

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

**CAMILA HOLANDA DE ALBUQUERQUE**

**Constituintes químicos e atividade  
farmacológica de *Erythroxylum pulchrum* St. Hil.  
(Erythroxylaceae)**



**JOÃO PESSOA**

**2013**

**CAMILA HOLANDA DE ALBUQUERQUE**

**Constituintes químicos e atividade  
farmacológica de *Erythroxylum pulchrum* A. St. Hil.  
(Erythroxylaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração Farmacoquímica.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva**

**João Pessoa**

**2013**

**CAMILA HOLANDA DE ALBUQUERQUE**

**Constituintes químicos e atividade  
farmacológica de *Erythroxylum pulchrum* St. Hil.  
(Erythroxylaceae)**

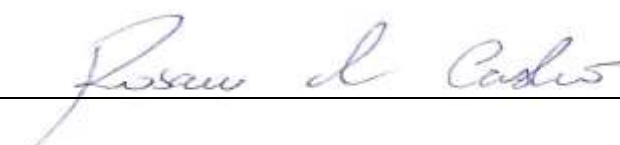
**Banca examinadora**

---

**Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva - Orientador**  
**Universidade Federal da Paraíba**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Bárbara Viviana de Oliveira Santos - Examinador interno**  
**Universidade Federal da Paraíba**



---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Nora Castro - Examinador externo**  
**Universidade Federal da Rural do Rio de Janeiro**

*Deus transforma choro em sorriso, dor em força,  
fraqueza em fé, sonho em realidade. Pela fé verei  
os meus sonhos realizados por Deus.*

*Autor desconhecido*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, fonte de força e inspiração para vencer os obstáculos em toda essa caminhada. Por todas as dificuldades que enfrentei. Elas foram adversárias dignas e tornaram minhas vitórias muito mais saborosas.

Á minha Mãe Santíssima, Mãe de misericórdia, depois de meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, ponho toda a minha confiança e todas as minhas esperanças. Recebei-me como vosso servo e defendei-me, ó Maria, com vossa proteção.

Agradeço ao meu pai Genildo Lins de Albuquerque Filho e a minha mãe Maria Aparecida Almeida Holanda. Como essas pessoinhas são importantes para mim, agradeço á Deus todos os dias por vocês estarem ao meu lado neste momento. Não sei se conseguirei agradecer a vocês através das palavras, mas vou tentar. MUITÍSSIMO OBRIGADO pelo investimento que fizeram em mim, pela confiança, pela oportunidade, por sempre lutarem para que eu pudesse somente estudar até prestar o vestibular, pelo amor incondicional, pelo carinho, pelo apoio, pelo exemplo de pessoas honestas e trabalhadoras que são, enfim, eu poderia escrever infinitas páginas sobre vocês, porém minhas lágrimas não permitem. AMOOOO muito vocês.

Agradeço a minha irmã Leticia Holanda de Albuquerque pela pessoa maravilhosa que é. Continue trilhando esse caminho, pois certamente atingirá seus objetivos. AMOOO demaissss...

Ao meu AMOR... Steno!! Por todo amor, carinho, amizade, lealdade e companheirismo, pois você sempre esteve junto de mim nas alegrias e nas tristezas me apoiando e me empurrando adiante, não permitindo que eu caísse. Quero agradecer pela sinceridade, o que permitiu que eu ficasse sempre tranquila em relação ao nosso relacionamento. Te AMOOO.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e ao Prof. Dr Josean Fachine Tavares pelos ensinamentos e orientação. À Profa. Dra Maria de Fátima Agra pela identificação do material botânico. À Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa pela colaboração na realização do estudo microbiológico. Á Profa. Dra. Rosane Nora Castro por ter aceito gentilmente o convite de avaliar meu trabalho. Aos professores de graduação e pós-graduação pela participação em minha formação acadêmica.

À Vicente Carlos, Alexsandro Marinho e Sócrates Golzio pela amizade e pelas análises em RMN e Massas. Aos técnicos Welington Navarro pela obtenção dos

espectros de IV e a Raimundo Nonato pelas ajudas constantes na bancada e pela amizade.

Aos meus tios Gomes, França, Humberto, Rosana, Heriberto, Rosângela, Jurandir, Ronaldo, Dinha, por todo amor e acolhimento durante toda minha vida. Agradeço também aos meus primos amados e ao meu avô Genildo Lins, por todo carinho e apoio.

A todos os meus amigos de graduação que conviveram todos esses anos comigo nessa caminhada pelo apoio, amizade e carinho. Principalmente as mais chegadas do coração Isabela, Ângela, Vanessinha e Gislaine por todo apoio, pelo simples escutar ao telefone, pelas farras. AMOOO muito vocês, fico feliz por nossa amizade continuar fora da universidade. Aos amigos de todos os momentos Gregório, Juliana, Gorete, Cassiano, Kel por todo apoio.

As minhas companheiras e amigas do coração Tainá, Eugenia e Graci. Agradeço por todo apoio, por toda educação e carinho. Graças á Deus que vocês estiveram comigo por todo esse tempo, o trabalho ficou menos pesado com vocês ao meu lado. Nosso apoio mútuo foi fundamental. AMOOO vocês!!!

A todos os colegas do laboratório pelo apoio e ensinamentos na bancada, principalmente Camila carioca, Ania, Denise, Jaqueline, Carol, Susy, Manso, Andresa, Sara, Antonilene.

Á Carolina Mangueira e Tânia Alves pelo carinho, disponibilidade e ajuda.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

## RESUMO

Os produtos naturais representam uma rica fonte de compostos biologicamente ativos e são um exemplo de diversidade molecular, com reconhecido potencial na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. *Erythroxylum pulchrum*, (Erythroxylaceae) é exclusiva da flora brasileira, com distribuição no Nordeste e Sudeste do país, só foi encontrada na Paraíba em uma área do Pico do Jabre – PB. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), sob o n° 4947. Neste estudo fitoquímico, as partes aéreas secas e pulverizadas foram submetidas a uma extração com metanol e em seguida, particionados. A fase acetato de etila foi submetida à cromatografia líquida de media pressão. Desta maneira, foi possível isolar quatro flavonoides: epicatequina, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-raminosídeo, ombuin-3-rutinosídeo e ombuin-3-rutinosídeo-5-glicosídeo. A fase hexânica também foi submetida à cromatografia líquida de media pressão, em que foi possível isolar um terpenoide lupeol e um esteróide  $\beta$ -sitosterol. Essas substâncias tiveram sua identificação estrutural baseada na análise de dados espectrais de IV, EM, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , incluindo técnicas bidimensionais homonucleares e heteronucleares, além de comparação com dados da literatura. Foi avaliado também, o efeito antibacteriano do extrato metanólico bruto de *Erythroxylum pulchrum* frente a cepas de bactérias de importância clínica, determinando a concentração inibitória mínima do extrato metanólico para cada linhagem de bactéria testada pela técnica de microdiluição. Assim, o extrato inibiu o crescimento das linhagens bacterianas de *Bacillus subtilis* CCT 0516, *Escherichia coli* ATCC 2536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Streptococcus sanguíneos*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus ATCC*. No entanto, a espécie *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 foi a mais sensível, e espécies as *Streptococcus sanguíneos* e *Streptococcus salivares* foram as mais resistentes á ação antibacteriana do extrato metanólico bruto. Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o conhecimento fitoquímico e farmacológico de *Erythroxylum pulchrum* e para a o conhecimento quimiotaxonômico do gênero *Erythroxylum* e da família Erythroxylaceae.

Palavras-Chave: *Erythroxylum pulchrum*, constituintes químicos, atividade antimicrobiana

## ABSTRACT

The natural products represent a rich source of bioactive compounds and are an example of molecular diversity, with a well-known potential on the discovery and development of new drugs. *Erythroxylum pulchrum*, (Erythroxylaceae) is an exclusive species from the Brazilian flora, distributed on the northeast and southeast regions of the country; which can be found in Paraíba in a particular area of "Pico do Jabre – PB". A voucher specimen is deposited at the Professor Lauro Pires Xavier (JPB) herbarium with the code 4947. On this phytochemical study the dried powder of the aerial parts was submitted to an extraction with methanol, followed by partition. The ethyl acetate fraction was submitted to a Medium Pressure Liquid Chromatography. Therefore, it was possible to identify four flavonoids: epicatechin, quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside, ombuin-3-rutinoside and ombuin-3-rutinoside-5-glucoside. The hexanic fraction was also submitted to a Medium Pressure Liquid Chromatography which led to the identification of one terpenoid - lupeol and one steroid -  $\beta$ -sitosterol. These substances were identified by analysis of data obtained from spectroscopic methods such as infrared, mass spectrometry and NMR of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ , with the aid of two dimensional techniques, besides comparison with literature data. It was also evaluated the antimicrobial activity from its crude extract against bacterial strains of clinical matter by measuring the minimum inhibitory concentration for each bacterial strain tested by the microdilution assay. So, the crude extract inhibited the growth of the following bacterial strains: *Bacillus subtilis* CCT 0516, *Escherichia coli* ATCC 2536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Streptococcus sanguineus*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus ATCC*. However, the genus *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 was the most sensible, but on the other hand, the species *Streptococcus sanguineus* e *Streptococcus salivares* was the most resistant against the antimicrobial effect of the crude extract. The results obtained on this research contributed to the phytochemical and pharmacology study of *Erythroxylum pulchrum* and to the chemotaxonomic knowledge of the genus *Erythroxylum*, as well as the Erythroxylaceae family.

Keywords: *Erythroxylum pulchrum*, chemical constituents, antimicrobial activity

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APT	“Attached Proton Test”
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
COSY	“Correlation Spectroscopy”
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
EPA	<i>Erythoxylum pulchrum</i>
EM	Espectrometria de massas
ESI	“Electrospray ionization”
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multipleteo
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ppm	Partes por milhão
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Sinpleto
<i>sl</i>	Sinpleto largo
<i>t</i>	Tripleteo
<i>R<sub>f</sub></i>	Fator de retenção
ECA	Enzima conversora de angiotencina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários em plantas .....	19
<b>Figura 2.</b>	Distribuição geográfica da família Erythroxylaceae no mundo .....	21
<b>Figura 3.</b>	Mapa de distribuição da <i>Erythroxylum pulchrum</i> no Brasil .....	25
<b>Figura 4.</b>	Esqueleto básico dos flavonoides .....	28
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática da biossíntese de flavonoide.....	30
<b>Figura 6.</b>	Representação esquemática da biossíntese de flavonoide.....	31
<b>Figura 7.</b>	Representação das unidades isoprênicas.....	34
<b>Figura 8.</b>	Biossíntese geral dos terpenos.....	35
<b>Figura 9.</b>	Formação do geranylpirofosfato.....	36
<b>Figura 10.</b>	Espectro de infravermelho de EPA 1.....	53
<b>Figura 11.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 1</b> .....	54
<b>Figura 12.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 1</b> na região entre δ <sub>C</sub> 108,0-172,0 ppm .....	55
<b>Figura 13.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 1</b> na região entre δ <sub>C</sub> 15,0-105,0 ppm .....	56
<b>Figura 14.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 1</b> .....	57
<b>Figura 15.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 1</b> na região entre δ <sub>H</sub> 1,0-8,0 ppm .....	58
<b>Figura 16.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 1</b> na região entre δ <sub>H</sub> 5,3-7,5 ppm .....	59
<b>Figura 17.</b>	Espectro de massa do composto <b>EPA 2</b> .....	63
<b>Figura 18.</b>	Espectro de IV do composto <b>EPA 2</b> .....	64
<b>Figura 19.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 2</b> .....	65
<b>Figura 20.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (250 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 2</b> na região entre δ <sub>C</sub> 115,0 a 190,0 ppm .....	66
<b>Figura 21.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (250 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 2</b> na região entre δ <sub>C</sub> 10,0 a 105,0 ppm .....	67
<b>Figura 22.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 2</b> .....	68
<b>Figura 23.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 2</b> na região entre δ <sub>H</sub> 0,5 a 8,5 ppm .....	69
<b>Figura 24.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 2</b>	

	na região entre $\delta_H$ 5,2 a 7,5 ppm .....	70
<b>Figura 25.</b>	Expansão do espectro de RMN $^1H$ (200 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre $\delta_H$ 0,8 a 5,0 ppm .....	71
<b>Figura 26.</b>	Espectro de HMQC (500 e 125 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> .....	72
<b>Figura 27.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (5,1 a 7,6) x (90 a 130) ppm .....	73
<b>Figura 28.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (3,0 a 4,5) x (45 a 80) ppm .....	74
<b>Figura 29.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (0,0 a 3,4) x (0,0 a 32,0) ppm.....	75
<b>Figura 30.</b>	Espectro de HMBC (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> .....	76
<b>Figura 31.</b>	Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (5,1 a 7,9) x (90 a 180) ppm.....	77
<b>Figura 32.</b>	Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (0,5 a 6,5) x (60 a 110) ppm.....	78
<b>Figura 33.</b>	Expansão do espectro de HMBC (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (5,1 a 7,5) x (70 a 170) ppm.....	79
<b>Figura 34.</b>	Espectro de COSY (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> .....	80
<b>Figura 35.</b>	Expansão do espectro de COSY (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (6,5 a 8,0) x (5,5 a 9,0) ppm.....	81
<b>Figura 36.</b>	Expansão do espectro de COSY (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (2,6 a 6,0) x (1,5 a 7,0) ppm.....	82
<b>Figura 37.</b>	Expansão do espectro de COSY (500 MHz, $CD_3OD$ ) de <b>EPA 2</b> na região entre (0,0 a 6,0) x (0,0 a 7,0) ppm.....	83
<b>Figura 38.</b>	Espectro de massa do composto <b>EPA 3</b> .....	88
<b>Figura 39.</b>	Espectro de IV do composto <b>EPA 3</b> .....	89
<b>Figura 40.</b>	Espectro de RMN $^{13}C$ -APT (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> .....	90
<b>Figura 41.</b>	Expansão do espectro de RMN $^{13}C$ -APT (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre $\delta_C$ 132 a 180 ppm.....	91
<b>Figura 42.</b>	Expansão do espectro de RMN $^{13}C$ -APT (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre $\delta_C$ 86 a 126 ppm.....	92
<b>Figura 43.</b>	Expansão do espectro de RMN $^{13}C$ -APT (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre $\delta_C$ 15 a 80 ppm.....	93

<b>Figura 44.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> .....	<b>94</b>
<b>Figura 45.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre δ <sub>H</sub> 5,8 a 8,0 ppm.....	<b>95</b>
<b>Figura 46.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre δ <sub>H</sub> 0,0 a 5,6 ppm.....	<b>96</b>
<b>Figura 47.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre (0,0 a 9,0) x (10 a 120) ppm.....	<b>97</b>
<b>Figura 48.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre (5,8 a 8,0) x (85 a 125) ppm.....	<b>98</b>
<b>Figura 49.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre (0,5 a 6,0) x (20 a 110) ppm.....	<b>99</b>
<b>Figura 50.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 3</b> na região entre (3,0 a 4,1) x 52 a 82) ppm.....	<b>100</b>
<b>Figura 51.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de <b>EPA 3</b> na região entre (0,4 a 4,4) x (10 a 80) ppm.....	<b>101</b>
<b>Figura 52.</b>	Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre (0,5 a 6,0) x (20,0 a 110,0) ppm.....	<b>102</b>
<b>Figura 53.</b>	Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> .....	<b>103</b>
<b>Figura 54.</b>	Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre (6,0 a 8,1) x (90,0 a 170,0) ppm.....	<b>104</b>
<b>Figura 55.</b>	Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre (0,8 a 4,6) x (20,0 a 170,0) ppm.....	<b>105</b>
<b>Figura 56.</b>	Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre 4,9 a 5,8) x (118,0 a 146,0) ppm.....	<b>106</b>
<b>Figura 57.</b>	Espectro de COSY (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre 0,0 a 8,0) x (1,0 a 8,5) ppm.....	<b>107</b>
<b>Figura 58.</b>	Expansão do espectro de COSY (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre 5,8 a 8,2) x (6,0 a 8,4) ppm.....	<b>108</b>
<b>Figura 59.</b>	Expansão do espectro de COSY (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 3</b> na região entre 1,0 a 6,0) x (0,0 a 6,0) ppm.....	<b>109</b>
<b>Figura 60.</b>	Espectro de massa do composto <b>EPA 4</b> .....	<b>114</b>
<b>Figura 61.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz, DMSO de <b>EPA 4</b> .....	<b>115</b>

<b>Figura 62.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região entre δ <sub>C</sub> 132,0 a 184,0 ppm.....	<b>116</b>
<b>Figura 63.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT (125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região entre δ <sub>C</sub> 94,0 a 128,0 ppm.....	<b>117</b>
<b>Figura 64.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> .....	<b>118</b>
<b>Figura 65.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região entre δ <sub>H</sub> 6,75 a 7,80 ppm.....	<b>119</b>
<b>Figura 66.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região entre δ <sub>H</sub> 4,30 a 5,50 ppm.....	<b>120</b>
<b>Figura 67.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região entre δ <sub>H</sub> 0,9 a 4,1 ppm.....	<b>121</b>
<b>Figura 68.</b>	Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região entre δ <sub>H</sub> 2,9 a 4,0 ppm.....	<b>122</b>
<b>Figura 69.</b>	Espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> .....	<b>123</b>
<b>Figura 70.</b>	Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (6,7 – 7,9 ppm) x (92,0 – 124,0 ppm).....	<b>124</b>
<b>Figura 71.</b>	Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (2,7 – 4,8 ppm) x (50,0 – 82,0 ppm).....	<b>125</b>
<b>Figura 72.</b>	Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (4,1 – 5,6 ppm) x (95,0 – 107,0 ppm).....	<b>126</b>
<b>Figura 73.</b>	Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (0,5 – 1,5 ppm) x (13,0 – 23,0 ppm).....	<b>127</b>
<b>Figura 74.</b>	Espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> .....	<b>128</b>
<b>Figura 75.</b>	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (6,6 – 7,9 ppm) x (90,0 – 170,0 ppm).....	<b>129</b>
<b>Figura 76.</b>	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (4,4 – 5,4 ppm) x (60,0 – 78,0 ppm).....	<b>130</b>
<b>Figura 77.</b>	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (3,0 – 4,0 ppm) x (10,0 – 170,0).....	<b>131</b>
<b>Figura 78.</b>	Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (4,8 – 5,3 ppm) x (136,0 -160,0 ppm).....	<b>132</b>
<b>Figura 79.</b>	Espectro COSY (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> .....	<b>133</b>

<b>Figura 80.</b>	Expansão do espectro COSY (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (6,8 –7,8 ppm) x (6,8 –7,9 ppm).....	<b>134</b>
<b>Figura 81.</b>	Espectro NOESY (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> .....	<b>135</b>
<b>Figura 82.</b>	Expansão do espectro NOESY (500 MHz, DMSO) de <b>EPA 4</b> na região de (5,0 –7,0 ppm) x (4,8 –7,0 ppm).....	<b>136</b>
<b>Figura 83.</b>	Espectro de massa e fragmentação por ESI-MS de <b>EPA 2</b> .....	<b>138</b>
<b>Figura 84.</b>	Espectro de massa e fragmentação por ESI-MS de <b>EPA 3</b> .....	<b>139</b>
<b>Figura 85.</b>	Espectro de massa e fragmentação por ESI-MS de <b>EPA 4</b> .....	<b>140</b>
<b>Figura 86.</b>	EPH1 – Estrutura do lupeol.....	<b>141</b>
<b>Figura 87.</b>	Espectro RMN <sup>13</sup> C APT (125 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de <b>EPH 1</b> .....	<b>143</b>
<b>Figura 88.</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H APT (500 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de <b>EPH 1</b> .....	<b>143</b>
<b>Figura 89.</b>	EPH1 –Estrutura do beta-sitosterol.....	<b>144</b>
<b>Figura 90.</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H APT (500 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de <b>EPH 2</b> .....	<b>146</b>
<b>Figura 91.</b>	Espectro RMN <sup>1</sup> H APT (500 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de <b>EPH 2</b> .....	<b>146</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Classificação botânica.....	<b>26</b>
<b>Tabela 2.</b>	Exemplos de flavonoides em espécies de <i>Erythroxylum</i> .....	<b>27</b>
<b>Tabela 3.</b>	Exemplos de terpenoides em espécies de <i>Erythroxylum</i> .....	<b>33</b>
<b>Tabela 4.</b>	Mecanismos de ação de compostos isolados com atividade antimicrobiana.....	<b>37</b>
<b>Tabela 5.</b>	Parâmetros utilizados para análises no espectrômetro de massas	<b>42</b>
<b>Tabela 6.</b>	Método (MFA 1) desenvolvido no cromatógrafo líquido de média pressão para fase acetato.....	<b>45</b>
<b>Tabela 7.</b>	Método (MFH 1) desenvolvido no cromatógrafo líquido de média pressão para fase hexano.....	<b>47</b>
<b>Tabela 8.</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ a 200 MHz e 50 MHz de EPA 1.....	<b>52</b>
<b>Tabela 9.</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CD}_3\text{OD}$ 500 MHz e 125 MHz de EPA 2.....	<b>62</b>
<b>Tabela 10</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em DMSO a 500 MHz e 125 MHz de EPA 3.....	<b>87</b>
<b>Tabela 11</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em DMSO a 500 MHz e 250 MHz de EPA 4.....	<b>113</b>
<b>Tabela 12</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CHCl}_3$ a 500 MHz e 125 MHz de EPH 1.....	<b>142</b>
<b>Tabela 13</b>	: Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ em $\text{CHCl}_3$ a 500 MHz e 125 MHz de EPH 2.....	<b>146</b>
<b>Tabela 14</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de <i>Erythroxylum pulchrum</i> .....	<b>148</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Alcaloides isolados da espécie <i>E. caatingae</i> .....	<b>24</b>
------------------	--	-----------

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b>	Representação do processo de partição.....	<b>44</b>
<b>Esquema 2.</b>	Processo cromatográfico da fase acetato de etila e isolamento de seus constituintes químicos.....	<b>46</b>
<b>Esquema 3.</b>	<b>Esquema 3.</b> Processo cromatográfico da fase hexânica e isolamento de seus constituintes químicos.....	<b>48</b>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1. Considerações sobre a família Erythroxylaceae .....	21
2.2. Considerações sobre o gênero <i>Erythroxylum</i> .....	21
2.3. Considerações sobre <i>Erythroxylum pulchrum</i> .....	24
2.4. Classificação botânica.....	25
2.5. Considerações sobre flavonoides.....	26
2.6. Aspectos químicos dos flavonoides.....	28
2.7. Considerações sobre terpenoides .....	32
2.8. Aspectos químicos dos terpenos.....	34
2.9. Plantas medicinais com potencial antimicrobiano.....	37
2.10. Concentração inibitória mínima.....	38
2.11 Seleção de microorganismos .....	38
3. OBJETIVOS.....	40
3.1. Objetivo geral.....	40
3.2. Objetivos específicos.....	40
4. METODOLOGIA.....	41
4.1. Materiais e equipamentos utilizados.....	41
4.2. Material vegetal.....	43
4.3. Processamento do material vegetal.....	43
4.4. Obtenção do extrato metanólico bruto .....	43
4.5. Particionamento do extrato metanólico bruto.....	43
4.6. Estudo da fase acetato.....	44
4.7. Estudo da fase hexânica.....	46
4.8. Análise microbiológica.....	48
4.8.1. Linhagens bacterianas .....	48
4.8.2. Meios de cultura.....	49
4.8.3. Técnica de microdiluição.....	49
4.8.4. Caracterização da atividade antibacteriana.....	50
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	51
5.1. Identificação EPA 1.....	51
5.2. Identificação de EPA 2.....	60
5.3. Identificação de EPA 3.....	84
5.4. Identificação de EPA 4.....	110
5.5. Análise de EPA 2, EPA 3 e EPA 4 por ESI-EM.....	138
5.6. Identificação de EPH1.....	141
5.7. Identificação de EPH2.....	144
5.8 Atividade antibacteriana.....	147
5.8.1 Avaliação do efeito antibacteriano do extrato de <i>Erythroxylum pulchrum</i> frente a bactérias de importância clínica.....	147
5.8.2. Caracterização da atividade antibacteriana do extrato de <i>Erythroxylum pulchrum</i> .....	148
6. CONCLUSÃO.....	149
7. REFERÊNCIAS .....	150

## **I. INTRODUÇÃO**

O mundo assiste a uma reformulação no estilo de vida. Os valores naturais ecológicos retornam com grande força, em todas as áreas do conhecimento científico e da vida prática. Assim, o uso de plantas para fins medicinais tem renovado o interesse pelo conhecimento das características morfológicas, composição química, propriedades farmacológicas, entre outras, de drogas delas originadas (ARGENTA *et al.*, 2011).

A combinação de avanços no estudo químico e farmacológico das plantas, com a ocorrência de efeitos colaterais de medicamentos convencionais, bem como, o aparecimento de doenças não convencionais, fez crescer o interesse mundial pelos fitoterápicos. Desta forma, mesmo diante de todo avanço da medicina moderna, uma boa parte das substâncias utilizadas pela indústria farmacêutica tem sua origem, direta ou indireta, nas plantas medicinais (BOTSARIS, 2011).

Analisando os medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, observa-se que 28% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais ou semissintéticos, ao passo que, 24% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais. (BRANDÃO *et al.*, 2010).

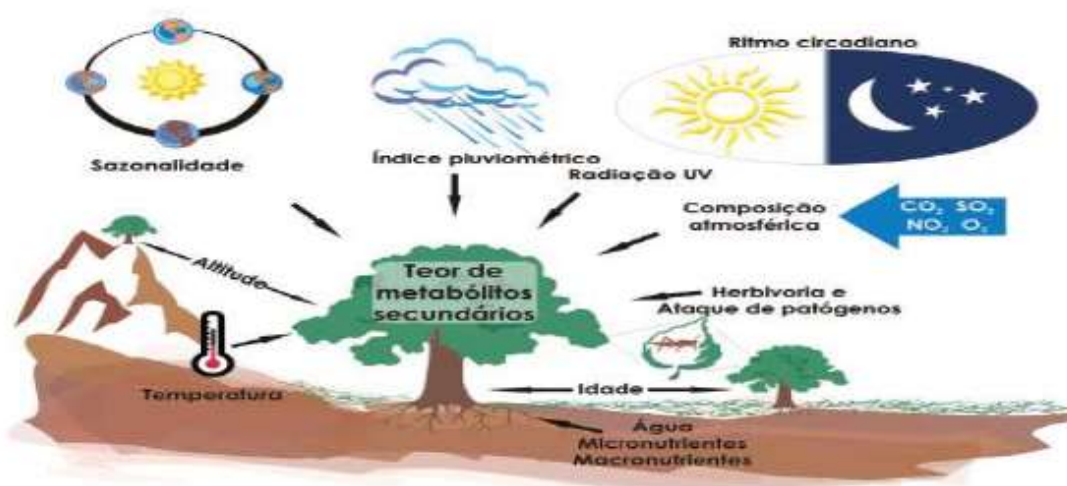
Outros dados mostram que as indústrias farmacêuticas atravessam uma crise de criatividade no desenvolvimento de moléculas bioativas inovadoras, que possam ser utilizadas como fármacos eficazes para o tratamento de novas e antigas doenças. Em 2010, as indústrias farmacêuticas lançaram 15 moléculas bioativas contra 39 introduzidas no mercado em 1997. Em função dessa crise de criatividade, as empresas farmacêuticas, que faturaram US\$ 850 bilhões em 2010 em todo o mundo e investiram 10% desse valor em pesquisa, desenvolvimento e inovação, voltam seus olhares para as moléculas desenvolvidas nas universidades. Assim, as moléculas bioativas mais inovadoras surgidas nas últimas décadas foram desenvolvidas nos laboratórios das indústrias farmacêuticas, mas com base no conhecimento produzido em universidades e centros de pesquisa (BARREIRO, 2011).

Nesta perspectiva, observa-se um interesse crescente do estudo de plantas, objetivando fins terapêuticos, aliados a uma boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico, e as altas cifras que circundam a comercialização de fitomedicamentos observada na última década (NOLDIM *et al.*, 2006).

Segundo projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), o mercado de medicamentos fitoterápicos movimentará de 400 milhões a 500 milhões de dólares por ano no Brasil. No mundo, estima-se que o gasto com plantas medicinais chegue à cifra de US\$ 27 bilhões (em torno de 7% do mercado mundial de medicamentos) (BANDEIRA *et al.*, 2011).

Neste contexto, o Brasil apresenta-se em uma posição privilegiada, dos cerca de duzentos países atuais, apenas dezessete são considerados megadiversos, por conterem 70% da biodiversidade mundial. O Brasil está em primeiro lugar nessa lista, abrangendo a maior diversidade biológica continental, principalmente no que se refere à biodiversidade vegetal (GANEN, 2011). O território abriga entre 15% e 20% de toda a biodiversidade do planeta e o maior número de espécies endêmicas. Desta forma, pelo menos a metade das espécies vegetais pode possuir alguma propriedade terapêutica útil à população (MILLANI *et al.*, 2010).

Neste sentido, os estudos mostram que os vegetais respondem a estímulos ambientais bastante variáveis, de natureza física, química ou biológica. Fatores tais como fertilidade e tipo do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica, dentre outros, podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais (Figura 1, pág. 19) (ALVES, 2001).



**Figura 1.** Principais fatores que podem influenciar no acúmulo de metabólitos secundários em plantas (GOBBO-NETTO & LOPES, 2007).

Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais são formados por vários caminhos biossintéticos que produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais. Tais moléculas têm se mostrado eficientes no combate e tratamento de doenças, neste sentido, a química e a medicina passam a ter uma estreita relação, permitindo rápido desenvolvimento de seus campos específicos (ALVES, 2001).

Assim, a área da química de produtos naturais, especialmente de vegetais, que se dedica ao isolamento, bem como, á caracterização estrutural, á avaliação de propriedades e ás investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos, representa uma área em expansão. Uma vez que, com desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas e espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar rapidamente estruturas moleculares complexas (CECHINEL-FILHO, 1998). Desta forma, as atividades da fitoquímica contribuem significativamente para a investigação da flora e seu quimismo, para divulgação e geração de novos conhecimentos e para formação de recursos humanos qualificados (BRAZ-FILHO, 2010).

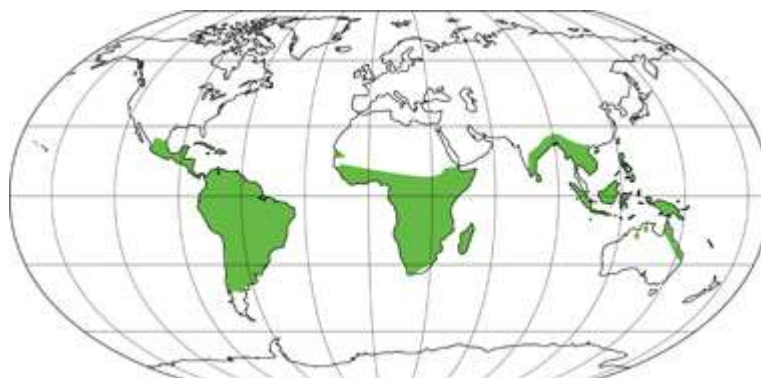
O estudo das plantas medicinais com finalidade terapêutica tem contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos importantes. Portanto, percebendo o potencial farmacológico e a importância do gênero, bem como, a ocorrência de muitas espécies de *Erythroxylum* encontradas na Paraíba, optou-se pelo estudo da espécie *Erythroxylum pulchrum* de cujos estudos químicos e farmacológicos ainda não são conhecidos, fato que poderá conduzir á descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Considerações sobre a família Erythroxylaceae

A família Erythroxylaceae compreende quatro gêneros e cerca de 240 espécies com distribuição pantropical, tendo seus principais centros de diversidade e endemismo na Venezuela, Brasil e Madagascar (DALY, 2004). A maioria das espécies pertence ao gênero *Erythroxylum* P. Browne, que apresenta distribuição ampla sendo encontrado nos quatro continentes, principalmente na América tropical (PLOWMAN, 2001). Os outros três gêneros, *Aneulophus* Benth., *Nectaropetalum* Engl. e *Pinacopodium* Exell, possuem poucas espécies e apresentam distribuição exclusiva na África (Figura 2, pág 21) (DALY, 2004).

Considerando a riqueza de espécies das famílias de Angiospermas na Caatinga do semi-árido do Nordeste do Brasil, Erythroxylaceae ocupa o 18º lugar (LOIOLA, 2007). Erythroxylaceae é uma importante família que produz metabólitos secundários ativos que vem demonstrando excelentes resultados frente ao sistema biológico (OLIVEIRA *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Distribuição geográfica da família Erythroxylaceae no mundo. (Laboratório de sistemática de plantas vasculares, 2011)

### 2.2. Considerações sobre o gênero *Erythroxylum*

É o maior gênero da família Erythroxylaceae, com ampla distribuição, nas regiões tropicais da Austrália, Ásia, África e Américas (LOIOLA *et al.*, 2007). É um grupo de grande versatilidade ecológica com espécies encontradas em ambientes

úmidos como a Floresta Amazônica e a Floresta Atlântica, e nas regiões semi-áridas, ocorrendo em diferentes níveis de elevações, desde o nível do mar até habitats montanhosos (DALY, 2004).

No Brasil, um dos principais centros de diversidade de espécies de *Erythroxylum*, são encontradas 116 espécies das 187 registradas para a América tropical por Plowman e Hensold em 2004. Destas, aproximadamente 74 (63,79%) possuem distribuição restrita. Para o nordeste brasileiro, foram listadas 66 espécies e uma variedade, dentre as quais 25 (37,31%) foram registradas apenas para essa região (LOIOLA, 2007).

Para a Paraíba foram registradas 13 (treze) espécies: *E. caatingae* Plowman, *E. citrifolium* A. St.-Hil, *E. nummularia* Peyr, *E. paufferrense* Plowman, *E. passerinum* Mart, *E. pulchrum* A. St.Hil, *E. pungens* O. E. Schulz, *E. revolutum* Mart, *E. rimosum* O. E. Schulz. *E. simonis* Plowman, *E. suberosum* var. *denudatum* O.E. Schulz, *E. subrotundum* A. St.-Hil. e *E. squamatum* Sw. encontradas nas diversas formações do Estado, como as florestas úmidas da Mata Atlântica, Brejos de Altitude, Matas Serranas, Restingas e áreas mais secas da Caatinga, como o Cariri Paraibano. As classes químicas de maior ocorrência no gênero são: alcaloides tropanos, terpenoides e flavonoides glicosilados (LOIOLA *et al.*, 2007).

O interesse pelo gênero intensificou-se no século XIX, após a descoberta das atividades farmacológicas apresentadas pelas folhas de *Erythroxylum coca* Lam, que secularmente eram empregadas pelos indígenas da região andina da América do Sul (ZUANAZZI, *et al.*, 2001). As folhas de coca foram amplamente utilizadas por tribos nativas da América do Sul há milhares de anos. O gênero caracteriza-se pela presença de alcaloides do grupo tropano, dentre os quais se destaca a cocaína, um alcaloide natural produzido por *E. coca* Lam, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (GRIFFIN & LIN, 2000). Todavia, a cocaína tomou notoriedade por sua atividade psicoativa no sistema nervoso central, tornando-se um dos grandes problemas de saúde pública (TAMAGNAN *et al.*, 2004)

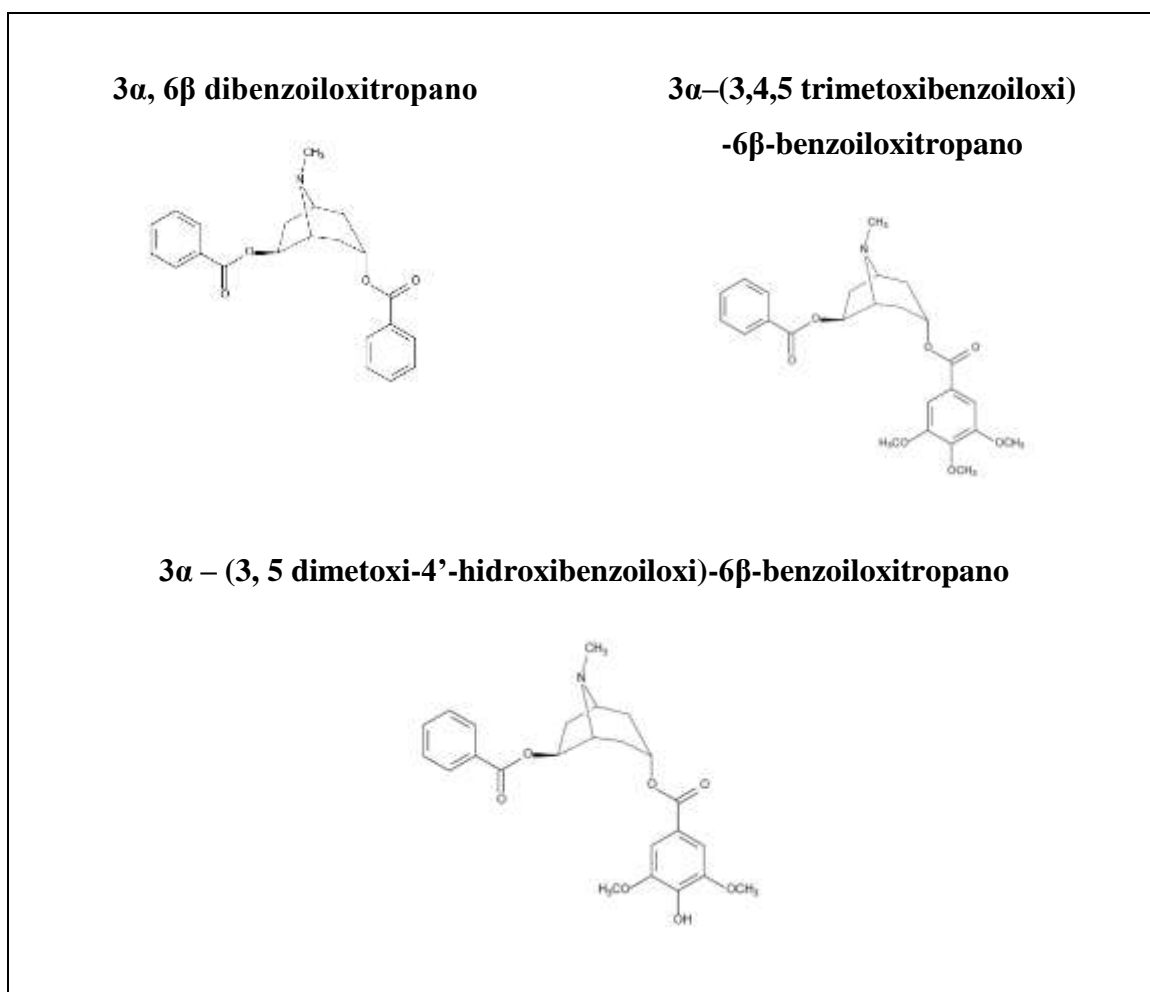
Algumas espécies são reconhecidas como potencial farmacológico, *Erythroxylum vacciniifolium* Mart, conhecida popularmente por “catuaba”, é usado como estimulante do sistema nervoso central, apresenta propriedades afrodisíacas e mostrou efeito contra infecções oportunistas em pacientes com HIV (ZANOLARI *et al.*, 2003). *E. pelleterianum* A. St. -Hil é usada para o tratamento de dores estomacais. Já *E. myrsinites* Mart. e *E. suberosum* A. St. -Hil são utilizadas na indústria de curtume

(LOIOLA, 2007). *E. moonii* apresentou atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias, fungos e leveduras (RAHMAN *et al.*, 1998). O extrato etanólico de partes aéreas de *E.gonocladum*, uma espécie endêmica do cerrado brasileiro, promoveu, significativamente a inibição da ECA *in vitro* e a sua atividade não diferiu do captopril (LUCAS-FILHO *et al.*, 2010).

As espécies do gênero *Erythroxylum* podem ser empregadas no estudo e pesquisa de fármacos com atividade antitumoral. Uma vez que, nove alcaloides tropanos foram isolados a partir das raízes de *Erythroxylum pervillei*, em seguida, avaliados quanto a atividade antitumoral, com os resultados, observou que seis destes alcaloides (Pervilleine A-F) apresentaram atividade em células tumorais do tipo KB-V1 (SILVA *et al.*, 2001).

Estudos realizados com outras espécies de *Erythroxylum* coletadas na Paraíba mostraram a presença de substâncias isoladas e de extratos com potencial farmacológico. O estudo fitoquímico do caule de *Erythroxylum caatingae*, espécie exclusiva da região nordeste, resultou no isolamento e identificação estrutural de três alcaloides tropanos (OLIVEIRA, 2008) (Quadro 1, pág. 24). Assim, o extrato metanólico e o alcaloide 3 $\alpha$ -(3,4,5 trimetoxibenzoiloxi)-6 $\beta$ -benzoiloxitropano isolado da espécie *Erythroxylum caatingae* apresentaram atividade antimicrobiana frente a fungos e bactérias Gram positivas, e antitumoral contra as linhagens de células NCI-H292, HEP-2 e K562 (AGUIAR *et al.*, 2011). Outra espécie presente na região da Paraíba, a *Erythroxylum pungens*, rico em alcaloides tropanos, apresentou atividade anti-hipertensiva, pois provocou relaxação de vasos, reduzindo a concentração de cálcio intracelular em células vasculares do músculo liso de ratos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

**Quadro 1.** Alcaloides isolados da espécie *E. caatingae* (OLIVEIRA, 2008).



### 2.3. Considerações sobre a espécie *Erythroxylum pulchrum*

Espécie exclusiva da flora brasileira, com distribuição no Nordeste e Sudeste do país, encontrada em Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Figura 3, pág. 25) (PLOWMAN & HENSOLD 2004). *E. pulchrum* só foi encontrada na Paraíba em uma área de Floresta Serrana, em elevações de 900 a 1.000 m de altitude. (LOIOLA, *et al.*, 2007). É conhecida popularmente por arco-de-pipa, cocão, guareita e sobragil e utilizado popularmente para dores do estômago e distúrbios gástricos (LIBER-HERBARIUM, 2013).



**Figura 3.** Mapa de distribuição da *Erythroxylum pulchrum* A. St.- Hil no Brasil.  
**Fonte:** Adaptado de CNCFLORA.

#### 2.4. Classificação botânica

A posição sistemática da família e suas afinidades têm apresentado controvérsias entre os diferentes autores. Cronquist (1988) (Tabela 1, pág 26) a posicionou na ordem Linales baseado principalmente na morfologia foliar e presença de vasos escalariformes. Estudos moleculares recentes (SCHWARZBACH & RICKLEFS, 2000), apoiados em caracteres morfológicos e anatômicos listados por Dahlgren (1988), evidenciaram a grande afinidade entre Erythroxylaceae e Rhizophoraceae e sugeriram seu posicionamento na ordem Malpighiales (LOIOLA, 2007).

**Tabela 1.** Classificação botânica (CRONQUIST, 1981).

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Divisão</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Classe</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Ordem</b>	<b>Malpighiales</b>
<b>Família</b>	<b>Erythroxylaceae</b>
<b>Gênero</b>	<i>Erythroxylum</i>
<b>Espécie</b>	<i>Erythroxylum pulchrum</i> A.St.-Hil

## 2.5. Considerações sobre flavonoides

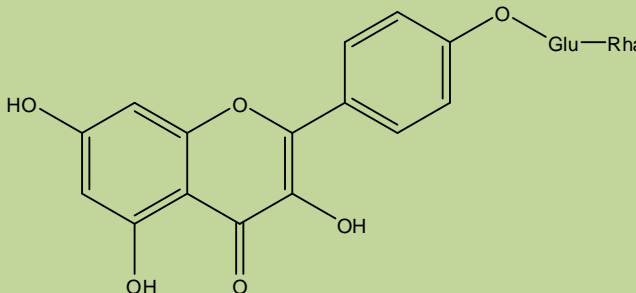
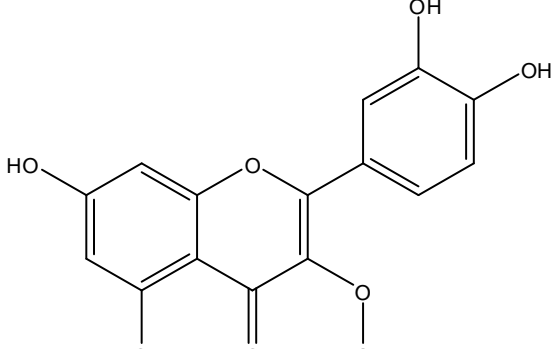
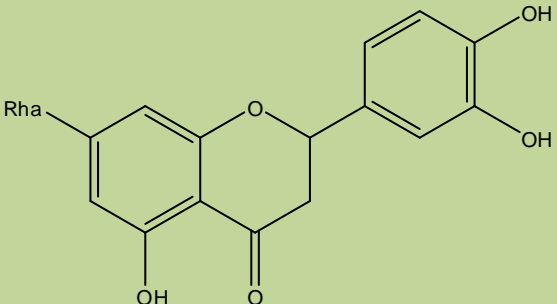
As plantas realizam o processo de fotossíntese para produzir todas as substâncias necessárias a sua sobrevivência no ciclo de vida da natureza. É cada vez mais conhecido mecanismos bioquímicos que constituem verdadeiras fábricas químicas de carboidratos, proteínas, gorduras, vitaminas e oligo-elementos. Estes são a base da cadeia alimentar que suporta todas as outras formas de vida em nosso planeta. Há compostos que são distribuídos e se restringem a apenas a determinadas espécies, gêneros ou famílias, como por exemplo, os flavonoides chamados de metabólitos secundários (SIMÕES *et al.*, 2003).

Os flavonoides foram descobertos em 1930, pelo vencedor do prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia, Dr. Albert Szent- Gyorgy, chamando-os de "vitamina P". Ele descobriu que estes compostos possuíam a capacidade de fortificar as paredes dos capilares favorecendo a função da vitamina C, melhorando, assim, a absorção e protegendo-os contra a oxidação (RUSSO *et al.*, 2006). Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonoides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, e de ativar sistemas de enzimas, incluindo ciclooxygenases e hipoxigenases. Esses efeitos são devidos a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (SILVA *et al.*, 2001).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Eles participam de importantes funções de crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra ataque de

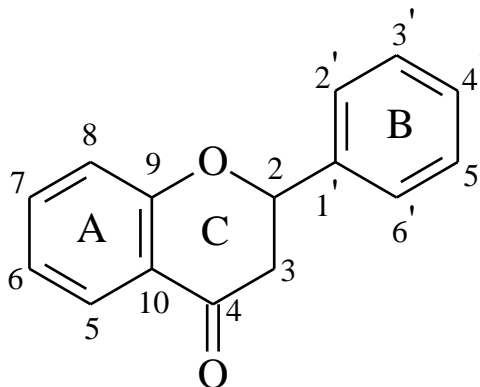
patógenos (DIXON e HARRISON, 1990). São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos. Amplamente distribuídos no reino vegetal. Presente em abundância em angiospermas (SIMÕES *et al.*, 2003). São predominantes em algumas espécies do gênero *Erythroxylum*, sendo considerado um dos marcadores quimiotaxonômico para o gênero (Tabela 2, pág. 27) (LOIOLA *et al.*, 2007).

**Tabela 2.** Exemplos de flavonoides em espécies de *Erythroxylum*.

	<p><i>Erythroxylum coca</i></p> <p>Camferol-4'-O-(raminose) glucose</p> <p>(JOHNSON <i>et al.</i>, 2003)</p>
	<p><i>Erythroxylum nummularia</i></p> <p>quercetina-3-O-β-glicopirranose</p> <p>(BARREIRO <i>et al.</i>, 2005)</p>
	<p><i>Erythroxylum australe</i></p> <p>7-O-raminose-5, 3', 4'-OH eriodictiol</p> <p>(JOHNSON <i>et al.</i>, 2004)</p>

## 2.6. Aspectos químicos dos flavonoides

Apresentam um núcleo característico com 15 átomos de carbono arranjados em três anéis ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Figura 4, pág 28), que são denominados A, B e C, como consequência da ligação de dois grupos fenila a uma cadeia de três carbonos, ou seja, são derivados difenil propânicos, sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e via acetato (Figuras 5 e 6, págs, 30 e 31) (COUTINHO *et al.*, 2009).



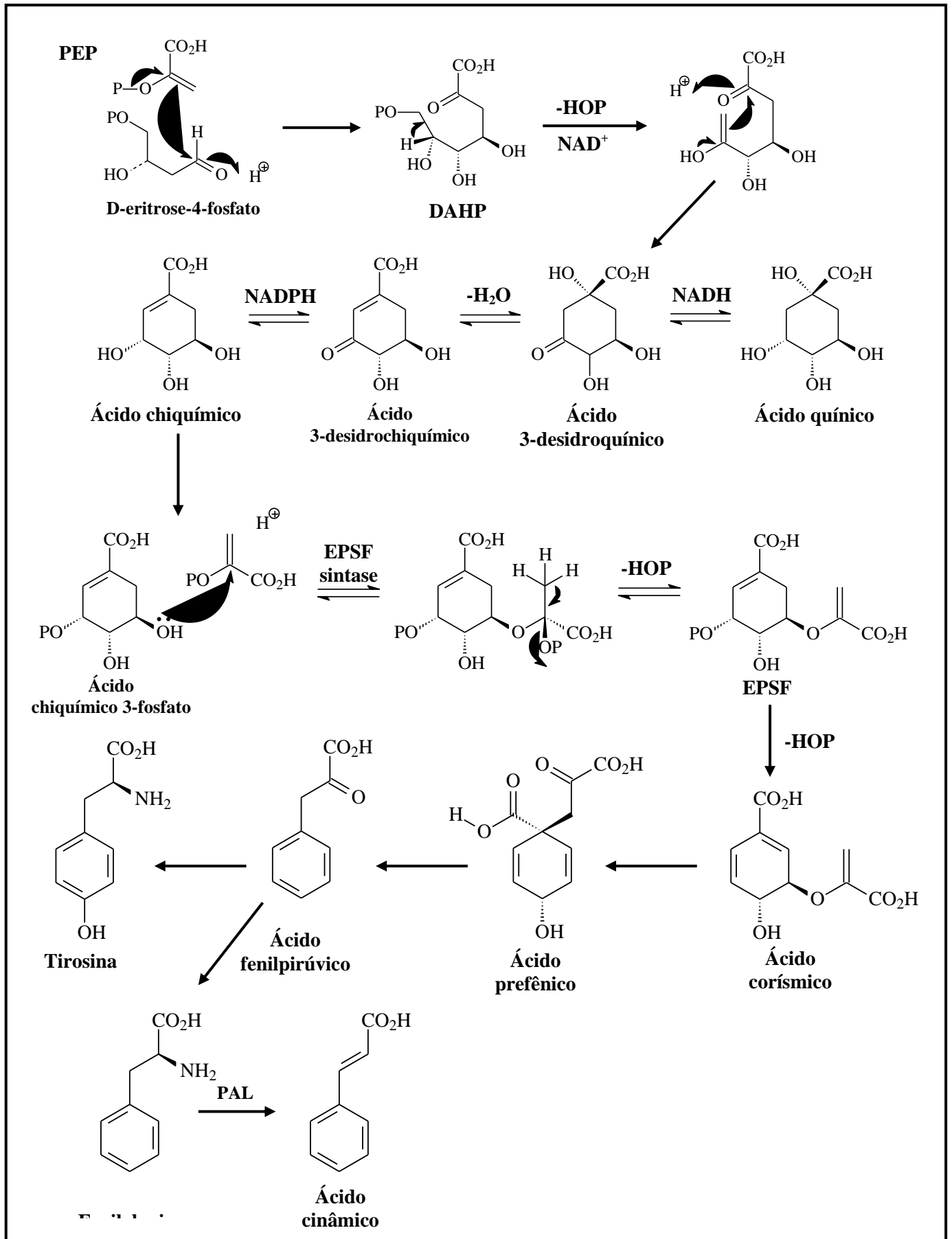
**Figura 4:** Esqueleto básico dos flavonoides.

A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico. Podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados. As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas (COUTINHO *et al.*, 2009). São usualmente oxigenadas e possuem substituintes do tipo: hidroxila, metoxila, metilenodioxila e prenila. São isolados de um grande número de plantas vasculares, com aproximadamente 8.000 compostos individuais conhecidos (PIETTA, 2000).

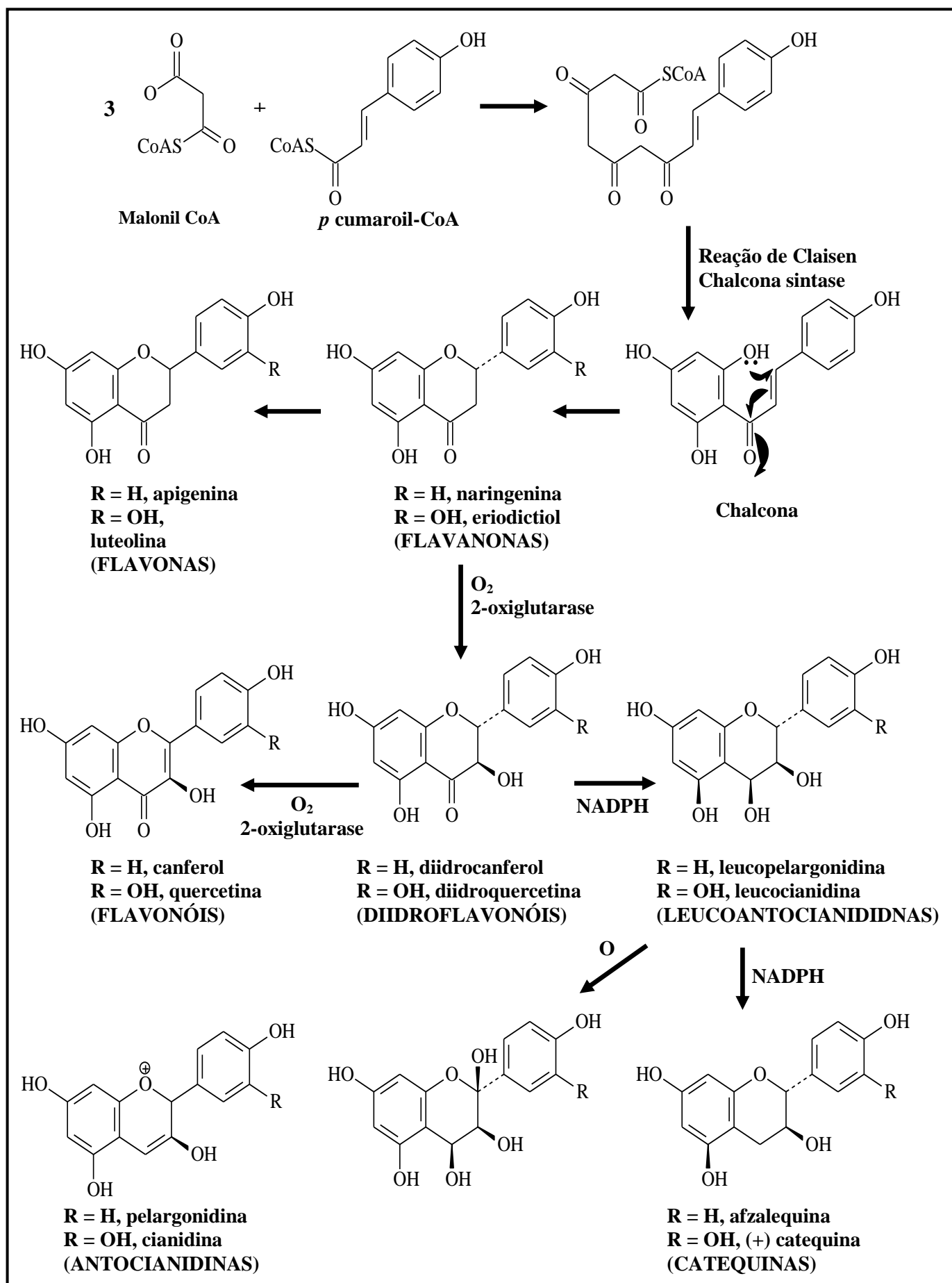
Muitos flavonoides ocorrem como O-glicosídios, em que um ou mais grupos de hidroxilas estão ligados a um ou mais açúcares. Esta forma chamada de conjugada é conhecida também como heterosídios. Alguns tipos de oxigenação, como aqueles das posições dos carbonos 5, 7, 3' e 4', são sempre os mesmos para as classes de flavonóis e flavonas por serem originários da mesma via biossintética. Nos flavonoides C-glicosídios, a ligação é feita entre o carbono anomérico C-1 (anomérico) do açúcar e um ou dois carbonos do anel A do flavonoide (sempre nos carbonos 6 e/ ou 8) (SIMÕES *et al.*, 2003). Quando o metabólito ocorre sem conjugação com esses carboidratos, ou

então, quando é submetido á hidrólise ácida, é denominada aglicona ou genina (ZUANAZZI *et al.*, 2001).

