



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
Roupala paulensis Sleumer (PROTEACEAE)

ROSEANA FARIAS DE ARAÚJO RAMOS

João Pessoa – PB

2015

ROSEANA FARIAS DE ARAÚJO RAMOS

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
***Roupala paulensis* Sleumer (PROTEACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacoquímica

Orientador: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

Co-orientador: Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa

João Pessoa – PB

2015

R175c Ramos, Roseana Farias de Araújo.

Constituintes químicos e atividade antioxidante de
Roupala paulensis Sleumer (PROTEACEAE) / Roseana Farias
de Araújo Ramos. - João Pessoa, 2015.

105 f. : il.

Orientação: Josean Fachine Tavares.

Coorientação: Vicente Carlos de Oliveira Costa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Estudo fitoquímico. 2. Feofitinas. 3. Triterpenos.
4. Quercetina. 5. Fenólicos totais. I. Tavares, Josean
Fachine. II. Costa, Vicente Carlos de Oliveira. III.
Título.

UFPB/BC

CDU 633.88(043)

ROSEANA FARIAS DE ARAÚJO RAMOS

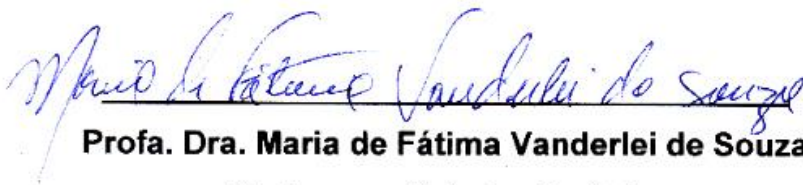
CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE
Roupala paulensis Sleumer (PROTEACEAE)

COMISSÃO EXAMINADORA



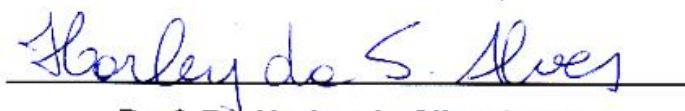
Prof. Dr. Josean Fachine Tavares

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Orientador)



Profa. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Doutora em Química Orgânica
Universidade Federal da Paraíba – Campus I
(Examinador Interno)



Prof. Dr. Harley da Silva Alves

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Estadual da Paraíba
(Examinador Externo)



Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa

Doutor em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
Universidade Federal da Paraíba
(Coorientador)

Tudo posso
(Celina Borges)

Posso, tudo posso naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou
para mim e ali estar

Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra
mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar à espera de um novo que vai
chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só
chora
Mas na alma, há certeza da vitória

Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não
entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... em Jesus

*Aos meus pais Vera Lúcia (in memoriam) e
Jupiratan que durante toda a vida me
ensinaram com amor e carinho tudo que
sou hoje.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por mais esta graça concedida em minha vida. Por iluminar minhas decisões para que cada obstáculo fosse superado, e por me dar força, coragem e perseverança para alcançar mais essa conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Josean Fachine Tavares por aceitar me orientar e pela disponibilidade sempre que necessário, pelos ensinamentos transmitidos ao longo desta caminhada acadêmica, e pela compreensão e paciência nos momentos de falhas.

Ao meu co-orientador Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa por todo apoio, conselhos e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho, estando sempre disposto a ajudar na bancada e solucionar dúvidas.

À banca examinadora pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra pela identificação botânica da espécie estudada.

Aos professores da Pós-graduação, cujos ensinamentos serão levados pela minha vida profissional e pessoal, especialmente à Profa. Dra. Celidarque da Silva Dias por ter aberto as portas do 'mundo' da fitoquímica.

Às professoras Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza e Dra. Barbara Viviana de Oliveira pelos ensinamentos compartilhados e disponibilidade de ajuda sempre que solicitadas.

À Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral por disponibilizar o Laboratório Oncofarm para realização dos testes antioxidantes.

Às alunas Tainá Silva, Clarice Noletto, Ayala Nara e Eugênia Abrantes pela contribuição nos estudos de atividade antioxidante.

Aos alunos de Iniciação Científica Ana Rita Rodrigues, Jociano Lins, Mariana Targino e Ranna Beatris por toda contribuição na bancada durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários do IPeFarm pelos diversos serviços prestados, especialmente Carolina Manguiera, Raimundo Nonato, Sócrates Golzio e Alexsandro Marinho sempre disponíveis para qualquer ajuda necessária.

A todos que fizeram e fazem parte da Fitoquímica, especialmente a equipe do Prof. Dr. Josean Fachine Tavares e do Prof. Dr. Marcelo Sobral, pela enriquecedora convivência científica. Em especial àqueles que sempre estiveram próximos e

dispostos a ajudar em qualquer momento, pelo todo apoio e amizade durante esta jornada.

À Dra. Narlize Silva Lira, pela amizade e ensinamentos durante o período de Iniciação Científica.

Aos alunos da turma do mestrado 2013 e 2014, especialmente aos amigos Ayala, Kaio, Márcio, Ingrid, Diego, Rayssa, Anderson, Denise, Andreza, Laiane e Yuri, pelo momentos compartilhados, companheirismo e agradável convívio.

Aos meus pais Vera Lúcia (*in memoriam*) e Jupiratan por todos os ensinamentos, dedicação e amor concedidos durante toda a minha vida. E por toda a renúncia durante minha educação, sempre incentivando e apoiando na busca de novas realizações.

À minha irmã Rossana e ao meu cunhado Alexandre pelo carinho e apoio durante minha formação acadêmica, perdando meus erros e faltas em muitos momentos da nossa vida familiar.

Às minhas sobrinhas Ivete e Ingrid, por trazerem sempre alegria para os meus dias, sendo capazes até de transformar os dias tristes e difíceis com um singelo sorriso e um simples gesto de amor e carinho. E por, na inocência de uma criança, entender minha ausências.

Ao meu noivo Glauco, meu grande companheiro, por estar sempre ao meu lado incentivando e aconselhando, com muito amor e compreensão. Perdando minhas falhas e ausências, e comemorando junto comigo cada nova conquista.

A todos os meus familiares que, mesmo ausentes ou distantes, desejam minha vitória. Em especial a minhas avós Elita e Ivete (*in memoriam*), que apesar de não estarem mais aqui sempre foram grandes incentivadoras em minha vida, e a minha Tia Lúcia de Fátima, exemplo de farmacêutica e torcedora convicta do meu sucesso profissional, por todo incentivo e conselhos.

A todos os meus amigos que, mesmo na distância, acompanharam minha trajetória e sabem o quanto significam para mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela apoio financeiro concedido.

RESUMO

RAMOS, R. F. de A. **Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Roupala paulensis* Sleumer (Proteaceae)**. 2015. 105 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

A família Proteaceae é constituída por aproximadamente 80 gêneros e 1705 espécies, com maior distribuição na Austrália, África do Sul e América do Sul. No Brasil, compreende 4 gêneros, e dentre esses, encontramos o gênero *Roupala*, que possui cerca de 33 espécies e 2 subespécies. Entre as espécies deste gênero destacamos a espécie *Roupala paulensis* Sleumer, espécie endêmica do Brasil que possui maior distribuição nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo. O presente trabalho teve como objetivo realizar um estudo fitoquímico de *Roupala paulensis*, bem como avaliar a atividade antioxidante e realizar a quantificação de fenólicos totais do seu extrato e fases. Para isto, o material botânico foi submetido a processos de extração, partição e cromatografia para isolamento dos constituintes químicos. A estrutura química das substâncias foi determinada por métodos espectroscópicos de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , Espectrometria de Massas e comparações com dados da literatura. O fracionamento cromatográfico da fase hexânica resultou no isolamento do triterpeno 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno (esqualeno), da mistura dos triterpenos urs-12-en-3 β -ol (α -amirina), olean-12-en-3 β -ol (β -amirina) e 3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno (lupeol), do esteroide β -sitosterol e da mistura de feofitinas 13 2 -hidroxi-(13 2 -R)-feofitina a e 13 2 -hidroxi-(13 2 -S)-feofitina a, da fase diclorometano obteve-se o esteroide glicosilado sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo e da fase acetato de etila foi isolado a flavona 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina). Todos os compostos estão sendo relatados pela primeira vez no gênero *Roupala*. A atividade antioxidante do extrato etanólico bruto (EEB) e das fases hexânica, diclorometano e acetato de etila foi verificada através do método do sequestro do radical DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e da quantificação de fenólicos totais, com comparações dos resultados obtidos com os padrões ácido ascórbico e ácido gálico, respectivamente. Entre todas as amostras testadas o EEB apresentou menor CE_{50} ($37,50 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$), seguido pela fase acetato de etila ($74,86 \pm 2,73 \mu\text{g/mL}$), sendo as amostras que apresentaram maior atividade antioxidante. Pela quantificação de fenólicos totais, as amostras que exibiram maiores concentrações desses compostos foram o EEB ($24,27 \pm 0,76 \text{ gEAG/100 g}$) e a fase acetato de etila ($30,47 \pm 0,52 \text{ gEAG/100 g}$). Portanto, estas amostras apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, provavelmente responsáveis pelos melhores resultados de atividade antioxidante apresentados no teste de DPPH realizado.

Palavras-chave: Estudo fitoquímico, feofitinas, triterpenos, quercetina, fenólicos totais.

ABSTRACT

RAMOS, R. F. de A. **Chemical constituents and antioxidant activity of *Roupala paulensis* Sleumer (Proteaceae)**. 2015. 105 p. Dissertation (Master's in Natural and Synthetic Bioactive Products) Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa.

The Proteaceae family is constituted of about 80 genus and 1705 species, with more distribution in Australia, South Africa and South America. In Brazil, consist in 4 genus, and among these we find the *Roupala* genus, having about 33 species and 2 subspecies. Among the species of this genus we highlight the species *Roupala paulensis* Sleumer, an endemic species from Brazil that has a greater distribution in the states of Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro and São Paulo. This study aimed to realize a phytochemical study of *Roupala paulensis* and to evaluate the antioxidant activity and perform the quantification of total phenolics of the extract and phases. For this, the plant material was subjected to extraction processes, partition and chromatography to isolate the chemical constituents. The chemical structure of the substances was determined by spectroscopic methods such as Infrared, Nuclear Magnetic Resonance of ^1H and ^{13}C , Mass Spectrometry and comparisons with literature data. The chromatographic fractionation (subdivision) of the hexane fraction resulted in the isolation of the triterpene 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexene (squalene), of the triterpenes mixture urs-12-en-3 β -ol (α -amyrin), olean-12-en-3 β -ol (β -amyrin) and 3 β -hydroxy-lup-20(29)-ene (lupeol), of the steroid β -sitosterol and of the mixture pheophytins 13 2 -hydroxy-(13 2 -*R*)-pheophytin a and 13 2 -hydroxy-(13 2 -*S*)-pheophytin a, of the dichloromethane fraction there was obtained the glycosylated steroid sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside and of the ethyl acetate fraction was isolated the flavone 3,3',4',5,7 -pentahydroxyflavone (quercetin). All compounds are being reported for the first time in *Roupala* genus. The antioxidant activity of ethanol extract and hexane fraction, dichloromethane and ethyl acetate was verified by DPPH free radical assay (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) and by quantification of total phenolics, with comparisons of the results obtained with the standards ascorbic acid and gallic acid, respectively. Among all samples tested the extract showed lower EC₅₀ ($37.50 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$), followed by ethyl acetate fraction ($74.86 \pm 2.73 \mu\text{g/mL}$), the samples had higher antioxidant activity. For quantification of total phenolics samples that exhibited higher concentrations of these compounds were the extract ($24.27 \pm 0.76 \text{ gGAE/100 g}$) and the ethyl acetate fraction ($30.47 \pm 0.52 \text{ gGAE/100 g}$). Therefore, these samples showed the greatest concentration of phenolic compounds, most likely responsible for the better results presented antioxidant activity in the DPPH assay realized.

Keywords: Phytochemical study, pheophytins, triterpenes, quercetin, total phenolics.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	<i>Attached Proton Test</i>
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EC₅₀	Concentração Efetiva Média
EEB	Extrato Etanólico Bruto
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Massa/carga
MHz	Megahertz
MMS	Metanossulfonato de metila
PFF	Pirofosfato de farnesila
Ppm	Partes por milhão
<i>q</i>	Quarteto
R_fs	Fatores de retenção
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Triplete
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico em ppm

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Etapas envolvidas no processo de particionamento do EEB de <i>Roupala paulensis</i>	39
Esquema 2 – Fracionamento da fase hexânica de <i>Roupala paulensis</i>	42
Esquema 3 – Fracionamento da fase diclorometano de <i>Roupala paulensis</i>	43
Esquema 4 – Fracionamento da fase acetado de etila de <i>Roupala paulensis</i> ...	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Metabólitos secundários isolados na família Proteaceae.....	25
Quadro 2 – Estudos antimicrobianos com espécies da família Proteaceae.....	26
Quadro 3 – Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase hexânica do EEB de <i>Roupala paulensis</i>	41
Quadro 4 – Sistemas de eluições utilizados no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de <i>Roupala paulensis</i>	43
Quadro 5 – Sistemas de eluições utilizados no fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de <i>Roupala paulensis</i>	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Proteaceae no mundo, representada pelas áreas verdes.....	23
Figura 2 – Naftoquinonas isoladas do gênero <i>Lomatia</i> (Proteaceae).....	24
Figura 3 – Mapa de distribuição do gênero <i>Roupala</i> no mundo, representada pelas áreas verdes.....	27
Figura 4 – Distribuição geográfica de <i>Roupala paulensis</i> no Brasil.....	28
Figura 5 – Estrutura básica do esteroides.....	29
Figura 6 – Formação da feofitina a partir da clorofila por hidrólise ácida.....	30
Figura 7 – Núcleo porfirínico.....	30
Figura 8 – Estrutura básica dos flavonoides.....	31
Figura 9 – Principais subclasses de flavonoides.....	32
Figura 10 – Principais esqueletos de triterpenos pentacíclicos.....	33
Figura 11 – Reação entre a quercetina e o DPPH.....	36
Figura 12 – Cromatograma CG-EM de <i>Rp-1</i>	52
Figura 13 – Espectro de massas de <i>Rp-1</i> (TR 28,8 min).....	52
Figura 14 – Espectro de massas do esqualeno (biblioteca NIST08.LIB).....	52
Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp-1</i> (50 MHz, CDCl_3).....	53
Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H de <i>Rp-1</i> (200 MHz, CDCl_3).....	53
Figura 17 – Espectro de IV de <i>Rp-2</i> (KBr , cm^{-1}).....	57
Figura 18 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp-2</i> (50 MHz, CDCl_3).....	57
Figura 19 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp-2</i> (50 MHz, CDCl_3) na região de 160,0-70,0 ppm.....	58
Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp-2</i> (50 MHz, CDCl_3) na região de 62,0-32,0 ppm.....	58
Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp-2</i> (50 MHz, CDCl_3) na região de 32,0-13,0 ppm.....	59
Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H de <i>Rp-2</i> (200 MHz, CDCl_3).....	59

Figura 23 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -2 (200 MHz, CDCl_3) na região de 5,4-2,2 ppm.....	60
Figura 24 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -2 (200 MHz, CDCl_3) na região de 2,2-0,3 ppm.....	60
Figura 25 – Cromatograma CG-EM de <i>Rp</i> -2.....	61
Figura 26 – Espectro de massas de <i>Rp</i> -2 (TR 38,265 min).....	61
Figura 27 – Espectro de massas da amirina (biblioteca NIST08.LIB).....	61
Figura 28 – Espectro de massas de <i>Rp</i> -2 (TR 40,945 min).....	61
Figura 29 – Espectro de massas do lupeol (biblioteca NIST08.LIB).....	62
Figura 30 – Espectro de IV de <i>Rp</i> -3 (KBr , cm^{-1}).....	65
Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -3 (500 MHz, CDCl_3).....	65
Figura 32 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -3 na região de 5,7-2,0 ppm (500 MHz, CDCl_3).....	66
Figura 33 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -3 na região de 1,05-0,6 ppm (500 MHz, CDCl_3).....	66
Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -3 (125 MHz, CDCl_3).....	67
Figura 35 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -3 na região de 144-44 ppm (125 MHz, CDCl_3).....	67
Figura 36 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -3 na região de 45-15 ppm (125 MHz, CDCl_3).....	68
Figura 37 – Espectro de IV de <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b (KBr , cm^{-1}).....	75
Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b.....	75
Figura 39 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b na região de 7,7-9,8 ppm.....	76
Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b na região de 3,0-6,5 ppm.....	76
Figura 41 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b na região de 0,0-2,1 ppm.....	77

Figura 42 – Espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b.....	77
Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b na região de 140,0-195,0 ppm.....	78
Figura 44 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b na região de 85,0-141,0 ppm.....	78
Figura 45 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias <i>Rp</i> -4a e <i>Rp</i> -4b na região de 0,0-70,0 ppm.....	79
Figura 46 – Espectro de IV de <i>Rp</i> -5 (KBr , cm^{-1}).....	82
Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -5 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	82
Figura 48 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -5 na região de 5,5-3,7 ppm (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	83
Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -5 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	83
Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -5 na região de 154-101 ppm (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	84
Figura 51 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -5 na região de 80-45 ppm (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	84
Figura 52 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -5 na região de 44-10 ppm (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).....	85
Figura 53 – Espectro de IV de <i>Rp</i> -6 (KBr , cm^{-1}).....	88
Figura 54 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de <i>Rp</i> -6 (25 MHz, CD_3OD).....	88
Figura 55 – Espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -6 (200 MHz, CD_3OD).....	89
Figura 56 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de <i>Rp</i> -6 na região de 8,0-5,9 ppm (200 MHz, CD_3OD).....	89
Figura 57 – Curva padrão para o teste de DPPH – ácido ascórbico.....	90
Figura 58 – CE_{50} expressa em $\mu\text{g/mL}$ do EEB e fases de <i>Roupala paulensis</i> e do ácido ascórbico.....	91
Figura 59 – Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico <i>versus</i> as absorvâncias (765 nm) para o ensaio de Folin-Ciocalteu.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados da CG-EM de <i>Rp-1</i>	51
Tabela 2 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) de <i>Rp-1</i> com dados da literatura (CURSINO et al., 2009) – em CDCl_3	51
Tabela 3 – Dados da CG-EM de <i>Rp-2</i>	56
Tabela 4 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) de <i>Rp-2</i> com dados da literatura (ASSIS JUNIOR; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S., 2013) – em CDCl_3	56
Tabela 5 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de <i>Rp-3</i> (500 e 125 MHz, respectivamente) com dados da literatura (KOJIMA et.al., 1990) - em CDCl_3	64
Tabela 6 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de <i>Rp-4a</i> (200 e 50 MHz, respectivamente), com dados da literatura (MATSUO, 1996), - em CDCl_3	73
Tabela 7 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de <i>Rp-4b</i> (200 e 50 MHz, respectivamente), com dados da literatura, (MATSUO, 1996) - em CDCl_3	74
Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de <i>Rp-5</i> (500 e 125 MHz, respectivamente), com dados da literatura (KOJIMA et al.,1990) - em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	81
Tabela 9 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de <i>Rp-6</i> (200 e 50 MHz, respectivamente), com dados da literatura (KALEGARI et al., 2011) - em CD_3OD	87
Tabela 10 – Determinação da CE_{50} a partir do teste de sequestro do DPPH.....	90
Tabela 11 – Concentração média $\pm$ coeficiente de variação de fenólicos totais encontrados no EEB e nas fases de <i>Roupala paulensis</i>	92

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
3.1 Considerações sobre a família Proteaceae Juss.....	23
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Roupala</i> Ablu.....	26
3.3 Considerações sobre <i>Roupala paulensis</i> Sleumer.....	28
3.4 Considerações químicas e biológicas sobre as classes de constituintes químicos isolados de <i>Roupala paulensis</i>	29
3.4.1 Esteroides.....	29
3.4.2 Feofitinas.....	30
3.4.3 Flavonoides.....	31
3.4.4 Terpenoides.....	33
3.5 Atividade antioxidante de produtos naturais.....	34
3.5.1 Sequestro do radical livre DPPH.....	35
3.5.2 Determinação do teor de fenólicos totais.....	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Estudo fitoquímico de <i>Roupala paulensis</i>	38
4.1.1 Coleta do material vegetal e processamento da planta.....	38
4.1.2 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de <i>Roupala paulensis</i> e particionamento com solventes orgânicos.....	38
4.1.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de <i>Roupala paulensis</i>	39
4.1.3.1 Processamento cromatográfico da fase hexânica.....	40
4.1.3.2 Processamento cromatográfico da fase diclorometano.....	42
4.1.3.3 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila.....	44

4.1.4 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados.....	45
4.2 Estudo da atividade antioxidante de <i>Roupala paulensis</i>	46
4.2.1 Teste do sequestro do radical livre DPPH.....	46
4.2.2 Determinação do teor de fenólicos totais.....	47
4.2.3 Análise estatística.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Determinação dos constituintes químicos isolados de <i>Roupala paulensis</i>	50
5.1.1 Determinação estrutural de <i>Rp</i> -1.....	50
5.1.2 Determinação estrutural de <i>Rp</i> -2.....	54
5.1.3 Determinação estrutural de <i>Rp</i> -3.....	63
5.1.4 Determinação estrutural de <i>Rp</i> -4	69
5.1.5 Determinação estrutural de <i>Rp</i> -5.....	80
5.1.6 Determinação estrutural de <i>Rp</i> -6.....	86
5.2 Avaliação da atividade antioxidante e quantificação do teor de fenólicos totais do EEB e fases de <i>Roupala paulensis</i>	90
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
REFERÊNCIAS.....	96

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Relatos existentes do uso de plantas como fonte de cura para inúmeras doenças podem ser observados desde os primórdios da civilização humana, estando as primeiras referências nos papiros egípcios, nas escrituras chinesas e nas placas sumérias (ROEWER et al., 2013). Conhecimento este que passado através de gerações e gerações, ao longo de milhares de anos, deu origem ao que conhecemos por medicina popular, termo geralmente aplicado ao conhecimento popular e tradicional utilização tradicional de plantas pela população, com base nas suas ações farmacológicas (CORRÊA, 2001; ÊLORENZI; MATOS, 2008).

Ao longo do tempo foram descobertas inúmeras substâncias com potenciais atividades biológicas, como por exemplo, morfina, codeína e papaverina, isoladas a partir da *Papaver somniferum*, planta esta utilizada desde a época dos Sumérios por volta de 4.000 a.C e amplamente conhecida por suas propriedades soporíferas e analgésicas (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Posteriormente, as plantas passaram a ser utilizadas como fonte de matéria prima na produção de medicamentos e as substâncias descobertas tornaram-se princípios ativos eficazes, durante o desenvolvimento industrial farmacêutico (TOMAZ et al., 2008).

Hoje sabe-se a importância dos metabólitos secundários em nossa sociedade e assim, verifica-se um crescente avanço na busca pelo isolamento de novos compostos que apresentem atividades terapêuticas, fato que deu origem a Química de Produtos Naturais (QPN). A QPN envolve tanto o isolamento e identificação dos constituintes químicos das plantas, como também o desenvolvimento e validação de medicamentos de origem vegetal (SOUZA; SILVA, 2006). Envolvendo desta forma estudos químicos e farmacológicos, e visando a obtenção novos fármacos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

A importância das plantas no desenvolvimento e produção de novos medicamentos pode ser confirmada se analisarmos os princípios ativos utilizados na produção de medicamentos, que podem ser naturais ou sintéticos. Ou seja, podem ser obtidos diretamente das plantas no caso dos princípios de origem natural, ou produzidos em laboratórios a partir de reações químicas no caso dos princípios de origem sintética, sendo estes obtidos geralmente a partir da modificação estrutural de metabólitos secundários já conhecidos (LEMOS et al., 2007; BRANDÃO et al., 2010).

Um grande marco na QPN foi a obtenção no século XIX de salicilatos a partir do extrato de *Salix alba*, responsável por apresentar propriedades analgésicas e antipiréticas. Fato que possibilitou no final deste século a síntese do ácido acetilsalicílico, analgésico e antiinflamatório muito utilizado até hoje, com importante ação no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

No Brasil ainda existem inúmeras espécies que não foram objeto de pesquisas, em busca de seus constituintes químicos. E apesar de já terem sido isolados mais de 50.000 metabólitos secundários de angiospermas, grupo mais diversificado das plantas (possuindo 236 famílias distribuídas no Brasil), muitas espécies nativas brasileiras ainda não passaram por avaliações do seu potencial biológico, fator que auxiliaria inclusive na verificação da eficácia e segurança do uso dessas espécies como promissoras fonte terapêutica (MONTANARI; BOLZANI, 2001; TOMAZ et al., 2008; FORZZA et al., 2015).

Partindo da premissa de que as drogas vegetais são de grande importância para a medicina popular, e que o isolamento e caracterização estrutural dos seus constituintes químicos contribui para o conhecimento quimiotaxonômico das mesmas, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico da espécie *Roupala paulensis*, espécie endêmica do Brasil com maior distribuição nos estados do Nordeste e pertencente à família Proteaceae. Esta família apesar de ser uma das mais importantes dos grupos das angiospermas apresenta raros estudos químicos e biológicos de suas espécies.

Para tanto, foram utilizadas técnicas cromatográficas e métodos físicos de análises, tais como Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM).

E visando contribuir com o conhecimento farmacológico da espécie estudada foram realizados testes para avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico, bem como das fases hexânica, diclorometano e acetato de etila, realizadas pelo método do sequestro do radical DPPH e pela quantificação de fenólicos totais.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Contribuir com o estudo do gênero *Roupala*, através da investigação fitoquímica da espécie *Roupala paulensis* Sleumer.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar os metabólitos secundários encontrados em *Roupala paulensis*, utilizando métodos cromatográficos;
- Identificar e/ou elucidar os constituintes químicos isolados de *Roupala paulensis* através de técnicas espectroscópicas, tais como Espectroscopia de Infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C ;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e fases de *Roupala paulensis*, através do método do sequestro de radical DPPH;
- Realizar a quantificação do teor de fenólicos totais do extrato etanólico bruto e fases de *Roupala paulensis*.

Fundamentação teórica

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a família Proteaceae Juss.

A família Proteaceae é uma das principais famílias do grupo das angiospermas, sendo característica do hemisfério sul, com maior diversidade apresentada na Austrália, África do Sul e América do Sul como pode ser observado na figura 1 (p. 23) (DELGADO et al., 2014). É caracterizada por árvores ou arbustos, com folhas alternas e inflorescências axilares ou terminais e comumente encontradas em altitudes mais elevadas (PIRANI; NASCIMENTO, 1995; PRANCE; PLANA, 1998).

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Proteaceae no mundo, representada pelas áreas verdes.



Adaptado de: TROPICOS – Proteaceae Juss., 2015.

Esta família é constituída mundialmente por 80 gêneros, nos quais estão distribuídas cerca de 1705 espécies, incluindo variações de espécies (WESTON; BARKER; 2006).

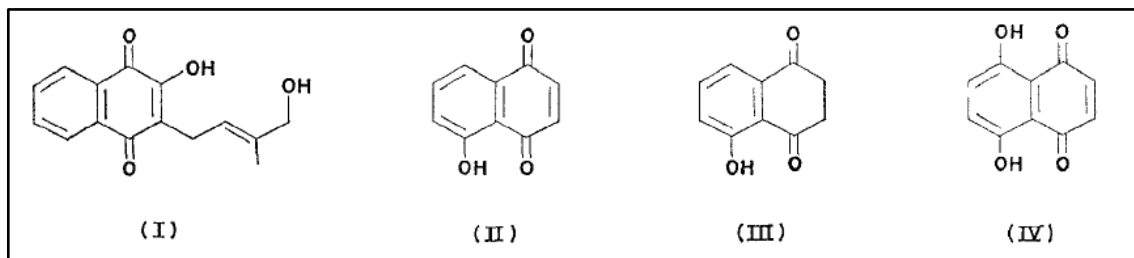
Alguns registros destacam a utilização de plantas da família Proteaceae na medicina popular, como por exemplo, a *Roupala montana*, utilizada para o tratamento

de artrite e reumatismo em Granada e Trinidad (localizadas nas Antilhas), espécie caracterizada pela presença de esteróides, compostos fenólicos, ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos, além de saponinas com anel do tipo ursano e glicosídeos de ácidos ursanodiólicos (TABI, 1998).

Constituintes químicos bastante relatados na literatura, os ácidos graxos também são característicos desta família, como podem ser destacados os ácidos isolados hexadecenóico, octadecenóico, eicosenóico, cis-hexadec-9-enóico e cis-octadec-11-enóico (VICKERY, 1971).

Outra classe de grande importância na literatura da família Proteaceae é a classe das naftoquinonas, apresentando substâncias isoladas de espécies do gênero *Lomatia* (*L. arborescens*, *L. silanfolia*, *L. tinctoria*, *L. fraxinifolia*, *L. longifolia*, *L. obliqua* e *L. silanfolia*): lomatiol (I), juglona (II), β -hidrojuglona (III) e naftazarina (IV), conforme apresentadas na figura 2 (p. 24) (MOIR; THOMSON, 1973).

Figura 2 – Naftoquinonas isoladas do gênero *Lomatia* (Proteaceae)



Fonte: MOIR; THOMSON, 1973.

Outras substâncias relatadas na literatura foram isoladas na família Proteaceae, com espécies dos gêneros *Grecillea* e *Orites*, descritas no Quadro 1 (p. 25).

Quadro 1 – Metabólitos secundários isolados na família Proteaceae

Metabólitos isolados	Espécie	Referência
Rutina Ácido 2,5-diidroxicinâmico 4-hidroxicinamato de metila Robustol Éter trimetil robustol	<i>Grecillea robusta</i>	CANNON, et al., 1973.
Éteres de 17,19,22,24- tetrahidroxi (14-p-0-o) ciclofano	<i>Grevillea striata</i>	RIDLEY; RITCHIE; TAYLOR, 1970.
5-n-tridecylresorcinol (Grevilol)	<i>Grevillea robusta</i>	RITCHIE; TAYLOR; VAUTIN, 1965.
Grevirobstol A e B e C bis-norstriatol Robustol diidrorobustol A e B 5-[14'-(3'',5''-diidroxifenil)-cis-tetradec-6'-en-1-il]benzeno-1,3-diol	<i>Grevillea robusta</i>	AHMED, et al., 2000.
Sitosterol	<i>Orites excelsa</i>	RITCHIE; TAYLOR; VAUTIN, 1965.

Entre os estudos realizados e relacionados às atividades biológicas da família Proteaceae se destacam os de atividades antimicrobianas dos variados extratos obtidos de espécies desta família, como pode ser observado no quadro 2 (p. 26).

Quadro 2 – Estudos antimicrobianos com espécies da família Proteaceae

Micro-organismo avaliado	Espécie vegetal utilizada	Parte da planta	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Hakea salicifolia</i>	Partes aéreas	MADUREIRA; DUARTE; TEIXEIRA, 2012.
	<i>Roupala heterophylla</i>	Folhas	ALVES, et al., 2000
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Hakea salicifolia</i>	Partes aéreas	MADUREIRA; DUARTE; TEIXEIRA, 2012.
<i>Candida albicans</i>			
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Roupala heterophylla</i>	Folhas	ALVES, et al., 2000.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			

No Brasil, onde seus domínios fitogeográficos são a Amazônia, a Caatinga, o Cerrado e a Mata Atlântica, podem ser encontrados os gêneros *Euplassa*, *Panopsis* e *Roupala*, gêneros mais endêmicos da América do Sul (PLANA; PRANCE, 1998). Neles estão distribuídas 33 espécies, 2 subespécies e 6 variedades. (PRANCE; AMORIM, 2015).

3.2 Considerações sobre o gênero *Roupala* Ablu.

O gênero *Roupala* é representado por 33 espécies e 2 subespécies (WESTON; BARKER; 2006). No Brasil é composto por 16 espécies: *R. asplenoides*, *R. caparoensis*, *R. consimillis*, *R. dielsii*, *R. gracillis*, *R. longepetiolata*, *R. montana*, *R. nítida*, *R. nonscripta*, *R. obtusata*, *R. pallida*, *R. paulensis*, *R. psilocarpa*, *R. sculpta*, *R. suaveolens* e *R. thomesiana* (PRANCE; AMORIM, 2015).

Figura 3 – Mapa de distribuição do gênero *Roupala* na América Latina, representada pelas áreas verdes.



