

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Busca de produtos naturais bioativos em plantas das famílias Myrtaceae (*Siphoneugena densiflora* Berg) e Verbenaceae (*Vitex polygama* Cham.)”

Margareth Borges Coutinho Gallo *

Tese apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial à obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

*Bolsista CAPES/CNPQ

São Carlos – SP

2004

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária/UFSCar

G172bp

Gallo, Margareth Borges Coutinho.
Busca de produtos naturais bioativos em plantas das famílias Myrtaceae (*Siphoneugena densiflora Berg*) e Verbenaceae (*Vitex polygama Cham.*) / Margareth Borges Coutinho Gallo. -- São Carlos : UFSCar, 2005.
419 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Produtos naturais. 2. *Atta sexdens rubropilosa*. 3. Trypanosoma cruzi. 4. GAPDH. 5. APRT. I. Título.

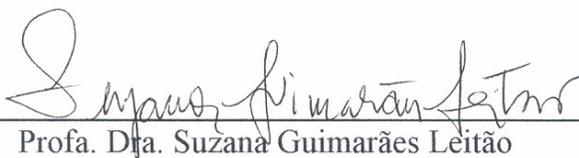
CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

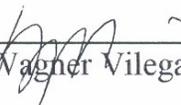
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou o exame de tese de doutorado da candidata **Margareth Borges Coutinho Gallo** realizado em 09 de dezembro de 2004:*



Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira



Profa. Dra. Suzana Guimarães Leitão



Prof. Dr. Wagner Vilegas



Prof. Dr. João Batista Fernandes



Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Ao meu amado Senhor, Salvador e Criador de todas as coisas.

Ao meu querido esposinho Jorge, aos meus filhos Iuri e Irã, a minha
mãezinha Terezinha e a todos os meus familiares.

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei. E ainda que eu distribua todos os meus bens entre os pobres e ainda que entregue o meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará.

O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se ensoberbece, não se conduz inconvenientemente, não procura seus interesses, não se exaspera, não se ressentido do mal; não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais acaba; mas, havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará... Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor”.

Extraído da Bíblia, livro de I Coríntios, capítulo 13, versículos de 1-13.

“Viver, como talvez morrer, é recriar-se: a vida não está aí apenas para ser suportada nem vivida, mas elaborada. Eventualmente reprogramada. Conscientemente executada. Muitas vezes, ousada.

Para viver de verdade, pensando e repensando a existência, para que ela valha a pena, é preciso ser amado; e amar; e amar-se. Ter esperança; qualquer esperança.

Questionar o que nos é imposto, sem rebeldias insensatas mas sem demasiada sensatez. Saborear o bom, mas aqui e ali enfrentar o ruim. Suportar sem submeter-se, aceitar sem se humilhar, entregar-se sem renunciar a si mesmo e à possível dignidade.

Sonhar, porque se desistimos disso, apaga-se a última claridade e nada mais valerá a pena. Escapar, na liberdade do pensamento, desse espírito de manada que trabalha obstinadamente para nos enquadrar, seja lá no que for.

E que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se conseguiu fazer “.

Extraído do livro Pensar é Transgredir, da autora gaúcha Lya Luft.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Paulo Cezar Vieira, que acreditou em mim e disse sim, quando oito professores anteriores haviam me dito não.

Aos professores Arlene Gonçalves Corrêa, João Batista Fernandes, Antônio Gilberto Ferreira, Maria Fátima das Graças F. da Silva, Úrsula Brockson Edson Rodrigues Filho, Quezia B. Cass e demais professores pelas inúmeras horas concedidas ao esclarecimento de dúvidas e ao grande carinho dedicado a mim.

À amiga Ângela Valente pela companhia e troca de idéias durante todos estes anos.

Aos amigos Cléverson Garcia, Patrícia Baraldi, Tatiana Gamboa, Waldirene Rocha, Waldir Tavares, Fernando Cotinguiba e Flávio Beltrame pelas várias contribuições sem as quais este trabalho não seria o mesmo.

Aos colegas do PN, RMN, Inorgânica, Síntese e demais laboratórios do DQ pela prestatividade, companherismo, pelos piqueniques e cafés da manhã, pelas festas juninas e de aniversários, churrascos, congressos e tantas outras confraternizações que nos uniram como uma grande família.

Às secretárias da pós-graduação Ariane, Cristina e Luciana pela alegria e disponibilidade na prestação de serviços.

Aos técnicos Dorai, Luciana e Paulo pela atenção, apoio e serviços prestados.

À Eurides Alves Matheus, minha senhoria e segunda mãe em São Carlos.

Às colegas de pensão Fernanda, Luciana, Flávia, Poliana, Karina, Rafaela, Mariá, Fátima, Viviane e Samira pela amizade e tão profundas e enriquecedoras conversas.

Aos professores, colegas e técnicos do Laboratório de Bioensaios do DQ/UFSCar; do Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física da USP/São Carlos; do Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP Piracicaba; do Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/Ribeirão Preto e do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP/Rio Claro por possibilitarem a realização de todos os bioensaios.

Aos professores Marcos Sobral (UFRGS/UFMG) e Fátima Regina Salimena-Pires (UFJF) pela identificação taxonômica das espécies vegetais.

A ALCOA, na pessoa de seus funcionários Reinaldo dos Santos, Benedito Joaquim da Silva e Charles G. Ferreira, por facilitar o acesso à coleta das plantas.

Abreviaturas e Símbolos

AcOEt	- Acetato de etila
Ace	- Acetona
APTR	- Enzima adenina fosforribosiltransferase
CCDA	- Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	- Cromatografia em camada delgada preparativa
CCV	- Cromatografia em coluna de vidro
CGCC	- Cromatografia de gotas em contra-corrente
CG-EM	- Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	- Cromatografia líquida a vácuo
CRLCC	- Cromatografia de rotação ocular em contra-corrente
COSY-45	- Correlation Spectroscopy
d	- Dupleto
dd	- Dupleto duplo
DEPT135	- Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, com pulso de 135°
Dic	- Diclorometano
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DOSY	- Diffusion Ordered Spectroscopy
dt	- Dupleto triplo
ED ₅₀	- Concentração que produz 50 % da dose efetiva
EM/IE	- Espectroscopia de massas com ionização por impacto eletrônico
EM/ESI	- Espectroscopia de massas com ionização por eletrospray
F.E.	- Fase estacionária
F.M.	- Fase móvel inicial
GAPDH	- Enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
H	- Altura da sílica ou outra fase estacionária usada no interior da coluna
HAc	- Ácido acético
HMBC	- Heteronuclear Multiple Bonding Correlation
HSCCC	- Cromatografia de alta velocidade centrífuga em contra-corrente
HSQC	- Heteronuclear Single Quantum Correlation

Hx	- Hexano
CI ₅₀	- Concentração correspondente a 50 % de inibição
IV	- Infra-vermelho
IR	- Índice de refração
<i>J</i>	- Constante de acoplamento (dada em Hertz)
LD ₅₀	- Concentração correspondente a 50 % do efeito de letalidade
m	- Multiplete
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
MeOH	- Metanol
<i>n</i> -BuOH	- <i>n</i> -butanol
NOEDIFF	- Nuclear Overhauser Difference Spectroscopy
PENDANT	- Polarization Enhancement During Attached Nucleus Testing
ppm	- Partes por milhão
PRPP	- Fosforribosilpirofosfato
QSAR	- Análise quantitativa da relação estrutura-atividade
RDA	- Reação Retro-Diels/Alder
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN 2D	- Ressonância magnética nuclear de duas dimensões
RPM	- Rotação por minuto
s	- Singleto
t	- Tripleto
T.C.	- Tamanho da coluna
TSPA-d ₄	- Sal de sódio do ácido trimetilsililpropiónico deuterado
tl	- Tripleto largo
U.R.	- Umidade Relativa
UV	- Ultravioleta
Φ	- Diâmetro da coluna
δ	- Deslocamento químico em partes por milhão
λ	- Comprimento de ondas

Lista de Tabelas

Tabela 1-1- Substâncias isoladas anteriormente de <i>V. polygama</i>	12
Tabela 4-1- Extratos brutos de <i>V. polygama</i>	52
Tabela 4-2- Resultados da partição líquido/líquido do extrato hidrometanólico de frutos	54
Tabela 4-3- Resultados da partição líquido/líquido do extrato hexânico de folhas	54
Tabela 4-4- Resultados da partição líquido/líquido do extrato hidrometanólico de folhas	55
Tabela 4-5- Resultados da partição líquido-líquido do extrato metanólico de galhos	56
Tabela 4-6- Resultados da partição líquido-líquido do extrato metanólico de folhas	56
Tabela 5-1- Dados dos espectros de absorção ultra-violeta das Substâncias VI e IX	71
Tabela 5-2- Dados dos espectros de massas, ESI modo negativo, das Substâncias I a IX	71
Tabela 5-3- Dados dos espectros de RMN ^1H das Substâncias I a IX ^a	72
Tabela 5-4- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, acetona- d_6) da Substância III e da 3'- <i>O</i> -metil luteolina	76
Tabela 5-5- Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância IX e da 3- <i>O</i> -metilquercetina	83
Tabela 5-6- Dados do espectro de RMN de ^1H (<i>J</i> em Hz, 400 MHz, acetona- d_6) das Substâncias XI e XII ...	86
Tabela 5-7- Dados dos espectros de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) das Substâncias XIII e XIV, schaftosídeo e isoschaftosídeo	90

Tabela 5-8- Dados das projeções dos C dos espectros de RMN $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$ HMBC e HSQC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV + XVI e carlinosídeo e isocarlinosídeo	98
Tabela 5-9- Dados do espectro de RMN ^1H da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII em vários solventes deuterados ^a	110
Tabela 5-10- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII, da 3'-O-metil luteolina (1), 3-O- β -D-glucopiranosilquercetina (2) e 4'-O- β -D-glucopiranosilquercetina (3).....	111
Tabela 5-11- Dados do espectro de RMN ^1H /HMBC da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII.....	112
Tabela 5-12- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI e do ácido vanílico.....	119
Tabela 5-13- Dados dos espectros de RMN de ^1H , de RMN ^{13}C , Correlações homonuclear (^1H - ^1H) e heteronuclear (^1H - ^{13}C) da mistura das Substâncias XXIV e XXV	127
Tabela 5-14- Dados do espectro de RMN de ^{13}C das Substâncias XXVII (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e XLVIII (50 MHz, CDCl_3); do 3-O- β -D-glucopiranosilsterol (TANDOM et al., 1990) e do sitosterol (FURUYA et al., 1987)	136
Tabela 5-15- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT da Substância XXVIII (50 MHz, CDCl_3) e do éster metílico do ácido 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico	140
Tabela 5-16- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI e do 2 α ,3 β -diidroxiolean-12-en-28-ato de metila e maslinato de metila.....	145
Tabela 5-17- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXVIII e XXIX e do 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-ato de metila	150
Tabela 5-18- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII e do 2 α ,3 α ,19 α -triidroxiolean-12-enato de β -D-glucopiranosila	154
Tabela 5-19- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV e do RMN de ^{13}C dos ácidos ursólico e oleanólico.....	160
Tabela 5-20- Dados do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV e da 20-hidroxiecdisona	166
Tabela 5-21- Dados do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, <i>J</i> em Hz) da Substância XXXV e da 20-hidroxiecdisona	167
Tabela 5-22- Dados do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVI e da polipodina B	173
Tabela 5-23- Dados do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII e da stachysterona B.....	177
Tabela 5-24- Dados do espectro de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII e da 20-hidroxiecdisona	178
Tabela 5-25- Dados do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII e da shidasterona	183
Tabela 6-1- Extratos brutos de <i>S. densiflora</i>	190

Tabela 6-2- Resultados da partição líquido/líquido do extrato metanólico do caule	191
Tabela 6-3- Resultados da partição líquido/líquido do extrato metanólico da casca da raiz.....	194
Tabela 6-4- Resultado da partição líquido/líquido do extrato metanólico de folhas	198
Tabela 7-1- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da Substância XL e da 3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosilquercetina.....	205
Tabela 7-2- Dados do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII e de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) dos grupos α -L-arabinopiranosila e β -D-xilopiranosila ^a	211
Tabela 7-3- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII e da 3- <i>O</i> - β -D-xilopiranosilquercetina e 3- <i>O</i> - β -D-arabinopiranosilquercetina	212
Tabela 7-4- Dados dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT135 (400 e 50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII (P), do ácido 2 α ,3 β ,6 β -triidroxiolean-12-en-28-óico (Q) e 2 α ,3 β ,19 α -triidroxiolean-12-en-24-óico-28-oato de β -D-glucopiranosila (R)	217
Tabela 7-5- Dados dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV e do ácido arjunólico	224
Tabela 7-6- Dados do espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII; do lupeol, α -amirina e β -amirina	230
Tabela 7-7- Dados de deslocamentos de RMN ^{13}C , ^1H e J para o pirrol, furano e respectivos 2-carboxaldeídos ^a	244
Tabela 7-8- Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), ^1H (400 MHz, acetona- d_6) e $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LV	247
Tabela 7-9- Dados dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT135 (50 MHz) das Substâncias LVI e LVII e da casuarinina e stachyurina	252
Tabela 7-10- Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz, δ em ppm e J em Hertz) das Substâncias LVI e LVII e da casuarinina e stachyurina.....	253
Tabela 7-11- Dados dos espectros de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) e HSQC (400 MHz, acetona- d_6 / D_2O) da mistura das Substâncias LVI e LVII.....	258
Tabela 7-12- Dados dos espectros de RMN ^1H e RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias LVIII e LXVIII e da castalagina e vescalagina.....	269
Tabela 7-13- Dados dos espectros de RMN ^{13}C e ^1H (50 e 400 MHz) da Substância LVIII	270
Tabela 7-14- Dados do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , J em Hz) da Substância LX, do eschweilenol C e do 3'- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo do ácido elágico	276
Tabela 7-15- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) da Substância LX, do eschweilenol C e do 3'- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo do ácido 3- <i>O</i> -metilelágico.....	277
Tabela 7-16- Dados do espectro de RMN de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD , J em Hz) da Substância LX, do eschweilenol C e do 3'- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo do ácido elágico	278

Tabela 7-17- Dados dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII, da Substância LX pura e dos 3'- <i>O</i> - α -L-2''; 3'' e 4''- <i>O</i> -acetilramnopiranosídeos do ácido 3- <i>O</i> -metilelágico	283
Tabela 7-18- Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII e dos 3'- <i>O</i> - α -L-2''; 3'' e 4''- <i>O</i> -acetilramnopiranosídeos do ácido 3- <i>O</i> -metilelágico	284
Tabela 7-19- Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV; do eschweilenol B (M; 400 e 100 MHz, $\text{DMSO}-\text{d}_6$) e penta- <i>O</i> -metil-eschweilenol B (Q; CD_3COD).....	291
Tabela 7-20- Dados do espectro de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV.....	292
Tabela 7-21- Dados dos espectros de RMN ^{13}C e ^1H (50 e 200 MHz, acetona- d_6) da Substância LXV e da β -pedunculagina ^a	300
Tabela 7-22- Dados dos espectros de RMN ^{13}C , DEPT135, ^1H , NOEDIFF, $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC e HMBC (50 e 400 MHz, piridina- d_5) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII	306
Tabela 7-23- Dados dos espectros de RMN ^{13}C da Substância LXVII (50 MHz, piridina- d_5), do ácido β -D-glucopiranoúrico e da γ -lactona do ácido β -D-glucofuranúrico	307
Tabela 8-1- Condições empregadas na CLAE para análise qualitativa dos padrões benzamida, acetofenona e benzofenona na coluna analítica recém empacotada	323
Tabela 8-2- Condições empregadas na CLAE para análise quantitativa da 20E presente no extrato metanólico de galhos de <i>V. polygama</i>	324
Tabela 8-3- Condições empregadas na CLAE para análise qualitativa da 20E presente na solução metanólica originada do pré-tratamento do extrato metanólico de galhos de <i>V. polygama</i> em cartucho C-18	325
Tabela 8-4- Dados da precisão e exatidão da quantificação da 20-hidroxiecdisona, inter-dia (n = 5).....	333
Tabela 9-1- Atividade inibitória enzimática de substâncias originadas da fração DMF de <i>V. polygama</i> sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $\text{CI}_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT	361
Tabela 9-2- Atividade inibitória enzimática de substâncias originadas da fração DMF e do extrato MVG de <i>V. polygama</i> sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $\text{CI}_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT	362
Tabela 9-3- Atividade inibitória enzimática de substâncias originadas da fração BHMVF de <i>V. polygama</i> sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $\text{CI}_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT	365
Tabela 9-4- Atividade inibitória enzimática de substâncias isoladas de <i>S. densiflora</i> sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $\text{CI}_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT	369
Tabela 9-5- Atividade dos extratos (4 mg/mL) de <i>V. polygama</i> sobre o <i>T. cruzi</i>	380
Tabela 9-6- Atividade das frações (4 mg/mL) de <i>V. polygama</i> sobre o <i>T. cruzi</i>	381
Tabela 9-7- Atividade de substâncias isoladas de <i>V. polygama</i> sobre <i>T. cruzi</i> (controle positivo violeta genciana, $\text{CI}_{50} = 31 \mu\text{g/mL}$ ou $76 \mu\text{M}$).....	382
Tabela 9-8- Atividade de substâncias isoladas de <i>S. densiflora</i> sobre <i>T. cruzi</i> (controle positivo violeta genciana, $\text{IC}_{50} = 31 \mu\text{g/mL}$ ou $76 \mu\text{M}$).....	383
Tabela 9-9- Atividade de extratos (4 mg/mL) de <i>S. densiflora</i> sobre <i>T. cruzi</i>	384
Tabela 9-10- Atividade de substâncias de <i>S. densiflora</i> e <i>V. polygama</i> sobre o crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i>	385

Tabela 9-11- Diâmetro dos halos (mm) de inibição dos microrganismos em presença dos extratos hidrometanólicos de <i>S. densiflora</i>	387
Tabela 9-12- Determinação da MIC ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hidrometanólicos de <i>S. densiflora</i> sobre alguns microrganismos.....	388
Tabela 9-13- Atividade de extratos e substâncias de <i>S. densiflora</i> e <i>V. polygama</i> sobre a enzima pectinase	391
Tabela 9-14- Atividade dos taninos sobre as enzimas GAPDH (controle positivo, chalepina $\text{CI}_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT	392

Lista de Figuras

Figura 1-1- Todas as novas entidades químicas organizadas por fonte/ano desde 1981 a 2002 (NEWMAN et al., 2003)	3
Figura 1-2 - <i>Vitex polygama</i> Cham.	10
Figura 1-3- Desenho de <i>Vitex polygama</i> Cham. (desenho de Suzana G. Leitão)	11
Figura 1-4- <i>Siphoneugena densiflora</i> var. <i>densiflora</i>	14
Figura 1-5- Estruturas químicas de compostos utilizados no tratamento químico e profilaxia da Doença de Chagas.....	18
Figura 1-6- Produtos naturais com atividade tripanocida	21
Figura 1-7- Estrutura tridimensional da enzima gGAPDH (SOUZA et al., 1998)	24
Figura 1-8- Estruturas químicas dos compostos empregados no tratamento de Leishmaníases	30
Figura 1-9- Produtos naturais com atividade leishmanicida	34
Figura 1-10- Produtos naturais com atividade inseticida.....	40
Figura 4-1- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias VI e VIII	61

