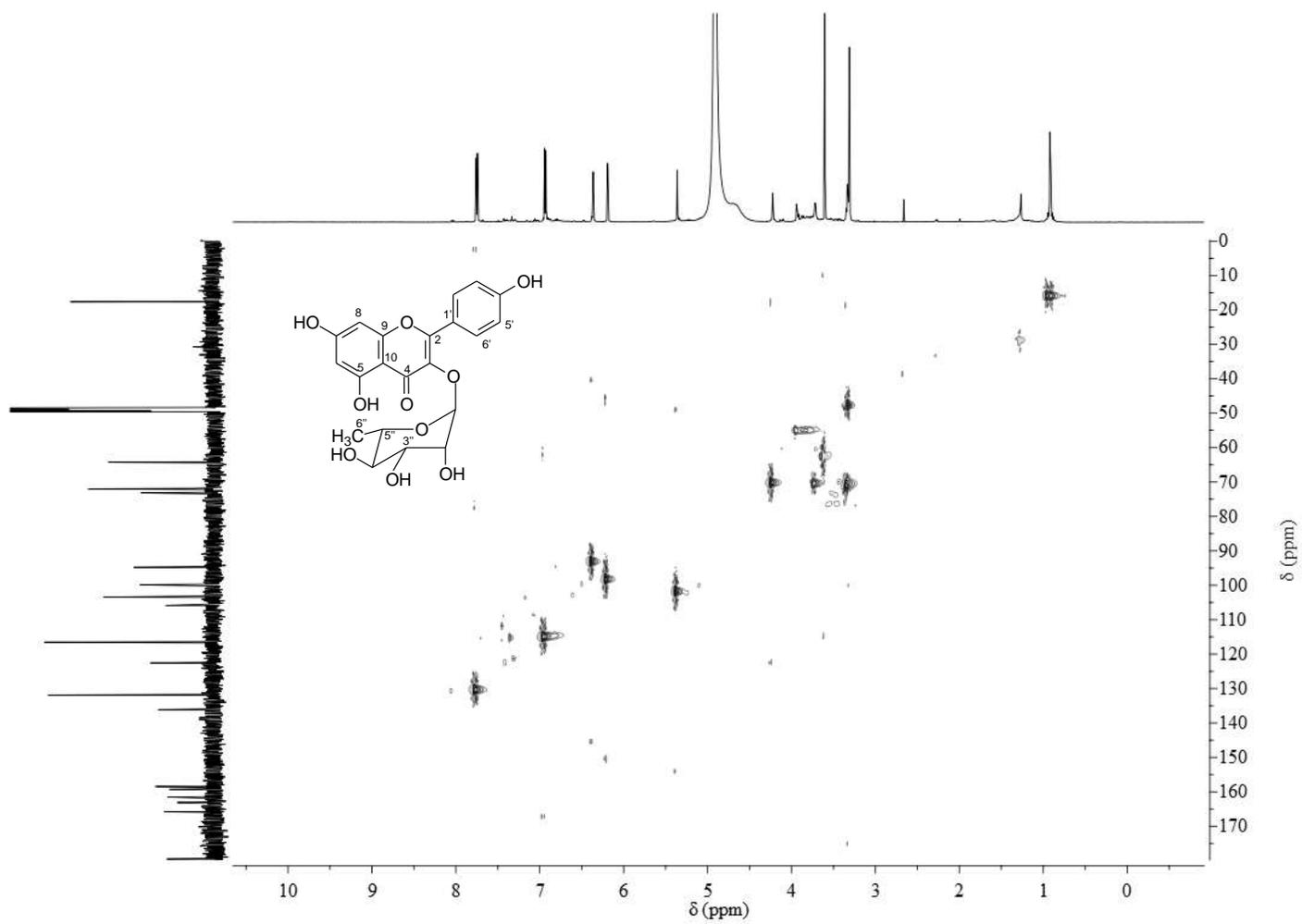


Figura 48 - Mapa de contorno HSQC do composto **3**. Expansões das regiões δ 5,2-8,1 (a) e δ 0-6,0 (b) (CD_3OD , 600 e 150 MHz)

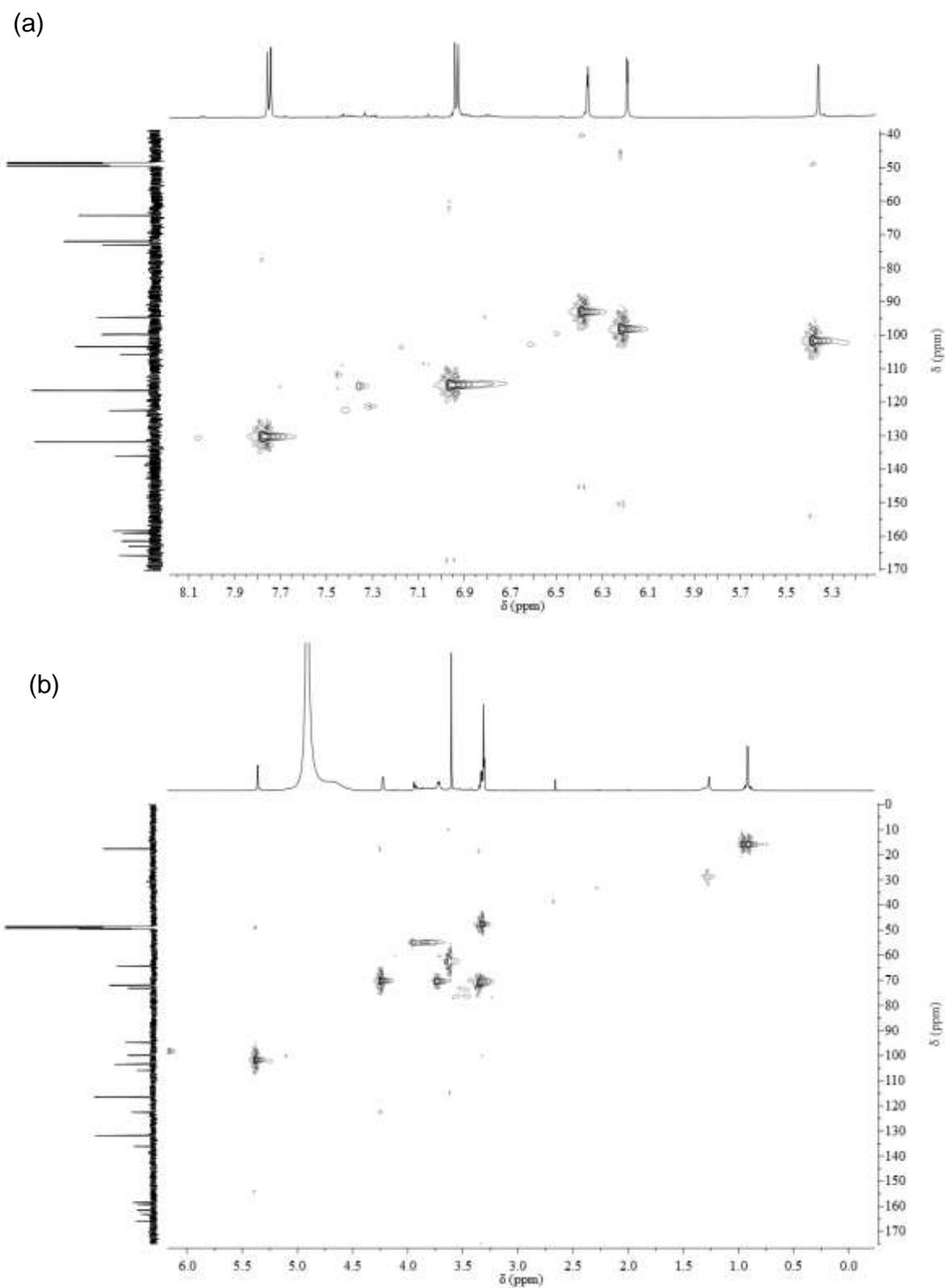


Figura 49 - Mapa de contorno HMBC do composto **3** (CD₃OD, 600 e 150 MHz)

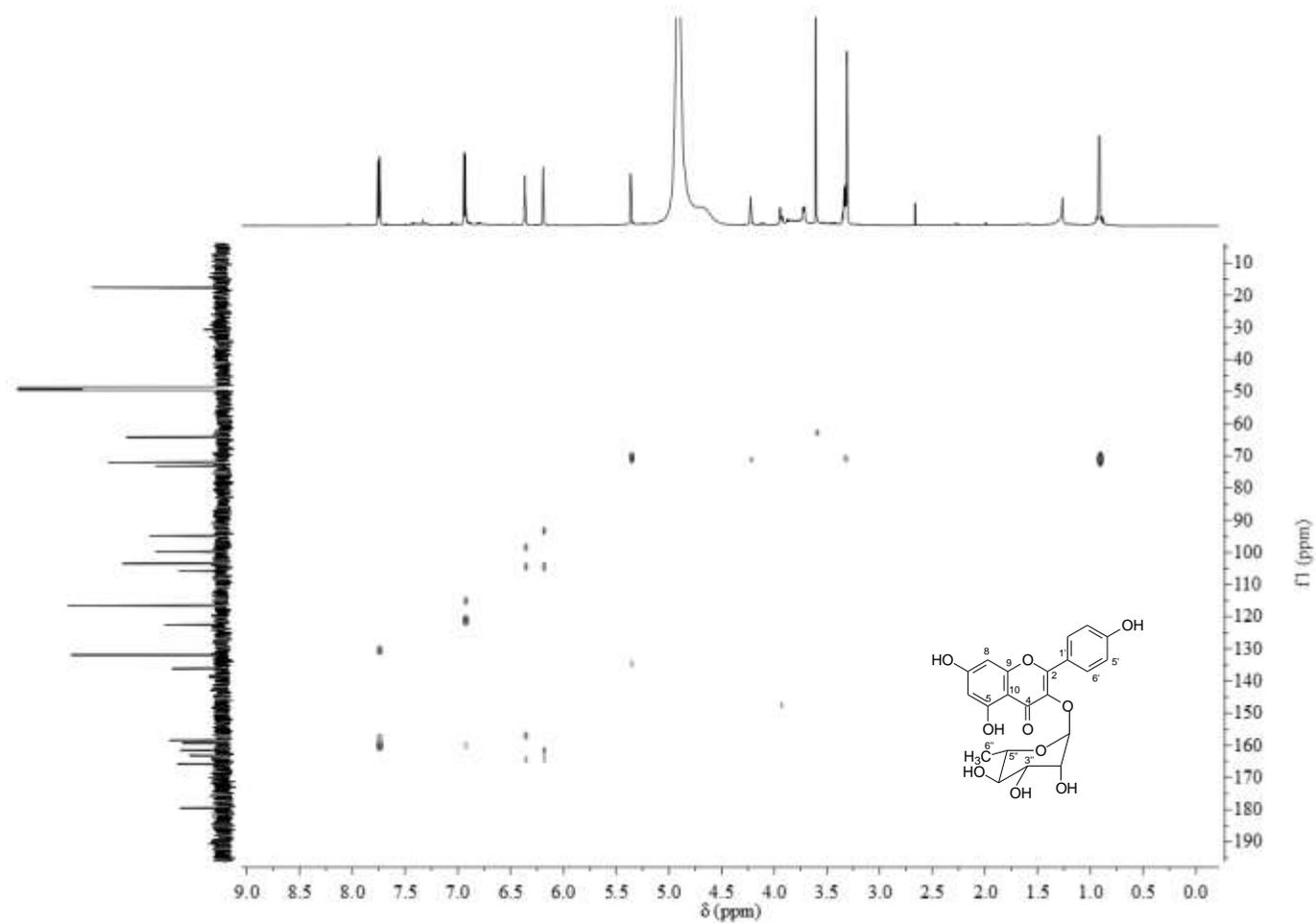
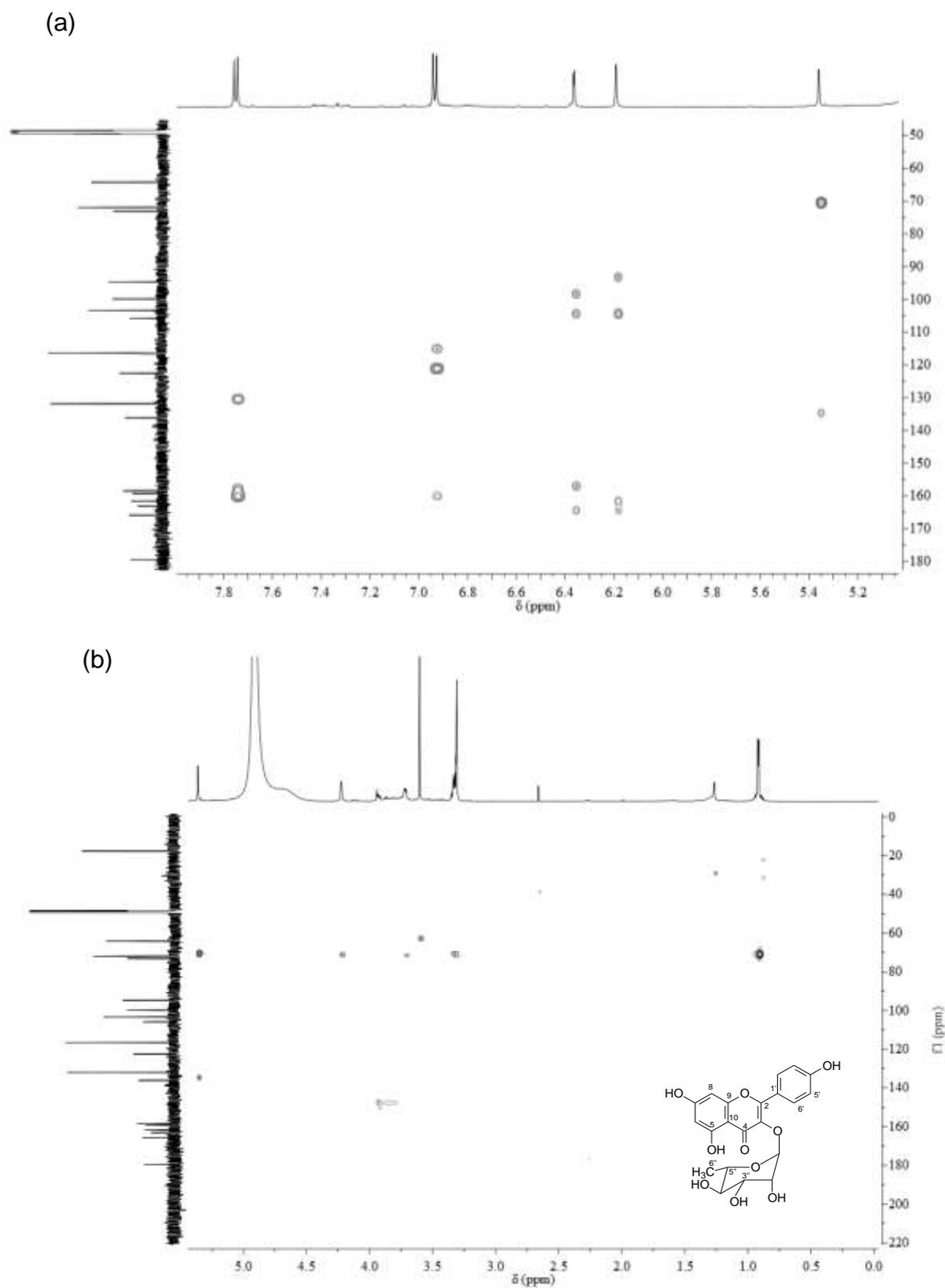
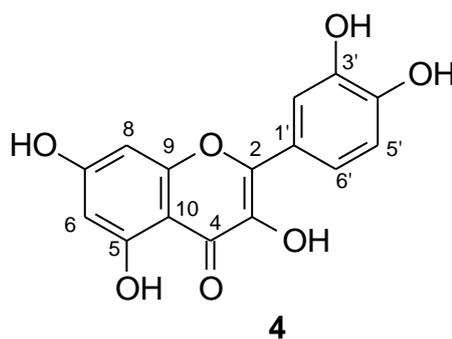


Figura 50 - Mapa de contorno HMBC do composto **3**. Expansões das regiões δ 5,0-8,2 (a) e δ 0-6,0 (b) (CD_3OD , 600 e 150 MHz)



5.3.4 Identificação estrutural do composto 4



O composto **4** (3,6 mg) foi isolado como um sólido amarelado e solúvel em DMSO, obtido do fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DF36 (Esquema 3, p. 45).

O espectro de RMN ^1H (Figura 52, Tabela 21) do composto **4** apresentou perfil característico de flavonoides, com dois simpletos largos em δ_{H} 6,18 e 6,40, atribuídos a H-6 e H-8 do anel A. O sinal em δ_{H} 12,48 foi atribuído ao hidrogênio da hidroxila em C-5, que se encontra desblindado pela quelação com a carbonila em C-4. O padrão 1,3,4-trissubstituído para o anel B foi definido pelos sinais em δ_{H} 7,67 (sl), 6,88 (d, $J=8,4$) e 7,54 (dl, $J=8,4$) referentes a H-2', H-5' e H-6', respectivamente.

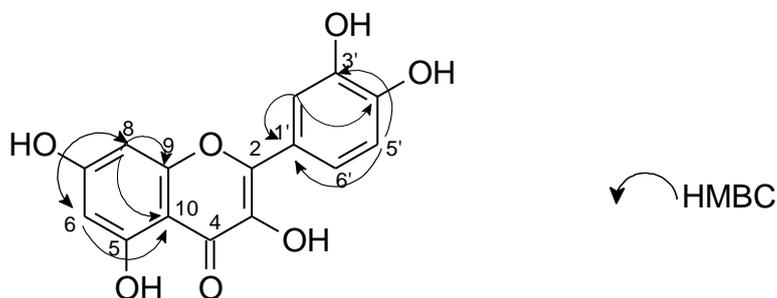
O espectro de RMN ^{13}C (Figura 53, Tabela 21) mostrou 15 sinais. Os sinais em δ_{C} 98,3 e 93,5 foram atribuídos a C-6 e C-8, respectivamente. Os sinais de carbonos metínicos em 115,1 (C-2'), 115,7 (C-5') e 120,1 (C-6') confirmaram a existência do padrão 1,3,4-trissubstituído para o anel B. O sinal em δ_{C} 175,9 foi atribuído a carbonila em C-4.

O mapa de contorno HSQC (Figuras 54 e 55; Tabela 21) apresentou correlações dos hidrogênios aos respectivos carbonos. As correlações observadas foram de H-6 (δ_{H} 6,18) com C-6 (δ_{C} 98,3), H-8 (δ_{H} 6,40) com C-8 (δ_{C} 93,5), H-2' (δ_{H} 7,67) com C-2' (δ_{C} 115,1), H-5' (δ_{H} 6,88) com C-5' (δ_{C} 115,7) e de H-6' (δ_{H} 7,54) com C-6' (δ_{C} 120,1).

O mapa de contorno HMBC (Figuras 56 e 57; Tabela 21) apresentou correlações à longa distância de H-6 (δ_{H} 6,18) com C-5 (δ_{C} 160,8), C-7 (δ_{C} 164,2), C-8 (δ_{C} 93,5) e C-10 (δ_{C} 103,0), de H-8 (δ_{H} 6,40) com C-6 (δ_{C} 98,3), C-7 (δ_{C} 164,2), C-9 (δ_{C} 156,2) e C-10 (δ_{C} 103,0), de H-2' (δ_{H} 7,67) com C-1' (δ_{C} 122,0) e C-4' (δ_{C} 147,8),

de H-5' (δ_H 6,88) com C-1' (δ_C 122,0), C-3' (δ_C 145,2) e C-4' (δ_C 147,8) e de H-6' (δ_H 7,54) com C-4' (δ_C 147,8) e C-5' (δ_C 115,7).

Figura 51 - Principais correlações HMBC do composto **4**



Os dados de RMN 1H , ^{13}C , HSQC e HMBC obtidos para o composto **4** com os relatados por Agrawal (1998) (Tabela 21), permitiram identificar o flavonoide quercetina. Este é o primeiro relato do isolamento de quercetina na família Simaroubaceae.

A quercetina (**4**) apresenta atividades antioxidante (SEIFI-JAMADI et al., 2017), antitumoral (LI et al., 2017), anti-inflamatória, imunossupressora (HALEAGRAHARA et al., 2017), neuroprotetora (MESRAM et al., 2017), mutagênica (BJELDANES e CHANG, 1977), antiproliferativa (BOOTS, HAENEN e BAST, 2008), dentre outras.

Tabela 21 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (600 e 150 MHz, δ/ppm , J/Hz , DMSO- d_6) do composto **4**

C	Tipo de carbono	4		Quercetina
		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	
2	C	146,8		146,9
3	C	135,8		135,8
4	C=O	175,9		175,9
5	C	160,8		160,8
6	CH	98,3	6,18 (sl)	98,3
7	C	164,2		164,0
8	CH	93,5	6,40 (sl)	93,5
9	C	156,2		156,2
10	C	103,0		103,1
1'	C	122,0		122,1
2'	CH	115,1	7,67 (sl)	115,2
3'	C	145,2		145,1
4'	C	147,8		147,7
5'	CH	115,7	6,88 (d, $J=8,4$)	115,7
6'	CH	120,1	7,54 (dl, $J=8,4$)	120,1
OH-5	-	-	12,48 (sl)	-

*Dados em DMSO- d_6 relatados por Agrawal (1998)

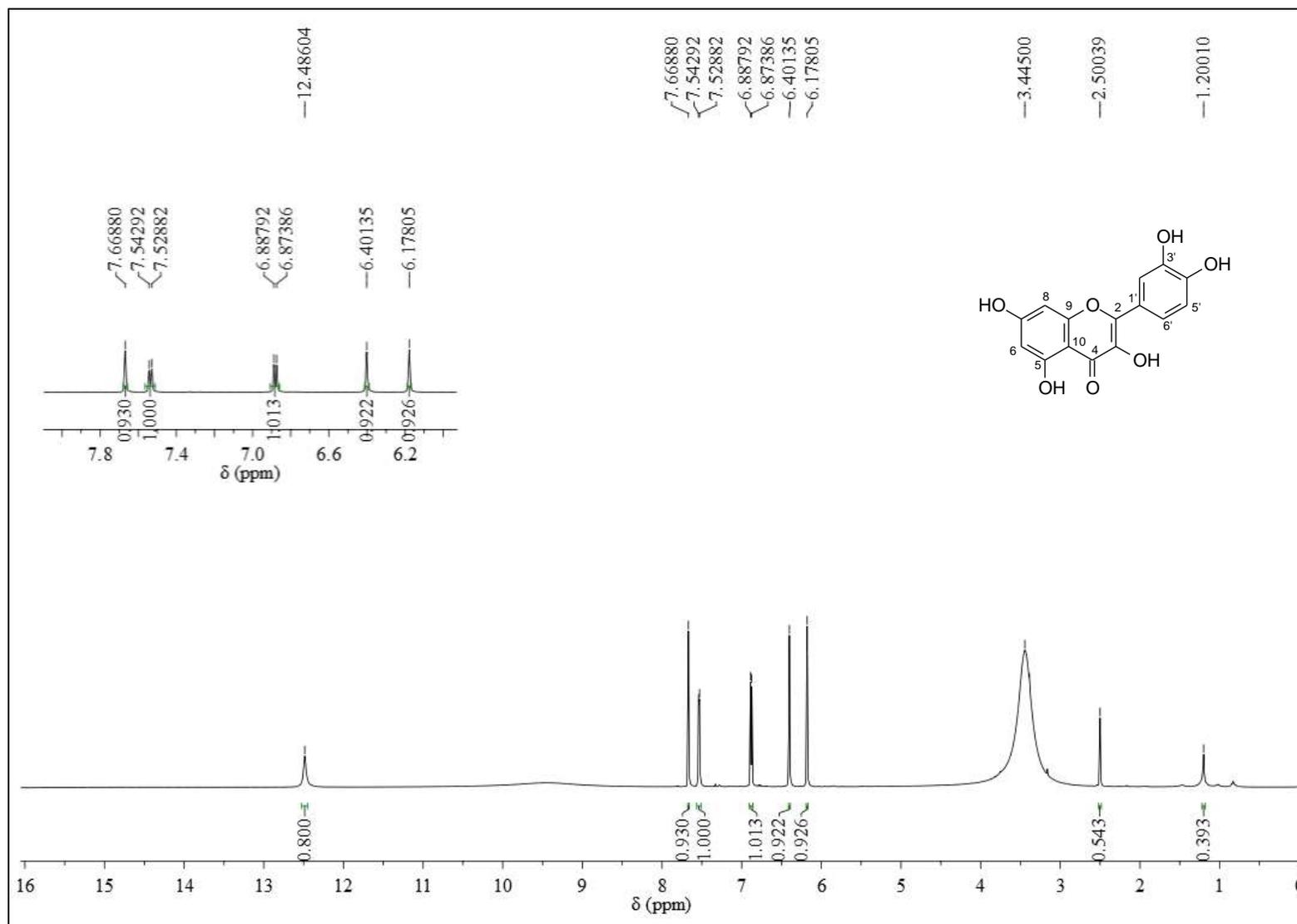
Figura 52 - Espectro de RMN ^1H do composto 4 (DMSO- d_6 , 600 MHz)

Figura 53 - Espectro de RMN ^{13}C do composto 4 (DMSO- d_6 , 150 MHz)