Adaptado de: TROPICOS – *Roupala* Aubl., 2015

As espécies deste gênero são geralmente utilizadas na medicina popular para limpeza de feridas e contra ulcerações, além da importância na economia por sua utilização em marcenaria, carpintaria, construção civil e naval, e em ornamentações (FLORA SBS, 2015).

Alguns estudos quanto às atividades biológicas do gênero já foram relatados. Entre eles pode ser o citado estudo realizado com a *Roupala montana*, que promove mortalidade moderada de formas adultas de *Schistosoma mansoni*, além de ser responsável pela redução de genotoxicidade induzida por metanossulfonato de metila (MMS), um agente alquilante tóxico e com alta taxa de carcinogenicidade (OLIVEIRA, et al., 2014). Esta espécie também apresentou atividade antimicrobiana, contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, em estudo desenvolvido por Alves e colaboradores (2000), a partir de testes utilizando o extrato aquoso de suas folhas.

Além de serem escassos os relatos de atividades biológicas realizadas, não foram encontrados estudos fitoquímicos de espécies deste gênero, despertando um grande interesse de escolha de uma espécie pertencente a ele, com o intuito de

apresentar uma grande contribuição com a realização de um estudo envolvendo tanto a parte química quanto a biológica do gênero *Roupala*.

3.3 Considerações sobre *Roupala paulensis* Sleumer

Entre as espécies do gênero *Roupala*, a *Roupala paulensis* é planta endêmica do Brasil que possui maior distribuição nos estados da Bahia, Ceará, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (Fig. 4, p. 28) (PRANCE; AMORIM, 2015)

Figura 4 – Distribuição geográfica de *Roupala paulensis* no Brasil.



Fonte: Prance; Amorim, 2015.

No Nordeste esta espécie, apresentada na forma de árvores, é conhecida popularmente por “carne de vaca”, “orelha de onça”, carvalho-do-brasil (OLIVEIRA FILHO, et al., 2008; PINTO; SAMPAIO; NASCIMENTO, 2012; PRANCE; AMORIM, 2015). Possui como sinonímia científica o nome *Roupala cearenses*.

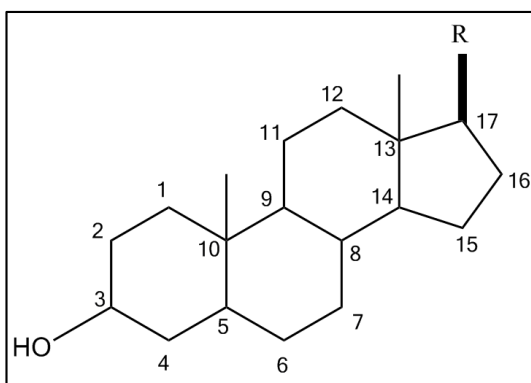
Esta espécie foi a escolhida para o desenvolvimento deste trabalho por não apresentar estudos fitoquímicos relatados na literatura e por mostrar-se interessante como objeto de estudo diante dos estudos realizados com outras espécies do gênero.

3.4 Considerações químicas e biológicas sobre as classes de constituintes químicos isolados de *Roupala paulensis*

3.4.1 Esteroides

Os esteroides são compostos formados por 27 a 29 átomos de carbono, e possuem como esqueleto principal o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno, com uma hidroxila ligada ao carbono 3 (Fig. 5, p. 29). A maior parte dos esteroides possui uma ligação dupla no carbono 5 e uma cadeia lateral no C-17 com 8 ou 10 átomos de carbono. A estereoquímica dos esteróides é representada por α ou β , como é o caso das metilas ligadas em C-10 e C-13 (HUNG-LLAMOS et al., 2005; PEREIRA; CARDOSO, 2012)

Figura 5 – Estrutura básica dos esteroides



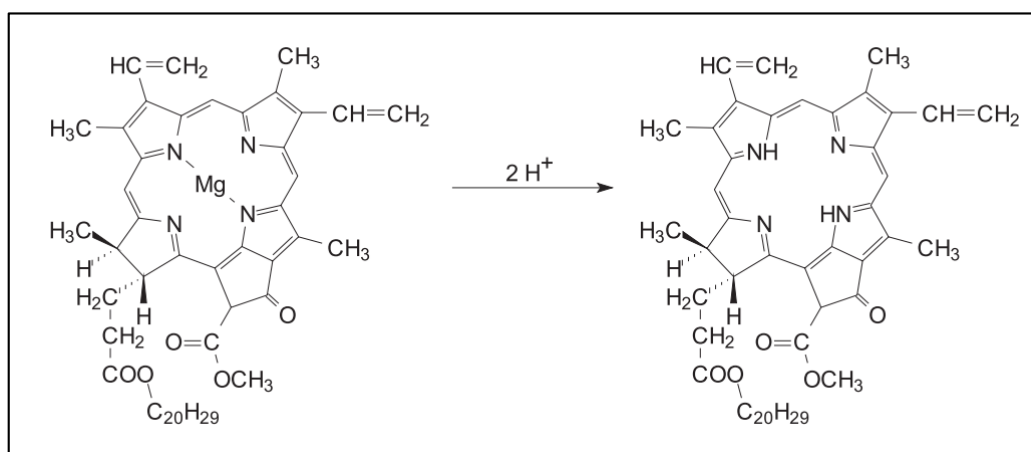
Quando sintetizados pelas plantas são denominados fitoesteroides que podem estar na forma de álcoois livres, conjugados a glicosídeos ou esterificados a ácidos graxos de cadeia longa (DEWICK, 2009). Os esteroides mais abundantes identificados são o estigmasterol, o campesterol e o β -sitosterol (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Entre as principais atividades apresentadas por esta classe, relata-se a redução do nível de colesterol sanguíneo, e consequentemente, redução dos riscos de doenças cardiovasculares. Como também a inibição do crescimento tumoral e as atividades anti-inflamatória, antipirética, antiulcerogênica e imunomoduladora (HUNG-LLAMOS et al., 2005; PEREIRA; CARDOSO, 2012)

3.4.2 Feofitinas

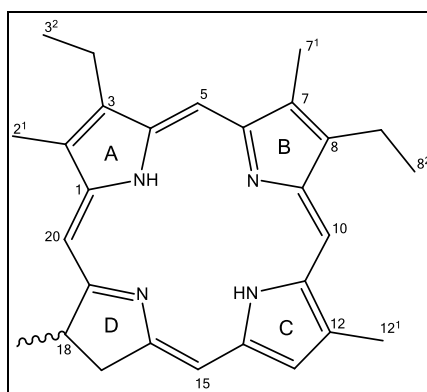
As feofitinas são substâncias formadas por um núcleo tetrapirrólico semelhante ao da clorofila, da qual são originadas biossinteticamente quando a mesma em meio ácido sofre a perda do magnésio (Fig. 6, p. 30). Após este processo conhecido por feofitinização a estrutura principal é denominada núcleo porfirínico (Fig. 7, p. 30) (TOMAZ, 2008; MOREIRA et al, 2010).

Figura 6 – Formação da feofitina a partir da clorofila por hidrólise ácida



Fonte: Moreira et al. 2010

Figura 7 – Núcleo porfirínico



Assim como as clorofilas, as feofitinas também podem ser classificadas de acordo com seus substituintes. No caso das feofitinas a e b, as mais abundantes no reino vegetal, apresentam diferenças em relação aos substituintes do carbono 7¹, uma metila para feofitina a e um aldeído para feofitina b (TOMAZ, 2008).

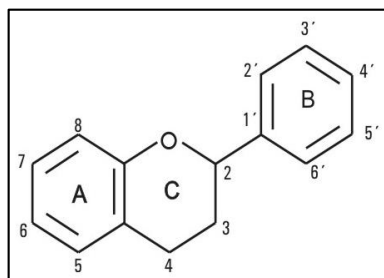
A presença da cadeia fitílica proporcionam a este tipo de metabólito secundário uma alta lipofilicidade (MARTINS; SILVA, 2002).

E estudos relatam as atividades antimicrobiana, citostática e antimultagênica das feofitinas (NOGUEIRA, 2009).

3.4.3 Flavonoides

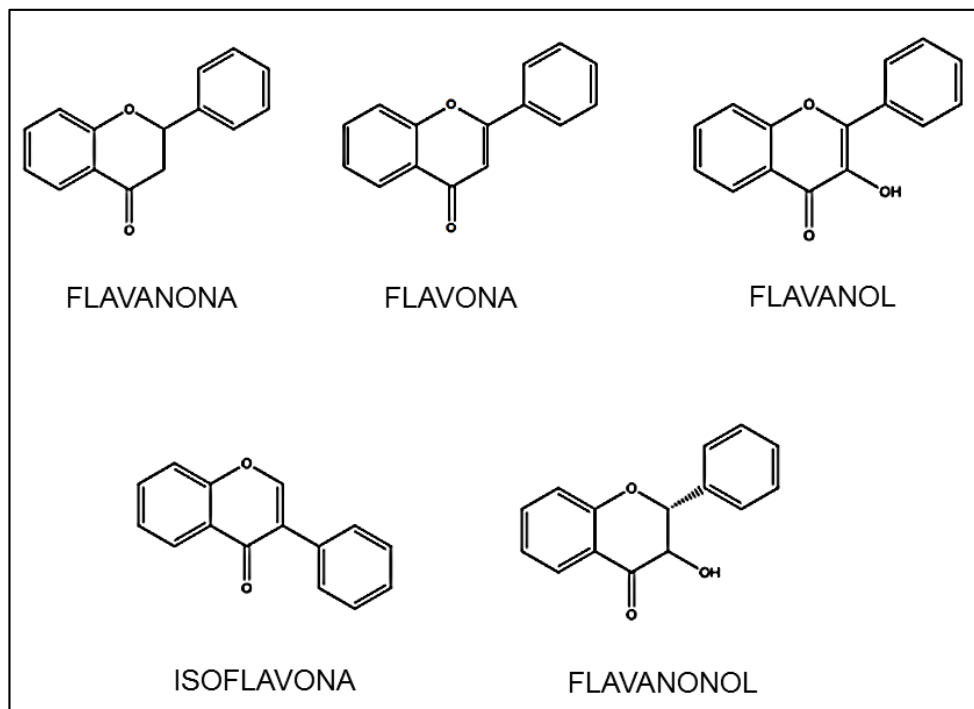
Os flavonoides compõem a classe mais importante dos compostos fenólicos encontrados no reino vegetal, principalmente em angiospermas. Biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides possuem como núcleo fundamental, em sua maioria, 15 átomos de carbono formando três anéis fenólicos (C6-C3-C6), dois anéis aromáticos (núcleos A e B) e um anel heterocíclico (núcleo C), conforme pode ser observado na figura 8 (p. 31) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Figura 8 – Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: adaptado de ZUANAZZI; MONTANHA, 2007.

Devido a variações no esqueleto básico decorrentes de reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização, das diferentes substituições do anel C e dos níveis de oxidação, pode ser encontrada nas plantas uma grande variedade de flavonoides. Dentro desta classe de substâncias são encontradas as subclasses: flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavanonois, entre outras (Fig. 9, p. 32) (TAHARA, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007)

Figura 9 – Principais subclasses de flavonoides

Fonte: ZUANAZZI; MONTANHA, 2007.

Dentre as inúmeras atividades biológicas relacionadas aos flavonoides estão as atividades antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, vasodilatadora, antiespasmódica, antitumoral, antinociceptiva, antiulcerogênica, antiplaquetária e hepatotóxica (PELZER, et al., 1998; DI CARLO, et al., 1999; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; RASO et al., 2001; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; LIMA-SARAIVA et al., 2012; PEREIRA; CARDOSO, 2012; SANTANA et al., 2012; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2013).

Destaca-se que os flavonoides são substâncias conhecidas por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes, interferindo assim na formação e na propagação de radicais livres. Essa ação resulta de um conjunto de propriedades: poder quelante de ferro, sequestro de radicais livres, inibição das enzimas diversas (cicloxygenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase), e ainda estimulação de enzimas com atividade antioxidante (catalase e superóxido-dismutase) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

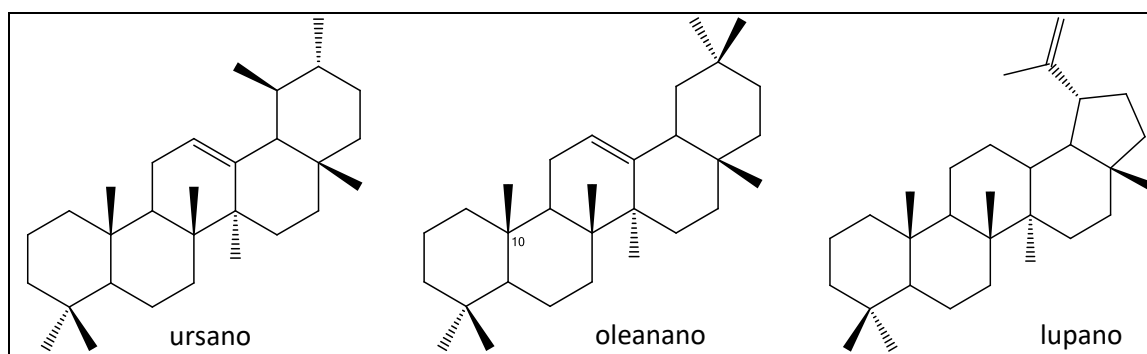
3.4.4 Triterpenos

Os triterpenos são substâncias de natureza terpênica encontrados em abundância no reino vegetal, principalmente em inúmeras plantas com uso medicinal, formados a partir de união de unidades de isopreno, unidade que se origina pela via do mevalonato. Esta classe de compostos apresentam 30 átomos de carbono, em esqueleto acíclico do tipo mono, di, tri, tetra ou pentacíclico. E podem apresentar-se na forma livre, glicosilados ou na forma de éteres ou ésteres (MAHATO; KUNDU, 1994).

Os triterpenos podem apresentar uma diversidade relacionada ao seu esqueleto carbônico e aos grupos funcionais presentes na estrutura (PATOČKA, 2003). Em relação aos grupos funcionais há uma predominância de grupos oxigenados, sendo comum a presença de mais de um grupo funcional oxigenado na molécula (OLEA; ROQUE, 1990).

Em relação ao esqueleto carbônico destacam-se os triterpenos pentacíclicos, que apresentam um esqueleto formado pelos 30 átomos de carbonos dispostos em cinco anéis. A diferença nesses anéis gera a classificação em esqueletos ursano, lupano, oleanano, entre outros. Os esqueletos dos tipos ursano e oleanano apresentam cinco anéis hexacíclicos, enquanto que o esqueleto dos tipos lupano apresentam quatro anéis deste tipo e um pentacíclico (Fig. 10, p. 33) (PATOČKA, 2003).

Figura 10 – Principais esqueletos de triterpenos pentacíclicos



As substâncias dessa classe apresentam várias atividades biológicas relatadas na literatura, tais como, anticancerígena, antiviral, bactericida, fungicida, analgésica, espermicida e antialérgica (PATOČKA, 2003). Especificamente, os

triterpenos pentacíclicos além da atividade tumoral comum dos triterpenos são também conhecidos por apresentarem atividade antiofídica, anti-inflamatória e hepatoprotetora (SHIRWAIKAR, et al., 2004, TANAKA, et al., 2004, SALEEM, et al., 2004, YAMASHITA, et al., 2002).

3.5 Atividade antioxidante de produtos naturais

O organismo humano produz naturalmente, a partir de oxidações biológicas, radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas com alto poder oxidante. Mas naturalmente o próprio organismo é responsável por defesas antioxidantes que neutralizam a produção e os efeitos destes radicais. Se estiverem em excesso no organismo, geralmente decorrente do desequilíbrio entre os radicais produzidos e a sua degradação, eles geram um processo chamado de *stress* oxidativo, que danifica biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA. Esses danos ao longo do tempo se acumulam e produzem danos celulares e teciduais, responsáveis pelo desenvolvimento patologias como as doenças degenerativas crônicas (doença de Alzheimer, aterosclerose, entre outras) e carcinogênese (SUMINO et al., 2002; RIVELLI et al., 2007; SORG, 2004).

As substâncias antioxidantes são aquelas que retardam este processo oxidativo, sendo as plantas grandes produtoras de substâncias com esta ação. Entre os inúmeros metabólitos secundários de origem vegetal com ação antioxidante, destacam-se os compostos fenólicos, que podem ser classificados em várias classes: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados hidrolisáveis e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004; SOUSA et al., 2007; NUNES, et al., 2008). Os principais compostos fenólicos que apresentam esta atividade são os flavonoides (PELZER et al, 1998; NUNES, et al., 2008).

Tournaire e colaboradores (1993) reportaram um estudo da reatividade de 13 flavonoides com oxigênio singlete, onde a eficiência desta reação é controlada principalmente pela presença de um grupo catecol no anel B dos flavonoides, enquanto que a estrutura de anel C é o principal fator determinante para a eficiência de sua reatividade química com o oxigênio, por estar relacionado à presença de um grupo hidroxila.

Desta forma, os estudos realizados de atividade antioxidante com plantas tornaram-se essenciais, em busca de fontes promissoras de metabólitos secundários com um potencial terapêutico para prevenção destas doenças (SUMINO, 2002).

A classificação dos ensaios antioxidantes é feita de acordo com os princípios de cinética química ou relacionado à transferência de elétrons ocorrido em uma determinada reação, sendo assim classificados em métodos diretos ou indiretos, respectivamente (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

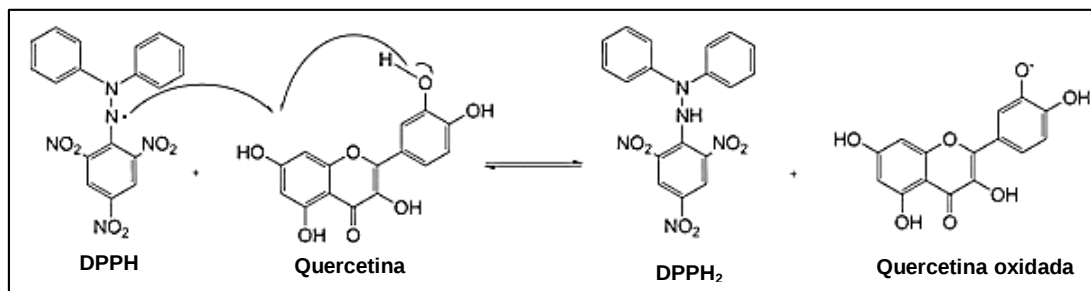
Como métodos diretos são encontrados o ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), o ensaio de redução do β -caroteno e de quimioluminescência do luminol, todos caracterizados pela competição entre um agente oxidável e um antioxidante por radicais livres de um determinado substrato (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Já como métodos indiretos podem ser citados o ensaio Folin-Ciocalteu, o teste de redução do radical DPPH, o ensaio TEAC (*Trolox equivalente antioxidante capacity*) e o ensaio FRAP (*Ferric reducing antioxidante power*), relacionados à mudanças colorimétricas, proporcionais às reações de oxi-redução entre o oxidante e o antioxidante (BENZIE; STRAIN, 1999).

3.5.1 Sequestro de radical livre DPPH

O método do sequestro do radical livre DPPH baseia-se na capacidade deste radical de reagir com doadores de hidrogênio (substâncias antioxidantes), sofrendo redução. A avaliação do sequestro do radical livre DPPH é feita baseada na medida da diminuição da absorbância do DPPH em aproximadamente 517 nm na presença de diferentes concentrações de amostras. O DPPH apresenta coloração púrpura e ao receber um átomo de hidrogênio cedido pela substância-teste, sofre redução e passa a apresentar coloração amarela (SANCHEZ-MORENO, 2002; BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, et al. 1997).

Figura 11 – Reação entre a quercetina e o DPPH



A absorbância medida é comparada com a absorbância do branco e calculada considerando a absorbância do controle negativo, que é a absorbância do DPPH sem a presença de amostra. Desta forma, pode ser obtida a concentração efetiva 50% (CE₅₀), ou seja, concentração necessária para diminuir em 50% a absorbância do DPPH. Como referência são utilizadas substâncias-padrão, como o ácido gálico e a quercetina, considerando que estas possuem o poder de sequestrar 100% dos radicais.

3.5.2 Determinação do teor de fenólicos

A determinação do teor de fenólicos totais é realizada através da reação da amostra-teste com o reagente Folin-Ciocalteu, uma mistura de ácido fosfomolibdico e fosfotúngstico. Este ensaio é um dos mais antigos para quantificação de fenólicos, desenvolvido inicialmente por Singleton e colaboradores em 1965. (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS; 1999). Neste teste o aparecimento de uma coloração azul (em aproximadamente 725 nm) indica a presença de compostos fenólicos, visto que esses ácidos ao reagir com esses compostos com ação redutora sofrem oxidação e formam os complexos de molibdênio e tungstênio, cujo estado de oxidação é +5 e +6. E quanto mais intensa a coloração maior o teor de substâncias fenólicas na amostra.

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo fitoquímico de *Roupala paulensis*

4.1.1 Coleta do material vegetal e processamento da planta

As partes aéreas de *Roupala paulensis* foram coletadas em março de 2012 no município de Maturéia – PB. Sua identificação botânica foi realizada pela Professora Dra. Maria de Fátima Agra do Setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), estando uma exsicata depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier da UFPB, sob o número Agra et al. 7441 (JPB).

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante à temperatura média de 40 °C durante 72 horas e, posteriormente, triturado em moinho mecânico, obtendo-se 3 kg de pó da planta.

4.1.2 Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das partes aéreas de *Roupala paulensis* e particionamento com solventes orgânicos

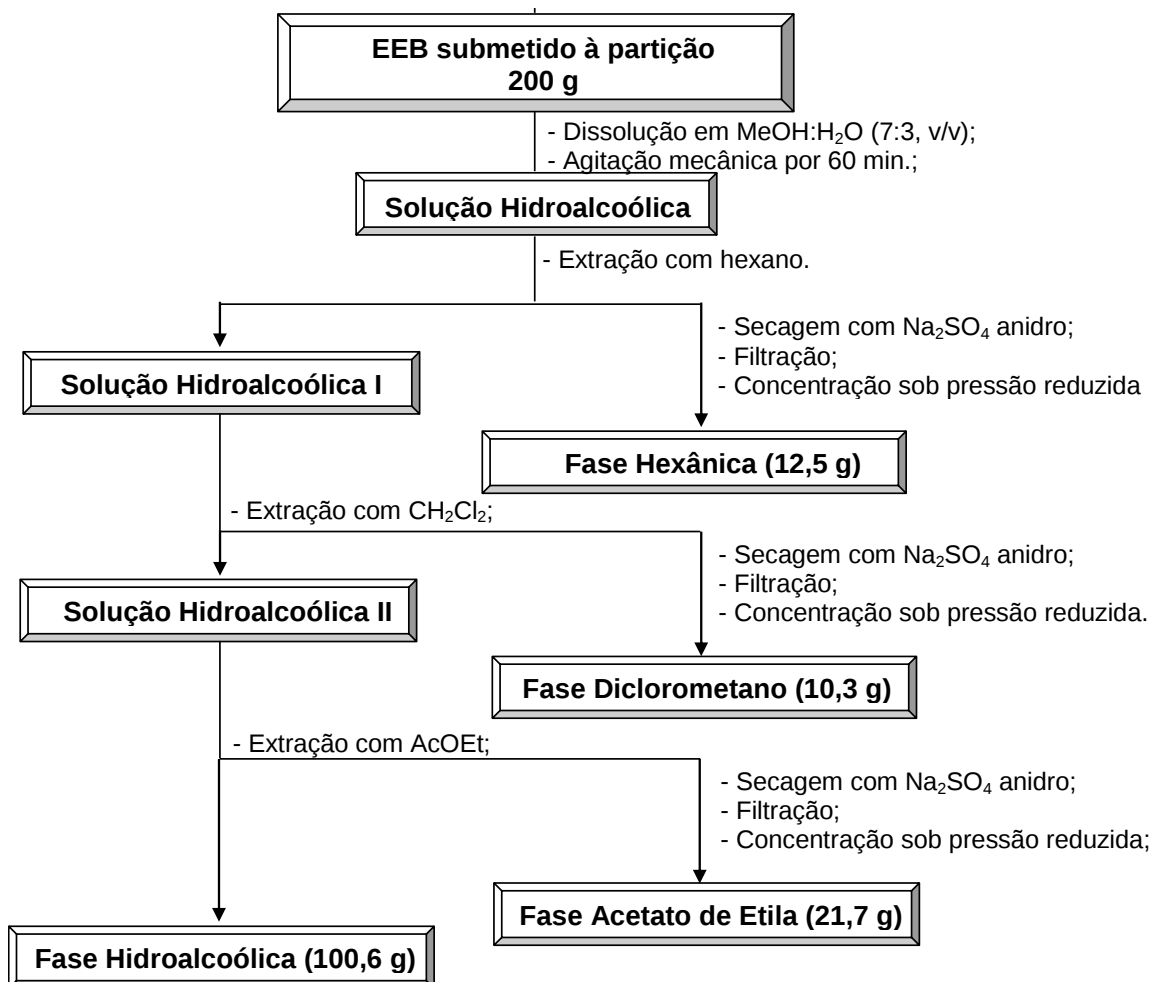
O pó da planta foi submetido à maceração com etanol a 95%, durante 72 horas, processo este repetido por cinco vezes, para obtenção de um maior rendimento do extrato. A solução extrativa resultante foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura média de 40 °C, sendo obtidos 357 g de extrato etanólico bruto (EEB).

Uma alíquota do EEB (200 g) foi dissolvido em uma solução de metanol e água destilada, MeOH:H₂O (7:3), e homogeneizado sob agitação mecânica por 60 minutos, obtendo-se uma solução hidroalcoólica. Esta solução foi submetida à partição líquido-líquido em ampola de separação com os seguintes solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade: hexano (Hex), diclorometano (CH₂Cl₂) e acetato de etila (AcOEt) (Esquema 1, p. 39).

As soluções resultantes foram tratadas com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro, submetidas à filtração e, em seguida, concentradas em evaporador rotativo sob

pressão reduzida à temperatura média de 40 °C, obtendo-se suas respectivas fases: hexânica (12,5 g), diclorometano (10,3 g), acetato de etila (21,7 g) e hidroalcoólica (100,6 g) (Esquema 1, p. 39).

Esquema 1 – Etapas envolvidas no processo particionamento do EEB de *Roupala paulensis*



4.1.3 Isolamento e purificação dos constituintes químicos de *Roupala paulensis*

O isolamento e a purificação dos constituintes químicos de *Roupala paulensis* foram realizados através de técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de média pressão (CLMP), cromatografia em coluna (CC) de adsorção e por exclusão molecular. Foram utilizados sílica gel (ART 7734 da MERCK, de partículas com

dimensões entre 0,060 – 0,200 mm e 70 - 230 mesh), e Sephadex LH-20 (AMERSHAM BIOSCIENCES), colunas cilíndricas de vidro com comprimentos e diâmetros variáveis (de acordo com a quantidade de amostra submetida à cromatografia) e solventes comerciais para eluição (Hex, AcOEt e MeOH), puros ou em misturas binárias.

Para CLMP foi utilizado aparelho de Média Pressão BUCHI Pump Manager C-615/605 e coluna Glass 15/100 cpl.

Para análise do processo de isolamento e purificação das frações obtidas, foram realizadas cromatografias em camada delgada analíticas, utilizando cromatofolha de alumínio – sílica gel 60 F254 da MERCK. As substâncias em análise foram reveladas através da exposição das cromatoplasas à radiação ultravioleta (UV) sob os comprimentos de onda de 254 e 366 nm, em aparelho MINERALIGHT (modelo UVGL-58), como também, por impregnação das placas em cubas de vidro saturadas com vapores de iodo.

Após análise da CCDA, as frações foram reunidas de acordo com os semelhanças no perfil de eluição.

4.1.3.1 Processamento cromatográfico da fase hexânica

Uma alíquota da fase hexânica (11 g) foi submetida à CC utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel Hex, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 248 frações de 150 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo. Estas frações foram em seguida analisadas através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição.

Quadro 3 – Sistemas de eluição utilizados no fracionamento cromatográfico da fase hexânica do EEB de *Roupala paulensis*

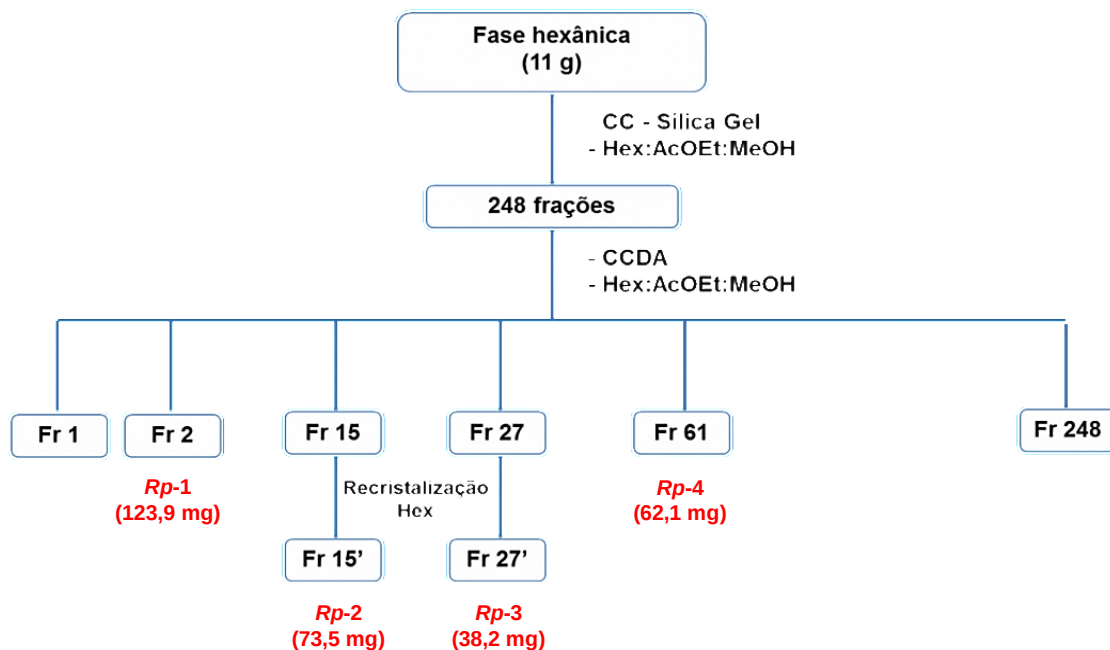
Frações	Solvente	Proporção (%)
1	Hex	100
2-18	Hex:AcOEt	95:5
19-55	Hex:AcOEt	90:10
56-87	Hex:AcOEt	80:20
88-114	Hex:AcOEt	70:30
115-137	Hex:AcOEt	50:50
138-157	AcOEt:Hex	70:30
158-190	AcOEt	100
191-223	AcOEt:MeOH	95:5
224-234	AcOEt:MeOH	90:10
235-247	AcOEt:MeOH	80:20
248	AcOEt:MeOH	70:30

A fração 2 foi obtida como um óleo incolor (123,9 mg), sendo então encaminhada para RMN de ^1H e codificada como *Rp-1* (Esquema 2, p. 42)

As frações 15 e 27 foram separadamente recristalizadas em hexano, submetidas posteriormente à RMN de ^1H e codificadas como *Rp-2* (73,5 mg) e *Rp-3* (38,2 mg), respectivamente (Esquema 2, p. 42).

A fração 61 foi obtida como um sólido amorfo verde oliva (62,1 mg), sendo então encaminhada para RMN de ^1H e codificada como *Rp-4* (Esquema 2, p. 42).

Esquema 2 – Fracionamento da fase hexânica de *Roupala paulensis*



4.1.3.2 Processamento cromatográfico da fase diclorometano

Uma alíquota da fase diclorometano (8 g) foi submetida à CC utilizando como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel Hex, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, em gradiente crescente de polaridade.