Figura 5-1- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância I.....	73
Figura 5-2- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6), da Substância I.....	73
Figura 5-3- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância II e VI em mistura	74
Figura 5-4- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância II.....	74
Figura 5-5- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância III.....	75
Figura 5-6- Espectro de RMN de NOEDIFF (400 MHz, acetona- d_6 , irradiação OMe em δ 4,00) da Substância III	75
Figura 5-7- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da Substância III	77
Figura 5-8- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância III.....	78
Figura 5-9- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância V	79
Figura 5-10- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância VI	79
Figura 5-11- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância VI	80
Figura 5-12- Espectro de RMN de NOEDIFF (400 MHz, acetona- d_6 , irradiação da OMe em δ 4,00) da Substância VI.....	80
Figura 5-13- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância VII	81
Figura 5-14- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância VII	81
Figura 5-15- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância VIII	82
Figura 5-16- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância VIII	82
Figura 5-17- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância IX	83
Figura 5-19- Espectro de massas (ESI, modo negativo) das Substâncias XI e XII	86
Figura 5-20- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) das Substâncias XI e XII	87
Figura 5-21- Espectro de massas (ESI, modo negativo) das Substâncias XIII e XIV.....	91
Figura 5-22- Espectro de massas (ESI, modo positivo) das Substâncias XIII e XIV	91
Figura 5-23- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XIII e XIV	92
Figura 5-24- Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) das Substâncias XIII e XIV	93
Figura 5-25- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CD_3OD) Substâncias XIII e XIV	93
Figura 5-26- CCDA das Flavonas Glicosiladas	94
Figura 5-27- Espectro de ^1H \times ^{13}C HSQC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XIII e XIV	94
Figura 5-28- Espectros de massas das Substâncias XV e XVI.....	99

Figura 5-29- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI.....	100
Figura 5-30- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{acetona-}d_6$) das Substâncias XV e XVI.....	101
Figura 5-31- Espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI.....	102
Figura 5-32- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI	102
Figura 5-33- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI.....	103
Figura 5-34- Espectro de massas (ESI, modo negativo, pré-coluna G-ODS) da mistura das Substâncias XVII e XVIII e Substâncias III e VIII	107
Figura 5-35- Espectro de massas (ESI, modo negativo, 9,7 eV) da mistura das Substâncias XVII e XVIII	107
Figura 5-36- Espectro de massas (ESI, modo negativo, 30,0 eV) da mistura das Substâncias XVII e XVIII	108
Figura 5-37- Espectro de massas da mistura das Substâncias XVII e XVIII.....	108
Figura 5-38- Espectro de massas (ESI, modo negativo, 25 eV) da mistura das Substâncias XVII e XVIII	109
Figura 5-39- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII.....	113
Figura 5-40- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da mistura de Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII.....	113
Figura 5-41- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII.....	114
Figura 5-42- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII.....	114
Figura 5-43- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, A: $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; B: CD_3OD) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII.....	115
Figura 5-44- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII.....	116
Figura 5-45- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI	119
Figura 5-46- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XIX	120
Figura 5-47- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI.....	120
Figura 5-48- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI	121
Figura 5-49- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância XX	121
Figura 5-50- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância XIX	122
Figura 5-51- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXII e XXIII.....	124

Figura 5-52- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XXII e XXIII	124
Figura 5-53- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XXIV e XXV	128
Figura 5-54- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XXIV e XXV	129
Figura 5-55- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XXIV e XXV	129
Figura 5-56- Espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XXIV e XXV	130
Figura 5-57- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXIV e XXV.....	130
Figura 5-58- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, D_2O) da Substância XXVI.....	133
Figura 5-59- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XXVI.....	133
Figura 5-60- Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, D_2O) da Substância XXVI.....	134
Figura 5-61- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXVII.....	137
Figura 5-62- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXVII.....	137
Figura 5-64- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XXVIII.....	141
Figura 5-65- Espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (200 MHz, CDCl_3) da Substância XXVIII.....	141
Figura 5-66- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XXVIII.....	142
Figura 5-67- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXX e XXXI.....	146
Figura 5-68- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI.....	146
Figura 5-69- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI ..	147
Figura 5-70- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI.....	147
Figura 5-71- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXVIII e XXIX.....	151
Figura 5-72- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXVIII e XXIX.....	151
Figura 5-73- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXX e XXXII.....	153
Figura 5-74- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII.....	155
Figura 5-75- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII.....	156
Figura 5-76- Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII.....	156
Figura 5-77- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII.....	157
Figura 5-78- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII.....	157

Figura 5-79- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV .	161
Figura 5-80- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV	161
Figura 5-81- Espectro ampliado de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV	162
Figura 5-82- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV..	163
Figura 5-83- Espectro de massas (ESI, modo positivo) da Substância XXXV.....	167
Figura 5-84- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XXXV	168
Figura 5-85- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV.....	168
Figura 5-86- Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV	169
Figura 5-87- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV	169
Figura 5-88- Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV	170
Figura 5-89- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVI.....	174
Figura 5-90- Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVI	174
Figura 5-91- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, com supressão do sinal da água em 4,9 ppm) da Substância XXXVI.....	175
Figura 5-92- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII	179
Figura 5-93- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII.....	180
Figura 5-94- Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII.....	180
Figura 5-95- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII	184
Figura 5-96- Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII	185
Figura 5-97- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII.....	185
Figura 5-98- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII.....	186
Figura 5-99- Espectro de ^1H ^{13}C HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII.....	187
Figura 5-100- Espectro de ^1H ^{13}C HMBC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII.....	188
Figura 7-1- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância XXXIX	203
Figura 7-2- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da Substância XL.....	206
Figura 7-3- Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, CD_3OD) da Substância XL.....	206
Figura 7-4- Espectro de ^1H ^{13}C HMBC (400 MHz, CD_3OD) da Substância XL	207
Figura 7-5- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XL	207

Figura 7-6- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da Substância XL.....	208
Figura 7-7- Espectro de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII	210
Figura 7-8- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII	213
Figura 7-9- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII	213
Figura 7-10- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XLI e XLII	214
Figura 7-11- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII.....	214
Figura 7-12- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII	218
Figura 7-13- Espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII	219
Figura 7-14- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII.....	219
Figura 7-15- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII	220
Figura 7-16- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XLIII	220
Figura 7-17- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII.....	221
Figura 7-18- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII	221
Figura 7-19- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV.....	223
Figura 7-20- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XLIV.....	225
Figura 7-21- Espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV.....	225
Figura 7-22- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV.....	226
Figura 7-23- Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135^\circ$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV	226
Figura 7-24- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância XLIV.....	227
Figura 7-25- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII...	229
Figura 7-26- Cromatograma da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII	231
Figura 7-27- Espectro de massas, CG/EM-IE, da Substância XLVII.....	231
Figura 7-28- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII ..	232
Figura 7-29- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XLVIII	233
Figura 7-30- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância XIX.....	234
Figura 7-31- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância XLIX	235
Figura 7-32- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância L	236
Figura 7-33- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LI	237

Figura 7-34- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LII.....	239
Figura 7-35- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da Substância LII	239
Figura 7-36- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias LIII e LIV.....	241
Figura 7-37- Reação de degradação ácida de pentoses (MORRISON & BOYD, 1972)	243
Figura 7-38- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância LV.....	245
Figura 7-39- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LV	245
Figura 7-40- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LV	246
Figura 7-41- Espectro de massas, EM/CG-IE, da Substância LV	247
Figura 7-42- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância LV.....	248
Figura 7-43- Espectro de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LV	248
Figura 7-44- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, CD_3OD) da Substância LVII.....	254
Figura 7-45- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVI e LVII	254
Figura 7-46- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVI e LVII.....	255
Figura 7-47- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$) da mistura das Substâncias LVI e LVII	256
Figura 7-48- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$) da Substância LVI.....	257
Figura 7-49- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da Substância LVII	258
Figura 7-50- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LVI e LVII.....	259
Figura 7-51- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, acetona- d_6) da Substância LVI	259
Figura 7-52- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$) da mistura das Substâncias LVI e LVII.....	260
Figura 7-53- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{D}_2\text{O}$) da Substância LVIII	265
Figura 7-54- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVIII e LXVIII ...	266
Figura 7-55- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVIII e LXVIII	267
Figura 7-56- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) da Substância LVIII	267
Figura 7-57- Espectro RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVIII e LXVIII	268
Figura 7-58- Espectro RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{D}_2\text{O}$) da Substância LVIII.....	268
Figura 7-59- Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da Substância LVIII	269

Figura 7-60- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LVIII (A) e da Substância LVI (B)	271
Figura 7-61- Espectro de massas, ESI modo positivo, da mistura das Substâncias LVIII e LIX	272
Figura 7-62- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LVIII, LXVIII e LIX	272
Figura 7-63- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LVIII e LIX	273
Figura 7-64- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LX	278
Figura 7-65- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da Substância LX	279
Figura 7-66- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O , TSPA- d_4 padrão interno) da Substância LX	280
Figura 7-67- Espectro de RMN de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da Substância LX	280
Figura 7-68- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII	285
Figura 7-69- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII	285
Figura 7-70- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII	286
Figura 7-71- Espectro de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII	287
Figura 7-72- Espectro de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII	287
Figura 7-73- syzyginina B; Substância LXIV; eschweilenol B e seu derivado metilado	290
Figura 7-74- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LXIV	292
Figura 7-75- Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV	293
Figura 7-77- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV	294
Figura 7-78- Espectro de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV	295
Figura 7-79- Espectro de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV	296
Figura 7-80- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) da Substância LXV	299
Figura 7-81- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância LXV	299
Figura 7-82- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, piridina- d_5) da Substância LXVI	302
Figura 7-83- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da Substância LXVI	302
Figura 7-84- Espectros de massas, ESI modo negativo (A) e positivo (B), da Substância LXVI	303
Figura 7-85- Modelos usados para a identificação da Substância LXVII	307
Figura 7-86- Espectro de massas, ESI modo positivo, da mistura das Substâncias LXVI e LXVII	308

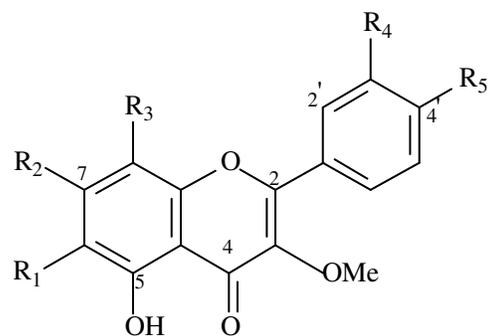
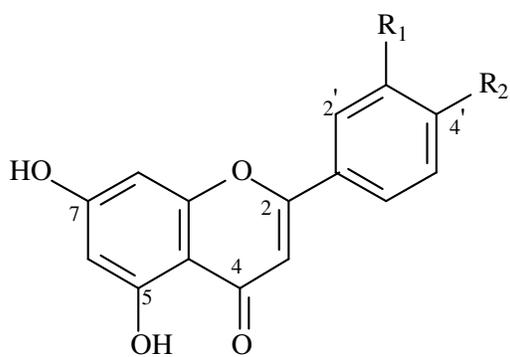
Figura 7-87- Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, piridina-d ₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII	308
Figura 7-88- Espectro de RMN ¹³ C/DEPT 135 (50 MHz, piridina-d ₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII	309
Figura 7-89- Espectro de RMN ¹ Hx ¹³ C HMBC (400 MHz, piridina-d ₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII	309
Figura 7-90- Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, piridina-d ₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII.....	310
Figura 7-91- Espectro de RMN ¹ Hx ¹³ C HSQC (400 MHz, piridina-d ₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII	311
Figura 7-92- Espectro de NOEDIFF (400MHz, piridina-d ₅), irradiação em δ 5,02, da mistura das Substâncias LXVI e LXVII.....	311
Figura 7-93- Espectro de NOEDIFF (400MHz, piridina-d ₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII ...	312
Figura 7-94- Espectro de NOE (400MHz, piridina-d ₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII	313
Figura 8-1- Estrutura geral dos ecdisteróides.....	316
Figura 8-2- Cromatograma da mistura de padrões	329
Figura 8-3- Cromatograma do extrato metanólico de galhos de <i>V. polygama</i>	330
Figura 8-4- Cromatograma da análise da 20-hidroxiecdisona no extrato metanólico de galhos de <i>V. polygama</i> : (azul) extrato; (verde) extrato pré-tratado em cartucho C-18; (rosa) padrão	331
Figura 9-1- Lagartas de <i>S. frugiperda</i> dentro do tubo de vidro contendo dieta artificial (A); recém eclodidas na placa de Petri (B) e na forma adulta, mariposa (C).....	344
Figura 9-2- Teste preliminar dos extratos com lagartas de <i>S. frugiperda</i> (foto menor/autora) nos tubos de vidro, mantidas sob condições controladas (foto maior/ Waldir T. de Lima).....	346
Figura 9-3- Aplicação da dieta em placa ELISA (foto maior) e inoculação das lagartas (1 ^a instar; foto menor) de <i>S. frugiperda</i> para o ensaio com substâncias puras.....	346
Figura 9-4- Material para o ensaio bioquímico com as pectinases	351
Figura 9-5- Placa contendo resultado da determinação da MIC pelo método do TTC	357
Figura 9-6- Atividade inibitória enzimática de extratos e frações de <i>V. polygama</i> sobre a GAPDH	359
Figura 9-7- Gráfico da curva dose resposta para a determinação da CI ₅₀ da 3-O-metil quercetina sobre a GAPDH	363
Figura 9-8- Atividade inibitória enzimática de extratos de <i>V. polygama</i> sobre a APRT	364
Figura 9-9- Atividade inibitória enzimática de extratos de <i>S. densiflora</i> sobre a GAPDH	366
Figura 9-10- Gráfico da curva dose-resposta para a determinação da CI ₅₀ da quercetina sobre a GAPDH	368
Figura 9-11- Gráfico da curva dose-resposta para a determinação da CI ₅₀ do ácido elágico sobre a GAPDH	368

Figura 9-12- Atividade inibitória enzimática de extratos de <i>S. densiflora</i> sobre a APRT	370
Figura 9-13- Atividade dos extratos (adição à dieta) de <i>S. densiflora</i> sobre <i>S. frugiperda</i>	371
Figura 9-14- % de mortalidade, ao 10 ^o dia, de lagartas (1 ^o instar) de <i>S. frugiperda</i> alimentadas em dieta contaminada superficialmente com taninos.....	372
Figura 9-15- % de mortalidade, ao 10 ^o dia, das lagartas (2 ^o instar) de <i>S. frugiperda</i> alimentadas em dieta contaminada superficialmente com extratos hidrometanólicos de <i>S. densiflora</i> a 5 % (equivalente a 1000 ppm no ensaio do tubo)	374
Figura 9-16- Média das massas (mg), ao 10 ^o dia, das lagartas (2 ^o instar) de <i>S. frugiperda</i> alimentadas em dieta contaminada superficialmente com extratos de <i>S. densiflora</i> a 5 % (equivalente a 1000 ppm no ensaio do tubo)	375
Figura 9-17- Atividade dos extratos (adição à dieta) e partições de <i>V. polygama</i> sobre <i>S. frugiperda</i> ...	377
Figura 9-18- Método de difusão em ágar com discos de papel de filtro contaminados com extratos de <i>S. densiflora</i> para determinação de atividade antimicrobiana sobre <i>S. aureus</i> e <i>M. roseus</i>	388
Figura 9-19- Método de difusão em ágar com discos de papel de filtro contaminados com extratos de <i>S. densiflora</i> para determinação de atividade antimicrobiana sobre <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	389
Figura 9-20- Método de difusão em ágar com discos de papel de filtro contaminados com extratos de <i>S. densiflora</i> para determinação de atividade antimicrobiana sobre <i>T. cutaneum</i> e <i>B. cereus</i>	389
Figura 9-21- Espectro de absorção do NADH, castalagina, casuarinina e 4- <i>O</i> - α -L-raminopiranosídeo do ácido elágico.....	393

Lista de Esquemas

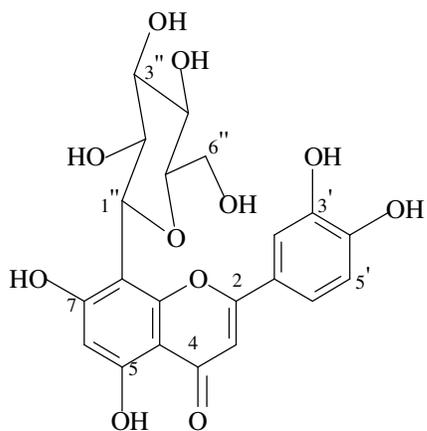
Esquema 1-1- Esquema da glicólise ocorrida no glicossomo do <i>T. cruzi</i>	25
Esquema 1-2- Vias metabólicas para a síntese de purino-nucleotídeos	32
Esquema 5-1- Proposta de fragmentação da Substância XVIII	106
Esquema 5-2- Reações de formação do ácido metacrílico (KITAGAWA, 1984)	132
Esquema 7-1- Proposta de reação ocorrida com a Substância LVI para troca de configuração do centro anomérico	260
Esquema 7-2- Proposta de formação dos adutos de massa 964 e 996 a partir da Substância LVIII.....	264
Esquema 7-3- Proposta de formação da Substância LIX, artefato, a partir da Substância LVIII.....	274
Esquema 7-4- Proposta de formação biossintética da Substância LXIV	297
Esquema 7-5- Reação de equilíbrio da γ -lactona e do seu ácido correspondente, o ácido 3,4,5,6-tetraidroxihexanóico.....	305
Esquema 9-1- Reação de oxirredução (HOSTETTLER et al., 1951) ocorrida no ensaio bioquímico de determinação da inibição de atividade das pectinases fúngicas.....	350

Lista de Substâncias Identificadas de *Vitex polygama* Cham.

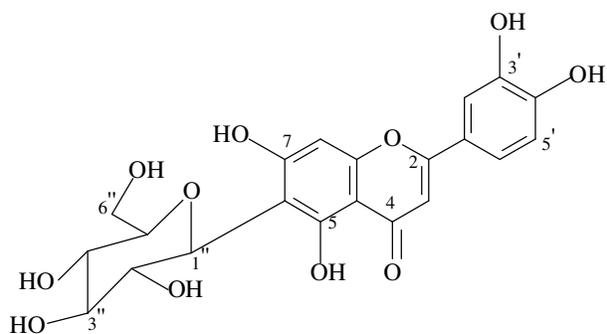


	R ₁	R ₂
Substância III (crisoeriol)	OMe	OH
Substância IV (acacetina)	H	OMe
Substância VII (luteolina)	OH	OH

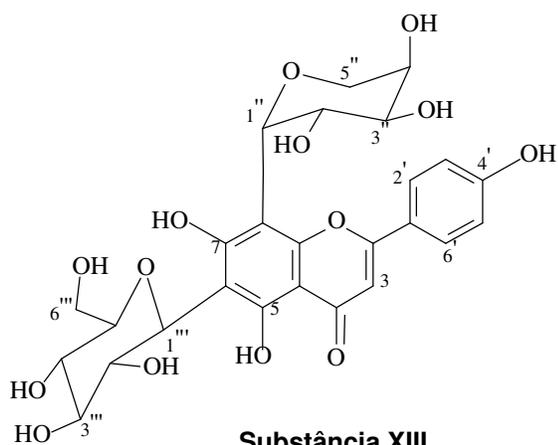
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Substância I (4'-metoxipenduletina)	OMe	OMe	H	H	OMe
Substância II (5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona)	H	OMe	H	H	OMe
Substância V (3-metoxikaempferol)	H	OH	H	H	OH
Substância VI (casticina)	OMe	OMe	H	OH	OMe
Substância VIII	H	OH	H	OMe	OH



