



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRESENTES
NAS FOLHAS DE *Siparuna cymosa* (SIPARUNACEAE)**

RAFAELA OLIVEIRA DA SILVA

Ilhéus - Bahia

2019

RAFAELA OLIVEIRA DA SILVA

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRESENTES
NAS FOLHAS DE *Siparuna cymosa* (SIPARUNACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQUIM) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré, como requisito para obtenção do título de mestre em Química.

Área e Concentração: Recursos Naturais e Tecnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosilene Aparecida de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Faustino de Oliveira

Ilhéus - Bahia

2019

S586 Silva, Rafaela Oliveira da.
Isolamento e identificação de substâncias bio-
ativas presentes nas folhas de Siparuna cymosa
(Siparunaceae) / Rafaela Oliveira da Silva. –

Ilhéus,

BA: UESC, 2019.
xv, 101 f. : il.

Orientadora: Rosilene Aparecida de Oliveira.
Coorientador: Fernando Faustino de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
Química.

Referências: f. 93-101.

1. Plantas medicinais. 2. Siparunaceae. 3. Óleos
essenciais. 4. Metabólitos. 5. Esteroides. I. Título.

CDD 581.634

Dedico este trabalho a minha mãe, pela educação e conhecimento proporcionados durante toda minha vida, ensinando os valores e princípios éticos, resultando em quem sou e tendo todos os méritos por qualquer conquista minha.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom a vida, por ter me dado força e proteção para terminar este trabalho, e assim ter a oportunidade de vencer mais essa etapa da vida.

A minha mãe Arlete, por todos os ensinamentos, educação, por sempre ter me dado suporte para que chegasse com êxito nessa fase da vida. Pelo carinho, dedicação, educação que me ofereceu desde os primeiros dias de minha vida e por todo esforço para dar o melhor para mim e meus irmãos.

A meus irmãos Geórgia e Lucas pelo amor, companheirismo, carinho e por vibrarem comigo em cada vitória.

A minha companheira Renata Matos por todo amor e por estar sempre ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos, parceira especial de todas as horas.

Aos meus sobrinhos: Analú, Victória e Vítor, pelo motivo do meu sorriso mais intenso e minha distração na falta de paciência. Amores para toda vida

A minha tia, Maria das Graças, pelo apoio emocional, pelo incentivo e por se fazer presente.

As amigas: Ana Carolina e Tina Macena, por serem sempre necessárias, pelos sentimentos compartilhados, por estarem sempre ao meu lado comemorando cada vitória.

Aos companheiros de caminhada e laboratório (LPPNS): Ana Carolina, Cláudia, Fabiana, Gabriel, Hemerson, Iago, Ingrede, Isaac, João, Jordan, Luhyris, Manoel, Rândilla, Thalyta e Thiago que fizeram parte do meu dia a dia compartilhando os conhecimentos, ensinamentos, dificuldades, alegrias. Meu muito obrigada.

A Professora Rosilene Aparecida de Oliveira, pela oportunidade ao aceitar-me como sua orientanda, pelo estímulo, compreensão, profissionalismo, paciência, apoio e disposição.

Ao Professor Fernando Faustino de Oliveira, co - orientador, pela sua dedicação, apoio, conselhos e sugestões.

A professora Aline Conceição do Laboratório de Micologia pela parceria e disponibilização do material microbiológico utilizado no desenvolver deste trabalho.

Ao professor Adriano de Paula Sabino do laboratório de Hematologia clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela disponibilidade na realização dos testes citotóxicos.

À Ivana Silva Lula pelas análises de RMN, departamento de Química, UFMG e ao Grupo de Pesquisa Bioma e CBG pela aquisição dos espectros no Infravermelho, UESC.

A UESC e ao PPGQUIM pela viabilização da pesquisa, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Por fim a todos aqueles que de uma forma direta ou indiretamente contribuíram para que esse momento se tornasse uma realidade.

RESUMO

Na literatura há registro de seis espécies do gênero *Siparuna*, família Siparunaceae, de ocorrência na Mata Atlântica (Sul da Bahia), dentre elas a *Siparuna cymosa*, endêmica da região Sul da Bahia. Nesse trabalho é apresentado o estudo químico do óleo essencial e do extrato em acetato de etila das folhas de *Siparuna cymosa* (Siparunaceae). O óleo essencial (OE) foi obtido por hidrodestilação e os extratos das folhas de *S. cymosa* por maceração exaustiva com solventes orgânicos de diferentes polaridades (hex, CHCl₃, AcOEt e EtOH). O teor de OE foi de 2,11 ± 0,09%, tendo como compostos majoritários α -bisabolol (68,9%), *p*-cimen-9-ol (7,9%) e espatulenol (3,7%). Os extratos obtidos foram submetidos a prospecção fitoquímica levando a detecção das classes de fenóis, antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavononóis, xantonas, esteroides, triterpenoides e saponinas, conforme dados relatados para o gênero *Siparuna*. O extrato de acetato de etila foi submetido ao fracionamento cromatográfico, eluído com os solventes hex, CHCl₃, AcOEt e EtOH puros e em misturas fornecendo vinte grupos. O fracionamento do extrato, levou ao isolamento de três substâncias, 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol (RS1), 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol (RS2) e uma mistura de RS2 mais 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil]-kanferol (RS3, 4A), sendo a substância RS1 relatada pela primeira vez no gênero e RS3 - 4A pela primeira vez na literatura. As identificações estruturais das substâncias foram feitas por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensional (DEPT-135, HSQC e HMBC), EM, ponto de fusão e comparação com dados da literatura. O teste de letalidade frente a *Artemia salina* apresentou CL₅₀ 29,00 μ g mL⁻¹ para o OE, diferente do extrato de acetato de etila, o qual não apresentou letalidade. A atividade citotóxica foi avaliada através do método MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio) frente a linhagens de células tumorais de Leucemia mieloide aguda (LMA) e Leucemia mieloide crônica (LMC). O OE de *S. cymosa* apresentou propriedades citotóxicas frente as linhagens de células tumorais de LMA e LMC, com índice de seletividade maior para as células do tipo LMA. O extrato etanólico apresentou citotoxicidade elevada frente aos dois tipos de células testadas, sendo mais seletivo frente as células de LMA. O extrato hexânico não apresentou atividade citotóxica frente os dois tipos de células, assim como a substância 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol (RS1). O extrato clorofórmico e acetato de etila apresentaram moderada citotoxicidade frente aos dois tipos de células, porém poucos seletivos. A substância 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol (RS2) apresentou atividade citotóxica moderada frente a linhagem de células LMA, com Índice de seletividade (IS) próximo da substância controle. As substâncias isoladas (RS1 e RS2), frações, extrato em AcOEt e OE foram submetidos ao teste de atividade antimicrobiana frente as bactérias *Salmonella enterica*, *E. coli* e *S. aureus* (Biocromatografia). O OE apresentou halo de inibição frente a todas as bactérias testadas, sendo que sua ação pode ser proveniente do composto α -bisabolol. As frações e substâncias isoladas RS1 e RS3 somente apresentaram halo de inibição frente a bactéria *S. aureus*. Diante dos resultados obtidos a espécie se torna promissora, este estudo contribui para o conhecimento químico da espécie *S. cymosa*, endêmica da região Sul da Bahia.

Palavras-chaves: citotoxicidade, metabólitos secundários, esteroide, flavonoides glicosilados.

ABSTRACT

In the literature there are six species of the genus *Siparuna*, family Siparunaceae, occurring in the Atlantic Forest (South of Bahia), among them *Siparuna cymosa*, endemic to the south region of Bahia. In this work the chemical study of the essential oil and ethyl acetate extract of the leaves of *Siparuna cymosa* (Siparunaceae). The essential oil was obtained by hydrodistillation and the leaf extracts of *S. cymosa* by exhaustive maceration with organic solvents of different polarities (hex, CHCl₃, AcOEt and EtOH). The essential oil yield was $2.11 \pm 0.09\%$, with major compounds bisabolol- α (68,9%), cymen-9-ol-*p* (7,9%) and spathulenol (3,7%). The extracts obtained were submitted to phytochemical prospection, leading to the detection of classes of phenols, anthocyanidins, flavones, flavonols, flavononols, xanthones, steroids, triterpenoids and saponins, according to data reported for the genus *Siparuna*. The ethyl acetate extract was subjected to chromatographic fractionation, eluted with the solvents hex, CHCl₃, AcOEt and EtOH pure and in mixtures providing twenty groups. The fractionation of the extract, led to the isolation of three substances, sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosyl (RS1), Kanferol-3,7-di-O- α -L-ramnopyranosyl (RS2) and a mixture of RS2 and kanferol-3-O- α -L-ramnopyranosyl-7-O-[α -L-ramnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl] (RS3, 4A), being the substance RS1 reported for the first time in the genus and RS3-4A for the first time in the literature. The lethality test against *Artemia salina* showed LC₅₀ 29.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for OE, different from ethyl acetate extract, which one did not present lethality. The cytotoxic activity has been evaluated through the MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) - 2,5-diphenyl-tetrazolium) method against acute myeloid leukemia (AML) tumor cell lines and chronic myeloid leukemia (CML). The essential oil of *S. cymosa* showed cytotoxic properties against LMA and CML tumor cell lines, with a higher selectivity index (SI) for AML cells. The ethanolic extract presented high cytotoxicity against the two types of cells tested, being more selective against AML cells. The hexane extract showed no cytotoxic activity against the two cell types, as well as the substance sitosterol-3-O- β -D-glucopyranosyl (RS1). The chloroform extract and ethyl acetate showed moderate cytotoxicity against to the two cell types, however few selective ones. The kanferol-3,7-di-O- α -L-ramnopyranosyl (RS2) substance presented moderate cytotoxic activity against the LMA cell line, with SI close to the control substance. The isolated substances (RS1 and RS2), fractions, extract in AcOEt and OE were submitted to the test of antimicrobial activity against the bacteria *Salmonella enterica*, *E. coli* and *S. aureus* (Biochromatography). The OE presented halo of inhibition against all bacteria tested, and its action may be from the compound α -bisabolol. The fractions, extract in AcOEt and isolated substances RS1 and RS3 showed halo of inhibition against *S. aureus* bacterium. In view of the results obtained the species becomes promising, this study contributes to the chemical knowledge of the species *S. cymosa*, endemic to the south region of Bahia.

Key words: cytotoxicity, secondary metabolites, steroids, glycosylated flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição do gênero <i>Siparuna</i> . A- Visão mundial. B- América do Sul ...	18
Figura 2: A- Distribuição do gênero <i>Siparuna</i> no Brasil. B- Distribuição da espécie <i>S. cymosa</i> no Brasil	19
Figura 3: A- Arbusto de <i>S. cymosa</i> ; B- Folhas e frutos de <i>S. cymosa</i> (Una, Ilhéus-BA) (Foto da autora).....	20
Figura 4: Rota biossintética das principais classes de metabólitos secundários, CoA: Coenzima A.....	21
Figura 5: Fórmula estrutural de compostos identificados nos óleos essenciais de espécies de <i>Siparunas</i>	23
Figura 6: Fórmula estrutural dos metabólitos secundários isolados dos extratos espécies do gênero <i>Siparunas</i>	28
Figura 7: Fluxograma de preparação dos extratos das folhas de <i>S. cymosa</i>	37
Figura 8: Fluxograma do fracionamento do extrato de acetato de etila bruto de <i>S. cymosa</i>	42
Figura 9: Esquema da purificação da substância presente no grupo SAC-15.....	43
Figura 10: Esquema da purificação da substância presente no grupo SAC-16.....	43
Figura 11: Esquema de purificação da substância 3 e 4 presentes no grupo SAC- 17 (4 e 8).....	44
Figura 12: Cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial extraído das folhas de <i>S. cymosa</i> , contendo a identificação dos principais componentes.....	47
Figura 13: Espectros de massas dos principais componentes identificados no óleo essencial de <i>S. cymosa</i>	48
Figura 14: Proposta de fragmentação para o composto α -bisabolol adaptada.....	49
Figura 15: Proposta de fragmentação adaptada para o composto espatulenol.....	50
Figura 16: Proposta de fragmentação para o composto <i>p</i> -cimen-9-ol.....	51
Figura 17: Espectro na região do infravermelho representativo dos grupos SAC-1, SAC-2, SAC-3 e SAC-4 (ATR), região de 4000-600 cm^{-1}	54
Figura 18: Espectro na região do infravermelho da Substancia 1 (ATR), região de 4000-600 cm^{-1}	55
Figura 19: Estrutura básica de um esteroide.....	55
Figura 20: Estrutura do 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol.....	56
Figura 21: Ampliação (0 – 5.4) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de RS1 em CD_3OD e gotas de DMSO.....	58
Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de RS1 em CD_3OD e gotas de DMSO. A- ampliação de (21-42 ppm).....	59
Figura 23: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de RS1 em CD_3OD e gotas de DMSO. A- ampliação (14- 47 ppm).....	60
Figura 24: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento de HSQC de RS1(CD_3OD e gotas de DMSO), com destaque ao H- 1', H- 3 e H- 6.....	61

Figura 25: Correlação de H-C observados no mapa de contorno no experimento de HMBC (CD ₃ OD e gotas de DMSO) de RS1, com destaque ao H- 1' e H-6.	62
Figura 26: Correlação de H-H observados no mapa de contorno no experimento de COSY (CD ₃ OD e gotas de DMSO) de RS1, com destaque ao H- 1', H-3, H-6 e H-7.	63
Figura 27: Fotografia eletrônica, cromatoplaça CCD em sílica gel 60G.	64
Figura 28: Espectro na região do infravermelho da substância 3 (ATR), região de 4000-600 cm ⁻¹	66
Figura 29: Estrutura básica de um kanferol.	66
Figura 30: Estrutura do 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol.	68
Figura 31: Ampliação (0- 8.4 ppm) do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de RS2 em CD ₃ OD e gotas de DMSO.	70
Figura 32: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz) de RS2 CD ₃ OD e gotas de DMSO. A- ampliação de (71- 76 ppm).	71
Figura 33: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de RS2 em CD ₃ OD e gotas de DMSO. A- ampliação (67- 75 ppm); B- ampliação (92- 105 ppm).	72
Figura 34: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento HSQC de RS2 em CD ₃ OD e gotas de DMSO, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6', H- 6R1 e H- 6R2.	73
Figura 35: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento de HMBC de RS2 em CD ₃ OD e gotas de DMSO, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6'.	74
Figura 36: Correlações de H-H observadas no mapa de contorno no experimento COSY de RS2 em CD ₃ OD e gotas de DMSO, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6', H- 6R1 e H- 6R2.	75
Figura 37: Espectro de massas da substância RS2.	76
Figura 38: Espectro na região do infravermelho da substância 4 (RS3) (ATR), região de 4000-600 cm ⁻¹	77
Figura 39: Estrutura do composto 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil]-kanferol.	79
Figura 40: Ampliação (0- 8.2 ppm) do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de RS3 em CD ₃ OD.	81
Figura 41: Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz) de RS3 em CD ₃ OD. A- ampliação de (62- 87 ppm).	83
Figura 42: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de RS3 em CD ₃ OD. A- ampliação (64- 78 ppm).	84
Figura 43: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento HSQC de RS3 em CD ₃ OD, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H-1G, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6' e H- 3R1.	85
Figura 44: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento HMBC de RS3 em CD ₃ OD, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H-1G, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6' e H-3R1.	86

Figura 45: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento COSY de RS3 em CD₃OD, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H-1G, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6' e H-3R1.....**87**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Utilização etnobotânica das espécies Siparuna.....	20
Tabela 2: Composição química dos principais componentes presentes no óleo essencial de espécies de Siparunas.	22
Tabela 3: Metabólitos secundários isolados dos extratos de espécies de Siparunas	24
Tabela 4: Prospecção fitoquímica do extrato clorofórmico, acetato de etila e etanólico das folhas de <i>S. cymosa</i>	38
Tabela 5: Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do extrato de acetato de etila.	41
Tabela 6: Composição química do óleo essencial de <i>S. cymosa</i>	47
Tabela 7: Bioprospecção fitoquímica das principais das principais classes de metabólitos secundários dos extratos de <i>S. cymosa</i>	52
Tabela 8: Dados de ¹³ C, ¹ H, COSY e HMBC do composto RS1 (3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol).	57
Tabela 9: Dados de ¹³ C, ¹ H, COSY e HMBC do composto 3,7-di-O-α-L-ramnopiranosilkanferol	68
Tabela 10: Dados de ¹³ C, ¹ H, COSY e HMBC do composto 3-O-α-L-ramnopiranosil-7-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosil]-kanferol	80
Tabela 11: Dados do teste de letalidade para o óleo essencial de <i>S. cymosa</i> frente à <i>A. salina</i>	88
Tabela 12: Dados obtidos através do teste de citotoxicidade e Índice de seletividade frente as linhagens de células tumorais THP-1 e K562.....	89
Tabela 13: Resultado da biocromatografia do óleo, extrato de AcOEt, frações e substâncias isoladas frente as bactérias <i>Salmonella enterica</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AcOEt - Acetato de etila
Anvisa - Agência Nacional de vigilância sanitária
ATCC - American Type Culture Collection
ATR - *attenuated total reflectance*
BHI - *Brain heart infusion*
CCD - Cromatografia em camada delgada
CD₃OD - metanol deuterado
CF - Coluna flash
CE₅₀ - Concentração efetiva
CG-DIC - Cromatografia a gás acoplada ao detector de ionização de chama
CHCl₃ - Clorofórmio
CH₂Cl₂ - Diclorometano
CI₅₀ - Concentração inibitória
CIM - Concentração inibitória mínima
CL₅₀ - Concentração letal
d - Dupleto
DEPT - Distortionless enhancement by polarisation transfer
DMSO - Dimetilsufoxido
EtOH - Etanol
EM - Espectrometria de massas
Hex - Hexano
HMBC - Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC - Heteronuclear multiple quantum coherence
Hz - Hertz
IS - Índice de seletividade
IV - Infravermelho
J - Constante de acoplamento
LMA - Leucemia mieloide aguda
LMC - leucemia mieloide crônica
m - Multiplete
MeOH - Metanol
MTT- brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCI - National Cancer Insitute
OE - óleo essencial
OMS - Organização Mundial de Saúde
Ph - Philadelphia
ppm - Partes por milhão
RAM - Resistência antimicrobiana
RMN de ¹H- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de ¹³C- Ressonância magnética nuclear de carbono
SAC - Siparuna acetato de etila
s - singleto
sl - singleto largo
TMS - Tetrametilsilano
T - tripleto
δ_H e δ_C - Deslocamento químico de hidrogênio e carbono

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Gênero <i>Siparuna</i> (Siparunaceae)	18
2.2 Metabólitos secundários do gênero <i>Siparuna</i>	21
2.3 Atividade biológica	28
2.3.a Teste frente a <i>Artemia salina</i>	28
2.3.b Citotoxicidade.....	29
2.3.c Atividade antibacteriana	30
3 OBJETIVO	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos.....	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 Reagentes e equipamentos	33
4.2 Procedimentos gerais	34
4.3 Coleta do material vegetal	34
4.4 Extração e análise do óleo essencial.....	35
4.5 Preparação dos extratos das folhas de <i>S. cymosa</i>	36
4.6 Prospecção dos constituintes químicos dos extratos das folhas de <i>Siparuna cymosa</i>	37
4.7 Atividade biológica das folhas de <i>S. cymosa</i>	39
4.7.1 Teste de letalidade	39
a) Óleos essencial	39
b) Extratos.....	39
4.7.2 Atividade citotóxica.....	40
4.7.3 Biocromatografia	40

4.8 Isolamento de constituintes químicos do extrato em acetato de etila.....	41
a) Fracionamento.....	41
b) Isolamento de metabólitos secundários do grupos	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Prospecção fitoquímica	51
5.2 Isolamento e identificação das substâncias do extrato em Acetato de etila.....	53
5.2.1 Substância 1: 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol.....	54
5.2.2 Substância 2: 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol.....	64
5.2.3 Substância 3: 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol	65
5.2.4 Substância 4: 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil]-kanferol.....	77
5.3 Testes biológicos.....	88
5.3.1 Letalidade frente <i>Artemia salina</i>	88
5.3.2 Citotoxicidade frente a LMA e LMC	88
5.3.3 Atividade antimicrobiana.....	90
6 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm fundamental importância para a pesquisa farmacológica e na produção de drogas (BRASIL, 2006). Seu uso como alternativa terapêutica é muito útil devido à sua eficácia, o baixo custo operacional e a facilidade de aquisição (TORRÊS *et al.*, 2005). Os produtos naturais são utilizados como importantes ferramentas nos procedimentos de terapias naturais, sendo uma prática muito antiga (MUKHERJEE *et al.*, 2010). Uma das primeiras formas do uso de plantas medicinais para o alívio e cura de diferentes doenças foi a utilização de ervas (BRAGA, 2011).

Na Mata Atlântica, um local de grande biodiversidade, existem muitas espécies vegetais, algumas desconhecidas do ponto de vista fitoquímico e que podem apresentar grande valor terapêutico. Dentre as espécies de ocorrência na Mata Atlântica é necessário dar ênfase as espécies produtoras de óleo essencial, visto que apenas cerca de três mil óleos essenciais de origem vegetal são conhecidos e, dentre estes apenas 300 são de importância comercial (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais são de grande importância na natureza, principalmente pelo fato de apresentarem atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica e inseticida além, de atuarem contra herbívoros predadores (MONTANARI, *et al.*, 2010, SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012).

Os óleos essenciais possuem uma posição de destaque especial na indústria farmacêutica, como alternativa aos produtos sintéticos e no combate aos micro-organismos, principalmente diante do crescente aumento da resistência dos micro-organismos aos antibióticos usuais (ESSAWI e SROUR, 2000). Com isso, existe um grande interesse em desenvolver pesquisa com produtos naturais (WANG *et al.*, 2006 e HAIDA *et al.* 2007).

Algumas espécies vegetais produzem óleo essencial, dentre estas, as espécies da família Siparunaceae, relatadas por serem bons produtores de óleos essenciais. Esta família ocupa uma extensão em toda América do Sul, porém ela consiste em apenas dois gêneros: *Glossocalyx* e *Siparuna*. A *Siparuna guianensis* Aublet, espécie mais estudada do gênero *Siparuna*, possui uma vasta indicação etnobotânica e etnofarmacológica, sendo indicada como uma das espécies

prioritárias de conservação para a região do cerrado brasileiro (VIEIRA e ALVES, 2003).

No óleo essencial da *Siparuna guianensis*, foram identificados os compostos curzerenona, miristicina (ANTONIO *et al.*, 1984), γ -cadineno, bergamotanal, (E)- β -cariofileno (REBOUÇAS, 1984), α -bisabolol, espatulenol (ZOGHBI *et al.*, 1998), α -pineno e mirceno (VIANA *et al.*, 2002).

Estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Siparuna* (*S. apoisyce*, *S. arianae*, *S. dresslerana*, *S. gilgiana*, *S. guianensis*, *S. nicaraguensis*, *S. pauciflora*, *S. tonduziana*, *S. poeppigii*) levaram ao isolamento de flavonoides e alcaloides a partir dos extratos das folhas e cascas (LEITÃO *et al.*, 1999, PINA, 2016).

Os flavonoides, apresentam várias atividades biológicas, como antioxidantes, antibacteriana, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória. A ingestão diária de flavonoides está associada à longevidade e a menor incidência de doenças cardiovasculares. Portanto, são do ponto de vista farmacêutico muito importante (SIMÕES *et al.*, 2004; ARAÚJO, 2008; PEREIRA e DAS GRAÇAS, 2012).

Os alcaloides também despertam um grande interesse na comunidade científica. Estudos realizados com o extrato de acetato de etila do caule de *Rollinia pittieri* e *Pseudomalmea boyacana* (Annonaceae), levaram ao isolamento de alcaloides com atividade antiplasmodial (MUÑOZ *et al.*, 2006). Desses alcaloides, a liriodenina exibiu a maior atividade contra cepas resistentes à cloroquina de *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} = 8.0 - 10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Dentre a vasta biodiversidade do bioma da Mata Atlântica há relatos de espécies endêmicas do gênero *Siparuna*, em nossa região. Nesse trabalho foi proposto o estudo fitoquímico de uma espécie endêmica da região Sul da Bahia, a *Siparuna cymosa*, desconhecida no ponto de vista químico e biológico. Assim sendo, torna-se importante realizar esse estudo, pois a família Siparunaceae apresenta metabólitos secundários de grande interesse farmacológico.

Esse estudo ampliará o conhecimento químico de espécies vegetais da família Siparunaceae, possibilitando a identificação e o isolamento de metabólitos secundários com potencial biológico; que podem ser futuramente usados no combate a várias doenças, contribuindo assim para a melhoria da qualidade de vida do ser humano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Siparuna* (Siparunaceae)

O Brasil possui a maior diversidade biológica do mundo incluindo ecossistemas, espécies, populações, indivíduos e genes. Devido à exuberância da sua biodiversidade, o interesse de comunidades científicas vem sendo despertado para o estudo, conservação e utilização destes recursos naturais (SOUZA e FELFILI, 2006).

O país possui cinco áreas de grande abundância de plantas nativas, dentre elas à Mata Atlântica, atualmente reduzida a quase 8% da sua extensão original (CAMPANILI e SCHAFFER, 2010), esta área se estende desde o Rio grande do Sul até o Nordeste (BIOMA DA MATA ATLÂNTICA, 2016).

Dentre as diversas famílias de espécies vegetais estudadas para fins medicinais no mundo, encontra-se a família Siparunaceae. Essa família consiste em dois gêneros, *Glossocalyx*, uma espécie nativa do oeste da África, e *Siparuna* nativa da América do Sul, com aproximadamente 65 espécies de ocorrência nos neotrópicos, a maior parte na América do Sul, Figura 1 (RENNER, 1997; MONTANARI, 2010; VALENTINI *et al.*, 2010).

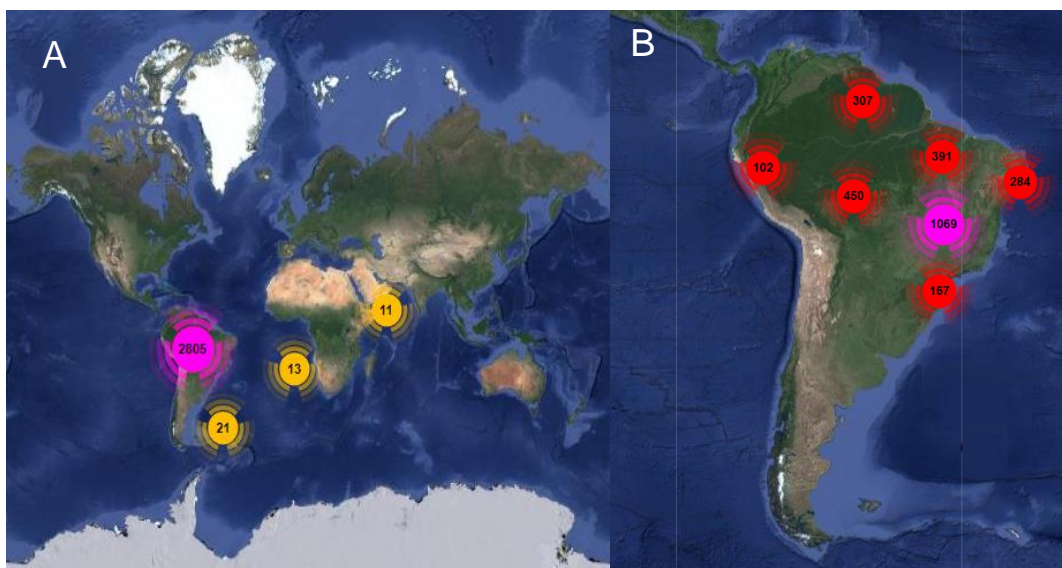


Figura 1: Distribuição do gênero *Siparuna*. A- Visão mundial. B- América do Sul

Fonte: <http://inct.splink.org.br/index>

O gênero *Siparuna* apesar de ser reconhecido por muitos taxonomistas como pertencente à família Monimiaceae, em 2003, foi segregado pelo sistema APG II (Grupo para a Filogenia das Angiospermas) a família Siparunaceae (VALENTINI *et al.*, 2010). O gênero *Siparuna* se distribui por todo o território brasileiro, destacamos a ocorrência da *S. cymosa*, de maior ocorrência na região sul da Bahia (Figura 2) e objeto de estudo desse trabalho, a qual é totalmente desconhecida do ponto de vista fitoquímico, bem como da atividade biológica de seus metabólitos secundários.

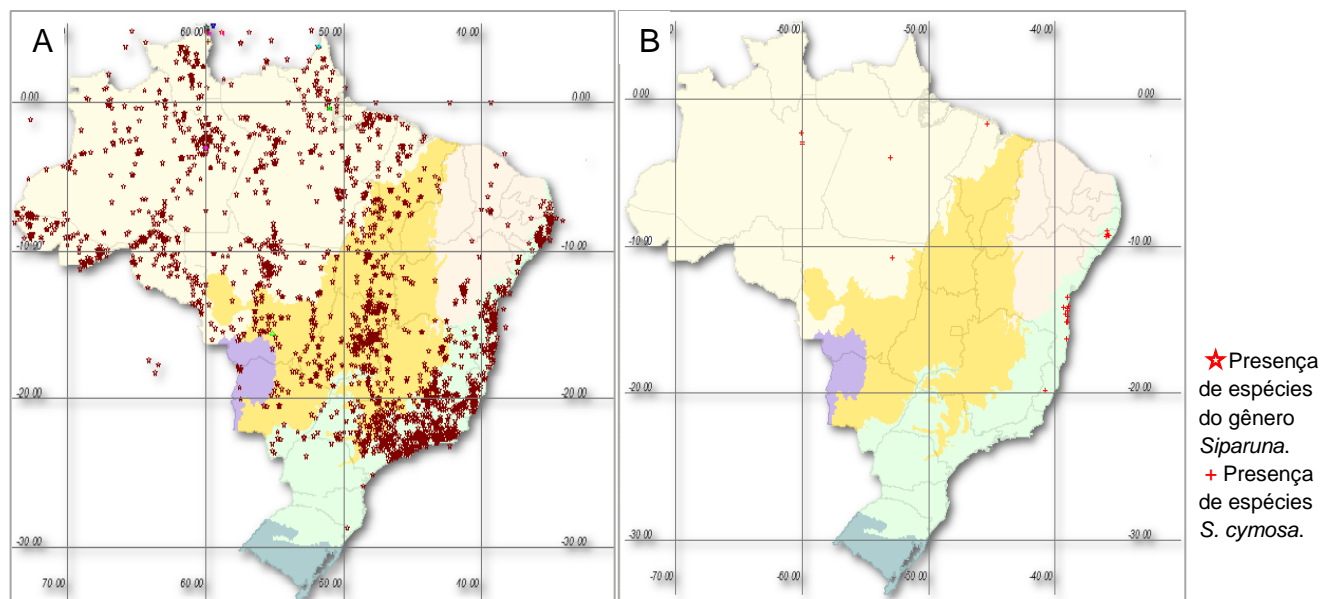


Figura 2: A- Distribuição do gênero *Siparuna* no Brasil. B- Distribuição da espécie *S. cymosa* no Brasil.

Fonte: <http://inct.splink.org.br/index>

O gênero *Siparuna*, compreende espécies de arbustos e arvoretas, exceto para 15 espécies que são árvores de 20 a 40 metros de altura, com troncos de diâmetro maiores que 120 cm, que ocorrem geralmente na Amazônia (RENNER e HAUSNER, 2005), apresentam inflorescência em forma de cachos, folhas sempre verdes e frutos de coloração vermelha, conforme figura 3.

Alguns frutos, de coloração vermelha, servem de alimentos para os pássaros *Mionectes oleagineus* (LICHTENSTEIN, 1823) e *Mionectes striaticollis* (ORBIGNY e LAFRESNAYER, 1837), assim como as sementes de *S. arianae* compõe a dieta alimentar do primata *Callithrix flaviceps* (LEITÃO *et al.*, 1999).

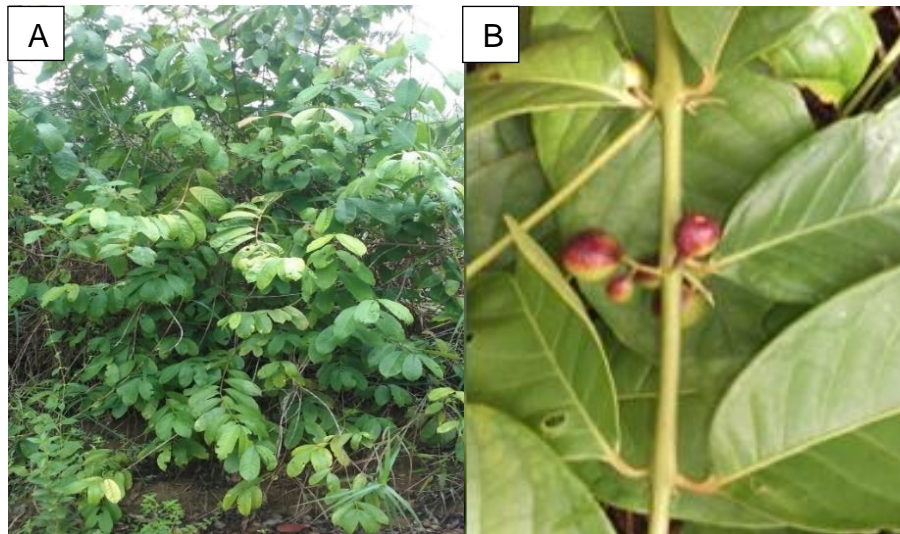


Figura 3: A- Arbusto de *S. cymosa*; B- Folhas e frutos de *S. cymosa* (Una, Ilhéus-BA) (Foto da autora).

Dentre as espécies estudadas no ponto de vista químico e farmacológico do gênero *Siparuna*, temos: *S. guianensis*, *S. apoisyce*, *S. arianae*, *S. aspera*, *S. dresslerana*, *S. gilgiana*, *S. nicaraguensis*, *S. pauciflora*, *S. tonduziana* e *S. poeppigii*. Dessas espécies foram isolados flavanóides e alcalóides (LEITÃO *et al.* 1999; PINA, 2016), classes de compostos que apresentam atividades antioxidantes, atividade antibacteriana e antiviral (SIMÕES *et al.*, 2004).

São vários os relatos de uso popular do gênero *Siparuna* para o combate de doenças, Tabela 1.

Tabela 1: Utilização etnobotânica das espécies *Siparuna*.