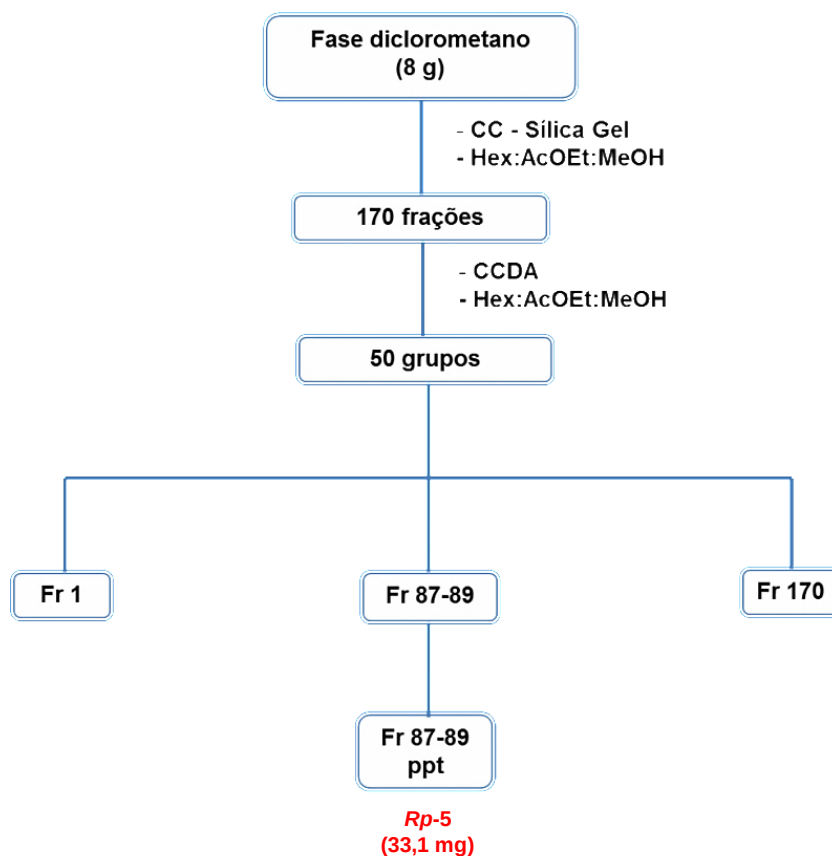
Foram coletadas 170 frações de 100 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo à temperatura média de 40 °C. Em seguida, foram analisadas através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição, e reunidas em 50 grupos, de acordo com os respectivos Rfs (Quadro 4, p. 43; Esquema 3, p. 43)

Quadro 4 – Sistemas de eluições utilizados no fracionamento cromatográfico da fase diclorometano de *Roupala paulensis*.

Frações	Solvente	Proporção (%)
1-18	Hex:AcOEt	90:10
19-35	Hex:AcOEt	80:20
36-52	Hex:AcOEt	70:30
53-60	Hex:AcOEt	60:40
61-68	Hex:AcOEt	50:50
69-79	AcOEt:Hex	70:30
80-100	AcOEt:Hex	90:10
101-106	AcOEt	100
107-135	AcOEt:MeOH	95:5
136-141	AcOEt:MeOH	90:10
142-156	AcOEt:MeOH	80:20
157-170	AcOEt:MeOH	70:30

A fração 87-89 apresentou um precipitado branco, que foi encaminhado para RMN de ^1H e codificado como *Rp-5* (Esquema 3, p. 43).

Esquema 3 – Fracionamento da fase diclorometano de *Roupala paulensis*



4.1.3.3 Processamento cromatográfico da fase acetato de etila

Uma alíquota da fase acetato de etila (10 g) foi submetida à CLMP utilizando-se como fase estacionária sílica gel 60 e como fase móvel Hex, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias, com sistema gradiente em ordem crescente de polaridade.

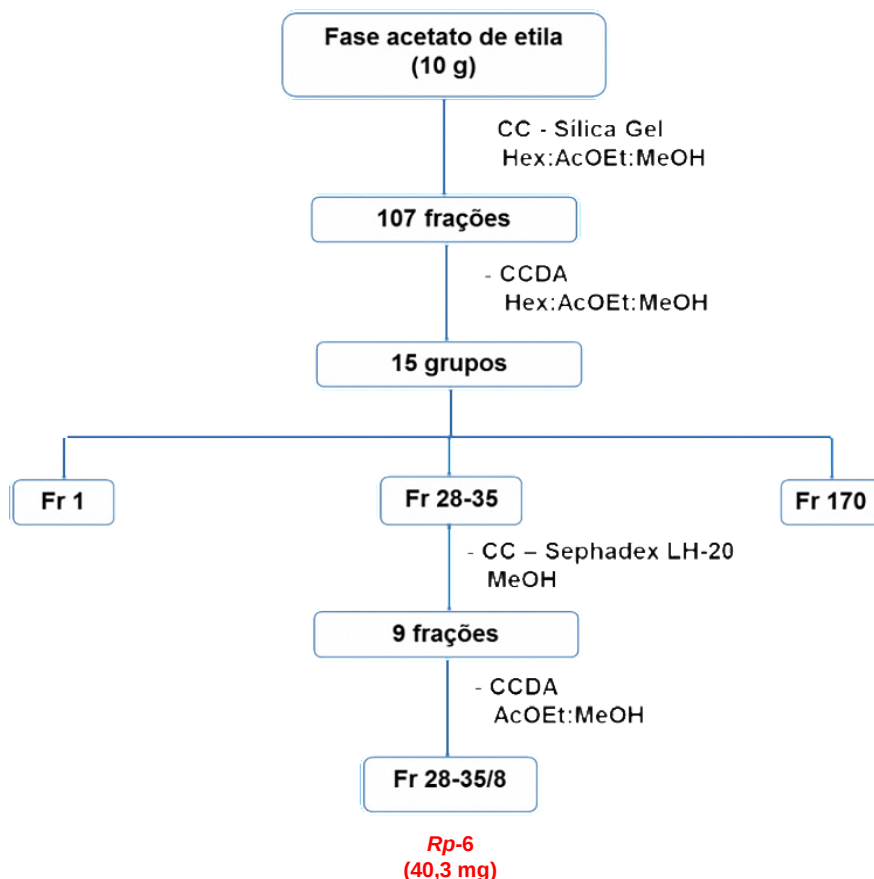
Foram coletadas 107 frações de 100 mL cada, que foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo a temperatura média de 40° C. E em seguida, analisadas através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluição, e reunidas em 15 grupos, de acordo com os respectivos R_fs (Quadro 5, p. 44; Esquema 4, p. 45)

Quadro 5 – Sistemas de eluições utilizados no fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila de *Roupala paulensis*.

Frações	Solvente	Proporção
1-3	Hex:AcOEt	90:10
4-10	Hex:AcOEt	80:20
11-14	Hex:AcOEt	70:30
15-25	Hex:AcOEt	60:40
26-39	Hex:AcOEt	50:50
40-47	AcOEt:Hex	70:30
48-54	AcOEt:Hex	90:10
55-59	AcOEt	100
60-75	AcOEt:MeOH	95:5
76-89	AcOEt:MeOH	90:10
90-95	AcOEt:MeOH	80:20
96-107	AcOEt:MeOH	70:30

A fração 28-35 (50,8 mg) foi submetida à CC, utilizando-se Sephadex LH-20 como fase fixa e MeOH como eluente, obtendo-se 9 frações. Após monitoramento em CCDA, a fração 8, apresentou-se como um sólido amorfo amarelo, sendo então encaminhada para RMN de ¹H e codificada como *Rp*-6 (Esquema 4, p. 45)

Esquema 4 – Fracionamento da fase acetato de etila de *Roupala paulensis*



4.1.4 Caracterização estrutural dos constituintes químicos isolados

A determinação estrutural dos constituintes químicos foi realizada através dos métodos espectroscópicos como Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , e Espectrometria de Massas.

Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos em espectrômetro VARIAN e BOMEM 100 MB, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY, operando para hidrogênio (RMN de ^1H) a 200 e 500 MHz e para carbono (RMN de ^{13}C) a 50 e 125 MHz, com a utilização de solventes deuterados, apresentando deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm) e constantes de acoplamento (J) em Hz, e as multiplicidades de RMN de ^1H indicadas segundo a convenção: *s* (singleto), *sl* (singleto largo) *d* (dubleto), *dl* (dubleto largo), *dd* (duplo dubleto), *t* (tripleto), *q* (quarteto) e *m* (multipleto).

Para obtenção do espectro de massas foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra. Coluna RTX-5MS capilar (5 % difenil / 95 % dimetil polisiloxano), com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm df.

Foi ainda realizada a determinação do ponto de fusão das amostras, através da utilização de aparelho digital de ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com temperatura variando de 0-350 °C.

4.2 Estudo da atividade antioxidante de *Roupala paulensis*

Para a determinação da atividade antioxidante de *Roupala paulensis* o EEB e suas fases hexânica, diclorometano e acetato de etila foram submetidos aos métodos fotolorimétricos *in vitro* do sequestro do radical livre DPPH e de determinação do teor de fenólicos, ambos realizados em triplicata.

Foram utilizados como controle positivo os padrões, ácido ascórbico e ácido gálico, além dos reagentes 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio (Na₂CO₃), todos obtidos da SIGMA-ALDRICH.

As leituras da absorbância após as reações foram realizadas em Espectrofotômetro Biotek Leitora de Microplacas Multidetecção Synergy HTX.

4.2.1 Teste do sequestro do radical livre DPPH

Para determinação do sequestro do radical livre DPPH foi utilizado o teste de redução do radical DPPH pelo método de microdiluição, adaptado de Garcez, 2009.

Uma solução de DPPH foi preparada pela mistura de 11,82 mg de DPPH e 100 mL de MeOH, bem como soluções em 5 concentrações diferentes de ácido ascórbico (substância padrão) ente 0,5 e 8 µg/mL e das substâncias-teste (variando de 6,25 a 300 µg/mL, de acordo com a amostra testada).

100 µL de cada concentração, tanto da substância padrão quanto da substância-teste, foram distribuídos em placa de 96 poços, em triplicata adicionando-se em seguida 100 µL da solução de DPPH. Desta forma, em cada poço a concentração das substâncias foi diluída 1:1, assim como a concentração do DPPH.

Após 30 min de incubação da reação à temperatura ambiente, protegida de luz, foi realizada a leitura da absorbância a 518 nm, em espectrofotômetro. E assim pode ser verificada a diminuição da concentração do radical DPPH.

A capacidade de sequestro do radical DPPH, ou seja, a % da atividade antioxidante foi calculada através da equação:

$$\%AA = \frac{\{[Abscontrole - (Absamostra - Absbranco)] \times 100\}}{Abscontrole}$$

Onde:

Abscontrole = absorbância do controle negativo (DPPH incubado apenas com metanol)

Absamostra = absorbância da substância-teste (amostra incubada com DPPH)

A concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres (CE₅₀) foi determinada de acordo com o método de regressão linear no intervalo de confiança de 95% (p<0,05) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO). Os resultados foram expressos através da CE₅₀ ± D.P. (desvio padrão).

4.2.2 Determinação do teor de fenólicos totais

Para quantificação de fenólicos totais nas amostras de *Roupala paulensis*, foi utilizado o ensaio Folin-Ciocalteu, com adaptações (Cabral et al. 2009).

Inicialmente foi construída uma curva de calibração utilizando soluções padrão hidroalcoólicas de ácido gálico com concentrações entre 0 e 500 µg/mL. Em eppendorf de 2 mL foram misturados 120 µL de cada solução padrão com 500 µL de solução a 10% de Folin-Ciocalteu. Após 8 minutos, foram adicionados 400 µL de solução de Na₂CO₃ a 7,5%. Após 2h foi medida a absorbância a 765 nm, obtendo-se uma curva de calibração com coeficiente de regressão linear de 0,99...

Para a quantificação de fenólicos totais das amostras foram preparadas, do extrato e das fases hexânica, diclorometano e acetato de etila, soluções diluídas em MeOH:H₂O (1:1), com concentrações variando entre 10 e 500 µg/mL, e em seguida submetidas ao mesmo procedimento descrito para as soluções padrão de ácido gálico.

Como branco foram utilizadas soluções preparadas conforme o procedimento descrito substituindo a amostra ou a solução padrão por solução MeOH:H₂O (1:1).

O teor de fenólicos totais no extrato, na fração aquosa e subfrações foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico e expresso como g de equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra.

4.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média e analisados estatisticamente com auxílio software GraphPad Prisma versão 5.0. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way), seguido de teste de comparação múltipla de Dunnett.

Resultados e discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação dos constituintes químicos isolados de *Roupala paulensis*

5.1.1 Determinação estrutural de *Rp-1*

A substância codificada como *Rp-1* foi obtida como um óleo incolor com 123,9 mg.

A análise de *Rp-1* em CG-EM mostrou um pico em tempo de retenção (TR) 28,8 min (Fig. 12, p. 52; Tab. 1, p. 51). O espectro de massas correspondente a esse pico (Fig. 13, p. 52) apresentou um sinal em m/z 410 correspondente com a fórmula molecular $C_{30}H_{50}$, e quando comparado com o espectro de massas da biblioteca NIST08.LIB (Fig. 14, p. 52) foi possível identificar que a substância em análise seria o esqualeno, com um índice de similaridade de 94%. Para consolidar essa proposta foram realizados espectros de RMN de ^{13}C e 1H .

O espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, $CDCl_3$) de *Rp-1* (Fig. 15, p. 53) apresentou sinais em δ_c 131,17, 134,83 e 135,04, característicos de absorções de carbonos não-hidrogenados (C-2/C-23, C-10/C-15, e C-6/C-19, respectivamente), um sinal em δ_c 124,28 característico de carbonos de dupla ligação (C-3, C7, C-11, C-14, C-18 e C-22), e sinais entre δ_c 16,02 e 39,74 atribuídos aos carbonos metilênicos e metílicos de cadeia poli-insaturada (CURSINO et al., 2009).

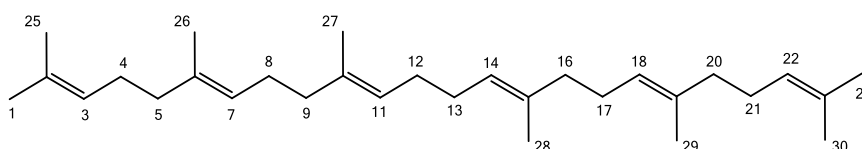
O espectro de RMN de 1H (200 MHz, $CDCl_3$) de *Rp-1* (Fig. 16, p. 53) apresentou um tripleto em δ_H 5,12 ($J=4$ Hz) atribuído aos hidrogênios das duplas ligações H-3, H-7, H-11, H-14, H-18 e H-22, um multiplete em δ_H 2,01 atribuído aos hidrogênios metilênicos vizinhos às ligações duplas, um singleto em δ_H 1,60 atribuído aos hidrogênios das metilas H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 e H-30, e um singleto em δ_H 1,68 atribuído aos hidrogênios das metilas H-1 e H-24 (CURSINO et al., 2009).

A partir da análise do espectro de massas e dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C , bem como comparações com os dados da literatura foi possível identificar *Rp-1* como sendo o 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno, conhecido por esqualeno. Substância isolada pela primeira vez no gênero *Roupala*.

O esqualeno, conhecido intermediário na biossíntese do colesterol, é um antioxidante estável e eficaz, capaz de impedir a peroxidação lipídica. Sendo desta forma um importante componente dos lipídios da superfície da pele humana, por promover uma proteção natural da peroxidação induzida por UV (KOHNO et al., 1995; HUANG; LIN; FANG, 2009). Pode atuar no aumento da resposta imune à vários antígenos (REDDY; COUVREUR, 2009). Além da capacidade de inibição de tumores em animais, possivelmente devido à redução de pirofosfato de farnesila (PFF) disponível para prenilação do oncogene RAS (NEWMARK, 1997; RAO; NEWMARK; REDDY, 1998; SPORN; SUH, 2000; WALL, 2010).

Tabela 1 – Dados da CG-EM de Rp-1

Pico	TR (min)	m/z	Nome
1	28,8	410	Esqualeno



Esqualeno

Tabela 2 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) de Rp-1 com dados da literatura (CURSINO et al., 2009) – em CDCl_3

C	Rp-1 δ_c	Esqualeno δ_c
1/24	25,69	25,29
2/23	131,17	131,43
3/22	124,28	124,65
4/21	26,46	26,90
5/20	39,74	39,98
6/19	135,04	135,30
7/18	124,28	124,54
8/17	28,27	27,01
9/16	39,74	39,96
10/15	134,83	135,10
11/14	124,28	124,52
12/13	29,73	28,50
25/30	17,66	17,89
26/29	16,02	16,26
27/28	16,02	16,21

Figura 12 – Cromatograma CG-EM de *Rp*-1

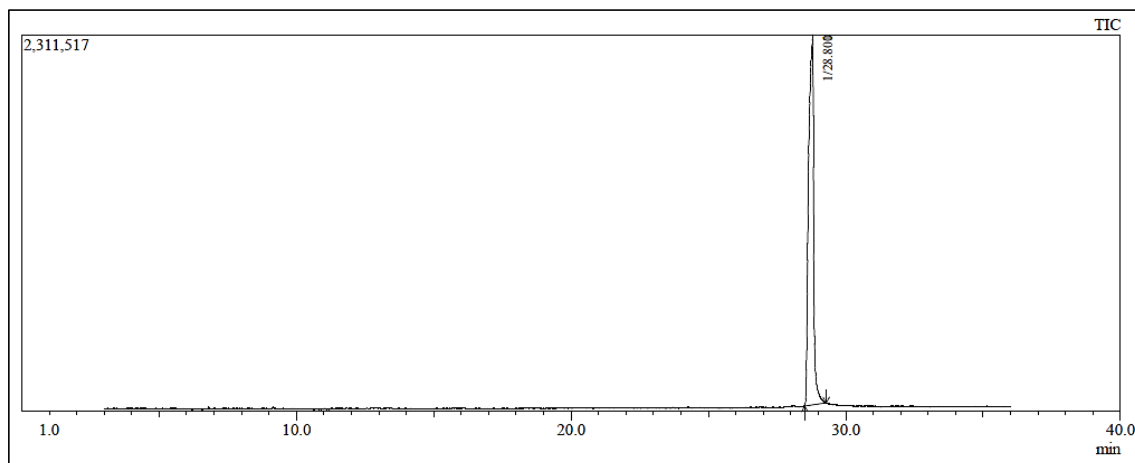


Figura 13– Espectro de massas de *Rp*-1 (TR 28,8 min)

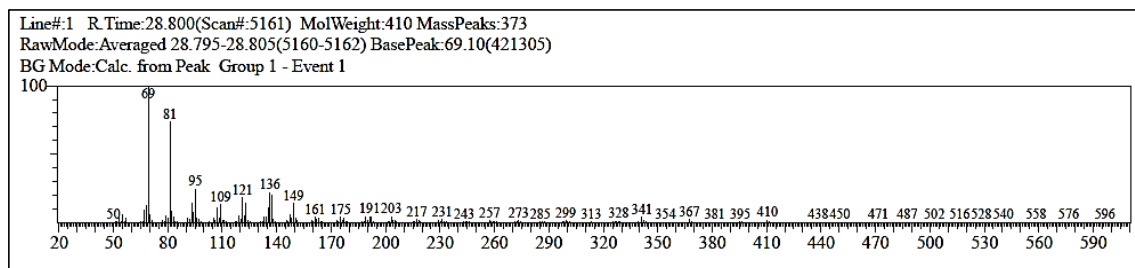


Figura 14 – Espectro de massas do esqualeno (biblioteca NIST08.LIB)

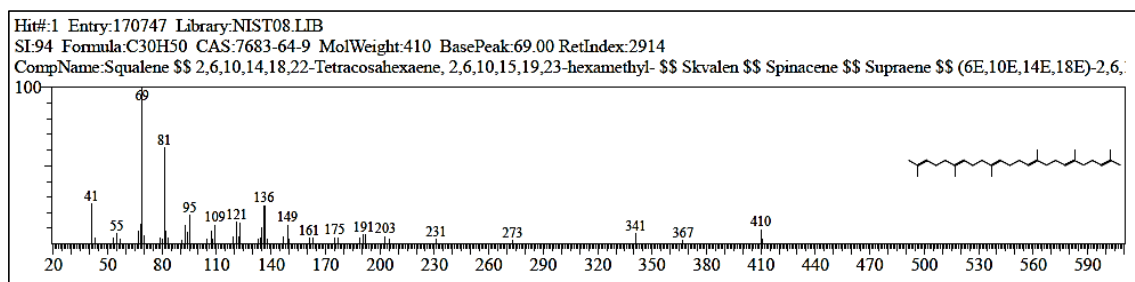


Figura 15 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-1 (50 MHz, CDCl_3)

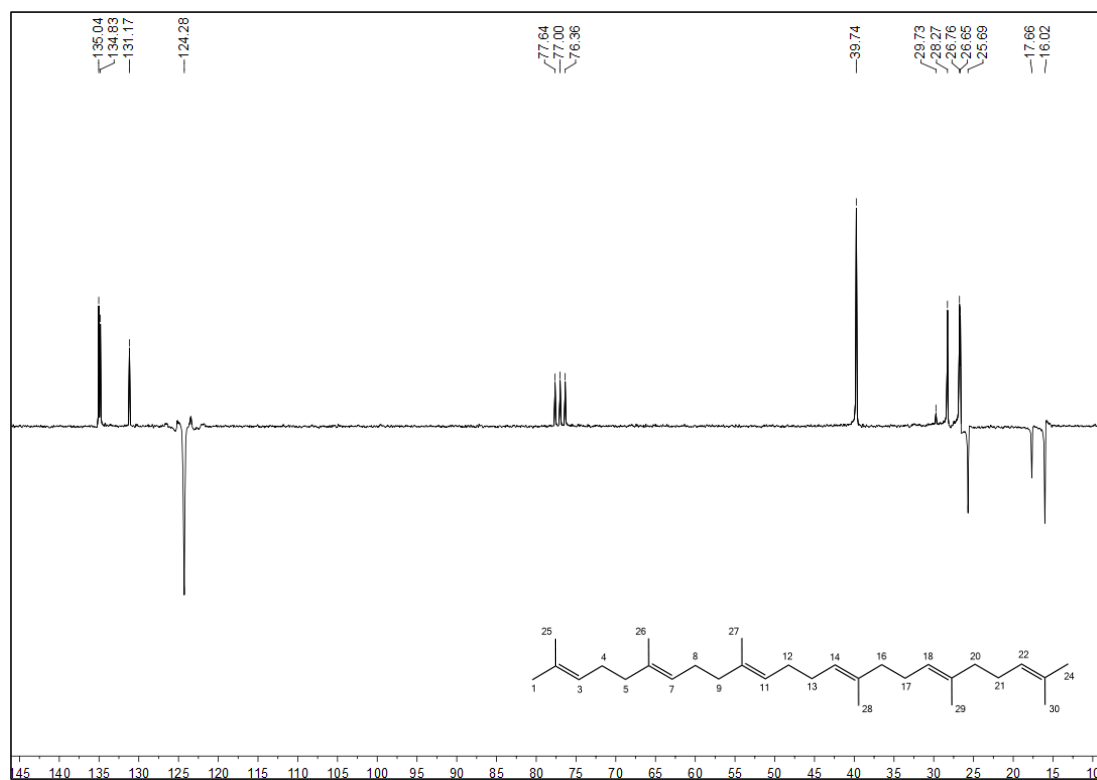
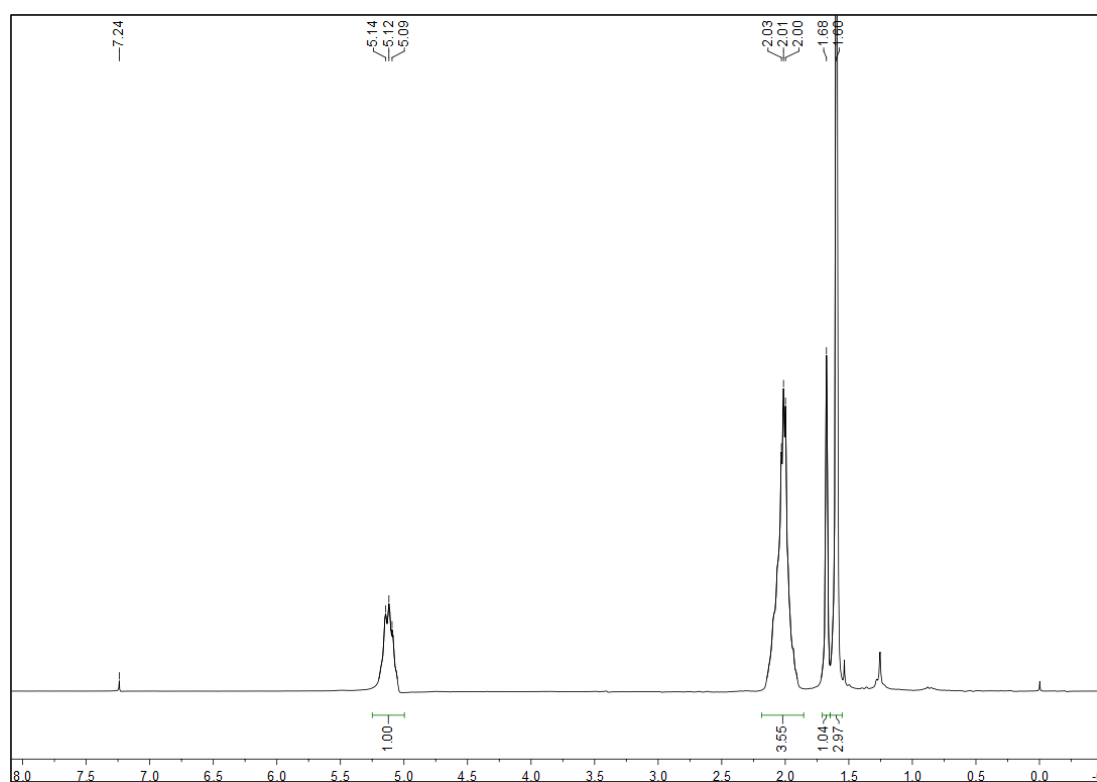


Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H de *Rp*-1 (200 MHz, CDCl_3)



5.1.2 Determinação estrutural de *Rp-2*

A substância codificada como *Rp-2* foi obtida na forma de sólido branco com 73,5 mg.

O espectro de IV de *Rp-2* obtido em pastilhas de KBr (Fig. 17, p. 57) apresentou banda de absorção em 3.350 cm^{-1} característico de estiramento hidroxila, banda aproximadamente em 1.050 cm^{-1} de estiramento C–O de álcool. Além de absorções em 2.950 cm^{-1} de C–H sp^3 e em 1.640 , característico de C=C (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007; PAVIA et al., 2010).

O espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) (Fig. 18, p. 57) e suas expansões (Fig. 19-21, p. 58 e 59) apresentou 70 sinais, estando a maioria na região entre δ_{C} 15,5 e 56,0, característicos de carbonos metínicos, metilênicos e metílicos, o que permitiu sugerir que o composto isolado poderia tratar-se de uma mistura de substâncias de natureza terpênica e/ou esteriodal. A análise dos dados de RMN de ^{13}C permitiu inferir que a mistura era composta por triterpenos pentacíclicos com esqueleto ursano, oleanano e lupano. Sendo assim as substância da mistura foram codificadas como *Rp-2a*, *Rp-2b* e *Rp-2c*.

Essa proposta foi evidenciada pela observação no espectro de RMN de ^{13}C de deslocamentos químicos característicos, em δ_{C} 124,4 e 139,5, atribuídos a C-12 e C-13, respectivamente, de triterpeno do tipo ursano (*Rp-2a*); em δ_{C} 121,7 e 145,2, atribuídos a C-12 e C-13, respectivamente, de triterpeno do tipo oleanano (*Rp-2b*); e em δ_{C} 151,0 e 109,3, atribuídos a C-20 e C-29, respectivamente, de triterpeno do tipo lupano (*Rp-2c*). O sinal em δ_{C} 78,9 foi atribuído ao C-3 comum às três substâncias com a hidroxila (OH) ligada ao mesmo em orientação β (DIAZ et al., 2008).

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de *Rp-2* (Fig. 22, p. 59) e suas expansões (Fig. 23-24, p. 60) mostraram sinais que corroboraram com os dados de RMN de ^{13}C . Foram observados singletos característicos de hidrogênios metílicos de esqueletos triterpênicos entre 0,7 e 1,2, corroborando com os dados de RMN de ^{13}C . Ainda foram evidenciados os tripletos largos em δ_{H} 5,15 e 5,10 referentes à hidrogênios vinílicos de *Rp-2a* e *Rp-2b*, além dos sinais em δ_{H} 4,66, 4,54 e 1,65 para *Rp-2c*, corroborando com os dados destes três tipos de triterpenos (DIAZ et al., 2008).

Esses dados permitiram sugerir que a mistura era composta pelos triterpenos pentacíclicos urs-12-en-3 β -ol (*Rp-2a*), olean-12-en-3 β -ol (*Rp-2b*) e 3 β -hidroxi-lup-

20(29)-eno (*Rp-2c*). Os demais sinais foram atribuídos por comparação com dados da literatura, apresentando-se compilados na tabela 4 (p. 56).

Para confirmação da proposta, foi realizada a análise em CG-EM que mostrou um cromatograma (Fig. 25, p. 61) no qual foram evidenciados dois picos, com tempo de retenção em 38,267 e 40,945 min (Tab. 3, p. 56). O espectro de massas desses picos (Fig. 26 e 28, p. 61) apresentaram picos em m/z 426 que corroboraram para urs-12-en-3 β -ol, olean-12-en-3 β -ol e 3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno, respectivamente, quando comparados com a biblioteca NIST08.LIB (Fig. 27 e 29, p. 61 e 62).

No espectro de massas do pico 2 (TR 40,945 min.) (Fig. 28, p. 61) também puderam ser observados íons de fragmentação com m/z 189 e 207, característicos para o fragmentação de triterpenos com esqueleto lupano com substituição de OH na posição 3 (CARVALHO et al., 2010).

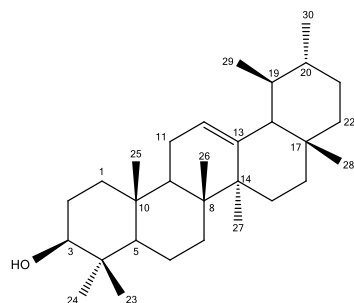
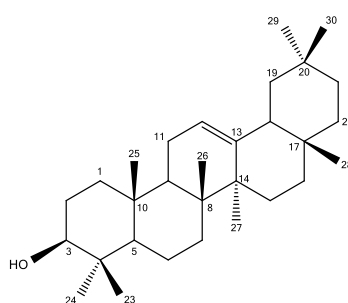
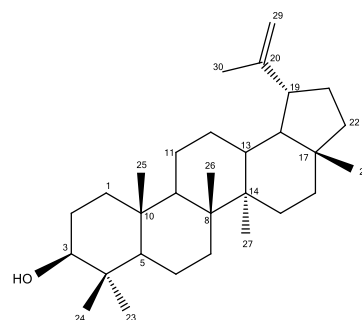
Assim, após análises desses dados, juntamente com comparação com dados da literatura foi possível confirmar que *Rp-2* era constituída por uma mistura dos triterpenos urs-12-en-3 β -ol (*Rp-2a*), olean-12-en-3 β -ol (*Rp-2b*) e 3 β -hidroxi-lup-20(29)-eno (*Rp-2c*), mais conhecidos como α -amirina, β -amirina e lupeol, respectivamente. Substâncias relatadas pela primeira vez no gênero *Roupala*.

A α -amirina é relatada na literatura por apresentar atividade anti-inflamatória. Assim como a β -amirina, que também apresenta estudos relacionados a sua atividade antimicrobiana e antitumoral (MEDEIROS et al., 2007; LIN et al., 2010; SHARMA; SINGH; VIJAYVERGIA, 2010; SHIN et al., 2010). Quando em mistura essas duas substâncias apresentaram ainda atividade antinociceptiva em estudos com camundongos (LIMA JUNIOR et al., 2007) e efeito ansiolítico e antidepressivo (ARAGÃO et al., 2006).