Entre os heterosídeos de flavonoides, as variações estruturais são consideráveis. Os açúcares conjugados com flavonoides identificados até o momento são nove. As pentoses: D-apiose, L-arabinose, L-raminose e D-xilose, e as hexoses: D-alose, D-galactose e D- glicose e os ácidos D-galacturônico e D- glicurônico. Os flavonoides podem, também, estar associados a dissacarídeos e a trissacarídeos (SIMÕES *et al.*, 2003).



**Figura 5:** Representação esquemática da biossíntese dos flavonoides segundo Dewick (2002) (primeira etapa – rota do ácido chiquímico).

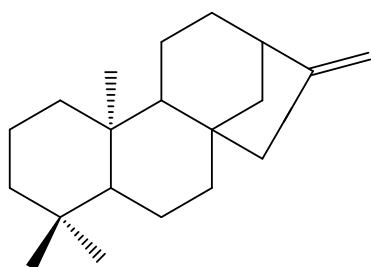


**Figura 6:** Representação esquemática da biossíntese dos flavonoides segundo Dewick (2002) (segunda etapa – rota do acetato polimalonato).

## 2.7. Considerações sobre terpenoides

Os terpenoides apresentam funções variadas nos vegetais e de modo geral possuem diversas atividades farmacológicas (NIERO; MALHEIROS, 2007). Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos voláteis, importantes comercialmente na fabricação de sabões, detergentes, cosméticos e perfumaria, além de serem atrativos dos polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenoides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenoides e seus derivados esteroidais apresentam uma gama de funções como proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (NIERO; MALHEIROS, 2007). São predominantes em algumas espécies do gênero *Erythroxylum*, sendo considerado um dos marcadores quimiotaxonômico para o gênero (LOIOLA *et al.*, 2007) (Tabela 3, pág. 33).

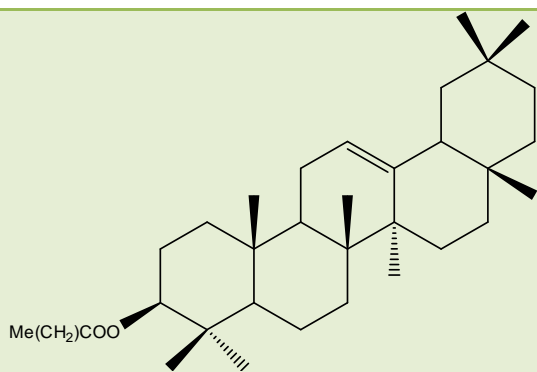
**Tabela 3.** Exemplos de terpenoides em espécies de *Erythroxylum*



*Erythroxylum revolutum*

*ent*-cauran-16-eno

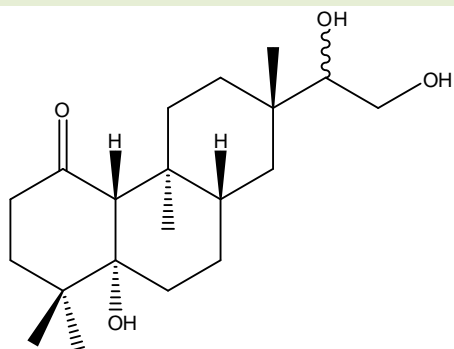
(OLIVEIRA, 2012)



*Erythroxylum confusum*

palmitato de  $\beta$ -amirina

(GONZALEZ-LAVAUT *et al.*, 2008)



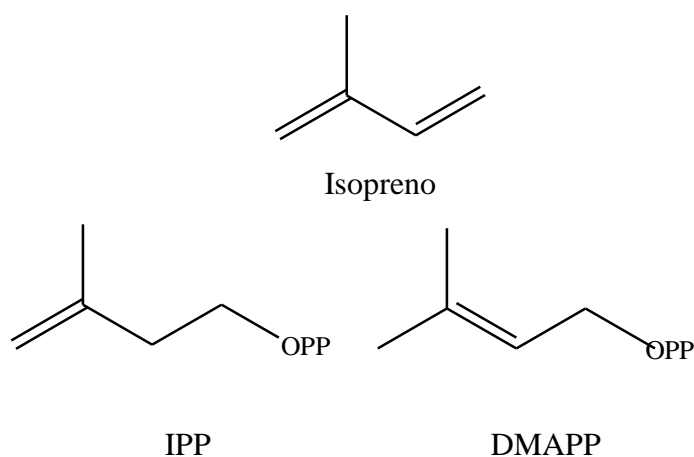
*Erythroxylum barbatum*

*ent*-rosan-1-one-5 $\alpha$ ,15,16-triol

(SANTOS *et al.*, 2006)

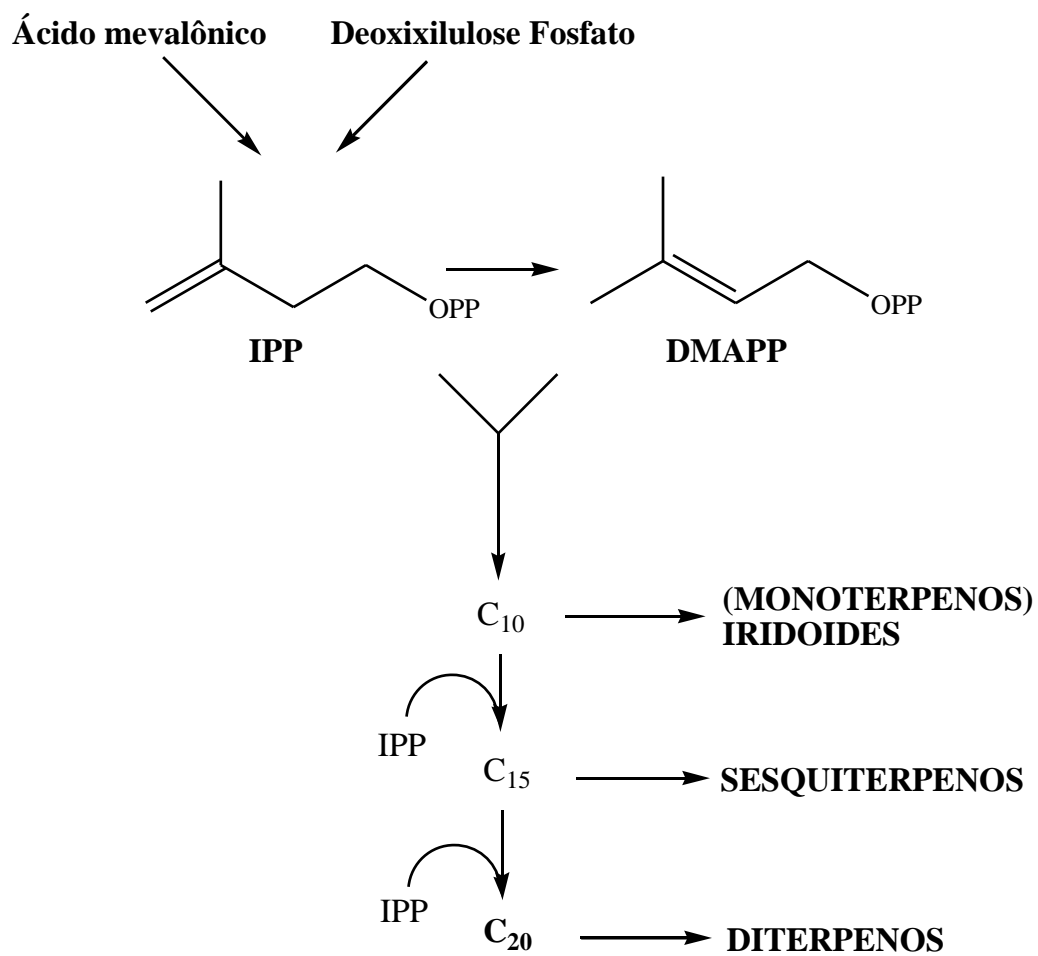
## 2.8 Aspectos químicos dos terpenoides

Os terpenos constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo que esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isoprenos. Isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido na formação destes compostos, e as unidades bioquimicamente ativas do isopreno foram identificadas como o dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) (Figura 7, pág 34).

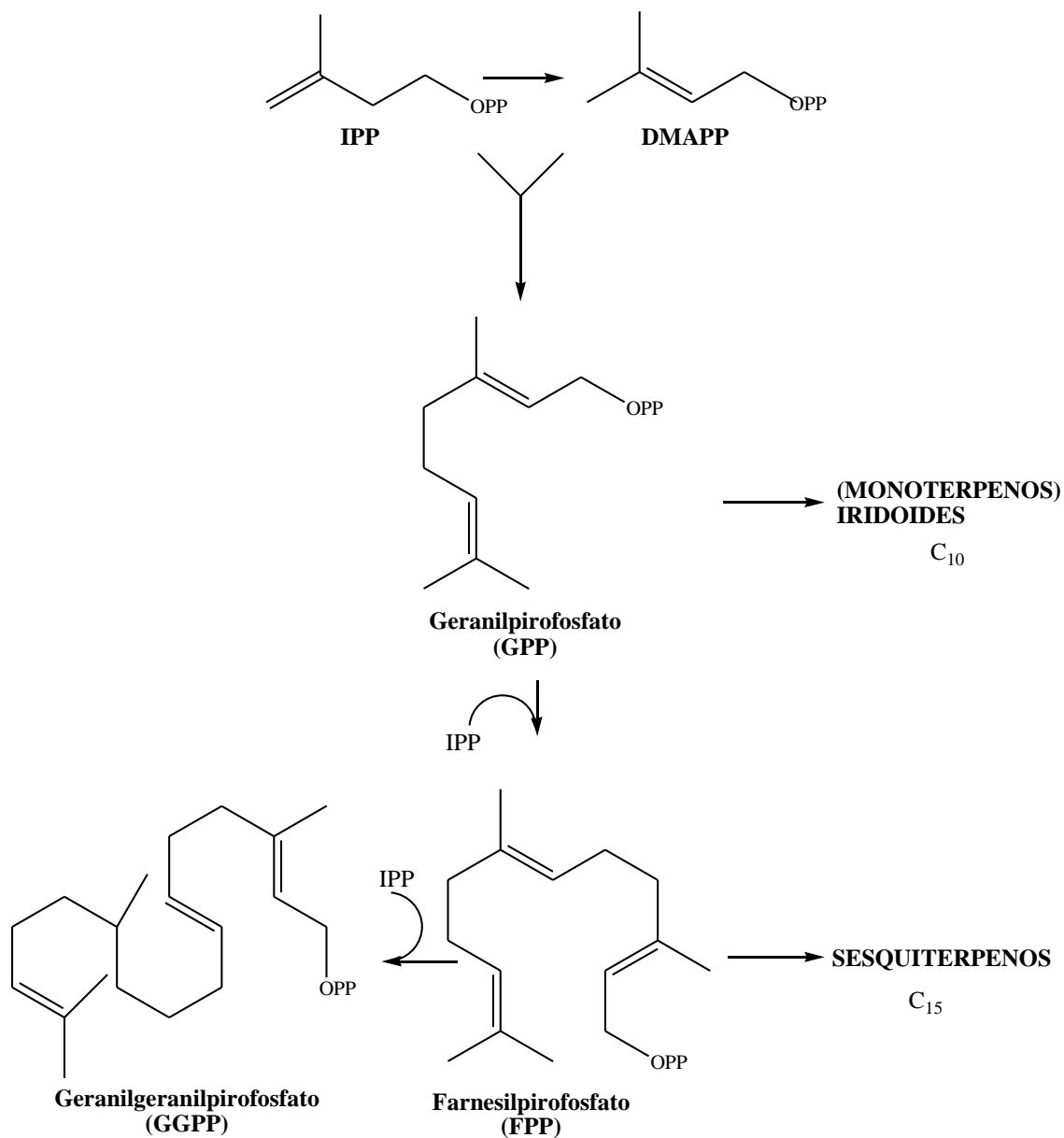


**Figura 7:** Representação de unidades isoprênicas

A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico (Figura 8, pág 35). Os esqueletos carbônicos dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (= unidades isoprênicas), através de ligações *cabeça-cauda* entre as moléculas de IPP e seu isômero DMAPP formando o *trans*-geranyl-pirofosfato, a partir dos quais se formam os demais terpenos (SIMÕES *et al.*, 2003) (Figura 9, pág 36).



**Figura 8:** Biossíntese geral dos terpenoides (Adaptado de Dewick, 2002).



**Figura 9:** Formação do Geranilgeranilpirofosfato (GGPP) (Adaptado de Dewick, 2002).

## 2.9. Plantas medicinais com potencial antimicrobiano

Em decorrência dos problemas devido ao uso abusivo de prescrições médicas de antibióticos tradicionais, os microbiologistas clínicos têm demonstrado grande interesse na investigação de extratos de plantas, com potencial antimicrobiano (VOLPATO, 2005). A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006).

A maioria das plantas possui compostos que são antimicrobianos. Na Tabela 4 são apresentados os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos vegetais de acordo com as classes já estudadas. Geralmente, os mecanismos de ação de compostos naturais são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios, serem afetados em consequência de outros mecanismos (SILVA, 2010).

Algumas espécies de *Erythroxylum* vêm sendo relatadas na literatura por apresentar atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias, fungos e leveduras. O extrato metanólico de *Erythroxylum caatingae* apresentou atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias gram positivas (AGUIAR *et al.*, 2011). Bem como, óleos essenciais de *Erythroxylum coca* apresentaram atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (VENTURA *et al.*, 2009).

**Tabela 4.** Mecanismos de ação de compostos isolados com atividade antimicrobiana.

Classes de compostos	Exemplos	Mecanismo de ação
Fenóis simples	Epicatequina	Desintegração da membrana
Flavonoides	Crisina	Ligação com adesinas
Flavonas	Abissinona	Inativa enzimas e inibe HIV transcriptase reversa
Terpenóides	Capsaicina	Desintegração da membrana

**Fonte:** Adaptado de Cowan (1999).

## 2.10 Concentração inibitória mínima

As propriedades antimicrobianas têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo mundo. Geralmente, são estudadas, avaliadas e confirmadas por meio de ensaios biológicos *in vitro* (susceptibilidade e sensibilidade). Estes ensaios são realizados por meio de técnicas padronizadas como pela determinação da concentração inibitória mínima - CIM (FERNANDES, 2011). A CIM é um teste usado para determinar a concentração mínima em que um produto apresenta atividade bactericida ou bacteriostática. Uma das técnicas utilizadas para a determinação deste dado é por microdiluição em placas que possuem 94 poços.

## 2.11 Seleção de microorganismos

Geralmente são utilizados nos ensaios microbiológicos, gêneros e espécies de bactérias ou fungos ou outros microorganismos oportunistas ou patogênicos. Podem ser cepas padrão como American Type Culture Collection - ATCC ou microorganismos isolados a partir de materiais biológicos. Nestes testes de atividade antimicrobiana sempre se incluem bactérias Gram-positivas, Gram-negativas que representam bactérias ácido resistente (VOLPATO, 2005).

*Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva pertencente à família Baccillaceae, as células têm forma de bacilos grandes, geralmente móveis, formando esporos que lhes conferem a capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis tais como: altas temperaturas, baixa umidade e ausência de nutrientes. É um saprófita comum do solo e da água, porém algumas espécies, acidentalmente provocam infecções (TRABULSI, 2004).

*Staphylococcus aureus* pertence à família Staphylococcaceae, se apresentam como cocos Gram positivos que formam grupos com aspecto de cachos de uvas com cor amarelada. Normalmente, está associado com infecções da pele e do trato respiratório inferior. *S. aureus* tem uma grande importância clínica uma vez que é a principal causa de infecções hospitalares adquiridas nos berçários, em cirurgias e em procedimentos médicos invasivos. Algumas linhagens têm se mostrado muito resistentes a vários antibióticos (HOLT *et al.*, 1994).

*Pseudomonas aeruginosa* pertence à família Pseudomonadaceae caracteriza-se como bastonete Gram negativo reto ou ligeiramente curvo. Comporta-se como um

patógeno oportunista iniciando infecções em indivíduos com baixa resistência e freqüentemente está associada com infecções do trato respiratório, urinário e lesões na pele resultantes de queimaduras graves ou outros traumatismos. Esta bactéria, naturalmente resistente a muitos dos antibióticos amplamente utilizados, é comumente encontrada no ambiente hospitalar e pode infectar facilmente os pacientes que estão recebendo tratamento para outras doenças (MADIGAN; MARTINKO, 2004).

*Escherichia coli* é um bacilo Gram negativo pertencente à família das Enterobacteriaceae. *E. coli* é o membro mais bem conhecido da microbiota normal do intestino humano, mas também é um patógeno gastrointestinal versátil que pode estar envolvido na diarreia infantil, ocasionalmente ocorrendo em proporções epidêmicas em berçários ou enfermarias obstétricas. *E. coli* também pode causar infecções no trato urinário de pessoas mais velhas ou naquelas cuja resistência está diminuída devido a cirurgias ou exposição à radiação ionizante. As linhagens entero patogênicas de *E. coli* estão freqüentemente envolvidas nas infecções semelhantes à disenteria e febres generalizadas (TORTORA, 2005).

*Streptococcus* são bactérias Gram positivas em forma de cocos. São largamente distribuídos na natureza e comensais em animais. Espécies potencialmente patogênicas e não patogênicas podem estar presentes na pele e nas mucosas do trato genital, no trato respiratório e digestivo superiores. A pneumonia e a meningite são as manifestações mais frequentes (TORTORA, 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Contribuir para o estudo químico, quimiotaxonômico e farmacológico do gênero *Eythroxylum* da Paraíba, através do estudo da espécie *Erythroxylum pulchrum*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Isolar constituintes químicos de *Erythroxylum pulchrum*;
- Identificar ou elucidar a estrutura de seus constituintes químicos através de técnicas de IV, EM e RMN (uni e bidimensionais);
- Contribuir com a quimiotaxonomia da espécie em estudo;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato metanólico de *Erythroxylum pulchrum* frente a linhagens de microrganismos de importância clínica, por meio da CIM;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Materiais e equipamentos utilizados

- Aparelho de Cromatografia Líquida Média Pressão BÜCHI Pump Manager.
- Cromatografias de adsorção em colunas foram realizadas em colunas de vidro de comprimentos e diâmetros variados, utilizando como adsorvente sílica gel 60, ART 7734 da MERCK, com granulometria entre 0,063- 0,200 mm e 0,04 -0,063 mm. Utilizou-se ainda, como fase estacionária Sephadex LH- 20.
- Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foi preparada com sílica gel 60 PF<sub>254</sub> artigo 7749, Merck, suspensa em água destilada (1:2), espalhada sobre placas de vidro por meio de um cursor “Quickfit” que conferia a camada espessura de 0,25. As cromatoplasmas obtidas eram secas ao ar livre e, em seguida, ativadas em estufa a 110 °C durante duas horas.
- As revelações das cromatoplasmas foram realizadas por exposição por luz ultravioleta, por meio do aparelho Mineralight, modelo UVGL-58 com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) e reveladas com vapores de iodo para as placas analíticas.
- Os espectros de absorção na região de infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro, MODELO BOMEM SERIE 100MB, na faixa de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, utilizando-se pastilhas de KBr (0,5 mg da amostra/ 100 mg de KBr).
- Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetros VARIAN-NMR SYSTEM, operando a 500 MHz para hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H) e a 125 MHz para carbono-13 (RMN <sup>13</sup>C). e a 200 MHz para hidrogênios (RMN <sup>1</sup>H) e 50MHz para carbono 13(RMN <sup>13</sup>C). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hz. As multiplicidades das RMN <sup>1</sup>H foram indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto),

*sl* (simpleto largo), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (tripleto), *tl* (tripleto largo) e *m* (multiplete).

- Os espectros de massas das substâncias foram obtidos em modo de íons negativos pela técnica de Ionização por Eletrospray (-) utilizando um espectrômetro de massas de alta resolução (Bruker, Microtof II) do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise LMCA UFPB usando os seguintes parâmetros (Tabela 5, pág 42)

**Tabela 5:** Parâmetros utilizados para análises no espectrômetro de massas

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Condições de ionização	ESI- negativo
<b>Scan Auto MSn</b>	50-1000 uma
Gás nebulizador	Nitrogênio
<b>Pressão do gás nebulizador</b>	8 psi
Fluxo do gás nebulizador	5,0 L/min
<b>Temperatura do gás nebulizador</b>	220 °C
Faixa de obtenção dos espectros	

- Os solventes utilizados foram hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, puro ou em misturas binárias, segundo gradiente crescente de polaridade.
- Autoclave Qualxtron – estufa de cultura bacteriológica. Temperatura de 37 °C.
- Elisa readwell plate analyser Robonilk.
- Vórtex Motion II LOGGN.
- Balança de precisão. Celtac- FA-2104N.

## **4.2. Material vegetal**

As partes aéreas da espécie *Erythroxylum pulchrum* (folhas e gravetos) foram coletados no Pico do Jabre, localizada no município de Maturéia no estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Prof. Dra. Maria de Fátima Agra, uma exsicata da planta está depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da Universidade Federal da Paraíba sob o código Agra 4947.

## **4.3. Processamento do material vegetal**

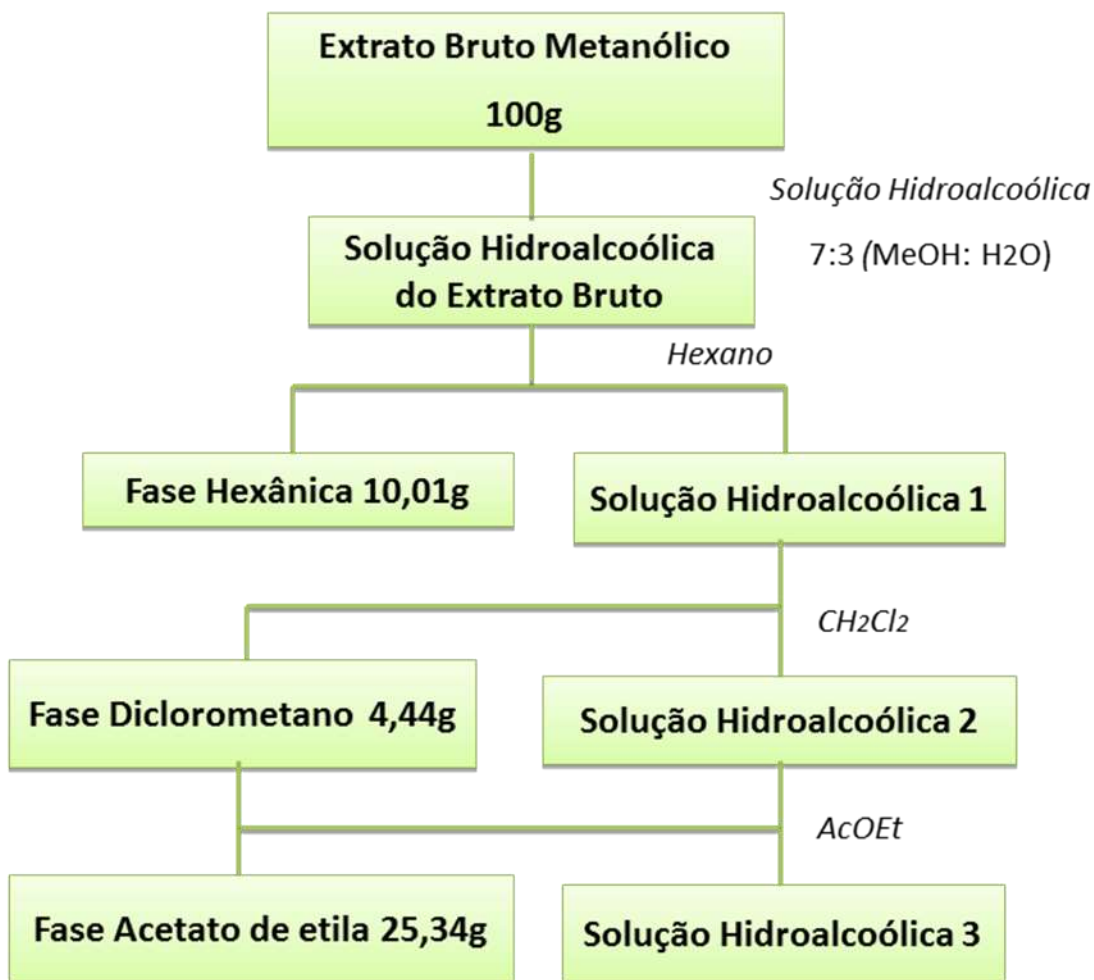
O material vegetal foi dessecado em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se o pó da planta com peso de 1.376,40 g.

## **4.4. Obtenção do extrato metanólico bruto**

O pó obtido (1.376,40g) foi submetido à maceração com metanol durante 72 horas. Esse processo de maceração foi repetido 3 vezes, resultando na solução do extrato metanólico bruto (EMB). Após a extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida e a uma temperatura de 40°C obtendo, assim, o extrato metanólico bruto (281,33g). O rendimento foi de 20% em relação à massa do pó obtido inicialmente.

## **4.5. Particionamento do extrato metanólico bruto**

Parte do extrato (100g) foi dissolvido em metanol-água (7:3) e, em seguida, submetido a sucessivas partições líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades em um funil de separação de 150 mL, fornecendo as frações hexânica (10,01g), diclorometano (4,44g) e acetato de etila (25,34g). Cerca de 60% do material ficou retido na solução hidroalcolica (Esquema 1, pág. 44).



**Esquema 1.** Representação do processo de partição.

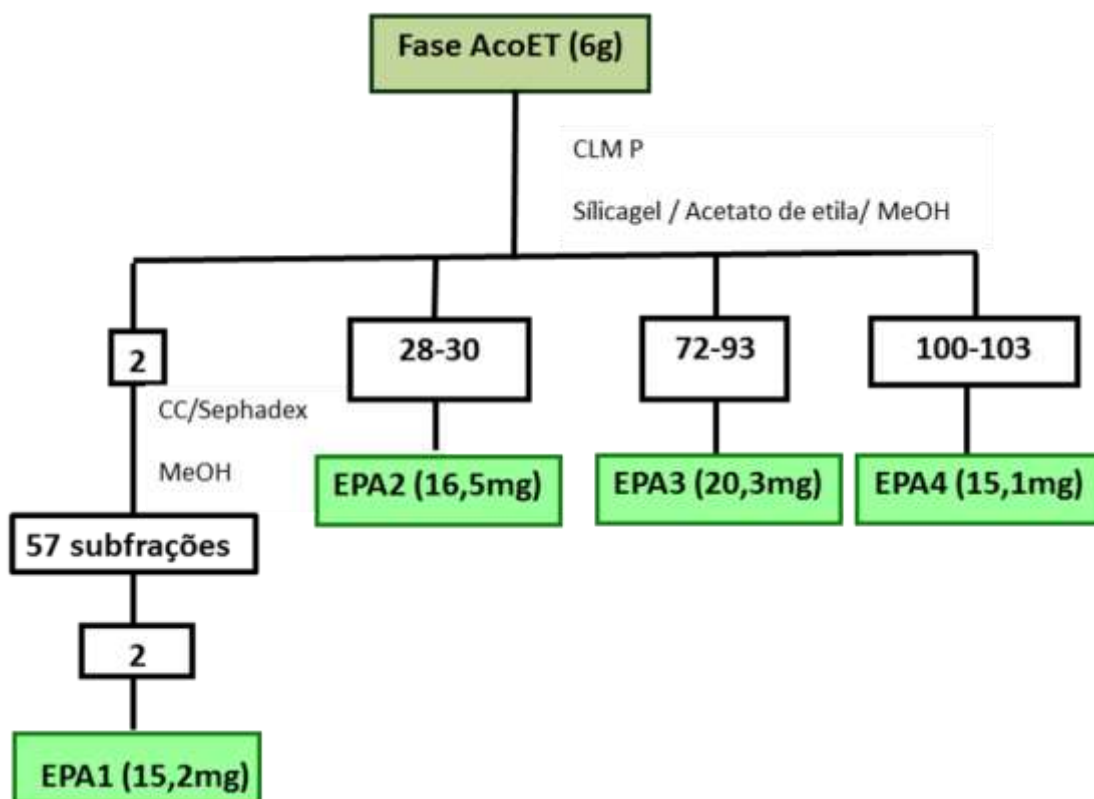
#### 4.6. Estudo da fase acetato

Uma quantia da fase acetato (6g) foi submetida a uma coluna cromatográfica líquida de média pressão, utilizando sílica gel como adsorvente. A amostra foi aplicada líquida solubilizada em acetato de etila (Tabela 6, pág. 45). Foram utilizados acetato de etila e metanol como eluentes puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade. Esse método foi codificado como **MFA 1**. Foram obtidas, com o método **MFA 1**, 123 frações das quais foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), eluídas em diversos sistemas de solventes e reunidas de acordo com os seus  $R_f$ 's. A fração 2 foi submetida a cromatografia em coluna com Sephadex utilizando metanol como fase móvel, obtendo assim, 57 subfrações das quais, a de número dois apresentou aparência de uma substância amorfa alaranjada codificada como **EPA 1** (15,2mg). As frações 28, 29 e 30 foram reunidas, apresentando aparência

de uma substância amorfa amarelada codificada como **EPA 2** (16,5 mg). As frações 72 á 93 foram reunidas apresentando uma aparência amorfa amarelada, codificada como **EPA 3** (20,3mg). As frações 100 á 103 foram reunidas apresentando uma aparência amorfa amarelada codificada como **EPA 4** (15,1mg) (Esquema 2, pág. 46). Todas essas frações foram submetidas à análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono treze (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) Infravermelho (IV) e a espectrometria de massas EM para a identificação estrutural.

**Tabela 6.** Método (MFA 1) desenvolvido no cromatógrafo líquido de média pressão para fase acetato.

<b>MFA1</b>		
<b>Sistema de Solventes</b>	<b>Tempo de Corrida</b>	<b>Frações Obtidas</b>
<b>Isocrático</b>		
<b>100% Acetato de Etila</b>	Uma hora	1 a 6
<b>Gradiente</b>		
<b>100% a 99% Acetato de Etila</b>	Uma Hora	7 a 17
<b>0% a 1% Metanol</b>		
<b>Gradiente</b>		
<b>99% a 95% Acetato de Etila</b>	Duas Horas	18 a 61
<b>1% a 5% Metanol</b>		
<b>Gradiente</b>		
<b>95% a 90% Acetato de Etila</b>	Duas Horas	62 a 82
<b>5% a 10% Metanol</b>		
<b>Gradiente</b>		
<b>90% a 50% Acetato de Etila</b>	Duas Horas	83 a 123
<b>10% a 50% Metanol</b>		



**Esquema 2.** Processo cromatográfico da fase acetato de etila e isolamento de seus constituintes químicos.

#### 4.7. Estudo da fase hexânica

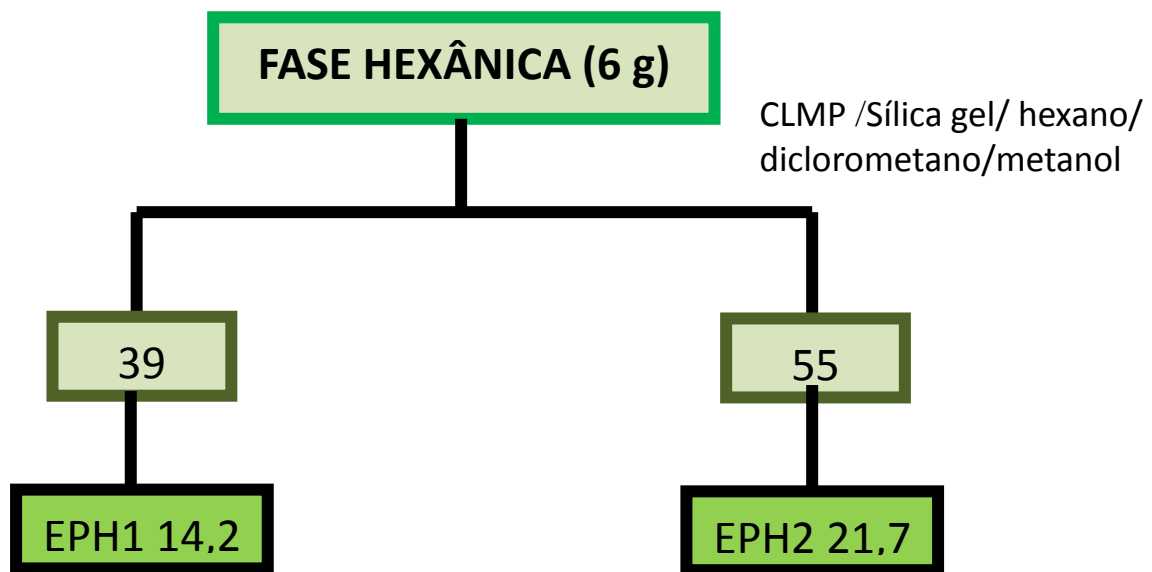
Uma quantia da fase hexânica (6g) foi submetida a uma coluna cromatográfica de média pressão, utilizando sílica gel como adsorvente. A amostra foi aplicada líquida solubilizada em hexano (Tabela 7, pág. 47). Foram utilizados solventes em grau crescente de polaridade (hexano, diclorometano, metanol). Esse método foi codificado como **MFH 1**.

Foram obtidas, com o método **MFH 1**, 89 frações das quais foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), eluídas em diversos sistemas de solventes e reunidas de acordo com os seus Rfs. As frações 11 á 30 foram reunidas, em seguida, purificadas em cromatografia de coluna com sílica gel, obtendo dessa forma, 48 subfrações. As subfrações de número 2, 3 e 4 apresentaram aparência amorfa na cor branca, codificada como **EPH 1** (10,3 mg). A fração 39 apresentou

aparência de um sólido branco sendo codificada como **EPH 2** (14,1mg). A fração 55 apresentou aparência sólida na cor branca codificada como **EPH 3** (21,7mg) (Esquema 3, pág. 48). As frações foram submetidas a análises em RMN  $H^1$  e  $C^{13}$ .

**Tabela 7.** Método (**MFH 1**) desenvolvido no cromatógrafo líquido de média pressão para fase hexano.

<b>MFH 1</b>		
<b>Sistema de Solventes</b>	<b>Tempo de Corrida</b>	<b>Frações Obtidas</b>
<b>Isocrático</b> <b>100% Hexano</b>	Uma hora e trinta minutos	1a 10
<b>Gradiente</b> <b>100% a 50% Hexano</b> <b>0% a 50% Diclorometano</b>	Duas horas	11 a 30
<b>Gradiente</b> <b>50% a 0% Hexano</b> <b>50% a 100% Diclorometano</b>	Três horas	31 a 40
<b>Gradiente</b> <b>100% a 70% Diclorometano</b> <b>0% a 30% Metanol</b>	Duas horas	41 a 86
<b>Gradiente</b> <b>70% a 50% Diclorometano</b> <b>30% a 50% Metanol</b>	Uma hora	87 a 89



**Esquema 3.** Processo cromatográfico da fase hexânica e isolamento de seus constituintes químicos.

#### 4.8. Análise microbiológica

##### 4.8.1. Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas, oriundas da CCT – Coleção de Culturas Tropicais e ATCC – American Type Culture Collection, utilizadas foram:

- *Bacillus subtilis* CCT 0516
- *Escherichia coli* ATCC 2536
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25925
- *Streptococcus sanguíneos*
- *Streptococcus salivares*
- *Streptococcus mutans*
- *Streptococcus* ATCC

#### **4.8.2. Meios de cultura**

O meio de cultura utilizado nas análises foi o Luria Bertani (LB) preparado com 5g de extrato de levedura (DIFCO), 10,0g de triptona (DIFCO), 10,0 g de NaCl (VETEC) para 1L. Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza P.A. Os meios de cultura foram preparados com água destilada esterilizados por autoclavagem a 121 °C durante 15 minutos.

#### **4.8.3. Técnica de microdiluição**

O potencial citotóxico para bactérias foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição. Para isso, diluições seriadas a metade de uma solução do extrato metanólico de *Erythroxyllum pulchrum* (1-1024µg) foram adicionadas a uma suspensão ( $1 \times 10^{-2}$  UFC/mL) de *B. subtilis* CCT 0516, *E. coli* ATCC 2536, *P. aeruginosa* ATCC 8027, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25925, *Streptococcus sanguíneos*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus* ATCC em meio LB e em seguida, incubadas a 37°C por 24h. A leitura dos comprimentos de ondas para análise foi realizada no ELISA. Foi considerada como CIM a menor concentração da solução do extrato de *Erythroxyllum pulchrum* que inibiu completamente o crescimento bacteriano.

#### **4.8.4. Caracterização da atividade antibacteriana**

Para determinar se a atividade antibacteriana era bacteriostática ou bactericida, uma alíquota da amostra de extrato metanólico bruto que não apresentou crescimento bacteriano foi plaqueada, em seguida, incubada a 37°C por 24h. A atividade do extrato será considerada bacteriostática quando decorrido este tempo for evidenciado crescimento, e bactericida, quando este não ocorrer (MADIGAN; MARTINKO, 2004).

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

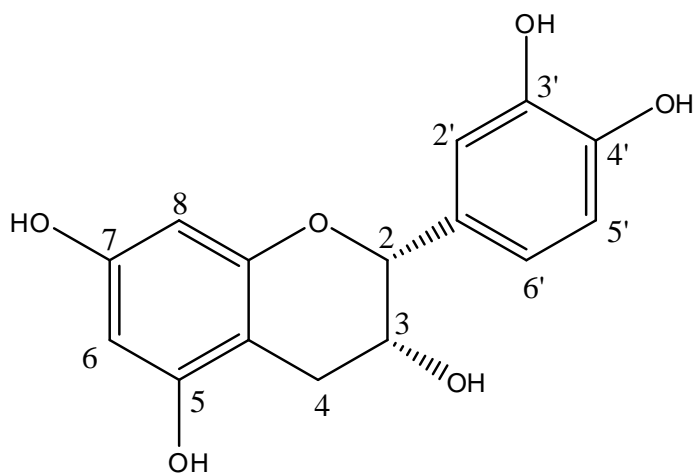
### 5.1. Identificação EPA 1

O espectro de IV de **EPA 1** (Fig.10, pág. 53) revelou bandas de absorção características de deformações axiais de grupamentos O-H ( $3.354\text{ cm}^{-1}$ ), vibrações de deformações axiais de ligações C=C de sistemas aromáticos ( $1.624\text{ cm}^{-1}$ ) e C-O de fenóis ( $1.282\text{ cm}^{-1}$ ).

Na análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 11 á 13, pág. 54 á 56), foram observados, sete sinais referentes a carbonos quaternários, em  $\delta_{\text{C}}$  157,5; 157,3; 157,9; 100,0; 132,2; 145,8 e 145,7, em conjunto com sete sinais metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  95,8; 96,3; 79,7; 67,4; 115,2; 115,3, 119,3 e um sinal de carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  29,2 permitindo sugerir a presença de esqueleto de flavonoide. A comparação com os dados da literatura (LÔBO *et al.*, 2008), permitiu atribuir os quinze sinais observados aos carbonos da estrutura da epicatequina, em destaque para os sinais atribuídos aos C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  79,7) e C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  67,4), caracterizando a estereoquímica relativa  $\alpha$  da OH em C-3 da epicatequina que a diferencia de seu epímero catequina.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 14 á16, pág. 57-59) apresentou padrões de deslocamentos químicos característicos de catequinas, com dois duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,75(H-4 $\alpha$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  2,91(H-4 $\beta$ ), característicos de hidrogênios de grupo metilênicos, um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,16 atribuído ao hidrogênio H-3 e um singletto largo em  $\delta_{\text{H}}$  4,80 referente ao hidrogênio oximetínico benzílico H-2. Esse conjunto de sinais é típico do anel C da epicatequina. As constantes de acoplamentos observadas para os hidrogênios H-2 e H-3, bem como, o singletto largo em  $\delta_{\text{H}}$  4,80 atribuído ao H-2, sugere configuração *cis* entre H-2 e H-3 para o isômero epicatequina. A estereoquímica absoluta no  $\alpha\text{D}$  é de  $-7,7$ , confirmando, portanto, a estereoquímica proposta.

Diante de todos os dados, confirmados com a literatura (LÔBO, *et al.*, 2008), foi concluído que o composto **EPA 1** se tratava do flavonoide epicatequina. Todos os dados estão compilados na tabela 8, pág. 52. Tal composto já foi isolado em outras espécies do gênero *Erythroxylum*, sendo relatada pela primeira vez na espécie *Erythroxylum pulchrum*.



**Tabela 8.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 200 MHz e 50 MHz de **EPA 1**

EPA 1			Literatura (LÔBO <i>et al.</i> , 2008)	
C	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Catequina $\delta_{\text{C}}$ (ppm)	Epicatequina $\delta_{\text{C}}$ (ppm)
2	79,5	4,80 sl	82,4	79,1
3	67,4	4,16 m	68,0	66,6
4	29,2	2,75(dd, $J = 2,8/16,8$ Hz $1\text{H}_{\alpha}$ ) 2,91(dd, $J = 4,4/16,8$ Hz $1\text{H}_{\beta}$ )	28,6	28,5
5	157,3		156,6	157,3
6	96,3	5,93 (d, $J = 2,2$ Hz)	96,6	96,0
7	157,5		157,5	156,0
8	95,8	5,91(d, $J = 2,2$ Hz)	95,1	95,3
9	157,9		157,0	157,1
10	100,0		100,3	99,5
1'	132,2		131,7	131,7
2'	115,3	6,97(d, $J = 1,5$ Hz)	115,2	115,0
3'	145,8		145,6	145,0
4'	145,7		145,5	145,1
5'	115,8	6,76 m	115,6	115,4
6'	119,5	6,78 m	119,8	119,0

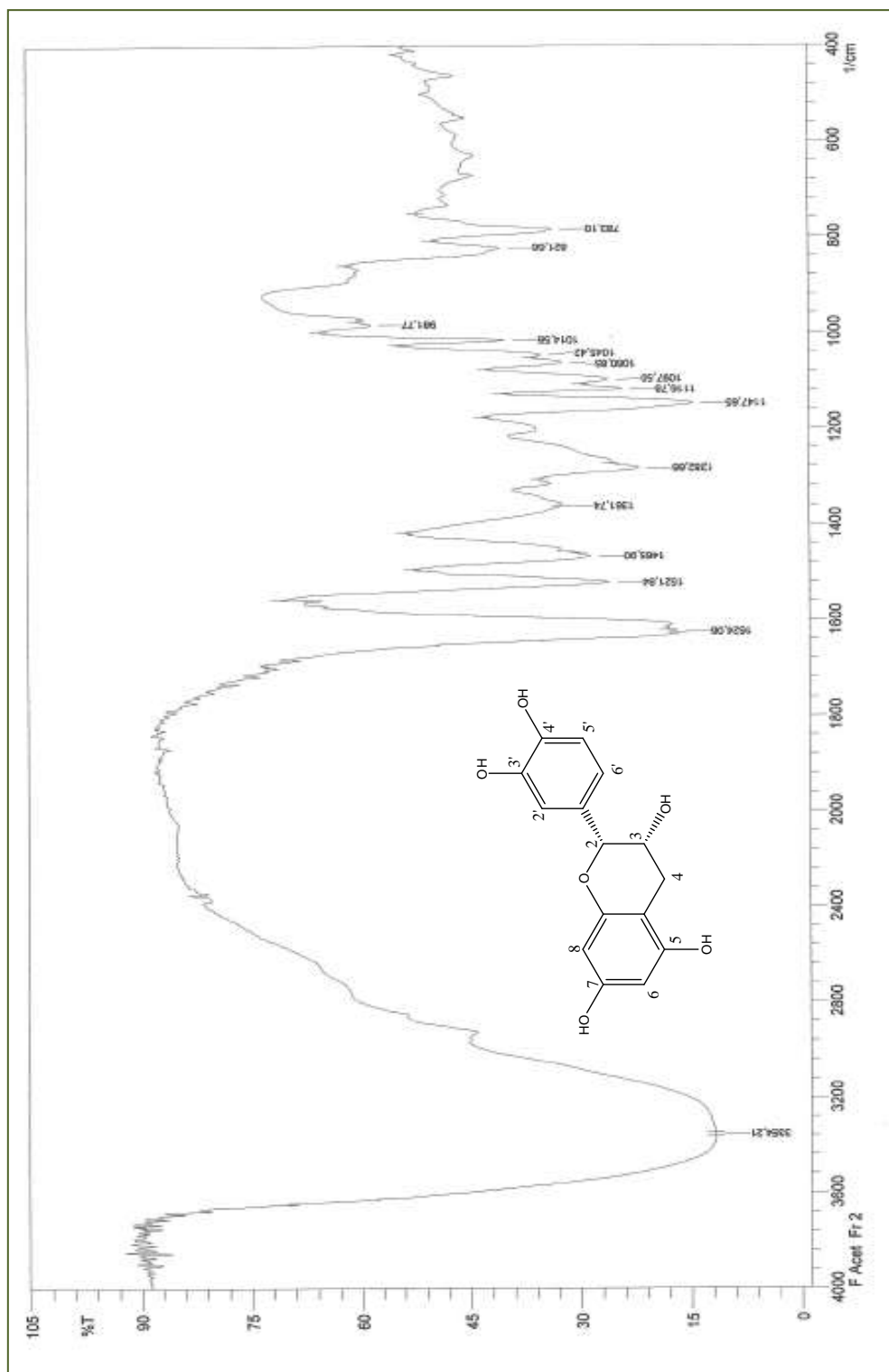
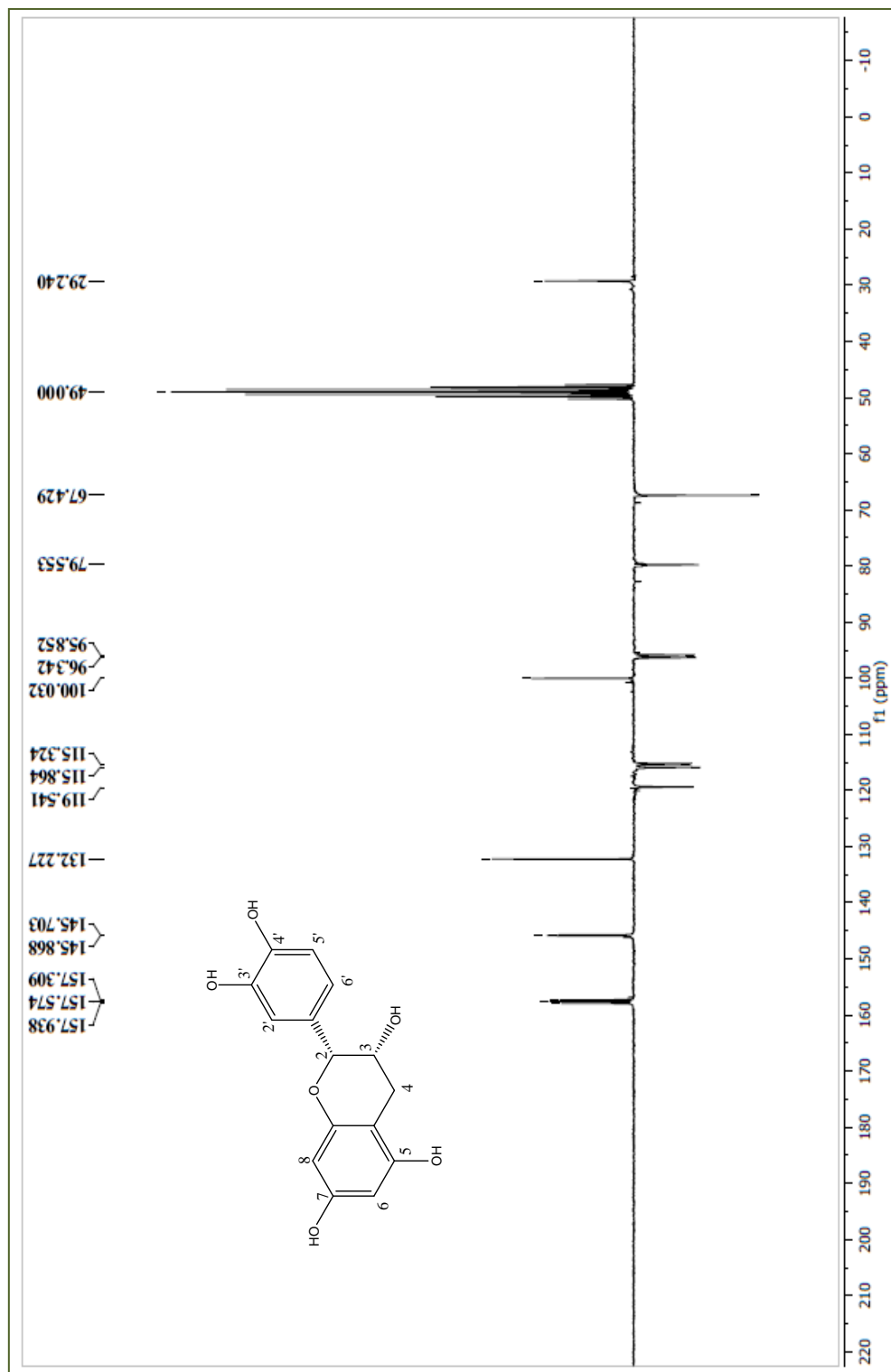
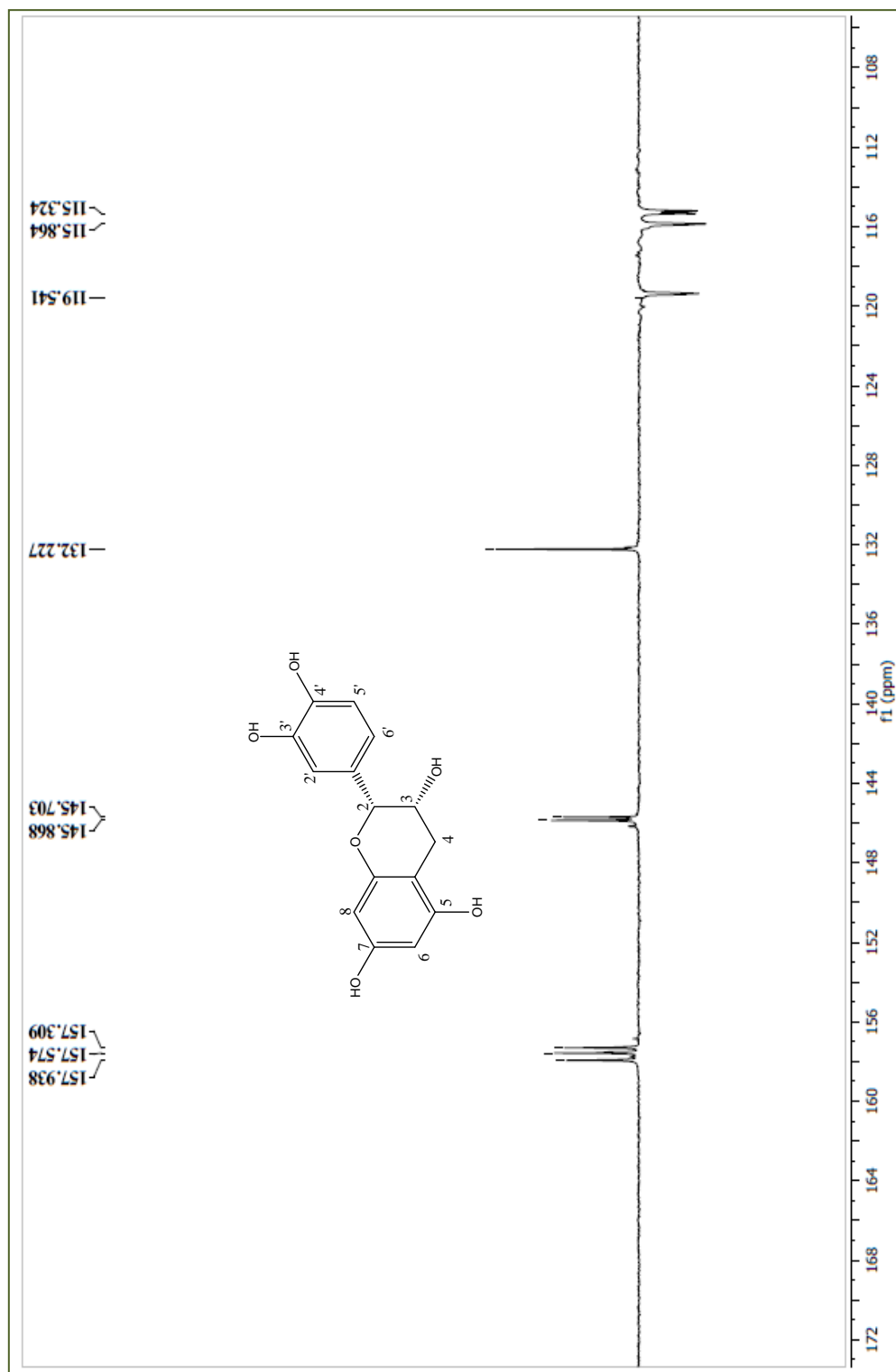


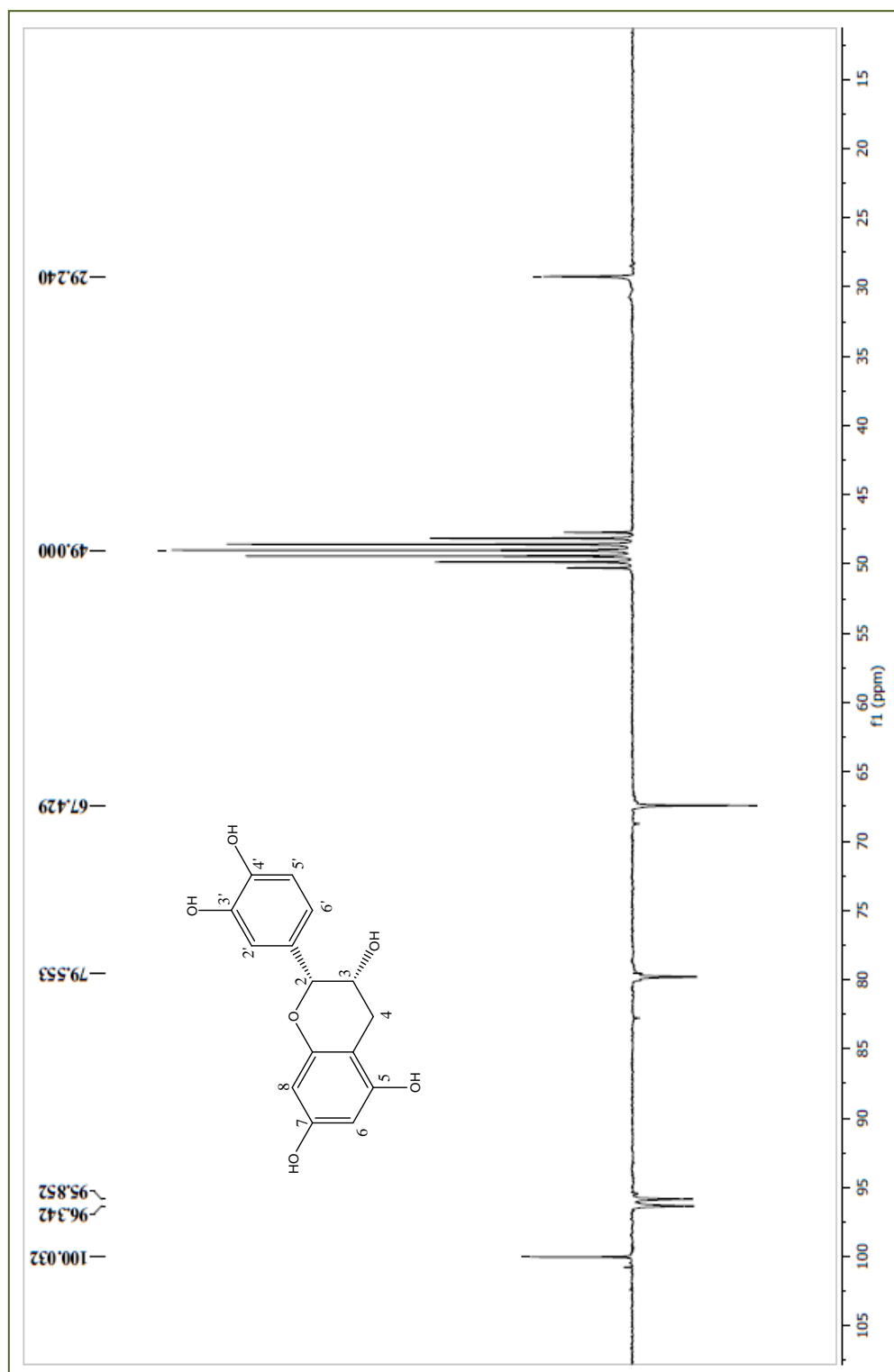
Figura 10. Espectro de IV do composto EPA 1.