Espécies	Etnobotânica	Referências
<i>S. guianensis</i>	Desordem estomacais, dor de cabeça, reumatismo, inseticida, febre, pressão arterial, cólicas, ansiolítico	VALENTINI <i>et al.</i> , 2010 RODRIGUES, 2006
<i>Campomanesia</i> + <i>S. guianensis</i>	Malária, bebida e banho após parto.	VIGNERON <i>et al.</i> , 2005 RENNER E HAUSNER, 2005
<i>S. apoisyce</i>	Dispepsia, frutância, tosse, bronquites, laringites, doenças de pele, febre, gripe, dor de cabeça, reumatismo, contusões e mordidas de cobra.	FISCHER <i>et al.</i> , 1999 LEITÃO <i>et al.</i> , 1999 CORRÊA, 1978 LOPEZ <i>et al.</i> , 1993
<i>S. thecaphora</i>	Resfriado, reumatismo, dor de cabeça e picadas de cobra.	CICCIÓ E GÓMEZ-LAURITO, 2002 OTERO <i>et al.</i> , 2000
<i>S. pauciflora</i>	Febre	JENETT-SIEMS <i>et al.</i> 2003

2.2 Metabólitos secundários do gênero *Siparuna*

Os compostos químicos derivados de reações químicas que ocorrem nas células são designados metabólitos, que por sua vez podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários (WAKSMUNDZKA-HAJNOS *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.* 2004). Vários metabólitos secundários apresentam valor comercial na área farmacêutica, alimentícia, cosmética, agrônômica, entre outras (SIMÕES *et al.* 2004).

Os metabólitos secundários são substâncias produzidas em pequenas quantidades, e, nem sempre estão envolvidos em funções essenciais primárias do vegetal. Suas classes são oriundas das rotas biossintéticas, a partir do metabolismo da glicose, conforme a Figura 4. Compostos derivados dessas rotas podem ser armazenados em todas as partes da espécie vegetal (SILVA, 2013).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários sintetizado pelas espécies vegetais, via diferentes rotas biossintéticas: os compostos fenólicos, terpenos e esteroides e os alcaloides. O ácido chiquímico é precursor dos compostos fenólicos e alcaloides, o ácido malônico dos compostos fenólicos e o ácido mevalônico dos terpenos e esteróis. Cada classe possui suas propriedades específicas (TAIZ e ZEIGER, 2009).

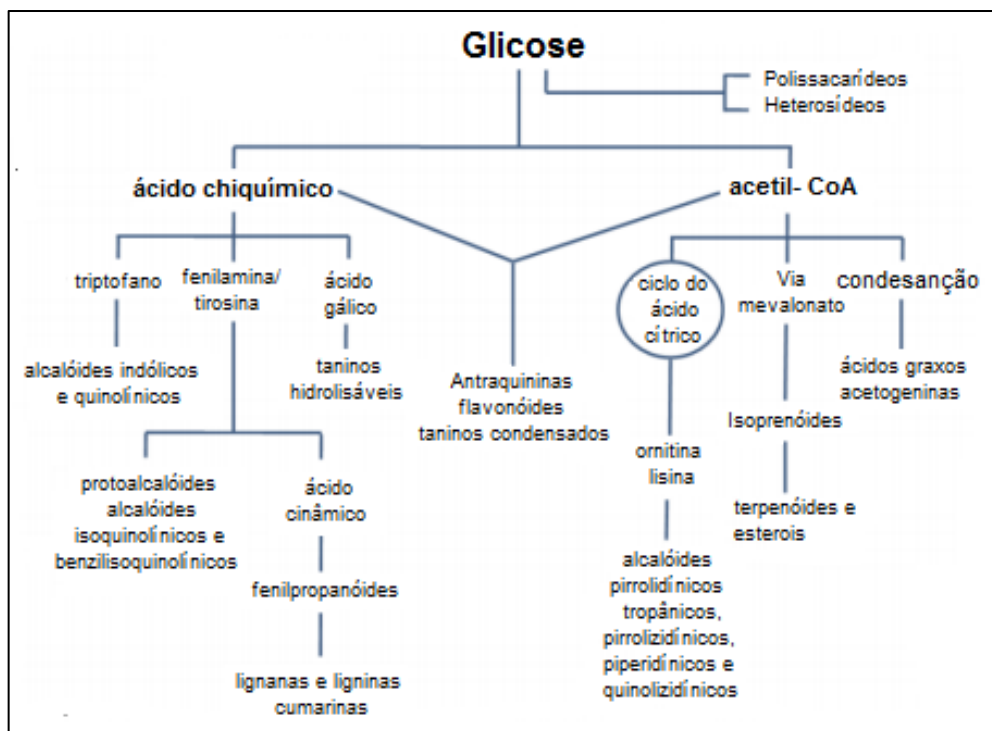


Figura 4: Rota biossintética das principais classes de metabólitos secundários (SANTOS, 2004), CoA: Coenzima A.

A síntese de metabólitos secundários é influenciada por diversos fatores, tanto qualitativo como quantitativo, e, podem estar relacionados a alguns aspectos ligados à sazonalidade, horário de colheita, ciclo circadiano, idade da planta, altitude, temperatura, excesso de radiação, nutrientes, disponibilidade hídrica, poluição atmosférica ou do solo e ataque patógenos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007)

Esses metabólitos atuam na defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de polinizadores, de animais dispersores de sementes, bem como micro-organismos (fungos e bactérias). Protege o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, proteção contra raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (MACEDO *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2004).

Vários metabólitos secundários foram isolados em óleos essenciais e extratos de espécies da família Siparunaceae, conforme Tabela 2 e 3.

Tabela 2: Composição química dos principais componentes presentes no óleo essencial de espécies de Siparunas.

Espécies	Local	Substâncias	Referências
<i>S. guianensis</i>	Porto Velho	Curzerenona (47,6%) (1), espatulenol (2) (22,4%) e eudesm-7(11)-en-4-ol (18,2%) (3)	ROVER, 2006
<i>S. guianensis</i>	Sudoeste brasileiro	Ácido decanóico (46,6%) (4), 2-undecanona (31,7%) (5), Frutos: 2-undecanona (32,5%) (5), β -pineno (19,6%) (6) e limoneno (13,6%) (7)	FISCHER <i>et al.</i> , 2005
<i>S. schimpffii</i>	Sul do Equador	Germacreno D (35, 3%) (8), biciclogermacreno (8,7%) (9), γ -muuruleno (7,0%) (10), Germacreno B (6,4%) (11) e Cadina-1,4-diene (5,2%) (12)	RIVERA 2014
<i>S. thecaphora</i>	Turrialba-Costa Rica	Germacreno D (32,7%) (8), α -pineno (16,3%) (14), β -pineno (13,8%) (6) e β -cariofileno (4,1%) (16)	CICCIÓ E GÓMEZ-LAURITO, 2002

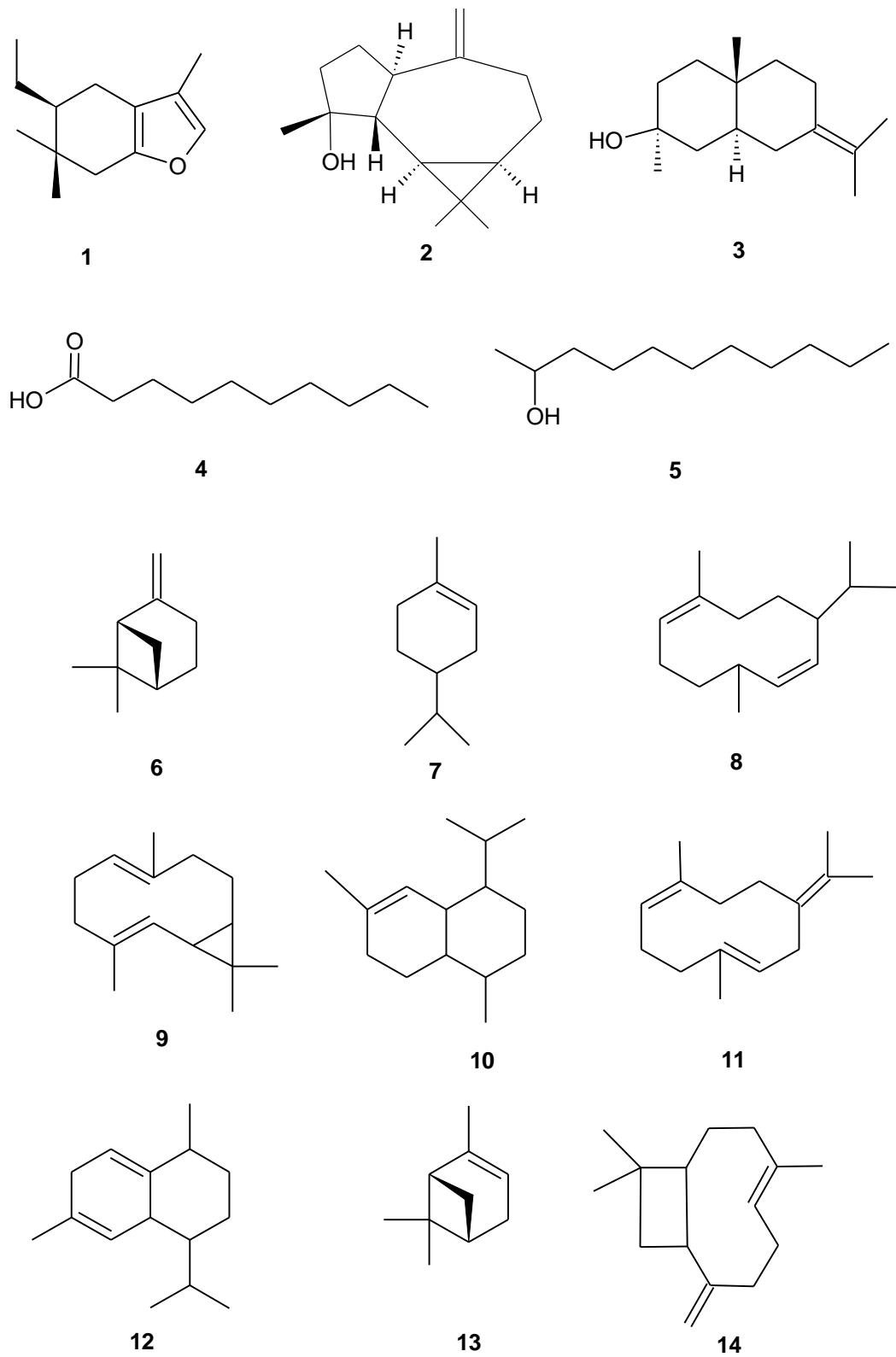
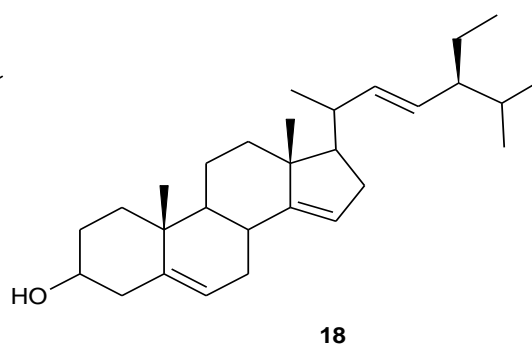
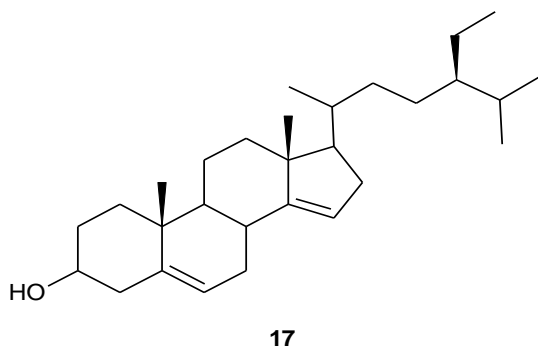
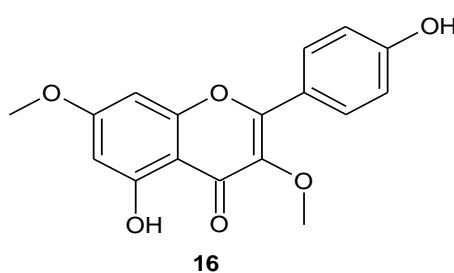
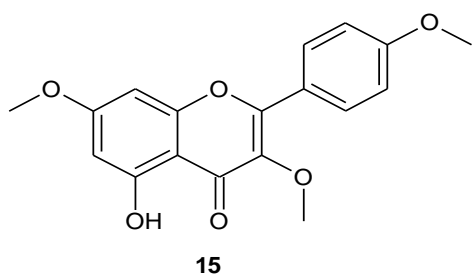
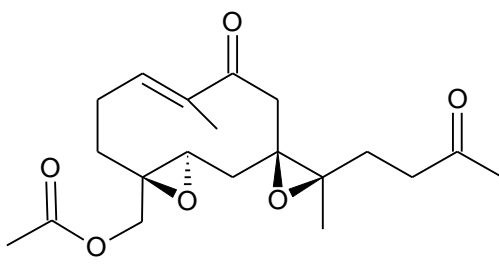


Figura 5: Fórmula estrutural de compostos identificados nos óleos essenciais de espécies de Siparunas.

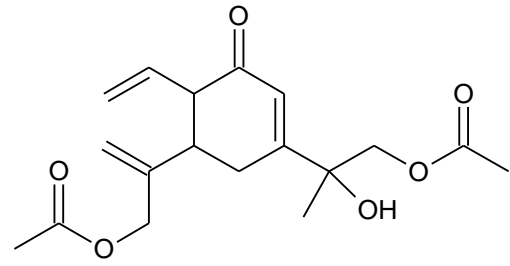
Tabela 3: Metabólitos secundários isolados dos extratos de espécies de Siparunas.

Espécies	Local	Substâncias	Referências
<i>S. guianensis</i>	Porto Velho	2 flavonoides: 5-hidroxi-3,7-dimetoxi-2(4-metoxifenil)-cromen-4-ona (15) e 5-hidroxi-3,7-dimetoxi-2(4-hidroxifenil)-cromen-4-ona (16) e uma mistura de β -sitosterol (17) e o estigmasterol (18)	ROVER, 2006
<i>S. pauciflora</i>	Sudoeste brasileiro	3 sesquiterpenóides: sipaucin A (19), sipaucin B (20) e sipaucin C (21) 4 Alcalóides: nor-boldina (22), boldina (23), laurotetanina (24) e N-metil-laurotetanina (25)	JENETT-SIEMS <i>et al.</i> , 2003
<i>S. dresslerana</i>	Panamá	2 alcalóides: flavinantina (26) e O-metilflavinantina (27)	GERARD <i>et al.</i> , 1986
<i>S. sessiliflora</i>	Colômbia	2 alcalóides: talicarpa (28) e ajmalina (29)	LÓPEZ e HERNANDO, 2011
<i>S. pachyantha</i>	Guiana Francesa	3 alcaloides: Coridina (30), roemerina (31) e liriodenina (32)	MARTI <i>et al.</i> , 2013
<i>S. guianensis</i>	Rôndonia	2 flavonoides: Canferol-3,7-dimethylether (33) Canferol-3,7,4'-trimethylether (34)	FACUNDO <i>et al.</i> , 2012
<i>S. guianensis</i>	Manaus	luteolina-6-C-glicosil-2"-O-glucoside (35), vicenina-2 (36), apigenina-6-C-glucosil-8-C-arabinosil (37), apigenina-6-C-arabinosil-8-C-glicosil (38), orientina (39), apigenina-6-C-glicosil-2"-O-glicoside (40), apigenina-8-C-glicoside (41), procianidina (42), lucenina-2 (43), 3-O-rutinoside-7-O-rhamnosidequercetina (44), 3,7-di-O-ramnosidequercetina (45), 3,7-di-O-ramnosidekanferol (46)	NEGRI <i>et al.</i> , 2012
<i>S. poeppigi</i>	Belém	liriodenina (32)	PINA, 2016

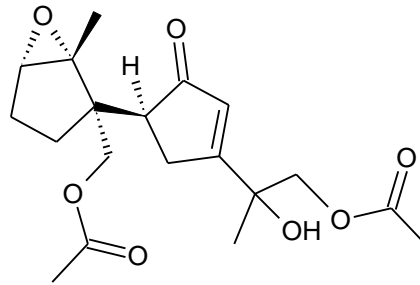




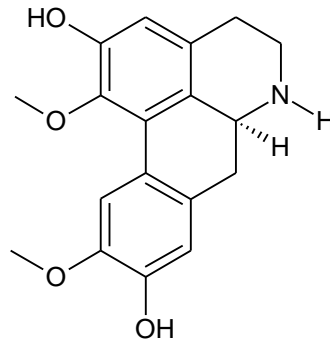
19



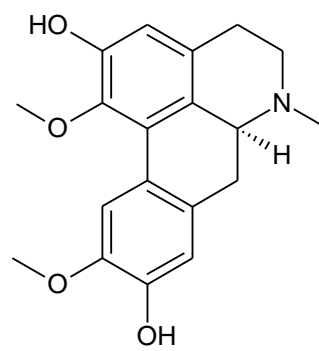
20



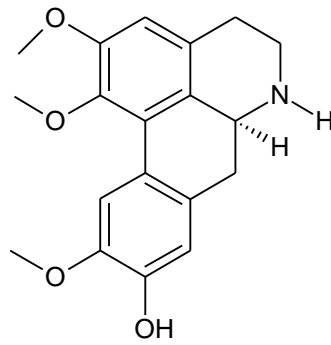
21



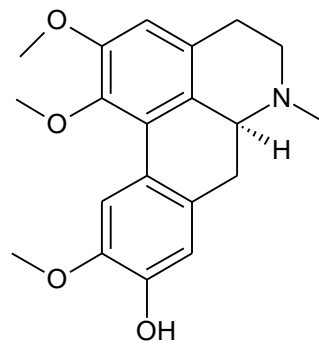
22



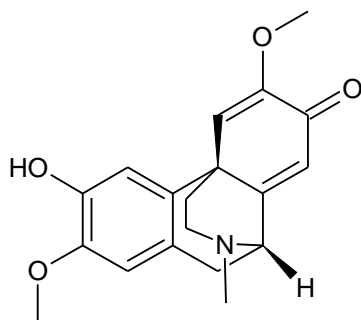
23



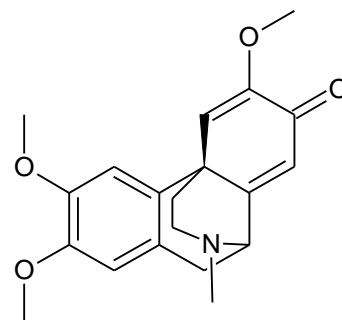
24



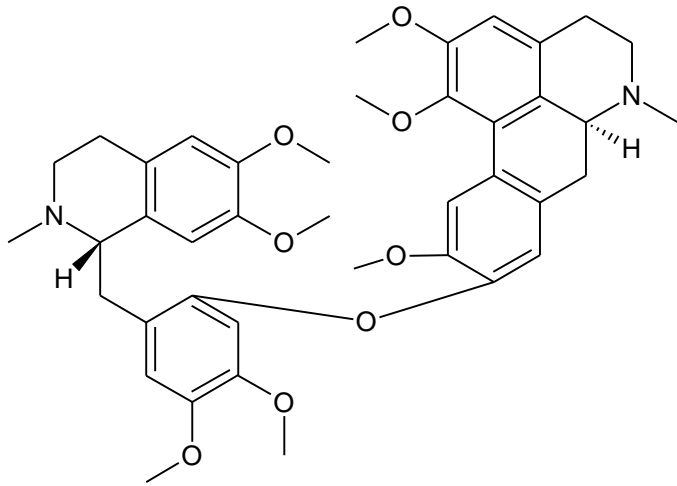
25



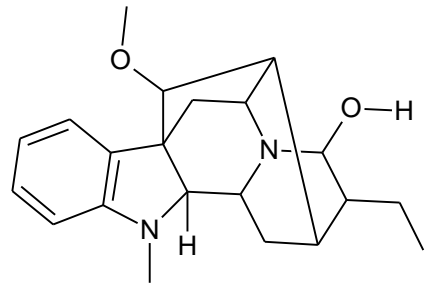
26



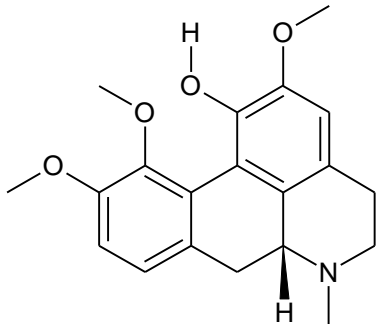
27



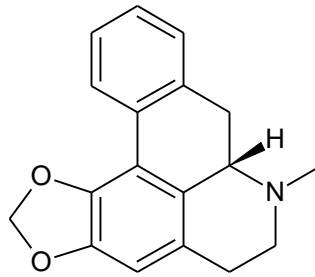
28



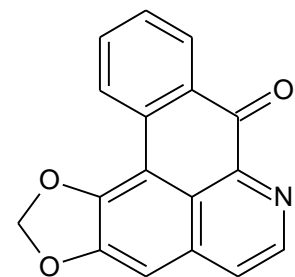
29



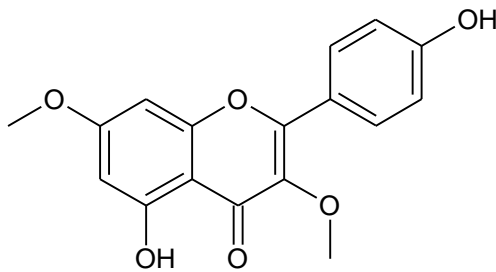
30



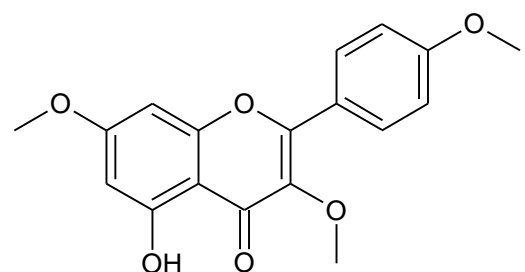
31



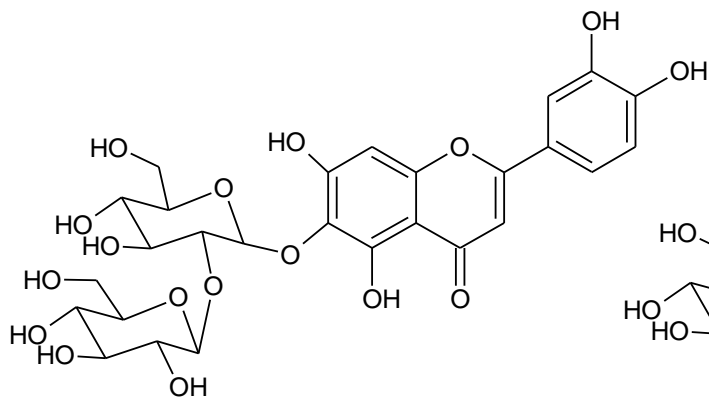
32



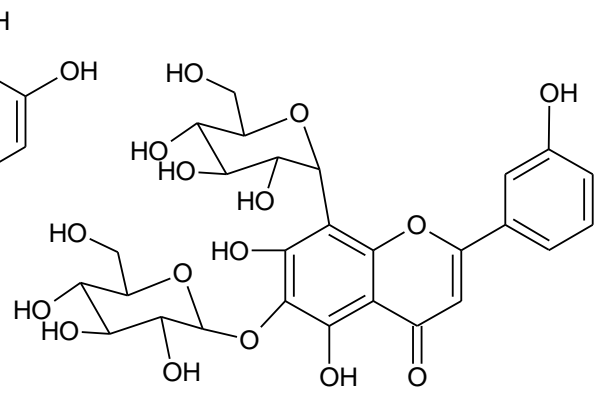
33



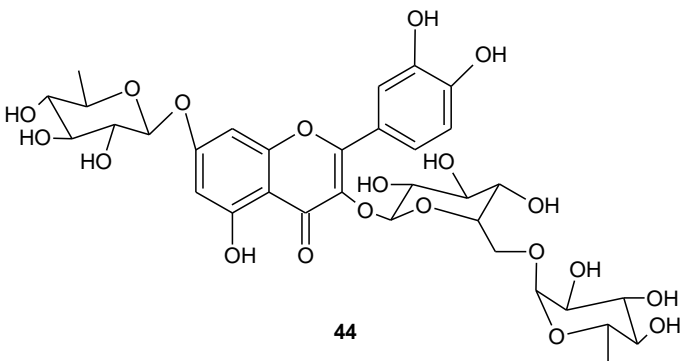
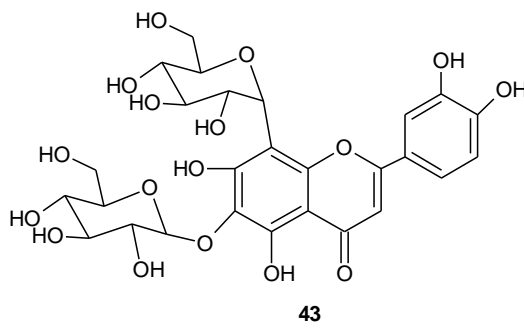
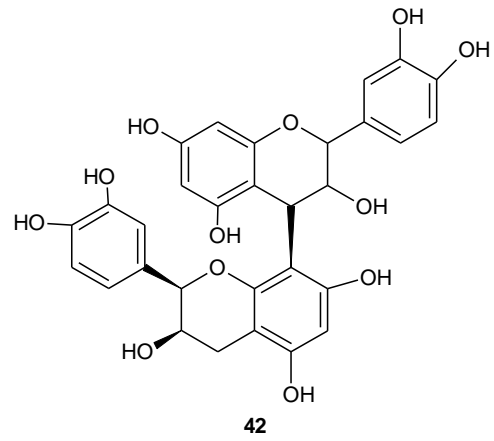
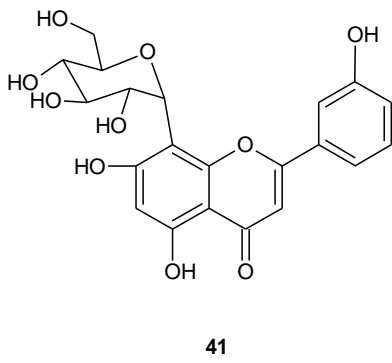
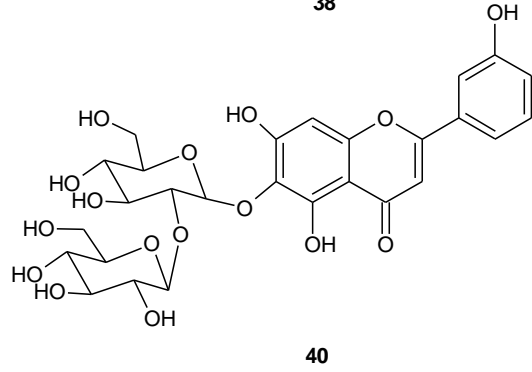
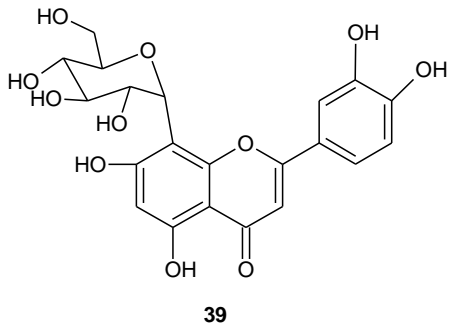
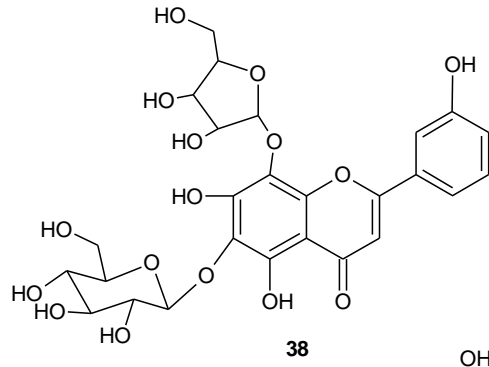
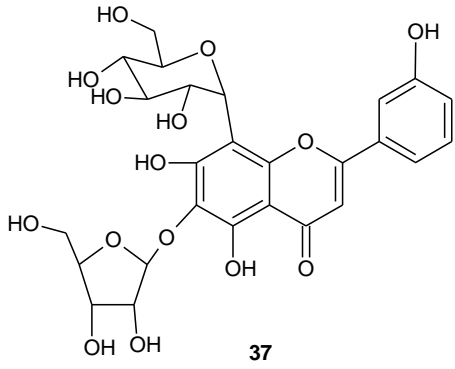
34



35



36



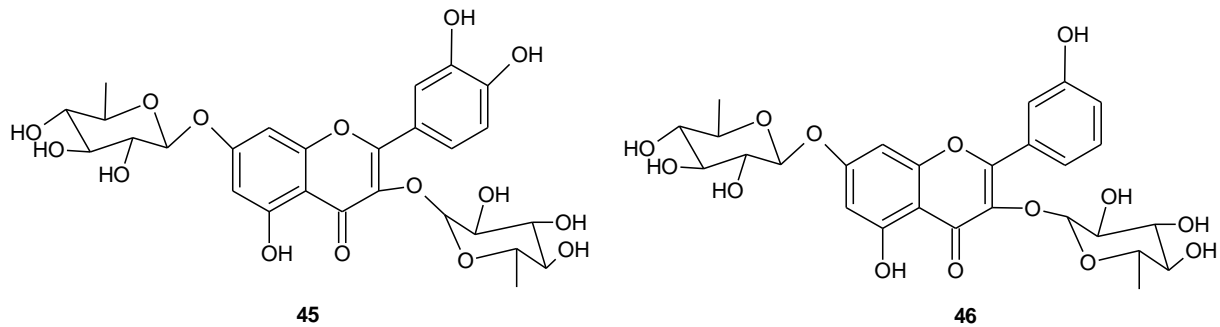


Figura 6: Fórmula estrutural dos metabólitos secundários isolados dos extratos espécies do gênero *Siparunas*.

2.3 Atividade biológica

Em busca de substâncias com potencial biológico é necessário a realização de testes qualitativos preliminares rápidos e de baixo custo e, que futuramente podem ser direcionados para estudos futuros mais aprofundados. Exemplos são os testes: *Artemia salina*, citotoxicidade e antimicrobiano.

2.3.a Teste frente a *Artemia salina*

O ensaio utilizando a *Artemia salina* para teste de letalidade é amplamente utilizado devido a disponibilidade comercial em forma de cistos, estabilidade, além de ser um teste rápido, simples e de baixo custo (MAYORGA *et al.*, 2010, MEYER *et al.*, 1982 e DOS SANTOS *et al.*, 2017).

O microcrustáceo é utilizado para detecção de componentes bioativos presentes em óleos essenciais e extratos vegetais. McLaughlin e colaboradores (1988) correlaciona o teste de letalidade com a atividade antitumoral, assim como o instituto nacional de câncer (NCI, EUA), sendo uma ferramenta utilizada como forma de avaliação para pré-selecionar drogas antitumorais (ANDERSON *et al.*, 1991). MEYER e colaboradores (1982) também correlaciona o teste com atividade antimicrobiana.

Martins filho (2016) testou o óleo essencial de *S. guianensis* frente *A. salina*, determinando uma CL_{50} de $392,38 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo considerado moderadamente tóxico.

2.3.b Citotoxicidade

O câncer é considerado um dos importantes problemas de saúde pública mundial sendo que, diversos tumores ainda não possuem formas de tratamento quimioterápico adequado, sendo necessária a pesquisa de novos medicamentos, alternativos e mais eficazes aos disponíveis comercialmente (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

A leucemia mielóide crônica (LMC) é um tipo de câncer com origem na medula óssea, caracterizada por uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, dando origem ao cromossomo Filadélfia (Ph) (HEIBLIG *et. al.*, 2014).

A doença que no passado foi considerada incurável, apresenta hoje bons resultados de remissão e cura com o transplante de células-tronco hematopoiéticas (células-tronco responsáveis pela manutenção da produção dos diversos tipos de células sanguíneas), embora este tratamento não possa se estender a todos os pacientes com LMC devido em grande parte à falta de doadores adequados e o risco de rejeição do hospedeiro contra o enxerto que pode levar a morte.

A leucemia mielóide aguda (LMA) se caracteriza pela expansão clonal de mieloblastos, tendo consequência o acúmulo anormal destas células na medula óssea, levando a diminuição da produção de outras células, como hemácias, leucócitos e plaquetas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA, 2004). O acúmulo dessas células imaturas começa na medula óssea, mas na maioria das vezes, ocorre no sangue podendo propagar para outras partes do corpo como nódulos linfáticos, baço, fígado, testículos e o sistema nervoso central (BITTENCOURT, 2003).

A descoberta de alguns agentes antitumorais isolados de espécies vegetais como a vincristina, vimblastina e taxol servem como motivação para a pesquisa de novas substâncias de origem vegetal com ação citotóxica em células tumorais. Os óleos essenciais também podem apresentar ação citotóxica. Exemplos são os óleos das espécies, *Casearia sylvestris* (SILVA *et al.*, 2008), *Calamansi* (PALMA *et al.* 2019), *Potentilla descolorir* (ZHANG *et al.*, 2018), *Chenopodium ambrosioides* (DEGENHARDT *et al.*, 2016) e *Pistacia khinjuk* (TAGHIZADEH *et al.*, 2018).

2.3.c Atividade antibacteriana

O aumento da resistência antimicrobiana (RAM) é considerado como ameaça à saúde pública, uma vez que, eleva o tempo de permanência hospitalar, gerando custos devido a necessidade de cuidados mais intensivos (OMS, 2019).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2012 na Europa, cerca de mais de 25.000 pessoas morreram por ano devido a infecções bacterianas hospitalares resistentes, além dos custos de 1,5 bilhões de euros por ano. Além do mais, devido ao efeito da RAM ocorre a necessidade de prescrever novos medicamentos, os quais podem causar efeitos colaterais ao organismo humano a longo prazo (RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA, 2012).

Algumas bactérias são responsáveis pelo desenvolvimento de algumas doenças comuns. *Escherichia coli* é uma bactéria que na maior parte vive naturalmente no intestino, tendo um papel importante na digestão dos alimentos. No entanto, nem todas *E. coli* são inofensivas, alguns tipos podem causar diarreia e outras doenças (BOSTON PUBLIC HEALTH COMMISSION, 2014).