Estudos demonstraram que o lupeol apresenta atividade antitumoral em células do câncer de próstata in vivo, inibindo o potencial proliferativo das células, através da modulação no nível de expressão de genes associados com a proliferação e sobrevivência deste tipo de célula (SALEEM et al., 2009). Foram relatadas ainda as atividades anti-inflamatória, cardioprotetora, hepatoprotetora e antiofídica (SHIRWAIKAR et al., 2004; SALEEM et al., 2004; YAMASHITA et al., 2002; FERNANDEZ et al., 2001; PREETHA et al., 2006; SALEEM et al., 2004; SUDHAHAR et al., 2007)

Tabela 3 – Dados da CG-EM de *Rp-2*

Pico	TR (min)	% Area	m/z	Nome
1	38,267	18,48	426	α -amirina
2	40,945	81,52	426	lupeol

 **α -amirina** **β -amirina****lupeol****Tabela 4 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C (50 MHz) de *Rp-2* com dados da literatura (ASSIS JUNIOR; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; 2013) – em CDCl_3**

C	<i>Rp-2</i> ^a δ_c	α -amirina δ_c	<i>Rp-2b</i> δ_c	β -amirina δ_c	<i>Rp-2c</i> δ_c	Lupeol δ_c
1	38,7	38,6	38,7	38,6	38,7	38,7
2	27,2	27,3	27,2	27,3	27,4	27,4
3	79,0	79,0	79,0	79,0	79,0	79,0
4	38,8	38,8	38,8	38,8	38,8	38,8
5	55,1	55,2	55,2	55,3	55,2	55,3
6	18,3	18,4	18,3	18,4	18,3	18,3
7	32,9	32,9	32,6	32,7	34,2	34,3
8	40,0	40,0	38,8	38,8	40,8	40,8
9	47,7	47,7	47,7	47,7	50,4	50,4
10	36,9	36,9	37,1	37,2	37,1	37,2
11	23,2	23,3	23,5	23,7	20,9	20,9
12	124,4	124,4	121,7	121,7	25,1	25,2
13	139,5	139,6	145,2	145,2	38,0	38,1
14	42,0	42,1	41,7	41,7	42,8	42,8
15	28,7	28,7	26,1	26,2	27,4	27,4
16	26,6	26,6	26,9	26,9	35,6	35,6
17	33,7	33,7	32,5	32,5	43,0	43,0
18	59,0	59,1	47,2	47,2	48,2	48,3
19	39,7	39,7	46,8	46,8	48,0	48,0
20	39,6	39,6	31,1	31,1	151,1	150,9
21	31,2	31,3	34,7	34,7	29,8	29,9
22	41,5	41,5	37,1	37,2	40,0	40,0
23	28,1	28,1	28,4	28,4	28,0	28,0
24	15,6	15,6	15,5	15,5	15,4	15,4
25	15,6	15,7	15,6	15,6	16,1	16,1
26	16,8	16,9	16,8	16,9	16,0	16,0
27	23,3	23,4	26,0	26,0	14,5	14,5
28	28,1	28,1	28,4	28,4	18,0	18,0
29	17,5	17,5	33,3	33,7	109,3	109,3
30	21,4	21,4	23,7	23,7	19,3	19,3

Figura 17– Espectro de IV de *Rp*-2 (KBr, cm^{-1})

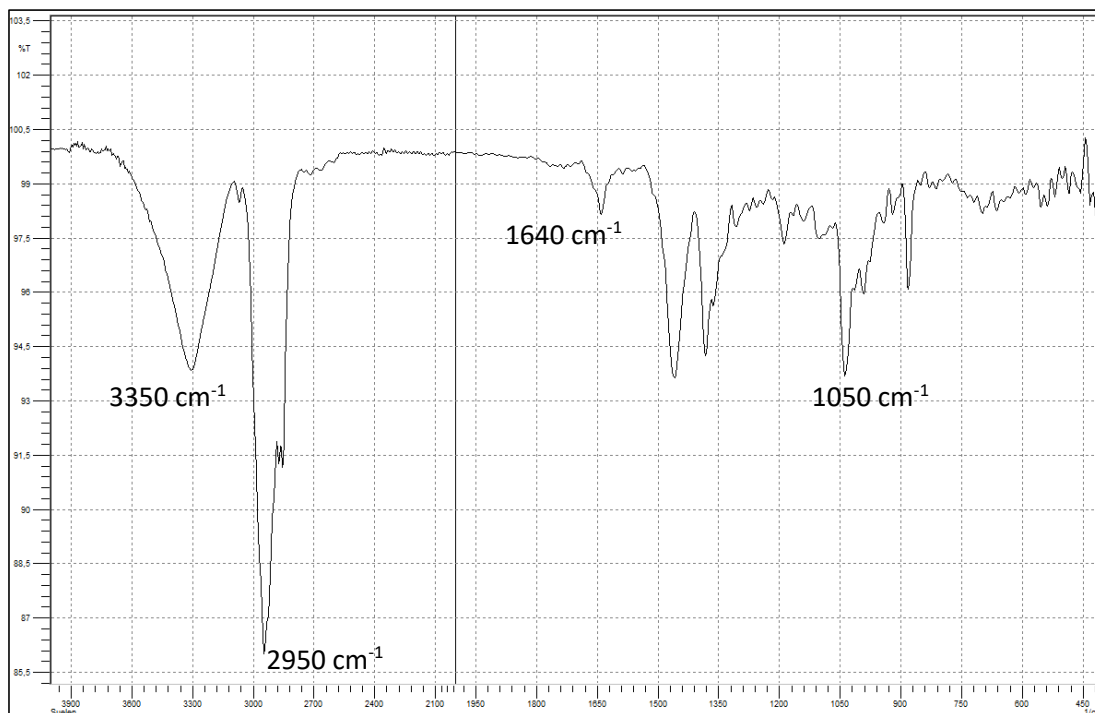


Figura 18 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-2 (50 MHz, CDCl_3)

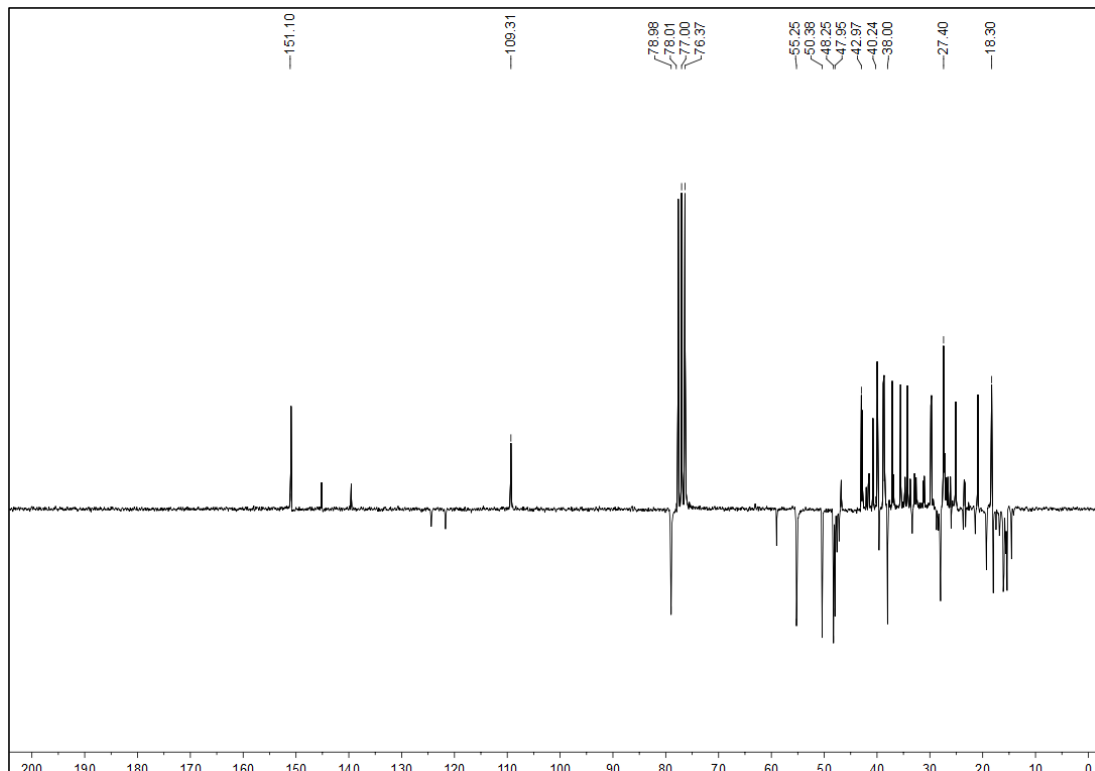


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-2 (50 MHz, CDCl_3) na região de 160,0-70,0 ppm.

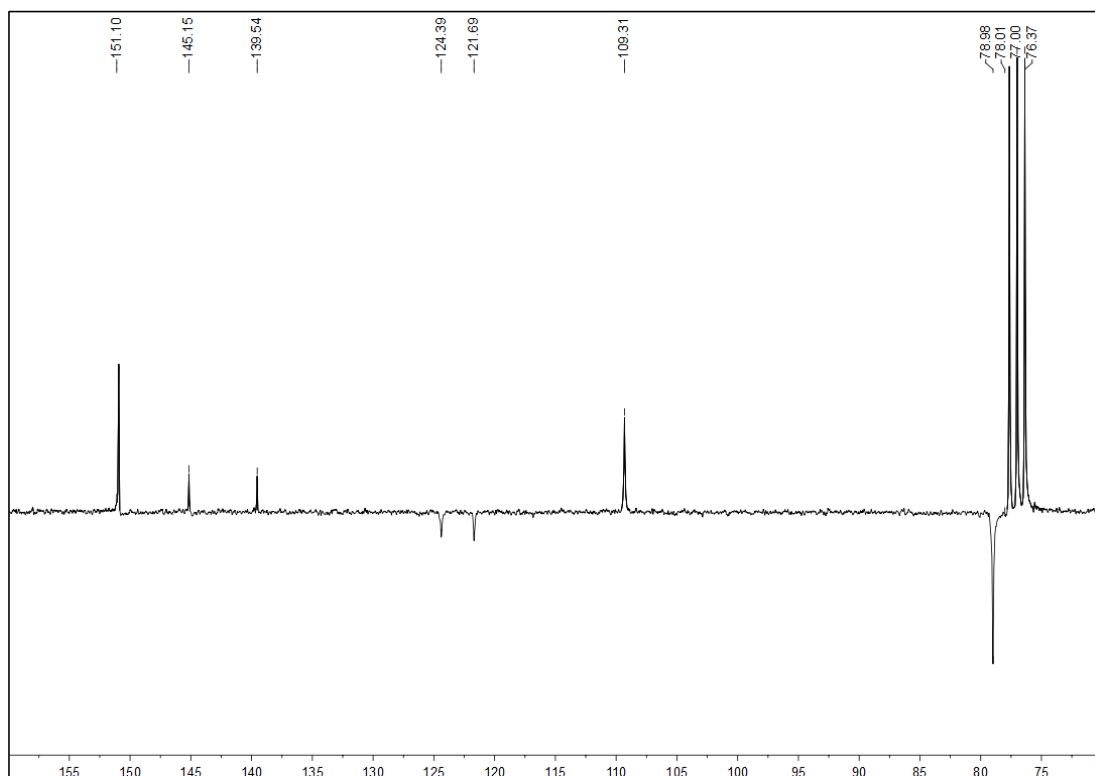


Figura 20 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-2 (50 MHz, CDCl_3) na região de 62,0-32,0 ppm.

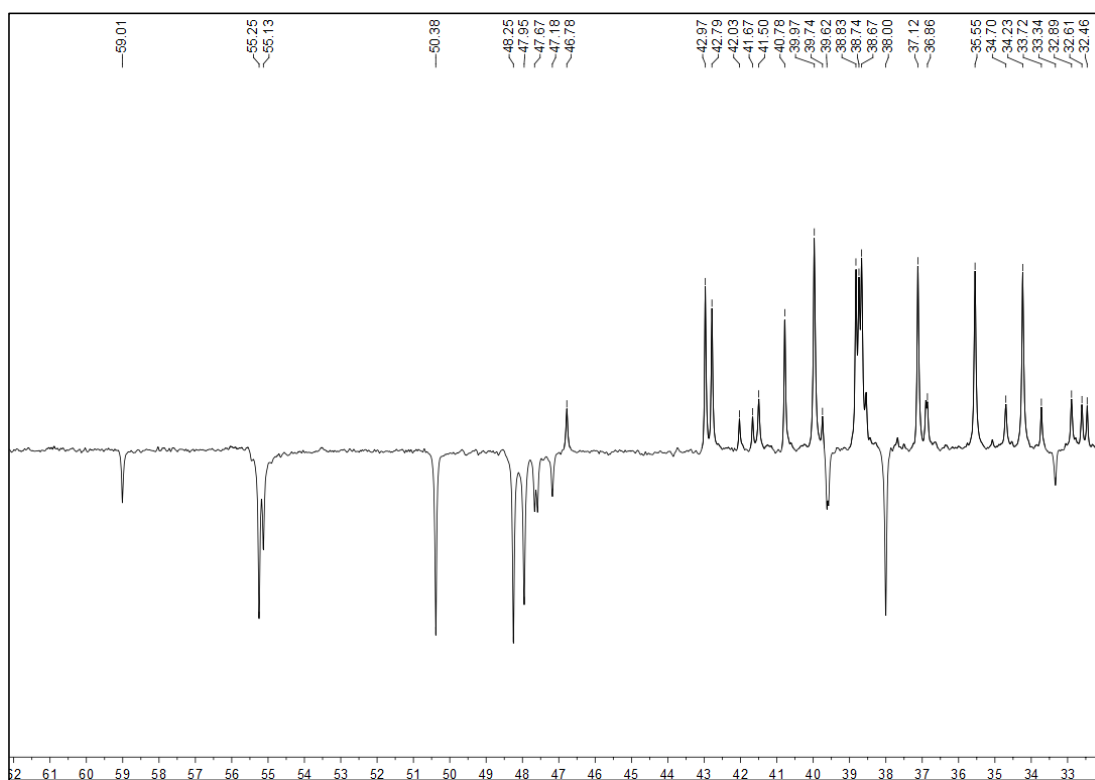


Figura 21 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-2 (50 MHz, CDCl_3) na região de 32,0-13,0 ppm.

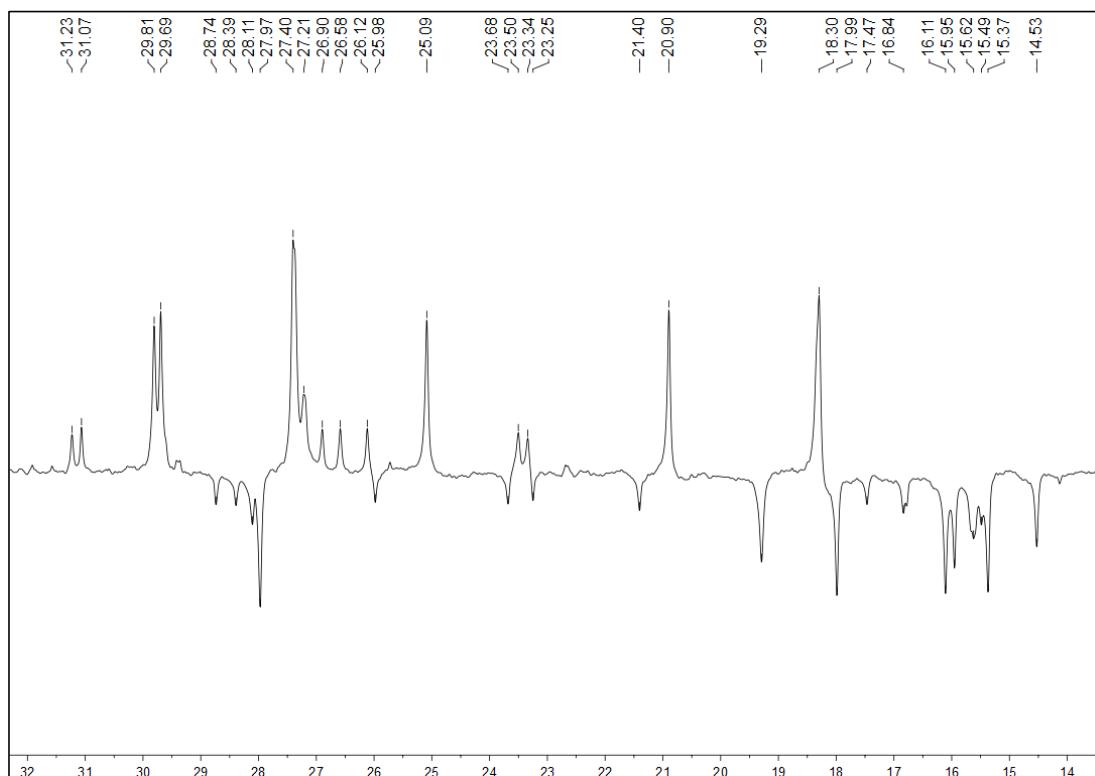


Figura 22 – Espectro de RMN de ^1H de *Rp*-2 (200 MHz, CDCl_3)

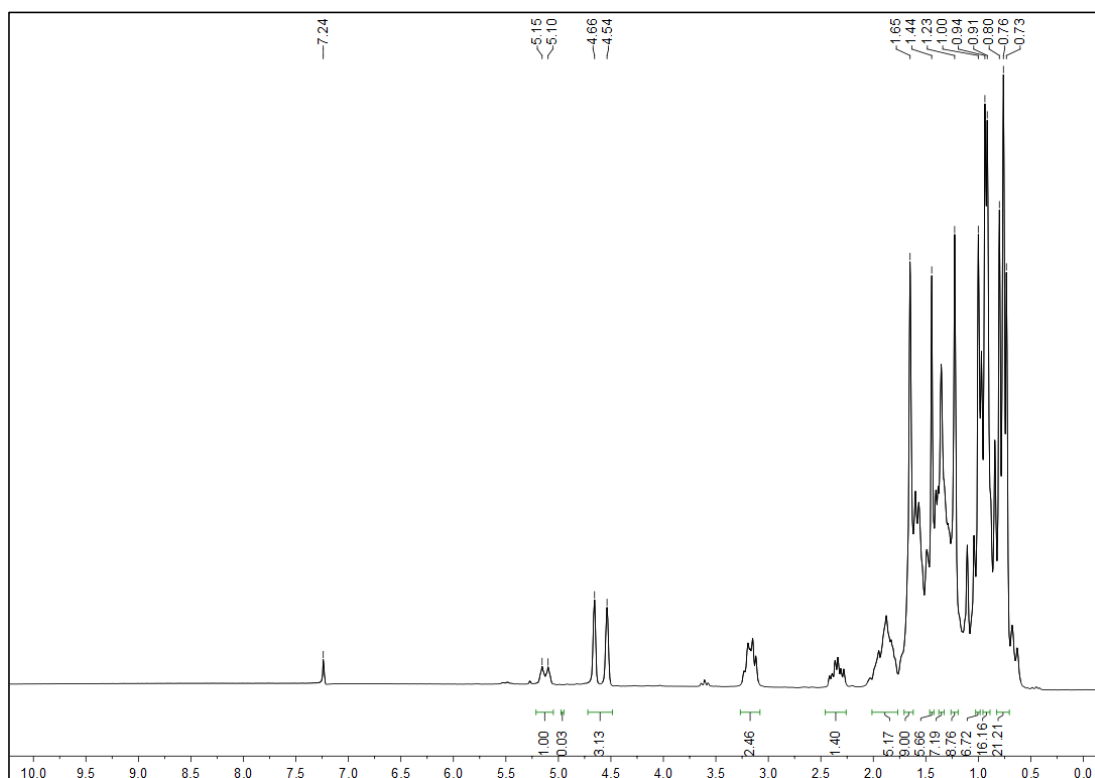


Figura 23 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Rp*-2 (200 MHz, CDCl_3) na região de 5,4-2,2 ppm.

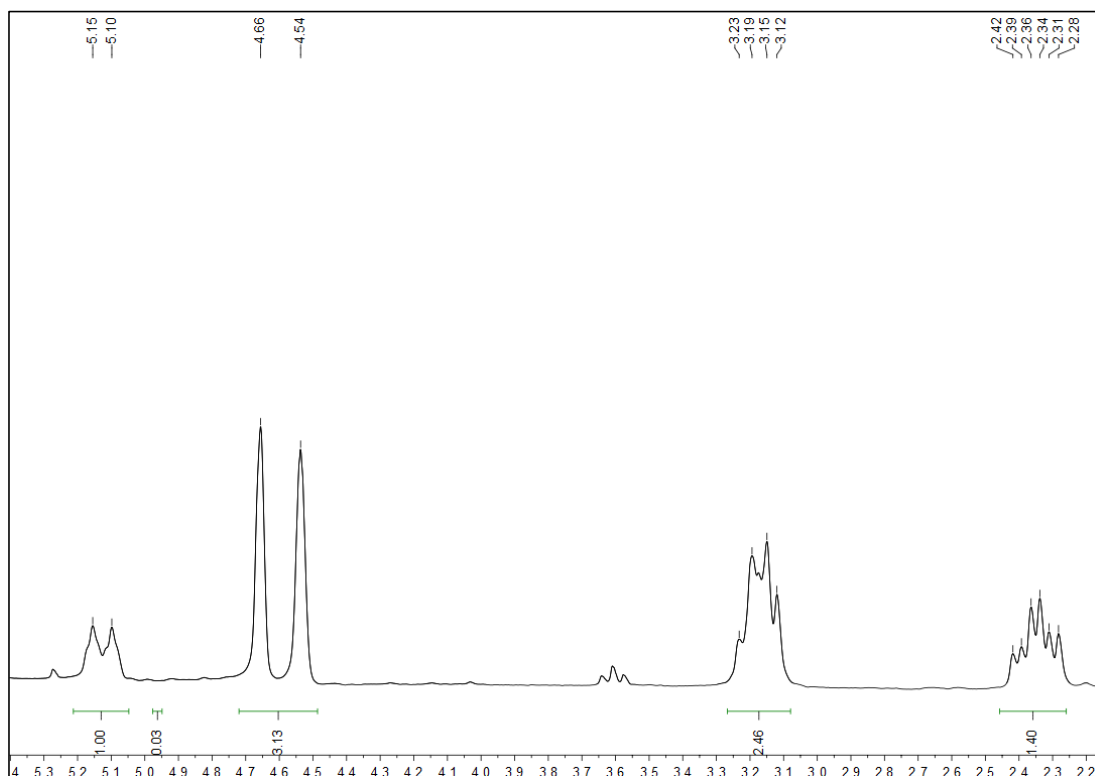


Figura 24 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Rp*-2 (200 MHz, CDCl_3) na região de 2,2-0,3 ppm.

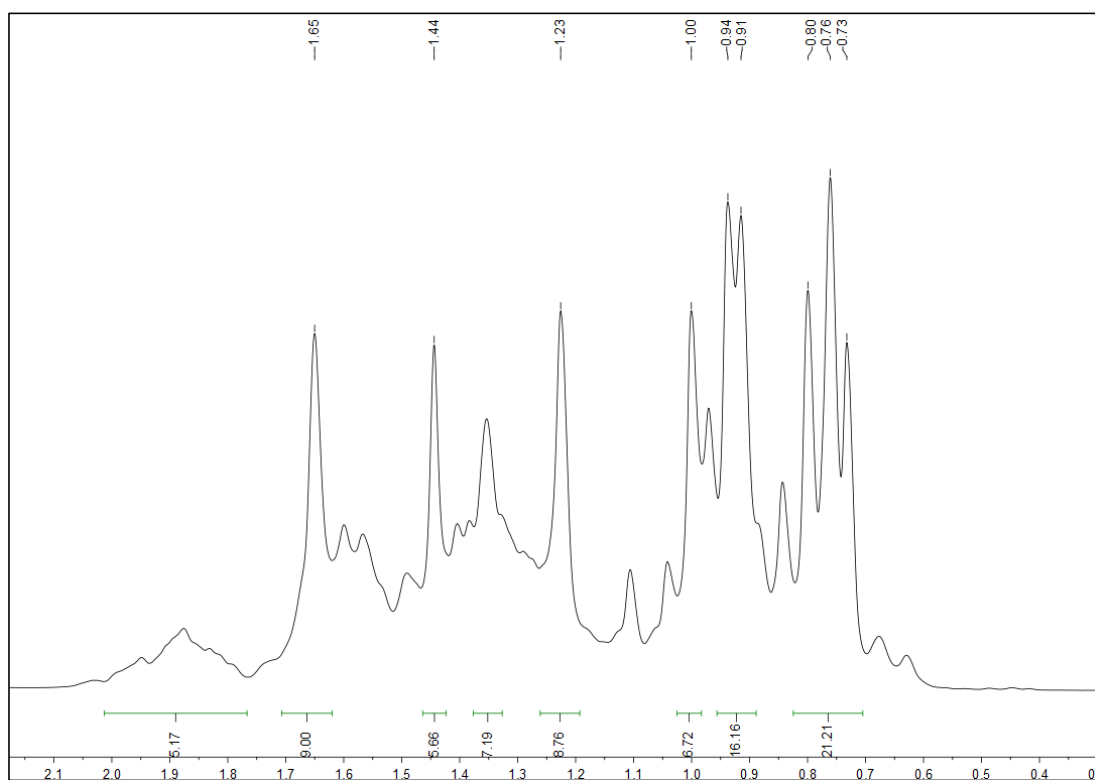


Figura 25 – Cromatograma CG-EM de *Rp*-2

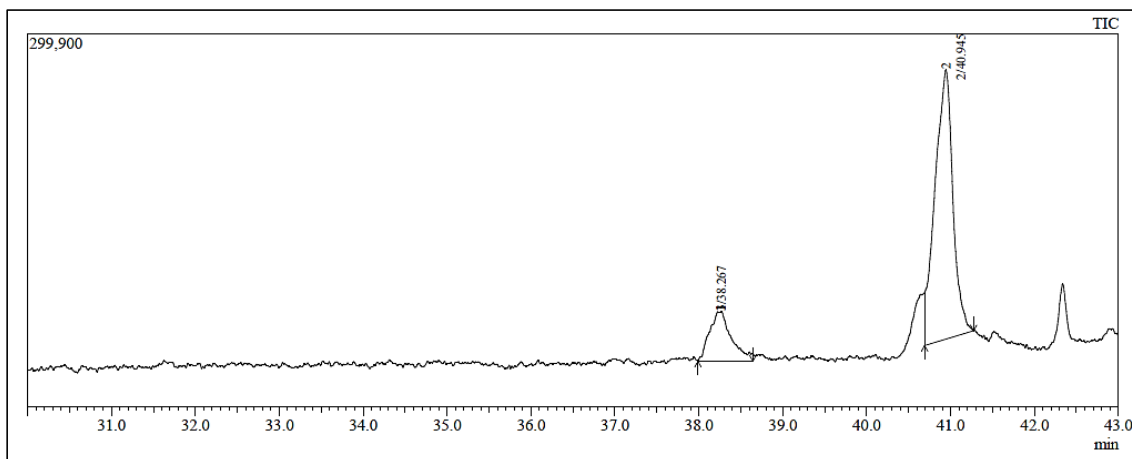


Figura 26 – Espectro de massas de *Rp*-2 (TR 38,265 min)

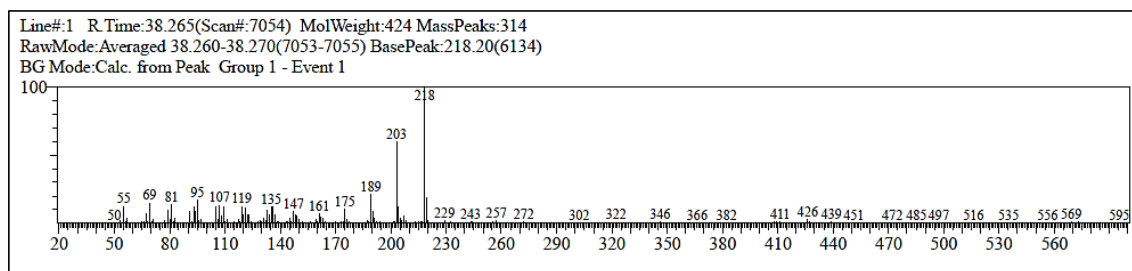


Figura 27 – Espectro de massas da amirina (biblioteca NIST08.LIB)

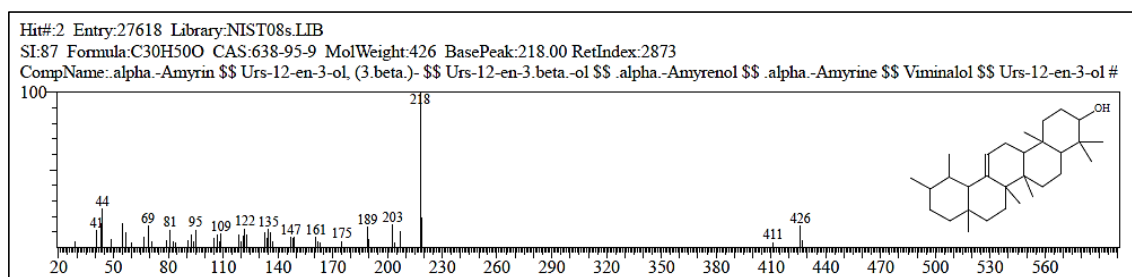


Figura 28 – Espectro de massas de *Rp*-2 (TR 40,945 min)

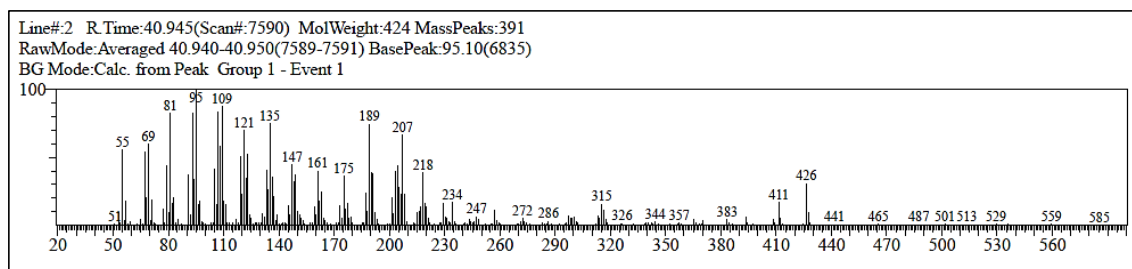
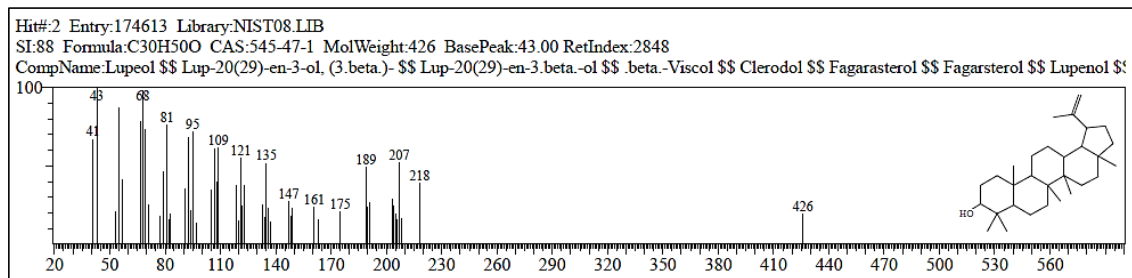


Figura 29 – Espectro de massas do lupeol (biblioteca NIST08.LIB)

5.1.3 Determinação estrutural de *Rp*-3

A substância codificada como *Rp*-3 foi isolada da fase hexânica na forma de cristais em agulha brancos com 38,2 mg e ponto de fusão 137-139°C.

O espectro de IV de *Rp*-3 obtido em pastilhas de KBr (cm^{-1}) (Fig. 30, p. 65) apresentou intensa banda de absorção em 3440 cm^{-1} característica de estiramento de ligação O–H, uma banda intensa em $2929\text{--}2854\text{ cm}^{-1}$ correspondentes a estiramentos C–H e banda de absorção em 1640 cm^{-1} característica de estiramentos C=C (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007; PAVIA et al., 2010).

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 31, p. 65) e em suas expansões (Fig 32-33, p. 66) foi observado um conjunto de sinais entre δ_{H} 0,66 e δ_{H} 2,2 característicos de hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos, sugerindo a presença de uma estrutura triterpênica ou esteriodal para esta substância. A presença de um multiplete em δ_{H} 3,49 sugeriu a presença de um hidrogênio oximetínico atribuído ao hidrogênio do carbono 3 (H-3) do núcleo esteroidal. Foi observado ainda, também relacionado a este tipo núcleo, um dubleto em δ_{H} 5,32 ($J=5,0\text{ Hz}$) característico do hidrogênio olefínico da posição 6 (H-6) (KOJIMA et al., 1990).