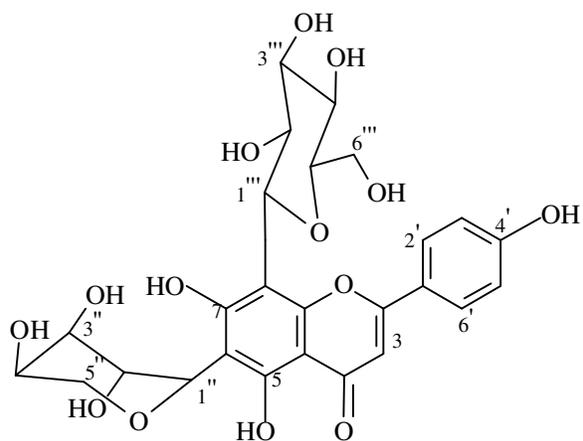
Substância XI
orientina



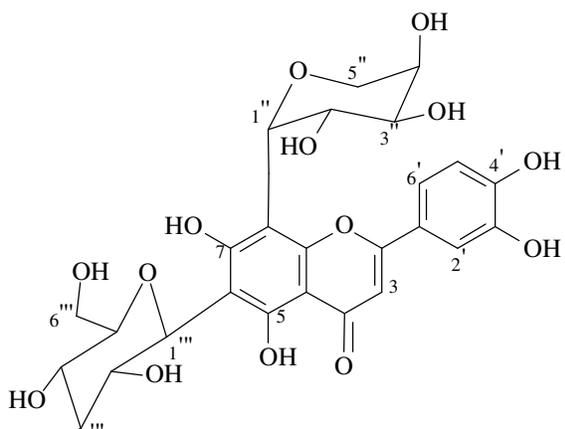
Substância XII
isoorientina



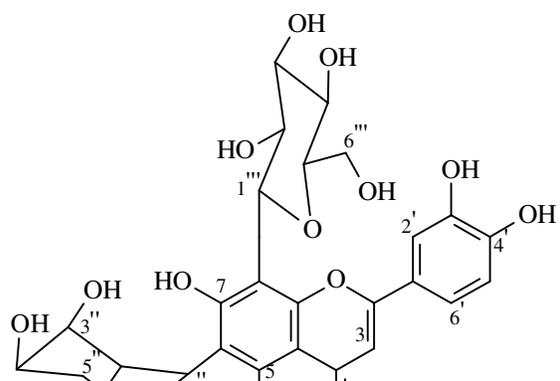
Substância XIII
schaftosídeo



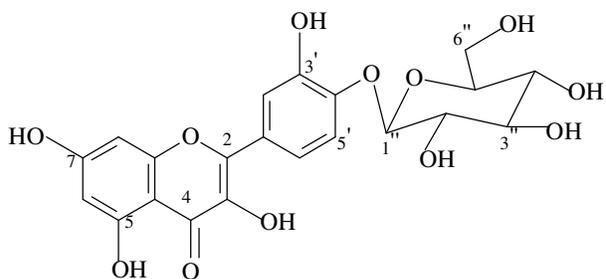
Substância XIV
isoschaftosídeo



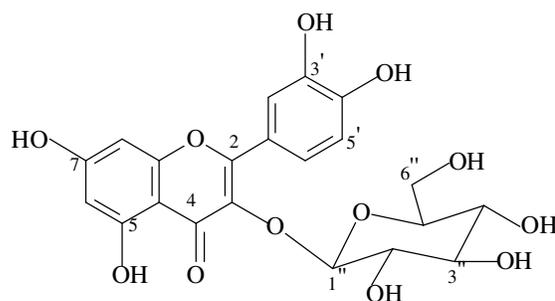
xxvi



Substância XV
carlinosídeo

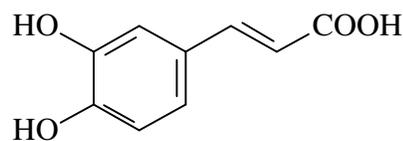
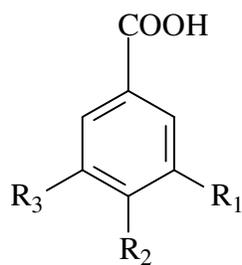


Substância XVI
isocarlinosídeo



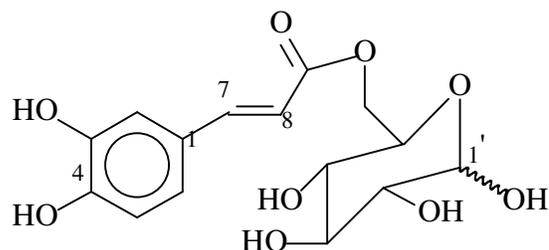
Substância XVII
4'-O-β-D-glucopiranosilquercetina

Substância XVIII
3-O-β-D-glucopiranosilquercetina

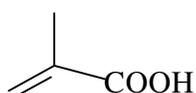


Substância XXII
ácido cafeico

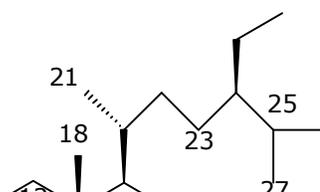
	R ₁	R ₂	R ₃
Substância XIX (ácido vanílico)	OMe	OH	H
Substância XX (ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico)	H	OH	H
Substância XXI (ácido 5-hidroxivanílico)	OMe	OH	OH
Substância XXIII (ácido protocatéquico)	OH	OH	H



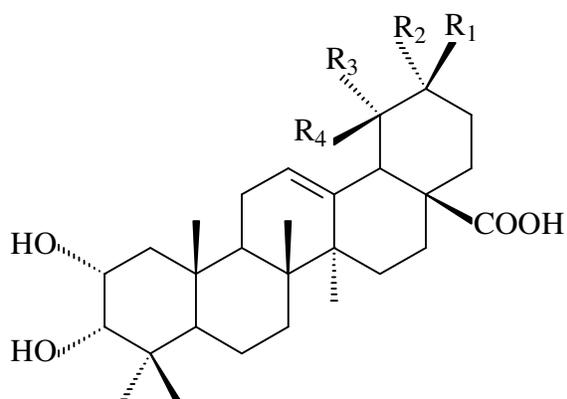
Substância XXIV e XXV
6'-O-cafeoil-β e α-D-glucopiranosídeo



xxvii



Substância XXVI
ácido metacrílico



Substância XXVII
3-O-β-D-glucopiranosilsterol
ou daucosterol

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
----------------	----------------	----------------	----------------

Me	Me	H	H
----	----	---	---

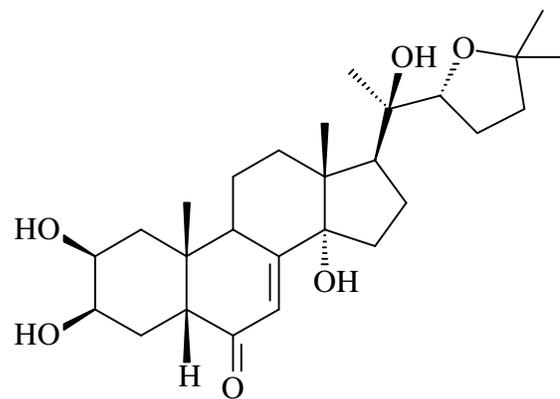
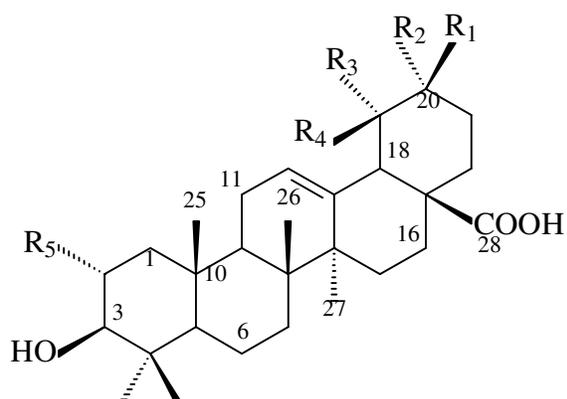
Substância XXVIII

(ácido 2α,3α-dihidroiolean-12-en-28-óico)

Substância XXIX

H	Me	H	Me
---	----	---	----

(ácido 2α,3α-dihidroxiurs-12-en-28-óico)



Substância XXXVIII
shidasterona

Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Substância XXX	Me	Me	H	H	OH

(ácido 2α,3β-dihidroiolean-12-en-28-óico)

Substância XXXI	H	Me	H	Me	OH
------------------------	---	----	---	----	----

(ácido 2α,3β-dihidroxiurs-12-en-28-óico)

Substância XXXII	H	Me	OH	Me	OH
-------------------------	---	----	----	----	----

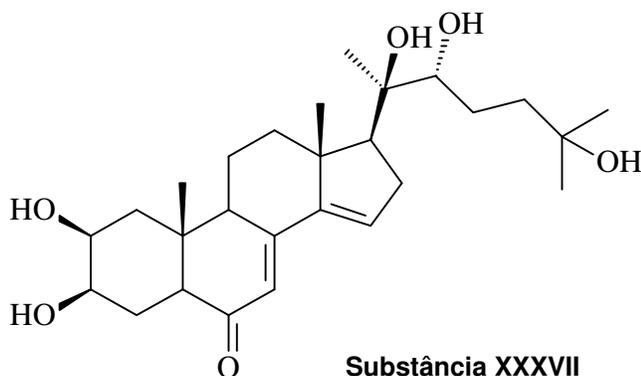
(ácido 2α,3α,19α-triidroxiurs-12-en-28-óico)

Substância XXXIII	H	Me	H	Me	H
--------------------------	---	----	---	----	---

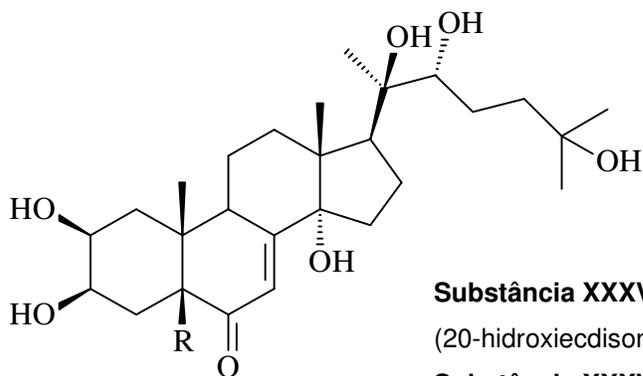
(ácido ursólico)

Substância XXXIV	Me	Me	H	H	H
-------------------------	----	----	---	---	---

(ácido oleanólico)



Substância XXXVII
stachysterona B



Substância XXXV
(20-hidroxiiecdisona ou polipodina A)

Substância XXXVI

(polipodina B)

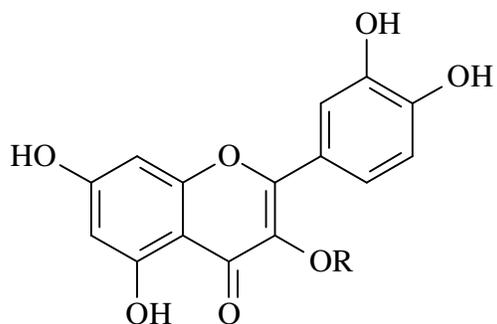
R

H

OH

Lista de Substâncias Id

siflora Berg



Substância XXXIX

(quercetina)

Substância XL

(quercitrina)

Substância XLI

(3-O-β-D-xilopiranosilquercetina)

Substância XLII

(3-O-α-L-arabinopiranosilquercetina)

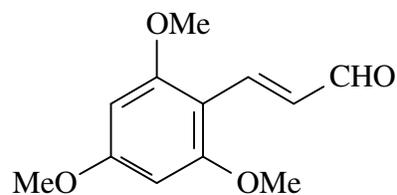
R

H

α-L-ramnopiranosila

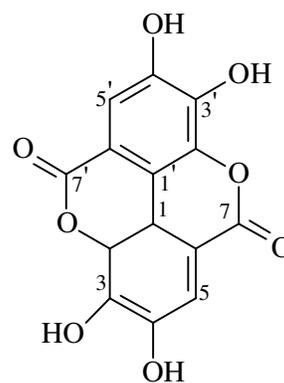
β-D-xilopiranosila

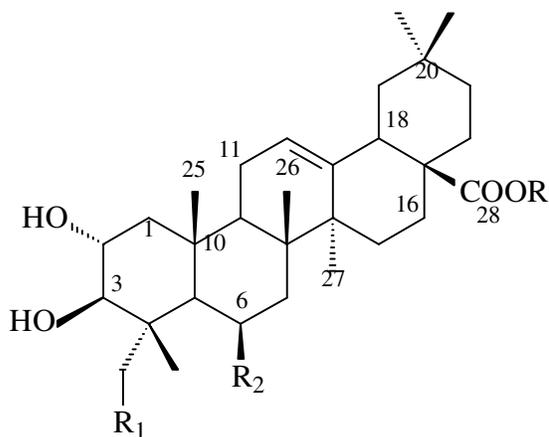
α-L-arabinopiranosila



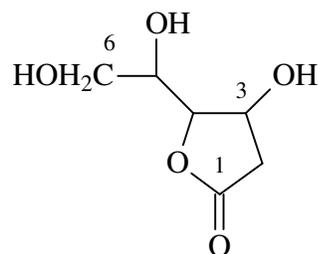
Substância LIV

trans-2,4,6-trimetoxifenilpropanaldeído





Substância LI
ácido elágico



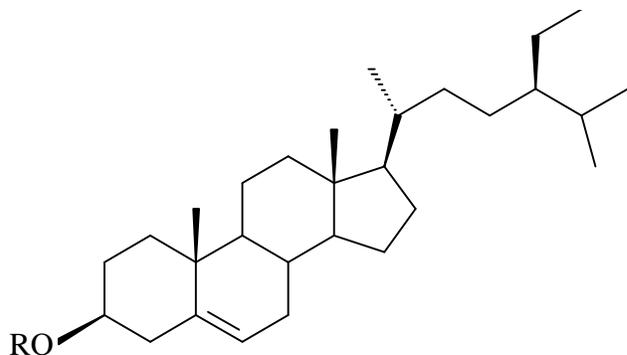
Substância LXVII
 γ -lactona do ácido 3,4,5,6-tetraidroxihexanóico

	R ₁	R ₂	R
Substância XLIV	OH	H	H

(ácido arjunólico)

Substância XLIII	H	OH	β -D-glucopiranosila
-------------------------	---	----	----------------------------

(6 β -hidroximaslinato de β -D-glucopiranosila) **inédita**

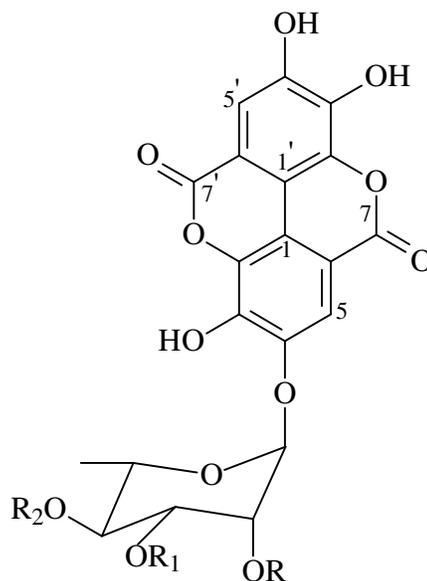


Substância XLVIII	R
	H

(sitosterol)

Substância XXVII	β -D-glucopiranosila
-------------------------	----------------------------

(3-O- β -D-glucopiranosilsitosterol)



Substância LX

R = R₁ = R₂ = OH 4-O- α -L-ramnopiranosídeo do ácido elágico

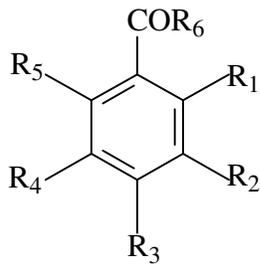
Substância LXI

R = OAC; R₁ = R₂ = OH 4-O- α -L-2''-O-acetilramnopiranosídeo do ácido elágico- **inédita**

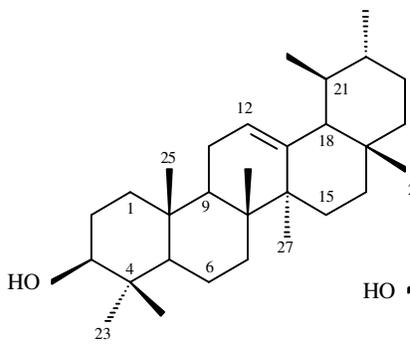
Substância LXII

R = R₂ = OH; R₁ = OAC 4-O- α -L-3''-O-acetilramnopiranosídeo do ácido elágico- **inédita**

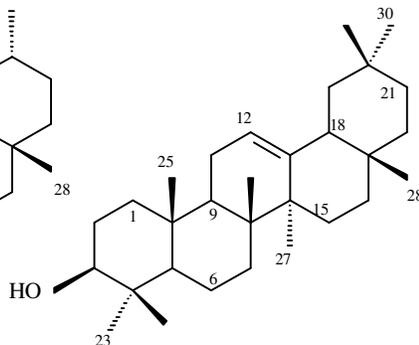
Substância LXIII



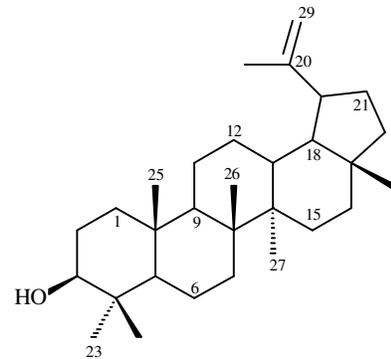
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Substância XLIX (ácido gálico)	H	OH	OH	OH	H	OH
Substância L (ácido siríngico)	H	OMe	OH	OMe	H	OH
Substância LII (ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico)	OMe	H	OMe	H	OMe	OH
Substância LIII (2,4,6-trimetoxibenzaldeído)	OMe	H	OMe	H	OMe	H
Substância XIX (ácido vanílico)	H	OMe	OH	H	H	OH



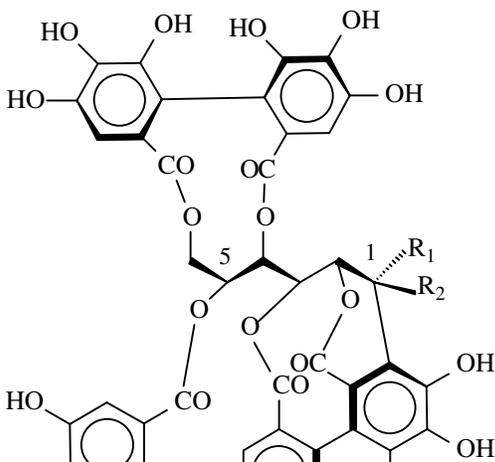
Substância XLV
α-amirina



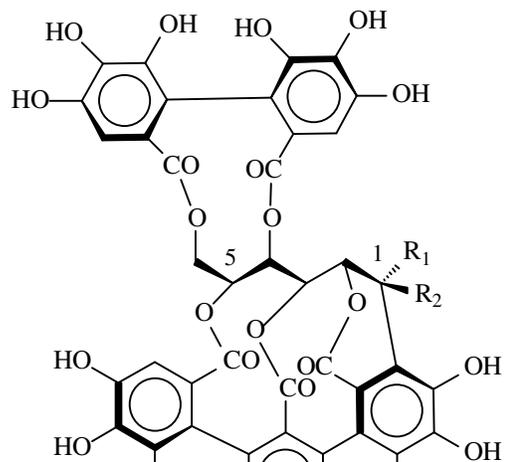
Substância XLVI
β-amirina



Substância XLVII
lupeol



xxxii



Substância LVI

R₁ = H e R₂ = OH casuarinina

Substância LVII

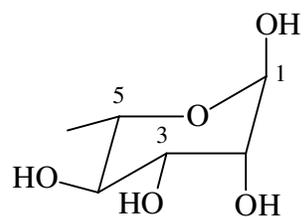
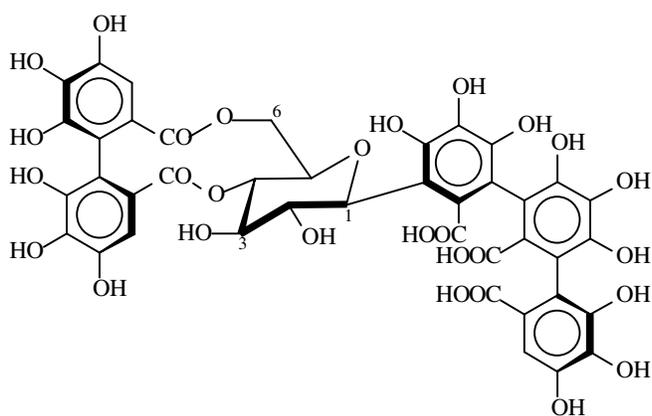
R₁ = OH e R₂ = H estaquiurina