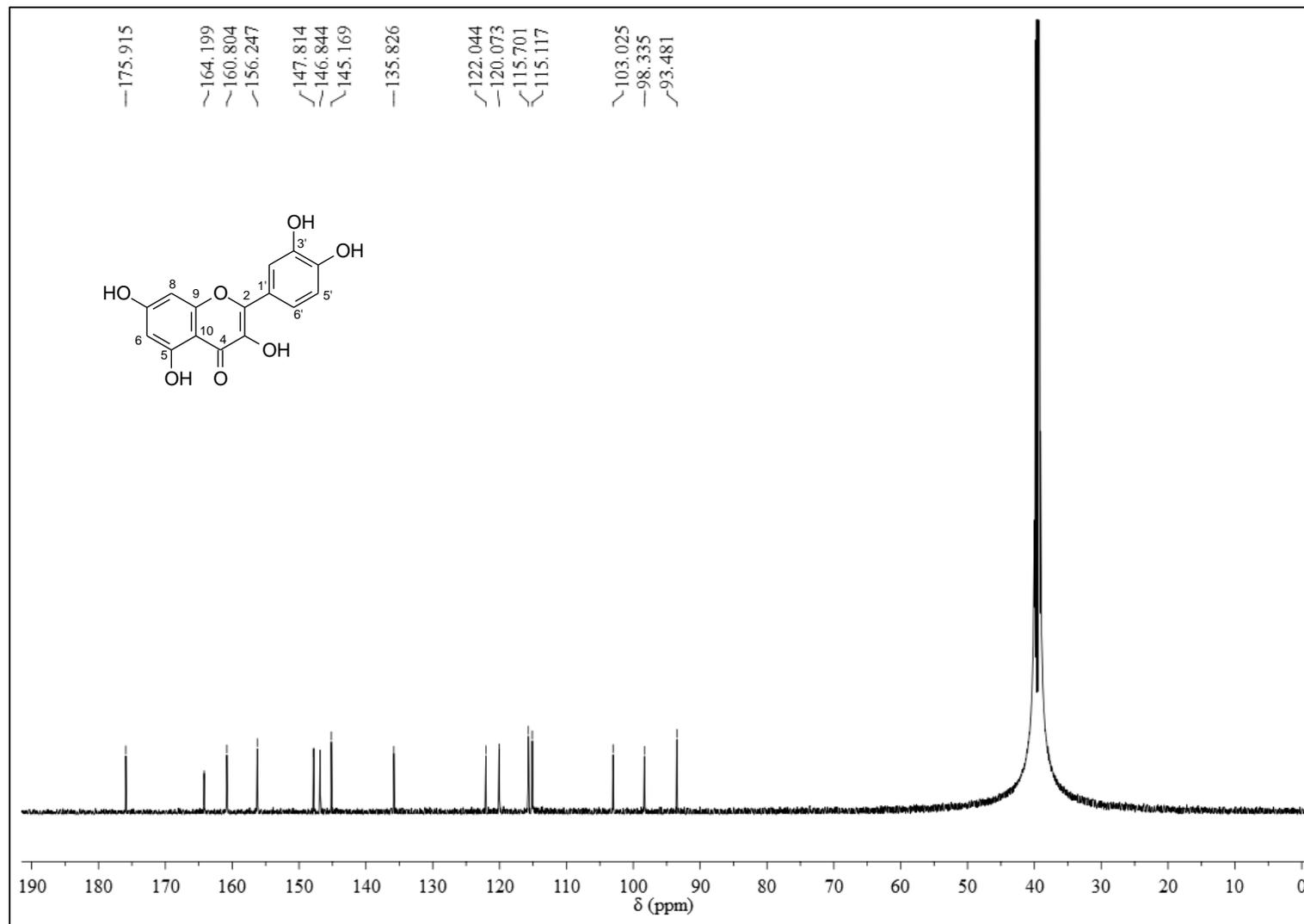


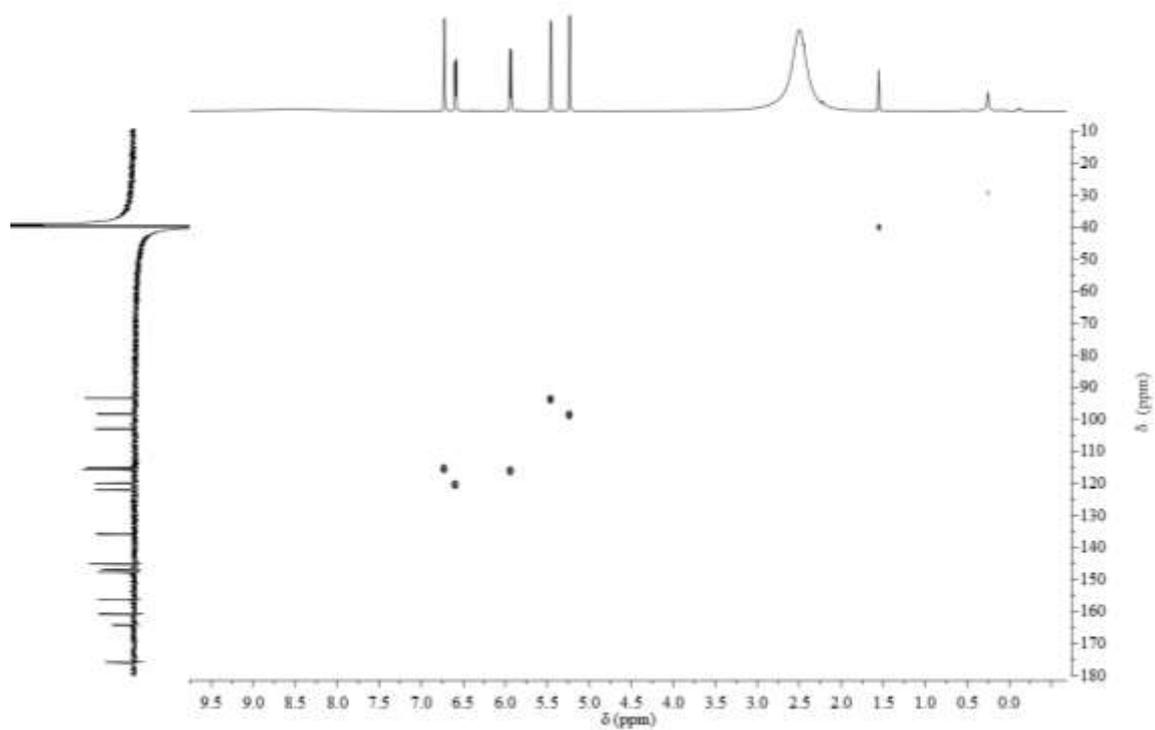
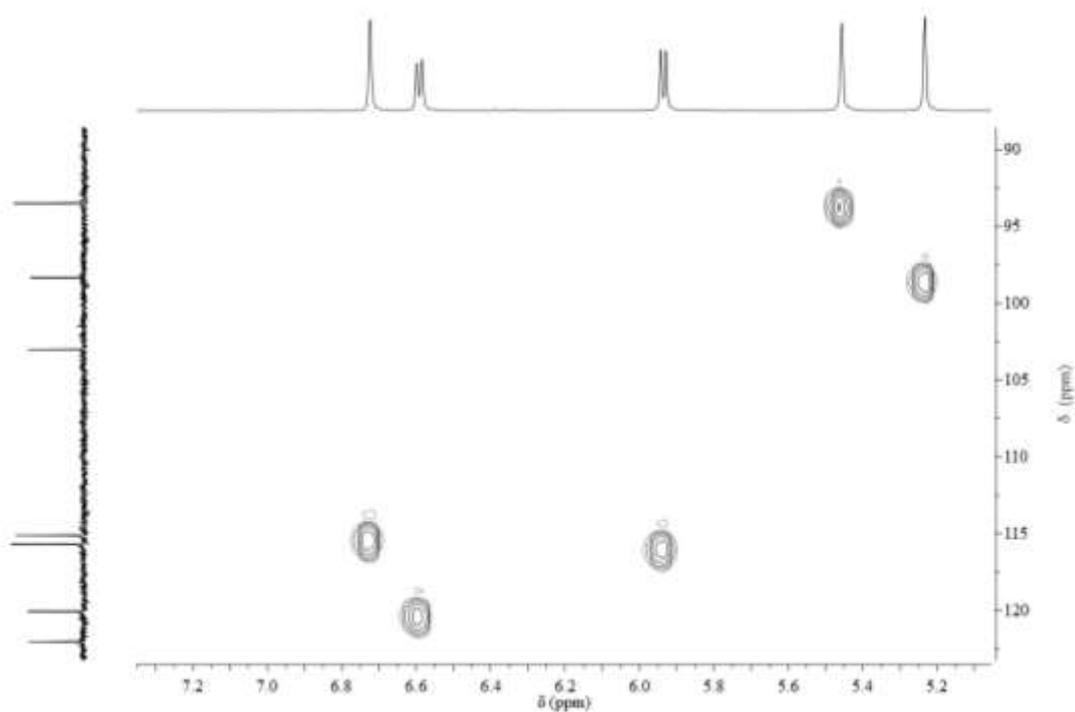
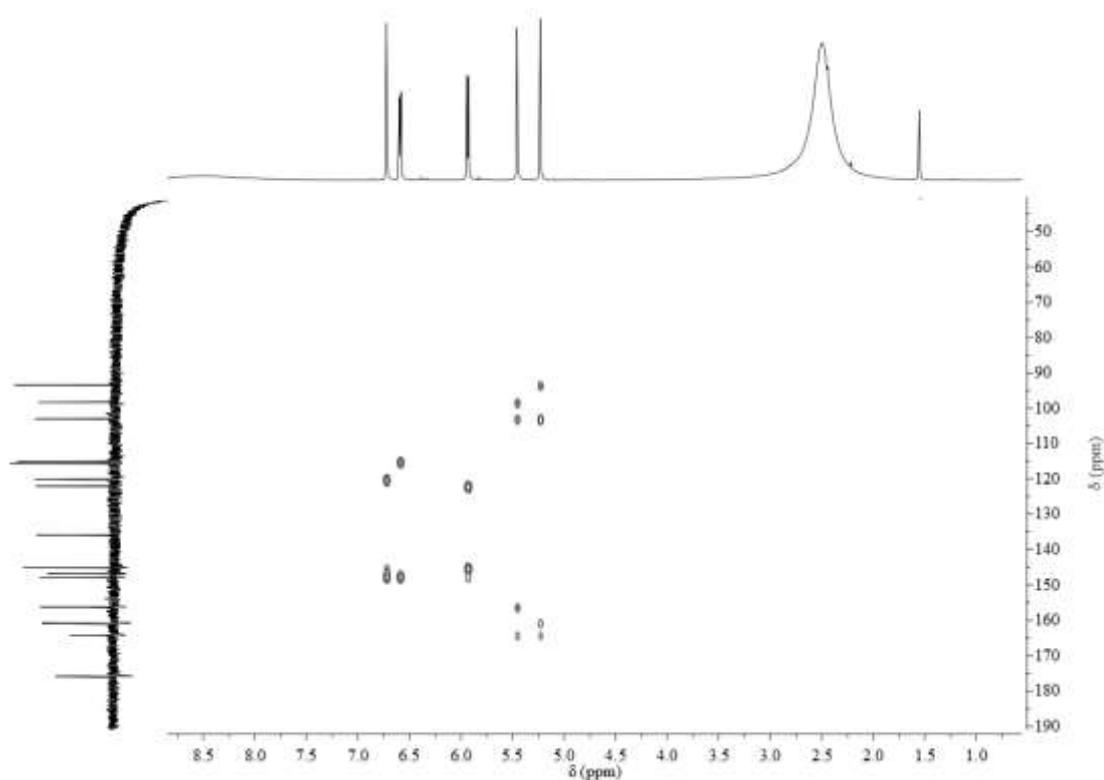
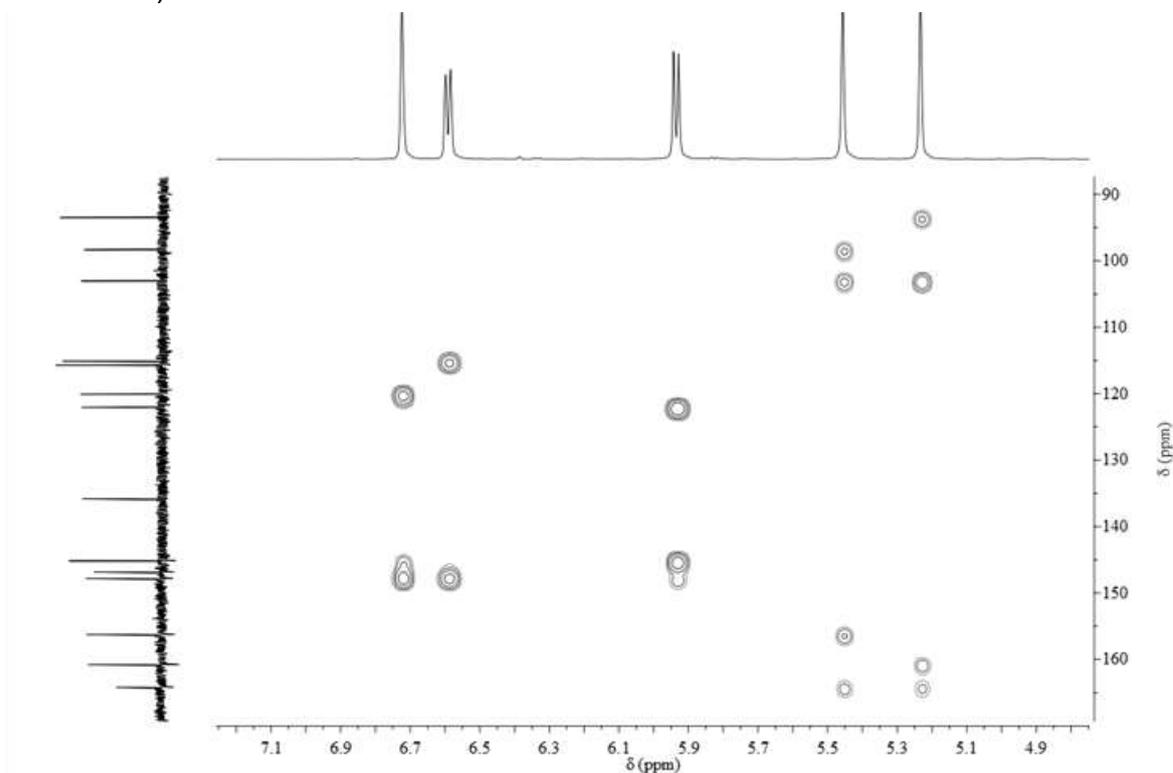
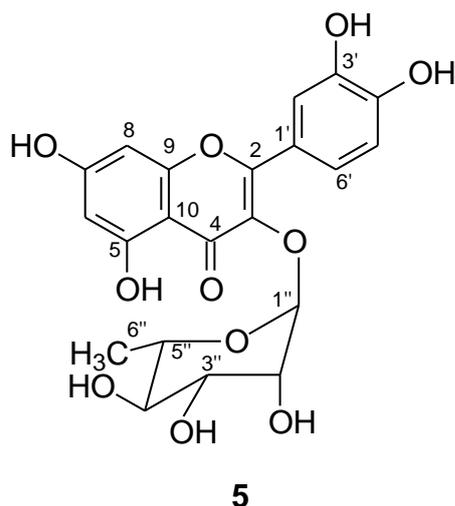
Figura 54 - Mapa de contorno HSQC do composto **4** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz)Figura 55 - Expansão do mapa de contorno HSQC do composto **4** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz)

Figura 56 - Mapa de contorno HMBC do composto **4** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz)Figura 57 - Expansão do mapa de contorno HMBC do composto **4** (DMSO- d_6 , 600 e 150 MHz)

5.3.5 Identificação estrutural do composto 5



O composto **5** (50,0 mg) foi isolado como um sólido amarelado e solúvel em metanol obtido do fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 do grupo PS-46 (Esquema 2, p. 36).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto **5** apresentaram perfis característicos de flavonoides glicosilados evidenciados pela presença de sinais entre δ_{H} 3,2-4,2 e δ_{C} 71,9-73,2 referentes a presença de açúcar e entre δ_{H} 6,14-7,29 correspondentes aos hidrogênios de anel aromático.

O espectro de RMN ^1H (Figuras 58-60, Tabela 22) apresentou um duplete em δ_{H} 5,30 ($J=1,4$ Hz) característico de hidrogênio de carbono anomérico em açúcar com configuração α e um duplete em δ_{H} 0,90 ($J=6,1$ Hz) referente a hidrogênio de carbono metílico, sugerindo a presença de unidade α -L-ramnosídica. Os dupletos em δ_{H} 6,14 e 6,30 ($J=2,0$ Hz) característicos de hidrogênios posicionados *meta* foram atribuídos a H-6 e H-8 do anel A, respectivamente. Os sinais em δ_{H} 7,29 (d, $J=2,0$ Hz), 7,25 (dd, $J=2,0$ Hz e 8,3 Hz) e 6,86 (d, $J=8,3$ Hz) referentes aos H-2', H-6', H-5' definiram o padrão 1,3,4-trissubstituído para o anel B.

Os espectros de RMN ^{13}C , DEPT 135° e 90° (Figuras 61-63, Tabela 22) evidenciaram a presença de 21 sinais, sendo quinze referentes à aglicona e seis a uma unidade de açúcar. O sinal em δ_{C} 179,6, característico de carbonila, é referente à C-4. Os sinais em δ_{C} 17,6 do carbono metílico (C-6''), entre δ_{C} 71,9-73,2, atribuídos a quatro carbonos metínicos (C-2'' a C-5'') e em δ_{C} 103,5 característico de carbono anomérico (C-1'') confirmaram a presença da unidade α -L-ramnosídica

As análises de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135° e DEPT 90° (Figuras 58-63) e comparação com dados descritos na literatura (ALBUQUERQUE et al., 2014; LU; HU; XIA, 2010) permitiram identificar o composto **5** como sendo o flavonoide quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo, também conhecida como quercitrina. Noldin et al. (2005), em um estudo com as folhas de *S. ferruginea* isolou e identificou esta substância na fração acetato de etila.

A quercitrina (**5**) apresenta atividade antioxidante (ARTANTI; MA'ARIFA; HANAFI, 2006), fototóxica (WILHELM et al., 2001), antibacteriana (ARIMA et al.; 2002), neuroprotetora (MA et al., 2015), leishmanicida (SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012), anticancerígena (CINCIN et al., 2014), anti-inflamatória (CAMUESCO et al., 2006) e apresenta ação protetora da pele contra danos oxidativos induzidos por exposição à radiação UVB (YIN et al., 2013).

Tabela 22 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, δ /ppm, J/Hz, CD_3OD) do composto **5**

C	Tipo de carbono	5		Quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo*
		δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)	
2	C	158,4		158,4
3	C	136,2		136,2
4	C=O	179,6		179,6
5	C	163,1		163,1
6	CH	99,8	6,14 (d, $J = 2,0$)	99,8
7	C	165,8		165,8
8	CH	94,7	6,30 (d, $J = 2,0$)	94,7
9	C	159,2		159,2
10	C	105,8		105,8
1'	C	122,9		122,9
2'	CH	116,9	7,29 (d, $J = 2,0$)	116,9
3'	C	146,3		146,3
4'	C	149,7		149,7
5'	CH	116,3	6,86 (d, $J = 8,3$)	116,3
6'	CH	122,8	7,25 (dd, $J = 8,3$ e $2,0$)	122,8
1''	CH	103,5	5,30 (d, $J = 1,4$)	103,5
2''	CH	71,9	4,19 (dd, $J = 1,4$ e $3,4$)	71,8
3''	CH	72,1	3,71 (dd, $J = 3,4$ e $9,3$)	72,1
4''	CH	73,2	3,27 (m)	73,2
5''	CH	72,0	3,38 (m)	72,0
6''	CH_3	17,6	0,90 (d, $J = 6,1$)	17,6

*Dados em CD_3OD relatados por Albuquerque et al. (2014)

Figura 58 - Espectro de RMN ¹H do composto **5** (CD₃OD, 400 MHz)

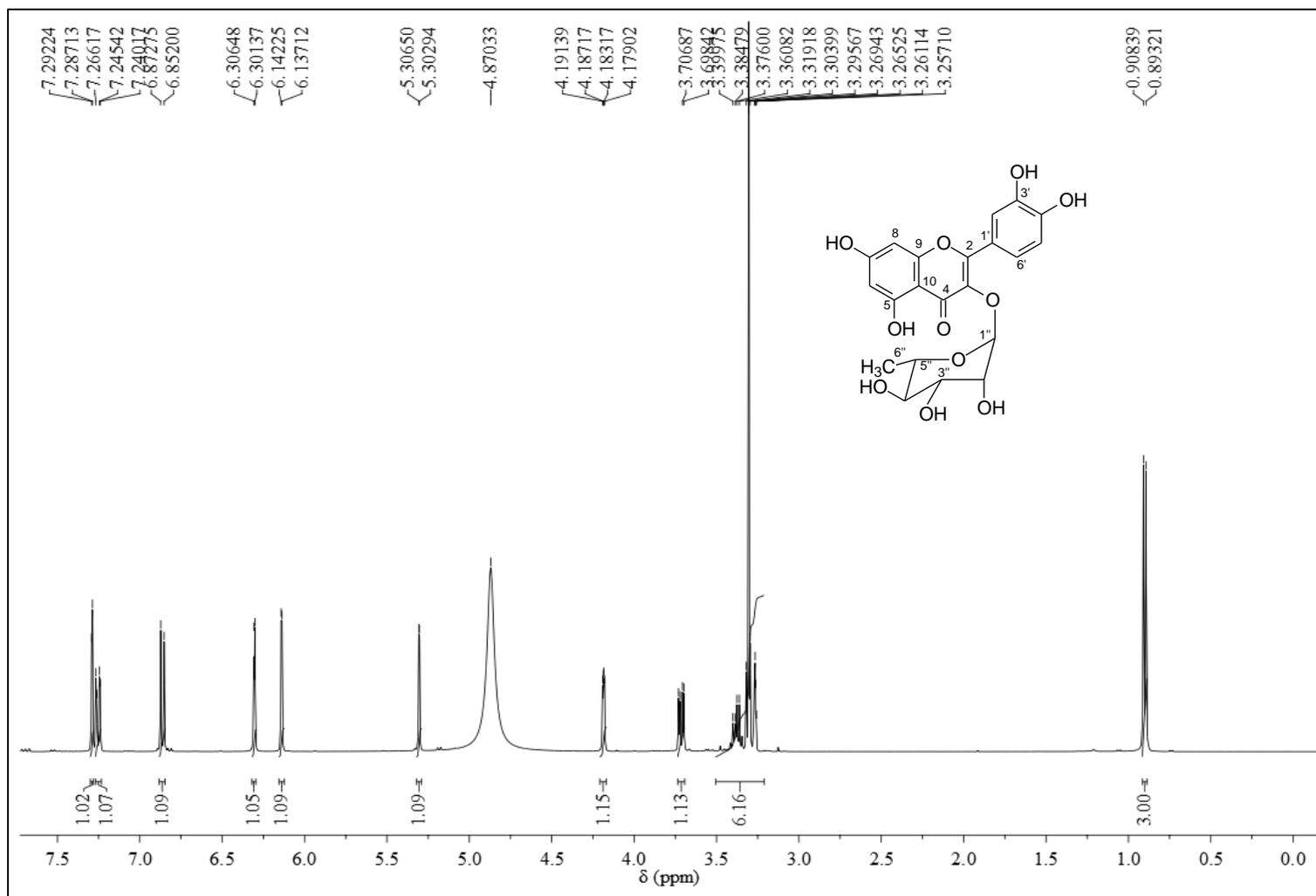


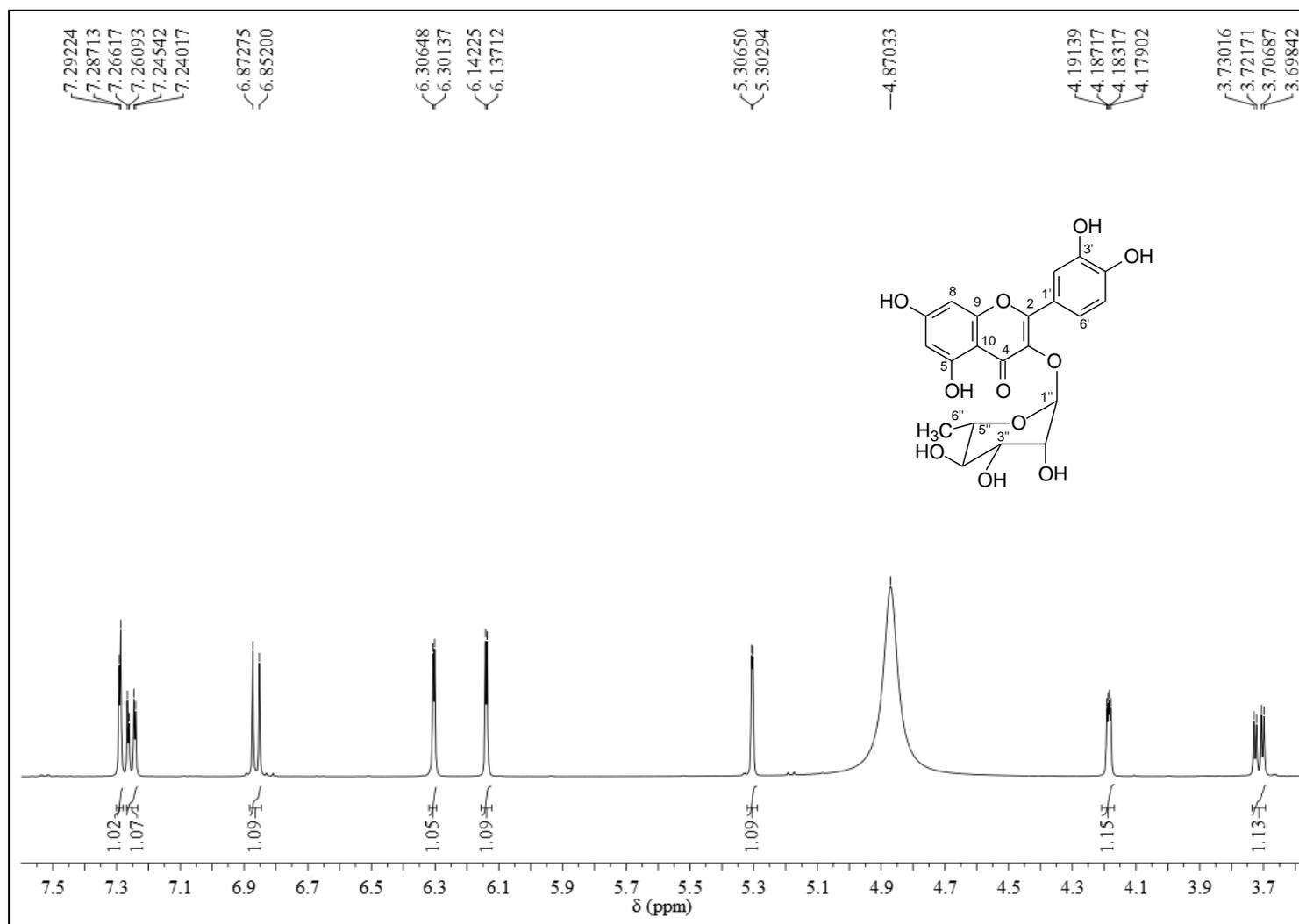
Figura 59 - Expansão (δ 3,6-7,5) do espectro de RMN ^1H do composto **5** (CD_3OD , 400 MHz)

Figura 60 - Expansão (δ 4,3-2,9) do espectro de RMN ^1H do composto **5** (CD_3OD , 400 MHz)

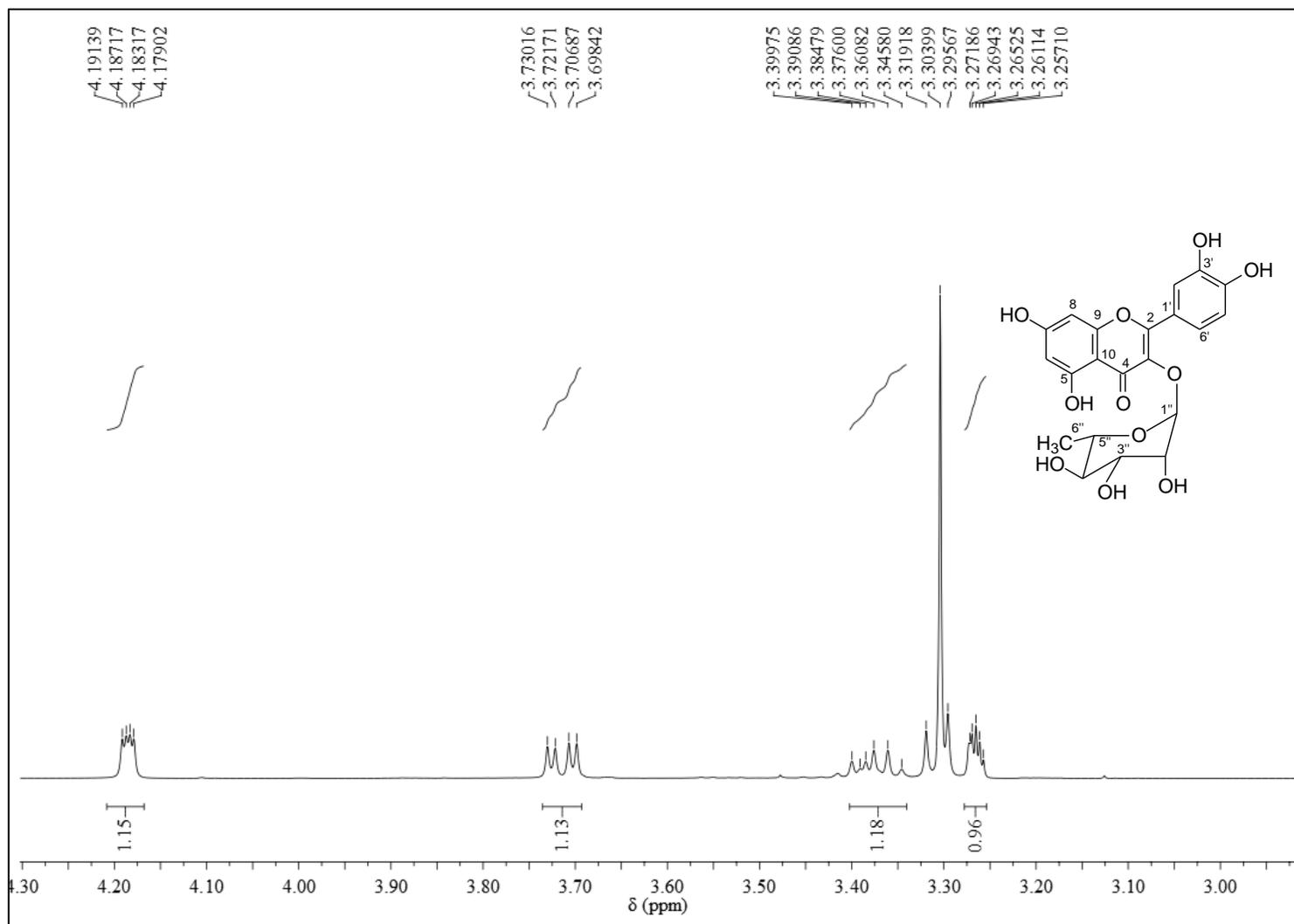


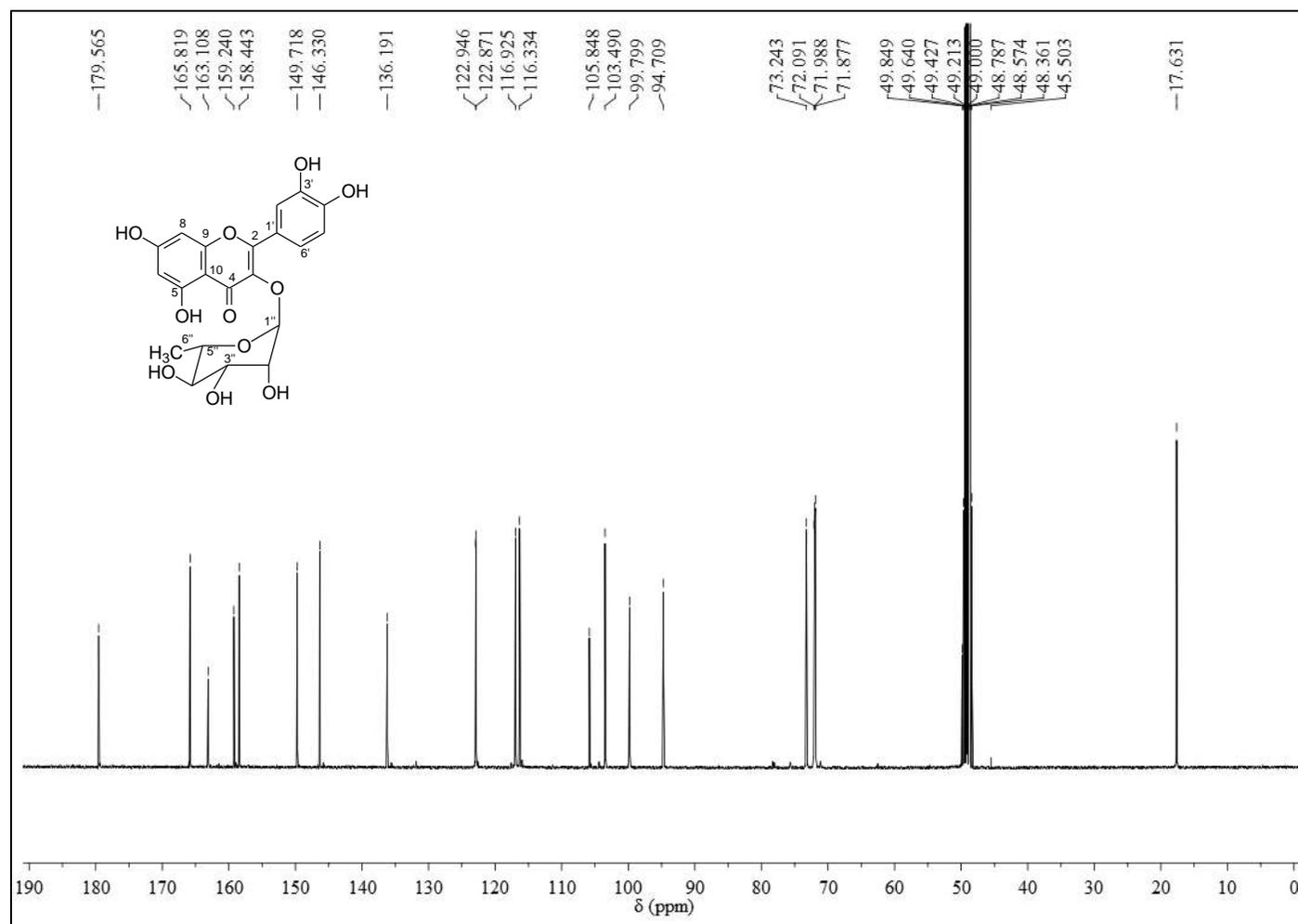
Figura 61 - Espectro RMN de ^{13}C do composto **5** (CD_3OD , 100 MHz)

Figura 62 - DEPT 135° do composto **5** (CD₃OD, 100 MHz)