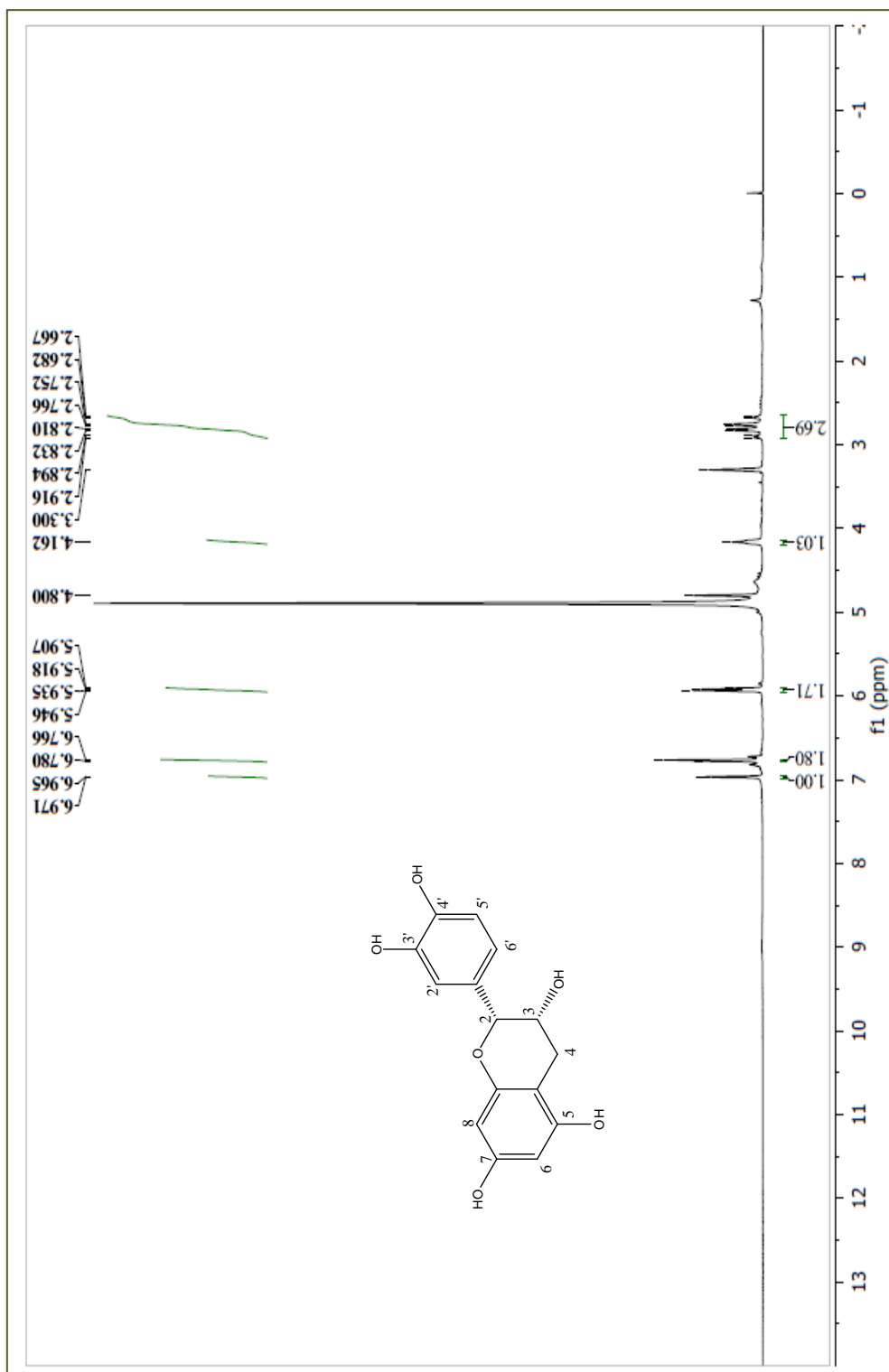
**Figura 11.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 1.



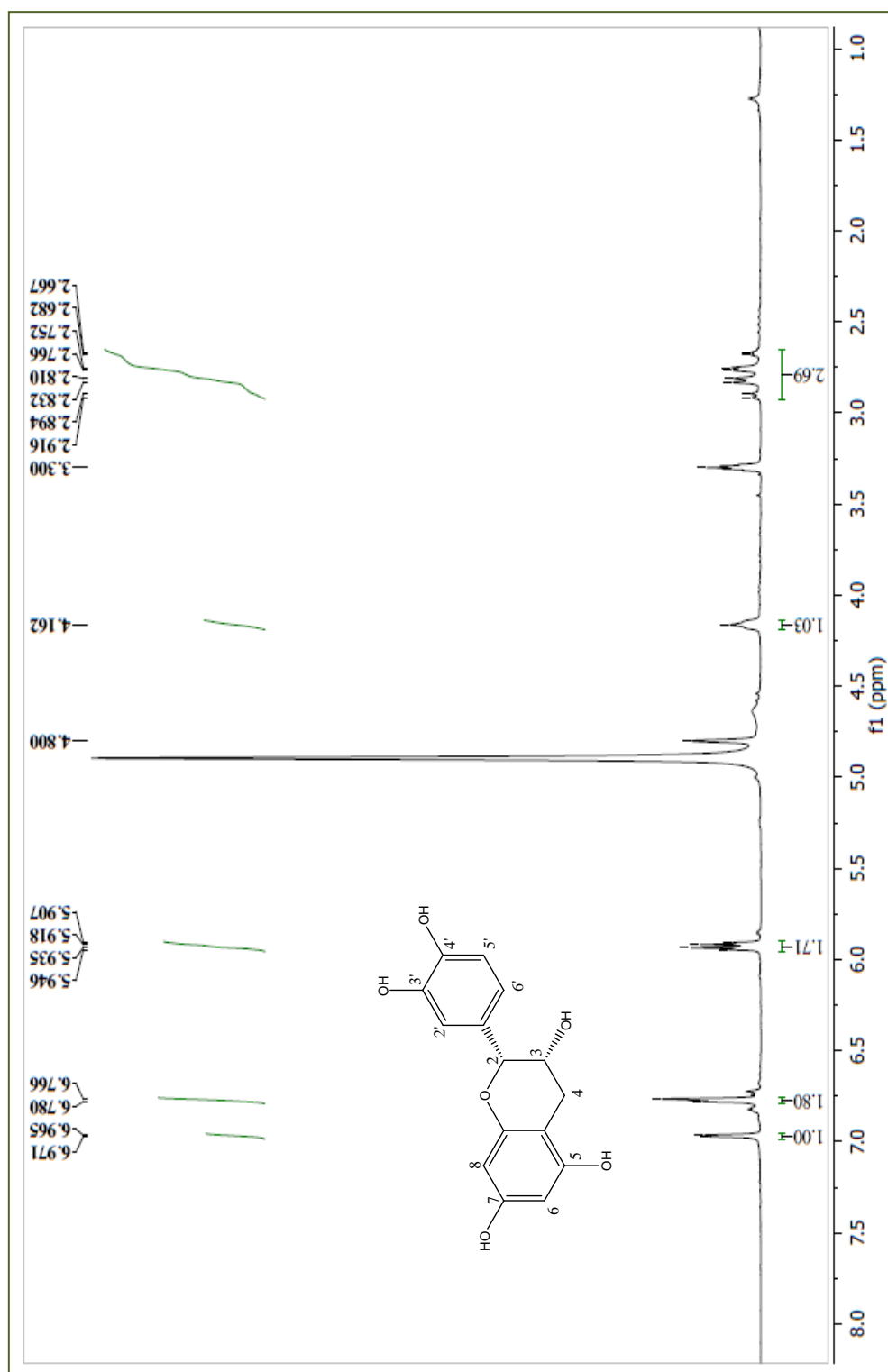
**Figura 12.** Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **EPA 1** na região entre  $\delta_c$  108,0-172,0 ppm.



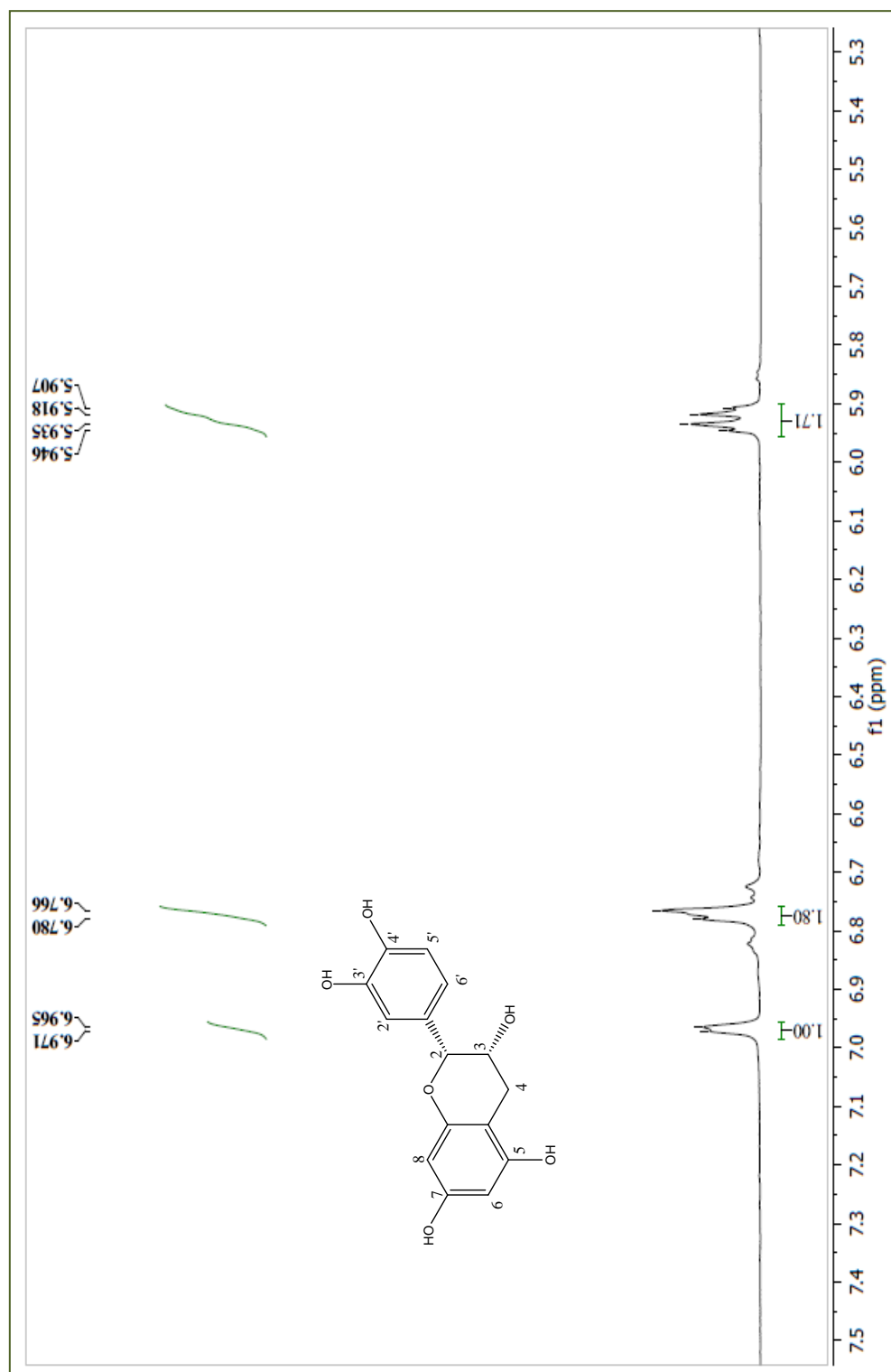
**Figura 13.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **EPA 1** na região entre  $\delta_{\text{C}}$  15,0-105,0 ppm.



**Figura 14.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 1.



**Figura 15.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 1 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  1,0-8,0 ppm.



**Figura 16.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 1 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  5,3-7,5 ppm.

## 5.2. Identificação de EPA 2

A substância **EPA 2** apresentou aparência amorfa de cor amarelada. O espectro de massas obtido com EM-ESI (Fig. 17, pág. 63) mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  447,1 [M-H], compatível com a fórmula molecular  $C_{21}H_{20}O_{11}$ .

O espectro de IV de **EPA 2** (Fig. 18, pág. 64) evidenciam bandas de absorção em  $3.336\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H),  $1.654\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de carbonila conjugada),  $1.604\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C de anel aromático) e em  $1.357\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 19-21, pág. 65-67) apresentou 21 sinais, sendo dez para carbonos quaternários, em  $\delta_{\text{C}}$  179,6; 165,8; 163,1; 159,2; 158,4; 149,7; 146,3; 136,2; 122,9; 105,8, em conjunto com cinco sinais metínicos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  122,8; 116,9; 116,3; 99,8 e 94,7 permitindo, portanto, sugerir um esqueleto de flavona. A ausência de sinal em  $\delta_{\text{C}}$  107,5 possibilitou sugerir a presença de substituinte no carbono 3. O conjunto de sinais em  $\delta_{\text{C}}$  103,5; 73,2; 72,1; 72,1; 71,8 e 17,6 indicou a presença de uma unidade osídica. Em comparação com dados da literatura, foi possível sugerir a presença de raminose (BELTRAME *et al.*, 2001).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 22-25, pág. 68-71) apresentou dois dubletos na região de hidrogênios aromáticos com deslocamentos de  $\delta_{\text{H}}$  6,36 e 6,19 acoplando meta ( $J= 2,0\text{ Hz}$ ), característicos de hidrogênios H-8 e H-6 de flavonas oxigenadas na posição 5 e 7 (HARBORNE, 1989). Um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,29 (H-6') ( $J=8,0$  e  $2,0\text{ Hz}$ ) acoplando orto ( $J=8,0$ ) com o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,91 (H-5') e acoplando meta com o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,33 (H-2'), possibilitou, dessa maneira, atribuir um sistema ABX ao anel B da flavona. A ausência do singlete com absorção entre  $\delta_{\text{H}}$  6,39 e 6,94, o qual seria característico do hidrogênio 3, reforçou a proposta da existência de um substituinte nesta posição, sugerindo uma flavona 3, 5, 7, 3', 4' pentasubstituída. Adicionalmente neste espectro, foram reveladas absorções que permitiram inferir a presença de uma unidade de açúcar. Estas absorções correspondiam a um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  5,34 correspondente ao hidrogênio anomérico, um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  3,75 e os multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,34 e 3,43, um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,94, referente ao hidrogênio da metila de raminose.

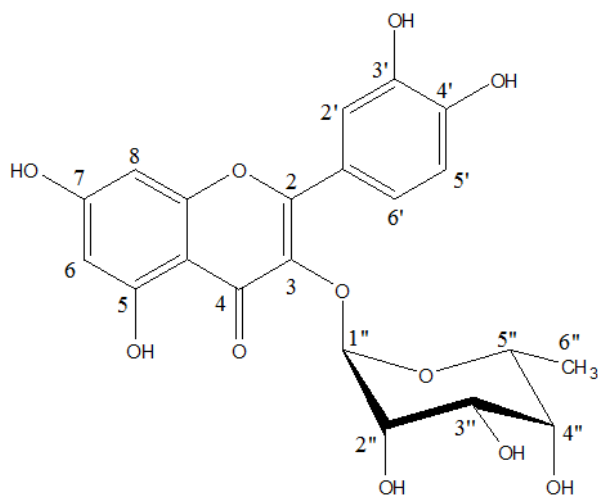
No espectro HMQC foi observado as correlações dos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (H-6) com  $\delta_{\text{C}}$  99,8 (C-6) e de  $\delta_{\text{H}}$  6,36 (H-8) com  $\delta_{\text{C}}$  94,7 (C-8), confirmando as atribuições de C-6 e C-8 do anel A da flavona. As correlações de  $\delta_{\text{H}}$  6,91 (H-5') com  $\delta_{\text{C}}$  116,3 (C-5'),

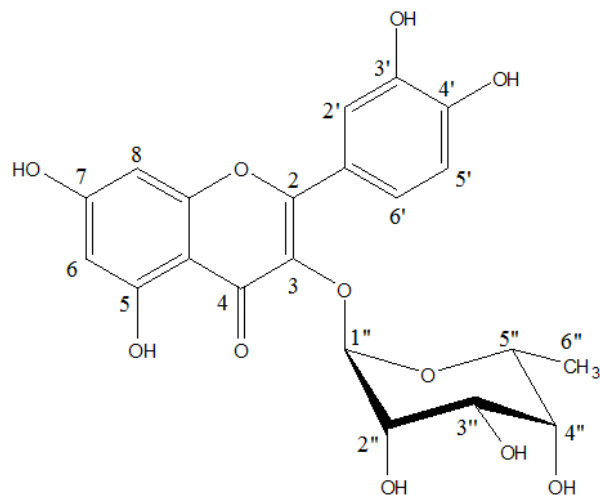
de  $\delta_H$  7,30 (H-6') com  $\delta_C$  122,8 (C-6') e de  $\delta_H$  7,33 (H-2') com  $\delta_C$  116,9 (C-2') confirmaram as atribuições sugeridas. As correlações dos sinais em  $\delta_H$  0,94 (H-6'') com  $\delta_C$  17,6 (C-6'') e dos sinais em  $\delta_H$  5,34 (H-1'') com  $\delta_C$  103,5 (C-1'') confirmaram, respectivamente, a metila e o carbono anomérico da raminose (BELTRAME *et al.*, 2001). As demais correlações estão compiladas na tabela 9, página 62.

No espectro HMBC (Fig. 30-33, pág. 76-79), foi possível determinar as correlações de  $\delta_H$  6,17(H-6) e  $\delta_H$  6,33 (H-8) com  $\delta_C$  165,8 que foi atribuída ao C-7. Bem como, as correlações de  $\delta_H$  6,17 (H-6) com  $\delta_C$  163,1 que foi atribuído ao C-5. A correlação de  $\delta_H$  6,33 (H-8) com  $\delta_C$  158,4 que foi atribuído ao C-9, assinalando todos os carbonos do anel A da flavona. Ainda nesse espectro, houve as correlações de  $\delta_H$  7,33 (H-2') e 7,30 (H-6') com  $\delta_C$  159,2 que foram atribuídas ao C-2. A correlação observada em  $\delta_H$  5,34 (H-1'') com  $\delta_C$  136,2 confirma a unidade osídica em C-3. As demais correlações estão compiladas na tabela 9, página 62 (BELTRAME *et al.*, 2001).

No espectro COSY (Fig. 34-37 pág. 80-83), foi possível observar correlações dos sinais em  $\delta_H$  6,19 (H-6) com 6,36 (H-8), confirmando o anel A substituído nas posições 5 e 7. Correlações de  $\delta_H$  7,33 (H-2') com  $\delta_H$  7,30 (H-6'); de  $\delta_H$  6,91 (H-5') com 7,30 (H-6'); e de  $\delta_H$  7,30 (H-6') com 7,33 (H-2') e 6,91 (H-5') confirmaram o sistema ABX para o anel B da flavona. As demais correlações estão compiladas na tabela 9, página 62.

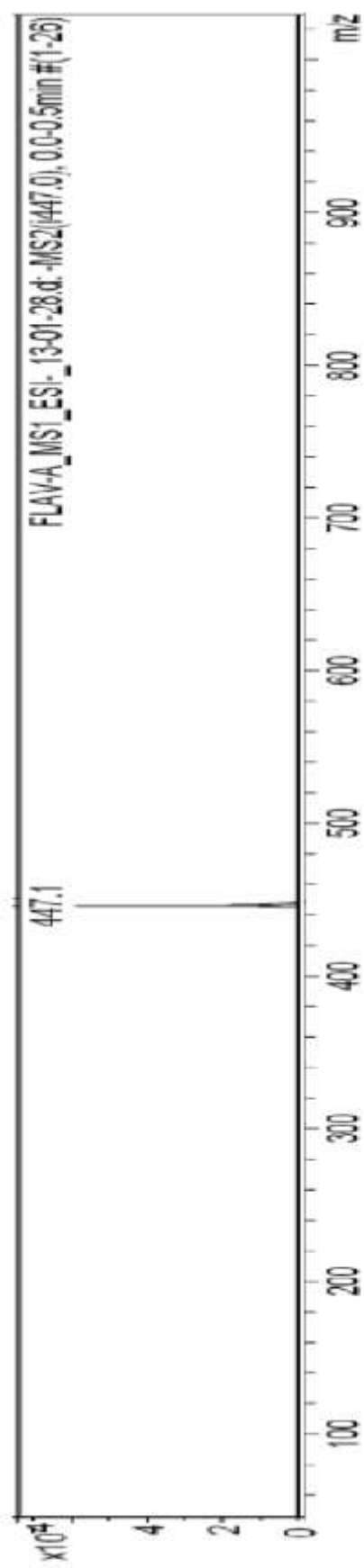
Após análise dos dados e a comparação com a literatura, foi possível identificar **EPA 2** como sendo quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-raminosídeo. Tal composto é comum em espécies de *Erythroxylum*, já relatada na espécie *Erythroxylum subrotundum* (OLIVEIRA, 2012) e pela primeira vez na espécie *E. pulchrum*.



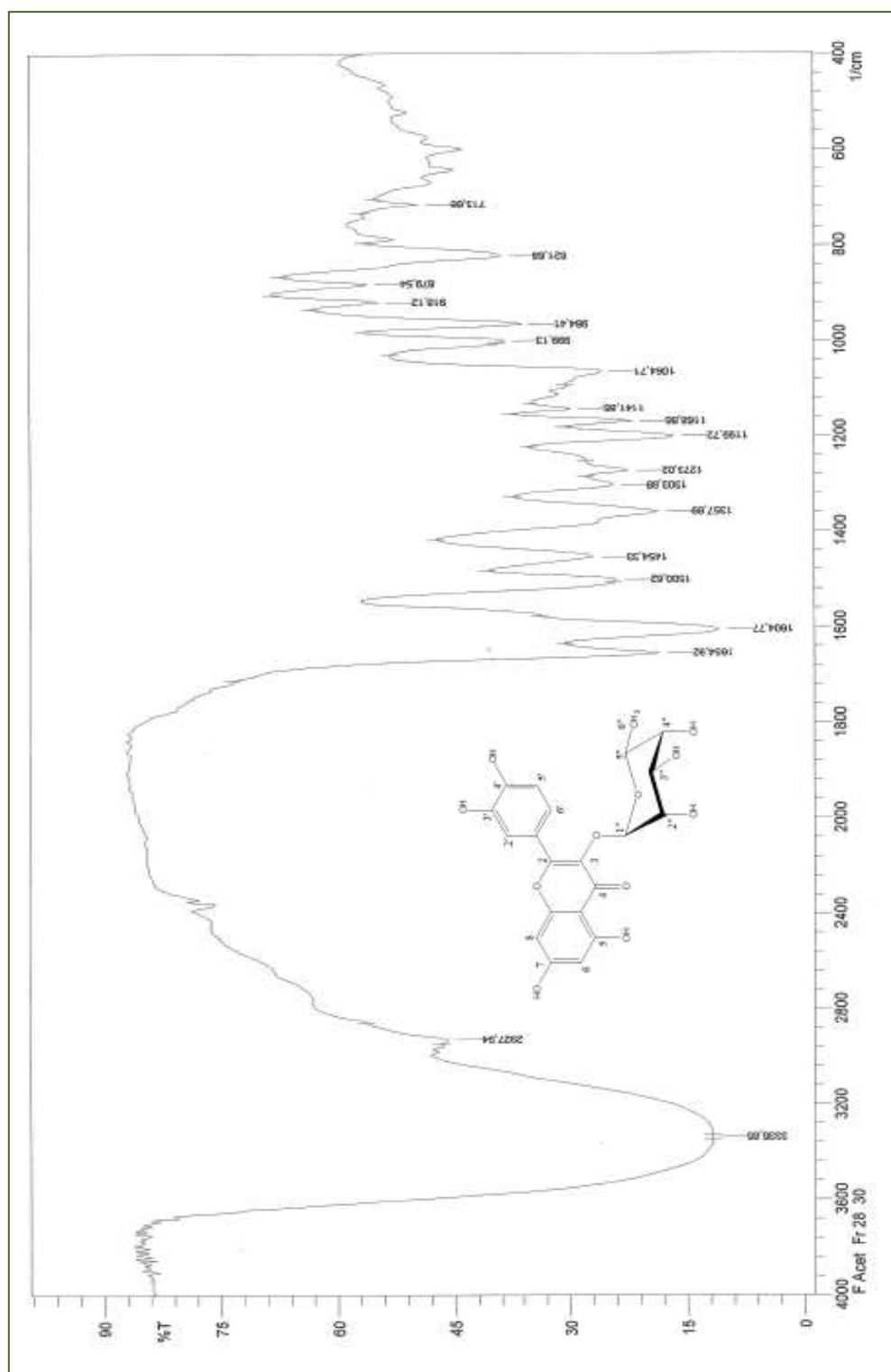


**Tabela 9.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  500 MHz e 125 MHz de **EPA 2**.

<b>EPA 2</b>		<b>MODELO (BELTRAME <i>et al.</i>, 2001)</b>			
<b>HMQC</b>		<b>HMBC</b>	<b>COSY</b>		
<b>C</b>	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	158,4		H-2', H-6'		158,8
3	136,2		H-1''		136,4
4	179,6				179,9
5	163,1		H-6		163,5
6	99,8	6,19 (d, $J= 2,0\text{Hz}$ )	H-8	H-8	99,9
7	165,8		H-6, H-8		166,1
8	94,7	6,36 (d, $J= 2,0\text{ Hz}$ )	H-6	H-6	94,8
9	159,2		H-8		158,0
10	105,8		H-6, H-8		106,0
1'	122,9		H-2', H-5' H6'		123,1
2'	116,9	7,33 (d, $J= 2,0\text{ Hz}$ )	H-6'		117,0
3'	146,3		H-2', H-5'		144,6
4'	149,7		H-2', H-5',H-6'		150,0
5'	116,3	6,91(d, $J= 8,5\text{ Hz}$ )	H-6'	H-6'	116,5
6'	122,8	7,30 (dd, $J= 2,0; 8,0\text{ Hz}$ )	H-2', H-5'	H-5'	123,1
1''	103,5	5,34 (d, $J= 1,5\text{ Hz}$ )		H-2''	103,7
2''	71,8	4,21 (dd, $J= 1,5; 3,0\text{ Hz}$ )	H-1''H-4''	H-1'', H-3''	72,1
3''	72,1	3,75 (dd, $J= 3,5; 9,5\text{ Hz}$ )	H-1''H-2'', H 4''	H-2'',H-4''	72,2
4''	73,2	3,32(m)	H-6'',H-2'', H 5''	H-3''	73,3
5''	72,0	3,42 (m)	H-1''H-4'',H-6''	H-6''	72,0
6''	17,6	0,94 (d, $J=6\text{ Hz}$ )	H-4'', H-5''		17,6

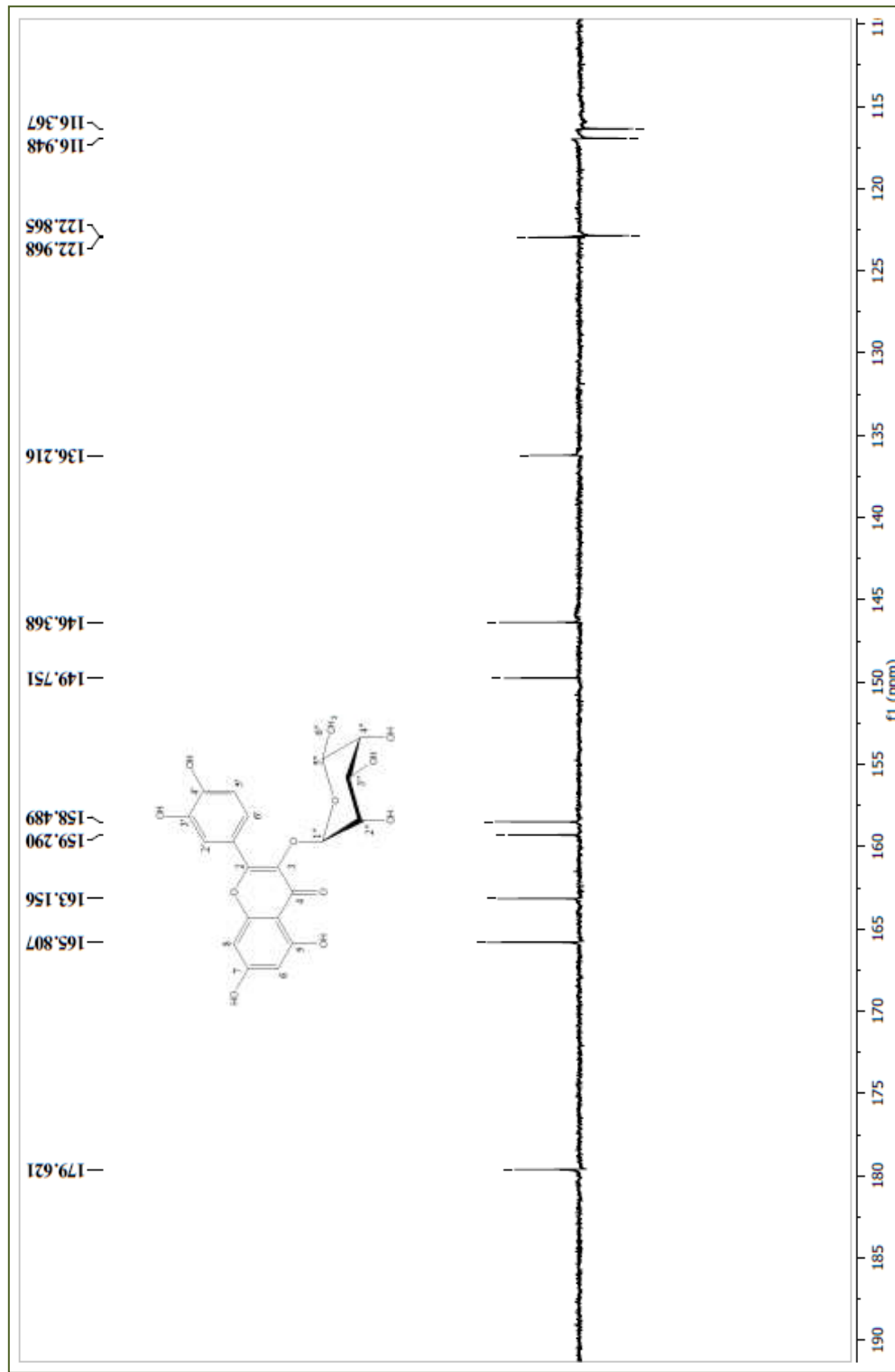


**Figura 17.** [M-H]<sup>-</sup> (EM-ESI, modo negativo)  
Espectro de massa do composto **EPA 2**.

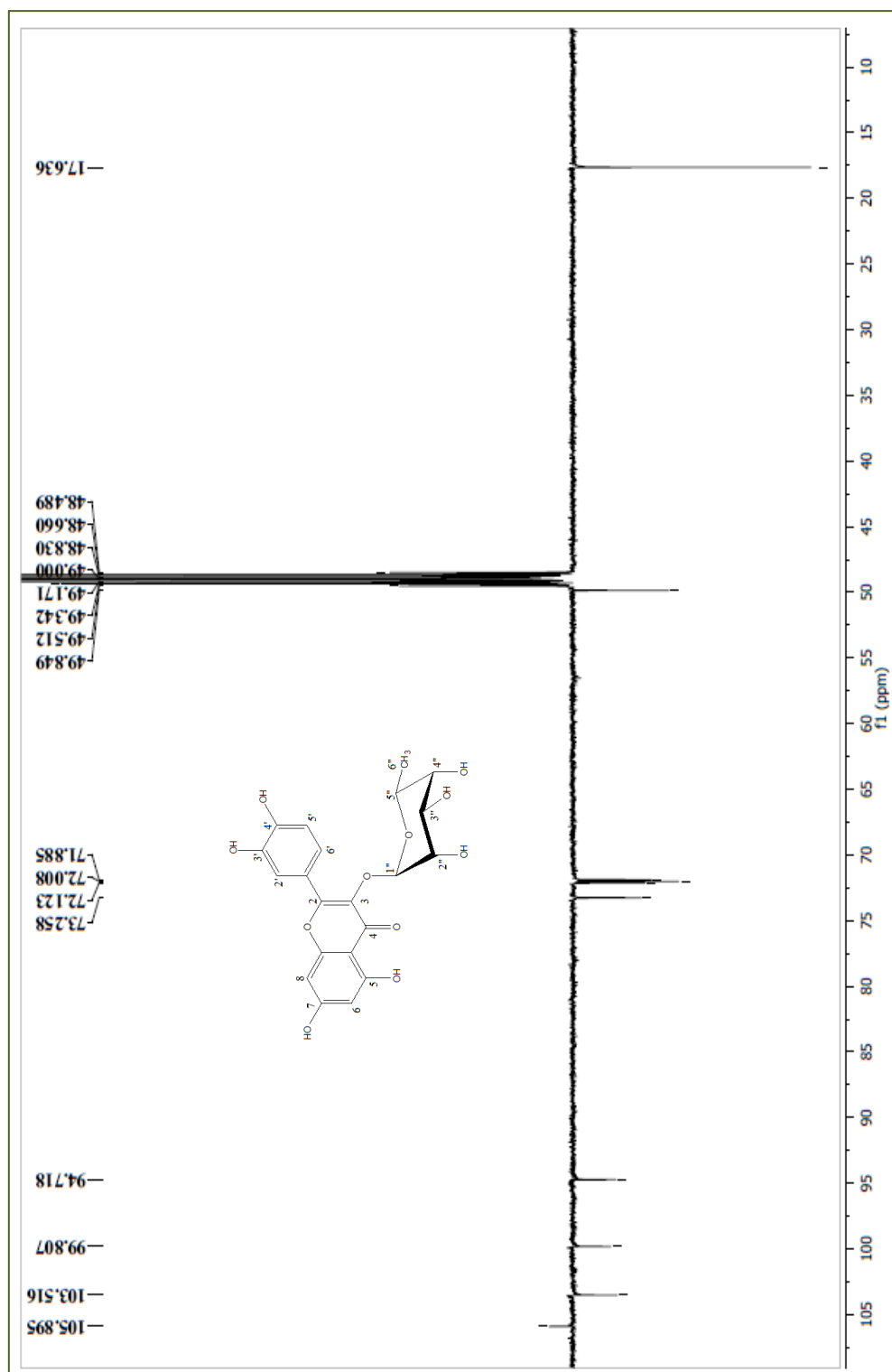


**Figura 18.** Espectro de IV do composto EPA 2.

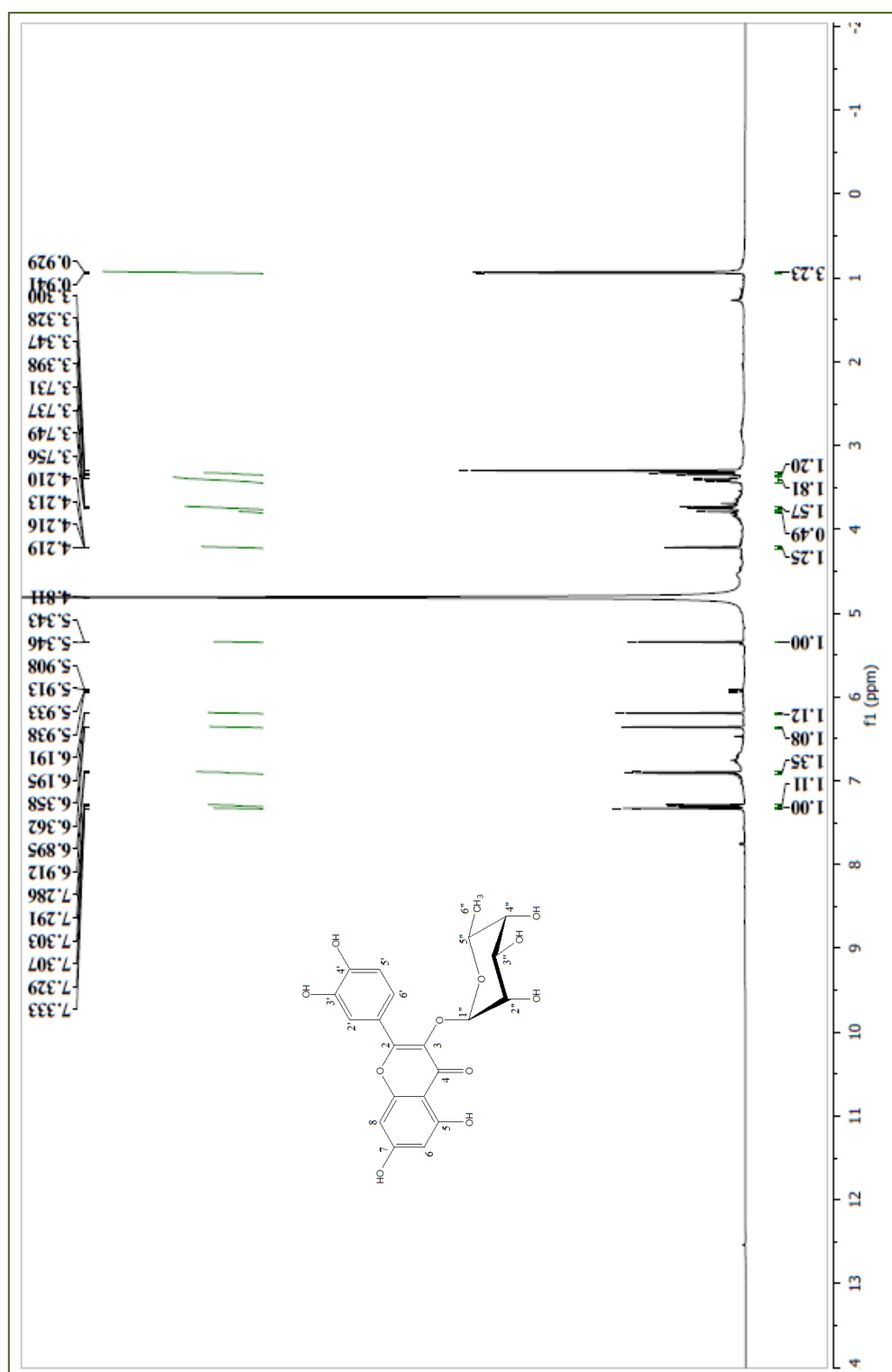




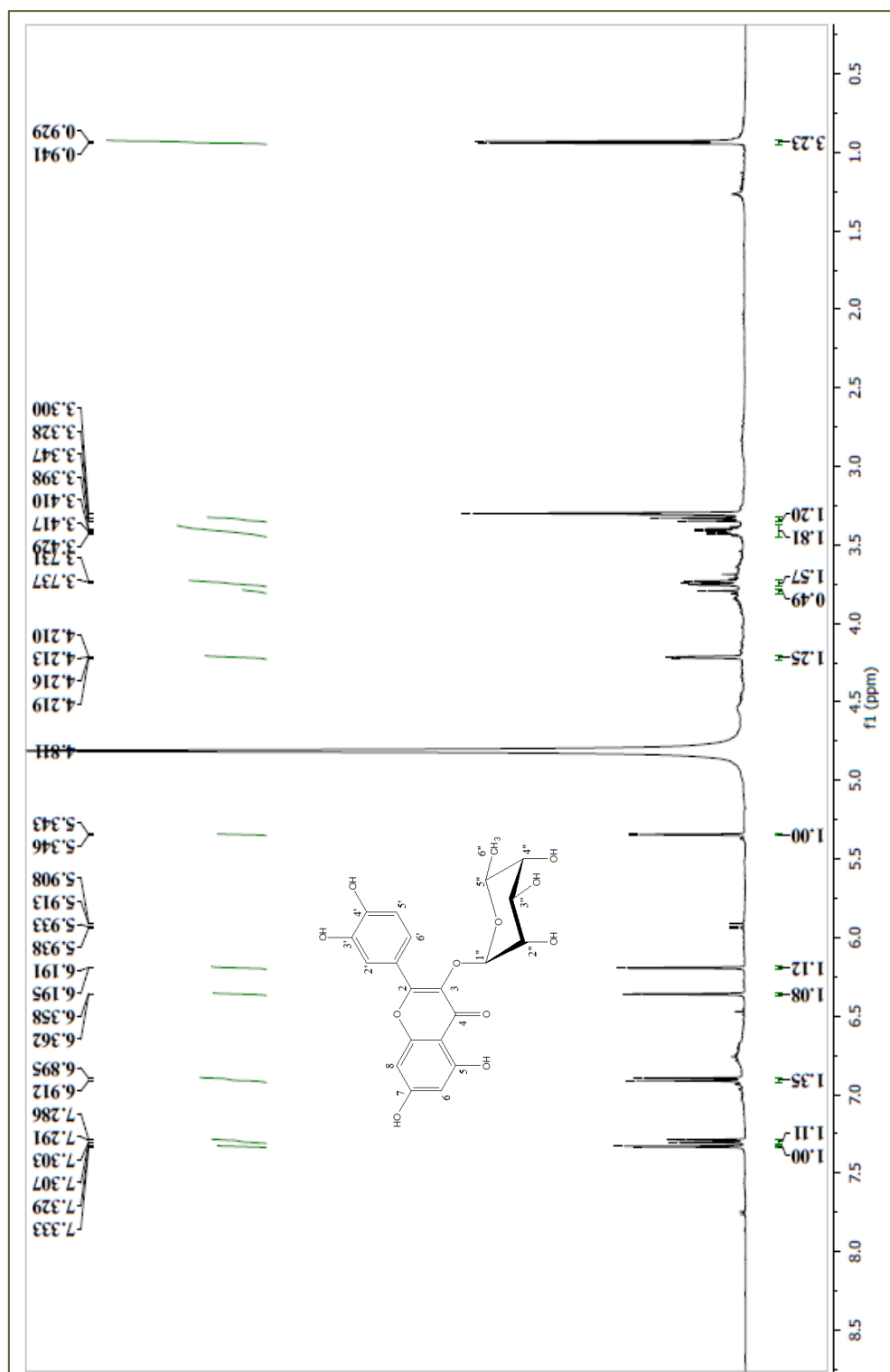
**Figura 20.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **EPA 2** na região entre  $\delta_{\text{C}}$  115,0 a 190,0 ppm.



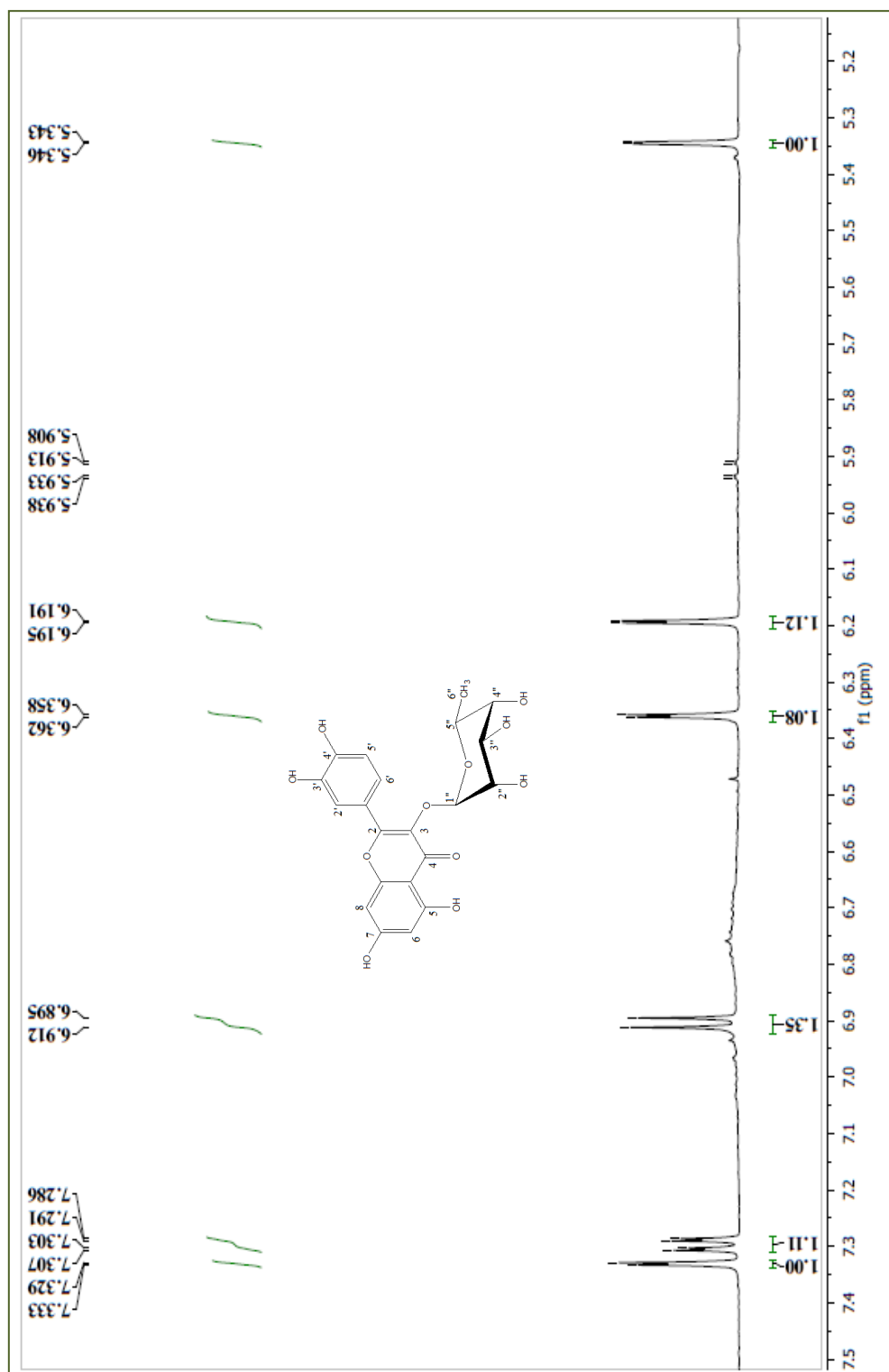
**Figura 21.** Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **EPA 2** na região entre δ<sub>C</sub> 10,0 a 105,0 ppm.



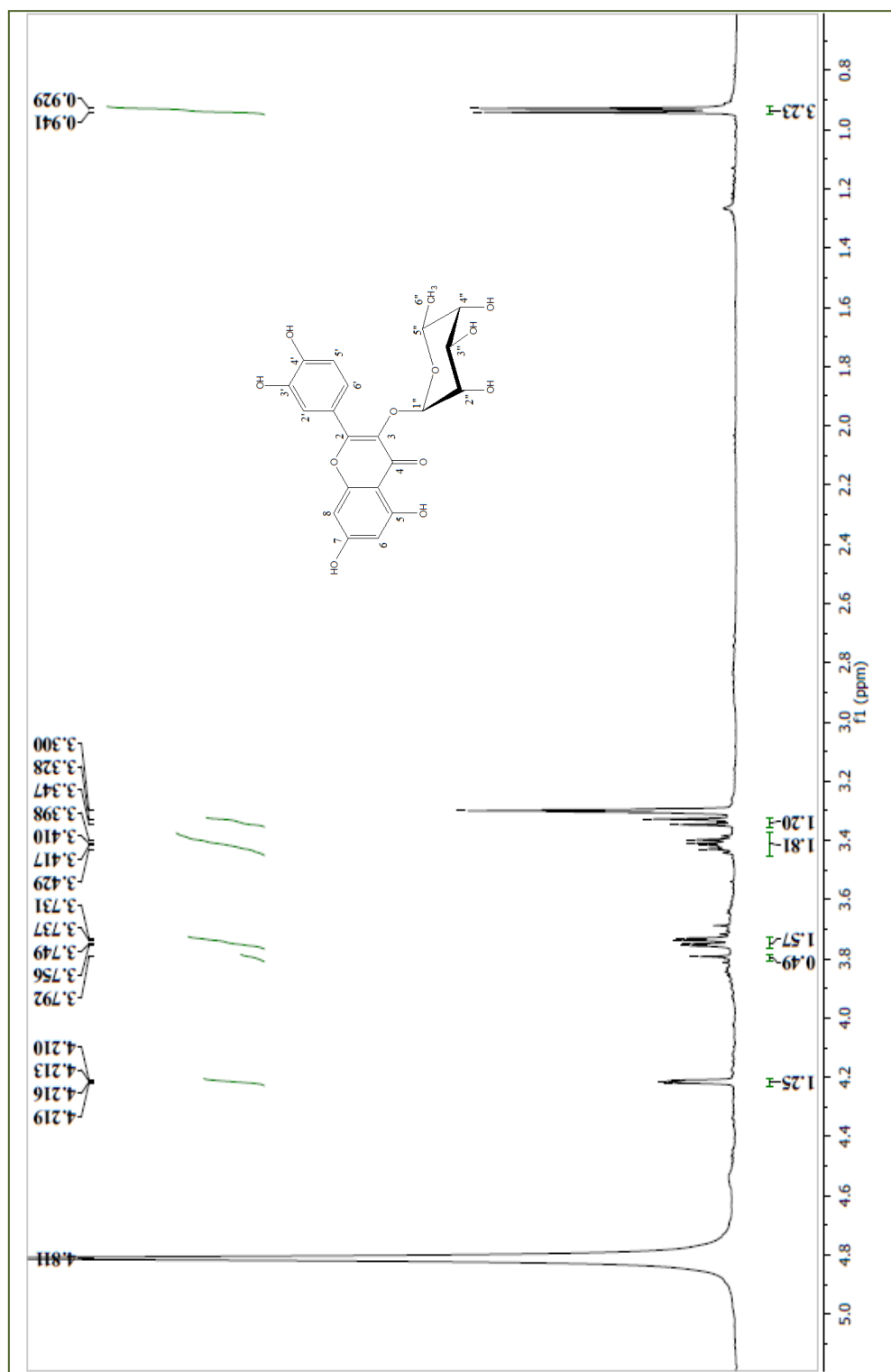
**Figura 22.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 2



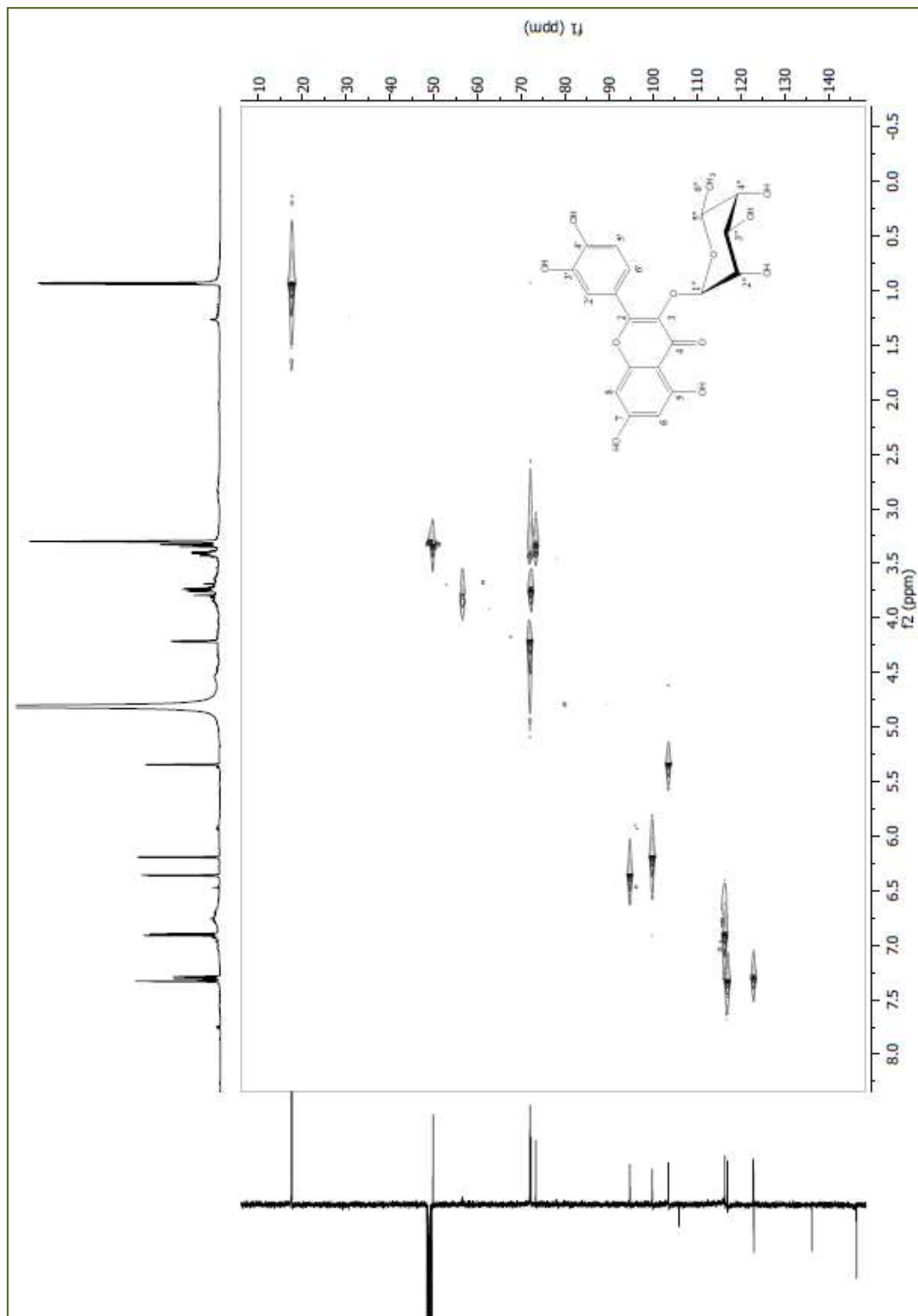
**Figura 23.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 2 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,5 a 8,5 ppm.



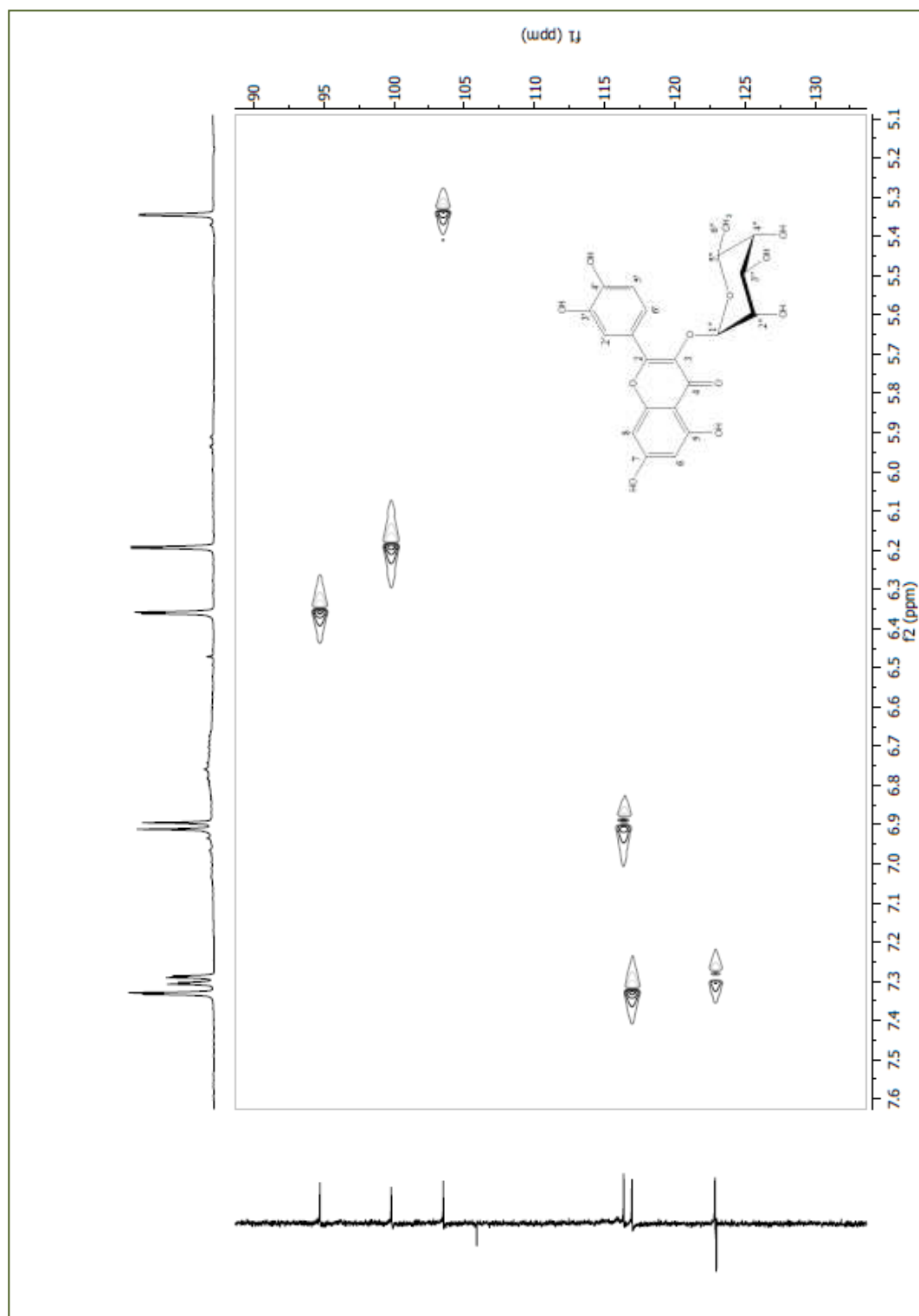
**Figura 24.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 2 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  5,2 a 7,5 ppm.