Corroborando com os dados de RMN de ^1H , no espectro de RMN de ^{13}C – APT (125 MHz, CDCl_3) (Fig. 34, p. 67) e em suas expansões (Fig. 35-36, p. 67 e 68) foi possível observar um sinal em δ_{C} 71,8 atribuído ao carbono oximetínico (C-3). Além de sinais em δ_{C} 121,7 e δ_{C} 140,8, característicos de carbono sp^2 metínico e carbono não hydrogenado, respectivamente, atribuídos aos carbonos da dupla ligação C-5 e C-6, e em δ_{C} 34,0 e δ_{C} 26,2, característicos de carbonos metilênicos, atribuídos aos carbonos C-22 e C23.

A partir dos dados espectrais e comparações com a literatura foi possível sugerir que *Rp*-3 tratava-se do β -sitosterol (Tab. 5, p. 64). Substância isolada pela primeira vez no gênero *Roupala*.

O β -sitosterol tem sido reportado na literatura por apresentar atividade anti-inflamatória, analgésica, antipirética e ação moduladora de enzimas antioxidantes (GUPTA et al., 1980; VIVANCOS; MORENO, 2005). Além de atividades antiúlcero-gênica, gastroprotetora e anticancerígena (LING; JONES, 1995; NAVARRETE; TREJO-MIRANDA; REYES-TREJO, 2002; AWAD; BURR; FINK, 2005;

MCANUFF et al., 2005). E ainda atividade antiofídica, quando associada ao estigmasterol (GOMES et al., 2007).

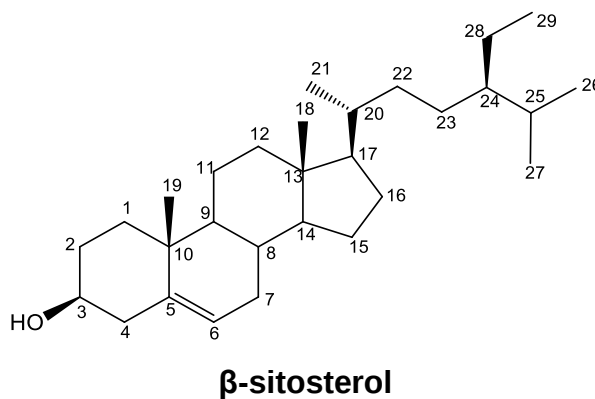


Tabela 5 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de *Rp-3* (500 e 125 MHz, respectivamente) com dados da literatura (KOJIMA et.al., 1990) - em CDCl_3

C	<i>Rp-3</i>		β-sitosterol	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	37,2	-	37,2	
2	31,7	-	31,6	
3	71,8	3,49 (m, 1H)	71,8	3,52 (m)
4	42,3	-	42,3	
5	140,8	-	140,7	
6	121,7	5,32 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H)	121,7	5,35 (m)
7	31,9	-	31,9	
8	31,9	-	31,9	
9	50,1	-	50,1	
10	36,5	-	36,5	
11	21,1	-	21,1	
12	39,8	-	39,8	
13	42,3	-	42,3	
14	56,8	-	56,8	
15	24,3	-	24,3	
16	28,2	-	28,2	
17	56,1	-	56,0	
18	11,8	0,66 (s, 3H)	11,9	0,68 (s)
19	19,4	0,98 (s, 3H)	19,4	1,01 (s)
20	36,1	-	31,6	
21	18,8	-	18,8	0,92 (d)
22	34,0	-	33,9	
23	26,2	-	26,0	
24	45,8	-	45,8	
25	29,2	-	29,1	
26	19,8	0,89 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H)	19,8	0,83 (d, $J=6,5$ Hz)
27	19,0	0,79 (d, $J = 5,6$ Hz, 3H)	19,0	0,81 (d, $J=6,5$ Hz)
28	23,1	-	23,0	
29	12,0	-	12,0	0,84 (t, $J=7,5$ Hz)

Figura 30 – Espectro de IV de *Rp*-3 (KBr, cm^{-1})

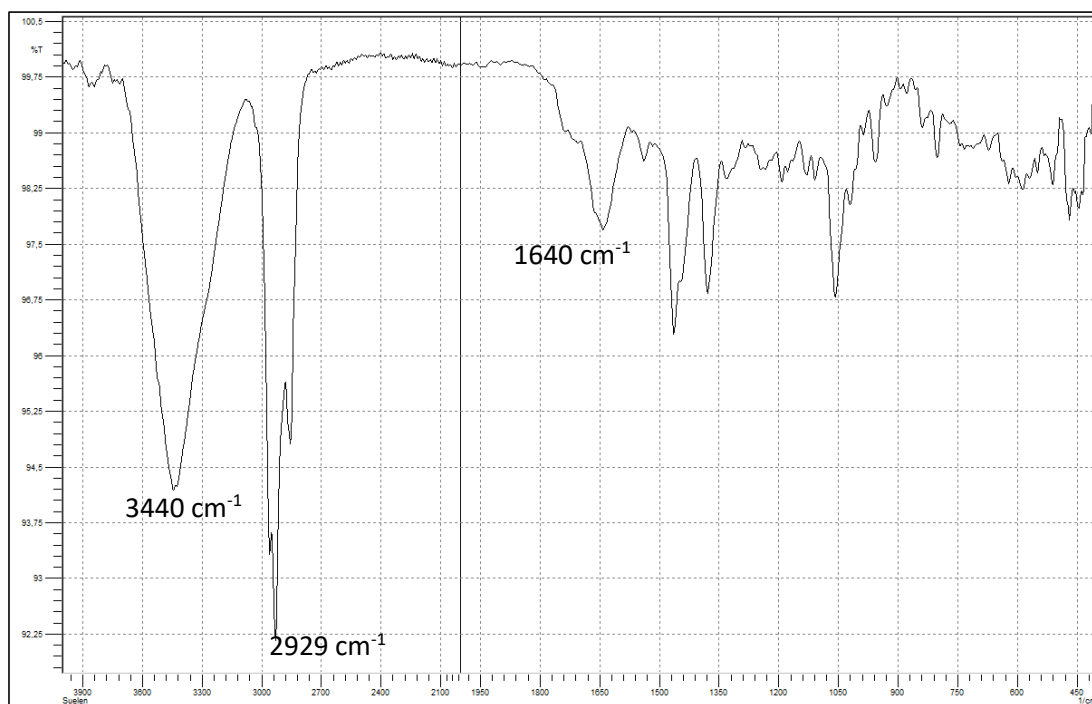


Figura 31– Espectro de RMN de ^1H de *Rp*-3 (500 MHz, CDCl_3)

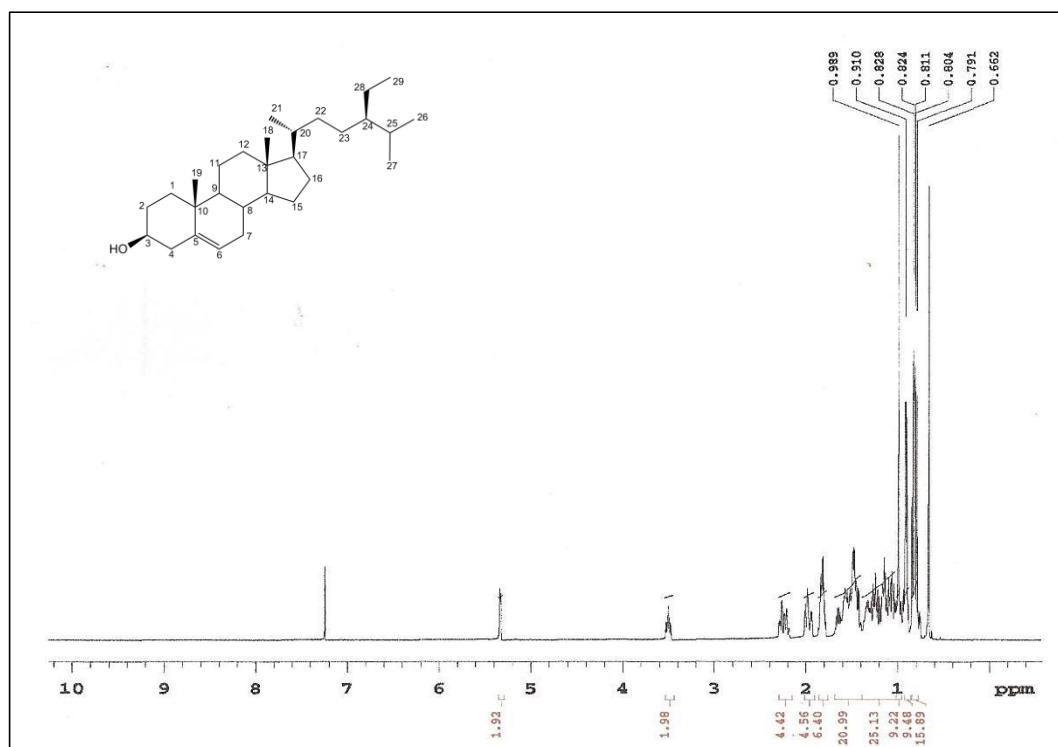


Figura 32 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Rp*-3 na região de 5,7-2,0 ppm (500 MHz, CDCl_3)

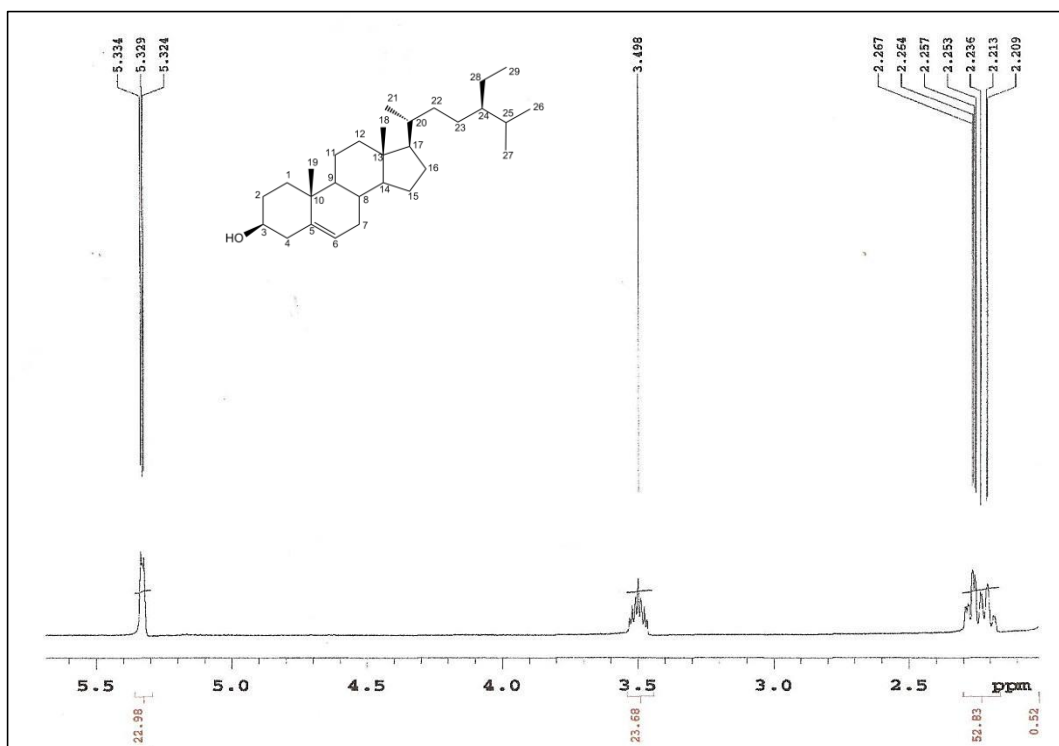


Figura 33 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Rp*-3 na região de 1,05-0,6 ppm (500 MHz, CDCl_3)

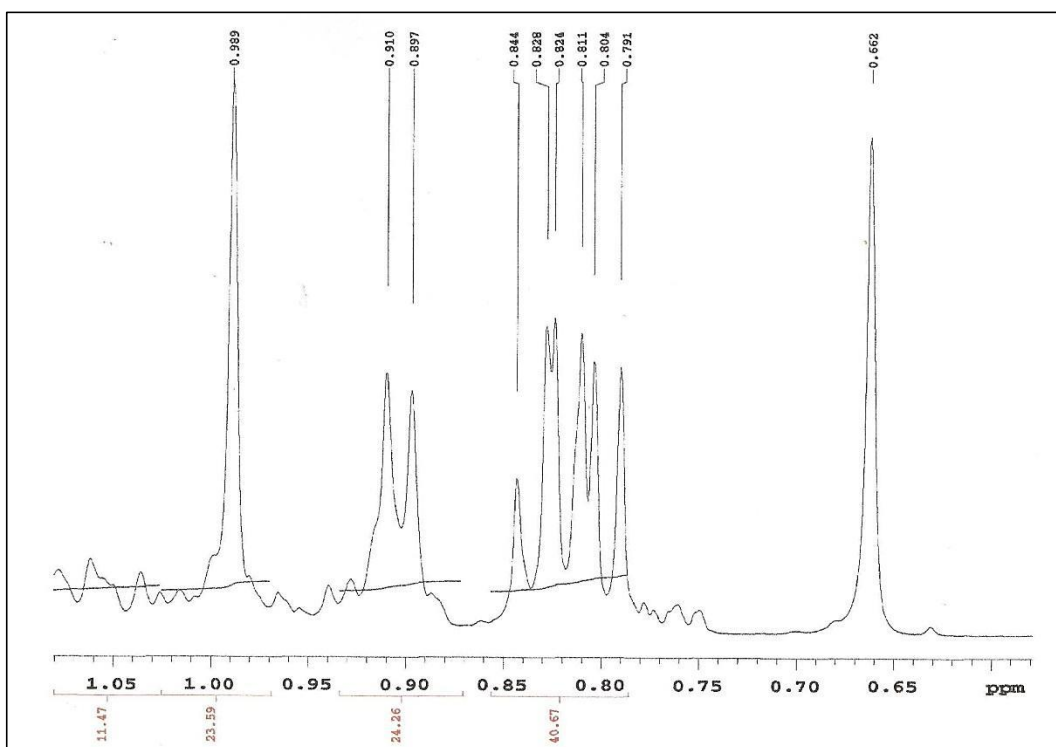


Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-3 (125 MHz, CDCl_3)

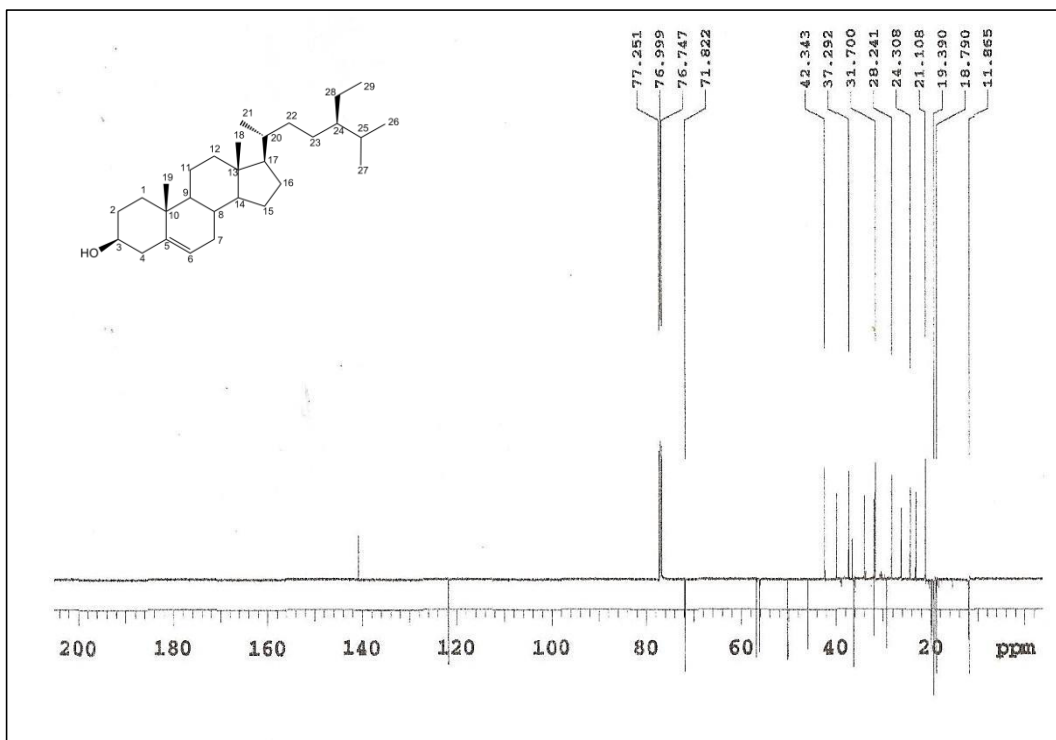


Figura 35 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-3 na região de 144-44 ppm (125 MHz, CDCl_3)

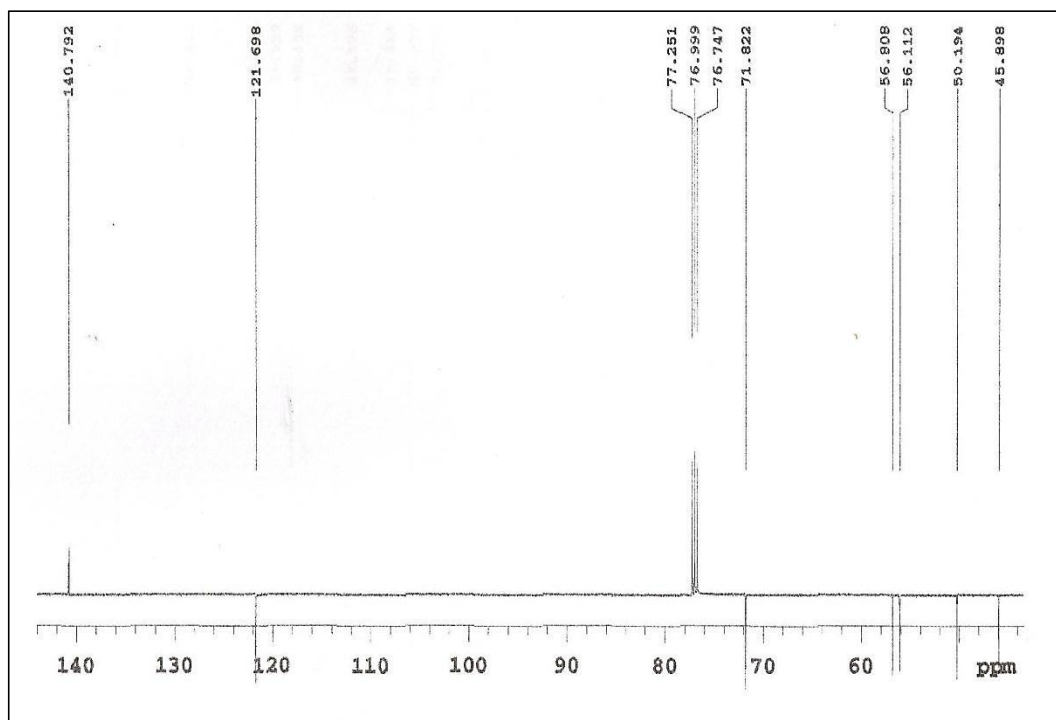
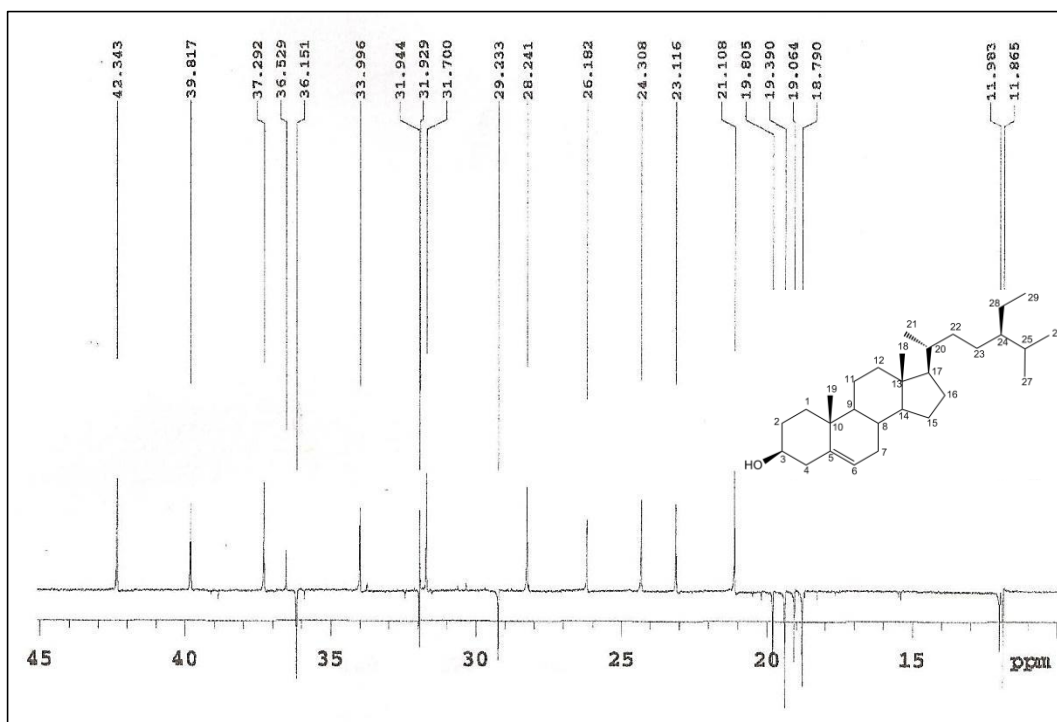


Figura 36 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-3 na região de 45-15 ppm (125 MHz, CDCl_3)



5.1.4 Determinação estrutural de *Rp-4*

A substância *Rp-4* foi obtida como um sólido amorfo verde oliva com 62,1 mg.

O espectro de IV obtido em pastilhas de KBr (Fig. 37, p.75) mostrou banda de absorção em 3.400 cm^{-1} característico de deformação axial de ligação N–H ou O–H, o que sugeriu a presença de aminas e/ou hidroxilas. Banda de absorções em aproximadamente 1740 cm^{-1} (C=O) juntamente com banda em aproximadamente em 1400 cm^{-1} (C–O), foram associadas à presença de carbonila de éster e de cetona. Além de duas bandas de absorção em aproximadamente 2900 cm^{-1} características de estiramento CH, CH₂ e CH₃, sugerindo a presença de cadeias alifáticas (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007; PAVIA et al., 2010).

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl₃) (Fig. 38, p. 75) e suas expansões (Fig. 39-41, p. 76 e 77) apresentaram sinais duplicados que permitiram sugerir que *Rp-4* deveria tratar-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico. Sendo assim, as substâncias foram codificadas como *Rp-4a* e *Rp-4b*.

Para determinação deste esqueleto foram observados sinais característicos com deslocamento acima de δ_{H} 8,5 atribuídos aos hidrogênios olefínicos dos carbonos 5, 10 e 20: seis singletos, todos integrando para um hidrogênio cada, em δ_{H} 9,45 para H-5 de *Rp-4a* e δ_{H} 9,42 para H-5 de *Rp-4b*, em δ_{H} 9,57 para H-10 de *Rp-4a* e δ_{H} 9,59 para H-10 de *Rp-4b*, e em δ_{H} 8,59 para H-20 de *Rp-4a* e δ_{H} 8,62 para H-20 de *Rp-4b*.

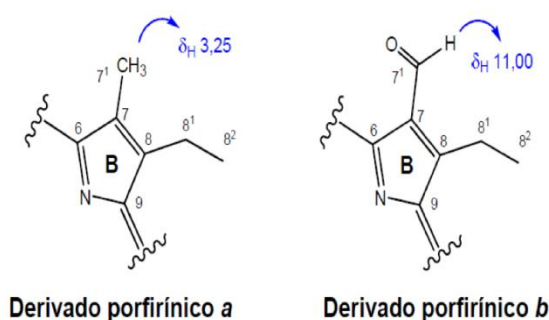
Também foram observados singletos atribuídos à três metilas olefínicas de cada composto, em δ_{H} 3,70 e 3,720 para H-12¹ de *Rp-4a* e *Rp-4b* e em δ_{H} 3,24 e 3,23 para H-7¹ de *Rp-4b* e *Rp-4a*, todos respectivamente e dois sobrepostos em δ_{H} 3,40 (H-2¹ de *Rp-4a* e *Rp-4b*). Além de dois duplo-dubletos sobrepostos para um hidrogênio cada em δ_{H} 8,00 ($J = 11,2$ e $18,0\text{ Hz}$) e 7,99 ($J = 11,2$ e $18,0\text{ Hz}$) e dois dubletos, para dois hidrogênios cada, em δ_{H} 6,28 ($J = 18,0\text{ Hz}$) e 6,17 ($J = 11,2\text{ Hz}$), condizentes aos hidrogênios vinílicos dos grupos vinila terminais inseridos na posição 3 de ambos os derivados (H-3¹, H-3²_(trans) e H-3²_(cis), respectivamente).

Todos estes sinais foram sugestivos da presença do núcleo porfirínico nestas substâncias, (SCHWIKKARD; MUKHOLLAND; HUTCHINGS, 1998; DUAN et al., 2002; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007, TOMAZ et al., 2008).

No espectro de RMN de ^{13}C -APT (50 MHz, CDCl_3) (Fig. 42, p. 77) e nas expansões (Fig. 43-45, p. 78 e 79), foram observados sinais intensos e outros duplicados confirmando as suposições obtidas nos espectros de RMN de ^1H de que o composto codificado como *Rp*-4 tratava-se de uma mistura de duas substâncias, ambas apresentando o mesmo esqueleto carbônico.

Entre esses sinais apresentados destacaram-se δ_{C} 97,7 de C-5, 103,9 de C-10 e 93,34 e 93,55 de C-20 de *Rp*-4a e *Rp*-4b, respectivamente. Observou-se também a presença de sinais intensos para os dois carbonos vinílicos C-3¹ e C-3² em δ_{C} 128,8 e 122,65, bem como, outros sinais para três metilas em δ_{C} 12,24, 12,03 e 10,97 de C-12¹, C-2¹ e C-7¹ de ambos compostos, confirmando se tratar de uma substância constituída pelo núcleo porfirínico.

Como os derivados porfirínicos podem ser do tipo a ou b, para realização desta classificação foram observados os deslocamentos químicos em δ_{H} 3,24 e 3,23 (ambos s, 3H) permitindo ainda classificar os dois derivados porfirínicos da mistura (*Rp*-4a e *Rp*-4b) como do tipo a, uma vez que correspondem aos hidrogênios do grupo metila na posição 7¹. Corroborado pela ausência de sinais em, aproximadamente, δ_{H} 11,00 referente ao hidrogênio do grupo aldeído em C-7¹ dos derivados porfirínicos do tipo b, e fortaleceu tal classificação (BUCHANAN; HASHIMOTO; ASAKAWA, 1996; SCHWIKKARD; MUKHOLLAND; HUTCHINGS, 1998).

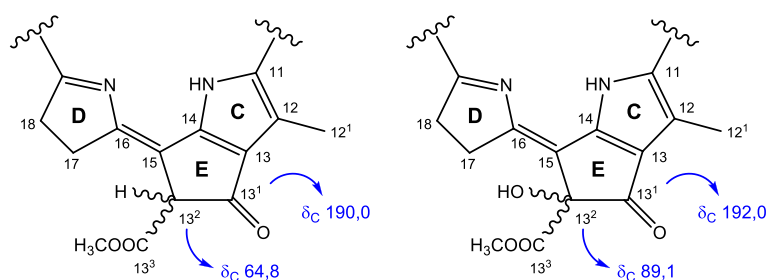


Um envelope de sinais em δ_{H} 0,73 – 1,93, (Fig.), provenientes dos hidrogênios CH, CH₂ e CH₃ de cadeias alifáticas sugeriu a presença de um grupo fitil ($-\text{C}_{20}\text{H}_{39}$) geralmente encontrado em moléculas de natureza porfirínica. Os dubletos em δ_{H} 4,53 ($J = 6,8$ Hz) e 4,45 ($J = 7,0$ Hz) e os tripletos sobrepostos em δ_{H} 5,18 ($J = 7,0$ Hz) e 5,15 ($J = 7,2$ Hz) reforçaram esta proposta uma vez que correspondem aos deslocamentos químicos dos hidrogênios H-P1 e H-P2 da cadeia fitílica de *Rp*-4b e *Rp*-4a, respectivamente. Estes dados foram importantes na classificação de ambas

como feofitinas, pois a ausência destes dados caracterizariam as substâncias como sendo feoforbídeos (apud SOUZA, 2009).

Foram observados no espectro de RMN de ^{13}C sinais que confirmaram a presença de cadeia fitílica nas duas substâncias, em δ_{C} 61,6 e 61,4 de C-P1 de *Rp*-4a e *Rp*-4b, respectivamente, δ_{C} 117,8 e 117,7 de C-P2 de *Rp*-4a e *Rp*-4b, respectivamente, e δ_{C} 142,9 e 142,8 (Fig. 7) de C-P3 de *Rp*-4b e *Rp*-4a, respectivamente (SCHWIKKARD; MUKHOLLAND; HUTCHINGS, 1998; HUANG et al., 2007; JERZ et al., 2007; TOMAZ et al., 2008)

Os derivados porfirínicos na maioria das vezes são encontrados na natureza apresentando o anel E do tipo ciclopentanona. Caracterizando este anel, encontra-se uma carbonila cetônica, localizada em C-13¹ com deslocamento químico em aproximadamente δ_{C} 190,0 – 192,0. O sinal para carbono C-13² pode variar conforme o tipo de substituinte que possui, hidroxila ou hidrogênio, sendo aproximadamente δ_{C} 89,1 quando se trata de um carbono quaternário hidroxilado ou δ_{C} 64,8 quando o mesmo é um carbono metínico não hidroxilado (KOBAYASHI et al., 1991; MATSUO et al., 1996).



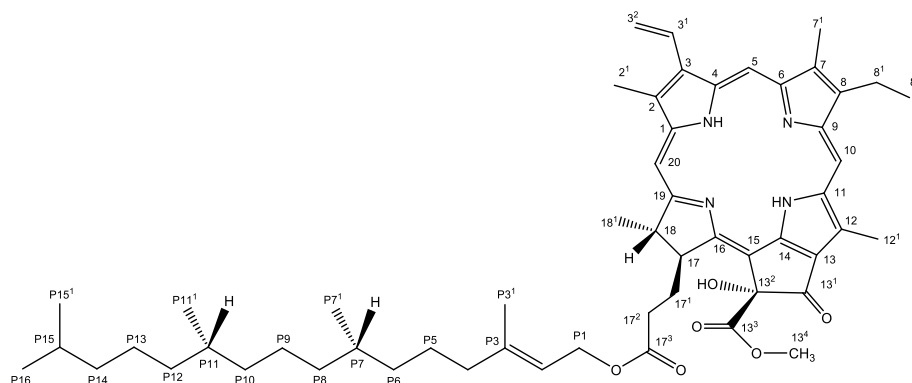
Anel E do tipo ciclopentanona

Um sinal intenso em δ_{C} 192,1 (C-13¹ de ambos compostos), bem como, sinais em δ_{C} 89,1 e 88,4 (C-13² de *Rp*-4b e *Rp*-4a, respectivamente) permitiram confirmar uma estrutura do tipo ciclopentanona com hidroxila em C-13² para o anel E dos dois derivados porfirínicos da mistura. Corroborado com deslocamentos químicos evidenciados nos espectros de RMN ^1H em δ_{H} 5,54 e 5,33 uma vez que correspondem aos hidrogênios das hidroxilas de *Rp*-4a e *Rp*-4b, respectivamente. Além disso, os sinais nos espectros de RMN ^1H em δ_{H} 3,61 e 3,59 (H-13⁴ de *Rp*-4b e *Rp*-4a, respectivamente) e nos espectros de RMN ^{13}C em δ_{C} 53,8 e 53,4, (C-13⁴ de *Rp*-4b e *Rp*-4a, respectivamente) possibilitaram afirmar sobre a presença de metoxilas para os dois compostos (SCHWIKKARD; MUKHOLLAND; HUTCHINGS, 1998).

Como todos os deslocamentos químicos desta mistura de feofitinas ora apresentavam-se intensos ora duplicados, a análise dos dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiram inferir sobre a possibilidade de *Rp-4* ser uma mistura de diastereoisômeros *R* e *S*, como já relatado por Nakati e colaboradores (1981) e Kobayashi e colaboradores (1991). A presença de dois dubletos largos em δ_{H} 4,66 ($J = 6,8 \text{ Hz}$) e 4,14 ($J = 7,0 \text{ Hz}$), característicos de H-17 para os isômeros *R* e *S*, respectivamente, confirmaram a existência destes dois compostos isoméricos.