A *Staphylococcus aureus* está presente na pele e nas fossas nasais do ser humano, entretanto pode provocar doenças infecciosas, como: acnes, furúnculos, pneumonia, meningite, entre outras. Essa bactéria tem uma enorme capacidade de adaptação e resistência aos antibióticos usuais, a qual vem sendo tratada como de grande importância no quadro das infecções hospitalares (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

A *Salmonella* é uma das principais bactérias responsáveis por intoxicações alimentares, tendo como principais sintomas, gastroenterite, vômitos, diarreia e febre. A salmonelose (infecção por *salmonella*) é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo (SHINOHARA *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por González-Lamothe *et al.* (2009) mostra que os metabólitos secundários existentes nas plantas podem atuar: como “potencializadores de atividade antimicrobiana” agindo em conjunto com antibióticos potencializando seu efeito frente a micro-organismos com mecanismos resistentes aos antibióticos usuais.

Estudos demonstram que alguns óleos essenciais apresentam atividade contra uma diversidade de micro-organismos como: vírus, fungos e bactérias. Montanari e

colaboradores (2010) relataram atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *S. guianensis* frente *E. coli*, *S. aureus* e *Bacillus cereus*.

Assim como os óleos essenciais os extratos, frações ou componentes isolados também podem apresentar atividade antibacteriana. González e Gil Archila (2012) relataram atividade antibacteriana da fração de alcaloides das folhas de *S. sessiliflora* frente a bactéria *Bacillus subtilis*. A espécie *S. arianae* apresentou a atividade antibacteriana do extrato bruto das folhas (CIM = de 200 µg mL⁻¹) contra *Mycobacterium malmoense* (FONSECA *et al.*, 2008). O extrato etanólico de *S. áspera*, apresentou atividade antiplasmodial (CELINE *et al.*, 2009).

Diante do exposto, é necessário que se busque novos compostos que possam ser utilizados de forma mais eficiente no combate de doenças infecciosas causadas por bactérias.

Os vários relatos indicam que espécies do gênero *Siparuna* são promissoras na classe de metabólitos secundários de interesse científico. Esses relatos nos motivam a buscar o isolamento e identificação de substâncias desta espécie, contribuindo, principalmente, para o conhecimento químico e biológico do gênero *Siparuna*.

No nosso trabalho é a primeira vez em que substâncias isoladas do gênero *Siparuna* estão sendo testadas frente a testes citotóxicos e antimicrobianos.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Isolar e identificar metabólitos secundários nas folhas de *S. cymosa*, através do estudo químico do óleo essencial e do extrato orgânico de acetato de etila, bem como investigar as atividades: citotóxica, letalidade e antibacteriana.

3.2 Específicos

- Obter e caracterizar o óleo essencial das folhas de *S. cymosa*.
- Obter extratos orgânicos das folhas de *S. cymosa*,
- Isolar e identificar metabólitos secundários do extrato em acetato de etila.
- Identificar e caracterizar os compostos isolados utilizando técnicas espectroscópicas na região do Infravermelho (IV), Ressonância magnética nuclear uni e bidimensional (RMN de ^1H e de ^{13}C) e Espectrometria de massas (EM).
- Avaliar o potencial biológico do óleo essencial, extrato em acetato de etila, sub-frações e compostos isolados através da realização de testes antimicrobiano, citotóxico, e letalidade frente *A. salina*.

4 METODOLOGIA

4.1 Reagentes e equipamentos

- Os solventes orgânicos utilizados nos procedimentos foram das marcas Vetec®, Quimica Moderna®, Neon®, Dinâmica® e Synth, todos de grau PA.
- Para a trituração do material vegetal foi utilizado um moinho de facas da marca Marconi® MA-680 e para a secagem das folhas foi utilizada estufa com circulação e renovação de Ar SL-102, sendo 40°C para a extração do óleo essencial e 60°C para a preparação dos extratos.
- Os pontos de fusão foram determinados usando o Ponto de Fusão Capilar Fisatom® 430D digital e não foram corrigidos.
- Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos na faixa de 4000-600 cm^{-1} usando um espectrofotômetro Thermo Scientific™ Perkin Elmer® 400. As amostras foram analisadas em ATR (attenuated total reflectance), na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) em colaboração com o grupo Bioma.
- Os espectros de CG - DIC foram obtidos usando um Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas Varian Saturn 3800/MS2000.
- O espectro de CG - EM foi obtido por injeção direta utilizando um Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas Shimadzu QP-2010 SE.
- Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C uni e bidimensionais, bem como os experimentos de DEPT 135 foram obtidos no espectrômetro Bruker Avance® CRX400, na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) operando com frequência de 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C . Os deslocamentos químicos foram expressos em valores de δ (ppm), utilizando como referência interna tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,0$). Os solventes utilizados na dissolução das amostras para obtenção dos espectros de RMN foram metanol deuterado ($\delta_{\text{H}} 3,31$ e $\delta_{\text{C}} 49,00$) e DMSO deuterado ($\delta_{\text{H}} 2,50$ e $\delta_{\text{C}} 35,2$).

4.2 Procedimentos gerais

- **Técnicas de cromatografia:** nas separações cromatográficas em coluna foram utilizadas sílica gel Merck® 60 (0,063 – 0,200 mm), segundo metodologias descritas por Collins *et al.*, (2006). A sílica foi suspensa inicialmente com solvente utilizado como fase móvel e empacotada em coluna de vidro até total decantação da sílica. A amostra foi incorporada com quantidade suficiente de sílica e solvente e aplicada no topo da coluna, em seguida foi realizada a eluição com solventes de ordem crescente de polaridade. Na cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) foi utilizado gel de sílica Vetec® 60-G. As cromatoplasmas para CCD foram preparadas espalhando-se uma suspensão de sílica em água destilada sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico, obtendo-se placas com espessuras de 0,25 mm. Depois de secar ao ar livre, todas as cromatoplasmas foram ativadas em estufas a 100 °C por um período de aproximadamente uma hora (COLLINS *et al.*, 2006). Como reveladores foram utilizados vapores de iodo, reagente de vanilina e anisaldeído preparado conforme a metodologia descrita por (MARQUES E BORGES, 2007).

- **Reação de Liebermann-Burchard para esteroides e triterpenos:** de acordo com a metodologia proposta por Matos (1997), adicionou-se à amostra 1 mL de clorofórmio e em seguida 1 mL de anidrido acético. A mistura foi agitada suavemente e adicionou-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado. O material foi novamente agitado e observado o aparecimento de cores. A coloração azul evanescente seguida de verde permanente indica a presença de esteroides livres e a formação de cor parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.

4.3 Coleta do material vegetal

As folhas da espécie *S. cymosa* (cerca de 4000g) foram coletadas em maio de 2017 na cidade de UNA (coordenadas 15° 12'34.2"S e 39° 03'36.4"W), município do estado da Bahia. A identificação taxonômica da espécie foi realizada pelo botânico Luiz Alberto Mattos sob registro 16332 no Herbário da UESC. As folhas foram submetidas a secagem, em estufa de ventilação forçada até a observação da

massa constante, resultando ao fim do processo uma massa total de 309 g de folhas secas para o óleo essencial e 1100 g para os extratos.

4.4 Extração e análise do óleo essencial

As folhas secas (30g) foram submetidas ao processo de extração do óleo essencial empregando à técnica de hidrodestilação adaptada a um aparelho de Clevenger (CRAVEIRO *et al.*, 1981; BIASI e DESCHAMPS, 2009). O hidrolato foi submetido à extração líquido-líquido utilizando diclorometano como solvente orgânico. Posteriormente, foi tratado com sulfato de sódio anidro e, em seguida filtrado e concentrado, levando ao óleo essencial. O teor foi expresso em percentual, a partir da relação entre massa de óleo obtido por massa de material vegetal seco utilizado (%m/m), em triplicatas.

A composição química do óleo volátil foi obtida por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), e espectrometria de massas (EM). Para tanto, o equipamento utilizado foi o cromatógrafo a gás (VARIAN, Chromopack, CP-3800), equipado com coluna capilar de sílica fundida VF5-ms (30m X 0,25 mm) com fase estacionária de 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano (0,25µm de espessura de filme), tendo hélio como gás de arraste e fluxo de 1,0 mLmin⁻¹ (10 psi). As temperaturas do injetor e detector foram de 250 e 280 °C, respectivamente.

Injetou-se na coluna 1,0 µL de solução em clorofórmio a 10% no modo split (1:10) para cada amostra de óleo, em triplicatas. A temperatura da coluna teve início a 60 °C, sendo acrescida de 8 °C por minuto até 260 °C, sendo mantida nesta temperatura durante 5 minutos. O tempo de análise foi de 30 minutos. A quantificação das substâncias presentes nos óleos foi obtida por integração eletrônica dos picos detectados no DIC por normalização.

A espectrometria de massas foi feita por meio do equipamento VARIAN (Chromopack Saturn 2000) equipado com a mesma coluna capilar e mesmas condições de análise usadas na CG-DIC, sendo a temperatura de *transferline*, *manifold* e *trap* de 280, 50 e 150 °C, respectivamente. Para a identificação das substâncias, os índices de retenção foram calculados a partir da relação entre os tempos de retenção de cada composto químico presente no óleo com tempos de retenção de padrões de hidrocarbonetos C₃-C₂₆ (sigma-USA), conforme a equação:

$$IK = 100 \left\{ n + (N - n) \left[\frac{(\text{Log } TR_o - \text{Log } TR_m)}{\text{Log } TR_M - \text{Log } TR_m} \right] \right\}$$

Em que:

- IK é o índice de Kovats;
- n é o número de carbono do hidrocarboneto que elui antes do composto de interesse;
- N é o número de carbono do hidrocarboneto que elui antes do composto de interesse;
- $\text{Log } TR_o$ é o logaritmo do tempo de retenção do composto químico presente na amostra, na base 10;
- $\text{Log } TR_m$ é o logaritmo do menor tempo de retenção do hidrocarboneto padrão, mais próximo do intervalo de tempo em que se encontra cada composto na amostra, na base 10;
- $\text{Log } TR_M$ é o logaritmo do maior tempo de retenção do hidrocarboneto padrão, mais próximo do intervalo de tempo em que se encontra cada composto na amostra, na base 10;

Os constituintes químicos foram identificados a partir da comparação computadorizada dos cromatogramas com a biblioteca do NIST 08 (*National Institute of Standards and Technology*), além da comparação dos índices de retenção e dos espectros de massas com a literatura (ADAMS, 2007).

4.5 Preparação dos extratos das folhas de *Siparuna cymosa*

Cerca de 1100 g de folhas secas de *S. cymosa* foram trituradas em moinho de facas. Posteriormente, 860 g do material foram submetidos à extração por maceração exaustiva seguida de concentração utilizando um rotaevaporador para obtenção dos extratos brutos. Foram utilizados os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, obtendo os respectivos extratos: hexânico (67,10g), clorofórmico (24,43g), acetato de etila (29,43g) e etanólico (178,39g), conforme a figura 7, página 37.

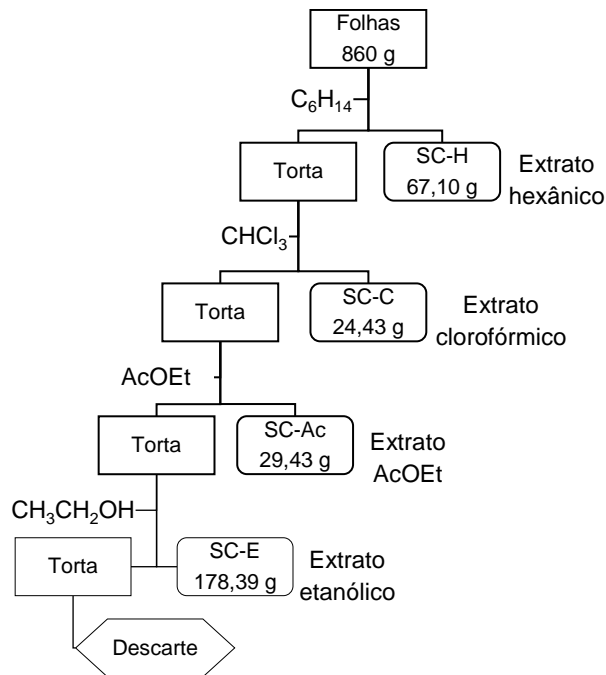


Figura 7: Fluxograma de preparação dos extratos das folhas de *S. cymosa*

4.6 Prospecção dos constituintes químicos dos extratos das folhas de *S. cymosa*

Através da metodologia descrita por Matos (2009), com adaptações foi realizada a caracterização das principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos clorofórmico, acetato de etila e etanólico de *S. cymosa*. Para isso, 10 mg de cada extrato foi solubilizado em etanol (20 mL). Em seguida, separou-se sete tubos de ensaio numerados com cerca de 3-4 mL da solução, posteriormente foram realizados testes conforme a tabela 4, página 38.

Tabela 4: Prospecção fitoquímica do extrato clorofórmico, acetato de etila e etanólico das folhas de *S. cymosa* (MATOS, 2009).

Metabólitos secundários	Reação de caracterização	Resultado indicativo dos testes
Fenóis e Taninos	Reação com solução alcoólica de FeCl ₃	Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos (taninos hidrosolúveis) e verde, a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).
Antocianinas ¹ , antocianidinas ¹ e flavonoides ²	Reação em meio ácido (pH=3), básico (pH=8,5) e básico (pH=11)	Coloração ¹ = vermelho, lilás e azul purpura Coloração ² = vermelho, ----, vermelho alaranjado
Leucoantocianidinas ¹ , Catequinas ² e Flavonas ³	Reação em meio ácido com HCl (pH=1-3) e básico com NaOH (pH=11)	Coloração ¹ = vermelho Coloração ² = Pardo amarelada Coloração ³ = vermelho laranja
Flavonóis, flavonas, flavononóis e xantonas	Reação com Mg e HCl	Coloração = vermelho
Esteroides ¹ e triterpenoides ² (Lieberman-Burchard)	Reação com anidrido acético e H ₂ SO ₄	Coloração ¹ = azul evanescente seguida de verde permanente (esteroides livres) Coloração ² = parda até vermelha indica triterpenoides pentacíclicos livres.
Saponinas	Reação com adição de H ₂ O	Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponina (heterosídeos saponínicos)
Alcaloides	Reação com Reagente de Dragendorff	Precipitado floculoso, pesado em pelo menos dois tubos é indicativo de alcalóides.
Cumarinas	Reação com solução alcoólica mol L ⁻¹ de KOH e irradiação UV	Desenvolvimento de fluorescência azulada progressiva e forte, bem visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada.

(1,2,3) resultados indicativos para o metabólito sobrescrito com a numeração.

4.7 Atividade biológica das folhas de *S. cymosa*

4.7.1 Teste de letalidade

a) Óleo essencial

Através da metodologia descrita por Meyer (1982), com adaptações foi realizado o teste de letalidade utilizando larvas do tipo *nauplios* de *Artemia salina* (Maramar), onde foram incubados em solução salina sob iluminação artificial por 48 h, para eclosão. Após esse período, 10 microcrustáceos foram contados e adicionados a recipientes transparente contendo uma solução resultante de 5 mL composta por água do mar, 1 mL de Tween a 5% e cinco diferentes concentrações de óleo essencial (1000 - 500 - 300 - 100 - 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), cada uma delas formada por 5 replicatas. Utilizou-se como controle água do mar e uma solução de Tween a 5% em triplicatas. Após 24 horas da adição dos microcrustáceos na presença de luz, foi feita uma nova contagem para determinar os microcrustáceos vivos e mortos, em cada concentração. Para determinar a CL_{50} , utilizou-se como parâmetro de avaliação o método de interpolação, onde correlaciona-se a percentagem de microcrustáceos mortos e vivos em função da concentração, conforme dos Santos e colaboradores (2017).

b) Extratos

Inicialmente, foi feito um teste de solubilidade dos extratos utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80 conforme metodologia de dos Santos e colaboradores (2017). Os extratos utilizados para esse teste, foram: clorofórmico, acetato de etila e etanólico, com exceção do extrato hexânico que não apresentou solubilidade nos tensoativos utilizados no teste de solubilidade. Para isso, 52 mg do extrato foram misturados em solução de 50 mL (composta por água do mar e 1 mL solução de tween a 5%). A mistura foi agitada e decantada, seguida de filtração. O material insolúvel foi pesado, e a partir da massa residual foi determinada a massa solubilizada na solução aquosa salina. A partir da solução mãe foi realizada diluições de diferentes concentrações (200 - 150 - 100 - 50 - 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), dos extratos, cada uma delas formada de 5 replicatas. Após 24 h os microcrustáceos foram contados para a determinação da CL_{50} (dos Santos *et al.*, 2017).

4.7.2 Atividade citotóxica

Na avaliação da atividade citotóxica foi usando o ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich) conforme VALADARES e colaboradores (2007), utilizando linhagem celular de Leucemia Mieloide Aguda (ATCC TIB-202, THP-1) e linhagem celular de Leucemia Mieloide Crônica (ATCC CRL-3344, K562). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2×10^5 células por poço) e incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24 h, os poços foram lavados com meio de cultura (RPMI-1640 + soro bovino fetal inativado a 20% + 2 m mol L⁻¹ L-glutamina) e incubados com amostras a concentrações de 0,10 a 100 µg mL⁻¹. Após 48 h de incubação, as placas foram tratadas com MTT (5 mg mL⁻¹). As medições colorimétricas foram realizadas a 550 nm utilizando o leitor de microplacas Spectramax M5e. Todas as experiências foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos pelos valores de CI₅₀ (concentração do fármaco que reduziu a viabilidade celular em 50%). Os valores de CI₅₀ foram calculados usando o software OriginPro 8.0.

O índice de seletividade (IS) corresponde à divisão entre o valor da CI₅₀ do material testado frente a linhagem de células normais e o valor da CI₅₀ do material testado frente a linhagem de células neoplásicas ($IS = CI_{50} \text{ células normais} / CI_{50} \text{ células neoplásicas}$) (NAKAMURA *et al.*, 2006).

Este trabalho foi realizado em parceria com o professor Dr. Adriano de Paula Sabino do departamento de análises clínicas e toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.7.3 Biocromatografia

Uma suspensão do micro-organismo foi preparada em 3 mL do meio infusão de cérebro e coração *Brainheart Infusion* (BHI) a ponto de turvação 1 na escala MacFarland a partir de estoque de bactérias. Em um tubo de 50 mL foram adicionados 20 mL de ágar nutriente a uma temperatura de 45°C, 3 mL de suspensão antibacteriana e 150 µL do corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC).

Cerca de 1000 μL da mistura foram distribuídos sobre uma placa cromatográfica de sílica gel, contendo spots dos materiais a serem testados. As cromatoplasmas permaneceram em repouso por 24 horas, sob temperatura constante de 37 °C em estufa de esterilização e em seguida foi medido o halo de inibição. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Foi utilizado como controle o antibiótico cefalexina.

Nesse teste foram utilizadas as bactérias *S. aureus* (ATCC 25904), *E. coli* (ATCC 25299) e *Salmonella enterica* (SE PT4). Foram considerados com atividade inibitória os halos com diâmetro ≥ 6 mm (BONA *et al.*, 2014).

Esses testes foram realizados sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Aline Conceição, coordenadora do laboratório de micologia da UESC.

4.8 Isolamento de constituintes químicos do extrato em acetato de etila

a) Fracionamento

Parte do extrato de acetato de etila (17,00 g) foi fracionado através de uma coluna cromatográfica de vidro (\emptyset de 5 cm), empacotada com sílica gel 60 (600 g) e eluída com hexano, sendo o volume morto de 1000 mL. Em seguida, foram utilizadas a mistura de Hex puro, Hex/ CHCl_3 (1:1), CHCl_3 puro, $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (8:2), $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (6:4), $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (4:6), $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ (2:8), AcOEt puro, AcOEt /EtOH (8:2), e por último EtOH, levando a obtenção de 51 frações (Tabela 5).

Tabela 5: Frações obtidas e eluentes usados na coluna cromatográfica do extrato de acetato de etila.

Eluente	(%)	Frações
Hex	100	1 – 2
Hex/ CHCl_3	50	3 – 4
CHCl_3	100	5 – 14
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$	80/20	15 – 25
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$	60/40	26 – 29
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$	40/60	30 – 34
$\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$	20/80	35 – 38
AcOEt	100	39 – 42
AcOEt/EtOH	80/20	43 – 49
EtOH	100	50 – 51

As frações foram concentradas em rotaevaporador e, submetidas ao agrupamento através da cromatografia em camada delgada comparativa (CCD),

usando como reveladores vapores de I_2 e vanilina. As frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhante entre si foram agrupadas, obtendo-se 20 grupos de frações denominadas como “SAC”, como mostrado na Figura 8.

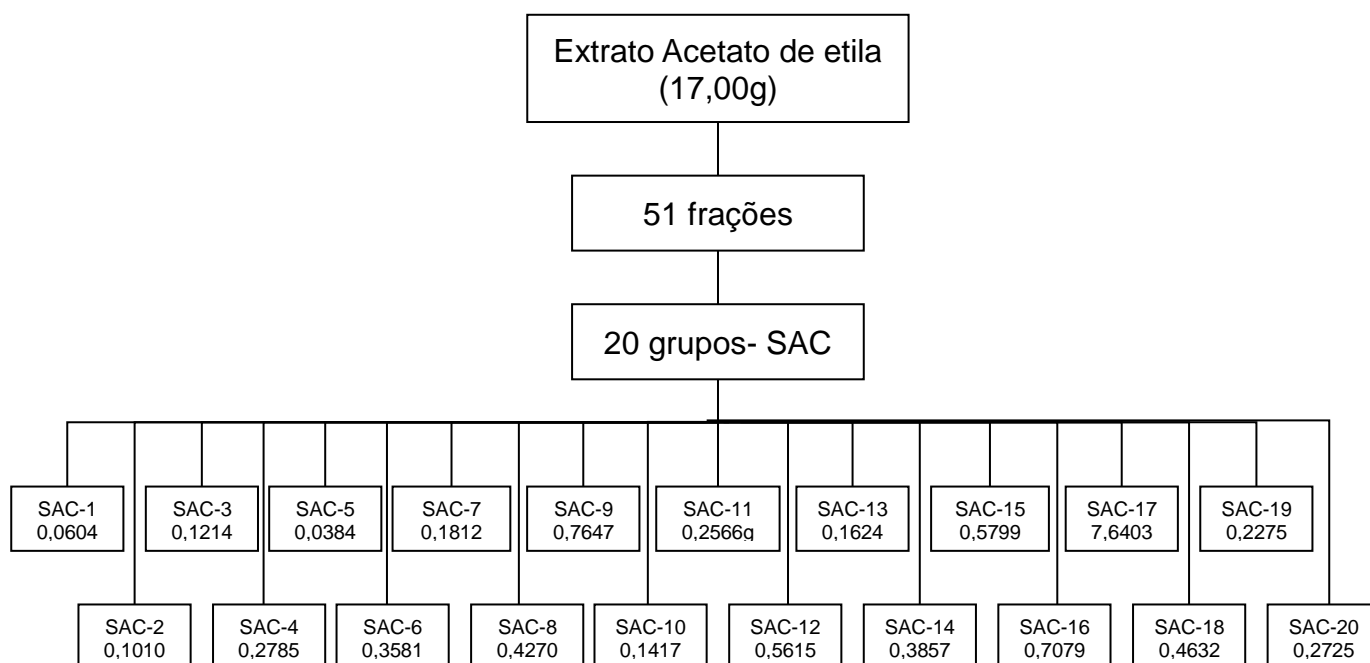


Figura 8: Fluxograma do fracionamento do extrato de acetato de etila bruto de *S. cymosa*.

b) Isolamento de metabólitos secundários dos grupos

Grupo SAC-1, SAC-2, SAC-3, SAC-4:

Os grupos SAC-1 (0,0604g), SAC-2 (0,1010g), SAC-3 (0,1214g) e SAC-4 (0,2785g) apresentaram-se com textura de óleo de coloração amarela. Estas frações foram tratadas com acetona levando a formação de um sólido branco finamente dividido. Os sólidos foram analisados através de CCD e IV.

Grupo SAC-15:

O grupo SAC-15 (0,5799 g) apresentou-se como um material sólido de coloração escura, em meio a um óleo. Esta fração foi tratada com metanol, e a filtração levou ao isolamento de um sólido de coloração branca (m=0,0532 g, substância 1 (RS1)). O filtrado após concentração foi tratado com acetona formando um sólido finamente dividido (m=0,0068g), apresentando ponto de decomposição

entre 247 °C a 249 °C. Posteriormente, foi identificado como quantidade adicional da substância 1 (RS1). O sólido foi analisado através da CCD e IV, constatando que o mesmo se encontrava puro, conforme a figura 9.

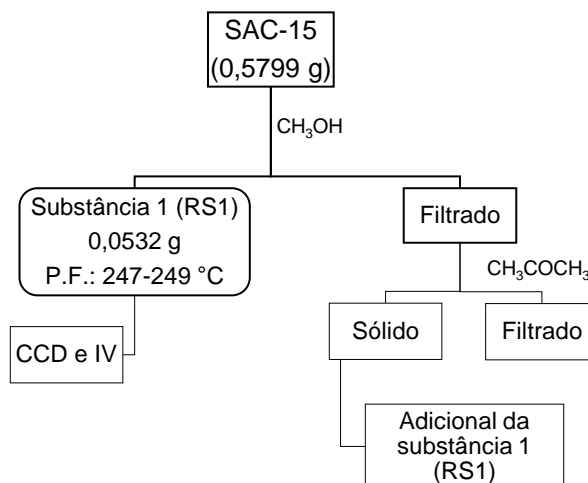


Figura 9: Esquema da purificação da substância presente no grupo SAC-15.

Grupo SAC-16:

O grupo SAC-16 (0,7079 g) apresentou-se como um material sólido de coloração escura, em meio a um óleo. Esta fração foi tratada com metanol seguida de filtração levando a obtenção de um sólido de coloração branca ($m = 0,0110$ g, substância 2), o sólido foi analisado através da CCD e IV e apresentou-se como adicional da substância 1 (RS1), conforme a figura 10.

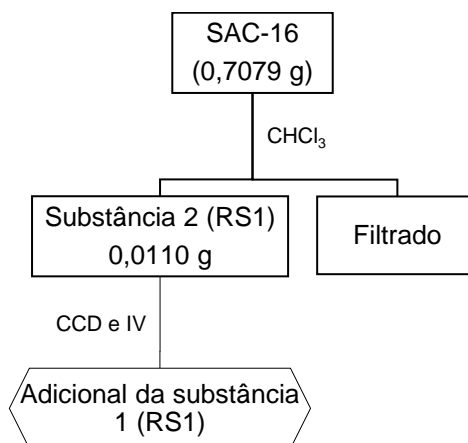


Figura 10: Esquema da purificação da substância presente no grupo SAC-16.

Grupo SAC-17:

Esse grupo SAC-17 (7,6403g) apresentou-se como um material sólido de coloração escura, em meio a um óleo. Cerca de 0,400 g desse grupo foi submetido a cromatografia em CF, eluída com metanol, fornecendo 24 frações. O agrupamento por CCD levou a formação de 9 grupos denominados SAC - 17(1) – SAC - 17 (9). Os grupos SAC- 17(4) e SAC- 17 (8) apresentaram sólidos de coloração amarelo palha. O sólido do grupo SAC- 17(4), foi submetido a CCD e IV, constatando que o mesmo se encontrava puro, dando origem a substância 3 (RS2), o grupo SAC- 17(8) foi submetido a sephadex fornecendo 6 frações agrupadas por CCD levando a formação de dois grupos 1 e 2. O grupo 2 foi submetido a CCD e IV, dando origem a substância 4 (RS3), conforme a figura 11.

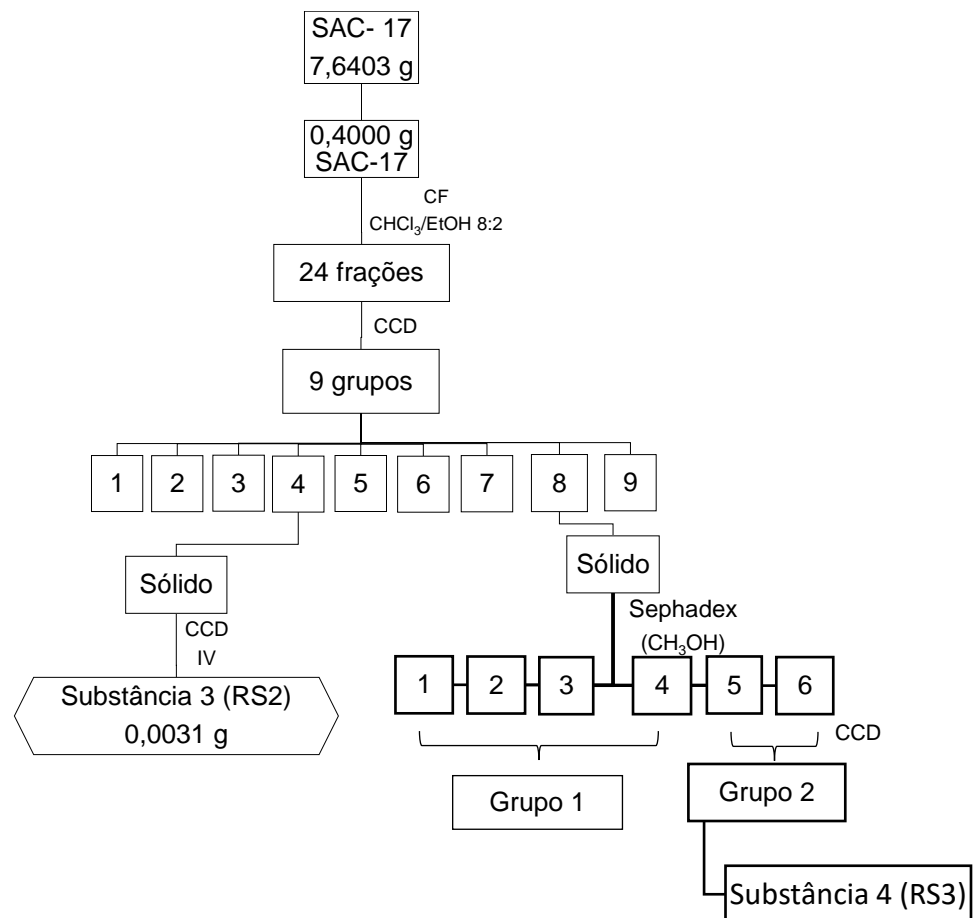


Figura 11: Esquema de purificação da substância 3 e 4 presentes no grupo SAC- 17 (4 e 8)

Demais grupos:

Os grupos SAC-5, SAC- 6, SAC- 7, SAC-8, SAC- 9, SAC- 10, SAC- 11, SAC- 12, SAC- 13, SAC- 14, SAC- 18, SAC- 19 e SAC- 20 não foram trabalhados devido à pouca massa de material obtida ou alta complexidade observada através da CCD.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para extração do óleo essencial foram necessários 90 minutos utilizando à técnica de hidrodestilação adaptada ao aparelho Clevenger. O teor médio de óleo essencial foi de $2,11 \pm 0,09\%$.

Castellani *et al.* (2006) relataram a variabilidade de teores de óleos essenciais da *S. guianensis*, em função das partes vegetais (folhas e galhos) e da época de colheita (primavera, verão, outono e inverno). Essa espécie apresentou teor médio de óleo essencial das folhas secas variando de 0,13 - 0,24% e para os galhos de 0,04 – 0,09%. Bersan (2012) relatou o teor de 0,29% de óleo essencial das folhas dessa mesma espécie.

Comparando com o teor médio de óleo essencial nesse estudo, a espécie *S. cymosa* apresenta maior teor de óleo essencial. Nosso grupo de pesquisa é o primeiro a estudar o óleo essencial dessa espécie e, poucos são os estudos de óleo essencial de espécies desse gênero.

A análise cromatográfica do óleo essencial permitiu a identificação de 20 componentes, representando 97,0% do total de voláteis, distribuídos em monoterpenos (2,8%), monoterpenos oxigenado (7,9%), fenilpropanoide (1,3%) sesquiterpenos (3,7%) e sesquiterpenos oxigenados (81,3%), Figura 12 e Tabela 6, página 47. O α -bisabolol (68,9%), é o principal componente majoritário do óleo, *p*-cimen-9-ol (7,9%) e espatulenol (3,7%) foram encontrados em quantidades significativas, seus espectros de massas estão representados na figura 13, página 48.

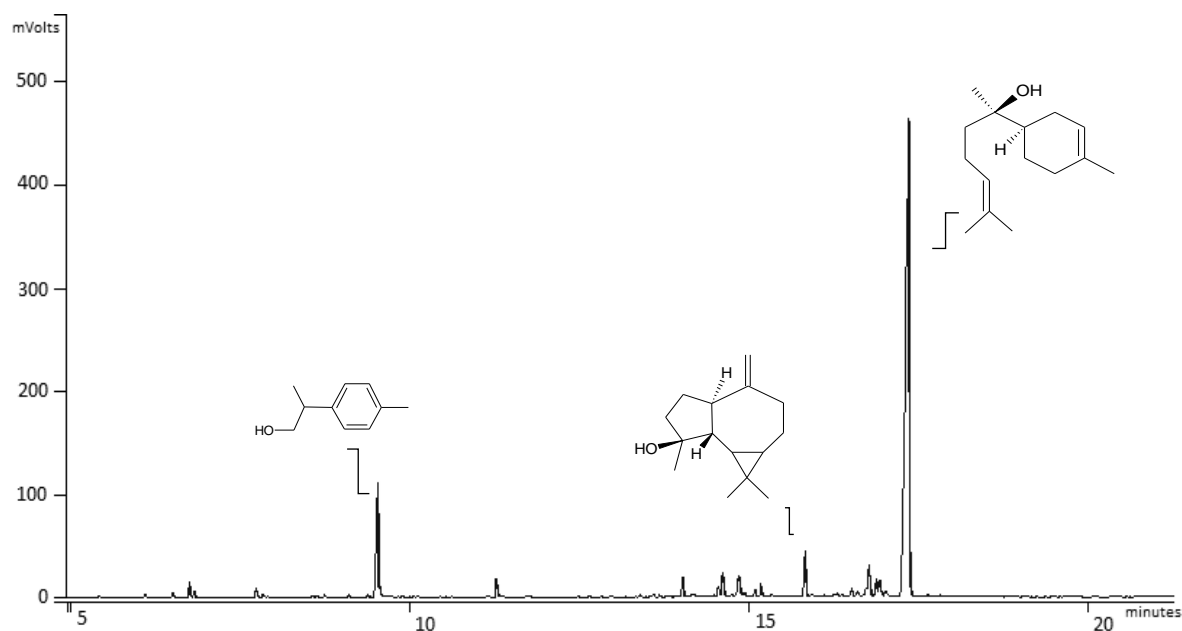


Figura 12: Visão parcial do cromatograma (CG-DIC) do óleo essencial extraído das folhas de *S. cymosa*, contendo a identificação dos principais componentes.