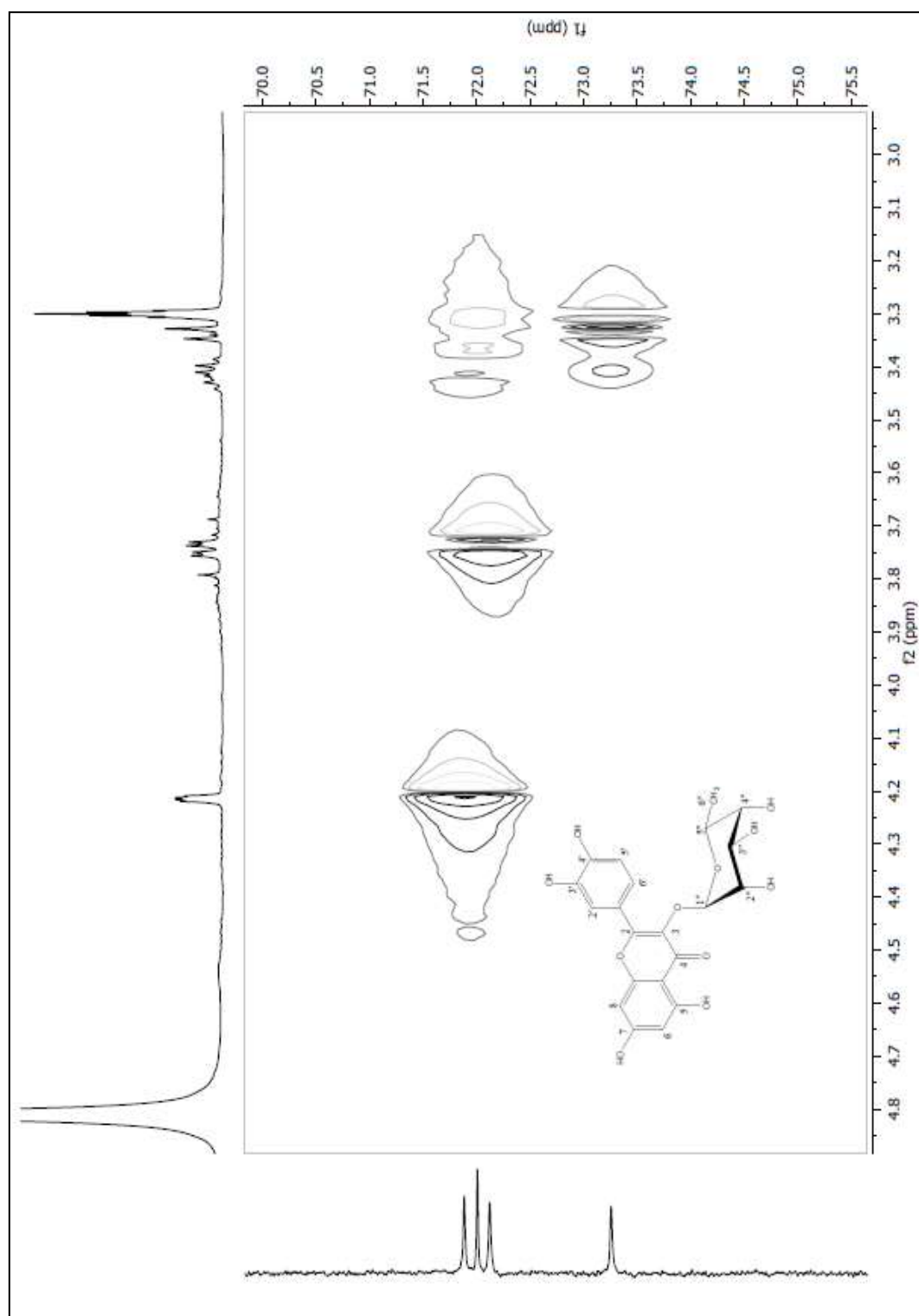
**Figura 25.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **EPA 2** na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,8 a 5,0 ppm.



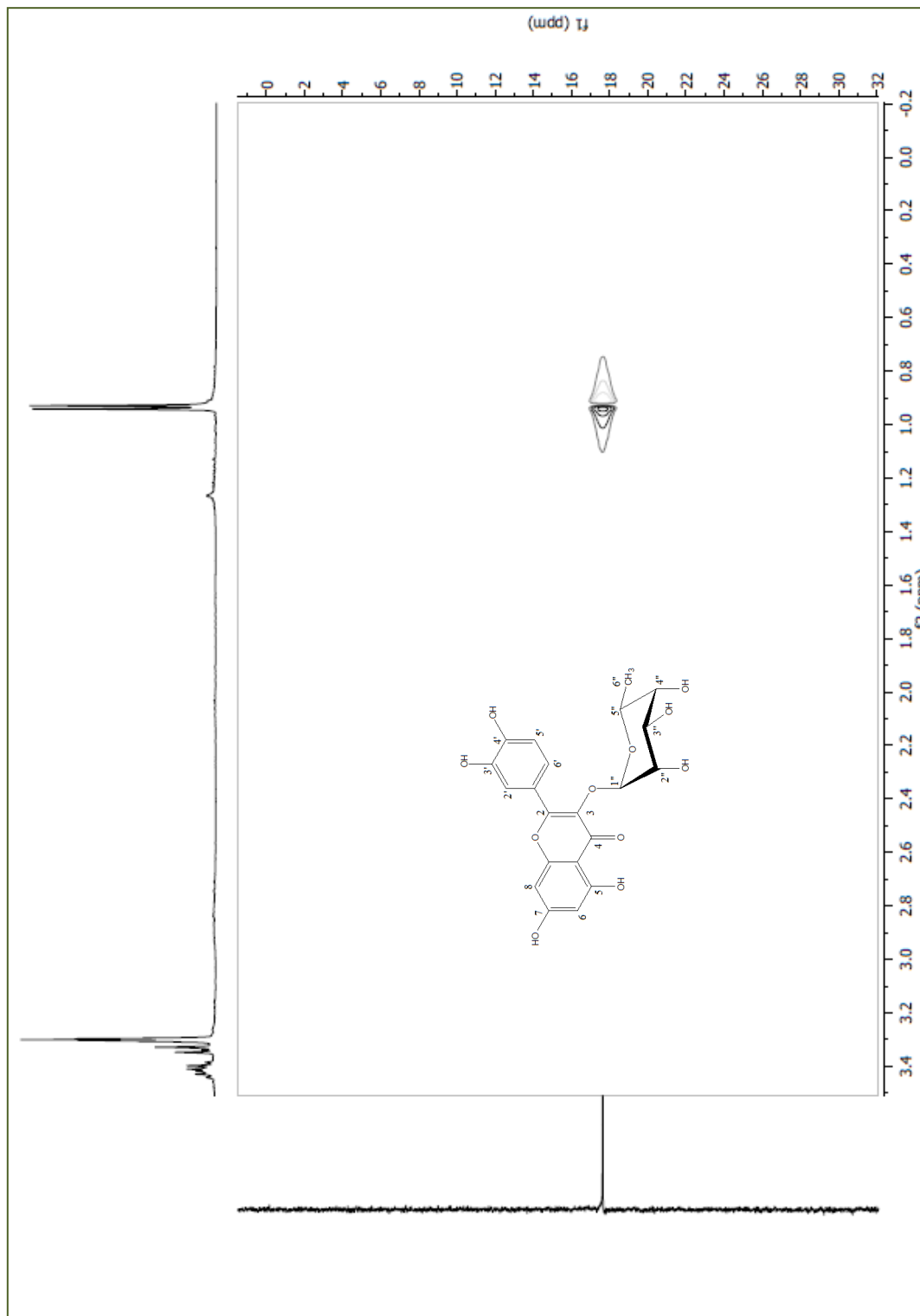
**Figura 26.** Espectro de HMQC (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 2.



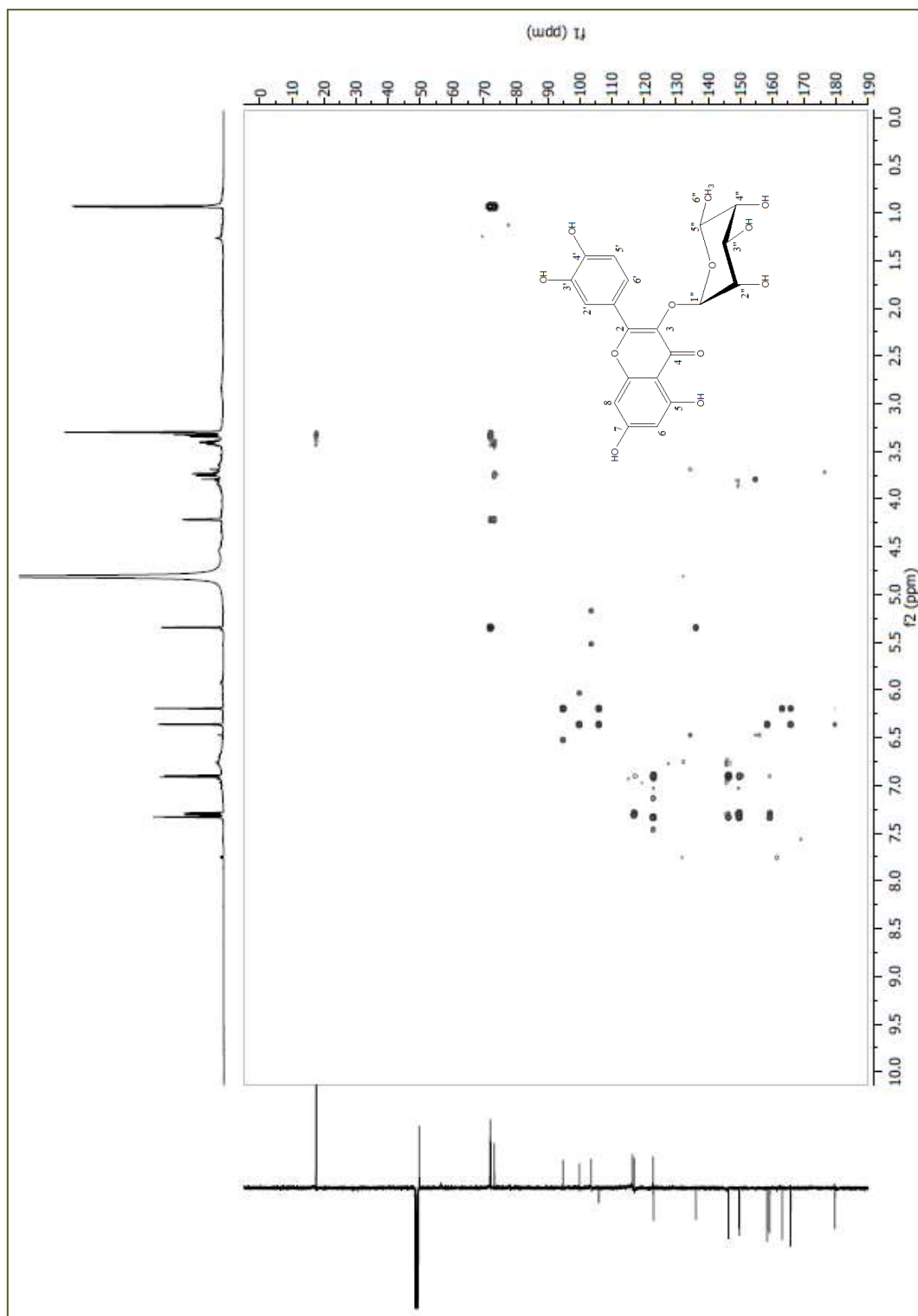
**Figura 27.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de EPA 2 na região entre (5,1 a 7,6) x (90 a 130) ppm.



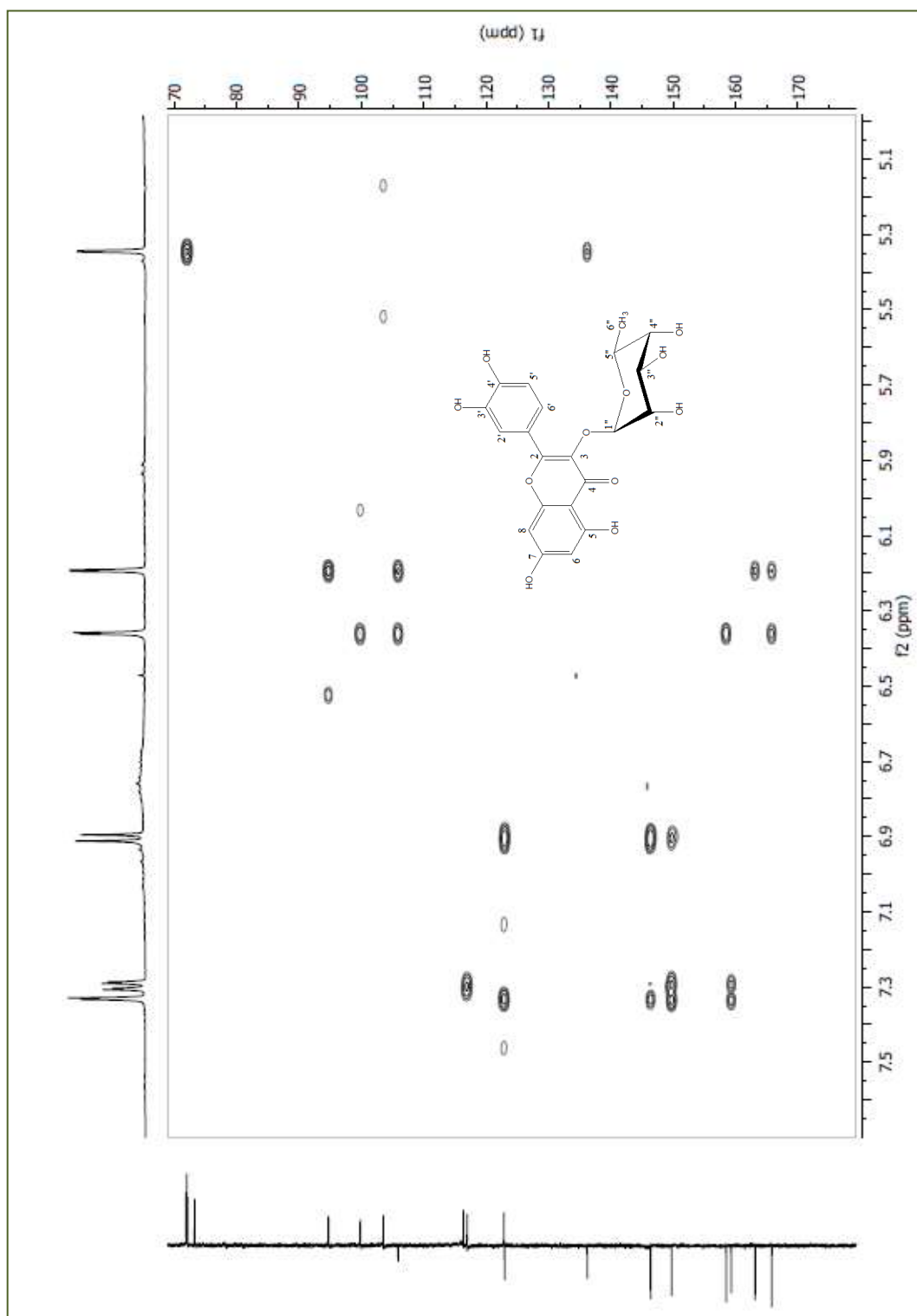
**Figura 28.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **EPA 2** na região entre (3,0 a 4,8) x (70,0 a 75,5) ppm.



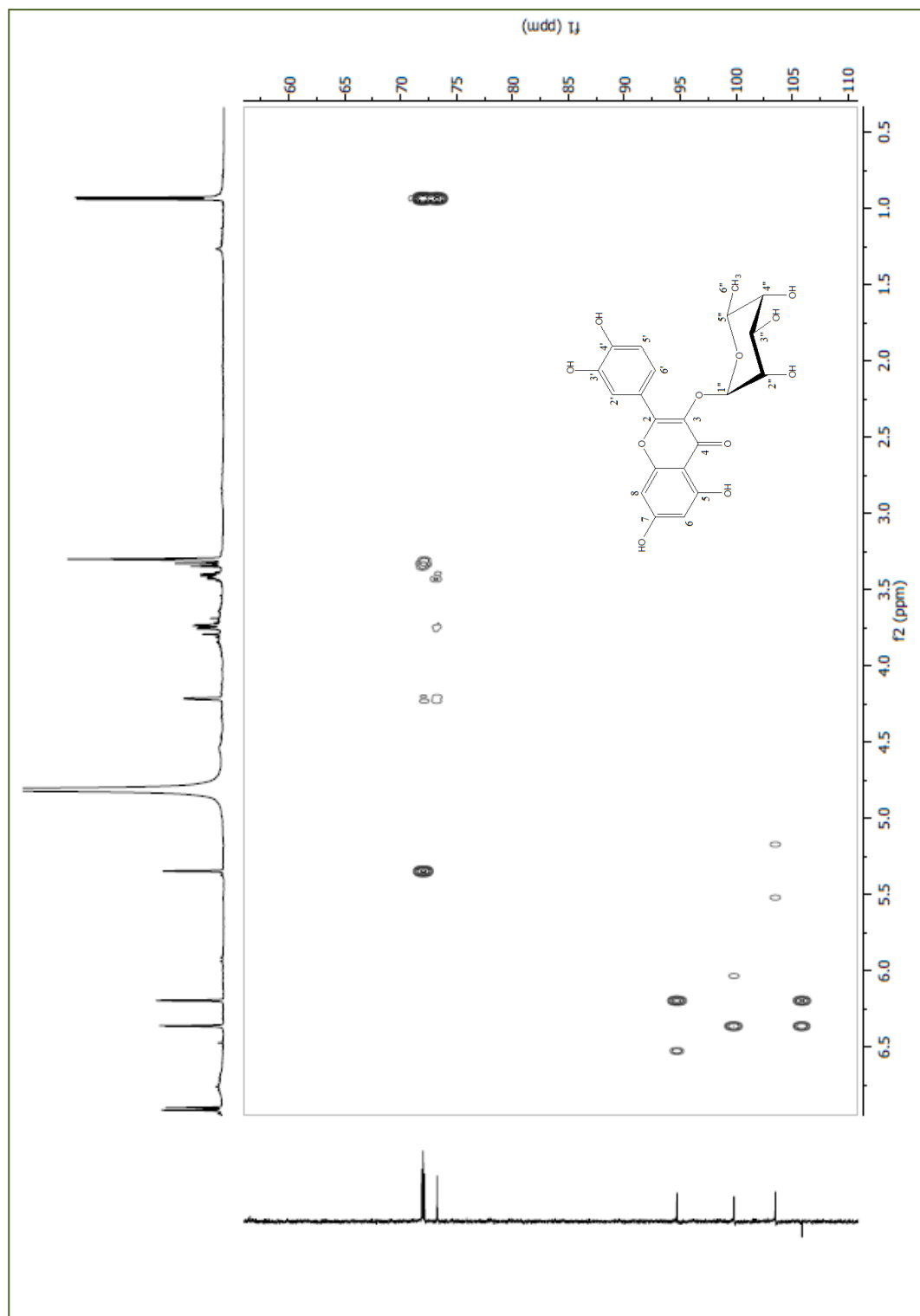
**Figura 29.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 2 na região entre (0,0 a 3,4) x (0,0 a 32,0) ppm.



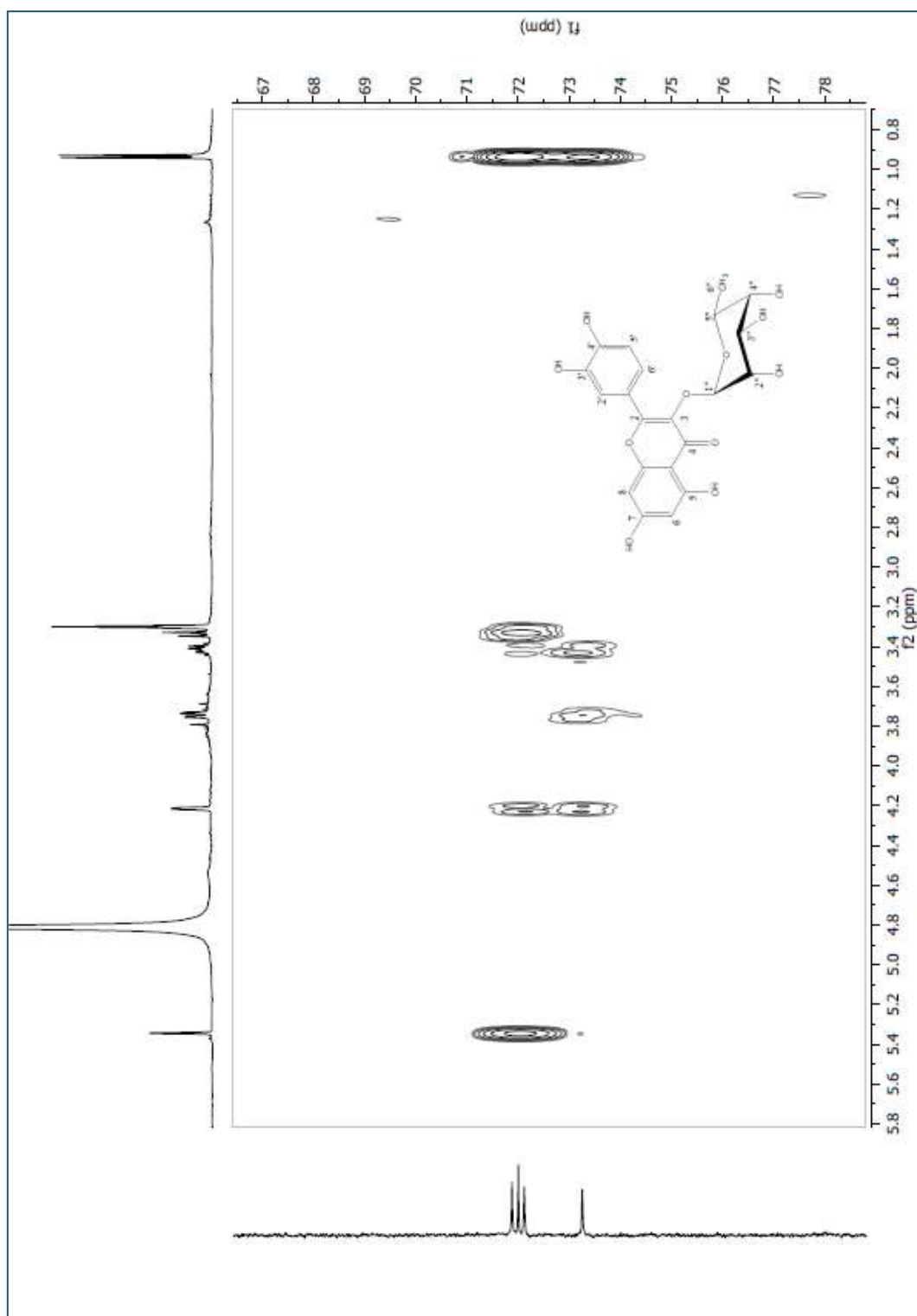
**Figura 30.** Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de EPA 2



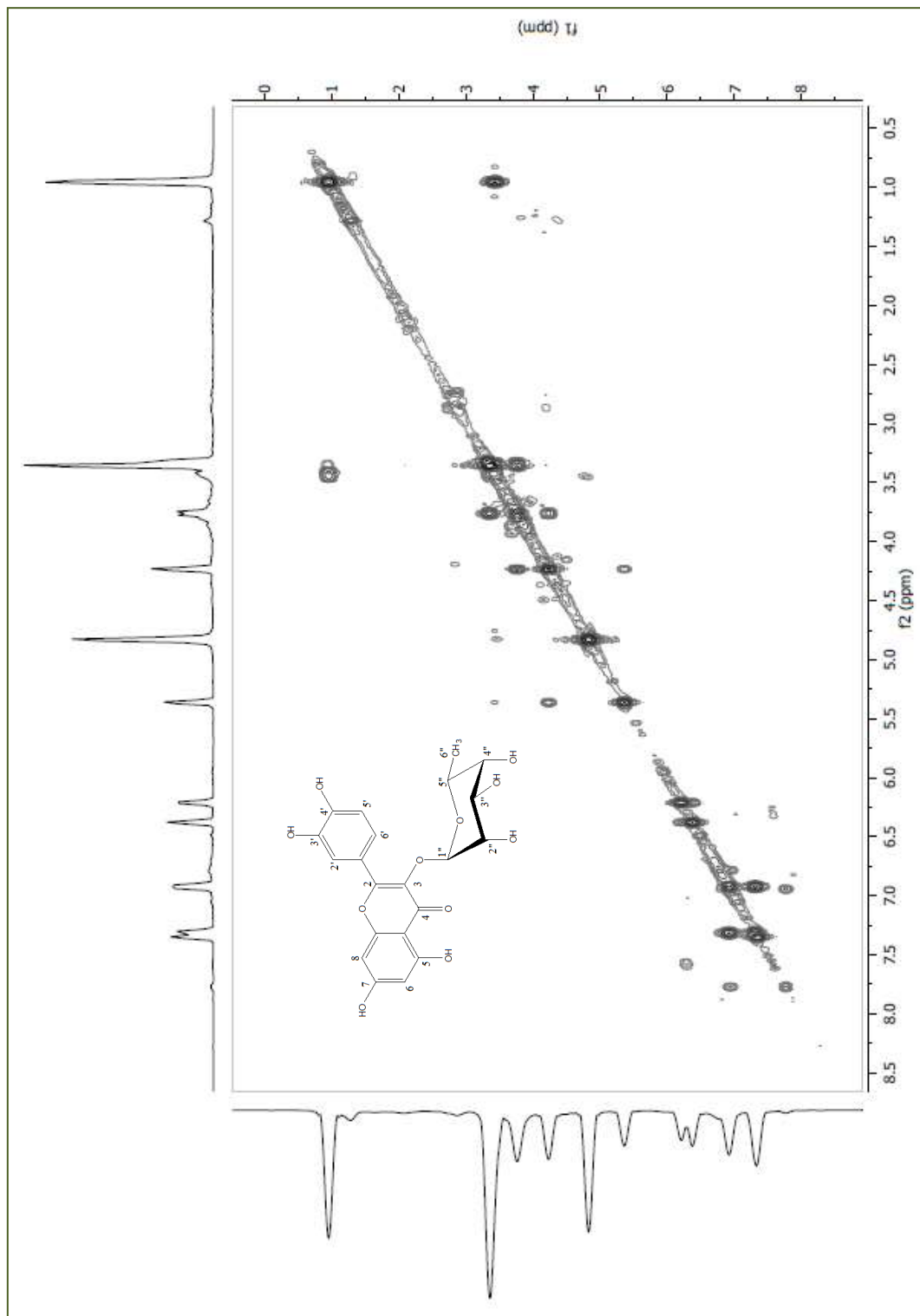
**Figura 31.** Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **EPA 2** na região entre (5,1 a 7,5) x (70,0 a 170,0) ppm.



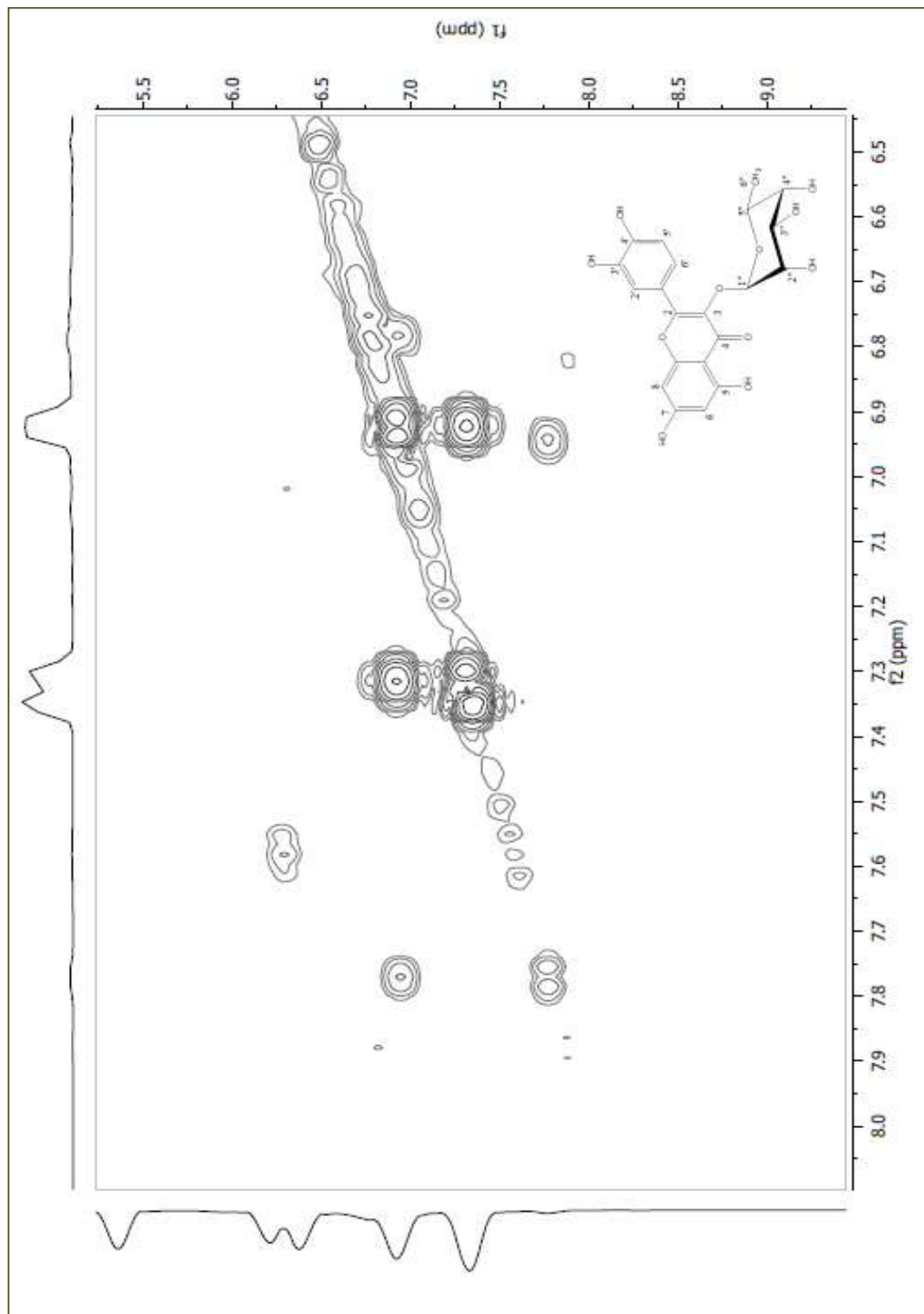
**Figura 32.** Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **EPA 2** na região entre (0,5 a 6,5) x (60,0 a 110,0) ppm.



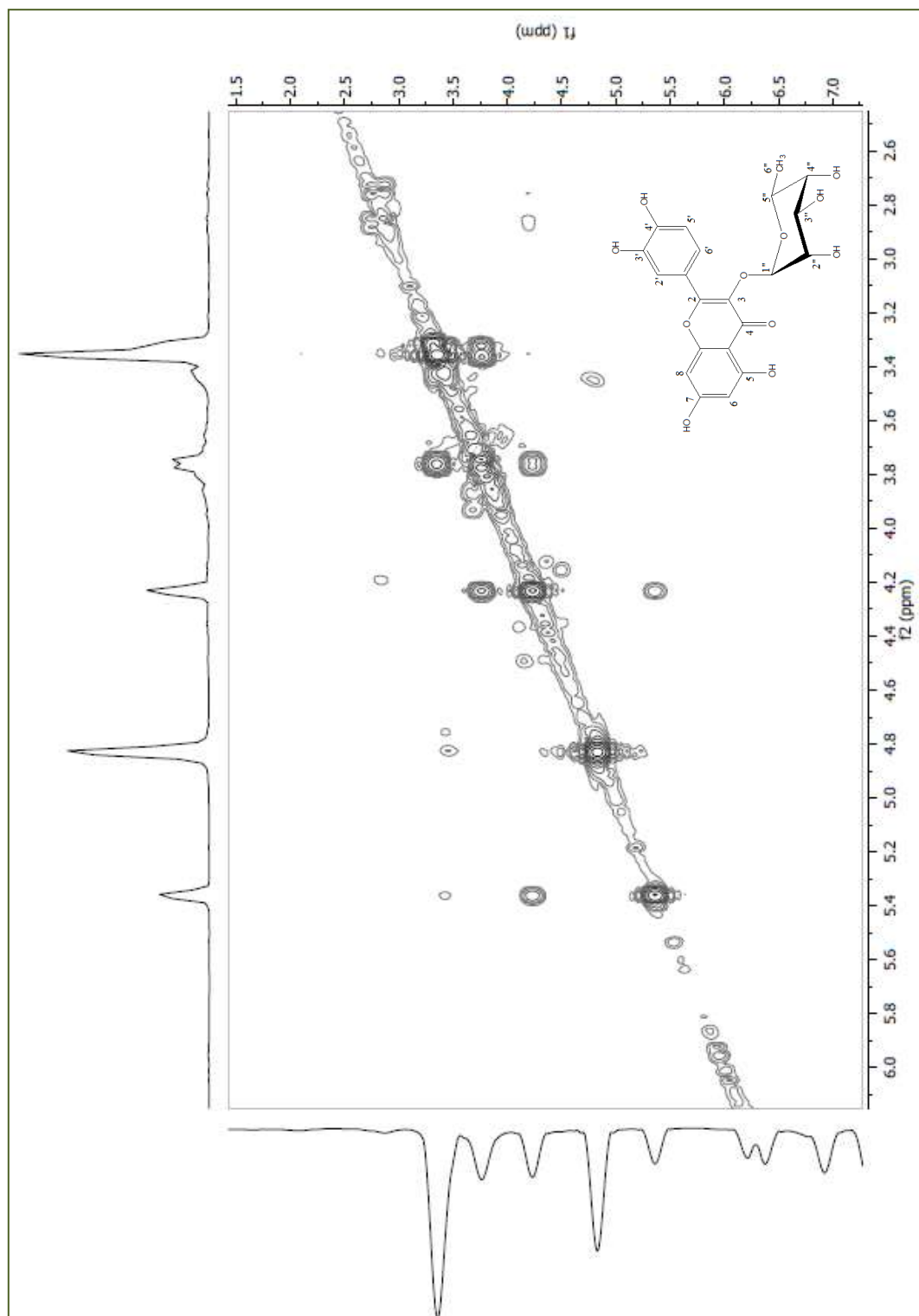
**Figura 33.** Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **EPA 2** na região entre (0,8 a 5,8) x (67,0 a 78,0) ppm.



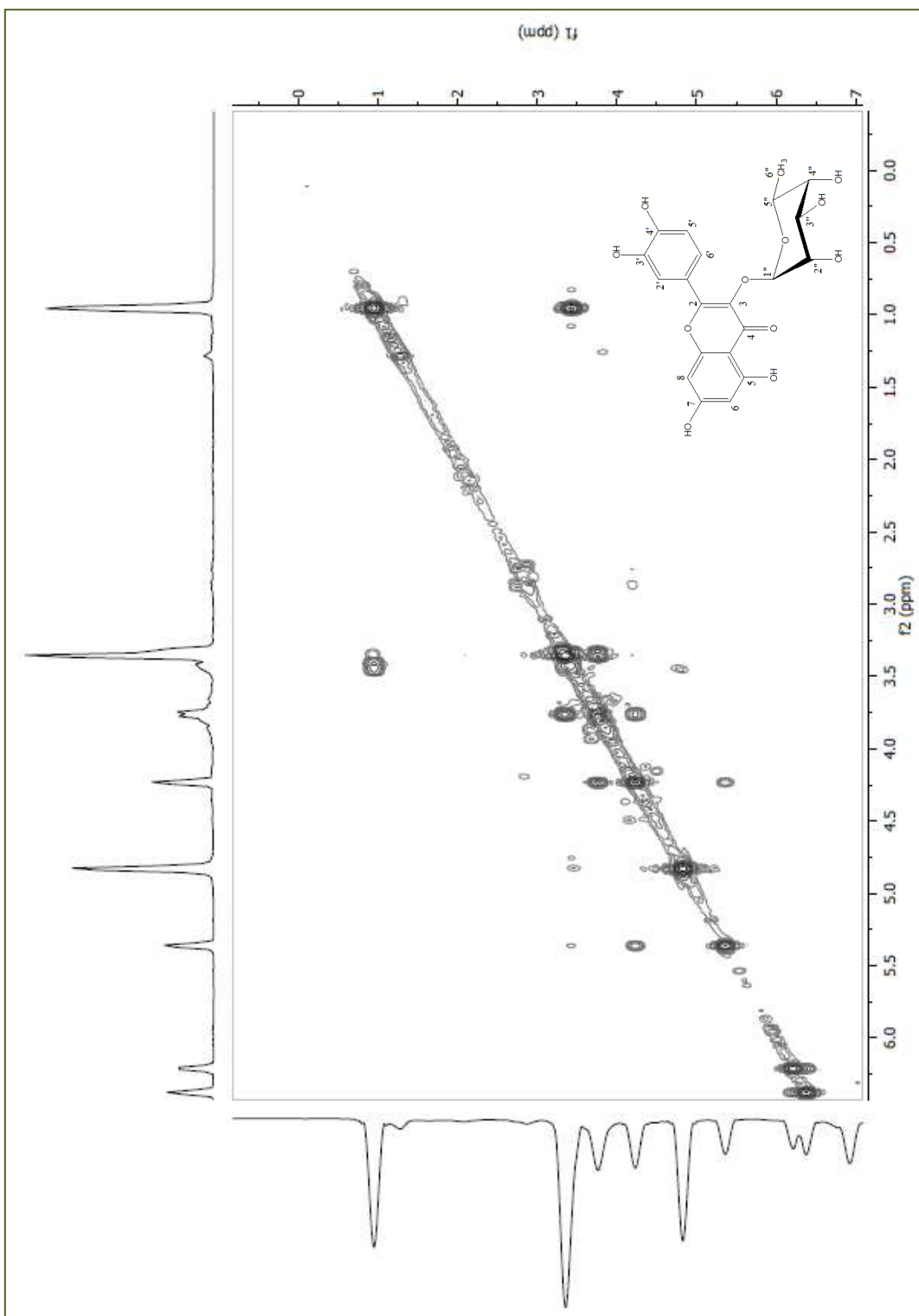
**Figura 34.** Espectro de COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de EPA 2.



**Figura 35.** Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **EPA 2** na região entre (6,5 a 8,0) x (5,5 a 9,0) ppm.



**Figura 36.** Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de **EPA 2** na região entre (2,6 a 6,0) x (1,5 a 7,0) ppm.



**Figura 37.** Expansão do espectro de COSY (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de EPA 2 na região entre (0,0 a 6,0) x (0,0 a 7,0) ppm.

### 5.3. Identificação de EPA 3

A substância **EPA 3** foi isolada com aparência amorfa de cor amarelada. O espectro de massas obtido com EM-ESI (Figura 38, pág. 88) mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  637,2 [M-H], compatível com a fórmula molecular  $C_{29}H_{34}O_{16}$ .

O espectro de IV de **EPA 3** (Fig. 39, pág. 89) evidencia bandas de absorção em  $3.431\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H),  $1.653\text{ cm}^{-1}$  (estiramento de carbonila conjugada),  $1.595\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C de anel aromático) e em  $1.209\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz, DMSO) (Fig. 40-43, pág. 90-93) apresentou 29 sinais correspondentes a 29 átomos de carbonos. Desta forma, dez sinais foram atribuídos a carbonos quaternários em  $\delta_{\text{C}}$  177,4; 165,1; 160,8; 150,0; 156,3; 156,5; 145,7; 134,0; 122,2; 104,8 e um conjunto com cinco sinais metínicos aromáticos em  $\delta_{\text{C}}$  121,5; 115,7; 111,1; 97,9; 92,2 sugeriram um esqueleto de flavonoide. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  177,4 característico de grupo carbonila e dois sinais em  $\delta_{\text{C}}$  55,6 e 56,0 referentes à presença de duas metoxilas.

A ausência do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  107,5, indicou a presença de substituinte no carbono 3. O conjunto de sinais em  $\delta_{\text{C}}$  76,4; 75,7; 74,0; 71,8; 70,5; 70,0; 69,8; 68,1 e 66,8 sugeriram a presença da rutinose - um dissacarídeo contendo uma unidade de glicose ligada a ramnose. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  101,1 e 66,8, foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1'') e ao carbono metilênico respectivamente, sinais estes característicos da presença de glicose. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  100,7 e 17,6 foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1''') e ao carbono metílico (C-6'''), característicos da presença de ramnose (GONZÁLEZ-GUEVARA, *et al.*, 2006).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO) (Fig. 44-46, pág. 94-96) apresentou na região de hidrogênios aromáticos, dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,36 (1H,  $J=2,0$  Hz) e 6,67 (1H,  $J=2,0$ Hz) acoplando em meta características dos hidrogênios nas posições (H-6) e (H-8) de flavonoides. Foi observado um duplo dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 (1H,  $J=2,5$  e 8,5 Hz) referente ao hidrogênio H-6' acoplado a meta e orto, um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,55 (1H,  $J=2,0$  Hz) com acoplamento meta referente ao hidrogênio (H-2') e um dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (1H,  $J=9,0$  Hz) com acoplamento orto referente ao hidrogênio (H-5'). Assim, foi sugerido um sistema ABX no anel B do flavonoide. A ausência do singlete referente ao H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  6,75), reforça, portanto, a proposta da existência de um substituinte nesta posição. Ainda, os dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,38 e 3,70, o singlete em  $\delta_{\text{H}}$  4,39 e o dubleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,97, bem como, os multipletos entre  $\delta_{\text{H}}$  3,39; 3,22; 3,34; 3,70; 3,29; 3,07 e 3,26

permitiram sugerir as duas unidades osídicas. Todas as atribuições foram realizadas em comparação com dados da literatura (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006).

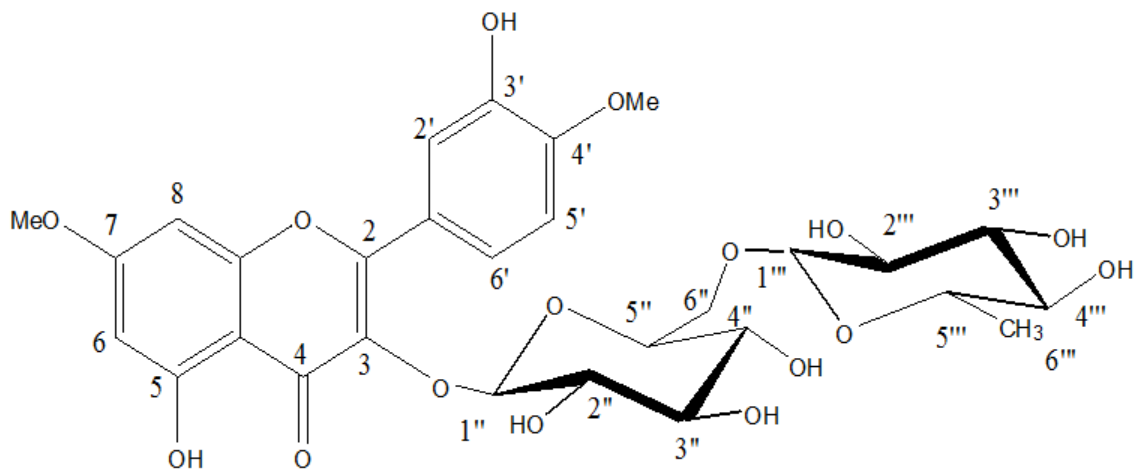
Na análise do espectro HMQC (Fig. 47-52, pág. 97-102), foi observado correlações de sinais entre  $\delta_H$  6,36 (H-6) com  $\delta_C$  97,9 (C-6) e de  $\delta_H$  6,67 (H-8) com  $\delta_C$  92,2 (C-8), confirmando as atribuições C-6 e C-8 do anel A do flavonoide. As correlações de  $\delta_H$  7,04 (H-5') com  $\delta_C$  111,1 (C-5');  $\delta_H$  7,72 (H-6') com  $\delta_C$  121,5 (C-6') e de  $\delta_H$  7,55 (H-2') com  $\delta_C$  115,7 (C-2') confirmaram as atribuições feitas para estes carbonos. Foi observado ainda, correlações entre o sinal em  $\delta_H$  0,97 (H-6''') com  $\delta_C$  17,6 (C-6''') e de  $\delta_H$  4,39 (H-1''') com  $\delta_C$  100,7 (C-1'''), confirmando respectivamente a metila e o carbono anomérico da ramnose. As correlações entre o sinal em  $\delta_H$  3,70/3,28 (H-6'') com  $\delta_C$  66,8 (C-6'') e de  $\delta_H$  5,38 (H-1'') com  $\delta_C$  101,1 (C-1''), confirmaram, respectivamente, o carbono metilênico e o anomérico da glicose. Outras correlações estão compiladas na tabela 10, página 87.

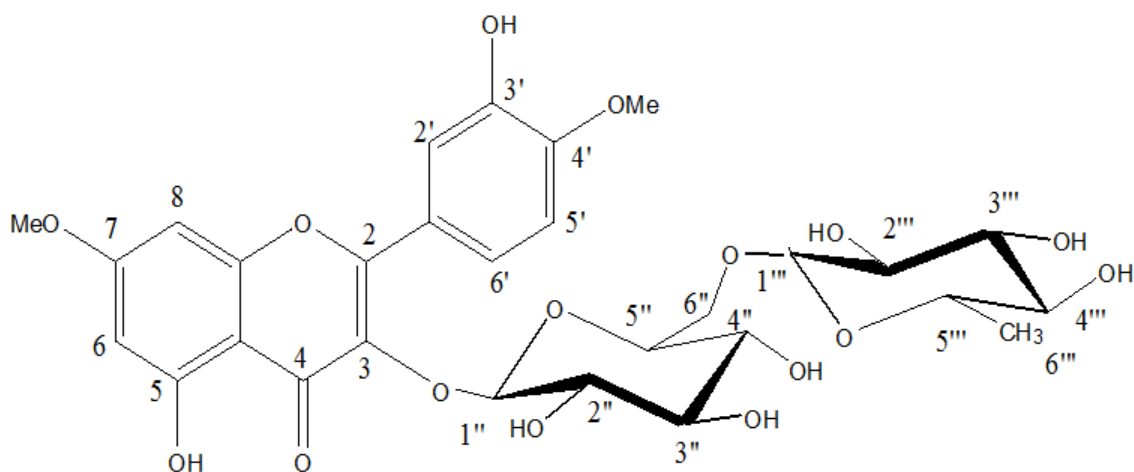
No espectro HMBC (Fig. 53-56, pág. 103-106), foi possível determinar as correlações dos sinais em  $\delta_H$  6,36 (H-6), 6,67 (H-8) e o sinal dos hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,88 com  $\delta_C$  165,1 confirmando o carbono da posição C-7. Comprovando que uma das metoxilas, estaria nesta mesma posição. Observou-se as correlações de  $\delta_H$  6,36 (H-6) com  $\delta_C$  160,8 atribuída ao carbono da posição C-5. Observou-se ainda, a correlação de  $\delta_H$  6,67 (H-8) com  $\delta_C$  156,5 atribuída ao carbono da posição C-9, assinalando todos os carbonos do anel A do flavonoide. Neste espectro, foi possível ainda observar as correlações em  $\delta_H$  7,55 (H-2') e  $\delta_H$  7,72 (H-6') com  $\delta_C$  156,3, atribuída ao carbono da posição C-2. As atribuições foram confirmadas com as correlações de  $\delta_H$  7,72 (H-6');  $\delta_H$  7,55 (H-2');  $\delta_H$  7,04 (C-5') e os hidrogênios da metoxila em  $\delta_H$  3,88 com 150,0, que foi atribuído ao carbono da posição C-4'. As correlações  $\delta_H$  3,70 (H-6'') com  $\delta_C$  100,6 (C-1''') confirmam a ligação C-1''' da ramnose com C6'' da glicose. As demais correlações estão compiladas na tabela 10, página 87.

No espectro de COSY (Fig. 57-59, pág. 107-109), foi possível observar correlações dos sinais em  $\delta_H$  6,36 (H-6) com 6,68 (H-8);  $\delta_H$  7,72 (H-6') com  $\delta_H$  7,04 (H-5').

Com a análise dos dados dos espectros de RMN  $^{13}C$  e  $^1H$ , e diante das confirmações obtidas com as correlações dos bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY) foi concluído que a substância se tratava do 7,4'-Di-O-metilquercetin-3-O- $\beta$ -rutinosídeo (Ombuin-3-rutinosídeo), já reportando na literatura na espécie *Ebenus pinnata* (ABREU

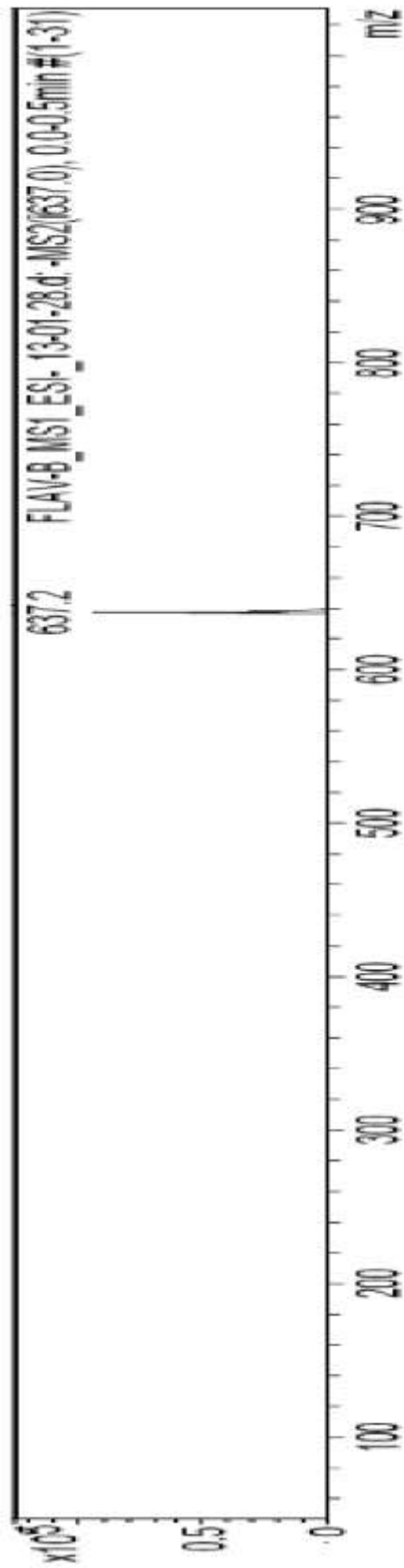
et al; 2007) e em espécies de *Erythroxyllum cuban* (GONZÁLEZ-GUEVARA, et al., 2006).