Sendo assim, a partir dos dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , bem como comparações com os dados da literatura permitiram identificar *Rp-4* como uma mistura dos isômeros 13²-hidroxi-(13²-*R*)-feofitina *a* e 13²-hidroxi-(13²-*S*)-feofitina *a*. Substâncias relatadas pela primeira vez no gênero *Roupala*.

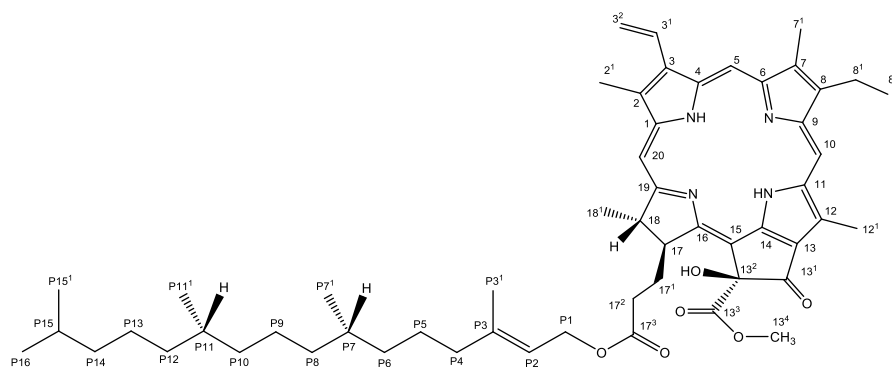
Estas substâncias apresentaram na literatura atividade antiviral contra o vírus da herpes simples tipo-1 (HSV-1) (SAKDARAT et al., 2009).



13²-hidroxi-(13²-R)-feofitina a

Tabela 6 – Comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C de *Rp*-4a (200 e 50 MHz, respectivamente) com dados da literatura (MATSUO, 1996) - em CDCl₃

C	<i>Rp</i> -4 ^a		13 ² -hidroxi-(13 ² -R)-feofitina a	
	δ _C	δ _H	δ _C	δ _H
1	142,0	-	142,9	-
2	131,74	-	131,9	-
2 ¹	12,03	3,40 (s, 3H)	12,1	3,42 (s, 3H)
3	126,11	-	136,5	-
3 ¹	128,8	7,99 (dd, J = 11,2 e 18,0 Hz, 1H)	129,1	8,01 (dd, J = 11,2 e 18,0 Hz, 1H)
3 ²	122,65	6,28 (dd, J = 18,0 Hz, 1H) 6,17 (dd, J = 11,2 Hz, 1H)	122,9	6,30 (dd, J = 18,0 Hz, 1H) 6,20 (dd, J = 11,2 Hz, 1H)
4	136,20	-	136,4	-
5	97,69	9,42 (s, 1H)	97,9	9,46 (s, 1H)
6	155,28	-	155,6	-
7	135,99	-	136,3	3,25 (s, 3H)
7 ¹	10,97	3,24 (s, 3H)	11,3	-
8	144,87	-	145,3	-
8 ¹	22,60	3,66 (m, 2H)	19,5	3,72 (q, 2H)
8 ²	16,25	1,68 (t, J = 7,8 Hz, 3H)	17,5	1,70 (t, J = 7,8 Hz, 3H)
9	150,7	-	151,0	-
10	103,98	9,57 (s, 1H)	104,2	9,61 (s, 1H)
11	137,57	-	137,8	-
12	129,39	-	129,3	-
12 ¹	12,24	3,70 (s, 3H)	12,2	3,72 (s, 3H)
13	53,80	-	126,3	-
13 ¹	192,04	-	192,0	-
13 ²	89,1	5,34 (s, 1H)	89,1	5,35 (s, 1H)
13 ³	173,46	-	173,0	-
13 ⁴	53,8	3,61 (s, 3H)	53,8	3,64 (s, 3H)
14	149,75	-	150,2	-
15	107,5	-	107,6	-
16	161,81	-	161,9	-
17	51,7	4,66 (dl, J = 6,8 Hz, 1H)	50,8	4,48 (ddd, J = 7,0 Hz, 1H)
17 ¹	31,61	-	31,2	-
17 ²	31,16	-	31,9	-
17 ³	173,02	-	173,5	-
18	50,12	4,47 (m, 1H)	50,2	4,69 (dq, 1H)
18 ¹	22,70	1,57 (d, J = 7,4 Hz, 3H)	22,7	1,68 (d, J = 7,4 Hz, 3H)
19	172,70	-	172,8	-
20	93,34	8,59 (s, 1H)	93,4	8,63 (s, 1H)



13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina a

Tabela 7 – Comparação dos dados de RMN de ¹H e ¹³C de *Rp*-4b (200 e 50 MHz, respectivamente) com dados da literatura (MATSUO, 1996) - em CDCl₃

C	<i>Rp</i> -4b		13 ² -hidroxi-(13 ² -S)-feofitina a	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1	141,91	-	142,8	-
2	131,57	-	131,8	-
2 ¹	12,03	3,40 (s, 3H)	12,1	3,43 (s, 3H)
3	126,83	-	136,6	-
3 ¹	128,8	8,00 (dd, <i>J</i> = 11,2 e 18,0 Hz, 1H)	129,1	8,01 (dd, <i>J</i> = 11,2 e 18,0 Hz, 1H)
3 ²	122,65	6,28 (dd, <i>J</i> = 18,0 Hz, 1H) 6,17 (dd, <i>J</i> = 11,2 Hz, 1H)	122,9	6,30 (dd, <i>J</i> = 18,0 Hz, 1H) 6,20 (dd, <i>J</i> = 11,2 Hz, 1H)
4	136,20	-	136,3	-
5	97,69	9,45 (s, 1H)	98,0	9,47 (s, 1H)
6	155,07	-	155,4	-
7	135,99	-	136,2	3,25 (s, 3H)
7 ¹	10,97	3,23 (s, 3H)	11,3	-
8	144,87	-	145,8	-
8 ¹	22,60	3,66 (m, 2H)	19,5	3,70 (q, 2H)
8 ²	16,32	1,68 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 3H)	17,4	1,70 (t, <i>J</i> = 7,8 Hz, 3H)
9	150,79	-	151,1	-
10	103,98	9,59 (s, 1H)	104,3	9,62 (s, 1H)
11	137,66	-	137,8	-
12	129,9	-	129,4	-
12 ¹	12,24	3,72 (s, 3H)	12,3	3,74 (s, 3H)
13	53,40	-	127,0	-
13 ¹	192,04	-	192,0	-
13 ²	88,9	5,55 (s, 1H)	89,0	5,53 (s, 1H)
13 ³	173,63	-	172,8	-
13 ⁴	53,40	3,59 (s, 3H)	53,4	3,62 (s, 3H)
14	150,14	-	149,8	-
15	107,63	-	107,7	-
16	161,38	-	162,5	-
17	51,7	4,14 (dl, <i>J</i> = 6,8 Hz, 1H)	51,8	4,17 (ddd, <i>J</i> = 6,8 Hz, 1H)
17 ¹	31,61	-	31,1	-
17 ²	31,16	-	31,6	-
17 ³	172,79	-	173,6	-
18	50,30	4,47 (m, 1H)	50,3	4,50 (dq, 1H)
18 ¹	22,70	1,57 (d, <i>J</i> = 7,4 Hz, 3H)	22,7	1,61 (d, <i>J</i> = 7,4 Hz, 3H)
19	172,33	-	172,4	-
20	93,55	8,62 (s, 1H)	93,6	8,65 (s, 1H)

Figura 37 – Espectro de IV de *Rp*-4a e *Rp*-4b (KBr, cm^{-1})

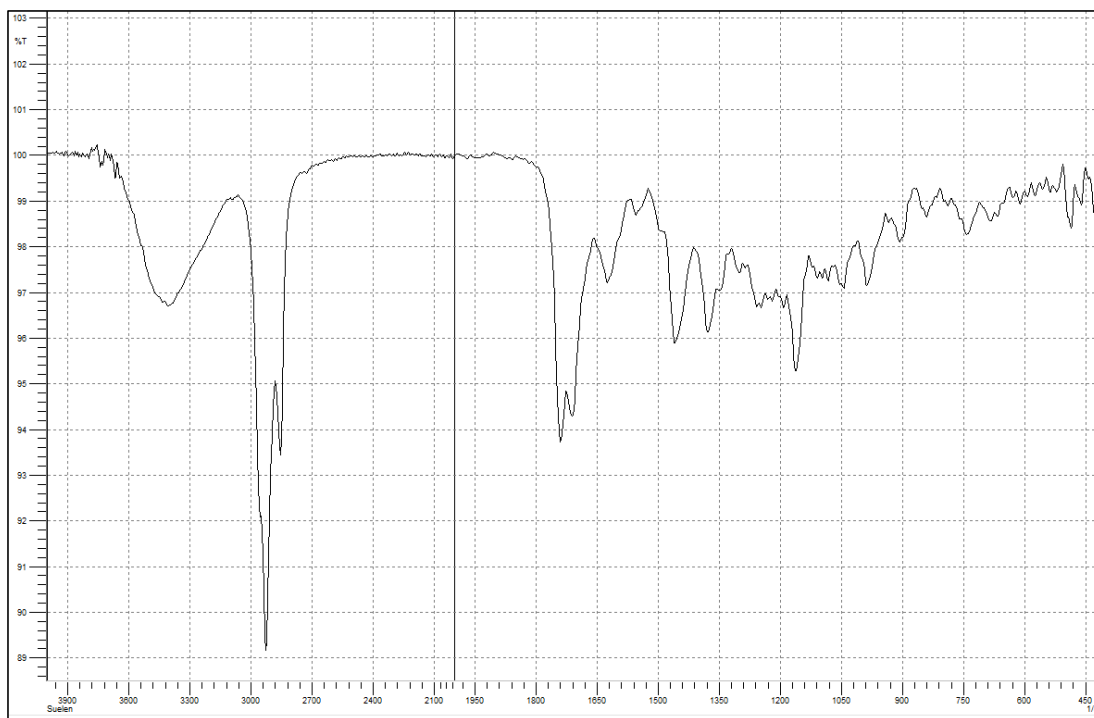


Figura 38 – Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b

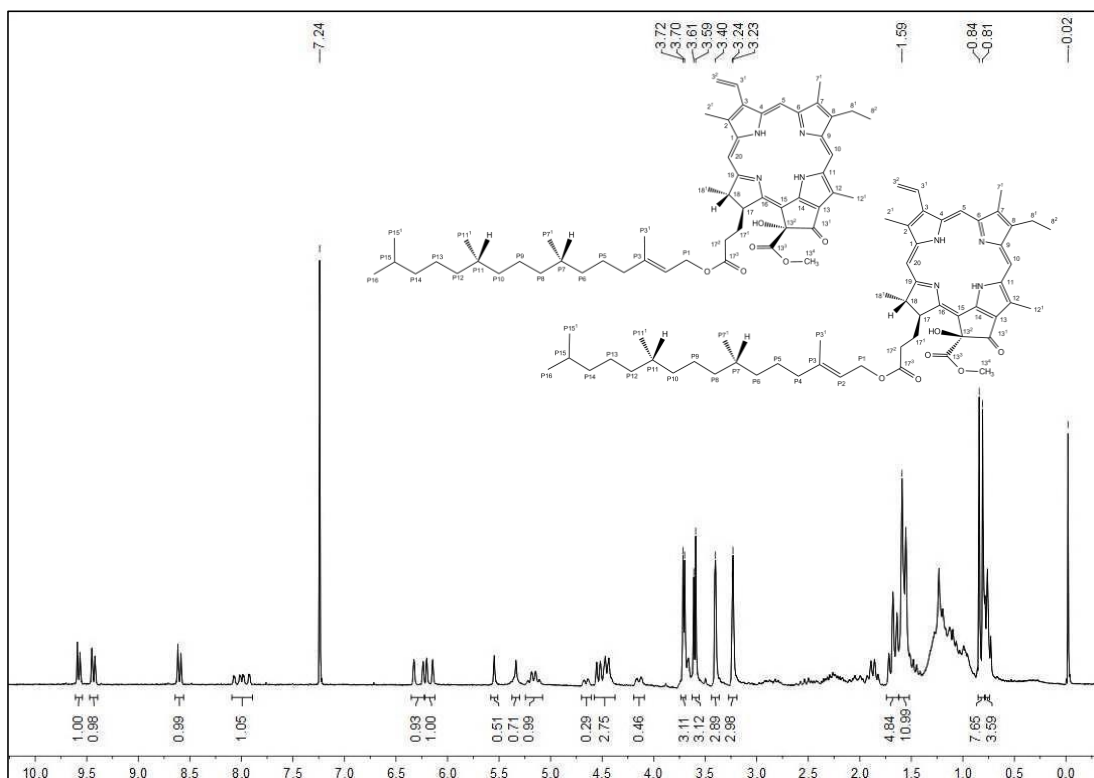


Figura 39 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b na região de 7,7-9,8 ppm

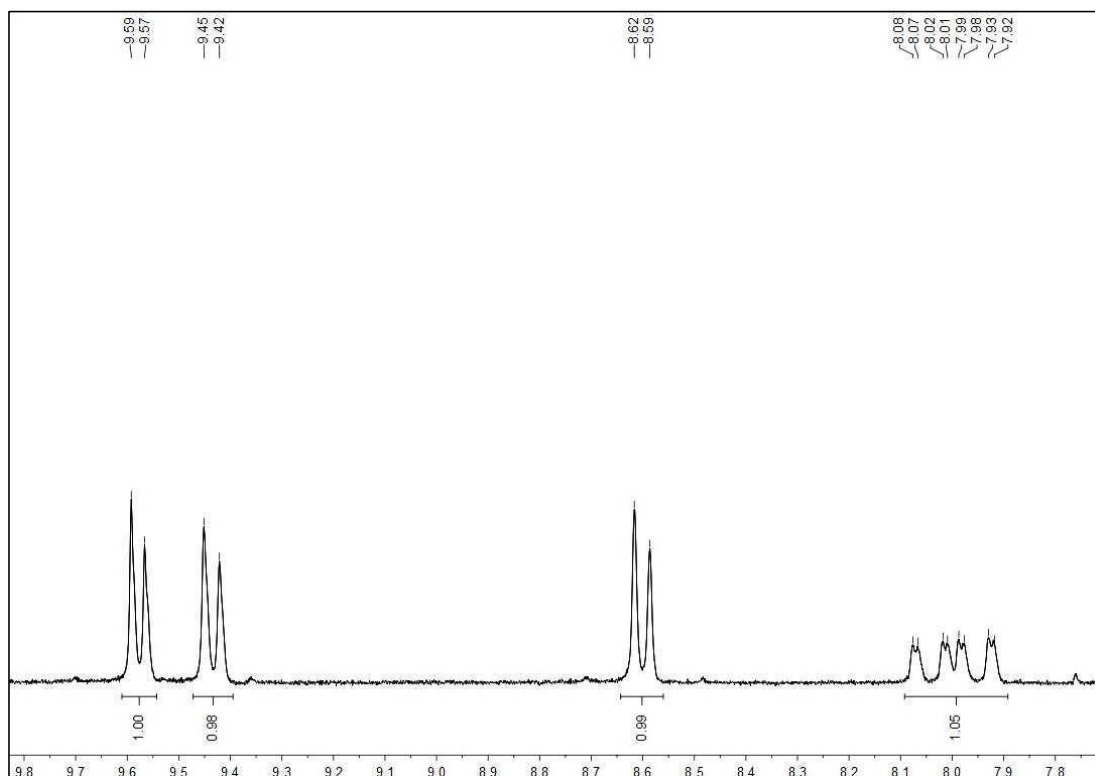


Figura 40 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b na região de 3,0-6,5 ppm

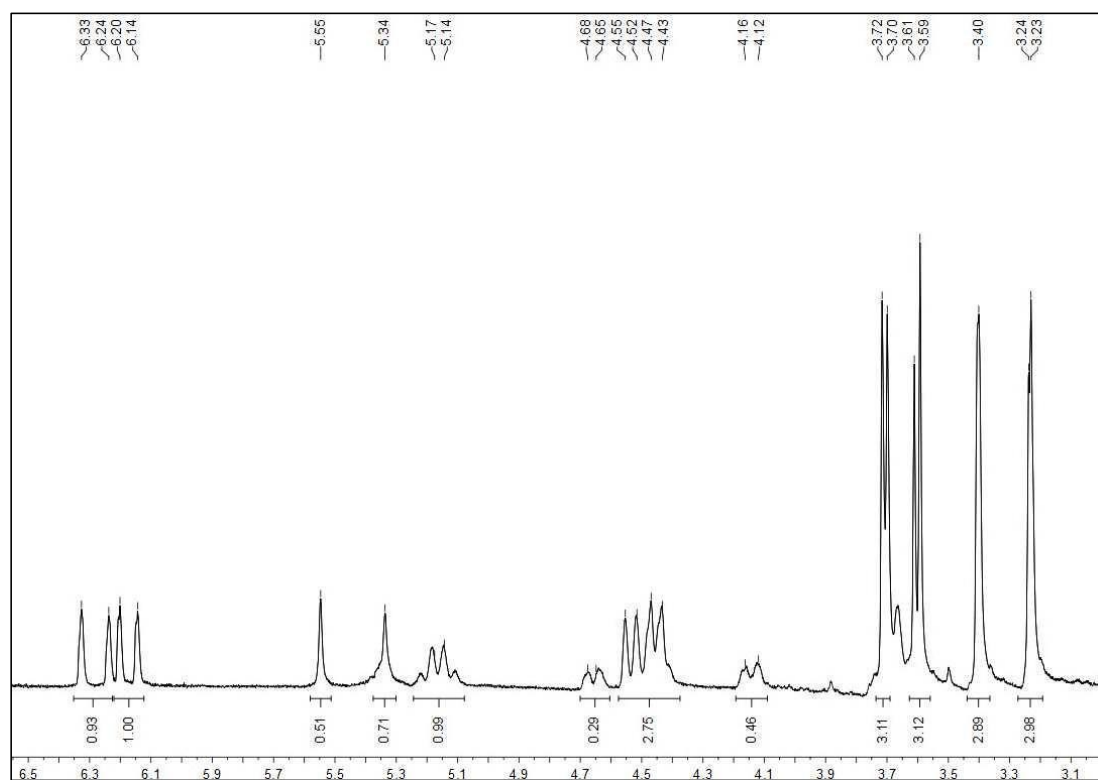


Figura 41 – Expansão do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b na região de 0,0-2,1 ppm

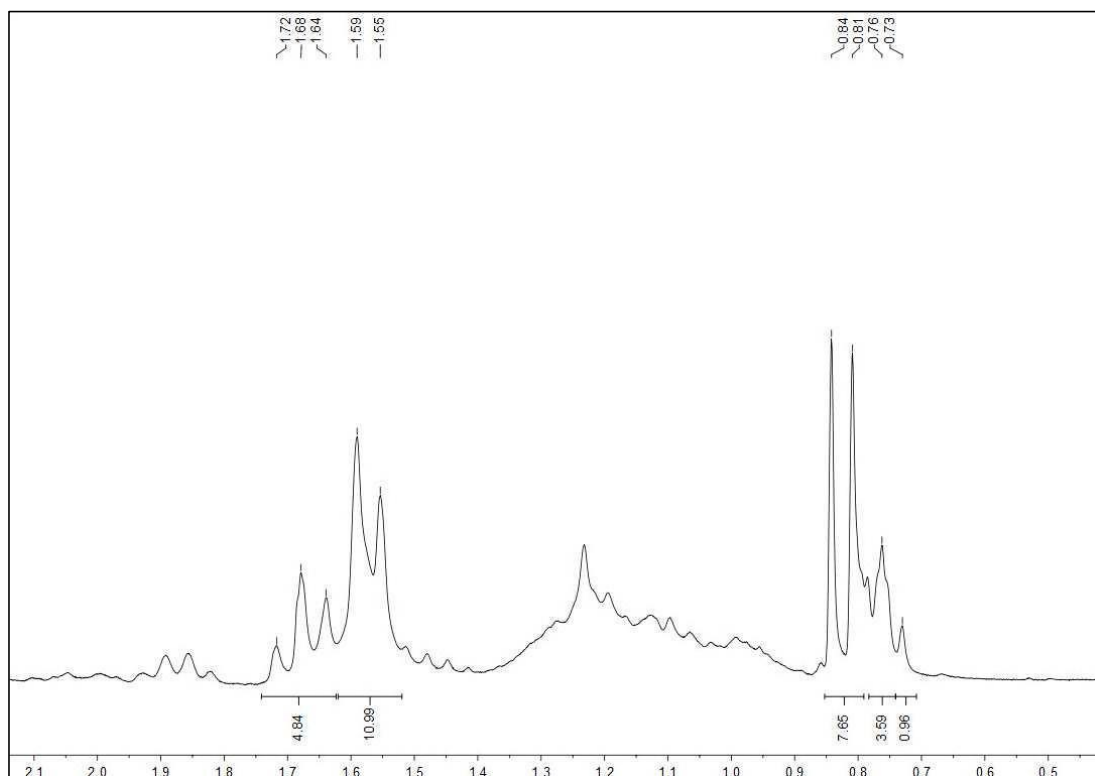


Figura 42 – Espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b

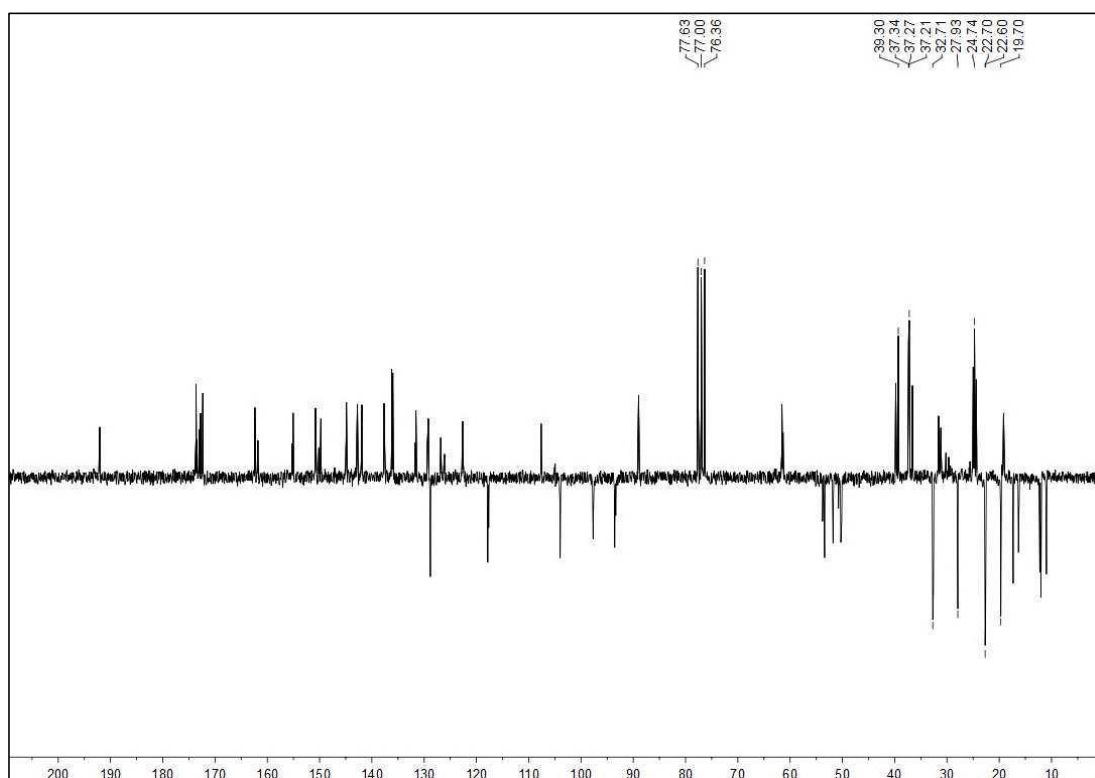


Figura 43 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b na região de 140,0-195,0 ppm

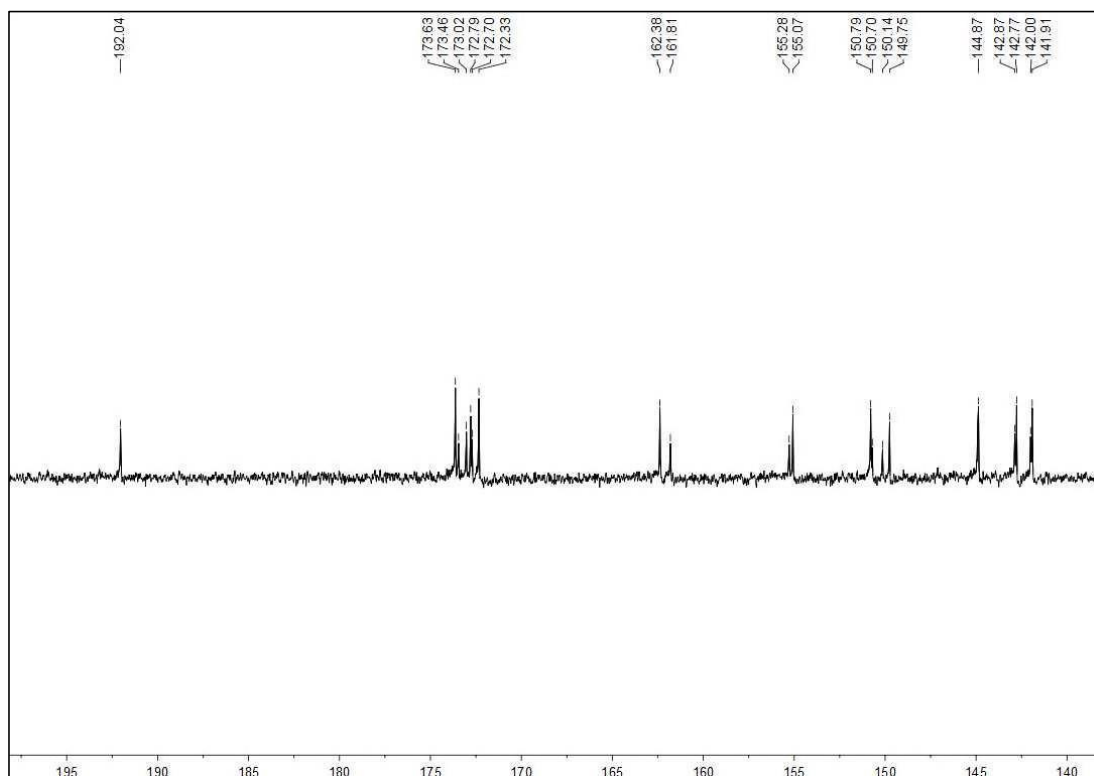


Figura 44 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b na região de 85,0-141,0 ppm

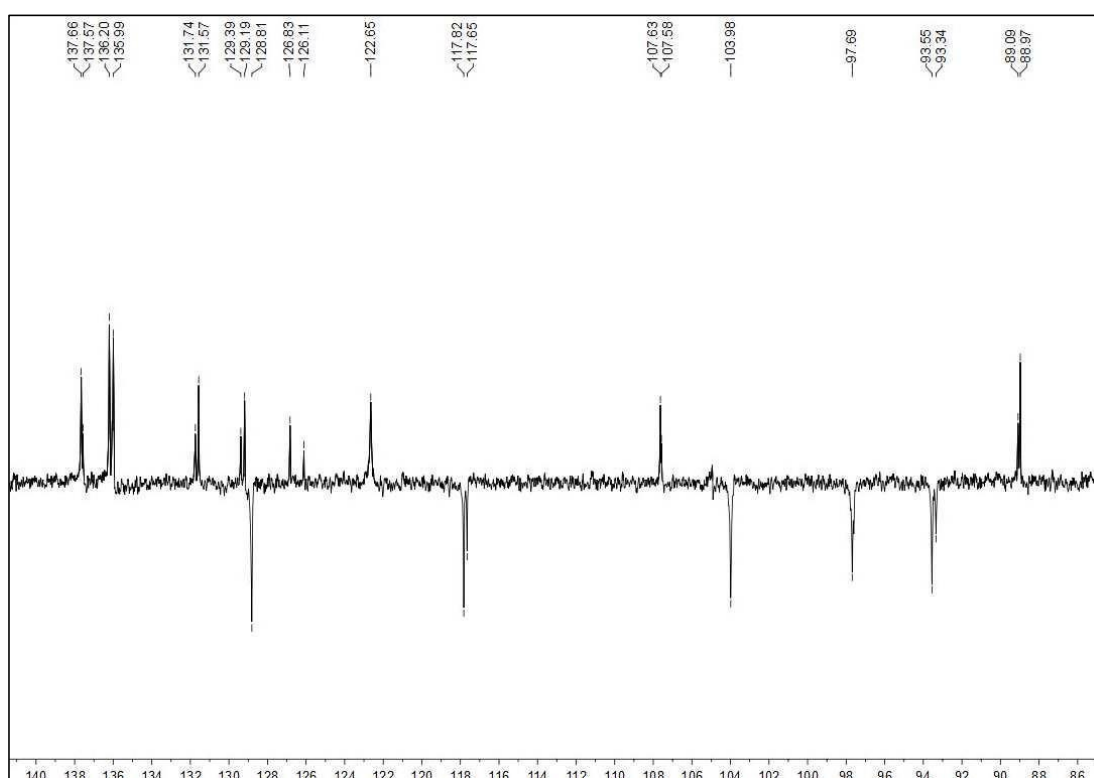
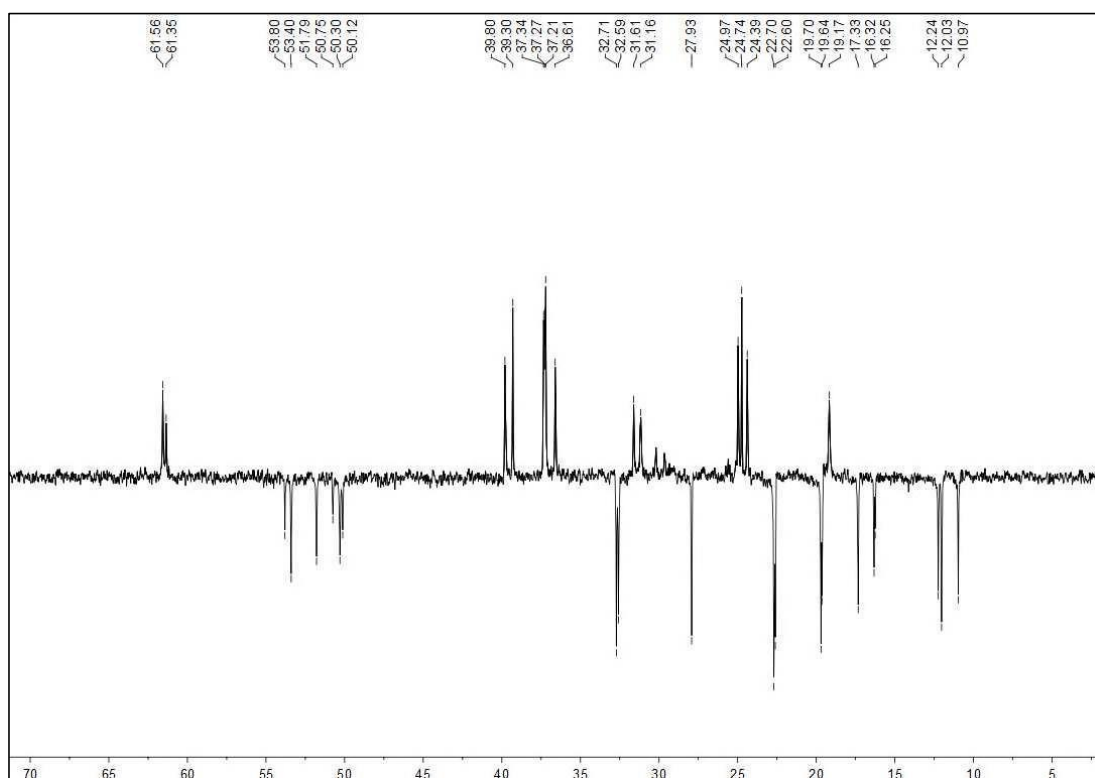


Figura 45 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C - APT (CDCl_3 , 50 MHz) das substâncias *Rp*-4a e *Rp*-4b na região de 0,0-70,0 ppm



5.1.5 Determinação estrutural de *Rp*-5

A substância codificada como *Rp*-5 foi isolada na forma de um sólido amorfo branco com 33,1 mg e ponto de fusão 292-294 °C.

