

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo Químico de *Pavonia multiflora* A. St-Hil.
(Malvaceae), planta endêmica do Espírito Santo**

Leandra Gobira Lopes

Dissertação de Mestrado em Química

**Vitória
2014**

Leandra Gobira Lopes

Estudo Químico de *Pavonia multiflora* A. St-Hil. (Malvaceae), planta endêmica do Espírito Santo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges

**Vitória
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

L864e Lopes, Leandra Gobira, 1981-
Estudo químico de *Pavonia multiflora* A. St-Hil. (Malvaceae),
planta endêmica do Espírito Santo / Leandra Gobira Lopes. – 2014 .
117 f. : il.

Orientador: Warley de Souza Borges.
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. Produtos naturais. 2. Química vegetal. 3. *Pavonia multiflora*. 4.
Catepsinas. I. Borges, Warley de Souza. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas. III. Título.

CDU: 54

**Estudo Químico de *Pavonia multiflora* A. St-Hil.
(Malvaceae), planta endêmica do Espírito Santo**

Leandra Gobira Lopes

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Aprovada em 27/03/2014 por:

Prof. Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino
Universidade Federal de Goiás

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Margarida e João, pela formação do meu caráter, pelo amor e dedicação, pelo incentivo ao estudo como forma de crescimento, e por acreditarem na minha capacidade. Por me fortalecerem em momentos em que me faltaram confiança e força. Por segurarem em minhas mãos e caminharem ao meu lado, me fazendo seguir em frente. Obrigada pelo apoio infinito e pelo amor incondicional.

Ao meu marido, Alexandre, pela paciência e companheirismo diante de tantas atribulações. Pela preocupação com meu bem-estar e pela compreensão de minhas ausências e tantas ocupações. Agradeço por tanto amor, e por me proporcionar momentos de felicidade, mesmo nas horas mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Warley de Souza Borges, pelo otimismo e confiança. Agradeço pela oportunidade de trabalharmos juntos nessa área tão rica em informações. Obrigada pela orientação e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos de mestrado: Eder Lana, Dayane Galvão, Thales Altoé, Carliani Bessa e Michelli Silva. Obrigada pela parceria, conselhos, momentos de descontração e auxílios nos trabalhos diários. Agradeço ainda pela força, apoio e palavras de motivação nos momentos de fraqueza. São lembranças que certamente me acompanharão sempre.

Às amigas de laboratório: Caroline Guerrieri e Gabriela Tavares. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pela disponibilidade, boa vontade e companheirismo.

Aos demais amigos da Pós-Graduação e do laboratório de Química Orgânica, em especial à Roberta Cecília e Gustavo, pelo convívio e pelos momentos em pudemos compartilhar nossas experiências e caminharmos juntos.

Aos amigos dos cursos de Farmácia e de Química, especialmente à Kamila Soares, que tanto me apoiou nessa jornada, obrigada pela amizade e parceria. Aos amigos de infância e de trabalho, que mesmo de longe, torceram pelo meu sucesso ao longo desses dois anos.

Aos professores das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Química da UFES, pelos ensinamentos.

À Prof^a Dr^a Luciana Diaz Thomas e seu aluno Weverson Cavalcante pela coleta e identificação da espécie vegetal trabalhada.

Ao laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (UFES-NCQP) e seus responsáveis pelas análises realizadas.

A Universidade Federal de São Carlos pelas análises por CG-EM e pelos ensaios enzimáticos com as catepsinas.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pelas análises de Espectrometria de Massas.

A Universidade Federal de Goiás e ao Prof. Dr. José Sabino pela análise por cristalografia de difração de Raios-X.

Ao Projeto Sisbiota e todos os seus colaboradores, especialmente ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira.

Aos professores Prof. Dr. Reginaldo Bezerra dos Santos e Prof^a. Dr^a. Juliana Aparecida Severi pelas sugestões e correções na qualificação deste trabalho.

Aos professores Dr. Álvaro Cunha Neto e Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino pela disponibilidade em participar da banca de defesa dessa dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de realização deste trabalho e pela formação.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao CNPQ-Fapesp (proc. nº 56328612010-5) e CNPQ (552686/2011-5) pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substâncias com atividade biológica de origem vegetal.	20
Figura 2: <i>P. multiflora</i> coletada na Reserva Biológica de Duas Bocas / E.S.....	31
Figura 3: Esquema da preparação do extrato W19.....	32
Figura 4: Esquema da partição líquido-líquido.	33
Figura 5: Fracionamento cromatográfico do extrato W19A.	36
Figura 6: Fracionamento cromatográfico da fração W19A 2.	38
Figura 7: Fracionamento cromatográfico da fração W19A 3	40
Figura 8: Fracionamento cromatográfico do extrato W19H.....	42
Figura 9: Esquema do ensaio enzimático de inibição das catepsinas.....	45
Figura 10: Gráfico da porcentagem de inibição das catepsinas K, L e V frente a diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato total.....	47
Figura 11: Cromatograma CLAE da subfração W19A 2.3, destacando a banda da substância 1	48
Figura 12: Cromatograma CLAE da subfração W19A 2.4.7, destacando a banda da substância 2	49
Figura 13: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.3, destacando a banda da substância 3	50
Figura 14: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.4.6.20, destacando as bandas das substâncias 3 e 4	51
Figura 15: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.5.2, destacando a banda da substância 6	52
Figura 16: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.5.3, destacando a banda da substância 7	52
Figura 17: Estrutura química geral de um ftalato.....	54
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da amostra W19A 3.1p(38) (CDCl_3 , 400MHz). ..	55
Figura 19: Estrutura química do ácido vanílico (1).	57
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H da substância 1 (ácido vanílico) da amostra W19A 2.3p(13,03) (CD_3OD , 400MHz).	59
Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 1 (ácido vanílico) da amostra W19A 2.3p(13,03) (CD_3OD , 100MHz).	60

Figura 22: Mapa de contornos HMBC da substância 1 (ácido vanílico) na amostra W19A 2.3p(13,03), destacando a correlação dos hidrogênios metoxílicos com C-3 do anel aromático (CD ₃ OD, 400 MHz).	60
Figura 23: Estrutura química do ácido ferúlico (2).	61
Figura 24: Espectro de RMN de ¹ H da substância 2 (ácido ferúlico) da amostra W19A 2.4.7p(18,09) (CD ₃ OD, 400MHz).	62
Figura 25: Estrutura química do ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (3).	64
Figura 26: Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico) da amostra W19A 3.3p(11,7) (CD ₃ OD, 400MHz).	66
Figura 27: Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico) da amostra W19A 3.4.6.20p(13,6) (CD ₃ OD, 400MHz).	67
Figura 28: Estrutura química do ácido <i>trans p</i> -cumárico (4).	68
Figura 29: (a) Representação da excitação de elétrons π quando absorve energia; (b) Conversão do ácido <i>trans p</i> -cumárico em ácido <i>cis p</i> -cumárico.	69
Figura 30: Espectro de RMN de ¹ H da substância 4 (ácido <i>p</i> -cumárico) (CD ₃ OD, 400MHz).	71
Figura 31: Estruturas químicas do isopreno (C ₅), DMAPP e IPP.	72
Figura 32: Formação de estruturas de <i>nor</i> -isoprenoides C ₉ , C ₁₀ , C ₁₁ e C ₁₃ a partir do beta-caroteno.	73
Figura 33: Estrutura de <i>nor</i> -isoprenoides megastigmanos.	74
Figura 34: Estrutura química da loliolida (5).	75
Figura 35: Espectro de RMN de ¹ H da substância 5 (loliolida) (CDCl ₃ , 400MHz).	77
Figura 36: Espectro de RMN de ¹³ C da substância 5 (loliolida) (CDCl ₃ , 100 MHz).	78
Figura 37: Espectro de massas de alta resolução da substância 5 (loliolida).	79
Figura 38: Estrutura química do vomifoliol (6).	80
Figura 39: Espectro de massas de alta resolução da substância 6 (vomifoliol).	81
Figura 40: Espectro de RMN de ¹ H da substância 6 (vomifoliol) (CD ₃ OD, 400MHz).	82
Figura 41: Mapa de contornos HMBC da substância 6 (vomifoliol) (CDCl ₃ , 400MHz).	83
Figura 42: Principais correlações de HMBC (H→C) da substância 6 (vomifoliol).	84
Figura 43: Estrutura química do 4,5-dihidroblumenol A (7).	86
Figura 44: Espectro de massas de alta resolução da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A).	88

Figura 45: Espectro de RMN de ^1H da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A) (CDCl_3 , 400MHz).....	89
Figura 46: Mapa de contornos HMBC da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A) (CDCl_3 , 400MHz).....	90
Figura 47: Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A).....	90
Figura 48: Principais correlações de HMBC (H \rightarrow C) da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A).....	91
Figura 49: Estrutura química do <i>p</i> -metoxibenzoato de taraxerol (8).....	93
Figura 50: Espectro de RMN de ^1H da substância 8 (<i>p</i> -metoxibenzoato de taraxerol) (CDCl_3 , 400MHz).....	95
Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 8 (<i>p</i> -metoxibenzoato de taraxerol) (CDCl_3 , 100MHz).....	96
Figura 52: Mapa de contornos HMBC para substância 8 (<i>p</i> -metoxibenzoato de taraxerol) (CDCl_3).....	97
Figura 53: Expansão do mapa de contornos HMBC para substância 8	98
Figura 54: Representação ORTEP do <i>p</i> -metoxibenzoato de taraxerol (8), obtida por cristalografia de difração de Raios-X.....	100
Figura 55: Estrutura química do 3-oxo- α -ionol (9).....	103
Figura 56: Estrutura química do blumenol C (10).....	103
Figura 57: Cromatograma da amostra W19A 2.4.4(19-24) (CG-EM).....	104
Figura 58: Expansão do cromatograma da amostra W19A 2.4.4(19-24) (CG-EM).....	104
Figura 59: Espectro de massas da substância 9	104
Figura 60: Espectro de massas da substância 10	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados em porcentagem de inibição das catepsinas K, V e L pelo extrato total (W19).....	47
Tabela 2: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância 1 (ácido vanílico) comparados com a literatura (*SHAIKH, MAKHMOOR, CHOUDHARY, 2010) (δ em ppm, J em Hz).....	58
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância 2 (ácido ferúlico) comparados com a literatura (*REGASINI, FERNANDES, CASTRO-GAMBOA <i>et al</i> , 2008) (δ em ppm, J em Hz).....	63
Tabela 4: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância 3 (ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico) comparados com a literatura (*YAYLI, YILDIRIM, USTA <i>et al</i> , 2003) (δ em ppm, J em Hz).	65
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância 4 (ácido <i>trans p</i> -cumárico) comparados com a literatura (*KALINOWSKA, LADERIERE, CHAMPAGNE <i>et al</i> , 2013) (δ em ppm, J em Hz).	70
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância 5 (loliolida) e comparados com a literatura (*CONEGERO, IDE, NAZARI <i>et al</i> , 2002) (δ em ppm, J em Hz).....	76
Tabela 7: Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e as correlações de HMBC da substância 6 (vomifoliol) comparados com a literatura (*ÖKSÜZ, ULUBELEN, BARLA <i>et al</i> , 2002) (δ em ppm, J em Hz).	84
Tabela 8: Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e as correlações de HMBC da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A) comparados com a literatura (*MARINO, BORBONE, ZOLLO <i>et al</i> , 2004) (δ em ppm, J em Hz).....	91
Tabela 9: RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações de HMBC para a substância 8 (CDCl_3 , δ em ppm, J em Hz).	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

AcOEt – acetato de etila

ax - axial

CCDC - cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CD₃OD - metanol deuterado

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

CG-EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CH₂Cl₂ - diclorometano

CLC – cromatografia líquida em coluna

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

CLV – cromatografia líquida a vácuo

d - dubleto

dd - duplo dubleto

dquad – duplo quadrupletto

dquint – duplo quintupletto

DMSO - dimetilsulfóxido

DTE - ditioeritritol

eq - equatorial

EtOH - etanol

h - altura

Hex - hexano

HMBC - *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*

Hz - Hertz

J - constante de acoplamento

m - massa

m - multipletto

m/z - razão massa/carga

MeOH - metanol

MHz - Mega hertz

nm - nanômetro

pH - potencial hidrogeniônico

Rt – tempo de retenção

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1

s - singleto

t – tripleto

TMS – Tetrametilsilano

UV - Ultravioleta

Z-FR-MCA - Carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina

μL - microlitro

μm - micrometro

μM – micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

δ - Deslocamento químico em partes por milhão (ppm)

δ_H - Deslocamento químico de hidrogênio 1 em partes por milhão (ppm)

δ_C - Deslocamento químico de carbono 13 em partes por milhão (ppm)

ϕ - Diâmetro

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

K - Kelvin

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo químico das folhas da espécie *Pavonia multiflora*, visando o isolamento e a identificação de seus metabólitos secundários que possam ser direcionados à busca por atividade biológica. A espécie de estudo é endêmica do Estado do Espírito Santo, e é encontrada na região de Mata Atlântica. Essa espécie ainda não possui registros de estudos fitofarmacológicos na comunidade científica. Portanto, neste trabalho, as partições hexano e acetato de etila, provenientes do extrato etanólico das folhas de *P. multiflora*, foram submetidos a diversas metodologias cromatográficas, com objetivo no isolamento dos seus constituintes químicos. Tais métodos cromatográficos incluíram Cromatografia em Camada Delgada Comparativa, Cromatografia Líquida em Coluna, Cromatografia em Camada Delgada Preparativa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Líquida à Vácuo, as quais tiveram diversificadas fases estacionárias e eluentes. Através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, foram identificadas pela primeira vez nessa espécie, dez substâncias, sendo quatro compostos fenólicos: ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico e ácido ferúlico; cinco derivados terpênicos: loliolida, vomifoliol, 4,5 dihidroblumenol A, 3-oxo- α -ionol e o blumenol C; e um triterpenoide esterificado derivado do taraxerol, o *p*-metoxibenzoato de taraxerol, ainda não descrito na literatura. O extrato total das folhas foi ensaiado em diferentes concentrações como inibidor das catepsinas K, L e V, o qual apresentou atividade inibitória da catepsina K e V com concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras chave: *Pavonia multiflora*. Catepsinas. Fitoquímica. Produtos naturais.

ABSTRACT

This paper describes the chemical study of *Pavonia multiflora* leaves. The study targeted the isolation and identification of the species' secondary metabolites, which can be used to search for biological activity. *P. multiflora* is endemic of the state of Espírito Santo and is found in the Atlantic Forest region. This species has not yet been recorded in phytopharmacological studies in the scientific community. Therefore, in this work, the ethanolic extract, from the leaves of the *P. multiflora*, was partitioned to the partitions of hexane and of ethyl acetate. Such partitions were subjected to various chromatographic methodologies, including a thin layer chromatography, an in column liquid chromatography, preparative thin layer chromatography, vacuum liquid chromatography, and a high-performance liquid chromatography using diverse stationary phases and eluents, to isolate the chemical components. Using spectroscopic and spectrometric techniques, ten substances, including four phenolic compounds (*p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, vanillic acid and ferulic acid), five terpene derivatives (loliolide, vomifoliol, 4,5 dihydroblumenol A, 3-oxo- α -ionol and blumenol C), and an esterified derivative of triterpenoid taraxerol, taraxerol *p*-methoxybenzoate (novel compound), not previously described in this species. The total leaf extract was tested at different concentrations to determine if it is an inhibitor of cathepsins K, L and V, and these tests showed cathepsin K and V inhibitory properties at a concentration of 500 μ g/mL.

Keywords: *Pavonia multiflora*. Cathepsins. Phytochemistry. Natural products.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1.	Um breve histórico do uso dos produtos naturais pelo homem	18
1.2.	A importância dos produtos naturais na descoberta de fármacos	19
1.3.	Mata Atlântica - Biodiversidade como fonte de novos fármacos.....	21
1.4.	Família Malvaceae	22
1.5.	Gênero <i>Pavonia</i>	23
1.6.	Busca por atividade biológica da <i>P. multiflora</i>	25
1.6.1	Inibição das catepsinas	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivos gerais.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	28
3.1	Materiais e Equipamentos para ensaio químico.....	28
3.2	Materiais e Equipamentos para ensaio biológico	30
3.2.1	Ensaio de inibição enzimática (Catepsinas).....	30
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
4.1	Coleta e Identificação do material vegetal.....	31
4.2	Preparação dos Extratos.....	31
4.3	Metodologias cromatográficas	33
4.3.1	Metodologia geral	33
4.3.2	Metodologia para CLAE em modo analítico e semipreparativo	34
4.4	Fracionamento Cromatográfico.....	35
4.4.1	Fracionamento Cromatográfico do Extrato Acetato de Etila (W19A).....	35
4.4.2	Fracionamento Cromatográfico do Extrato Hexano (W19H).....	41
4.5	Metodologia para ensaio de inibição das Catepsinas	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Resultados do ensaio de inibição das Catepsinas	46
5.2	Resultados dos fracionamentos cromatográficos.....	48
5.2.1	Resultados do Extrato Acetato de Etila (W19A).....	48
5.2.2	Resultados do extrato Hexano (W19H).....	53
5.3	Determinação estrutural das substâncias isoladas	53

5.3.1	Presença de contaminantes	53
5.3.2	Compostos Fenólicos	56
5.3.2.1	Substância 1 (ácido vanílico).....	57
5.3.2.2	Substância 2 (ácido ferúlico).....	61
5.3.2.3	Substância 3 (ácido p-hidroxibenzoico).....	64
5.3.2.4	Substância 4 (ácido p-cumárico)	68
5.3.3	Derivados Terpenoides	72
5.3.3.1	Substância 5 (loliolida).....	75
5.3.3.2	Substância 6 (vomifoliol).....	80
5.3.3.3	Substância 7 (4,5-dihidroblumenol A).....	86
5.3.3.4	Substância 8 (p-metoxibenzoato de taraxerol).....	93
5.3.3.5	Substâncias 9 e 10 (3-oxo- α -ionol e blumenol C)	103
6	CONCLUSÃO	106
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

1.1. Um breve histórico do uso dos produtos naturais pelo homem

O contato do homem com a natureza ocorre desde o início de sua existência, e a relação dos povos com as plantas vai além da alimentação. Os vegetais são recursos de grande valor terapêutico, devido à sua diversidade e ao seu potencial em fornecer substâncias bioativas. Essas interações veem sendo estudadas pela Etnobotânica, ciência responsável pela pesquisa das relações entre humanos e plantas em toda sua complexidade, e é baseada na observação detalhada que uma sociedade faz de diversas espécies (SIMÕES, SCHENKEL, GOSMAN *et al.*, 2010).

Segundo evidências arqueológicas, o uso dos vegetais para obtenção de princípios ativos era amplo em culturas antigas. Nozes de bétel, semente de um fruto aromático que contém substâncias psicoativas e estimulantes, eram mascaradas há 13 mil anos no Timor em rituais religiosos. Registros descobertos no Equador apontam o uso das folhas de coca há cinco mil anos, como anestésico em casos de dor, frio e fome (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002).

Outros registros, de cerca de 2600 a.C., apontam o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia, enquanto que na medicina Egípcia, há cerca de 1500 a.C., existem registro da utilização de mais de 700 substâncias de origem vegetal (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002).

Entre 130-200 d.C., surge na Grécia, Galeno, farmacêutico e médico, cujas formulações medicamentosas eram preparadas por misturas de compostos e extratos, e esse conceito deu origem à farmácia galênica. Porém, foi entre os séculos V e XVII que o velho mundo expandiu seu conhecimento sobre plantas medicinais, pois passou a conhecer as ervas chinesas e indianas. Nessa mesma época, as grandes navegações tiveram como descoberta o continente das Américas, com seus povos (Incas, Maias e Astecas) e suas culturas, juntamente com sua flora e seu grande potencial terapêutico, que é até hoje indispensável à medicina (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002).

Nos séculos XVIII e XIX se iniciaram os processos de extração e purificação de substâncias a partir de vegetais. E somente no século XX que os métodos espectroscópicos foram introduzidos com objetivo de identificar estruturas de substâncias provenientes do metabolismo secundário de vegetais, de microrganismos, dentre outros, demonstrando uma diminuição significativa de tempo e de recursos necessários para extração (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002; CRAGG e NEWMAN, 2013).

1.2. A importância dos produtos naturais na descoberta de fármacos

O uso de plantas tem sido o único recurso terapêutico ao longo do tempo por uma grande parcela da população brasileira, e por mais de 2/3 da população do planeta. Além disso, o mercado mundial de fitoterápicos e fitofármacos movimentam bilhões de US\$ por ano (PINTO, SILVA, BOLZANI *et al.*, 2002).

Diversificadas publicações afirmam que os produtos naturais continuam, ainda nos dias atuais, a ter papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2012; HARVEY, 2008). Essa situação conta com os crescentes investimentos em pesquisas, aliado ao conhecimento dos povos na medicina tradicional, como é o caso dos indígenas, que dominam o conhecimento sobre a aplicação de cerca de 1300 espécies de plantas brasileiras em diferentes doenças, segundo dados do Ministério da Saúde (FUNARI e FERRO, 2005).

Um exemplo bem sucedido da utilização dos produtos naturais foi a descoberta da morfina (figura 1), um alcaloide isolado da *Papaver somniferum* L., utilizado há centenas de anos como anestésico potente. Outro exemplo trata-se do alcaloide quinolínico, a quinina (figura 1), isolada de *Cinchona ledgeriana* Moens, utilizada como antimalárico e como febrífugo, logo após a colonização espanhola da América do Sul (BARREIRO e BOLZANI, 2009; BARREIRO, 1990).

Newman e Cragg (2012) destacam a importância da continuidade das pesquisas em produtos naturais na busca de novos fármacos, já que mais de 50% dos novos agentes terapêuticos lançados entre 1981 e 2010 envolvem esses produtos. Essa busca se faz necessária para a descoberta de princípios bioativos

inovadores, principalmente no controle de infecções bacterianas e fúngicas, câncer e outras doenças, já que os vegetais continuam sendo uma importante fonte de novos compostos para a terapêutica de diversas patologias (CLARDY e WALSH, 2004; NEWMAN e CRAGG, 2012). Exemplos disso são o taxol (figura 1), obtido da *Taxus brevifolia*, utilizado no tratamento do câncer, e a hipericina (figura 1), isolada do extrato do *Hypericum perforatum* e utilizada como antidepressivo (VIEGAS, BOLZZANI e BARREIRO, 2006).

Entretanto, várias outras moléculas já foram isoladas de plantas e modificadas por semissínteses para serem utilizadas em tratamentos de doenças, como derivados de artemisina (figura 1), para o tratamento de malária, e camptotecina (figura 1), que deu origem a vários fármacos com aplicação na oncologia (BARREIRO e BOLZANI, 2009).

Essas e tantas outras moléculas são originadas do metabolismo secundário das plantas, que funciona produzindo substâncias que dão suporte à sua sobrevivência. Esses metabólitos têm distribuição limitada na natureza, e sua expressão é individualizada em cada espécie. Portanto, é esse metabolismo que fornece vários produtos naturais farmacologicamente ativos (DEWICK, 2002).

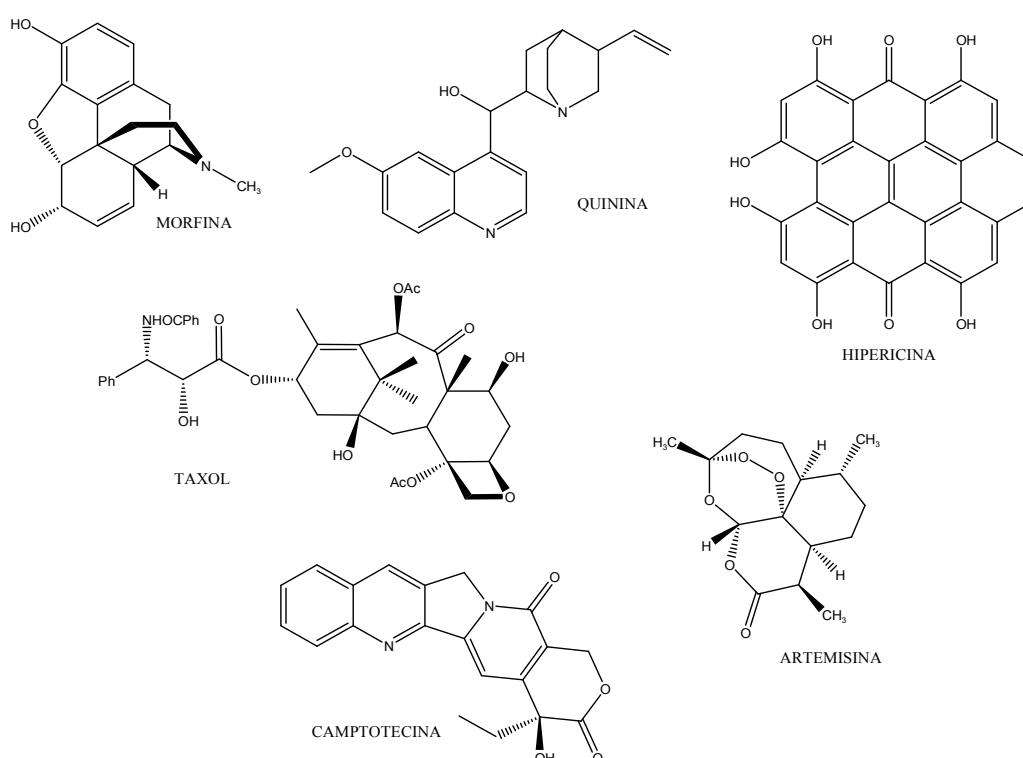


Figura 1: Substâncias com atividade biológica de origem vegetal.

Todo o processo de obtenção do produto natural, que envolve desde a coleta da planta até o isolamento e identificação dos compostos, e aplicação dos ensaios de atividade biológica, é dispendioso e requer tempo. Por isso, os avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas na busca de moléculas bioativas, como os métodos espectrométricos, e principalmente pela química computacional, aplicável no planejamento racional de novos fármacos (BARREIRO, 2002).

Diante disso, o interesse na pesquisa dos produtos naturais continua crescente, uma vez que se trata de muitos recursos naturais ainda não explorados e com grande potencial, que vão além da terapêutica contra o câncer e infecções, abrangendo doenças cardiovasculares, neurológicas, hormonais e metabólicas, como diabetes, dentre outras (HARVEY, 2008).

1.3. Mata Atlântica - Biodiversidade como fonte de novos fármacos

O Brasil possui cerca de 20% de toda biodiversidade mundial, sendo considerado o país com maior número de espécies endêmicas do planeta. Portanto, este é um país com grande riqueza natural e fonte de substâncias com possíveis potenciais bioativos, sendo esse um dos principais motivos para sua preservação e investigação, para descoberta de novos fármacos (MYERS, MITTERMEIER, da FONSECA *et al.*, 2000; RIBEIRO, METZGER, MARTENSEN *et al.*, 2009).

A Mata Atlântica é um dos mais importantes biomas das Américas, com mais de 20 mil espécies de plantas, que inclui cerca de 8% das espécies de toda fauna e flora do planeta. Originalmente, este bioma ocupava 1.290.000 km² do território brasileiro. Os impactos de diferentes ciclos de exploração e a concentração das maiores cidades e núcleos industriais fizeram com que a vegetação natural fosse reduzida drasticamente. A devastação foi maior nas áreas planas da região costeira e na estreita faixa litorânea do Nordeste (Conservation International, 2014).

Segundo RIBEIRO *et al* (2009), cerca de 9% da floresta remanescente está em áreas de reservas naturais, sendo apenas 1% de floresta original, que encontram-se separadas em pequenas áreas, ou ligadas por corredores biológicos

formados por matas secundárias (RIBEIRO, METZGER, MARTENSEN *et al.*, 2009).

Os registros mostram que a Mata Atlântica possui cerca de oito mil espécies endêmicas de plantas, e é considerada um dos *Hotspots* mundiais. Esse termo foi introduzido por MYERS *et al* (2000) como áreas de elevada taxa de endemismo e com grande perda de sua vegetação primária. Para tanto, um bioma recebe essa qualificação quando possui pelo menos 1500 espécies de plantas endêmicas, de um total de 300 mil espécies de plantas do planeta, além de ter perdido mais de 70% de sua área original de vegetação (MYERS, MITTERMEIER, da FONSECA *et al.*, 2000; Conservation International, 2014).

Apesar de já existirem grupos de pesquisa que desenvolvem trabalhos na área de Química de Produtos Naturais de plantas provenientes deste bioma, a quantidade de exemplares estudados em relação ao número de espécies existentes é insignificante. Uma das possibilidades em se estudar estes vegetais é a descoberta de novas moléculas que possam ter diversos efeitos biológicos podendo levar a descoberta de novos produtos com valor agregado. (BARREIRO e BOLZANI, 2009; FUNARI e FERRO, 2005).

A biodiversidade brasileira é considerada um instrumento importante na descoberta de novas fontes de substâncias biologicamente ativas, já que os produtos naturais continuarão a ter aplicações em novos produtos farmacêuticos, medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos, como os bioherbicidas. Dessa forma, a preservação dessas áreas é fundamental tanto pela riqueza biológica quanto pelo seu enorme potencial como fonte de possíveis novos fármacos (BARREIRO e BOLZANI, 2009; FUNARI e FERRO, 2005).

1.4. Família Malvaceae

A família Malvaceae é predominantemente tropical e possui cerca de 250 gêneros e mais de 4200 espécies (FRYXELL, 1999), com importâncias econômicas variadas. Pode-se citar que das sementes de espécies de *Gossypium* L. obtêm-se fibras de algodão, e espécies de *Ceiba* Mill. fornecem madeira para carpintaria. Na alimentação destacam-se *Abelmoschus esculentus*, *Theobroma cacao* e *Theobroma*

grandiflorum, conhecidos como quiabo, cacau e cupuaçu, respectivamente, sendo os dois últimos de grande valor nutricional e com elevada importância comercial (SABA, 2007).

Apesar de ser uma família extensa, os registros sobre a utilização de suas espécies na medicina popular ainda são restritos. Os extratos de diferentes espécies das Malvaceae têm mostrado algum tipo de atividade biológica. Pode-se citar que nas áreas costeiras da Índia, o extrato das flores do *Abelmoschus manihot* é usado no tratamento da bronquite crônica e em dores de dentes, já os extratos das folhas e raízes mostram-se efetivas na cicatrização de feridas (PRITAM e SANJAY, 2011). O extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* tem apresentado atividade anti-hipertensiva, através do relaxamento da musculatura lisa (ALI, WABEL e BLUNDEN, 2005; ALONSO, ZAMILPA, AGUILAR *et al.*, 2012). O extrato etanólico da *Sida rhombifolia* L. tem apresentado atividade vasorrelaxante (CHAVES, GOMES, TOMAZ *et al.*, 2013), além de citotoxicidade fraca (PIEME, PENLAP, NGOGANG *et al.*, 2010).

Outras espécies da família Malvaceae são conhecidas por seus diferentes usos na medicina popular como diurético, em tratamento de reumatismo, distúrbios gastrointestinais e asma. Seus usos como anti-inflamatórios e antinociceptivos têm sido investigados (COSTA, SILVA, CAVALCANTI *et al.*, 2007).

A família Malvaceae possui uma grande variedade de metabólitos secundários já descritos, tais como compostos fenólicos (LEAL, 2008), betainas (BLUDEN, PATEL, ARMSTRONG *et al.*, 2001), especialmente as glicilbetainas (GORHAM, 1996), alcaloides (GHOSAL, CHAUHAN e MEHIA, 1975), terpenoides (SILVA, SILVA, LINS *et al.*, 2006), fitoesteróis (TODARWAL, JAIN e BARI, 2011), e flavonoides (SILVA, COSTA, SILVA *et al.*, 2005).

1.5. Gênero *Pavonia*

O gênero *Pavonia* Cav. possui 224 espécies nas Américas e é um dos maiores gêneros da família Malvaceae (FRYXELL, 1999). No Brasil, ocorre principalmente entre as regiões Nordeste e Sudeste, apresentando-se como ervas, arbustos e raramente árvores de pequeno porte. A maioria de suas espécies ocorre

em áreas com matos, bordas de florestas, campos rochosos e áreas modificadas, tais como estradas e áreas de cultivo abandonadas (GRINGS, KRAPOVICKAS e BOLDRINI, 2011).

Segundo registros encontrados na Lista de Espécies da Flora do Brasil do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, a espécie *P. multiflora* é endêmica do Espírito Santo (Flora do Brasil JBRJ, 2014).

Para a maioria das espécies do gênero *Pavonia* são encontrados estudos botânicos e agrônômicos. Algumas espécies apresentam estudos de atividade biológica, como a *P. alnifolia*, cujo extrato hidroalcoólico apresentou efeito hipotensivo dose-dependente (ANDRADE, EWALD, FREITAS *et al.*, 2012), o extrato metanólico de *P. odorata* apresentou propriedade citotóxica e ação antioxidante (SELVAN, KAKOTI, GOMATHI *et al.*, 2007), e o extrato acetônico de *P. zeylanica* evidenciou atividade larvicida (VAHITHA, VENKATACHALAM, MURUGAN *et al.*, 2002).

Sobre estudos químicos, para a espécie *P. distinguenda*, já foram isolados flavonoides e identificados triterpenoides, enquanto que para a *P. varians* já foram detectados alcaloides, taninos, catequinas e saponinas (LEAL, 2008). Portanto, estudos fitoquímicos, aliados a estudos farmacológicos, e testes de atividade biológica para o gênero ainda são escassos na literatura científica (LEAL, 2008).

O estudo fitoquímico de uma espécie endêmica possui como ponto favorável a possibilidade de se extrair e isolar novos constituintes químicos, ou substâncias com atividade biológica, que possam ser usadas como potenciais terapêuticos. Quando não se dispõe de estudos químicos preliminares sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode indicar grupos de metabólitos secundários relevantes e servir como estudo de bioprospecção (SIMÕES, SCHENKEL, GOSMAN *et al.*, 2010). A *P. multiflora* se enquadra nesse caso, pois é uma espécie endêmica e sem estudos fitoquímicos preliminares.

1.6. Busca por atividade biológica da *P. multiflora*

O estudo químico de produtos de origem natural é acompanhado da avaliação de sua atividade biológica frequentemente.

Este estudo integra a rede de pesquisa SISBIOTA (Proc. CNPQ n° 563286/2010-5), composta por grupos de pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (*Campus* Goiabeiras), Universidade Federal de São Carlos (*Campus* São Carlos), Universidade Federal de Goiás (Regional Catalão) e Universidade Federal de São Paulo (*Campus* Diadema), a qual propõe a prospecção química e biológica de plantas pertencentes ao Cerrado e à Mata Atlântica, com o objetivo de fornecer dados que estimulem a preservação desses biomas, juntamente com a descoberta de novos compostos bioativos.

A avaliação de atividade biológica de um produto natural é realizada por testes que procuram demonstrar a ação e a eficiência de uma substância, ou grupo de compostos, num determinado mecanismo biológico. Dessa forma, buscou-se nesse estudo a avaliação do extrato de *P. multiflora* frente à inibição de catepsinas, atividade a qual está associada ao projeto SISBIOTA.

1.6.1 Inibição das catepsinas

As enzimas são macromoléculas que exercem diversas funções, as quais incluem catálise de reações biológicas fundamentais no organismo, transporte de substâncias, defesa e regulação (NELSON e COX, 2004).

Essas moléculas são cadeias polipeptídicas longas, formadas por centenas de aminoácidos unidos pelas ligações peptídicas. Tais estruturas podem ser simples, quando formadas apenas por aminoácidos, ou conjugadas, quando apresentam um cofator, que pode ser um íon metálico ou um grupo orgânico (ex: vitamina, lipídio, glicídio). Elas se diferenciam quanto ao tamanho, forma, afinidade de ligação, e carga elétrica. Porém, a diferença em relação à sua atividade ocorre principalmente devido à sua constituição, ou seja, a sequência de aminoácidos, que lhe confere forma (BARRETO e FRAGA, 2008). Assim, por serem responsáveis por

atividades altamente específicas, elas são alvos terapêuticos muito atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos (MARQUES, 2011; SEVERINO, 2008).