Tabela 6: Composição química do óleo essencial de *S. cymosa*.

Nº	IK experimental	IK literatura	Substâncias	(%)
1	1010	1011	3- δ -careno	0,5 \pm 0,0
2	1027	1027	<i>o</i> -cimeno	1,1 \pm 0,2
3	1031	1026	<i>p</i> -cimeno	0,6 \pm 0,1
4	1085	1086	<i>p</i> -menta-2,4 (8)-dieno	0,6 \pm 0,1
5	1195	1206	<i>p</i> -cimeno-9-ol	7,9 \pm 0,6
6	1292	1285	safrol	1,3 \pm 0,2
7	1496	1493	<i>epi</i> -cubenol	0,8 \pm 0,1
8	1503	1509	β -bisaboleno	1,7 \pm 0,1
9	1517	1514	cubebol	2,0 \pm 0,2
10	1522	1524	δ -cadineno	0,6 \pm 0,0
11	1536	1531	γ -(E)-bisaboleno	0,5 \pm 0,0
12	1542	1556	germacreno B	0,9 \pm 0,1
13	1581	1576	espatulenol	3,7 \pm 0,3
14	1630	1628	1- <i>epi</i> -cubenol	0,7 \pm 0,0
15	1636	1631	β -murolo-4,10(14)-dien-1-ol	0,6 \pm 0,0
16	1645	1642	cubenol	0,8 \pm 0,0
17	1650	1653	α -cadinol	2,3 \pm 0,0
18	1657	1655	α -bisabolol oxido B	1,4 \pm 0,0
19	1670	1671	β -bisabolol	0,7 \pm 0,0
20	1699	1686	α -bisabolol*	68,3 \pm 1,8
Monoterpenos não oxigenados				2,8
Monoterpenos oxigenados				7,9
Fenilpropanoide				1,3
Sesquiterpenos não oxigenados				3,7
Sesquiterpenos oxigenados				81,3
Total identificado (%)				97,0

IK experimental- obtidos do banco de dados NIST 2008 e dados da literatura; IK literatura- obtido do Adams (2007); (%) obtida por integração eletrônica dos picos (n=3); *confirmado com padrão autêntico.

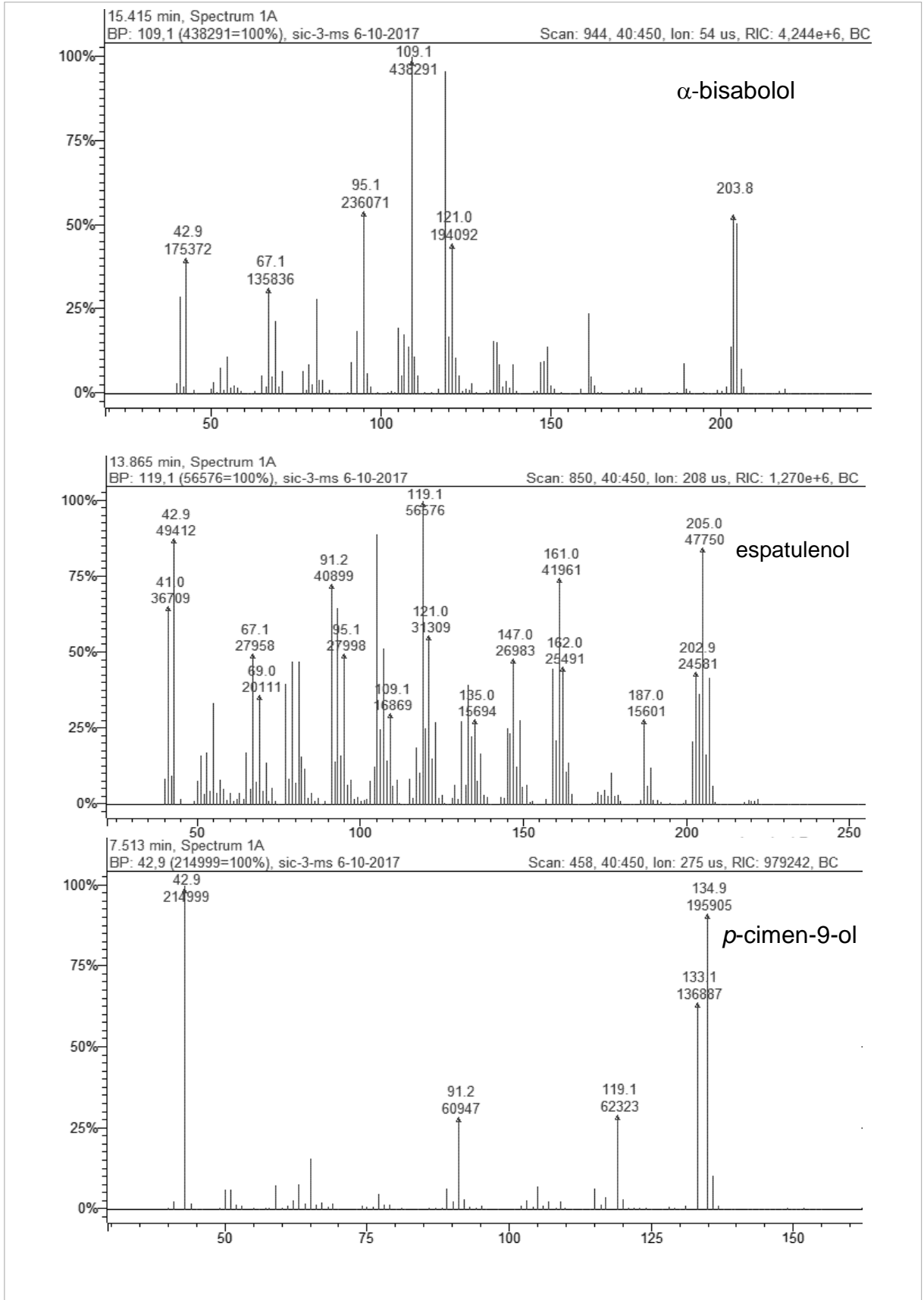


Figura 13: Espectros de massas dos principais componentes identificados no óleo essencial de *S. cymosa*.

A figura 14 apresenta uma proposta de fragmentação para o composto α -bisabolol, o qual também foi identificado tanto no óleo essencial de *S. guianensis* (DINIZ, 2014; CARVALHO, 2017; ZOGHBI *et al.*, 1998) como em espécies de outras famílias: *Matricaria recutita*, *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz (DARRA *et al.*, 2008; DIAS, 2009; ROCHA *et al.*, 2011; SOUZA, 2014).

O α -bisabolol apresenta massa molecular de 222 g mol^{-1} (não detectado) com pico base m/z 109, formado através da eliminação do fragmento $M^+ - 95$ na forma de radical, seguida da eliminação de uma molécula neutra de água.

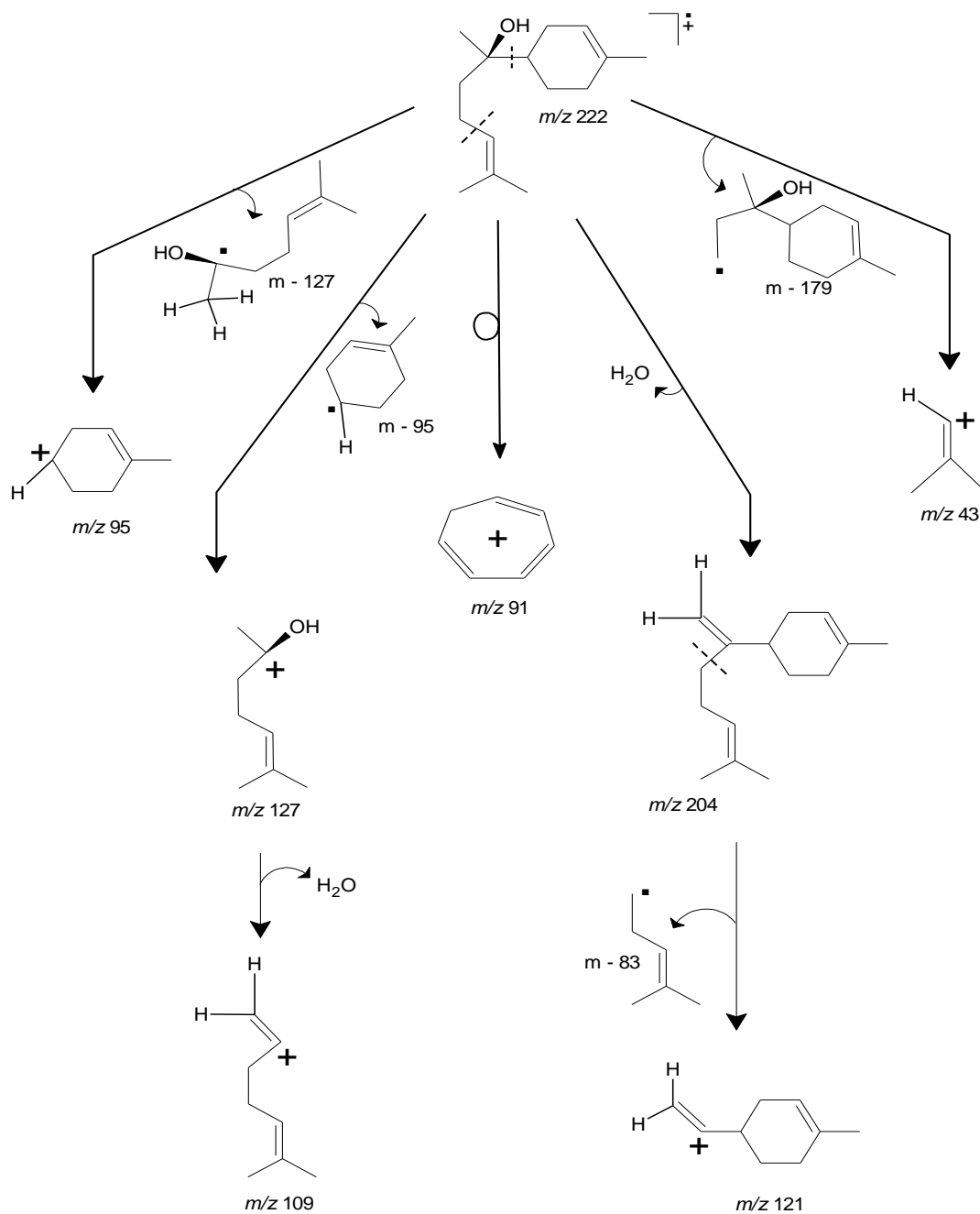


Figura 14: Proposta de fragmentação para o composto α -bisabolol adaptada (PERBELLINI *et al.*, 2004)

A figura 15 apresenta a proposta de fragmentação para o composto espatulenol, que também foi relatado em óleos essenciais extraídos das folhas de *S. thecaphora* (CICCIÓ E GÓMEZ-LAURITO, 2002), *S. eggerssi* (RUIZ *et al.*, 2010) e *S. guianensis* (FISCHER *et al.*, 2005; VIANA *et al.*, 2002), e dos frutos de *S. thecaphora* (CICCIÓ E GOMEZ- LAURITO, 2010).

O composto apresenta massa molecular de 220 g mol^{-1} (não detectado) com pico base m/z 119 derivados da eliminação do radical isopropila ($M^+ - 43$) a partir do fragmento m/z 162.

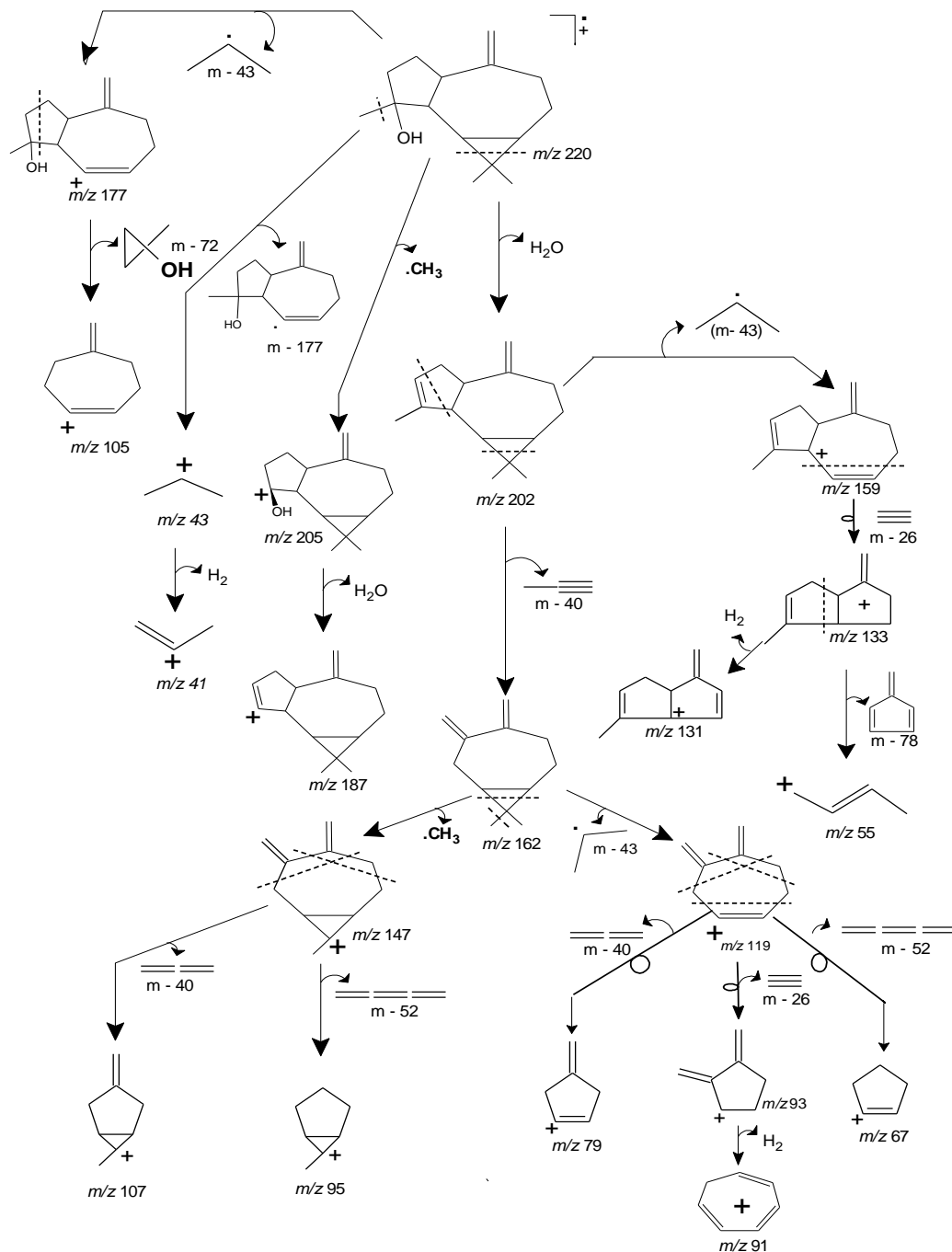


Figura 15: Proposta de fragmentação adaptada para o composto espatulenol (BOLZAN, 2007)

A figura 16 apresenta a proposta de fragmentação para o composto *p*-cimen-9-ol, sendo essa a primeira vez relatada no óleo essencial de espécies desse gênero. O composto *p*-cimen-9-ol apresenta massa molecular de 150 g mol⁻¹ (não detectado) com pico base 134,9 g mol⁻¹ derivado da eliminação do radical metila (M⁺ - 15).

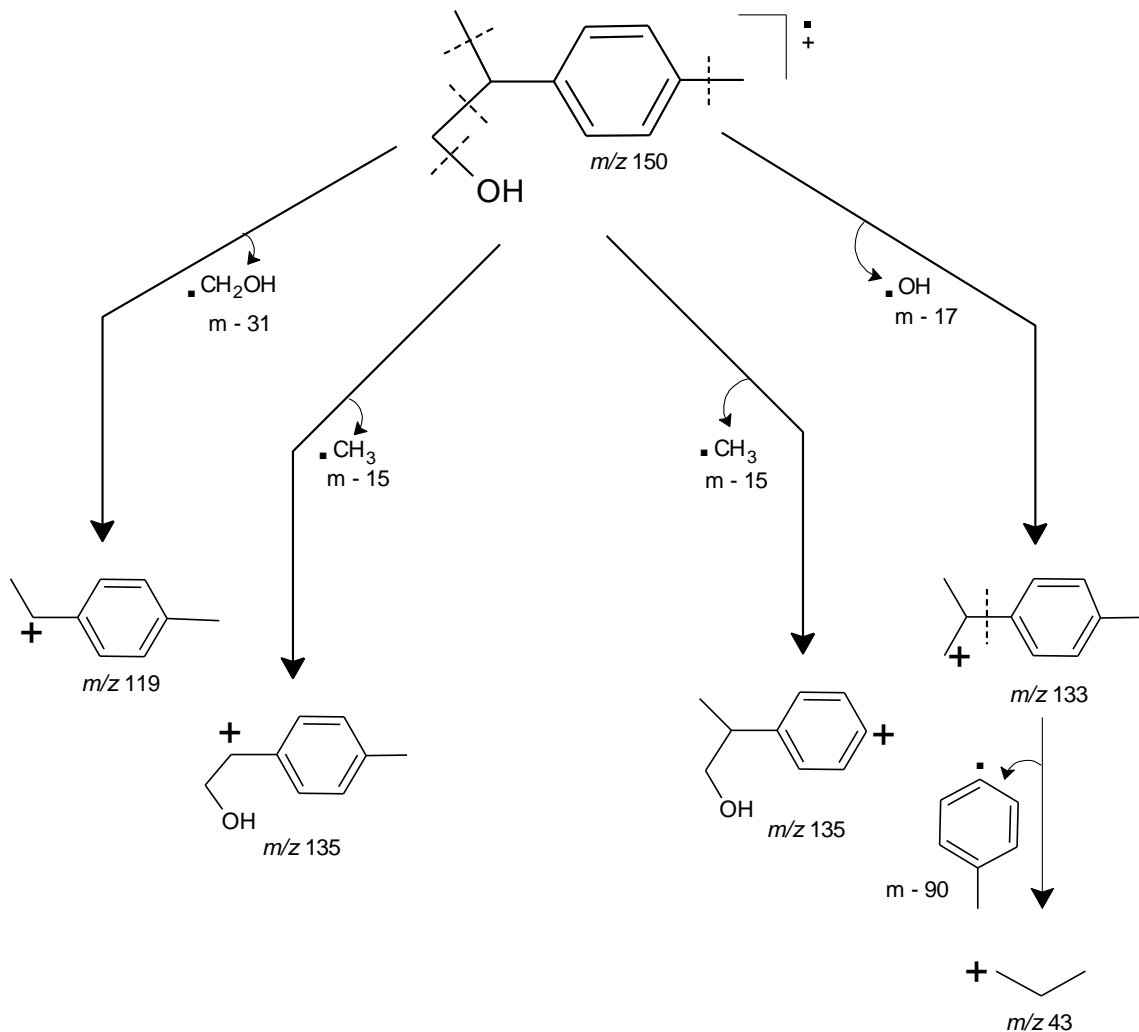


Figura 16: Proposta de fragmentação para o composto *p*-cimen-9-ol.

5.1 Prospecção fitoquímica

Os testes químicos qualitativos indicam as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos, auxiliando no isolamento de substâncias.

Os testes de prospecção fitoquímica foram baseados nas metodologias descritas por Matos (2009) e foram realizados com os extratos: clorofórmico, acetato de etila e etanólico.

As classes de metabólitos detectados nos extratos das folhas de *S. cymosa* encontram-se listados na Tabela 7, página 52.

Tabela 7: Bioprospecção fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários dos extratos de *S. cymosa*.

Classes de metabólitos secundários	Resultados		
	Extrato clorofórmico	Extrato de acetato de etila	Extrato etanólico
Fenóis ¹ e taninos ²	-	+ ²	+ ²
Antocianinas ¹ , antocianidinas ² e flavonóides ³	-	+ ^{2,3}	+ ^{2,3}
Leucoantocianidinas ¹ , catequinas ² e flavonas ³	-	-	+ ³
Flavonóis, flavanonóis e xantonas	-	+	+
Esteróides ¹ e triterpenóides ² (Liebermann Burchard)	+ ²	+ ^{1,2}	+ ^{1,2}
Saponinas	+	+	+
Alcalóides	-	-	-
Cumarinas	-	-	-

(+) presença (-) ausência; (1, 2 e 3) resultado indicativo para o metabólito sobrescrito com a numeração

O extrato clorofórmico apresentou menor complexidade, sendo positivo para triterpenos, esteroides e saponinas. Entre o extrato em acetato de etila e etanólico foram detectadas várias classes em comum, taninos, antocianidinas, flavonóides, flavonóis, flavanonóis, xantonas, esteroides, triterpenóides e saponinas, com exceção para a classe das flavonas presente no extrato etanólico.

Essa diferença de metabólitos secundários é esperada, pois solventes de diferentes polaridades extrai diferentes classes de compostos.

São vários os relatos de prospecção fitoquímica para espécies do gênero. Estudos realizados por Bessa e colaboradores (2011) com extrato etanólico da espécie *S. guianensis* comprovaram a presença de saponinas, alcalóides, flavonas, flavanonóis e xantonas, taninos e fenóis, catequinas, depsídeos, depsídonas e cumarinas e, esteróides, triterpenóides e azulenos. Beserra e colaboradores (2011) relataram estudos de prospecção fitoquímica com a mesma espécie e detectaram a presença das várias classes de compostos em comum, com exceção para flavonas, flavanonóis e xantonas. NEGRI e colaboradores (2012) detectaram a presença de flavonoides.

Em estudo de prospecção fitoquímica realizado por López (2011) com a espécie *S. sessiliflora*, dos extratos clorofórmico e etanólicos, das folhas e pecíolos, mostraram a presença de compostos fenólicos, alcaloides, esteroides e esteróis, nos quatro extratos. No extrato clorofórmico (folhas e pecíolos) foram detectados terpenos, glicosídeos de flavonóides. No extrato etanólico (folhas e pecíolos) foram detectados sesquiterpenlactonas, saponinas, flavonoides e fenóis. De acordo com Guevara (2012) a espécie *S. sessiliflora* mostrou a presença de flavonóides, leucoantocianinas, compostos fenólicos, alcalóides e esteróides.

As classes fenóis, antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavononóis, xantonas, esteroides, triterpenoides e saponinas detectados no presente estudo corroboram com relatos na literatura para espécies do gênero *Siparuna*.

5.2 Isolamento e identificação das substâncias do extrato em acetato de etila

Devido a semelhança na composição química entre os extratos em acetato de etila e etanólico, acrescido da dificuldade de isolar substâncias de maior caráter polar, presente no extrato etanólico usando técnicas usuais de bancada, optamos por realizar o estudo fitoquímico com o extrato em acetato de etila.

O estudo fitoquímico do extrato de acetato de etila das folhas de *S. cymosa*, resultou no isolamento e identificação de três substâncias.

➤ Grupos SAC-1, SAC-2, SAC-3 e SAC-4:

Os grupos SAC-1 (0,0604g), SAC-2 (0,1010g), SAC-3 (0,1214g) e SAC-4 (0,2785g) foram tratadas com acetona levando a formação de um sólido branco, finamente dividido. As análises dos espectros de infravermelho (Figura 17, página 54) dos sólidos apresentaram bandas largas em 3421 cm^{-1} (vibrações de estiramento OH), 2916 e 2848 cm^{-1} (vibrações de estiramento CH_3 , CH_2 ou CH), 1473 e 1462 cm^{-1} (deformação de alcano) e 729 cm^{-1} (deformação de C-H metílico de compostos de cadeia longa), sendo características de compostos de natureza alifática.

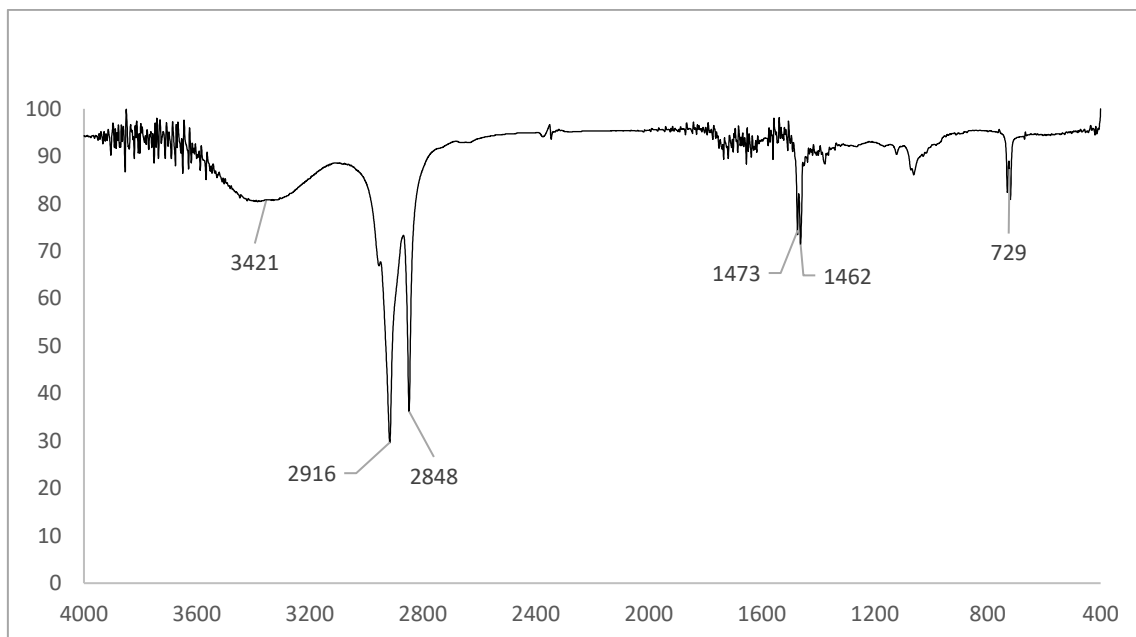
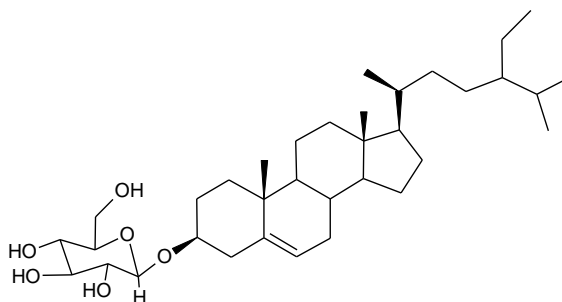


Figura 17: Espectro na região do infravermelho representativo dos grupos SAC-1, SAC-2, SAC-3 e SAC-4 (ATR), região de 4000-600 cm^{-1} .

5.2.1 Substância 1: 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol



➤ RS1 (SAC-15)

Desse grupo foi isolado um sólido de coloração branco, solúvel em metanol. O teste de Liebermann-Burchard para essa substância apresentou resultado positivo para esteróide. Sua determinação estrutural foi realizada a partir dos experimentos no IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT-135, HSQC, HMBC e comparação com dados da literatura.

A análise do espectro de infravermelho (Figura 18, página 55) dessa substância apresentou banda de absorção larga média em 3374 cm^{-1} atribuída a vibração de estiramento de ligações O-H do grupo hidroxila. As bandas de absorção médias em 2934 e 2870 cm^{-1} , foram atribuídas a deformações de C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos, respectivamente (PAVIA *et al.* 2012).

As bandas de absorção médias em 1461 e 1367 cm^{-1} , foram relacionadas a deformação angular da ligação $-\text{CH}_2-$. No espectro foi observada banda de absorção entre 1167-1020 cm^{-1} do tipo de ligação C-O de álcoois.

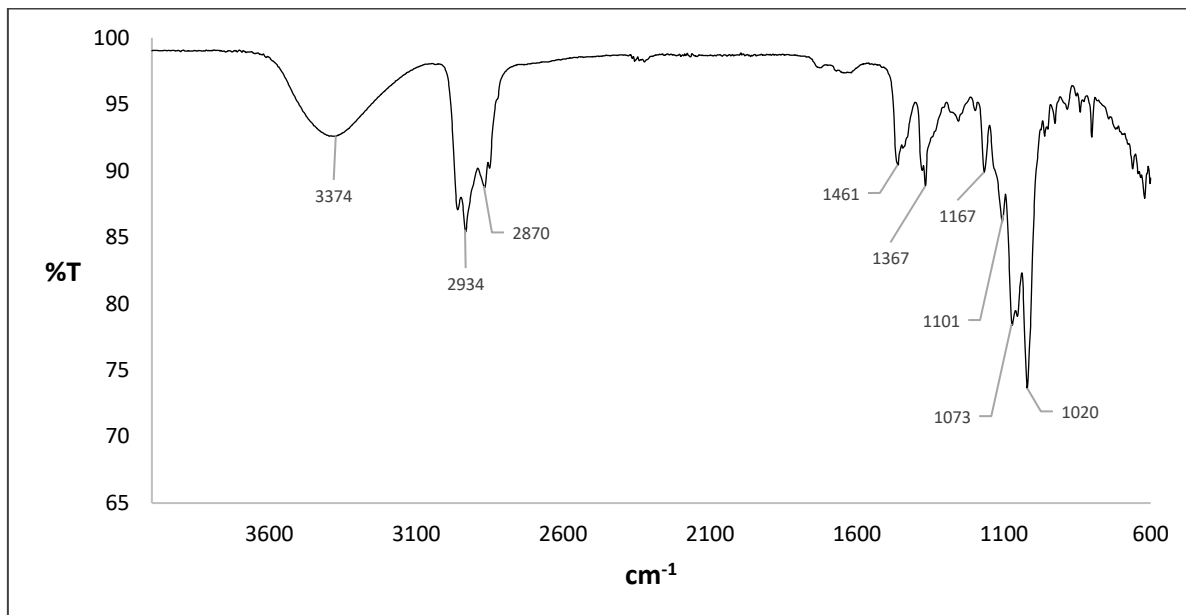


Figura 18: Espectro na região do infravermelho da Substância 1 (ATR), região de 4000-600 cm^{-1}

Esses dados sugerem que essa substância seja um esteróide. A figura 19, representa a estrutura básica de um esteróide.

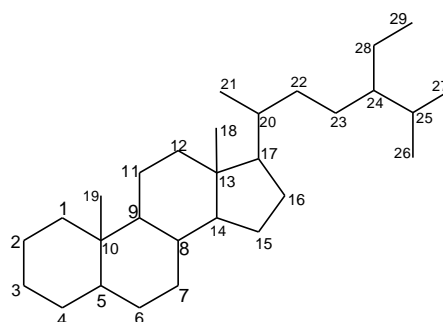


Figura 19: Estrutura básica do esteróide.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 21, Página 58) apresentou sinais típicos de grupos metila terciários em δ_{H} 0,64 (s) e δ_{H} 0,95 (s) ppm atribuídos ao C18 e C19, respectivamente. Um grupo metila secundário em δ_{H} 0,88 (d; $J=6\text{Hz}$) ppm foi atribuído a posição C21, sinais de hidrogênio em δ_{H} 0,78 (d; $J=7\text{Hz}$), δ_{H} 0,82 (d; $J=2\text{Hz}$) e δ_{H} 0,78 (d; $J=7\text{Hz}$) ppm foram atribuídos a grupos metílicos nas posições C26, C27 e C29, respectivamente. O sinal em δ_{H} 5,31 (sl) ppm está relacionado a presença da ligação dupla na posição C6, também foi observado a presença de hidrogênio anomérico em δ_{H} 4,23 (d; $J=7,6\text{Hz}$), sugerindo que essa estrutura seja

um esteroide glicosilado com ligação glicosídica na posição β . (KHATUN *et al.*, 2012).

Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT- 135 (Figura 22 e 23, Página 59 e 60) foram observados 35 sinais de ressonância de carbono, sendo que seis sinais de ressonância de carbono foram atribuídos a uma unidade glicídica e 29 sinais a aglicona.

Foram observados a presença de seis sinais atribuídos aos grupos metílicos em δ_c 11,49 (CH_3 -18), δ_c 19,16 (CH_3 -19), δ_c 18,40 (CH_3 -21), δ_c 19,40 (CH_3 -26), δ_c 18,90 (CH_3 -27) e δ_c 11,75 (CH_3 -29) ppm, além dos sinais em δ_c 141,10 (C- 5) e δ_c 121,93 (C- 6) ppm referentes a ligação dupla (KHATUN *et al.*, 2012, PESHIN e KAR, 2017).

A análise dos espectros de HSQC e HMBC (Figura 24 e 25, Página 61 e 62) permitiram caracterizar os seis sinais de carbono de ressonância atribuídos a seis átomos de carbono do glicídio em δ_c 101,74, δ_c 73,90, δ_c 77,84, δ_c 70,56, δ_c 77,19 e δ_c 61,60 ppm, caracterizando o glicídio como sendo uma unidade de glicose.

Com base na análise final nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HSQC e HMBC conclui-se que a substância seja um β -sitosterol glicosilado. A posição da glicose na estrutura foi confirmada através do espectro de HMBC, onde H-1' (δ_c 101,74/ δ_H 4,23; d; J=7,6) da glicose acopla fortemente em J^3 com C-3 (δ_c 73,90) da aglicona, assim como H-1' (δ_H 4,23; d; J=7,6 Hz) acopla fortemente em J^4 com H-3 (δ_H 2,92; m; J=8,4 Hz). Os restantes dos sinais de carbono foram determinados pelas correlações dos espectros de HSQC, HMBC e COSY (Figura 26, Página 63), descritos na tabela 8, página 57.

Portanto, os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, IV, o teste de Liebermann-Burchard associado a faixa de fusão entre 247 a 249 $^\circ\text{C}$ e dados reportados na literatura (KHATUN *et al.*, 2012), sugerem que essa substância seja o esteroide 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol, figura 20.

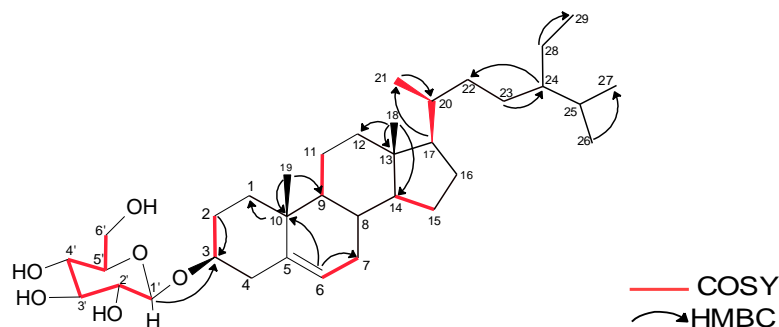


Figura 20: Estrutura do 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol.