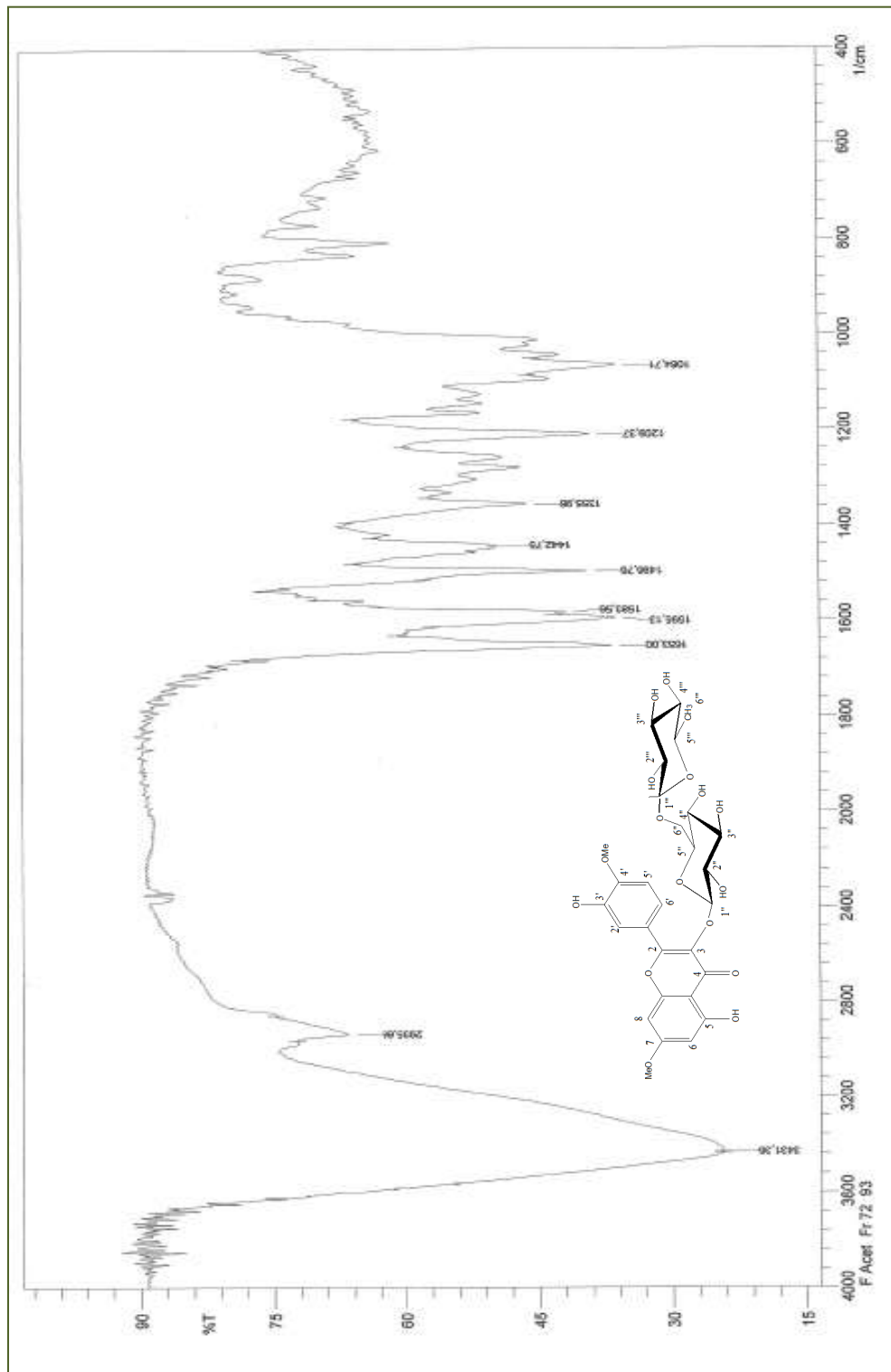


**Tabela 10.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em DMSO a 500 MHz e 125 MHz de EPA 3

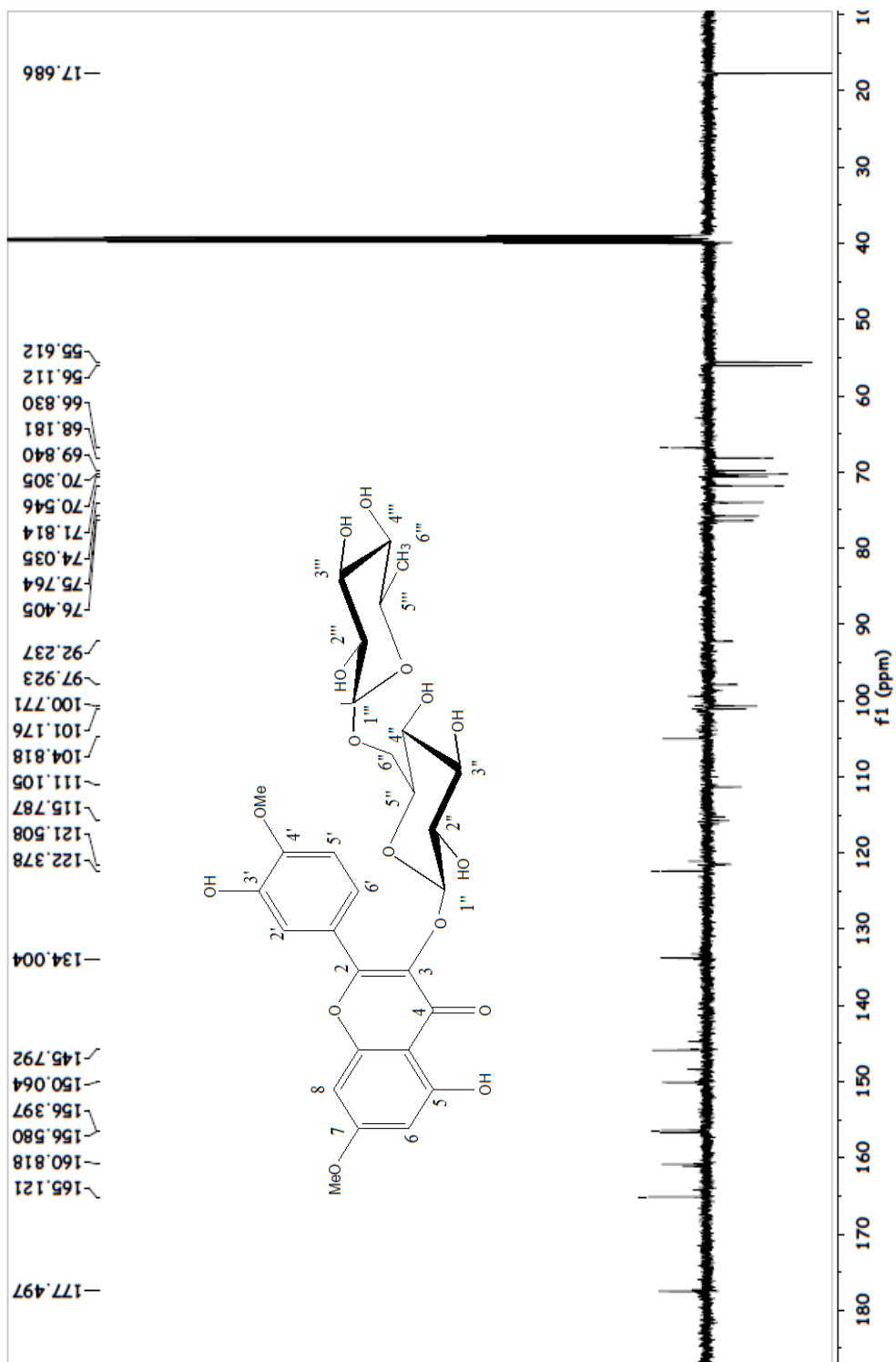
EPA 3		MODELO (GONZÁLEZ-GUEVARA, <i>et al.</i> , 2006).			
HMQC		HMBC	COSY	MODELO	
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	156,3		H-2', H-6'		156,2
3	134,0		H-1''		135,7
4	177,4				177,3
5	160,8		H-6		160,7
6	97,9	6,36 (d, $J= 2,0$ Hz)	H-8	H-8	97,7
7	165,1		H-6, H-8, OMe		165,0
8	92,2	6,67 (d, $J= 2,0$ Hz)	H-6	H-6	92,1
9	156,5		H-8		156,5
10	104,8				104,8
OMe	55,6	3,88 sl	H-6, H-8		55,5
OMe	56,1	3,88 sl			55,8
1'	122,3		H-2', H-5'		122,7
2'	115,7	7,55 (d, $J= 2,0$ Hz)	H-6'		115,7
3'	145,7		H-2', H-5'		145,7
4'	150,0		H-2', H-5', H-6', OMe		150,0
5'	111,1	7,04(d, $J= 9,0$ Hz)		H-6'	111,2
6'	121,5	7,72 (dd, $J= 2,5; 8,5$ Hz)	H-2', H-5'	H-5'	121,3
1''	101,1	5,38 (d, $J= 7,5$ Hz)		H-2''	101,07
2''	74,0	3,22 m	H-4''	H-1''	73,9
3''	75,7	3,25m	H-2'', H-4''		76,3
4''	70,3	3,39 m	H-2'', H-3'', H 5''		69,7
5''	76,4	3,24 m	H-4'', H-6'		75,7
6''	66,8	3,70 (d, $J=11,0$ Hz)	H-1''', H-5''		66,7
1'''	100,7	4,39 sl	H-6''		100,5
2'''	70,5	3,29 m	H-4''', H-3'''		70,2
3'''	69,8	3,08 m			70,4
4'''	71,8	3,07 m	H-5'''		71,7
5'''	68,1	3,26 m	H-6''', H-4'''		68,0
6'''	17,6	0,97 (d, $J=5,0$ Hz)	H-4'''		17,4



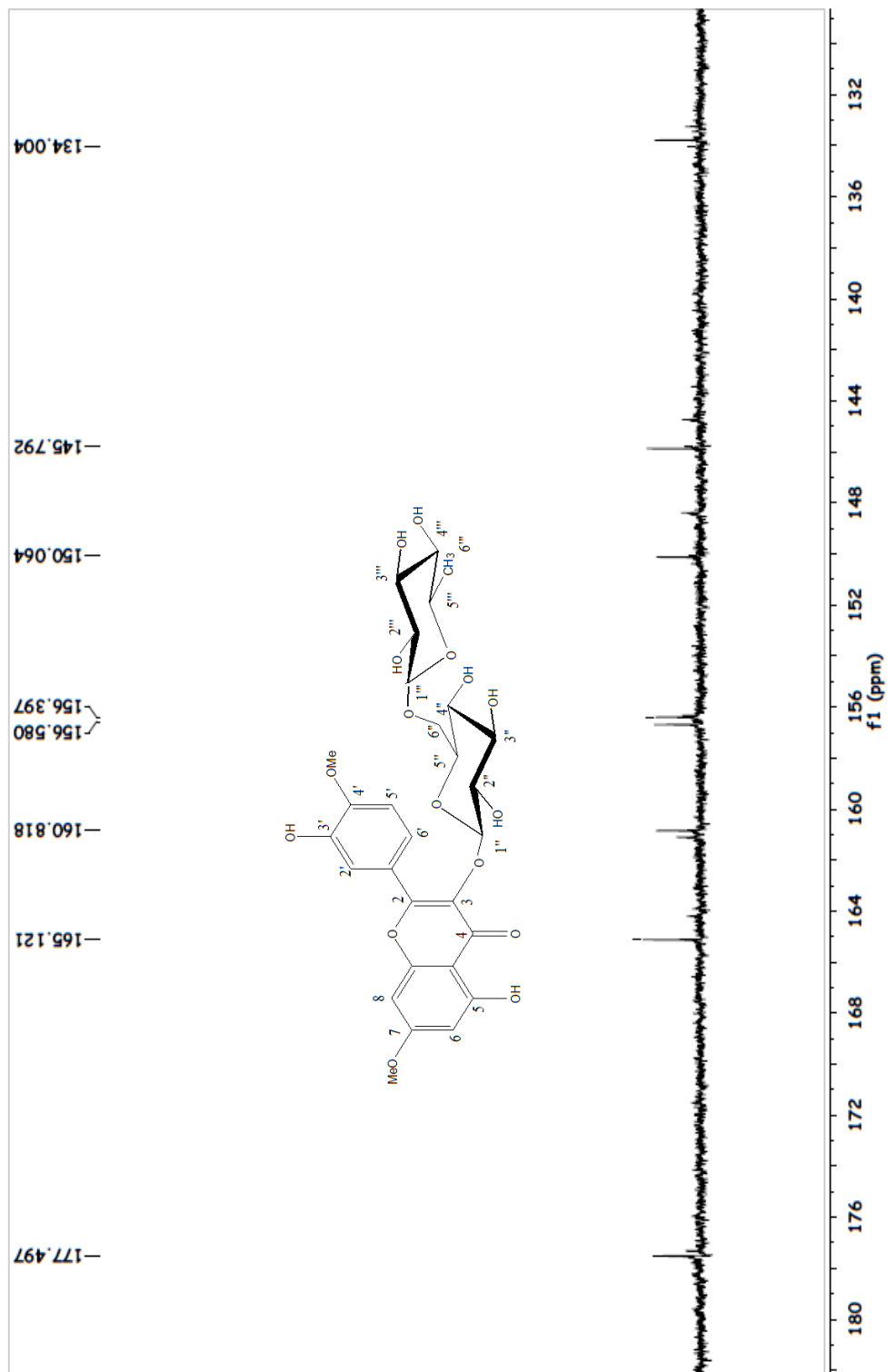
**Figura 38.** . [M-H] – ( EM-ESI, modo negativo)  
Espectro de massa do composto **EPA 3**



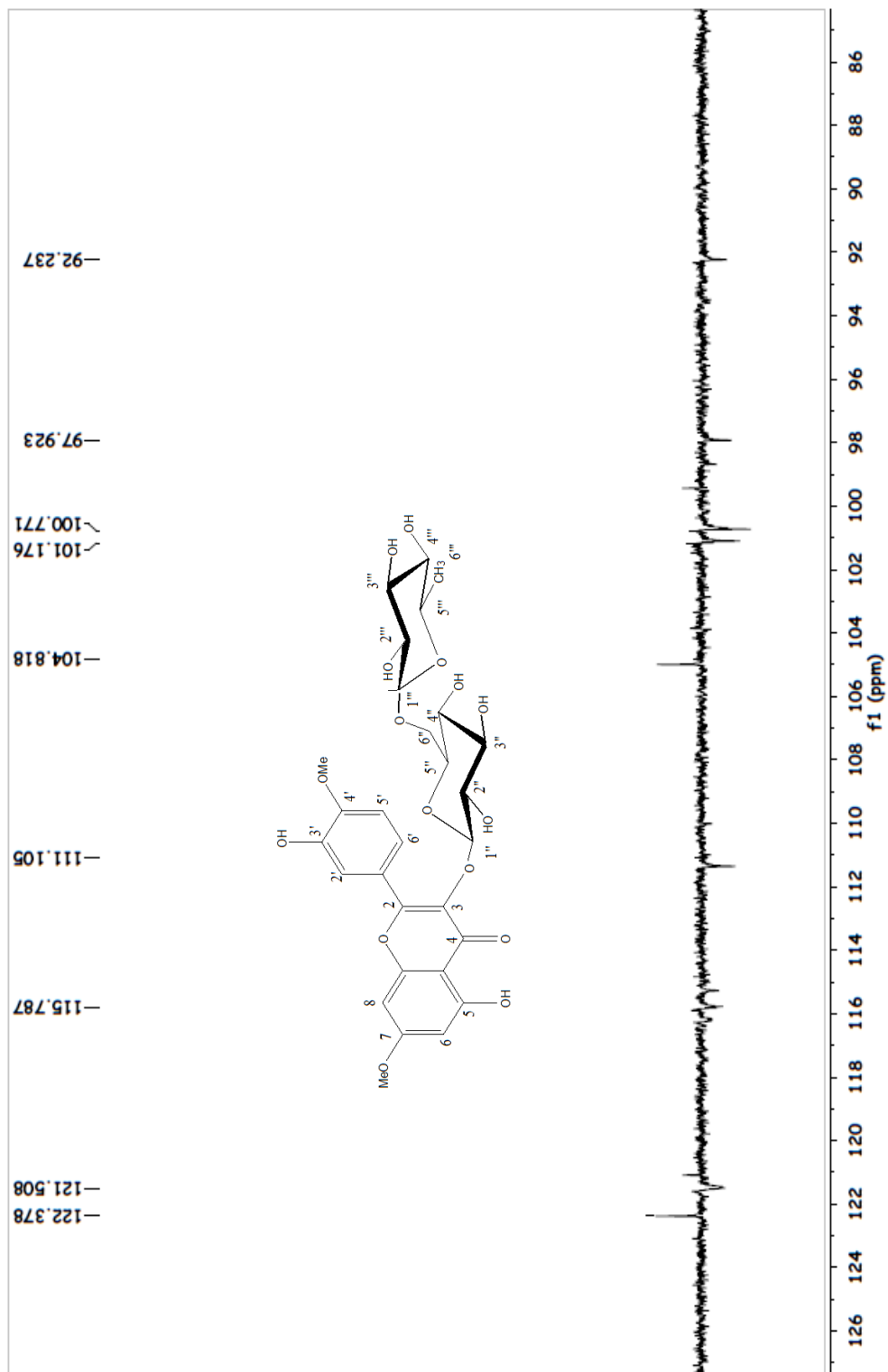
**Figura 39.** Espectro de IV do composto EPA 3.



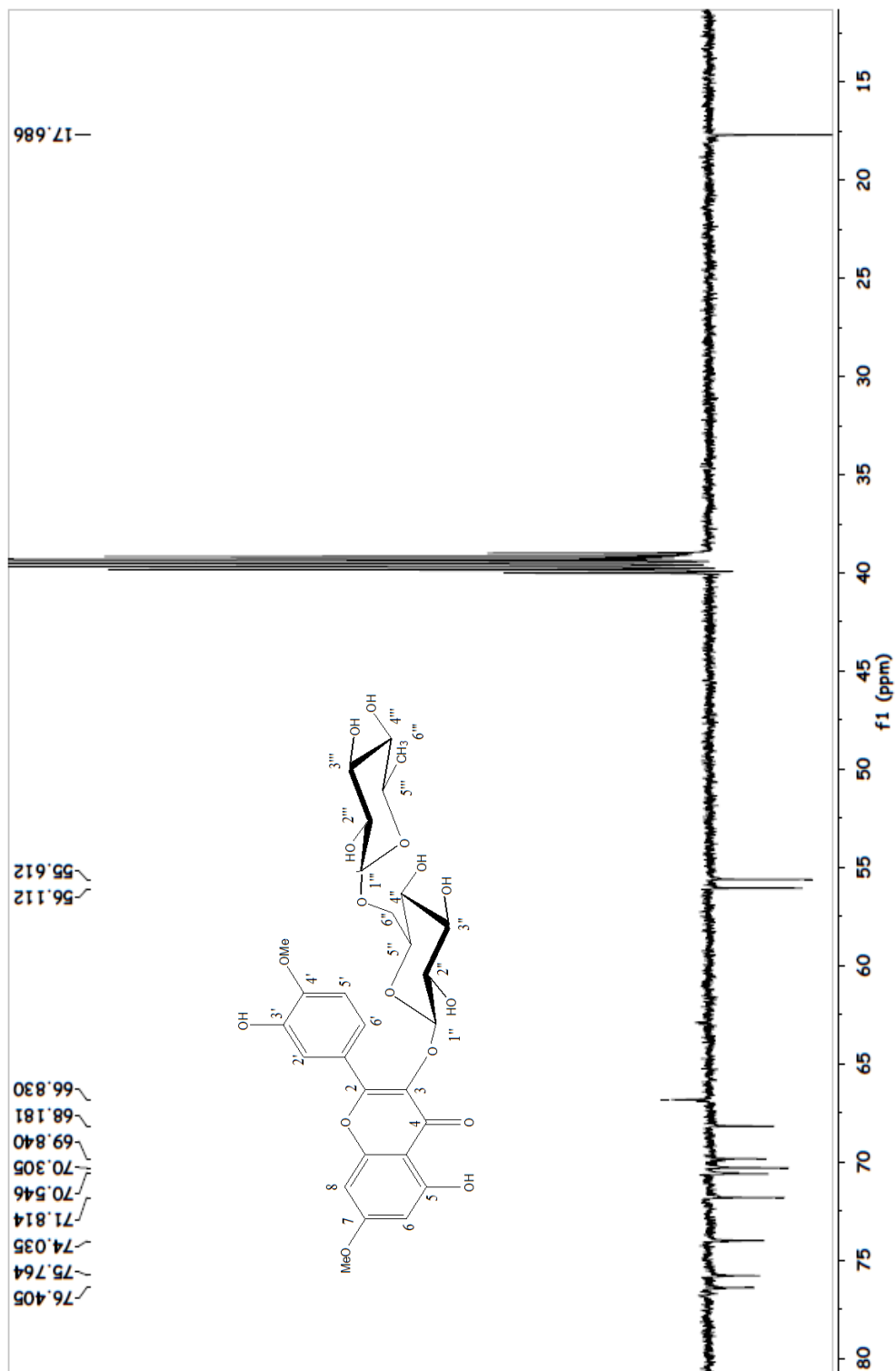
**Figura 40.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz,  $\text{DMSO}$ ) de EPA 3



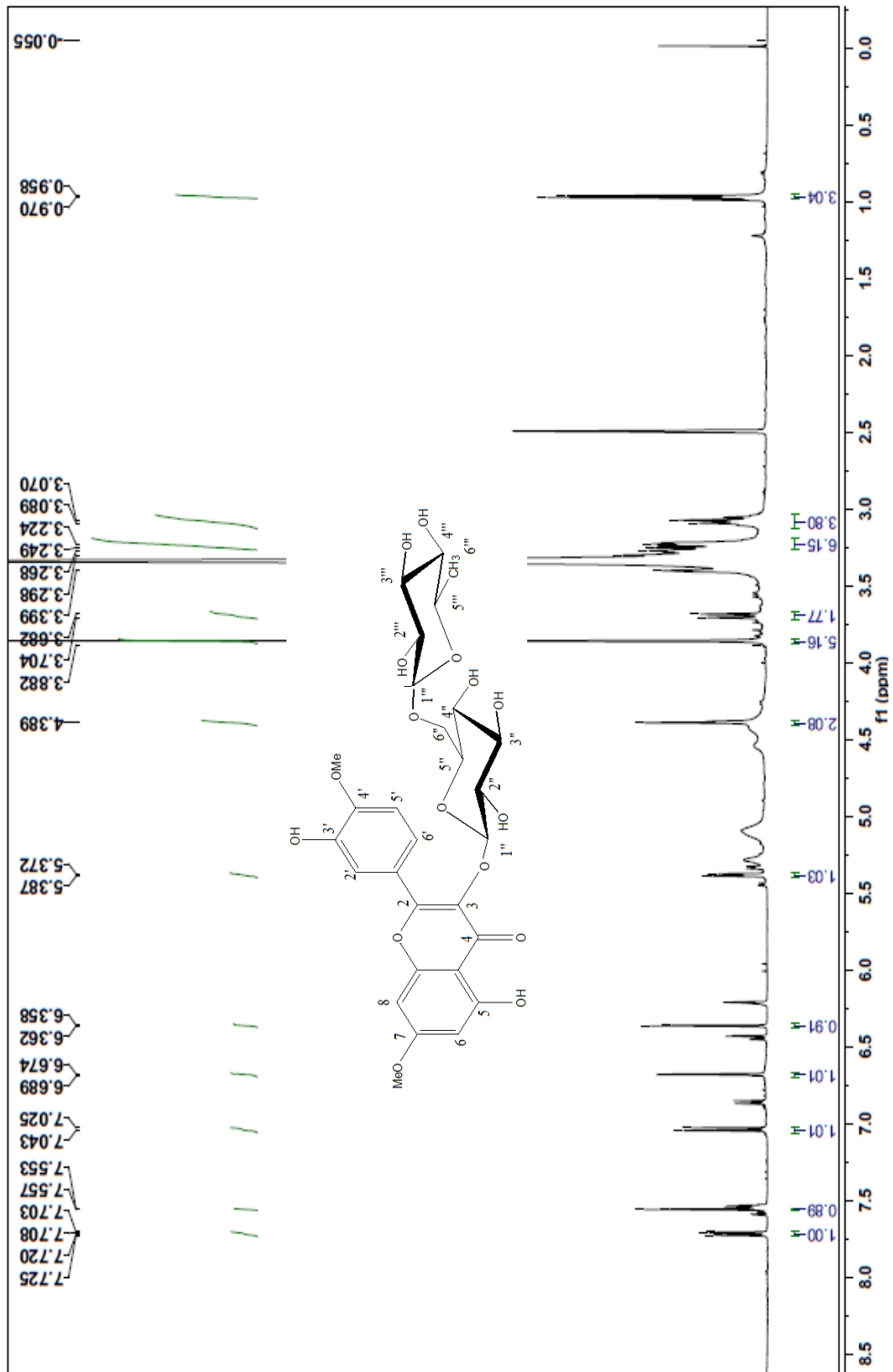
**Figura 41.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz, DMSO) de EPA 3 na região entre  $\delta_{\text{C}}$  132 a 180 ppm.



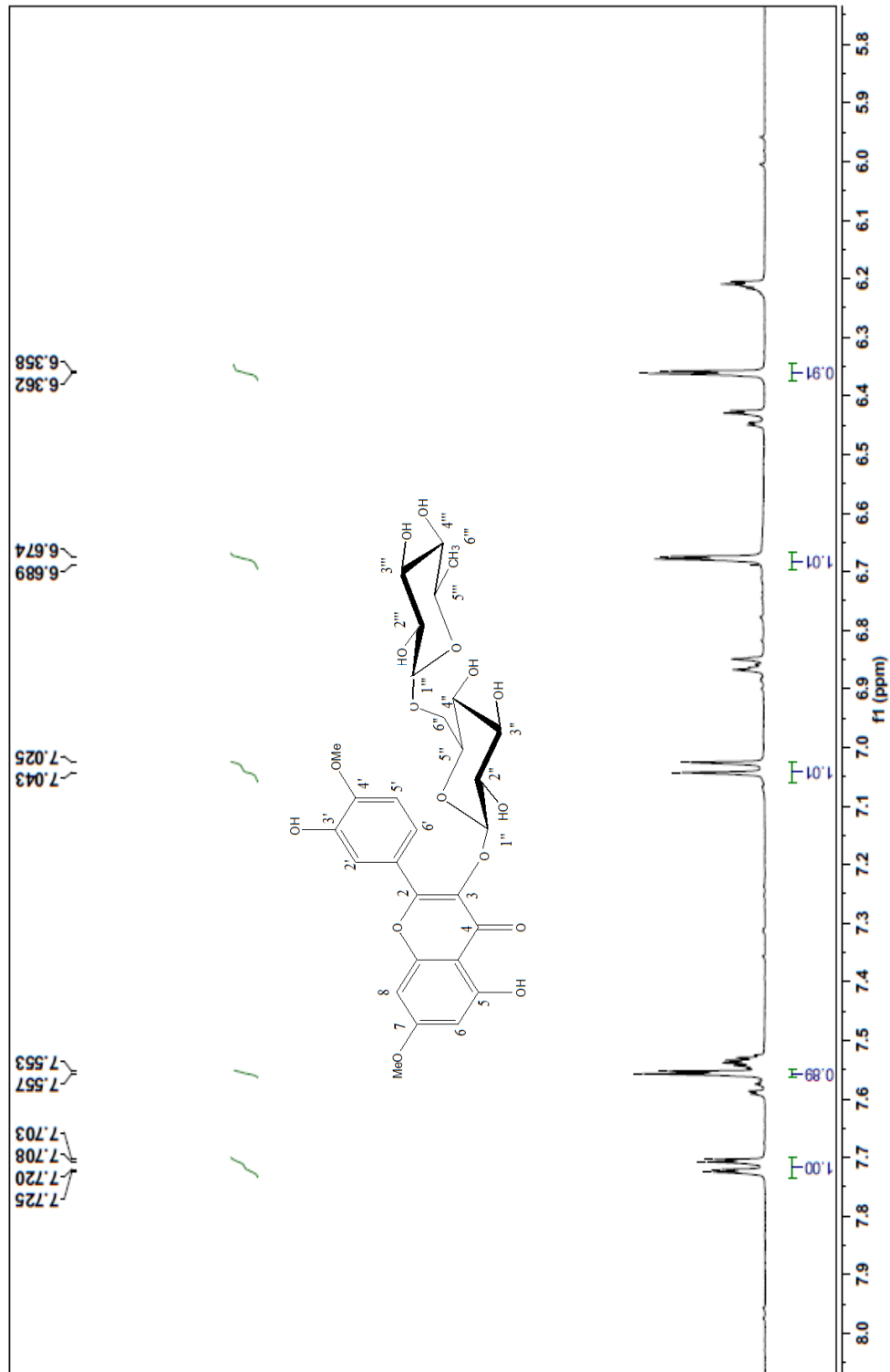
**Figura 42.** Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C-APT (125 MHz, DMSO) de EPA na região entre δ<sub>c</sub> 86 a 126 ppm.



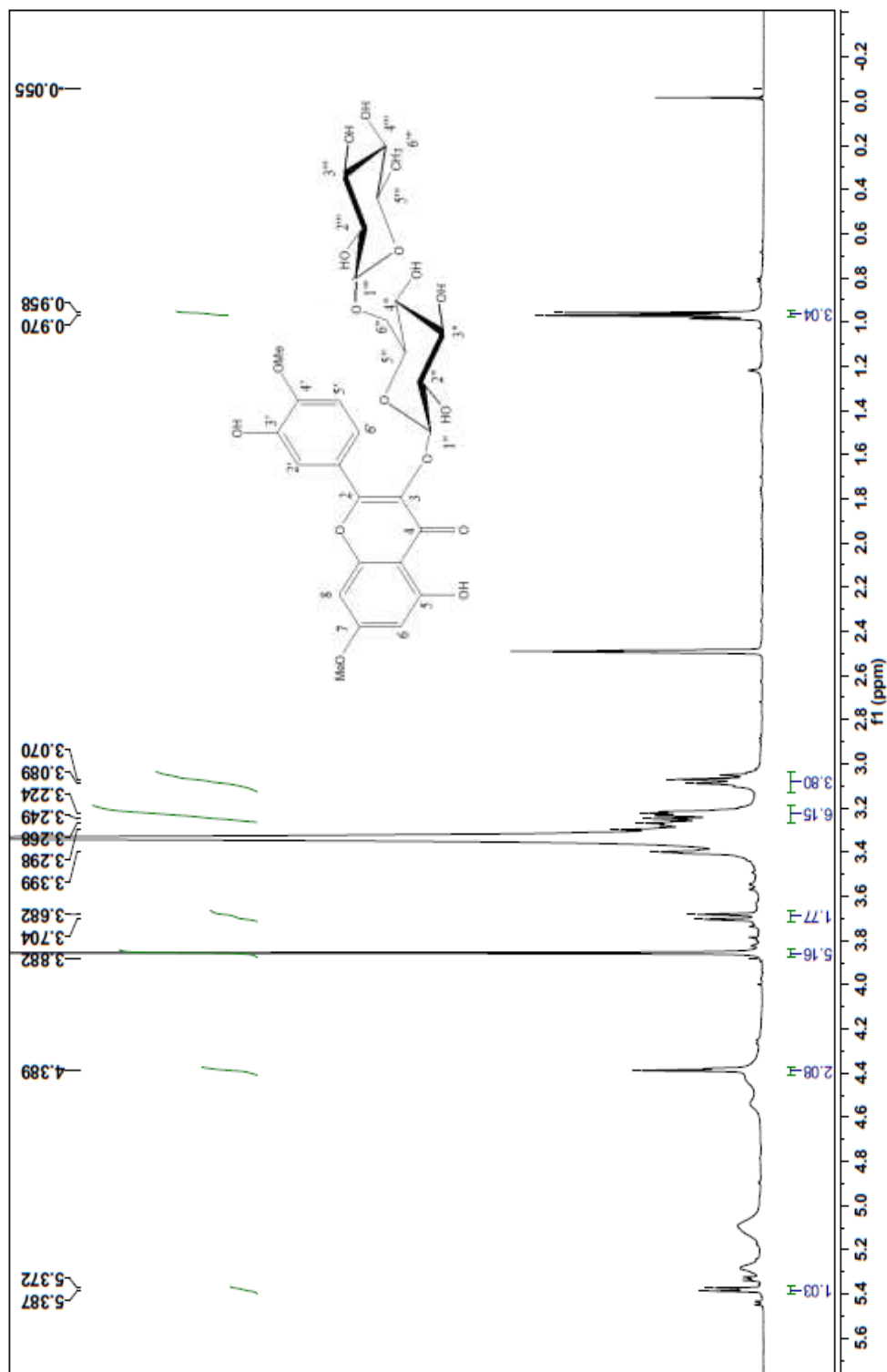
**Figura 43.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz, DMSO) de EPA na região entre  $\delta_{\text{C}}$  15 a 80 ppm.



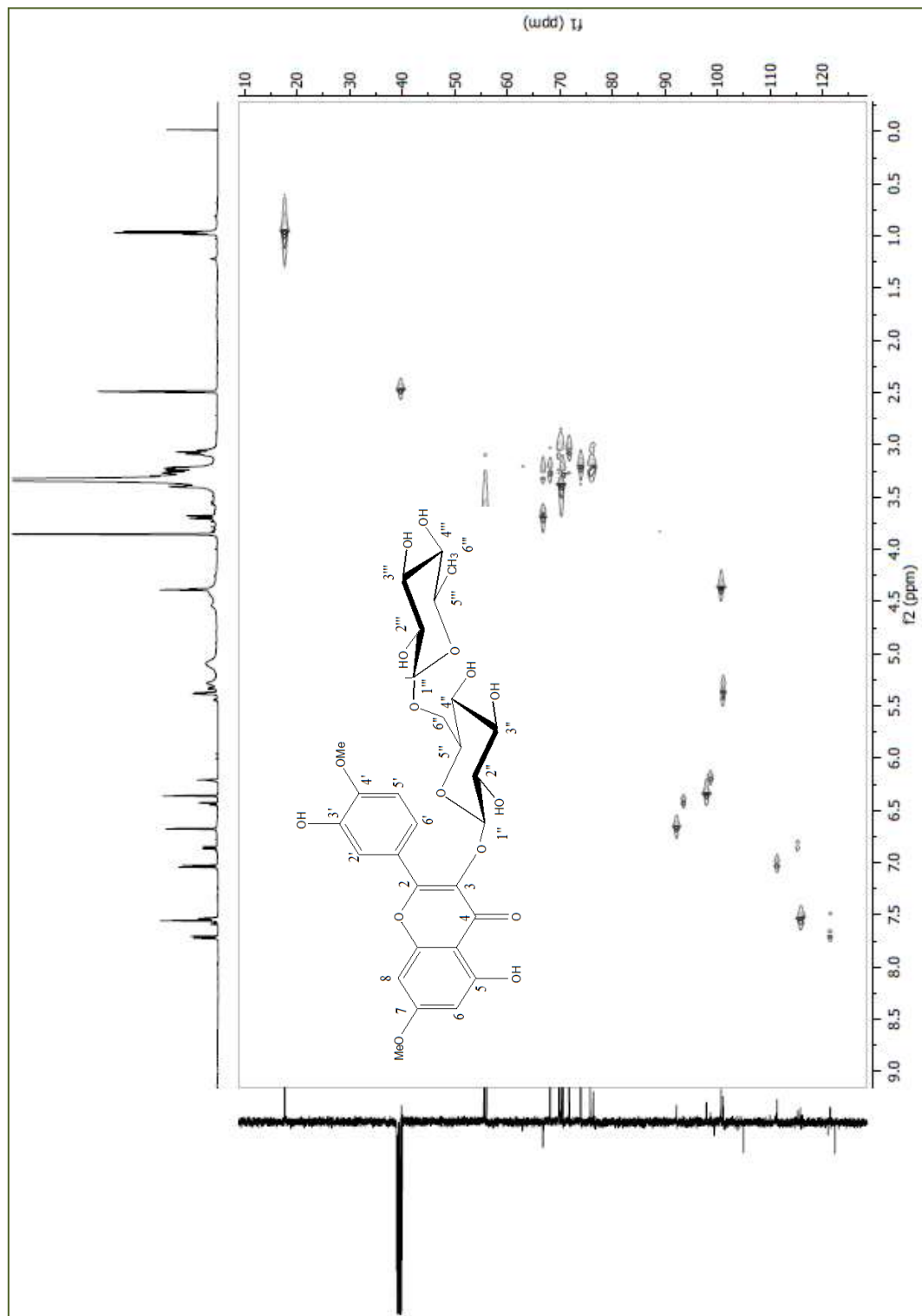
**Figura 44.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO de EPA 3



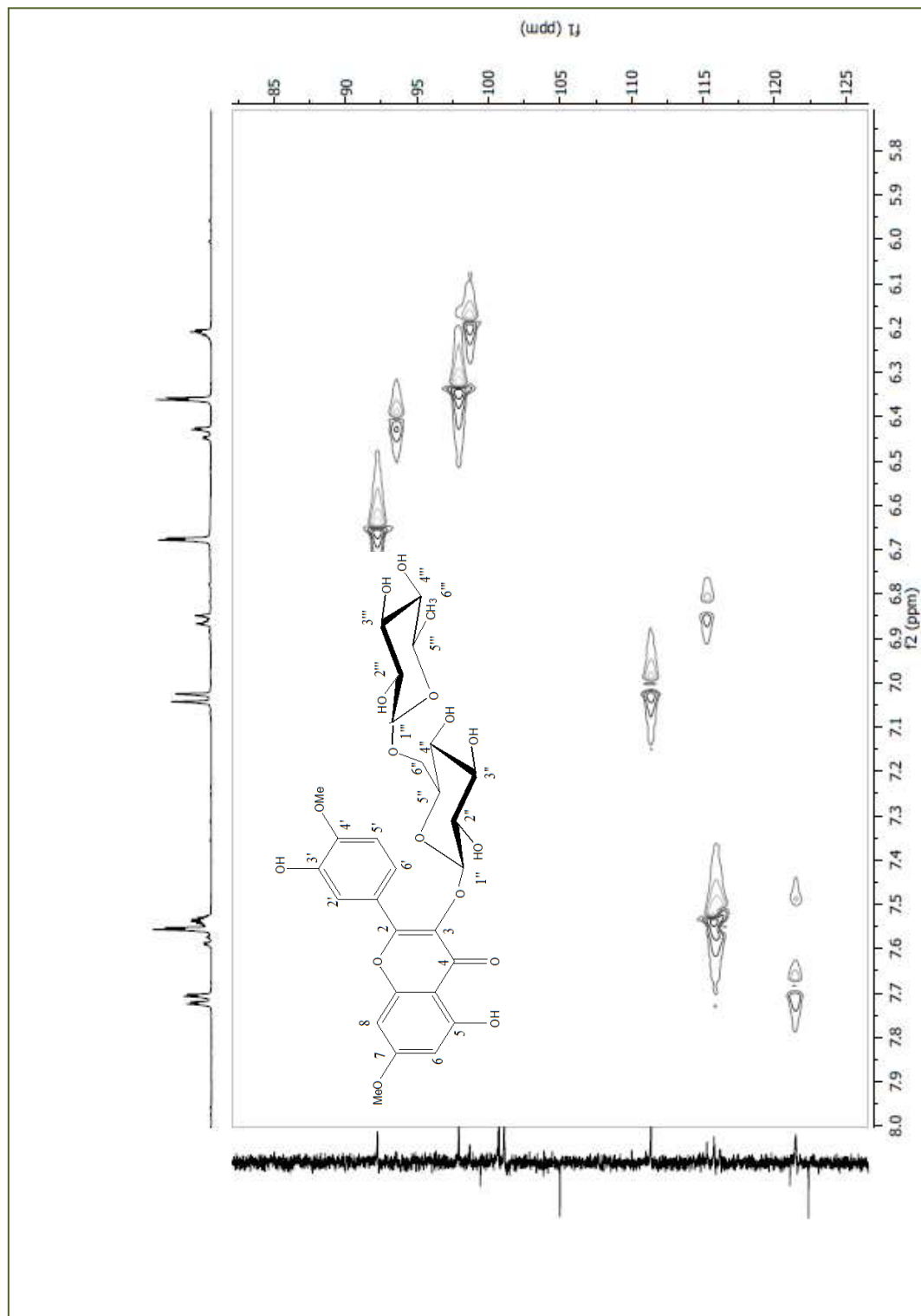
**Figura 45.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO) de EPA 3 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  5,8 a 8,0 ppm



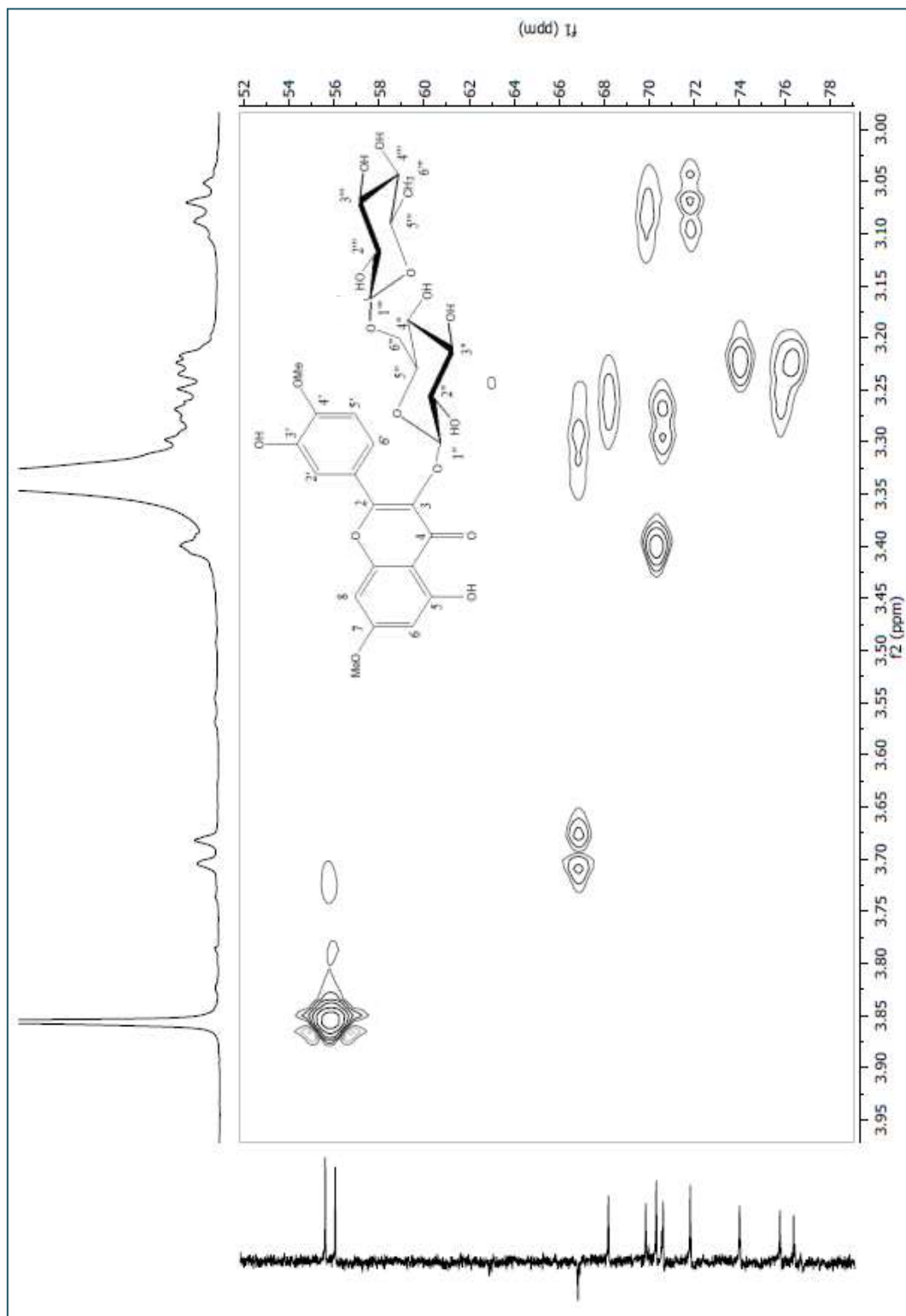
**Figura 46.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de EPA 3 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,0 a 5,6 ppm.



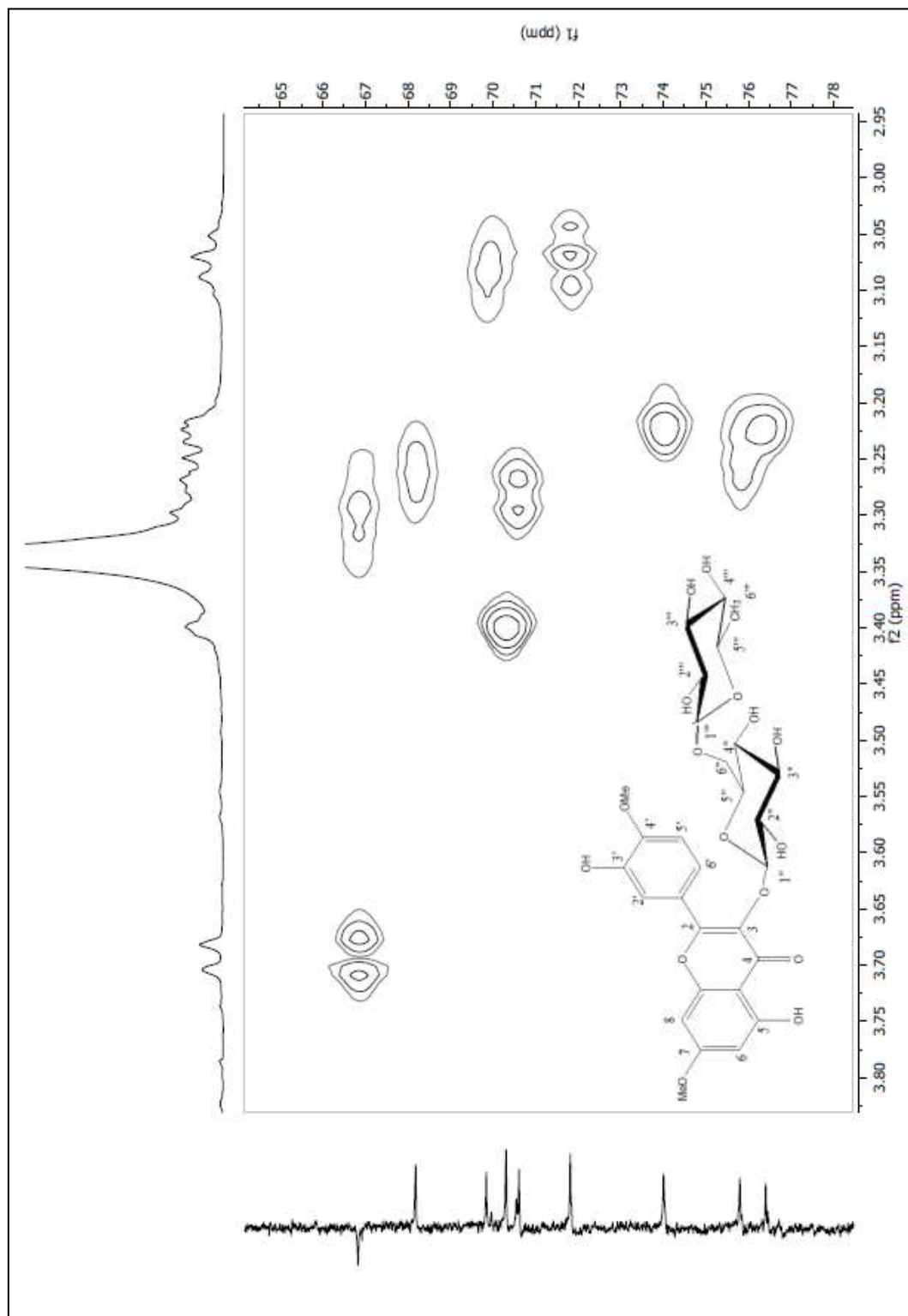
**Figura 47.** Espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO de EPA 3 na região entre (0,0 a 9,0) x (10,0 a 120,0) ppm.



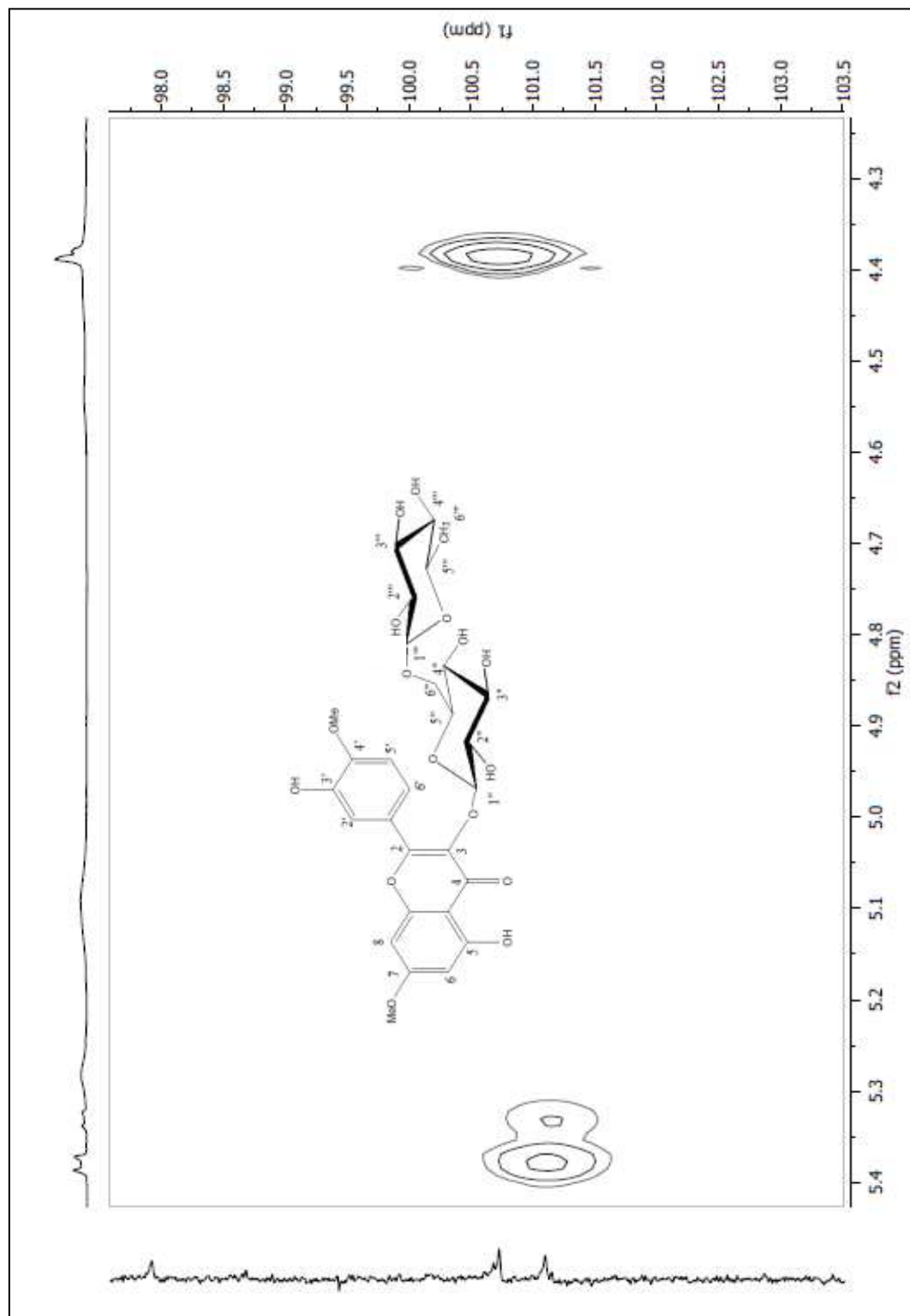
**Figura 48.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 3 na região entre (5,8 a 8,0) x (85,0 a 125,0) ppm.



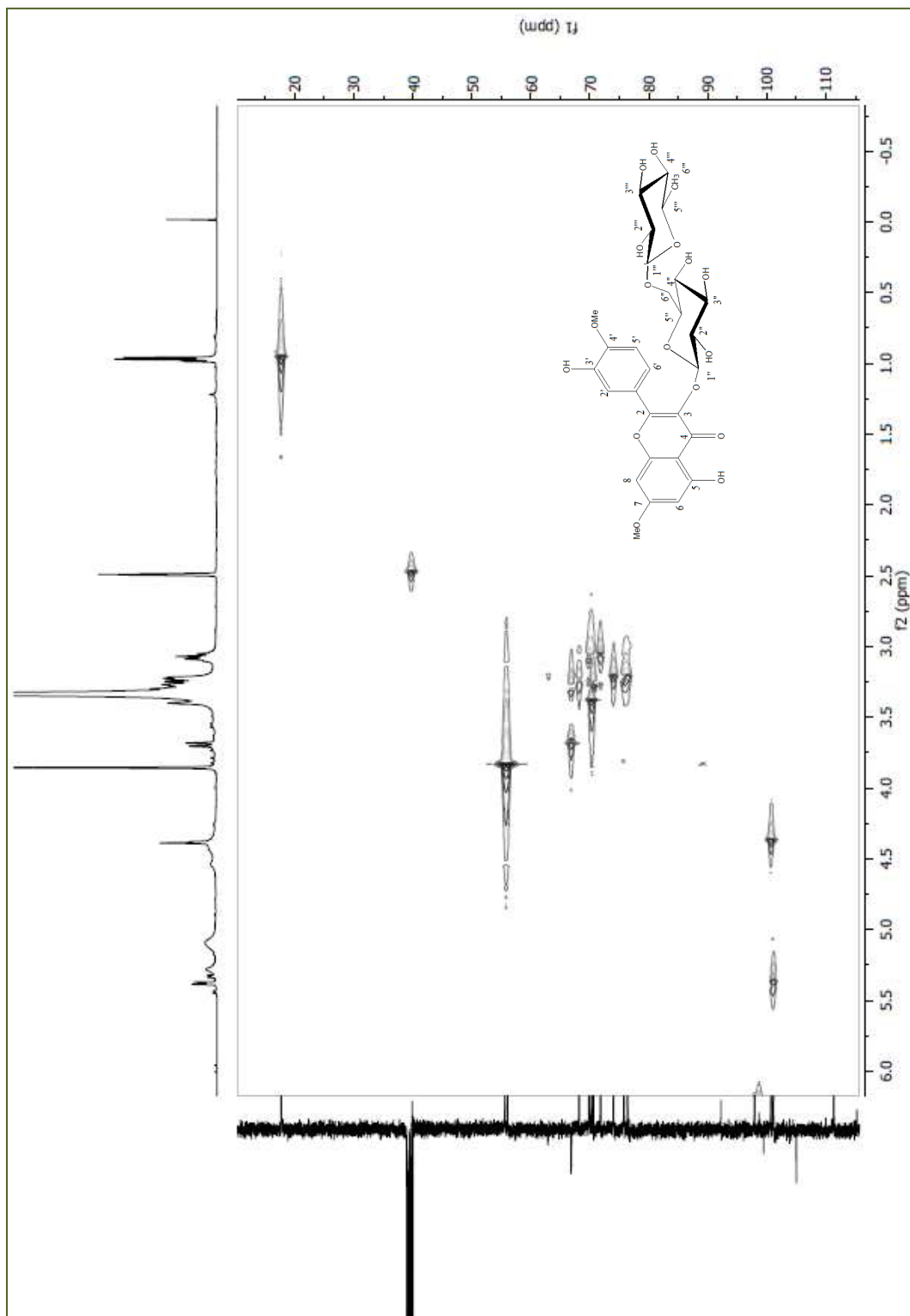
**Figura 49.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 3 na região entre (3,0 a 3,9) x (52,0 a 78,0) ppm.



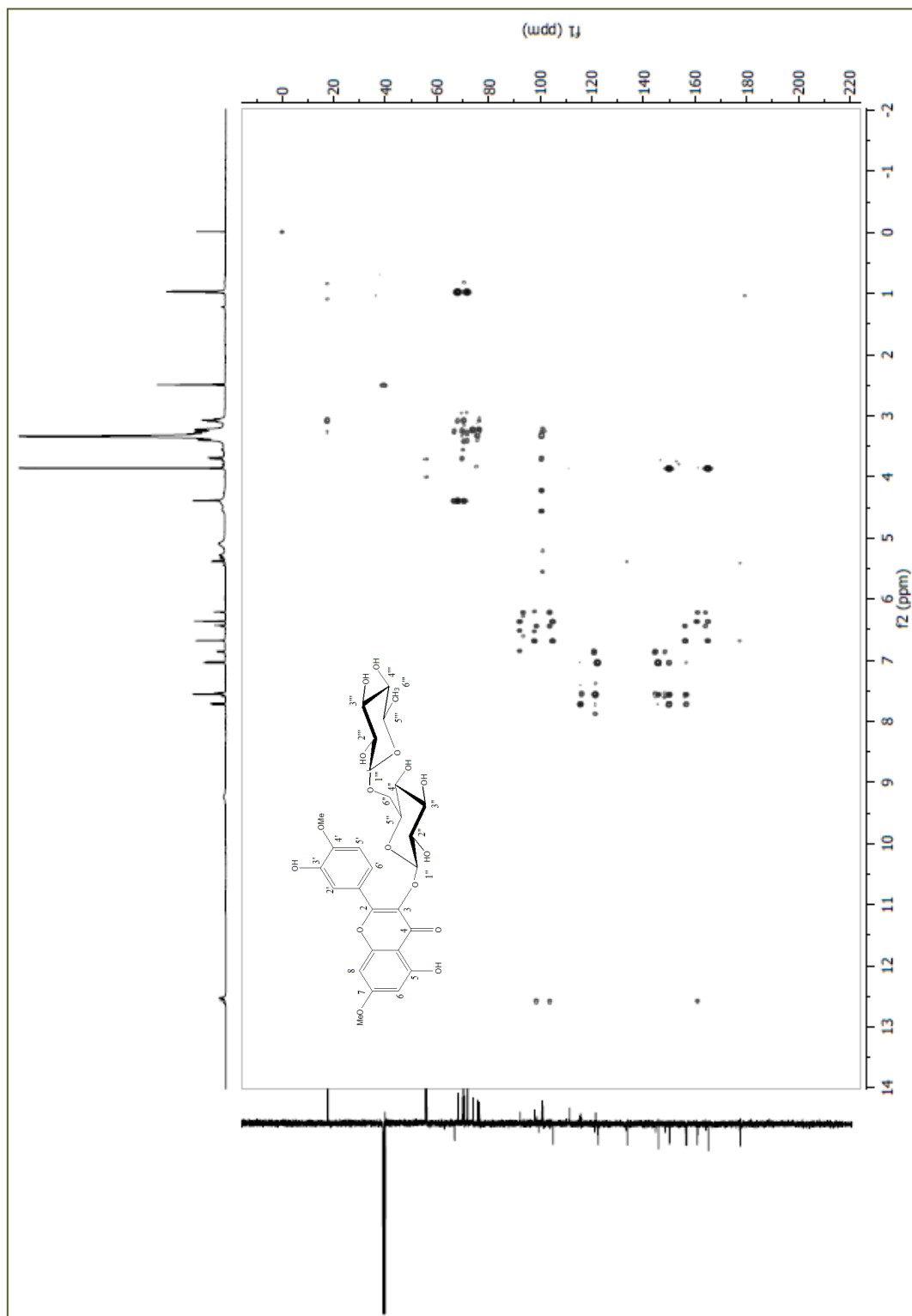
**Figura 50.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 3 na região entre (2,9 a 3,8) x (65,0 a 78,0) ppm.



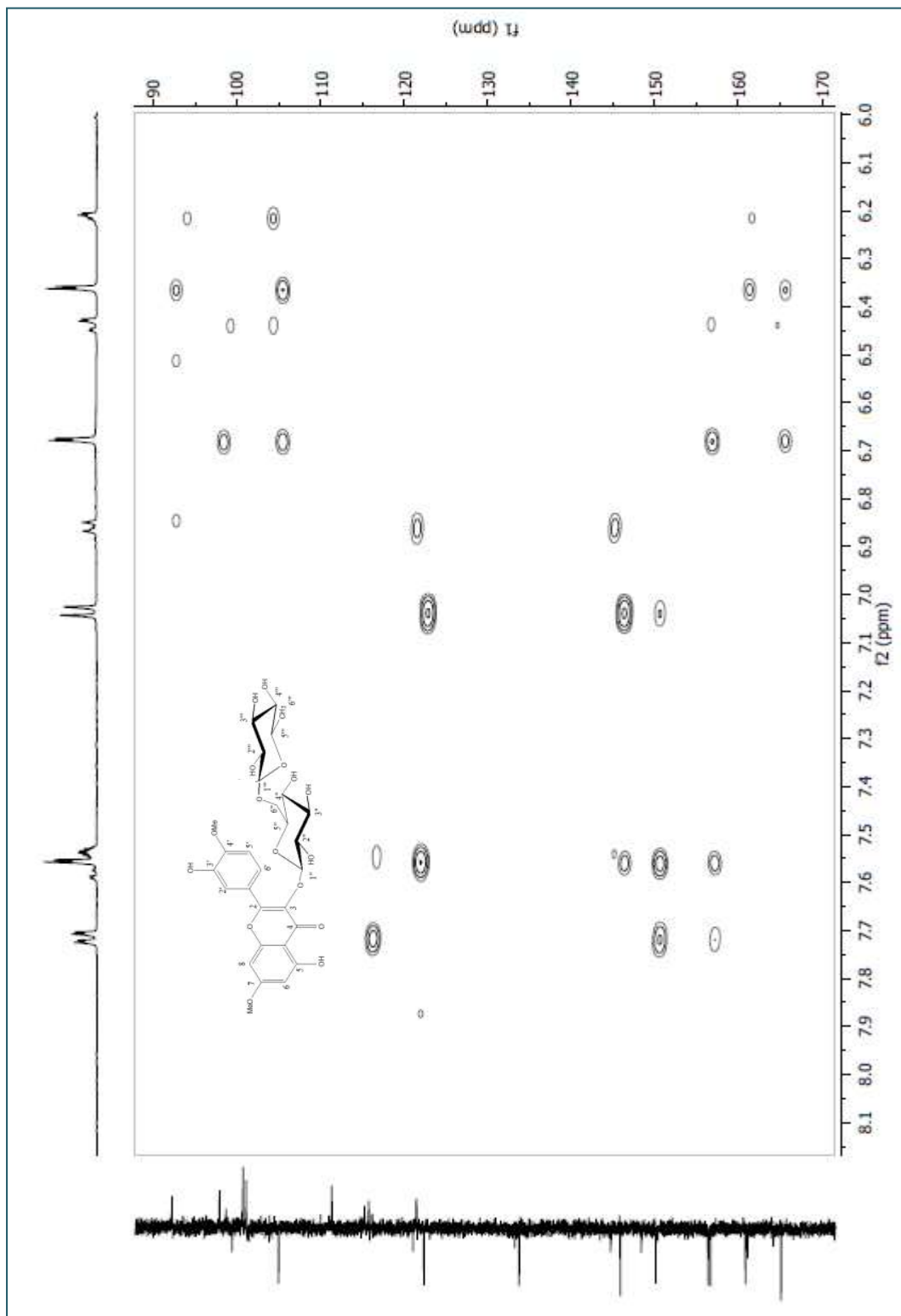
**Figura 51.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO de EPA 3 na região entre (4,3 a 5,4) x (98,0 a 103,5) ppm.