As catepsinas são cisteíno-peptidases, uma classe de enzimas envolvidas no processo de degradação de proteínas nos lisossomos, ou em outras organelas, de forma fisiológica, e atuam também em diversos processos patológicos, como osteoporose e câncer. Nos mamíferos, todas as cisteíno peptidases são conhecidas como catepsinas, porém o contrário não é verdadeiro (PALERMO e JOYCE, 2007). Essas enzimas estão classificadas em aspartil endopeptidases (catepsinas D e E), serino peptidases (A e G) e cisteíno peptidases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, e X) (TURK e GUNCAR, 2003; MARQUES, 2011), sendo que as catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X são catalogadas como presentes em humanos, em um total de 11 enzimas. Diferentes funções fisiológicas foram relatadas para as mesmas e, por estarem também associadas aos diversos processos patológicos, despertaram o interesse de indústrias farmacêuticas na busca de possíveis inibidores (KUESTER, LIPPERT, ROESSNER *et al.*, 2008).

Dentre as enzimas estudadas neste trabalho, a catepsina K está presente de forma predominante nos osteoclastos e, portanto, associada à reabsorção óssea e ao desenvolvimento de osteoporose. Por sua vez, a catepsina L, relatada nos mais variados tipos celulares, relaciona-se com artrite e progressão de tumores, enquanto que a catepsina V, fisiologicamente associada ao complexo de histocompatibilidade maior de classe II (MHC II) e seleção de linfócitos T, é considerada como marcadora de diagnóstico de tumores de cólon; estando também associada à doenças cardiovasculares e inflamações, e carcinomas em geral (MARQUES, 2011, LETO, SEPPORTA, CRESCIMANNO *et al.*, 2010, LANKELMA, VOOREND, BARWARI *et al.*, 2010, YASUDA, GREENBAUM, BOGBO *et al.*, 2004).

A inibição seletiva dessas enzimas pode ajudar no desenvolvimento de novos medicamentos envolvidos em diversas doenças. Por isso, este estudo busca o teste de inibição das catepsinas K, L e V como forma de verificar se o extrato de *P. multiflora* é capaz de apresentar-se ativo, inibindo essas enzimas em caso de processo patológico, assim como suas partições e substâncias isoladas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo o estudo fitoquímico do extrato das folhas da *Pavonia multiflora*, e avaliação da atividade biológica frente às catepsinas K, L e V.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e elucidar as estruturas químicas dos metabólitos secundários presentes no extrato das folhas da *P. multiflora*.
- Avaliar a atividade biológica do extrato e frações frente aos testes de inibição das catepsinas.

3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

3.1 Materiais e Equipamentos para ensaio químico

- A secagem do material vegetal foi realizada em estufa artesanal no setor de Botânica, Departamento de Biologia - UFES.
- A moagem do material seco foi feita em liquidificador Arno.
- O evaporador rotatório utilizado na concentração do extrato foi um Fisatom 801, acoplado a bomba de vácuo Buchi V-700.
- Os solventes utilizados na preparação do extrato e das partições, assim como nas separações por CLC, CLV, CCDP e CCDC foram etanol, hexano, acetato de etila, metanol e diclorometano, de marcas comerciais Synthlab e Merck. Para a CLAE foram utilizados metanol, isopropanol, acetonitrila, hexano e acetato de etila da marca Panreac, e água mili-Q, ultrapurificada pelo sistema Purelab Ultra MK2 da marca Elga. Para os experimentos de RMN, foram utilizados solventes CDCl_3 e CD_3OD da Sigma Aldrich.
- Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): placas de sílica gel 60 G Merck, observadas sob a radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm em câmara de UV da Camag, e reveladas com solução ácida de vanilina 1% em ácido acético.
- Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP): placas de vidro recobertas com suspensão de sílica gel 60 G Merck.
- Cromatografia Líquida em Coluna (CLC): fases estacionárias sílica gel 60 G Merck, Florisil® Tedia Brazil e Sephadex® LH-20 Sigma-Aldrich.
- Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV): kitassato acoplado à bomba de vácuo Buchi V-700, e funil de placa sinterizada com capacidade de 1L, com sílica gel 60 G Merck e Florisil® Tedia Brazil, como fase estacionária.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): equipamento Agilent de bomba quaternária modelo G1311C-1260 e acoplado a detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD) modelo G1315D-1260.
 - Sistema analítico de fase reversa: coluna Phenomenex C-18 (5 μm , 4,8 x 250 mm); vazão de 1 mL/min, com fase móvel formada por

mistura de H₂O e MeOH em eluição gradiente (iniciando em 90:10, alcançando 100% de MeOH aos 40 minutos, e retornando a proporção 90:10 aos 46 minutos, e mantendo-se até 50 minutos de eluição).

▪ Sistema analítico de fase normal: coluna Zorbax RX-SIL (5 µm, 4,6 x 250 mm); vazão de 1 mL/min, com fase móvel formada por mistura de Hex e AcOEt em eluição gradiente (iniciando em 100% de Hex, alcançando 100% de AcOEt aos 45 minutos, e retornando a 100% de Hex aos 46 minutos, e mantendo-se até 50 minutos de eluição).

▪ Sistema semipreparativo de fase reversa: coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 µm, 9,4 x 250 mm); sob as mesmas condições de eluição gradiente do sistema analítico de fase reversa, porém com vazão alterado para 3 e 4 mL/min.

▪ Sistema semipreparativo de fase normal: coluna Zorbax RX-SIL (5 µm, 9,4 x 250 mm); sob as mesmas condições de eluição gradiente do sistema analítico de fase normal, porém com vazão alterado para 3 mL/min.

- Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN): equipamento Varian 400 MHz, com sonda 5 mm ATB BroaBand ¹H/¹⁹F/X, e com TMS como padrão de referência.
- Espectrometria de Massa (EM): equipamento Esquire 3000 Plus sob infusão direta de amostra solubilizadas em MeOH:H₂O (9:1).
- Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM): cromatógrafo CG-17A Shimadzu, modelo GC-EM QP5000, equipado com coluna apolar DB-1 (30 m x 0,25 mm), filme = 0,25 µm, ionização via impacto de elétrons (IE) (70 eV). Condições operacionais de análises: pressão interna da coluna de 100 kPa (4 min.); fluxo de gás na coluna de 1,5 mL/min. com gás Hélio; temperatura no injetor: 250 °C; temperatura no detector: 280 °C; Modo split, volume de injeção de 1 µL; programação da coluna: 150 °C (2 min.), 10 °C/min. até 280 °C (10 min.), 5 °C/min. até 300 °C (5 min.), totalizando 34 min. de tempo de eluição.
- Cristalografia por difração de Raios-X: difratômetro Enraf-Nonius CAD-4 empregando monocromador de grafite a 150 K, e operando no modo de

varredura φ - ω $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ em 40 KV e 20mA). A estrutura foi elucidada utilizando o pacote de programas WingX, que utiliza o SHELX-97.

3.2 Materiais e Equipamentos para ensaio biológico

3.2.1 Ensaio de inibição enzimática (Catepsinas)

- Catepsinas K, L e V recombinantes humanas expressas em *Pichia pastoris* e cedidas pelo Prof. Dr. Marcio Fernando Madureira Alves, da Universidade Federal de São Paulo. Essas enzimas foram estocadas em soluções contendo 0,01% de Tween 20 (v/v);
- DTE (Sigma Aldrich);
- Substrato fluorogênico Z-FR-MCA (carbобензоxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina) das empresas Bachem Inc e Sigma;
- Inibidor irreversível específico de cisteíno peptidase E-64;
- Acetato de sódio trihidratado (J.T. Baker);
- EDTA (J.T. Baker);
- Espectrofluorímetro: com leitor de placa com 96 poços, Corporation – Spectra, modelo MAX GEMINI XS. DQ-UFSCar.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

No dia 08 de junho de 2012 foram coletados dois quilogramas de folhas frescas de *P. multiflora* (figura 2) na Reserva Biológica de Duas Bocas, município de Cariacica, localizada na região da Grande Vitória-ES (sob as coordenadas 20°16.353'S e 40°28.820'W). Dois galhos da planta contendo flores foram retirados como amostra para a preparação de exsicata, que se encontra depositada no Herbário VIES da UFES, com o registro de número 26625.

A identificação da espécie foi realizada pelo setor de botânica da UFES, supervisionada pela Prof^a. Dr^a. Luciana Diaz Thomas e pelo biólogo Weverson Cavalcante Cardoso, como *P. multiflora* A. St-Hil. (Malvaceae).

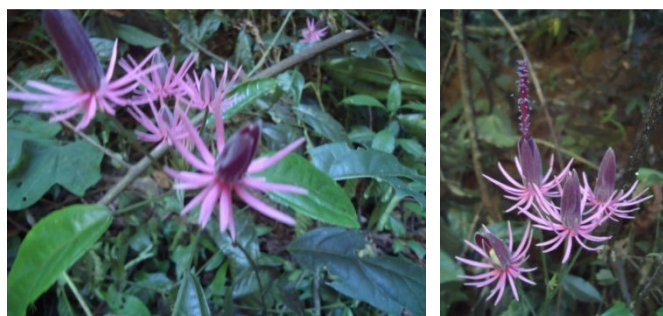


Figura 2: *P. multiflora* coletada na Reserva Biológica de Duas Bocas / E.S.

4.2 Preparação dos Extratos

As folhas coletadas foram secas em estufa de madeira, aquecidas por lâmpadas incandescentes, em aproximadamente 40°C, durante 10 dias, no setor de Botânica, Departamento de Biologia-UFES, fornecendo um total de 486 gramas de material vegetal seco.

A moagem das folhas secas foi realizada em liquidificador, e todo o material foi submetido à maceração com EtOH 96% por 72 horas. O material foi filtrado em

papel de filtro, e o material vegetal foi submetido novamente a maceração com EtOH por 72 horas. Esse procedimento foi repetido por mais uma vez, totalizando três macerações com EtOH, e em seguida fez-se a maceração por mais 72 horas com AcOEt. Todos esses filtrados foram reunidos, gerando o extrato total, que foi concentrado com auxílio de evaporador rotatório. Em seguida, esse extrato concentrado foi transferido para um frasco, e foi mantido em capela de exaustão por dez dias, em temperatura ambiente. A figura 3 ilustra o processo de preparação do extrato total das folhas da *P. multiflora*.

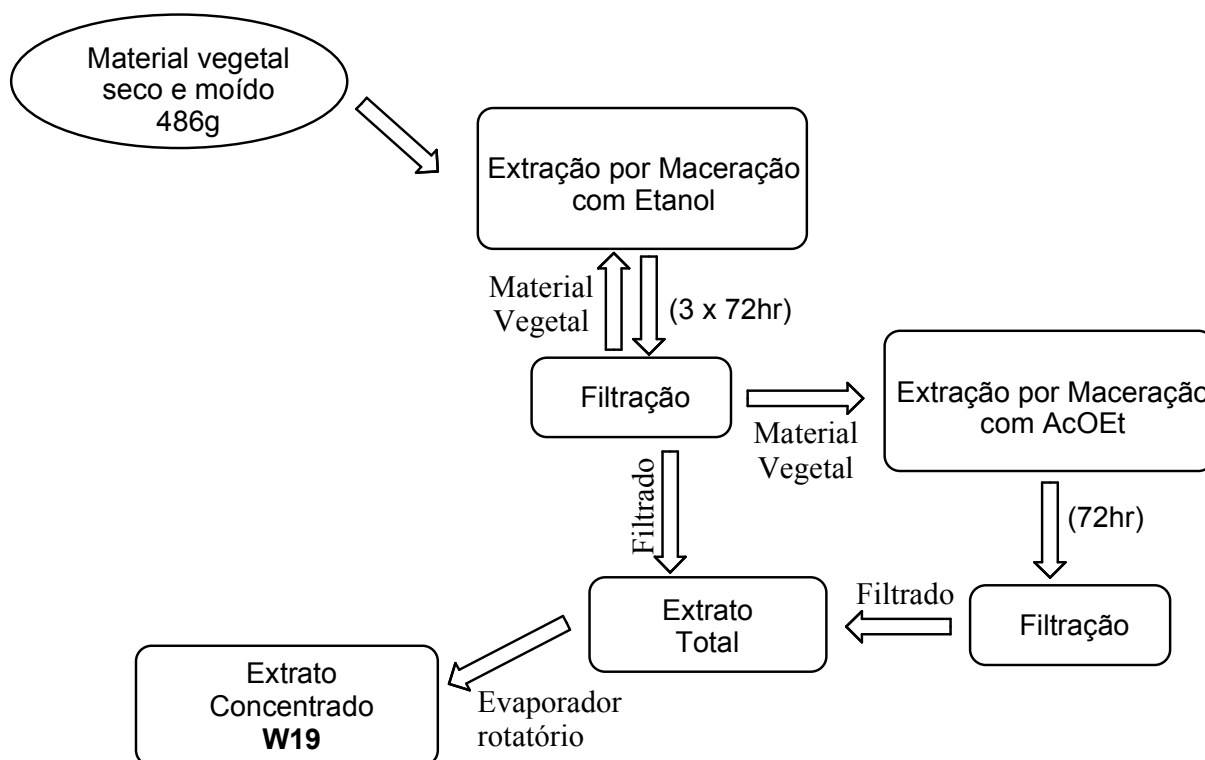


Figura 3: Esquema da preparação do extrato W19.

Em seguida o extrato concentrado foi ressuspensionado em 300 mL de MeOH:H₂O 1:3 v/v. Com essa ressuspensão foram realizadas partições líquido-líquido, utilizando 600 mL de hexano, e posteriormente 600 mL de acetato de etila, que originaram três extratos: Hexano (W19H), Acetato de Etila (W19A) e Hidroalcoólico (W19HA). A figura 4 ilustra o procedimento de partição descrito.

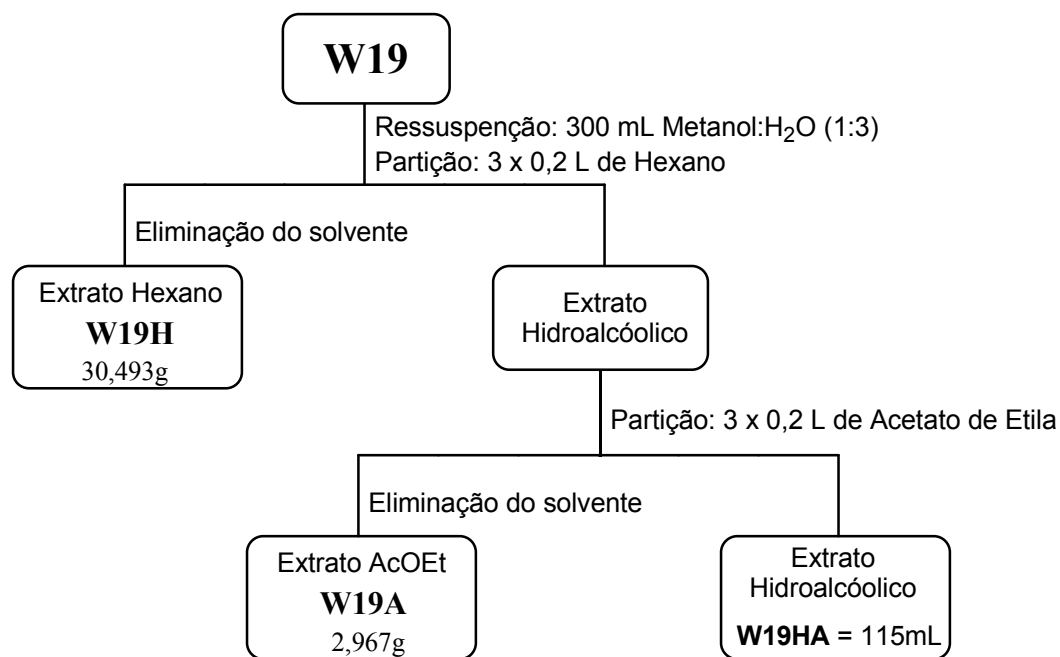


Figura 4: Esquema da partição líquido-líquido.

4.3 Metodologias cromatográficas

4.3.1 Metodologia geral

As comparações entre os constituintes químicos de cada amostra foram realizadas utilizando Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), que foram observadas sob luz UV 254 e 365 nm, e tratadas com vapores de iodo ou com solução ácida de vanilina 1% e posteriormente aquecidas.

A definição da composição de cada amostras foi estabelecida através da observação dos fatores de retenção (R_f) de cada um dos diferentes constituintes químicos, que direcionou cada amostra aos procedimentos cromatográficos posteriores, tais como CLC, CCDP e CLAE.

A Cromatografia Líquida em Coluna (CLC) foi realizada utilizando-se diferentes diâmetros de colunas, fases estacionárias de sílica gel ou Sephadex LH-20, e variadas fases móveis, escolhidas de acordo com a quantidade e características de cada amostra, tais como solubilidade e polaridade na CCDC.

A Cromatografia Líquida a Vácuo (CLV) foi realizada utilizando-se um funil de placa sinterizada com capacidade para 1000 mL acoplado ao Kitassato de 2 L, que encontrava-se conectado à bomba de vácuo. O recheio utilizado no funil foi sílica gel ($\phi = 11$ cm, $h = 8$ cm) e uma camada de 1 cm de Florisil[®]. Utilizou-se fase móvel de Hex:AcOEt em gradiente, partindo de 500 mL de Hexano 100%. A quantidade de acetato de etila adicionada foi aumentada em 10% a cada 500 mL de fase móvel, até atingir 100% de AcOEt, totalizando 11 fases móveis.

4.3.2 Metodologia para CLAE em modo analítico e semipreparativo

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizada na determinação dos perfis cromatográficos das amostras, com o objetivo de determinar suas composições. Para isso, foi aplicado o método analítico com a coluna C-18 Phenomenex (5 μ m, 4,5 x 250 mm) e vazão de 1 mL/min. As amostras foram previamente diluídas em MeOH e injetadas no equipamento em volumes de 20 μ L. A eluição foi realizada em modo gradiente utilizando água mili-Q (tipo 1) e MeOH. O método analítico teve sua eluição em gradiente, iniciando-se com uma mistura de H₂O:MeOH 9:1. Após 40 minutos foi alcançado 100% de metanol, e aos 46 minutos a eluição voltou para o eluente H₂O:MeOH 9:1, até o final da eluição, aos 50 minutos.

Para o método analítico em coluna de fase normal, foi utilizada a coluna Zorbax RX-SIL (5 μ m, 4,6 x 250 mm) e vazão de 1 mL/min. As amostras foram previamente diluídas em hexano e injetadas no equipamento em volumes de 20 μ L. A eluição foi realizada em modo gradiente, iniciando-se em 100% de Hexano e alcançando 100% de acetato de etila aos 45 minutos e mantendo essa porcentagem até 46 minutos. Aos 47 minutos foi reestabelecido os 100% de hexano, que foi mantido até os 50 minutos de eluição.

As separações de substâncias pelo método semipreparativo seguiu o mesmo gradiente de eluição dos métodos analíticos, utilizando-se coluna Zorbax Eclipse XDB C-18 (5 μ m, 9,4 x 250 mm) e vazão de 3 ou 4 mL/min para o método

semipreparativo de fase reversa, e coluna Zorbax RX-SIL (5 μ m, 9,4 x 250 mm) com vazão de 3mL/min para o método semipreparativo de fase normal.

4.4 Fracionamento Cromatográfico

4.4.1 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Acetato de Etila (W19A)

O extrato acetato de etila W19A (m = 2,967g) foi submetido à CLC com sílica gel (ϕ = 5,5 cm, h = 30 cm) e fase móvel de CH₂Cl₂:MeOH em eluição gradiente (9:1 = 3,5 L; 7:3 = 1 L; 1:1 = 0,5 L) e MeOH = 2 L. Foram obtidas oito frações (W19A 1 a 8).

Cada uma das oito frações foi submetida à CLAE método analítico em coluna C-18 para determinação do seu perfil cromatográfico, e em seguida foram submetidas à CLC com sílica gel ou Sephadex LH-20, utilizando-se como eluentes diferentes concentrações de Hex:AcOEt e AcOEt:MeOH, ou MeOH, respectivamente. Tanto a fase estacionária quanto a fase móvel para cada cromatografia foram escolhidas de acordo com as características das amostras, tais como solubilidade na fase móvel e análise do R_f de suas CCDC. A figura 5 representa o esquema da realização das cromatografias e obtenção das amostras a partir do extrato W19A.

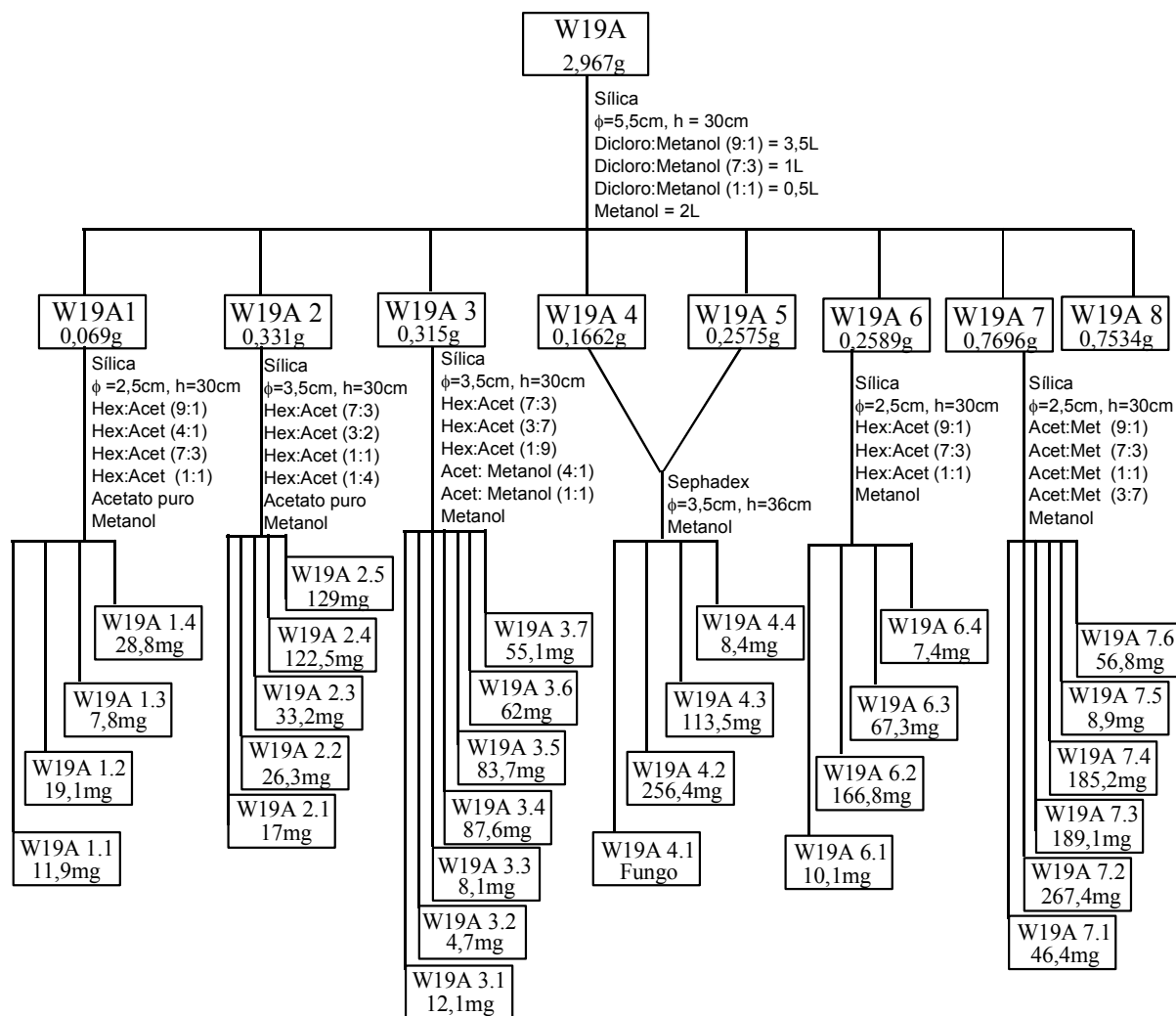


Figura 5: Fracionamento cromatográfico do extrato W19A.

- W19A 1:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase reversa. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 2,5$ cm, $h = 30$ cm) ($m = 69$ mg) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (9:1 = 0,3 L; 4:1 = 0,7 L; 7:3 = 0,3 L; 1:1 = 0,3 L), AcOEt = 0,2 L e MeOH = 0,2 L. Foram obtidas quatro frações (W19A 1.1 a 1.4), as quais foram submetidas à CLAE analítica em fase reversa. Em seguida, as frações W19A 1.3 ($m = 7,8$ mg) e W19A 1.4 ($m = 28,8$ mg) foram submetidas à CLAE semipreparativa de fase reversa, e as amostras coletadas foram encaminhadas para análise por RMN de ^1H .
- W19A 2:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase reversa. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 3,5$ cm, $h = 30$ cm) ($m = 331$ mg) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (7:3 = 1 L; 3:2 = 0,5 L; 1:1 = 0,5 L; 1:4 = 0,5 L), AcOEt = 0,5 L e MeOH = 0,5 L. Foram obtidas cinco subfrações (W19A 2.1 a 2.5),

que foram submetidas à CLAE analítica de fase reversa. As subfrações W19A 2.2 (m = 26,3 mg) e W19A 2.3 (m = 33,2 mg) foram submetidas à CLAE semipreparativa de fase reversa, enquanto W19A 2.4 (m = 122,5 mg) e W19A 2.5 (m = 129 mg) foram conduzidas à CLC em Sephadex LH-20 (ϕ = 3,5 cm, h = 35 cm) e MeOH como fase móvel em eluição isocrática. As amostras coletadas, que apresentavam massa acima de 1 mg e apenas uma mancha em suas CCDC, foram encaminhadas para análise por RMN de ^1H .

- A subfração W19A 2.3 (m = 33,2 mg) foi conduzida à CLAE semipreparativa de fase reversa, e isolou-se uma substância de coloração castanho-amarelada, que foi conduzida à análise por RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC, sendo denominada substância **1** (m = 2,4 mg) (figura 6).
- A subfração W19A 2.4 (m = 122,5 mg) foi conduzida a CLC em Sephadex LH-20 (ϕ = 3,5 cm, h = 35 cm) e MeOH como fase móvel em eluição isocrática. Foram obtidas oito subfrações (W19A 2.4.1 a 2.4.8), e todas foram submetidas à CLAE analítica de fase reversa. A subfração W19A 2.4.4 (m = 56,5 mg) foi conduzida a CLC em Sephadex LH-20 (ϕ = 1,5 cm, h = 37 cm) e MeOH como fase móvel em eluição isocrática, pela qual isolou-se um sólido amarelado, na subfração W19A 2.4.4 (30-35), que foi encaminhado à análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e EM, sendo denominada substância **5** (m = 33 mg) (figura 6). Um sólido branco foi isolado da subfração W19A 2.4.4 (19-24) e encaminhado para CG-EM, sendo denominadas substâncias **9** e **10** (m = 2 mg) (figura 6). As subfrações W19A 2.4.3 (m = 16,8 mg), W19A 2.4.5 (m = 7,5 mg) e W19A 2.4.6 (m = 4,2 mg) foram conduzidas à CLAE semipreparativa em fase reversa. A subfração W19 2.4.7 (m = 9,5 mg) foi conduzida à CLAE semipreparativa de fase reversa, de onde isolou-se um sólido branco que foi conduzido à análise por RMN de ^1H , sendo denominada substância **2** (m = 2,3 mg) (figura 6).

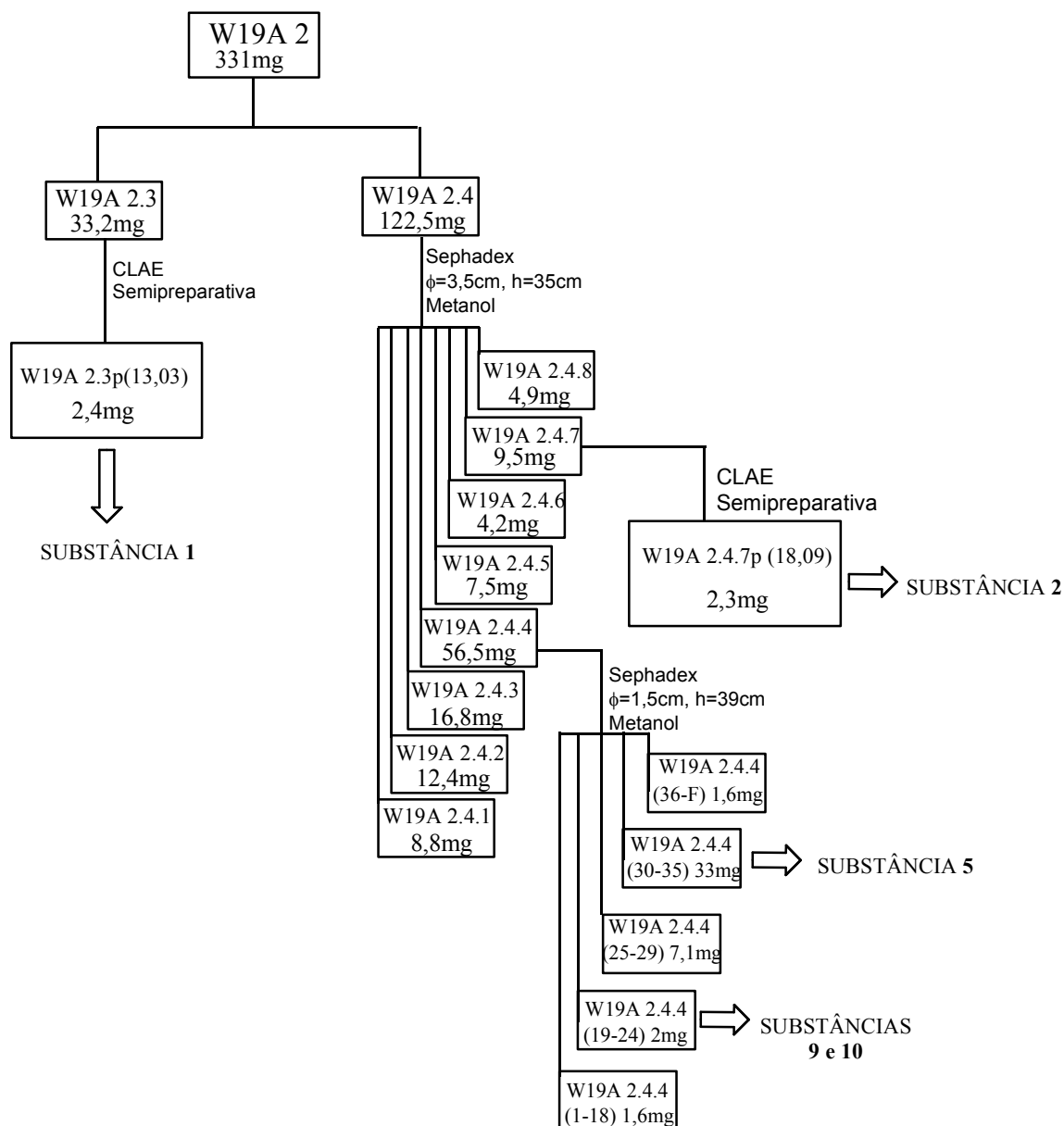


Figura 6: Fracionamento cromatográfico da fração W19A 2.

- W19A 3:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 3,5$ cm, $h = 30$ cm) ($m = 315$ mg) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (7:3 = 0,3 L; 1:1 = 0,5 L; 3:7 = 0,5 L; 1:9 = 0,2 L), AcOEt:MeOH (9,5:0,5 = 0,5 L; 4:1 = 0,2 L; 1:1 = 0,3 L) e MeOH = 0,5 L. Foram obtidas sete subfrações (W19A 3.1 a 3.7), que foram submetidas à CLAE analítica em fase reversa. As subfrações W19A 3.1 ($m = 12,1$ mg), W19A 3.2 ($m = 4,7$ mg) e W19A 3.3 ($m = 8,1$ mg) foram submetidas à CLAE semipreparativa em fase reversa. As

subfrações W19A 3.4 (m = 87,6 mg) e W19A 3.6 (m = 62 mg) foram conduzidas à CLC. A subfração W19A 3.5 (m = 83,7 mg) foi submetida à CCDP.

- A subfração W19A 3.3 (m = 8,1 mg) foi conduzida à CLAE semipreparativa de fase reversa, onde foi isolado um sólido branco, que foi conduzido à análise por RMN de ^1H , sendo denominada substância **3** (m = 2,2 mg) (figura 7).
- A subfração W19A 3.4 (m = 87,6 mg) foi conduzida a uma CLC em Sephadex LH-20 (ϕ = 3,5 cm, h = 36 cm) e MeOH como fase móvel em eluição isocrática. As oito subfrações obtidas (W19A 3.4.1 a 3.4.8) foram submetidas à CLAE analítica em fase reversa. A subfração W19A 3.4.6 (m = 37,6 mg) foi conduzida a CLC em Sephadex LH-20 (ϕ = 1,5 cm, h = 37 cm) e MeOH como fase móvel em eluição isocrática. A amostra W19A 3.4.6.20 foi conduzida à CLAE semipreparativa de fase reversa, pela qual foram isoladas duas amostras de sólidos branco-amarelados. Esses sólidos foram conduzidos à análise por RMN de ^1H , sendo denominadas substância **3** (m = 5,1 mg) e substância **4** (m = 3,3 mg) (figura 7).
- A subfração W19A 3.5 (m = 83,7 mg) foi submetida à CCDP em placa de sílica gel de 20x20cm, com fase móvel de Hex:AcOEt 1:1 v/v. Foram obtidas quatro subfrações (W19A 3.5.1 a 3.5.4). A subfração W19A 3.5.2 (m = 26,4 mg) foi conduzida CLAE semipreparativa em fase reversa de onde foi isolado um sólido esbranquiçado, que foi encaminhado à análise por RMN de ^1H , sendo denominada substância **6** (m = 2,1 mg). A subfração W19A 3.5.3 (m = 23,7 mg) foi conduzida CLAE semipreparativa em fase reversa de onde foi isolado um sólido esbranquiçado, que foi encaminhado à análise por RMN de ^1H , sendo denominada substância **7** (m = 5,1 mg) (figura 7).