Substância LVIII

R₁ = H e R₂ = OH castalagina

Substância LXVIII

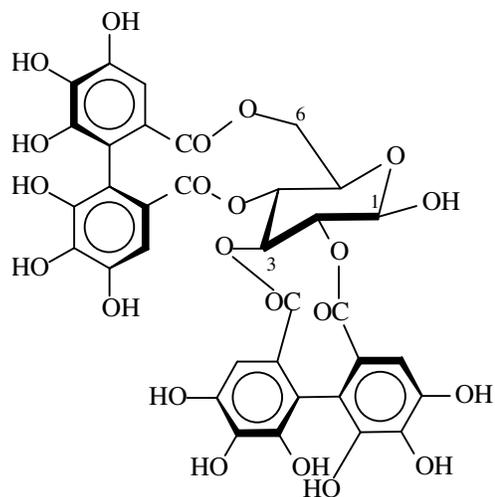
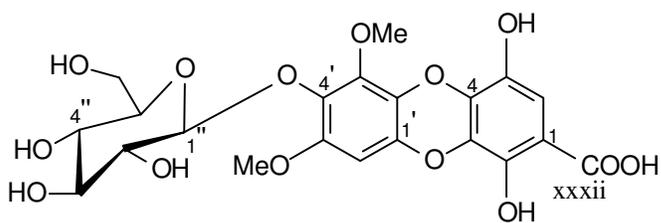
R₁ = OH e R₂ = H vescalagina



Substância LXVI
ramnose

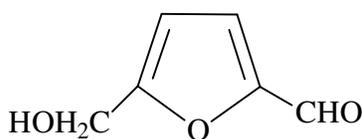
Substância LIX

1-C-flavogalonil-4,6-O-(S)-hexaidroxidifenoil-β-D-glucopiranosídeo



Substância LXIV
ácido 4'-O-β-D-glucopiranosil,
3',5'-dimetoxifenil-[1', 4]-dioxinil-2-hidroxi gálico
ou siphoneugenina - **inédita**

Substância LXV
β-pedunculagina



Substância LV
5-hidroxi metil-2-furfuraldeído

Resumo

“BUSCA DE PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS EM PLANTAS DAS FAMÍLIAS MYRTACEAE (*Siphoneugena densiflora* Berg) E VERBENACEAE (*Vitex polygama* Cham.)” – Neste trabalho estão sendo descritas trinta e sete substâncias identificadas de *V. polygama* Cham. e trinta e duas de *S. densiflora* Berg, provenientes do estudo fitoquímico de seus respectivos extratos. Destas, quatro substâncias isoladas de *S. densiflora* são destacadas por serem inéditas na literatura, a saber: 6β-hidroxi maslinato de β-D-glucopiranosila; 4-O-α-L-2”-O-acetil ramnopiranosídeo do ácido elágico e seu regioisômero com o grupo acetila na posição 3” e a siphoneugenina. São relatadas as atividades inibitórias enzimáticas de várias das substâncias identificadas, e de seus extratos de origem, sobre as enzimas gliceraldeído 3-fosfatodesidrogenase glicossomal (gGAPDH), de *Trypanosoma cruzi*; adenina fosforribosiltransferase (APRT), de *Leishmania tarentolae*; e pectinase, do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbionte da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*. Dentre todas as substâncias

testadas, os taninos castalagina e casuarinina se revelaram os mais promissores inibidores com valores de CI_{50} de 7,5 e 1,8 μM sobre a gGAPDH e 3,3 e 1,8 μM sobre a APRT, respectivamente. Como os taninos podem precipitar proteínas e causar uma ação inibitória não específica, foram realizados estudos sobre a interação deles com os reagentes dos ensaios enzimáticos. São relatadas as atuações biológicas *in vitro* de algumas substâncias sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*; sobre as lagartas de 1^o e 2^o instar da mariposa, praga do milho, *Spodoptera frugiperda*; sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus roseus* e sobre os fungos *Leucoagaricus gongylophorus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus laurentii*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Trichosporon cutaneum*. A mistura dos flavonóis glicosilados 3-O + 4'-O- β -D-glucopiranosil quercetina apresentou a maior atividade tripanocida (1,1 mM; 97 % lise contra 0,6 mM; 100 % lise da violeta genciana), ressaltando-se que sua CI_{50} sobre a gGAPDH foi de 20 μM . Os extratos metanólicos e hidrometanólicos dos galhos, caule, folhas e cascas da raiz de *S. densiflora* causaram 100 % de morte das lagartas de *S. frugiperda*, a uma concentração de 1000 ppm. Do extrato metanólico de folhas de *S. densiflora* foram isolados dois flavonóides: quercetina e quercitrina que, a uma concentração de 100 ppm, provocaram 78 e 85 % de morte das lagartas. Os taninos casuarinina e 4-O- α -L-raminopiranosídeo do ácido elágico, na mesma concentração, atuaram principalmente como fago-inibidores. O extrato hidrometanólico de folhas de *V. polygama* teve uma atividade inseticida de 60 % sobre *S. frugiperda* a uma concentração de 1000 ppm. Dele foram isoladas as misturas das flavonas di-C-glicosiladas carlinosídeo, schaftosídeo e seus respectivos isômeros, os quais apresentaram atividade inseticida relatada na literatura (SIMMONDS, 2001). O extrato hidrometanólico de folhas de *S. densiflora* apresentou uma atividade bactericida (halo de inibição de 11 mm) tão intensa quanto a do antibiótico tetraciclina (10 e 12 mm) para as bactérias *P. aeruginosa* e *M. roseus*. Das substâncias ensaiadas, apenas a mistura do cafeoil-6-O- α + β -D-glicopiranosídeo foi relativamente ativa sobre o fungo *L. gongylophorus* causando 60 % de inibição de seu crescimento, a uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Também está sendo narrado o desenvolvimento de um método, usando-se CLAE, para a análise e quantificação da 20-hidroxiecdisona presente no extrato metanólico de galhos de *V. polygama*, em virtude de suas inúmeras atividades biológicas e grande uso e importância na indústria farmacêutica.

Abstract

“SEARCH FOR BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS IN SPECIES OF MYRTACEAE’S (*Siphoneugena densiflora* BERG) AND VERBENACEAE’S (*Vitex polygama* CHAM.) FAMILIES” - The present work describes the results of phytochemical investigations of the species *S. densiflora* and *V. polygama*, culminating in 32 and 37 identified natural substances respectively. Among them, the structural elucidation of four new ones, from *S. densiflora*, deserves to be stood out: 28- β -D-glucopyranosyl-6 β -hydroxymaslinic acid; ellagic acid 4-*O*- α -L-2''-*O*-acetyl-rhamnopyranoside and its regioisomer in the 3''-*O*-acetyl position; and siphoneugenin. The extracts and substances' inhibitory enzymatic activities on glucosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) of *Trypanosoma cruzi*, adenine phosphoribosyltransferase (APRT) of *Leishmania tarentolae*, and pectinase of *Leucoagaricus gongylophorus* (a symbiont fungus of leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*) enzymes are reported. Taking into account all the assayed compounds, the

tannins Castalagin and Casuarinin have been assigned as the most promising inhibitors with IC_{50} of 7.5 and 1.8 μ M on gGAPDH and 3.3 and 1.8 μ M on APRT enzymes, respectively. As tannins can conjugate with protein and hence non-specifically inhibit enzyme action, researches were performed in order to assess their influences upon the biochemical assays' reagents. The *in vitro* biological effects of some compounds on trypomastigote form of *T. cruzi*; on 1st and 2nd instar larvae of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*; on the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Micrococcus roseus*; and on the fungi *Leucoagaricus gongylophorus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus laurentii*, *Sacharomyces cerevisiae* and *Trichosporon cutaneum* are related. The mixture of glycosylated flavonols quercetin 3-O + 4'-O- β -D-glucopyranosides has presented the highest trypanocidal activity (1.1 mM, 97 % lysis versus gentian violet 0.6 mM, total lysis) and an IC_{50} of 20 μ M on gGAPDH enzyme. The methanol and hydroalcoholic extracts from twigs, stem, leaves and roots' bark of *S. densiflora* incorporated into an artificial diet of 1st instar *S. frugiperda* larvae at a concentration of 1000 ppm induced 100 % of mortality. The methanol extract from leaves of *S. densiflora* yielded two flavonoids: quercetin and quercitrin. The 1st instar larvae reared on a diet containing 100 ppm of those flavonoids an overall mortality of 78 and 85 % was observed. The tannins casuarinin and ellagic acid 4-O- α -L-rhamnopyranoside have been shown to possess, at the same concentration, antifeedant activity. The inclusion of 1000 ppm hydroalcoholic extract from leaves of *V. polygama* in the diet of the 1st instar *Spodoptera* larvae caused 60 % of mortality. This extract yielded two mixtures of di-C-glycosylflavones carlinoside and schaftoside along with their isomers, whose insecticidal effects are reported in the literature (SIMMONDS, 2001). The antimicrobial activity observed with the hydroalcoholic extract from leaves of *S. densiflora* (inhibition halo of 11 mm) was as intense as that of the antibiotic tetracycline (10 and 12 mm, respectively) on the bacteria *P. aeruginosa* and *M. roseus*. Among the tested substances, only the mixture containing cafeoyl-6-O- α + β -D-glucopyranoside played a significant action against the fungus *L. gongylophorus*, causing 60 % of growth inhibition at a concentration of 50 μ g/mL. An analytical method for the quantitative HPLC determination of 20-hydroxyecdysone, which is present in the methanol extract from twigs of *V. polygama*, has been

developed since this compound exhibits several biological activities and has found widespread applications into the pharmaceutical industries.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HISTÓRICO	2
1.2. ASPECTOS GEOGRÁFICOS DO LOCAL DE COLETA DAS ESPÉCIES VEGETAIS	4
1.3. <i>VITEX POLYGAMA</i> CHAMISSO	6
1.3.1. <i>Perfil Químico de V. polygama Cham.</i>	9
1.4. <i>SIPHONEUGENA DENSIFLORA</i> BERG	13
1.4.1. <i>Perfil Químico de S. densiflora Berg</i>	15
1.5. DOENÇA DE CHAGAS.....	16
1.5.1. <i>Quimioterapia</i>	17
1.5.2. <i>Quimioprofilaxia</i>	19
1.5.3. <i>Produtos naturais tripanocidas</i>	20
1.6. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	22
1.6.1. <i>A enzima gGAPDH de T. cruzi</i>	23
1.7. LEISHMANÍASES	25
1.7.1. <i>Leishmaníase Cutânea</i>	26
1.7.2. <i>Leishmaníase Mucocutânea</i>	27
1.7.3. <i>Leishmaníase Visceral</i>	28
1.7.4. <i>Fosforribosiltransferases (PRTases) de Leishmania</i>	31
1.7.5. <i>Produtos naturais leishmanicidas</i>	33
1.8. INSETOS	34
1.8.1. <i>Inseticidas</i>	35
1.8.2. <i>Inseticidas de origem natural</i>	37

2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS.....	44
3.2. EQUIPAMENTOS	44
3.2.1. <i>Separação de substâncias em geral</i>	44
3.2.2. <i>Análise das substâncias</i>	45
3.2.3. <i>Quantificação da 20-hidroecdisona</i>	46
3.2.4. <i>Ensaio com enzima pectinase</i>	46
3.3. MÉTODOS.....	47
3.3.1. <i>Colunas cromatográficas</i>	47
3.3.2. <i>Cromatografia de CCDA e CCDP</i>	47
3.3.3. <i>“Cromatografia de Spins”</i>	48
3.4. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO NO UV.....	48
3.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS, IV E RMN	48
3.6. COLETA DO MATERIAL.....	48
4. ESTUDO FITOQUÍMICO DE VITEX POLYGAMA CHAM.- EXPERIMENTAL	51
4.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	52
4.2. FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	53
4.2.1. <i>Extrato hexânico dos frutos</i>	53
4.2.2. <i>Extrato hidrometanólico dos frutos</i>	54
4.2.3. <i>Extrato hexânico das folhas</i>	54
4.2.4. <i>Fração metanólica do extrato hexânico de folhas</i>	55
4.2.5. <i>Extrato hidrometanólico das folhas</i>	55
4.2.6. <i>Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos de galhos e folhas</i>	56
4.2.7. <i>Fração em diclorometano do extrato metanólico de folhas</i>	57
4.2.7.1. <i>Obtenção Substância XXVII</i>	57
4.2.7.2. <i>Obtenção da Substância XXXII e das Substâncias XXXIII e XXXIV em mistura</i>	58
4.2.7.3. <i>Obtenção da Substância III</i>	58
4.2.7.4. <i>Obtenção da Substância IV e das Substâncias XVII e XVIII em mistura</i>	59
4.2.7.5. <i>Obtenção das Substâncias V e XXVIII</i>	59
4.2.7.6. <i>Obtenção da Substância VI</i>	60
4.2.7.7. <i>Obtenção das Substâncias VII e IX</i>	60
4.2.7.8. <i>Obtenção da Substância VIII</i>	60
4.2.7.9. <i>Obtenção das Substâncias XXX e XXXI em mistura</i>	61
4.2.7.10. <i>Obtenção das Substâncias XXVIII e XXIX em mistura</i>	62
4.2.7.11. <i>Obtenção das Substâncias XIX, XX e XXI em mistura</i>	62
4.2.7.12. <i>Obtenção das Substâncias XXII e XXIII em mistura e XXIV e XXV em mistura</i>	62
4.2.8. <i>Fração em diclorometano do extrato metanólico de galhos</i>	63
4.2.9. <i>Fração em acetato de etila do extrato metanólico de galhos</i>	64
4.2.10. <i>Fração em n-butanol do extrato hidrometanólico de folhas</i>	65
5. ESTUDO FITOQUÍMICO DE VITEX POLYGAMA CHAM.- RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS I A IX	68
5.2. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XI E XII.....	85
5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XIII E XIV	88
5.4. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XV E XVI	95
5.5. IDENTIFICAÇÃO SUBSTÂNCIAS XVII E XVIII.....	104
5.6. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XIX, XX E XXI EM MISTURA	117
5.7. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XXII E XXIII EM MISTURA	123
5.8. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XXIV E XXV EM MISTURA	125
5.9. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXVI.....	131
5.10. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXVII	135
5.11. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXVIII	138
5.12. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XXX E XXXI EM MISTURA	143
5.13. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XXVIII E XXIX EM MISTURA	148
5.14. IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXXII	152

5.15.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XXXIII E XXXIV EM MISTURA	158
5.16.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXXV	164
5.17.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXXVI.....	171
5.18.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXXVII.....	176
5.19.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXXVIII.....	181
6.	ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>S. DENSIFLORA</i> BERG - EXPERIMENTAL	189
6.1.	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS	190
6.2.	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES	191
6.2.1.	<i>Partição líquido/líquido do extrato metanólico do caule.....</i>	<i>191</i>
6.2.2.	<i>Fração em n-butanol do extrato metanólico de caule e obtenção das Substâncias LVIII e LXV</i>	<i>191</i>
6.2.3.	<i>Fração em acetato de etila do extrato metanólico de caule</i>	<i>192</i>
6.2.4.	<i>Fração em diclorometano do extrato metanólico de caule</i>	<i>192</i>
6.2.4.1.	Obtenção das Substâncias LIII e LIV em mistura e da Substância LII	193
6.2.4.2.	Obtenção das Substâncias XIX e LV	193
6.2.4.3.	Obtenção da Substância XLIV e XLIX.....	194
6.2.5.	<i>Partição líquido/líquido do extrato metanólico da casca da raiz.....</i>	<i>194</i>
6.2.6.	<i>Fração em acetato de etila do extrato metanólico da casca da raiz.....</i>	<i>195</i>
6.2.6.1.	Obtenção das Substâncias L e XLIX.....	195
6.2.6.2.	Obtenção da Substância LVI.....	195
6.2.6.3.	Obtenção das Substâncias LXVI, LXVII e LXIV	196
6.2.6.4.	Obtenção da Substância LX.....	196
6.2.6.5.	Obtenção da Substância LI	196
6.2.6.6.	Obtenção das Substâncias LVIII e LIX em mistura e LVI e LVII em mistura.....	196
6.2.6.7.	Obtenção das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII em mistura	197
6.2.7.	<i>Extrato hidrometanólico do caule</i>	<i>198</i>
6.2.8.	<i>Partição líquido/líquido do extrato metanólico de folhas.....</i>	<i>198</i>
6.2.9.	<i>Fração em acetato de etila do extrato metanólico de folhas</i>	<i>199</i>
6.2.10.	<i>Fração em diclorometano do extrato metanólico de folhas e obtenção das Substâncias XLV, XLVI e XLVII em mistura.....</i>	<i>199</i>
7.	ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>S. DENSIFLORA</i> BERG – RESULTADOS E DISCUSSÕES	201
7.1.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XXXIX	202
7.2.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XL.....	204
7.3.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XLI E XLII EM MISTURA.....	209
7.4.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XLIII	215
7.5.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XLIV	222
7.6.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS XLV, XLVI E XLVII EM MISTURA	228
7.7.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XLVIII	233
7.8.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XIX	234
7.9.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA XLIX	235
7.10.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA L	236
7.11.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LI	237
7.12.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LII	238
7.13.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS LIII E LIV EM MISTURA	240
7.14.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LV.....	242
7.15.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS LVI E LVII EM MISTURA	249
7.16.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS LVIII, LXVIII E LIX EM MISTURA	261
7.17.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LX.....	275
7.18.	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS LX, LXI, LXII E LXIII EM MISTURA	281
7.19.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LXIV	288
7.20.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LXV	298
7.21.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LXVI	301
7.22.	IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA LVII.....	304
8.	DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA A ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DA 20-HIDROXIECDISONA	315

8.1.	INTRODUÇÃO	316
8.1.1.	<i>Ecdisteróides: Estrutura química</i>	316
8.1.2.	<i>Ocorrência na natureza</i>	317
8.1.3.	<i>Atividade biológica</i>	317
8.1.4.	<i>Separação cromatográfica de ecdisteróides para fins analíticos</i>	319
8.2.	METODOLOGIA.....	321
8.2.1.	<i>Análise quantitativa da 20-hidroxiecdisona</i>	321
8.2.2.	<i>Preparação do extrato</i>	322
8.2.3.	<i>Preparação da coluna analítica</i>	322
8.2.4.	<i>Gradiente exploratório</i>	323
8.2.5.	<i>Pré-tratamento do extrato</i>	324
8.2.6.	<i>Purificação e determinação da pureza do padrão 20E</i>	325
8.2.7.	<i>Solução estoque do padrão externo e preparação das amostras para a construção da curva de calibração externa</i>	326
8.2.8.	<i>Solução estoque do extrato e preparação das amostras para a construção da curva de calibração por adição de padrão</i>	326
8.2.9.	<i>Recuperação</i>	327
8.2.10.	<i>Precisão</i>	327
8.2.11.	<i>Exatidão</i>	327
8.2.12.	<i>Seletividade</i>	328
8.2.13.	<i>Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)</i>	328
8.3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	328
8.3.1.	<i>Preparação do extrato</i>	328
8.3.2.	<i>Preparação da coluna analítica</i>	328
8.3.3.	<i>Gradiente exploratório</i>	329
8.3.4.	<i>Pré-tratamento do extrato</i>	330
8.3.5.	<i>Determinação da pureza do padrão 20E e seletividade</i>	331
8.3.6.	<i>Validação do método</i>	332
8.3.6.1.	<i>Linearidade</i>	332
8.3.6.2.	<i>Precisão e exatidão</i>	332
8.3.6.3.	<i>Limite de quantificação e limite de detecção</i>	334
8.3.6.4.	<i>Recuperação</i>	334
9.	ENSAIOS BIOQUÍMICOS E BIOLÓGICOS.....	335
9.1.	VERIFICAÇÃO DE INIBIÇÃO DAS ENZIMAS GLICERALDEÍDO 3-FOSFATODESIDROGENASE (GAPDH) E ADENINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE (APRT)	336
9.1.1.	<i>Local de realização</i>	336
9.1.2.	<i>Método para avaliação de inibição enzimática da gGAPDH</i>	336
9.1.3.	<i>Método para avaliação de inibição enzimática da APRT</i>	337
9.1.4.	<i>Metodologia para o ensaio de inibição da atividade da enzima GAPDH em placa ELISA</i>	337
9.1.5.	<i>Metodologia para o ensaio de inibição da atividade da enzima APRT em placa ELISA</i>	337
9.1.6.	<i>Cálculo dos resultados</i>	338
9.1.7.	<i>Determinação da Cl_{50}</i>	339
9.1.8.	<i>Teste de interação química entre os taninos e a APRT</i>	339
9.1.8.1.	<i>Preparo das soluções</i>	340
9.1.8.2.	<i>Teste com a enzima</i>	341
9.1.8.3.	<i>Teste com o PRPP</i>	341
9.1.8.4.	<i>Teste com a Adenina</i>	341
9.1.9.	<i>Teste de interação química entre os taninos e a enzima GAPDH</i>	341
9.1.9.1.	<i>Preparo das soluções</i>	341
9.1.9.2.	<i>Teste com NAD^+</i>	342
9.1.9.3.	<i>Teste com G3P</i>	342
9.1.9.4.	<i>Teste com a enzima</i>	342
9.1.9.5.	<i>Teste com tampão TEA em pH 7,5</i>	342
9.2.	VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE INSETICIDA SOBRE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i>	343
9.2.1.	<i>Introdução</i>	343
9.2.2.	<i>Local de realização</i>	343
9.2.3.	<i>Criação artificial da <i>S. frugiperda</i></i>	343
9.2.4.	<i>Metodologia</i>	344