Tabela 8: Dados de ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC do composto RS1 (3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol).

Posição	Composto RS1					
	δ_{C}	δ_{H}	Acoplamento (Hz)	COSY (H-H)	HMBC (H-C)	δ_{C} literatura*
1	36,82	1,31	8,8; m	X	X	36,85
2	29,64	1,49/1,79	8,8; t/12; d	H-4 (J ⁴)	C-3 (J ⁴)/C-5 (J ⁴)	29,12
3	73,90	2,92	8,4; m	H-1' (J ⁴)	X	78,61
4	42,20	2,13	11; m	X	X	42,12
5	141,10	X	X	X	X	139,98
6	121,93	5,31	sl	H-7 (J ³)	C-7 (J ⁴)/C-10 (J ⁴)	121,54
7	31,69	1,49/1,93	8,8; m/12; m	H-6 (J ³)/H-8 (J ³)	X	31,41
8	31,94	1,39	11; m	H-7 (J ³)	X	31,46
9	50,10	0,888	6; d	H-1 (J ⁴)/H-7 (J ⁴)/H-11 (J ³)	X	49,83
10	36,74	X	X	X	X	36,27
11	21,32	1,31	8; m	X	X	20,21
12	38,59	2,13/2,35	11; t/14; d	X	C-10 (J ⁴)	38,20
13	41,58	X	X	X	X	41,88
14	56,70	0,99	6,8; m	H-7 (J ⁴)/H-12 (J ⁴)/H-15 (J ³)/H-16 (J ⁴)	X	56,36
15	24,02	0,99/1,49	10; m/8,8; m	H-16 (J ³)	X	23,79
16	27,86	1,22/1,79	sl/12; t	X	X	27,76
17	55,97	1,08	8; m	X	C-21 (J ³)	55,66
18	11,44	0,64	sl	X	C-13 (J ³)/C-12 (J ³)/C-14 (J ³)	11,27
19	19,16	0,95	sl	X	C-9 (J ³)/C-1 (J ³)/C-10 (J ³)	19,10
20	35,78	1,31	8; m	H-21 (J ³)	X	35,70
21	18,40	0,89	6; d	H-20 (J ³)/H-22 (J ⁴)	C-22 (J ³)/C-20 (J ³)/C-17 (J ³)	18,69
22	33,73	0,991/1,315	6,8; m/8; m	X	X	33,51
23	25,81	1,13	8; m	X	C-24 (J ³)/C-27 (J ³)/C-29 (J ³)/C-28 (J ³)/C-25 (J ³)	25,64
24	45,75	0,8	6; d	H-22 (J ⁴)	C-22 (J ³)/C-20 (J ³)	45,49
25	28,88	1,62	5,6; m	X	C-26 (J ³)/C-24 (J ³)	28,74
26	19,40	0,78	7,7; d	X	C-27 (J ³)/C-28 (J ³)/C-25 (J ³)/C-24 (J ³)	18,69
27	18,90	0,82	2; d	X	C-26 (J ³)/C-25 (J ³)/C-24 (J ³)	18,35
28	22,70	1,13	8; m	X	C-27 (J ³)/C-29 (J ³)/C-25 (J ³)/C-24 (J ³)	22,60
29	11,75	0,78	6,8; t	X	C-28 (J ³)/C-25 (J ³)/C-24 (J ³)	12,29
1'	101,74	4,23	7,6; d	H-2' (J ³)	C-3 (J ³)	100,74
2'	78,74	3,14	4,8; t	X	C-5' (J ³)/C-1' (J ³)	73,21
3'	77,84	3,44	4,8; m	H-5' (J ⁴)	X	76,18
4'	70,56	3,06	8,8; t	3' (J ³)/5' (J ⁴)	C-5' (J ³)	69,90
5'	77,19	3,16	8,4; m	H-3' (J ⁴)	C-4' (J ³)/C-2' (J ³)	75,62
6'	61,60	3,62/3,44	4,8; m/8,4; m	H-5' (J ³)	X	61,36

*Deslocamento de RMN de ^{13}C relatado na literatura (KHATUN *et al.*, 2012), solvente CD_3OD e DMSO; X- Não há deslocamento químico.

Pelos nossos conhecimentos não há relatos na literatura dessa substância no gênero siparuna. Essa é a primeira vez que está sendo relatada no gênero.

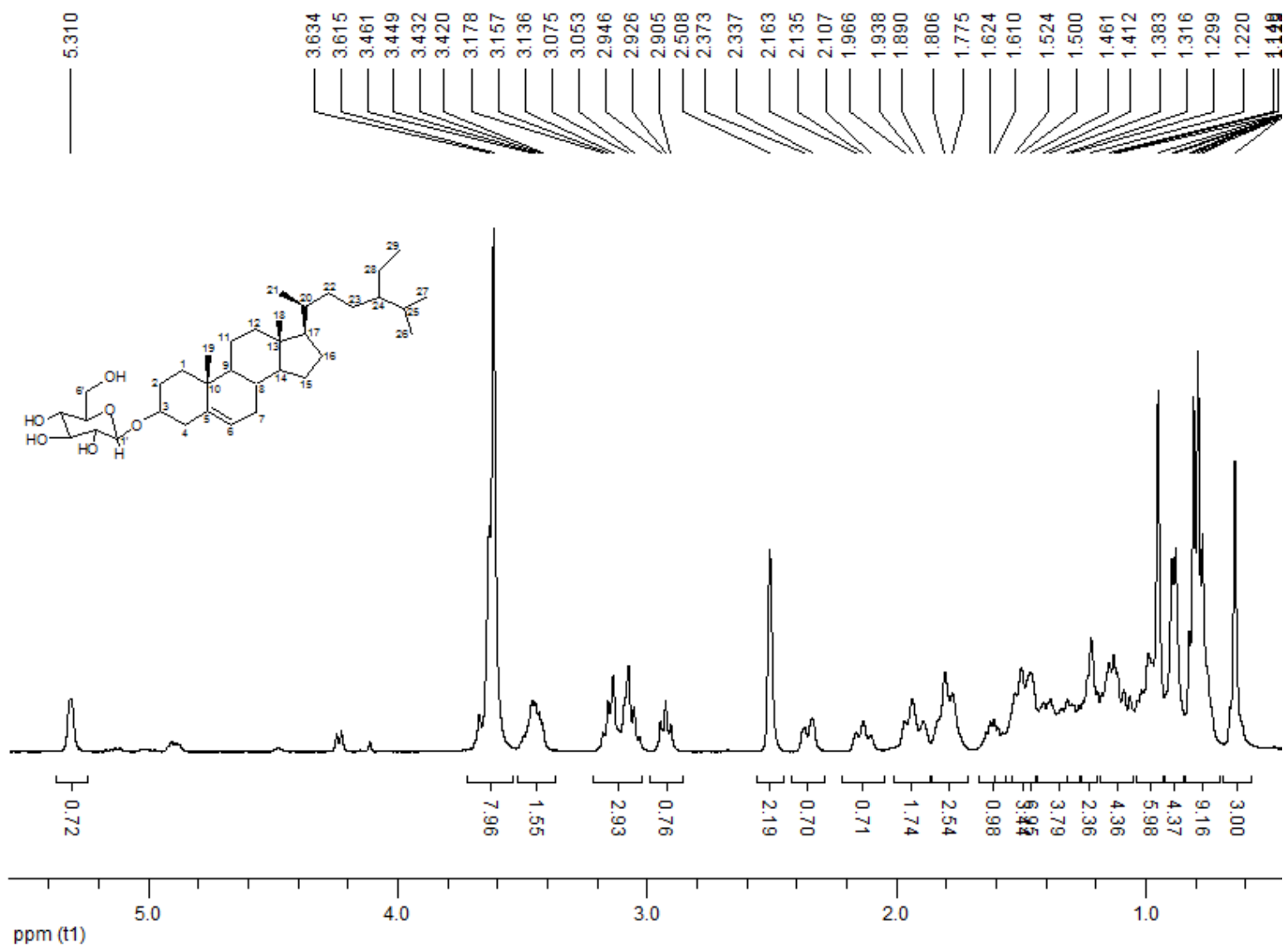


Figura 21: Ampliação (0 – 5.4) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de RS1 em CD_3OD e gotas de DMSO.

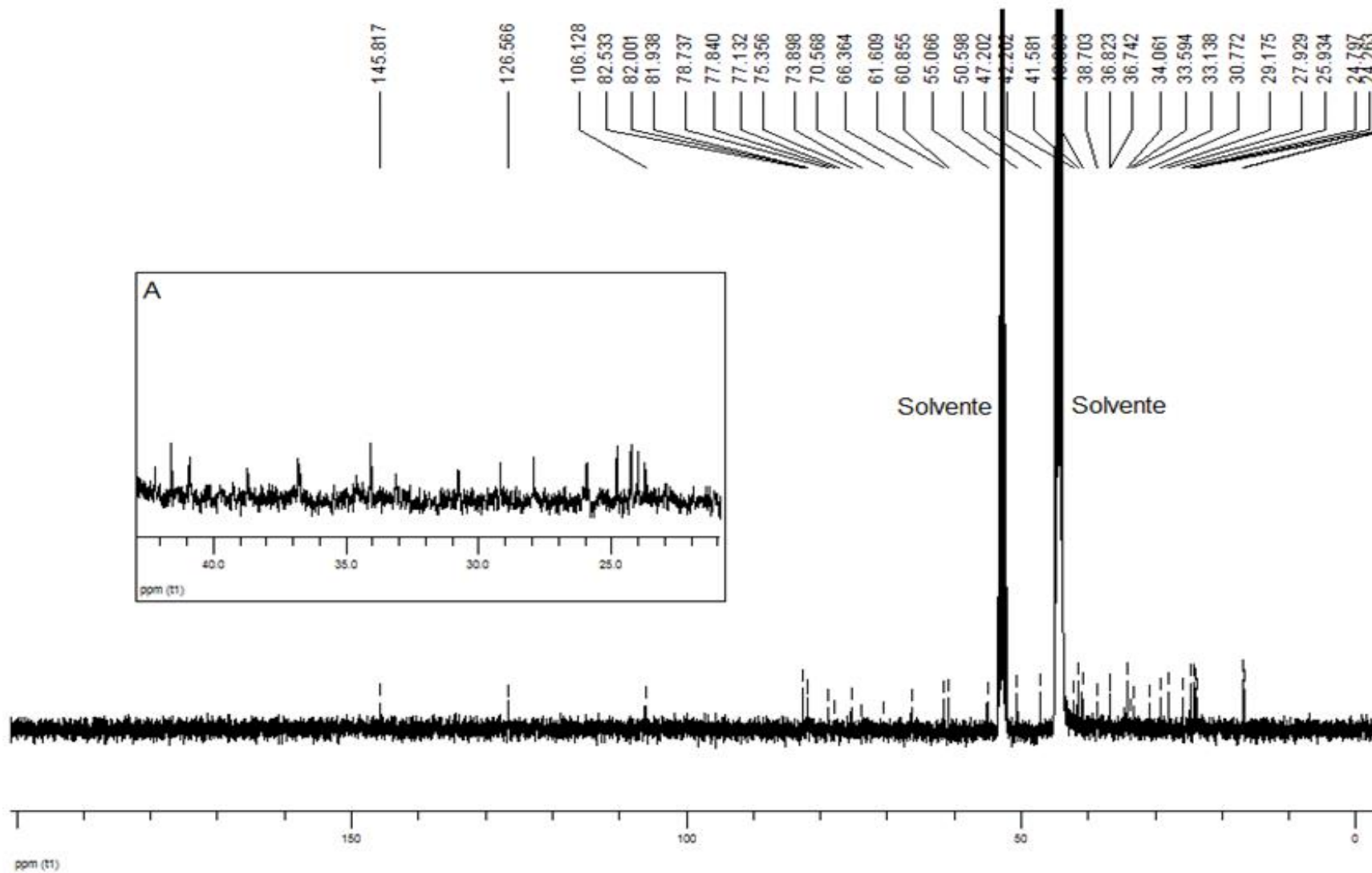


Figura 22: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de RS1 em CD_3OD e gotas de DMSO. A- ampliação de (21-42 ppm).

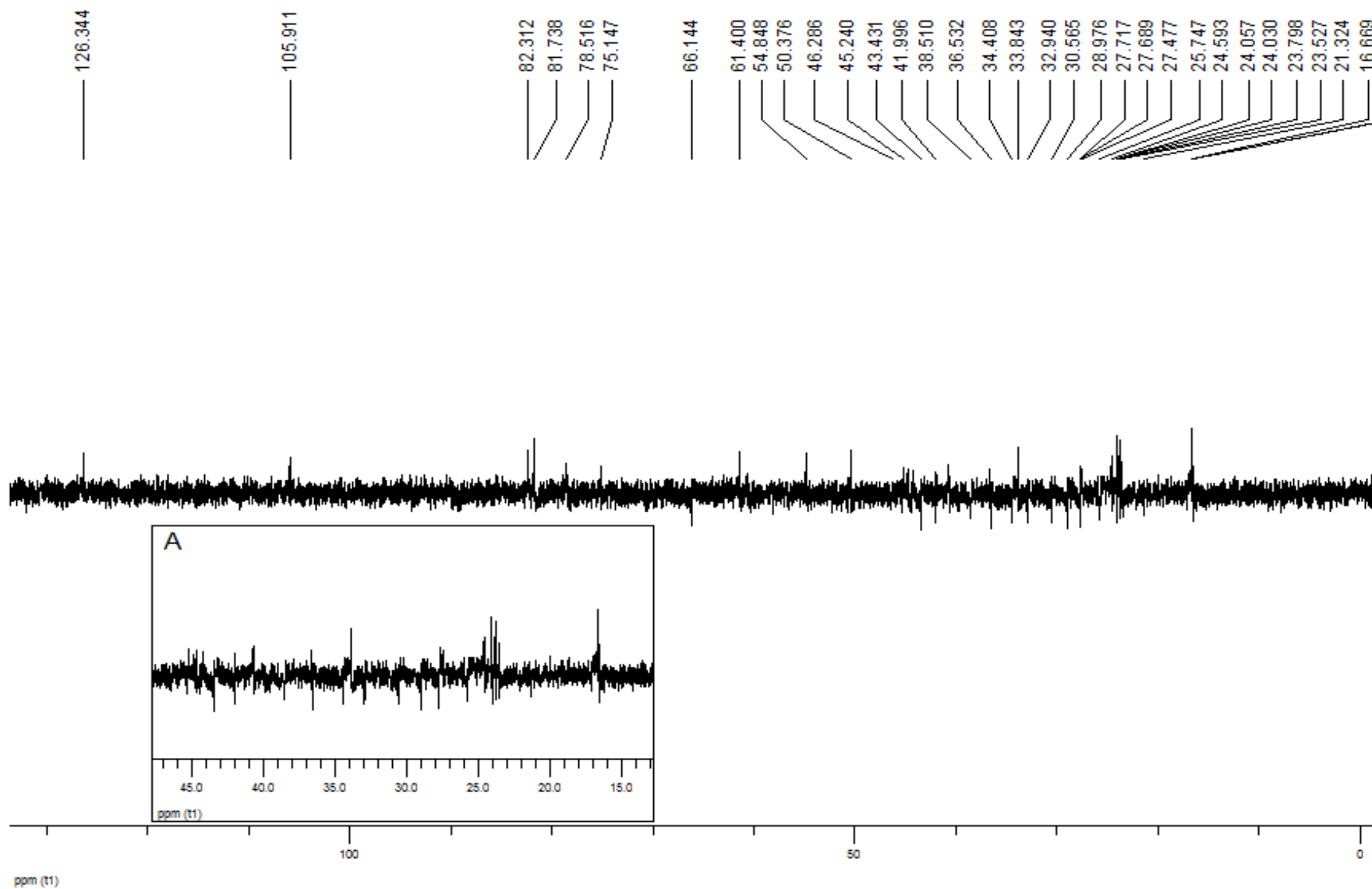


Figura 23: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de RS1 em CD₃OD e gotas de DMSO. A- ampliação (14- 47 ppm).

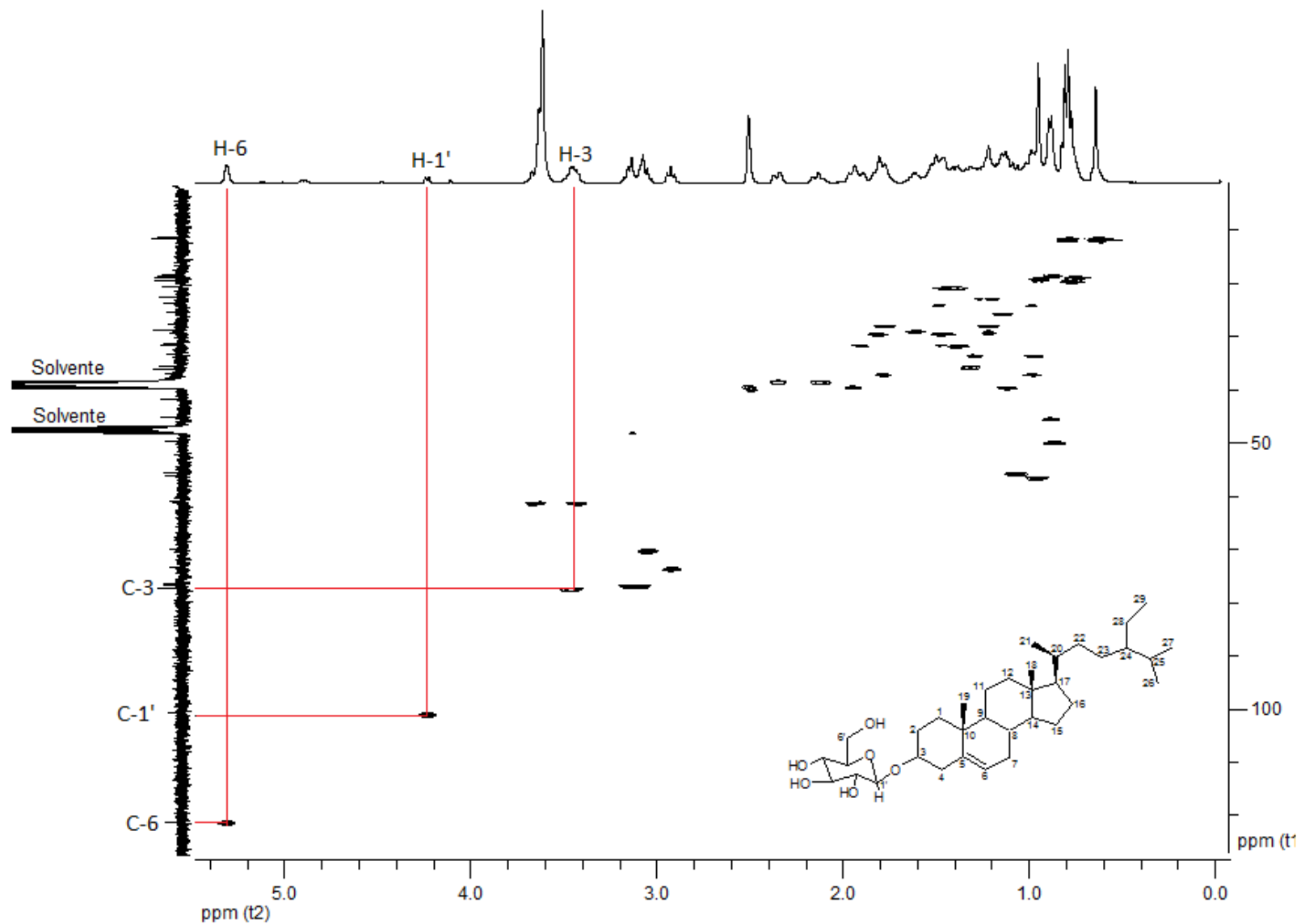


Figura 24: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento de HSQC de RS1(CD_3OD e gotas de DMSO), com destaque ao H- 1', H- 3 e H- 6.

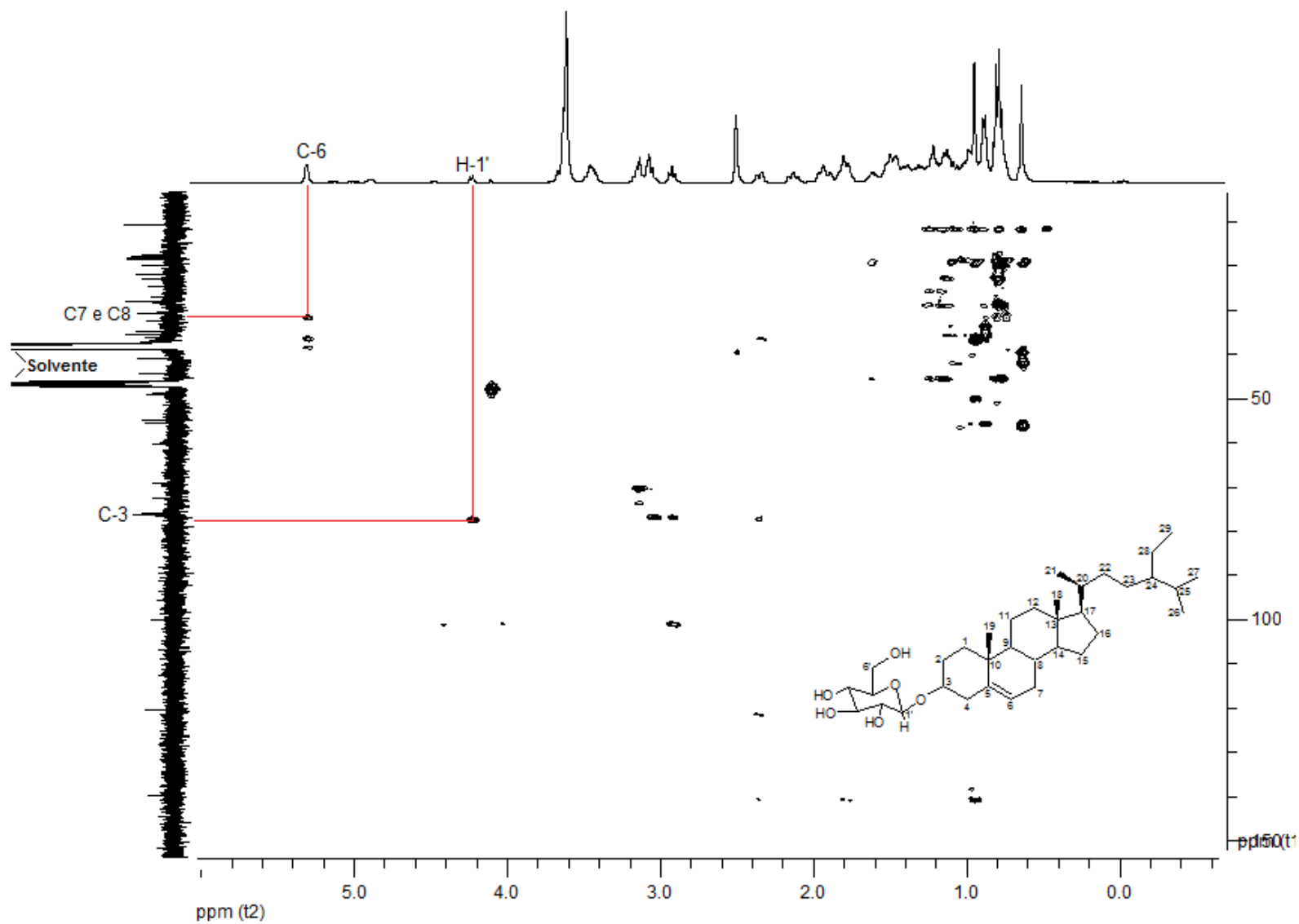


Figura 25: Correlação de H-C observados no mapa de contorno no experimento de HMBC (CD_3OD e gotas de DMSO) de RS1, com destaque ao H- 1' e H-6.

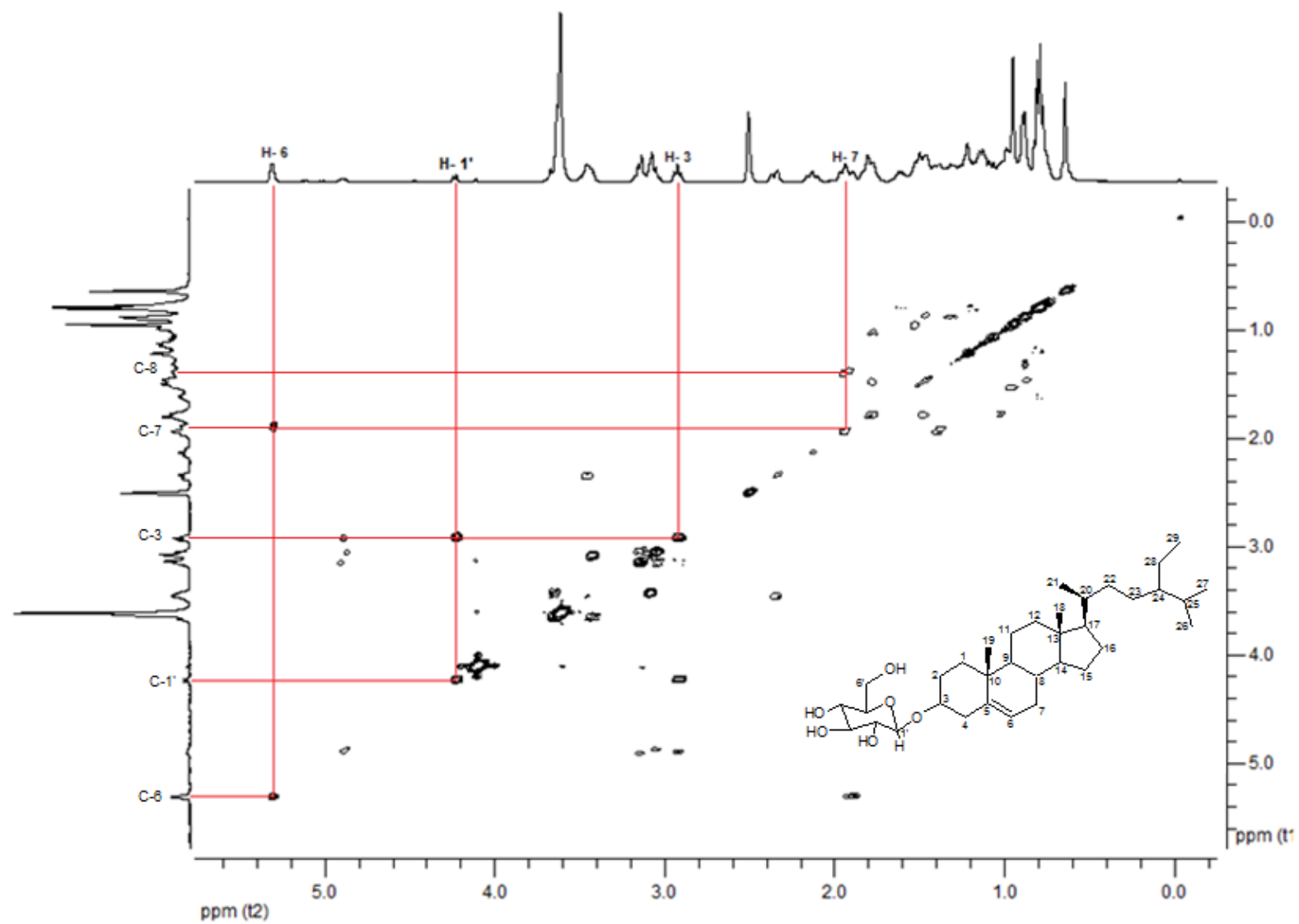


Figura 26: Correlação de H-H observados no mapa de contorno no experimento de COSY (CD₃OD e gotas de DMSO) de RS1, com destaque ao H- 1', H-3, H-6 e H-7.

5.2.2 Substância 2: 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol

➤ (SAC-16)

Desse grupo foi isolado um sólido amarelo palha (substância 2) que apresentou resultado positivo para o teste de Liebermann-Burchard, sugerindo a estrutura de um esteroide. A análise do espectro de IV da substância 2 apresentou os picos de absorção semelhantes aos apresentados pelo espectro de IV da substância 1 além da mesma faixa do ponto de fusão 247 a 249 °C. As substâncias 1 e 2 foram comparadas por CCD, conforme figura 27, apresentando o mesmo tempo de retenção. Logo a substância 2 é uma quantidade adicional a substância RS1.

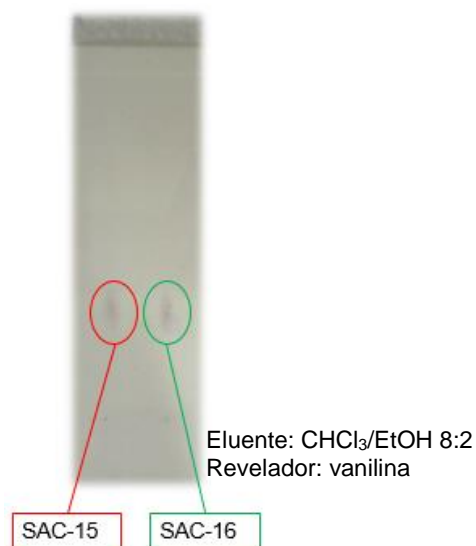
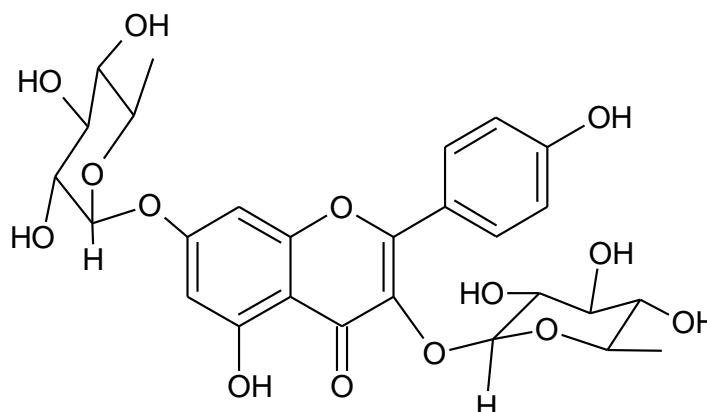


Figura 27: Fotografia eletrônica, cromatoplaça CCD em sílica gel 60G.

5.2.3 Substância 3: 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol



➤ RS2 (SAC-17 (4))

Desse grupo foi isolado um sólido amorfo de coloração amarelo claro, solúvel em metanol. A análise do espectro de IV (Figura 28, Página 66) apresentou banda de absorção forte centrada em 3323 cm^{-1} atribuída ao estiramento de ligações O-H do grupo hidroxila, em 2932 e 2872 cm^{-1} , absorções fracas, característico de estiramento assimétrico e simétrico de ligação C-H de grupos CH_2 e CH_3 alifáticos.

A banda de absorção média em 1657 cm^{-1} foi associada à vibração de estiramento de carbonila α,β -insaturada. As bandas de absorção em 1602 , 1493 e 1439 cm^{-1} foram associadas à vibração de estiramentos de ligações múltiplas C-C de anel aromático. No espectro, foram observadas também bandas de absorção entre 1261 - 1030 cm^{-1} do tipo de ligação C-O. As bandas de absorção médias em 891 , 838 , 807 e 710 cm^{-1} foram atribuídas a deformações C-H de aromáticos substituídos.

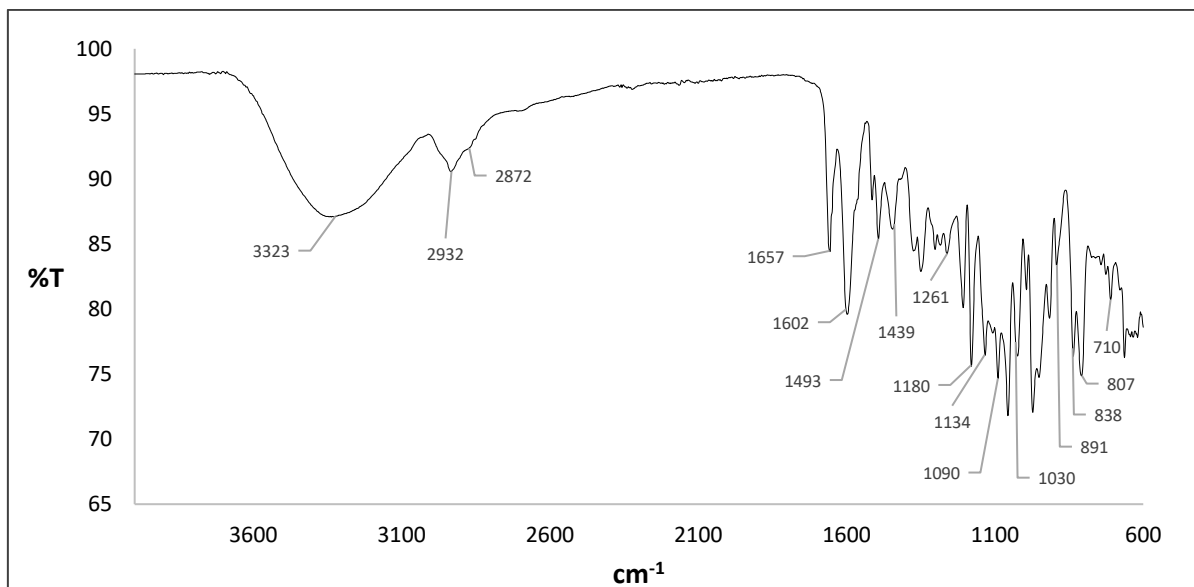


Figura 28: Espectro na região do infravermelho da substância 3 (ATR), região de 4000-600 cm^{-1} .

Os dados no IV associado a coloração da mancha amarela presente na CCD, sugerem que essa substância seja um flavonoide. Essa proposta foi reforçada pela análise de RMN de ^1H e ^{13}C .

Através da análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 31, Página 70), foram identificados os sinais de hidrogênio aromáticos no anel A e B, como sendo: 2 átomos de hidrogênio que mantêm entre si relação meta no anel A aos hidrogênios H- 6/ H- 8 [δ_{H} 6,48/6,74; d; J= 1,6 Hz] e sinais de hidrogênios equivalentes no anel B no sistema aa' bb' típico de flavonoides *p*-dissubstituídos [δ_{H} 7,82 e 6,97; d; J= 8,8 Hz]. Os sinais obtidos indicam o kanferol como núcleo. A figura 29, representa a estrutura básica de um kanferol (GERALDO *et al.*, 2003).