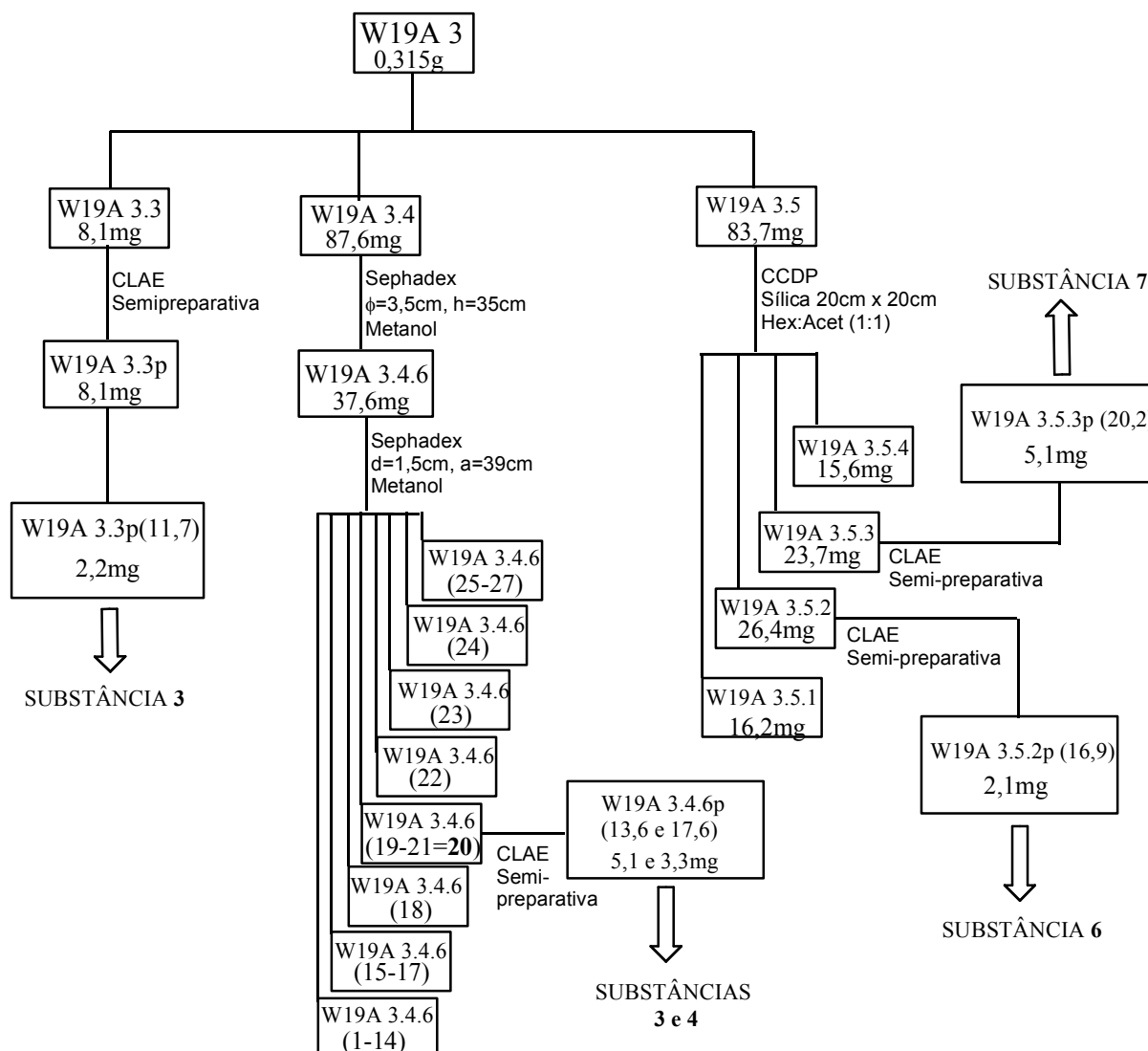


Figura 7: Fracionamento cromatográfico da fração W19A 3

- W19A 4:** Essa amostra representa a união das frações W19A 4 e W19A 5, obtidas diretamente da primeira CLC do extrato W19A, com o objetivo de aumentar as massas de substâncias com mesmo Rf, que apareciam nas CCDC das duas frações (m = 423,7 mg). Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase reversa. Em seguida, foi realizada CLC com Sephadex LH-20 ($\phi = 3,5$ cm, h = 36 cm) e fase móvel com MeOH em eluição isocrática. Foram obtidas quatro subfrações (W19A 4.1 até 4.4), que foram submetidas à CLAE analítica em fase reversa. As subfrações W19A 4.2 (m = 256,4 mg) e W19A 4.3 (m = 113,5 mg) foram conduzidas à CLC em Sephadex LH-20 ($\phi = 2,5$ cm, h = 38,5 cm) e MeOH como fase móvel em eluição isocrática. As subfrações obtidas foram conduzidas à CLAE analítica de fase reversa.

- **W19A 6:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase reversa. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 2,5$ cm, $h = 30$ cm) ($m = 258,9$ mg) e fase móvel de AcOEt:MeOH em eluição gradiente (9:1 = 0,8 L; 7:3 = 0,4 L; 1:1 = 0,2 L) e MeOH = 0,5 L. Foram obtidas quatro subfrações (W19A 6.1 a 6.4), que foram submetidas à CLAE analítica em fase reversa. As subfrações W19A 6.2 ($m = 166,8$ mg) e W19A 6.3 ($m = 67,3$ mg) foram conduzidas à CLC em Sephadex LH-20 ($\phi = 3,5$ cm, $h = 38,5$ cm) e MeOH como fase móvel em eluição isocrática. As subfrações obtidas foram conduzidas à CLAE analítica.
- **W19A 7:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase reversa. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 5,5$ cm, $h = 39$ cm) ($m = 769,6$ mg) e fase móvel de AcOEt:MeOH em eluição gradiente (9:1 = 0,5 L; 7:3 = 1 L; 1:1 = 0,25 L; 3:7 = 1 L) e MeOH = 0,8 L. Foram obtidas seis subfrações (W19A 7.1 a 7.6), que foram submetidas a CLAE analítica em fase reversa.
- **W19A 8:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase reversa.

4.4.2 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Hexano (W19H)

O extrato Hexano W19H ($m = 30,493$ g) foi submetido à CLV com apenas parte de sua amostra ($m = 10,018$ g) com objetivo de separar tal extrato em frações iniciais de massas menores. A CLV foi realizada utilizando-se um funil de placa sinterizada com capacidade para 1000 mL acoplado ao Kitassato de 2 L. A fase estacionária utilizada foi sílica gel ($\phi = 11$ cm, $h = 8$ cm) e uma camada de Florisil® ($h = 1$ cm). A fase móvel em gradiente utilizada foi Hex:AcOEt, partindo de 100% de Hex (500 mL) e aumentando 10% de AcOEt a cada 500 mL, até 100% de AcOEt. Por fim, foi feita a limpeza da sílica gel com 100% de MeOH. Foram obtidas oito frações (W19H 1 a 8).

Cada uma das frações foi submetida à CLAE analítica em coluna de fase normal para determinação do seu perfil cromatográfico, e em seguida foram submetidas à CLC com sílica gel, utilizando-se como eluentes diferentes concentrações de Hex:AcOEt e AcOEt:MeOH, escolhidos de acordo com os R_f nas suas CCDC. A figura 8 representa um esquema da realização das cromatografias e obtenção das subfrações a partir do extrato W19H.

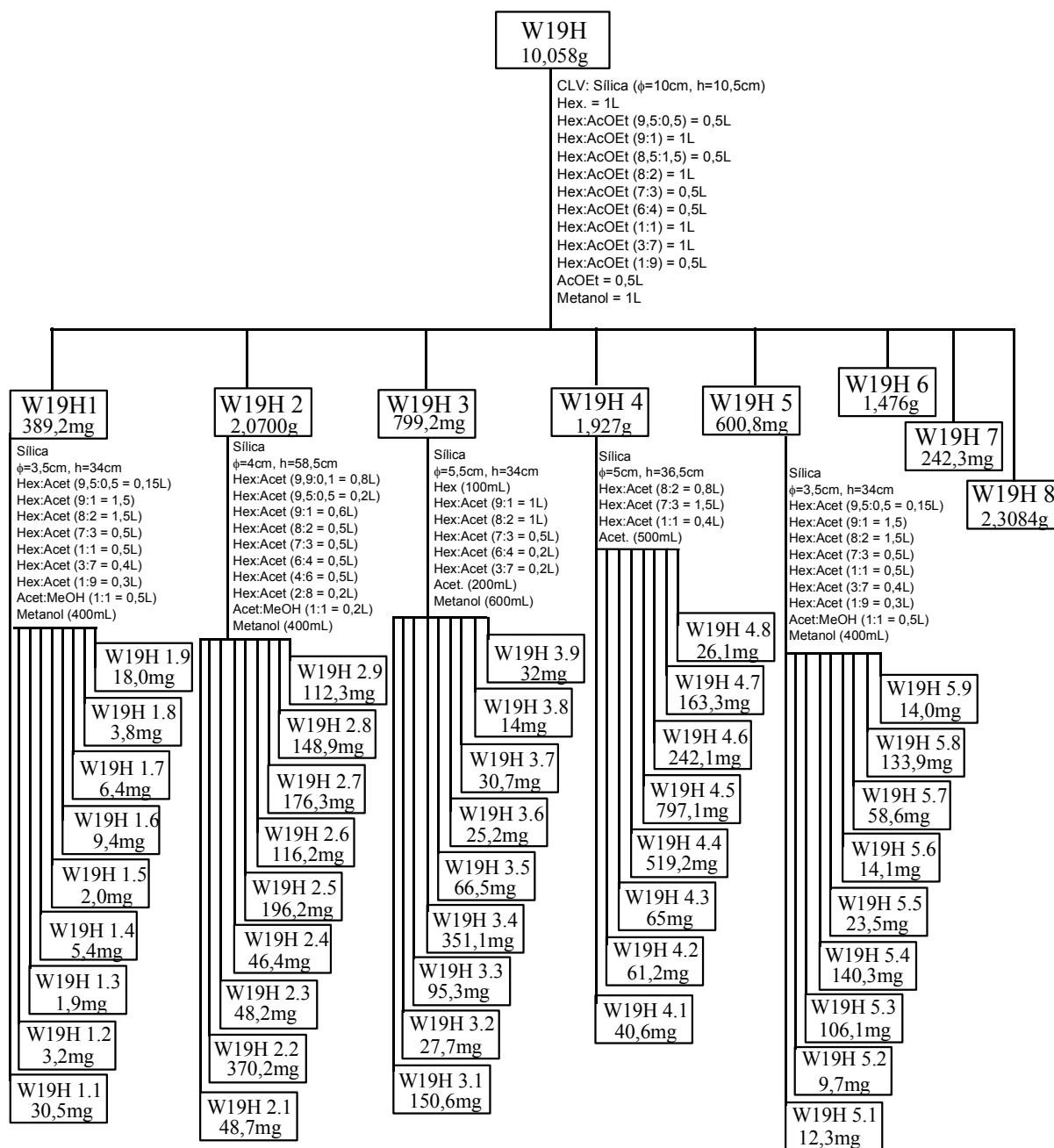


Figura 8: Fracionamento cromatográfico do extrato W19H.

- W19H 1:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 3,5\text{ cm}$, $h = 34\text{ cm}$) ($m = 389,2\text{ mg}$) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (9,5:0,5 = 0,15 L; 9:1 = 1,5 L; 4:1 = 1,5 L; 7:3 = 0,5 L; 1:1 = 0,5 L; 3:7 = 0,4 L; 1:9 = 0,3 L), AcOEt:MeOH 1:1 = 0,5 L e MeOH = 0,5 L. Foram obtidas nove subfrações (W19H 1.1 a 1.9).

- **W19H 2:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 4$ cm, $h = 58,5$ cm + 1,5 cm de Florisil) ($m = 2,07$ g) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (9,9:0,1 = 0,8 L; 9,5:0,5 = 0,2 L; 9:1 = 0,6 L; 4:1 = 0,5 L; 7:3 = 0,5 L; 3:2 = 0,5 L; 2:3 = 0,5 L; 1:4 = 0,2 L), AcOEt:MeOH 1:1 = 0,2 L e MeOH = 0,2 L. Foi observado que a medida que o solvente evaporava, ficava retido nas paredes dos tubos de ensaio um sólido branco cristalino, que foi coletado separadamente e encaminhado para análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e HMBC, que permitiu a identificação da substância **8** ($m = 138,9$ mg). Em seguida, foram obtidas nove subfrações (W19A 2.1 a 2.9), das quais apenas a W19H 2.9 não foi submetida à CLC em sílica.
- **W19H 3:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 5,5$ cm, $h = 34$ cm) ($m = 799,2$ mg) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (9:1 = 1 L; 4:1 = 1 L; 7:3 = 0,5 L; 3:2 = 0,2 L; 3:7 = 0,2 L), AcOEt = 0,2 L e MeOH = 0,6 L. Foram obtidas nove subfrações (W19A 3.1 a 3.9), das quais apenas as W19H 3.8 e W19H 3.9 não foram submetidas à CLC em sílica.
- **W19H 4:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 5$ cm, $h = 36,5$ cm) ($m = 1,927$ g) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (4:1 = 0,8 L; 7:3 = 1,5 L; 1:1 = 0,4 L), AcOEt = 0,5 L e MeOH = 0,5 L. Foram obtidas oito subfrações (W19A 4.1 a 4.8), das quais apenas W19H 4.8 não foi submetida à CLC em sílica.
- **W19H 5:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal. Em seguida foi realizada CLC com sílica gel ($\phi = 5,5$ cm, $h = 28$ cm) ($m = 600,8$ mg) e fase móvel de Hex:AcOEt em eluição gradiente (4:1 = 0,1 L; 7:3 = 1,5 L; 1:1 = 1,3 L), AcOEt = 0,3 L, AcOEt:MeOH 1:1 = 0,5 L e MeOH = 0,5 L. Foram obtidas nove subfrações (W19H 5.1 a 5.9).
- **W19H 6:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal.
- **W19H 7:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal.
- **W19H 8:** Realizou-se CCDC e CLAE analítica de fase normal.

As frações W19H 6, W19H 7 e W19H 8 não demonstraram boa separação de seus componentes via CCDC, e não foram observadas bandas de absorção no UV/CLAE, não prosseguindo em suas análises.

4.5 Metodologia para ensaio de inibição das Catepsinas

Os ensaios enzimáticos propostos nesse trabalho foram realizados em parceria com a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), segundo metodologia descrita por SEVERINO (2008), que consistem na inibição das catepsinas.

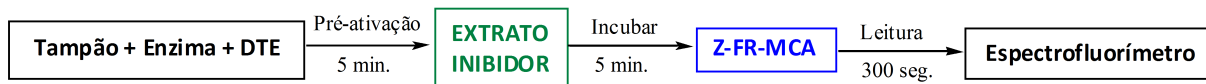
Os testes enzimáticos foram feitos em espectrofluorímetro (λ_{em} 460 nm e λ_{ex} 355 nm) com leitor de placa de 96 poços, com monitoramento direto da hidrólise do substrato Z-FR-MCA através do aumento de fluorescência em função do tempo.

As enzimas foram pré-ativadas com DTE por 5 minutos, em seguida foram pré-incubadas por mais 5 minutos com as amostras a serem avaliados, que foram previamente solubilizados em DMSO, e em diferentes concentrações. Após esse tempo foi feita a leitura da hidrólise do substrato pela fluorescência emitida. O controle negativo foi o próprio solvente (DMSO) enquanto que o positivo foi o inibidor específico E-64. A figura 9 ilustra o processo para a realização do ensaio de inibição das catepsinas.

Os resultados foram interpretados na forma de porcentagem de inibição pela equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 \times (1 - V_i/V_0);$$

sendo V_i a velocidade de reação na presença de inibidor e V_0 a velocidade observada na ausência do inibidor (velocidade controle).



Tampão = acetato de sódio + EDTA (pH 5,5)
DTE (ditioeritrol)

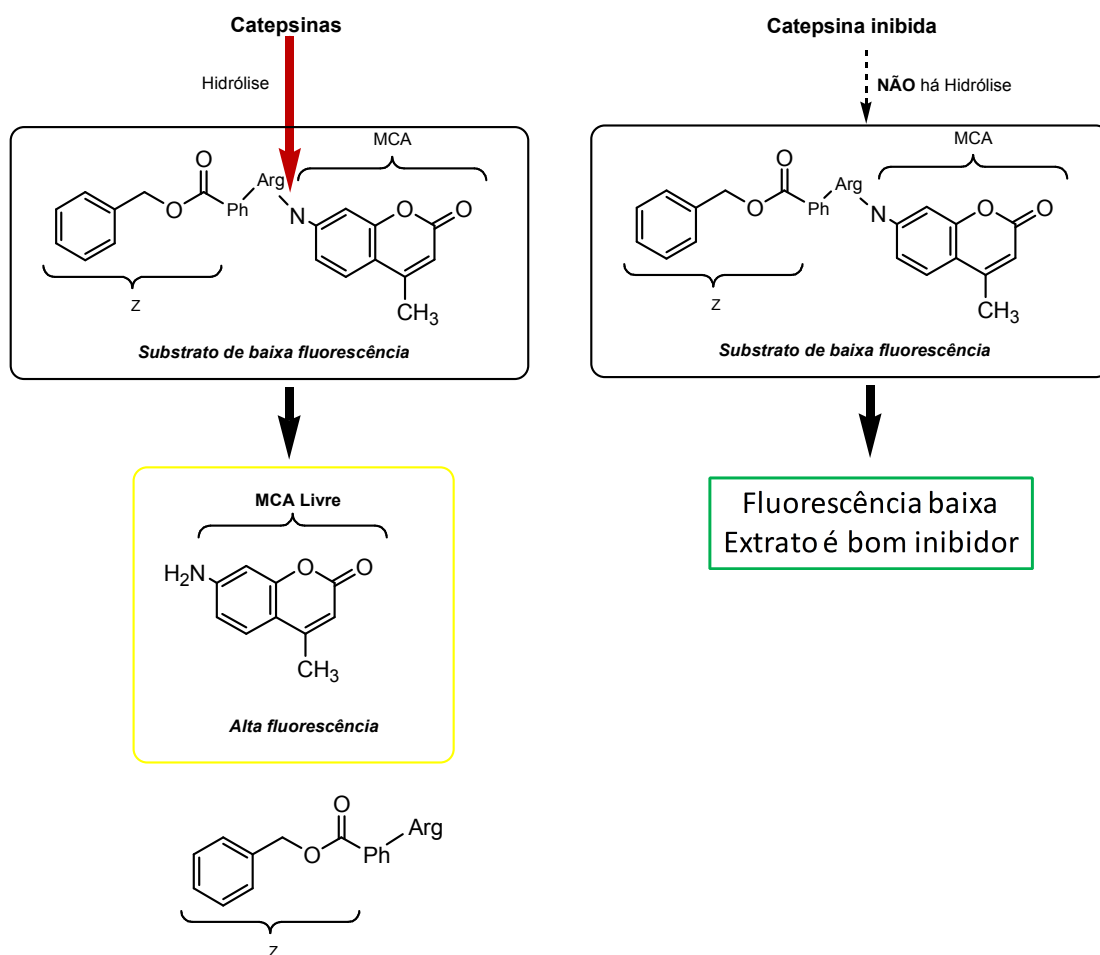


Figura 9: Esquema do ensaio enzimático de inibição das catepsinas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *P. multiflora* é endêmica do Brasil e se destaca por ser uma planta ornamental graças à beleza de suas flores. Não são encontrados registros de sua utilização na medicina tradicional, tão pouco dados de estudos fitoquímicos e de aplicação em ensaios de atividade biológica, em busca realizado no Scifinder em março de 2014.

Contudo, com objetivo de conhecer os constituintes químicos dessa espécie, foram isoladas e identificadas sete substâncias, outras duas substâncias foram identificadas em mistura, sendo que todas elas já são conhecidas e descritas em plantas, porém até então não descritas para essa espécie; além de ser isolada uma substância inédita.

5.1 Resultados do ensaio de inibição das Catepsinas

O ensaio de inibição enzimática foi interpretado pela leitura da hidrólise do substrato Z-FR-MCA, através do aumento de fluorescência emitida em função do tempo. Os resultados foram calculados como porcentagem de inibição, e aqueles que apresentaram valores acima de 50% foram considerados ativos para inibição enzimática, de acordo com os parâmetros internos do laboratório que realizou os testes.

Os resultados para o ensaio de inibição das catepsinas K, L e V pelo extrato total revelou a necessidade de altas concentrações da amostra para inibir as catepsinas K e V. Porém, nem mesmo altas concentrações do extrato foram capazes de inibir a catepsina L (tabela 1 e figura 10).

Um extrato de planta é uma matriz complexa, uma vez que é composta por inúmeros metabólitos secundários. Essas substâncias têm diferentes papéis na manutenção e fisiologia da planta. Tais metabólitos são produzidos de maneira individualizada e em quantidades diversificadas, sendo característicos para cada

espécie, e muitas vezes dependentes de estímulos externos. Quando um extrato apresenta uma determinada resposta frente a um ensaio de atividade biológica, seja ela positiva ou negativa, deve-se considerar a possibilidade de estarem ocorrendo interações sinérgicas, que são comuns em matrizes complexas. Por essa razão, o isolamento e caracterização de cada um dos seus metabólitos são operações chave na avaliação das misturas biologicamente ativas, e que exigem um trabalho muitas vezes demorado (JUNIO, SY-CORDERO, ETTEFAGH *et al*, 2011; INUI, WANG, PRO *et al*, 2012).

Tabela 1: Resultados em porcentagem de inibição das catepsinas K, V e L pelo extrato total (W19).

Amostra W19 ($\mu\text{g/mL}$)	500	250	125	50	25	5
Catepsina K	52	0	0	0	0	0
Catepsina V	89	25	2	0	0	0
Catepsina L	0	0	0	0	0	0

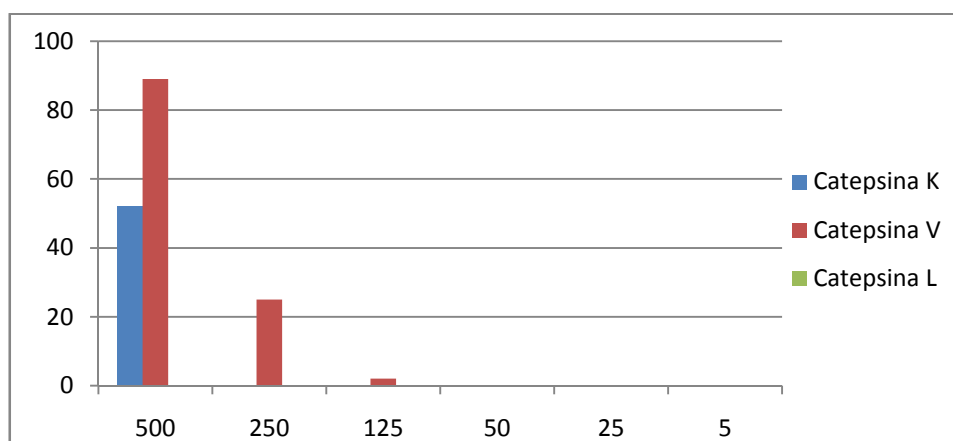


Figura 10: Gráfico da porcentagem de inibição das catepsinas K, L e V frente a diferentes concentrações ($\mu\text{g/mL}$) do extrato total.

Portanto, esses resultados não excluem a possibilidade de que frações e subfrações do extrato, ou até mesmo suas substâncias isoladas e purificadas, possam apresentar inibição de tais enzimas.

5.2 Resultados dos fracionamentos cromatográficos

5.2.1 Resultados do Extrato Acetato de Etila (W19A)

O fracionamento cromatográfico de W19A forneceu oito frações (W19A 1 a 8) (figura 5), que foram submetidas à CCDC e CLAE analítica de fase reversa. Em seguida foram realizadas CLC em diferentes condições para cada fração. As frações W19A 2 e W19A 3 resultaram na identificação de nove substâncias.

- **W19A 2:** A subfração W19A 2.3 (m = 33,2 mg) foi submetida à CLAE semipreparativa de fase reversa, pela qual coletaram-se amostras referentes à cinco bandas com diferentes tempos de retenção. Em seguida, tais amostras foram encaminhadas para análise por RMN de ^1H . A amostra com tempo de retenção em 13,03 minutos, denominada W19A 2.3p(13,03) (m = 2,4 mg) foi encaminhada para análise por RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC, em que foi identificada a substância **1** (ácido vanílico), uma vez que seus dados espectroscópicos de RMN foram comparados com a literatura e confirmados. A figura 11 apresenta o cromatograma da subfração W19A 2.3, destacando a banda referente à substância **1**.

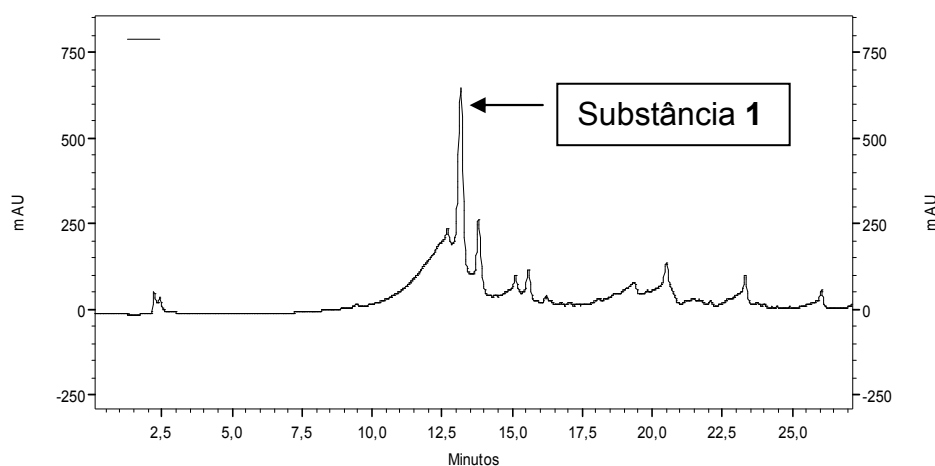


Figura 11: Cromatograma CLAE da subfração W19A 2.3, destacando a banda da substância **1**.

A subfração W19A 2.4 (m = 122,5 mg) foi submetida à CLC obtendo-se oito subfrações (W19A 2.4.1 a 2.4.8), que foram encaminhadas para CLAE analítica de fase reversa. A subfração W19A 2.4.4 (m = 56,5 mg) foi submetida à CLC em Sephadex LH-20 ($\phi = 1,5$ cm, h = 37 cm) e MeOH como fase móvel em eluição

isocrática. Foram coletadas cinco amostras, e encaminhadas para análise por RMN de ^1H . Dessas, a amostra W19A 2.4.4 (19-24) (m = 2 mg) apresentou-se como um sólido esbranquiçado solúvel em CHCl_3 e MeOH. Essa amostra foi encaminhada para análise por CG-EM, que permitiu a identificação da substância **9** (3-oxo- α -ionol) e substância **10** (blumenol c), após comparação dos dados obtidos com a literatura. A amostra W19A 2.4.4(30-35) (m = 33 mg) apresentou-se como cristais amarelados solúveis em CHCl_3 , sendo identificada como a substância **5** (loliolida), após análise de RMN de ^1H e ^{13}C e EM e comparação com dados da literatura.

A subfração W19A 2.4.7 (m = 9,5 mg) foi conduzida à CLAE semipreparativa de fase reversa. A amostra coletada com tempo de retenção de 18,09 minutos, denominada W19A 2.4.7p(18,09) (m = 2,3 mg), foi encaminhada para análise por RMN de ^1H , identificando-se a substância **2** (ácido ferúlico), por comparação com dados da literatura. A figura 12 apresenta o cromatograma da subfração W19A 2.4.7, destacando a banda referente à substância **2**.

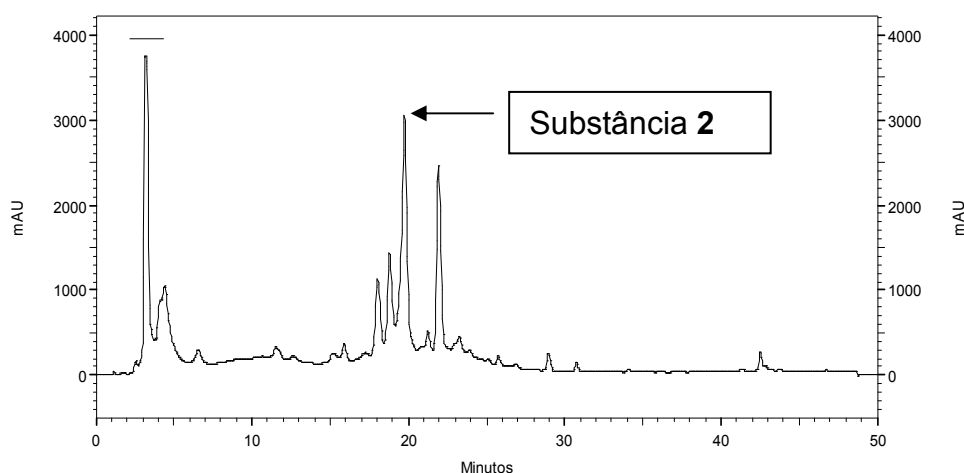


Figura 12: Cromatograma CLAE da subfração W19A 2.4.7, destacando a banda da substância **2**.

- **W19A 3:** O perfil químico para a subfração W19A 3.1 (m = 12,1 mg) apresentou bandas de com alta intensidade de absorção no UV, sendo encaminhada para CLAE semipreparativa em fase reversa. Das amostras coletadas, apenas a amostra com tempo de retenção de 38 minutos, denominada W19A 3.1p(38) foi encaminhada para análise por RMN de ^1H . O espectro obtido apresentou sinais característicos de ftalato.

A subfração W19A 3.3 (m = 8,1 mg) foi submetida à CLAE semipreparativa de fase reversa. As amostras coletadas foram encaminhadas para análise por RMN de ^1H . A amostra com tempo de retenção de 11,7 minutos, denominada W19A 3.3p(11,7) (m = 2,2 mg), apresentou sinais no espectro que levaram a identificação da substância **3** (ácido *p*-hidroxibenzoico) após comparação com dados da literatura. A figura 13 apresenta o cromatograma da subfração W19A 3.3, destacando a banda referente à substância **3**.

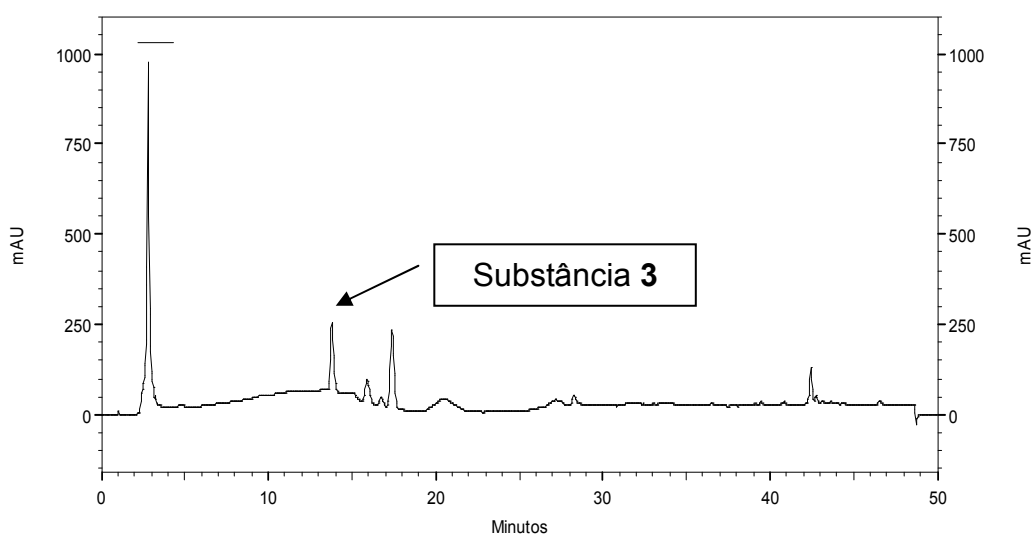


Figura 13: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.3, destacando a banda da substância **3**.

As subfrações W19A 3.4.3 (m = 43,3 mg) e W19A 3.4.6 (m = 37,6 mg) foram conduzidas à CLC em Sephadex LH-20 e MeOH como fase móvel em eluição isocrática. Das amostras obtidas e encaminhadas para RMN ^1H , apenas a amostra W19A 3.4.6.20 apresentou sinais em seu espectro que permitiram a identificação das substâncias **3** e **4**. Essa amostra foi encaminhada para CLAE semipreparativa de fase reversa, e as amostras com tempo de retenção em 13,6 e 17,6 minutos, denominadas W19A 3.4.6.20p(13,6) (m = 5,1 mg) e W19A 3.4.6.20p(17,6) (m = 3,3 mg) permitiram o isolamento da substância **3** (ácido *p*-hidroxibenzoico) e substância **4** (ácido *p*-cumárico), respectivamente. A figura 14 apresenta o cromatograma da subfração W19A 3.4.6.20, destacando as bandas referentes às substâncias **3** e **4**.

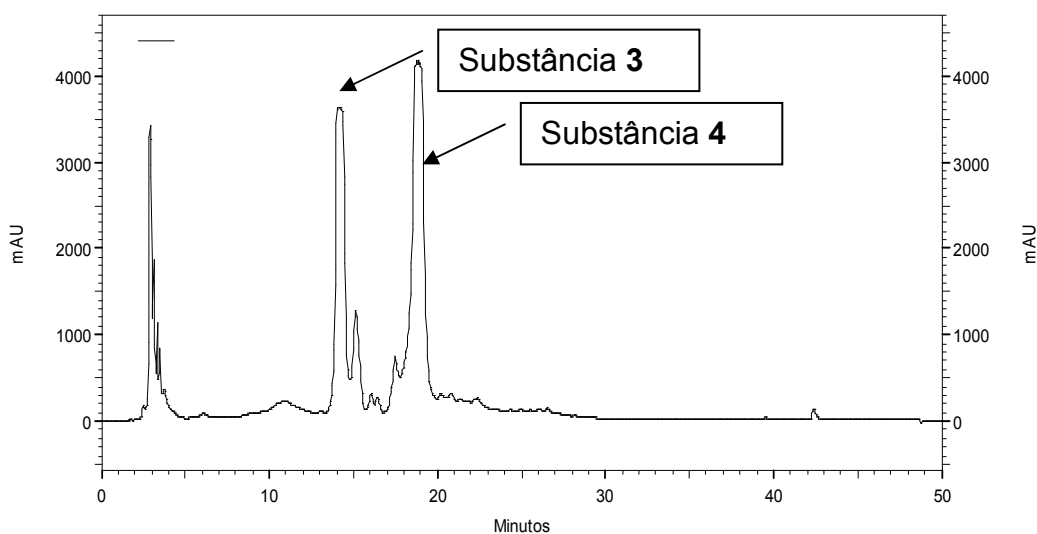


Figura 14: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.4.6.20, destacando as bandas das substâncias **3** e **4**.

A subfração W19A 3.5.2 ($m = 26,4$ mg) foi conduzida à CLAE semipreparativa de fase reversa. A amostra com tempo de retenção de 16,9 minutos, denominada W19A 3.5.2p(16,9) ($m = 2,1$ mg), foi encaminhada para análise por RMN de ^1H . Os sinais de seu espectro permitiram a identificação da substância **6** (vomifoliol), após comparação com dados da literatura. A figura 15 apresenta o cromatograma da subfração W19A 3.5.2, destacando a banda referente à substância **6**. Na mesma figura, observam-se outras bandas de alta intensidade de absorção no UV/CLAE. As amostras referentes às tais bandas foram coletadas, porém suas massas não eram suficientes para continuidade das análises, uma vez que não há uma relação linear entre intensidade da banda do espectro e quantidade de amostra.

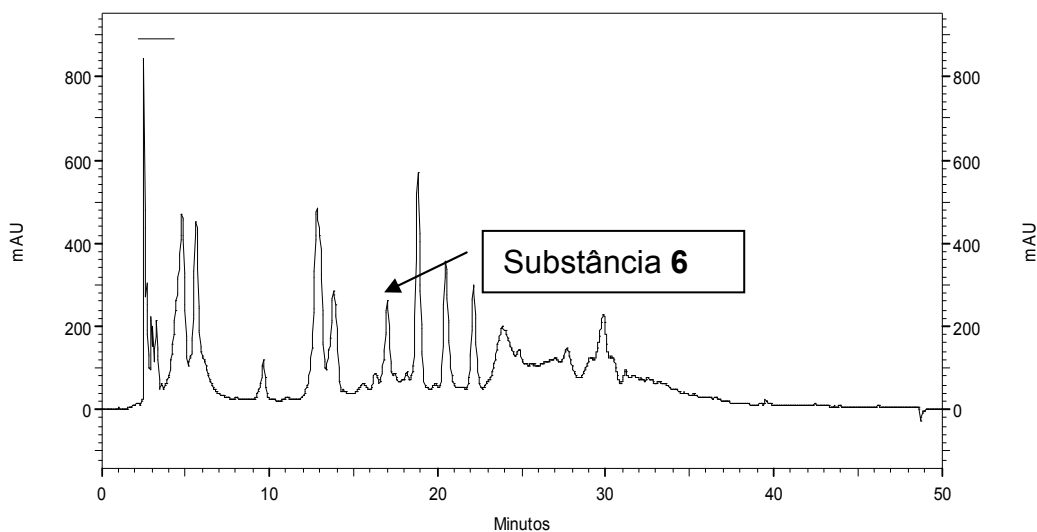


Figura 15: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.5.2, destacando a banda da substância **6**.

A subfração W19A 3.5.3 ($m = 23,7$ mg) foi conduzida à CLAE semipreparativa de fase reversa. A amostra com tempo de retenção de 20,2 minutos, denominada W19A 3.5.3p(20,2) ($m = 5,1$ mg), foi encaminhada para análise por RMN de ^1H . Os sinais de seu espectro permitiram a identificação da substância **7** (4,5-dihidrobolumenol A), após comparação com dados da literatura. A figura 16 apresenta o cromatograma da subfração W19A 3.5.3, destacando a banda referente à substância **7**.