9.3.	VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE INSETICIDA SOBRE A FORMIGA <i>ATTA SEXDENS RUBROPILOSA</i>	347
9.3.1.	<i>Introdução</i>	347
9.3.2.	<i>Local de realização</i>	348
9.3.3.	<i>Metodologia do ensaio enzimático com as pectinases fúngicas</i>	349
9.3.3.1.	Teste de interação dos taninos com a pectinase	350
9.3.3.2.	Teste com a pectinase	351
9.3.3.3.	Teste com a pectina	351
9.3.3.4.	Teste com o tampão.....	352
9.3.3.5.	Teste com o ADNS.....	352
9.3.4.	<i>Metodologia para o ensaio com o fungo simbiote</i>	352
9.3.4.1.	Preparo dos tubos contendo o meio de cultura.....	352
9.3.4.2.	Preparo do inóculo	353
9.3.4.3.	Determinação da massa seca.....	353
9.3.4.4.	Avaliação do crescimento do fungo simbiote	353
9.3.5.	<i>Ensaio antimicrobiano</i>	354
9.3.5.1.	Método de difusão em ágar utilizando-se discos de papel de filtro (BAUER et al., 1966).....	354
9.3.5.2.	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pelo método da microdiluição com Alamar Blue (MABA)	355
9.3.5.3.	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pelo método do TTC	356
9.4.	VERIFICAÇÃO DE ATIVIDADE SOBRE O <i>T. CRUZI</i>	357
9.4.1.	<i>Introdução</i>	357
9.4.2.	<i>Local de realização</i>	357
9.4.3.	<i>Metodologia</i>	358
9.5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	359
9.5.1.	<i>Atividade inibitória enzimática de V. polygama sobre a GAPDH</i>	359
9.5.2.	<i>Atividade inibitória enzimática de V. polygama sobre a APRT</i>	364
9.5.3.	<i>Atividade inibitória enzimática de S. densiflora sobre a GAPDH</i>	366
9.5.4.	<i>Atividade inibitória enzimática de S. densiflora sobre a APRT</i>	370
9.5.5.	<i>Atividade de S. densiflora sobre S. frugiperda</i>	371
9.5.6.	<i>Atividade de V. polygama sobre S. frugiperda</i>	375
9.5.7.	<i>Atividade de V. polygama sobre o T. cruzi</i>	379
9.5.8.	<i>Atividade de S. densiflora sobre o T. cruzi</i>	383
9.5.9.	<i>Atividade de S. densiflora e V. polygama sobre o fungo Leucoagaricus gongylophorus simbiote de Atta sexdens rubropilosa</i>	385
9.5.10.	<i>Atividade de S. densiflora e V. polygama sobre microrganismos</i>	386
9.5.11.	<i>Atividade de S. densiflora e V. polygama sobre a enzima pectinase</i>	390
9.5.12.	<i>Atividade dos taninos sobre as enzimas GAPDH e APRT</i>	392
10.	CONCLUSÕES	395
11.	PERSPECTIVAS	399
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	401

1.Introdução

1.1. Histórico

O homem vem utilizando vários produtos de origem natural para o tratamento de doenças e a manutenção da saúde há séculos (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). Dentre estes produtos naturais, as plantas originaram as primeiras substâncias desenvolvidas como fármacos. São conhecidas 250 mil espécies de plantas floríferas, mas apenas 10 % foram estudadas quimicamente. Um enorme arsenal de substâncias químicas, com um grande potencial farmacológico, se coloca a nossa frente (ROUHJ, 2003), pois o Brasil é o país que possui o maior número de espécies de angiospermas no planeta (MITTERMEIER et al., 1992).

Porém, devido à automação, robótica, descobertas da biologia molecular em identificar alvos biológicos e à afirmação de que os produtos naturais eram irrelevantes para a maioria das doenças humanas, eles foram deixados de lado na década de 90, havendo um crescente desinteresse da indústria por este tipo de pesquisa (ROUHJ, 2003).

No entanto, nos últimos anos, ressurgiu o interesse pela investigação de produtos naturais na busca de novas substâncias ativas como compostos de partida para o desenvolvimento de fármacos, já que o número de novas entidades químicas caiu de uma média de 30 para 17 na última década, como pode ser visualizado no gráfico da Figura 1-1 (NEWMAN et al., 2003).

Aliados aos grandes avanços tecnológicos e científicos em cultura de células, as técnicas de extração e de identificação estrutural, os processos de triagem (onde um grande número de substâncias pode ser testado de maneira automatizada), a genética, a bioquímica de proteínas, a biologia estrutural e a química sintética têm convergido para criar um futuro promissor entre as ciências de produtos naturais e o desenvolvimento de novos fármacos (ROUHJ, 2003).

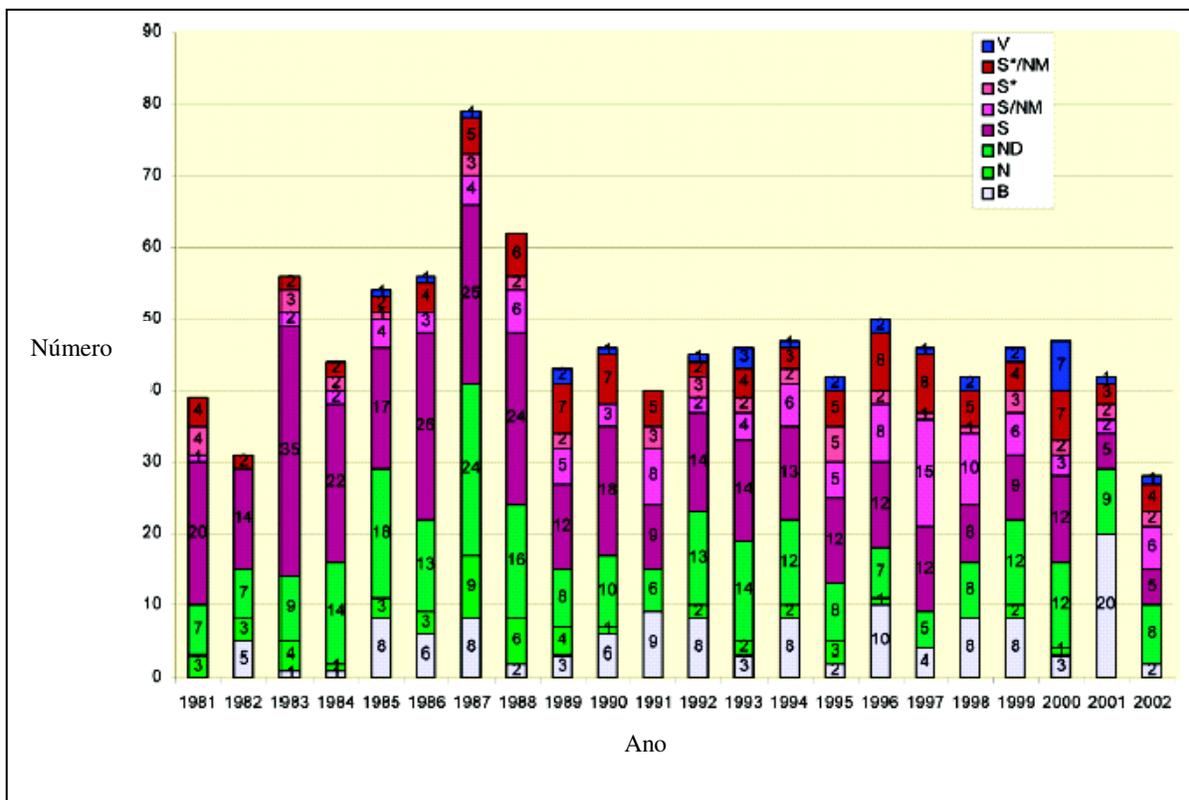


Figura 1-1- Todas as novas entidades químicas organizadas por fonte/ano desde 1981 a 2002 (NEWMAN et al., 2003)

Legenda da figura: V: vacina; S*/NM: sintético com farmacóforo e mimetizador de produto natural; S*: sintético com farmacóforo de produto natural; S/NM: sintético mimetizador de produto natural; S: totalmente sintético; ND: derivado de produto natural com modificação semissintética; N: produto natural; B: biológico

A descoberta de novos agentes terapêuticos inicia-se sempre pela busca de uma molécula que cause uma resposta biológica específica: um protótipo (ROUHI, 2003). Vários tipos de bioensaios têm sido usados para monitorar o fracionamento de extratos brutos vegetais, usando principalmente organismos alvo, como parasitas, microrganismos, linhagens de células cancerígenas etc. Na maioria dos casos o receptor específico da substância não é conhecido, o que pode dificultar o desenvolvimento de um medicamento. O uso de receptores específicos, como enzimas alvo, através de ensaios bioquímicos, representa uma ótima estratégia na busca de substâncias bioativas e, recentemente, vem sendo empregada na busca de compostos de partida anti HIV (MAHATO & SEM, 1997), para a terapia anticâncer (FANG et al.,

1993); inseticidas (YU & ABO-ELGHAR, 2000) e tripanocidas (LEITÃO et al., 2004). Nesta área, várias classes de produtos naturais apresentaram atividade de inibição enzimática, entre elas: flavonóides, cumarinas, antraquinonas, ésteres de ácido gálico, triterpenos ácidos, taninos condensados e hidrolisáveis e alcalóides.

Segundo NEWMAN et al. (2003), entre 1981 e 2002, 61 % das 877 moléculas novas introduzidas como fármacos no mundo foram provenientes de ou inspiradas em produtos naturais: 6 % incluíam produtos naturais; 27 % eram derivadas de produtos naturais; 5 % eram sintéticos com farmacóforos derivados de produtos naturais e 23 % sintéticos mimetizadores de produtos naturais.

Entre as 137 novas entidades químicas, moléculas de baixo peso molecular, na fase II ou III das triagens clínicas em junho de 2003, 59 % eram produtos naturais, derivadas ou inspiradas em produtos naturais (NEWMAN et al., 2003).

Faz muito sentido usarem-se produtos naturais como líderes para o desenvolvimento de novos fármacos, pois eles integram os elementos de conservadorismo e diversidade simultaneamente expressados pelos alvos biológicos (NEWMAN et al., 2003).

1.2. Aspectos geográficos do local de coleta das espécies vegetais

Segundo VICENZI et al. (1992), o Planalto de Poços de Caldas, Estado de Minas Gerais, também chamado Maciço de Poços de Caldas, está situado entre a parte oeste da Serra da Mantiqueira e o bordo leste da bacia sedimentar do Rio Paraná. É uma região que abrange aproximadamente 800 km² de superfície, dentro das coordenadas geográficas de longitude 46° a 47° W de Greenwich e latitude 21° e 22° S, a sudoeste de Belo Horizonte, da qual dista de 460 Km.

O clima desta região sofre interferência da sua topografia e do seu relevo movimentado, onde ocorrem altitudes médias de 1200 a 1400 m acima do nível do mar, com pontos que superam os 1600 m. Nessas condições, a circulação atmosférica, de origem tropical, é influenciada por correntes de ar do quadrante sul e por sistemas localizados de vale-montanha. Sendo assim, as condições médias do clima permitem caracterizá-lo como do tipo Tropical Mesotérmico Brando Sub-úmido, com verões

quentes, algumas geadas, concentração de chuvas no verão e estação seca nos meses de inverno. A temperatura média anual é de 18°C, ocorrendo uma grande amplitude térmica, sendo registradas as temperaturas máxima absoluta de 34°C e mínima absoluta de -4°C. A média anual das precipitações pluviométricas está entre 1500 mm a 1750 mm, sendo que de meados de maio a meados de outubro ocorre o período de seca. O mês mais seco tem até 30 mm de chuva em média, podendo ser zero em certos anos. A umidade relativa do ar varia ao longo do dia e também da estação, podendo chegar a níveis baixos na época do inverno.

O maciço de Poços é uma intrusão de rochas alcalinas em rochas pré-existentes de granitos e gnaisses do escudo cristalino e arenitos, apresentando uma predominância de rochas nefelínicas, tinguaitos, foaitos e fonolitos. Nefelínica é a rocha rica em silicatos de alumínio e sódio, cujos principais minerais são feldspatos sódico e nefelina.

Submetida a intensos processos de meteorização e erosão, a porção central do maciço foi dissecada, destacando-se as bordas periféricas que oferecem maior resistência à decomposição, que justamente são as rochas alcalinas nas quais ocorre a bauxita. Essas bordas alcançam altitudes de 300 a 600 m acima das áreas circunvizinhas. As bordas apresentam-se segundo um formato anelar, dando a impressão, quando observadas através de fotografias aéreas, de se tratarem de bordas erodidas de um antigo e enorme vulcão que jamais existiu.

A rede de drenagem que banha o Planalto de Poços integra a bacia do rio Paraná. É no maciço que nascem alguns dos rios que formarão o rio Grande que, juntamente com o Paraíba, formam o rio Paraná. São todos rios de planalto e, como tal, apresentam trechos curtos de navegabilidade, porém, em contrapartida, elevado potencial de aproveitamento hidrelétrico. O rio que se destaca é o das Antas, que é um tributário do rio Pardo.

Na região de Poços predominam solos classificados como latossolos, de coloração avermelhada e com espessura variando de 150 a 200 cm. Em geral, são porosos e bem drenados, com textura argilosa. São, normalmente, ácidos e, para as práticas agrícolas, necessitam de correção (calagem) e adubação.

São três os tipos de vegetação predominantes na região: a floresta subtropical subcaducifolia, os campos de altitude e formações com espécies de cerrado, sendo uma área de transição entre diferentes formações.

As famílias das espécies arbóreas predominantes na região são Lauráceas, Voquisiáceas, Mirtáceas e Euforbiáceas (VICENZI et al., 1992).

1.3. *Vitex polygama* Chamisso

Esta espécie pertence à ordem Lamiales, família Verbenaceae (MOLDENKE, 1957; CRONQUIST, 1981), subfamília Viticoideae (BRIQUET, 1895).

O nome *Vitex* é de raiz latina, *viere*, que significa juntar, tecer, em alusão aos ramos flexíveis com os quais podem ser tecidos cestos. O nome *polygamo*, também com raiz latina, significa aquela planta que conduz, sobre o mesmo indivíduo, flores hermafroditas e unissexuais (RIZZINI & RIZZINI, 1983).

É largamente aceito que a família Lamiaceae evoluiu da Verbenaceae, e que o limite entre as duas famílias é arbitrário. Tradicionalmente, a família Lamiaceae se distingue da Verbenaceae de acordo com a estrutura do gineceu (reunião de carpelos ou órgãos femininos da flor). A classificação de subfamília é a proposta por BRIQUET (1895) que, baseada nos tipos de inflorescência e posição dos óvulos, origina 7 subfamílias: Verbenoideae, Chloanthoideae, Viticoideae, Caryopteridoideae, Symphoremnoideae, Stilboideae e Avicennioideae. As três últimas subfamílias são, algumas vezes, segregadas como famílias (VON POSER et al., 1995 e 1997). Baseando-se em estudos morfológicos do gineceu (JUNELL, 1934), a família Verbenaceae ficou restrita à subfamília Verbenoideae, consistindo de 6 tribos: Verbeneae, Lantaneae, Privaceae, Petreeae, Citharexyleae e Casselleae (TRONCOSO, 1974). CANTINO et al. (1992) introduziram o gênero *Vitex* na família Lamiaceae (ou Labiateae) e subdividiram-na em oito subfamílias: Ajugoideae (ou Teucroideae); Scutellarioideae; Lamioideae; Nepetoideae; Chloanthoideae; Viticoideae e Pogostemonoideae. O estudo fitoquímico das espécies destas famílias tende a contribuir para a resolução dos impasses acima discutidos.

O gênero *Vitex* possui cerca de 250 espécies registradas na Ásia, Américas do Sul e Central, Caribe, África e Europa. É bem representado no Brasil,

ocorrendo desde a Região Amazônica até o Estado do Rio Grande do Sul (MOLDENKE, 1957).

A espécie aqui apresentada (Figura 1-2; Figura 1-3) tem a casca do caule e frutos tradicionalmente usados como emenagogo e as folhas como diurético (CORREA, 1926). No Brasil, pode ser encontrada nos estados do Espírito Santo, Distrito Federal, Pará, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. É conhecida popularmente como Azeitona do Campo, Maria-Preta, Tarumã e Velame do Campo (MOLDENKE, 1957).

Segundo MOLDENKE (1957), seu tamanho varia de arbustivo a arbóreo, podendo chegar a 20 m de altura e o tronco com 15 cm de diâmetro. Apresenta galhos grossos, marrom-acizentados, subcilíndricos ou visivelmente achatados de modo tetragonal; flexíveis e densamente tomentosos ou vilosos, menos pubescentes à medida que envelhecem, principalmente nos nódulos. Os pêlos são amarelados ou ferruginosos e aveludados; os nódulos medem de 1,0-9,5 cm de comprimento. As folhas são opostas cruzadas, 5-folioladas (raramente 3), totalmente desenvolvidas quando na época da floração (antese); pecíolos grossos, de 3,5-17,0 cm de comprimento, densamente tomentosos ou vilosos, como os galhos. Convexos na base, achatados no ápice.

Os folíolos são semelhantes às folhas ou consideravelmente reduzidos, todos geralmente com pecíolos curtos de 1,0-14,0 mm de comprimento, sendo que os centrais são freqüentemente mais longos do que os laterais, todos mais ou menos marginados (bordos espaçados) e também densamente tomentosos. A lâmina foliolar é submembranosa ou muito fina quando jovem; subcoriácea quando totalmente desenvolvida; verde escura na face superior (freqüentemente pardacenta quando seca); amarelo-amarronzada ou ferruginosa na face inferior; elíptica (oval) ou oblonga, variando levemente de suboval a oboval, 5,5-22,0 cm comprimento; 1,7-10,0 cm de largura, aguda ou acuminada no ápice, com as margens inteiras ou levemente onduladas (raramente serreadas nos brotos); aguda ou acuminada na base, densamente pubescente ou velutinoso na face inferior, com pêlos amarelo-amarronzados ou ferruginosos. As lâminas laterais são semelhantes à central, com exceção do tamanho e que, algumas vezes, são assimétricas. As nervuras são reticuladas e abundantes, indiscerníveis ou obscuras na face superior (nas folhas

jovens) ou subimpressas (nas folhas velhas), sendo que somente as partes mais largas são proeminentes, geralmente escondidas pelo tomento denso.