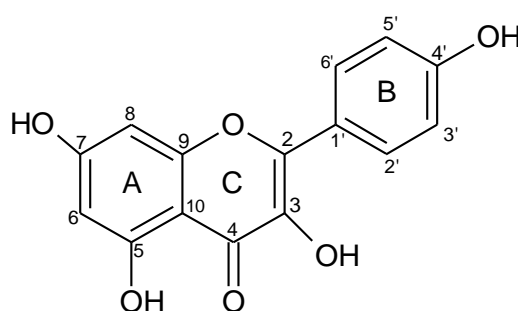


Figura 29: Estrutura básica de um kanferol.

Foram observados a presença de hidrogênios anoméricos nos deslocamentos em δ_{H} 5,43 e 5,59 ppm (s), indicando a presença de duas ligações glicosídicas α . Também foram identificados a presença de duas metilas em δ_{H} 1,29 e δ_{H} 0,96 ppm, sugerindo a presença de duas ramnosas no composto.

A natureza glicosídica desta substância foi confirmada pelo número de sinais oximetilênicos e oximetínicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , e confirmada pelos espectros 2D (COSY, HMBC e HSQC).

Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (Figura 32 e 33, Página 71 e 72) foram observados 27 sinais de ressonância de carbono. O descolamento em δ_{C} 178,60 indica a presença de uma carbonila de éster, ratificando a banda de absorção em 1657 cm^{-1} no espectro de IV. Os restantes dos sinais de carbono foram determinados pelas correlações dos espectros de HSQC e HMBC, descritos na tabela 9, página 68.

A comparação dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC permitiram a observação de dois sinais de carbono anoméricos em δ_{C} 102,30 e 98,70 ppm correlacionados com o sinal em δ_{H} 5,43 e 5,59 respectivamente, singletos, no espectro de HSQC (Figura 34, Página 73).

A presença de uma unidade α -L- ramnopiranosídica ligado ao oxigênio do C-7 foi indicada pelos sinais δ_{H} 5,59 (singleto referente ao hidrogênio anomérico da primeira unidade raminosídica) e δ_{C} 162,30 atribuído ao C-7 sendo confirmado no espectro HMBC (Figura 35, Página 74) através do acoplamento heteronuclear (J^3) entre o hidrogênio anomérico H-1R1 (δ_{H} 5,59) e o C- 7 (δ_{C} 162,30), assim como a forte correlação a longa distância entre o hidrogênio anomérico H-1R2 (δ_{H} 5,43, hidrogênio anomérico da segunda unidade raminosídica) e o carbono C- 3 (δ_{C} 135,20; J^3), estabelecendo assim as posições das unidades ramnosídicas nos carbonos 7 e 3.

Através da correlação H-H do espectro COSY (Figura 36, Página 75) pode-se observar o acoplamento do hidrogênio anomérico 1R1 (δ_{H} 5,59; sl; δ_{C} 98,70) com o grupo metila 6R1 (δ_{H} 1,29; d; δ_{C} 17,10), assim como, o hidrogênio do grupo metílico 6R2 (δ_{H} 0,96; d; δ_{C} 16,60) acoplando fortemente com o hidrogênio anomérico 1R2 (δ_{H} 5,42; sl; δ_{C} 102,30).

Portanto, os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT-135, HSQC, HMBC, COSY, IV, associado a faixa de fusão entre 186 a 188°C e dados reportados na literatura (NEGRI *et al.*, 2012), sugerem que essa substância seja o flavonoide 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol (Figura 30, página 68).

Este composto foi analisado por CG-MS, seu espectro de massa (Figura 37, Página 76) apresentou pico base de m/z 286 e seus demais fragmentos (m/z 60, m/z

73 e m/z 128) confirmando a aglicona como sendo kanferol com fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_6$.

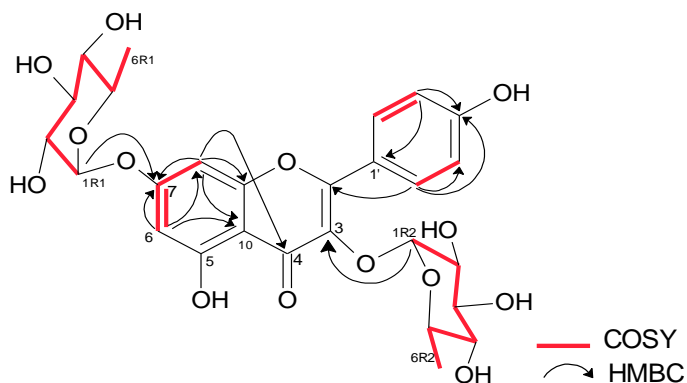


Figura 30: Estrutura do 3,7-di-O- α -L-ramnopyranosilkanferol

Tabela 9: Dados de ^{13}C , 1H , COSY e HMBC do composto 3,7-di-O- α -L-ramnopyranosilkanferol.

Posição	Composto RS2					
	δ_c	δ_H	Acoplamento (Hz)	H-H	HMBC	δ_c literatura*
2	158,60	X	X	X	C-2' e 6' (J^3)	157,77
3	135,29	X	X	X	C-1R2 (J^3)	134,55
4	178,60	X	X	X	X	177,92
5	161,76	X	X	X	C-6 (J^2)	160,93
6	99,44	6,48	d; 1,6	H-8/ H-1R1	C-8(J^3)/C-10(J^3)/C7(J^2)	99,44
7	162,38	X	X	X	C-8 (J^2) / C-6 (J^2) / C-1R1 (J^3)	161,70
8	94,53	6,75	d; 1,6	H-6/H-1R1	C-6 (J^3)/C-10 (J^3)/C-9 (J^2)/C-7 (J^2)	94,59
9	156,89	X	X	X	C-8 (J^2)	156,09
10	106,38	X	X	X	C-8 (J^3)/C-6 (J^3)	105,79
1'	121,22	X	X	X	C-3' e 5' (J^3)	120,36
4'	160,60	X	X	X	C-2' e 6' (J^3)/C-3' e 5' (J^2)	160,14
2' e 6'	130,90	7,82	d; 8,4	H-3' e 5'	C-3' e 5' (J^2) / C-2 (J^3) / C-4' (J^3)	130,68
3' e 5'	115,50	6,97	d; 8,8	H- 2' e 6'	C-1' (J^3)/C-4' (J^2)	115,42
1R1	98,73	5,59	sl	H-6R1/H-3R1/H-5R1/ H-4R1/H-2R1/H-8/H-6	C-3R1 (J^3)/C-7 (J^3)	98,50
2R1	71,98	4,04	sl	H-1R1/H-4R1/H-3R1/ H-5R1	C-1R1 (J^2)	70,26
3R1	70,20	3,50	t; 9,2	H-4R1/H-2R1/H-1R1	C-2R1 (J^2)/C-4R1 (J^2) / C-1R1 (J^3)	69,80
4R1	72,41	3,84	d; 6,8	H-1R1/H-2R1/H-3R1/ H-5R1	C-3R1 (J^2)/C-6R1 (J^3)	71,61
5R1	70,51	3,34/3,62	t; 8/m;3,6	H-1R1/H-3R1/H-4R1/ H-2R1/H-6R1	C-6R1 (J^2) / C-1R1 (J^3) / C-4R1 (J^2)	70,06
6R1	17,05	1,29	d;6	H-5R/H-1R1/H-3R1	C-5R1 (J^2)	17,94
1R2	102,33	5,43	sl	H-5R2/H-4R2/H-2R2/ H-6R2	C-3 (J^3) / C-3R2 (J^3)	101,91
2R2	70,73	4,24	sl	H-1R2/H-4R2/H-5R2	X	70,35
3R2	70,20	3,50	t; 9,2	X	C-1R2 (J^3)	70,64
4R2	72,42	3,73	d;5,2	H-6R2/H-5R2/H-2R2/ H-1R2	C-6R2 (J^3)	72,39
5R2	70,51	3,34/3,62	t; 8/m;3,6	H-6R2/H-4R2/H-2R2	C-6R2 (J^2)/C-1R2 (J^3)	70,06
6R2	16,62	0,96	d; 5,2	H-5R2/H-4R2/H-1R2	C-5R2 (J^2)	17,45

*Deslocamento de RMN de ^{13}C relatado na literatura (NEGRI *et al.*, 2012), solvente DMSO- d_6 ; X- Não há deslocamento químico.

Negri e colaboradores (2012) identificaram o flavonoide 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol, a partir do extrato hidroetanólico das folhas de *S. guianensis* coletadas no Amazonas.

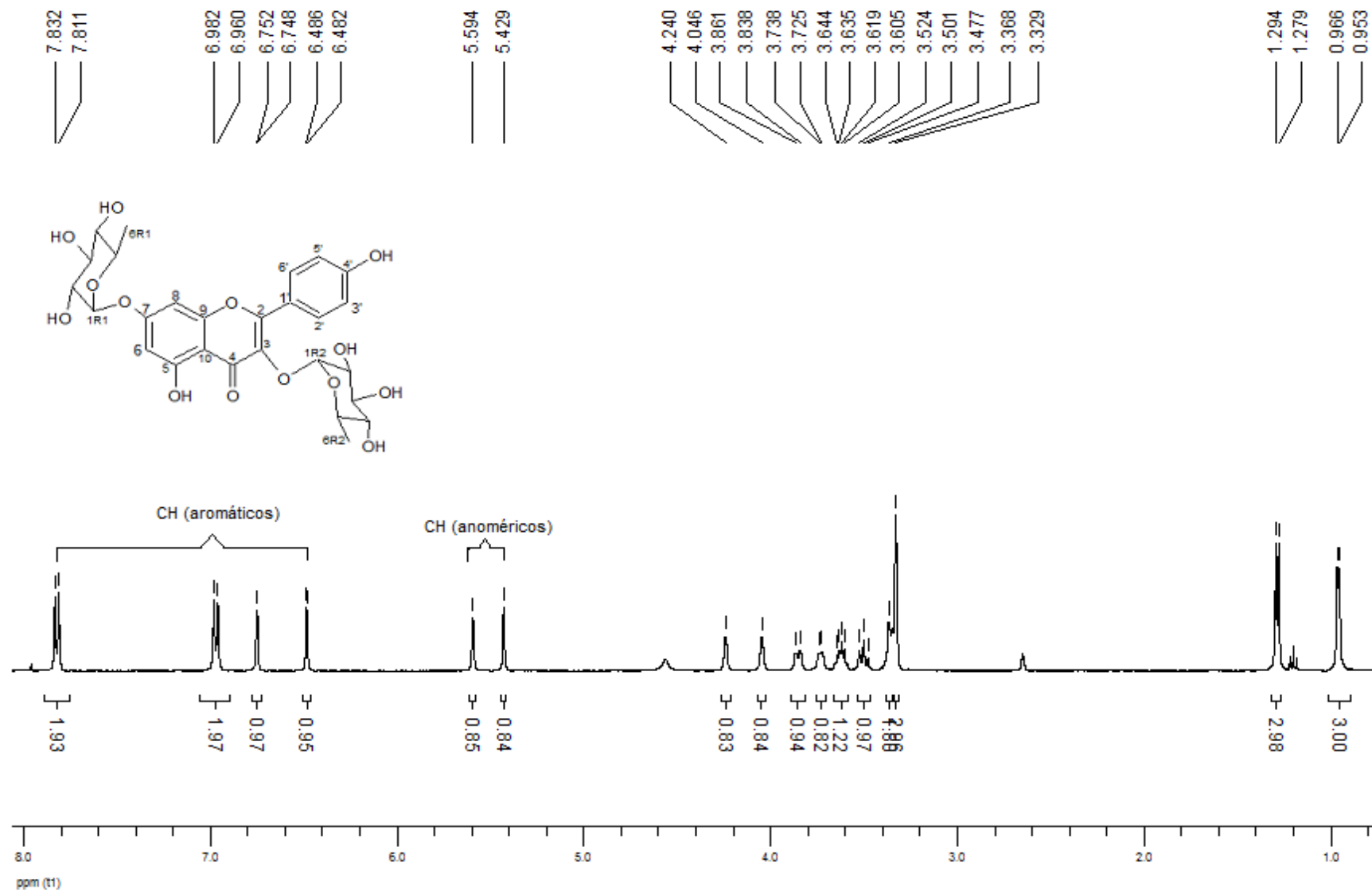


Figura 31: Ampliação (0- 8.4 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de RS2 em CD_3OD e gotas de DMSO.

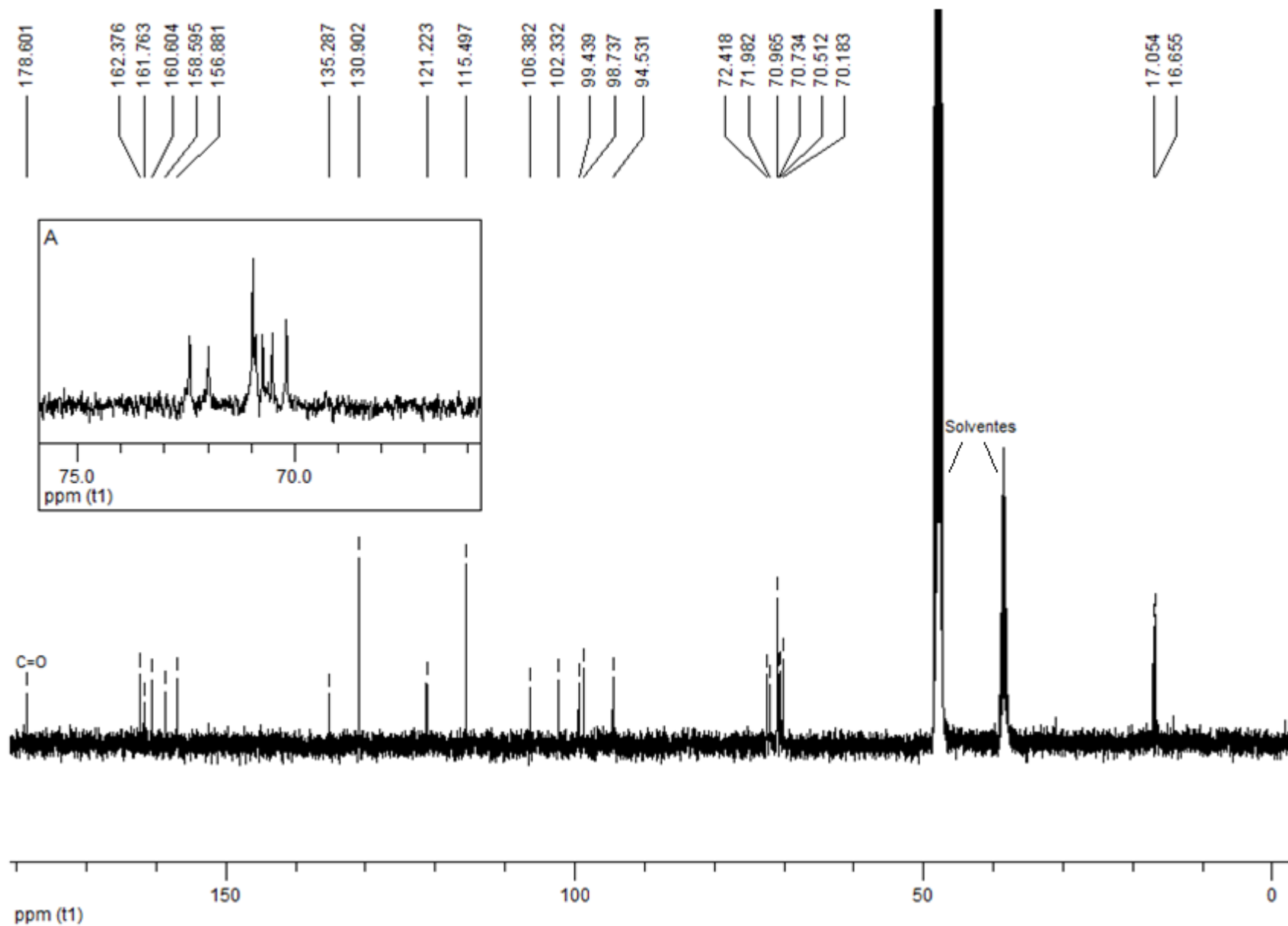


Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de RS2 CD_3OD e gotas de DMSO. A- ampliação de (71- 76 ppm).

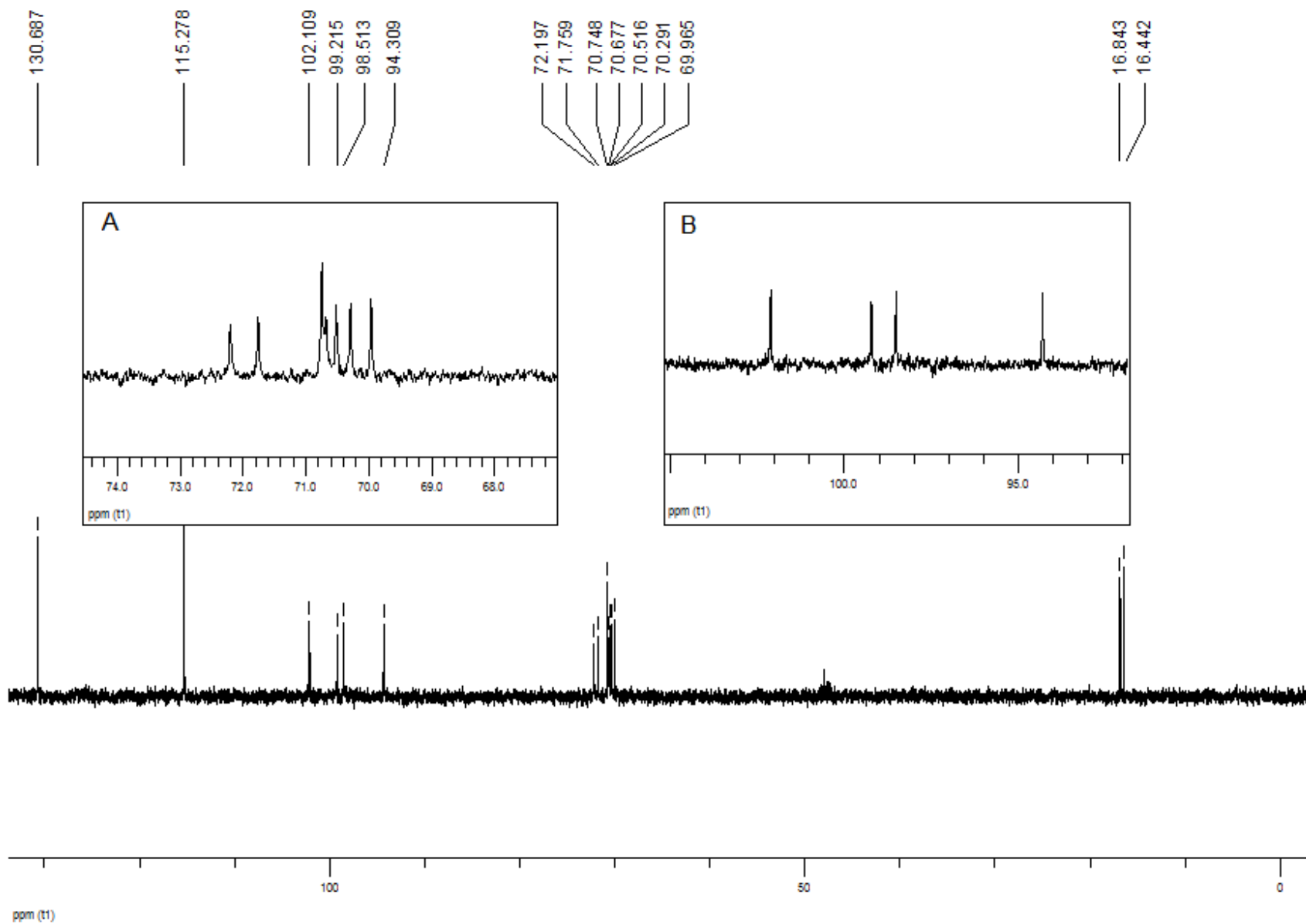


Figura 33: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de RS2 em CD₃OD e gotas de DMSO. A- ampliação (67- 75 ppm); B- ampliação (92- 105 ppm).

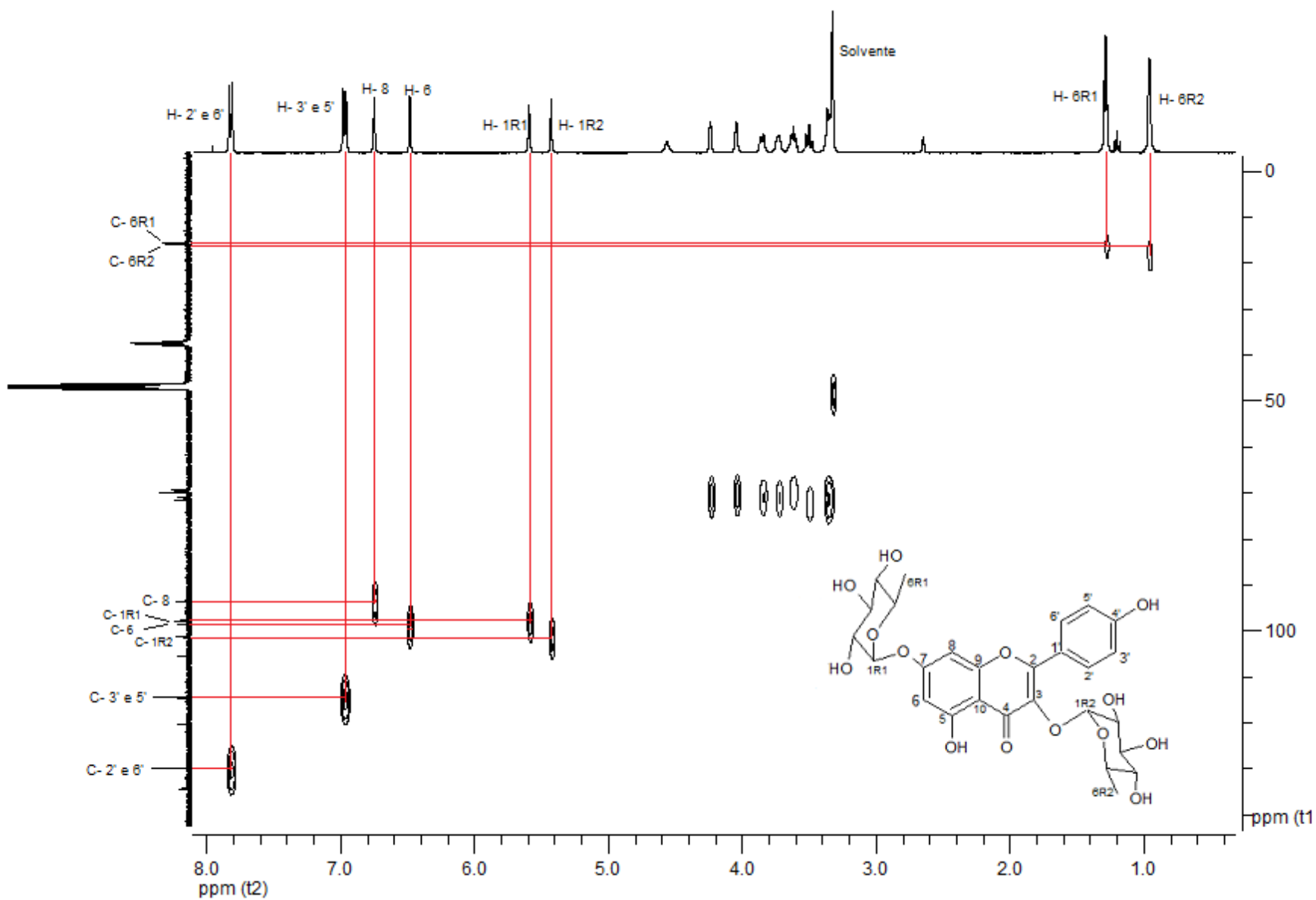


Figura 34: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento HSQC de RS2 em CD_3OD e gotas de DMSO, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6', H- 6R1 e H- 6R2.

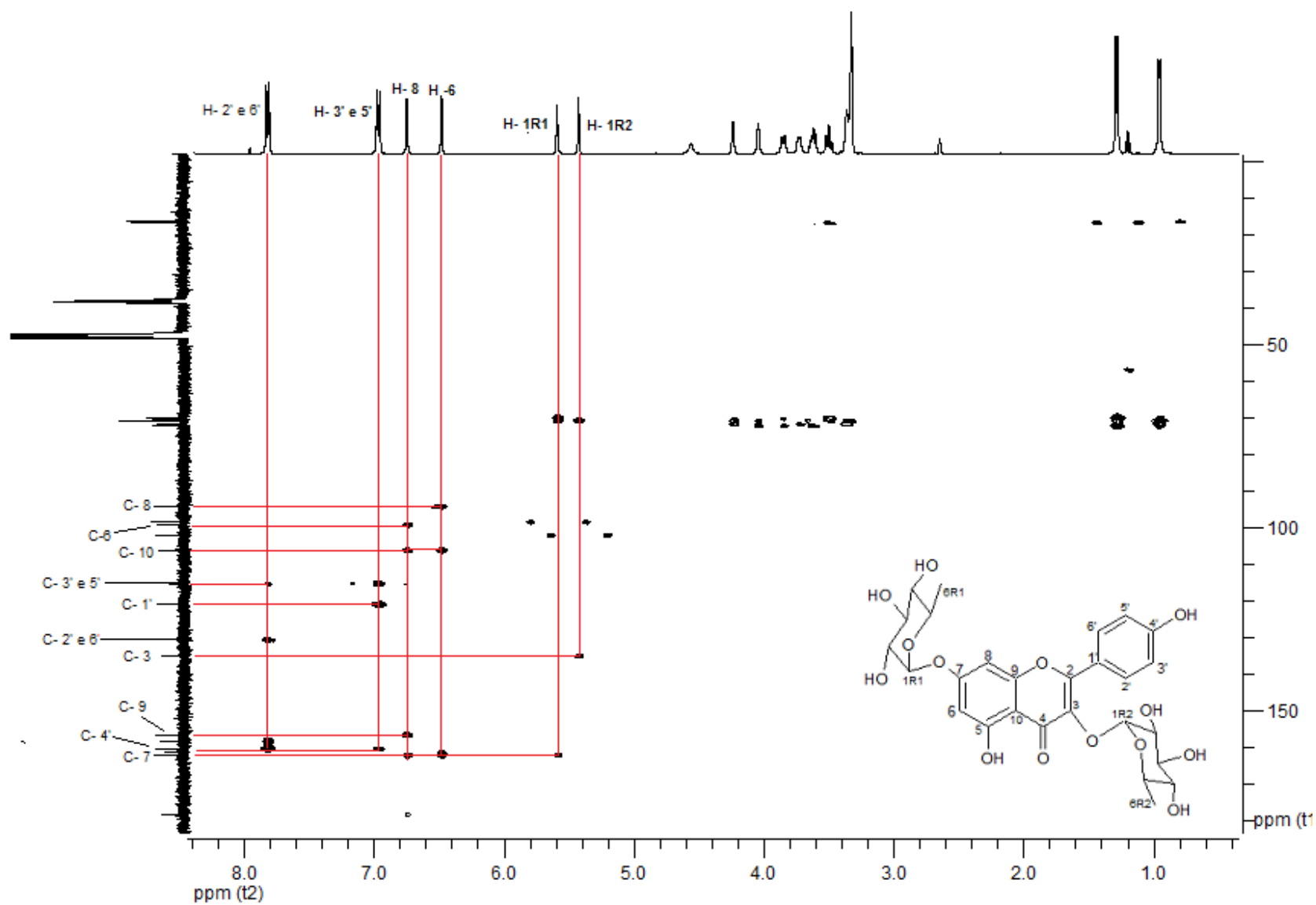


Figura 35: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento de HMBC de RS2 em CD₃OD e gotas de DMSO, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6'.

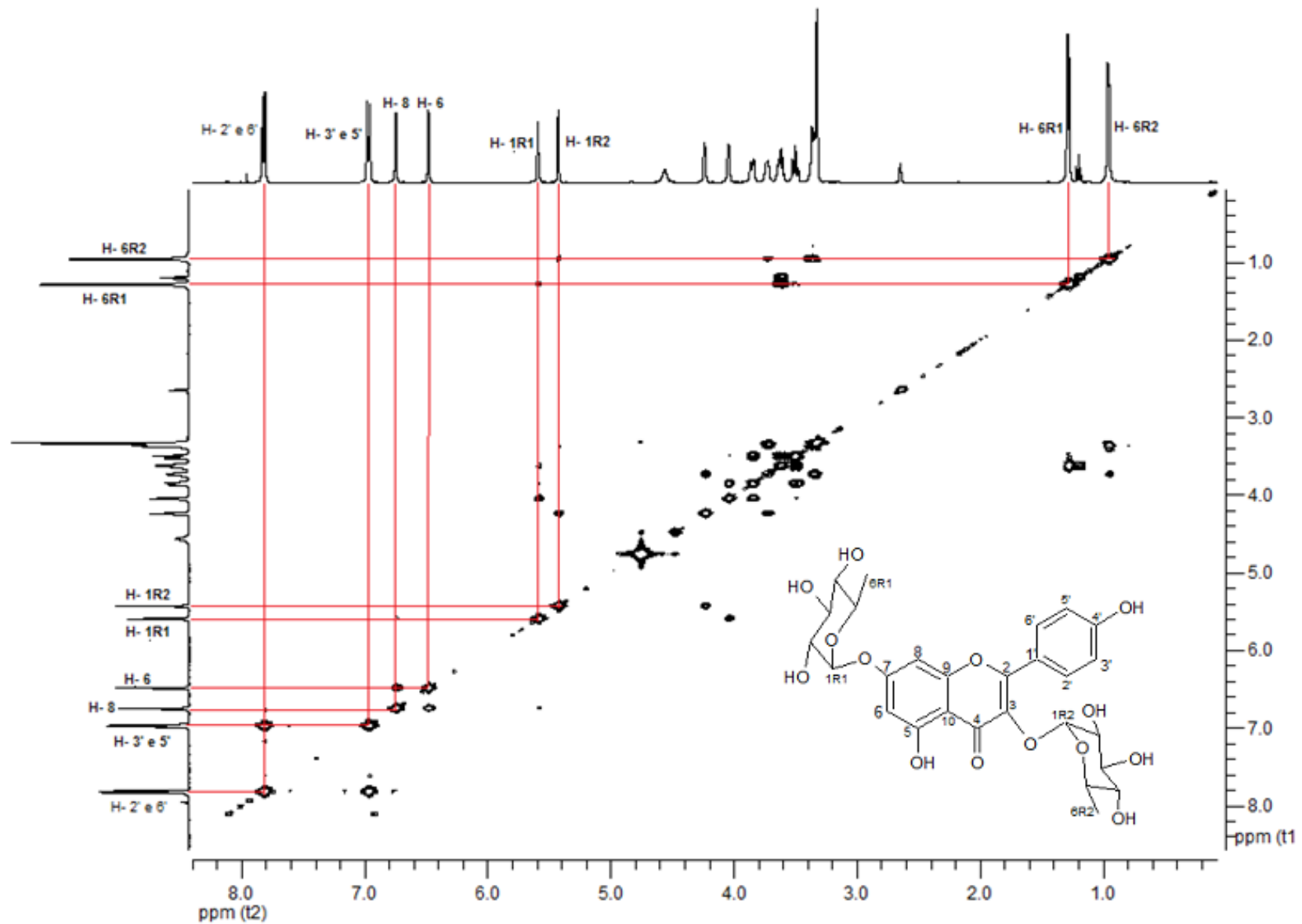


Figura 36: Correlações de H-H observadas no mapa de contorno no experimento COSY de RS2 em CD₃OD e gotas de DMSO, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6', H- 6R1 e H- 6R2.

Line#:1 R.Time:11.000(Scan#:1001)

MassPeaks:389

RawMode:Single 11.000(1001) BasePeak:286(52334)

BG Mode:None Group 1 - Event 1 Scan

intensity

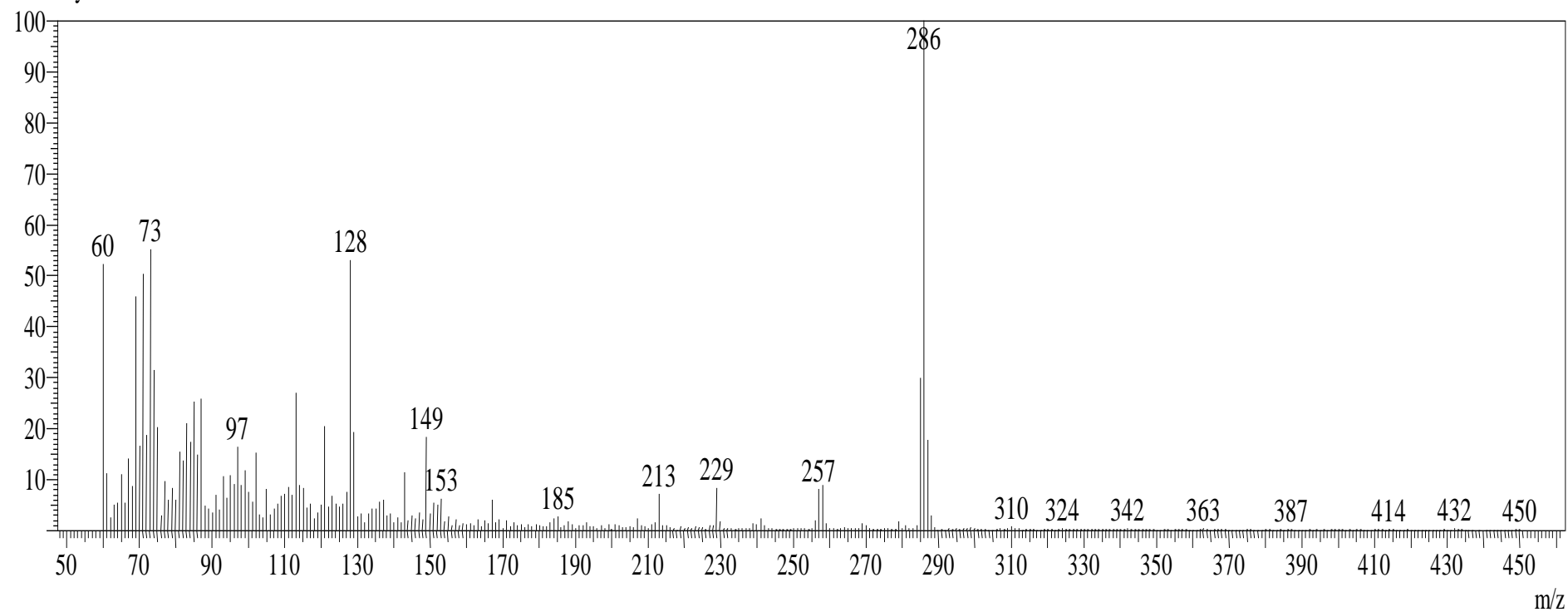
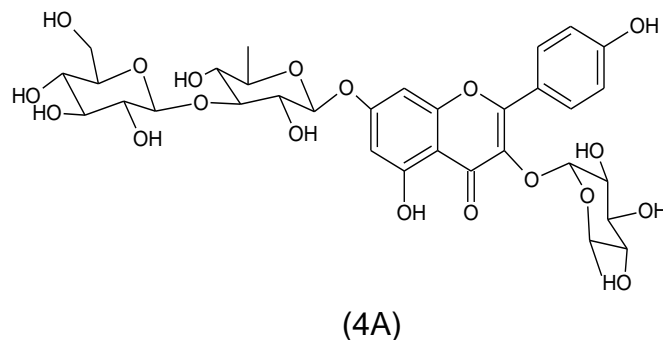
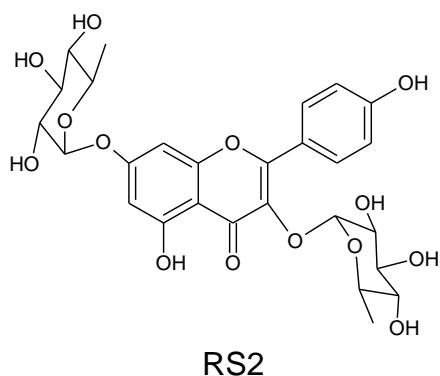


Figura 37: Espectro de massas do composto RS2.