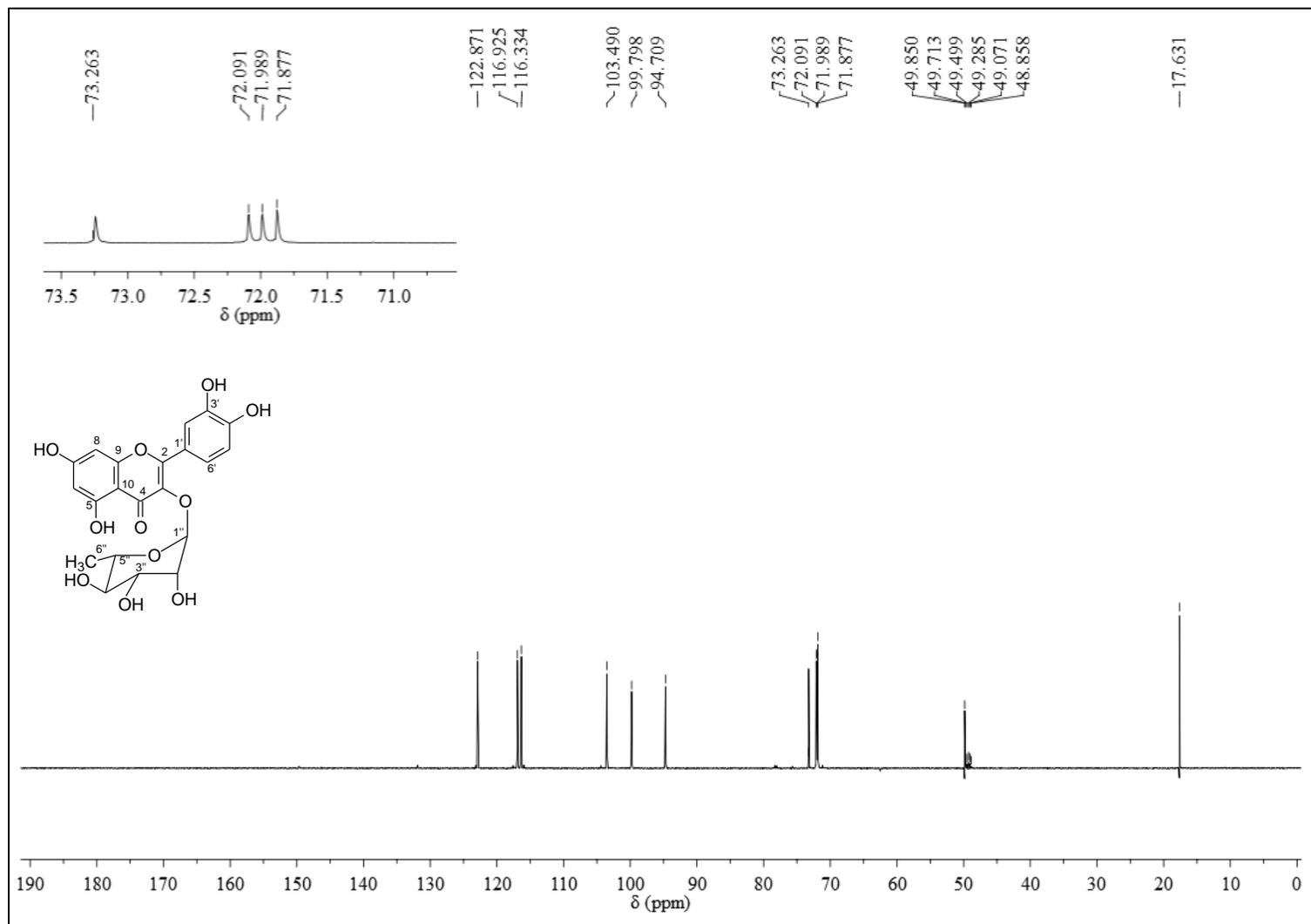
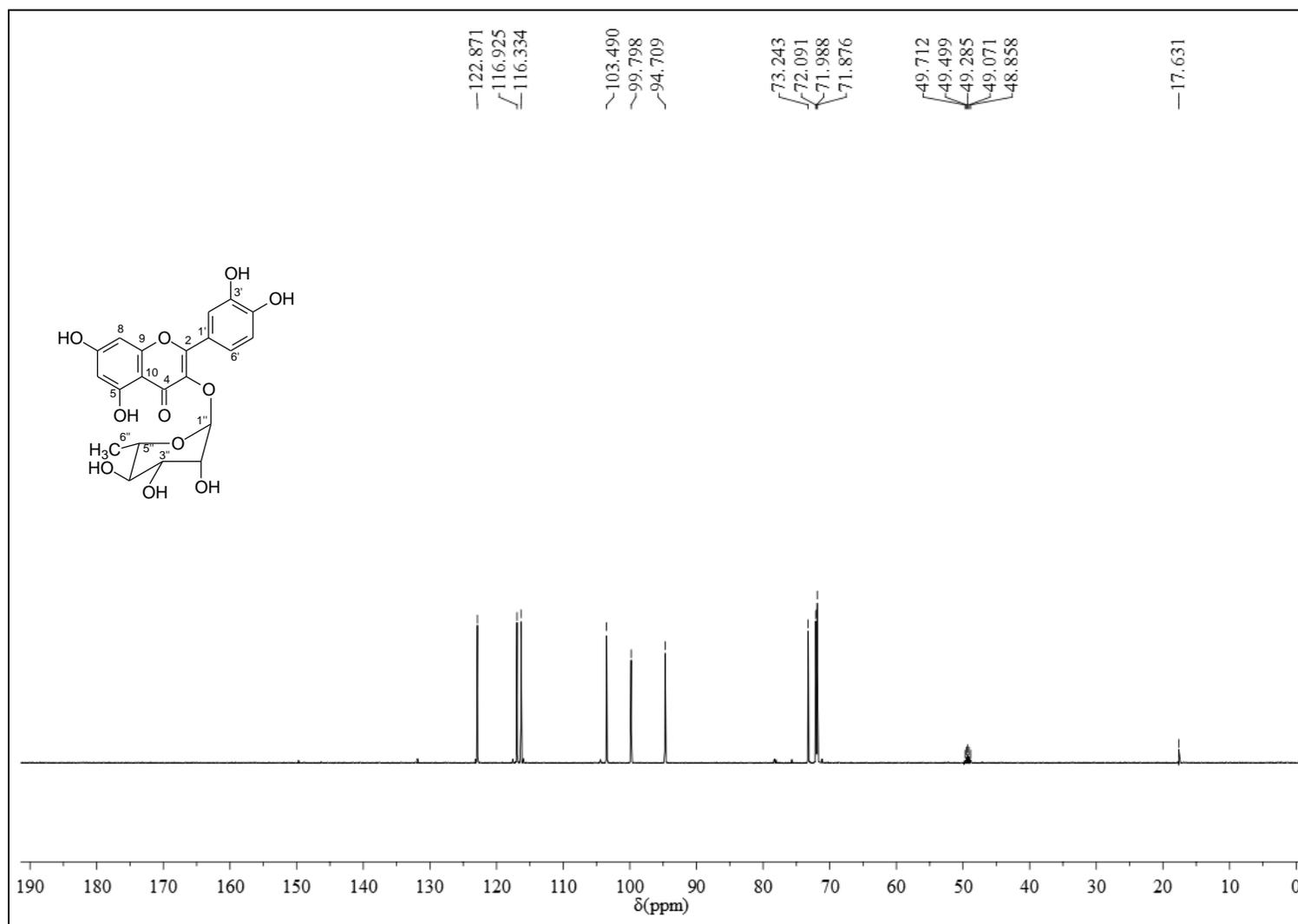
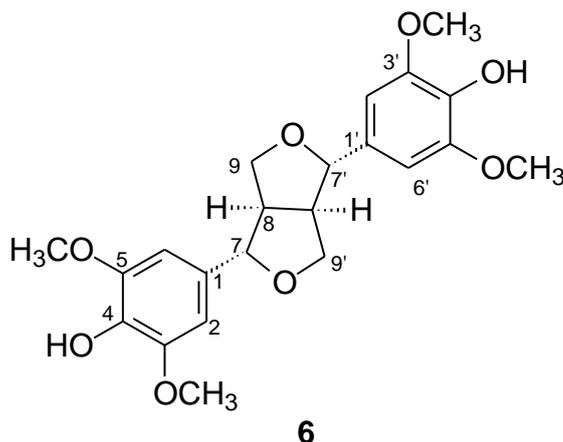


Figura 63 - DEPT 90° do composto 5 (CD₃OD, 100 MHz)

5.3.6 Identificação estrutural do composto 6



O composto **6** (4,0 mg) foi isolado como um sólido branco proveniente do fracionamento em coluna de Sephadex do subgrupo DF7 obtido a partir da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (Esquema 3, p. 45).

O espectro de RMN ^1H (Figuras 64 e 65, Tabela 23) deste composto mostra um sinal em δ_{H} 3,09 (m, 2H) referente a H-8 e H-8', um duplete em δ_{H} 4,73 ($J=4,0$ Hz) correspondente aos hidrogênios oximetínicos H-7 e H-7'. Um multiplete em δ_{H} 3,88 e um duplo duplete em δ_{H} 4,29 ($J=9,1$ e 5,7 Hz), atribuídos aos hidrogênios oximetilênicos H-9a/9'a e H-9b/9'b. Adicionalmente, verificou-se na região de aromático um único simpleto em δ_{H} 6,58 atribuído aos dois pares de hidrogênios metínicos equivalentes, H-2/2' e H-6/6'. O simpleto intenso em δ_{H} 3,89 foi atribuído a doze hidrogênios de metoxilas ligadas aos carbonos C-3/3' e C-5/5' do anel aromático e o simpleto largo em δ_{H} 5,53 com integração para dois hidrogênios sugeriu a presença de duas hidroxilas. Esses dados sugerem a presença de uma estrutura simétrica para o composto **6**.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 66 e 67; Tabela 23) apresentou oito sinais mais intensos, sendo três deles de carbonos não hidrogenados, três sinais de carbonos metínicos, um sinal em δ_{C} 71,9 atribuído aos carbonos oximetilênicos C-9 e C-9' e um sinal em δ_{C} 56,5 referentes aos carbonos das metoxilas. Estes dados são indicativos de lignana com esqueleto furofurânico (MONTHONG et al., 2011).

O resultado observado na análise de rotação específica de $[\alpha]_{\text{D}} + 0,014$, possibilitou identificar o composto **6** como lignana (+)-siringaresinol.

Os dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT 135°, DEPT 90° (Figuras 64-69) e $[\alpha]_D$ obtidos para o composto **6** em comparação com dados da literatura (MONTHONG et al., 2011; RAHMAN et al., 2007), conforme mostra a Tabela 22, permitiram identificá-lo como a lignana (+)-siringaresinol.

A lignana (+)-siringaresinol (**6**) foi anteriormente isolada a partir da casca do caule de *Ailanthus altissima* (KIM et al., 2015) e das folhas de *Holacantha emoryi* (STOCKLIN; SILVA; GEISSMAN, 1969), espécies pertencentes a família Simaboubaceae, no entanto, este é o primeiro relato do isolamento deste composto no gênero *Simaba*.

A lignana (+)-siringaresinol (**6**) apresenta ação anti-inflamatória (KIM et al., 2015), antileucêmica (PARK et al., 2008), antioxidante e neuroprotetora (HUANG et al., 2016).

Tabela 23 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, δ /ppm, J /Hz, CDCl_3) do composto **6**

6				
C	Tipo de C	δ_C	δ_H	(+)-siringaresinol*
1,1'	C	132,2		132,1
2,2'/6,6'	CH	102,8	6,58 (s)	102,7
3,3'/5,5'	C	147,3		147,2
4,4'	C	134,4		134,3
7,7'	CH	86,2	4,73 (d, $J=4,0$ Hz)	86,1
8,8'	CH	54,5	3,09 (m, 2H)	54,4
			3,88 (m, H-9a)	
9,9'	CH_2	71,9	4,29 (dd, $J=9,1$ e $5,7$, H-9b)	71,8
3,3'/5,5'- OCH_3	CH_3	56,5	3,89 (s, 6H)	56,4

*Dados em CDCl_3 relatados por Rahman et al. (2007)

Figura 64 - Espectro de RMN ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 400 MHz)

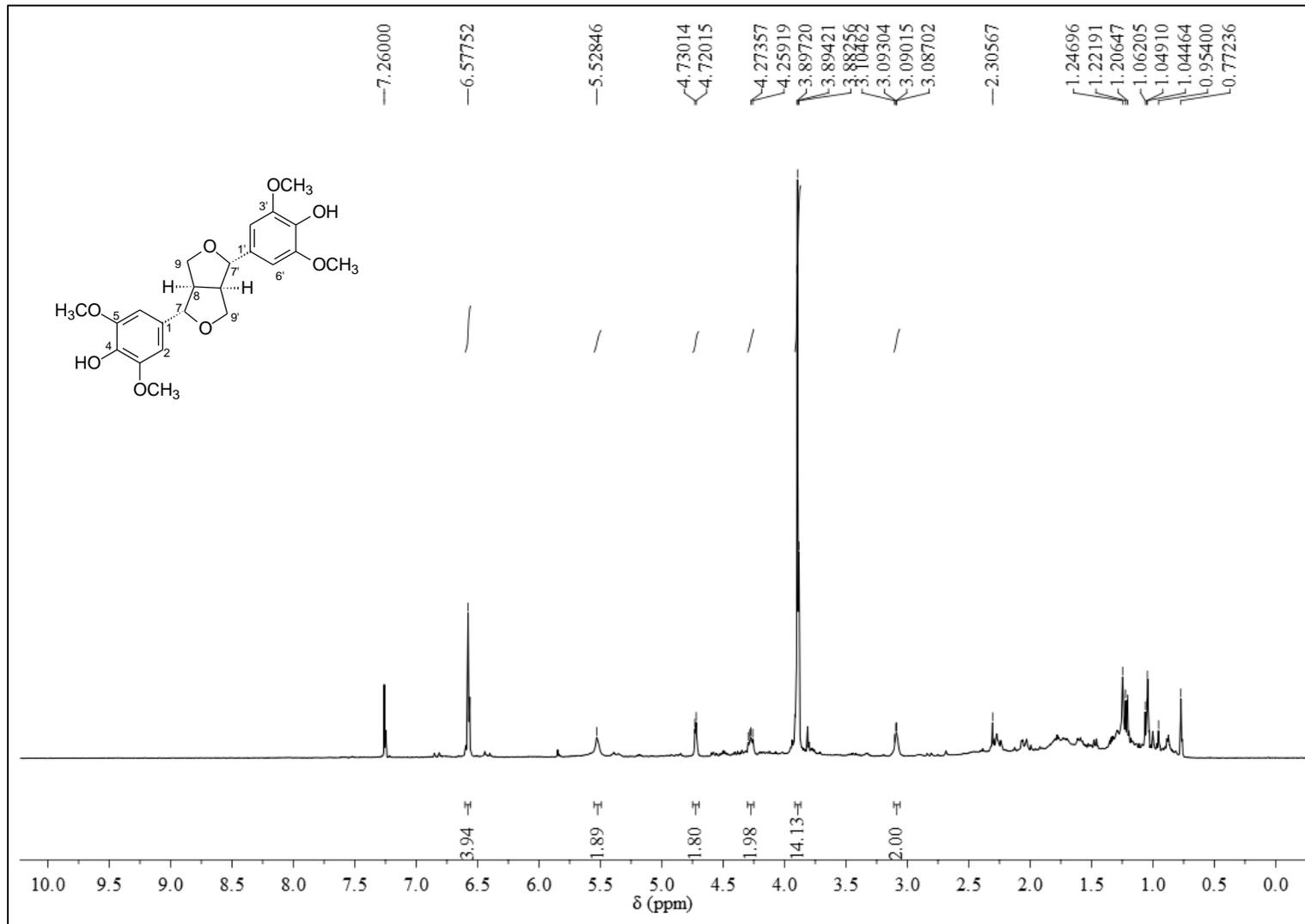


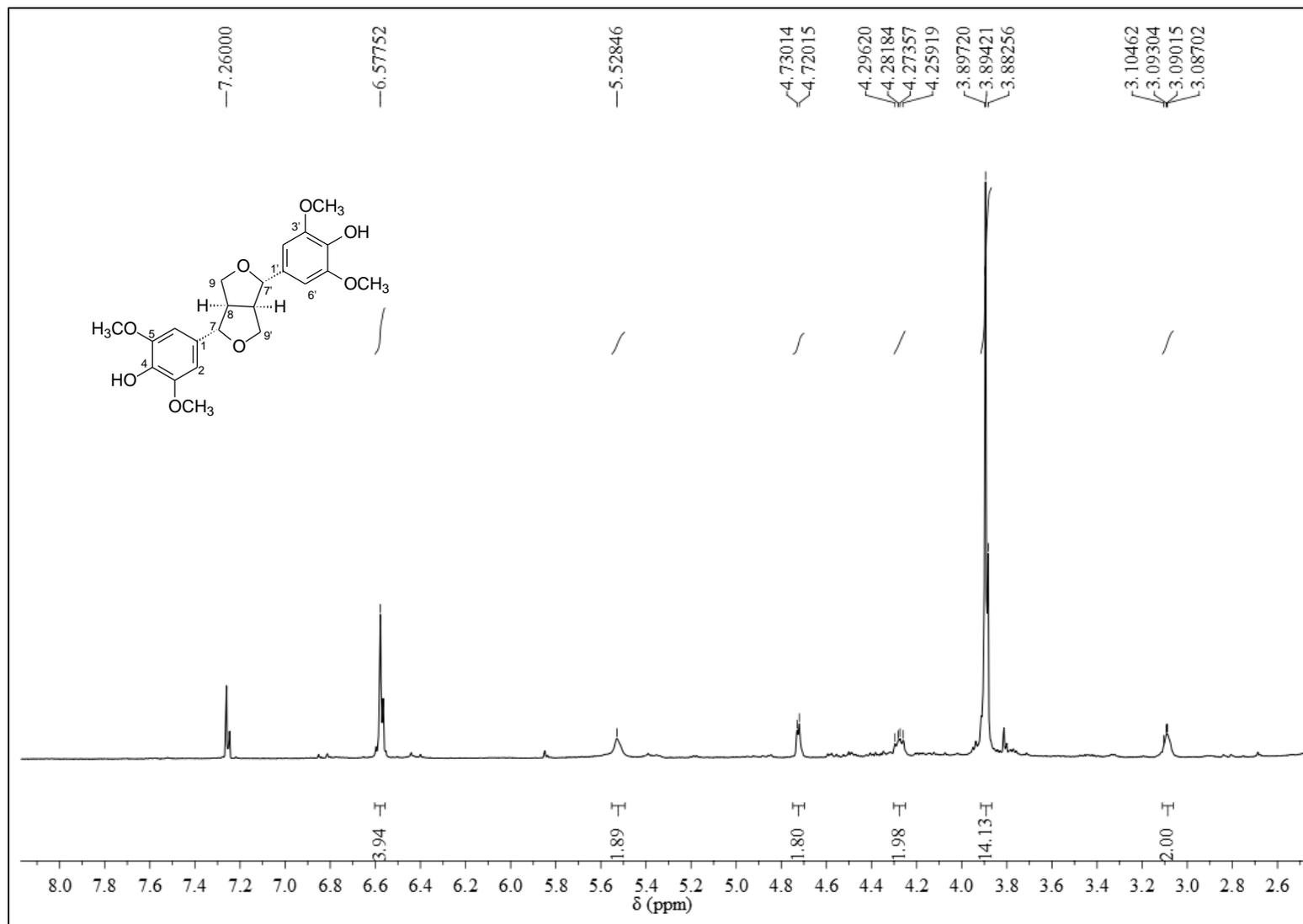
Figura 65 - Expansão (δ 2,5-8,2) do espectro de RMN ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 66 - Espectro de RMN ¹³C do composto **6** (CDCl₃, 100 MHz)

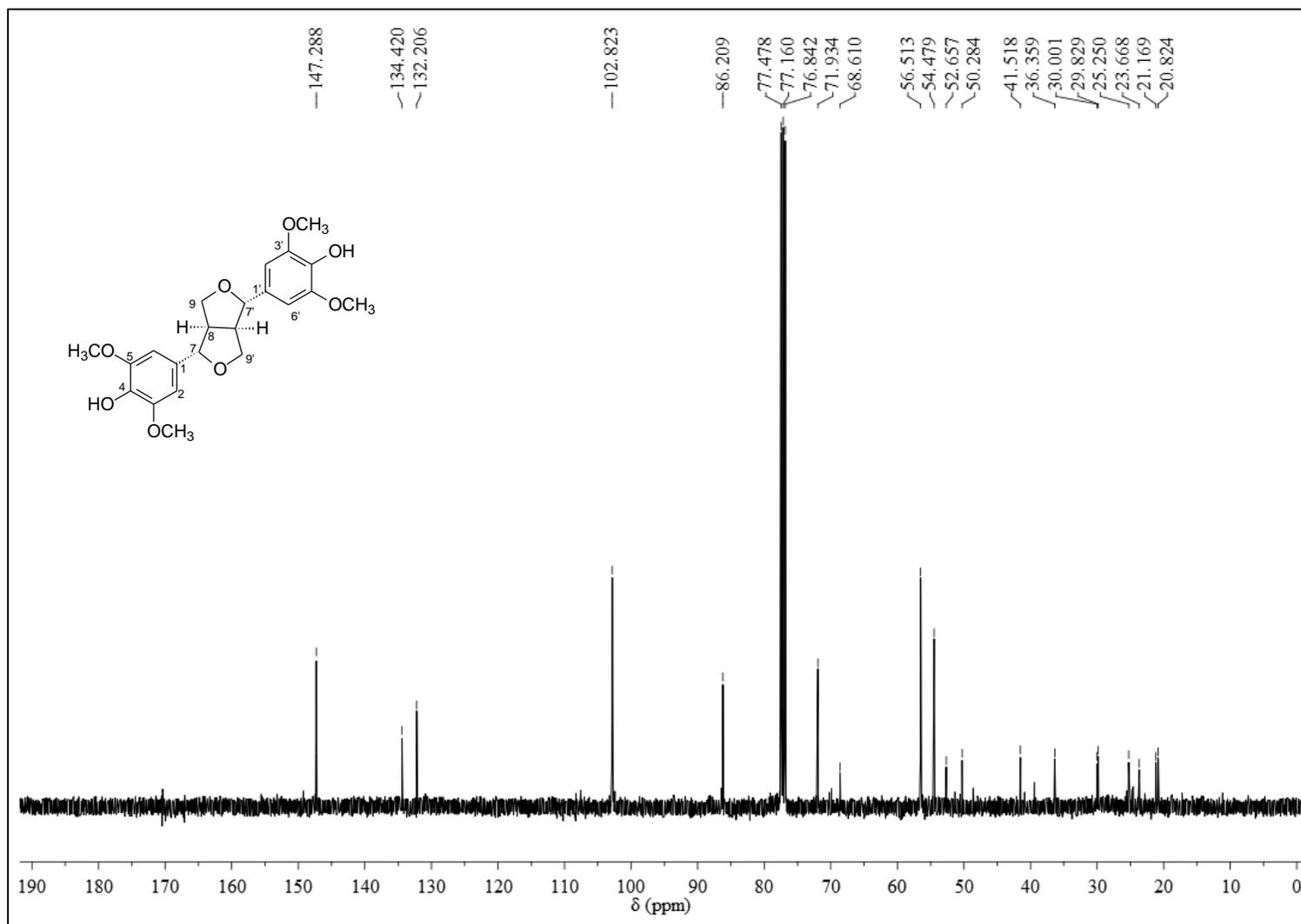


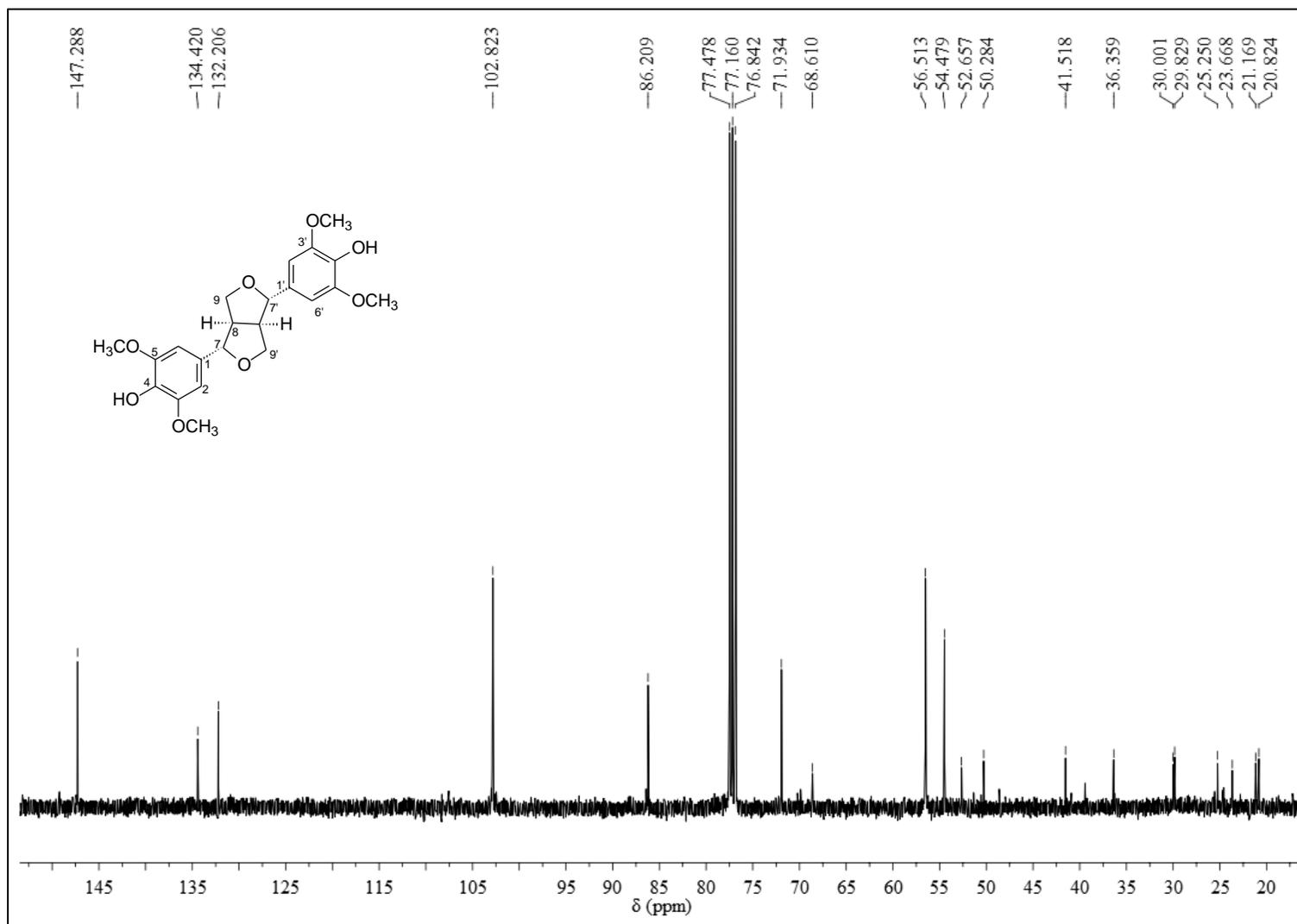
Figura 67 - Expansão (δ 19,5-150) do espectro de RMN ^{13}C do composto **6** (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 68 - DEPT 135° do composto **6** (CDCl₃, 100 MHz)

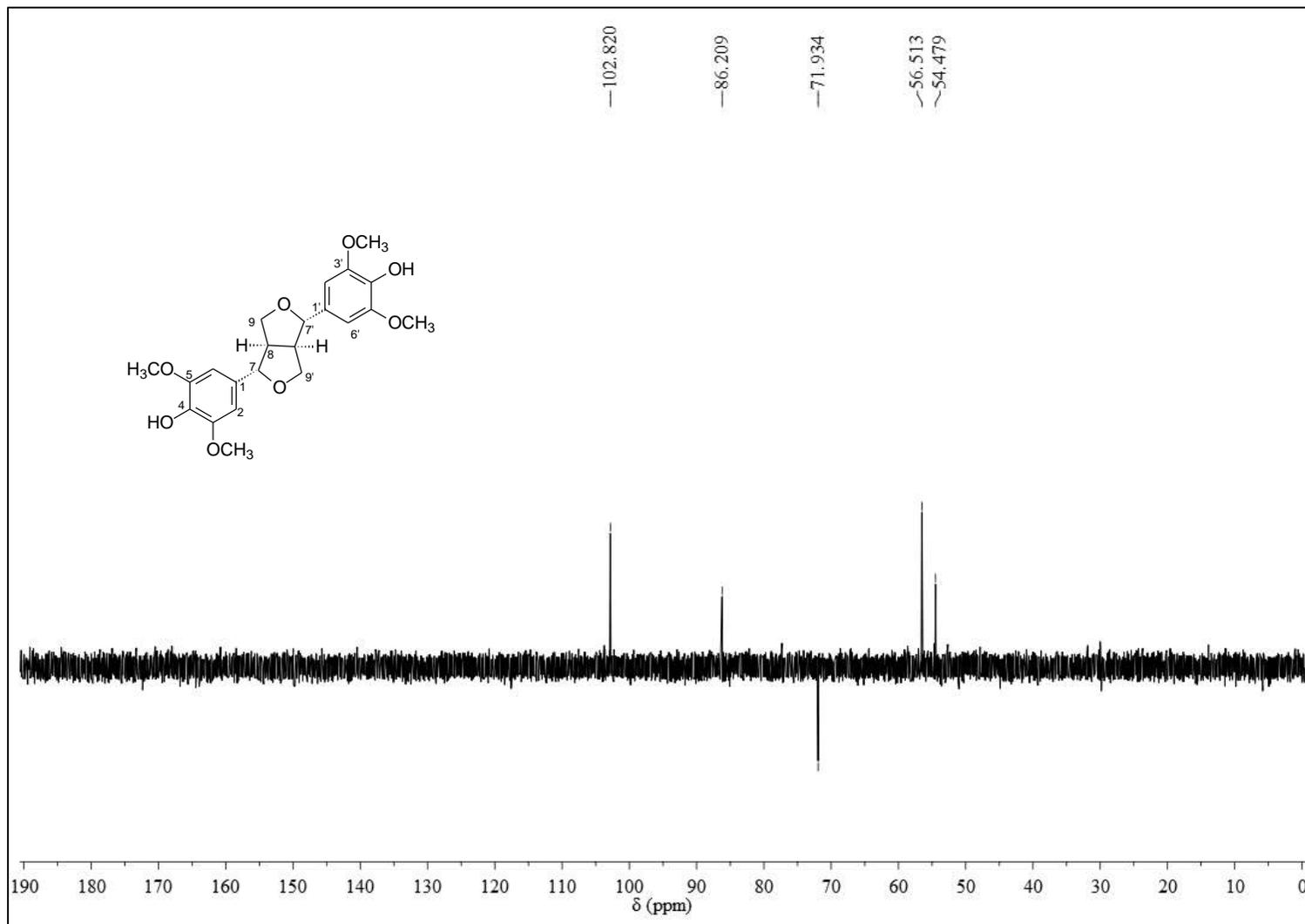
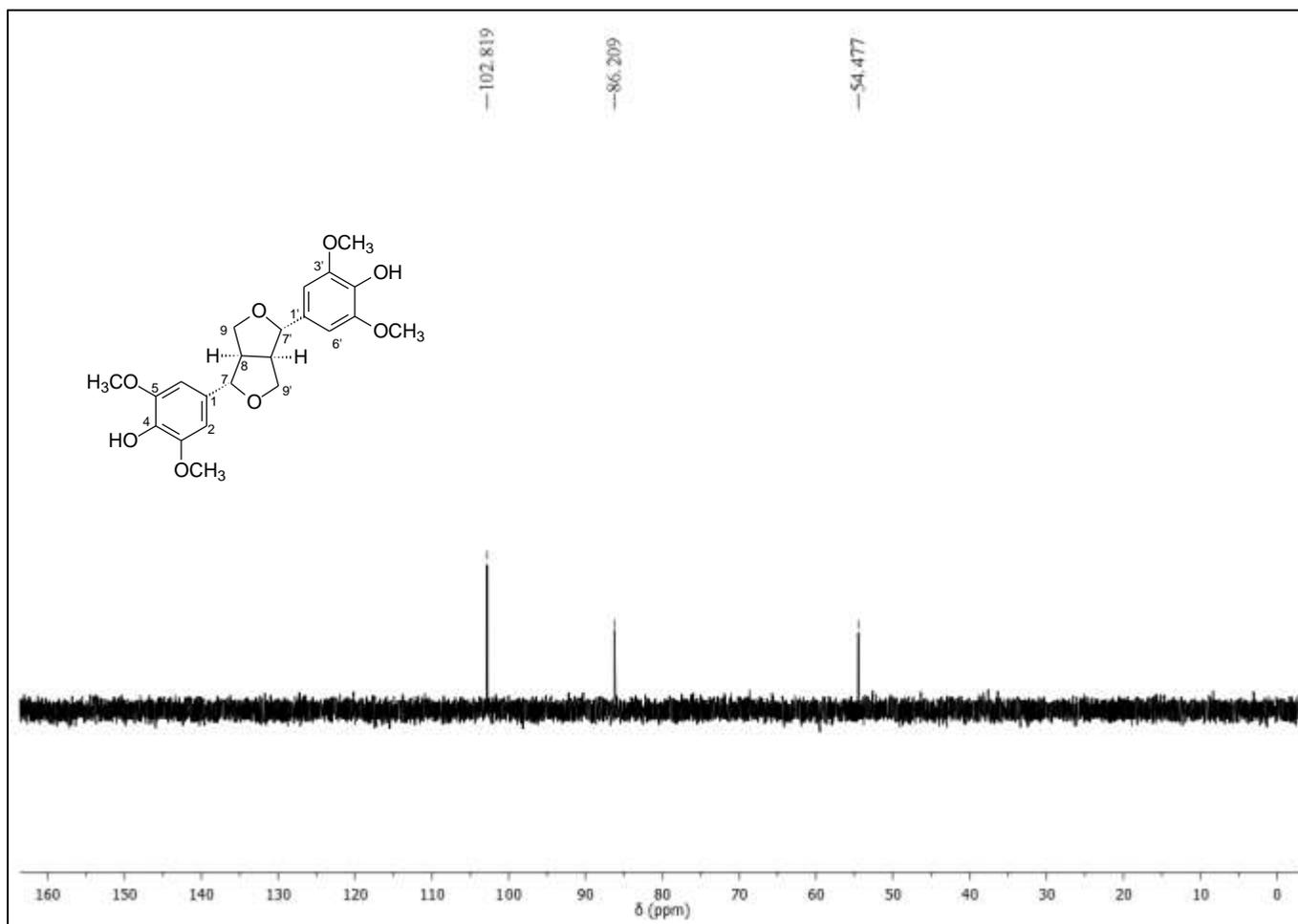
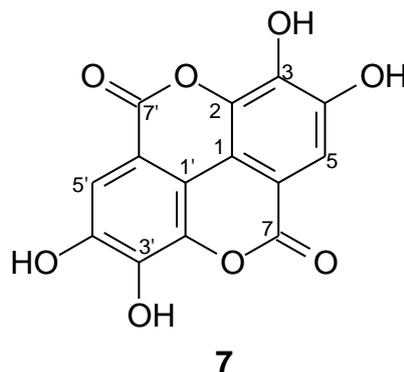


Figura 69 - DEPT 90° do composto **6** (CDCl₃, 100 MHz)

5.3.7 Identificação estrutural do composto 7



O composto **7** (1,5 g) foi isolado como um sólido amorfo branco, solúvel em dimetilsulfóxido a partir das folhas de *S. ferruginea* (Esquema 1, p. 31).