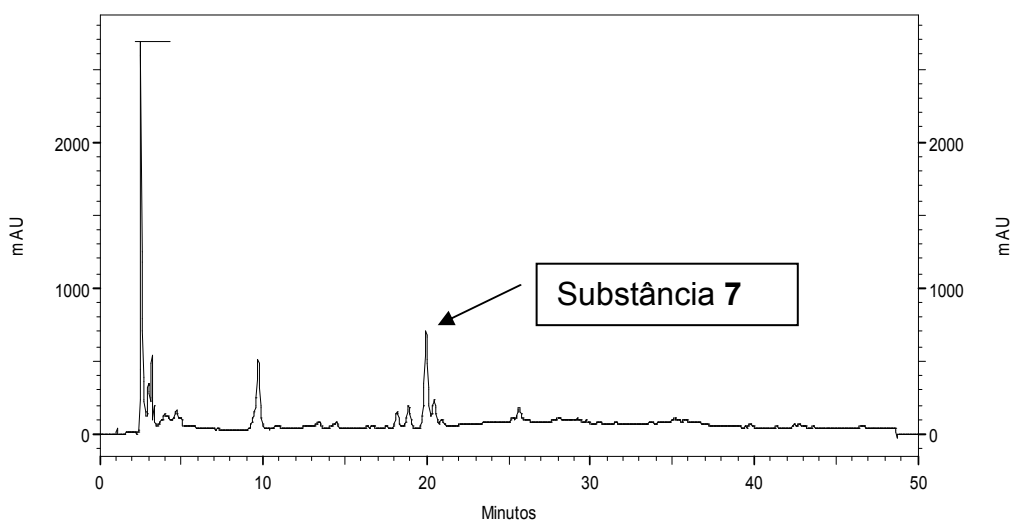


Figura 16: Cromatograma CLAE da subfração W19A 3.5.3, destacando a banda da substância **7**.

5.2.2 Resultados do extrato Hexano (W19H)

As oito frações foram submetidas à CCDC e CLAE analítica de fase normal. Em seguida foram realizadas CLC em sílica gel em eluição gradiente de Hex:AcOEt nas frações W19H 1 a W19A 5, porém apenas a fração W19H 2 resultou no isolamento de substância.

- **W19H 2:** Essa fração (m = 2,070 g) foi conduzida à CLC com sílica gel e eluição gradiente de Hex:AcOEt. Após evaporação de parte do solvente, um sólido branco cristalino ficou retido nas paredes do tubo de ensaio. Esse material sólido foi coletado (m = 138,9 mg) e encaminhado para análise por RMN de ^1H e de ^{13}C , e HMBC, que permitiu a identificação da substância **8** (*p*-metoxibenzoato de taraxerol). Em seguida, esse material foi encaminhado para análise por cristalografia de Raios-X, para averiguação de sua estrutura molecular em sua célula unitária.

Todas as suas demais subfrações foram conduzidas à CLC com sílica gel em eluição gradiente de Hex:AcOEt, porém nenhuma outra substância foi isolada dessa fração.

5.3 Determinação estrutural das substâncias isoladas

5.3.1 Presença de contaminantes

Quando um trabalho de pesquisa envolve atividades práticas no laboratório, todo o procedimento experimental está sujeito à contaminação de diversas formas e origens. Essa contaminação pode estar relacionada desde a qualidade dos materiais utilizados até a técnica do pesquisador.

Os ftalatos (figura 17) são ésteres do ácido ftálico, muito empregados como plastificantes para aumentar a flexibilidade e viabilidade de diversos tipos de plásticos (ESTEVES, BORGES, ABRANTE *et al*, 2007). Essa é uma substância incomum entre os produtos naturais, porém aparece com frequência nos trabalhos como contaminante, uma vez que os solventes utilizados na preparação dos extratos e nas cromatografias podem ser armazenados em recipientes plásticos.

Dentre diversos compostos que têm origem no metabolismo secundário das plantas, e que podem ser identificados, não se deve descartar que a substância isolada pode ter sua origem devido à contaminação.

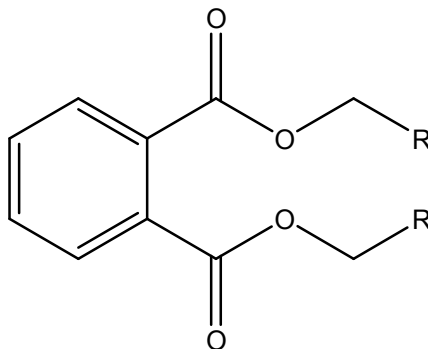


Figura 17: Estrutura química geral de um ftalato.

Durante o processo de separação dos constituintes das folhas da *P. multiflora*, uma das amostras, a W19A 3.1p(38), apresentou uma substância amarelada. Essa amostra foi coletada por CLAE e parecia pura. Então, foi conduzida à análise de RMN de ^1H . A presença de um composto derivado do ftalato foi evidenciada em tal amostra pelos sinais característicos no espectro de RMN de ^1H (figura 18), no qual se destacam dois duplos dubletos entre δ_{H} 7,70-7,40 ppm, que são referentes aos pares de hidrogênios equivalentes do anel aromático com substituição em posição *orto*, e um tripleto próximo de δ_{H} 4,20 ppm, que se refere aos hidrogênios do grupamento OCH_2 (COHEN, CHARRIER e SARFATY, 1991).

Nesse trabalho, o ftalato aparece como contaminante do procedimento, uma vez que foi isolado na amostra W19A 3.1p(38), e observado em alguns espectros de RMN de ^1H e UV/CLAE de outras subfrações.

PROTON_01
W19A_31p_38

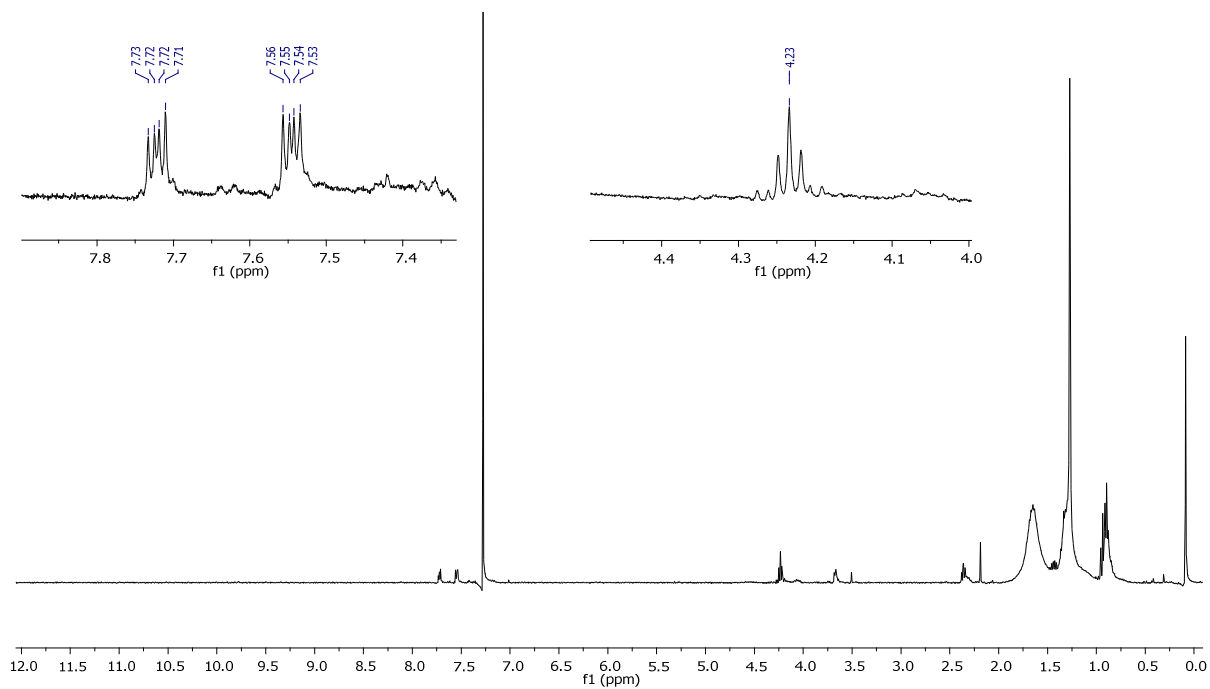


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da amostra W19A 3.1p(38) (CDCl_3 , 400MHz).

5.3.2 Compostos Fenólicos

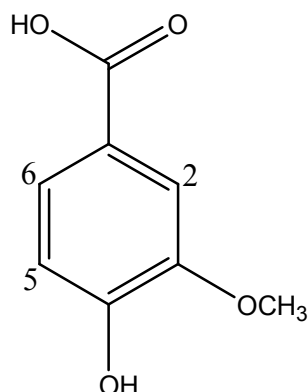
Derivados do ácido benzoico são amplamente utilizados como produtos químicos industriais, agrotóxicos e medicamentos, dentre outros materiais de consumo. Alguns deles, com um ou mais grupos hidroxila e metoxila na molécula, são conhecidos por terem várias atividades biológicas, tais como no combate aos radicais livres (através da doação de hidrogênio ou pela redução de radicais peróxido), atuação como quelantes de metais, modulação da atividade de algumas enzimas, na aterosclerose, e até mesmo com ação antimutagênica. Em sistemas biológicos, os radicais livres altamente reativos são capazes de causar mutações pela modificação da estrutura dos ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e do DNA (S`WISŁOCKA, REGULSKA, SAMSONOWICZ *et al.*, 2013).

Muitos dos compostos fenólicos são capazes de atuar como antioxidantes, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático (RAMALHO e JORGE, 2006).

Tais compostos também podem apresentar atividade antimicrobiana, sendo que essa atividade é dependente de sua concentração. Segundo Campos *et al.* (2009), como os compostos fenólicos são ácidos orgânicos fracos, e devido à sua natureza parcialmente lipofílica, eles atravessam passivamente a bicamada lipídica das membranas em sua forma não dissociada, perturbando a estrutura celular e acidificando o citoplasma, o que pode causar a desnaturação das proteínas (CAMPOS, COUTO, FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Dessa forma, pode-se considerar que tais substâncias possuem considerável importância, graças à sua provável capacidade de prevenção de várias doenças humanas (S`WISŁOCKA, REGULSKA, SAMSONOWICZ *et al.*, 2013).

5.3.2.1 Substância 1 (ácido vanílico)



Substância 1
 W19A 2.3p (13,03)
 m=2,4mg

Figura 19: Estrutura química do Ácido vanílico (1).

O sólido W19A 2.3p(13,03) (m = 2,4mg), solúvel em metanol, foi solubilizado em CD₃OD e encaminhado para análise por RMN de ¹H e de ¹³C, e HMBC.

A análise do espectro de RMN de ¹H de W19A 2.3p(13,03) (figura 20) apresentou sinais com deslocamentos químicos em 7,57 ppm (1H, *d*, *J* = 1,6 Hz, H-2), 7,54 ppm (1H, *dd*, *J* = 8,0 Hz e 1,6 Hz, H-6) e 6,82 ppm (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-5), referentes aos hidrogênios aromáticos característicos de uma estrutura de anel 1,3,4-trissubstituído. O espectro apresentou ainda um sinal de hidrogênio singlete em 3,90 ppm (3H) atribuído à presença de uma metoxila na estrutura da molécula (SHAIKH, MAKHMOOR e CHOUDHARY, 2010; ZENG, YE, CHENG *et al.*, 2013).

No espectro de RMN de ¹³C de W19A 2.3p(13,03) (figura 21) foram evidenciados os oito carbonos pelos deslocamentos químicos em 170,0 ppm (COOH), 148,6 ppm (C-3) e 152,6 ppm (C-4), característicos de carbonos ligados ao oxigênio. Os demais carbonos da substância exibiram valores de 125,2 ppm (C-6), 123,0 ppm (C-1), 115,7 ppm (C-2), 113,7 ppm (C-5) e 56,3 ppm (CH₃), sendo esse último característico de carbono da metoxila (HUANG, DOSTAL e ROSAZZA, 1993).

O posicionamento da metoxila foi verificada por análise de HMBC (figura 22), que apresentou a correlação entre os sinais em 3,90 ppm do espectro de RMN de ¹H com o carbono C-3 em 148,6 ppm do espectro de RMN de ¹³C.

O espectro de RMN de ^1H de W19A 2.3p(13,03) (figura 19) também apresentou sinais com deslocamentos químicos em 6,93 ppm ($J = 8,4$ Hz) e em 7,79 ppm ($J = 8,8$ Hz) indicando a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído, sugerindo que a substância **1** esteja em mistura com o ácido *p*-hidroxibenzoico.

Tabela 2: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância **1** (ácido vanílico) comparados com a literatura (* SHAIKH, MAKHMOOR e CHOUDHARY, 2010) (δ em ppm, J em Hz).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD)	δ ^1H (substância 1)	δ $^1\text{H}^*$
H-2	7,57 (1H, <i>d</i> , $J = 1,6$)	7,56 (1H, <i>d</i> , $J = 1,8$)
H-5	6,82 (1H, <i>d</i> , $J = 8,0$)	6,77 (1H, <i>d</i> , $J = 8,2$)
H-6	7,54 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,0$ e $1,6$)	7,50 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,2$)
OCH_3	3,90 (3H, <i>s</i>)	3,88 (3H, <i>s</i>)

Dessa forma, após a comparação dos dados obtidos com a literatura, a proposta da estrutura química para a substância **1** é o **ácido vanílico** (figura 19) (SHAIKH, MAKHMOOR e CHOUDHARY, 2010; ZENG, YE, CHENG *et al.*, 2013; HUANG, DOSTAL e ROSAZZA, 1993).

O ácido vanílico é um dos principais compostos fenólicos responsáveis pelo aroma e sabor do extrato de baunilha, obtido pelo processamento das favas de orquídeas do gênero *Vanilla*, como *V. pampona*, *V. tahitensis* e *V. planifolia* (LIBARDI, 2010). Por ser um composto fenólico, apresenta atividade antioxidante (RAMALHO e JORGE, 2006).

PROTON_01
W19A_23p_1303

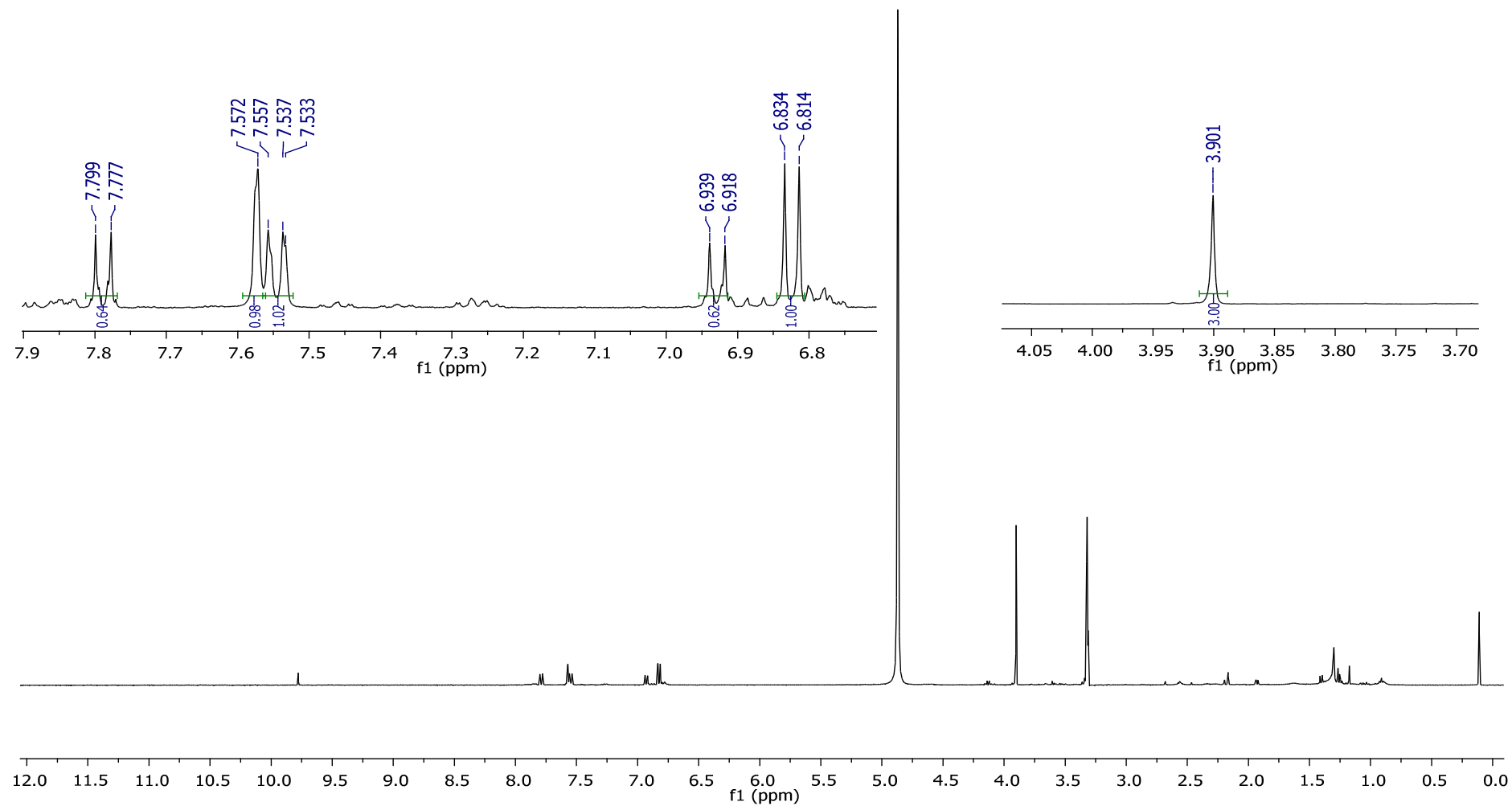


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H da substância **1** (ácido vanílico) da amostra W19A 2.3p(13,03) (CD_3OD , 400MHz).

CARBON_01
W19A23p1303

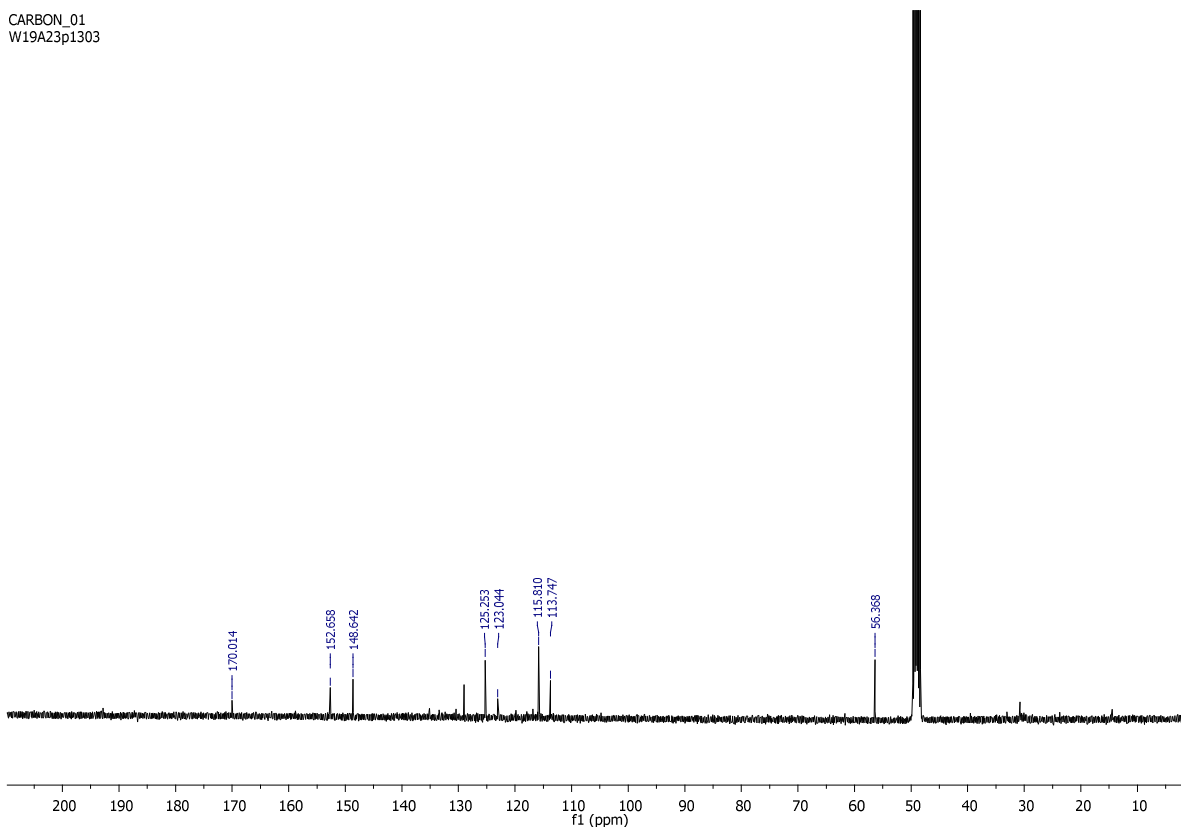


Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **1** (ácido vanílico) da amostra W19A 2.3p(13,03), destacando os sinais característicos (CD_3OD , 100MHz).

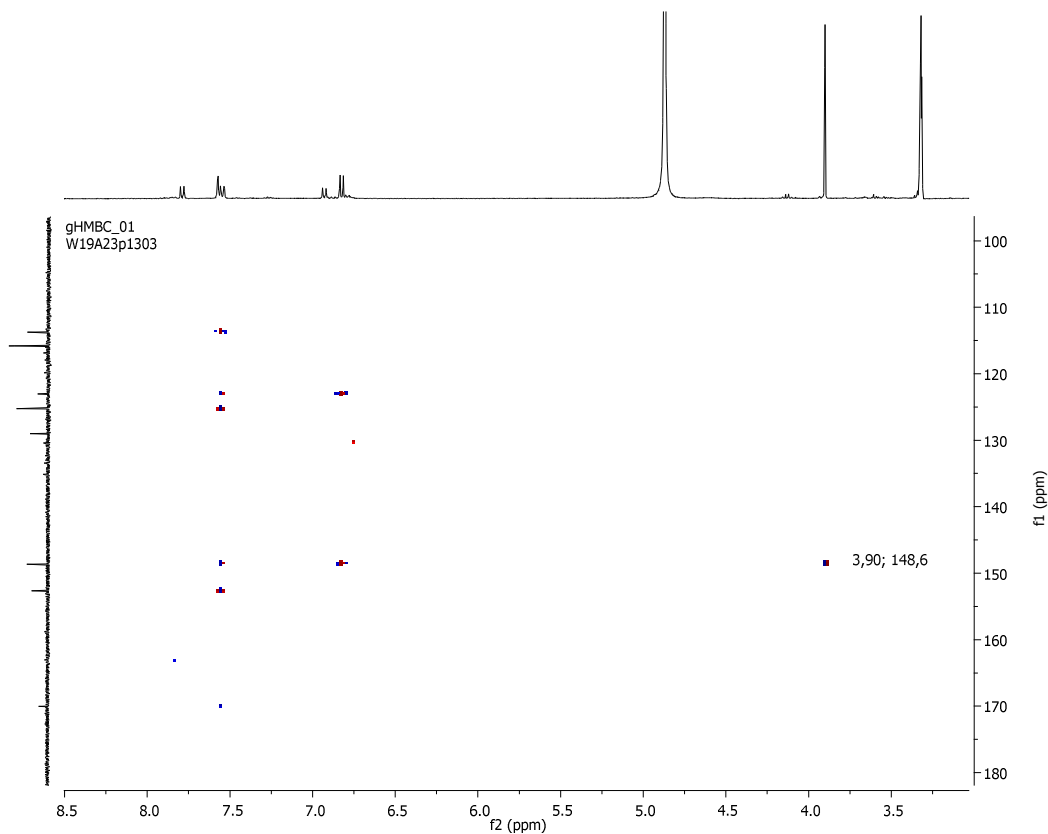
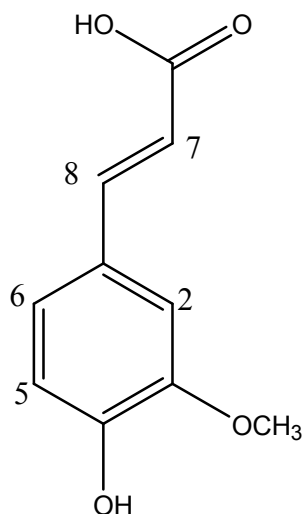


Figura 22: Mapa de contornos HMBC da substância **1** (ácido vanílico) na amostra W19A 2.3p(13,03), destacando a correlação dos hidrogênios metoxílicos com C-3 do anel aromático (CD_3OD).

5.3.2.2 Substância 2 (ácido ferúlico)



Substância 2
 W19A 2.4.7p (18,09)
 m=2,3mg

Figura 23: Estrutura química do ácido ferúlico (2).

O sólido branco W19A 2.4.7p(18,09) (m = 2,3 mg), solúvel em metanol, foi solubilizado em CD₃OD e encaminhado para análise por RMN de ¹H.

A análise do espectro de RMN de ¹H de W19A 2.4.7p(18,09) (figura 24) apresentou sinais com deslocamentos químicos em 7,15 ppm (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-2), 7,02 ppm (1H, *dd*, *J* = 8,4 e 2,0 Hz, H-6) e 6,78 ppm (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-5), referentes aos hidrogênios aromáticos característicos de uma estrutura de anel 1,3,4-trissubstituído.

Um sinal de hidrogênio dubleto com deslocamento químico em 6,31 ppm (1H, *d*, *J* = 16,0 Hz, H-7) e outro sinal de hidrogênio dubleto com deslocamento químico em 7,49 ppm (1H, *d*, *J* = 16,0 Hz, H-8), acoplam-se entre si, e o valor da constante de acoplamento é característico de um sistema α,β -insaturado com posicionamento *trans* entre seus hidrogênios. Dessa forma, atribuiu-se a presença de hidrogênios olefínicos na estrutura da molécula.

O espectro apresentou ainda um sinal de hidrogênio singleto em 3,88 ppm (3H), atribuído à presença de uma metoxila na estrutura, que de acordo com os dados da literatura, aparece na posição C-3 do anel aromático (REGASINI, FERNANDES, CASTRO-GAMBOA *et al.*, 2008).

PROTON_01
W19A247p1809

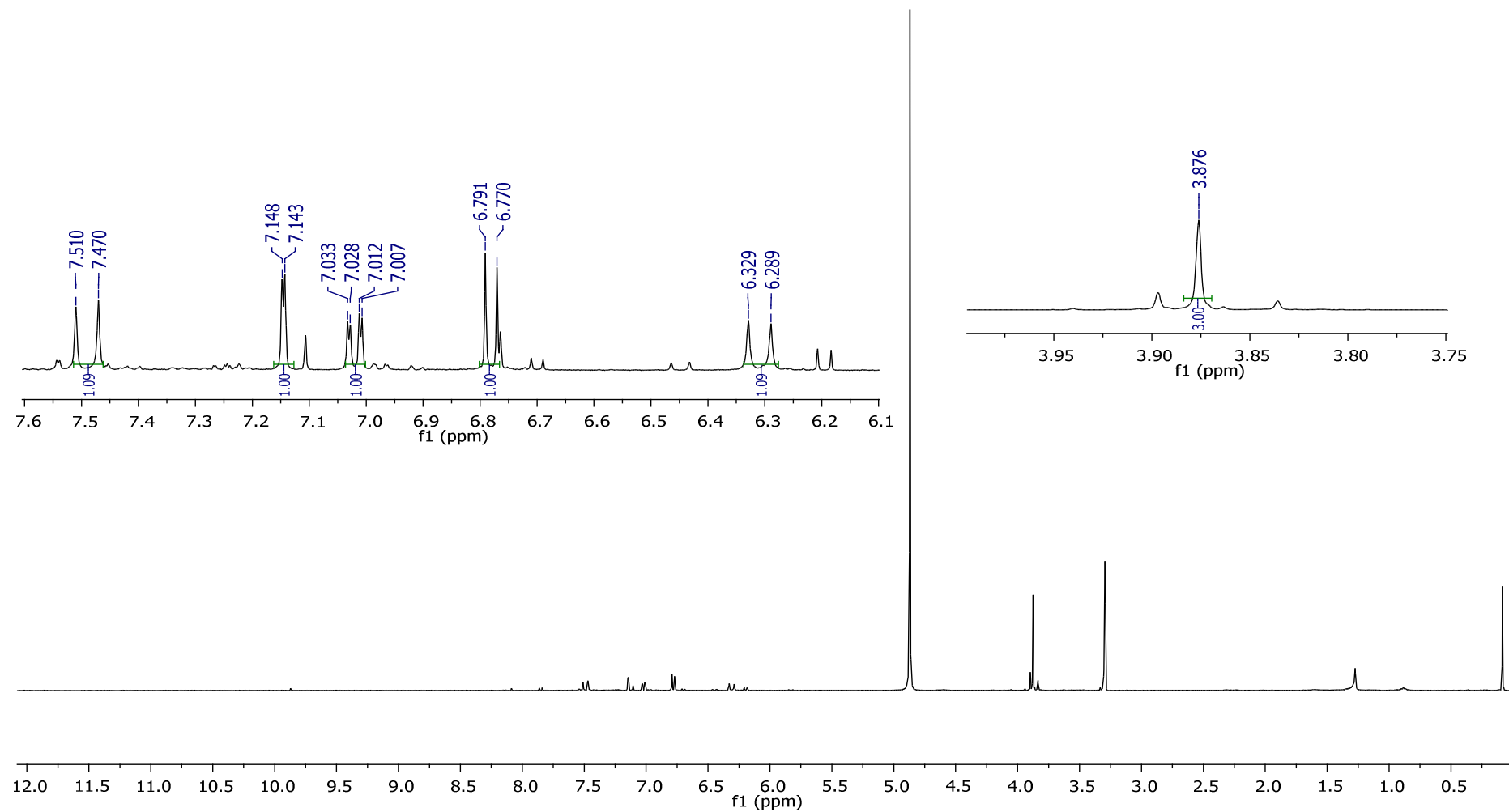


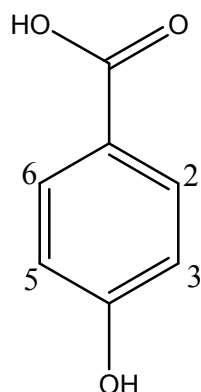
Figura 24: Espectro de RMN de ¹H da substância **2** (ácido ferúlico) da amostra W19A 2.4.7p(18,09) (CD₃OD, 400MHz).

Tabela 3: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância **2** (ácido ferúlico) comparados com a literatura (* REGASINI, FERNANDES, CASTRO-GAMBOA *et al.*, 2008) (δ em ppm, J em Hz).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD)	δ ^1H (substância 2)	δ $^1\text{H}^*$
H-2	7,15 ppm (1H, <i>d</i> , $J = 2,0$)	7,12 (1H, <i>d</i> , $J = 2,5$)
H-5	6,78 ppm (1H, <i>d</i> , $J = 8,4$)	6,85 (1H, <i>d</i> , $J = 8,5$)
H-6	7,02 ppm (1H, <i>dd</i> , $J = 8,4$ e 2,0)	7,04 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,5$ e 2,5)
H-7	6,31 ppm (1H, <i>d</i> , $J = 16,0$)	6,40 (1H, <i>d</i> , $J = 16,0$)
H-8	7,49 ppm (1H, <i>d</i> , $J = 16,0$)	7,58 (1H, <i>d</i> , $J = 16,0$)
OCH_3	3,88 (3H, <i>s</i>)	3,90 (3H, <i>s</i>)

Dessa forma, após a comparação dos dados obtidos com a literatura, a proposta da estrutura química para a substância **2** é o **ácido ferúlico** (figura 23) (REGASINI, FERNANDES, CASTRO-GAMBOA *et al.*, 2008), um ácido fenólico com ação antioxidante (RAMALHO e JORGE, 2006).

5.3.2.3 Substância 3 (ácido *p*-hidroxibenzoico)



<p style="text-align: center;">Substância 3 W19A 3.3p (11,7) m= 2,2mg W19A 3.4.6.20p (13,6) m= 5,1mg</p>

Figura 25: Estrutura química do Ácido *p*-hidroxibenzoico (**3**).

O sólido branco W19A 3.3p(11,7) (m = 2,2 mg), solúvel em metanol, foi isolado da subfração W19A 3.3. Outro sólido branco W19A 3.4.6.20p(13,6) (m = 5,1 mg), solúvel em metanol, foi isolado da subfração W19A 3.4.6.20. Esses sólidos foram solubilizados em CD₃OD e encaminhados para análise por RMN de ¹H separadamente.

A análise do espectro de RMN de ¹H da amostra W19A 3.3p(11,7) (figura 26) apresentou dois sinais de hidrogênios dubletos com deslocamentos químicos em 7,86 ppm (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-2 e H-6) e 6,79 ppm (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-3 e H-5) (tabela 4). Já a amostra W19A 3.4.6.20p(13,6) (figura 27), apresentou dois sinais de hidrogênios dubletos com deslocamentos químicos em 7,84 ppm (2H, *d*, *J* = 8,8 Hz, H-2 e H-6) e 6,76 ppm (2H, *d*, *J* = 8,8 Hz, H-3 e H-5) (tabela 4), indicando que as substâncias das duas amostras coletadas por CLAE eram a mesma (YAYLI, YILDIRIM, USTA *et al.*, 2003).

Portanto, ambos os espectros apresentaram dois sinais de hidrogênios dubletos que apresentavam acoplamento entre si, evidenciando na molécula a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído característico do ácido *p*-hidroxibenzoico.

Tabela 4: Dados de RMN ^1H obtidos para a substância **3** (ácido *p*-hidroxibenzoico) comparados com a literatura (* YAYLI, YILDIRIM, USTA *et al.*, 2003) (δ em ppm, *J* em Hz).

RMN ^1H	δ ^1H (substância 3)	δ ^1H (substância 3)	δ $^1\text{H}^*$
(400 MHz, CD_3OD)	W19A 3.3p(11,7)	W19A 3.4.6.20p(13,6)	
H-2 e H-6	7,86 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	7,84 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)	7.86 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)
H-3 e H-5	6,79 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,4)	6,76 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)	6.80 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8,8)

Dessa forma, após a comparação dos dados obtidos com a literatura, a proposta da estrutura química para a substância **3** é o **ácido *p*-hidroxibenzoico** (figura 25), um ácido fenólico (YAYLI, YILDIRIM, USTA *et al.*, 2003) responsável por atividade antimicrobiana (ESTEVINHO, PEREIRA, MOREIRA *et al.*, 2008) e com pouca atividade antioxidante (RAMALHO e JORGE, 2006).