É encontrada habitando campos, especialmente cerrados, florestas primitivas, capoeiras e clareiras arenosas até 1500 m acima do nível do mar, em Minas Gerais. A madeira é usada nas construções civis. Floresce de setembro a janeiro e frutifica de dezembro a junho. A inflorescência é axilar, cimosa, abundante, 3,5-7,5 cm de comprimento, 2,0-4,5 cm de largura, geralmente pouco florida, mas densa, uma ou duas vezes furcada, notavelmente bracteolada, densamente tomentosa, subvilosa ou totalmente pubescente, pêlos amarelo-amarronzados ou ferruginosos (aveludados quando jovens); pedúnculos delgados ou ligeiramente grossos, 5,0 cm comprimento ou muito reduzidos, achatados, tomentosos ou vilosos; pedicelos grossos com 1,0 mm comprimento ou obsoletos; numerosas bractéolas, oblongas ou lanceoladas, 2,0 mm comprimento, 3,0 mm largura, sésseis, escuras na face superior, claras na face inferior, densamente pubescentes; flores sésseis ou subsésseis; cálice herbáceo, campanulado ou obcônico, densamente viloso-velutíneo com pêlos amarelos ou ferruginosos, tubo com 6,0-8,0 mm de comprimento; 4,0-6,0 mm largura; margem profundamente 5-lobada, lobos lanceolados, 2,0-4,8 mm comprimento, acuminados. Corola hipocrateriforme, variando de azul, violeta pálida ou rosada, branca ou amarela na base, com tubo largamente cilíndrico, cerca de 1,5 cm de comprimento, 3,5-5,0 mm largura, levemente alargado no ápice, densamente amarelo-tomentoso na face externa acima do cálice, pétalas com 1,0-1,5 cm largura, bilabiadas, os quatro lobos menores oblongo-lanceolados, cerca de 5,0 mm comprimento e 6,0-7,0 mm largura, ondulado-crispados ao longo das margens, barbados em direção à base, pubérulos em ambas as faces; estames e estiletos livres cerca de 5,0 mm para fora do tubo da corola; ovário densamente pubescente, pardo. As flores, que aparecem principalmente entre novembro e dezembro, são mui procuradas por mamangabas e abelhas silvestres. Fruto tipo drupa, preto ou preto-avermelhado, elíptico ou esférico, suculento, cerca de 1,5 cm comprimento e largura, comestível, embora com sabor pouco convidativo, com caroço grande e pétreo. Na época do amadurecimento dos frutos, entre março-maio, essas árvores são muito freqüentadas por diversos pássaros frugívoros como os sabiás e sanhaços. Foram encontrados caroços inteiros do fruto em dejeções de *Jacus*. HOEHNE, citado por MOLDENKE (1957), escreveu: “ainda nos recordamos como,

quando meninos, ficávamos escondidos sob os ramos de árvores do pomar de casa, para esperarmos os periquitos que vinham comer essas preciosas negras drupas da “Maria-Preta”, que no pomar havia sido poupada para, entre as fruteiras exóticas, apresentar a fartura para os ditos psitacídeos. Tão entretidas ficavam as aves no banquete, que podíamos passar-lhes o laço de cerdas de rabo de cavalo por sobre a cabeça, sem que notassem o movimento da ponta de bambu ou ainda sentissem o instrumento, antes de serem puxadas para baixo. Essas drupas, um pouco maiores do que cerejas, aparecem em tal profusão nesta planta, que ela toda se mostra negra entre o verde da folhagem”.

1.3.1. Perfil Químico de *V. polygama* Cham.

Segundo BRITO (1986), os compostos predominantes da ordem Lamiales são originados da via do mevalonato, sendo o perfil químico da família Verbenaceae caracterizado por metabólitos secundários tipo neolignanas, lignanas, naftoquinonas preniladas, iridóides carbocíclicos, terpenóides e aromáticos. De acordo com JUDD et al. (2001), a química de Verbenaceae e Lamiaceae é semelhante.

O gênero *Vitex* tem sido amplamente estudado, apresentando diversas substâncias identificadas como ecdisteróides, iridóides glicosilados, diterpenos do tipo labdano, flavonóides C-glicosilados, triterpenos, lignanas entre outras (TAVARES et al., 1999; ONO et al., 1998; DUTTA et al., 1983; SEHGAL et al., 1982; CHAWLA et al., 1992a.; SUKSAMRARN & SOMMECHAI, 1993; BARBOSA et al., 1995; WERAWATTANAMETIN et al., 1986; SANTOS et al., 2000; LEITÃO et al., 1997; LEITÃO & DELLE MONACHE, 1998; CHAWLA et al., 1992b; HERNÁNDEZ et al., 1999; SEIKEL et al., 1966). Algumas espécies apresentam atividade inseticida (HERNÁNDEZ et al., 1999), antivirótica (LEITÃO et al., 1997), antiinflamatória (CHAWLA et al., 1992a), citotóxica (HIROBE et al., 1997) etc.

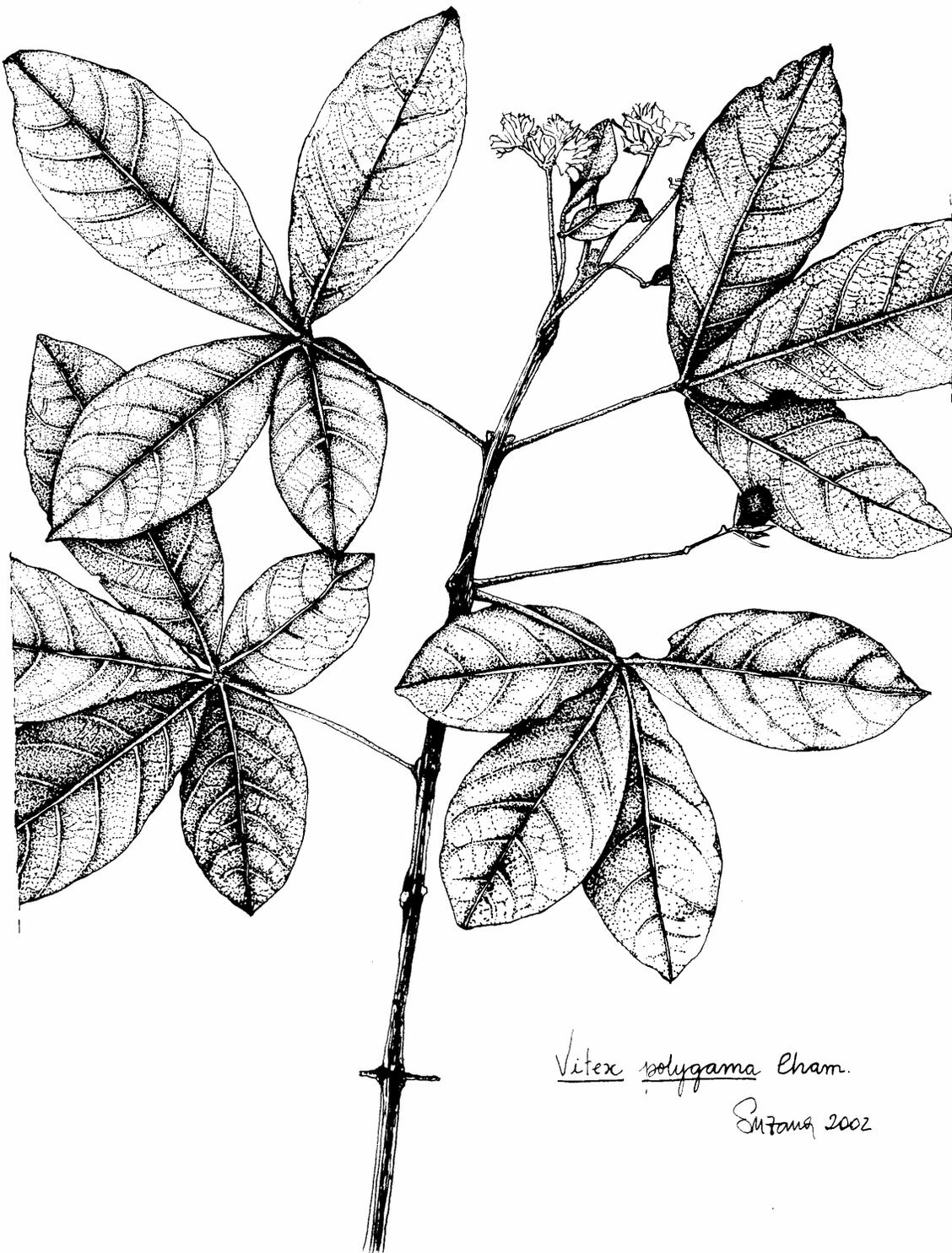
A espécie *V. polygama* não é inédita do ponto de vista fitoquímico. A decisão de se estudá-la novamente residiu no fato da espécie possuir uma grande quantidade de metabólitos secundários, principalmente flavonóides, que poderiam ser testados nos ensaios propostos para este trabalho. Variadas substâncias foram identificadas anteriormente e podem ser conferidas na Tabela 1-1.



Figura 1-2 - *Vitex polygama* Cham.

Foto maior: coleta de frutos em maio de 2002

Foto menor: frutos de vários tamanhos e estágios de maturação (fotos da autora).



Vitex polygama Cham.

Suzana 2002

Figura 1-3- Desenho de *Vitex polygama* Cham. (desenho de Suzana G. Leitão)

Tabela 1-1- Substâncias isoladas anteriormente de *V. polygama*

ORIGEM	SUBSTÂNCIA	CLASSE
Folha	2''-O-cafeoil-orientina [‡]	Flavona C-glicosilada acilada
Folha	orientina ^{*‡}	Flavona C-glicosilada
Folha	isorientina ^{*‡}	Flavona C-glicosilada
Folha	vitexina ^{*‡}	Flavona C-glicosilada
Folha	isovitexina ^{*‡}	Flavona C-glicosilada
Folha	luteolina [‡]	Flavona
Folha	quercetina [‡]	Flavonol
Folha	3-metoxiquercetina [‡]	Flavonol
Folha	ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico [‡]	Ácido Fenólico
Galho	20-hidroxiecdisona [*]	Ecdisteróide
Galho	ajugasterona C [*]	Ecdisteróide
Galho	monoacetono de ajugasterona C [*]	Ecdisteróide
Galho	turkesterona [*]	Ecdisteróide
Galho	3-O-β-D-glucopiranosilsterol [*]	Esterol
Folha	3,4-dicafeoilquinato de metila [*]	Éster de fenilpropanóide
Folha	3,5-dicafeoilquinato de metila [*]	Éster de fenilpropanóide
Folha	3-(3',4'-diidroxifenil)-2-propenoato de etila (cafeato de etila) [∞]	Éster de fenilpropanóide
Folha	hentriacontano, hexacosanoato de tetracosanoila, nonacosano [∞]	Hidrocarboneto
Folha	espatulenol [∞]	Sesquiterpeno
Óleo essencial de folhas	α-pineno, β-pineno, limoneno, <i>trans</i> -pinocarveol, terpin-4-ol, δ-cadineno, β-cariofileno, δ-elemeno, α-cubebeno, α-copaeno, β-elemeno, Z-β-farneseno, α-humuleno, allo-aromadendreno, ar-curcamedeno [‡]	Monoterpeno e Sesquiterpeno

*SANTOS, 2000; ‡LEITÃO & DELLE MONACHE, 1998; ∞BARBOSA et al., 1995; †LEITÃO et al., 1999.

1.4. *Siphoneugena densiflora* Berg

Esta espécie pertence à ordem Myrtales; família Myrtaceae; subfamília Myrtoideae; tribo Myrteae (PROENÇA, 1990; JUDD et al., 2001).

O nome *Siphoneugena* tem raiz latina, *siphone*, sifão; raiz grega, *eugéneia*, propícia à reprodução; raiz latina, *densiflora*, que tem flores numerosas e próximas (RIZZINI & RIZZINI, 1983).

O gênero *Siphoneugena* é pequeno, sendo composto por oito espécies. Ocorre desde Porto Rico até ao norte da Argentina, com centro de diversidade no sudeste do Brasil. Pertence à subtribo Eugeniinae e é um dos gêneros especializados segregados do gênero *Eugenia* por Berg (PROENÇA, 1990).

Segundo PROENÇA (1990), a espécie é arbórea (Figura 1-4), podendo atingir até 12 m de altura. Habita campos rupestres, cerradões e florestas de galerias no Sul de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo. É conhecida vulgarmente como Maria-Preta, Murta (Distrito Federal) e Uvatinga (São Paulo).

Os galhos jovens são lisos, glabros ou pubérulos, tornando-se levemente estriados com a idade, não cascudos. Folhas com glândulas translúcidas; nervura média surgindo mais ou menos do mesmo ponto em ambas as superfícies; nervuras laterais idem; nervura marginal quase reta. Pecíolo 3,0-14,5 x 1,0-2,0 mm, glabro ou pubérulo. Lâmina foliar 4,0-13,7 x 1,4-5,0 cm, ovada a elíptica, glabra ou com poucos pêlos delgadamente esparsos e próximos à base; ápice abrupto ou longo-cônico acuminado; base aguda; face superior contendo glândulas subepidermais rentes à superfície ou ligeiramente afundadas.

Racemos com (1-)2-7(-14) flores, 0,8-2,7 cm, pubérulos a glabros, raque (eixo da inflorescência) de 1,0-1,7 cm; brácteas e bractéolas glabras a pubérulas, cerca de 1,0 mm, largamente triangulares a lanceoladas; geralmente persistentes no fruto. Pedicelo (haste que sustenta cada flor) 0-15,0 mm, mas as flores terminais são sésseis algumas vezes. Botões com 3,5 x 2,0-3,0 mm, glabros ou pubérulos. Antese pela abertura dos lóbulos do cálice, raramente com rasgo entre os lóbulos; lóbulos do cálice depois da antese 1,0 x 1,0-1,5 mm. Estilete 4,5-7,0 mm; óvulos 3-7 por lóculo. Hipanto geralmente constricto (apertado) entre o cálice e o ovário; cálice hipantial cerca de 2,0 x 3,0 mm. Pétalas 1,5-2,5 x 1,5-2,0 mm, irregularmente ovais a orbiculares (o diâmetro

longitudinal é igual ao transversal). Estames 1,5-5,0 mm, de 65-110 unidades. Ovário bilocular ou raramente trilocular, cerca de 1,0 x 1,0-2,0 mm, redondo ou em formato de fuso. Fruto tipo baga indeiscente, 9,0-12,0 mm de diâmetro; epicarpo brilhante de cor vinho; mesocarpo carnudo com sabor doce adstringente. Sementes 1-4. Embrião 6,0-7,0 x 4,0-6,0 mm, esferóide a elipsóide; cotilédones com glândulas afundadas na superfície intercotiledonária (PROENÇA, 1990).

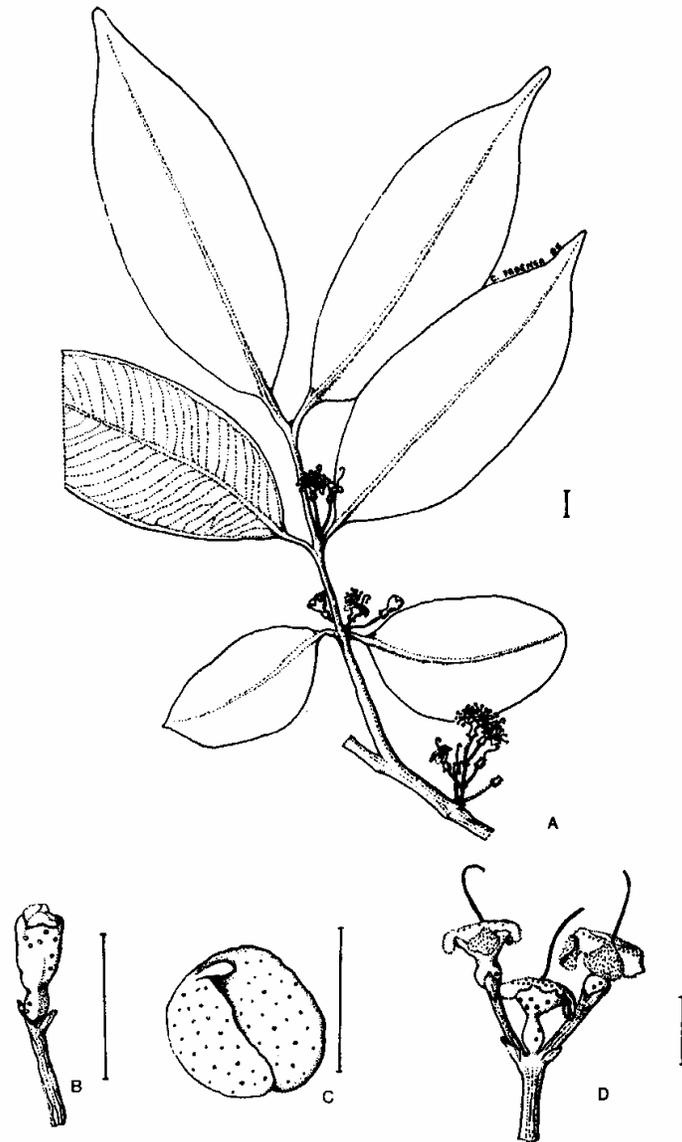


Figura 1-4- *Siphoneugena densiflora* var. *densiflora*.

A: habitat; B: botão da flor; C: embrião; D: ápice da inflorescência (desenho de Carolyn Proença em PROENÇA, 1990)

1.4.1. Perfil Químico de *S. densiflora* Berg

Segundo BRITO (1986), os compostos predominantes da ordem Myrtales são originados das três vias metabólicas: chiquimato, mevalonato e acetato/malonato. A via acetato/malonato leva à formação de substâncias de natureza policetídica. A via mevalonato forma substâncias terpenoídicas e a via do chiquimato forma compostos lignóides. Assim sendo, taninos gálicos, elágicos, flavonóides, aromáticos, terpenos, estilbenos, floroglucinóis, acetofenonas e cumarinas são exemplos de classes de substâncias que podem ser encontradas nesta ordem.

Vale ressaltar que os taninos gálicos e elágicos são derivados de metabólitos iniciais da via do chiquimato e constituem marcadores sistemáticos das angiospermas, pois nunca foram encontrados em monocotiledôneas (BRITO, 1986). Derivados do ácido elágico são largamente encontrados na ordem Myrtales, sendo que alguns deles só ocorrem em famílias pertencentes a esta ordem (GIBBS, 1974).

Apesar do seu grande valor econômico, devido ao seu espécime mais importante na indústria do papel, o eucalipto, a família Myrtaceae tem sido pouco explorada quanto ao seu potencial químico, sendo uma das famílias botânicas menos investigadas. Algumas razões se revelam para tal desinteresse, figurando como principal a dificuldade de classificação taxonômica em decorrência das grandes semelhanças morfológicas entre seus representantes. É constituída por 144 gêneros, incluindo cerca de 3100 espécies (KAWASAKI, 1984; JUDD et al., 2001).

A espécie *S. densiflora* é inédita quanto ao estudo fitoquímico e não apresenta uso popular registrado. No entanto, o gênero *Eugenia*, do qual *Siphoneugena* foi segregado, comportando 400 espécies, tem sido amplamente estudado, sendo usado na medicina popular para inúmeros fins, como, por exemplo, antiinflamatório, analgésico, antipirético, antifúngico, no tratamento de úlcera péptica, antidiabético (MAHMOUD et al., 2001), digestivo, eupéptico, carminativo (LEE et al., 1997), anti hipertensivo (PAINULY & TANDOM, 1983) e com propriedades tripanocidas sobre *T. congolense* e *T. brucei* com LD₅₀ de 12,5 e 66,7 µg/mL (ADEWUNMI, et al., 2001). Os taninos, comuns neste gênero, têm largo emprego na indústria de curtume como tanantes (EL-SHERBEINY & SALEH, 1974). Além destes, vários outros metabólitos secundários têm sido relatados: derivados polifenólicos do ácido gálico e

elágico, flavonóis glicosilados (MAHMOUD et al., 2001), C-metil-flavonas glicosiladas (PAINULY & TANDOM, 1983) e muitos triterpenos com esqueletos do tipo lupano, ursano e oleanano (JUNGES, 1994).

1.5. Doença de Chagas

A Doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta aproximadamente 18 milhões de pessoas principalmente nas Américas do Sul e Central, e também se manifesta em áreas metropolitanas dos Estados Unidos, com cerca de 50 a 100 mil pessoas infectadas, principalmente imigrantes da América Central (WENDEL et al., 1992; Doença de Chagas, 2003).

No Brasil, cerca de 5 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que 300 mil delas se situam no estado de São Paulo (VERONESI, 1991). Por sua grande difusão e gravidade das manifestações que pode acarretar, além da grande perda econômica (US\$ 8,156 milhões, o equivalente a 2,5 % da dívida externa do continente americano inteiro em 1995) devido à mortalidade e inatividade de indivíduos jovens no auge de sua produtividade, a doença ainda representa um sério problema de saúde pública (Doença de Chagas, 2003).