O espectro na região do infravermelho (Figura 70) deste composto apresentou absorções em 3558 e 3070 cm^{-1} de vibrações de estiramento O-H livre e ligada, respectivamente, em 1692 cm^{-1} de estiramento C=O conjugada, absorções entre 1450-1616 cm^{-1} correspondentes a estiramento C-C de aromático e em 1394 cm^{-1} de estiramento C-O (ZHANG et al., 2004).

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto **7** apresentaram sinais característicos de derivado de ácido gálico. O espectro de RMN de ^1H (Figura 71) mostrou um único sinal em δ_{H} 7,46 (2H, s) atribuído aos hidrogênios H-5 e H-5'.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 72) apresentou sete sinais e o DEPT 135° (Figuras 72) apenas um sinal em δ_{C} 110,4 que foi atribuído aos carbonos metínicos C-5 e C-5'. Os demais sinais tratam-se de carbonos não hidrogenados, destes, um em δ_{C} 159,2 foi atribuído aos carbonos da carbonila, C-7 e C-7'.

Os dados de IV, RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° (Figuras 70-73, Tabela 24) em comparação com os descritos na literatura (CUI et al., 2002; SILVA et al., 2007), permitiram identificar o composto **7** como sendo o ácido elágico.

O ácido elágico foi anteriormente identificado em um estudo com o extrato aquoso das cascas do caule da espécie *Simarouba amara* (Simaroubaceae) (MARANHÃO et al., 2014) e isolado a partir das folhas de *Holacantha emoryi* (Simaroubaceae) (STOCKLIN; SILVA; GEISSMAN, 1969), no entanto, este é o primeiro relato do isolamento desse composto no gênero *Simaba*.

O ácido elágico (**7**) é um agente quimiopreventivo eficaz para toxicidade induzida por níquel, reduzindo o estresse oxidativo (AHMED et al., 1999). Apresenta

elevado potencial antifúngico (LI et al., 2015), antioxidante (HAYES et al., 2011), atividade antinociceptiva quando administrado sistemicamente em um modelo de dor inflamatória visceral (MANSOURI, 2015). Adicionalmente, têm sido relatadas as ações hepatoprotetora, antiviral e anticâncer, entre outros efeitos (GIRISH e PRADHAN, 2008).

Tabela 24 - Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) do composto **7**

C	Tipo de carbono	δ_c (ppm)	
		7	Ácido elágico*
1,1'	C	112,4	112,4
2,2'	C	136,5	136,4
3,3'	C	139,7	139,7
4,4'	C	148,2	148,5
5,5'	CH	110,4	110,2
6,6'	C	107,7	107,5
7,7'	C	159,2	159,2

*Dados em DMSO- d_6 relatados por Silva et al. (2007)

Figura 70 - Espectro de IV (KBr) do composto 7

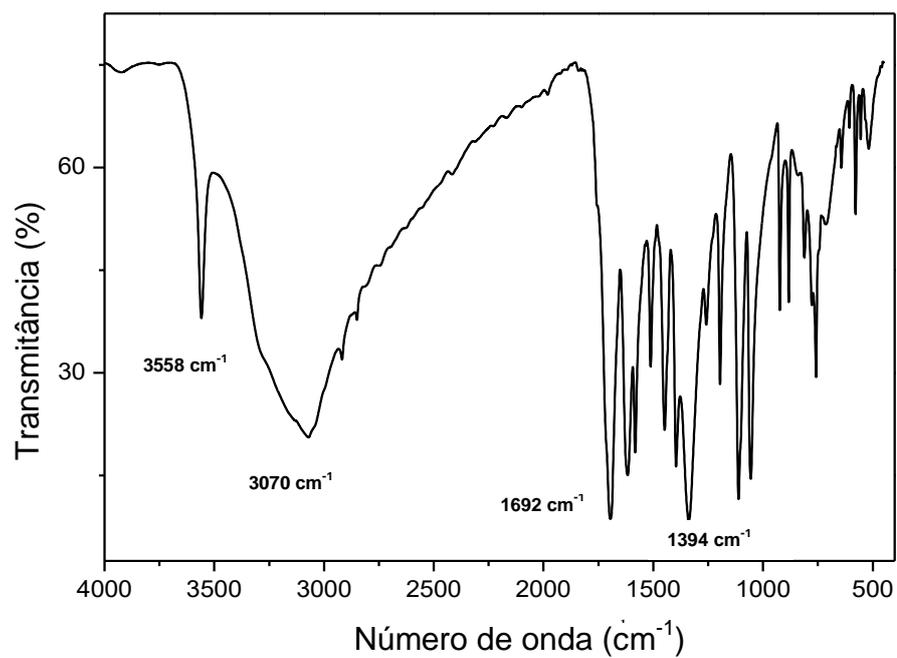


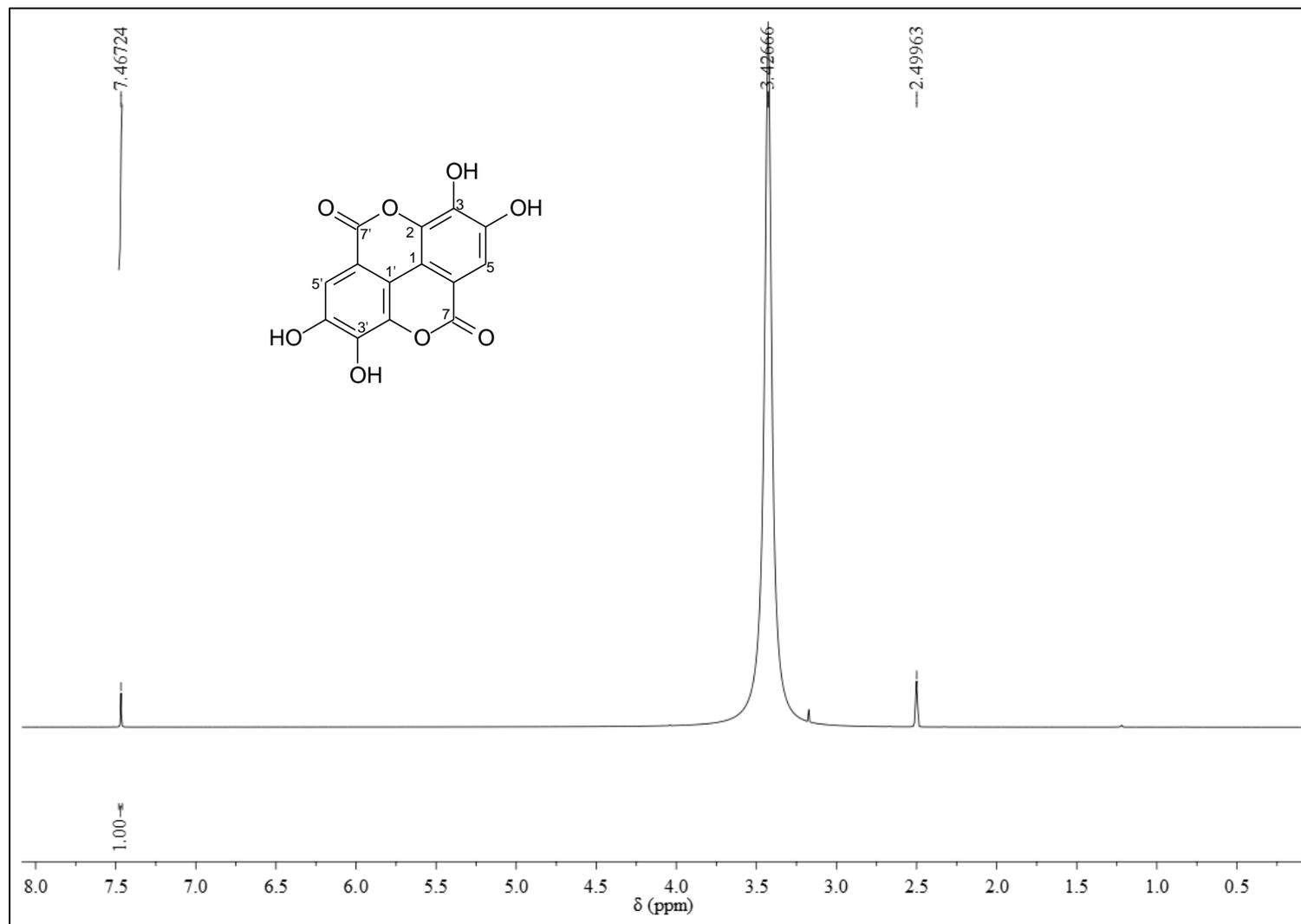
Figura 71 - Espectro de RMN ^1H do composto 7 (DMSO- d_6 , 400 MHz)

Figura 72 - Espectro de RMN ^{13}C do composto **7** (DMSO- d_6 , 100 MHz)

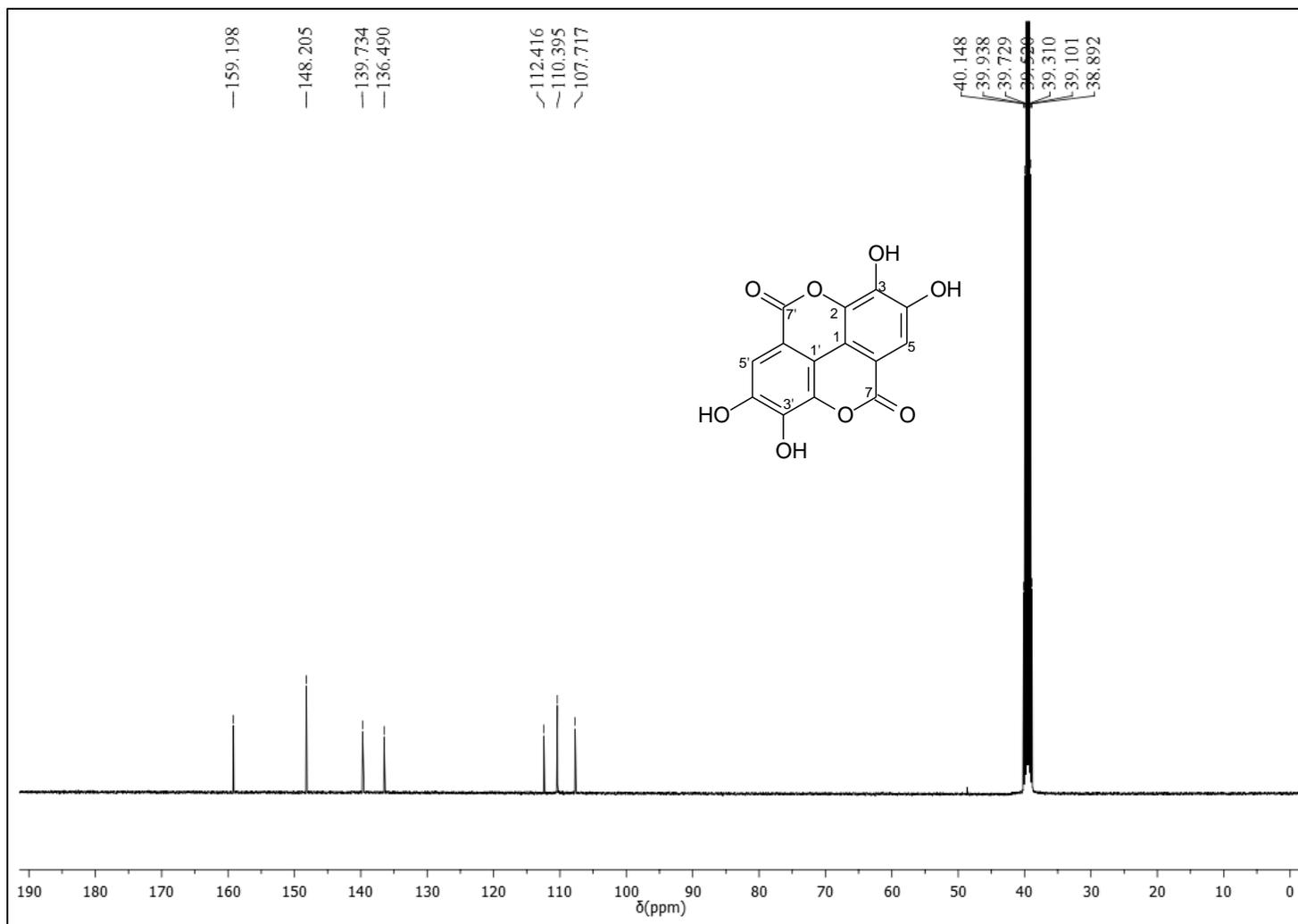
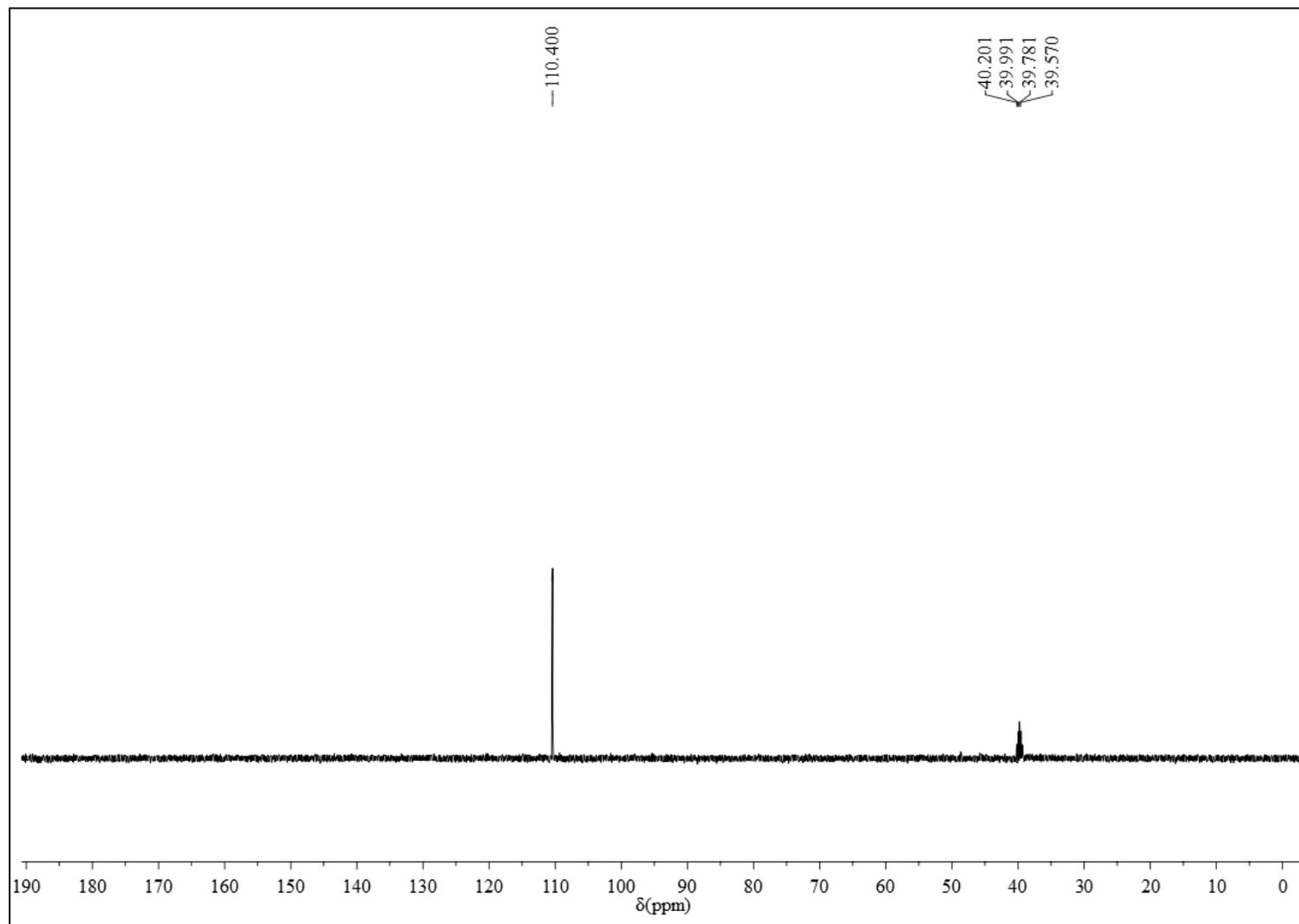
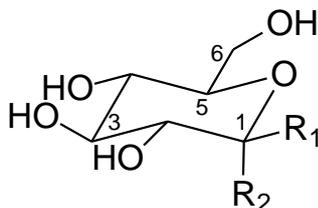


Figura 73 - DEPT 135° do composto **7** (DMSO- d_6 , 100 MHz)

5.3.8 Identificação estrutural dos compostos 8+9



8: R₁ = H; R₂ = OH

9: R₁ = OH, R₂ = H

Os compostos **8+9** (42 mg) foram isolados do subgrupo PS-57-10. A mistura foi isolada como um sólido viscoso e solúvel em metanol e obtida do fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 do grupo PS-57 (Esquema 2, p. 36).

Os espectros de RMN ¹H (Figuras 74 e 75) apresentaram perfis característicos de açúcares, evidenciados pela presença de sinais na região entre δ_H 3,0-4,2 e pelos dupletos característicos de hidrogênios anoméricos (H-1), em δ_H 5,13 (*J*=3,7 Hz) e δ_H 4,50 (*J*=7,8 Hz) (JAMRÓZ et al., 2014; ROSLUND et al., 2007).

O espectro de RMN ¹³C e sua expansão (Figuras 76 e 77, Tabela 24) apresentou 12 sinais mais intensos, que em comparação com o DEPT 135° (Figura 78 e 79) foram classificados em dez carbonos metínicos e dois metilênicos. Os sinais em δ_C 91,9 e 95,7, característicos de carbonos anoméricos (C-1α e C-1β), juntamente com os sinais em δ_C 60,4 e 60,6 referentes aos carbonos metilênicos C-6 da unidade com configuração α e C-6 da unidade com configuração β, evidenciaram a presença de duas unidades de açúcares, correspondentes aos compostos **8** e **9**.

Os dados de RMN de ¹H e ¹³C obtidos para estes compostos em comparação com os relatados na literatura (JAMRÓZ et al., 2014) são mostrados na Tabela 25 e sugeriram que a mistura é constituída por α-glicose (**8**) e β-glicose (**9**).

Tabela 25 - Dados de RMN ^{13}C (CD_3OD , 400 MHz) para a mistura (8+9)

C	Tipo de carbono	δ_c (ppm)			
		8	α -glicose*	9	β -glicose*
1	CH	91,9	92,2	95,7	96,0
2	CH	71,3	71,5	73,9	74,2
3	CH	72,6	72,9	75,6	75,8
4	CH	69,5	69,7	69,4	69,7
5	CH	71,3	71,5	75,8	76,0
6	CH_2	60,4	60,7	60,6	60,8

*Dados em CD_3OD relatados por Jamróz et al. (2014)

Figura 74 - Espectro de RMN ¹H da mistura **8+9** (CD₃OD, 400 MHz)

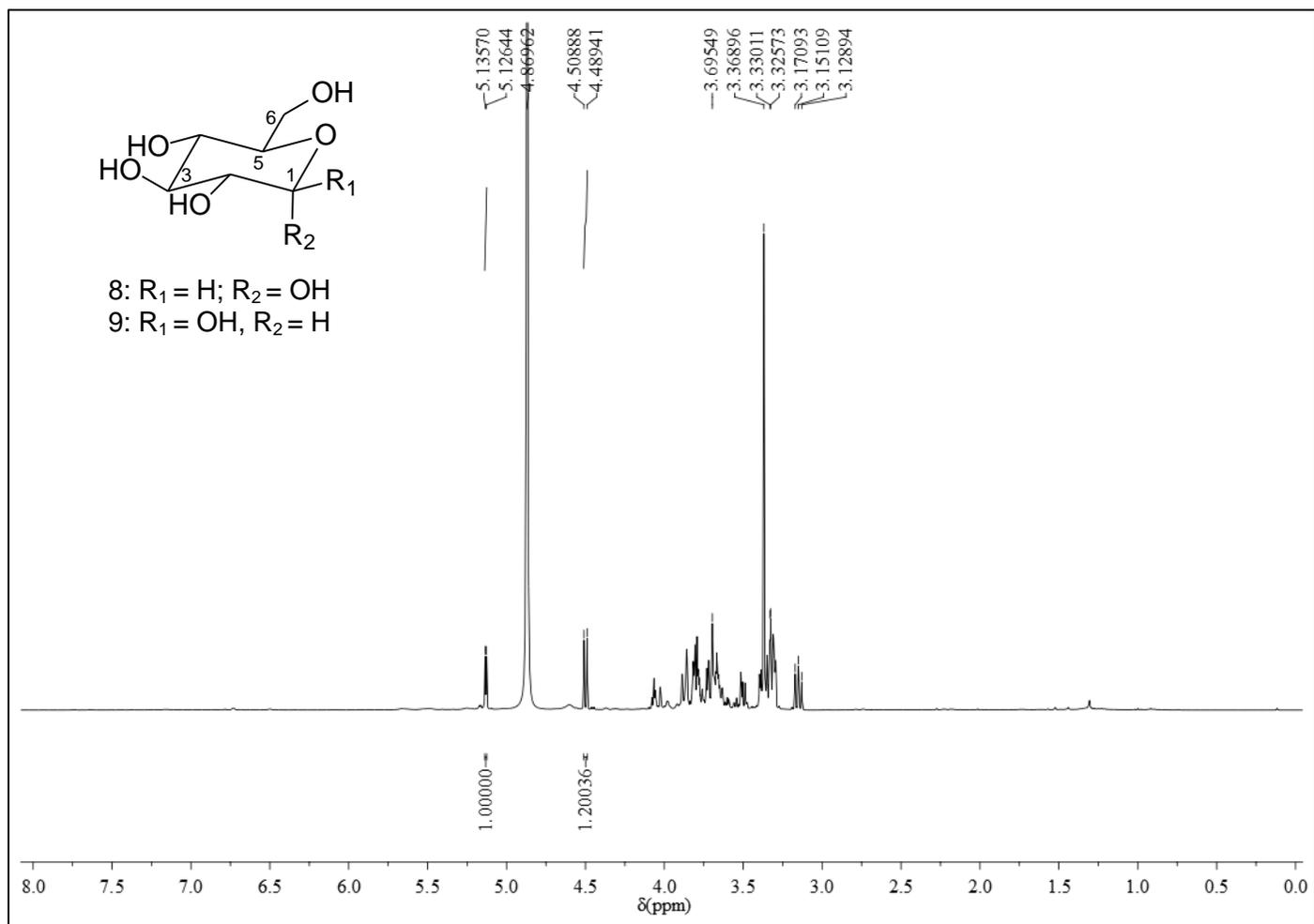


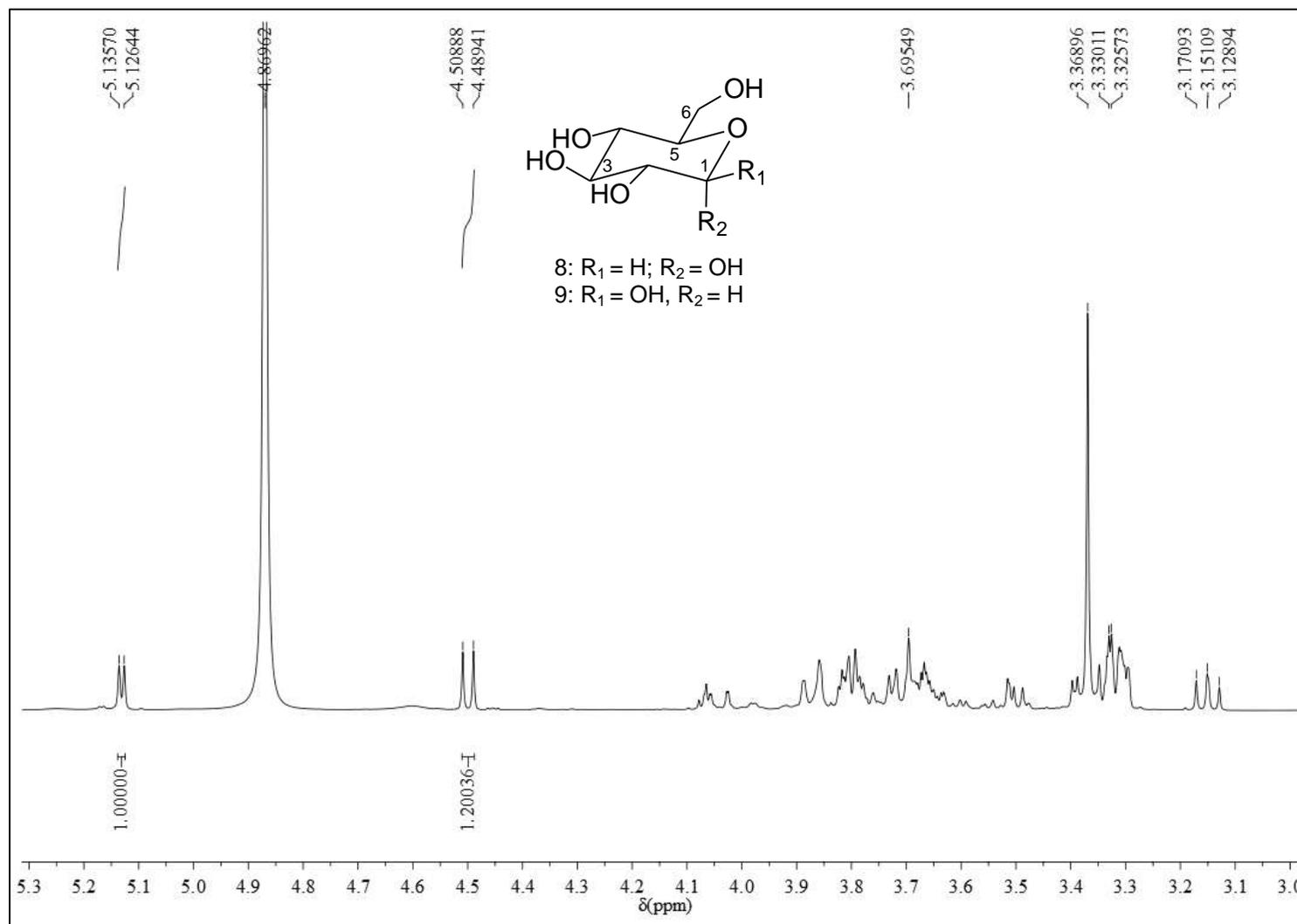
Figura 75 - Expansão (δ 3,0-5,3) do espectro de RMN ^1H da mistura **8+9** (CD_3OD , 400 MHz)

Figura 76 - Espectro de RMN ^{13}C da mistura **8+9** (CD_3OD , 100 MHz)

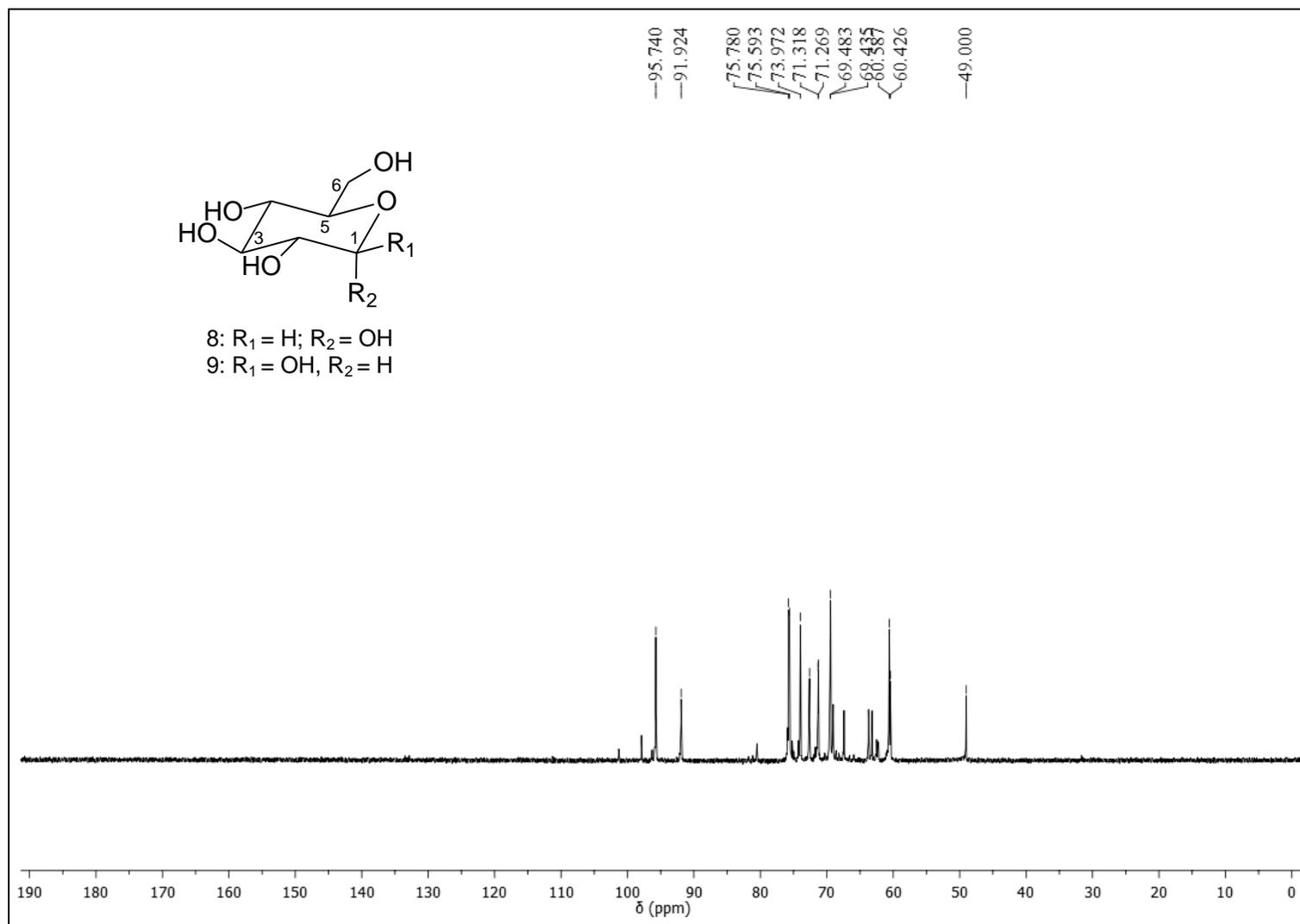


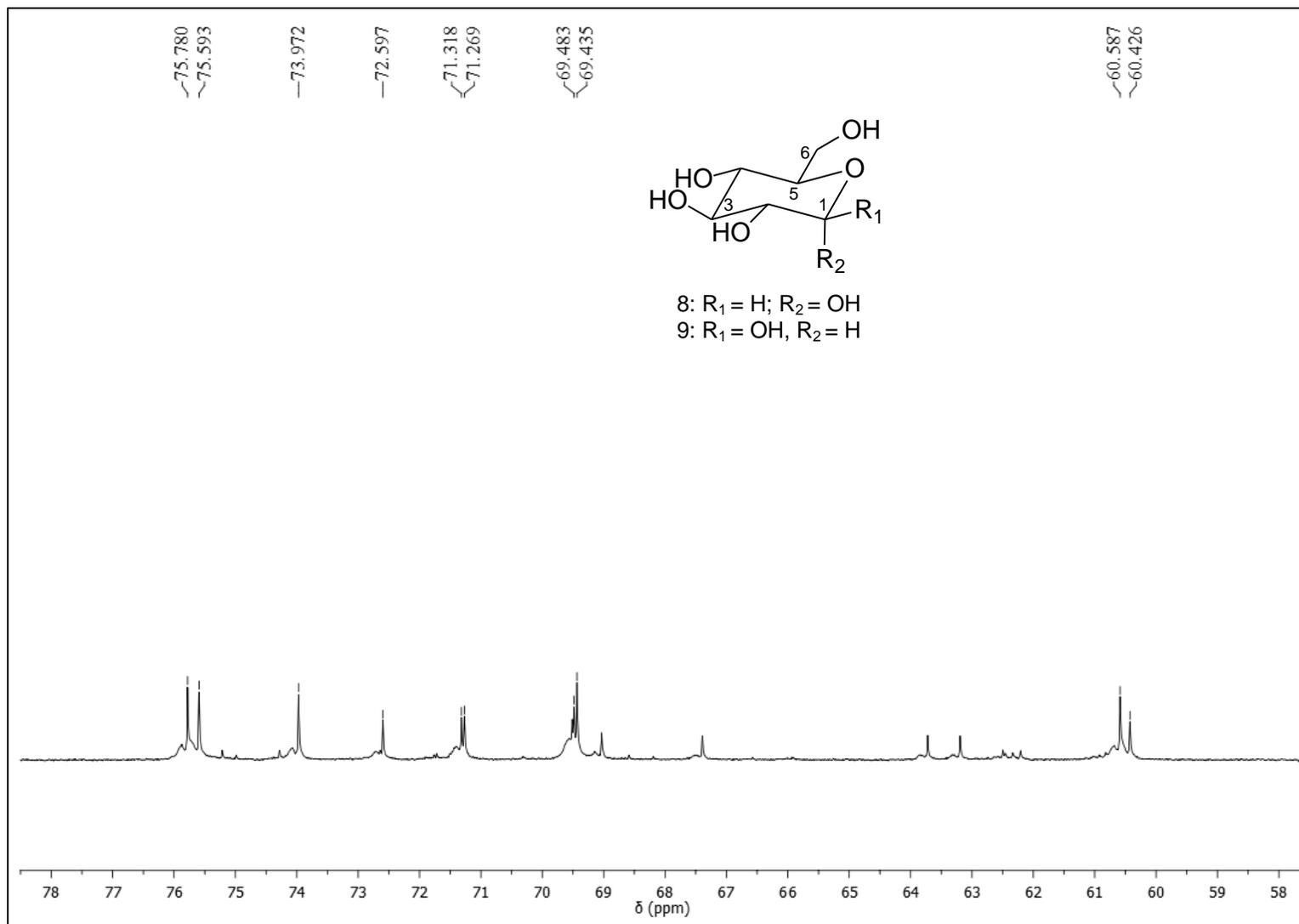
Figura 77 - Expansão (δ 58-78) do espectro de RMN ^{13}C da mistura **8+9** (CD_3OD , 100 MHz)