5.2.4 Substância 4: Mistura de 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol e 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil]-kanferol



➤ RS3 (SAC-17 (8))

Desse grupo foi isolado um sólido de coloração amarelo claro, solúvel em metanol. O espectro de infravermelho (Figura 38) da substância 4, apresentou bandas de absorção similares a RS2, com exceção em dois pontos destacados no espectro. Portanto, foi proposto que a substância seja um flavonoide glicosilado.

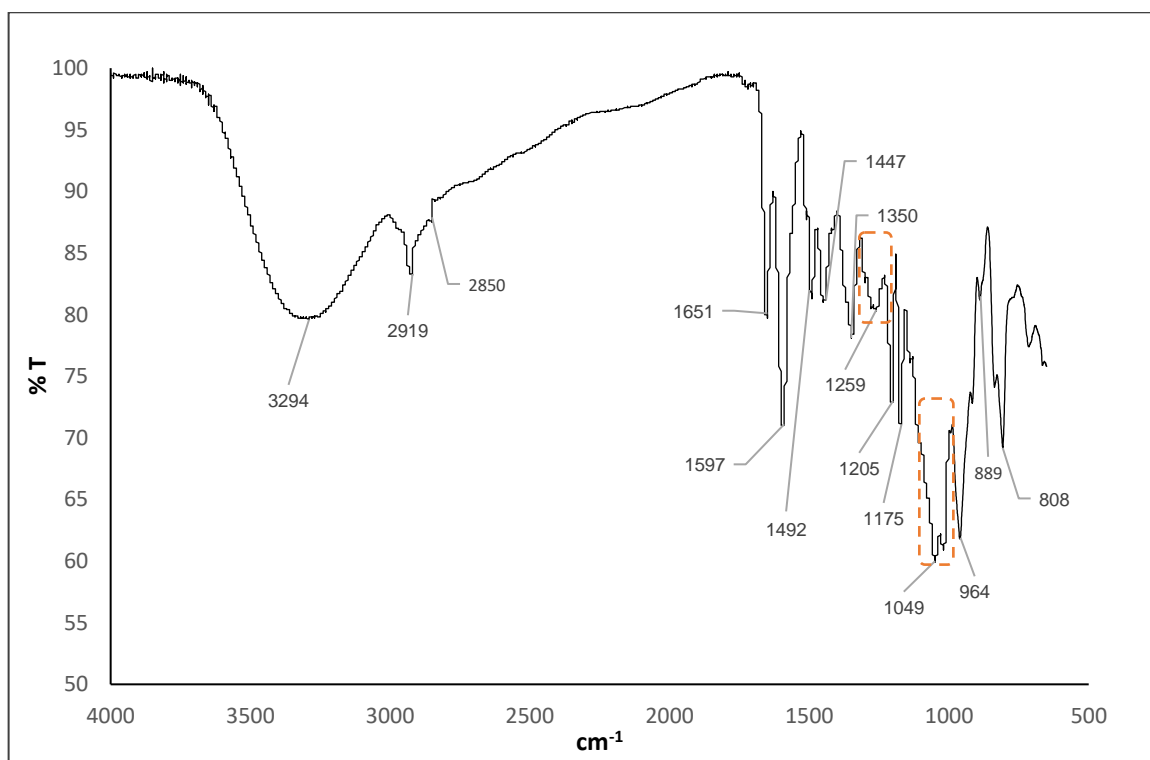


Figura 38: Espectro na região do infravermelho da substância 4 (ATR), região de 4000-600 cm^{-1} .

Os valores das integrais e os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT-135 (Figura 40, 41 e 42, Página 81, 83 e 84, respectivamente), sugerem que a substância 4 seja uma mistura de dois núcleos kanferol, contendo substituintes diferentes.

A aglicona foi caracterizada através da análise do espectro de RMN de ^1H , onde foram identificados 4 sinais de hidrogênio aromáticos no anel A e B, como sendo: 2 átomos de hidrogênio que mantêm entre si relação meta no anel A aos hidrogênios H- 6/ H- 8 [δ_{H} 6,48/6,74; d; J= 1,6 Hz] de RS2 e 2 átomos de hidrogênio H- 6/ H- 8 [δ_{H} 6,43/ 6,25; d; J= 2 Hz] para a substância 4A.

Também foram identificados 4 sinais de hidrogênios equivalentes no anel B no sistema aa' bb' típico de flavonoides *p*-dissubstituídos, com deslocamento em δ_{H} 7,82 e 6,97; d; J= 8,8 Hz para a substância RS2 e δ_{H} 8,03 e 6,99; d; J= 8,8 Hz para 4A.

O espectro de HSQC (Figura 43, Página 85) permitiu a observação de três sinais de carbono anoméricos em δ_{C} 98,85, 102,15 e 107,17 ppm correlacionados com o sinal em δ_{H} 5,61, 5,48 e 4,33 ppm respectivamente, para a substância 4A, sendo caracterizado como um kanferol triglicosilado. Com base nos dados espectrais de RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT- 135 foram identificadas três unidades glicídicas, duas ramnoses e uma glicose, confirmada pela presença dos sinais em δ_{H} 1,04 e 1,31 ppm atribuídos a dois grupos metilas das unidades raminosídicas e em δ_{H} 3,73/3,23 atribuídos a ligação $-\text{CH}_2-$ da glicose.

A localização da unidade α -L-ramnopiranosil é sugerida através da correlação em HMBC (Figura 44, Página 86) do hidrogênio anomérico H-1R2 (δ_{C} 102,15/ δ_{H} 5,48 ppm) com o carbono C-3 (δ_{C} 135,83 ppm). A unidade glicosídica β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil se deu através do acoplamento heteronuclear (J^3) entre o hidrogênio anomérico H-1R1 (δ_{C} 98,85/ δ_{H} 5,61 ppm) com o carbono C- 7 (δ_{C} 162,67 ppm), além do acoplamento a longa distância do hidrogênio H-3R1 (δ_{C} 81,47/ δ_{H} 3,64 ppm) com o carbono anomérico C- 1G (δ_{C} 107,17/ δ_{H} 4,24 ppm), descritos na tabela 10, página 80.

Portanto, os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT-135, HSQC, HMBC, COSY (Figura 45, Página 87), IV, associado a faixa de fusão entre 220 a 221°C, sugere que RS3 seja caracterizado como uma mistura do composto 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol mais a substância 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil]-kanferol (4A; Figura 39). Pelos nossos conhecimentos não há relatos na literatura da descrição da substância 4A.

A fim de confirmar essa proposta estrutural do composto 4A a RS3 será purificada por HPLC e submetida a HPLC - MS, RMN de ^1H , de ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC.

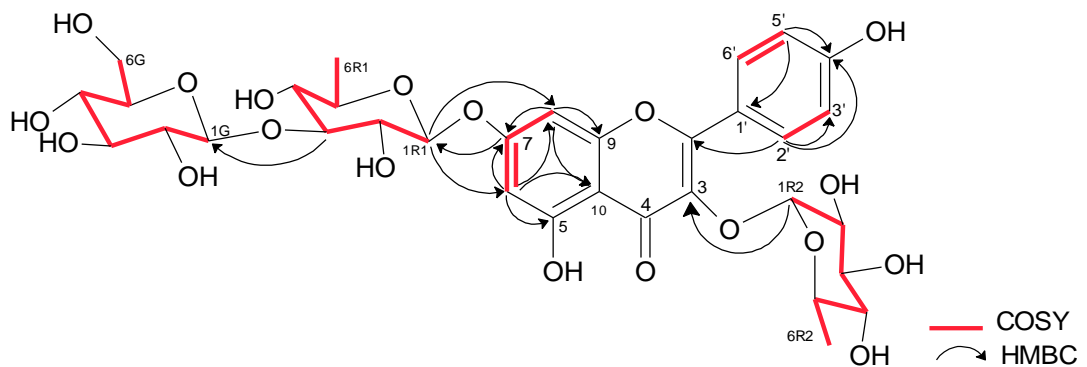


Figura 39: Estrutura do composto 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil]-kanferol

Tabela 10: Dados de ^{13}C , ^1H , COSY e HMBC do composto 3-O- α -L-ramnopiranosil-7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glicopiranosil]-kanferol.

Posição	Composto RS3					
	δ_{C} RS3	δ_{C}^* RS2	δ_{H}	Acoplamento (Hz)	H-H	HMBC
2	158,11	158,60	X	X	X	C-3' e 5' (J^3)
3	135,83	135,29	X	X	X	C-1R2 (J^3)
4	178,54	178,60	X	X	X	X
5	164,59	161,76	X	X	X	C-6 (J^2)
6	98,85	99,44	6,24	d; 1,6	H-8	C-8 (J^3)
7	162,67	162,38	X	X	X	C-8 (J^2)/C-6 (J^2)/C-1R1 (J^3)
8	93,83	94,53	6,43	d; 2	H-6	C-6 (J^3)
9	157,10	156,89	X	X	X	C-8 (J^2)
10	104,5	106,38	X	X	X	C-8 (J^3)/C-6 (J^3)
1'	121,52	121,22	X	X	X	C-3' e 5' (J^2)
4'	160,60	160,60	7,99	X	X	C-2' e 6' (J^3)/C-3' e 5' (J^2)
2' e 6'	130,80	130,90	6,98	d; 8,8	H-3' e 5'	C-2(J^3) e C-4' (J^3)
3' e 5'	115,40	115,50	X	d; 8,8	H-2' e 6'	C-1'(J^3) e C-4' (J^2)
1R1	98,85	98,73	5,61	sl	H-2R1(J^3)	C-7 (J^3)
2R1	71,0	71,98	4,07	sl	H- 1R1 (J^3)/H-3R1 (J^3)	C-1R1(J^2)
3R1	81,47	70,20	4,24	sl	H-2R1(J^3)/H-4R1(J^3)	C-1G (J^3)
4R1	72,42	72,41	3,87	t; 4,8	H-5R1(J^3)	C-3R1(J^2)/ C-6R1(J^3)
5R1	70,52	70,51	3,35/3,64	t; 1,2/m; 3,6	H-4R1(J^3)/H-6R1 (J^3)	C-6R1(J^2)/C-1R1(J^3)/ C-4R1(J^2)
6R1	16,19	17,05	1,31	d;6	H-5R1(J^3)	C-5R1 (J^2)
1R2	102,15	102,33	5,48	sl	H-2R2 (J^3)	C-3 (J^3)
2R2	70,74	70,73	4,24	sl	H-1R2 (J^3)/H-3R2 (J^3)	X
3R2	70,10	70,20	3,64	d; 3,6	X	C-1R2(J^3)
4R2	72,42	72,42	3,73	m; 6	H-5R2 (J^3)	C-6R2(J^3)
5R2	70,6	70,51	3,35/3,64	t; 1,2/ m; 3,6	H-4R2 (J^3)/H-6R2 (J^3)	C-6R2(J^2)/C-1R2(J^3)
6R2	16,19	16,62	1,31	d; 6	H-5R2 (J^3)	C-5R2 (J^2)
1G	107,17	X	4,33	d; 7,6	H-2G (J^3)	C-2G(J^2)
2G	74,07	X	3,24	t; 7,6	H-1G (J^3)/H-3G (J^3)	C-1G(J^2)/C-3G(J^2)
3G	76,60	X	3,35	t; 1,2	H-2G (J^3)/H-4G (J^3)	X
4G	69,79	X	3,24	t; 7,6	H-5G (J^3)	C-5G (J^3)
5G	74,07	X	3,35	t; 7,6	H-4G (J^3)/H-6G (J^3)	X
6G	65,88	X	3,73/3,24	m; 7,6	X	X

X- Não há deslocamento químico. * Deslocamento de carbono conforme tabela 9.

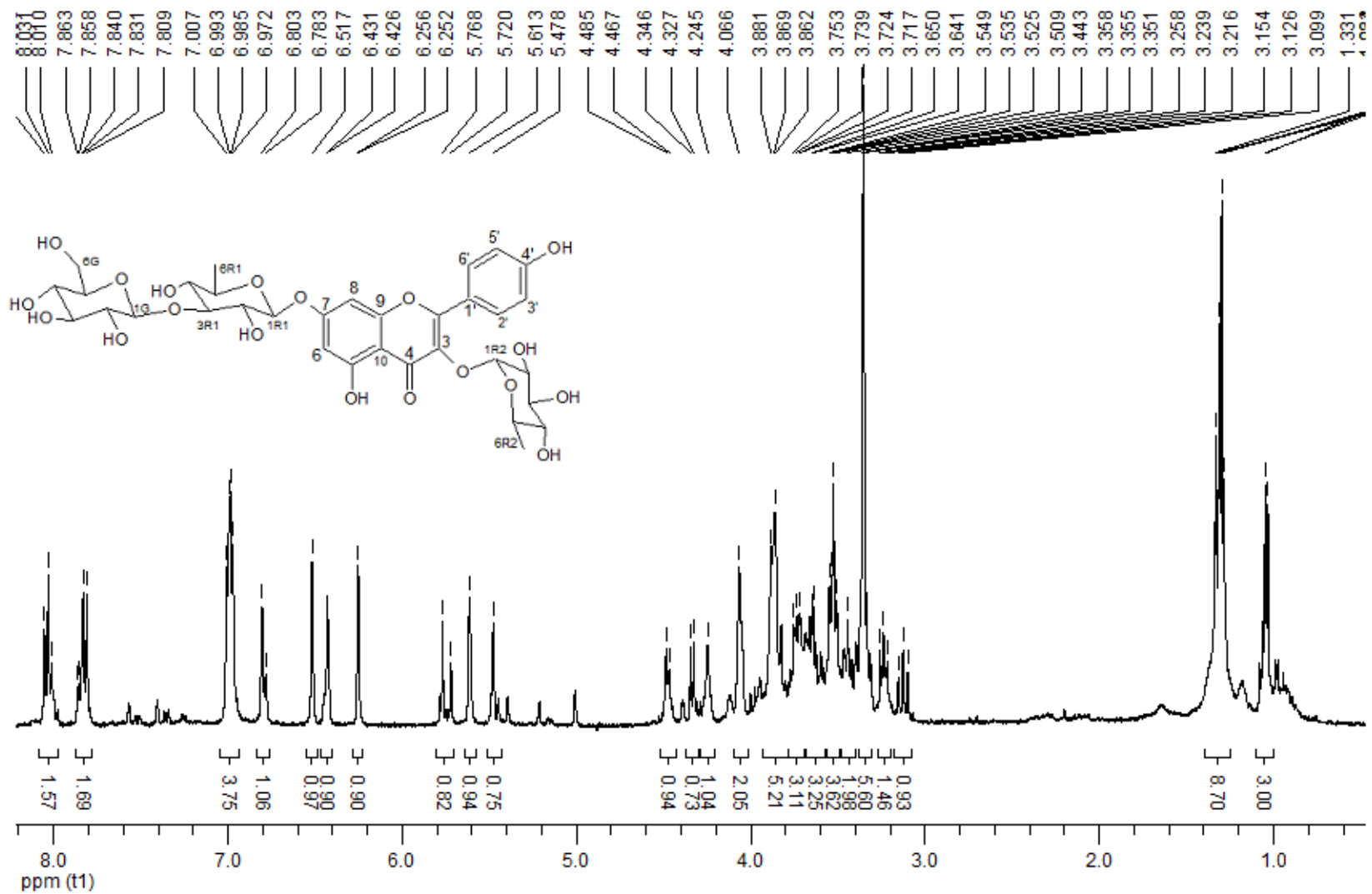
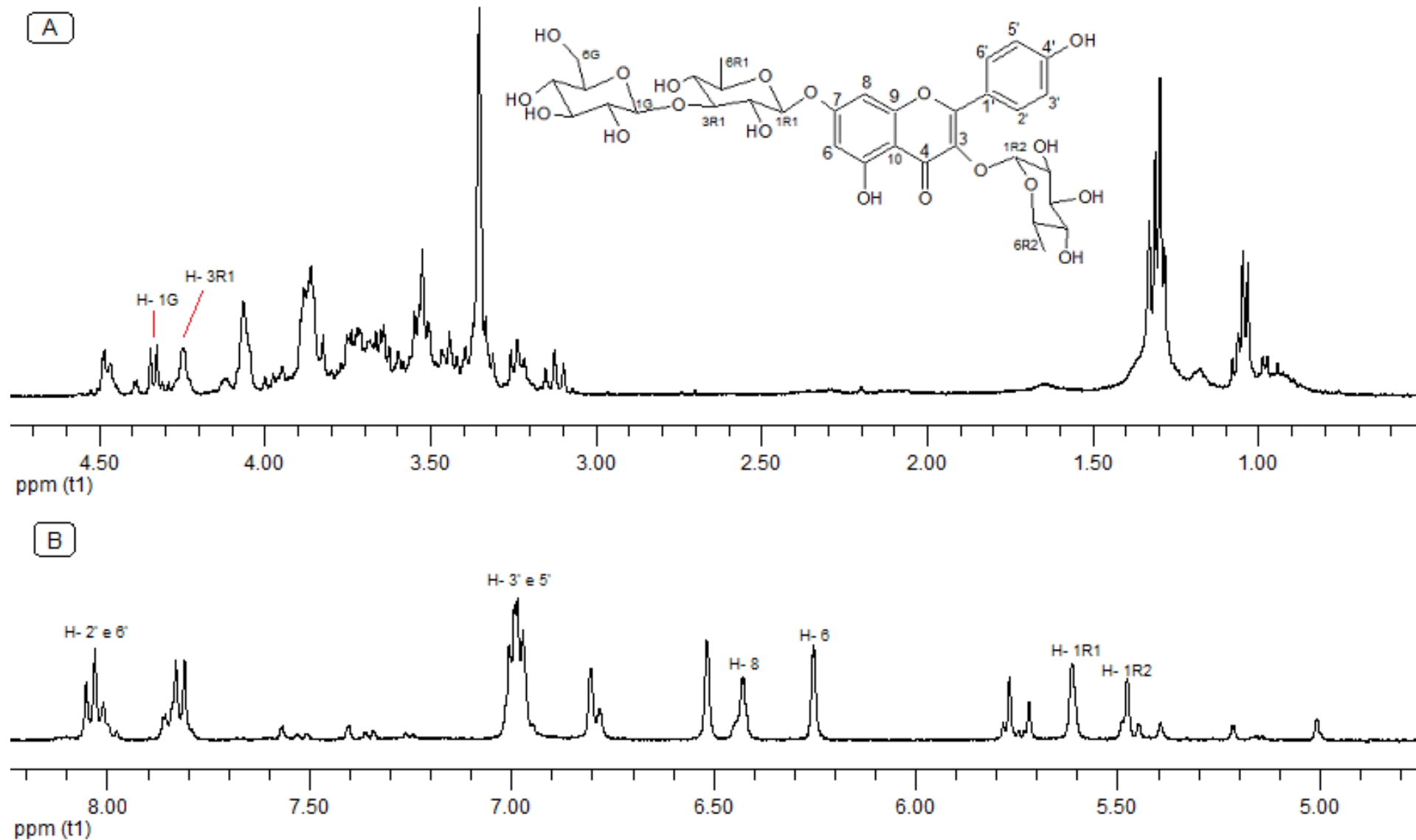


Figura 40: Ampliação (0- 8.2 ppm) do espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de RS3 em CD_3OD .



Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de RS3 em CD_3OD . A- ampliação de (0- 4.80 ppm); B- ampliação de (4.80- 8,2 ppm).

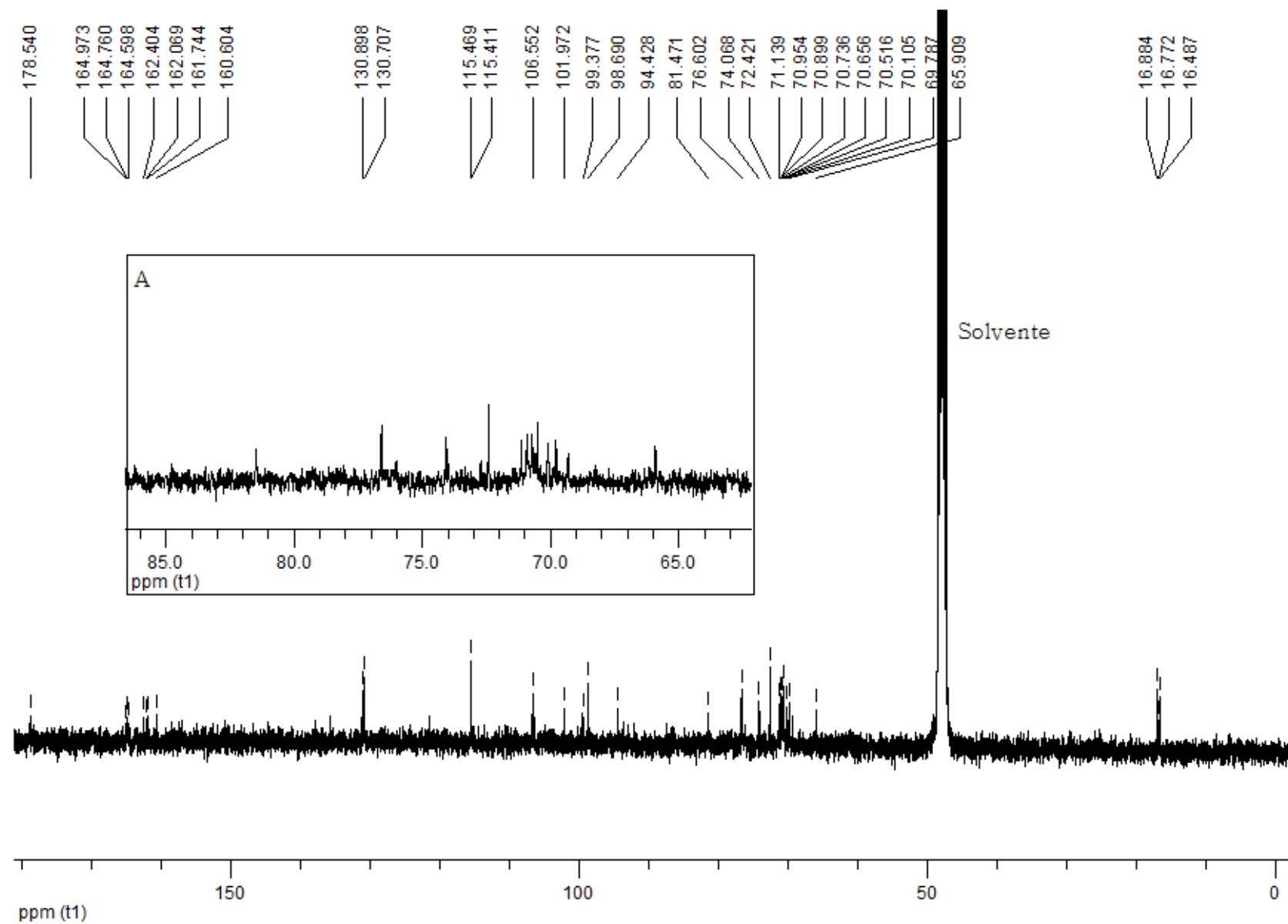


Figura 41: Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz) de RS3 em CD_3OD . A- ampliação de (62- 87 ppm).

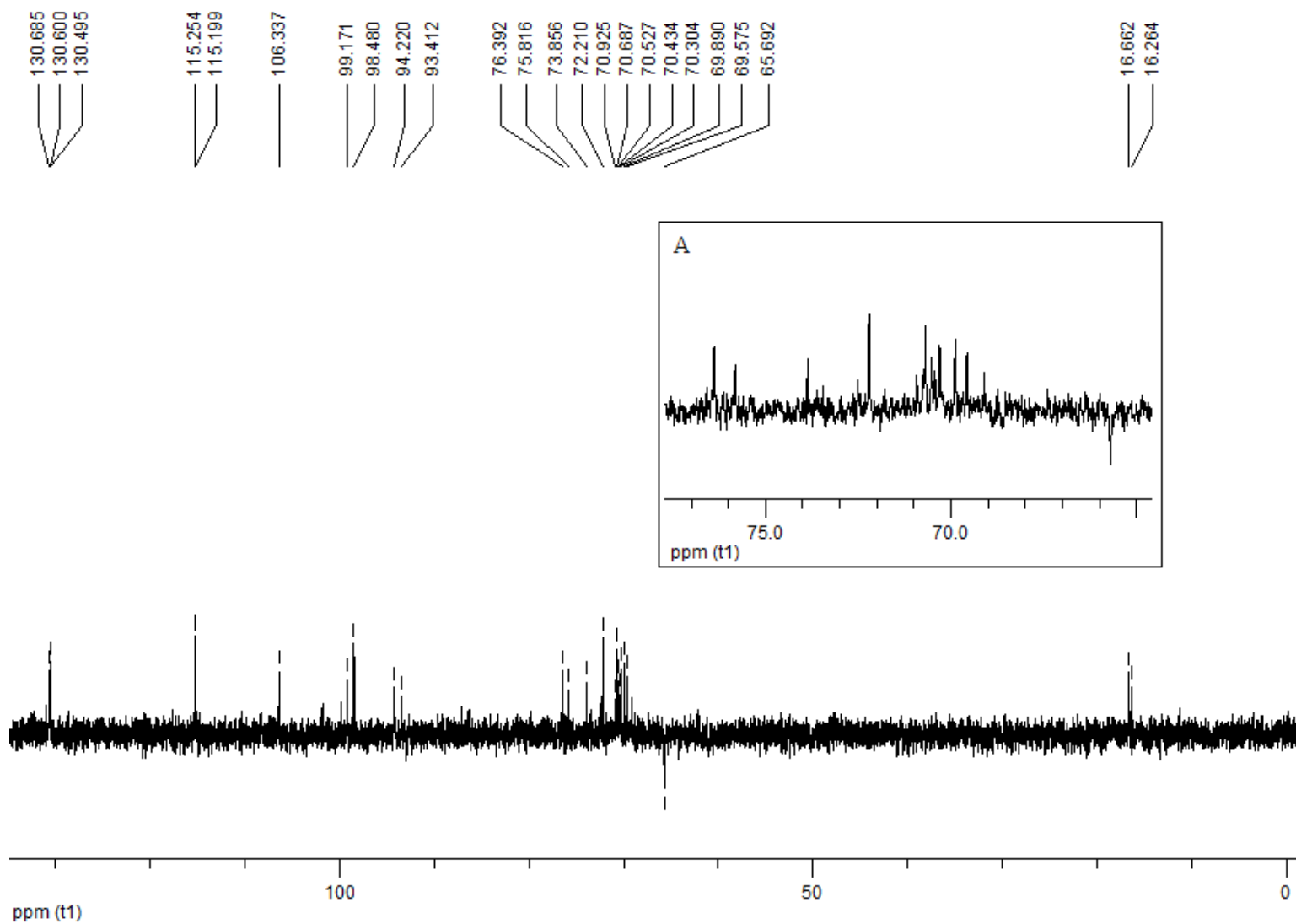


Figura 42: Espectro DEPT-135 (100 MHz) de RS3 em CD₃OD. A- ampliação (64- 78 ppm).

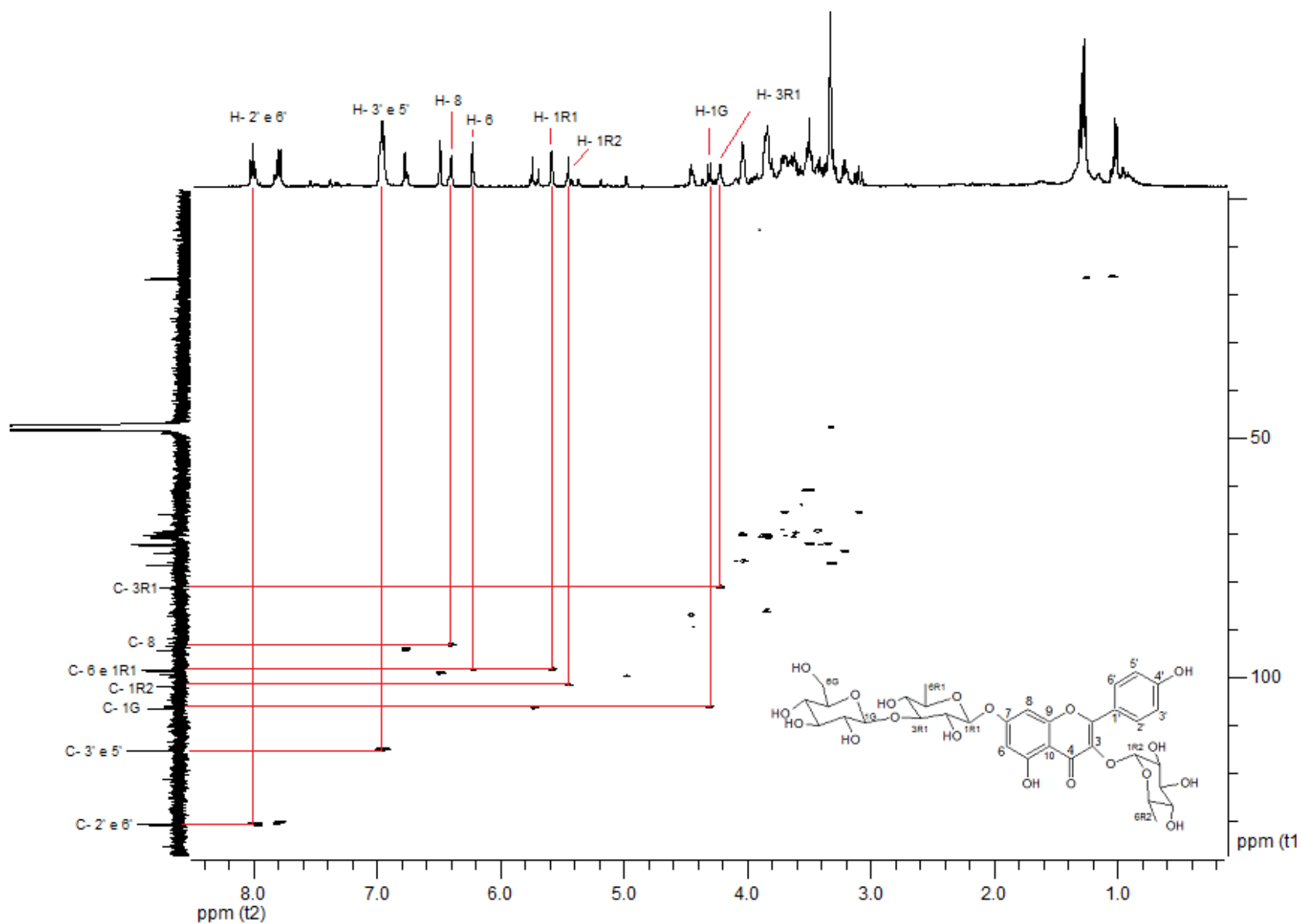


Figura 43: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento HSQC de RS3 em CD₃OD, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H-1G, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6' e H- 3R1.