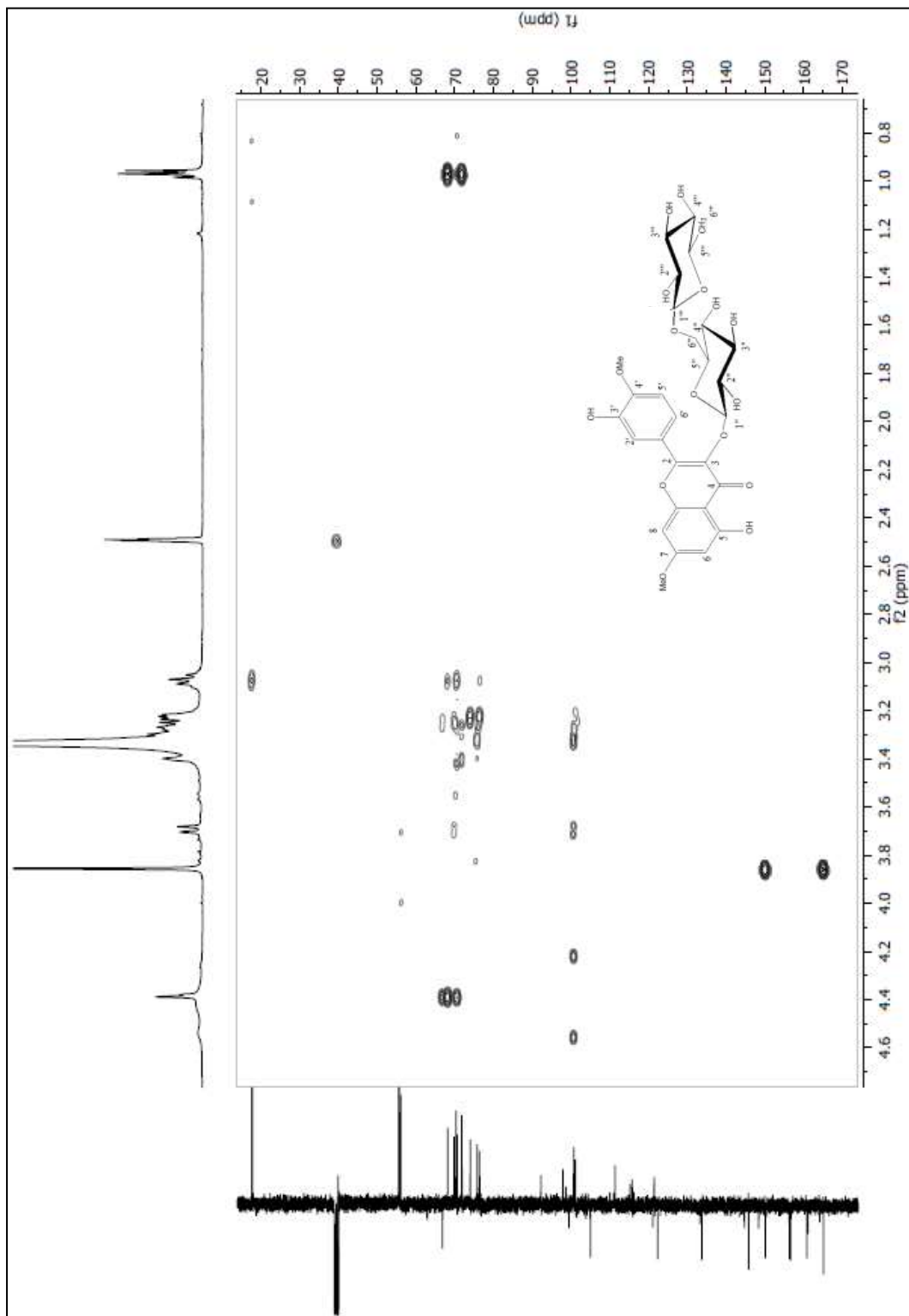
**Figura 52.** Expansão do espectro de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de **EPA 3** na região entre (0,5 a 6,0) x (20,0 a 110,0) ppm.



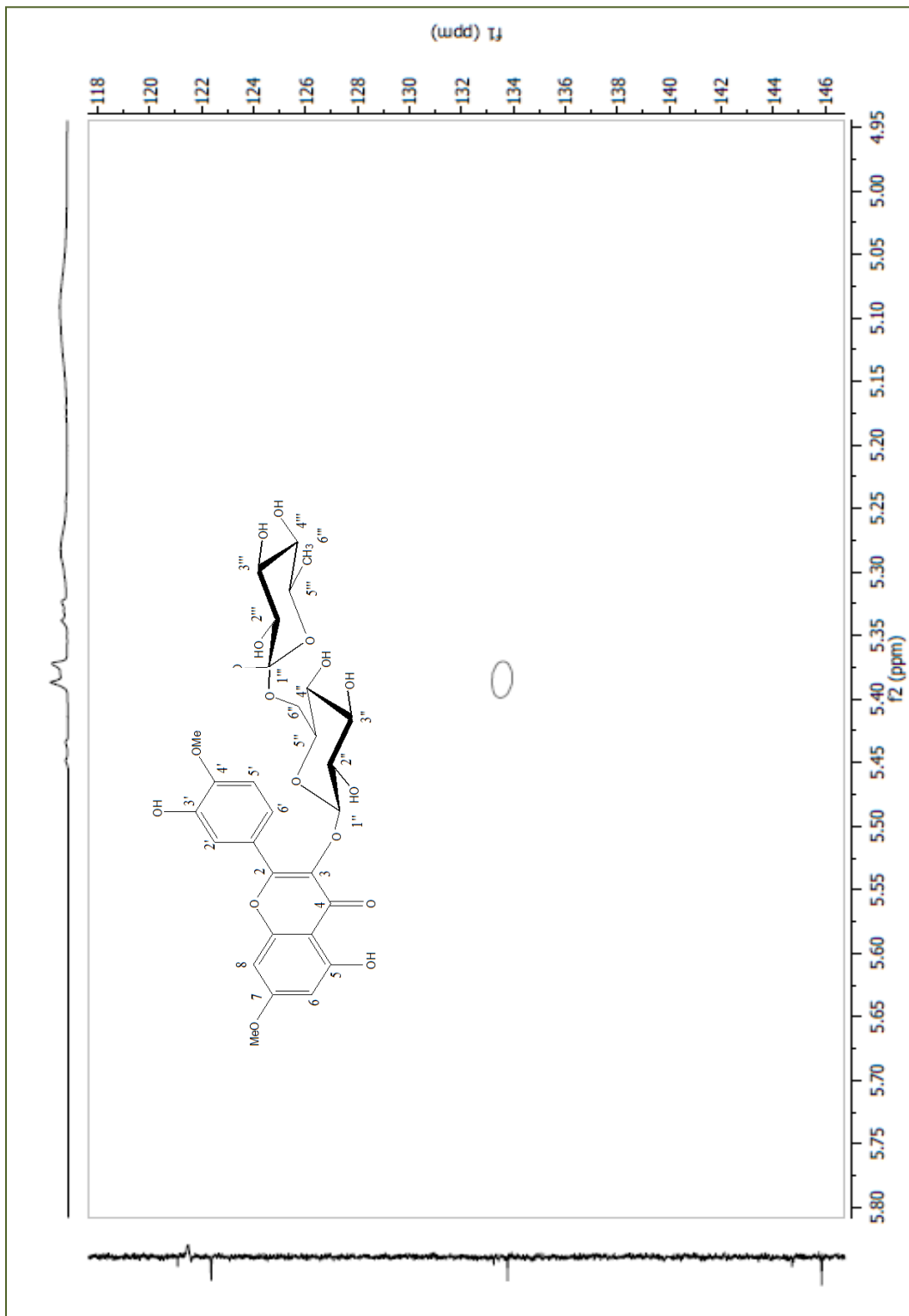
**Figura 53.** Espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 3.



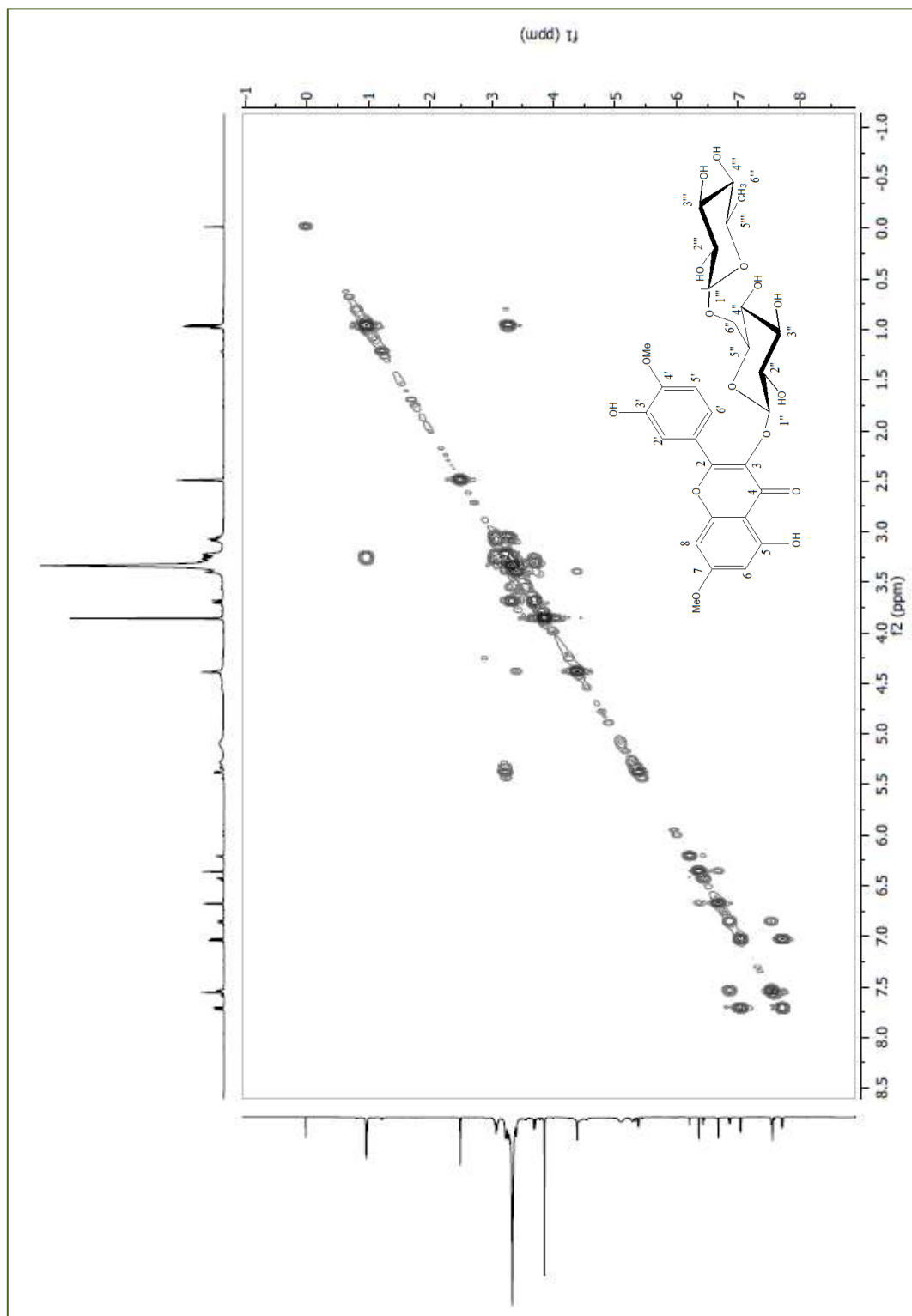
**Figura 54.** Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de **EPA 3** na região entre (6,0 a 8,1) x (90,0 a 170,0) ppm.



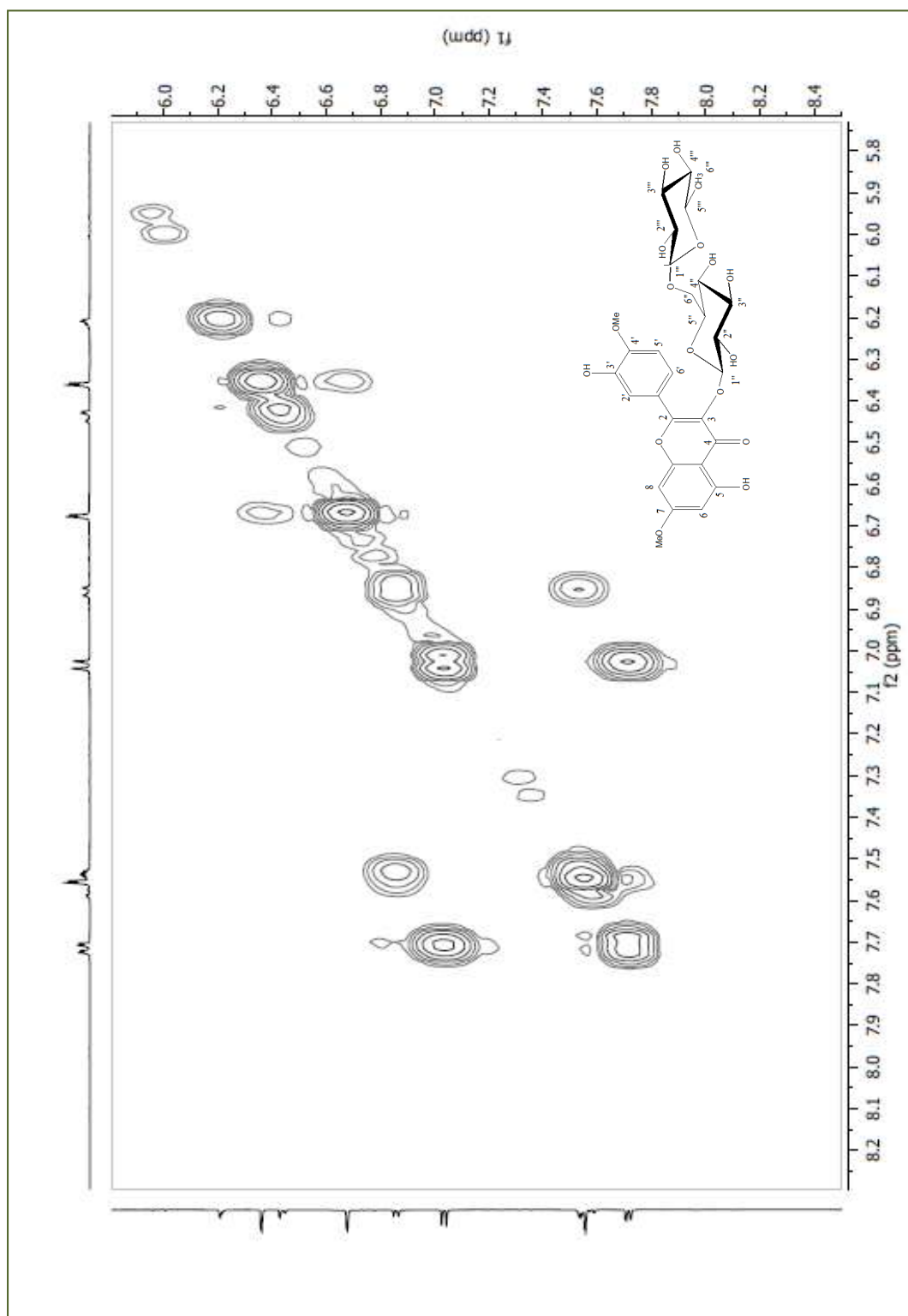
**Figura 55.** Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 3 na região entre (0,8 a 4,6) x (20,0 a 170,0) ppm.



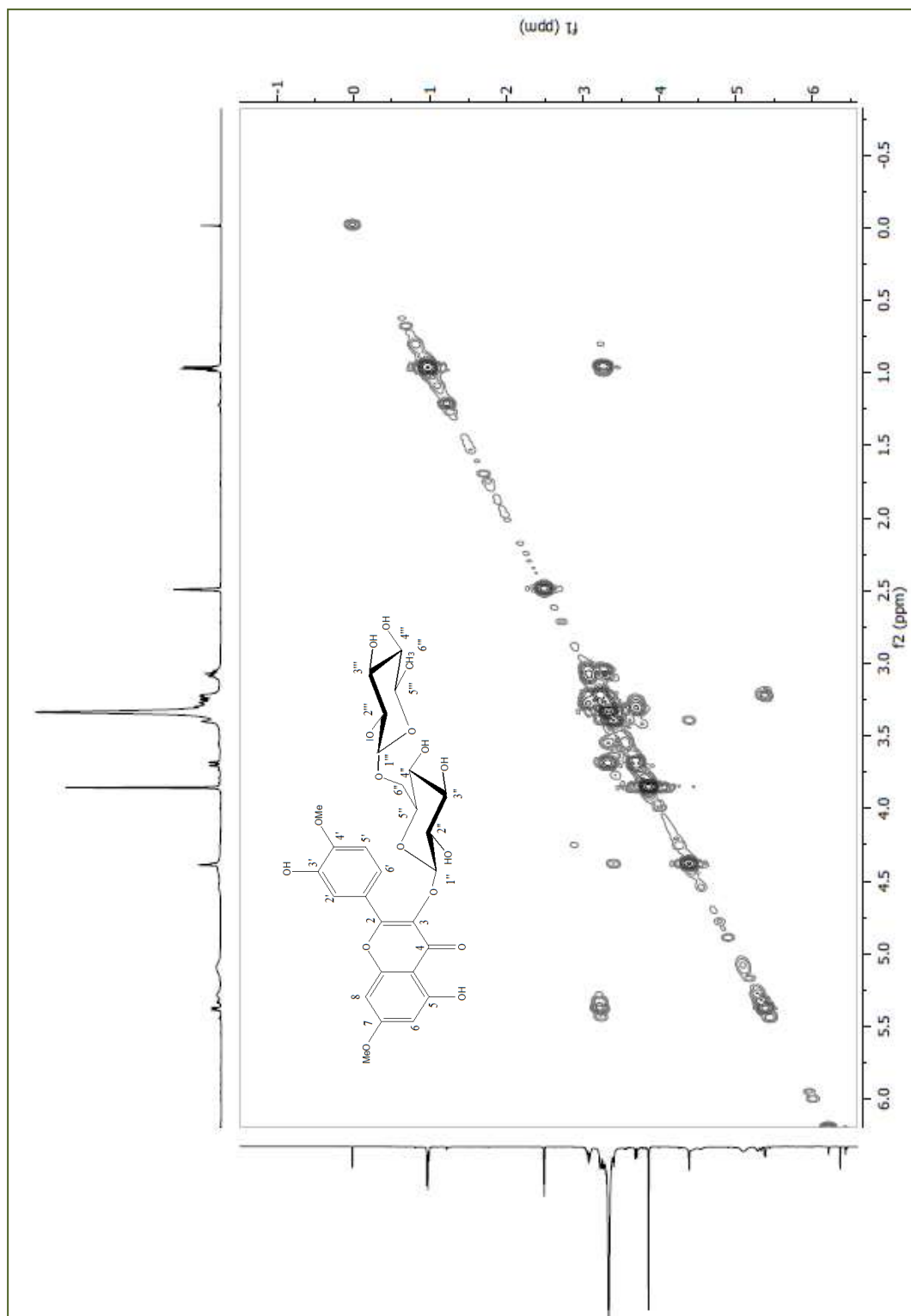
**Figura 56.** Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de **EPA 3** na região entre 4,9 a 5,8) x (118,0 a 146,0) ppm.



**Figura 57.** Espectro de COSY (500 MHz, DMSO) de **EPA 3** na região entre 0,0 a 8,0 x (1,0 a 8,5) ppm



**Figura 58.** Expansão do espectro de COSY (500 MHz, DMSO) de **EPA 3** na região entre 5,8 a 8,2) x (6,0 a 8,4) ppm.



**Figura 59.** Expansão do espectro de COSY (500 MHz, DMSO) de EPA 3 na região entre 1,0 a 6,0) x (0,0 a 6,0) ppm.

#### 5.4. Identificação de EPA 4

A substância **EPA 4** foi isolada com aparência amorfa de cor amarela. O espectro de massas obtido com EM-ESI (Figura 60, pág. 114) mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  799,0 [M-H], compatível com a fórmula molecular  $C_{35}H_{44}O_{21}$ .

O espectro de carbono de RMN  $^{13}C$ -APT (125 MHz, DMSO) (Fig. 61-63, pág. 115-117) apresentou dez sinais referentes aos carbonos quaternários em  $\delta_C$  173,0; 163,6; 158,3; 157,6; 154,6; 149,8; 145,8; 136,0; 108,9 e 122,5 e em conjunto com a presença de cinco sinais referentes a carbonos metínicos de sistema aromático em  $\delta_C$  122,2; 115,7; 111,2; 103,6 e 95,6 sugerem a presença de um esqueleto de flavona. A ausência do sinal em  $\delta_C$  107,5 (C-3) e do sinal que pode variar em torno de  $\delta_C$  160,8 (C-5) indicaram a presença de substituinte no carbono 3 e de um substituinte diferente da hidroxila no carbono 5 respectivamente.

O conjunto de sinais em  $\delta_C$  77,6; 76,5; 75,7; 75,6; 74,0; 73,5; 71,8; 70,6; 70,3; 69,8; 69,7; 68,3; 66,7; 60,8 sugeriram a presença de três unidades osídicas substituídas no núcleo da flavona. Os sinais em  $\delta_C$  101,1 e 66,8, foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1<sup>''</sup>) e ao carbono metilênico (C-6<sup>''</sup>) respectivamente, sinais estes característicos da presença de glicose ligada a outro açúcar. Os sinais em  $\delta_C$  100,7 e 17,6 foram atribuídos ao carbono anomérico (C-1<sup>'''</sup>) e ao carbono metílico (C-6<sup>'''</sup>), característicos da presença de ramnose. Bem como, os sinais em  $\delta_C$  103,5 atribuído ao carbono (C-1<sup>IV</sup>) e  $\delta_C$  60,8 ao carbono metínico (C-6<sup>IV</sup>) indicaram a presença de outra unidade de glicose. Estas atribuições foram feitas por comparação de dados de referência (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006).

O espectro de RMN  $^1H$  (500 MHz, DMSO) (Fig. 64-68, pág. 118-122) de **EPA 4** mostrou dois dubletos na região de hidrogênios de sistema aromático em  $\delta_H$  6,91 ( $J=2,0$ Hz) e 6,85 ( $J=2,0$ Hz) com acoplamento meta, característicos de hidrogênios H-6 e H-8 de flavonas oxigenadas na posição 5 e 7 (HARBORNE, 1994). Dois dubletos em  $\delta_H$  7,55 (1H,  $J=2$  Hz) acoplado meta e 7,03 (1H,  $J=9,0$ Hz) acoplado orto e um duplo dubleto em  $\delta_H$  7,76 (1H,  $J=8,5$  e 2,0Hz) com acoplamento orto e meta, atribuídos a um sistema ABX no anel B da flavona.

A ausência do singlete referente ao H-3 ( $\delta_H$  6,75) e de hidroxila quelada em  $\delta_H$  14,00 reforçou a proposta de existência de substituintes nestas posições diferentes das hidroxilas. Os sinais em  $\delta_H$  5,25 (1H, d,  $J=7,0$  Hz), 4,84 (1H, d,  $J=7,5$  Hz),  $\delta_H$  3,76; 3,49 e 3,69; 3,39, além dos sinais em  $\delta_H$  4,40 (1H, d,  $J=1,5$  Hz) e um dubleto em  $\delta_H$

0,98 (3H, d,  $J=8,0$  Hz) sugeriram a presença de três unidades de açúcares. No espectro HMQC (Fig. 69-73, pág. 123-127), foram observados correlações dos sinais em  $\delta_H$  (ppm) 6,85 (H-6) com  $\delta_C$  (ppm) 103,6 e de  $\delta_H$  (ppm) 6,92 (H-8) com  $\delta_C$  (ppm) 95,6 confirmando as atribuições de C-6 e C-8 do anel A da flavona. As correlações do  $\delta_H$  (ppm) 7,03 (H-5') com  $\delta_C$  (ppm) 111,2, do sinal em  $\delta_H$  (ppm) 7,76 (H-6') com  $\delta_C$  122,2 e do sinal em  $\delta_H$  7,55 (H-2') com 115,7 confirmaram as atribuições.

As correlações dos sinais em  $\delta_H$  5,25 (H-1'') com  $\delta_C$  101,3 (C1''), do sinal em  $\delta_H$  3,71 (H-6'') com  $\delta_C$  66,78 (C6''), bem como, os sinais em  $\delta_H$  4,84 (H-1<sup>IV</sup>) com  $\delta_C$  103,1 (C1<sup>IV</sup>),  $\delta_H$  3,75/3,51(H-6<sup>IV</sup>) com  $\delta_C$  60,8 confirmaram a presença dos hidrogênios anoméricos e dos hidrogênios metilênicos de duas unidades de glicose. As correlações dos sinais em  $\delta_H$  4,40 (H-1''') com  $\delta_C$  100,7 e do sinal em  $\delta_H$  0,98 (H-6'') com  $\delta_C$  17,6 confirmaram a presença do hidrogênio anomérico e a metila de uma unidade de raminose (GONZÁLEZ-GUEVARA *et al.*, 2006). As demais correlações estão compiladas na tabela 11, página. 113.

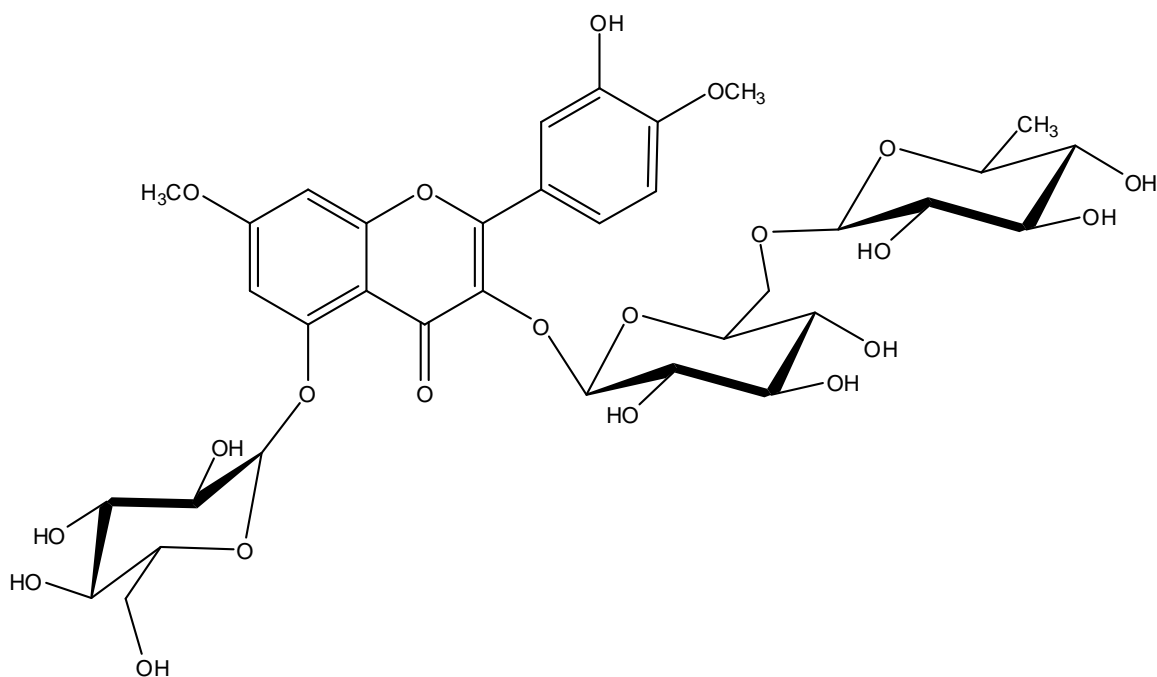
No espectro HMBC (Fig. 74-78, pág. 128-132), foi possível determinar as correlações de  $\delta_H$  6,85 (H-6) e 6,92 (H-8) com  $\delta_C$  163,6 e 108,9 que foram atribuídos aos C-7 e C-10 respectivamente. Foram observadas as correlações de  $\delta_H$  6,85 (H-6) com  $\delta_C$  158,3 sendo atribuído ao C-5 e a correlação de  $\delta_H$  6,92 (H-8) com  $\delta_C$  154,6 que foi atribuído ao C-9, assinalando todos os carbonos do anel A da flavona. As correlações entre  $\delta_H$  7,55 (H-2') com os sinais em  $\delta_C$  145,8, 149,8, 122,2 e 157,6 confirmaram as atribuições feitas para os carbonos C-3', C-4', C-6' e C-2. Outras atribuições foram confirmadas pelas correlações entre  $\delta_H$  7,03 (H-5') com  $\delta_C$  145,8 (C-3') e 122,5 (C-1'). As posições das metoxilas foram confirmadas através das correlações dos sinais em  $\delta_H$  3,88 (OCH<sub>3</sub>) com  $\delta_C$  163,6 (C-7) no anel A e  $\delta_H$  3,87 (OCH<sub>3</sub>) com  $\delta_C$  149,8 (C-4') no anel B da flavona.

As posições das unidades de açúcares foram estabelecidas através das correlações entre o hidrogênio anomérico da glicose em  $\delta_H$  4,84 (H-1<sup>IV</sup>) a três ligações com o carbono C-5 em  $\delta_C$  158,3 e da correlação entre o hidrogênio anomérico da glicose em  $\delta_H$  5,25 (H-1'') a três ligações com o carbono C-3 em  $\delta_C$  136,0. A correlação entre o hidrogênio anomérico da raminose em  $\delta_H$  4,40 (H-1''') a três ligações com o carbono C-6'' em  $\delta_C$  66,7 confirmando a presença da raminose terminal ligada à glicose em C-3. As demais correlações estão compiladas na tabela 11, página. 113.

No espectro COSY (Figuras 79-80, pág. 133-134), foi possível observar correlações dos sinais em  $\delta_H$  (ppm) 7,76 (H-6') com 7,03 (H-5') e  $\delta_H$  (ppm) 7,76 (H-6') com 7,55 (H-2') confirmando o sistema ABX para o anel B da flavona.

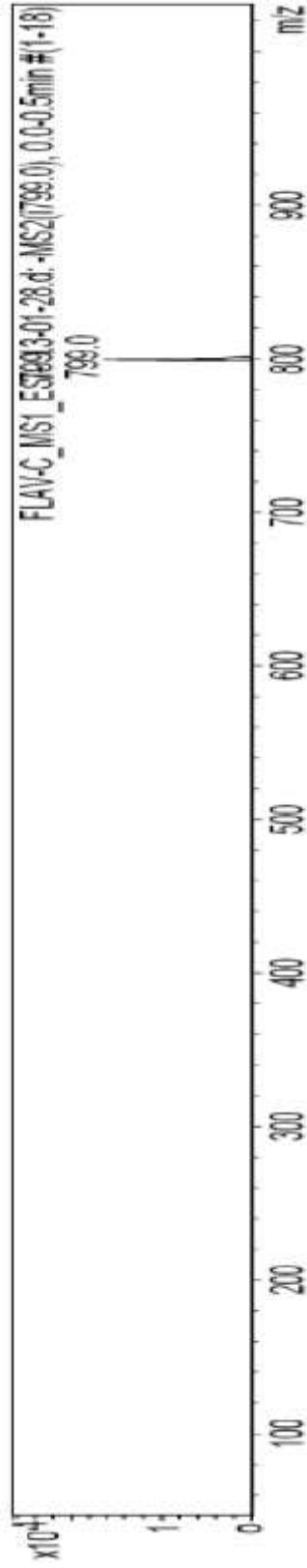
No espectro NOESY (Figuras 81-82, pág. 135-136), foi possível observar a correlação entre o sinal em  $\delta_H$  (ppm) 5,23 (H-1<sup>IV</sup>) com  $\delta_H$  (ppm) 6,91 (H-6), confirmando a substituição de uma unidade de glicose em C-5 do anel A da flavona.

Após análise dos dados de RMN 1D e 2D e comparação com dados da literatura, foi possível identificar **EPA 4** como sendo o 7,4'-Di-*O*-metilquercetin-3-*O*- $\beta$ -glucosídeo (ombuin-3-rutinosídeo-5-glucosídeo). Tal composto já foi relatado em outras espécies de *Erythroxylum*, como por exemplo, na espécie *Erythroxylum cuban* (GONZÁLEZ-GUEVARA, *et al.*, 2006).

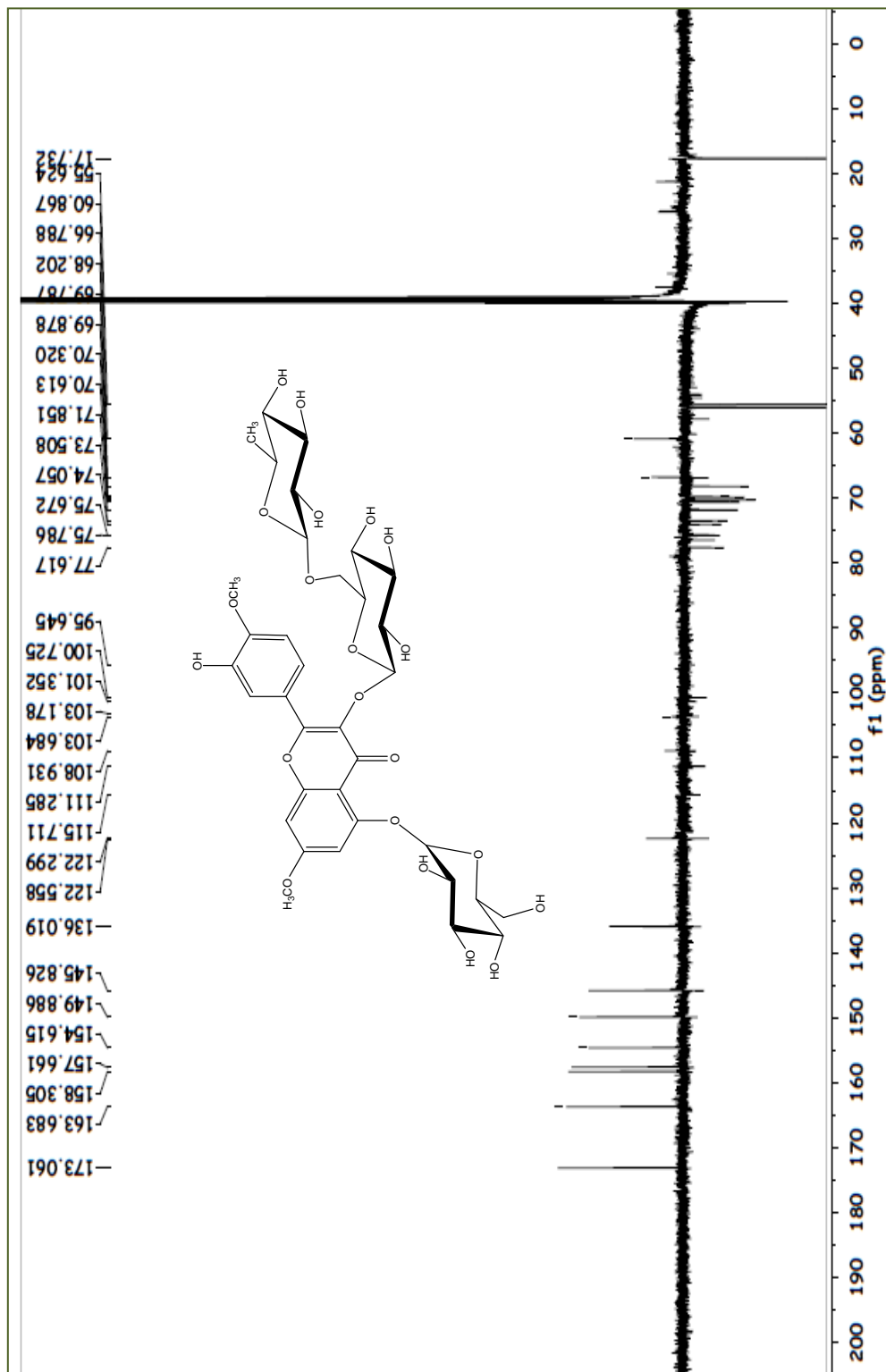


**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em DMSO a 500 MHz e 125 MHz de **EPA 4**.

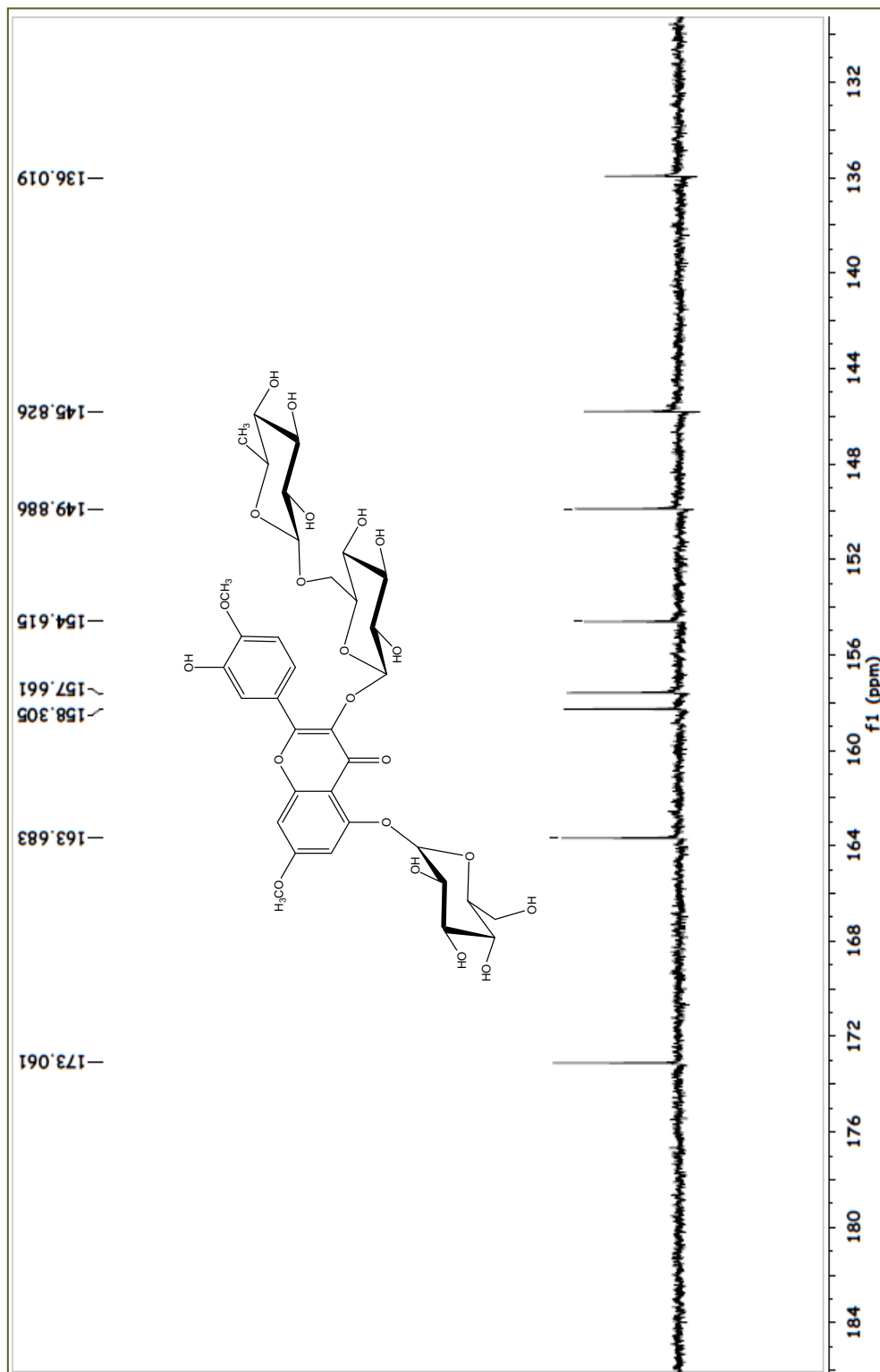
EPFA 4		Literatura(GONZÁLEZ-GUEVARA <i>et al.</i> , 2006)			
HMQC		HMBC	COSY		
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}} \times \delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}} \times \delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	154,6		H-6', H-2',		157,4
3	136,0		H-1''		135,8
4	173,0				172,9
5	158,3		H-6, H-1 <sup>IV</sup>		158,1
6	103,6	6,85 (d, $J=2,5$ Hz)	H-8		103,6
7	163,6		H-6, H-8, OMe		163,5
8	95,6	6,92 (d, $J=2,5$ Hz)	H-6		95,5
9	157,6		H-8		154,4
10	108,9		H-8, H-6		108,8
OMe	55,5	3,86 s			55,5
OMe	56,0	3,88 s			55,8
1'	122,5		H-5'		122,3
2'	115,7	7,55 (d, $J=2,0$ Hz)	H-6'		115,6
3'	145,8		H-2', H-5'		145,6
4'	149,8		H-6', H-2', OMe		149,7
5'	111,2	7,03 (d, $J=9,0$ Hz)		H-6'	111,2
6'	122,2	7,76 (dd, $J=2,0$ e $8,5$ Hz)	H-2'	H-5'	121,2
1''	101,3	5,25 (d, $J=7,0$ Hz)			101,2
2''	73,5	3,39 m			73,9
3''	76,4	3,10 m			76,3
4''	69,7				69,8
5''	75,7	3,24 m	H-1''		75,6
6''	66,7	3,71 (d, $J=10,0$ Hz)	H-1'''		66,6
1'''	100,7	4,40 (d, $J=1,5$ Hz)			100,5
2'''	70,3	3,25 m			70,1
3'''	70,6		H-1'''		70,4
4'''	71,8	3,08 m			71,7
5'''	68,2	3,26 m	H-1'''		68,0
6'''	17,6	0,98 (d, $J=8,0$ Hz)			17,5
1 <sup>IV</sup>	103,1	4,84 (d, $J=7,5$ Hz)			102,3
2 <sup>IV</sup>	74,0	3,25 m			73,3
3 <sup>IV</sup>	75,6	3,24 m	H-1 <sup>IV</sup>		75,5
4 <sup>IV</sup>	69,8				69,7
5 <sup>IV</sup>	77,6		H-1 <sup>IV</sup>		77,4
6 <sup>IV</sup>	60,8	3,76 (dd, $J=5,5$ e $12,0$ Hz) 3,51 (dd, $J=5,5$ e $11,5$ Hz)			60,8



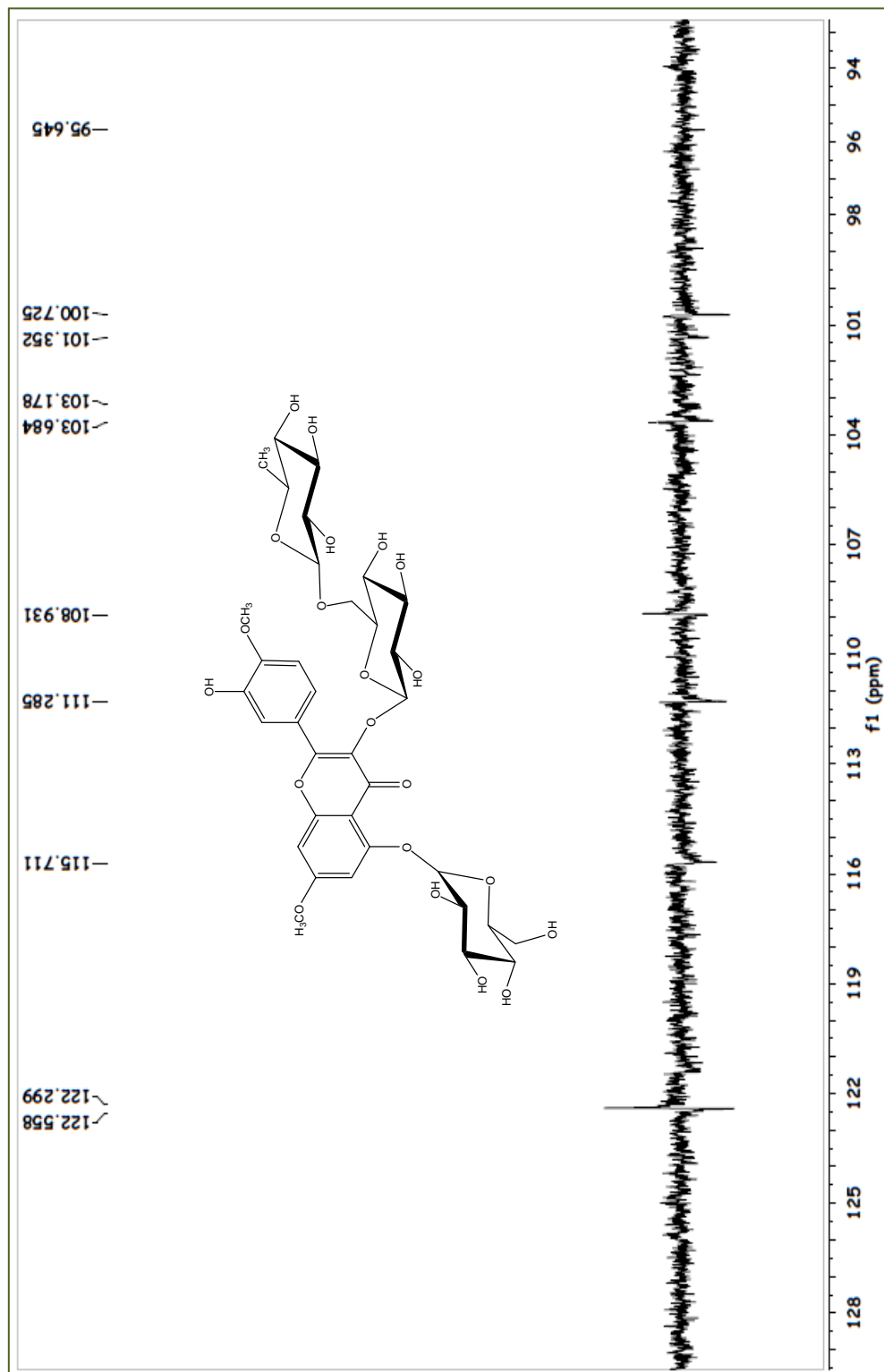
**Figura 60.** . [M-H] – (EM-ESI, modo negativo)  
Espectro de massa do composto **EPA 4**



**Figura 61.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de EPA 4.



**Figura 62.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz, DMSO) de EPA 4 na região entre  $\delta_c$  132,0 a 184,0



**Figura 63.** Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (125 MHz, DMSO) de EPA 4 na região entre  $\delta_{\text{C}}$  94,0 a 128,0 ppm.

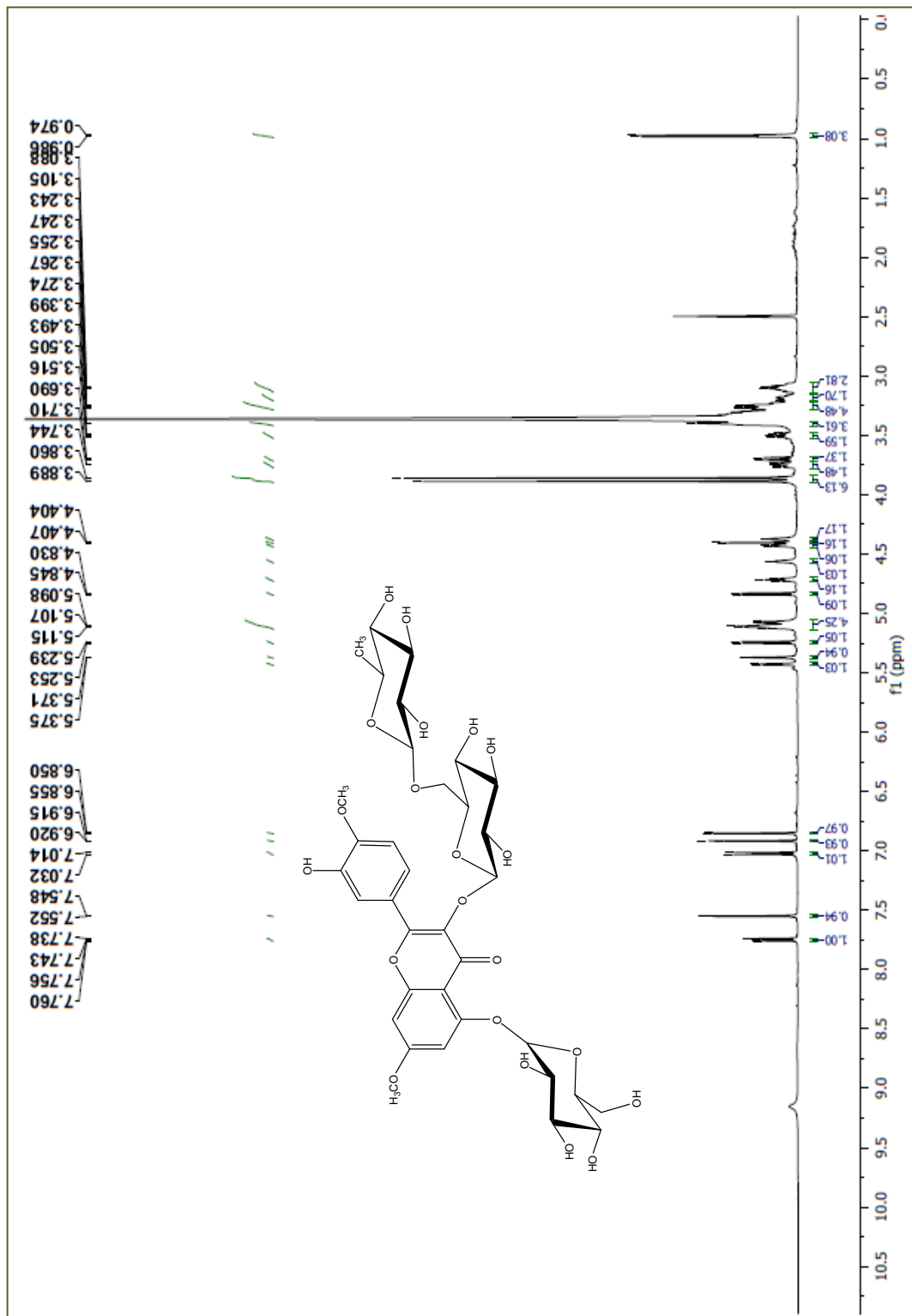
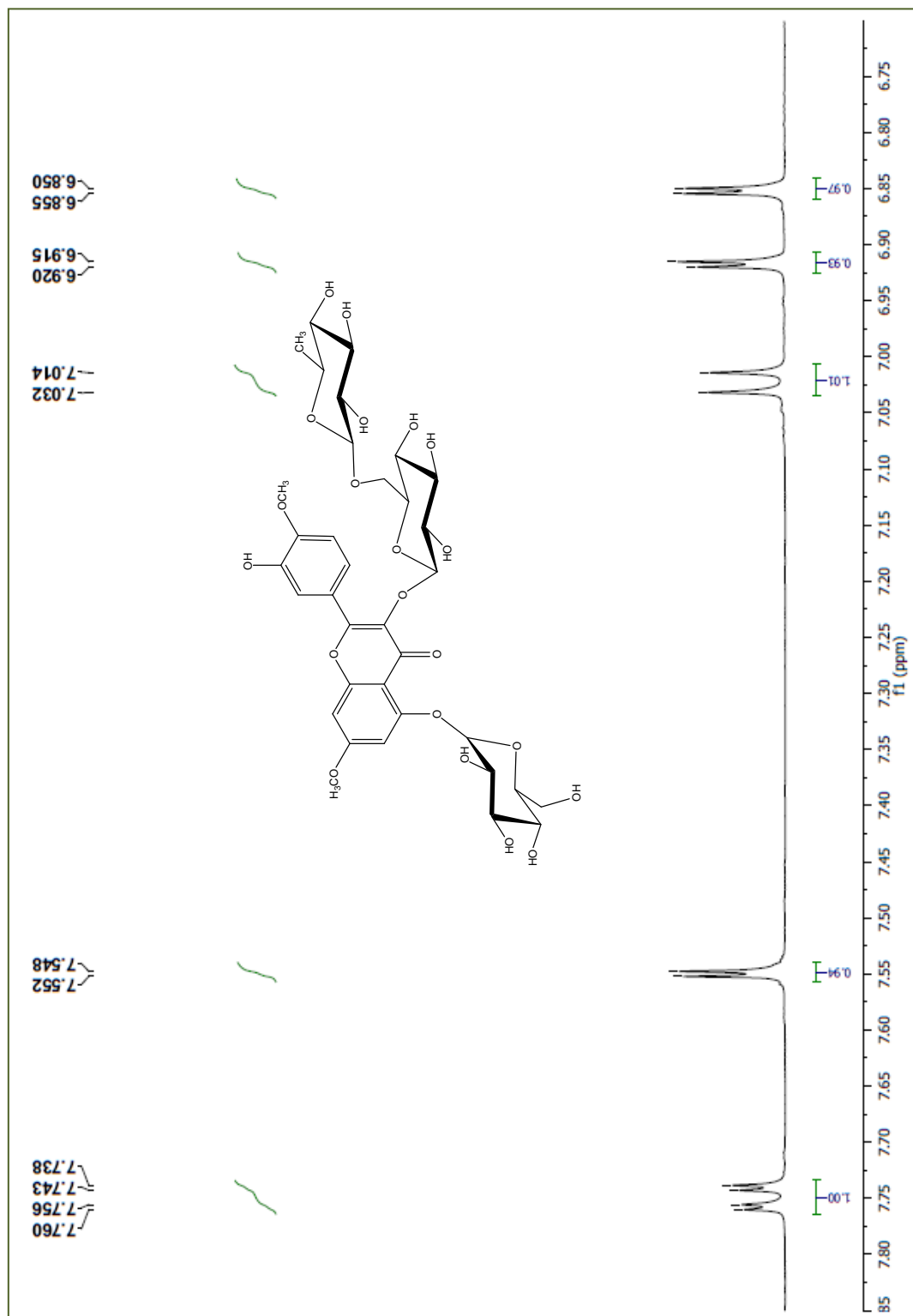
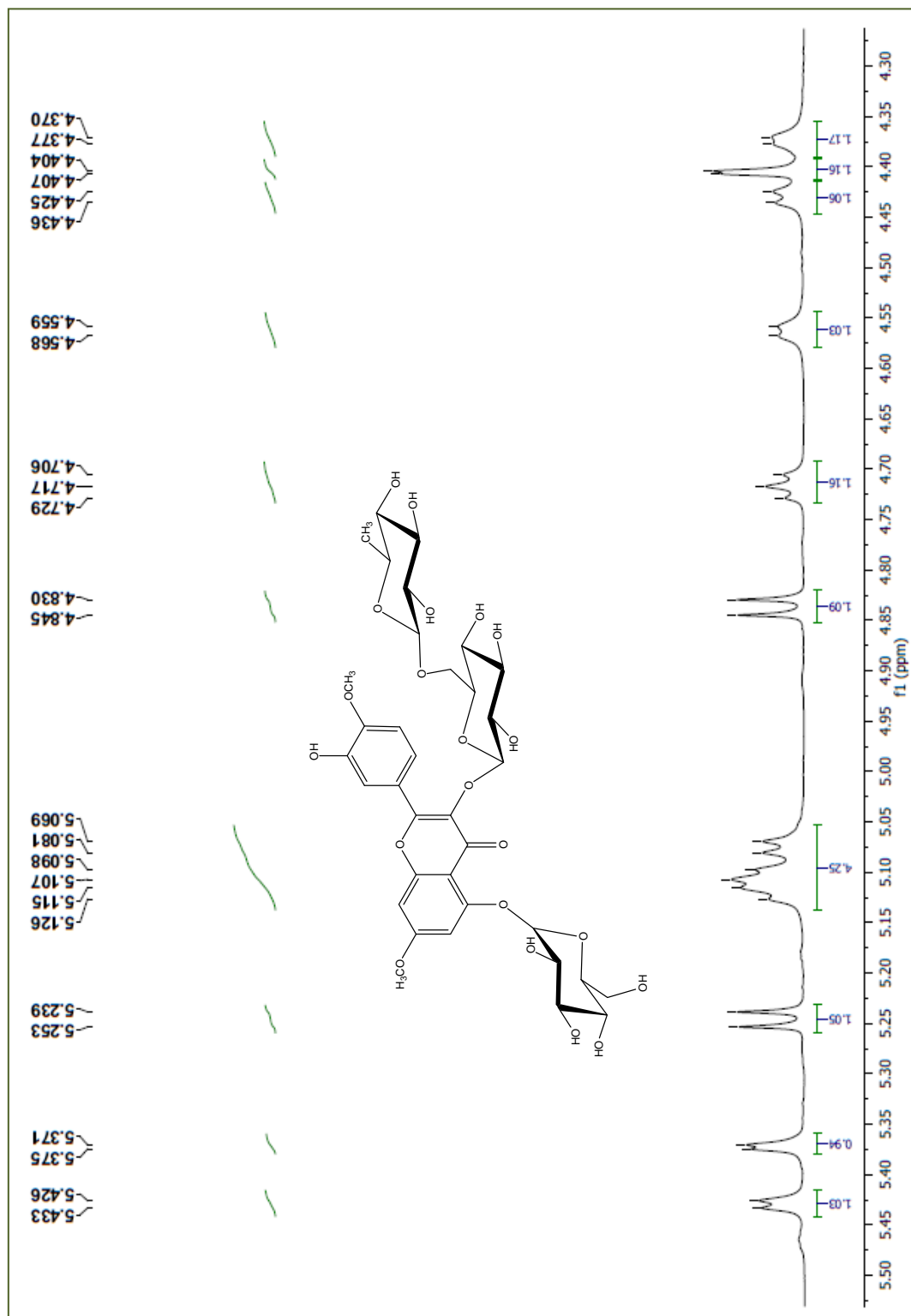


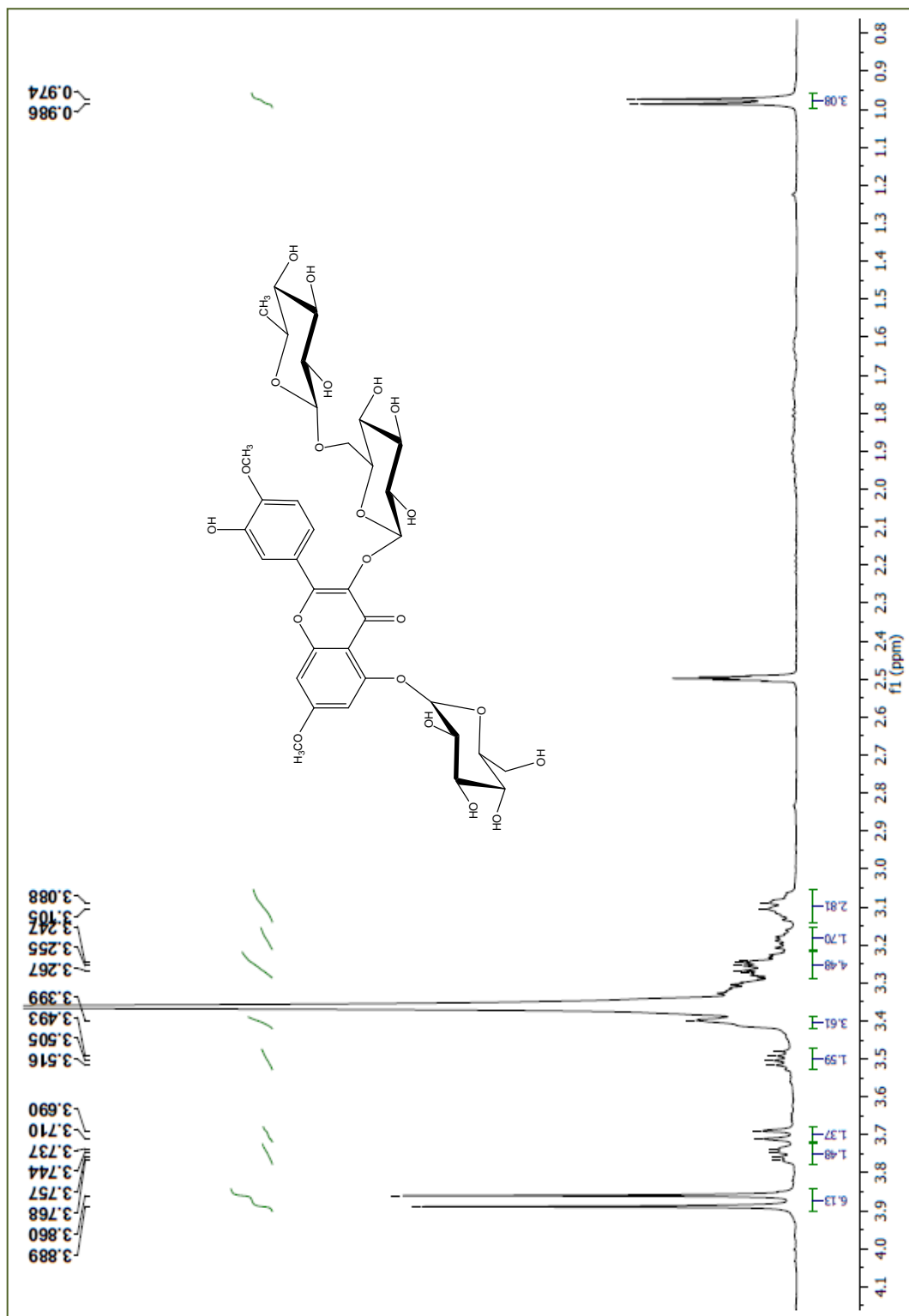
Figura 64. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO) de EPA 4.