Figura 78 - DEPT 135° da mistura **8+9** (CD₃OD, 100 MHz)

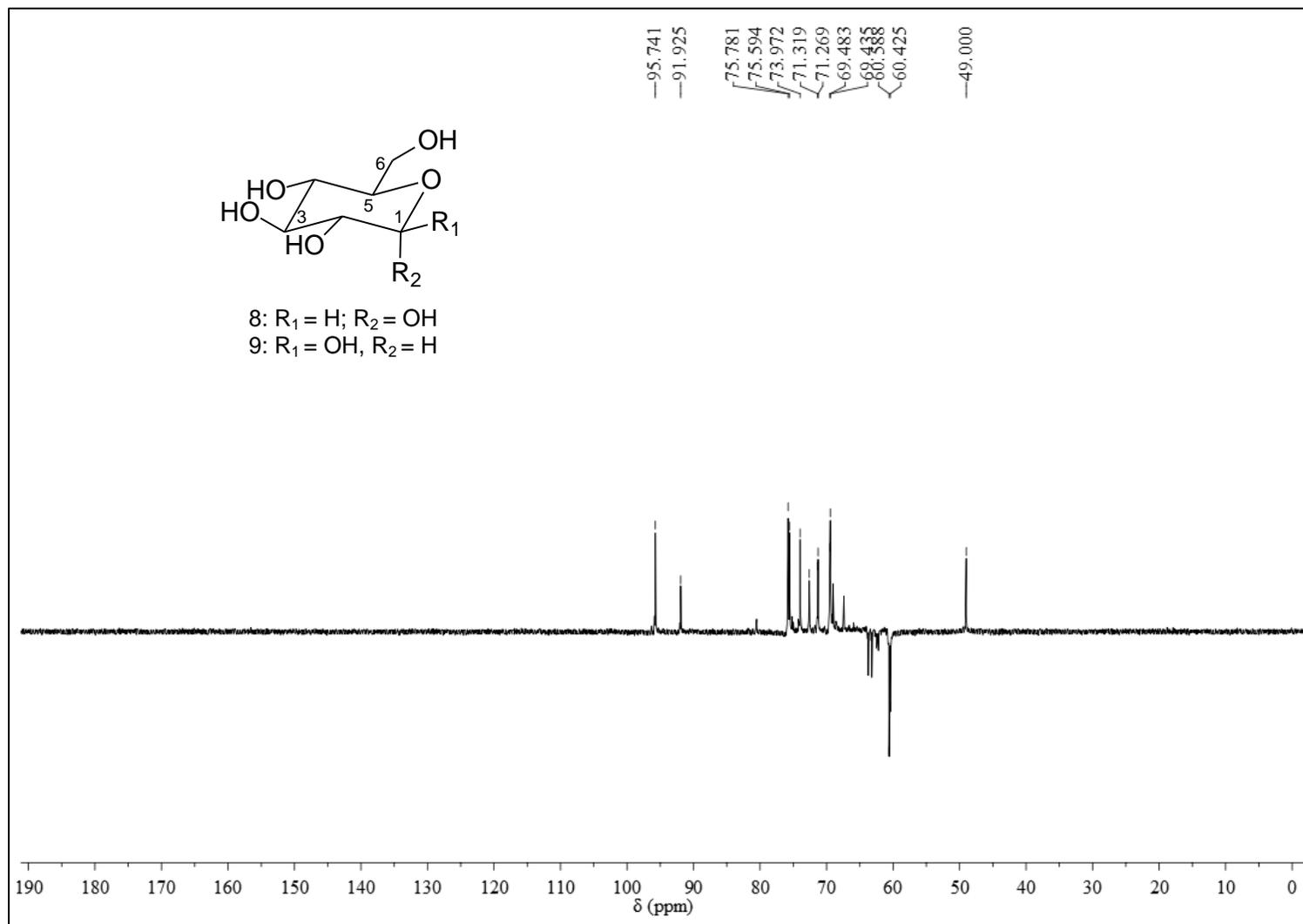
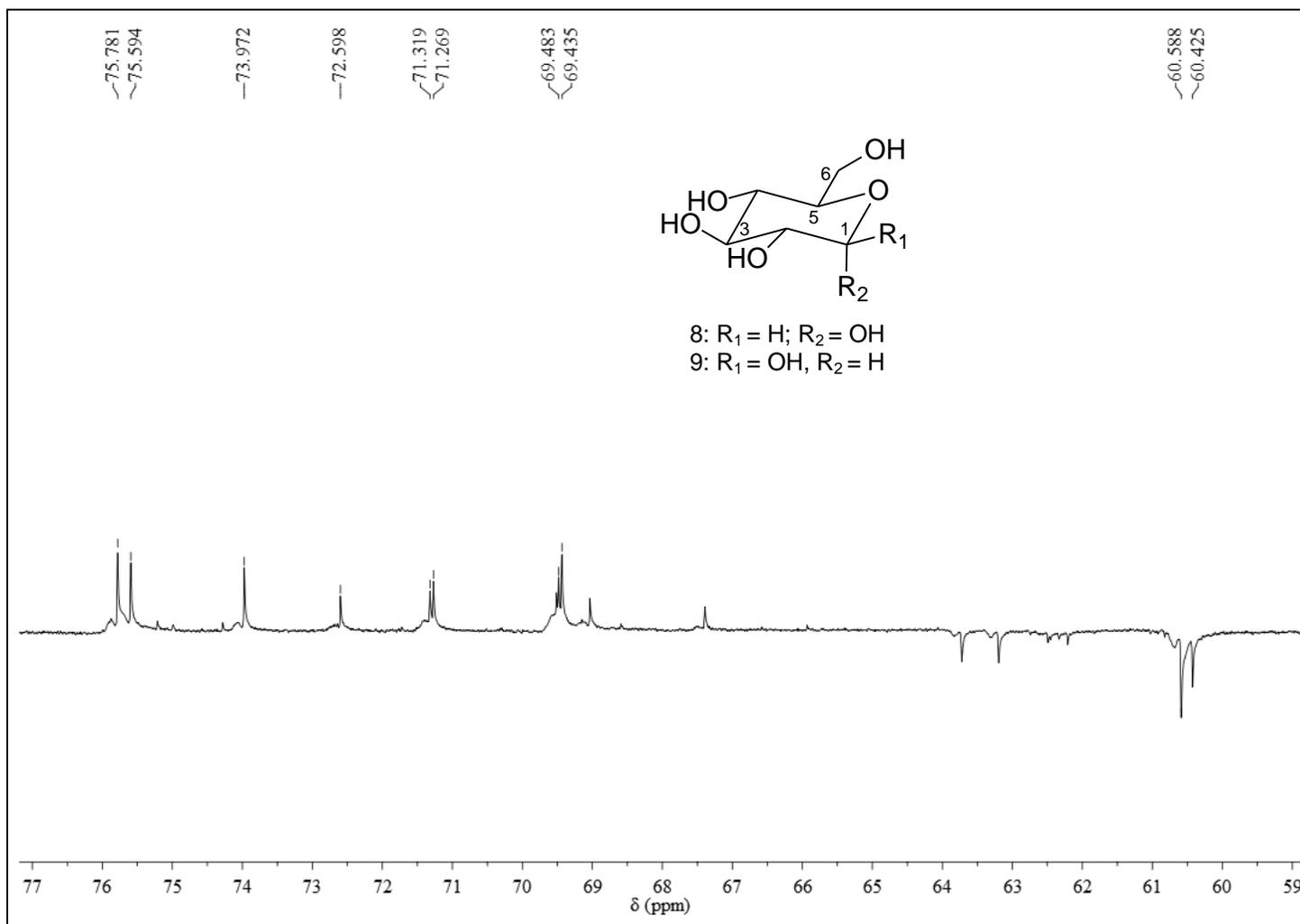


Figura 79 - Expansão (δ 59-77) do DEPT 135° da mistura **8+9** (CD₃OD, 100 MHz)

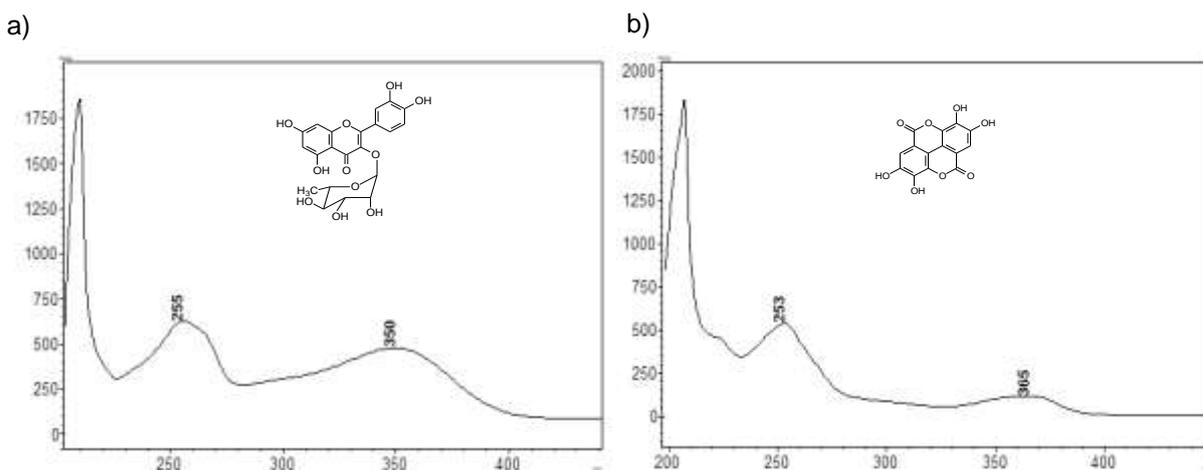
5.4 Desenvolvimento de método de quantificação de quercitrina e ácido elágico em extratos e frações de *S. ferruginea*

Considerando a ocorrência de ácido elágico nos extratos etanólicos dos galhos, pecíolos e folhas e na fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* e da quercitrina no extrato etanólico e frações diclorometano e acetato de etila das folhas de *S. ferruginea* foram desenvolvidos dois métodos cromatográficos, um para quantificação de ácido elágico e outro para quantificação de quercitrina nos respectivos extratos e frações desta espécie.

Os comprimentos de onda para quantificação de quercitrina e ácido elágico foram selecionados a partir da injeção dos padrões autênticos por monitoramento da faixa de comprimento de onda de 200 a 450 nm.

Os espectros UV-Vis obtidos pelo detector de arranjo de diodo apresentaram máximos de absorção de 255 e 350 nm para a quercitrina e 253 e 366 nm para o ácido elágico (Figura 80).

Figura 80 - Espectros UV-Vis dos padrões. a) quercitrina; b) ácido elágico



5.4.1 Seletividade

A seletividade do método é verificada comparando-se os cromatogramas dos padrões de referência quercitrina e ácido elágico com os cromatogramas dos extratos e frações de *S. ferruginea* (Figuras 81-90). A sobreposição dos espectros fUV-Vis dos extratos e frações de *S. ferruginea* com os padrões são mostrados nas Figuras 91 e 92.

Os índices de similaridade das bandas correspondentes aos padrões foram calculados pelo *software LabSolution* (Tabela 26) e confirmaram que a banda com tempo de retenção de 30,5min presente nas amostras é atribuída a quercitrina (Figuras 81-87) e a banda com tempo de retenção em 16min é atribuída ao ácido elágico (Figuras 88-90).

A similaridade dos extratos e frações de *S. ferruginea* com os padrões quercitrina e ácido elágico variaram de 96,4 a 99,6% (Tabela 26). Não foi possível determinar a similaridade da quercitrina com os extratos etanólicos dos galhos (Figura 81) e pecíolos (Figura 82), bem como do ácido elágico com a fração acetato de etila das folhas (Figura 90).

Tabela 26 - Índice de similaridade dos picos presentes nos extratos etanólico dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e frações diclorometano (FDFSf) e acetato de etila (FAEFSf) do EEFSf de *S.ferruginea*

Extrato/Fração	Índice de similaridade (%)	
	Quercitrina ($t_R=30,5\text{min}$)	Ácido elágico ($t_R=16\text{min}$)
EEGSf	-	96,40
EEPSf	-	98,00
EEFSf	96,50	99,60
FDFSf	97,00	97,40
FAEFSf	98,97	-

Figura 81 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos galhos de *S. ferruginea* (EEGSf) com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , $\lambda=255\text{ nm}$

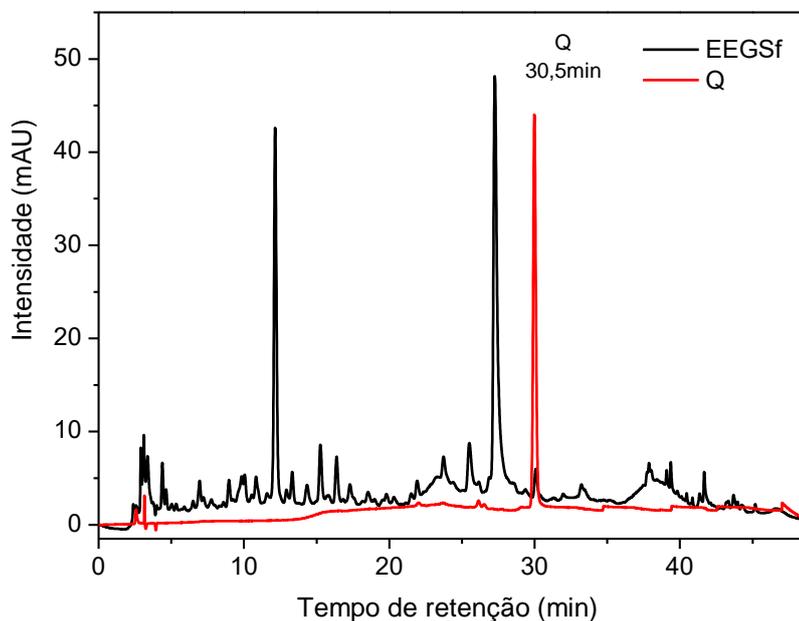


Figura 82 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos pecíolos de *S. ferruginea* (EEPSf) com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , $\lambda=255\text{ nm}$

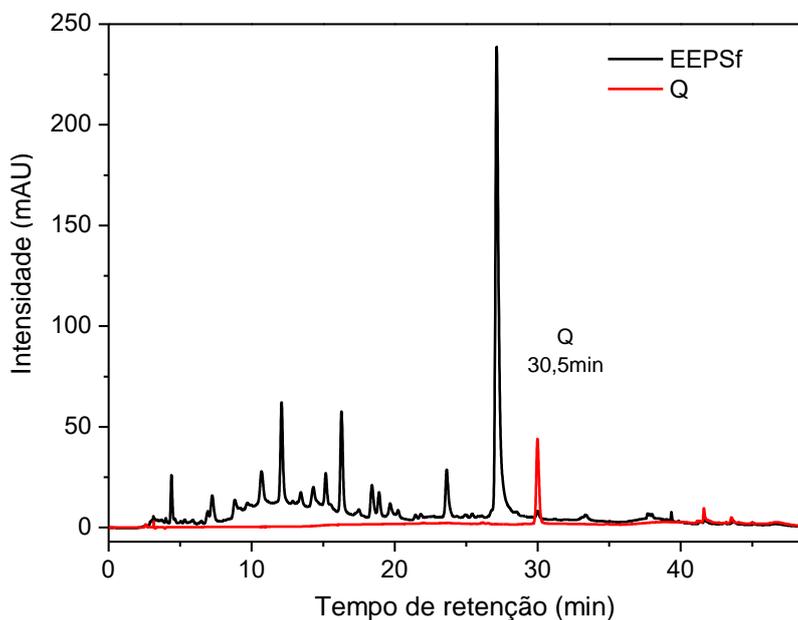


Figura 83 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* (EEFSf) com o padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , $\lambda=255\text{ nm}$

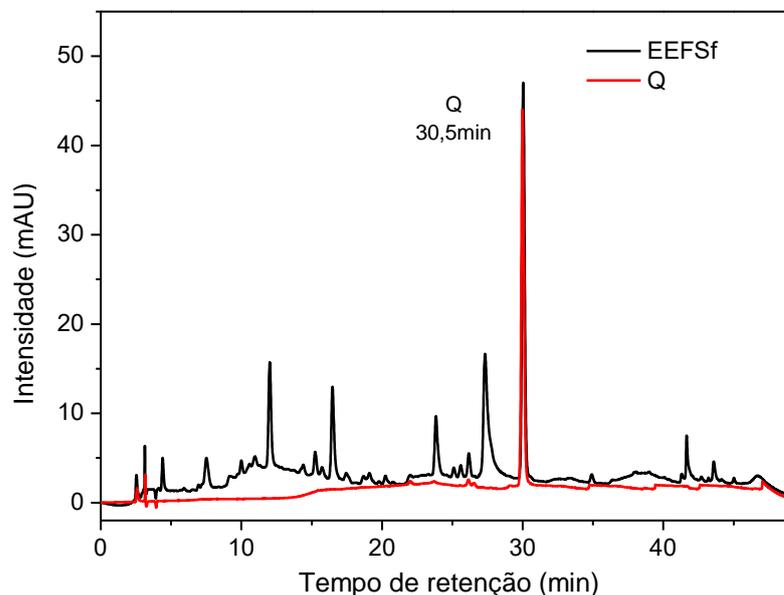


Figura 84 - Sobreposição do cromatograma da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (FDFSf) com o padrão quercitrina ($t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , $\lambda=255\text{ nm}$

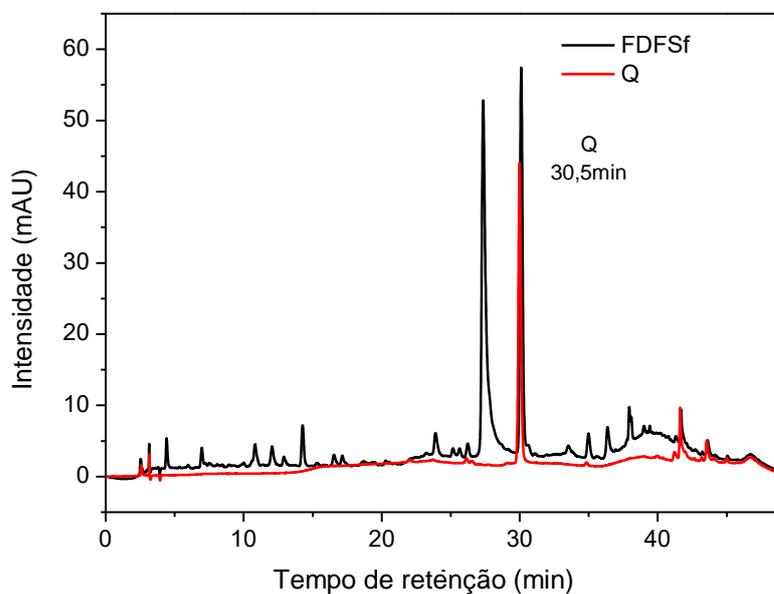


Figura 85 - Sobreposição dos cromatogramas da fração acetato de etila das folhas de *S. ferruginea* (FAEFSf) com os padrão quercitrina (Q, $t_R=30,5\text{min}$). Coluna C-18, gradiente I: 0-30min, 20-50%B; 30-35min, 50-90%B; 35-40min, 90%B; 40-45min, 90-20%B, fase móvel: MeOH-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , $\lambda=255\text{ nm}$

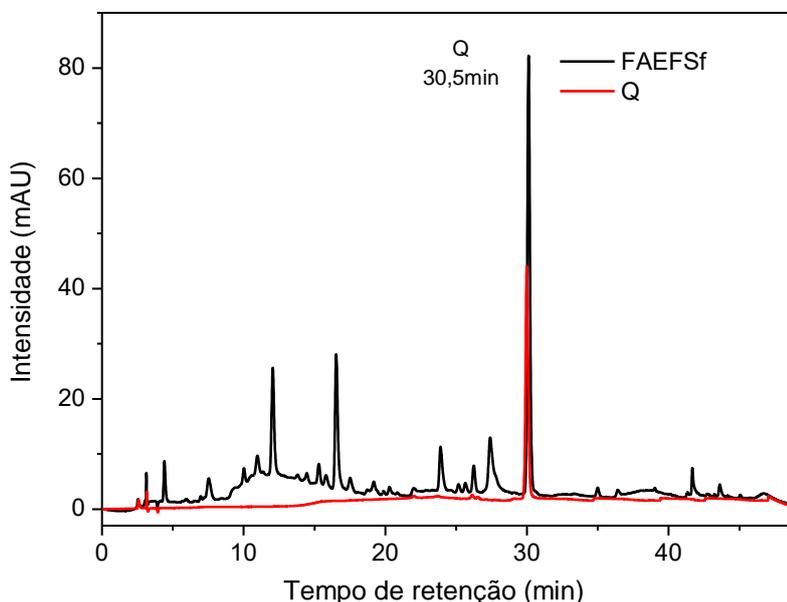


Figura 86 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos galhos de *S. ferruginea* (EEGSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B. fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 20 μL , $\lambda=253\text{ nm}$

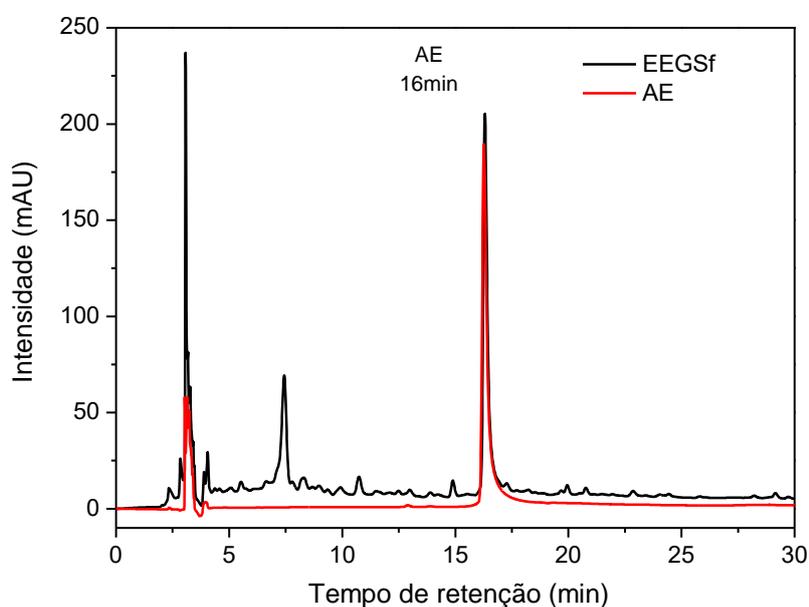


Figura 87 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico dos pecíolos de *S. ferruginea* (EEPSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B; fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 20 μL, $\lambda=253\text{ nm}$

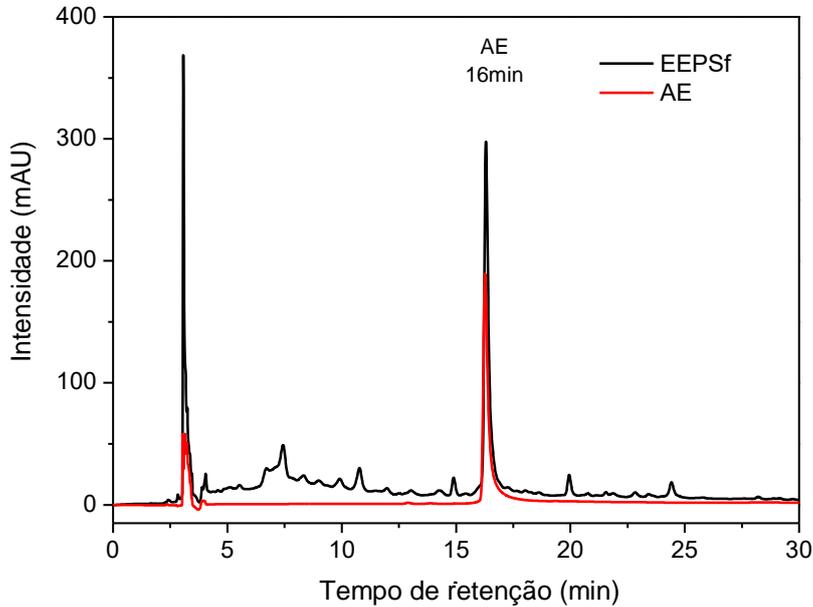


Figura 88 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* (EEFSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B. fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 20 μL, $\lambda=253\text{ nm}$

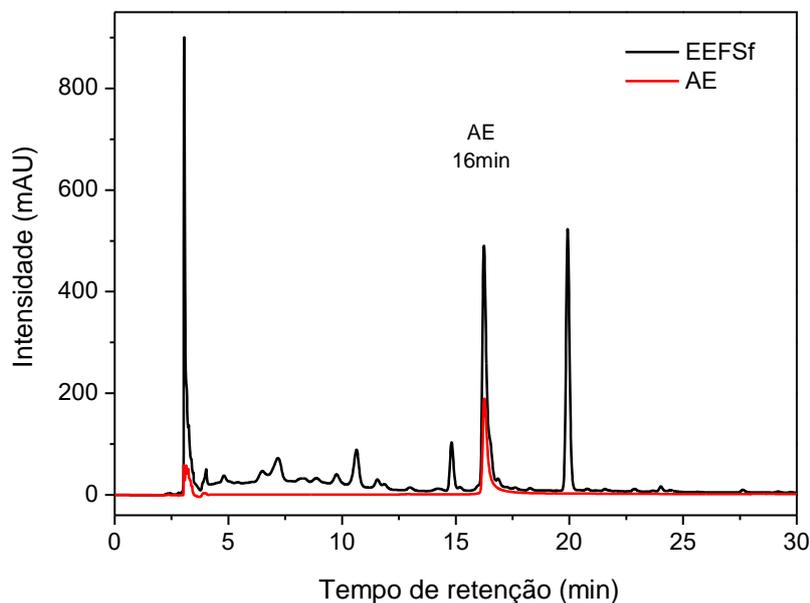


Figura 89 - Sobreposição dos cromatogramas da fração diclorometano das folhas de *S. ferruginea* (FDFSf) com o padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 20 μL , $\lambda=253\text{ nm}$

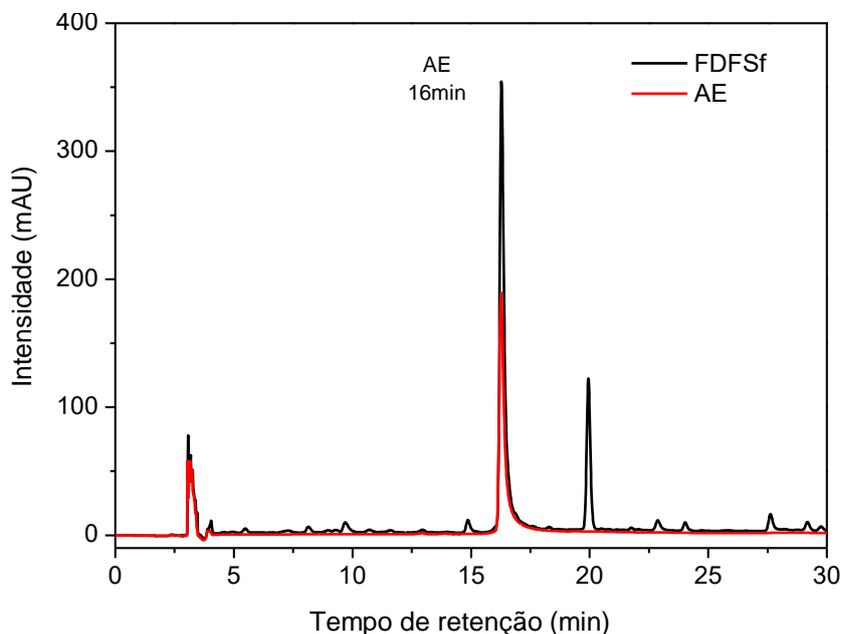


Figura 90 - Sobreposição dos cromatogramas da fração acetato de etila das folhas de *S. ferruginea* (FAEFSf) com os padrão ácido elágico (AE, $t_R=16\text{min}$). Coluna C-18, gradiente II: 0-30min, 20-50% de B, fase móvel: MeOH/ACN (1:1)-H₂O/AcOH (1%), vazão: 1,0 mL min⁻¹, volume de injeção: 20 μL , $\lambda=253\text{ nm}$

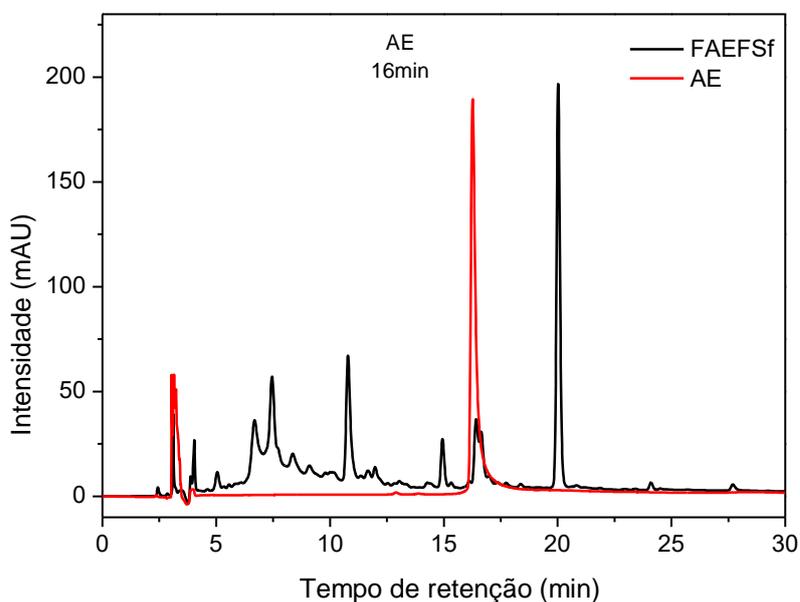


Figura 91 - Sobreposição dos espectros de UV-Vis dos extratos e frações de *S. ferruginea* com o padrão quercitrina (Q). a) extrato das folhas (EEFSf); b) fração diclorometano das folhas (FDFSf); c) fração acetato de etila das folhas (FAEFSf)