PROTON_01
W19A_33p_117

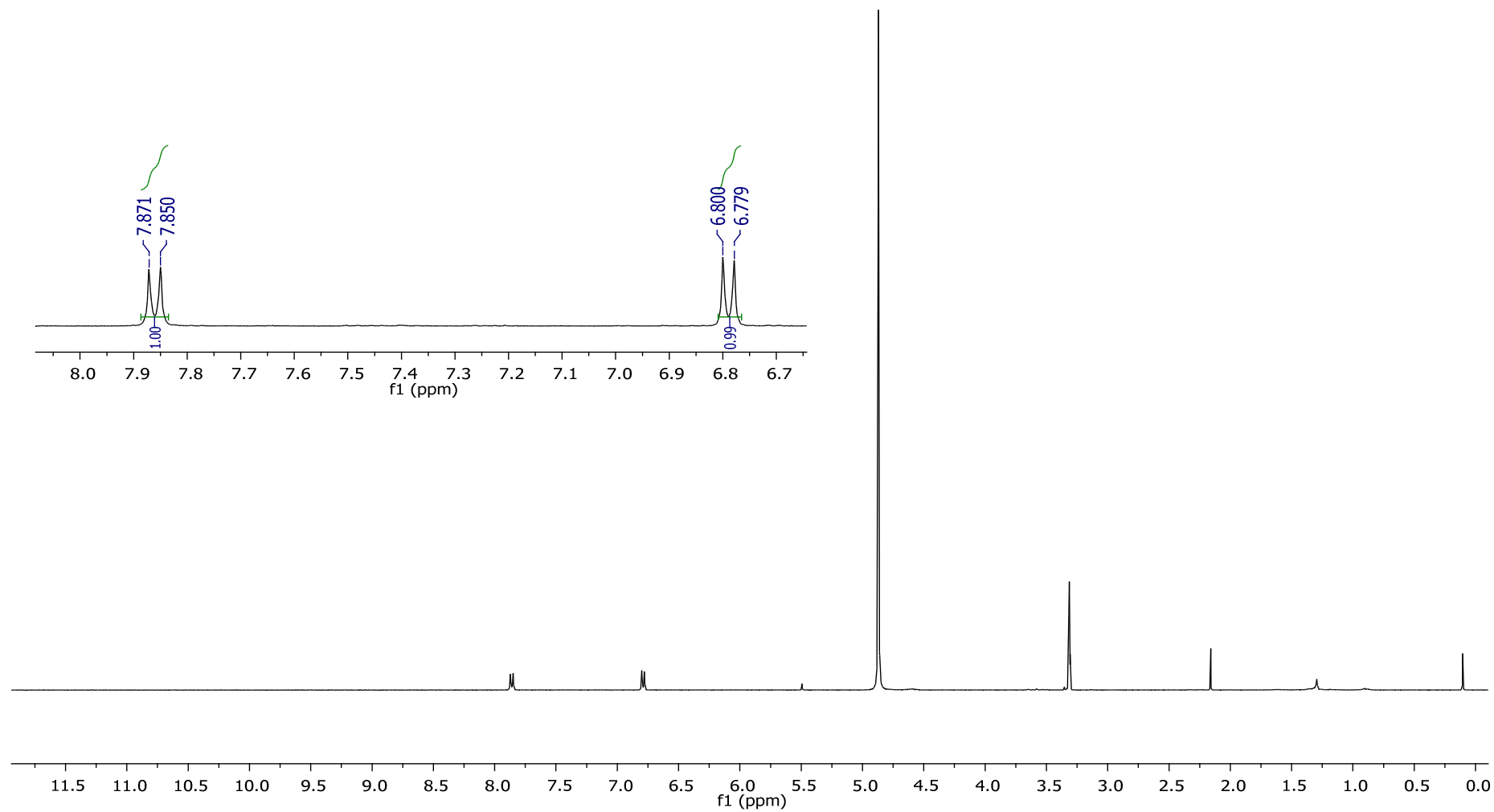


Figura 26: Espectro de RMN de ¹H da substância **3** (ácido *p*-hidroxibenzoico) da amostra W19A 3.3p(11,7) (CD₃OD, 400MHz).

PROTON_01
W19A_34620P_13_6

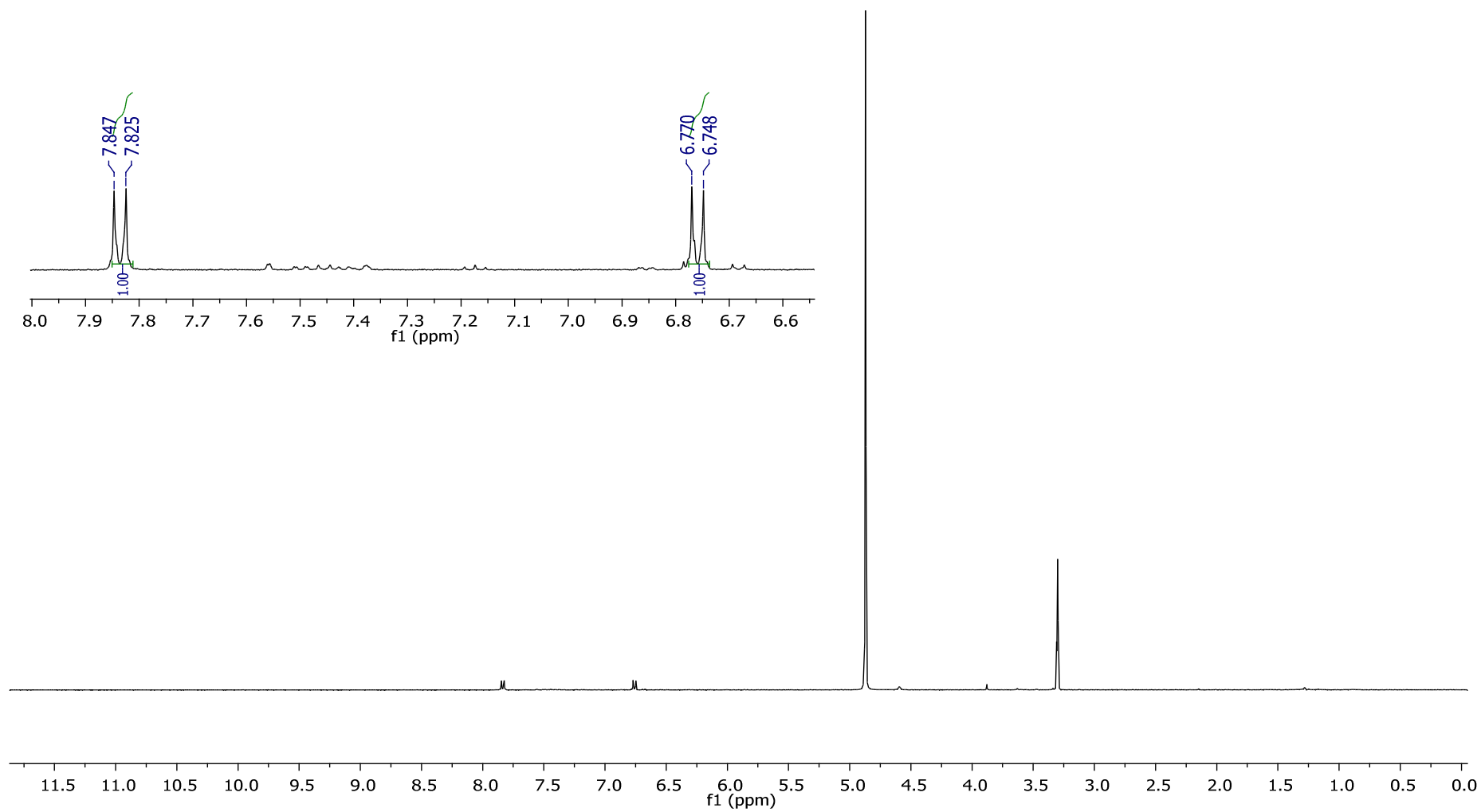
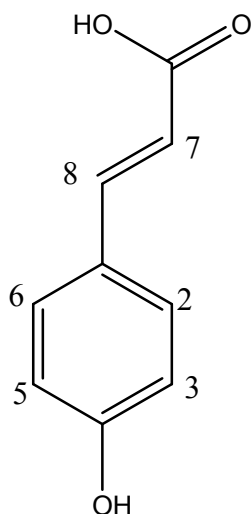


Figura 27: Espectro de RMN de ¹H da substância **3** (ácido *p*-hidroxibenzoico) da amostra W19A 3.4.6.20p(13,6) (CD₃OD, 400MHz).

5.3.2.4 Substância 4 (ácido *p*-cumárico)



<p>Substância 4 W19A 3.4.6.20p (17,6) m= 3,3mg</p>
--

Figura 28: Estrutura química do ácido *trans p*-cumárico (4).

O sólido branco W19A 3.4.6.20p(17,6) ($m = 3,3$ mg), solúvel em metanol, foi isolado da subfração W19A 3.4.6.20. Esse sólido foi solubilizado em CD_3OD e encaminhado para análise por RMN de 1H .

A análise do espectro de RMN de 1H de W19A 3.4.6.20p(17,6) (figura 29) apresentou dois sinais de hidrogênios dubletos com deslocamentos químicos em 7,43 ppm (2H, *d*, $J = 8,6$ Hz, H-2 e H-6) e 6,79 ppm (2H, *d*, $J = 8,6$ Hz, H-3 e H-5) que acoplam-se entre si (tabela 5). Esses sinais integram para dois hidrogênios cada, indicando que tais pares de hidrogênios são quimicamente equivalentes, o que representa uma molécula com anel aromático 1,4-dissubstituído.

Um sinal de hidrogênio dubleto com deslocamento químico de 6,27 ppm ($J = 16,0$ Hz, H-7) e outro sinal de hidrogênio dubleto com deslocamento químico em 7,57 ppm ($J = 16,0$ Hz, H-8), acoplam-se entre si, e o valor da constante de acoplamento é característico de um sistema α,β -insaturado com posicionamento *trans* entre seus hidrogênios. Dessa forma, atribuiu-se a presença de hidrogênios olefínicos na estrutura da substância (KALINOWSKA, LADERIERE, CHAMPAGNE *et al.*, 2013; SOUZA FILHO, PEREIRA e BAYAMA, 2005).

Sabe-se que a forma *trans* do ácido *p*-cumárico é mais estável, porém ele está suscetível a um processo chamado fotoisomerização, que promove sua conversão para a forma *cis* após algumas horas recebendo radiação UV. A radiação excita o elétron do orbital π ligante para o orbital π^* antiligante, fazendo com que a ligação permaneça, momentaneamente, apenas na forma ligação sigma. Esse tipo de ligação permite a rotação da estrutura da molécula. Quando o elétron volta ao seu orbital ligante pode ocasionar a formação do isômero, passando da conformação *trans* para a conformação *cis* (figura 29) (CAREY e SUNDBERG, 2007).

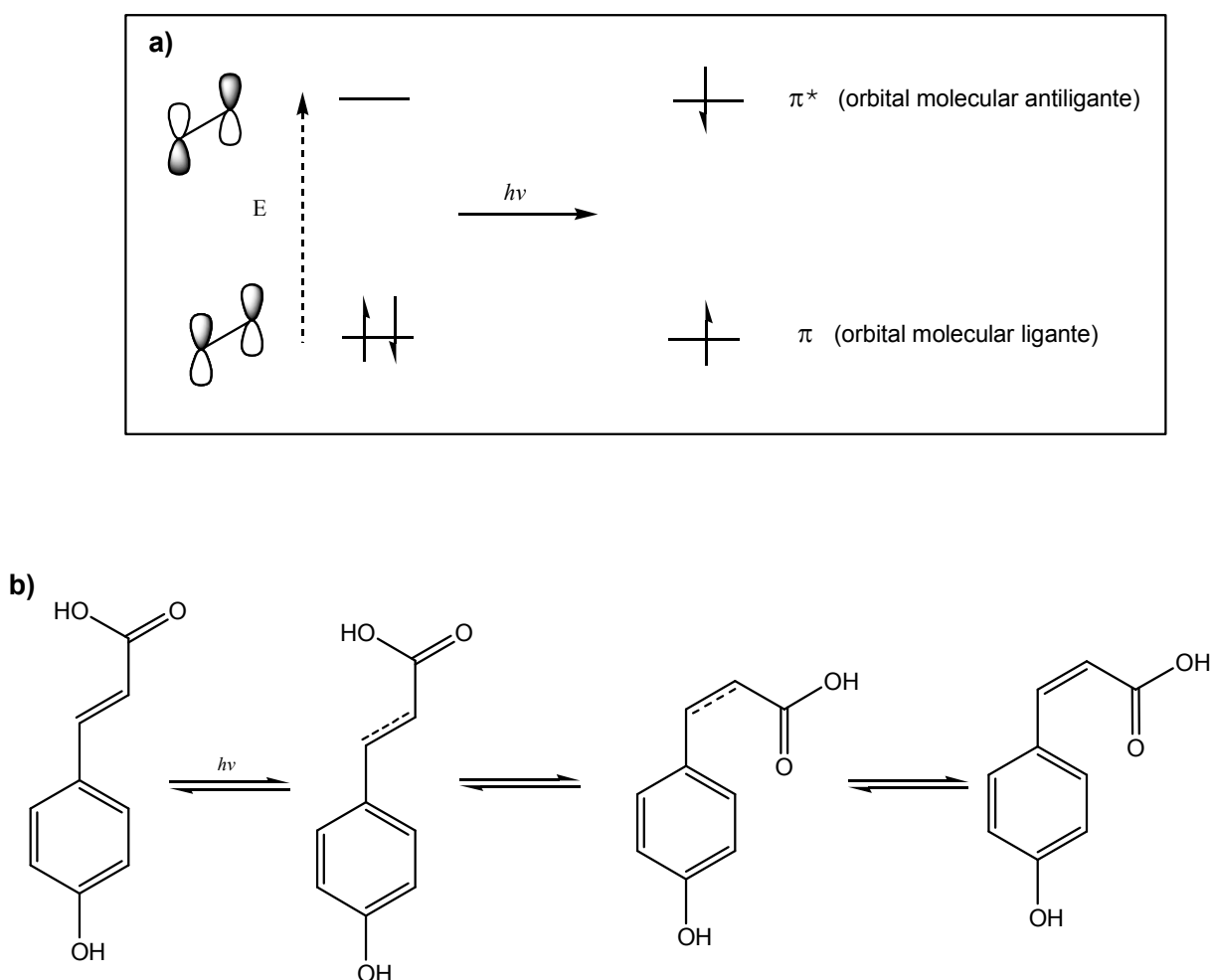


Figura 29: (a) Representação da excitação de elétrons π quando absorvem energia; (b) Conversão do ácido *trans* *p*-cumárico em ácido *cis* *p*-cumárico.

Esse fato foi confirmado pelos sinais característicos de hidrogênios de um sistema α,β -insaturado, que aparecem no espectro de RMN de ^1H (figura 30) com deslocamentos químicos em 5,77 ppm (1H, *d*, $J = 12,8$ Hz) e 6,69 (1H, *d*, $J = 12,8$ Hz), e os hidrogênios dubletos com deslocamentos químicos em 7,56 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz, H-2 e H-6) e 6,71 ppm (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz, H-3 e H-5) que possuem acoplamento entre si, representando uma molécula com anel aromático 1,4-dissubstituído (KORT, VONK, XU *et al.*, 1996).

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância **4** (ácido *trans p*-cumárico) comparados com a literatura (* KALINOWSKA, LADERIERE, CHAMPAGNE *et al.*, 2013) (δ em ppm, J em Hz).

RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD)	δ ^1H (substância 4)	δ $^1\text{H}^*$
H-2 e H-6	7,43 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$)	7,49 (2H, <i>d</i>)
H-3 e H-5	6,79 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$)	6,79 (2H, <i>d</i>)
H-7	6,27 (1H, <i>d</i> , $J = 16,0$)	6,29 (1H, <i>d</i>)
H-8	7,57 (1H, <i>d</i> , $J = 16,0$)	7,52 (1H, <i>d</i>)

Dessa forma, após a comparação dos dados obtidos com a literatura, a proposta da estrutura química para a substância **4** é o **ácido *p*-cumárico** (figura 28), um ácido fenólico (KALINOWSKA, LADERIERE, CHAMPAGNE *et al.*, 2013).

O ácido *p*-cumárico é um ácido fenólico com atividade antioxidante e possui capacidade de formar complexos com metais de transição (S'WISŁOCKA, REGULSKA, SAMSONOWICZ *et al.*, 2013; KALINOWSKA, LADERIERE, CHAMPAGNE *et al.*, 2013). Estudos mostram que ele tem apresentado atividade alelopática (SOUZA FILHO, PEREIRA e BAYAMA, 2005) e é responsável por alguma atividade antimicrobiana (ESTEVINHO, PEREIRA, MOREIRA *et al.*, 2008).

PROTON_01
W19A_34620P_17_6B

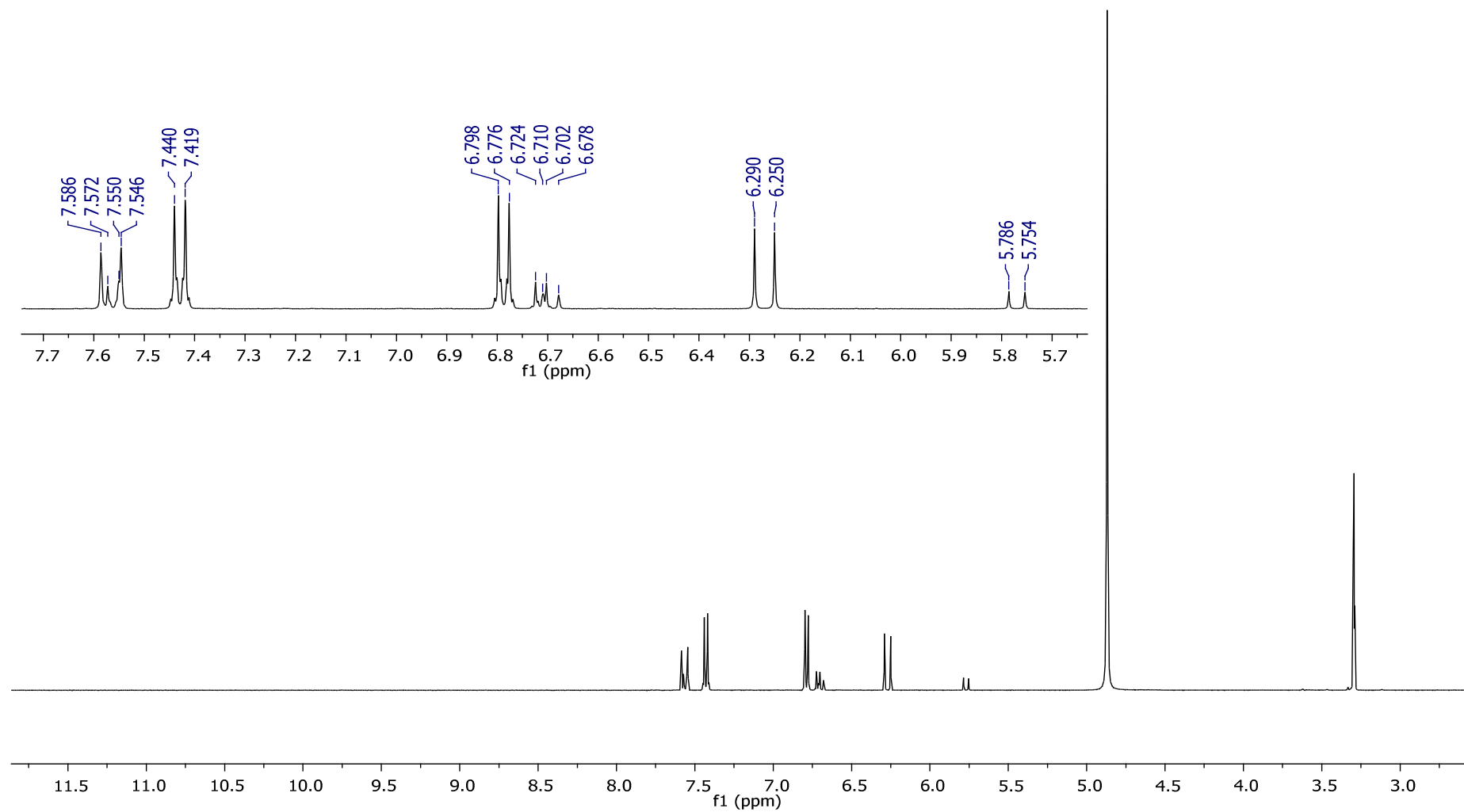


Figura 30: Espectro de RMN de ¹H da substância **4** (ácido *p*-cumárico) (CD₃OD, 400MHz).

5.3.3 Derivados Terpenoides

Os terpenoides compõem uma diversificada classe de metabólitos secundários formados a partir da união de unidades C_5 (unidade isoprênica). As unidades básicas para a biossíntese desses compostos são: dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e isopentenil pifosfato (IPP) (figura 31). A partir delas, várias estruturas podem ser formadas, e posteriormente modificadas por diversas reações orgânicas, originando uma grande quantidade de derivados, cujos esqueletos carbônicos são representados por $(C_5)_n$. Os compostos dessa classe de metabólitos são classificados como: hemiterpenoides (C_5), monoterpênicos (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), sesterpenoides (C_{25}), triterpenoides (C_{30}) e tetraterpenoides (C_{40}) (PADUCH, SZERSZEN e TRYTEK, 2007; DEWICK, 2002).

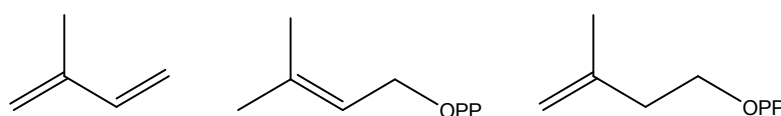


Figura 31: Estruturas químicas do isopreno (C_5), DMAPP e IPP, respectivamente.

Os terpenoides constituem o grupo mais complexo e diversificado de metabólitos secundários e o segundo maior em termos de relevância farmacológica (FELIU, 2011). Na medicina popular, bem como na terapêutica, plantas contendo derivados terpênicos têm sido usadas como tranquilizantes, sedativas e anticonvulsivantes. Os óleos voláteis, que em sua maioria são constituídos por mono e sesquiterpenoides, também possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva (PASSOS, ARBO, RATES *et al.*, 2009). Podem também atuar como inseticidas naturais e protetores que aumentam o tempo de armazenagem de produtos agrícolas (FELIU, 2011; PADUCH, SZERSZEN e TRYTEK, 2007).

Dentre tantos derivados destacam-se nesse trabalho os triterpenoides (C_{30}) e os tetraterpenoides (C_{40}), também chamados de carotenoides (C_{40}).

Triterpenoides são metabólitos secundários não esteroidais presentes na flora e da fauna terrestres e marinhos. Ocorrem na forma livre, bem como nas formas de éter, éster e glicosídeos (MAHATO e KUNDU, 1994).

Os triterpenoides apresentam uma extensa variedade de compostos presentes nos vegetais, com amplo e diversificados tipos de estruturas e funcionalizações. Alguns desses triterpenos ocorrem com frequência maior, principalmente os que apresentam apenas um grupo funcional no C-3. São pentacíclicos ou tetracíclicos, e contém no máximo uma ou duas ligações duplas respectivamente. Exemplos característicos são o lupeol, a α -amirina e a β -amirina. Além disso, quando um extrato vegetal contém diversos triterpenoides, o seu fracionamento dificilmente leva ao isolamento de substâncias puras, sendo possível identificá-las em mistura (OLEA e ROQUE, 1990).

Os carotenoides são compostos instáveis, no que se refere a possíveis processos oxidativos, devido à sua estrutura com ligações duplas conjugadas. Assim, os carotenoides são passíveis de sofrerem reações químicas e enzimáticas que geram variados tipos de compostos (DEWICK, 2002).

Alguns dos produtos de decomposição dos carotenoides são os formados por 13, 11, 10 ou 9 átomos de carbono, e mantendo o grupo terminal característico dos carotenoides (MENDES-PINTO, 2009). Esses produtos formados pela degradação oxidativa dos carotenoides são chamados apocarotenoides (JONDIKO e PATTENDEN, 1989; DEWICK, 2002), também conhecidos como *nor*-isoprenoides. A figura 32 ilustra o processo da formação de alguns dos *nor*-isoprenoides.

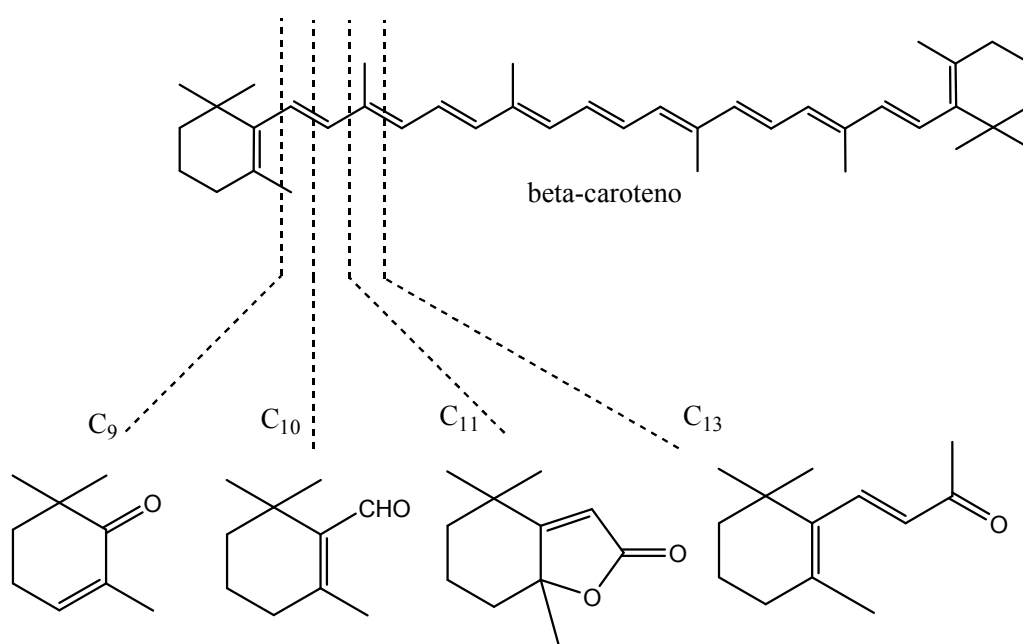


Figura 32: Formação de estruturas de *nor*-isoprenoides C₉, C₁₀, C₁₁ e C₁₃ a partir do beta-caroteno.

Os compostos formados por 13 átomos de carbono são os *nor*-isoprenoides mais abundante na natureza. Eles podem ser divididos em estrutura dos megastigmanos, incluindo a família de iononas e damasconas (figura 33), e dos não-megastigmanos. Os megastigmanos são caracterizados por possuírem um anel com seis átomos de carbono, substituídos nas posições 1, 5 e 6, sendo nesta última uma cadeia alifática de quatro átomos de carbono (MENDES-PINTO, 2009).

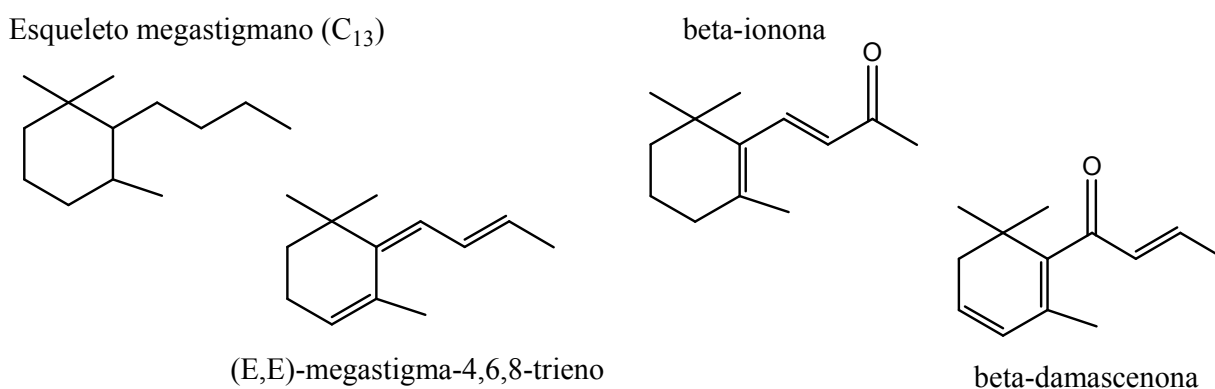


Figura 33: Estrutura de *nor*-isoprenoides megastigmanos.

A definição de uma rota biossintética para cada metabólito secundário não é simples, uma vez que se trata de substâncias produzidas pela participação de enzimas específicas em processos biológicos complexos. Portanto, as substâncias **5, 6, 7, 9 e 10**, descritas a seguir, podem ter suas rotas de biossíntese relacionadas às estruturas dos terpenoides devido às semelhanças em suas estruturas.

5.3.3.1 Substância 5 (loliolida)

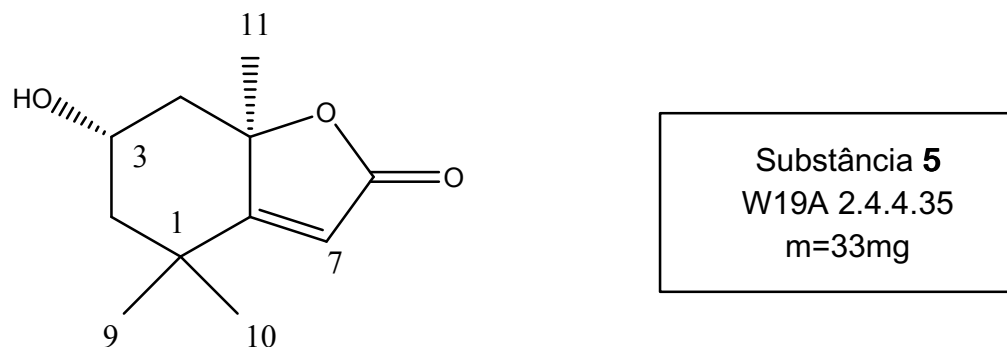


Figura 34: Estrutura química da loliolida (5).

Um sólido amarelado W19A 2.4.4.35 (m = 33 mg), solúvel em metanol e clorofórmio, foi isolado da subfração W19A 2.4.4. Esse sólido foi encaminhado para análise por RMN de ^1H e de ^{13}C .

A análise do espectro de RMN de ^1H (figura 35) apresentou um hidrogênio singlete em 5,69 ppm sem acoplamentos vicinais, que representa um hidrogênio olefínico (H-7). O hidrogênio quintupletto em 4,33 ppm é característico do hidrogênio oximetínico (H-3) que acopla com hidrogênios vicinais com $J = 3,5$ Hz.

Os sinais em 2,46 ppm (1H, *dt*, $J = 14,0$ e $2,7$ Hz, H-4), 1,97 ppm (1H, *dt*, $J = 14,4$ e $2,7$ Hz, H-2), 1,79 ppm (1H, *dd*, $J = 14,0$ e $3,5$ Hz, H-4') e 1,53 ppm (1H, *dd*, $J = 14,4$ e $3,5$ Hz, H-2'), apresentaram constantes de acoplamento geminais e vicinais estabelecidas entre eles, o que representa a presença de hidrogênios metilênicos (H-2 e H-4) na molécula. Tais constantes de acoplamento sugeriram suas posições espaciais na estrutura da molécula. Já as orientações alfa e beta desses átomos de hidrogênio foram concluídas por comparação com os dados relatados na literatura.

Também foram verificados três sinais de hidrogênios singletos integrados para três hidrogênios cada, em 1,27 ppm (H-9), 1,47 ppm (H-10) e 1,78 ppm (H-11), confirmando a presença de três metilas na estrutura química da substância (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al.*, 2002).

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 36) os deslocamentos químicos em 182,47 ppm (C-6), 171,98 ppm (C-8) e 113,10 ppm (C-7) evidenciaram a presença

de unidade lactônica α,β -insaturada, uma vez que esses sinais são característicos para esse grupo. Os demais carbonos da substância exibiram deslocamentos químicos de 86,79 ppm (C-5), 67,01 ppm (C-3), 47,47 ppm (C-2), 45,77 ppm (C-4), 36,06 ppm (C-1), 30,81 ppm (C-11), 27,16 ppm (C-10) e 26,64 ppm (C-9) (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al.*, 2002; KIM, LEE, MOON *et al.*, 2004; HONG, WANG, HSU *et al.*, 2011).

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H obtidos para a substância **5** (loliolida) e comparados com a literatura (* CONEGERO, IDE, NAZARI *et al.*, 2002) (δ em ppm, J em Hz).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)	δ ^1H (substância 5)	δ ^1H *
H-2	1,97 (1H, <i>dt</i> , $J = 14,4$ e $2,7$)	1,98 (1H, <i>dt</i> , $J = 14,4$ e $2,7$)
H-2'	1,53 (1H, <i>dd</i> , $J = 14,4$ e $3,5$)	1,53 (1H, <i>dd</i> , $J = 14,4$ e $3,5$)
H-3	4,33 (1H, <i>quint</i> , $J = 3,5$)	4,33 (1H, <i>quint</i> , $J = 3,5$)
H-4	2,46 (1H, <i>dt</i> , $J = 14,0$ e $2,7$)	2,46 (1H, <i>dt</i> , $J = 14,0$ e $2,7$)
H-4'	1,79 (1H, <i>dd</i> , $J = 14,0$ e $3,5$)	1,79 (1H, <i>dd</i> , $J = 14,0$ e $3,5$)
H-7	5,69 (1H, <i>s</i>)	5,70 (1H, <i>s</i>)
H-9	1,27 (3H, <i>s</i>)	1,27 (3H, <i>s</i>)
H-10	1,47 (3H, <i>s</i>)	1,47 (3H, <i>s</i>)
H-11	1,78 (3H, <i>sl</i>)	1,78 (3H, <i>s</i>)

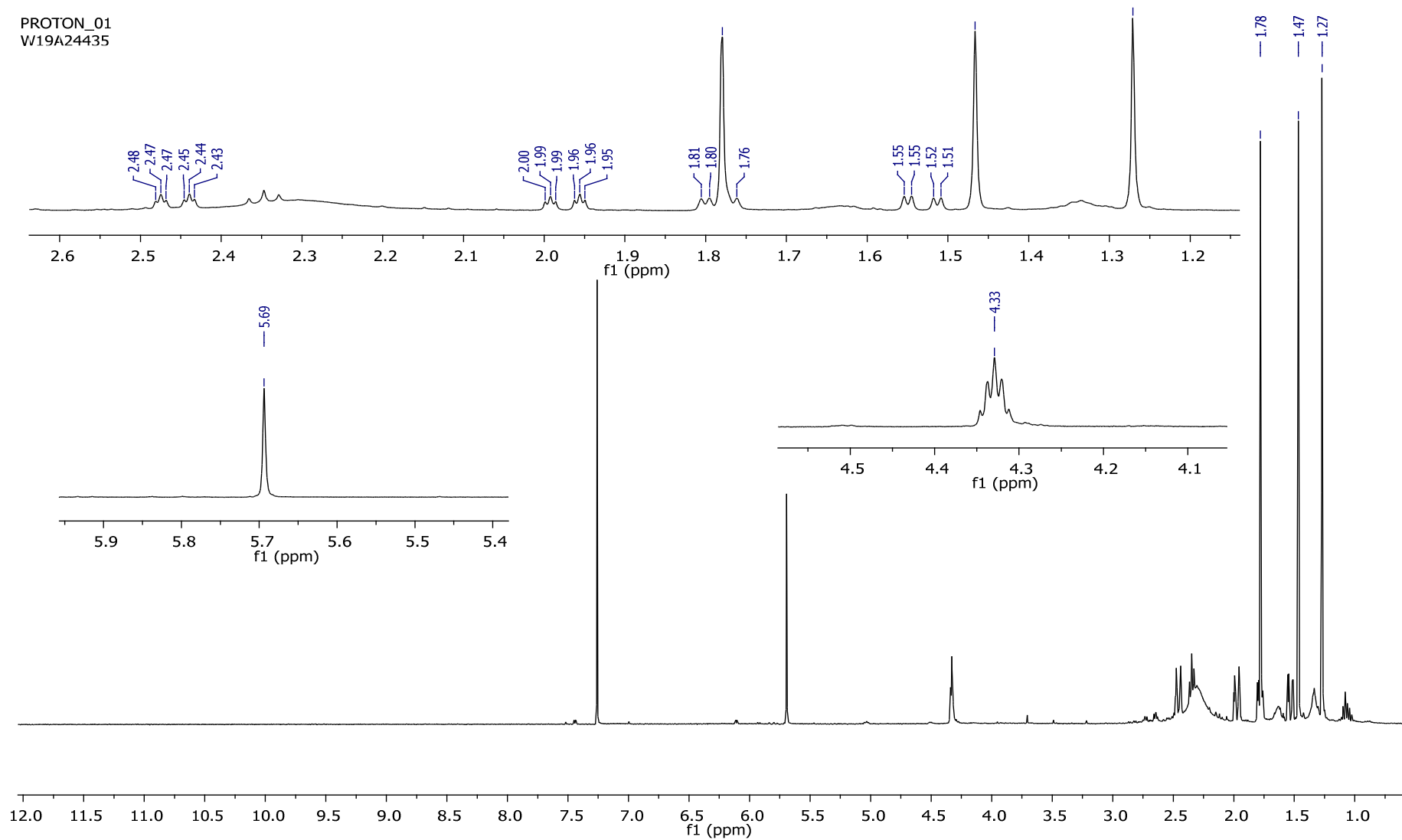


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H da substância **5** (loliolida) (CDCl_3 , 400MHz).