O espectro de IV obtido em pastilhas de Kbr (Fig. 46, p. 82) apresentou banda de absorção em 3440 cm⁻¹ característica de estiramento de ligação O–H, uma banda intensa em 2929–2854 cm⁻¹ correspondentes a estiramentos C–H (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007; PAVIA et al., 2010).

Assim como em *Rp*-3, no espectro de RMN de ¹H (500 MHz, C₅D₅N) (Fig. 47, p. 82) e em sua expansão (Fig 48, p. 83) foi observado um envelope de absorções entre δ_H 0,64 e δ_H 2,7 característico de núcleo triterpênico ou esteroidal. Um conjunto de absorções entre δ_H 4,0 e 4,5 típicos de hidrogênios oximetínicos, juntamente com um multipeto em δ_H 3,94, atribuído a hidrogênio carbinólico, sugeriu a presença de uma unidade osídica ligada ao C-3 (KASAI et al., 1987). Diferindo do mesmo hidrogênio (H-3) de *Rp*-3, que absorve em δ_H 3,49.

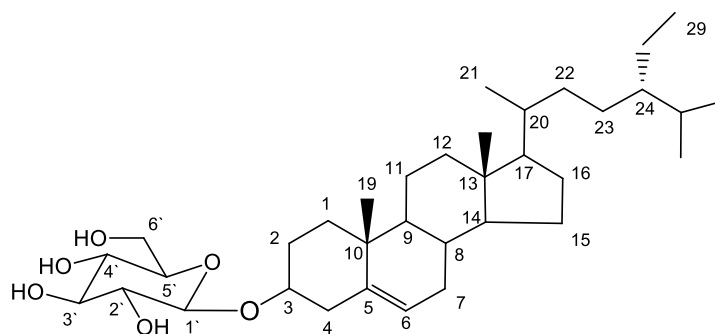
No espectro de RMN de ¹³C-APT (Fig. 49, p. 83) e em suas expansões (Fig. 50-52, p. 84 e 85) foram observados sinais que corroboraram com a proposta da presença da unidade osídica na substância, como um sinal em δ_C 102,5 atribuído ao carbono anomérico C-1' (AQUINO et al., 1988). Além de absorções na região entre δ_C 71,7 e 78,5 condizentes com carbonos carbinólicos.

Um sinal em δ_C 62,8 atribuído ao carbono metilênico oxigenado confirmou a presença da unidade osídica na estrutura, sendo esta especificamente a glicose.

Foram observados ainda sinais entre δ_C 11,9 e 19,9, característicos de carbonos metílicos de esteroides. Além de sinais em δ_C 140,9 e 123,7 atribuídos aos carbonos do núcleo esteriodal C-5 e C-6, respectivamente.

A partir destes dados espectrais e comparações com dados da literatura foi possível sugerir que *Rp*-5 trata-se do β -sitosterol-3-O- β -glicopiranosídeo, conhecido como do β -sitosterol glicosilado (Tab. 8, p. 81). Substância isolada pela primeira vez no gênero *Roupala*.

Estudos relataram que o β -sitosterol glicosilado apresenta atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imunomodulatória (MIZUSHINA et al., 2006).



Sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo

Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN de ^{13}C de *Rp-5* (125 MHz, respectivamente), com dados da literatura (KOJIMA et al.,1990) - em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

C	<i>Rp-5</i> δ_c	β -sitosterol glicosilado δ_c
1	37,45	37,6
2	30,21	30,3
3	78,39	78,3
4	30,31	39,4
5	140,89	141,0
6	121,86	122,0
7	32,14	32,2
8	32,03	32,1
9	50,33	50,4
10	36,89	37,0
11	21,13	21,4
12	39,92	40,0
13	42,45	42,6
14	56,23	57,0
15	24,47	24,6
16	28,50	28,7
17	56,81	56,3
18	11,94	12,0
19	19,19	19,3
20	36,35	36,5
21	18,98	19,1
22	34,19	34,3
23	26,40	26,4
24	46,03	46,1
25	29,46	29,5
26	19,93	19,5
27	19,38	20,1
28	23,37	23,4
29	11,85	12,2
1'	102,60	102,6
2'	75,40	75,4
3'	78,70	78,7
4'	71,70	71,7
5'	77,50	78,5
6'	62,90	62,9

Figura 46 – Espectro de IV de *Rp*-5 (KBr, cm^{-1})

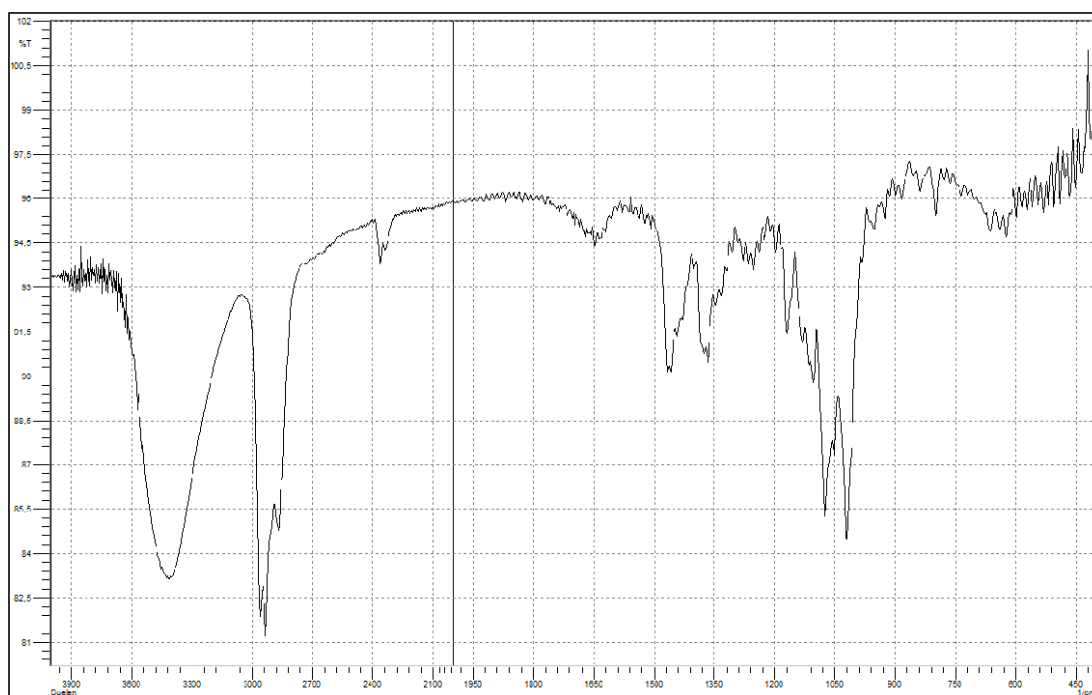


Figura 47 – Espectro de RMN de ^1H de *Rp*-5 (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

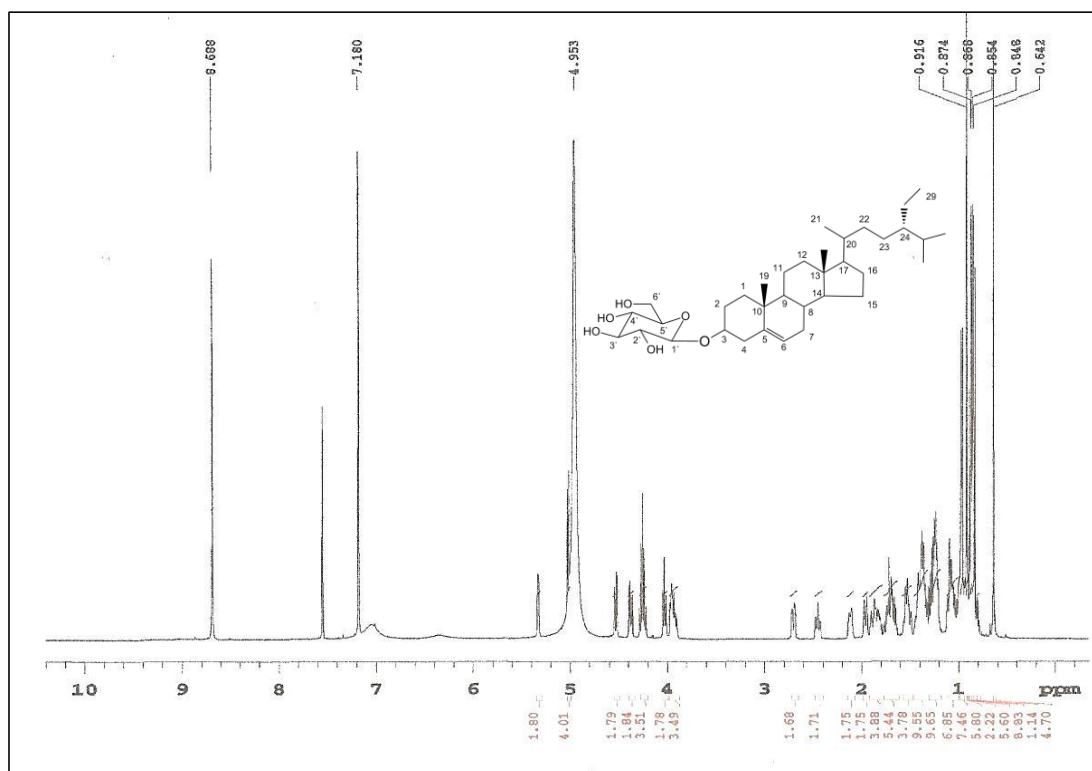


Figura 48 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Rp*-5 na região de 5,5-3,7 ppm (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

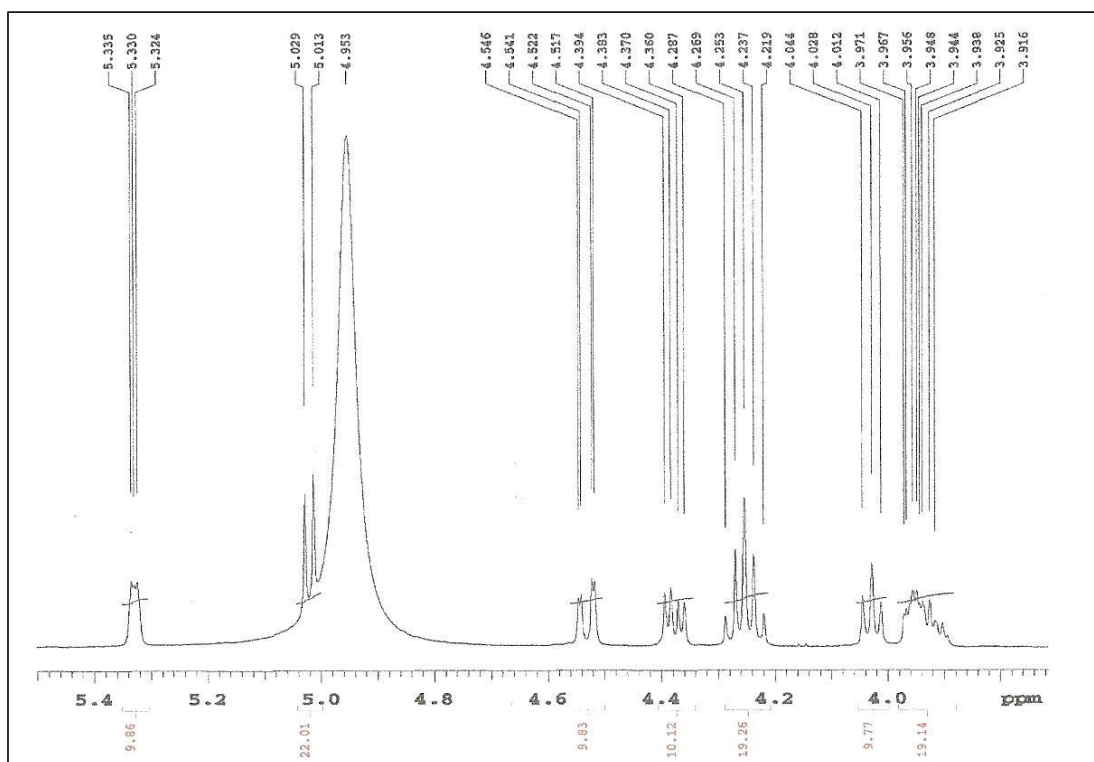


Figura 49 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-5 (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

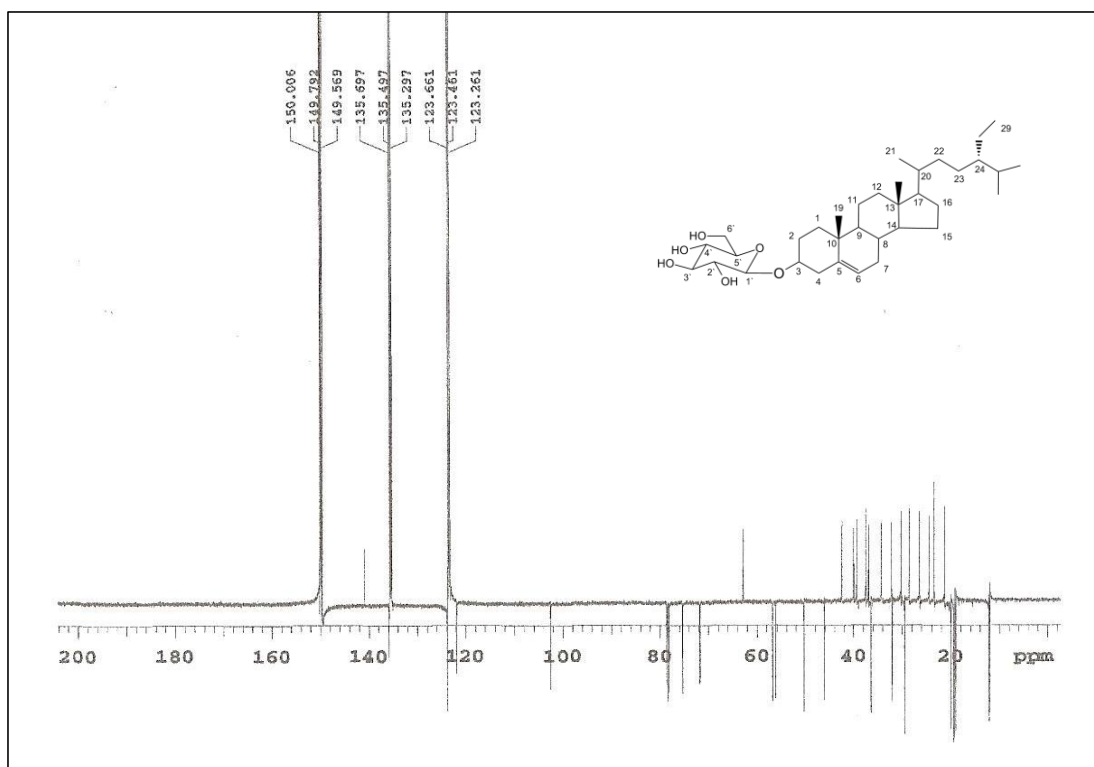


Figura 50 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-5 na região de 154-101 ppm (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

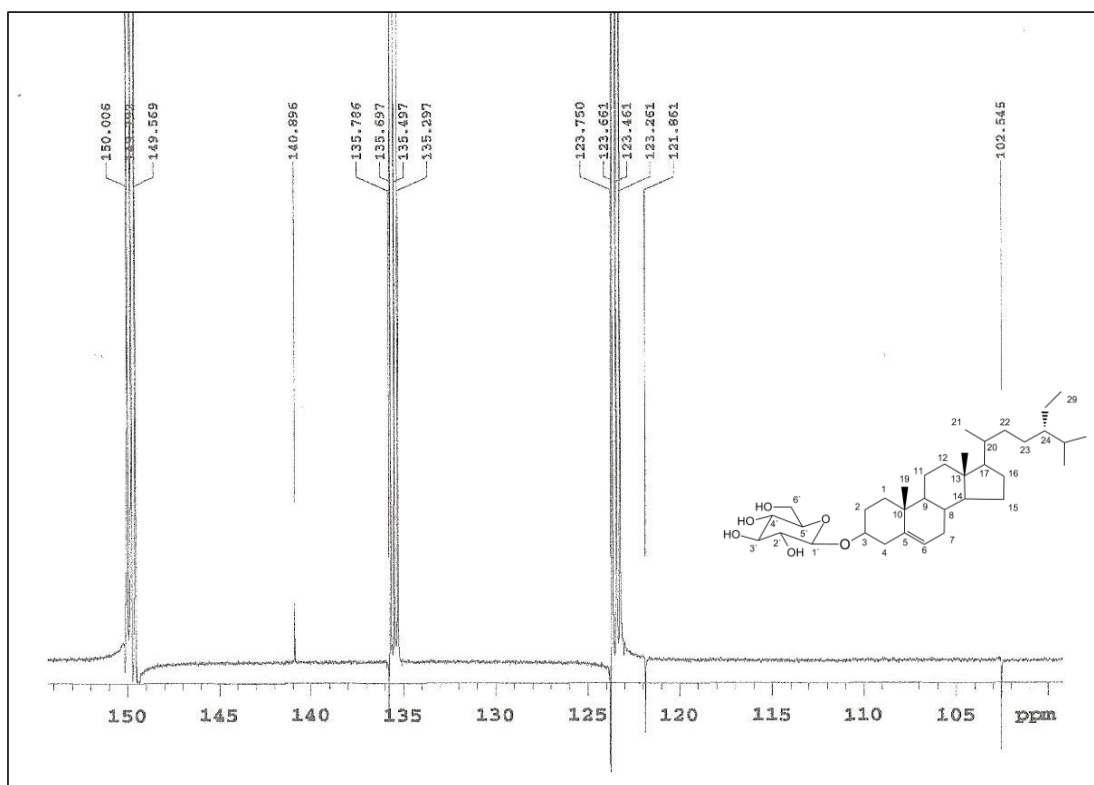


Figura 51 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-5 na região de 80-45 ppm (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

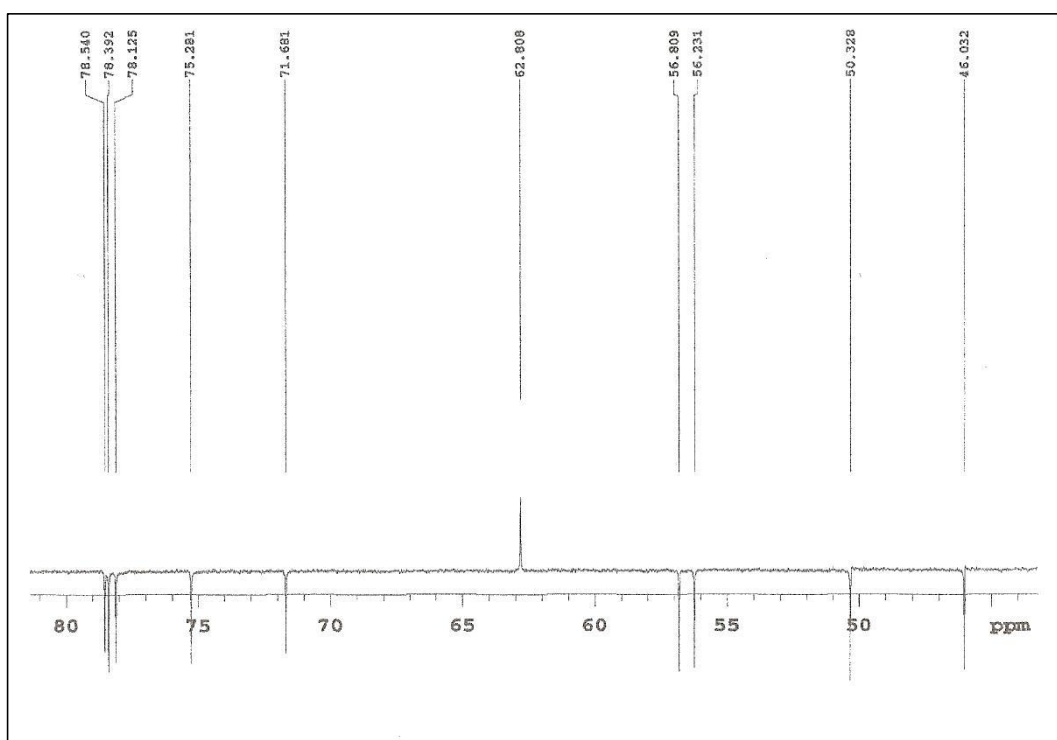
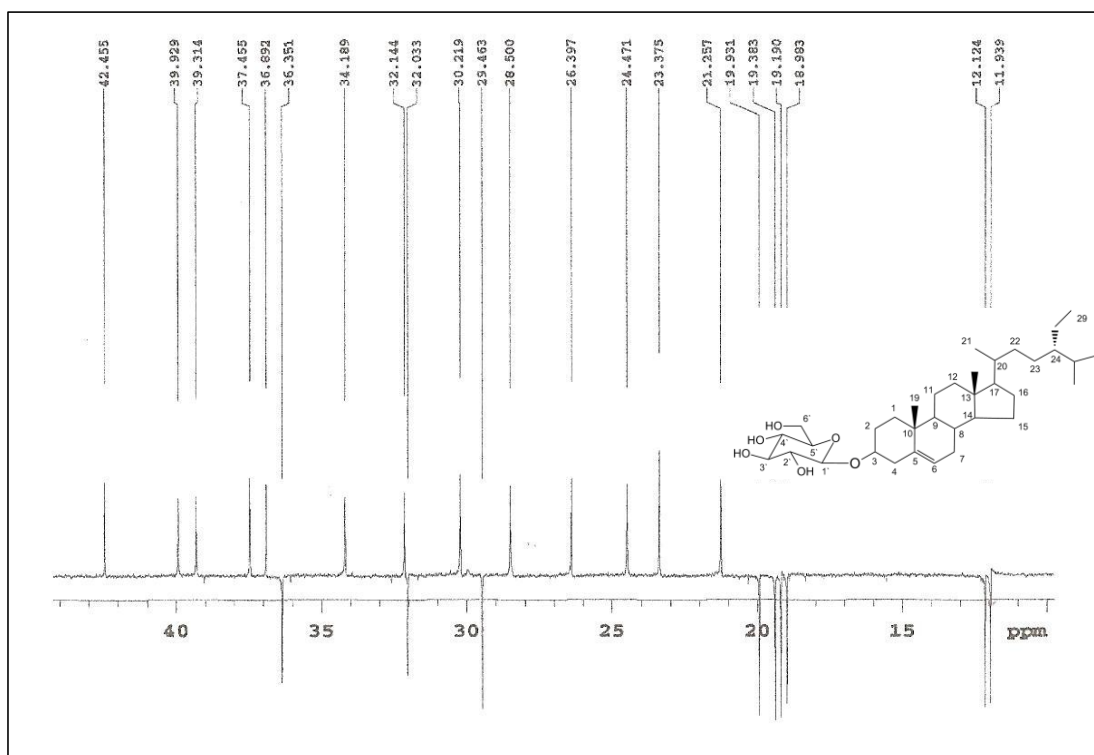


Figura 52 – Expansão do espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-5 na região de 44-10 ppm (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)



5.1.6 Determinação estrutural de *Rp*-6

A substância codificada como *Rp*-6 foi obtida como um sólido amorfo amarelo com 40,3 mg.

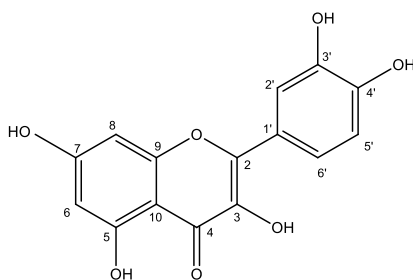
O espectro de IV de *Rp*-6 obtido em pastilhas de KBr (cm^{-1}) (Fig. 53, p. 88) revelou bandas de absorção em 3300 cm^{-1} , características de deformações axiais de grupamento OH, em aproximadamente 1600 cm^{-1} referentes a deformações axiais de ligações C=C de sistemas aromáticos, e em aproximadamente 1280 de ligações C–O de fenóis (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 2007; PAVIA et al., 2010).

O espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, em CD_3OD) de *Rp*-6 (Fig. 54, p. 88) apresentou quinze sinais, correspondentes a quinze átomos de carbono. Destes 10 foram atribuídos a átomos de carbono não hidrogenados e 5 a átomos de carbono metínicos. Os sinais em δ_{C} 94,4 e 99,2, aliados a presença de 15 carbonos e δ_{C} em 162,4 e 165,5 permitiram inferir um anel A de flavonas 5,7-dissubstituído. O sinal em δ_{C} 137,2 sugeriu a posição C-3 substituída por OH (OLIVEIRA et al., 1999). Observou-se ainda os sinais em δ_{C} 148,7 e 146,2 que foram atribuídos a C-3' e C-4', que juntamente com os sinais em δ_{C} 115,9, 116,2 e 121,7 corroboraram para um anel B de flavonas com um padrão ABX.

O espectro de RMN de ^1H (200 MHz, em CD_3OD) de *Rp*-6 (Fig. 55, p. 89) e sua expansão (Fig. 56, p.89) evidenciaram dois singletos largos em δ_{H} 6,17 e 6,38 corroborando para um anel A 5,7-dissubstituído. Além de um dubleto em δ_{H} 7,72 ($J=2,0 \text{ Hz}$), um duplo dubleto em δ_{H} 7,62 ($J=8,0; 2,0 \text{ Hz}$) e outro dubleto em δ_{H} 6,88 ($J=8,0 \text{ Hz}$) característicos do anel B com sistema ABX (MOREIRA et al., 2003).

Após análise desses dados e comparações com dados da literatura foi possível identificar *Rp*-6 como sendo a 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona, mais conhecida como quercetina (Tab. 9, p. 87), aqui relatada pela primeira vez no gênero *Roupala*.

Estudos relatam que a quercetina apresenta atividades antialérgica, antitumoral, hepatotóxica, antiulcerogênica, antiespasmódica, anti-inflamatória (TOUNAIRE et al., 1993; PELZER et al., 1998; DI CARLO et al., 1999).



Quercetina

Tabela 9 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de *Rp-6* (200 e 50 MHz, respectivamente), com dados da literatura (KALEGARI et al., 2011) - em CD_3OD .

C	<i>Rp-6</i>		Quercetina	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
2	148,0		147,8	
3	137,2		137,1	
4	177,3		177,2	
5	162,4		162,3	
6	99,2	6,17 (sl, 1H)	99,1	6,17 (d, $J=2,1$ Hz, 1H)
7	165,6		165,3	
8	94,4	6,38(sl, 1H)	94,4	6,36 (d, $J=2,1$ Hz, 1H)
9	158,2		158,1	
10	104,5		104,1	
1'	124,1		124,0	
2'	115,9	7,72 (d, $J=2,0$ Hz, 1H)	115,9	7,72 (d, $J=2,1$ Hz, 1H)
3'	148,7		148,5	
4'	146,2		146,0	
5'	116,2	6,88 (d, $J=8,0$ Hz, 1H)	116,1	6,8 (d, $J=8,4$ Hz, 1H)
6'	121,7	7,62 (dd, $J=8,0$; 2,0 Hz, 1H)	121,6	7,6 (dd, $J=8,7$; 2,1 Hz, 1H)

Figura 53 – Espectro de IV de *Rp*-6 (KBr, cm^{-1})

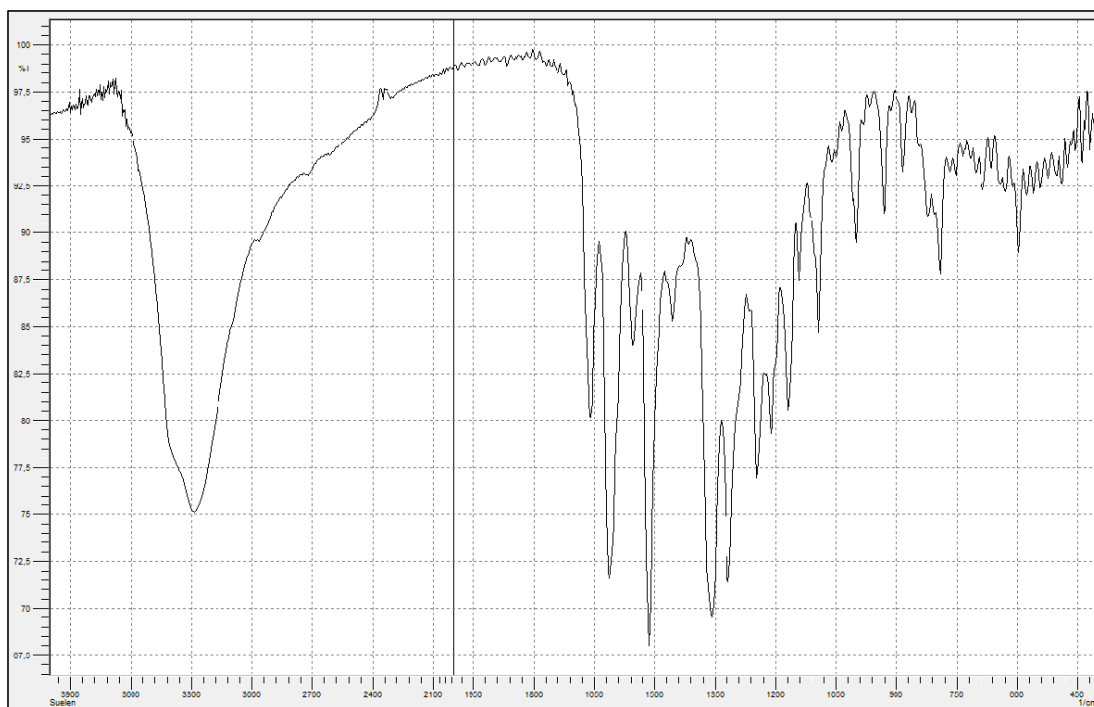


Figura 54 – Espectro de RMN de ^{13}C -APT de *Rp*-6 (25 MHz, CD_3OD)

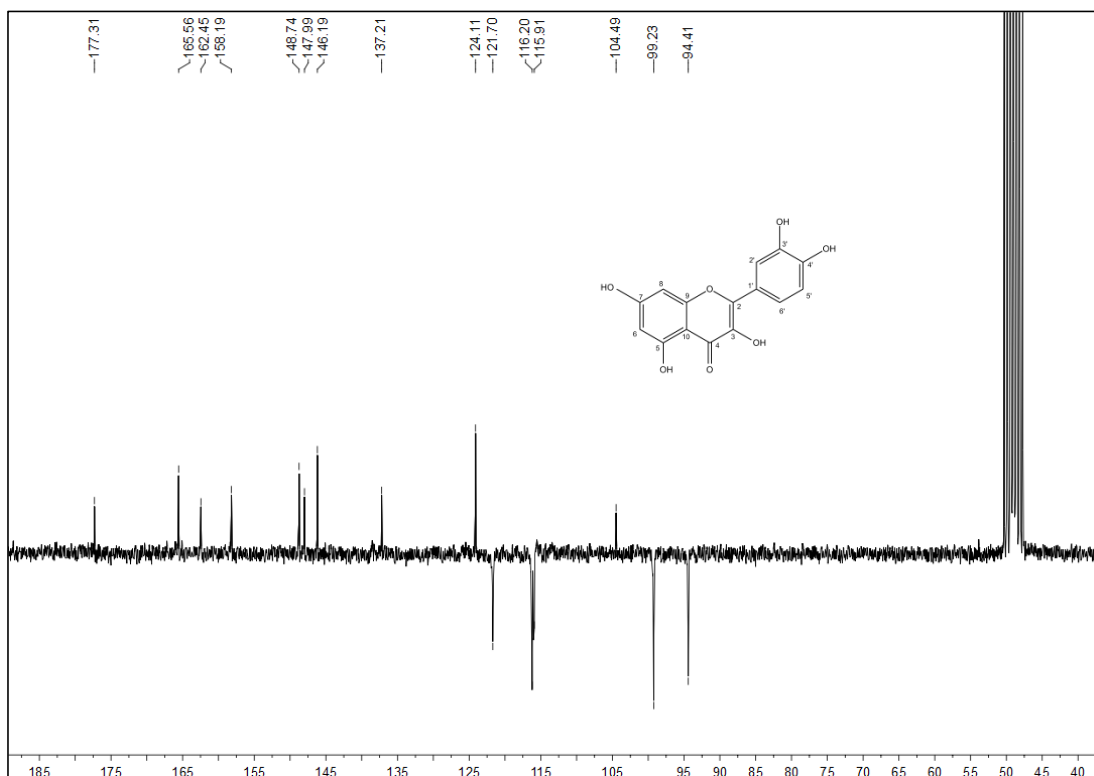


Figura 55 – Espectro de RMN de ^1H de *Rp*-6 (200 MHz, CD_3OD)