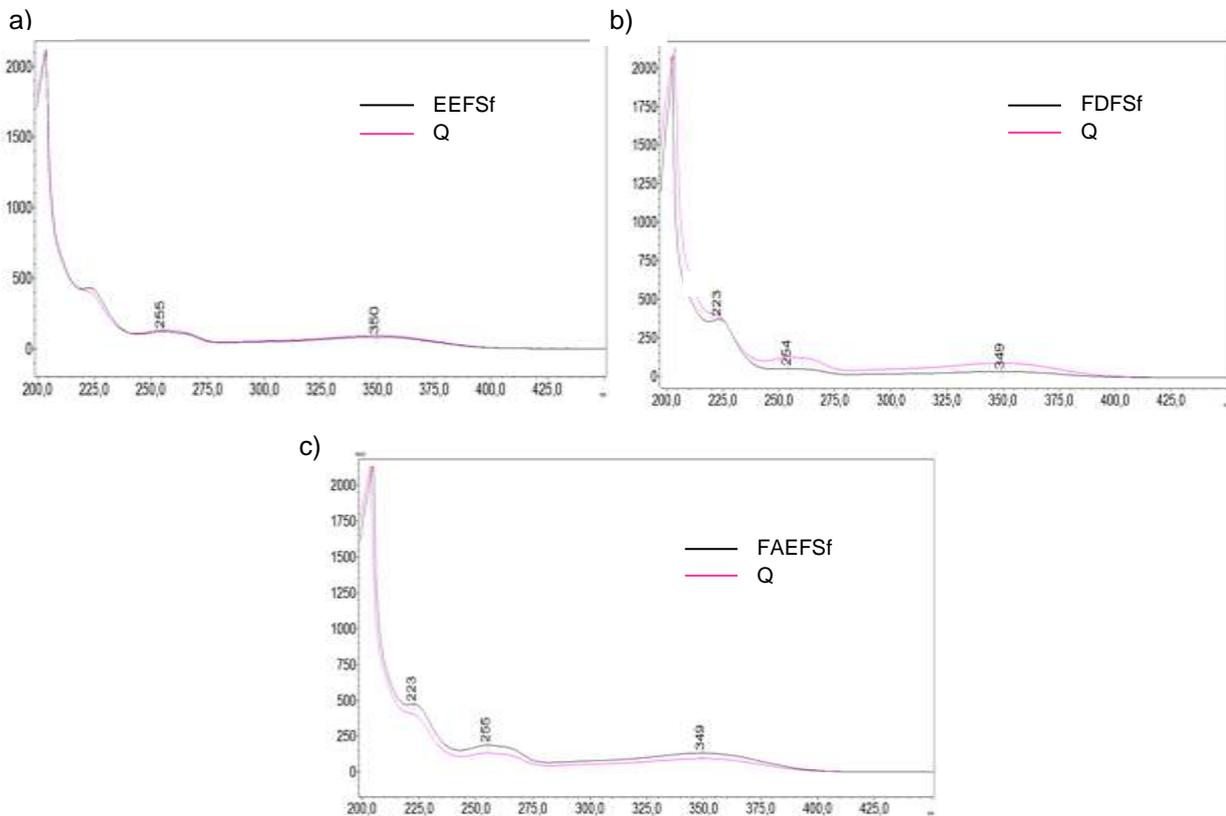
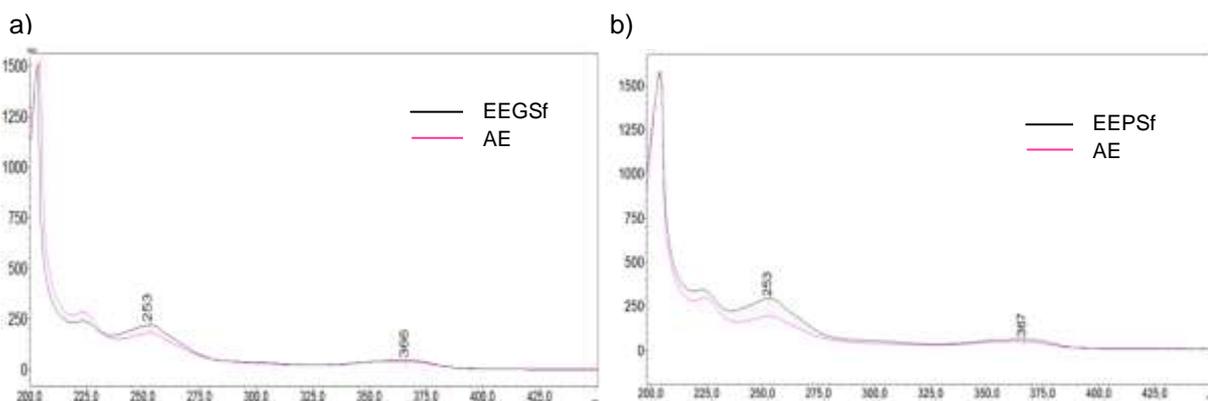
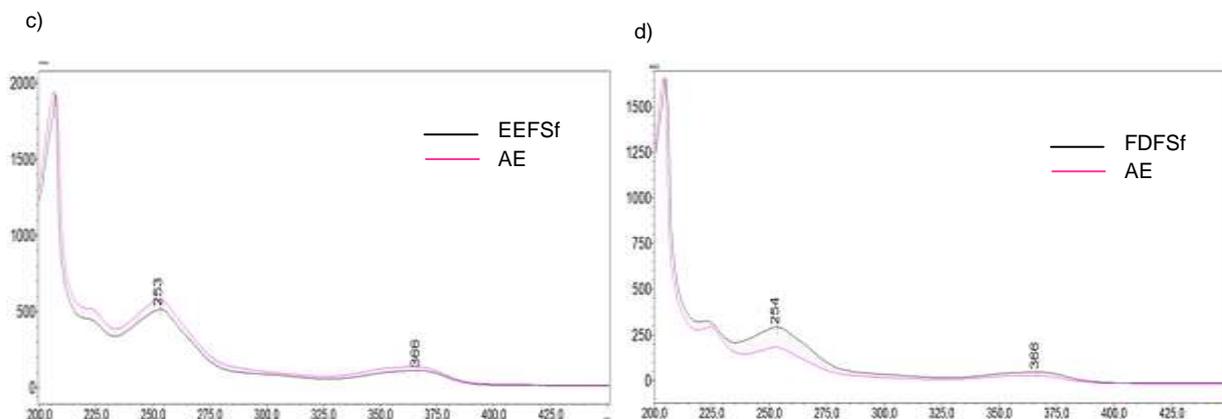


Figura 92 - Sobreposição dos espectros de UV-Vis dos extratos e frações de *S. ferruginea* com o padrão ácido elágico (AE). a) extrato dos galhos (EEGSf); b) extrato dos pecíolos (EEPSf); c) extrato das folhas (EEFSf) e d) fração diclorometano das folhas (FDFSf)





5.4.2 Linearidade

As curvas analíticas para a quercitrina e ácido elágico apresentaram boa linearidade nas faixas de concentrações avaliadas, $8\text{-}70\ \mu\text{g mL}^{-1}$ e $20\text{-}90\ \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, com coeficientes de correlação (r) de 0,999, uma vez que a Anvisa (2003) estabelece um $r \geq 0,99$. Isso mostra que as concentrações de cada padrão foram diretamente proporcionais às áreas dos picos (Figuras 93 e 94 e Tabela 27).

A linearidade do método e a validade da regressão foram avaliadas por meio da análise de variância (ANOVA), em que valores de F obtidos ou calculados (F_0) para a linearidade de cada curva analítica foram comparados com o $F_{crítico}$ ou $F_{significação}$. O valor de F é dado pela razão entre a média quadrática do modelo de regressão (MQm) e a média quadrática residual (MQr) (SKOOG et al. 2006).

O método é considerado linear quando o valor de F_0 é maior que o $F_{significação}$ (DEL MORAL et al., 2007). Com isso, verificou-se que para todas as curvas o valor de F_0 é maior que o $F_{significação}$, confirmando assim com 95% de confiança que os modelos das curvas são lineares e que a inclinação de cada reta não é nula (Tabelas 28 e 29).

Figura 93 - Curva analítica quercitrina obtida a 255 nm

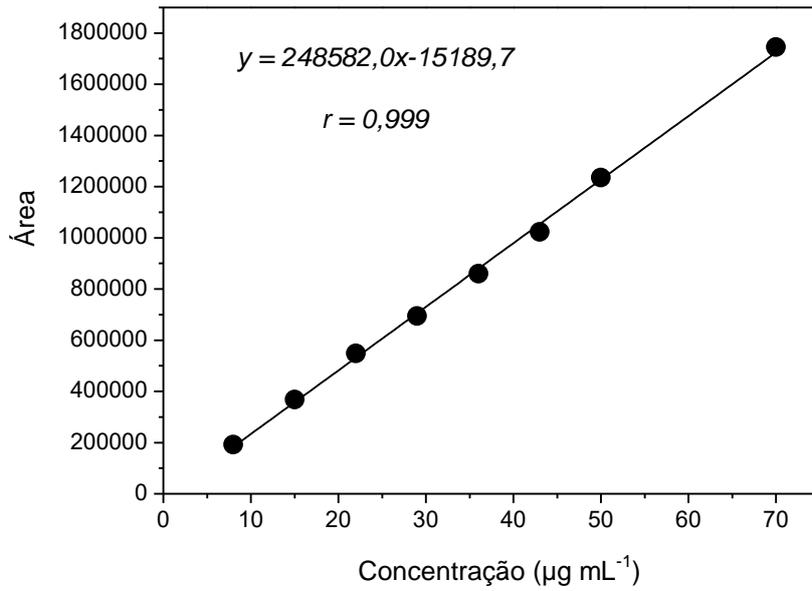


Figura 94 - Curva analítica do ácido elágico obtida a 253 nm

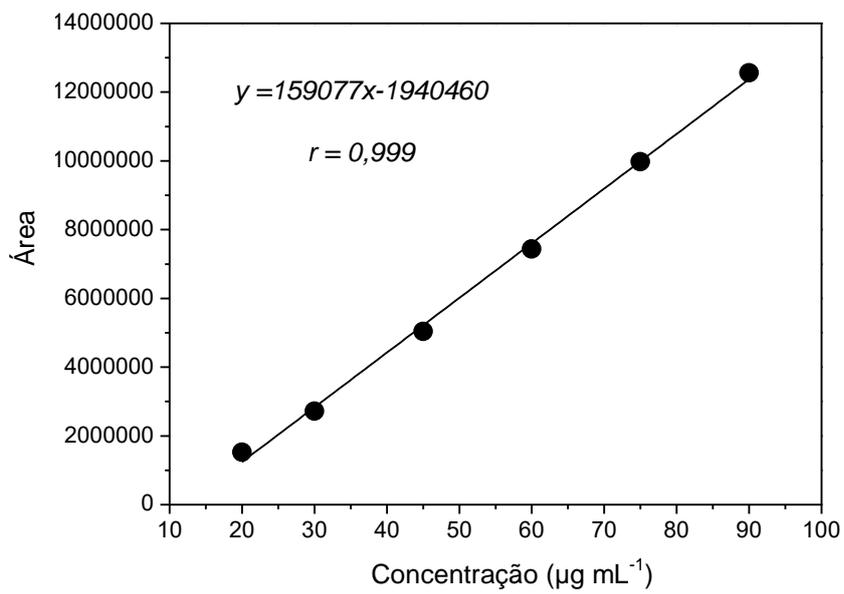


Tabela 27 - Faixa de linearidade, equações de regressão das curvas analíticas e coeficientes de correlação da quercitrina e ácido elágico

λ (nm)	Linearidade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quercitrina	Ácido elágico
		Equação da curva analítica / coeficiente de correlação (r)	
253	20-90	-	$y = 159077x - 1940460$ $r = 0,999$
255	8-70	$y = 248582,0x - 15189,7$ $r = 0,999$	-

Tabela 28 - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para a quercitrina ($\lambda=255$ nm)

	gl	SQ	MQ	F	F significação
Regressão	1	$1,75681 \times 10^{12}$	$1,75681 \times 10^{12}$	4482,7205	$7,46713 \times 10^{-10}$
Resíduo	6	$2,35144 \times 10^9$	$3,91907 \times 10^8$		
Total	7	$1,75916 \times 10^{12}$			

gl: graus de liberdade, SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste da regressão linear para o ácido elágico ($\lambda=253$ nm)

	gl	SQ	MQ	F	F significação
Regressão	1	$9,06783 \times 10^{13}$	$9,06783 \times 10^{13}$	1920,6170	$1,62093 \times 10^{-6}$
Resíduo	4	$1,88852 \times 10^{11}$	$4,72131 \times 10^{10}$		
Total	5	$9,08671 \times 10^{13}$			

gl: graus de liberdade, SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática

5.4.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção para determinação de quercitrina e ácido elágico nos extratos etanólicos e frações das folhas de *S. ferruginea* são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para quercitrina (255nm) e ácido elágico (253 nm)

Composto	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Quercitrina	2,59	7,84
Ácido elágico	4,51	13,66

5.4.4 Teores de quercitrina e ácido elágico nos extratos e frações de *S. ferruginea*

A quercitrina é um flavonoide amplamente distribuído na natureza, encontrada em vegetais e frutas (CINCIN et al., 2014; WAGNER et al., 2006). Apresenta diversas propriedades, como antioxidante (ARTANTI; MA'ARIFA; HANAFI, 2006), fototóxica (WILHELM et al., 2001), antibacteriana (ARIMA et al.; 2002), neuroprotetora (MA et al., 2015), leishmanicida (SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012), anticancerígena (CINCIN et al., 2014), anti-inflamatória (CAMUESCO et al., 2006). Atua ainda, na proteção da pele contra danos oxidativos induzidos por exposição à radiação UVB (YIN et al., 2013).

A quercitrina consiste de um glicosídeo de flavonol com uma unidade de ramnose no carbono C-3 e contém dois cromóforos atribuídos aos sistemas cinamoila e benzoila, os quais absorvem na região do ultravioleta em 350 nm (banda I) e 255 nm (banda II), respectivamente (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Na literatura há relatos de quantificação de flavonóis com detecção em comprimento de onda correspondente tanto ao cromóforo cinamoila, quanto ao benzoila (LANDIM et al., 2013; VECCHIA et al., 2016). Desta forma, a construção da curva analítica para a quercitrina foi realizada utilizando o comprimento de onda de 255 nm.

O ácido elágico é um composto fenólico dimérico derivado do ácido gálico, encontrado em vegetais e frutas (AMAKURA et al., 2000). É um agente

quimiopreventivo eficaz para toxicidade induzida por níquel, reduzindo o estresse oxidativo (AHMED et al.,1999). Apresenta elevado potencial antifúngico (LI et al., 2015), antioxidante (HAYES et al., 2011), antinociceptivo (MANSOURI, 2015). hepatoprotetor, antiviral e anticâncer, entre outros efeitos (GIRISH e PRADHAN, 2008).

O espectro de UV-Vis fornecido pelo detector de arranjo de diodo apresenta absorções máximas em 253 e 366 nm. Desta forma, a quantificação do ácido elágico pode ser realizada tanto no comprimento de onda de 253 nm (BALA et al., 2006), como no de 366 nm (AMAKURA et al., 2000). Assim, para construção da curva analítica para o ácido elágico foi utilizado o comprimento de onda de 253 nm.

Os teores de quercitrina e ácido elágico nos extratos e frações de *S. ferruginea* são apresentados na Tabela 31. O maior teor de quercitrina foi encontrado na fração acetato de etila das folhas (105,4 mg g⁻¹ de fração), seguida da fração diclorometano (73,9 mg g⁻¹ de fração) e extrato etanólico das folhas (57,4 mg g⁻¹ de extrato). Nos extratos etanólicos dos pecíolos e dos galhos não foi possível quantificar, uma vez que, os valores obtidos para a quercitrina ficaram abaixo do limite de quantificação.

O maior teor de ácido elágico foi apresentando pela fração diclorometano das folhas (100,38 mg g⁻¹ de fração), seguida do extrato etanólico das folhas (27,2 mg g⁻¹ de extrato) pecíolos (18,0 mg g⁻¹ de extrato) e galhos (13,4 mg g⁻¹ de extrato). Não foi possível quantificar o ácido elágico na fração acetato de etila das folhas, pois os valores obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação.

Este é o primeiro estudo que relata o desenvolvimento de método de quantificação de quercitrina e ácido elágico em *S. ferruginea*, bem como, em espécies da família Simaroubaceae.

Tabela 31 - Teores de quercitrina e ácido elágico nos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e frações diclorometano (FDFSf) e acetato de etila (FAEFSf) das folhas de *S. ferruginea*

Amostra	Teor de quercitrina		Teor de ácido elágico	
	$\mu\text{g mL}^{-1}$	mg g^{-1} (%)	$\mu\text{g mL}^{-1}$	mg g^{-1} (%)
EEGSf	nq	nq	26,79 \pm 1,00	13,40 \pm 1,00 (1,34%)
EEPSf	nq	nq	36,04 \pm 0,16	18,02 \pm 0,16 (1,80%)
EEFSf	22,94 \pm 0,73	57,40 \pm 0,73 (5,74%)	54,37 \pm 1,40	27,18 \pm 1,40 (2,72%)
FDFSf	29,56 \pm 0,32	73,90 \pm 0,32 (7,39%)	40,15 \pm 1,40	100,38 \pm 1,40 (10,04%)
FAEFSf	41,96 \pm 1,62	105,00 \pm 1,62 (10,54%)	nq	nq
FAFSf	nq	nq	nq	nq

nq: não quantificável, pois os valores ficaram abaixo do limite de quantificação

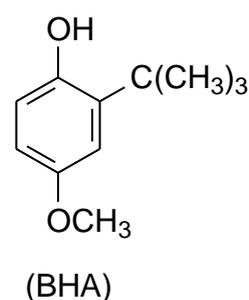
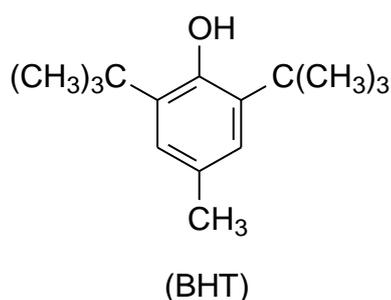
5.5 Avaliação do potencial biológico dos extratos e frações de *S. ferruginea*

5.5.1 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são provenientes de processos metabólitos essenciais no corpo humano ou de fontes exógenas, como: radiação, poluentes do ar e produtos químicos industriais (LOBO et al., 2010). As EROs incluem os radicais livres, que contêm oxigênio, tais como: radicais hidroxila (HO^\bullet), peroxila (ROO^\bullet), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical alcóxi (RO^\bullet), além de espécies não radicalares oxigênio singlete (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FAN et al., 2017; WU; KOSTEN; ZHANG, 2013)

Os radicais livres estão envolvidos em processos metabólitos de grande importância, como, na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; ALVES et al., 2010). No entanto, a falta ou excesso de radicais livres, ocasionam o estresse oxidativo, que está relacionado ao surgimento de diversos tipos de doenças, como câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas, distúrbios gastrointestinais, doenças cardiovasculares, asma, hepatite, entre outras (CARMONA-JIMÉNEZ et al., 2014; FORMAGIO et al., 2014; LOBO et al., 2010)

O estresse oxidativo pode ser reduzido e/ou eliminado pela ação dos antioxidantes, uma vez que estes agem no sequestro e estabilização dos radicais livres, impossibilitando seus efeitos nocivos às células e, conseqüentemente, o surgimento de doenças relacionadas a estes radicais (BARHÉ e TCHOUYA, 2015; YAO et al., 2016). Os antioxidantes sintéticos como, butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) têm demonstrado efeitos tóxicos, dessa forma, têm-se intensificado a busca por antioxidantes naturais (YAO et al., 2016).

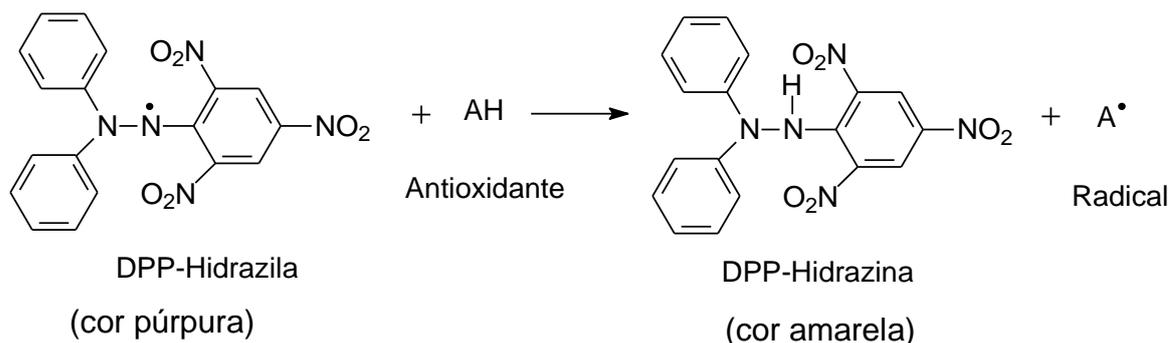


As plantas são fontes naturais de substâncias antioxidantes. Os metabólitos secundários que mais se destacam por apresentarem potencial antioxidante são os carotenoides, terpenoides e principalmente os compostos fenólicos, que incluem os flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e taninos por apresentarem anel aromático e grupos hidroxilas em suas estruturas. O ácido ascórbico, as vitaminas C e E também são exemplos de compostos antioxidantes (BROINIZI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012; WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011).

Vários métodos são utilizados na determinação da atividade antioxidante, como, por exemplo: sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, os métodos de sequestro de radicais livres DPPH \cdot (1,1- difenil-2-picrilidrazila), do cátion radical ABTS $^{2+}$ (2,2'-azinobis(3etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e do radical peroxila (ROO \cdot). O método de sequestro do radical livre DPPH é um dos mais utilizados, por ser de baixo custo e eficiente (ALVES et al., 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; ZHANG et al., 2016; ZHOU et al., 2017). Neste trabalho a atividade antiradicalar dos extratos etanólicos das folhas, pecíolos e galhos e frações do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea* foi avaliada por meio do ensaio de sequestro do radical livre DPPH.

O DPPH é um radical estável de coloração púrpura e apresenta absorção máxima na faixa de 515 a 520 nm. Na presença de compostos antioxidantes, o DPPH pode receber um elétron ou um átomo de hidrogênio por meio de uma reação de redução, convertendo-se em uma molécula de DPPH mais estável de coloração amarelada (Figura 95). Os resultados são expressos como Concentração Eficiente (CE₅₀), que é definida como a concentração do antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Quanto menor a CE₅₀, maior o potencial antioxidante da amostra (ALVES et al., 2010; CARMONA-JIMÉNEZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 95 - Estabilização do radical livre DPPH por uma espécie antioxidante AH



Fonte: Adaptada de OLIVEIRA et al., 2009

Os resultados de atividade antioxidante (%AA e CE_{50}) dos extratos e frações de *S. ferruginea* e dos controles positivos (rutina e BHT) frente ao radical DPPH estão apresentados na Figura 96 e nas Tabelas 32 e 33.

Os resultados mostraram que os extratos etanólicos das folhas, pecíolos e galhos apresentaram atividade antioxidante frente ao radical DPPH, com percentuais de 92,8, 93,4 e 51,7% (Tabela 32), respectivamente, na maior concentração testada ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que os extratos das folhas e pecíolos foram mais ativos, exibindo uma CE_{50} de $42,00 \pm 3,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $59,87 \pm 0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 33).

Todas as frações provenientes do extrato etanólico das folhas apresentaram atividade antioxidante. A fração acetato de etila apresentou o maior percentual de atividade antioxidante (CE_{50} de $32,67 \pm 0,63 \mu\text{g mL}^{-1}$), superando o extrato etanólico. Isto mostra que a partição do extrato etanólico concentrou maior parte das substâncias antioxidantes na fração acetato de etila.

As frações hexânica e diclorometano foram menos ativas, com %AA de $21,32 \pm 3,31$ e $46,46 \pm 1,41 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, na maior concentração (Tabela 32). Dessa forma, não foi possível calcular a CE_{50} , pois não houve redução em 50% do radical DPPH nas concentrações testadas.

O extrato etanólico das folhas e a fração acetato de etila foram os mais ativos, sendo superiores aos controles positivos rutina ($CE_{50} = 47,06 \pm 4,65 \mu\text{g mL}^{-1}$ e %AA = $94,14 \pm 0,22$) e BHT ($CE_{50} = 69,34 \pm 5,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ e %AA = $89,88 \pm 0,83$). Embora menos ativo, o extrato etanólico dos pecíolos exibiu atividade superior ao controle positivo BHT (Tabelas 32 e 33).

Figura 96 - (a) Percentual de atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e controles positivos rutina e BHT. (b) Percentual do EEFSf e frações hexânica (FHFSf), diclorometano (FDFSf), acetato de etila (FAEFSf) e aquosa (FAFSf) das folhas de *S. ferruginea* e dos controles positivos rutina e BHT. Tempo de reação com DPPH: 30min

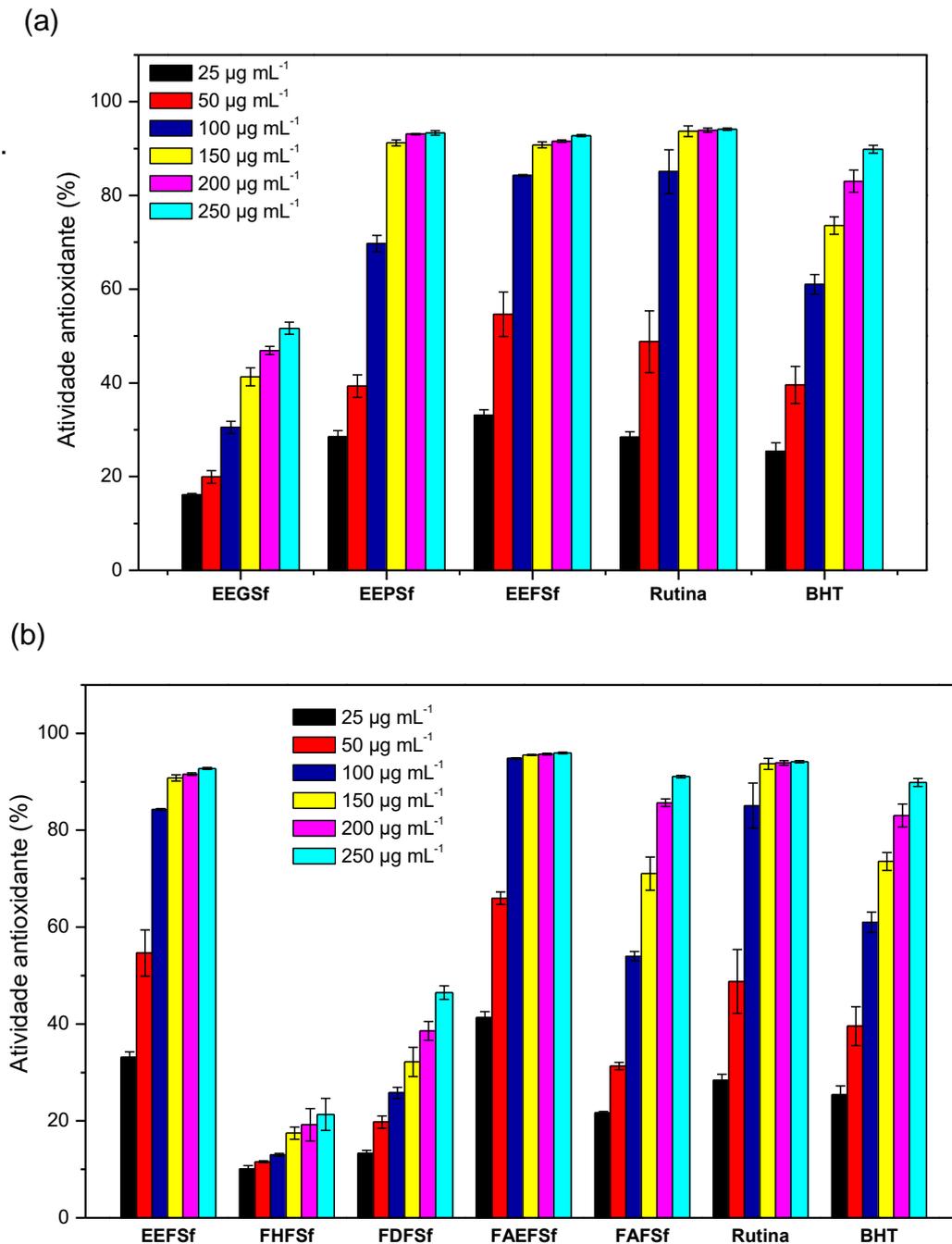


Tabela 32 - Percentual de atividade antioxidante dos extratos, frações de *S. ferruginea* e dos padrões rutina e BHT

AMOSTRAS	DPPH					
	AA% ± DP					
	25 µg mL ⁻¹	50 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	150 µg mL ⁻¹	200 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹
EEGSf	16,10 ± 0,30	19,93 ± 1,33	30,51 ± 1,28	41,30 ± 1,91	46,81 ± 0,88	51,65 ± 1,29
EEPSf	28,50 ± 1,29	39,29 ± 2,39	69,74 ± 1,74	91,22 ± 0,63	93,09 ± 0,14	93,35 ± 0,46
EEFSf	33,13 ± 1,12	54,65 ± 4,75	84,29 ± 0,17	90,78 ± 0,63	91,57 ± 0,41	92,75 ± 0,20
FHFSf	10,04 ± 0,74	11,55 ± 0,21	12,99 ± 0,31	17,48 ± 1,25	19,21 ± 3,32	21,32 ± 3,31
FDFSf	13,27 ± 0,66	19,76 ± 1,24	25,79 ± 1,12	32,18 ± 3,02	38,57 ± 1,94	46,46 ± 1,41
FAEFSf	41,32 ± 1,24	65,97 ± 1,29	94,81 ± 0,14	95,56 ± 0,10	95,71 ± 0,15	95,96 ± 0,17
FAFSf	21,67 ± 0,29	31,31 ± 0,76	53,98 ± 0,97	71,05 ± 3,43	85,65 ± 0,79	91,08 ± 0,25
Rutina	28,41 ± 1,19	48,79 ± 6,60	85,09 ± 4,68	93,72 ± 1,14	93,90 ± 0,45	94,14 ± 0,22
BHT	25,41 ± 1,82	39,55 ± 3,99	61,02 ± 2,11	73,58 ± 1,84	83,03 ± 2,37	89,88 ± 0,83

AA: atividade antioxidante; DP: desvio padrão; EEGSf: extrato etanólico dos galhos; EEPSf: extrato etanólico dos pecíolos; EEFSf: extrato etanólico das folhas; FHFSf: fração hexânica; FDFSf: fração diclorometano; FAEFSf: fração acetato de etila; FAFSf: fração aquosa; BHT- butil-hidróxido-tolueno

Os extratos etanólicos das folhas, pecíolos e a fração acetato de etila apresentaram atividade antiradicalar superiores as registradas para outras espécies de Simaroubaceae. Estudos com extratos metanólicos das folhas da espécie *Ailanthus altissima* coletadas em regiões distintas apresentaram CE_{50} de $81,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $86,61 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ALBOUCHI et al., 2013). O extrato hidroalcoólico das raízes de *Eurycoma longifolia* exibiu CE_{50} de $159,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ (VARGHESE et al., 2013). O extrato metanólico das folhas de *Ailanthus excelsa* apresentou CE_{50} de $85,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SAID et al., 2010). Entretanto, um estudo com o extrato etanólico das folhas de *Castela coccinea* mostrou que a atividade antioxidante foi superior aos extratos de *S. ferruginea*, com CE_{50} de $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CAMPAGNA et al., 2011).

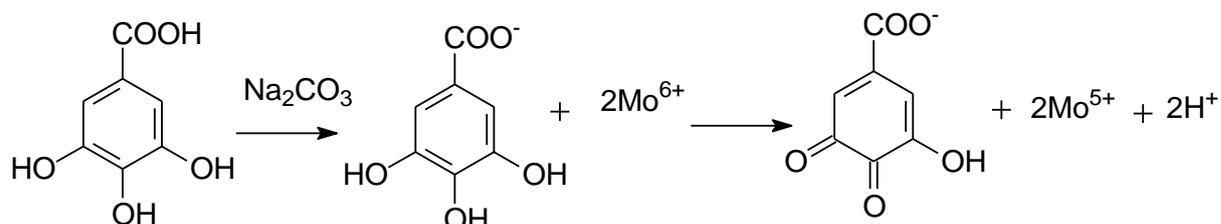
5.5.2 Determinação dos teores de fenóis e flavonoides totais

Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, devido sua capacidade de inativar reações radicalares e agir na complexação de íon metálicos, prevenindo processos oxidativos responsáveis pelo surgimento de doenças neurodegenerativas, carcinogênicas, cardiovasculares e inflamatórias (DUARTE- ALMEIDA et al., 2006; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; OLIVEIRA et al., 2009).