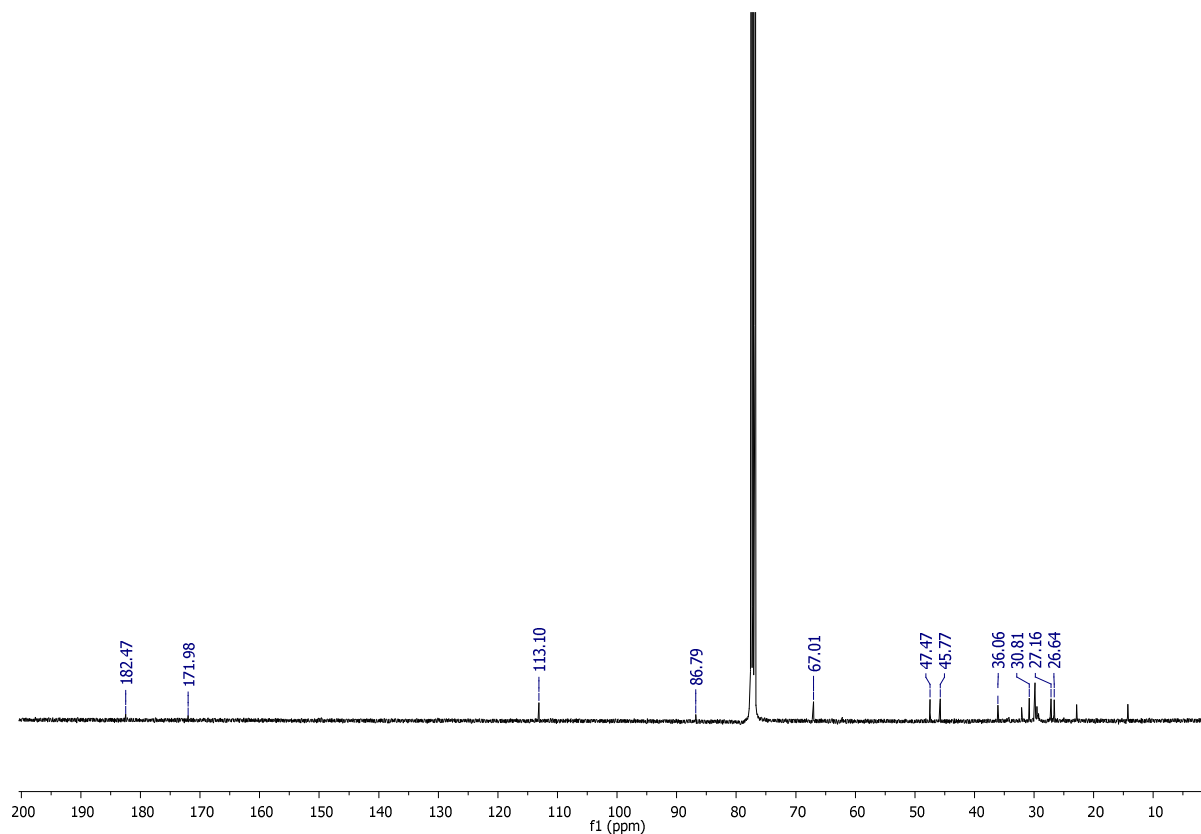


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (loliolida) (CDCl_3 , 100 MHz).

Para confirmação da estrutura, a amostra foi encaminhada à análise por espectrometria de massas de alta resolução (figura 37), realizado em modo positivo $[\text{M}-\text{H}]^+$, pelo qual obteve-se o resultado com sinal do íon molecular m/z 197,1177. A massa molecular calculada para substância proposta é de 196,11, e sua fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$ (YANG, KANG, LEE *et al.*, 2011).

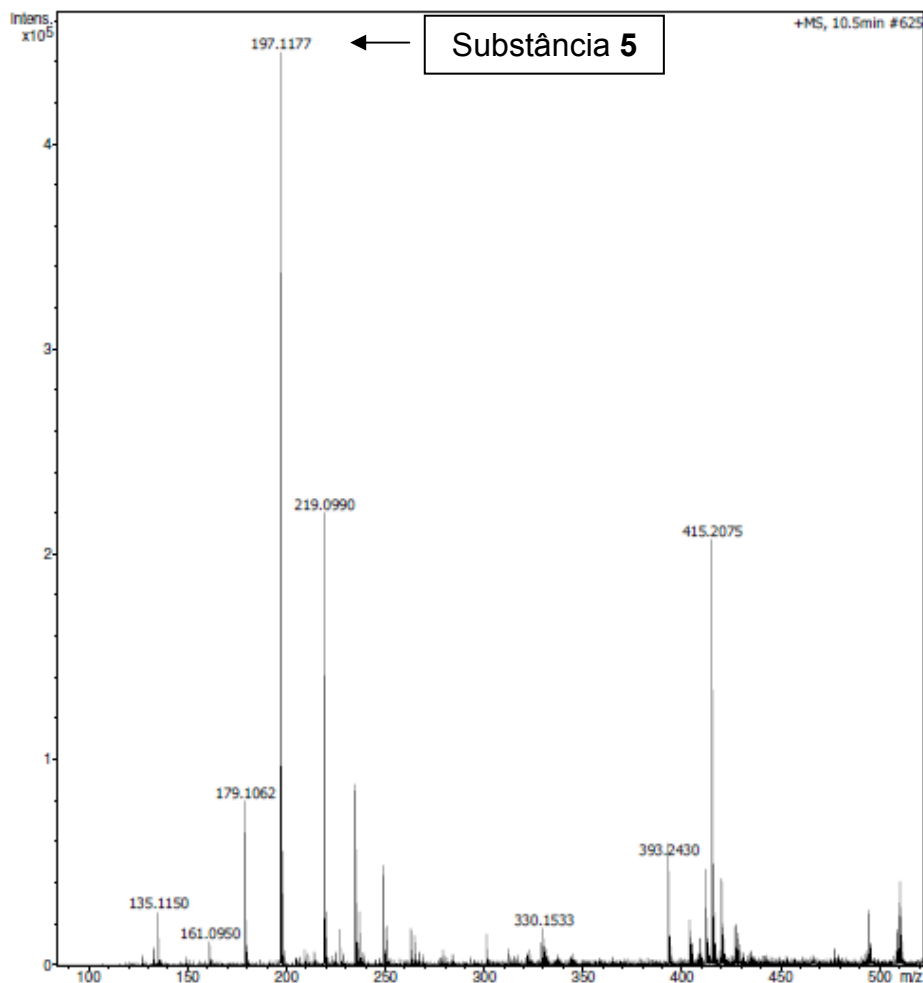


Figura 37: Espectro de massas de alta resolução da substância **5** (loliolida).

Dessa forma, após a comparação dos dados obtidos com a literatura (tabela 6), a proposta da estrutura química para a substância **5** é a **loliolida** (figura 34), um *nor*-isoprenoide C₁₁, originado da degradação oxidativa dos carotenos, cuja estrutura química difere da dihidroactinidiolida pela presença de um grupo OH em C-3 (ZELENA, HARDEBUSCH, HULSDAU *et al.*, 2009).

Segundo a literatura, a loliolida é uma lactona terpênica que possui diversas atividades biológicas que incluem ação repelente, inibidora de germinação, citotóxica em carcinoma humano de nasofaringe e leucemia linfóide (CONEGERO, IDE, NAZARI *et al.*, 2002), além de ser imunossupressora (OKADA, SHIRATA, NIWANO *et al.*, 1994). Ela já foi isolada em diversas espécies. Na família Malvaceae ela já foi identificada em *Sida acuta* (JANG, PARK, KANG *et al.*, 2003) e em *Malachra fascinata* (RAGASA, AGBAYANI, HERNANDEZ *et al.*, 1997).

5.3.3.2 Substância 6 (vomifoliol)

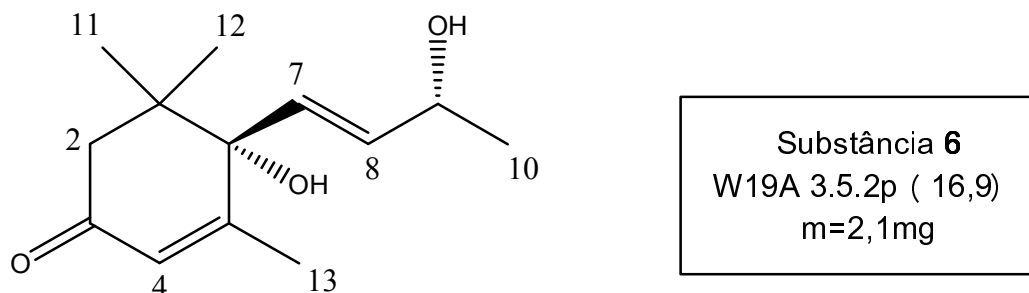


Figura 38: Estrutura química do vomifoliol (6).

Um sólido W19A 3.5.2p(16,9) ($m = 2,1\text{mg}$) solúvel em metanol e em clorofórmio, foi isolado da subfração W19A 3.5.2. Essa amostra foi encaminhada para análise por RMN de ^1H e HMBC.

A análise do espectro de RMN de ^1H da amostra W19A 3.5.2p(16,9) (figura 40) apresentou sinais com deslocamento químico em 5,87ppm (1H, *t*, $J = 1,2$ Hz, H-4), 5,80 ppm (1H, *dd*, $J = 15,6$ e 4,3 Hz, H-8) e 5,79 ppm (1H, *d*, $J = 15,6$ Hz, H-7) são característicos de hidrogênios olefínicos presentes na estrutura química da substância. Os hidrogênios que possuem deslocamento químico em 5,80 e 5,79 ppm possuem acoplamentos em $^3J = 15,6$ Hz, caracterizando um sistema *trans*.

Já o sinal em 4,31 ppm (1H, *dquad*, $J = 6,5$ e 4,3 Hz) é característico de um hidrogênio oximetínico (H-9), que acopla com três hidrogênios de uma metila vicinal com $J = 6,4$ Hz e com um dos hidrogênios olefínicos com $J = 4,3$ Hz.

Os sinais com deslocamentos químicos em 2,48 ppm (1H, *d*, $J = 17,1$ Hz) e 2,15 ppm (1H, *d*, $J = 17,1$ Hz) representam os hidrogênios metilênicos (H-2_a e H-2_b).

O sinal em 1,91 ppm (3H, *d*, $J = 1,3$ Hz) indica os hidrogênios metílicos (H-13), que acoplam a longa distância com um hidrogênio metilênico (H-2) na mesma posição espacial. O sinal em 1,23 ppm (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz) representa os hidrogênios metílicos (H-10), acoplando com o hidrogênio oximetínico (H-9). Os deslocamentos químicos em 1,03 ppm (3H, *s*) e 1,01 ppm (3H, *s*) são referentes aos hidrogênios metílicos (H-11 e H-12) (ÖKSÜZ, ULUBELEN, BARLA *et al.*, 2002; KIM, LEE, MOON

et al., 2004; HAMMAMI, JANNET, BERGAOUI *et al.*, 2004; YAMANO e ITO, 2005) (tabela 7).

A estrutura da cíclica de seis átomos de carbono foi confirmada pela observação do espectro de HMBC (tabela 7, figuras 41 e 42), que apresentou a correlação entre os hidrogênios com deslocamento químico em 2,15 ppm e 2,48 ppm (H-2_{ab}) com os carbonos em 196,1 ppm (C-3) e 77,58 ppm (C-6), como ilustrado na figura 38 (HAMMAMI, JANNET, BERGAOUI *et al.*, 2004; ÖKSÜZ, ULUBELEN, BARLA *et al.*, 2002).

Para confirmação da estrutura, a amostra foi encaminhada à análise por espectrometria de massas de alta resolução (figura 39), realizado em modo positivo [M-Na]⁺, onde obteve-se como resultado o íon molecular com sinal *m/z* 247,1304. A massa calculada para substância proposta é de 224,30, e sua fórmula molecular C₁₃H₂₀O₃ (HAMMAMI, JANNET, BERGAOUI *et al.*, 2004).

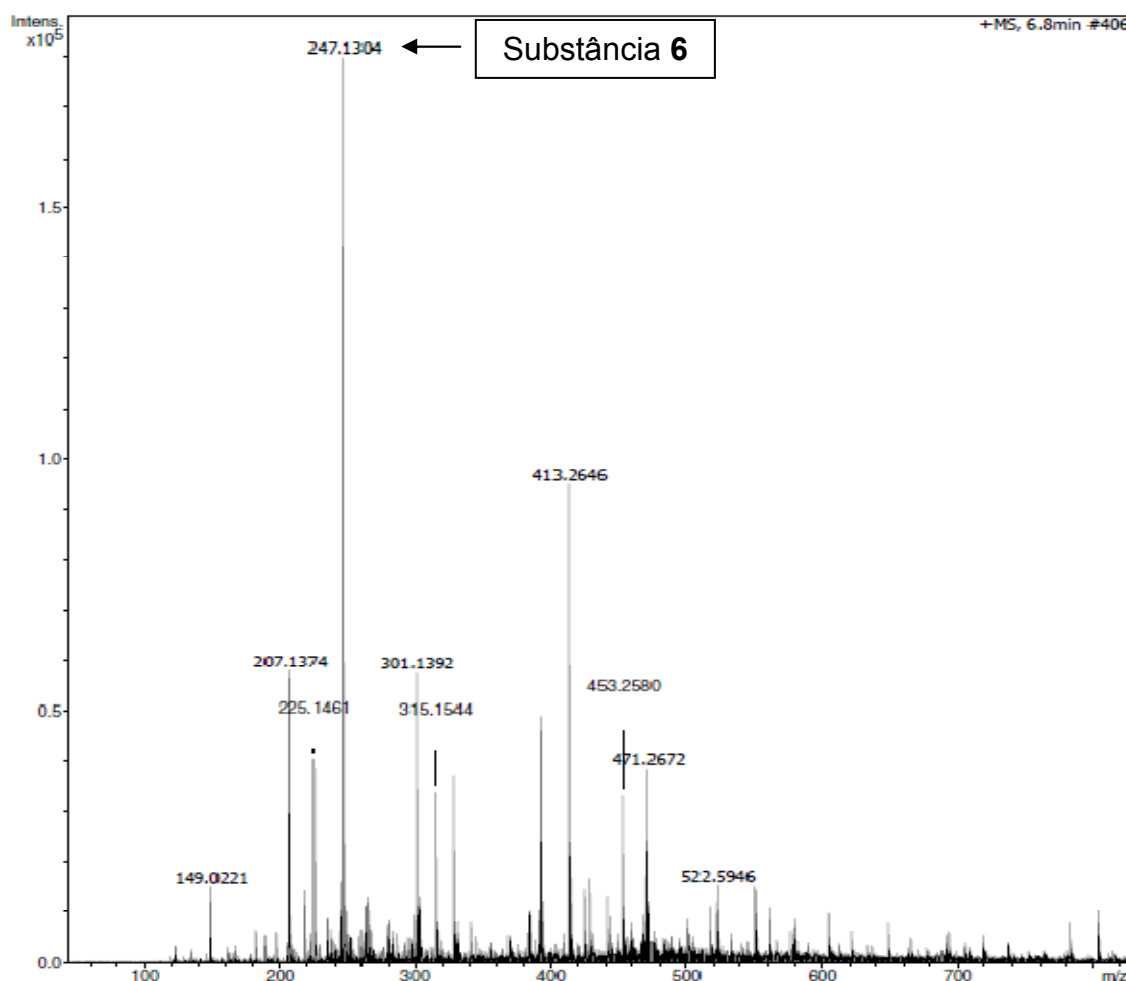


Figura 39: Espectro de massas de alta resolução da substância 6 (Vomifoliol).

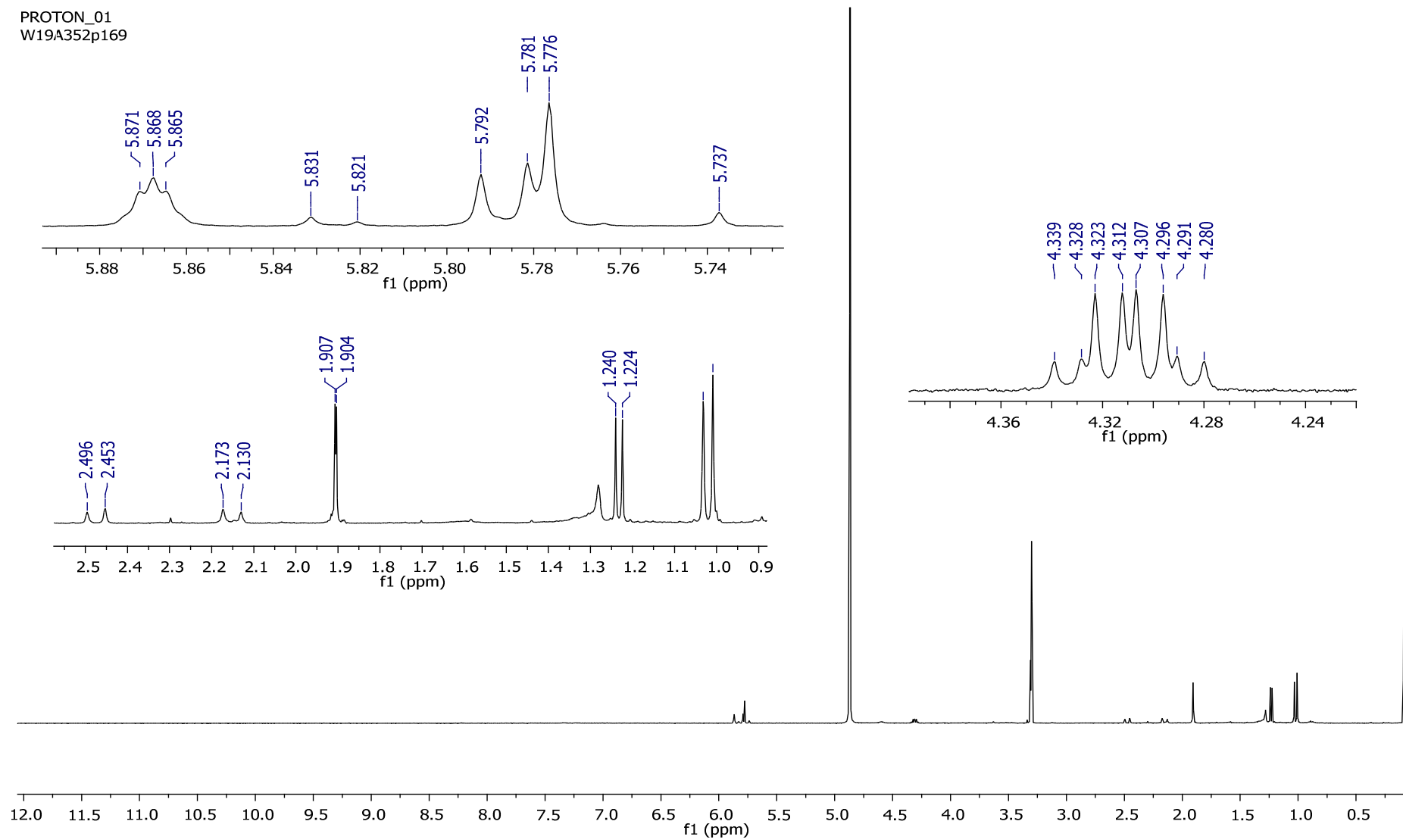


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H da substância **6** (vomifoliol) (CD_3OD , 400MHz).

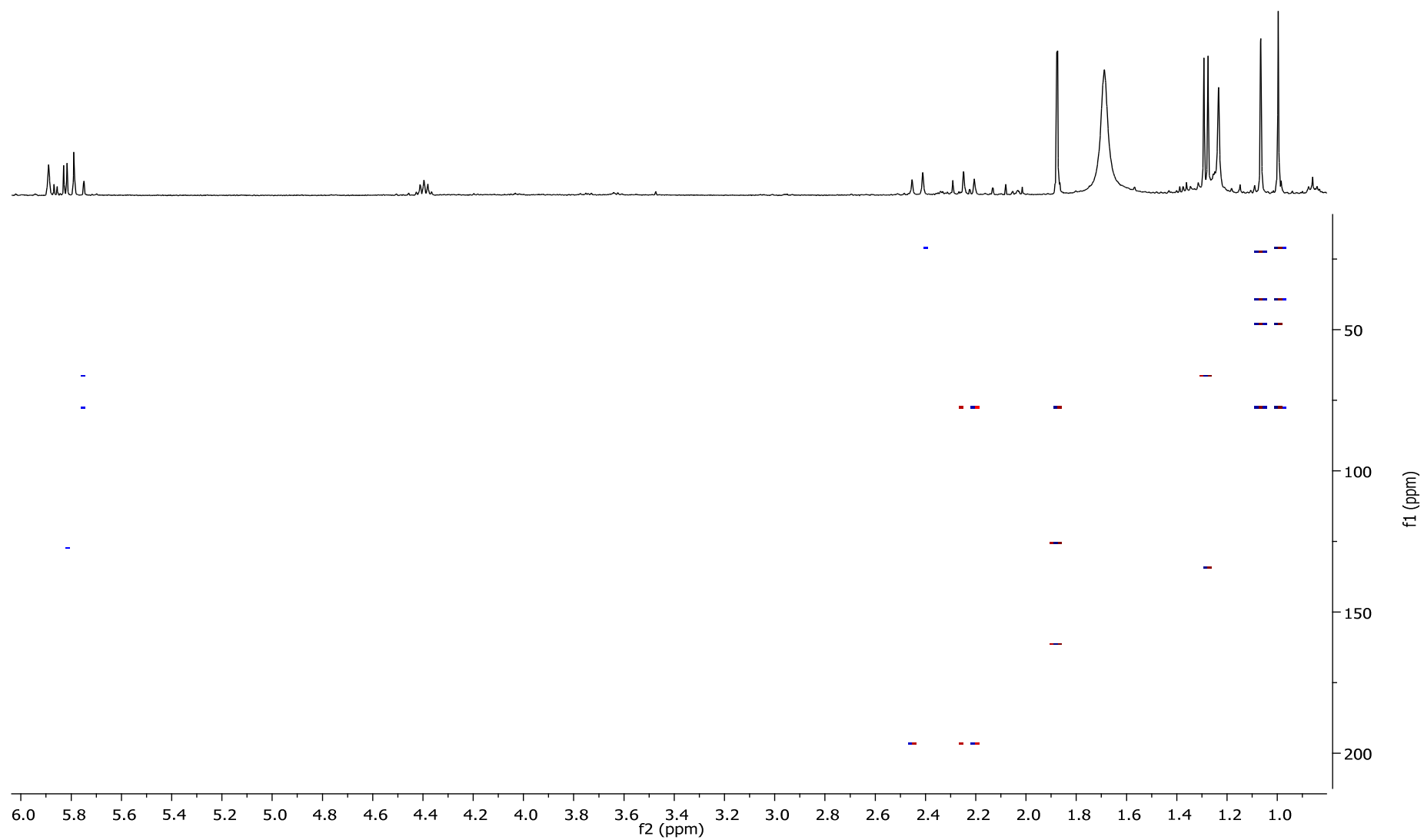


Figura 41: Mapa de contornos HMBC da substância **6** (vomifoliol) (CDCl₃, 400MHz).

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e as correlações de HMBC da substância **6** (vomifoliol) comparados com a literatura (* ÖKSÜZ, ULUBELEN, BARLA *et al*, 2002) (δ em ppm, J em Hz).

H/C	$\delta \text{ } ^1\text{H}$ (substância 6)	$\delta \text{ } ^1\text{H}^*$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$ (substância 6)	HMBC (H→C)
1	-	-	41,35	-
2 _a	2,48 (1H, <i>d</i> , $J = 17,1$)	2,47 (1H, <i>d</i> , $J = 17,0$)	49,54	3, 11, 12
2 _b	2,15 (1H, <i>d</i> , $J = 17,1$)	2,24 (1H, <i>d</i> , $J = 17,0$)	-	3, 6
3	-	-	198,24	-
4	5,87 (1H, <i>t</i> , $J = 1,2$)	5,90 (1H, <i>brs</i>)	127,83	6, 13
5	-	-	162,59	-
6	-	-	79,12	-
7	5,79 (1H, <i>d</i> , $J = 15,6$)	5,81 (1H, <i>dd</i> , $J = 14,5$)	129,4	6, 9
8	5,80 (1H, <i>dd</i> , $J = 15,6$ e 4,3)	5,85 (1H, <i>d</i> , $J = 14,0$)	136,64	6, 7, 9
9	4,31 (1H, <i>dquad</i> , $J = 6,4$ e 4,3)	4,38 (1H, <i>dq</i> , $J = 5,6$)	67,70	-
10	1,23 (3H, <i>d</i> , $J = 6,5$)	1,31 (3H, <i>d</i> , $J = 6,0$)	28,45	8, 9
11	1,03 (3H, <i>s</i>)	1,08 (3H, <i>s</i>)	22,80	1, 2, 6, 12
12	1,01 (3H, <i>s</i>)	1,00 (3H, <i>s</i>)	23,91	1, 2, 6, 11
13	1,91 (3H, <i>d</i> , $J = 1,2$)	1,90 (3H, <i>d</i> , $J = 1,5$)	18,34	4, 5, 6

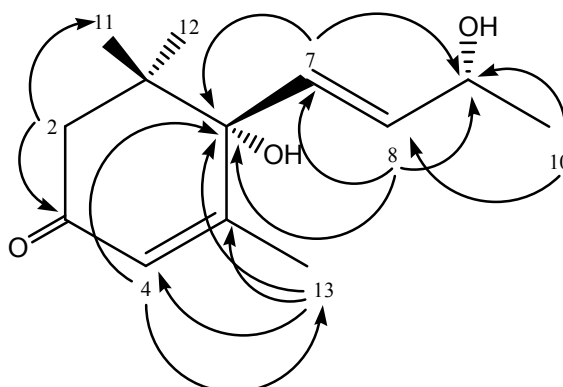


Figura 42: Principais correlações de HMBC (H→C) da substância **6** (vomifoliol).

Dessa forma, após a comparação dos dados obtidos com a literatura, a proposta para a estrutura química da substância **6** é o **vomifoliol** (figura 38). O vomifoliol, também chamado de blumenol A, possui quatro isômeros, os quais apresentam espectros de RMN com pequenas diferenças para determinação de suas estruturas. Porém, apenas o vomifoliol de configuração (6*S*,9*R*) foi isolado de produtos naturais, sendo os outros produtos de síntese (YAMANO e ITO, 2005).

Essa substância é um *nor*-isoprenoide C₁₃, um apocarotenoide formado pela clivagem oxidativa da cadeia carbônica de um caroteno (terpeno C₄₀), como exemplificado na figura 31 (DEWICK, 2002).

Trata-se de uma substância comumente encontrada em diferentes espécies de plantas, e já foi descrita na família Malvaceae na espécie *Sida acuta* (JANG, PARK, KANG *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostram que o vomifoliol apresentou moderada atividade citotóxica frente a células da linhagem COLO-250 e também demonstrou moderado efeito anti-inflamatório (BAI, HE, ROLLER *et al.*, 2011). Estudos mostram também que essa substância apresentou atividade fitotóxica, ou seja, foi capaz de inibir o crescimento de plantas (NOGUCHI, TAMURA, SASAKI *et al.*, 2012).

5.3.3.3 Substância 7 (4,5-dihidroblumenol A)

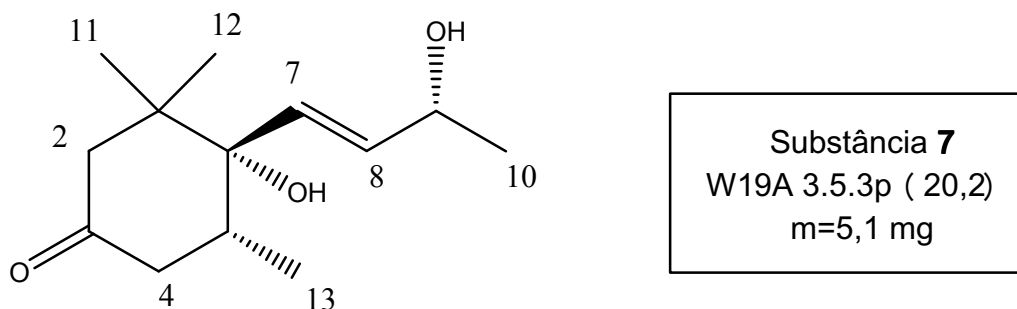


Figura 43: Estrutura química do 4,5-dihidroblumenol A (7).

O sólido W19A 3.5.3p(20,2) (5,1 mg), solúvel em metanol e em clorofórmio, foi isolado da subfração W19A 3.5.3. Essa amostra foi encaminhada para análise por RMN de ^1H e HMBC.

A análise do espectro de RMN de ^1H da amostra W19A 3.5.3p(20,2) (figura 45) apresentou sinais com deslocamento químico em 5,83 ppm (1H, *dd*, $J = 15,8$ e 5,7 Hz) e 5,70 ppm (1H, *dd*, $J = 15,8$ e 1,0 Hz) são sinais característicos da presença de hidrogênios olefínicos. Tais hidrogênios possuem acoplamentos em 3J de aproximadamente 16 Hz, caracterizando um sistema *trans* (H-8 e H-7). (GONZÁLEZ, GUILLERMO, RAVELO *et al.*, 1994).

Um hidrogênio duplo quintupeto apareceu em 4,43 ppm (1H, *dquint*, $J = 6,5$ e 1,0 Hz), sendo característico do hidrogênio oximetínico, que acopla com quatro hidrogênios vicinais com $J = 6,5$ Hz e com um hidrogênio a longa distância com $J = 1,0$ Hz (H-9) (GONZÁLEZ, GUILLERMO, RAVELO *et al.*, 1994).

Os deslocamentos químicos em 2,83 ppm (1H, *d*, $J = 13,5$ Hz) e 1,91 ppm (1H, *dd*, $J = 13,6$ e 2,1 Hz) são referentes à um par de hidrogênios metilênicos geminais (H-2), enquanto que os deslocamentos químicos em 2,42 ppm (1H, *t*, $J = 13,5$ Hz) e 2,18 ppm (1H, *dd*, $J = 13,3$ e 2,1 Hz) referem-se aos hidrogênios metilênico geminais (H-4) de outro carbono da molécula. Esses acoplamentos indicam a posição de cada hidrogênio metilênico, já que as posições equatoriais e axiais apresentam constantes de acoplamento diferentes. Segundo comparação com a literatura, os hidrogênios axiais estão em deslocamentos químicos de 2,83

ppm (H-2_{ax}) e 2,42 ppm (H-4_{ax}), enquanto os hidrogênios equatoriais apresentam os deslocamentos químicos em 1,91 ppm (H-2_{eq}) e 2,18 ppm (H-4_{eq}) (MARINO, BORBONE, ZOLLO *et al.*, 2004).

Um hidrogênio multiplete com deslocamento químico de 2,26 ppm integrou para 1 hidrogênio (H-5), e apresentou-se acoplando com os hidrogênios da metila ligada ao mesmo carbono e com os hidrogênios metilênicos vizinhos (H-4). O sinal em 1,32 ppm (3H, *d*, *J* = 6,4 Hz) refere-se aos hidrogênios metílicos (H-10) acoplando com o hidrogênio oximetínico (H-9). Os deslocamentos químicos em 0,96 ppm (3H, *s*), 0,94 ppm (3H, *s*) e 0,87 ppm (3H, *d*, *J* = 6,4 Hz) são característicos dos hidrogênios metílicos (H-11, H-12 H-13) presentes na substância (tabela 9) (GONZÁLEZ, GUILLERMO, RAVELO *et al.*, 1994, MARINO, BORBONE, ZOLLO *et al.*, 2004).

A estrutura do anel foi confirmada pela observação do espectro de HMBC (figuras 46 e 47) que apresentou a correlação entre os hidrogênios com deslocamento químico em 1,91 ppm e 2,83 ppm (H-2_{ab}) com os carbonos em 212 ppm (C-3) e 76,9 ppm (C-6), como ilustra a figura 48 (tabela 8) (GONZÁLEZ, GUILLERMO, RAVELO *et al.*, 1994, MARINO, BORBONE, ZOLLO *et al.*, 2004).

Para confirmação da estrutura, a amostra foi encaminhada à análise por espectrometria de massas de alta resolução (figura 44), realizado em modo positivo [M-Na]⁺, onde obteve-se como resultado o íon molecular com sinal *m/z* 249,1461. A massa calculada para substância proposta é de 226,31, e sua fórmula molecular é C₁₃H₂₂O₃ (GONZÁLEZ, GUILLERMO, RAVELO *et al.*, 1994).

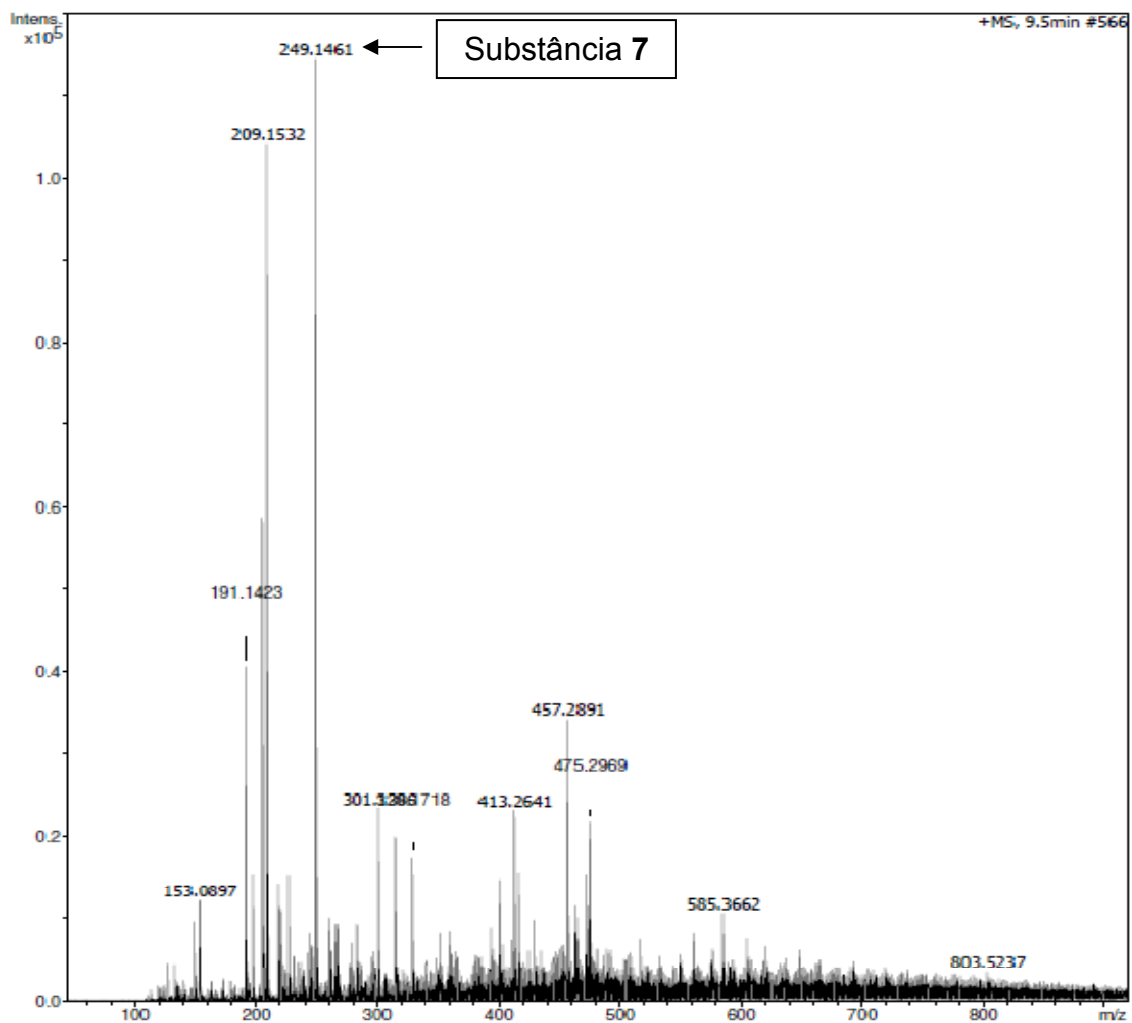


Figura 44: Espectro de massas de alta resolução da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A).