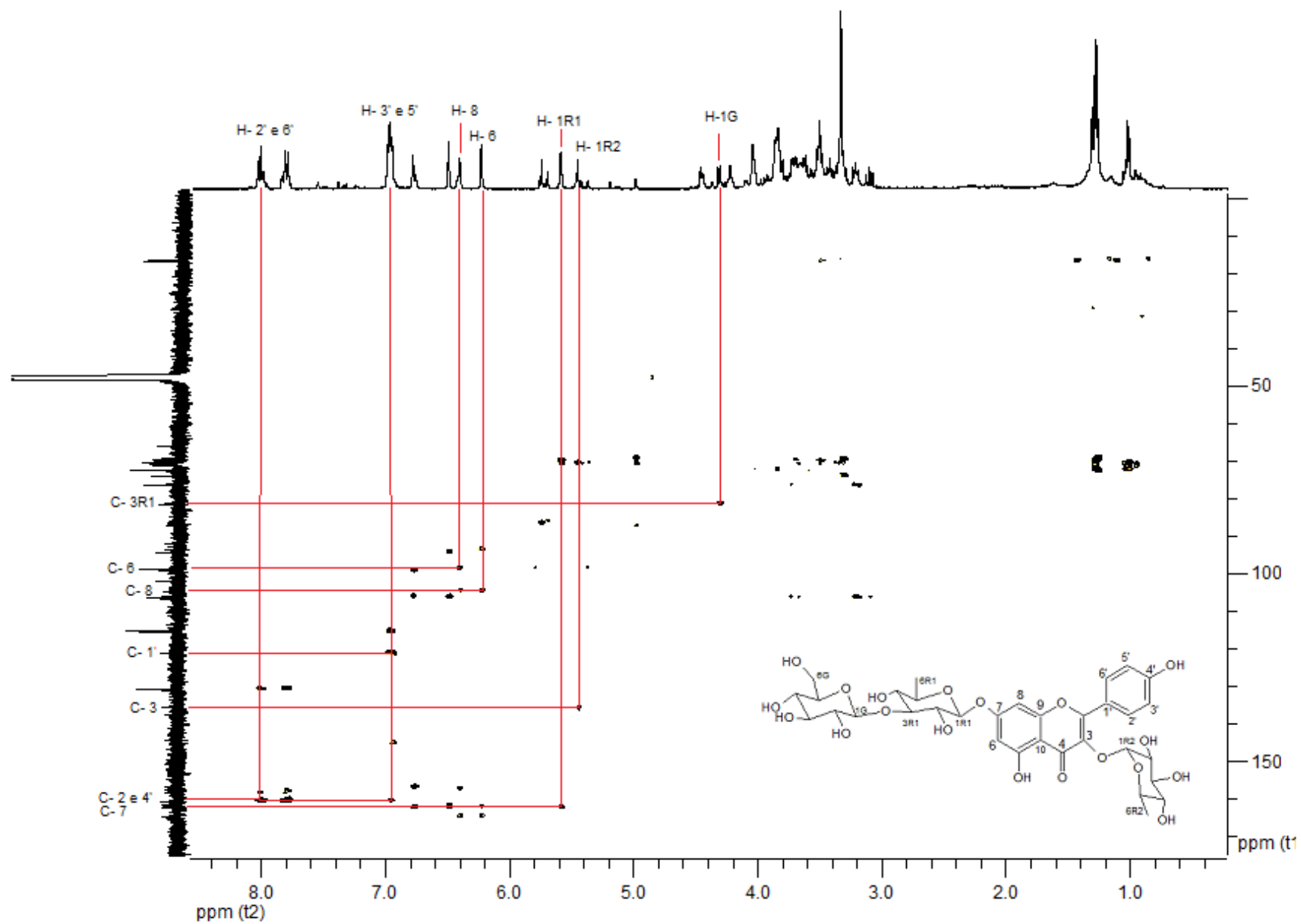


Figura 44: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento HMBC de RS3 em CD₃OD, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H-1G, H-6, H-8, H-3' e 5', H-2' e 6' e H-3R1.

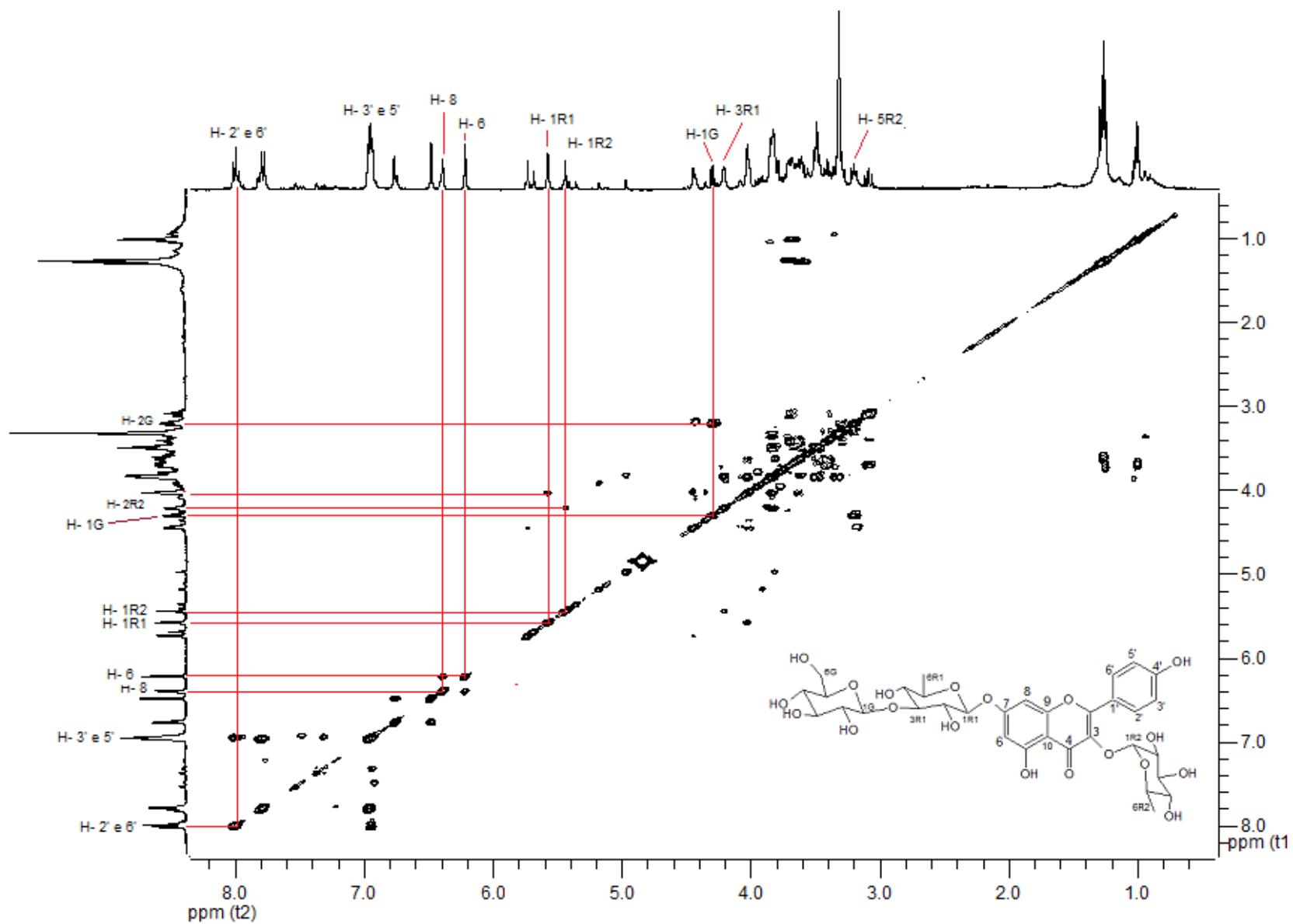


Figura 45: Correlação de H-C observadas no mapa de contorno no experimento COSY de RS3 em CD₃OD, com destaque ao H-1R1, H-1R2, H-1G, H- 6, H- 8, H- 3' e 5', H- 2' e 6' e H-3R1.

5.3 Testes biológicos

A fim de avaliar a atividade biológica do óleo essencial, extrato, frações e componentes isolados foram realizados testes de: letalidade, citotoxicidade e atividade antimicrobiana.

5.3.1 Letalidade frente *A. salina*

O óleo essencial da espécie apresentou CL_{50} de $29,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 11), considerado letal frente a *A. salina* (MEYER *et al.*, 1982), sendo um indicativo de atividade biológica. Esse teste, realizado com o óleo essencial da *S. guianensis* forneceu CL_{50} de $392,48 \mu\text{g mL}^{-1}$ (MARTINS FILHO, 2016), sendo considerado com letalidade moderada.

Tabela 11: Dados do teste de letalidade para o óleo essencial de *S. cymosa* frente à *A. salina*.

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Números de Mortos	Números de Vivos	%		CL_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
			Mortos	Vivos	
150	30	0	100	0	29
100	28	2	93	7	
50	26	4	87	13	
10	5	25	17	83	
Branco	0	30	0	0	
Tween	0	30	0	0	

O extrato de AcOEt não apresentou letalidade frente *A. salina*, pois mesmo testado na maior concentração ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) não foi observado a presença de nauplios mortos.

Não há relatos sobre a utilização da *A. salina* em extratos de espécies do gênero *Siparuna*.

5.3.2 Citotoxicidade frente a linhagem células leucêmicas

Estudos mostram a correlação entre o teste de letalidade frente a *A. salina* com a inibição do crescimento in vitro de linhagens de células tumorais; reconhecendo esse experimento como de fácil execução, simples e como uma forma de avaliação preliminar da atividade citotóxica de substâncias frente as células antitumorais (INC, EUA; MCLAUGHLIN *et al.*, 1988).

A tabela 12 mostra os resultados dos testes citotóxicos para os ensaios de MTT em linhagens celulares tumorais THP-1 e K562, assim como o Índice de seletividade (IS). O óleo essencial apresentou valores de CI_{50} para K562 e THP-1 muito próximos e inferiores a $30,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, indicando atividades citotóxicas, uma vez que, na literatura valores de CI_{50} muito próximos ou abaixo de $30,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados com atividade citotóxica relevantes (HENNEBELLE *et al.* 2008; BRAGA *et al.* 2014; TIWARY *et al.* 2015). As substâncias controles (quimioterápicas) utilizadas foram a citarabina (THP-1) e mesilato de imatinibe (K562).

O óleo essencial apresentou IS, sobre a linhagem THP-1 de 3,15, sendo o índice da citarabina de 4,62. Já o IS frente à K562 foi de 2,60, no qual o índice do imatinibe foi 6,63. Diante disso, os quimioterápicos apresentam um índice melhor que o óleo essencial avaliado, no entanto, o óleo tem ação sob os dois tipos de células tumorais.

Tabela 12: Dados obtidos através do teste de citotoxicidade e Índice de seletividade frente as linhagens de células tumorais THP-1 e K562.

Substâncias	$CI_{50} (\mu\text{g mL}^{-1}) \pm SD^*$		Índice de seletividade		PBMC
	THP-1	K562	THP-1	K562	
Óleo essencial	25,44 ± 1,55	30,88 ± 2,45	3.15	2.60	80,20 ± 4,11
Extrato hexânico	50,15 ± 3,29	68,80 ± 3,56	1,61	1,17	80,65 ± 4,02
Extrato clorofórmico	29,20 ± 2,08	30,54 ± 2,44	2,62	2,22	76,62 ± 3,50
Extrato de AcOEt	31,04 ± 2,30	33,60 ± 2,10	2,45	2,27	76,22 ± 3,58
Extrato etanólico	9,80 ± 1,10	12,56 ± 2,58	5,11	4,00	50,12 ± 3,57
RS1	>100	>100	ND	ND	70,11 ± 3,45
RS2	21.30 ± 1.29	42.50 ± 2.15	3.06	1,53	65,14 ± 2,57
Citarabina	12,70 ± 1,20	ND	4.62	-	58,70 ± 3,76
Imatinibe	ND	10,50 ± 1,05	-	6.63	69,63 ± 3,13

* Valores apresentados como média ± desvio padrão.

ND- Não determinado

Citarabina e imatinibe (substâncias controle)

THP-1- Leucemia Mielóide aguda; K562- Leucemia Mielóide Crônica

O extrato etanólico foi o que obteve o menor valor de CI_{50} e maior valor de IS frente as células de THP-1, ou seja, foi mais eficiente que a própria solução controle (citarabina). Já para as células de K562 o extrato etanólico apresentou concentração bem próxima da substância controle (imatinibe), assim como o IS.

Tomando como base que CI_{50} abaixo de $30,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerado com atividade citotóxica moderada para extratos, não podemos desconsiderar valores

menores ou mais próximos de $30,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ como no caso dos extratos de clorofórmico e acetato de etila, mas que obtiveram IS bem abaixo das substâncias controles. O extrato hexânico não apresentou atividade citotóxica frente aos dois tipos linhagem celular testadas, assim como a substância RS1 (esteróide).

A substância RS2 (flavonoide) apresentou atividade citotóxica moderada frente a linhagem de células THP-1 com IS de seletividade próximo da substância controle, diferente do resultado obtido frente as células de K562. A substância isolada RS2 foi mais ativa frente linhagem de células THP-1 comparada ao extrato da qual foi isolada, nesse caso pode estar ocorrendo um efeito antagonista onde os demais compostos do extrato em acetato de etila diminui o efeito da substância RS2.

A substância RS3 não foi testada devido à curta disponibilidade de tempo, uma vez que o teste de citotoxicidade não foi realizado na instituição (UESC).

Pelos nossos conhecimentos não há relatos da utilização de espécies do gênero *Siparuna* frente a linhagem de células leucêmicas.

5.3.3 Atividade antimicrobiana

As substâncias foram submetidas, em triplicata, ao teste de atividade antimicrobiana com as bactérias: *Salmonella enterica*, *E. coli* e *S. aureus* (Tabela 13, Página 91).

O óleo essencial apresentou halo de inibição frente a todas as bactérias testadas. Entretanto, o extrato de AcOEt, as frações e substâncias isoladas RS1 e RS3 somente apresentaram halo de inibição frente a bactéria *S. aureus*. O fato da substância RS3 ter apresentado halo inibição frente a bactéria *S. aureus* comparada a substância RS2, sugere a ocorrência de sinergismo entre as substâncias presentes na mistura ou o efeito pode ser apenas da substância 4A (ZAGO *et al.*, 2009).

Tabela 13: Resultado da biocromatografia do óleo, extrato de AcOEt, frações e substâncias isolada frente as bactérias *Salmonella entérica*, *E. coli* e *S. aureus*.

Substâncias	Bactérias		
	<i>Salmonella entérica</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
Extrato AcOEt	Ø	Ø	8
Grupo 15	Ø	Ø	7
Grupo 17	Ø	Ø	6
RS1	Ø	Ø	6
RS2	Ø	Ø	Ø
RS3	Ø	Ø	7
Óleo essencial	9	8	13
Cefalexina	25	23	23

Ø: Não houve aparecimento de halo inibitório; Cefalexina: substância controle. RS1: 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol; RS2: 3,7-di-O-α-L-ramnopiranosilkanferol; RS3: RS2 e 3-O-α-L-ramnopiranosil-7-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosil]-kanferol

Montanari (2010) relatou atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *S. guianensis*, assim como do padrão comercial de α-bisabolol frente às bactérias *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli*, os resultados mostraram que o óleo essencial e a substância de α-bisabolol inibiram o crescimento das bactérias testadas em concentrações relativamente baixas (8 - 63 µg mL⁻¹).

Além disso, foi observado que a substância α-bisabolol apresentou valores de CIM 2X maior do que o óleo essencial de *S. guianensis*. O autor ainda sugeriu que esse sesquiterpenóide, seja o principal responsável pela ação antibacteriana do óleo essencial. Da mesma forma Andrade (2013) relatou atividade inibitória, relativamente baixa, do óleo essencial de *S. guianensis* (CIM= 125 - 500 µg mL⁻¹).

Subramaniam e colaboradores (2014) estudaram o efeito da ação antibacteriana do composto 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol (RS1) e seu efeito sinérgico com alguns antibióticos, o qual relataram atividade frente as bactérias *S. aureus* (CIM= 25 µg mL⁻¹) e *E. coli* (CIM= 12,5 µg mL⁻¹). Nesse estudo foi realizado combinações do composto com antibióticos, produzindo padrões de sinergismo.

Pelos nossos conhecimentos não há relatos na literatura de testes antimicrobianos utilizando as demais substâncias (Extrato de AcOEt, RS2 e RS3).

Serão determinadas as concentrações inibitória mínima para o óleo essencial e substâncias ativas, em etapa futura.

6 CONCLUSÕES

A espécie é promissora como fonte de óleo essencial, rica em α -bisabolol, sendo de grande interesse nas áreas farmacêuticas e cosméticas.

O fracionamento do extrato em acetato de etila, levou ao isolamento de três substâncias, um esteroide e dois flavonoides com núcleo kanferol.

O óleo essencial apresentou alta letalidade frente *A. salina*, assim como apresentou halo de inibição frente a todas as bactérias testadas, sendo que sua ação pode ser proveniente do composto α -bisabolol. Além disso, indica atividade citotóxica frente as linhagens de células tumorais de LMA e LMC, com IS maior para células do tipo LMA.

O extrato etanólico apresentou citotoxicidade elevada frente aos dois tipos de células testadas, sendo mais seletivo frente as células de LMA. O extrato hexânico não apresentou atividade citotóxica frente os dois tipos de células, assim como a substância 3-O- β -D-glicopiranosil-sitosterol (RS1).

A substância 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosilkanferol (RS2) apresentou atividade citotóxica moderada frente a linhagem de células LMA, com IS de seletividade próximo da substância controle. As frações e substâncias isoladas RS1 e RS3 somente apresentaram halo de inibição frente a bactéria *S. aureus*. Já a substância RS2 não apresentou halo de inibição frente a nenhuma das bactérias testadas.

O estudo com a espécie *S. cymosa* da região Sul da Bahia se torna promissor, visto que esse trabalho apresentou resultados fitoquímicos e biológicos interessantes e, ainda não registrados na literatura, colaborando com o conhecimento da biodiversidade regional e aumento de informações relativas a esse gênero com potencial farmacológico.

Outras espécies do gênero, merecem ser estudadas, a fim de colaborar com a busca de novas substâncias de interesse farmacológico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry**. Allured. Illinois 4. ed., p. 455, 2007.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. Uma comparação cega de bioensaios simples de bancada e de citotoxicidades de células tumorais humanas como antitumorais em pré-telas. **Phytochem Analysis**, vol. 2, p. 107-111, 1991.
- ANDRADE, M. A. Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico. **Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais**, p. 226, 2013.
- ANTONIO, T. M.; WALLER, G. R.; MUSSINAN, C. J. composition of essential oil from the leaves of *siparuna*-guianensis (monimiaceae). **chemistry & industry**, n. 14, p. 514-515, 1984.
- ARAÚJO, J. M. Química de Alimentos: Teoria e Prática. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, p. 477, 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BESSA, N. G. F.; BORGES, J. C.; PEREIRA, M. A. B.; BESERRA, F. P.; CAMPOS, S. L. 11451-Prospecção fitoquímica das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet.(*siparunaceae*) de uso popular medicinal em reassentamento rural, Tocantins. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011.
- BERSAN, S. M. F. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos orais, (2012).
- BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; Campos, S. L.; Borges, J. C. M.; Fagundes, R.; Pereira, M. A. B.; Bessa, N. G. F. Prospecção fitoquímica das folhas de *Siparuna guianensis* Aublet. (**Siparunaceae**) de uso popular medicinal em reassentamento rural, Tocantins, 2011.
- BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.
- Bioma da Mata Atlântica: banco de dados, 2016. Disponível em:< <https://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>>. Acesso em: 10 abr. 2018.
- BITTENCOURT, R.; FOGLIATO, L.; DAUDT, L.; BITTENCOURT, H. N.; FRIEDERICH, J. R.; FERNANDES, F.; ONSTEN, T.; FASSINA, K.; ROCHA, L. K.; MORENO, F.; SILVA, G.; CRUZ, M. S.; DE GARCIA, R. G.; MASNIERSKY, J. C.; SILLA, L. M. R. Leucemia Mielóide Aguda: perfil de duas décadas do Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 25, n. 1, p. 15-24, 2003.

BOLZAN, A. A. Dissertação de mestrado: CONSTITUINTES DE *Senecio platensis* Arech. ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA. 2007.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. D. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. D. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BOSTON PUBLIC HEALTH COMMISSION | FACT SHEET, 2014. Disponível em:< <http://www.bphc.org/whatwedo/infectious-diseases/Infectious-Diseases-A-to-Z/Documents/Fact%20Sheet%20Languages/E.coli/Portuguese.pdf>>. Acesso em 01 mar. 2018.

BRAGA, C. D. M. Histórico da utilização de plantas medicinais, 2011.

BRAGA, T. V.; DAS DORES, R. G. R.; RAMOS, C. S.; EVANGELISTA, F. C. G.; DA SILVA TINOCO, L. M.; DE PILLA VAROTTI, F.; DE PAULA SABINO, A. Antioxidant, antibacterial and antitumor activity of ethanolic extract of the *Psidium guajava* leaves. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 23, p. 3492, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Política nacional de promoção da saúde/ Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, v.7, p.60, 2006.

CAMPANILI M.; SCHAFFER W. B. Mata Atlântica: patrimônio nacional brasileiro. 2. ed. Brasília: MMA. P. 408, 2010.

CARVALHO, V. F. Atividade antiparasitária in vitro do extrato e óleo extraídos da *Siparuna guianensis* e do alfa bisabolol isolado contra *Strongyloides venezuelensis*. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2017.

CASTELLANI, D. C.; CASALI, V. W. D.; SOUZA, A. L.; CECON, P. R.; CARDOSO, C. A.; MARQUES, V. B. Produção de óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4, 2006.

CELINE, V.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L.F.; ROSÁRIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C.; GENEVI'EVE, B. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimarial activity extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 123, p. 413-422, 2009.

CICCIÓ, J. F.; GÓMEZ-LAURITO, J. Volatile constituents of the leaves of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Turrialba, Costa Rica. **Revista de Biología tropical**, v. 50, n. 3-4, p. 963-967, 2002.

CICCIÓ, J. F.; GÓMEZ-LAURITO, J. Volatile Constituents of the Fruits of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Costa Rica. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 4, p. 328-330, 2010.

COLLINS, C. H; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Unicamp, São Paulo, 2006.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Vol. IV. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, p. 646, 656. 1978.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC- Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, p. 210, 1981.

DARRA, E.; ABDEL-AZEIM, S.; MANARA, A.; SHOJI, K.; MARÉCHAL, J. D.; MARIOTTO, S.; CAVALIERI, E.; PERBELLINI, L.; PIZZA, C.; PERAHIA, D.; CRIMI, M.; SUZUKI, H. Insight into the apoptosis-inducing action of α -bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 476, p. 113-123, 2008.

DEGENHARDT, R. T.; FARIAS, I. V.; GRASSI, L. T.; FRANCHI JR, G. C., NOWILL, A. E., BITTENCOURT, C. M. D. S., WAGNER, T. M., SOUZA, M. M., CRUZ A. B., MALHEIROS, A. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 56-61, 2016.

DIAS, A. J. L. G. Estudos para a preparação de tetraidrofuranos substituídos a partir do α -(-)-bisabolol e obtenção de análogos de compostos com atividade biológica. Departamento de Química Orgânica, Universidade Estadual de Campinas, p. 175, 2009.

DINIZ, J. A. *Siparuna guianensis* Aublet como nova fonte de α -bisabolol para o controle de *Rhipicephalus microplus*. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, p. 82, 2014.

DOS SANTOS, H. D.; DE OLIVEIRA, F. F.; DE OLIVEIRA, R. A. Influence of Solubility of Ethanol Extracts in *Artemia salina* Tests. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 4, p. 1535-1545, 2017.

DOS SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; DE FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.70, p.343-349, 2000.

FACUNDO, V. A.; AZEVEDO, M. S.; RODRIGUES, R. V.; NASCIMENTO, L. F.; MILITÃO, J. S. L. T.; SILVA, G. V. J.; BRAZ FILHO, R. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1134-1139, 2012.

FEIL, J. P. Reproductive ecology of dioecious *Siparuna* (Monimiaceae) in Ecuador, a cane of gall midge polination. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.110, p.171-203, 1992.

FISCHER, D. C.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T.; MORENO, P. R. Essential oils from fruits and leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 1, p. 101-102, 2005.

FISCHER, D. C. H.; GONÇALVES, M. I.; OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M. A. Constituents from *Siparuna apiosyce*. **Fitoterapia**, v.70, p.322 – 323, 1999.

FONSECA, T. L.; GROLL, A. V.; LEITÃO, G. G.; SCAINI, C. J.; RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A. D. Atividade antimicobacteriana de extratos vegetais frente a *mycobacterium fortuitum* e *mycobacterium malmoeense*, 2008.

GERALDO, P. M.; CUNHA, J. A.; BRUNO, S.; RAIMUNDO, B. F.; JAN, S. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

GERARD, R. V.; MACLEAN, D. B.; ANTONIO, T. M. Examination of three *Siparuna* species for alkaloid content. **Phytochemistry**, v. 25, n. 9, p. 2155-2156, 1986.

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

GONZÁLEZ, G. F. P.; GIL ARCHILA, E. Anti-bacterial action of extracts and fractions from *Siparuna sessiliflora* Kunth A. DC (limoncillo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 65-72, 2012.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, n.8, p. 3400-19, 2009.

GUEVARA VENEGAS, A. J. **Aislamiento, modificación sintética y evaluación in vitro de la actividad antifúngica de alcaloides provenientes de las hojas de la especie siparuna sessiliflora**. Dissertação de Mestrado. Faculta de Ciencias, 2012.

Haida, K. S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 3, 2007.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

JENETT-SIEMS, K.; KRAFT, C.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; SOLIS, P. N.; GUPTA, M. P.; BIENZLE, U. Sipaucins A-C, sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*. **Phytochemistry**, v.63, p. 377 – 381, 2003.

Khatun, M.; Billah, M.; Quader, M. A. Sterols and sterol glucoside from *Phyllanthus* species. **Dhaka University Journal of Science**, v. 60, n. 1, p. 5-10, 2012.

LEITÃO, G. G.; SIMAS, N. K.; SOARES, S. S. V.; BRITO, A. P. P. DE; CLAROS, B. M. G.; BITO, T. B. M.; MONACHE, F.D. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, p. 87-102, 1999.

LOPEZ, J. A.; LAURITO, J. G.; LIN, F.; SHARAF, M.; WONG, L. K.; SCHIFF Jr, P. L. Alkaloids of *Siparuna griseo-flavescens*. **Planta Médica**, v. 59, p.100-108, 1993.

LÓPEZ, P.; HERNANDO, D. **Evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides provenientes de las hojas de siparuna sessiliflora**. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculta Ciências, 2011.

MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; MENDES, C. S. O.; SILVA, C. M.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. Determinação de compostos fenólicos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 1164-1165, 2007.

MATOS, F. J. de A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1997.

MATOS, J. F. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: UFC, p. 150, 2009.

MARQUES, J. A.; BORGES, C. P. F.; **Práticas de Química Orgânicas**, Átomo: Campinas, 2007

MARTI, G.; EPARVIER, V.; MORLEO, B.; VEN, J.; APEL, C.; BODO, B.; AMAND, S.; DUMONTET, V.; LOZACH, O.; MEIJER, L.; GUÉRITTE, F; LITAUDON, M. Natural aristolactams and aporphine alkaloids as inhibitors of CDK1/Cyclin B and DYRK1A. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3018-3027, 2013.

MARTINS FILHO, S. E. C. Avaliação dos danos e métodos de regulação da floresta submetida à exploração de impacto reduzido na Amazônia Oriental. **Avaliação dos danos e métodos de regulação da floresta submetida à exploração de impacto reduzido na Amazônia Oriental**, 2006.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.

MAYORGA, P.; PÉREZ, K. R.; CRUZ, S. M.; CÁCERES, A. Comparação de bioensaios utilizando os crustáceos anostracanos *Artemia salina* e *Thamnocephalus platyurus* para triagem de toxicidade de extrato vegetal. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , vol. 20, não. 6, p. 897-903, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**, 2010.

MUKHERJEE, P. K.; VENKATESH, M.; GANTAIT, A. Ayurveda in modern medicine: development and modification of bioactivity. **Compr Nat Prod II**, p. 14, 2010.

MUÑOZ D. K.; Edison J. OSORIO D. Guillermo L. M. P. , Gabriel J. A.O A. Actividad antiplasmodial de alcaloides aporfínicos de *Rollinia pittieri* y *Pseudomalmea boyacana* (Annonaceae). **Vitae**, v. 13, n. 1, p. 49-54, 2006.

NAKAMURA, C. V., SANTOS, A. O., VENDRAMETTO, M. C., LUIZE, P. S., DIAS FILHO, B. P., CORTEZ, D. A., UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do

extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NEGRI, G.; SANTI, D. D.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1024-1034, 2012.

Organização mundial da saúde disponível em: <https://www.dgs.pt/em-destaque/oms-publica-relatorio-global-sobre-as-resistencias-aos-antimicrobianos.aspx>. Acesso em 18 de fev 2019.

OTERO, R.; NUNEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S. L.; OSORIO, R. G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A. Snakebites and Ethnobotany in the Northwest Region of Colômbia. Part III: Neutralization of the Haemorrhagic Effect of *Bothrops atrox* Venem. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 233-241, 2000.

PALMA, C. E.; CRUZ, P. S.; CRUZ, D. T. C.; BUGAYONG, A. M. S.; CASTILLO, A. L. Chemical composition and cytotoxicity of Philippine calamansi essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 128, p. 108-114, 2019.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. Cengage learninf, São Paulo, 2012.

PERBELLINI, L.; GOTTARDO, R.; CAPRINI, A.; BORTOLOTTI, F.; MARIOTTO, S.; TAGLIARO, F. Determination of alpha-bisabolol in human blood by micro-HPLC–ion trap MS and head space-GC–MS methods. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 373-377, 2004.

PEREIRA, R. J.; DAS GRAÇAS C., M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PESHIN, T.; KAR, H. K. Isolation and characterization of beta-sitosterol-3-O-beta-D-glucoside from the extract of the flowers of *Viola odorata*. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 4, 2017.

PINA, N. P. V. Fitoquímica e atividade antiplasmódica de *Siparuna poeppigii* (Tul.) A. DC. (Siparunaceae). 102 f. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

REBOUÇAS, L. M. C. Terpenos de *Siparuna guianensis*: aldeídos via epoxidação de duplas terminais. **Terpenos de Siparuna guianensis: aldeídos via epoxidação de duplas terminais**, 1984.

RENNER, S. S. Laurales. Complement, Post-C3 (Lytic) Pathway-Encyclopedia of Life Sciences. St. Louis US: Macmillan Reference Ltd, p. 5, 1997.

RENNER, S. S.; HAUSNER, G. **Monograph of Siparunaceae**. Flora Neotropica 95. New York: New York Botanical Garden, p. 256, 2005.

Resistência antibacteriana disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf. Acesso em 18 de fev 2019.

RIVERA, P. F. N.; GUERRINI, A.; TSAMARAINT, E. A. Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 2, p. 128-137, 2014.

ROCHA, N. F. M.; OLIVEIRA, G. V.; ARAÚJO, F. Y. R.; RIOS, E. R. V.; CARVALHO, A. M. R.; VASCONCELOS, L. F.; MACÊDO, D. S.; SOARES, P. M. G.; SOUSA, D. P. (-)- α Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 44, n. 4, p. 455-461, 2011.

RODRIGUES, E. Ethnopharmacology in the Jaú National Park (JNP), state of Amazonas, Brazil. **Phytother Res**, v. 5, p. 378-391, 2006.

ROVER, M. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Siparuna guianensis* Aubl. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Rondônia, p. 138, 2006.

RUIZ, S.; MALAGÓN, O.; ZARAGOZA, T.; VALAREZO, E. Composition of the Essential Oils of *Artemisia sodiroi* Hieron., *Siparuna eggersii* Hieron., *Tagetes filifolia* Lag. and *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 6, p. 676-691, 2010.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. P. C.; MENTZ, L. A.; PETROVIK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora: UFSC, Porto Alegre, p. 403 – 434, 2004.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B. D.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. D. C. L.; DUTRA, R. A. F.; LIMA FILHO, J. L. D. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, C. M. A. D. Metabólitos secundários de plantas do SEMI-ÁRIDO de PERNAMBUCO-uma inovação no controle de FITOPATÓGENOS, 2013.

SILVA, S. L. D.; CHAAR, J. D. S.; FIGUEIREDO, P. D. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Florianópolis: Editora UFRGS, 5 ed., p. 1102, 2004.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

SOUZA, C. D. de; FELFILI, J. M. *Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil*. 2006

SOUZA, F. C. B. Incorporação de *alfa-bisabolol* em membranas de policaprolactona e de quitosana complexada com goma guar. Campinas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, p.123, 2014.

SOUZA, T. M.; MORREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. R. L.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade asséptica do extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (MART) Collive e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.1, p.71-75, 2007.

SUBRAMANIAM, S.; KEERTHIRAJA, M.; SIVASUBRAMANIAN, A. Synergistic antibacterial action of β -sitosterol-D-glucopyranoside isolated from *Desmostachya bipinnata* leaves with antibiotics against common human pathogens. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 44-50, 2014.

TAGHIZADEH, S. F.; DAVARYNEJAD, G.; ASILI, J.; RIAHI-ZANJANI, B.; NEMATI, S. H.; KARIMI, G. Chemical composition, antibacterial, antioxidant and cytotoxic evaluation of the essential oil from pistachio (*Pistacia khinjuk*) hull. **Microbial pathogenesis**, v. 124, p. 76-81, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

TIWARY, B. K.; BIHANI, S.; KUMAR, A.; CHAKRABORTY, R.; GHOSH, R. The in vitro cytotoxic activity of ethno-pharmacological important plants of Darjeeling district of West Bengal against different human cancer cell lines. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 22, 2015.

TORRÊS, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p. 373-380, 2005.

VALADARES, M. C.; DE CASTRO, N. C.; DA CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007.

VALENTINI, C. M. A; RODRIGUES-ORTIZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (*negramina*): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p. 96-104, 2010.

VIANA, F. A.; ANDRADE-NETO, M.; POULIQUEN, Y. B.; UCHOA, D. E.; SOBRAL, M. M. S.; DE MORAIS, S. M. Essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet from the Amazon region of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 1, p. 60-62, 2002.

VIEIRA, R. F.; ALVES, R. B. N. **Desafios para a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas no Brasil**. In: COELHO, MFB;

COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, JLD Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais. Cuiabá: Unicen, p. 121-136, 2003.

VIGNERON, M.; DEPARIS, X.; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.351-60, 2005.

WANG, J.; SOISSON, S. M.; YOUNG, K.; SHOOP, W.; KODALI, S.; GALGOCI, A.; PAINTER, R.; PARTHASARATHY, G.; TANG, Y. S.; CUMMINGS, R.; HA, S.; DORSO, K; MOTYL, M.; JAYASURIYA, H.; ONDEYKA, J.; HERATH, K.; ZHANG, C.; HERNANDEZ, L.; ALLOCCO, J.; BASILIO, A.; TORMO, J. R.; GENILLOUD, O.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; COLWELL, L.; LEE, S. H.; MICHAEL, B.; FELCETTO, T.; GILL, C.; SILVER, L. L.; HERMES, J. D.; BARTIZAL, K.; BARRETT, J.; SCHMATZ, D.; BECKER, J. W.; CULLY, D.; SINGH, S. B. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 358, 2006.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin layer chromatography in phitochemistry. Chromatographic Science Series. v. 99; 2008.

ZAGO, J. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista brasileira de farmacognosia**, p. 828-833, 2009.

ZHANG, J.; HUANG, R. Z.; CAO, H. J.; CHENG, A. W.; JIANG, C. S.; LIAO, Z. X.; LIU, C.; SUN, J. Y. Chemical composition, in vitro anti-tumor activities and related mechanisms of the essential oil from the roots of *Potentilla discolor*. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 19-27, 2018.

ZOGHBI, M. D. G.; ANDRADE, E. H.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H.; MAIA, J. G. S. Essential Oils of *Siparuna guianensis* Aubl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 543-546, 1998.