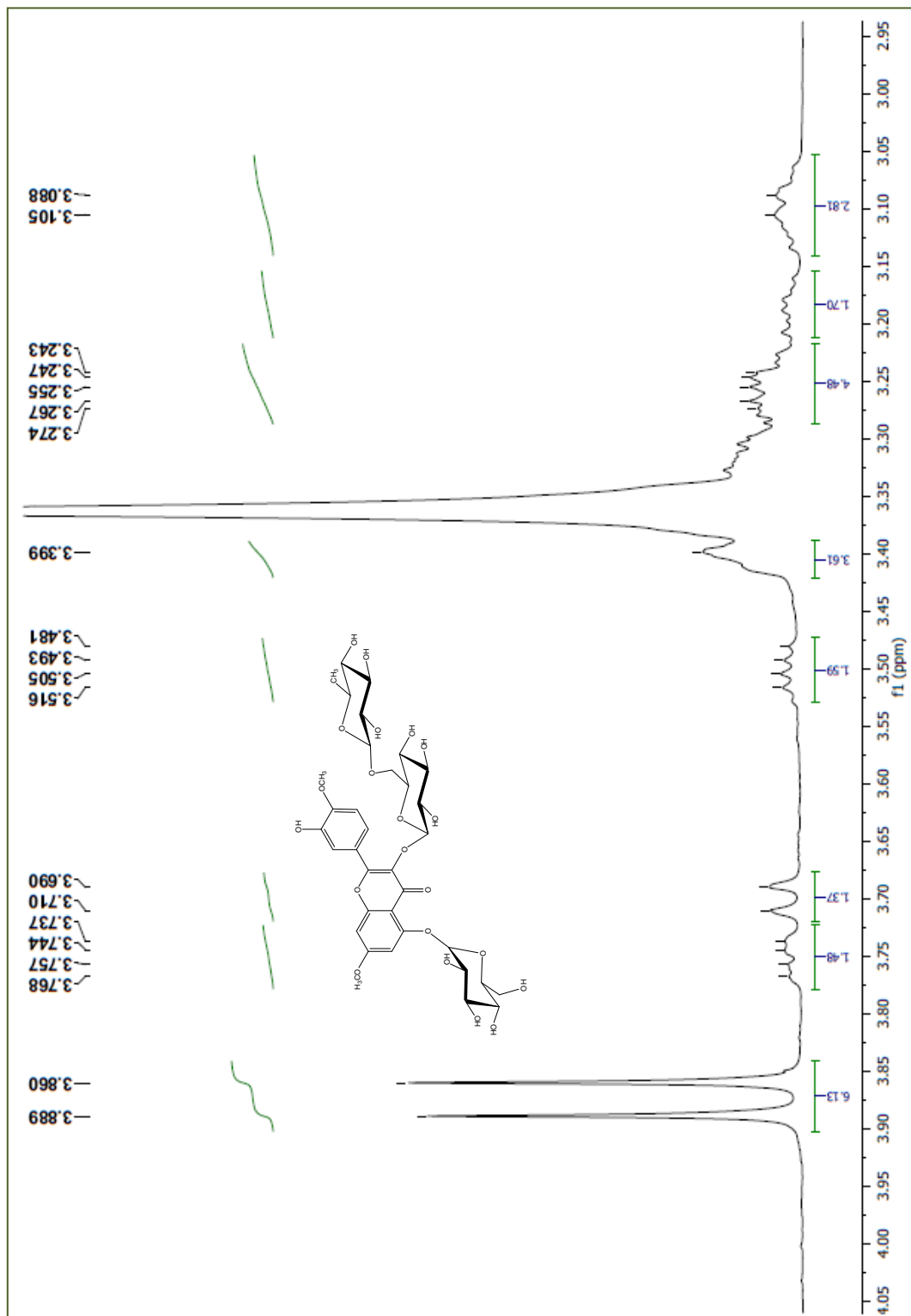
**Figura 65.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO de EPA 4 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  6,75 a 7,80 ppm.



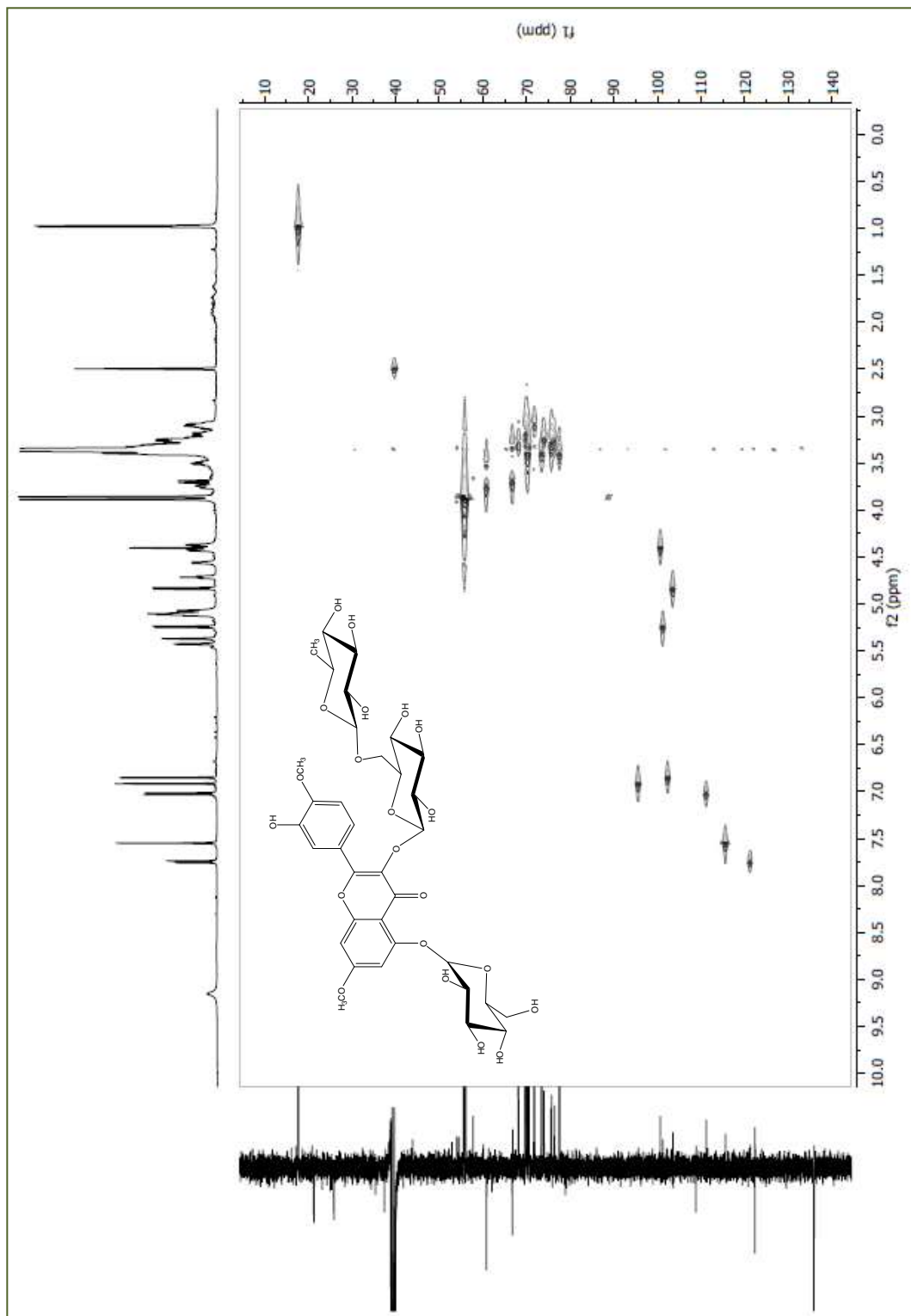
**Figura 66.** Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO de EPA 4 na região entre  $\delta_H$  4,30 a 5,50 ppm.



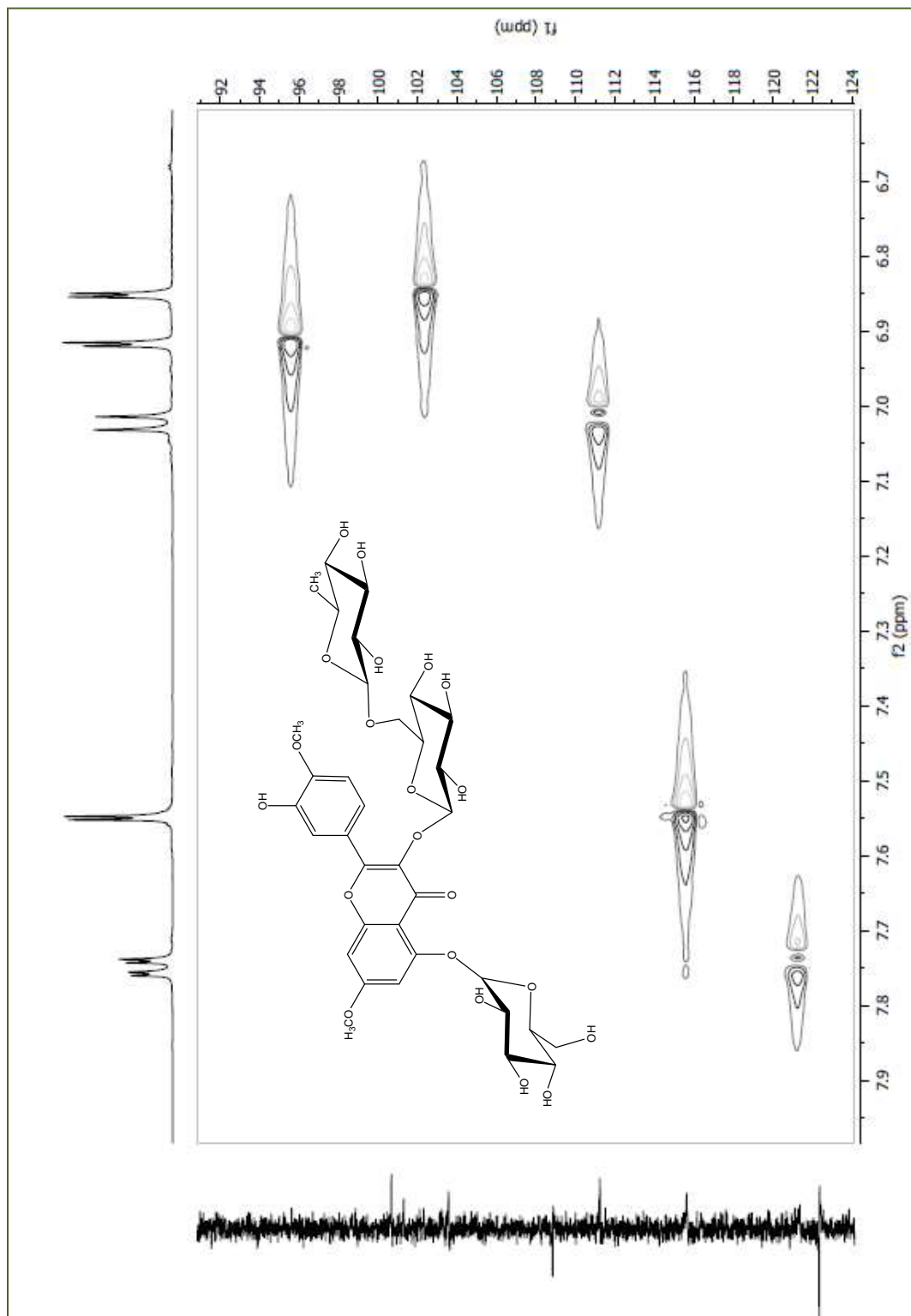
**Figura 67.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO) de EPA 4 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,9 a 4,1 ppm.



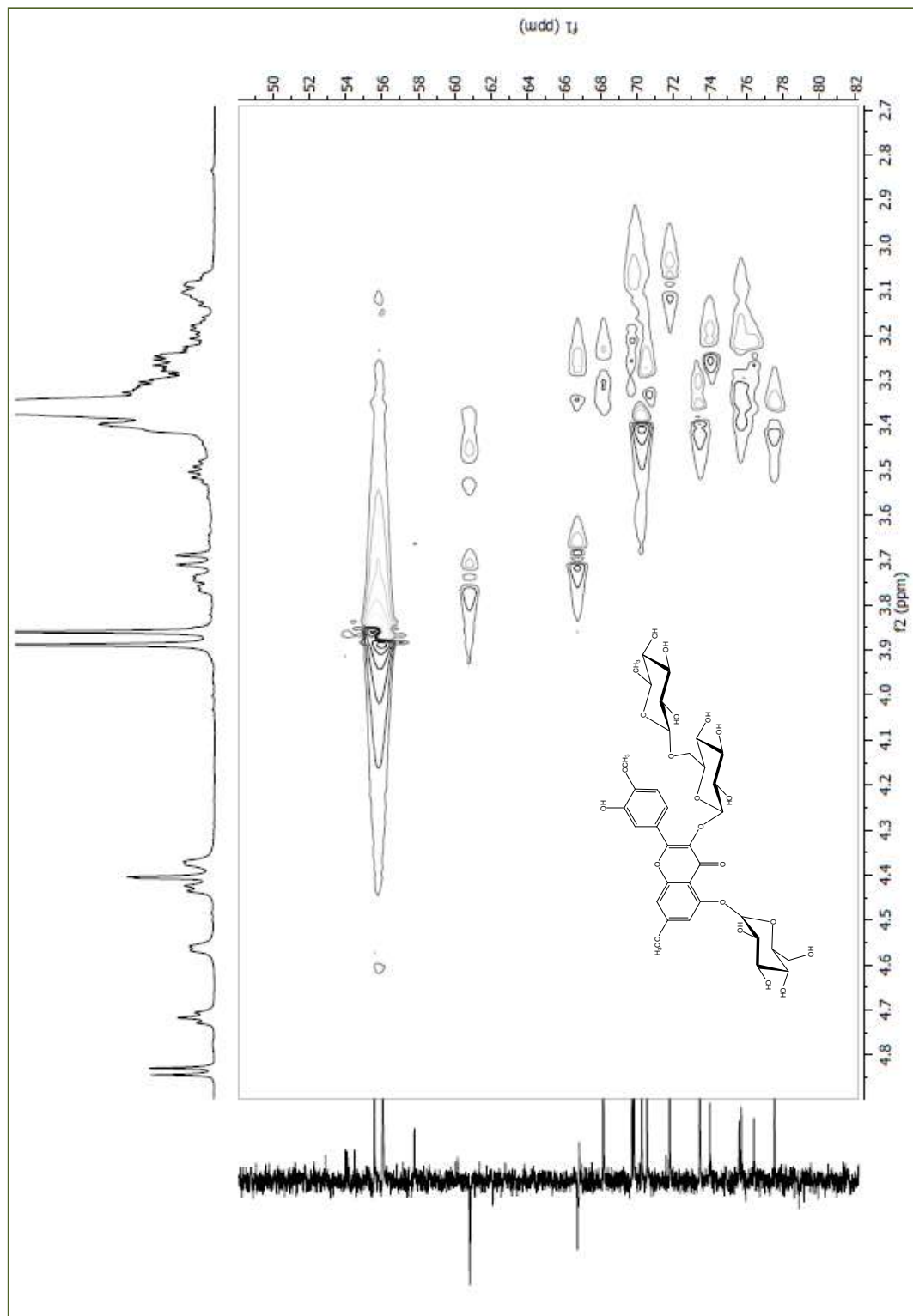
**Figura 68.** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO) de EPA 4 na região entre  $\delta_{\text{H}}$  2,9 a 4,0 ppm.



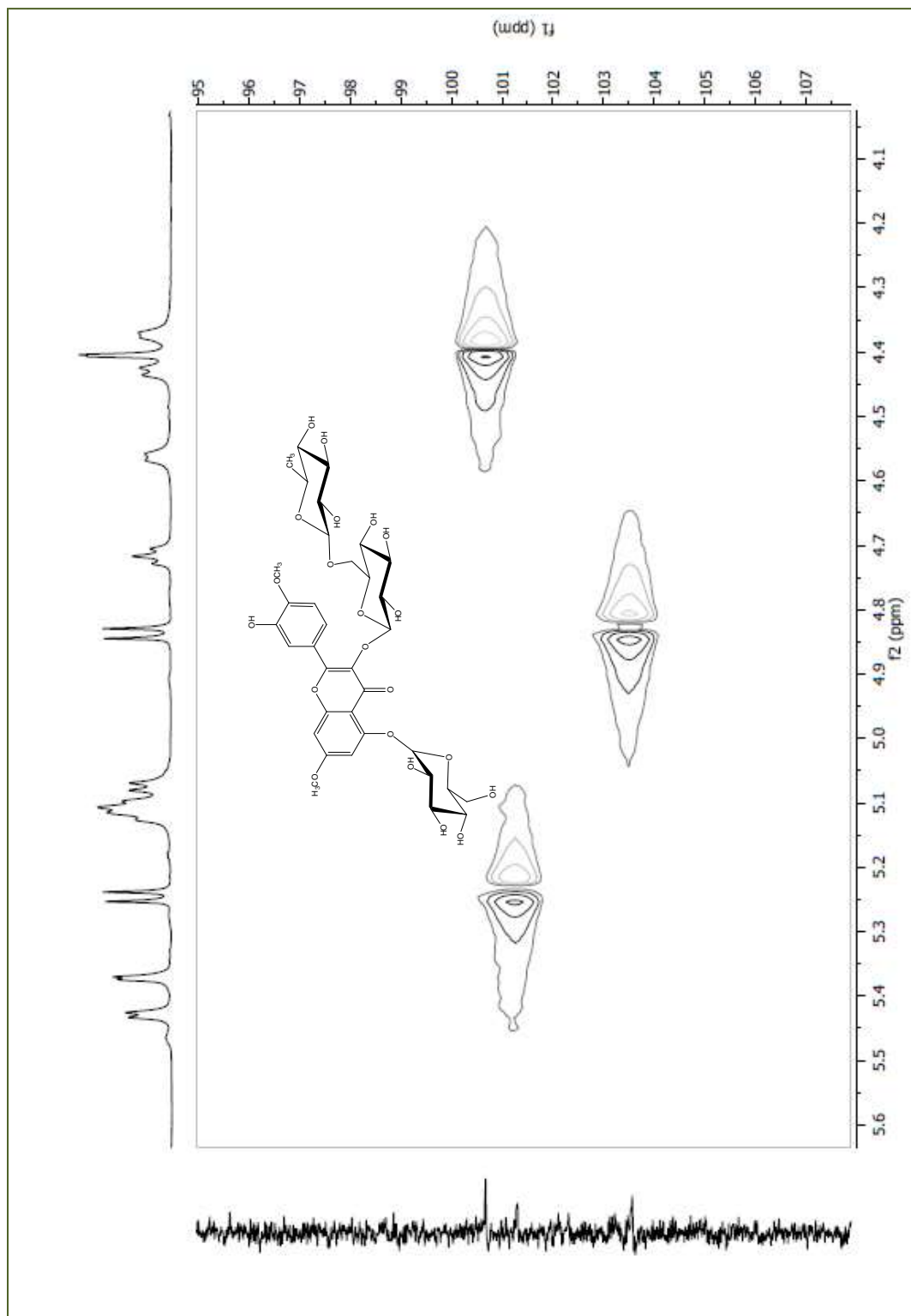
**Figura 69.** Espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 4.



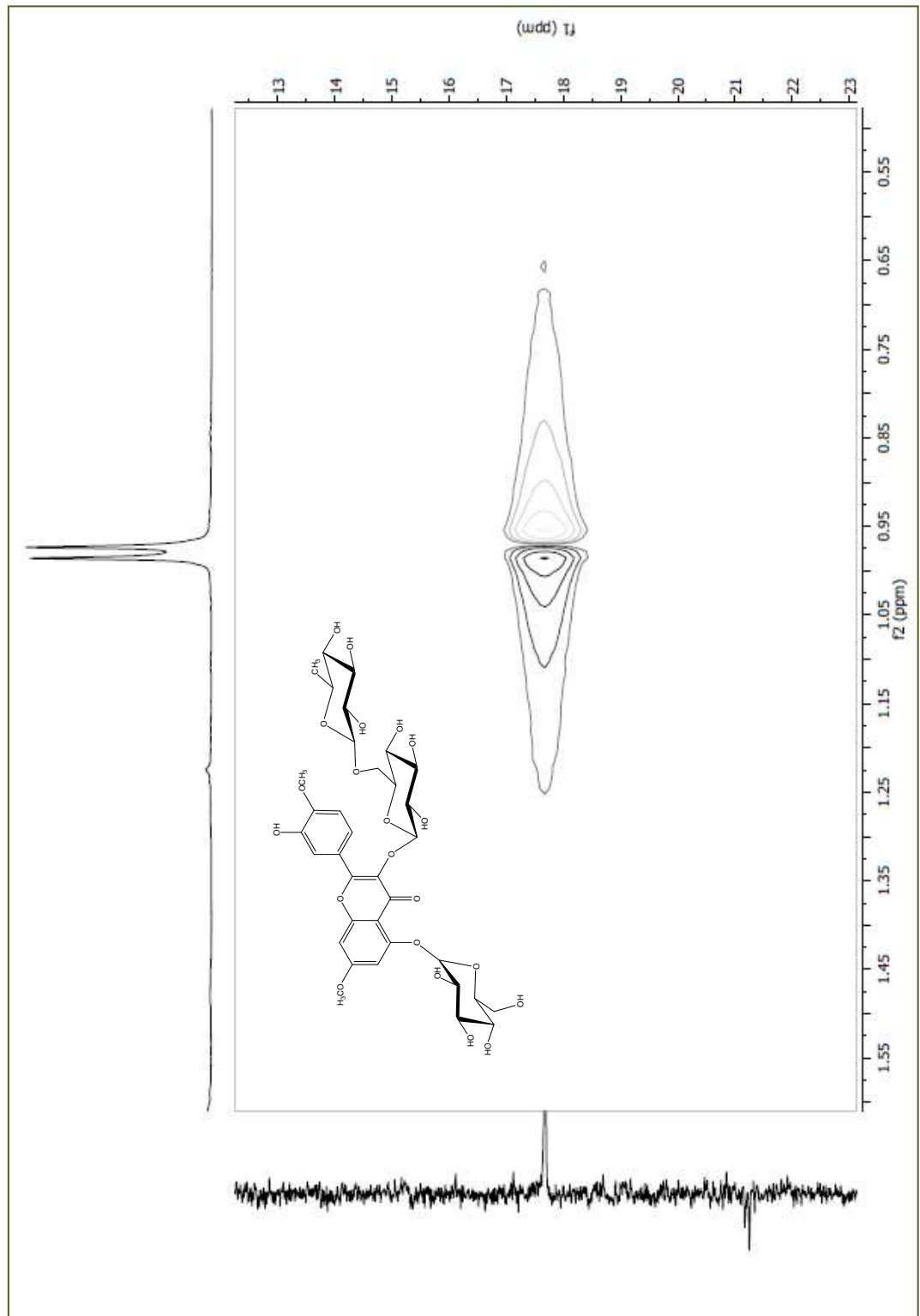
**Figura 70.** Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO ) de EPA 4 na região de (6,7 – 7,9 ppm) x (92,0 – 124,0 ppm).



**Figura 71.** Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO) de **EPA 4** na região de (2,7 – 4,8 ppm) x (50,0 – 82,0 ppm).



**Figura 72.** Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO ) de EPA 4 na região de (4,1 – 5,6 ppm) x (95,0 – 107,0 ppm).



**Figura 73.** Expansão do espectro HMQC (500 e 125 MHz, DMSO ) de **EPA 4** na região de (0,5 – 1,5 ppm) x (13,0 – 23,0 ppm).

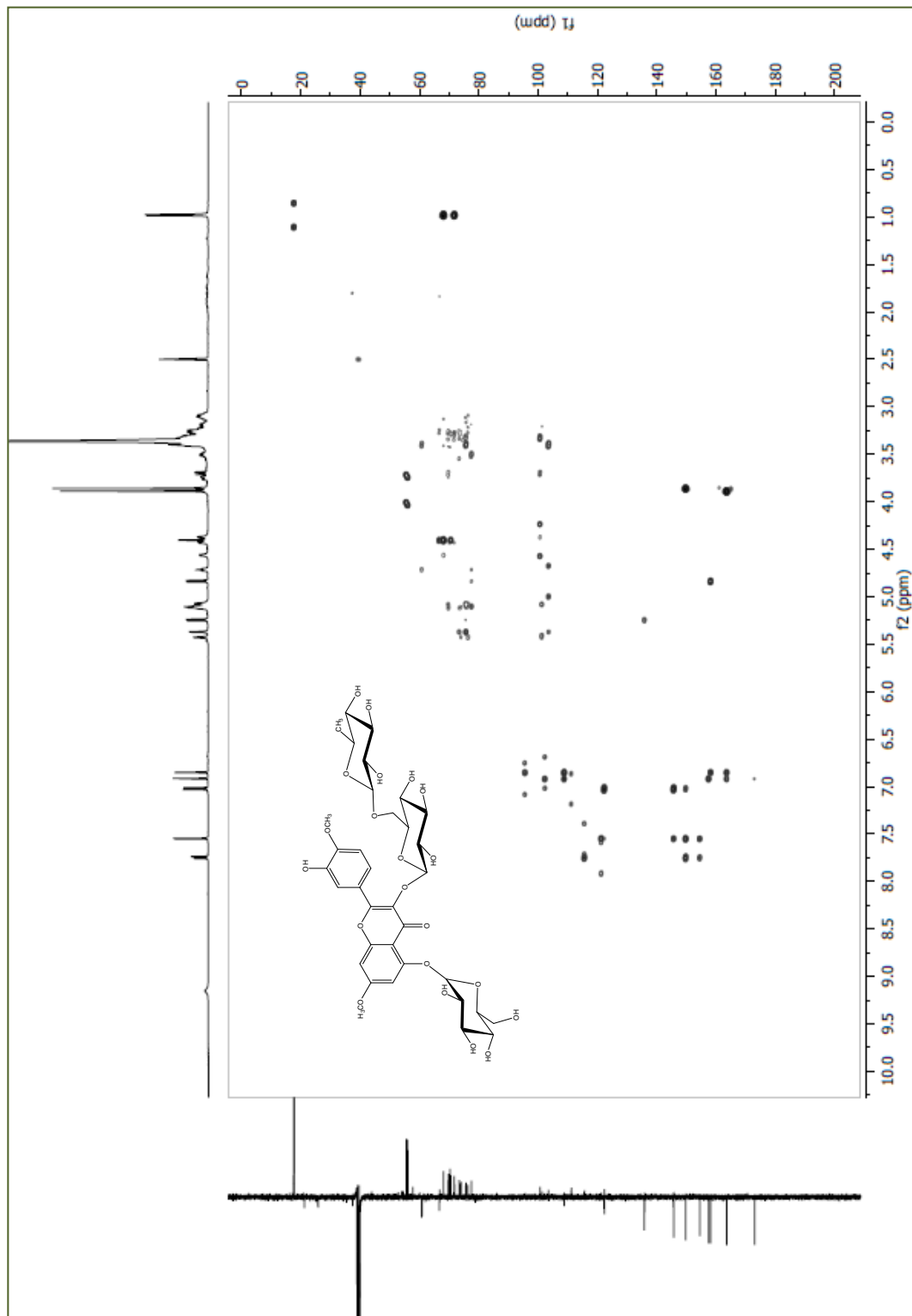
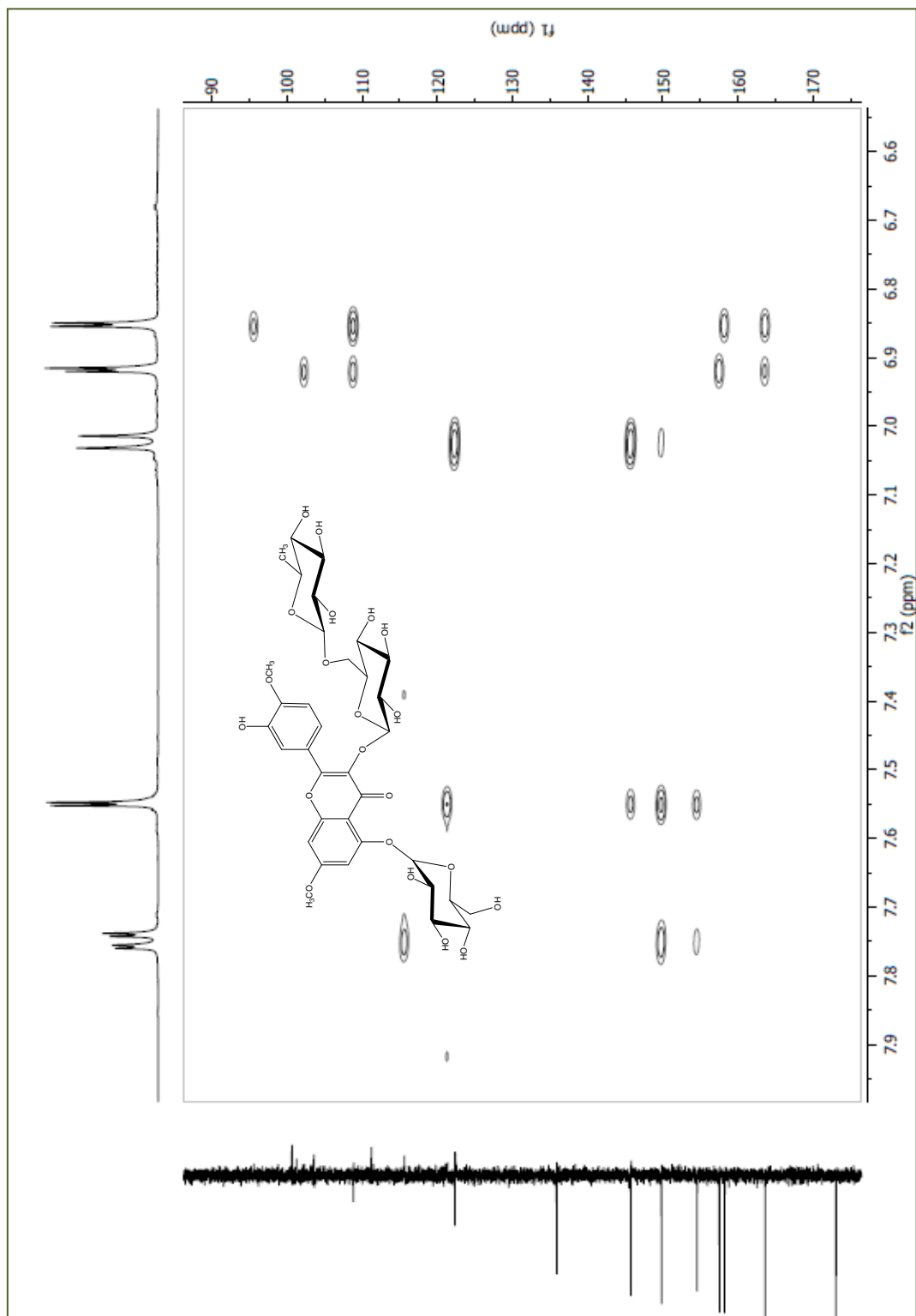
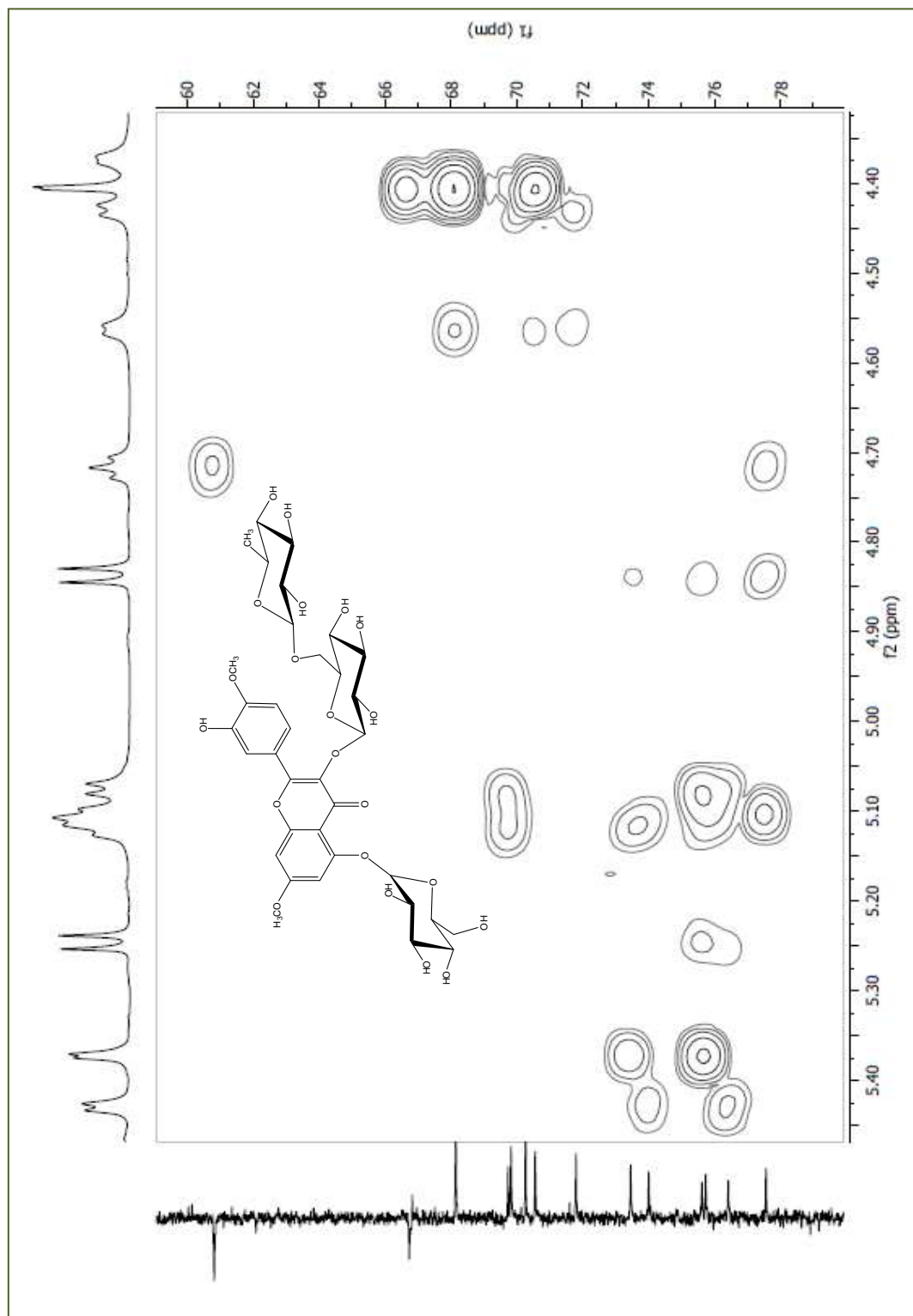


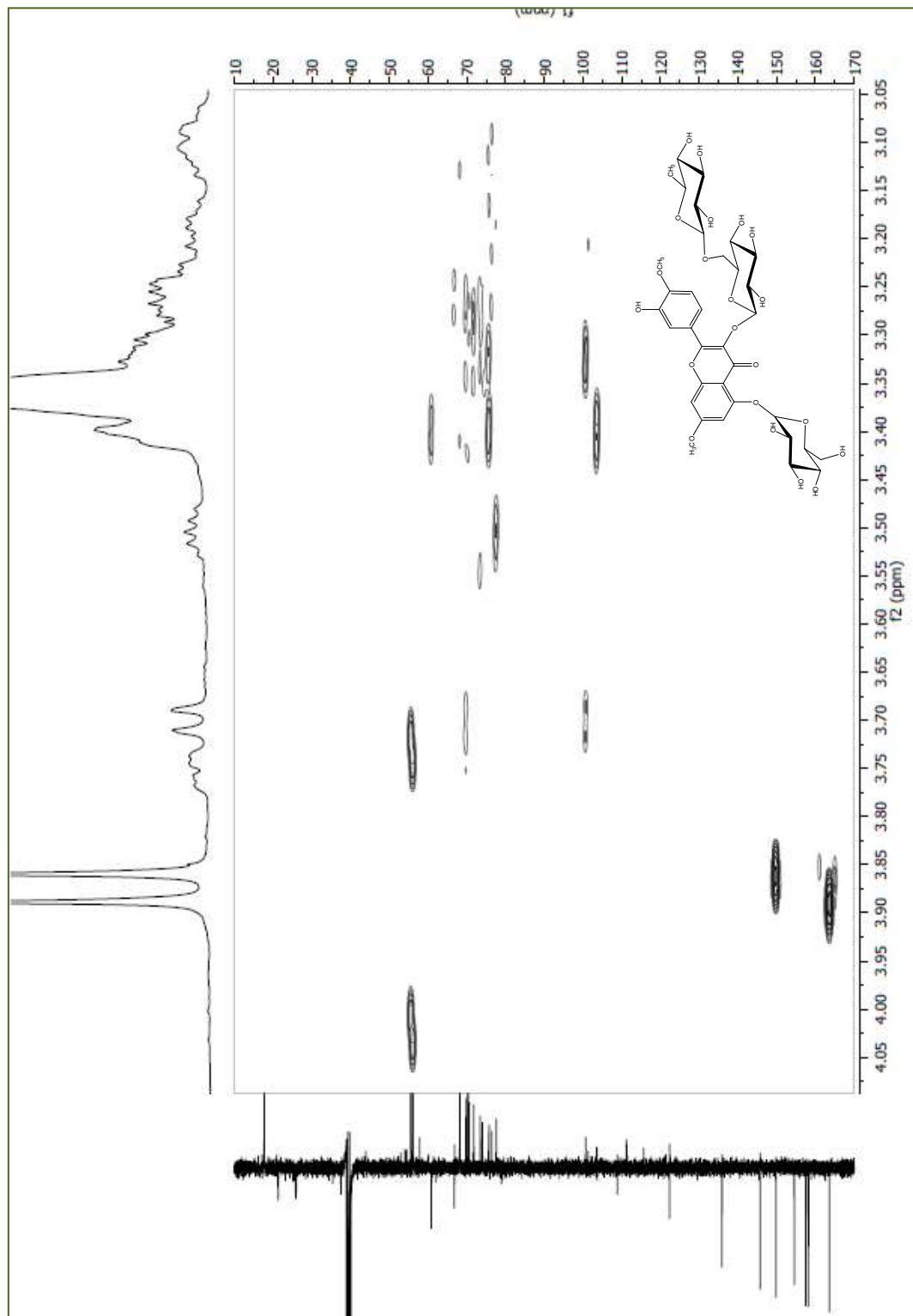
Figura 74. Espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 4.



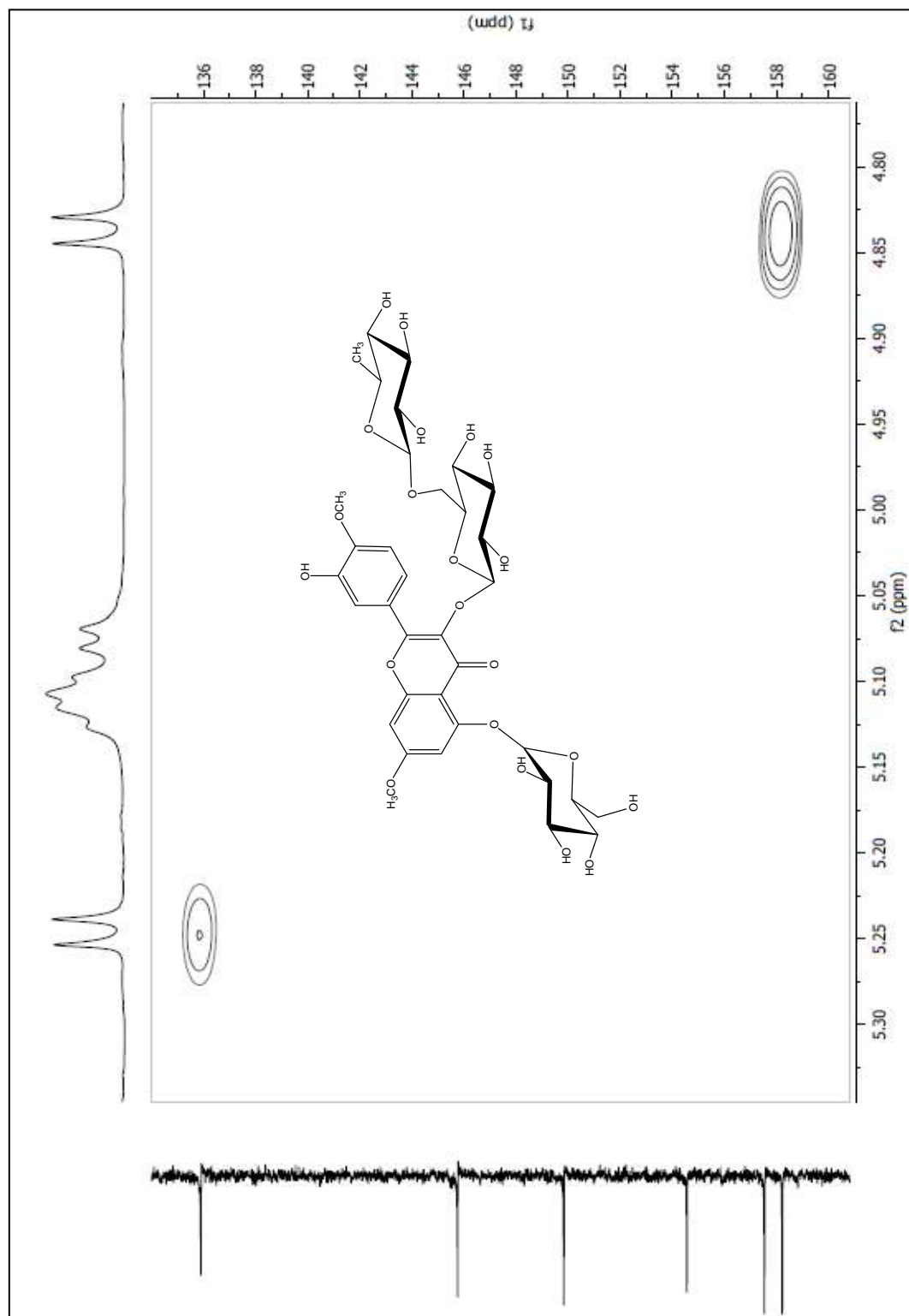
**Figura 75.** Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO de EPA 4 na região de (6,6 – 7,9 ppm) x (90,0 – 170,0 ppm).



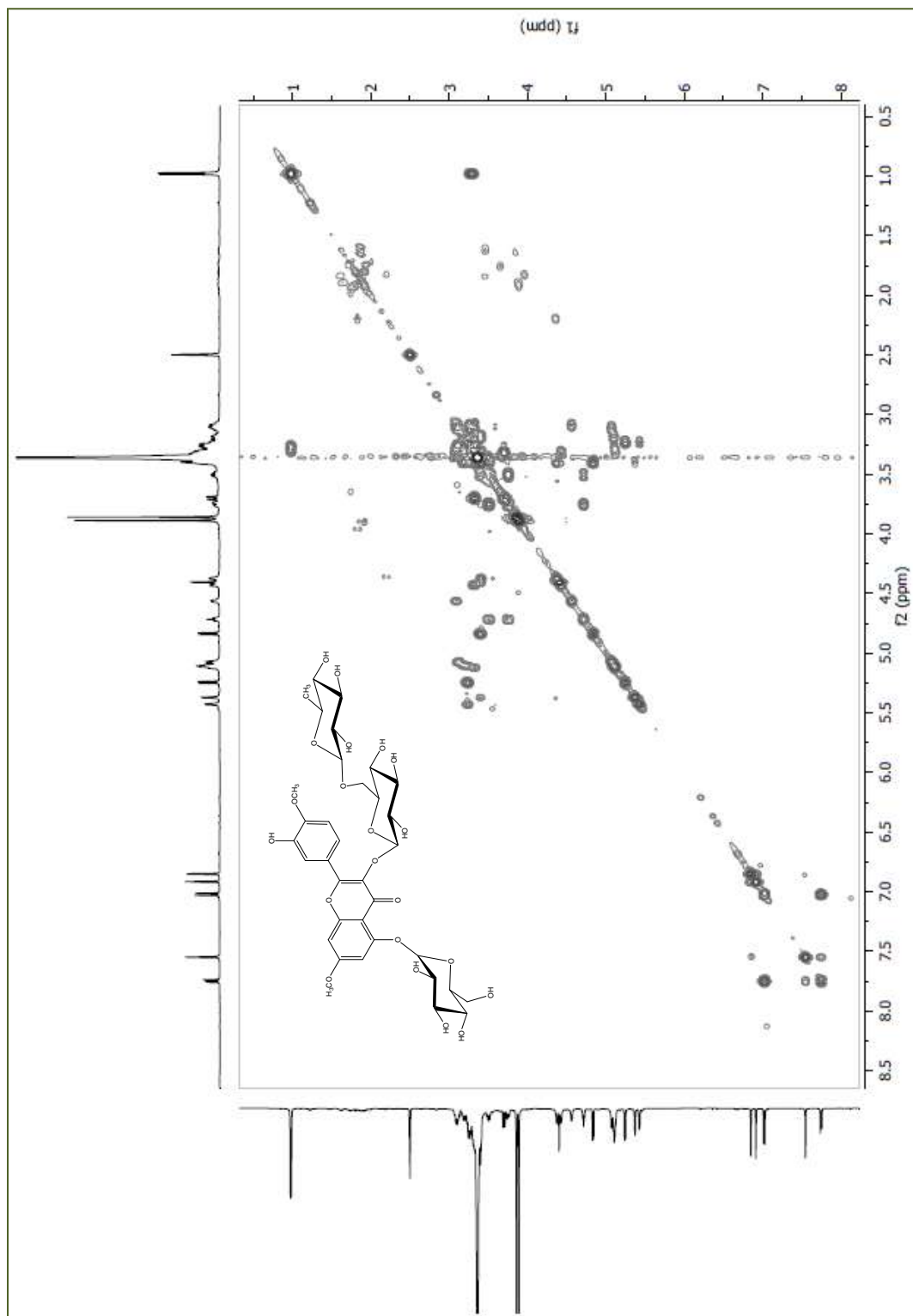
**Figura 76.** Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de EPA 4 na região de (4,4 – 5,4 ppm) x (60,0 – 78,0 ppm).



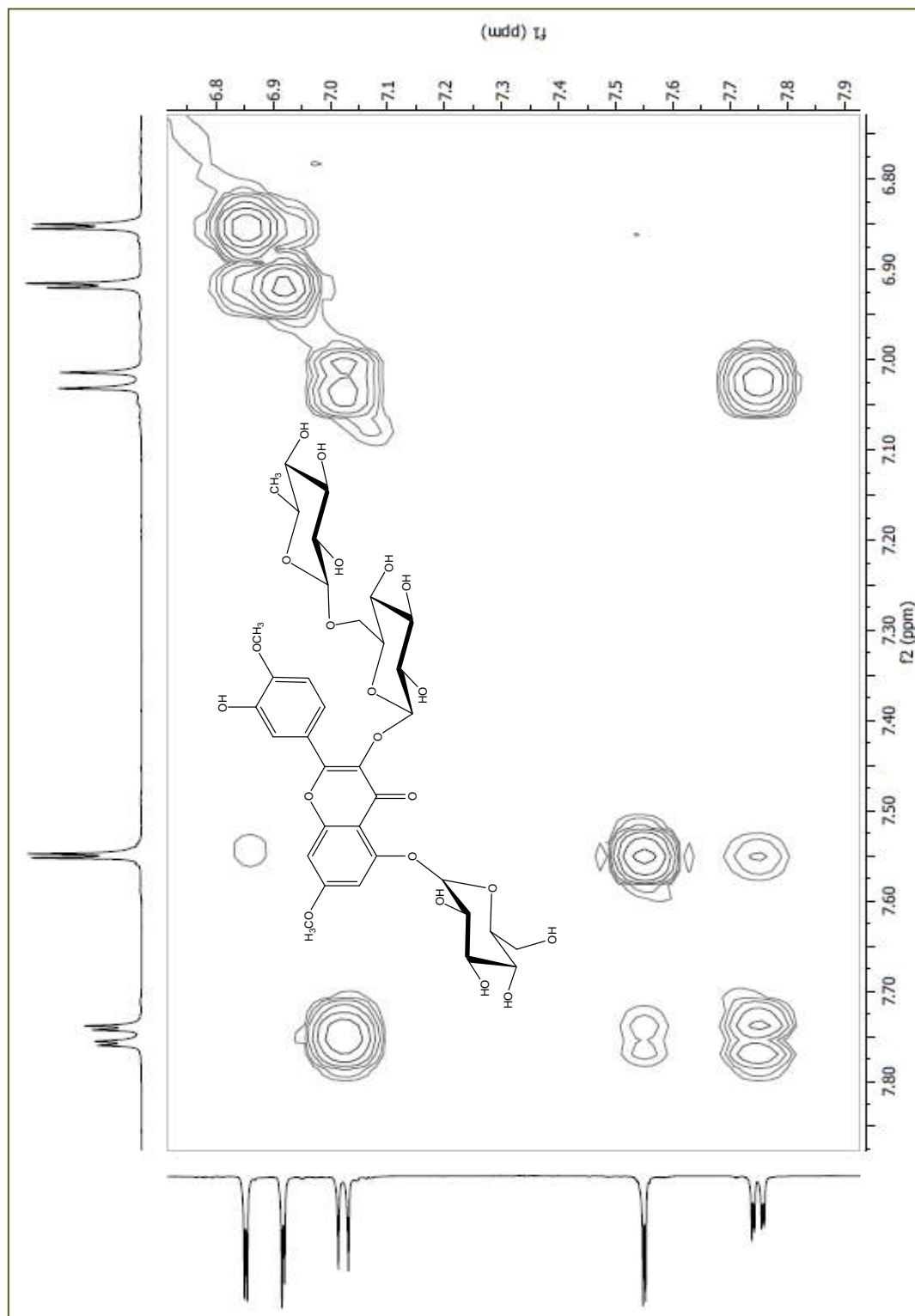
**Figura 77.** Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO ) de EPA 4 na região de (3,0 – 4,0 ppm) x (10,0 – 170,0 ppm).