O teor de fenóis totais é mais comumente quantificado pelo método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, composto por uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico. Os metais molibdênio e tungstênio encontram-se no estado de oxidação $6+$ e apresentam coloração amarela. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os complexos molibdênio-tungstênio azuis, nos quais os estados de oxidação dos metais encontram-se entre $5+$ e $6+$ e absorvem em 765 nm (EVERETE et al., 2010; IKAWA et al., 2003; WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011)

A mudança de coloração possibilita a determinação da concentração das substâncias redutoras. O reagente Folin-Ciocalteu em meio básico (Na_2CO_3) reage com o composto fenólico, iniciando com a desprotonação para formar o ânion fenolato, que posteriormente, é oxidado e os metais molibdênio e tungstênio presentes no reagente são reduzidos. Neste processo, a cor do meio reacional passa de amarelo para azul. A Figura 97 mostra a proposta de oxidação do composto fenólico ácido gálico, entretanto a reação é iniciada pela desprotonação, porém, com formação do ânion carboxilato e posterior oxidação (SOUSA et al., 2007).

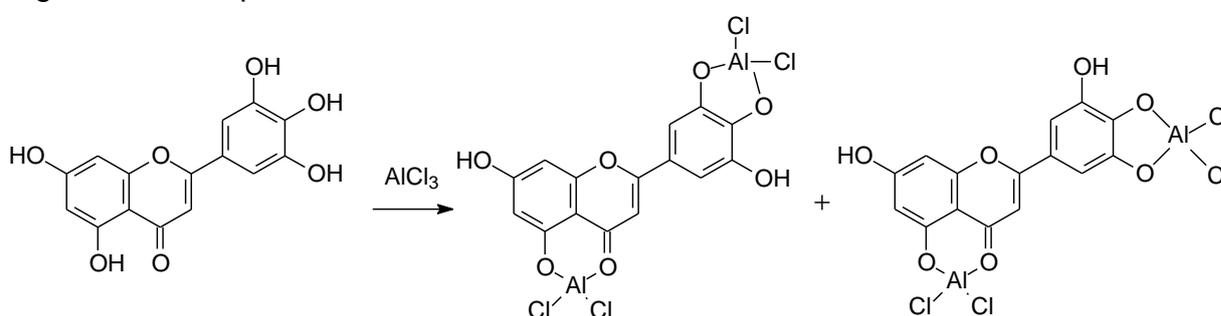
Figura 97 - Reação de redução do com o molibidênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico



Dentre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides que são substâncias antioxidantes devido sua capacidade de eliminar radicais livres e quelar metais (JABEEN et al., 2017). Além de propriedades antioxidantes, os flavonoides apresentam propriedades anti-inflamatórias, fotoprotetora, antimicrobianas, anti-diabéticas, antitumorais, entre outras (BARHÉ e TCHOUYA, 2015; ORHAN et al., 2010). As chalconas, flavononas, flavonóis, flavonas, antocianidinas, isoflavonas são exemplos de flavonoides (CUSHNIE e LAMB, 2005)

O método colorimétrico baseado na complexação dos flavonoides com o cloreto de alumínio é bastante utilizado para determinação do teor de flavonoides em plantas (FERREIRA et al., 2014; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012). A Figura 98 mostra como ocorre a formação do complexo flavonoide-Al.

Figura 98 - Complexos formados entre o flavonoide e o cloreto de alumínio



Fonte: Adaptada de Mabry; Markham; Thomas, 1970

Os teores de fenóis totais (FT), expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹ de amostra), os teores de flavonoides totais (FLAT), expressos em miligramas de equivalente de rutina por

grama de amostra (mg ER g^{-1} de amostra) e a concentração eficiente (CE_{50}) dos extratos e frações de *S. ferruginea* são mostrados na Tabela 33.

O extrato etanólico e a fração acetato de etila das folhas de *S. ferruginea* apresentaram os maiores teores de fenóis totais, $565,25 \pm 4,65$ e $654,94 \pm 3,59$ EAG g^{-1} , respectivamente. Estes dados mostraram que os compostos fenólicos ficaram mais concentrados na fração acetato de etila, após a extração líquido-líquido.

O extrato etanólico das folhas exibiu teor de fenóis totais ($565,25 \pm 4,65$ EAG g^{-1}) superior aos extratos etanólicos de quatro espécies do cerrado brasileiro, dentre as cinco estudadas por Sousa et al. (2007), as espécies *Terminalia brasiliensis* (folha, $667,90 \pm 10,93$ EAG g^{-1}), *Terminalia fagifolia* (folha, $483,63 \pm 26,00$ EAG g^{-1}), *Cenostigma macrophyllum* (folha, $439,38 \pm 3,15$ EAG g^{-1}), *Qualea grandiflora* (folha, $394,90 \pm 3,20$ EAG g^{-1}) e *Copernicia prunifera* (raiz, $250,00 \pm 8,20$ EAG g^{-1}).

Os resultados de fenóis totais se correlacionaram com a atividade antioxidante, uma vez que os compostos fenólicos são responsáveis por tal atividade, pois, em geral, quanto maior o conteúdo de fenóis totais de uma amostra, maior seu potencial antioxidante.

O extrato etanólico das folhas e a fração acetato de etila apresentaram elevado teor de flavonoides totais, $196,09 \pm 2,07$ mg ER g^{-1} e $158,34 \pm 1,96$ mg ER g^{-1} , respectivamente, estando desta forma em concordância com o elevado conteúdo de fenóis totais e potencial antioxidante.

Tabela 33 - Teores de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FLAT) e concentração eficiente (CE₅₀) dos extratos e frações das folhas de *S. ferruginea*

AMOSTRAS	FT	FLAT	CE ₅₀
	mg EAG g ⁻¹ de amostra ± DP	mg ER g ⁻¹ de amostra ± DP	µg mL ⁻¹ ± DP
EEGSf	137,02±3,11	39,26±4,19	242,78±12,05
EEPSf	377,01±0,47	52,10±0,63	59,87±0,80
EEFSf	565,25±4,65	196,09±2,07	42,00±3,20
FHFSf	119,55±1,96	nd	nd
FDFSf	233,52±2,92	nd	nd
FAEFSf	654,94±3,59	158,34±1,96	32,67±0,63
FAFSf	345,23±2,77	44,90±0,90	91,87±3,78
Rutina	-	-	47,06±4,65
BHT	-	-	69,34±5,53

EAG: equivalente de ácido gálico; ER: equivalente de rutina; DP: desvio padrão; EEGSf: extrato etanólico dos galhos; EEPSf: extrato etanólico dos pecíolos; EEFSf: extrato etanólico das folhas; FHFSf: fração hexânica; FDFSf fração diclorometano; FAEFSf: fração acetato de etila; FAFSf: fração aquosa.

5.5.3 Atividade fotoprotetora

As radiações ultravioleta (UV) são classificadas como radiações UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) e UVA (320-400 nm) (BOLOGH et al., 2011). A radiação UVC é absorvida totalmente pela camada de ozônio não ocasionando danos a pele. A UVB é absorvida parcialmente, ocorrendo predominantemente entre 10 e 14 horas e provoca queimaduras, enquanto que a radiação UVA ocorre durante todo dia e atinge as camadas mais profundas da pele, provocando envelhecimento precoce (OLIVEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2005).

A exposição excessiva às radiações UV provoca o estresse oxidativo e consequentemente, geram danos celulares na pele que resultam no surgimento acelerado de rugas, ressecamento, aspereza, pigmentação irregular,

imunossupressão, envelhecimento precoce e desenvolvimento de câncer de pele (BOLOGH et al., 2011).

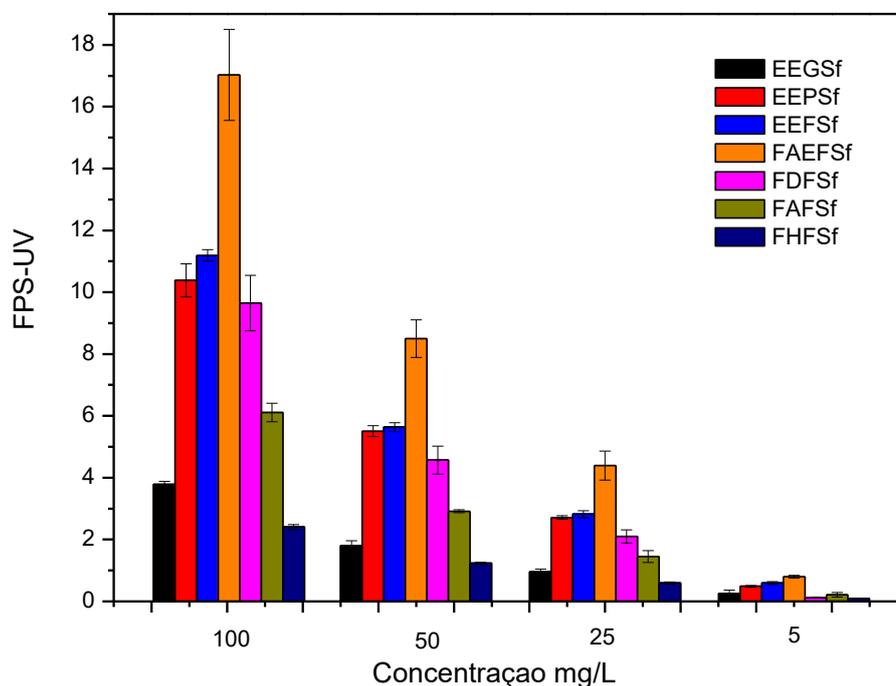
Os efeitos nocivos provocados principalmente pelas radiações UVA e UVB podem ser bloqueados pela ação de filtros solares, os fotoprotetores. Diversos extratos vegetais têm sido utilizados na indústria de cosméticos para a produção de filtros solares, devido à ação fotoprotetora verificada em algumas espécies de plantas. A eficácia de um filtro solar é medida em função de seu fator de proteção solar (FPS), quanto maior o FPS, maior a proteção para a pele (OLIVEIRA et al., 2013; VIOLANTE et al., 2009).

A atividade fotoprotetora depende da capacidade de absorção de radiação ultravioleta e da composição química da amostra. Tal atividade observada em algumas plantas deve-se principalmente a presença de determinadas classes de metabólitos secundários como, por exemplo, flavonoides, cumarinas e alcaloides que protegem a planta dos efeitos provocados pela radiação ultravioleta (OLIVEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2005; VIOLANTE et al., 2009).

Os resultados de FPS obtidos para os extratos e frações de *S. ferruginea* na maior concentração testada (100 mg/L) variaram de 3,78 a 17,03 (Figura 99). Segundo Violante et al. (2009) uma espécie com potencial fotoprotetor possui valores de FPS ≥ 2 . Desta forma todos os extratos e frações de *S. ferruginea* apresentaram atividade fotoprotetora.

O extrato etanólico e a fração acetato de etila das folhas foram os mais ativos, pois exibiram FPS de $11,18 \pm 0,18$ e $17,03 \pm 1,47$, respectivamente. Esses resultados podem ser justificados pela presença de flavonoides isolados nesta espécie. De acordo com Souza et al. (2005), os extratos de plantas que contêm flavonoides são capazes de absorver radiação ultravioleta, uma vez que o espectro de absorção ultravioleta destas substâncias apresentam picos máximos de absorções, um entre 240-280 nm e entre 300-550, o que possibilita a utilização destas amostras como filtros solares na produção de fotoprotetores. O extrato etanólico dos galhos e a fração hexânica das folhas foram os menos ativos, com FPS de $3,78 \pm 0,1$ e $2,4 \pm 0,1$, respectivamente (Figura 99).

Figura 99 - Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro* dos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf), folhas (EEFSf) e frações acetato de etila (FAEFSf), diclorometano (FDFSf), aquosa (FAFSf) e hexânica (FHFSf) das folhas de *S. ferruginea* na concentração de 100 mg L⁻¹



O FPS dos extratos etanólicos dos pecíolos ($10,38 \pm 0,53$), folhas ($11,18 \pm 0,18$) e frações diclorometano ($9,64 \pm 0,89$) e acetato de etila ($17,03 \pm 1,47$) das folhas de *S. ferruginea* foram superiores ao extrato etanólico ($7,22 \pm 0,61$), frações clorofórmica ($8,89 \pm 2,11$), acetato de etila ($4,60 \pm 0,65$) e hexânica ($1,74 \pm 0,13$) da espécie *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae), o que evidencia o elevado potencial fotoprotetor de *S. ferruginea* (OLIVEIRA et al., 2013)

Os extratos e frações de *S. ferruginea* apresentaram atividade fotoprotetora superior aos registrados em um estudo com espécies do cerrado brasileiro pertencentes às famílias Apocynaceae, Lythraceae e Oxaliaceae, onde foi verificado que todas as plantas exibiram $FPS < 2$, sendo assim, não apresentaram efeito fotoprotetor (VIOLANTE et al., 2009).

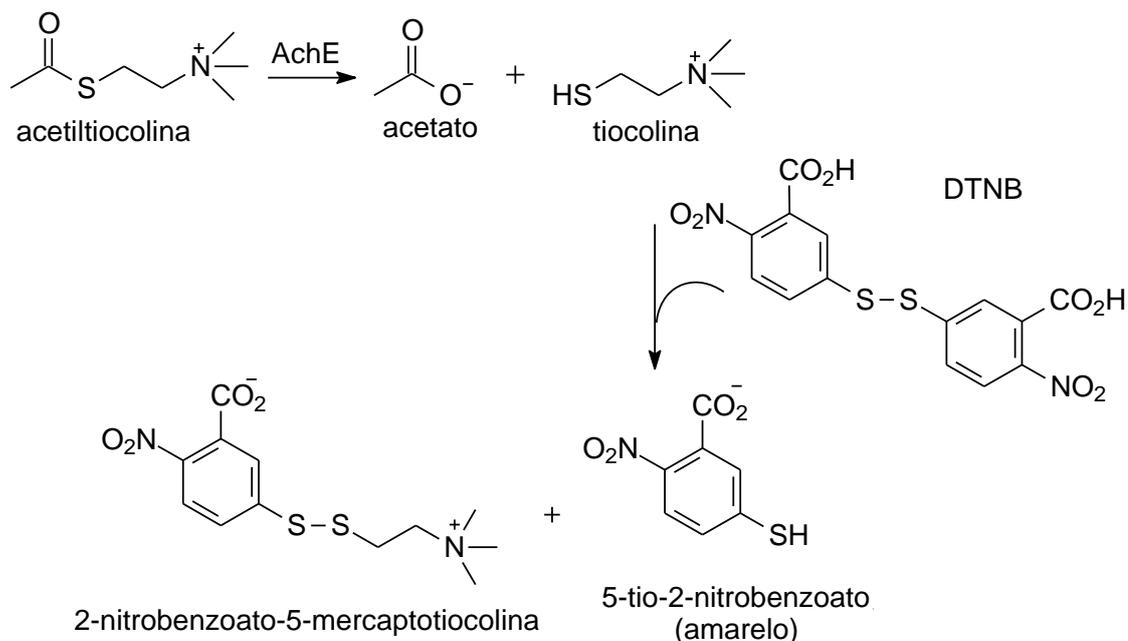
5.5.4 Atividade anticolinesterásica

O neurotransmissor acetilcolina (Ach) difundido por todo o sistema nervoso é responsável por diversas funções importantes no nosso organismo, como o controle motor, o aprendizado, alerta e a memória. No entanto, a enzima acetilcolinesterase (AChE) inativa a acetilcolina, hidrolisando-a em acetato e colina (MOTA et al., 2012).

A redução das taxas de Ach implica no surgimento de problemas degenerativos, como a doença de Alzheimer, que está relacionada com a perda da memória. O tratamento promissor para esta doença é o aumento do nível de Ach no cérebro, utilizando compostos capazes de inibir a enzima AchE no cérebro (CARVALHO et al., 2013). Diante disso, estudos com plantas medicinais na busca por compostos naturais com propriedade anticolinesterásica têm-se intensificado.

Um dos ensaios qualitativos utilizados para avaliar a inibição da enzima AchE emprega o método de Ellman, que se baseia na coloração apresentada na cromatoplaca e utiliza a cafeína como controle positivo. O princípio do método avalia a ação da enzima acetilcolinesterase (AchE) na hidrólise da acetiltiocolina, produzindo a tiocolina, que reage com DTNB (reagente de Ellman) formando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato de metila (coloração amarelada) e o 2-nitrobenzoato de metila-5-mercaptotiocolina (Figura 100). O teste de inibição é considerado positivo, quando se observa a presença de manchas brancas e o desaparecimento de coloração amarela na região de eluição, pois indica que houve inibição da enzima.

Figura 100 - Reação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE)



Fonte: Adaptada de RHEE et al., 2001

A atividade anticolinesterásica nos extratos etanólicos dos pecíolos, galhos, folhas e nas frações provenientes das folhas de *S. ferruginea* foi avaliada com base na coloração das cromatoplacas, utilizando a cafeína como controle positivo. Após a revelação com o reagente de Ellman, observou-se a presença de manchas brancas sob fundo amarelo nas regiões que continham os extratos dos pecíolos, folhas e as frações provenientes das folhas, sendo este perfil indicativo de resultado positivo de inibição da enzima acetilcolinesterase. No entanto, este resultado não foi observado para o extrato etanólico dos galhos.

5.5.5 Atividade larvicida

Estudos com plantas medicinais para avaliar seu potencial larvicida têm-se intensificado, em virtude do aumento de doenças transmitidas por insetos. Um exemplo é a dengue, doença de grande incidência nos países tropicais e subtropicais (inclusive no Brasil), que apesar dos avanços na busca por vacinas para prevenção da mesma e das medidas socioeducativas, ainda ocorre com muita frequência (GARCEZ et al., 2013; SILVA et al., 2014).

A fim de combater a grande incidência desta doença, a atividade larvicida de diversos extratos vegetais tem sido avaliada frente às larvas de *Aedes aegypti*,

mosquito transmissor da dengue. Neste trabalho os extratos etanólicos das folhas, pecíolos e galhos foram avaliados quanto ao seu potencial larvicida frente às larvas de *Aedes aegypti*. Os resultados mostraram que todos foram inativos.

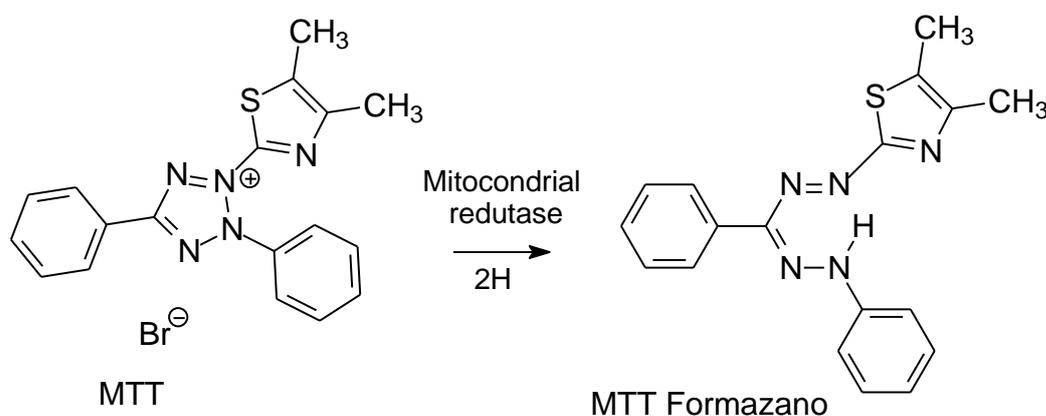
A atividade larvicida tem sido relatada na família Simaroubaceae, como por exemplo, para a espécie *Quassia amara* foi verificada esta atividade no extrato aquoso das folhas, cascas, flores e madeira frente a larvas de *Culex quinquefasciatus* (EVANS e RAJ, 1991).

5.5.6 Citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais

O câncer é um grande problema da saúde pública que afeta uma parcela considerável da população mundial. O número de casos e o surgimento de diversos tipos da doença são crescentes (CHANDEL et al., 2016). Extratos, frações e compostos isolados de plantas são avaliados em ensaio de viabilidade celular para apresentar possíveis propriedades citotóxicas.

O ensaio de citotoxicidade que utiliza o método MTT é bastante empregado, por se tratar de um método rápido, sensível e de baixo custo. É uma análise colorimétrica baseada na redução do MTT [brometo-3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] de coloração amarelada a cristais de formazano (precipitado de coloração azulada). Esta conversão ocorre por ação da enzima redutase mitocondrial presente em células metabolicamente ativas (Figura 101) (BURIOL et al., 2009; CHANDEL et al., 2016; EREN e OZATA, 2014; STOCKERT et al., 2012).

Figura 101 - Reação de redução do MTT a cristais de formazano



Fonte: Adaptada de STOCKERT et al. (2012)

A atividade citotóxica dos extratos etanólicos dos galhos, pecíolos e folhas de *S. ferruginea* foi avaliada frente a três linhagens de células tumorais, HCT-116 (cólon-humano), PC3 (próstata-humano) e SF-295 (glioblastoma-humano).

Os extratos etanólicos dos galhos e pecíolos de *S. ferruginea* apresentaram citotoxicidade moderada frente à linhagem de células tumorais SF-295 (glioblastoma), com percentuais de inibição de 60,15% e 46,55%, respectivamente, quando comparados ao controle positivo doxorubicina (87,67%), enquanto que o extrato etanólico das folhas exibiu baixo percentual, 33,05%.

O extrato etanólico dos galhos foi ativo frente as linhagens celulares HCT-116 (cólon) e SF-295 (glioblastoma), com percentuais de inibição de 88,61% e 60,15%, respectivamente. O extrato etanólico dos pecíolos apresentou citotoxicidade moderada frente às três linhagens celulares testadas, com percentuais de inibição de crescimento variando de 46,55 a 54,77%, conforme a Tabela 34.

A citotoxicidade frente a células tumorais tem sido relatada para algumas espécies de Simaroubaceae. Quassinoides isolados de *Ailanthus altissima* apresentaram citotoxicidade significativa frente linhagens celulares de hepatoma humano (Hep3B, HepG2 e HepG2/ADM) (WANG et al., 2013). Quassinoides isolados de *Simaba cedron* exibiram efeito citotóxico quando testados frente a linhagens celulares leucêmicas P388 (OZEKI et al., 1998).

Tabela 34 - Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos etanólicos dos galhos (EEGSf), pecíolos (EEPSf) e folhas (EEFSf) de *S. ferruginea*, na concentração de 10 µg mL⁻¹

AMOSTRA	IC% (média) ± DP		
	HCT-116	PC3	SF-295
EEGSf	88,61±1,44	32,88±25,06	60,15±16,27
EEPSf	54,77±1,90	52,30±2,93	46,55±16,68
EEFSf	23,70±12,31	46,33±7,64	33,05±5,65
Doxorrubicina*	nt	nt	87,67

DP: desvio padrão, *controle positivo. nt: não testada

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico das folhas de *S. ferruginea* resultou no isolamento de um quassinóide (**1**), dos flavonoides canferol (**2**), canferol-3-O- α -L-ramnosídeo (afzelina) (**3**), quercetina (**4**) e quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercitrina) (**5**), da lignana (+)-siringaresinol (**6**), do ácido elágico (**7**) e dos açúcares α -glicose (**8**) e β -glicose (**9**).

Os compostos **2**, **6** e **7** estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Simaba*, enquanto que os compostos **3**, **4**, **8** e **9** estão sendo relatados pela primeira vez na família Simaroubaceae e o composto **1** é inédito na literatura.

Os compostos quercitrina (Q) e ácido elágico (AE) foram também identificados por co-injeção e quantificados por CLAE-DAD nos extratos etanólicos dos galhos, pecíolos e folhas e frações diclorometano, acetato de etila e aquosa do extrato etanólico das folhas de *S. ferruginea*. Os métodos para quantificação apresentaram seletividade e boa linearidade dentro das faixas de concentração avaliadas ($r=0,999$).

A fração acetato de etila das folhas apresentou o maior teor de quercitrina ($105,4 \text{ mg g}^{-1}$), seguida da fração diclorometano e extrato etanólico das folhas. Não foi possível quantificar a quercitrina nos extratos etanólicos dos pecíolos e galhos, uma vez que, os valores obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação.

O maior teor de ácido elágico foi apresentando pela fração diclorometano das folhas ($100,38 \text{ mg g}^{-1}$), seguida dos extratos etanólicos dos pecíolos e galhos. Não foi possível quantificar o ácido elágico na fração acetato de etila das folhas, pois os valores obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação.

Na análise de atividade antioxidante por meio do ensaio de sequestro do radical DPPH, a fração acetato de etila e o extrato etanólico das folhas apresentaram os maiores percentuais de atividade antioxidante, com CE_{50} de $32,67 \pm 0,63 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $42,00 \pm 3,20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, bem como os maiores teores de fenóis e flavonoides totais. Estes resultados podem ser justificados, em parte, pela presença dos compostos fenólicos canferol (**2**), canferol-3-O- α -L-ramnosídeo (afzelina) (**3**), quercetina (**4**) quercetina-3-O- α -L-ramnosídeo (quercitrina) (**5**), (+)-siringaresinol (**6**) e ácido elágico (**7**) isolados do extrato etanólico das folhas.

Os extratos e frações provenientes das folhas de *S. ferruginea* apresentaram atividade fotoprotetora, pois os resultados de FPS variaram de 3,78 a 17,03 na maior

concentração testada (100 mg/L), sendo que o extrato etanólico e a fração acetato de etila das folhas foram os mais ativos, pois exibiram FPS de $11,18 \pm 0,18$ e $17,03 \pm 1,47$, respectivamente. Este resultado pode ser justificado, em parte, pela presença dos flavonoides isolados da espécie.

Com exceção do extrato etanólico dos galhos, os demais extratos e frações apresentaram indicativo de inibição da enzima acetilcolinesterase no ensaio em cromatografia em camada delgada e revelação com reagente de Ellman. Todos os extratos foram inativos frente às larvas de *Aedes aegypti*.

Quanto ao potencial citotóxico dos extratos etanólicos de *S. ferruginea*, o extrato dos pecíolos apresentou citotoxicidade moderada frente às três linhagens celulares testadas, HCT-116 (cólon-humano), PC3 (próstata-humano) e SF-295 (glioblastoma-humano). O extrato etanólico dos galhos foi ativo frente as linhagens celulares HCT-116 (cólon) e SF-295 (glioblastoma), com percentuais de inibição de 88,61% e 60,15%, respectivamente. No entanto, o extrato etanólico das folhas foi o que exibiu menor citotoxicidade.

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química e potencial biológico da espécie *S. ferruginea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº899, de 29/05/2003.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 of Flavonoids.** Elsevier, 1989, 164 p.

AHMED, S.; RAHMAN, A.; SALEEM, M.; ATHAR, M.; SULTANA, S. Ellagic acid ameliorates nickel induced biochemical alterations: diminution of oxidative stress. **Hum. Exp. Toxic.**, v. 18, n. 11, p. 691-698, 1999.

ALBOUCHI, F.; HASSEN, I.; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. Phytochemicals, antioxidant, antimicrobial and phytotoxic activities of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle leaves. **S. Afr. J. Bot.**, v. 87, p. 164-174, 2013.

ALBUQUERQUE, C. H.; TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, S. L.; SILVA, T. S.; GONÇALVES, G. F.; COSTA, V. C. O.; AGRA, M. F.; PESSÔA, H. L. F.; SILVA, M. S. Flavonoides glicosilados de *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil. (Erythroxylaceae). **Quim. Nova**, v. 37, n. 4, p. 663-666, 2014.

ALMEIDA, E. S. S.; CECHICEL FILHO, V.; NIERO, R.; CLASEN, B. K. Pharmacological mechanisms underlying the anti-ulcer activity of metanol extract na cathin-6-one of *Simaba ferruginea* A. St-Hil. in animal models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 134, p. 630-636, 2011.

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinoides da última década. **Quim. Nova**, v. 30, p. 935. 2007.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, I. A. B. S.; MIRANDA, H. M.; SOARES, L. A. L.; RANDAU, K. P. Simaroubaceae Family: botany, chemical composition and biological activities. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, n. 3, p. 481-501, 2014.

AMAKURA, Y.; OKADA, M.; SUMIKO, T.; TONOGAI, Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. **J. Chromatogr. A**, v. 896, n. 2, p. 87-93, 2000.

APERS, S., CIMANGA, K.; BERGHE, D. V.; MEENEN, E. V.; LONGANGA, A. O.; FORIERS, A.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiviral activity of simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. **Planta Med.**, v. 68, n. 01, p. 20-24, 2002.

ARIMA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G. Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 66, n. 5, p. 1009-1014, 2002.

ARISAWA, M.; KINGHORN, A. D.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. Plant anticancer agents. XXIII. 6 α -Seneciolyoxychaparrin, a new antileukemic quassinoid from *Simaba multiflora*. **J. Nat. Prod.**, v. 46, n. 2, p. 218-221, 1983.

- ARRIAGA, A. M. C.; MESQUITA, A. C.; POULIQUEN, Y. B. M.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; SIQUEIRA, J. A.; ALEGRIO, L. V.; BRAZ FILHO, R. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 74, n. 3, p. 415 – 424, 2002.
- ARTANTI, N.; MA'ARIFA, Y.; HANAFI, M. Isolation and identification of active antioxidant compound from star fruit (*Averrhoa carambola*) mistletoe (*Dendrophthoe pentandra* (L.) miq.) ethanol extract. **J. Appl. Sci.**, v. 6, p.1659-1663, 2006.
- AZIZ, M. A.; KHAN, A. H.; ADNAN, M.; IZATULLAH, I. Traditional uses of medicinal plants reported by the indigenous communities and local herbal practitioners of Bajaur Agency, Federally Administrated Tribal Areas, Pakistan. **J. Ethnopharmacol.**, v. 198, p. 268-281, 2017.
- BALA, I.; BHARDWAJ, V.; HARIHARAN, S.; RAVI KUMAR, M. N. V. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006.
- BARBOSA, L. F.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Simaba* (Simaroubaceae). **Chem. Biodivers.**, v. 8. p. 2163-2178, 2011.
- BARHÉ, T. A.; TCHOUYA, G. R. F. Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa* L., *Glycine max* L. Merr., yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. **Arab. J. Chem.**, v. 9, p. 1-8, 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova.**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.
- BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.
- BJELDANES, L. F.; CHANG, G. W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. **Science**, v. 1977, p.577-578, 1977.
- BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 585, p. 325-337, 2008.
- BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 4, p. 890-896, 2007.
- BURIL, M. T.; THOMAS, W. W.; ALVES, M. Flora of the Usina São José, Igarassu-PE: Rutaceae, Simaroubaceae and Picramniaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 701-710, 2014.

- BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M.; ROSA, M. R. D.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R.; SANTA, H. S. D.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; FERREIRA, P. M. P.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Quim. Nova**, v. 32, n.2, p.292-302, 2009.
- CABRAL, J. A.; McCHESNEY, J. D.; MILHOUS, W. K. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n. 11, p. 1954-1961, 1993.
- CALZADO-FLORES, C.; VERDE-STAR, J.; MORALES-VALLARTA, M.; SEGURA-LUNA, J. J. Possible inhibition of *Entamoeba invadens* encystation by *Castela texana*. **Arch. Med. Res.**, v. 31, n. 4, p. S196-S197, 2000.
- CAMPAGNA, M., MARTINEZ, M., BROUSSALIS, A., GATTUSO, M. Actividad antioxidante, análisis fitoquímico y micrografía analítica de hojas de *Castela tweedii* (Simaroubaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 11, n. 6, 2012.
- CAMUESCO, D.; COMALADA, M.; CONCHA, A.; NIETO, A.; SIERRA, S.; XAUS, J.; ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. **J. Nutr.**, v. 135, n. 4, p. 687-694, 2005.
- CARMONA-JIMÉNEZ, Y.; GARCÍA-MORENO, M. V.; IGARTUBURU, J. M.; BARROSO, C. G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. **Food Chem.**, v. 165, p. 198-200, 2014.
- CARTAXO, S. L.; ALMEIDA SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.
- CARTER, C. A.; TINTO, W. F.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Quassinoids from *Quassia multiflora*: Structural assignments by 2D NMR spectroscopy. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n. 1, p. 130-133, 1993.
- CARVALHO, R. B. F. D.; ALMEIDA, A. A. C. D.; FREITAS, R. M. D.; LIMA, L. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M.; FEITOSA, C. M. Composição química e atividade anticolinesterásica de uma fração ativa do extrato de folhas de *Citrus limon* (L.) Burm. **Quim. Nova**, v. 36, n. 9, p. 1375-1379, 2013.
- CAVALCANTE, P. B. Revisão taxonômica do gênero *Simaba* Aubl. (Simaroubaceae) na América do Sul. **Pub. Avulsas**, n. 37, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém-PA, 1983.
- CERCATO, L. M.; WHITE, P. A.; NAMPO, F. K.; SANTOS, M. R.; CAMARGO, E. A. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? **J. Ethnopharmacol.**, v. 176, p. 286-296, 2015.
- CHANDEL, M.; KUMAR, M.; SHARMA, U.; KUMAR, N.; SINGH, B.; KAUR, S. Isolation and characterization of flavanols from *Anthocephalus cadamba* and evaluation of their antioxidant, antigenotoxic, cytotoxic and COX-2 inhibitory activities. **Rev. Bra. Farmacogn.**, v. 26, n. 4, p. 474-483, 2016.

- CHEN, C. Y.; HSIEH, S. L.; HSIEH, M. M.; HSIEH, S. F.; HSIEH, T. J. Substituent chemical shift of rhamnosides from stems of *Cinnamomum osmophleum*. **The Chinese Pharm. J.**, v. 56, n. 3, p. 141-146, 2004.
- CINCIN, Z. B.; UNLU, M.; KIRAN, B.; BIRELLER, E. S.; BARAN, Y.; CAKMAKOGLU, B. Molecular mechanisms of quercitrin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer. **Arch. Med. Res.**, v. 45, n. 6, p. 445-454, 2014.
- COOMBES, P. H.; NAIDOO, D.; MULHOLLAND, D. A.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M. Quassinoids from the leaves of the Madagascan Simaroubaceae *Samadera madagascariensis*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 23, p. 2734-2739, 2005.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CUI, C. B.; ZHAO, Q. C.; CAI, B.; YAO, X. S.; OSADA, H. A new polyphenolic compound from *Rubus aleaefolius* and its inhibitory activity on mammalian cell cycle at G₀/G₁ Phase. **Chin. Chem. Lett.**, v. 13, n. 4, p. 327-330, 2002.
- CUNHA, G. P.; CECHINEL FILHO, V.; MARTINS, D. T. O.; MARCELLO, C. M.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; NOLDIN, V. F.; RODRIGUES, C. A. Utilization of chitin and chitosan as chromatography supports for separation of alkaloids from dichloromethane extract of *Simaba ferruginea*. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, p. 255, 2008.
- CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- DEL MORAL, P. G.; ARÍN, M. J.; RESINES, J. A.; DÍEZ, M. T. Determination of ellagic acid in oak leaves and in sheep ruminal fluid by ion-pair RP-HPLC. **J. Chromatogr. B**, v. 855, n. 2, p. 276-279, 2007.
- DEVI, K. P.; MALAR, D. S.; NABAVI, S. F.; SUREDA, A.; XIAO, J.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacol. Res.**, v. 99, p. 1-10, 2015.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Wiley, 2002.
- DIYABALANAGE, T.; RATNAYAKE, R.; WILSON, J. A.; HENRICH, C. J.; BEUTLER, J. A.; COLBURN, N. H.; MCMAHON, J. B.; GUSTAFSON, K. R. Nothospondin, a new AP-1 inhibitory quassinoid from the Cameroonian plant *Nothospondias staudtii*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 21, n. 15, p. 4397-4399, 2011.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciencia Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- ELEKOFEHINTI, O. O. Saponins: Anti-diabetic principles from medicinal plants—A review. **Pathophysiology**, v. 22, n. 2, p. 95-103, 2015.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, D. K.; ANDRES, V. J. R.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EREN, Y.; OZATA, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. **Rev. Bra. Farmacogn.**, v. 24, n. 1, p. 51-59, 2014.

EVANS, D. A.; RAJ, R. K. Larvicidal efficacy of quassin against *Culex quinquefasciatus*. **Indian J. Med. Res.**, v. 93, p. 324-327, 1991.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

FAN, J.; FENG, H.; YU, Y.; SUN, M.; LIU, Y.; LI, T.; SUN, M.; LIU, S.; SUN, M. Antioxidant activities of the polysaccharides of *Chuanminshen violaceum*. **Carbohydr. Polym.**, v. 157, p. 629-636, 2017.

FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I. M., SILVA, M. G., SANTOS, K. S. C. R., SILVA-JÚNIOR, A. A., CARVALHO, M. C. R. D.; SOARES, L. A. L.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 14, n. 3, p. 548-555, 2012.

FERREIRA, E. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. **J. Med. Plants Res.**, v.8, p. 353, 2014.

FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. *Bauhinia forficata* Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties. **Food Chem.**, v. 134, n. 2, p. 894-904, 2012.

FILOMENI, G.; GRAZIANI, I.; DE ZIO, D.; DINI, L.; CENTONZE, D.; ROTILIO, G.; CIRIOLO, M. R. Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging.**, v. 33, n. 4, p. 767-785, 2012.

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; SANTIAGO, M.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. D. C.; VALDEVINA PEREIRA, Z. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in psychotria leaf extracts. **Antioxidants**, v. 3, n. 4, p. 745-757, 2014.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; CARVALHO, A. A. J.; PEIXOTO, A. L.; TELES, B. M. W.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PADRO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; COSTA, L. M.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, Rio de Janeiro. v. 2, 2010.

FRANÇOIS, G.; DIAKANAMWA, C.; TIMPERMAN, G.; BRINGMANN, G.; STEENACKERS, T.; ATASSI, G.; LOOVEREN M. V. HOLENZ, J.; TASSIN, J. P.; ASSI, L. A.; FASTRÉ, L. V.; VANHAELEN, M. Antimalarial and cytotoxic potential of four quassinoids from *Hannoa chlorantha* and *Hannoa klaineana*, and their structure-activity relationships. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, n. 4, p. 635-640, 1998.

FURTADO, R. F.; DE LIMA, M. G.A. NETO, M. A.; BEZERRA, JOSÉ, N. S.; SILVA, M. G. V. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 34, p. 843-847, 2005.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M.; SARMENTO, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Rev. Virt. Quim.**, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Act. Bot. Bras.**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GIRISH, C.; PRADHAN, S. C. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 22, n. 6, p. 623-632, 2008.

GOIS, M.; LUCAS, F.; COSTA, J.; MOURA, P.; LOBATO, G. Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 18, n. 2, p. 547-557, 2016.

GUO, Z.; VANGAPANDU, S.; SINDELAR, R. W.; WALKER, L. A.; SINDELAR, R. D. Biologically active quassinoids and their chemistry: potential leads for drug design. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n. 2, p. 173-190, 2005.

HALEAGRAHARA, N.; MIRANDA-HERNANDEZ, S.; ALIM, M. A.; HAYES, L.; BIRD, G.; KETHEESAN, N. Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis. **Biomed. Pharmacother.**, v. 90, p. 38-46, 2017.

HANSEN, K.; ADSERSEN, A.; SMITT, U. W.; NYMAN, U.; CHRISTENSEN, S. B.; SCHWARTNER, C.; WAGNER, H. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Erythroxylum laurifolium*. **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 313-317, 1996.

HAYES, J. E.; ALLEN, P.; BRUNTON, N.; O'GRADY, M. N.; KERRY, J. P. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. **Food Chem.**, v. 126, n. 3, p. 948-955, 2011.

HITOTSUYANAGI, Y.; OZEKI, A.; ITOKAWA, H.; ALVES, S.M; TAKEYA, K. Cedronolactone E, a novel C₁₉ quassinoid from *Simaba cedron*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 12, p. 1583-1584, 2001.

HUANG, S. W.; QIAO, J. W.; SUN, X.; GAO, P. Y.; LI, L. Z.; LIU, Q. B. SUN, B.; W. D. L.; SONG, S. J. Secoiridoids and lignans from the leaves of *Diospyros kaki* Thunb. with antioxidant and neuroprotective activities. **J. Funct. Foods**, v. 24, p. 183-195, 2016.

- IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 7, p. 1811-1815, 2003.
- ITOH, T.; NINOMIYA, M.; YASUDA, M.; KOSHIKAWA, K.; DEYASHIKI, Y.; NOZAWA, Y.; AKAO, Y.; KOKETSU, M. Inhibitory effects of flavonoids isolated from *Fragaria ananassa* Duch on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 15, p. 5374-5379, 2009.
- JABEEN, E.; JANJUA, N. K.; AHMED, S.; MURTAZA, I.; ALI, T.; HAMEED, S. Radical scavenging propensity of Cu^{2+} , Fe^{3+} complexes of flavonoids and *in-vivo* radical scavenging by Fe^{3+} -primuletin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 432-438, 2017.
- JACOBS, H.; LEWIS, D. E.; SAWYER, J. F.; MCLEAN, S. Cedronin and 7-epi-Cedronin: X-ray crystal structure analysis. **J. Nat. Prod.**, v. 50, n. 4, p. 700-705, 1987.
- JAMROZ, M. K.; PARADOWSKA, K.; ZAWADA, K.; MAKAROVA, K.; KAZMIERSKI S.; WAWERA, I. ^1H and ^{13}C NMR-based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoneys and honeys. **J. Sci. Food Agric.** v. 94, p. 246–255, 2014.
- JIN, X.; JIN, H. R.; LEE, D.; LEE, J. H.; KIM, S. K.; LEE, J. J. A quassinoid 6 α -tigloyloxychaparrinone inhibits hypoxia-inducible factor-1 pathway by inhibition of eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 592, n. 1, p. 41-47, 2008.
- KASHYAP, D.; SHARMA, A.; TULI, H. S.; SAK, K.; PUNIA, S.; MUKHERJEE, T. K. Kaempferol – A dietary anticancer molecule with multiple mechanisms of action: Recent trends and advancements. **J. Funct. Foods**, v. 30, p. 203-219, 2017.
- KAUR, K.; JAIN, M.; KAUR, T.; JAIN, R. Antimalarials from nature. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 9, p. 3229-3256, 2009.
- KERKHOFF, J.; NORONHA, J. C.; BONFILIO, R.; SINHORIN, A. P.; RODRIGUES, D. J.; CHAVES, M. H.; JÚNIOR, G. M. V. Quantification of bufadienolides in the poisons of *Rhinella marina* and *Rhaebo guttatus* by HPLC-UV. **Toxicon**. v. 119, p. 311-318, 2016.
- KIM, H. M.; KIM, S. J.; KIM, H. Y.; RYU, B.; KWAK, H.; HUR, J.; CHOI, J. H.; JANG, D. S. Constituents of the stem barks of *Ailanthus altissima* and their potential to inhibit LPS-induced nitric oxide production. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 25, n. 5, p. 1017-1020, 2015.
- KUBO, I.; MURAI, Y.; CHAUDHURI, S. K. Structure of chaparramarin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3262-3264, 1992.
- KUBO, I.; MURAI, Y.; CHAUDHURI, S. K. Castelalin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 461-463, 1993.
- KUPCHAN, S. M.; BRITTON, R. W., LACADIE, J. A.; ZIEGLER, M. F.; SIGEL, C. W. The isolation and structural elucidation of bruceantin and bruceantanol, new potent

antileukemic quassinoids from *Brucea antidysenterica*. **J. Org. Chem.**, v. 40, n. 5, p. 648-654, 1975.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food Bioprod. Process.**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

LANDIM, L. P.; FEITOZA, G. S.; DA COSTA, J. G. M. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 23, n. 1, p. 58-64, 2013.

LI, Z. J.; GUO, X.; DAWUTI, G.; AIBAI, S. Antifungal Activity of Ellagic Acid *In Vitro* and *In Vivo*. **Phytother. Res.**, v. 29, n. 7, p. 1019-1025, 2015.

LI, J.; SHI, M.; MA, B.; NIU, R.; ZHANG, H.; KUN, L. Antitumor activity and safety evaluation of nanoparticle-based delivery of quercetin through intravenous administration in mice. **Mater. Sci. Eng C.**, v. 77, p. 803-810, 2007.

LIN, S.; ZHU, Q.; WEN, G.; YANG, B.; JIANG, L.; GAO, H.; CHEN, F.; JIANG, Y. Production of quercetin, kaempferol and their glycosidic derivatives from the aqueous-organic extracted residue of litchi pericarp with *Aspergillus awamori*. **Food Chem.**, v. 45, p. 220-227, 2014.

LIU, Y.; MURAKAMI, N.; JI, H.; ABREU, P.; ZHANG, S. Antimalarial Flavonol Glycosides from *Euphorbia hirta*. **Pharm. Biol.**, v. 45, n. 4, p. 278-281, 2007.

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ESTRADA-CAMARENA, E. Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. **J. Ethnopharmacol.**, v. 186, p. 377-391, 2016.

LU, R. L.; HU, F. L.; XIA, T. Activity-guided isolation and identification of radical scavenging components in Gao-Cha Tea. **J. Food Sci.**, v. 75, n. 8, p. H239-H243, 2010.

LUMONADIO, L.; ATASSI, G.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRE, R. Antitumor activity of quassinoids from *Hannoa klaineana*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 31, n. 1, p. 59-65, 1991.

LUMONADIO, L.; VANHAELEN, M. Indole alkaloids and quassin from *Quassia africana*. **J. Nat. Prod.**, v. 49, n. 5, p. 940-940, 1986.

LUO, C.; YANG, H.; TANG, C.; YAO, G.; KONG, L.; HE, H.; ZHOU, Y. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal in type 2 diabetic rats. **Int. Immunopharmacol.**, v. 28, n. 1, p. 744-750, 2015.

MA, J. Q.; LUO, R. Z.; JIANG, H. X.; LIU, C. M. Quercitrin offers protection against brain injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation. **Food Funct.**, v. 7, n. 1, p. 549-556, 2015.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1970, 354p.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAESTRIN, A. P. J.; NERI, C. R.; OLIVEIRA, K. T.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: Um experimento para os cursos de química. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.

MANSOURI, M. T.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Ellagic acid enhances the antinociceptive action of venlafaxine in mouse acetic acid-induced pain: An isobolographic analysis. **Pharmacol. Rep.**, v. 67, n. 3, p. 473-477, 2015.

MARANHÃO, H. M. L.; VASCONCELOS, C. F. B.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; NETO, J. C. S.; FILHO, R. C. S.; FERNANDES, M. P.; COSTA-SILVA, J. H.; ARAÚJO, A. V.; WANDERLEY, A. G. Hepatoprotective effect of the aqueous extract of *Simarouba amara* Aublet (Simaroubaceae) stem bark against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatic damage in rats. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17735-17746, 2014.

MATTE, A. K.; AK, A. R.; MATA, P. Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana de extratos das flores de *Sambucus nigra* L.(Caprifoliaceae). **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 17, n. 4, supl. 3, p. 1049-1054, 2015.

MESRAM, N.; NAGAPURI, K.; BANALA, R. R.; NALAGONI, C. R.; KARNATI, P. R. Quercetin treatment against NaF induced oxidative stress related neuronal and learning changes in developing rats. **Journal of King Saud University – Science**. v. 29, p. 221–229, 2017.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHELD, S.; TILLEQUIND, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J. Ethnopharmacol.**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

MIRANDA, M. L. D.; SOUZA, A. F.; RODRIGUES, E. D.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (LEGUMINOSAE). **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1306-1311, 2012.

MISHRA, K.; CHAKRABORTY, D.; PAL, A.; DEY, N. Plasmodium falciparum: *in vitro* interaction of quassin and neo-quassin with artesunate, a hemisuccinate derivative of artemisinin. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n. 4, p. 421-427, 2010.

MONTHONG, W.; PITCHUANCHOM, S.; NUNTASAEN, N.; POMPIMON, W. (+)-Syringaresinol Lignan from New Species *Magnolia Thailandica*. **Am. J. Appl. Sci.**, v. 8, n. 12, p. 1268-1271, 2011.

MORETTI, C.; BHATNAGAR, S.; BELOEIL, J. C.; POLONSKY, J. Two new quassinoids from *Simaba multiflora* fruits. **J. Nat. Prod.**, v. 49, n. 3, p. 440-444, 1986.

MORETTI, C.; DEHARO, E.; SAUVAIN, M.; JARDEL, C.; DAVID, P. T.; GASQUET, M. Antimalarial activity of cedronin. **J. Ethnopharmacol.**, v. 43, n. 1, p. 57-61, 1994.

MOTA, W. M.; BARROS, M. L.; CUNHA, P. E. L.; SANTANA, M. V. A.; STEVAM, C. S.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M. Evaluation of acetylcholinesterase

inhibition by extracts from medicinal plants. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 14, n. 4, p. 624-628, 2012.

MUHAMMAD, I.; BEDIR, E.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I. A.; TAKAMATSU, S.; PELLETIER, J.; WALKER, L. A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 5, p. 772-777, 2004.

MULHOLLAND, D. A.; NAIDOO, D.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; CHEPLOGOI, P. K.; COOMBES, P. H. Secondary metabolites from *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 631-635, 2003.

NOLDIN, V. F. **Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferrugínea* St. Hil. e a avaliação da atividade antiúlcera antinociceptiva dos extratos e compostos isolados**. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2005.

NOLDIN, V. F.; MARTINS, D. T. O.; MARCELLO, C. M.; LIMA, J. C. S.; MONACHE, F. D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and antiulcerogenic properties of rhizomes from *Simaba ferruginea* St. Hill. (Simaroubaceae). **Z. Naturforsch.**, v. 60, p. 701, 2005.

NUNOMURA, R. C. S.; PINTO, A. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M.; AMARAL, A. C. F. Constituintes químicos dos galhos de *Simaba guianensis* subesp. ecaudata (Cronquist). **Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2153-2158, 2012.

OH, H. A.; HAN, N. R.; KIM, M. J.; KIM, H. M.; JEONG, H. J. Evaluation of the effect of kaempferol in a murine allergic rhinitis model. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 718, n. 3, p. 48-56, 2013.

OKANO, M.; FUKAMIYA, N.; LEE, K. H. Bioactive quassinoids. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 23, p. 285-333, 2000.

ORHAN, D. D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiol. Res.**, v. 165, n. 6, p. 496-504, 2010.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; SEGUNDO, T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. New enamines derivatived of lapachol and biological activity. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 74, n. 2, p. 211-321, 2002.

OLIVEIRA, P. S.; MULLER, R. C. S.; DANTAS, K. G. F.; ALVES, C. N.; VASCONCELOS, M. A. M. VENTURIERI, G. C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Quim. Nova**, v. 35, p. 1728, 2012.

OLIVEIRA, R. G.; SOUZA, G. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P., MORAIS, A. C. S.; ARAÚJO, E. C.; NUNES, X. P.; ALMEIDA, J. R. G. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) present antioxidant and photoprotective activities *in vitro*. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, n. 3, p. 102-105, 2013.

O'NEILL, M. J.; BRAY, D. H.; BOARDMAN, P.; WRIGHT, C. W.; PHILLIPSON, J. D.; WARHURST, D. C.; MAHABIR, P. G.; CORREYA, M.; SOLIS, P. Plants as sources of antimalarial drugs, Part 6: Activities of *Simarouba amara* fruits. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, n. 2, p. 183-190, 1988.

OZEKI, A., HITOTSUYANAGI, Y., HASHIMOTO, E., ITOKAWA, H., TAKEYA, K., ALVES, S. M. Cytotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 6, p. 776-780, 1998.

PARK, B. Y.; OH, S. R.; AHN, K. S.; KWON, O. K.; LEE, H. K. (-)-Syringaresinol inhibits proliferation of human promyelocytic HL-60 leukemia cells via G1 arrest and apoptosis. **Int. Immunopharmacol.**, v. 8, n. 7, p. 967-973, 2008.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Teor de flavonoides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.

PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochem. Anal.**, v. 15, n. 4, p. 241-248, 2004.

PIRANI, J. R.; THOMAS, W. W. **Simaroubaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/>> Acessado em 15/10/2016.

POLONSKY, J.; VARON, Z.; MORETTI, C.; PETTIT, G. R.; HERALD, C. L.; RIDEOUT, J. A.; SAHA, S. B.; KHASTGIR, H. N. The antineoplastic quassinoids of *Simaba cuspidata* spruce and *Ailanthus grandis* Prian. **J. Nat. Prod.**, v. 43, n. 4, p. 503-509, 1980.

POLONSKY, J.; VARON, Z.; PRANGE, T.; PASCARD, C.; MORETTI, C. Structures of simarinolide and guanepolide (x-ray analysis), new quassinoids from *Simaba cf orinocensis*. **Tetrahedron Lett.**, v. 22, n. 37, p. 3605-3608, 1981.

POLONSKY, J.; GALLAS, J.; VARENNE, J.; PRANGE, T.; PASCARD, C.; JACQUEMIN, H.; MORETTI, C. Isolation and structure (x-ray analysis) of karinolide, a new quassinoid from *Simaba multiflora*. **Tetrahedron Lett.**, v. 23, n. 8, p. 869-872, 1982.

RAHMAN, M. D. A.; KATAYAMA, T.; SUZUKI, T.; NAKAGAWA, T. Stereochemistry and biosynthesis of (+)-lyoniresinol, a syringyl tetrahydronaphthalene lignan in *Lyonia ovalifolia* var. *elliptica* I: isolation and stereochemistry of syringyl lignans and predicted precursors to (+)-lyoniresinol from wood. **J. Wood Sci.**, v. 53, n. 2, p.161-167, 2007.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **J. Chromatogr. A.**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RODRIGUES, G.; SOUZA, W.; GODINHO, M.; FERREIRA, H.; VILA VERDE, G. M. Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas no município de Goiânia, GO. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 17, n. 4, p. 1169-1176, 2015.

ROSLUND, M. U.; TAHTINEN, P.; NIEMITZ, M.; SJOHOLM, R. Complete assignments of the ^1H and ^{13}C chemical shifts and $J_{\text{H,H}}$ coupling constants in NMR spectra of D-glucopyranose and all D-glucopyranosyl-D-glucopyranosides. **Carbohydr. Res.**, v. 323, p. 101-112, 2008.

SAID, A.; TUNDIS, R.; HAWAS, U. W.; EL-KOUSY, S. M.; RASHED, K.; MENICHINI, F.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of flavonoids from *Ailanthus excelsa* (Roxb.)(Simaroubaceae) leaves. **Z. Naturforsch. C.**, v. 65, p. 180-186, 2010.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, M. R.; FERREIRA, M. D. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Hortic. Bras.**, v. 26, n. 2, p. 244-250, 2008.

SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEVEE, G. J.; MARLOWE, E. A comparison of in vivo and *in vitro* testing of sunscreens formulas. **J. Photochem. and Photobiol.**, v. 29, n. 3, p. 559-566, 1979.

SEIFI-JAMADI, A.; AHMAD, E.; ASARI, MAHDI.; KOHRAM, H. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. **Cryobiology**. v. 75, p. 15-20, 2017.

SETHILKUMAR, R.; BAO-AN, C. H. E. N.; XIAO-HUI, C. A. I.; RONG, F. U. Anticancer and multidrug-resistance reversing potential of traditional medicinal plants and their bioactive compounds in leukemia cell lines. **Chin. J. Nat. Med.**, v. 12, n. 12, p. 881-894, 2014.

SHIN, S. W.; JUNG, E.; KIM, S.; KIM, J. H.; KIM, E. G.; LEE, J.; PARK, D. Antagonizing effects and mechanisms of afzelin against UVB-induced cell damage. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61971, 2013.

SILVA JUNIOR, I. F.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S. A.; LIMA, J. C. S. MARTINS, D. T. O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 19, p. 242, 2009.

SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Exp. Parasitol.**, v. 130, n. 3, p. 183-188, 2012.

SILVA, H. R. SILVA, C. C. M.; CALAND NETO, L. B.; LOPES, J. A. D.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos das cascas do caule DE *Cenostigma macrophyllum*: Ocorrência de colesterol. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

- SILVA, S. L. C.; GUALBERTO, S. A.; CARVALHO, K. S.; FRIES, D. D. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 79-85, 2014.
- SIMÃO, A. A.; CORREA, A. D.; FONSECA, F. L.; FREIRE, J. M.; SILVA, J. S.; FRAGUAS, R. M.; BRAGA, M. A.; QUEIROZ, E. R.; OLIVEIRA, F. C. Chemical composition of medicinal plants used as auxiliary treatments for obesity. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, n. 37, 2014.
- SIMÃO, S. M.; BARREIROS, E. L.; DA SILVA, M. F. D. G.; GOTTLIEB, O. R. Chemogeographical evolution of quassinoids in Simaroubaceae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 853-865, 1991.
- SKOOG, WEST, HOLLER, CROUCH. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, p. 351, 2007.
- SOUSA, R. P.; BARBOSA, L. F.; OLIVEIRA, A. F.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Cymosanine, a novel C19-Quassinoid from *Simaba subcymosa*. **Nat. Prod. Res.**, v. 19, n. 2, p. 151-155, 2005.
- SOUSA, R. P.; OLIVEIRA, J. S. S. M.; CHAVES, M. H. Prospecção científica e tecnológica do gênero *Simaba Aubl.* (SIMAROUBACEAE). **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 6, n. 3, p. 3343-3355, 2016.
- SOUZA, T. M.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; RANGEL, V. L. B. I. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Braz. J. Pharmacogn**, v. 15, n. 3, 2005.
- STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochem.**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012.
- STÖCKLIN, W.; SILVA, L. B.; GEISSMAN, T. A. Constituents of *Holacantha emoryi*. **Phytochemistry**, v. 8, n. 8, p. 1565-1569, 1969.
- SUN, S., LIU, J., ZHOU, N., ZHU, W., DOU, Q. P., ZHOU, K. Isolation of three new annonaceous acetogenins from Graviola fruit (*Annona muricata*) and their anti-proliferation on human prostate cancer cell PC-3. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 26, n. 17, p. 4382-4385, 2016.
- VALLE, P. D.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; ARRIAGA, D., GONZÁLEZ-DONQUILES, C.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, P.; RÚA, J. Antimicrobial activity of kaempferol and resveratrol in binary combinations with parabens or propyl gallate against *Enterococcus faecalis*. **Food Control**, v. 61, p. 213-220, 2016.

VANZELER, M.; BARROS, W.; NASELLO, A.; LOPES, L. Ensaios preliminares em ratas wistar com extrato hidroetanólico de calunga (*Simaba ferruginea* St. Hil.) v.o., nas fases gestacionais de implantação, organogênese e período fetal: interferências na prole. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 17, n. 3, p. 454-461, 2015.

VARGHESE, C. P.; AMBROSE, C.; JIN, S. C.; LIM, Y. J.; KEISABAN, T. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Eurycoma longifolia* Jack, a traditional medicinal plant in Malaysia. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 1875-1878, 2013.

VECHIA, C. A. D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A. P.; DIEL, K. A. P.; FAUST, C.; MENIN, C.; GOMES, D. B.; ROMAN, W. A. J. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 18, n. 1, p. 288-296, 2016.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, I. J. C.; BRAZ FILHO, R.; RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P. C., DA SILVA, M. F. G.; FERNANDES, J. B. 20 (*R*)-and 20 (*S*)-Simarolide epimers isolated from *Simaba cuneata*: Chemical shifts assignment of carbon and hydrogen atoms. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 1, p. 76-84, 1999.

VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R. Quassinoids: structural diversity, biological activity and synthetic studies. **Stud. Nat. Prod. Chem.**, v. 33, p. 433-492, 2006.

VIOLANTE, I. M.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F.; SANTOS, R. A.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 2A, p. 452-457, 2009.

WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; DALLA CORTE, C. L.; BRITO, V. B.; SEVERO, D., DIAS, G. D. O. C.; MOREL, A. F.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. **Brain Research**, v. 1107, n. 1, p. 192-198, 2006.

WANG, Y.; WANG, W. J.; SU, C.; ZHANG, D. M.; XU, L. P.; HE, R. R.; WANG, L.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; YE, W. C. Cytotoxic quassinoids from *Ailanthus altissima*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, n. 3, p. 654-657, 2013.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; THOMPSON, J. B.; WALL, M. E. Plant antitumor agents. XVI. 6 α -Seneciolyloxy-chaparrinone, a new antileukemic quassinoid from *Simaba multiflora*. **Lloydia**, v. 41, n. 6, p. 578-583, 1978.

WILHELM, K. P.; BIEL, S.; SIEGERS, C. P. Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 4, p. 306-309, 2001.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. **Food Res. Int.**, v. 44, n. 1, p. 217-224, 2011.

WU, J. Q.; KOSTEN, T. R.; ZHANG, X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 46, p. 200-206, 2013.

XAVIER, A. A. O.; MERCADANTE, A. Z. Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. **Quim. Nova**, v. 35, n. 10, p. 2057-2062, 2012.

XU, Z.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; KASHIWADA, Y.; MCPHAIL, A. T.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H. Anti-HIV Agents 45¹ and Antitumor Agents 205.² Two new sesquiterpenes, leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 12, p. 1712-1715, 2000.

YAO, X. H.; ZHANG, Z. B.; SONG, P.; HAO, J. Y.; ZHANG, D. Y.; ZHANG, Y. F. Different harvest seasons modify bioactive compounds and antioxidant activities of *Pyrola incarnata*. **Ind. Crop. Prod.**, v. 94, p. 405-412, 2016.

YIN, Y.; LI, W.; SON, Y. O.; SUN, L.; LU, J.; KIM, D.; WANG, X.; YAO, H.; WANG, L.; PRATHEESHKUMAR, P.; HITRON, A. J.; LUO, J.; GAO, N.; SHI, X.; ZHANG, Z. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 269, n. 2, p. 89-99, 2013.

YOSHIKAWA, M.; HARADA, E.; AOKI, S.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI, N.; SHIBUYA, H.; KITAGAWA, I. Indonesian Medicinal Plants. VI. On the chemical constituents of the bark of *Picrasma javanica* BL. (Simabroubaceae) from Flores Island. Absolute Stereostructures of Picrajavanins A and B. **Chem. Pharm. Bull.** v.41, n. 12, p. 2101-2105, 1993.

ZHANG, Y.; DEWITT, D. L.; MURUGESAN, S.; NAIR, M. G. Novel Lipid-Peroxidation- and Cyclooxygenase-Inhibitory Tannins from *Picrorhiza kurroa* Seeds. **Chem. Biodiversity**, v. 1, n. 3, p. 426-441, 2004.

ZHANG, Y.; ZHOU, X.; TAO, W.; LI, L.; WEI, C.; DUAN, J.; CHEN, S.; YE, X. Antioxidant and antiproliferative activities of proanthocyanidins from Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves. **J. Funct. Foods**, v. 27, p. 645-654, 2016.

ZHOU, F.; PENG, J.; ZHAO, Y.; HUANG, W.; JIANG, Y.; LI, M.; WU, X.; LU, B. Varietal classification and antioxidant activity prediction of *Osmanthus fragrans* Lour. flowers using UPLC–PDA/QTOF–MS and multivariable analysis. **Food Chem.**, v. 217, p. 490-497, 2017.

ZHOU, W.; NIE, X. Afzelin attenuates asthma phenotypes by downregulation of GATA3 in a murine model of asthma. **Mol. Med. Rep.**, v. 12, n. 1, p. 71-76, 2015.

ZHU, K. C.; SUN, J. M.; SHEN, J. G.; JIN, J. Z.; LIU, F.; XU, X. L.; CHEN, L.; LIU, L.; LV, J. J. Afzelin exhibits anti-cancer activity against androgen-sensitive LNCaP and androgen-independent PC-3 prostate cancer cells through the inhibition of LIM domain kinase 1. **Oncol. Lett.**, v. 10, n. 4, p. 2359-2365, 2015.