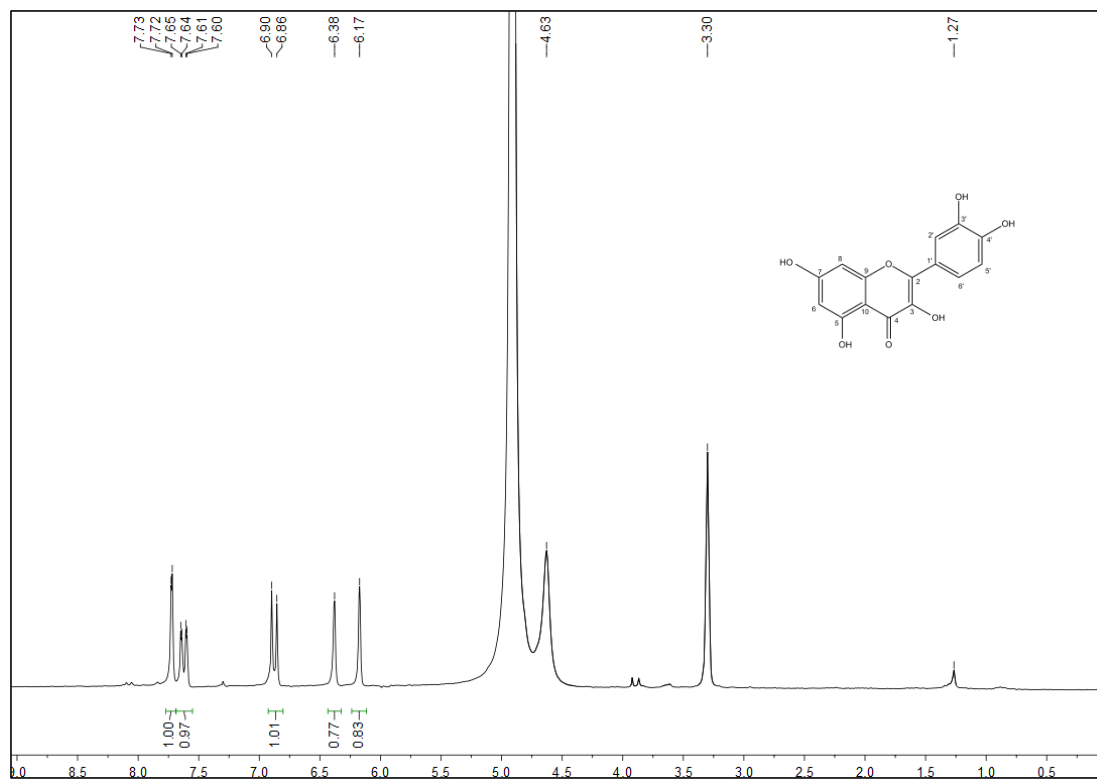
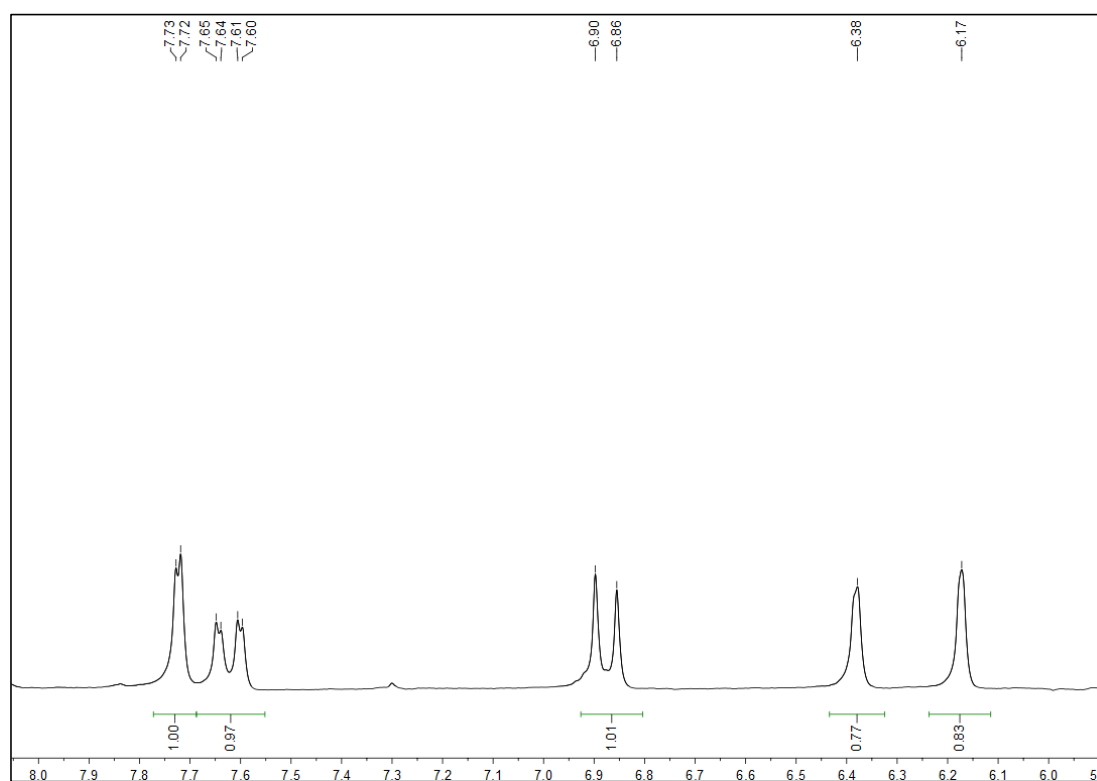


Figura 56 – Expansão do espectro de RMN de ^1H de *Rp*-6 na região de 8,0-5,9 ppm (200 MHz, CD_3OD)



5.2 Avaliação da atividade antioxidante e quantificação do teor de fenólicos totais do EEB e fases de *Roupala paulensis*

Na Tabela 10 (p. 90) encontram-se as concentrações de CE_{50} para cada uma das amostras e para o ácido ascórbico, analisadas pelo método do sequestro do radical DPPH.

Como pode ser observado entre as amostras testadas o extrato apresentou a menor CE_{50} ($37,50 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$) quando comparada à CE_{50} do ácido ascórbico ($4,25 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$). Entre as fases testadas a fase acetato de etila foi a que apresentou uma menor CE_{50} ($74,86 \pm 2,73 \mu\text{g/mL}$), embora esta tenha sido cerca de 17 vezes maior quando comparada com o ácido ascórbico. E a fase hexânica apresentou maior CE_{50} ($230,09 \pm 32,93 \mu\text{g/mL}$), cerca de 54 vezes maior quando comparada com o padrão. Ou seja, entre as fases estudadas a fase acetato de etila apresentou uma maior atividade oxidante visto que quanto menor a CE_{50} de uma amostra, maior o consumo de DPPH, portanto, maior é a sua atividade antioxidante.

Figura 57 – Curva padrão para o teste de DPPH – ácido ascórbico

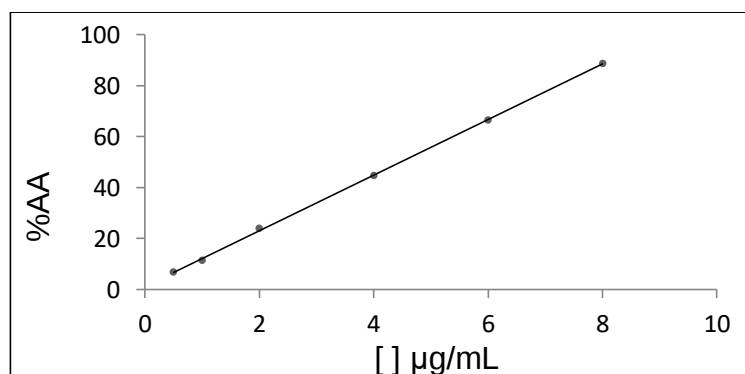
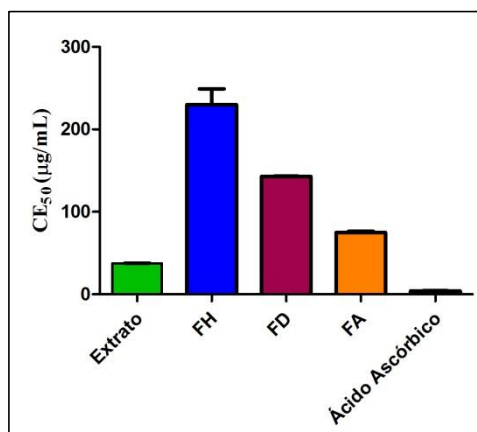


Tabela 10 – Determinação da CE_{50} a partir do teste de sequestro do DPPH

Amostra	$CE_{50} \pm DP (\mu\text{g/mL})$
EEB	$37,50 \pm 0,46$
Fase hexânica	$230,09 \pm 32,93$
Fase diclorometano	$142,79 \pm 0,73$
Fase acetato de etila	$74,86 \pm 2,73$
Ácido ascórbico	$4,25 \pm 0,22$

CE_{50} : Concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o radical;
DP: Desvio Padrão

Figura 58 – CE_{50} expressa em $\mu\text{g/mL}$ do EEB e fases de *Roupala paulensis* e do Ácido Ascórbico.



CE_{50} : Concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o radical;
 FH: fase hexânica; FD: fase diclorometano; FA: fase acetato de etila

Para quantificação do teor de fenólicos das amostras-teste utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu foi desenvolvida uma curva padrão de ácido gálico, para posterior cálculo das amostras avaliadas. Após a regressão linear, a equação obtida da curva de calibração foi $y = 0,0059x + 0,0298$, onde y é a absorbância a 765 nm, x é a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,9987 (Fig. 59 , p. 91).

Figura 59 – Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico *versus* as absorbâncias (765 nm) para o ensaio de Folin-Ciocalteu

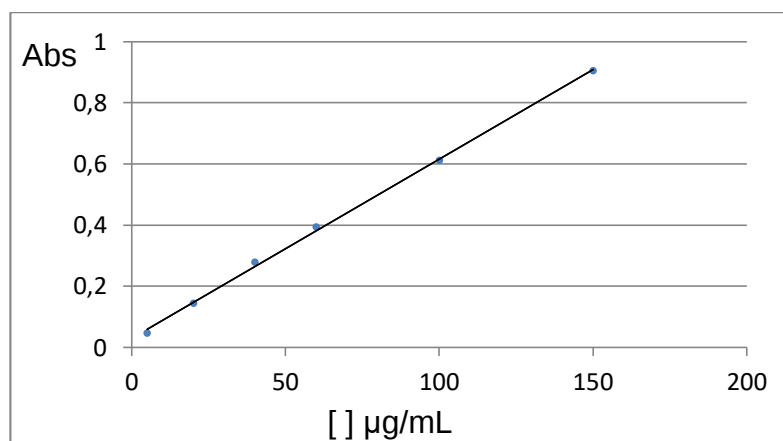


Tabela 11 – Concentração média $\pm$ coeficiente de variação de fenólicos totais encontradas no EEB e nas fases obtidas de *Roupala paulensis*

Amostra	Teor de fenólicos totais (mg EAG ^a /100 g)
EEB	24,27 $\pm$ 0,76
Fase hexânica	1,09 $\pm$ 0,08
Fase diclorometano	8,1 $\pm$ 0,14
Fase acetato de etila	30,47 $\pm$ 0,52

^aEquivalente Ácido gálico

De acordo com a quantificação de fenólicos totais, as amostras que exibiram maiores concentrações desses compostos foram o EEB (24,27 $\pm$ 0,76 gEAG/100 g) e a fase acetato de etila (30,47 $\pm$ 0,52 gEAG/100 g) (Tab. 11, p. 92). Como esperado, entre as fases testadas a fase acetato de etila apresentou a maior concentração de compostos fenólicos, sendo provavelmente responsável pelos melhores resultados de atividade antioxidante apresentados no teste de DPPH realizado.

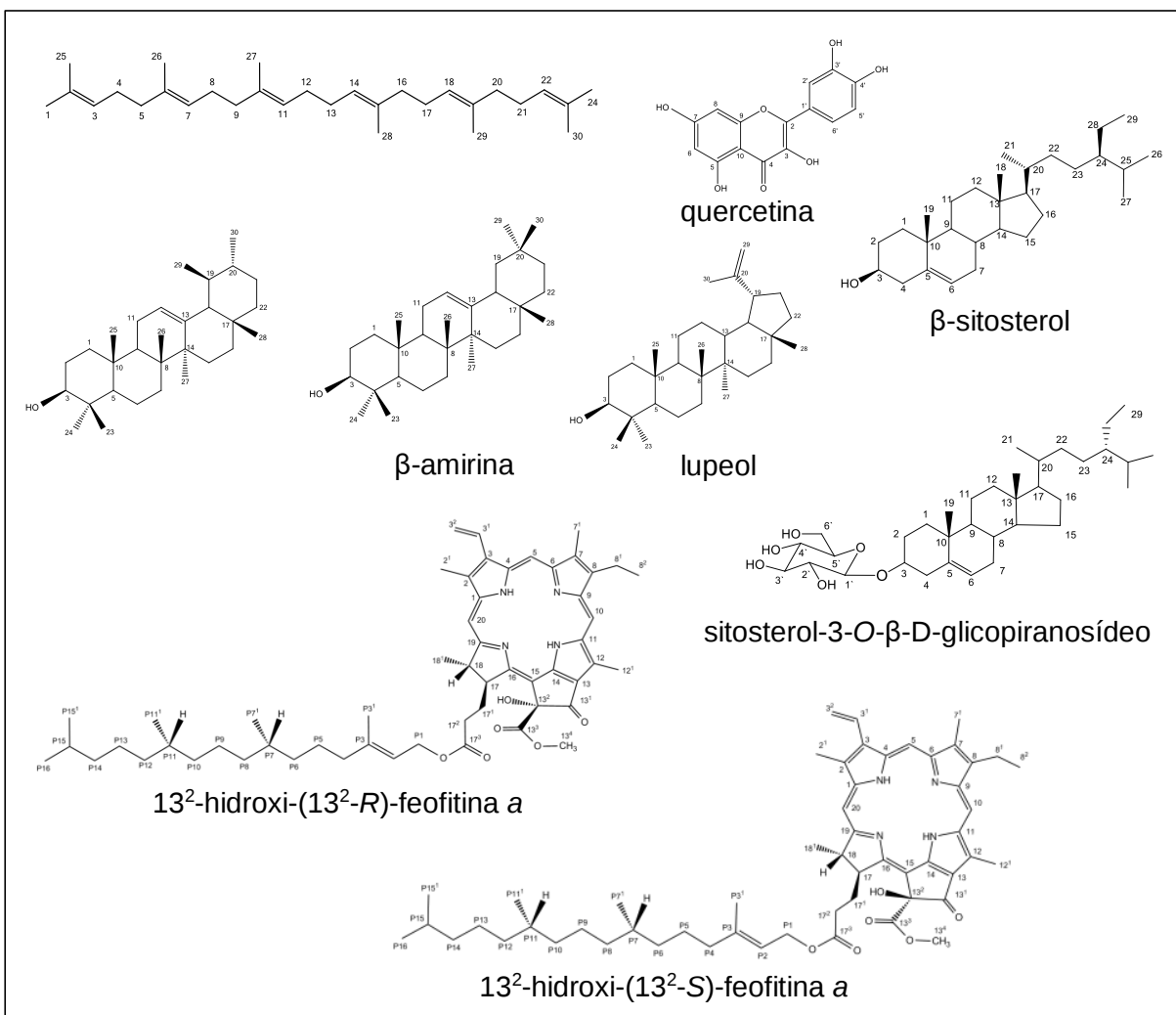
A determinação do teor de compostos fenólicos totais é um importante parâmetro de avaliação da atividade antioxidante, pois esses compostos são objeto de estudo em inúmeros relatos encontrados na literatura, onde são os principais responsáveis nos vegetais pela atividade antioxidante apresentada (TIVERON, 2010). Esta atividade ocorre devido a sua estrutura química e propriedades redutoras, que são capazes de agir tanto no início do processo oxidativo como na sua propagação, por neutralização ou sequestro de radicais livres ou por quelatação de metais de transição, (SOUSA et al., 2007).

Associando estes resultados ao estudo fitoquímico realizado com o EEB e as fases acetato de etila de *Roupala paulensis* é possível confirmar a maior atividade da fase acetato de etila da qual foi isolado o flavonoide quercetina, sendo esta fase uma fonte promissora para isolamento de outros compostos fenólicos, incluindo outros

Considerações finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Roupala paulensis* resultou no isolamento de quatro substâncias, além de uma mistura composta por três triterpenos e de uma mistura de dois derivados porfirínicos.



Da fase hexânica foram isolados quatro triterpenos, o 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexeno (esqualeno) e uma mistura de urs-12-en-3β-ol (α-amirina), olean-12-en-3β-ol (β-amirina) e 3β-hidroxi-lup-20(29)-eno (lupeol); um esteroide, o β-sitosterol; e duas feofitinas, em mistura, 13²-hidroxi-(13²-R)-feofitina a e 13²-hidroxi-(13²-S)-feofitina a. Da fase diclorometano foi isolado um esteroide glicosilado, o sitosterol-3-O-β-D-glicopiranosídeo. E da fase acetato de etila foi isolada uma flavona, 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina). Todas as substâncias estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero *Roupala*.

O estudo da atividade oxidante através do método do sequestro do radical DPPH mostrou uma maior atividade do EEB, seguido pela fase acetato de etila. A quantificação de fenólicos totais apresentou uma maior concentração de compostos fenólicos na fase acetato de etila, fator associado aos melhores resultados apresentados no teste de DPPH pela fase acetato de etila, entre as fases testadas.

Embora as substâncias isoladas já sejam conhecidas na literatura e amplamente distribuídas no reino vegetal este trabalho pode contribuir com o conhecimento fitoquímico do gênero *Roupala*, visto que todas as substância isoladas estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero e poucos relatos são encontrados sobre o mesmo. Bem como com o estudo biológico relacionado a atividade antioxidante, destacando-se que não foram encontrados relatos relacionados à este tipo de atividade com este gênero.

Devido a existência de grande variedade de metabólitos secundários na família Proteaceae e a escassez de relatos na literatura no gênero *Roupala* espera-se dar continuidade ao estudo com a espécie *Roupala paulensis*, principalmente das fases polares, onde são encontrados em maior quantidade os compostos fenólicos. E ainda submeter o EEB, as fases e substâncias isoladas de *Roupala paulensis* a outros testes farmacológicos, visando descobrir novas atividades biológicas em potencial, como testes para avaliação da atividade antimicrobiana, já relatada na literatura para outras espécies da família Proteaceae.

Referências

REFERÊNCIAS

- AHMED, A. S. et al. Phenolic constituents from *Grevillea robusta*. **Phytochemistry**. v. 53, 2000.
- ALMEIDA, M. C. S. de. et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 9, p. 1877-1881, 2010.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n.3, 2000.
- AQUINO, R. et al. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2927-2930, 1988.
- ARAGÃO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha-and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 4, p. 827-834, 2006.
- ASSIS JUNIOR, L. R. de; GARCEZ, F. R. e GARCEZ, W. S. Pregnanos e outros constituintes das raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. St.-Hil.) Kuntze (Apocynaceae). **Química Nova**, v.36, n. 4, 2013.
- AWAD, A. B.; BURR, A. T.; FINK, C. S. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 72, n. 3, p. 219-26, 2005.
- BARRETO, M. B. et al. Flavonoides e terpenoides de *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 15-27, 1999.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.
- BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1350-1360, 2010.
- BUCHANAN, M. S.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. Phytyl esters and phaeophytins from the hornwort *Megaceros flagellaris*. **Phytochemistry**. v. 41, n. 5, p. 1373-1376, 1996.
- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CANNON, J. R. et al. Phenolic Constituents of *Grevillea robusta* (Proteaceae). The Structure of Robustol, a Novel Macrocyclic Phenol. **Australian Journal of Chemistry**, v. 26, n.10, p. 2257-2275, 1973.

CARVALHO, T. C. de, et al. Screening of filamentous fungi to identify biocatalysts for lupeol biotransformation. **Molecules**, v. 15, p. 6140-6151, 2010.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CORRÊA, A. D. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica**. 4. ed. Petrópolis, Rio de Janeiro. Ed. Vozes, 2001. 247p.

CURSINO, L. M. de C. et al. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v.39, p. 181-186, 2009.

DELGADO, M. et al. Divergent functioning of Proteaceae species: the South American *Embothrium coccineum* displays a combination of adaptive traits to survive in high-phosphorus soils. **Functional Ecology**, v. 28, n. 6, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. 3 ed. Edition. John Wiley & Sons, 2009.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drug. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIAZ, G. et al. Estudo fitoquímico e biológico de *Vernonia tweediana* Baker (Asteraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 56-61, 2008.

DUAN, H. et al. Immunosuppressive constituents from *Saussurea medusa*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 85-90, 2002.

FERNANDEZ, M. A. et al. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 11, p. 1533-1539, 2001.

FLORA SBS. Proteaceae. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/florasbs/proteaceae/carvalho-brasileiro>>. Acesso em: 10 de maio de 2015.

FORZZA, R.C. et al. **Angiospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128482>>. Acesso em: 26 Abr. 2015

GOMES, A. et al. Viper and cobra venom neutralization by β -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). **Phytomedicine**, v. 14, n. 9, p. 637-643, 2007.

GUPTA, M. et al. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. **Planta Medica**, v. 39, n. 2, p. 157–163, 1980

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

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, X. et al. Proteasome and NF- κ B inhibiting phaeophytins from the green alga *Cladophora fascicularis*. **Molecules**. v. 12, n. 3, p. 582-592, 2007.

HUANG, Z. R.; LIN, Y. K.; FANG, J. Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 540-554, 2009.

HUNG-LLAMOS, B. R. et al. Fitosteroles. Parte 1. Tendencias actuales y aplicaciones biomédicas. **Revista CENIC. Ciências Biológicas**, v. 36, n.1, p. 23-33, 2005.

JERZ, G. et al. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-S)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 8, p. 413-413, 2007.

KALEGARI, M. et al. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KASAI, R. et al., Sweet and bitter cucurbitane glycosides from *Hemsleya carnosiflora*. **Phytochemistry**. v.26, n. 5, p. 1371-1376, 1987.

KOBAYASHI, M. et al. 10- hydroxypheophytins and a new norlabdane diterpene from the leaves of *Cupressus funebris* Endl. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 39, n. 12, p. 3348-3349, 1991.

KOHNO, Y., et al. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1256, n. 1, p. 52–56, 1995.

KOJIMA, H. et al. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2351-2355, 1990.

LEMOS, T. L. G. et al. Quinones from plants of Northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. **Natural Product Research**, v. 21, n.6, p. 529-550, 2007.

LIMA-JUNIOR, R. C. P. et al. Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene, α,β -amyrin in a mouse model of cystitis: role of tachykinin NK1-receptors, and K⁺ ATP channels. **Inflammation Research**, v.56, p.487-497,2007.

LIMA-SARAIVA, S. R. G. et al. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.6, p.5330-5336, 2012.

LIN, K. W. et al. Xanthine oxidase inhibitory triterpenoid and phloroglucinol from guttiferaceous plants inhibit growth and induced apoptosis in human NTUB1 cells through a ROS-dependent mechanism. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 1, p. 407-414, 2010.

LING, W. H.; JONES, P. J. H. Dietary Phytosterols - a Review of Metabolism, Benefits and Side-Effects. **Life Sciences**, v. 57, n. 3, p. 195-206, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MADUREIRA, A. M.; DUARTE, A.; TEIXEIRA, G. Antimicrobial activity of selected extracts from *Hakea salicifolia* and *H. sericeae* (Proteaceae) against *Staphylococcus aureus* multiresistant strains. **South African Journal of Botany**. v. 81, 2012.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclitriterpenoids - A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MARTINS, R. C.; SILVA, C. L. M. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Refrigeration**, v. 25, p. 966, 2002.

MATSUO, A. et al. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**. v. 42, n. 2, p. 427-430, 1996.

MCANUFF, M. A. et al. Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 11, p. 1667-1672, 2005.

MEDEIROS, Rodrigo et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European journal of pharmacology**, v. 559, n. 2, p. 227-235, 2007.

MOIR, M.; THOMSON, R. H. Naphthaquinones in *Lomatia* species. **Phytochemistry**. v. 12, 1973.

MIZUSHINA, Y. et al. β -Sitosterol-3-O- β -d-glucopyranoside: A eukaryotic DNA polymerase λ inhibitor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, n. 2, p. 100-107, 2006.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 2001.

MOREIRA, F. de P. M., et al. Flavonoides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

MOREIRA, L. M. et al. Influência de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila α . **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 258-262, 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

NAKATANI, Y.; OURISSON, G.; BECK, J. P.; Chemistry and biochemistry of Chinese drugs. VII. Cytostatic pheophytins from silkworm excreta, and derived photocytotoxic pheophorbides. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. 29: 2261-2269, 1981.

NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J. L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 383-388, 2002.

NEWMARK, H. L. Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 6, 1101–1103, 1997.

NOGUEIRA, T. B. de S. de S. Contribuição para quimiotaxonomia da Família Boraginaceae. 150f. Dissertação (Mestrado) João Pessoa:UFPB, 2009.

NUNES, X. P. et al., Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 718-723, 2008.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ^{13}C . **Química Nova**, v. 13, p. 278-281, 1990.

OLIVEIRA, M. C. C. de et al. Flavonoids from flowers of *Stiffitia crisantha* Mikan. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 182-184, 1999.

OLIVEIRA, P. F. et al. Antigenotoxicity of Roupala montana extract in the mouse micronucleus and comet assays. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 37, n.1, 2014.

OLIVEIRA FILHO, A. T. et al. Espécies de ocorrência exclusiva do domínio atlântico. In: OLIVEIRA FILHO, A. T.; SCOLFORO, J. R.(Ed.). **Inventário Florestal de Minas Gerais: Espécies Arbóreas da Flora Nativa**. Lavras: UFLA, 2008. (cap. 2)

OLIVEIRA-JUNIOR, R. G. et al. Dried extracts of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) presente antioxidante and photoprotective activities in vitro. **Journal of Young Pharmacists**, v. 5, n.3, p.102-105, 2013

PATOČKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 7-12, 2003.

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

PELZER, L. E. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. II *Fármaco*, v. 53, n. 6, p. 21-24, 1998.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p.146-152, 2012.

PINTO, M. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B.; NASCIMENTO, L. M. Florística e estrutura da vegetação de um brejo de altitude pesqueira, PE, Brasil. **Revista Nordestina de Biologia**. V. 21, n. 1, 2012.

PIRANI, J. R. ; NASCIMENTO, F. H. F. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Proteaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 14, n. 1, 1995.

PLANA; V.; PRANCE, G. T. A new specie of *Euplassa* (Proteaceae) from Brazil. **Kew Bulletin**. v. 53, n. 4, 1998.

PRANCE, G. T.; PLANA, V. The American Proteaceae. **Australian Systematic Botany**, v. 11, n. 4, 1998.

PRANCE, G. T.; AMORIM, A.M.A. Proteaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13801>>. Acesso em: 26 Abr. 2015

PREETHA, S. P. et al. Lupeol ameliorates aflatoxin B 1-induced peroxidative hepatic damage in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 3, p. 333-339, 2006.

RAO, C. V.; NEWMARK, H. L.; REDDY, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon câncer. **Carcinogenesis**. v.19, n. 2, 287–290, 1998.

RASO, G.M. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci**, v.68, p.921-931, 2001.

REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, 1412–1426, 2009.

RIDLEY, D. D.; RITCHIE, E; TAYLOR, W. C. Chemical studies of the Proteaceae. IV. The structures of the major phenols of *Grevillea striata*; a group of novel cyclophanes. **Australian Journal of Chemistry**, v. 23, n. 1, 1970.

RITCHIE, E.; TAYLOR, W. C.; VAUTIN, S. T. K. Chemical studies of the Proteaceae. I. *Grevillea robusta* A. Cunn, and *Orites excelsa* R. Br. **Australian Journal of Chemistry**. v. 18, n. 12, 1965.

RIVELLI, D. P. et al. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 215-222, 2007.

ROEWER, S. P. et al. Uso indevido de plantas medicinais pela população do Vale do Araguaia (MT e GO). **Interdisciplinar: Revista Eletrônica da Univar**. v. 1, n. 10, 2013

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

SAKDARATA, S. et al. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n.5, p. 1857-1860, 2009.

SALEEM, M. et al. Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene**, v. 23, p. 5203–5214, 2004.

SALEEM, M. et al. Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting β -catenin signaling. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 808-817, 2009.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTANA, C. R. R. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activity of *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae). **International Journal of Sciences**, v.1, n. 11, p. 1-19, 2012.

SCHWIKKARD, S. L.; MULHOLLAND, D. A.; HUTCHINGS, A. Phaeophytins from *Tapura fisheri*. **Phytochemistry**. 49 (8): 2391-2394, 1998.

SHARMA, S.; SINGH, T.; VIJAYVERGIA, R. Antimicrobial properties of β -amyrin (terpenoid). **Journal of Pharmacy Research**, v 3, n. 8, p. 1979-1980, 2010.

SHIH, M. et al. A molecular pharmacology study into the anti-inflammatory actions of *Euphorbia hirta* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells through selective iNOS protein inhibition. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 3, p. 330-335, 2010.

SHIRWAIKAR, A. et al. Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch.-Ham. stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, p. 686–690, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. P. C.; MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, n. 299C, p. 152-178, 1999.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes rendus biologies**, v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

SOUSA, C. M de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, M. F. V.; SILVA, D. A. Extração, isolamento e reações de caracterização de constituintes químicos. In: **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SOUZA, F. H. T; **Estudo fitoquímico e farmacobotânico de *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae)**. 194 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). João Pessoa: UFPB, 2009.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**. v. 21 n. 3, 525–530, 2000.

SUDHAHAR, V. et al. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular pharmacology**, v. 46, n. 6, p. 412-418, 2007.

SUMINO, M. et al. Ardisiphenols and other antioxidant principles from the fruits of *Ardisia colorata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 11, p. 1484-1487, 2002.

TABI, D. N. **A study of the chemical constituents of *Roupala montana* and an approach to the synthesis of trans-2-(trans-1-cis-3-hexadienyl)-5-methyltetrahydrofuran**. Tese (Doutorado). Washington: Howard University, 1998.

TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biothecnology and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1387-14004, 2007.

TANAKA, R. et al. Potential anti-tumor promoting activity of lupine-type triterpenoids from the stem bark of *Glochidion zeylanicum* and *Phyllanthus flexuosus*. **Planta Medica**, v. 70, p. 1234–1236, 2004.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2010.

TOMAZ, A. C. de A. **Abordagem fitoquímica de *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). João Pessoa: UFPB, 2008.

TOMAZ, A. C de A. et al., Chemical constituents from *Richardia grandiflora* (Cham. & Schltdl.) Steud. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 47-52, 2008.

TOURNAIRE, C. et al. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\Delta g$) quenching. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 19, n. 3, p. 205-215, 1993.

TROPICOS – Proteaceae Juss. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000186>>. Acesso em 26 de abril de 2015.

TROPICOS – Roupala Aubl. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/40027338>>. Acesso em: 26 de abril de 2015.

VICKERY, J. R. The fatty acid composition of the seed oils of proteaceae: A chemotaxonomic study. **Phytochemistry**. v. 10, 1971.

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

VIVANCOS, M.; MORENO, J. J. Beta-sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 1, p. 91–97, 2005.

WALL, M. M. Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars. **Food Chemistry**, v.121, p.1103–1108, 2010.

WESTON, P. H.; BARKER, N. P. A new suprageneric classification of the Proteaceae, with an annotated checklist of genera. **Telopea**. v.11, n. 3. 2006.

YAMASHITA, K. et al. Effect of three tritenoids, lupeol, betulin and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. **Clinica Chimica Acta**, v. 325, p. 91–96, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S. MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVIK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 577-614