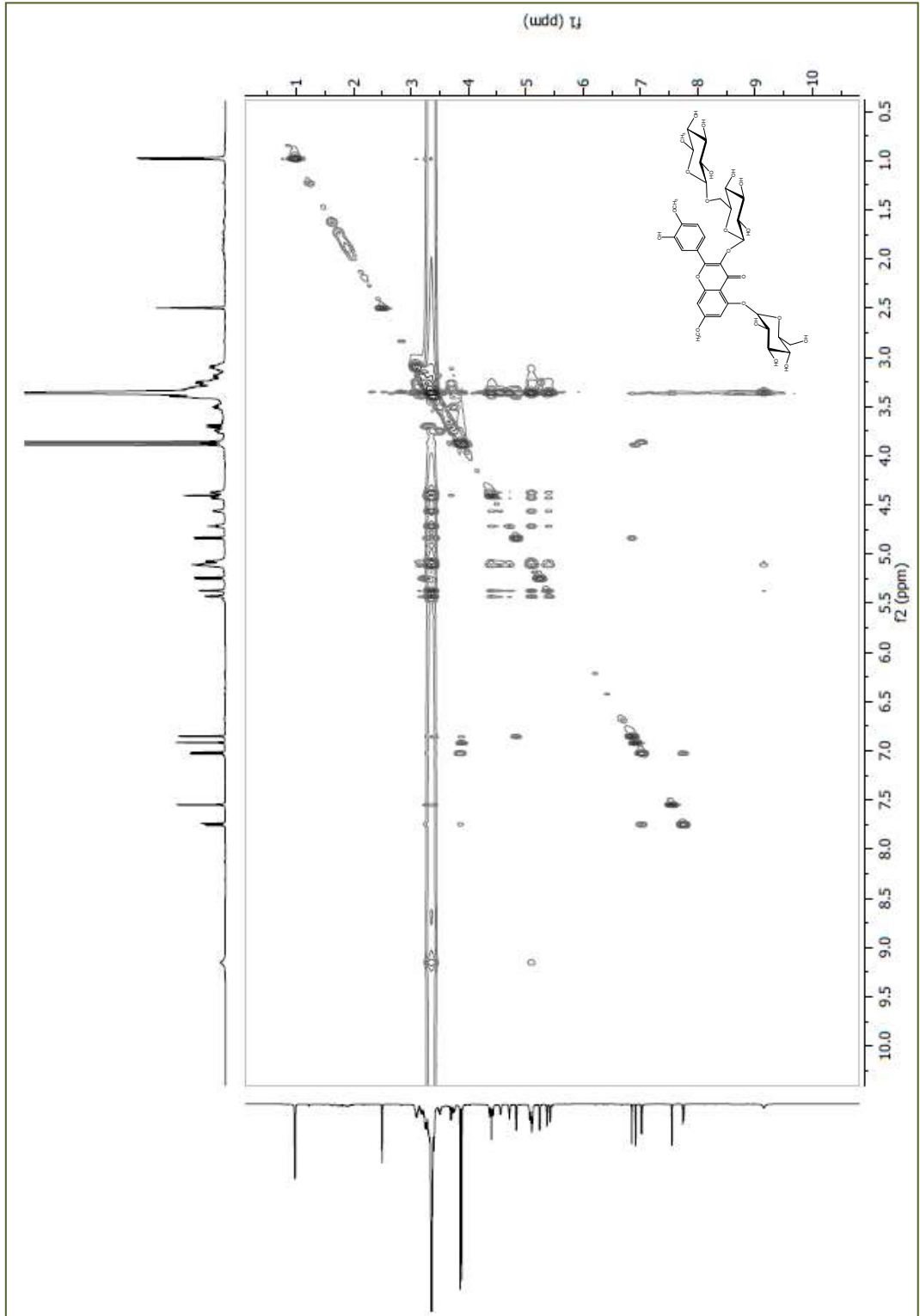
**Figura 78.** Expansão do espectro HMBC (500 e 125 MHz, DMSO) de **EPA 4** na região de (4,8 –5,3 ppm) x (136,0 - 160,0 ppm).



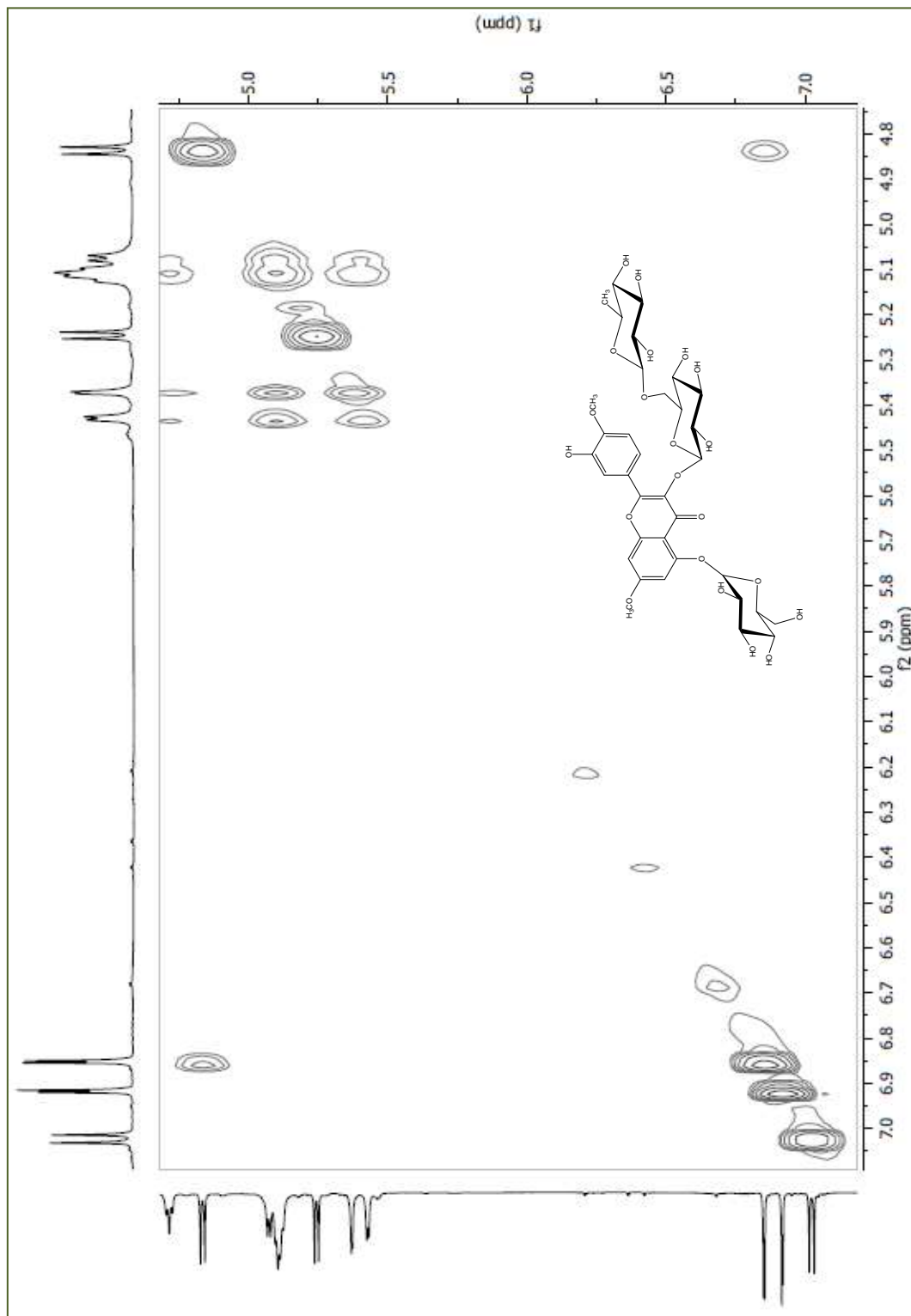
**Figura 79.** Espectro COSY (500 MHz, DMSO) de EPA 4.



**Figura 80.** Expansão do espectro COSY (500 MHz, DMSO) de EPA 4 na região de (6,8 –7,8 ppm) x (6,8 –7,9 ppm).



**Figura 81.** Espectro NOESY (500 MHz, DMSO) de **EPA 4**.



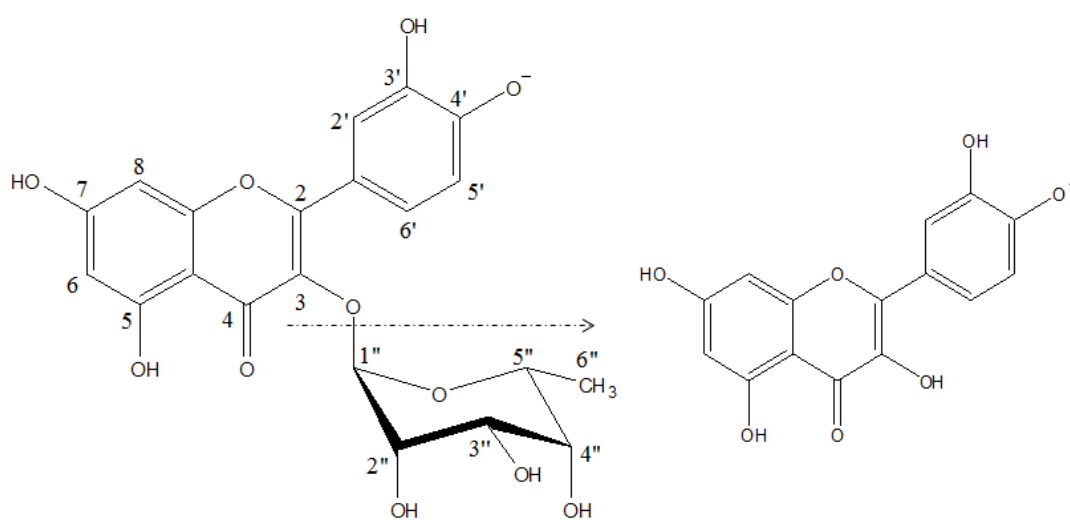
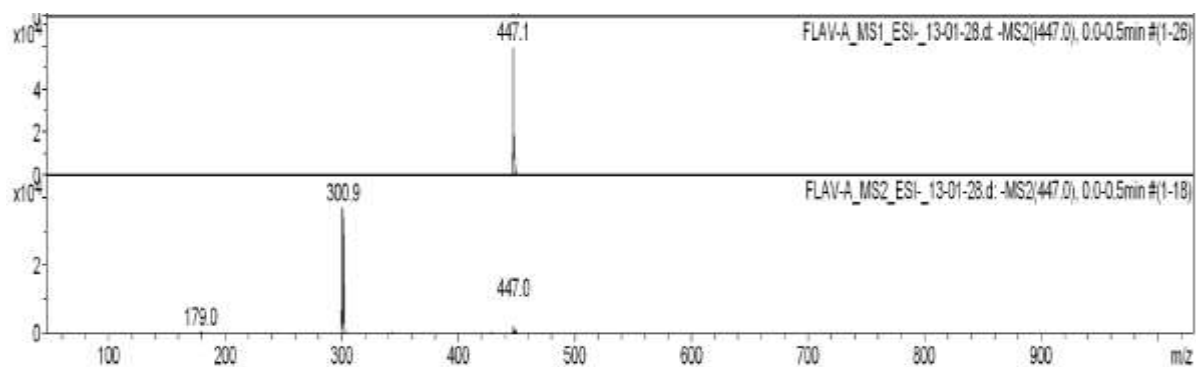
**Figura 82.** Expansão do espectro NOESY (500 MHz, DMSO) de **EPA 4** na região de (5,0 –7,0 ppm) x (4,8 –7,0 ppm).

## 5.5. Análise de EPA 2, EPA 3 e EPA 4 por ESI-EM

As amostras de flavonoides **EPA 2**, **EPA 3** e **EPA 4** foram solubilizadas em MeOH: H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), após sucessivas diluições, foram obtidas amostras nas concentrações de 1ng/mL para obtenção dos espectros de massas por análise em ESI-MS em modo negativo. Durante os processos de fragmentação em modo negativo de flavonoides glicosilados, poderão ser formados íons regulares da aglicona desprotonada [M]<sup>-</sup> através da clivagem heterolítica, ou como também, pode ocorrer a formação de íons referentes ao radical da aglicona desprotonada [M-H]<sup>•-</sup>, devido a possibilidade de clivagem homolítica entre o monossacarídeo e a aglicona (HVATTUM *et al.*, 2003).

Na clivagem heterolítica, a provável via de quebra do flavonoide ligada a raminose envolve a transferência do hidrogênio da unidade de açúcar para o oxigênio da ligação, e com isso a unidade doadora passa formar uma espécie contendo uma dupla ligação entre o carbono C-1'' e C-2'' (SOUZA, 2008).

O espectro de massas da substância **EPA 2** mostrou a presença de um pico do íon molecular com  $m/z$  447,1 [M-H]<sup>-</sup>. A fragmentação desse pico gerou o íon base com  $m/z$  300,9 [M-H], compatível com a fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>7</sub> (Figura 83, pág. 138).

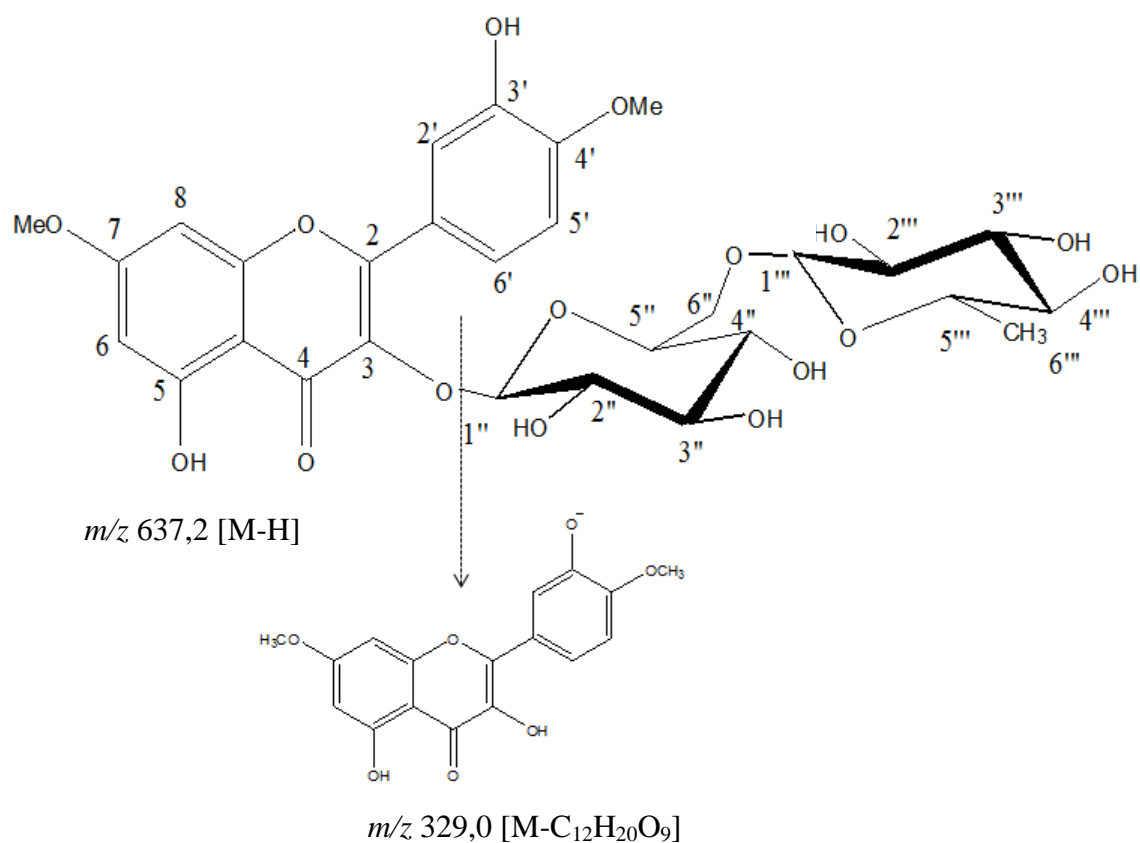
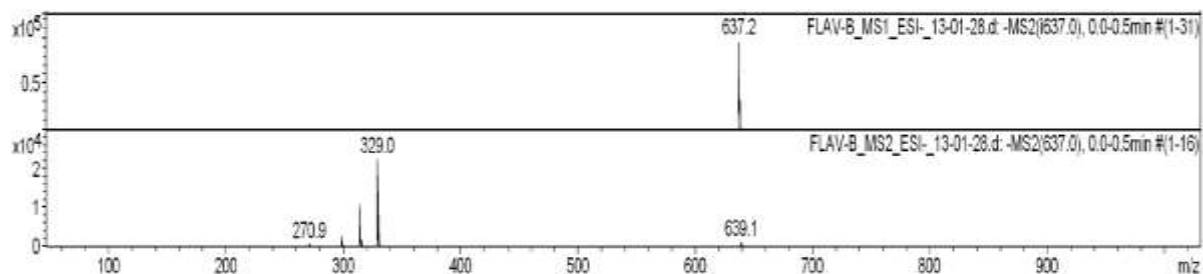


$m/z$  447,1 [M-H]

$m/z$  301,0 [M-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>]

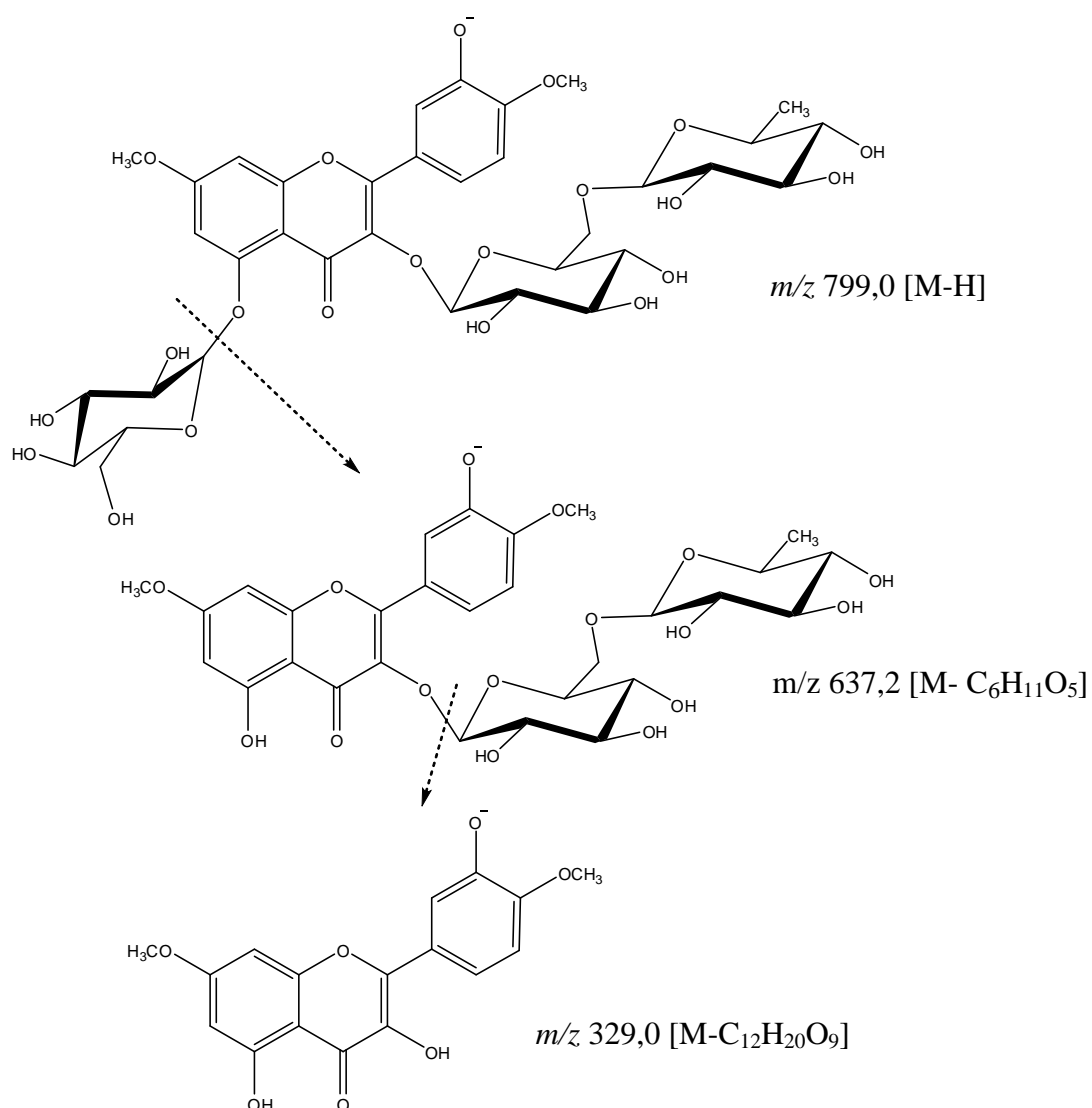
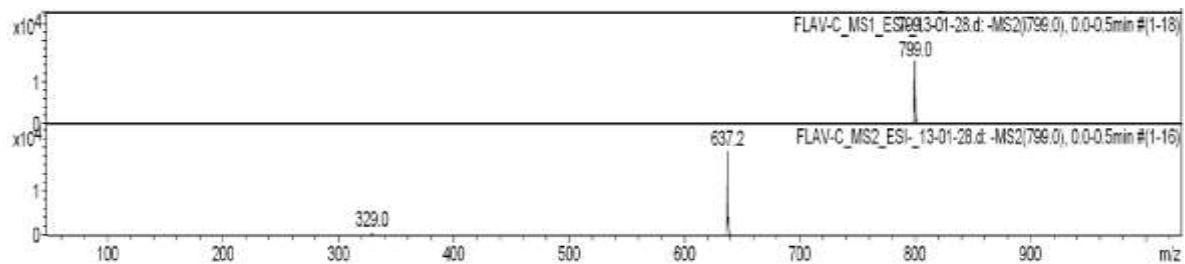
**Figura 83.** Espectro de massa e fragmentação por ESI-MS de **EPA 2**.

O espectro de massas da substância **EPA 3** mostrou a presença de um pico do íon molecular com  $m/z$  637,2. A fragmentação desse pico apresentou o íon base com  $m/z$  329,0 [M-H], compatível com a fórmula molecular  $C_{17}H_{12}O_7$  (Figura 84, pág. 139).



**Figura 84.** Espectro de massa e fragmentação por ESI-MS de **EPA 3**

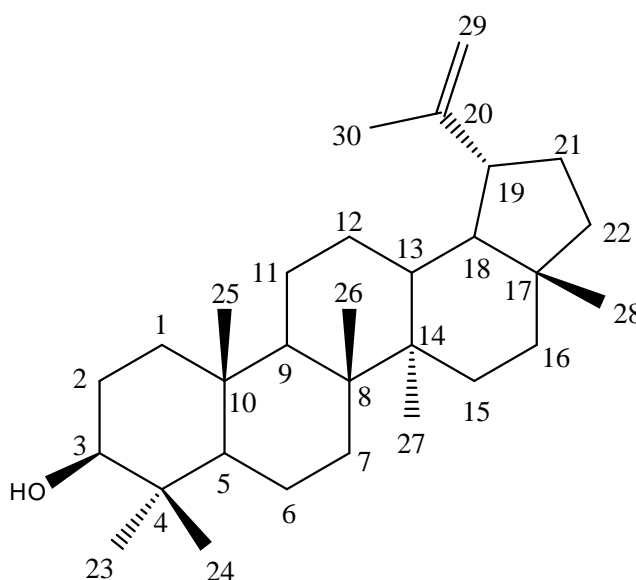
O espectro de massas da substância **EPA 4** mostrou a presença de um pico do íon molecular com  $m/z$  799,0. A fragmentação desse pico apresentou o íon base com  $m/z$  637,2 [M-H], compatível com a fórmula molecular  $C_{29}H_{33}O_{16}$  (Figura 85, pág. 140).



**Figura 85.** Espectro de massa e fragmentação por ESI-MS de EPA 4.

## 5.6. Identificação de EPH 1

A substância **EPH 1** foi obtida na forma de um pó branco. A estrutura foi determinada por métodos espectroscópicos e por comparações com dados da literatura (MALDANER, 2005). Por meio destas análises, comprovou-se tratar do triterpeno lupeol (Fig.86, pág 141) Analisando o espectro de carbono, verificou-se a presença de 27 átomos de carbonos, sendo dois sinais sobrepostos, que são metilas 24, 26 e 27 com deslocamento em 15,3 ppm e os carbonos 2 e 15 em 27, 4 ppm, confirmando a presença dos trinta carbonos (Tabela 12, pág 142).



**Figura 86:** EPH1 – Estrutura do lupeol

**Tabela 12:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CHCl}_3$  a 500 MHz e 125 MHz de **EPH 1**

EPH1			Literatura (MALDANER, 2005)
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	38,6	-	38,8
2	27,4	-	27,4
3	79,0	3,21 m	78,9
4	38,0	-	38,4
5	55,2	-	55,2
6	18,3	-	18,1
7	34,2	-	34,3
8	40,7	-	40,8
9	50,3	-	50,4
10	37,1	-	37,2
11	20,9	-	20,9
12	25,2	-	25,2
13	38,8	-	37,9
14	42,9	-	42,8
15	27,4	-	27,4
16	35,4	-	35,5
17	42,7	-	42,9
18	48,2	-	48,3
19	47,9	2,43 m	47,9
20	150,9	-	150,8
21	29,8	-	29,6
22	39,9	-	40,0
23	27,9	0,74 s	27,9
24	15,3	0,77 s	15,4
25	16,1	0,81 s	16,0
26	15,3	0,86 s	15,4
27	15,3	0,92 s	15,4
28	18,3	1,01 s	18,3
29	109,3	4,66 m	109,3
30	19,3	1,65 s	19,2

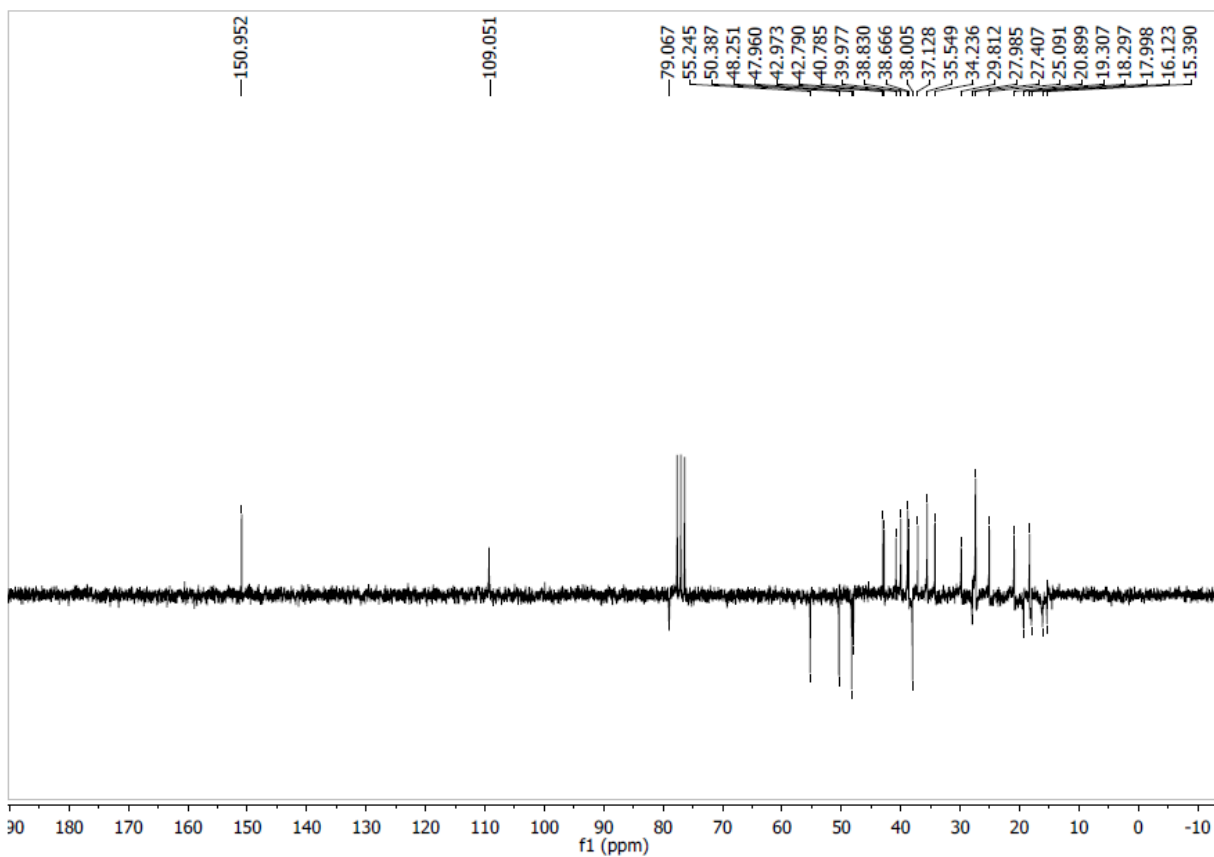


Figura 87. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  APT (125 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) de EPH 1

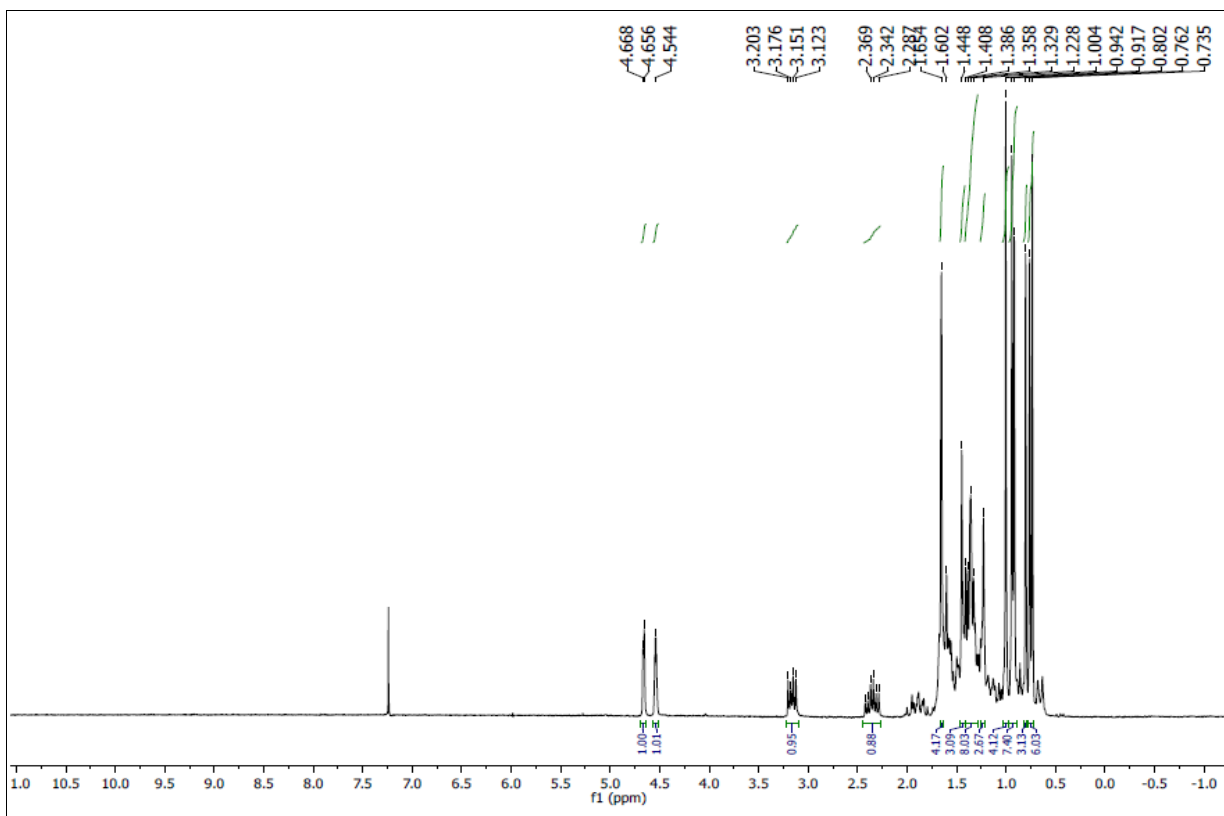
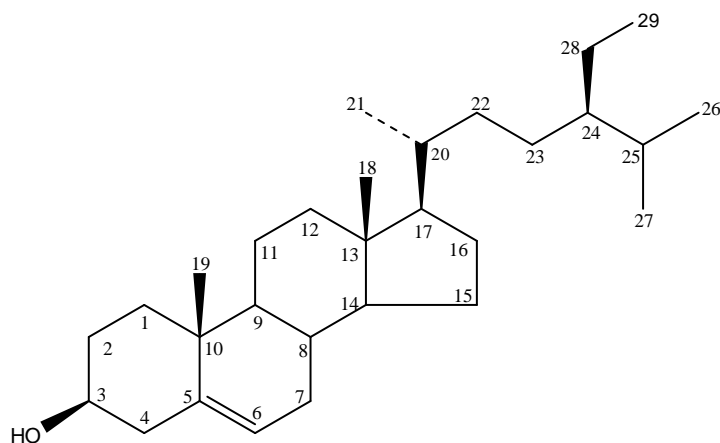


Figura 88. Espectro RMN  $^1\text{H}$  APT (500 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) de EPH 1

## 5.7 Identificação de EPH 2

A identificação do composto EPH 2 ocorreu por comparação da literatura, assim pode-se concluir que se tratava do  $\beta$ -sistosterol (Fig.89,pág 144). Composto já isolado e bem relatado na literatura (NASCIMENTO *et al.*, 2009).Os dados estão compilados na tabela 13, página 145.



**Figura 89:** EPH1 –Estrutura do beta-sitosterol

**Tabela 13:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CHCl}_3$  a 500 MHz e 125 MHz de **EPH 2**

EPH1			Literatura (NASCIMENTO, 2009)
C	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	37,2	-	37,2
2	31,7	-	31,4
3	71,8	3,49 ( <i>m</i> , 1H)	71,7
4	42,3	-	42,1
5	140,7	-	140,7
6	121,7	5,32 ( <i>d</i> , $J = 4,5$ Hz, 1H)	121,6
7	31,9	-	31,9
8	31,9	-	31,8
9	50,1	-	50,1
10	36,1	-	36,4
11	21,1	-	21,0
12	39,8	-	39,7
13	42,3	-	42,2
14	56,8	-	56,7
15	24,3	-	24,3
16	28,2	-	28,2
17	56,1	-	56,0
18	11,8	0,65 ( <i>s</i> , 3H)	11,8
19	19,4	0,98 ( <i>s</i> , 3H)	19,3
20	36,1	-	36,1
21	18,8	-	18,7
22	34,0	-	34,0
23	26,2	-	26,0
24	45,8	-	45,7
25	29,2	-	29,0
26	19,8	0,87 ( <i>d</i> , $J = 6,4$ Hz, 3H)	19,8
27	19,0	0,79 ( <i>d</i> , $J = 5,6$ Hz, 3H)	19,0
28	23,1	-	23,0
29	11,9	-	12,0

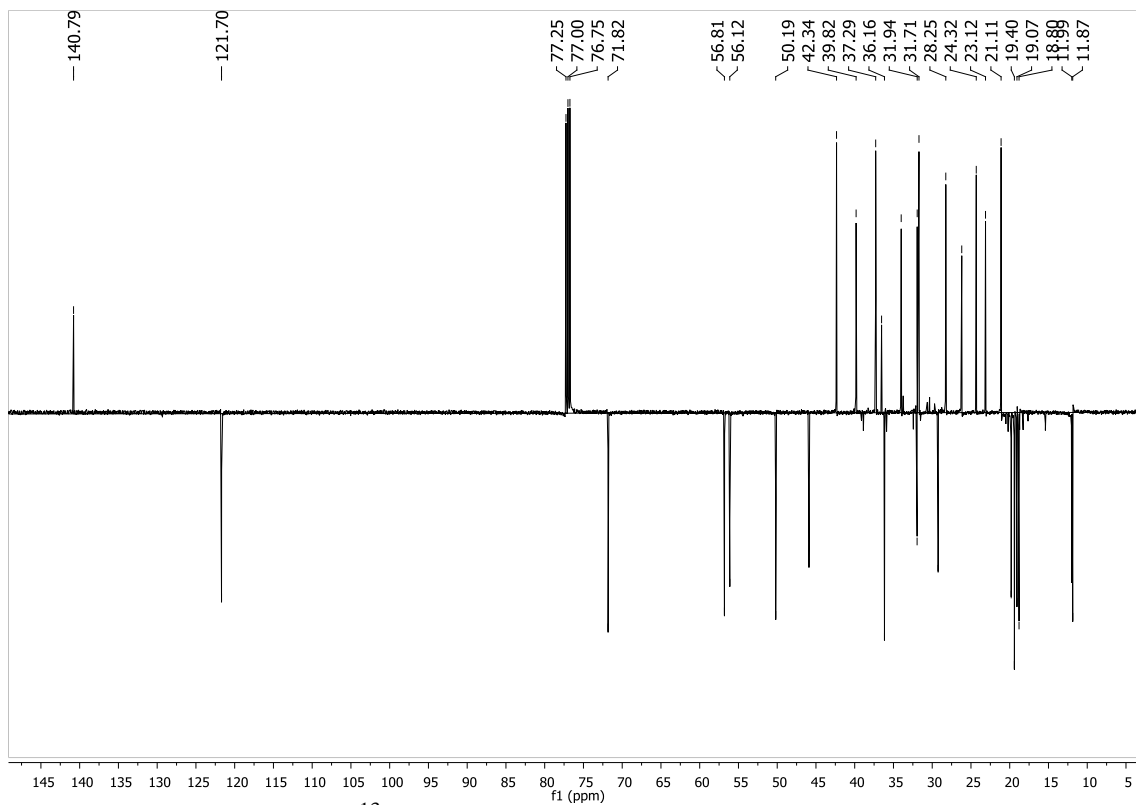


Figura 90. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  APT (125 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) de EPH 2

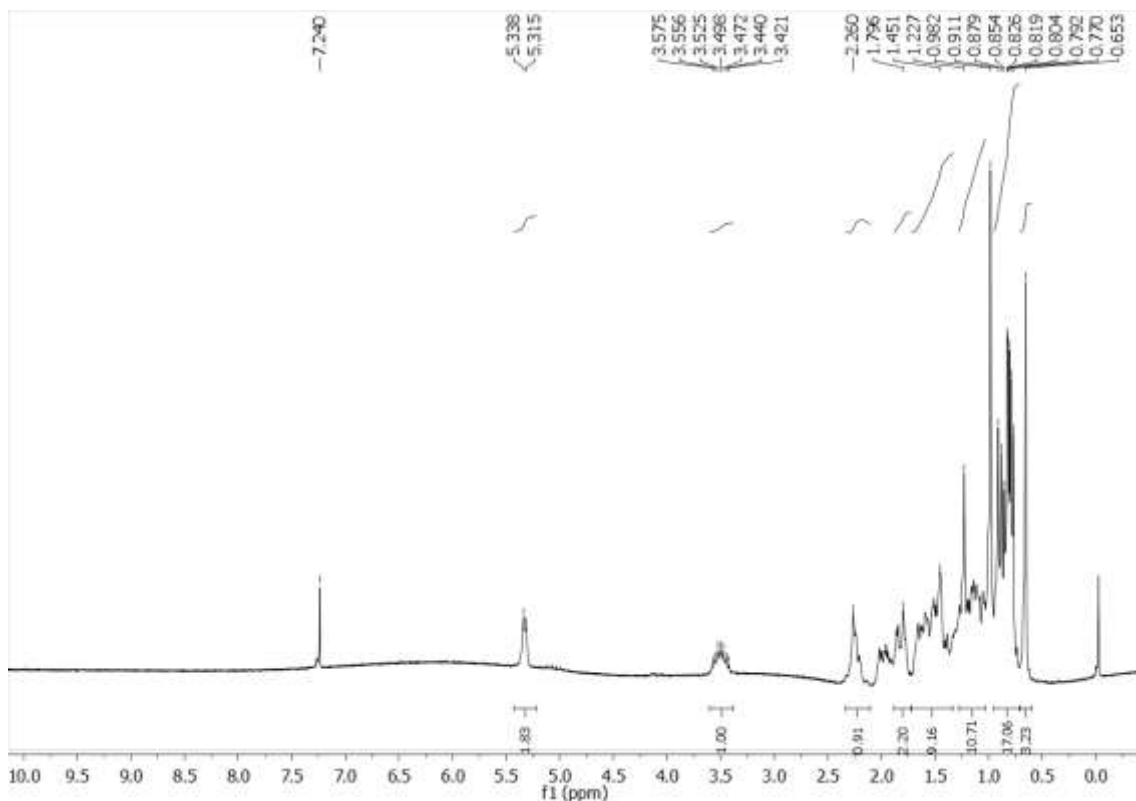


Figura 91. Espectro RMN  $^1\text{H}$  APT (500 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) de EPH 2

## 5.8 Atividade antibacteriana

### 5.8.1. Avaliação do efeito antibacteriano do extrato metanólico de *Erythroxylum pulchrum* frente a bactérias de importância clínica

Neste trabalho, foi investigado pela primeira vez, o potencial antibacteriano da espécie *Erythroxylum pulchrum*. O extrato metanólico inibiu o crescimento de todas as linhagens bacterianas testadas, tanto Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, a linhagem *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 foi o mais sensível apresentando resultados bastante satisfatórios, enquanto que as linhagens *Streptococcus sanguíneos* e *Streptococcus salivares* foram as mais resistentes a ação antibacteriana do extrato (Tabela 14, página 148).

Assim, a concentração inibitória mínima variou entre 64 µg/mL, 128 µg/mL, 256µg/mL e 512µg/mL agrupando linhagens Gram-positivas e Gram-negativas (Tabela 14, pág, 148). Este resultado é relevante uma vez que bactérias Gram-positivas são normalmente mais sensíveis a antibióticos do que as bactérias Gram-negativas (MADIGAN; 2004).

Tal resultado é bastante significativo visto que em um estudo em que foi avaliado 137 extratos diferentes do semi-árido brasileiro, apenas sete demonstraram atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* e nenhum dos extratos testados foi ativo contra *Escherichia coli* (NOVAIS *et al.*, 2003).

No entanto, não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável para os produtos naturais quando comparados com antibióticos que são utilizados na clínica médica, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos dos antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibição superiores. Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM que considera como: inibição forte - CIM até 500 µg/mL, inibição moderada – CIM. entre 600 e 1500 µg/mL e inibição fraca – CIM acima de 1600 µg/mL.

**Tabela 14.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de *Erythroxylum pulchrum*.

LINHAGEM BACTERIANA	CIM
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0516	128 µg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2536	256 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	256 µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	256 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	256 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	64 µg/mL
<i>Streptococcus sanguineus</i>	512 µg/mL
<i>Streptococcus salivares</i>	512 µg/mL
<i>Streptococcus mutans</i>	128 µg/mL
<i>Streptococcus</i> ATCC	128 µg/mL

#### 5.8.2. Caracterização da atividade antibacteriana do extrato de *Erythroxylum pulchrum*.

Após a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, na presença da CIM do extrato metanólico bruto de *Erythroxylum pulchrum*, essa linhagem foi capaz de retomar ao crescimento na ausência do extrato, após ser plaqueada e incubada em 37 por 24 horas. Dessa forma, a atividade antibacteriana exercida pelo extrato metanólico de *Erythroxylum pulchrum* frente a linhagem testada foi bacteriostática.

## 6. CONCLUSÃO

Pela primeira vez, foi relatado o estudo fitoquímico da espécie *Erythroxylum pulchrum* (Erythroxylaceae). O estudo da parte aérea da planta resultou no isolamento de sete substâncias com metodologias desenvolvidas em cromatografia líquida de média pressão. O isolamento dessas substâncias contribuiu para a quimiotaxonomia das espécies de *Erythroxylum* coletadas na Paraíba. Através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono treze (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), incluindo técnicas bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY), foi possível identificar.

- Quatro flavonoides dentre os quais três são heterosídeos já relatados em outras espécies de *Erythroxylum*: epicatequina, quercetina-3-O- $\alpha$ -L-raminosídeo, ombuin-3-rutinosídeo e ombuin-3-rutinosídeo-5-glicosídeo
- Um terpenoide - lupeol, e um esteróide –  $\beta$ -sitosterol.

Com o estudo da atividade antibacteriana do extrato metanólico de *Erythroxylum pulchrum*, pode-se concluir:

- O extrato metanólico de *Erythroxylum pulchrum* inibiu o crescimento das linhagens bacterianas de *Bacillus subtilis* CCT 0516, *Escherichia coli* ATCC 2536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Streptococcus sanguíneos*, *Streptococcus salivares*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus ATCC*
- A espécie *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 foi o mais sensível, e as espécies *Streptococcus sanguíneos* e *Streptococcus salivares* foram as mais resistentes a ação antibacteriana do extrato.

## 7. REFERÊNCIAS

ABREU, P.M., BRAHAM, H., JANNET, H.B., MIGHRI, Z., MATTHEW, S. Antioxidant compounds from *Ebenus pinnata*. **Fitoterapia**, v.78, p. 32–34, 2007.

AGUIAR, S. J., OLIVEIRA, S.L., TAVARES, J.F., BRANCO M.V., LUCENA, H.F., BARBOSA-FILHO J.M., AGRA, M.F., NASCIMENTO, S.C., SILVA, T.G., SIMONE, C.A., ARAÚJO, J.X.J., SILVA, M.S. Tropane alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman. **Chem Biodivers**.v.8, n 1, p. 155-165, 2011.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p.4168-4170, 2001.

ALVES, M.H. 2001. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Disponível em <http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/03/divers.pdf>. Acessado em 25 de dezembro de 2012.

ARGENTA, S.C., ARGENTA, L.C., GIACOMELLE S.R., CEZARROTO V.S. Plantas medicinais: Cultura popular versus Ciência. Vivências. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v.7, n 12, p. 51-60, 2011.

BANDEIRA, J.M., BARBOSA, F.F., BARBSA, L.M.P., RODRIGUES, I.C.S., BACARIN, M.A., PETERS, J.A., BRAGA, F.J.B. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, São Botucatu, v.13, n2, p.157-164, outubro 2011.]

BARREIRO, E. J. L. 2011. Fonte de novos medicamentos. Disponível em <http://agencia.fapesp.br/14023>. Acessado em 14 de fevereiro de 2013.

BARREIRO, M. L., DAVID, J. M., QUEIROZ, P.Q., DAVID, J. P. Flavonoids and triterpenes from leaves of *Erythroxylum nummularia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 537–540, 2005.

BELTRAME, F. L., SARTORETTO, J. L., BAZOTTE, R. B., CUMAN, R. N., CORTEZ, D. A. G., FERNANDES, L. C., ção do Potencial Antidiabético do *Cissussicyoides* L. **Química Nova**, v. 24, p.783-785, 2001.

BOTSARIS, A. Cresce o interesse pela fitoterapia. 2011. Disponível em <http://www2.uol.com.br/vyaestelar/plantas.htm>. Acessado em 20 de janeiro de 2013.

BRANDÃO, H.N., DAVID, J.P., COUTO R. D. NASCIMENTO, J.A.P., DAVID, J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. Bahia, v. 33, n 6, p. 1359-1369, junho 2010.

BRAZ- FILHO., R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente' **Quimica Nova**, São Paulo, v. 33, n 1, p. 229-239, dezembro 2010.

CECHINEL – FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, Santa Catarina, v. 21, n 1, p. 99-105,1998.

CNCFLORA. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://www.cncflora.jbrj.gov.br/?q=plataforma>. Acessado em 25 de Dezembro de 2012.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n 3, p. 241-256, 2009.

COWAN, M.M..Plant products as antimicrobial agents.**Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. The New York Botanical Garden.2 ed. 1988.

DAHLGREN, R. M. T. 1988. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1259-1277.

DALY, D. Flowering Plants of Neotropics-Erythroxylaceae. In: N. Smith; S.A. Mori, A. Henderson *et al.* (eds.). **The New York Botanical Garden**.p.143-145, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. New York:

DIXON R.A., HARRISSON M.J. Activation, structure and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Adv Genet* 1990;28:165-234

DUARTE, M.C.T. 2006. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Disponível em [http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf). Acessado em 21 de janeiro de 2013.

**Fármacos e a Moderna Farmacognosia**, Editora Univali, Capítulo X, p. 239-257, 2007.

FERNANDES, A.F.C. **Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico e fases particionadas de *Myracrodruom urundeuva* Fr.Alemão**. (Aroeira- do – sertão). Dissertação (Mestrado UEP). Campina Grande, 2011.

GANEM, R. S. Conservação da Biodiversidade Legislação e Políticas Públicas. Série de Memórias e Análises de Leis. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados 2011.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GONZALEZ-GUEVARA J.L., CASTRO, V.H., GONZALEZ-GARCIA, K.L., PAYO-HILL, A.L., GONZALEZ-LAVAUT J.A., TORRES, J.M., PRIETO-GONZALEZ, S. Flavonoid glycosides from *Cuban Erythroxylum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 539-542, 2006.

GONZÁLEZ-LAVAUT, J.A., GONZÁLEZ, N.G., ÁLVAREZ, G. O., CASTRO, H.V. Una Entidad Química Aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de – Amirina..**Latin American Journal of Pharmacy**. v.27, n 1, p.85-88, 2008.

GRIFFIN, W.J. & LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, n 8, p. 623-637, 2000.

HARBORNE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. Methods in plant biochemistry: Plant Phenolics. **Academic Press**, London, v. 1, p. 1-28. 1989.

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HVATTUM, E.; EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 38 p. 43-49, 2003. John Wiley & Sons Ltd., 2002.

JOHNSON, E.L., SCHMIDT, W.F. Flavonoids as Chemotaxonomic Markers for *Erythroxylum austral*. **Z Naturforsch.**v.59, p. 11-12, 2004.

JOHNSON, E.L., SCHMIDT, W.F., EMCHE, S.D., MOSSOBA, M.S., MUSSER, S.M. Kaempferol (rhamnosyl) glucoside, a new flavonol from *Erythroxylum coca*. var. *ipadu*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n 1, p. 59-67, 2003.

LABORATÓRIO SISTEMÁTICA DE PLANTAS VASCULARES.2011. Disponível em [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/erythroxyla-ceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/erythroxyla-ceae.html) Acessado em 22 de dezembro de 2012.

LIBER HERBÁRIUM. Guia incompleta de plantas medicinais. Disponível em <http://www.liberherbarum.com/Minor/BZ/Pn5927.HTM>. Acessado em 9 de fevereiro de 2013.

LÔBO, L. T., CASTRO, K. C. F., ARRUDA, M. S. P., SILVA, M. N., ARRUDA, A.C., MULLER, A. H., ARRUDA, G. M. S., SANTOS, A. S. Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosea). **Química Nova**, v.31, n. 3, p. 493-497, 2008.

LOIOLA, M.I.B. Simpósio - Flora fanerogâmica nordestina: diversidade, distribuição e potencial econômico. Universidade Regional do Cariri –URCA **cadernos de cultura e ciência**. V.2, n2, p. 15-16, 2007.

LOIOLA, M.I.B., AGRA, M.F., BARACHO, G.S., QUEIROZ, R.T. Flora da Paraíba, Brasil: Erythroxylaceae Kunth Flora of Paraíba, Brazil: *Erythroxylaceae Kunth*. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 21, n 2, p. 473-487, 2007.

LUCAS- FILHO M.D., SILVA G.C., CORTES S.F., MARES-GUIA TR., PERPÉTUA FERRAZ V., SERRA CP., BRAGA F.C. ACE inhibition by as tilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. **Phytochemistry**.v.17, n 5, p. 383-387, 2010.

M.G. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae. **Rev. bras. farmacogn.** v.19, n.4, João Pessoa, 2009.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. The Bacteria. In: **Brock – Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prantice Hall. 718-814, 2004.

MALDANER, G. 2005. Dissertação de mestrado. **Estudo dos metabólitos secundários de *Condalia buxifolia* e *Scutia buxifolia* e suas atividades antimicrobianas**. UFSM .Santa Maria, RS – Brasil.

MILLANI, A.A., ROSSATTO, D.R., RUBIN FILHO, C.J., KOLB, R.M M. Análise de crescimento e anatomia foliar da planta medicinal *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) cultivada em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n 2, p.127-134, 2010.

NASCIMENTO L.A.C., GUILHON, G. M.S.P., ARRUDA, M.S.P., SANTOS, L.S., ARRUDA A.C., MÜLLER A.H., SILVA M.N., RODRIGUES, T.S., CARVALHO, NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais Aspectos Químicos e Biológicos de Terpenos. In: Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A.(eds.). **Química de Produtos Naturais, Novos**

NOLDIN, V.F., ISAIAS, D.B., FILHO- CECHINEL V. Gênero *calophyllum*: importância química e farmacológica. **Química Nova**, Santa Catarina, v. 29, n 3, p. 549-554, fevereiro 2006.

NOVAIS, T.S., COSTA, J.F.O., DAVID, J.P.L., DAVID, J.M., QUEIROZ, L.P., FRANÇA, F., GIULIETTI, A.M., SOARES, M.B.P., SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. bras. farmacogn.** v.13, n 2, p.5-8, Maringá, 2003.

OLIVEIRA A.C; SENA-FILHO J.G; MENDES-JÚNIOR L.G; ANJOS R. A<sup>I</sup>; RIBEIRO T.P.; BARBOSA J.M.F; BRAGAV.A; MEDEIROS I.A. *Erythroxylum pungens* elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats. **Rev. bras. Farmacogn.** v.22, n 2, p. 436-442, 2012.

OLIVEIRA, S. L. **Alcaloides tropânicos de *Erythroxylum caatingae***. 2008. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2008.

OLIVEIRA, S.L. **Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos**. Dissertação (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2012.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. Institute of Advanced Biomedical Technologies, National Council of Research Via F.lli Cervi 93 Segrate (MI), Italy. v. 63, p.1035-1042, 2000.

PLOWMAN, T. C. & HENSOLD, N. Names, types and distribution of neotropical species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). **Brittonia** v. 56, n.1, p. 1-53, 2004.

PLOWMAN, T.C. *Erythroxylaceae Kunth*. In: W.D. Stevens; C. Ulloa; A. Pool & O.M. Montiel (eds.). Flora de Nicaragua. **Monographs Systematic Botany Missouri**, v. 85, p.834-838, 2001.

RAHMAN, A-V., KHATTAK, F.K., NIGHAT, F., SHABBIR<sup>‡</sup>, M., HEMALAL<sup>‡</sup>, K.D., TILLEKERATNE<sup>‡</sup> L.M. Dimeric tropane alkaloids from *Erythroxylum moonii*. **Phytochemistry**, v. 48, n 2, p. 377-383, 1998.

RUSSO, O.R., SÁNCHE, M.S. Los flavonoides en la terapia cardiovascular. **Revista Costarricense de Cardiología**, v.8 n.1 San José 2006.

SANTOS, C.C., LIMA, M. A. S., BRAZ-FILHO, R., SILVEIRA, E.R. Diterpenes from *Erythroxylum barbatum* Braz. **Chem. Soc.** vol. 17, n. 7, p. 1304-1308, 2006

SCHWARZBACH, A. E. & RICKLEFS, R. E. 2000. **American Journal of Botany** 87(4): 547564.

SILVA, G.L., CUI, B., CHÁVEZ, D., YOU M., CHAI, H.B., RASOANAIVO, P., LYNN, S.M., O'NEILL, M.J., LEWIS, J.A., BESTERMAN, J.M., MONKS, A., FARNSWORTH, N.R., CORDELL, G.A., PEZZUTO, J.M., KINGHORN A.D., Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*. **J Nat Prod.**, v. 64, n 12, p. 1514-1520, 2001.

SILVA, N.C.C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas.** Dissertação (Mestrado), UNESP Botucatu, 2010.

SIMÕES, C. M. O., SCBENKEL, E.P., GOSMANN G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R., *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Porto Alegre/Florianopolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2003.

SOUZA, L.M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular.** Tese de doutorado. UFPR, Curitiba, 2008.

TAMAGNA, G. A., KULA, N.S., BALDESSARINE R.J. Synthesis and monoamine transporter affinity of 3'-analogs of 2- $\beta$ -carbomethoxy-3- $\beta$ -(4'-iodophenyl)tropane ( $\beta$ -CIT). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n 9, pp. 2117-2120, 2004.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, Porto Alegre Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. Microbiologia, Rio de Janeiro, Atheneu, 2004.

VENTURA G.1, CASTRO A.1, ROQUE M.2, RUIZ J. Chemical composition of essential oil *Erythroxylum coca Lamvar.coca* (Coca) and evaluation of its antibacterial activity. **Ciencia e Investigación Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM**, v 12, n 1, p. 24-28, 2009.

VOLPATO, A.N.M. **Avaliação do potencial antimicrobiano de calêndula oficialis (asteraceae) para seu emprego como fitoterápico.** Tese de doutorado, UFPR Curitiba, 2005.

ZANOLARI, B., WOLFENDER J.L., GUILLET D., MARSTON A., QUEIROZ E.F., PAULO M.Q., HOSTETTMANN K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1020, p. 75-89. 2003.

ZUANAZZI, J.A.S., TREMEA, V., LIMBERGER, R.P., SOBRAL, M. & HENRIQUES, A.T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 29, n 8, p. 819-825, 2001.