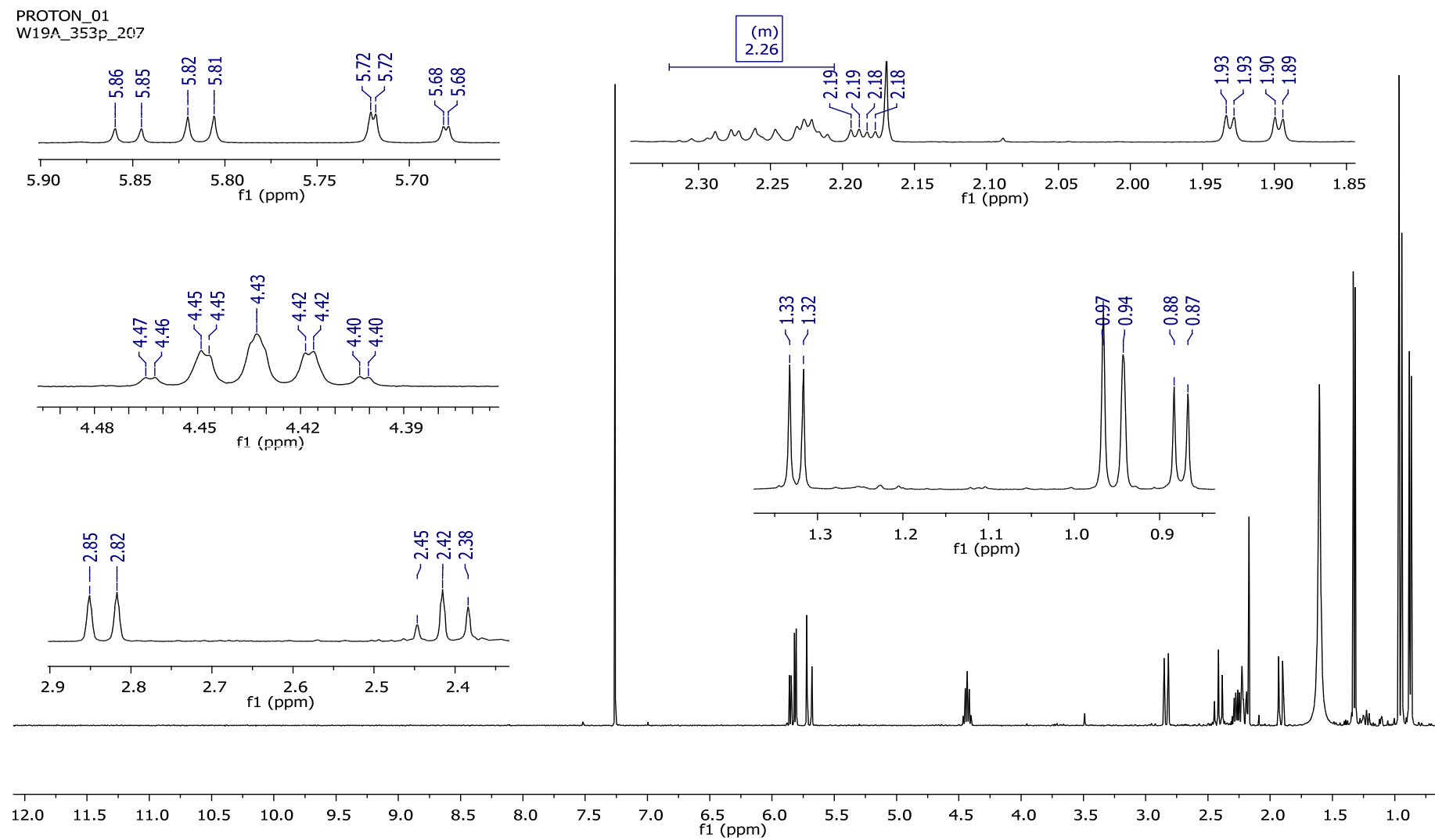


Figura 45: Espectro de RMN de ^1H da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A) (CDCl_3 , 400MHz).

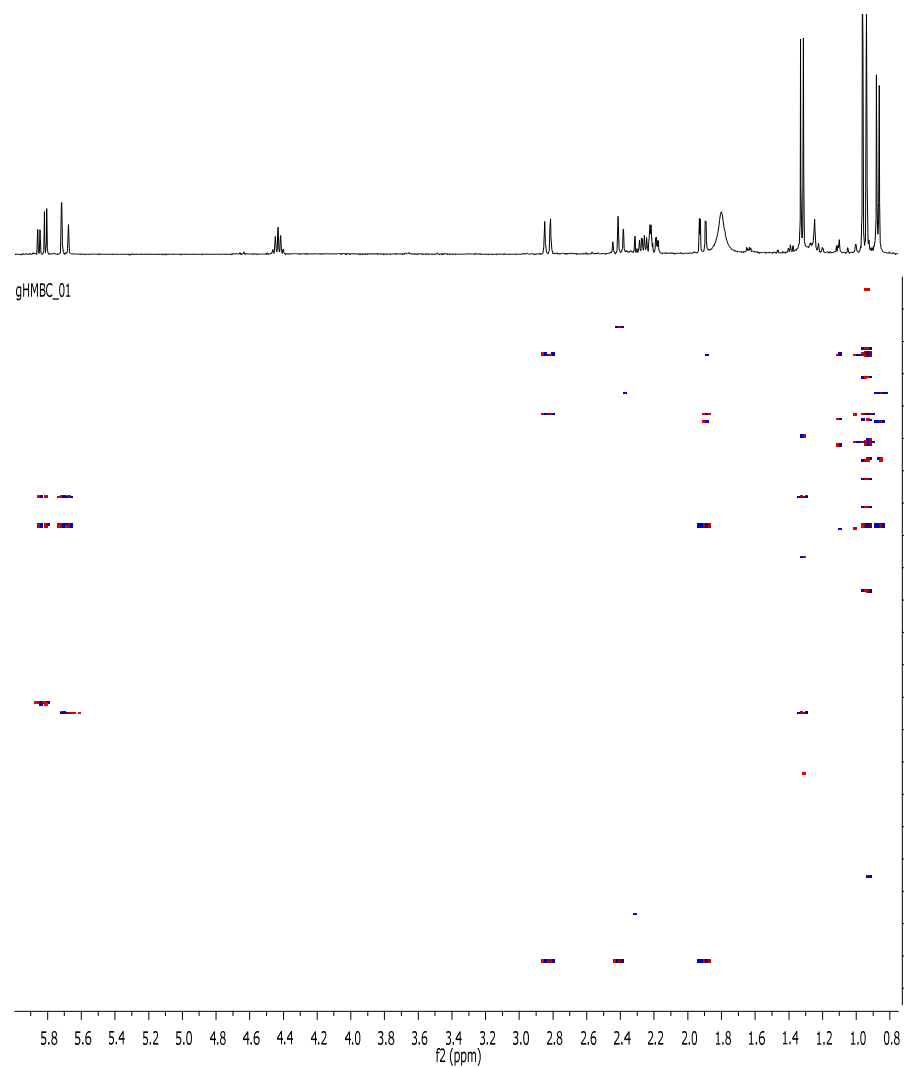


Figura 46: Mapa de contornos HMBC da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A) (CDCl_3 , 400MHz).

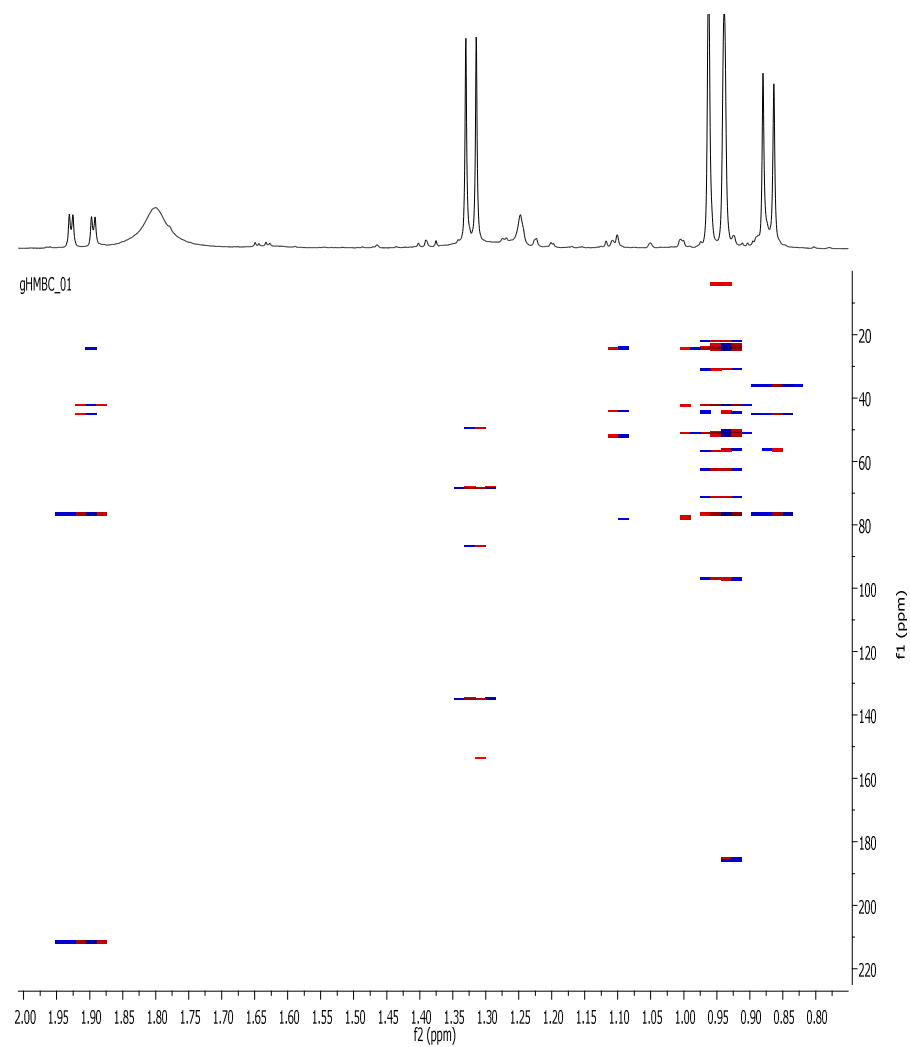


Figura 47: Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância 7 (4,5-dihidroblumenol A).

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e as correlações de HMBC da substância **7** (4,5-dihidroblumenol A) comparados com a literatura (*) (MARINO, BORBONE, ZOLLO *et al*, 2004) (δ em ppm, J em Hz).

H/C	$\delta ^1\text{H}$ (substância 7)	$\delta ^1\text{H}^*$	$\delta ^{13}\text{C}$ (substância 7)	HMBC (H→C)
1	-	-	42,2	-
2 _{ax}	2,83 (1H, <i>d</i> , $J = 13,5$)	2,87 (1H, <i>d</i> , $J = 13,4$)	51,2	1, 3, 11, 12
2 _{eq}	1,91 (1H, <i>dd</i> , $J = 13,6$ e 2,1)	1,82 (1H, <i>dd</i> , $J = 13,4$ e 2,0)	-	1, 3, 4, 6, 11, 12
3	-	-	212,0	-
4 _{ax}	2,42 (1H, <i>t</i> , $J = 13,5$)	2,45 (1H, <i>t</i> , $J = 13,4$)	45,2	3, 5, 6, 13
4 _{eq}	2,18 (1H, <i>dd</i> , $J = 13,3$ e 2,1)	2,13 (1H, <i>dd</i> , $J = 13,4$ e 2,1)	-	5, 6
5	2,28 (1H, <i>m</i>)	2,27 (1H, <i>m</i>)	36,4	13
6	-	-	76,9	-
7	5,70 (1H, <i>dd</i> , $J = 15,8$ e 1,0)	5,66 (1H, <i>dd</i> , $J = 15,8$)	131,7	6, 8, 9
8	5,83 (1H, <i>dd</i> , $J = 15,8$ e 5,7)	5,83 (1H, <i>dd</i> , $J = 15,8$ e 5,9)	135,2	6, 7, 9
9	4,43 (1H, <i>dquint</i> , $J = 6,5$ e 1,0)	4,34 (1H, <i>quint</i>)	68,6	7, 8
10	1,32 (3H, <i>d</i> , $J = 6,4$)	1,27 (3H, <i>d</i> , $J = 6,4$)	24,2	8, 9
11	0,96 (3H, <i>s</i>)	0,98 (3H, <i>s</i>)	23,9	1, 2, 6, 12
12	0,94 (3H, <i>s</i>)	0,92 (3H, <i>s</i>)	23,8	1, 2, 6, 11
13	0,87 (3H, <i>d</i> , $J = 6,4$)	0,90 (3H, <i>d</i> , $J = 6,6$)	15,8	4, 5, 6

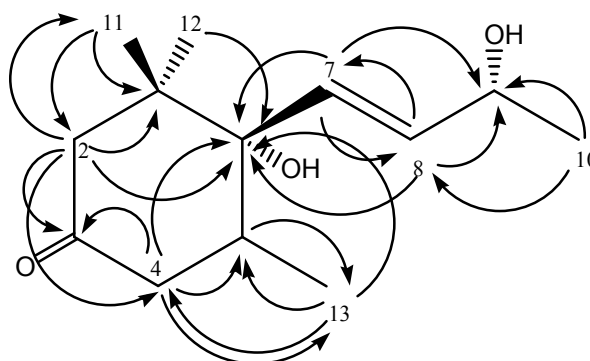


Figura 48: Principais correlações de HMBC (H→C) da substância **7** (4,5-dihidroblumenol A).

Dessa forma, após a comparação dos dados obtidos com a literatura, a proposta para a estrutura química da substância **7** é o **4,5-Dihidroblumenol A** (figura 43) (GONZÁLEZ, GUILLERMO, RAVELO *et al.*, 1994, MARINO, BORBONE, ZOLLO *et al.*, 2004).

Assim como o vomifoliol, o 4,5-dihidroblumenol A é um *nor*-isoprenoide C₁₃, um apocarotenoide formado pela clivagem oxidativa da cadeia carbônica de um carotenoide (C₄₀) (DEWICK, 2002), como exemplificado na figura 32. Por vezes, essa substância pode ser encontrada associada ao vomifoliol devido a sua rota de biossíntese.

O 4,5-dihidroblumenol A é uma substância encontrada em diferentes famílias de plantas como em *Laurus nobilis* (Lauraceae) (MARINO, BORBONE, ZOLLO *et al.*, 2004) em *Perrottetia multiflora* (Celastraceae) (GONZÁLEZ, GUILLERMO, RAVELO *et al.*, 1994) e em *Tachigali myrmecophyla* (Fabaceae) (SOUZA FILHO, LOBO e ARRUDA, 2005). Porém ainda sem registros na família Malvaceae.

O 4,5-dihidroblumenol A apresenta atividade alelopática, cujos efeitos variam em função da sua concentração e da espécie da planta daninha (SOUZA FILHO, LOBO e ARRUDA, 2005).

5.3.3.4 Substância 8 (*p*-metoxibenzoato de taraxerol)

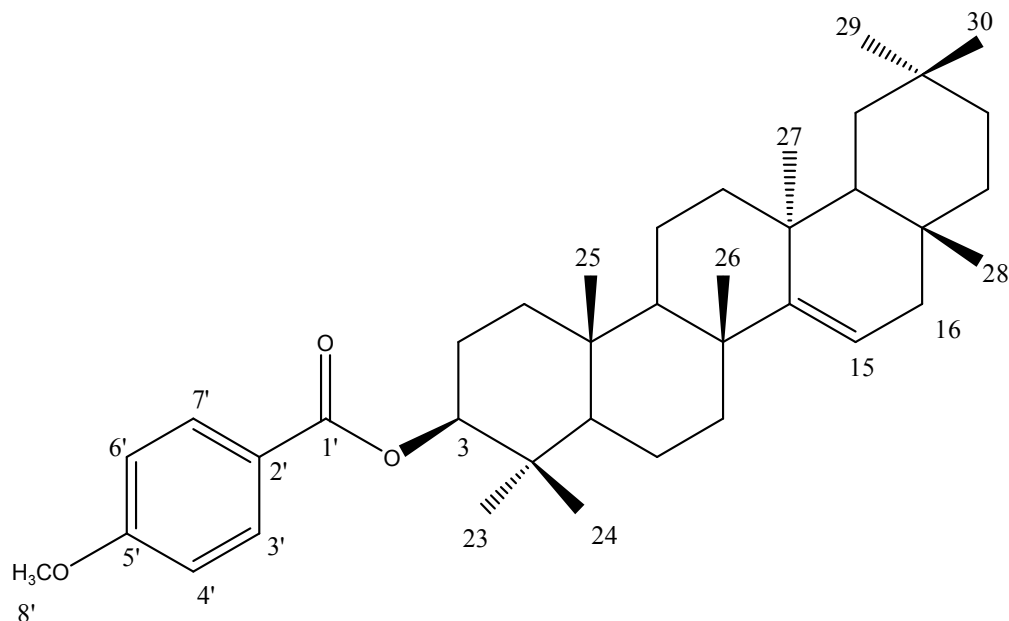


Figura 49: Estrutura química do *p*-metoxibenzoato de taraxerol (**8**).

A fração W19H 2 ($m = 2,07$ g) foi submetida à CLC em sílica gel como fase estacionária e eluição gradiente de Hex:AcOEt, sendo observada a cristalização de um material nas paredes dos tubos de ensaio. Esse material foi coletado e identificado como W19H 2cr ($m = 138,9$ mg) e em seguida encaminhado para análise por RMN de ^1H , de ^{13}C e HMBC.

A análise do espectro de RMN de ^1H da amostra W19H 2cr (figura 50) apresentou hidrogênios dubletos em 7,99 ppm e 6,92 ppm com constante de acoplamento de 8,8 Hz. Esses hidrogênios correspondem aos hidrogênios de um anel aromático 1,4-dissubstituído presente na estrutura da molécula.

Um sinal referente a um hidrogênio duplo dubleto foi observado em 4,68 ppm (1H, *dd*, $J = 5,2$ e $11,2$ Hz), sendo característico do hidrogênio oximetínico (H-3), que acopla com dois hidrogênios vicinais com constante de acoplamento diferentes devido às suas posições espaciais (KOKPOL, CHAVASIRI, CHITTAWONG *et al.*, 1990; SWAIN, ROUT e CHAND, 2012). Evidenciou-se também a presença de uma metoxila na estrutura química da substância pela presença de um sinal em 3,86 ppm (3H).

Um sinal em 5,55 ppm apresentou-se como duplo dubleto, com constante de acoplamento de 8,0 e 2,8 Hz, referente ao acoplamento com hidrogênios vicinais em posições espaciais diferente. Esse deslocamento químico é característico de hidrogênio vinílico (H-15) presente na estrutura da substância. Um sinal em 1,93 ppm confirmou a presença desses hidrogênios vicinais (H-16), pois apresentaram constantes de acoplamento de 2,8 Hz (com H-15) e 14,7 Hz (com hidrogênio geminal) (SWAIN, ROUT e CHAND, 2012). Outros sinais aparecem na região entre 1,2 e 1,85 ppm, referentes aos hidrogênios metilênicos presentes na estrutura da molécula.

Os sinais observados entre 0,83 e 1,11 ppm são característicos da presença de metilas na estrutura da substância, pois são sinais de hidrogênios singletos, que integram para 3 hidrogênios, e aparecem com deslocamentos químicos de 1,11 ppm (H-26), 1,03 ppm (H-23); 1,00 ppm (H-24); 0,96 ppm (H-27); 0,93 ppm (H-29 e H-30); 0,921 ppm (H-28) e 0,83 ppm (H-25) (KOKPOL, CHAVASIRI, CHITTAWONG *et al.*, 1990; SWAIN, ROUT e CHAND, 2012).

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 51) o deslocamento químico em 166,0 ppm corresponde ao sinal de um éster carbonílico (C-1'), e sinais característicos de carbonos aromáticos aparecem em 163,2 ppm (C-5'), 131,6 ppm (C-3' e C-7'), 123,5 ppm (C-2'), e 113,7 ppm (C-4' e C-6') (KOKPOL, CHAVASIRI, CHITTAWONG *et al.*, 1990).

Outros sinais com deslocamento químico em 158,13 ppm (C-14) e 117,08 ppm (C-15) foram observados no espectro, sendo que esses sinais são característicos para carbonos vinílicos nessas posições (SAKURAI, YAGUCHI e INOUE, 1987; MAHATO e KUNDU, 1994). Aparece ainda um sinal em 55,56 ppm que corresponde a presença de um carbono de metoxila na estrutura da molécula.

Porém, por se tratar de uma molécula com muitos dados espectroscópicos, e muitas correlações possíveis entre eles, foi realizada uma análise de HMBC (figura 52), pela qual se verificou as correlações entre os deslocamentos químicos entre ^1H e ^{13}C . Destacam-se duas correlações principais: entre H-8' (δ 3.86) com C-5' (δ 163.32), que estabeleceu a posição da metoxila no anel aromático; e entre o H-3 (δ 4.68) com C-1' (δ 166.18) que estabeleceu a esterificação do taraxerol (tabela 9).

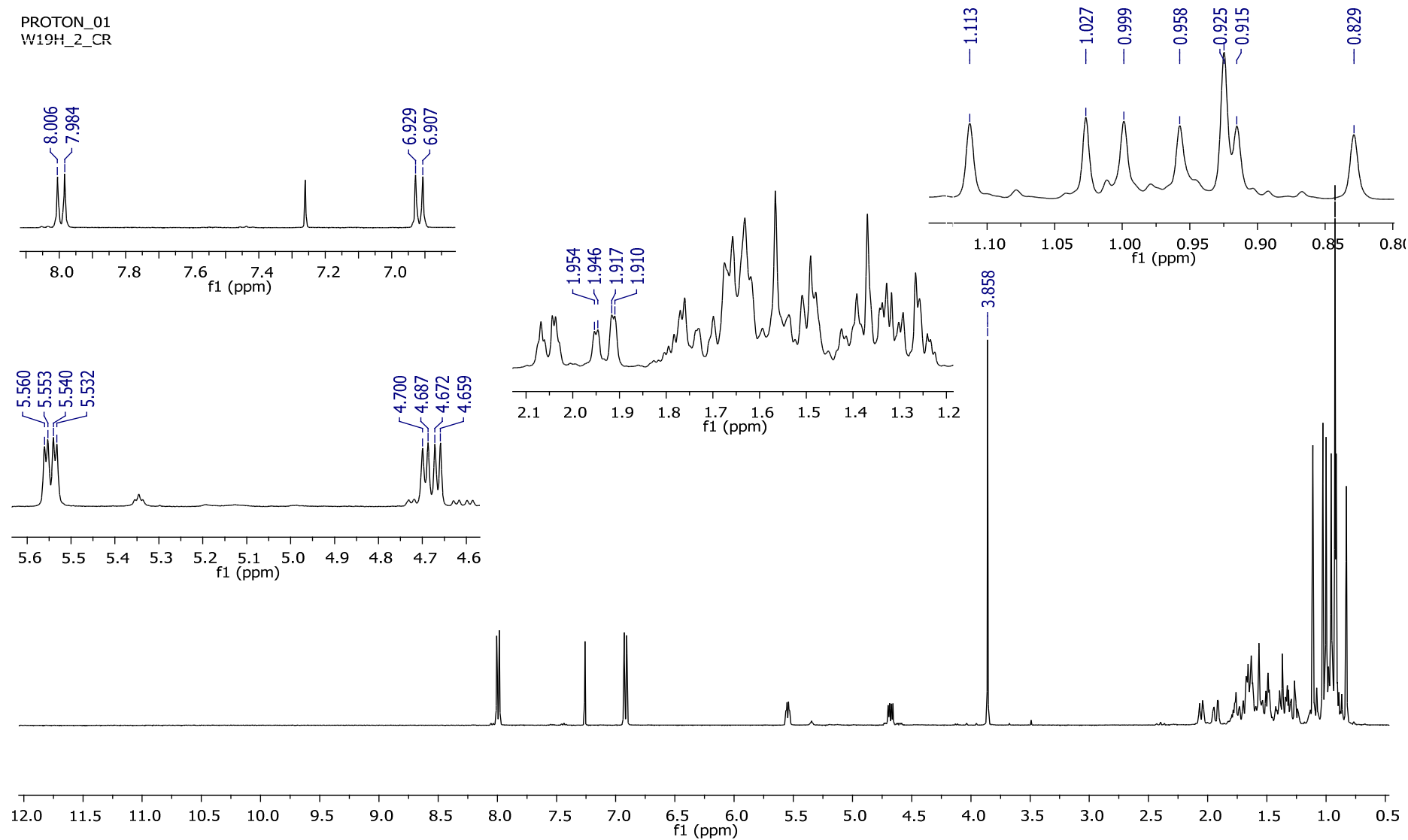


Figura 50: Espectro de RMN de ^1H da substância **8** (*p*-metoxibenzoato de taraxerol) (CDCl_3 , 400MHz).

CARBON_01
W19H_2_CR

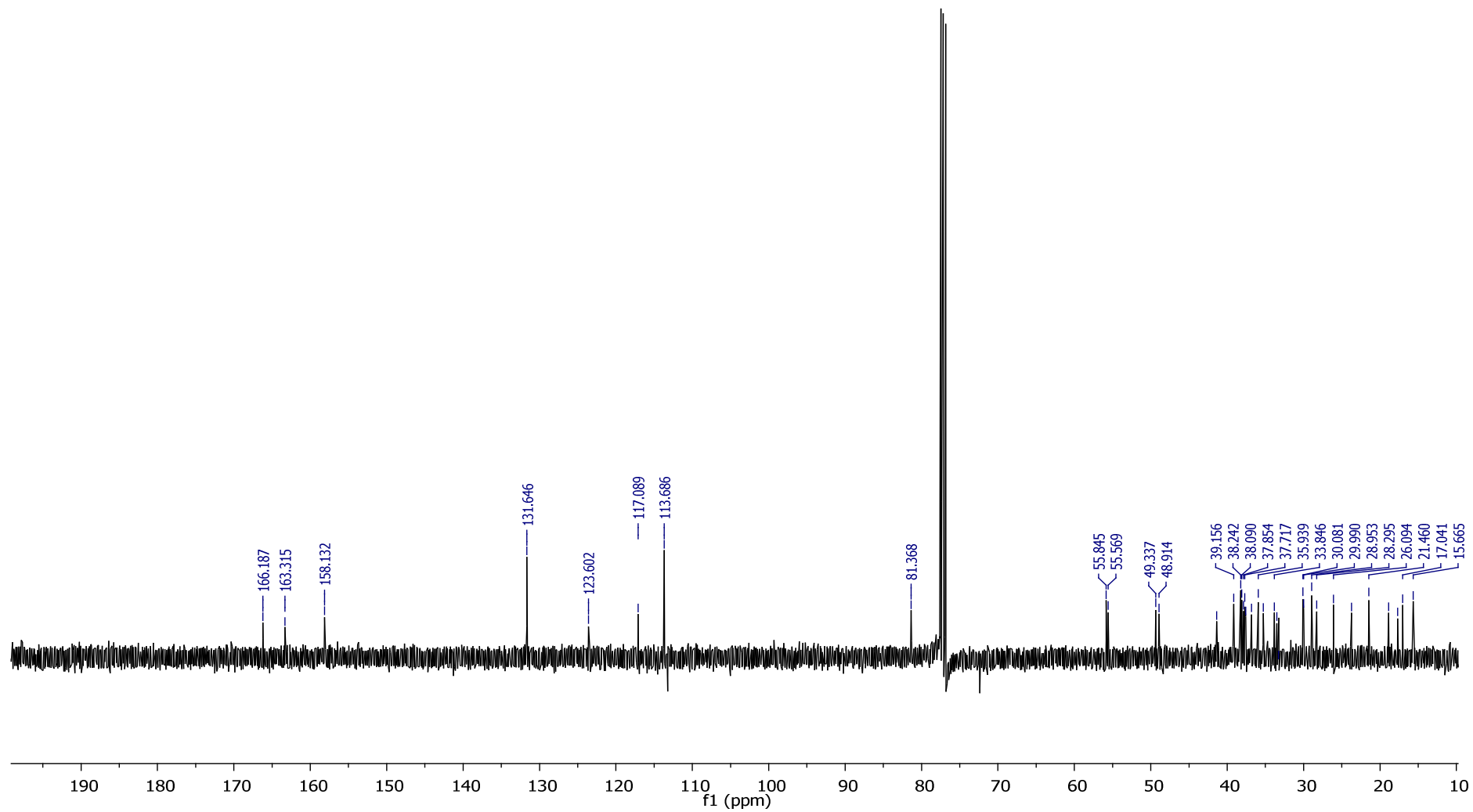


Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8** (*p*-metoxibenzoato de taraxerol) (CDCl_3 , 100MHz).

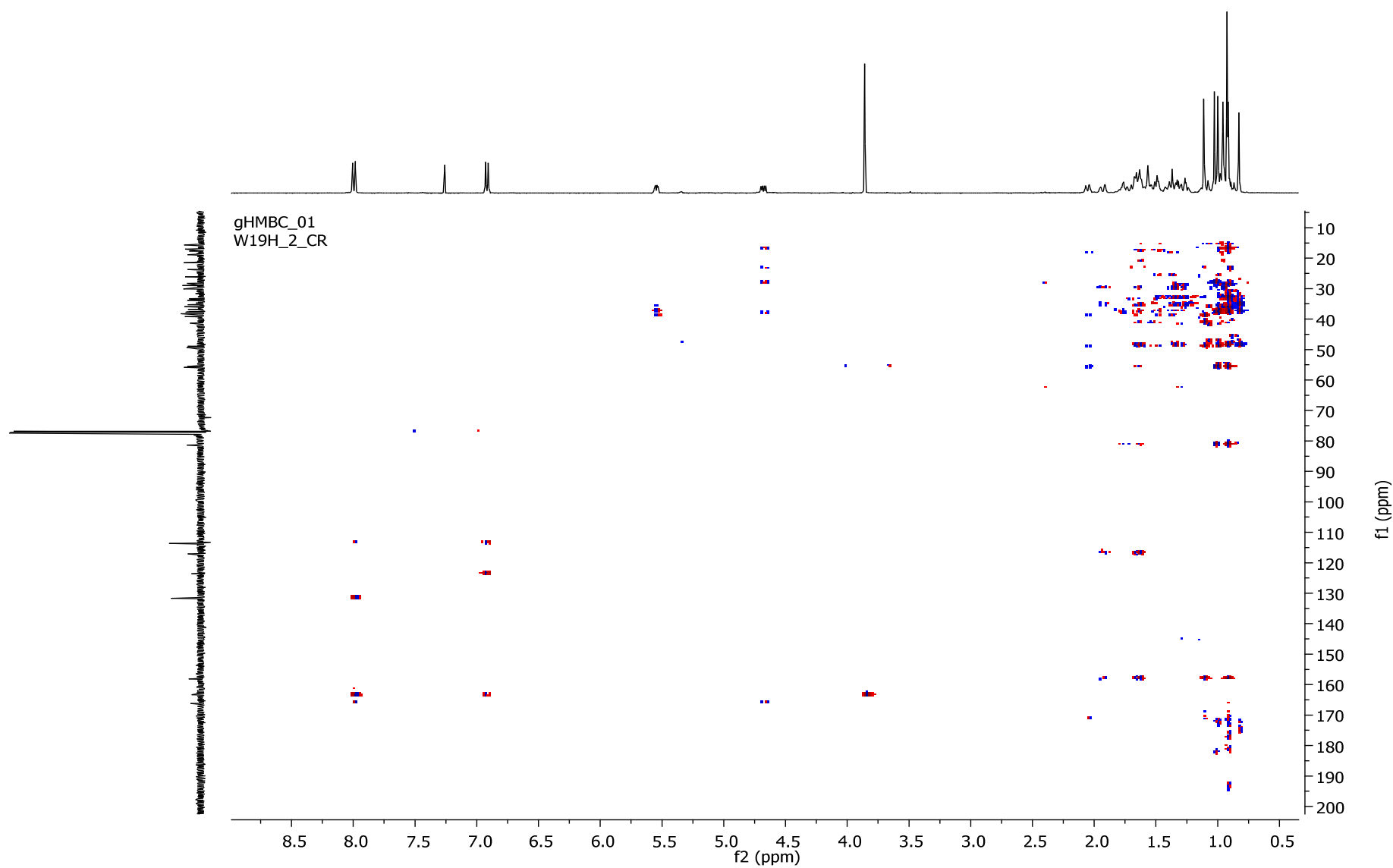


Figura 52: Mapa de contornos HMBC para substância **8** (*p*-metoxibenzoato de taraxerol) (CDCl₃).

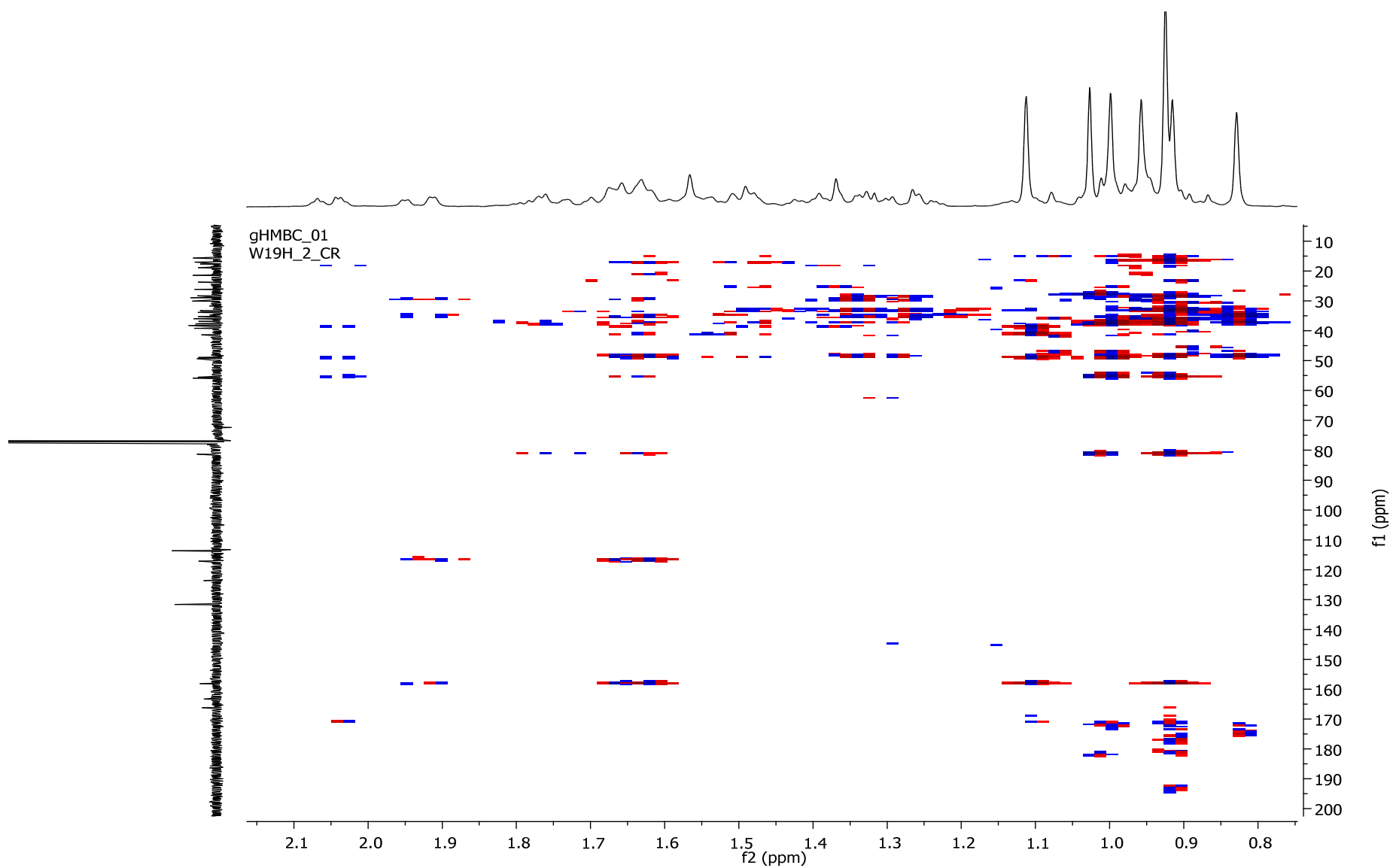


Figura 53: Expansão do mapa de contornos HMBC para substância 8

Tabela 9: RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações de HMBC para a substância **8** (CDCl_3 , δ em ppm, J em Hz).