O vetor de transmissão é um inseto conhecido popularmente como “barbeiro” (*Triatoma infestans*, ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae). À noite ou durante o dia em ambiente escuro, esses insetos saem de seus esconderijos, normalmente frestas de parede, colchões, tetos de palha ou barro, para sugar o sangue das partes descobertas do mamífero hospedeiro. Uma vez infectado, o indivíduo passa por duas fases: aguda e crônica. A fase aguda caracteriza-se normalmente pela manifestação de sintomas 8 a 10 dias após a contaminação. Além de inflamação local, que depende do mecanismo de entrada, ocorrem sintomas gerais como febre, mal estar e cefaléia. Alguns órgãos como, por exemplo, o coração, fígado e baço, apresentam aumento de volume. Com a regressão das manifestações da fase aguda, o paciente entra em um estado de cura aparente, podendo permanecer assintomático durante um longo período de tempo, o que caracteriza a chamada fase crônica da doença. Durante esta fase os sintomas associados ao coração podem

permanecer: arritmias, insuficiência cardíaca e tromboembolismo, levando o paciente a ter dores e palpitações associadas a esforços físicos. No estágio final da doença, a deficiência cardíaca e as inflamações gastrointestinais resultam em 10 % de casos fatais (MARKELL et al., 2003).

1.5.1. Quimioterapia

Desde a descoberta da doença pelo médico sanitário Carlos Chagas (1909) até os dias atuais, têm sido realizadas inúmeras tentativas de tratamento, sem se obter, entretanto, um medicamento que fosse totalmente eficaz.

Em 1961, iniciou-se um período de tentativas que resultou, principalmente, em dois medicamentos nitroderivados muito utilizados: o nifurtimox (3-metil-4(5'-nitrofurfurilidenamino)-tetraidro(1,4)-tiazina-1,1-dióxido; LAMPIT®) e o benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida; ROCHAGAN®, Figura 1-5).

O nifurtimox, que inibe o desenvolvimento das formas sanguínea e intracelular do *T. cruzi* a uma concentração de 1 μM *in vitro* (GILMAN et al., 1983), saiu do mercado desde 1997, devido a suspeitas de ser cancerígeno e mutagênico. Além disso, causava vários efeitos gastrointestinais adversos, tornando-o pouco tolerado, principalmente por adultos. Poucos pacientes completavam o total de 120 dias de tratamento, que era o período recomendado para a cura de casos crônicos.

Quanto ao benzonidazol, usado principalmente na Argentina, Brasil e Chile desde 1978, as reações são principalmente na pele (similar à urticária), neurite e diminuição dos glóbulos brancos no sangue. Em alguns pacientes tais reações são tão intensas que obrigam a suspensão do tratamento (MARTINDALE). Este medicamento é 80 % eficiente na cura da doença na fase aguda. Seu mecanismo de ação se dá através da inibição da síntese de ácido nucléico.

Um estudo recente mostrou os resultados do acompanhamento de 91 pacientes, portadores da Doença de Chagas, sendo tratados com nitroderivados por 10 anos. A conclusão foi de que a terapia à base de nitroderivados (Figura 1-5) é insatisfatória e não pode ser recomendada, pois falha na erradicação do parasita e pode mudar a progressão da doença cardíaca nos pacientes crônicos (LAURIA-PIRES et al., 2000).

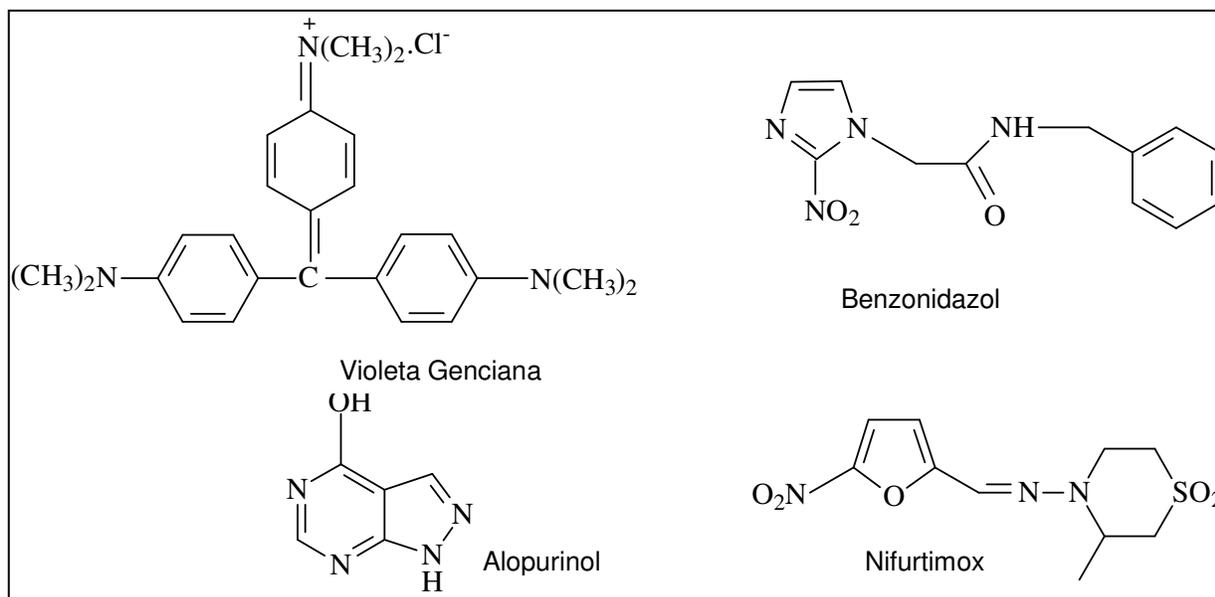


Figura 1-5- Estruturas químicas de compostos utilizados no tratamento químico e profilaxia da Doença de Chagas

O alopurinol (4-hidroxipirazol[3,4-d]pirimidina) parece ser um medicamento tão eficaz no tratamento da infecção por *T. cruzi*, bem como no das leishmaníases, tanto quanto o benzonidazol. Os sistemas enzimáticos destes organismos, diferentemente dos do homem, transformam o alopurinol em análogos tóxicos da adenina. Reações adversas, tais como dermatite pruriginosa generalizada, dor epigástrica, diarreia e polineurite transitórias, ocorrem em 11 % dos pacientes, contra 30 % daqueles em tratamento com benzonidazol (MARKELL et al., 2003).

Alguns esforços também têm sido feitos para buscar tratamentos alternativos, já que as perspectivas, a um curto prazo, para novos medicamentos eficazes no tratamento da doença são inexistentes, principalmente devido ao descaso da indústria farmacêutica em produzir e comercializar medicamentos que seriam dirigidos basicamente para populações muito pobres de países subdesenvolvidos (Pesquisa FAPESP, 2000). Por exemplo, a combinação do benzonidazol com o antifúngico cetoconazol produziu um efeito sinérgico na quimioterapia com o nitroderivado em ratos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* (ARAUJO et al., 2000).

1.5.2. Quimioprofilaxia

Os movimentos de migração rural/urbano que ocorreram na América Latina entre os anos de 1970-1980 transformaram o modelo epidemiológico da doença, caracterizando-o como uma infecção urbana. Com o controle da população de barbeiros, também a partir da década de 70, a utilização de sangue contaminado em bancos de sangue passou a ser a principal forma de transmissão da doença nas Américas do Sul e Central. As estatísticas demonstram números que variam entre 3 e 53 %, mostrando que a prevalência de sangue infectado por *T. cruzi* é maior do que a infecção por HIV, hepatite B e C (Doença de Chagas, 2003).

Esse fato passou a ter um efeito mais acentuado principalmente com as crescentes migrações. No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 2 milhões de indivíduos infectados vivendo em centros urbanos, cuja grande maioria são migrantes de áreas rurais endêmicas (Doença de Chagas, 2003).

De acordo com dados obtidos entre 1988-1989 de 850 municípios do país, apenas 56,9 % dos bancos de sangue realizavam testes sorológicos para doença de Chagas. Ainda que um grande número de substâncias químicas tenha sido testado como quimioprofiláticos na doença de Chagas, somente a violeta de genciana (cloreto de hexametilosanilina; CI_{50} 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Figura 1-5) é recomendada pela OMS (Doença de Chagas, 2003). O fato de induzir danos hemostáticos em plaquetas e alterar a coloração do sangue e urina, explica o uso cada vez menor da violeta de genciana na esterilização de sangue (RIBEIRO & PILÓ-VELOSO, 1997). Os parasitas tripanossomatídeos são conhecidos por serem muito sensíveis a alterações no seu balanço redox. A primeira linha de defesa contra peroxidantes, como nos hospedeiros mamíferos, consiste na glutathiona reduzida (GSH). Eles não têm a enzima glutathiona redutase (GR) e mantêm seu nível de GSH através de reações não enzimáticas com a tripanotiona ($T[\text{SH}]_2$, 18,-bis-glutationilespermidina) e a 1-glutationilespermidina, sendo estes compostos mantidos na sua forma reduzida pela ação da tripanotiona redutase (TR), enzima específica dos tripanossomatídeos. A violeta genciana inibe a TR do *T. cruzi* através de mecanismo de competição com um $K_i = 5,3 \mu\text{M}$ (SEPÚLVEDA-BOZA & CASSELS, 1996).

Algumas sugestões têm sido feitas para se ter substitutos mais convenientes, como é o caso, por exemplo, de antioxidantes usados na indústria alimentícia como o BHT (2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno) e o BHA (2-mono- e 2,6-di-terc-butilato de 4-hidroxianisol). Alguns produtos naturais que apresentem baixa toxicidade e qualidades antioxidantes potentes, como flavonóides e taninos, também podem vir a ser mais apropriados do que os antioxidantes sintéticos, se a atividade tripanocida deles contra a forma infectante do *T. cruzi* provar ser adequada (SEPÚLVEDA-BOZA & CASSELS, 1996).

1.5.3. Produtos naturais tripanocidas

Na Bolívia, algumas plantas são indicadas para o tratamento da doença de Chagas, porém não atuam sobre o parasita, sendo efetivas sobre alguns sintomas, como é o caso do Sangre de Drago (*Croton roborensis*), chá de flores de Retama (*Spartum junceum*) com *Lippia triphylla* e *Melissa officinalis* para tranqüilizar ataques do coração (BOURDY et al., 2000).

Com o objetivo de se identificar novos agentes quimioprolifáticos para bancos de sangue e quimioterapêuticos, muitos produtos naturais têm sido testados contra culturas de *T. cruzi* ou mamíferos infectados. O triterpeno tingenona (Figura 1-6) mostrou ser tão efetivo contra as formas epimastigotas de *T. cruzi in vitro* quanto o nifurtimox e mais do que o benzonidazol ($CI_{50} = 12$ e $40 \mu\text{M}$, respectivamente), inibindo completamente o crescimento do parasita a $30 \mu\text{M}$ ($12 \mu\text{g/mL}$). O flavonóide quinônico 3R-claussequinona (Figura 1-6) produziu 100 % de lise de formas tripomastigotas de *T. cruzi in vitro* a uma concentração de $100 \mu\text{M}$ (SEPÚLVEDA-BOZA & CASSELS, 1996). Os flavonóides sacuranetina e penduletina (Figura 1-6) apresentaram 100 e 86 % de atividade tripanocida em formas epimastigotas de *T. cruzi in vitro* com concentrações de $500 \mu\text{g/mL}$ (CI_{50} violeta genciana = $31 \mu\text{g/mL}$, 100 % lise = $250 \mu\text{g/mL}$) (RIBEIRO & PILÓ-VELOSO, 1997). As lignanas caerofilina e cubebina produziram 100 % de lise em formas tripomastigotas, cepa Boliviana, de *T. cruzi in vitro* na concentração de 25 e $50 \mu\text{g/mL}$ (BASTOS et al., 1999), mas não reproduziram tão boa atividade contra a cepa Y. Já as lignanas grandisina e veraguensina, a uma concentração de $5 \mu\text{g/mL}$, causaram 100 % lise na cepa Y (LOPES et al., 1998). A naftoquinona metoxilapachol

apresentou um ED₅₀/24h de 164,8 µmol/L sobre as formas tripomastigotas, cepa Y, de *T. cruzi* *in vitro* contra um ED₅₀/24h de 536,0 µmol/L da violeta genciana (MOURA et al., 2001). O monoterpreno terpinen-4-ol apresentou um ED₅₀ de 0,02 µg/mL em formas sanguíneas de *T. brucei* contra 0,5 µg/mL do Suramin (MIKUS et al., 2000).

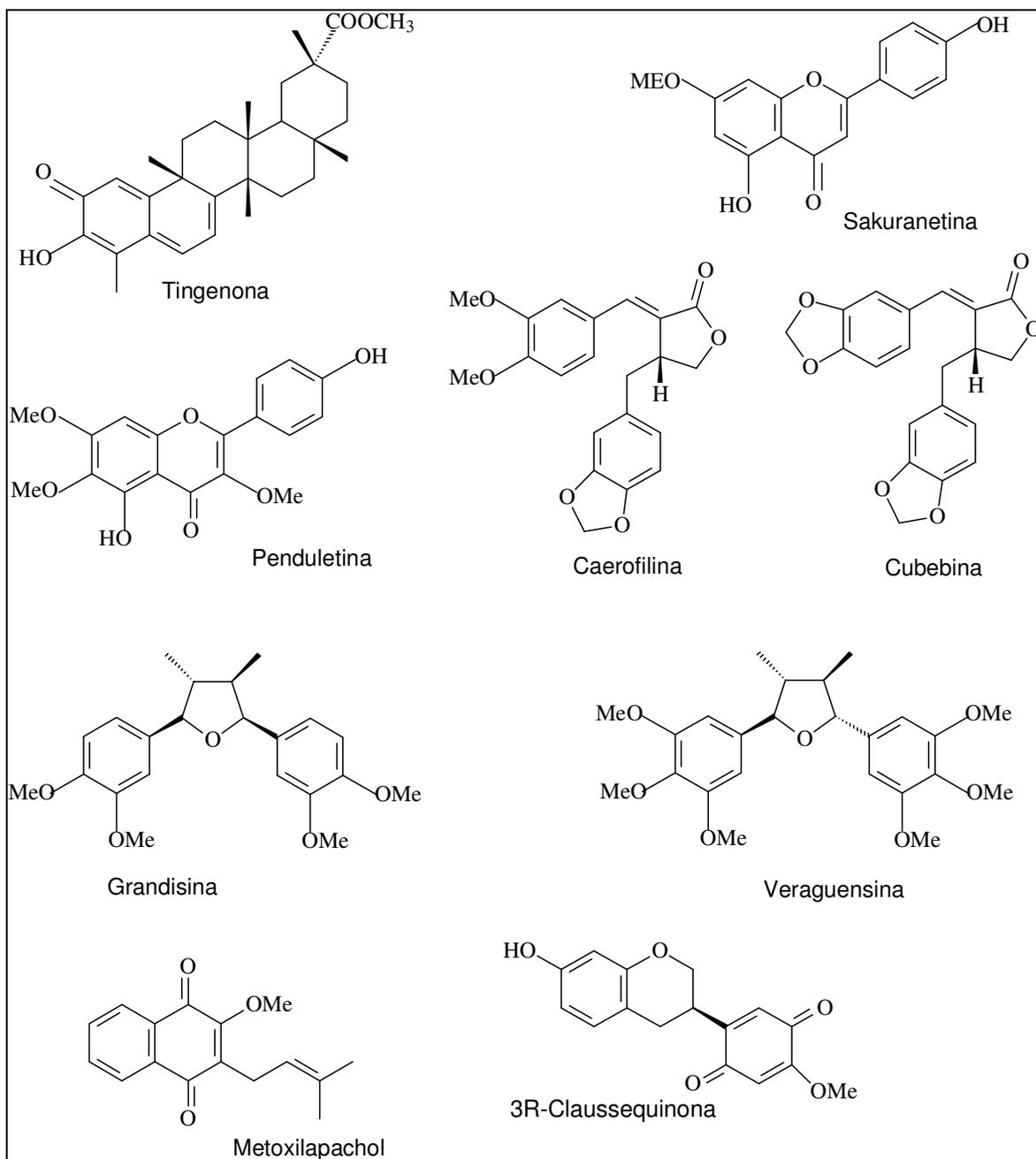


Figura 1-6- Produtos naturais com atividade tripanocida

1.6. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Este parasita tem um ciclo de vida complexo que inclui sua passagem tanto no inseto (hospedeiro intermediário) quanto no mamífero (hospedeiro definitivo, incluindo o homem) e apresenta a característica única de se dividir no interior das células do hospedeiro definitivo e não no sangue periférico. Durante seu ciclo de vida, apresenta-se sob três formas: tripomastigota, epimastigota e amastigota (MARKELL et al., 2003).

Tripomastigota é a forma flagelada ingerida pelo inseto, no momento da picada, pois está presente no sangue do mamífero contaminado. Depende exclusivamente da via glicolítica para obtenção de energia, pois não é munida de citocromo e possui mitocôndria inativa e, portanto, sem ciclo de Krebs funcional. É dotada de uma organela especializada, o glicossomo, que contém nove enzimas envolvidas na reação da glicólise e do metabolismo do glicerol (OPPERDOES & BORST, 1977; OPPERDOES, 1987). Devido a esta organela, a velocidade da glicólise é 50 vezes maior do que aquela ocorrida no eritrócito humano.

Após ingerida pelo inseto, a forma tripomastigota se diferencia na forma epimastigota (forma intermediária e flagelada). Esta, ao chegar no intestino posterior do inseto, se diferencia na forma tripomastigota novamente, a qual, posteriormente, invadirá a corrente sanguínea do mamífero picado pelo inseto e, quando penetrar no interior das células dos tecidos, se diferenciará na forma amastigota.

A forma amastigota é aflagelada, arredondada ou oval, encontrando-se agrupada formando os chamados ninhos parasitários no interior dos tecidos (MOURA et al., 2001). Ela tem como principal fonte de obtenção de energia os depósitos de lipídeos.

Em média, um *Trypanosoma*, na forma sanguínea do hospedeiro, contém 240 glicossomos, o que representa entre 4,3 a 8 % de seu volume total. Nas formas amastigota e epimastigota o número de glicossomos cai a menos de 50. Além do *Trypanosoma*, outros gêneros da família Trypanosomatidae como *Leishmania* e *Crithidia* também apresentam glicossomos (OPPERDOES & BORST, 1977).

O metabolismo de carboidratos de *Trypanosoma* no inseto vetor é completo, isto é, apresenta glicólise, ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa (CLARKSON & BROHN, 1976).

1.6.1. A enzima gGAPDH de *T. cruzi*

Um dos caminhos para o desenvolvimento de novos fármacos contra a doença de Chagas é explorar o fato de que a forma infectante do *T. cruzi* depende exclusivamente da via glicolítica como fonte de energia. Portanto, compostos que bloqueiem a glicólise podem ser utilizados como medicamentos para tratar e combater a doença.

Com o objetivo de se descobrir novas substâncias candidatas a combater doenças causadas por parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (várias espécies responsáveis pelas Leishmaníases), foram determinadas as estruturas tridimensionais de algumas de suas enzimas glicolíticas: triosefosfatoisomerase de *T. brucei* (WIERENGA et al., 1991) e gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) de *T. brucei* (VELLIEUX et al., 1993) e de *Leishmania mexicana* (KIM et al., 1995).

A investigação detalhada das estruturas de GAPDH humana e de *T. brucei* levou à identificação dos sítios de ligação do NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo, cofator da GAPDH) e à detecção de importantes diferenças nas duas enzimas (VERLINDE et al., 1994) quanto à afinidade pelo cofator, implicando em diferenças na estrutura tridimensional do sítio de ligação ao cofator e, portanto, a um possível sítio de seletividade. Esta descoberta forneceu subsídios para se acreditar que a GAPDH de *T. cruzi*, por apresentar alta homologia com a enzima de *T. brucei*, pode ser utilizada como uma molécula alvo interessante para o desenho de fármacos contra a Doença de Chagas (Figura 1-7, SOUZA et al., 1998).