H/C	RMN ^1H (δ), Constante de acoplamento J_{HH}	RMN ^{13}C (δ)	HMBC (H \rightarrow C)
1		37,71	
2		23,73	
3	4,68, <i>dd</i> (1H, $J = 11,2$ e $5,2$)	81,37	1, 2, 4, 23, 24, 1'
4	-	38,24	
5		55,85	
6		18,87	
7		33,28	
8	-	39,16	
9		49,34	
10	-	38,09	
11		17,69	
12		36,81	
13	-	37,85	
14	-	158,13	
15	5,55, <i>dd</i> (1H, $J = 8,0$ e $2,8$)	117,09	8, 13, 16, 17
16	1,93, <i>dd</i> (2H, $J = 14,7$ e $2,8$)	33,85	14, 15, 18, 22, 28
17	-	35,94	
18		48,91	
19		41,37	
20	-	28,95	
21		35,26	
22		37,55	
23	1,03, <i>s</i> (3H)	28,30	2, 3, 4, 5, 24
24	1,00, <i>s</i> (3H)	17,04	2, 3, 4, 5, 23
25	0,83, <i>s</i> (3H)	15,67	1, 5, 9, 10
26	1,11, <i>s</i> (3H)	26,09	7, 8, 9, 14
27	0,96, <i>s</i> (3H)	29,99	11, 12, 13, 14
28	0,92, <i>s</i> (3H)	30,08	16, 17
29	0,93, <i>s</i> (3H)	33,50	20, 21, 22, 30
30	0,93, <i>s</i> (3H)	21,46	20, 21, 22, 29
1'	-	166,18	-
2'	-	123,60	-
3', 7'	7,99, <i>d</i> (2H, $J = 8,8$)	131,65	1', 3', 4', 5' e 7'
4', 6'	6,92, <i>d</i> (2H, $J = 8,8$)	113,69	2', 4', 5', 6'
5'	-	163,32	-
8'	3,6, <i>s</i> (3H, OCH_3)	55,57	5'

A amostra W19H 2cr foi encaminhada para análise por cristalografia por difração de Raios-X aos cuidados do Prof. Dr. José Ricardo Sabino, do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás. A análise cristalográfica por difração de Raios-X foi utilizada para a confirmação da estrutura molecular e para o estudo conformacional da molécula (figura 54).

Depois de acompanhar a coleta de dados feita pelo difratômetro, a análise para a determinação da estrutura da substância foi feita pela verificação do centro de inversão e determinou-se o sistema cristalino, e assim resolveu-se a estrutura. Tudo foi feito utilizando o pacote de programas WINGX.

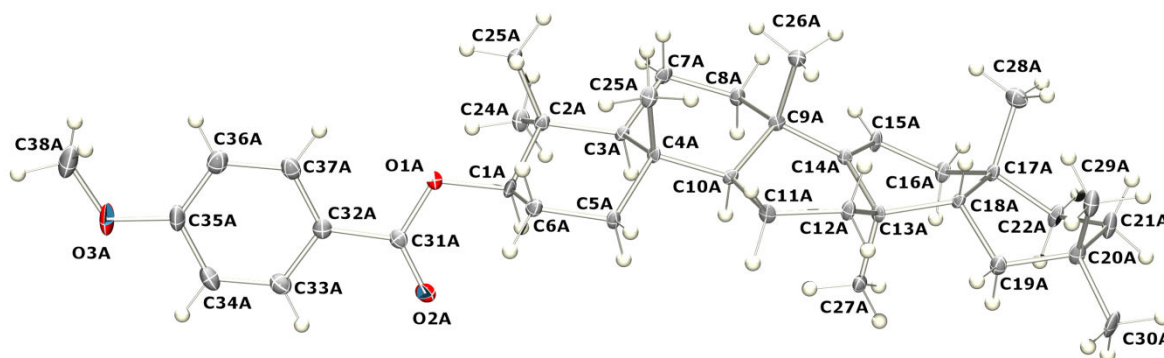


Figura 54: Representação ORTEP do *p*-metoxibenzoato de taraxerol (**8**), obtida por cristalografia de difração de Raios-X.

O cristal presente na amostra W19H 2cr possui forma molecular: $C_{76}H_{114}O_6$ e massa molecular 1121,67. A amostra utilizada para a coleta de dados foi visualmente homogênea, mas as amostras de cristais testados apresentaram geminação, o que indica que a fórmula molecular da estrutura é $C_{38}H_{56}O_3$, e massa molecular calculada de 560,35. Esse cristal tinha dimensões de 0,070 x 0,104 x 0,800 mm³. Os dados cristalográficos foram obtidos utilizando o difratômetro CAD-4, com feixe de radiação $CuK\alpha$ (0,71073 Å). Foram coletadas 19468 reflexões das quais 10131 são independentes. Foram obtidos os seguintes parâmetros cristalográficos para célula unitária:

- Dimensões da célula unitária: $a = 6.1848(4) \text{ \AA}$, $b = 7.3572(5) \text{ \AA}$, $c = 38.443(3) \text{ \AA}$
- Ângulos: $\alpha = 86.587(4)^\circ$, $\beta = 88.501(3)^\circ$, $\gamma = 65.655(3)^\circ$.
- Volume: $1590.88(19) \text{ \AA}^3$
- Grupo Espacial: P1
- Temperatura: 150 K
- Densidade Calculada: $1,173 \text{ mg/m}^3$
- Sistema Cristalino: Triclinico
- $Z = 2$ moléculas/cela

Os compostos são formados por arranjos periódicos de átomos, e a maneira como eles estão dispostos está relacionada com diversas de suas propriedades químicas, físicas e biológicas. As propriedades da difração e da interferência, que decorrem do espalhamento dos Raios-X por monocristais, são utilizadas para obter informações sobre a estrutura dos sólidos, visto que a simetria de um padrão de difração está relacionada à simetria da estrutura que o produziu, permitindo assim, determinar a forma do objeto que gerou tal padrão e, a partir das intensidades das ondas difratadas se obtém a natureza do objeto (CUNHA, 2008).

Dessa forma, após a comparação com os dados obtidos com os dados da literatura, a proposta para a estrutura química da substância **8** é o ***p*-metoxibenzoato de taraxerol** (figura 49) (SAKURAI, YAGUCHI e INOUE, 1987; MAHATO e KUNDU, 1994; KOKPOL, CHAVASIRI, CHITTAWONG *et al.*, 1990; SWAIN, ROUT e CHAND, 2012).

A molécula dessa substância **8** ainda não apresenta descrição na literatura, porém tanto o taraxerol quanto o ácido *p*-metoxibenzoico (ácido *p*-anísico) já foram descritos em relação às suas estruturas e atividades biológicas, separadamente.

O taraxerol ($C_{30}H_{50}O_3$) é um triterpenoide que já apresentou atividade antidiabética, tanto em relação à ativação do transporte da glicose pela insulina, quanto no armazenamento da glicose na forma de glicogênio (SANGEETHA, SUJATHA, MUTHUSAMY *et al.*, 2010). Estudos de *docking* mostram que sua interação com as enzimas ocorre devido ao grande número de interações

hidrofóbicas (TRINH e LE, 2013). Ele também apresentou forte atividade (78 mg/ml) contra *Staphylococcus aureus* (AMIR, WONG, ELDEEN *et al.*, 2013).

Já o ácido *p*-metoxibenzoico é um derivado do ácido benzoico. Alguns desses derivados, com um ou mais grupos hidroxila e metoxila na molécula, são conhecidos por terem várias atividades biológicas, tais como o combate aos radicais livres, atuação como quelante de metais, modulação da atividade de algumas enzimas, na aterosclerose, e com ação antimutagênica (SWISŁOCKA, REGULSKA, SAMSONOWICZ *et al.*, 2013). Ácidos metoxibenzoicos são conhecidos por serem inibidores importantes no crescimento de bactérias, e influenciam a atividade catalítica de várias enzimas (KALINOWSKA, SWISŁOCKA, REGULSKA *et al.*, 2010), como é o caso relatado por CHEN *et al.* (2005) em que o ácido *p*-metoxibenzoico teve efeitos sobre a atividade de inibição não-competitiva da tirosinase difenolase de cogumelos (CHEN, SONG, QIU *et al.*, 2005).

5.3.3.5 Substâncias 9 e 10 (3-oxo- α -ionol e blumenol C)

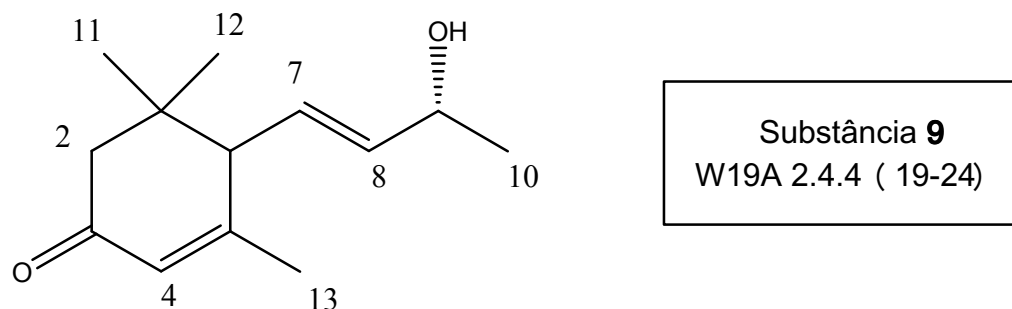


Figura 55: Estrutura química do 3-oxo- α -ionol (**9**).

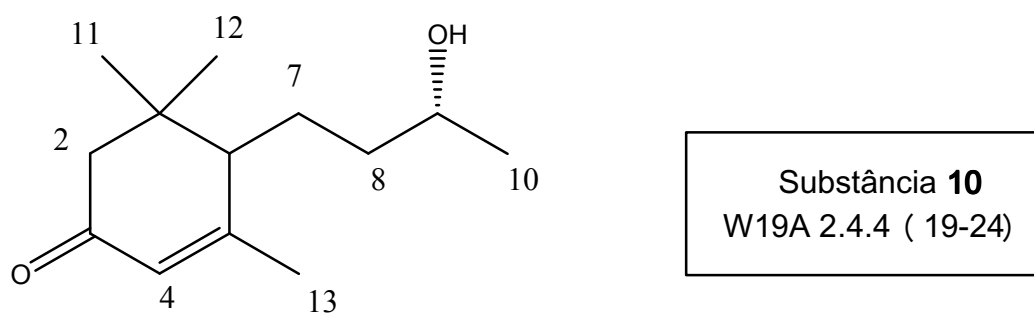


Figura 56: Estrutura química do blumenol C (**10**).

A amostra W19A 2.4.4(19-24) ($m = 2$ mg) foi conduzida à análise por CG-EM, pelo qual foram identificadas duas substâncias em mistura.

A substância **9** apresentou tempo de retenção (R_t) de 7,050 minutos no cromatograma (figuras 57 e 58), com similaridade de 87% para $C_{13}H_{20}O_2$. Em seu espectro de massas (figura 59), o pico m/z 208 $[M]^+$ corresponde ao íon molecular (D'ABROSCA, DELLAGRECA, FIORENTINO *et al.*, 2004; PARK, LEE, YEON *et al.*, 2011). O pico que corresponde ao íon m/z 108 (100) e as demais fragmentações estão em conformidade com a estrutura do **3-oxo- α -ionol** (figura 55) (FRAGA, HERNÁNDEZ, MESTRES *et al.*, 1994).

A substância **10** apresentou tempo de retenção (R_t) de 7,683 minutos no cromatograma (figura 57 e 58), com similaridade de 88% para $C_{13}H_{22}O_2$. Em seu espectro de massas (figura 60), o pico m/z 210 $[M]^+$ corresponde ao íon molecular (D'ABROSCA, DELLAGRECA, FIORENTINO *et al.*, 2004; PARK, LEE, YEON *et al.*,

2011). Os demais picos correspondem às fragmentações, e estão em conformidade com a estrutura do **blumenol C** (figura 56) (MAIER, PEIPP, SCHMIDT *et al.*, 1995).

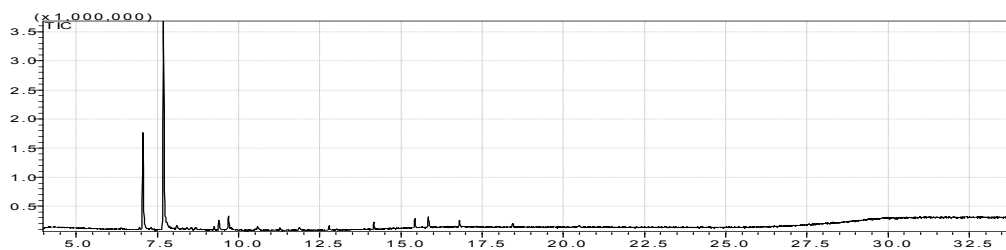


Figura 57: Cromatograma da amostra W19A 2.4.4(19-24) (CG-EM).

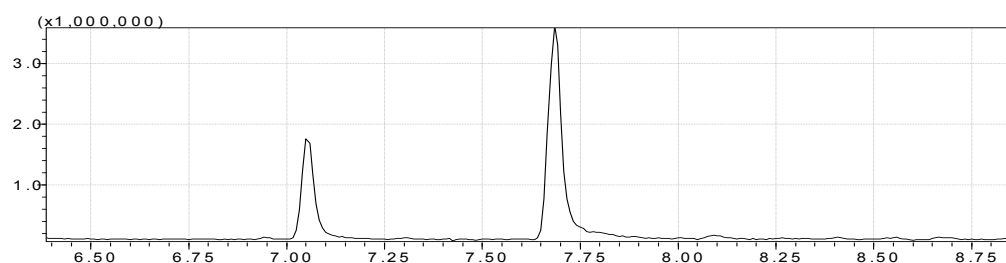


Figura 58: Expansão do cromatograma da amostra W19A 2.4.4(19-24) (CG-EM).

Rt = 7,050 - 87% - $C_{13}H_{20}O_2$

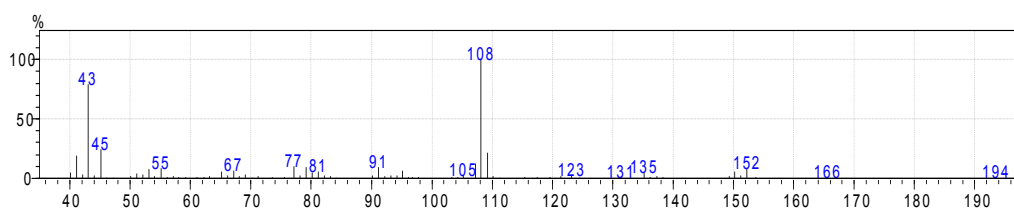


Figura 59: Espectro de massas da substância 9.

Rt = 7,683 - 88% - $C_{13}H_{22}O_2$

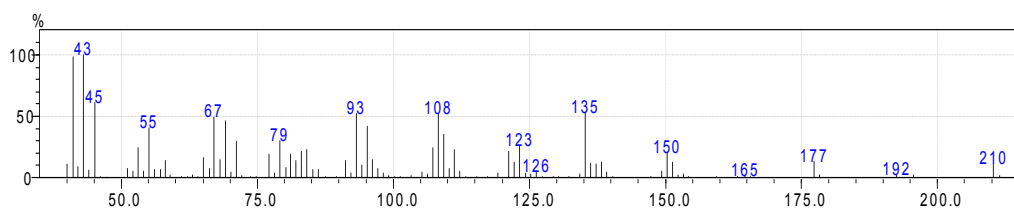


Figura 60: Espectro de massas da substância 10.

O blumenol C é formado como produto da hidrogenação do 3-oxo- α -ionol, e fazem parte da mesma rota metabólica. Ambos são produtos formados pela degradação oxidativa dos carotenóides, chamados *nor*-isoprenóides (C13) tipo megastigmanos (JONDIKO e PATTENDEN, 1989; DEWICK, 2002).

O blumenol C já foi descrito em produtos naturais, e foi submetido a ensaios biológicos, sendo testado como mediador no processo de supressão da inflamação, no qual apresentou aumento significativo na expressão das enzimas SIRT1 (PARK, LEE, YEON *et al.*, 2011).

6 CONCLUSÃO

A identificação de metabólitos secundários de origem vegetal de interesse terapêutico continua sendo área de relevada importância para a saúde humana. Esse trabalho representou o início do estudo fitoquímico da espécie *P. multiflora*, do gênero *Pavonia* (Malvaceae), no qual foram identificados pela primeira vez alguns metabólitos secundários nunca descritos na espécie.

A espécie de trabalho foi escolhida pelo fato de ser endêmica do estado do Espírito Santo, cujo bioma é uma área de *hotspot*, a Mata Atlântica.

O estudo fitoquímico das folhas de *P. multiflora* levou ao isolamento e identificação de substâncias descritas pela primeira vez na espécie, sendo quatro compostos fenólicos: o ácido vanílico (1), o ácido ferúlico (2), o ácido *p*-hidroxibenzoico (3) e o ácido *p*-cumárico (4); de cinco *nor*-isoprenoides: a loliolida (5), uma lactona terpênica, o vomifoliol (6), o 4,5-dihidroblumenol A (7), o 3-oxo- α -ionol (9) e o blumenol C (10); além do éster de triterpeno, *p*-metoxibenzoato de taraxerol (8), substância inédita até março de 2014.

Em relação aos ensaios de atividade biológica, as catepsinas são alvos terapêuticos importantes, e têm sido de grande interesse da indústria farmacêutica atualmente, pelo fato de estarem envolvidas em diversos processos fisiopatológicos. Especificamente para a V, que está relacionada com a progressão do câncer, o extrato apresentou elevada porcentagem de inibição, porém em elevadas concentrações. Portanto, existe um potencial caminho para continuação dos estudos.

Apesar de pertencer a uma família numerosa, a espécie em estudo não apresenta outros dados químicos e/ou biológicos publicados até agora. Assim, as informações fornecidas por essa pesquisa contribuem para o conhecimento científico, uma vez que se trata de uma espécie endêmica, da qual foi isolada uma substância inédita.

Portanto, a espécie *P. multiflora* pode ser fonte de outros metabólitos secundários com potencial para aplicação em diversos ensaios de atividade biológica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, B. H.; WABEL, N. A.; BLUNDEN, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytother. Res.*, **19**, 369-375, 2005.

ALONSO, J. A.; ZAMILPA, A.; AGUILAR, F. A.; RUIZ, M. H.; TORTORIELLO, J.; FERRER, E. J. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **139**, 751-756, 2012.

AMIR, F.; WONG, K.C.; ELDEEN, I.; ASMAWI, M.Z.; OSMAN, H. Evaluation of biological activities of extracts and chemical constituents of *Mimusops elengi*. *Trop J Pharm Res*, **12 (4)**, 591-596, 2013.

ANDRADE, T. U.; EWALD, B. T.; FREITAS, P. D. R.; LENZ, D.; ENDRINGER, D. C. *Pavonia alnifolia* A. St. Hil.: *in vivo* hypotensive effect and *in vitro* Ace inhibitory activity. *Int J Pharm Pharm Sci.*, **4 (1)**, 124-126, 2012.

BAI, N.; HE, K.; ROLLER, M.; LAI, C. S.; SHAO, X.; PAN, M. H.; BILY, A.; HO, C. T. Flavonoid glycosides from *Microtea debilis* and their cytotoxic and anti-inflammatory effects. *Fitoterapia*, **82**, 168–172, 2011.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: A descoberta de novo agente cardioativo. *Quim. Nova*, **25 (6B)**, 1172-1180, 2002.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Quim. Nova*, **13(1)**, 29-39, 1990.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quim. Nova*, **32 (3)**, 679-688, 2009.

BARRETO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as bases moleculares de ação dos fármacos. 2ª Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008.

BLUNDEN, G.; PATEL, A. V.; ARMSTRONG, N. J.; GORHAM, J. Betaine distribution in the Malvaceae. *Phytochemistry*, **58**, 451-454, 2001.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; FIGUEIREDO, A. R.; TOTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S.; HOGG, T. A. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, **135(2)**, 144-151, 2009.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms. Fifth Edition. New York: Springer, 2007.

CHAVES, O. S.; GOMES, R. A.; TOMAZ, A. C. A.; FERNANDES, M. G.; JUNIOR, L. G. M.; AGRA, M. F.; BRAGA, V. A.; de SOUZA, M. F. V. Secondary metabolites from *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) and the vasorelaxant activity of cryptolepinone. *Molecules*, **18**, 2769-2777, 2013.

CHEN, Q.-X.; SONG, K.-K.; QIU, L.; LIU, X.-D.; HUANG, H.; GUO, H.-Y. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by p-alkoxybenzoic acids. *Food Chemistry*, **91**, 269-274, 2005.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, **432**, 829-837, 2004.

COHEN, H.; CHARRIER, C.; SARFATY, J. Extraction and identification of a plasticizer, di-(2-ethylhexyl)-phthalate, from plastic bag containing contaminated corn. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20**, 437-440, 1991.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; de CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). *Quim. Nova*, **26 (6)**, 825-827, 2003.

CONSERVATION INTERNATIONAL. Disponível em:

www.conservation.org/where/priority_areas/hotspots/Pages/hotspots_main.aspx.

Acessado em 05 de março de 2014.

COSTA, D. A. da; SILVA, D. A. e; CAVALCANTI, A.C.; MEDEIROS, M. A. A. de; LIMA, J. T. de; CAVALCANTE, J. M. S.; SILVA, B. A. da; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F.

V. de. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of Kaempferol-3-O-B-D-(6"-E-P-Coumaroyl) glucopyranoside on Guinea-Pig Ileum. *Quim. Nova*, **30(4)**, 901-903, 2007.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1830**, 3670–3695, 2013.

CUNHA, S. Métodos simples de formação de monocristal de substância orgânica para estudo estrutural por difração de Raios-X. *Quim. Nova*, **31(4)**, 906-909, 2008.

D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; MONACO, P.; ORIANO, P.; TEMUSSI, F. Structure elucidation and phytotoxicity of C₁₃ nor-isoprenoids from *Cestrum parqui*. *Phytochemistry*, **65**, 497–505, 2004.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2nd Ed. England: John Wiley & Sons LTD, 2002. 507p.

ESTEVEES, A. A.; BORGES, S. V., ABRANTES, S.; SILVEIRA, M. G.; SOUZA, M. O. C. C. Validação em laboratório de método analítico para determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC. *Quim. Nova*, **30(1)**, 219-223, 2007.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A. P.; MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 3774–3779, 2008.

FELIU, D. A. Análise de terpenóides de espécies de *Croton* sect Lamprocroton (Mull.Arg.) Pax (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, 2011. 117p.

FLORA DO BRASIL (Jardim Botânico do Rio de Janeiro): Disponível em www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9161. Acessado em 20/02/2014.

FRAGA, B. M.; HERNÁNDEZ, M. G.; MESTRES, T.; TERRERO, D.; ARTEAGA, J. M. Nor-sesquiterpenes from *Teucrium heterophyllum*. *Phytochemistry*, **39(3)**, 617-619, 1995.

FRYXELL, P. A. *Pavonia* Cavanilles (Malvaceae). *Flora Neotropica Monograph* 76. Bronx, New York: The New York Botanical Garden Press, 1999.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **15(2)**, 178-182, 2005.

GHOSAL, S.; CHAUHAN, R. B. P. S.; MEHTA, R. Alkaloids of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry*, **14**, 830-832, 1975.

GONZÁLEZ, A. G.; GUILLERMO, J. A.; RAVELO, A. G.; JIMENEZ, I. A.; GUPTA, M. P. 4,5-Dihydroblumenol A, a new nor-isoprenoid from *Perrottetia multiflora*. *J. Nat. Prod.*, **57(3)**, 400-402, 1994.

GORHAM, J. Glycinebetaine is a major nitrogen-containing solute in the Malvaceae. *Phytochemistry*, **43(2)**, 367-369, 1996.

GRINGS, M.; KRAPOVICKAS, A.; BOLDRINI, I. I. A new species of *Pavonia* (Malvaceae) from Southern Brazil. *Systematic Botany*, **36(2)**, 419-423, 2011.

HAMMAMAI, S.; JANNET, H. B.; BERGAOUI, A.; CIAVATTA, L.; CIMINO, G.; MIGHRI, Z. Isolation and structure elucidation of a flavanone, a flavanone glycoside and vomifoliol from *Echiochilon Fruticosum* growing in Tunisia. *Molecules*, **9**, 602-608, 2004.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, **13(19/20)**, 894-901, 2008.

HONG, Y. H.; WANG, S. C.; HSU, C.; LIN, B. F.; KUO, Y. H.; HUANG, C. J. Phytoestrogenic compounds in alfafa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 131-137, 2011.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P. N. Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *The Journal of Biological Chemistry*, **268(32)**, 23954-23958, 1993.

INUI, T.; WANG, Y.; PRO, S. M.; FRANZBLAU, S. G.; GUIDO F. PAULI, G. F. Unbiased evaluation of bioactive secondary metabolites in complex matrices. *Fitoterapia*, **83**, 1218–1225, 2012.

JANG, D. S.; PARK, E. J.; KANG, Y. H.; SU, B. N.; HAWTHORNE, M. E.; VIGO, J. S.; GRAHAM, J. G.; CABIESES, F.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Compounds obtained from *Sida acuta* with the potential to induce quinone reductase and to inhibit 7,12-dimethylbenz-[α]anthracene - induced preneoplastic lesions in a mouse mammary organ culture model. *Arch Pharm Res.*, **26(8)**, 585-590, 2003.

JONDIKO, I. J. O.; PATTENDEN, G. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry*, **28(1)**, 3159-3162, 1989.

JUNIO, H. A.; SY-CORDERO, A. A.; ETTAFAGH, K. A.; BURNS, J. T.; MICKO, K. T.; GRAF, T. N.; RICHTER, S. J.; CANNON, R. E.; OBERLIES, N. H.; CECH, N. B. Synergy-directed fractionation of botanical medicines: A case study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J. Nat. Prod.*, **74**, 1621–1629, 2011.

KALINOWSKA, M.; LADERIERE, B.; CHAMPAGNE, P.; KOWCZYK-SADOWY, M.; LEWANDOWSKI, W. Mn(II), Cu(II) and Cd(II) *p*-coumarates: FT-IR, FT-Raman, ^1H and ^{13}C NMR and thermogravimetric studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **103**, 264–271, 2013.

KIM, M. R.; LEE, S. K.; KIM, C. S.; KIM, K. S.; MOON, D. C. Phytochemical constituents of *Carpesium macrocephalum* F_R. et S_{AV}. *Arch Pharm Res.*, **27 (10)**, 1029-1033, 2004.

KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; CHITTAWONG, V.; MILES, D. H. Taraxeryl *cis-p*-hydroxycinnamate, a novel taraxeryl from *Rhizophora apiculata*. *J. Nat. Prod.*, **53(4)**, 953-955, 1990.

KORT, R.; VONK, H.; XU, X.; HOFF, W. D.; CRIELAARD, W.; HELLINGWERF, K. J. Evidence for *trans-cis* isomerization of the *p*-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein. *FEBS Letters*, **382**, 73-78, 1996.

KUESTER, D.; LIPPERT, H.; ROESSNER, A.; KRUEGER, S. The cathepsin family and their role in colorectal cancer. *Pathology – Research and Practive*, **204**, 491-500, 2008.

LANKELMA, J. M.; VOOREND, D. M.; BARWARI, T.; KOETSVELD, J.; VAN DER SPEK, A. H.; DE PORTO, A. P.; VAN ROOIJEN, G.; VAN NOORDEN, C. J. Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci.*, **86**, 225-233, 2010.

LEAL, R. S. Estudo etnofarmacológico e fitoquímico das espécies medicinais *Cleome spinosa* Jacq, *Pavonia varians* Moric e *Croton cajuara* Benth. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2008. 190p.

LETO, G.; SEPPORTA, M. V.; CRESCIMANNO, M.; FLANDINA, C.; TUMMINELLO, F. M. Cathepsin L in metastatic bone disease: therapeutic implications. *Biol. Chem.*, **391**, 655-664, 2010.

LIBARDI, S. H. Atividade antioxidante da vanilina e do ácido vanílico e o efeito da complexação por proteínas do soro do leite na desativação de radicais ferrilmioglobina em condições simulando o trato gastrointestinal Dissertação de Mestrado. Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010. 91p.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37(6)**, 1517-1575, 1994.

MAIER, W.; PEIPP, H.; SCHMIDT, J.; WRAY, V.; STRACK, D. Levels of a terpenoid glycoside (Blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal Mycorrhizas. *Plant Physiol.*, **109**, 465-470, 1995.

MARINO, S. de; BORBONE, N.; ZOLLO, F.; IANARO, A.; MEGLIO, P. di; IORIZZI, M. Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7525-7531, 2004.

MARQUES, E. F. Estudos de produtos naturais e derivados sintéticos buscando inibidores seletivos das catepsinas L e V. Dissertação de Mestrado. Departamento de química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011. p. 7, 10-14.

MENDES-PINTO, M. M. Carotenoid breakdown products the norisoprenoids in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **483**, 236–245, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858, 2000.

NELSON, D. L. ; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry. 4^a Ed, New York: W. H. Freeman, 2004. 1200p.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **75**, 311-335, 2012.

NOGUCHI, H. K.; TAMURA, K.; SASAKI, H.; SUENAGA, K. Identification of two phytotoxins, blumenol A and grasshopper ketone, in the allelopathic Japanese rice variety Awaakamai. *Journal of Plant Physiology*, **169**, 682-685, 2012.

OKADA, N.; SHIRATA, K.; NIWANO, M.; KOSHINO, H.; URAMOTO, M. Immunosuppressive activity of a monoterpene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry*, **37 (1)**, 281-282, 1994.

ÖKSÜZ, S.; ULUBELEN, A.; BARLA, A.; VOELTER, W. Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*. *Turk. J. Chem.*, **26**, 457-463, 2002.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de mistura de triperpenos por RMN de ¹³C. *Quim. Nova*, **13(4)**, 278-281, 1990.

PADUCH, R.; SZERSZEN, M. K.; TRYTEK, M. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **55**, 315-327, 2007.

PALERMO, C.; JOYCE, J. A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in câncer. *Cell press.*, **29**, 22-27, 2007.

PARK, J. H.; LEE, D. G.; YEON, S. W.; KWON, H. S., KO, J. H.; SHIN, D. J.; PARK, H. S.; KIM, Y. S.; BANG, M. H.; BAEK, N. I. Isolation of megastigmane sesquiterpenes from the silkworm (*Bombyx mori* L.) droppings and their promotion activity on HO-1 and SIRT1. *Arch Pharm Res.*, **34(4)**, 533-542, 2011.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; POSER, G. L. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). *Rev. Bras. Farmacog.*, **19**, 140-149, 2009.

PIEME, C. A.; PENLAP, V. N.; NGOGANG, J.; COSTACHE, M. *In vitro* cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **29 (3)**, 223-228, 2010.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Quím. Nova.* **25 (1)**, 45-61, 2002.

PRITAM S. J.; SANJAY B. B. Preliminary phytochemical screening of woody stem extracts of *Abelmoschus manihot* and *Wrightia tinctoria*. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, **1 (3)**, 59-63, 2011.

RAGASA, C. Y.; AGBAYANI, V.; HERNANDEZ, R. B.; RIDEOUT, J. A. An antimutagenic monoterpene from *Malachra fasciata* (Malvaceae). *Philippine Journal of Science*, **126(2)**, 183-189, 1997.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, **29(4)**, 755-760, 2006.

REGASINI, L. O.; FERNANDES, D. C.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; CARDOSO-LOPES, E. M.; YOUNG, M. C. M.; TORRES, L. B.; VELLOSA, J. C. R.; OLIVEIRA, O. M. M. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (CAESALPINIOIDEAE). *Quim. Nova*, **31(4)**, 802-806, 2008.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, **142**, 1141-1153, 2009.

S'WISŁOCKA, R.; REGULSKA, E.; SAMSONOWICZ, M.; LEWANDOWSKI, W. Experimental and theoretical study on benzoic acid derivatives. *Journal of Molecular Structure*, **1044**, 181–187, 2013.

SABA, M. D. Morfologia Polínica de Malvaceae: Implicações Taxonômicas E Filogenéticas. *Tese de Doutorado*: Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil, 2007. 188p.

SAKURAI, N.; YAGUCHI, Y.; INOUE, T. Triterpenoids from *Myrica rubra*. *Phytochemistry*, **26(1)**, 217-219, 1987.

SANGEETHA, K.N.; SUJATHA, S.; MUTHUSAMY, V.S.; ANAND, S.; NITHYA, N.; VELMURUGAN, D.; BALAKRISHNAN, A.; LAKSHMI, B.S. 3 β -taraxerol of *Mangifera indica*, a PI3K dependent dual activator of glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1800**, 359–366, 2010.

SELVAN, V. T.; KAKOTI, B. B.; GOMATHI, P.; KUMAR, D. A.; ISLAM, A.; GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K. Cytotoxic and antitumor activities of *Pavonia odorata* against erlich's ascites carcinoma cells bearing mice. *Pharmacologyonline*, **2**, 453-477, 2007.

SEVERINO, R. P.; Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas. Tese de doutorado, Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008. p. 128 e 154.

SEVERINO, R. P.; GUIDO, R. V. C.; MARQUES, E. F.; BRÖMME, D.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; ANDRICOPULO, A. D.; VIEIRA, P. C. Acridone alkaloids as potent inhibitors of cathepsin V. *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 1477-1481, 2011.

SHAIKH, A.; MAKHMOOR, T.; CHOUDHARY, M. I. Radical scavenging potential of compounds isolated from *Vitex agnus-castus*. *Turk J Chem.*, **34**, 119-126, 2010.

SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; SOUZA, M. F. V.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo. *Rev. Bras. Farmacog.*, **15(1)**, 23-29, 2005.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; LINS, A. C. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V. BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* ULBR. (Malvaceae). *Quim. Nova*, **29(6)**, 1250-1254, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2010.

SOUZA FILHO, A. P. S.; LÔBO, L. T.; ARRUDA, M. S. P. Atividade alelopática em folhas de *Tachigali Myrmecophyla* (Leg. – Pap). *Planta Daninha*, **23 (4)**, 557-564, 2005.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYAMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, **23 (1)**, 25-32, 2005.

SWAIN, S. S.; ROUT, K. K.; CHAND, P. K. Production of triterpenoid anti-cancer compound Taraxerol in *Agrobacterium* - Transformed root cultures of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.). *Appl Biochem Biotechnol*, **168(3)**, 487-503, 2012

TODARWAL, A.; JAIN, P.; BARI, S. *Abelmoschus manihot* Linn: ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Asian Journal of Traditional Medicines*, **6(1)**, 1-7, 2011.

TRINH, Q.; LE, L. An investigation of antidiabetic activities of bioactive compounds in *Euphorbia hirta* Linn using molecular docking and pharmacophore. *Medicinal Chemistry Research*, **3(11)**, 841-853, 2013.

TURK, D.; GUNCAR, G. Lysosomal cysteine protease (cathepsinas): promising drug targets. *Acta Crys.*, **59**, 203-213, 2003.

- VAHITHA, R.; VENKATACHALAM, M. R.; MURUGAN, K.; JEBANESAN, A. Larvicidal efficacy of *Pavonia zeylanica* L. and *Acacia ferruginea* D.C. against *Culex quinquefasciatus* Say. *Bioresource Technology*, **82**, 203-204, 2002.
- VIEGAS Jr., C.; BOLZZANI, V. S. E BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quim. Nova*, **29 (2)**, 326-337, 2006.
- YAMANO, Y.; ITO, M. Synthesis of optically active vomifoliol and roseoside stereoisomers. *Chem. Pharm. Bull.*, **53(5)**, 541-546, 2005.
- YANG, X.; KANG, M. C.; LEE, K. W.; KANG, S. M.; LEE, W. W.; JEON, Y. J. Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from *Sargassum ringgoldianum* subsp. *coreanum*. *Algae*, **26(2)**, 201-208, 2011.
- YASUDA, Y.; LI, Z.; GREENBAUM, D.; BOGBO, M.; WEBER, E.; BROMME, D. Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J. Biol. Chem.*, **279**, 761-770, 2004.
- YAYLI, N.; YILDIRIM, N.; USTA, A.; OZKURT, S.; AKGUM, V. Chemical Constituents of *Campanula lactiflora*. *Turk J Chem.*, **27**, 749-755, 2003.
- ZELENA, K.; HARDEBUSCH, B.; HULSDAU, B.; BERGER, R. G.; ZORN, H. Generation of Norisoprenoid Flavors from Carotenoids by Fungal Peroxidases. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 9951-9955, 2009.
- ZENG, Q.; YE, J. CHENG, X.; QIN, J.; JIN, H. J.; ZHANG, W. D. Chemical constituents from *Aphanamixis grandifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, **49(3)**, 486-492, 2013.