A gGAPDH (GAPDH glicossomal) participa da via glicolítica, tanto do hospedeiro humano quanto do tripanossomo, catalisando a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato, na presença do cofator NAD⁺ e fosfato inorgânico (Esquema 1-1).

O Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Instituto de Física da Universidade de São Paulo *campus* São Carlos (IFSC/USP) mantém uma linha de

pesquisa dedicada ao estudo estrutural de proteínas do *T. cruzi* e à modelagem de inibidores específicos que possam ser potenciais medicamentos na terapia antichagásica. Dentre os resultados já alcançados por este grupo, destacam-se a expressão, purificação, cristalização, determinação da estrutura (a 2.8 Å de resolução) e padronização de ensaios de atividade seletiva da enzima glicolítica gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase de *T. cruzi*. Em paralelo, iniciou-se a modelagem de potenciais inibidores, pelas técnicas de simulação computacional em bases de estruturas micromoleculares com atividade farmacológica (PAVÃO, 1996; PAVÃO, 2001), além da síntese e bioensaios enzimáticos com produtos naturais de várias procedências, inclusive dos laboratórios de Síntese e de Produtos Naturais da UFSCar, destacando-se a cumarina chalepina com CI_{50} de 64 μ M e os flavonóides 5,6,7,3',4'-pentametoxiflavona, 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavona, 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona e 3,5,6,7,3',4',5'-heptametoxiflavonol cuja inibição enzimática foi de 100 % a uma concentração de 100 μ g/mL (LEITÃO et al., 2004; VIEIRA et al. 2001; PAVÃO et al., 2002; GARCIA et al., 2000; MORAES et al., 2003).

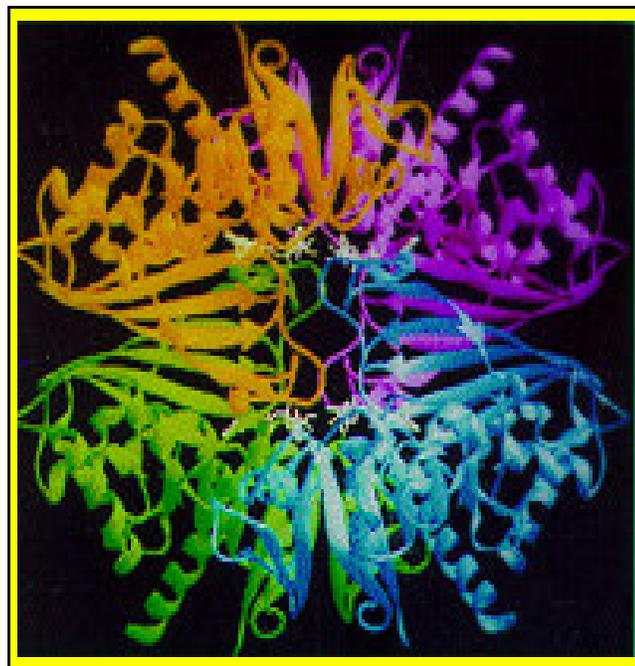
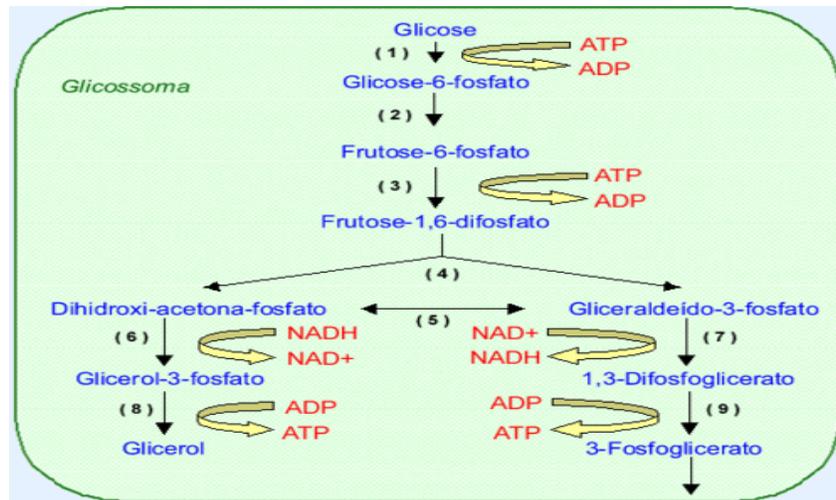


Figura1-7- Estrutura tridimensional da enzima gGAPDH (SOUZA et al., 1998)



Esquema 1-1- Esquema da glicólise ocorrida no glicossomo do *T. cruzi*

As enzimas de 1 a 9 são as glicossomais do parasita: (1) hexoquinase; (2) glicose-6-fosfatoisomerase; (3) fosfofrutoquinase; (4) frutose-difosfatoaldolase; (5) triose-fosfatoisomerase; (6) glicerol-3-fosfato desidrogenase; (7) gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH); (8) glicerolquinase; (9) fosfoglicerato quinase; (10) fosfogliceratomutase.

1.7. Leishmaníases

São doenças causadas por um grande número de espécies do gênero *Leishmania* e estão classificadas de acordo com sintomas clínicos e espécies causadoras em três principais tipos: Leishmaníase Cutânea, Mucocutânea e Visceral.

Todas são transmitidas por flebotomíneos pertencentes ao gênero *Phlebotomus*. Quando a picada de um destes insetos infectado introduz promastigotas na pele, os parasitas se proliferam como amastigotas nos macrófagos e no endotélio dos capilares e outros pequenos vasos das regiões contíguas. A lise dos amastigotas ocorre logo após a ativação dos macrófagos por linfócitos sensibilizados. Uma reação granulomatosa resulta na formação de um nódulo localizado, o qual se transforma em úlcera quando o suprimento de sangue para o local fica prejudicado devido ao dano induzido pelo parasita. Uma infecção piogênica, geralmente de pouca importância, desenvolve-se na base da úlcera aberta e, à medida que a imunidade do hospedeiro aumenta, a úlcera cicatriza. Observa-se o aumento no volume dos nodos linfáticos regionais (MARKELL et al., 2003).

O parasita, cujos alvos são macrófagos e células dendríticas, tem seu nome em homenagem ao pesquisador W. B. Leishman que, juntamente com Donovan,

primeiramente descreveu o protozoário responsável pelo Calazar indiano. No continente americano, foi Gaspar Viana, em 1909, no Instituto Oswaldo Cruz, que correlacionou as lesões conhecidas como Úlcera de Bauru ou ferida brava ao mesmo gênero de protozoário, o qual recebeu o nome de *L. braziliensis* (MARKELL et al., 2003).

Estas doenças estão espalhadas em 22 países do Novo Mundo e 66 países do Velho Mundo, não sendo encontradas apenas no Sudeste da Ásia. Produzem 1,98 milhões de indivíduos desabilitados, 57 mil mortes anuais; 1,5 milhões de novos casos por ano, sendo que 350 milhões de pessoas vivem nas áreas de risco. Só o tipo visceral tem 500 mil casos anuais registrados (Leishmaníases, 2002).

1.7.1. Leishmaníase Cutânea

É endêmica em 88 países de 4 continentes, mas 90 % dos casos se concentram no Irã, Nepal, Síria, Arábia Saudita, Brasil, Peru, Armênia, Azerbaijão, Turcomenistão, Uzbequistão, Afeganistão, Índia e Quênia (Leishmaníases, 2002).

A Leishmaníase Cutânea é conhecida no Velho Mundo como Botão do Oriente e é produzida por leishmânias que pertencem ao complexo *L. tropica*. Caracteriza-se pela produção de lesão seca que ulcera somente depois de vários meses, sendo geralmente unitária, mas podendo chegar ao número de 200, e ocorrendo principalmente na face, deixando cicatrizes horríveis. O cão pode ser um hospedeiro natural (MARKELL et al., 2003).

No Novo Mundo, esta doença é causada por espécies do complexo *L. mexicana*. É encontrada em Belize, Península de Yucatán, Guatemala, Mato Grosso, Venezuela e Bacia Amazônica. Pode se transformar na forma cutânea difusa, com pápulas de formato irregular que se assemelham às lesões da lepra lepromatosa e não se curam espontaneamente (MARKELL et al., 2003).

O tratamento se dá através do Estilbogluconato Sódico (gluconato sódico de antimônio, Pentostam), menos tóxico que os antimoniais pentavalentes mais antigos. É o mais eficaz composto atualmente disponível para o tratamento de todas as leishmaníases cutâneas. Seu mecanismo de ação se baseia na oxidação dos ácidos graxos das formas amastigotas da leishmânia e na inibição das enzimas glicolíticas. Uma dessas enzimas é a fosfofrutoquinase (PFK), a qual catalisa a fosforilação da frutose-6-

fosfato (F-6-P) pela adenosina trifosfato (ATP). Essa atividade inibitória sobre a enzima é exercida por mecanismo competitivo junto ao substrato F-6-P, resultando no acúmulo deste, ao mesmo tempo em que ocorre a redução da concentração do metabólito frutose-1,6-difosfato (FDP) e adenosina difosfato. Assim, como os parasitas consomem grande quantidade de glicose como fonte de energia para exercer suas funções vitais, a depleção do teor de FDP acarreta inibição da glicólise. Portanto, os parasitas morrem em consequência do baixo consumo de carboidratos. A PFK do hospedeiro também é afetada, mas sua sensibilidade a antimoniais é aproximadamente 80 vezes menor do que a do parasita (ZANINI & OGA, 1982).

Tosse, cefaléia e vômitos são os efeitos colaterais mais freqüentes da quimioterapia com antimoniais. Na América Latina este medicamento é substituído pelo Antimoniato de Meglumina (Glucantime, Figura 1-8). A Anfotericina B tem sido utilizada em pacientes que não respondem aos antimoniais pentavalentes, porém uma alternativa menos tóxica é o uso do Cetoconazol (inibidor da biossíntese de esteróis).

Uma vacina combinada (*L. amazonensis* morta pelo calor mais bacilo de Calmette-Guerin [BCG] viável) foi avaliada quanto a sua eficácia na imunoterapia para a leishmaníase cutânea americana num estudo clínico no qual participaram 217 pacientes. A cura clínica foi de mais de 90 % dos que receberam a vacina, sendo o tempo médio para a cura de 16 a 18 semanas, o qual é comparável ao do Glucantime. Porém a eficácia da vacina na profilaxia ainda não foi experimentada (MARKELL et al., 2003)

1.7.2. Leishmaníase Mucocutânea

Esta infecção é causada pela *L. braziliensis* e é encontrada no Brasil, leste do Peru, Bolívia, Paraguai, Equador, Colômbia e Venezuela. O aspecto que sobressai nesta doença, conhecida no Brasil como *espúndia*, é o desenvolvimento, em porcentagem variável de pacientes, de úlceras na mucosa oral ou nasal. As lesões cutâneas são múltiplas e podem se tornar muito grandes. Caso se desenvolvam ulcerações na mucosa, o avanço da infecção, embora lento, é constante. A não ser que um tratamento eficaz seja feito, toda a mucosa do nariz e a dos palatos duro e mole é eventualmente afetada. O septo nasal é destruído, mas diferentemente de lesões sífilíticas, o processo não envolve os ossos. A ulceração pode resultar em perda de todas

as partes moles do nariz, lábios, palato mole, e assim por diante. A morte ocorre, em geral, devido a infecções secundárias (MARKELL et al., 2003).

Vários roedores e cães do mato são os reservatórios naturais. Flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomia* e *Psychodopygus* são os vetores.

O tratamento também é através do Pentostam (Figura 1-8) com doses iniciais de 50 mg/Kg de peso corpóreo, intramuscular. O pamoato de cicloguanila (Camolar), um inibidor do ácido fólico, é eficaz quando administrado intramuscularmente nas quantidades de 300 mg para adultos e 280 mg para crianças de 1 a 5 anos de idade.

A anfotericina B (Fungizona, Figura 1-8) também apresenta bons resultados quando administrada intravenosamente. Porém, é freqüente ocorrer dano renal e depressão da medula óssea quando este medicamento é aplicado por períodos prolongados (MARKELL et al., 2003).

1.7.3. Leishmaníase Visceral

Amplamente conhecida por seu nome indiano calazar, é causada por parasitas do complexo *L. donovani*. Ao contrário daqueles que foram discutidos anteriormente, os parasitas que causam o calazar não estão confinados às células reticuloendoteliais dos tecidos subcutâneos e membranas mucosas, mas podem ser encontrados em todo o corpo (MARKELL et al., 2003).

Ocorre na Índia, Burma, Leste do Paquistão, Sumatra e Tailândia, bem como República Centro-Africana, Chad, Etiópia, Somália, Djibuti, Quênia entre outros (Leishmaníases, 2002).

Cães são os principais reservatórios e o vetor é o mosquito *Phlebotomus*.

Nas Américas Central e do Sul - Argentina, Bolívia, Brasil, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, El Salvador, Honduras e Guatemala - bem como no México e Guadalupe das Antilhas, a leishmaníase visceral é quase sempre causada pela *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Afeta principalmente crianças. Os cães, raposas e gatos domésticos são os reservatórios naturais. O vetor é o mosquito *Lutzomyia* (MARKELL et al., 2003).

As formas promastigotas do parasita se multiplicam no intestino do vetor e migram para a porção anterior deste, escapando pela probóscida quando o inseto se

alimenta. O período de incubação pode variar de 2 semanas a 18 meses. É freqüente o paciente se queixar de aumento do volume abdominal, sendo observadas, no exame, hepatomegalia e esplenomegalia (aumento do fígado e do baço). Algumas vezes o início é agudo e pode simular um ataque de malária. Outras vezes o paciente pode apresentar diarréia, sendo o início semelhante ao da febre tifóide. Ocorre anemia e perda progressiva de peso (MARKELL et al., 2003). Se a infecção não é tratada, pode causar de 75 a 95 % de mortes.

O tratamento se dá principalmente com o Pentostam, causando reações adversas severas, além de durar, no mínimo, 28 dias (20 mg/Kg/dia) e ser administrado parenteralmente, o que requer estrita supervisão médica. Somando-se a isto, o custo é alto, a resistência a antimoniais chega a 50 % e a eficácia é limitada (MARKELL et al., 2003).

A Índia, que é um dos berços da leishmaníase visceral, tem empregado um novo medicamento, a Miltefosina (1-*O*-hexadecilfosfocolina, da classe dos alquilisofosfolípídeos, Figura 1-8), que já vinha sendo usado na terapia da metástase cutânea de carcinomas mamários, porém com uso restrito, pois, na dosagem requerida, provoca uma série de efeitos colaterais graves como toxicidade renal, teratogenicidade e infertilidade, evidenciando ser citotóxica com pouca seletividade. No entanto, as doses necessárias para o tratamento da leishmaníase são muito menores e, como conseqüência, as reações adversas também, sendo em geral de ordem gastrointestinal (KAMINSKY, 2002). É o primeiro medicamento oral efetivo no tratamento da doença, inclusive de formas resistentes aos antimoniais, revolucionando o tratamento e controle do Calazar (Leishmaníases, 2002).

Seu mecanismo de ação ainda não está esclarecido, mas, por se tratar de um falso fosfolípídeo, é pouco sensível à ação hidrolítica das fosfolipases. O motivo químico para tal é que os fosfolípídeos são formados por ésteres de ácidos graxos (saturados ou insaturados) ligados a dois dos três grupos hidroxila do glicerol, estando o grupo hidroxila restante ligado a uma molécula de fosfato de colina (ou de etanolamina, de inositol, de serina etc). Assim sendo, este falso fosfolípídeo é capaz de competir com os fosfolípídeos verdadeiros enganando as enzimas. Em decorrência deste fato, diversas hipóteses já foram levantadas quanto ao seu modo de ação no parasita: interferência na transdução de sinais através da membrana citoplasmática, na

biossíntese do glicosilfosfatidilinositol, no metabolismo da alquilglicero-fosfocolina e na síntese de novo da fosfatidilcolina através da via Greenberg. Além disso, o tratamento com Miltefosina promove a ativação dos macrófagos, com conseqüente aumento na produção de NO e anticorpos monoclonais, resultando numa maior toxicidade para os parasitas (SARAIVA et al., 2002). Também é considerada como um inibidor seletivo na biossíntese de esteróis e fosfolipídeos dos Kinetoplastídeos (KAMINSKY, 2002).

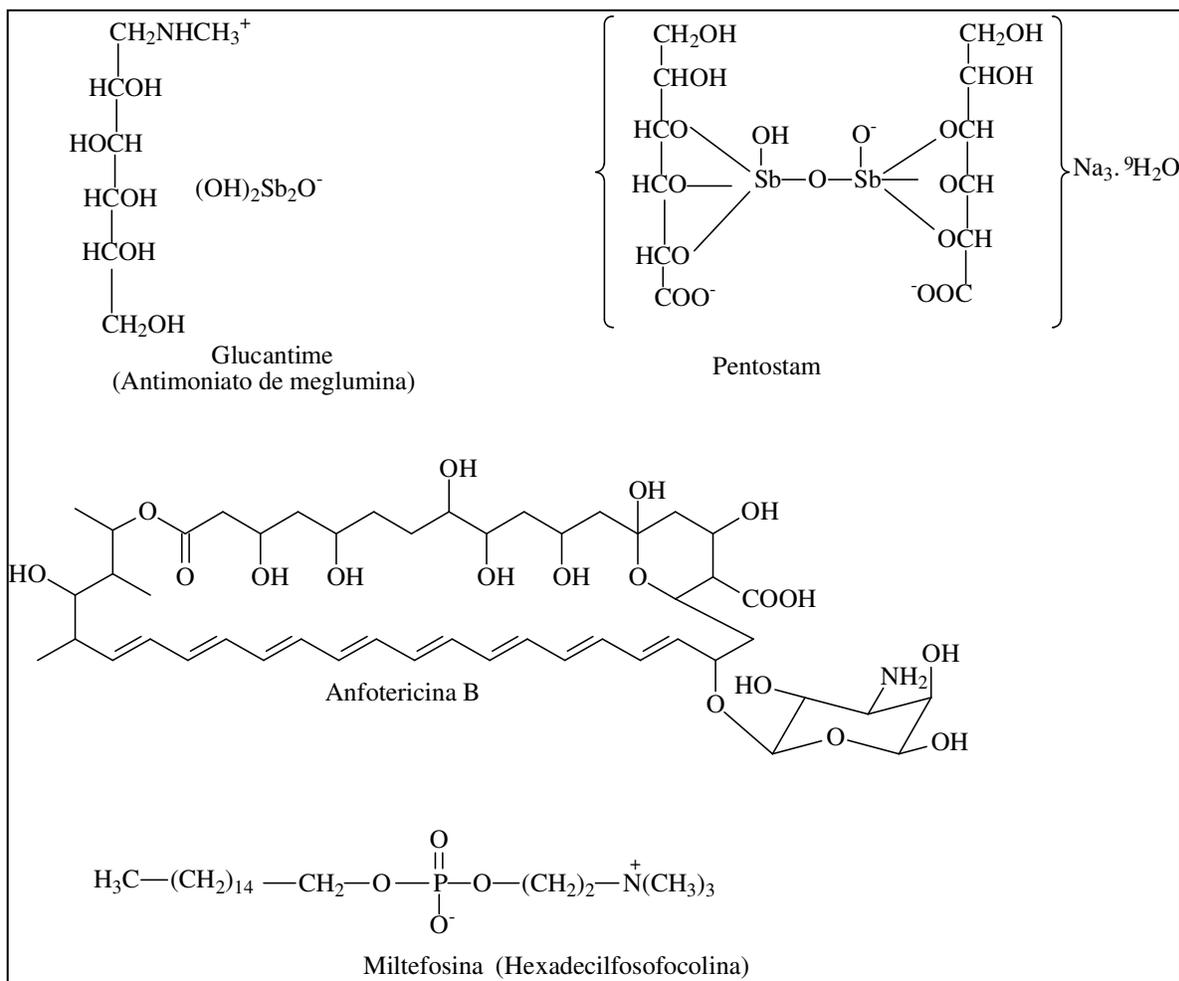
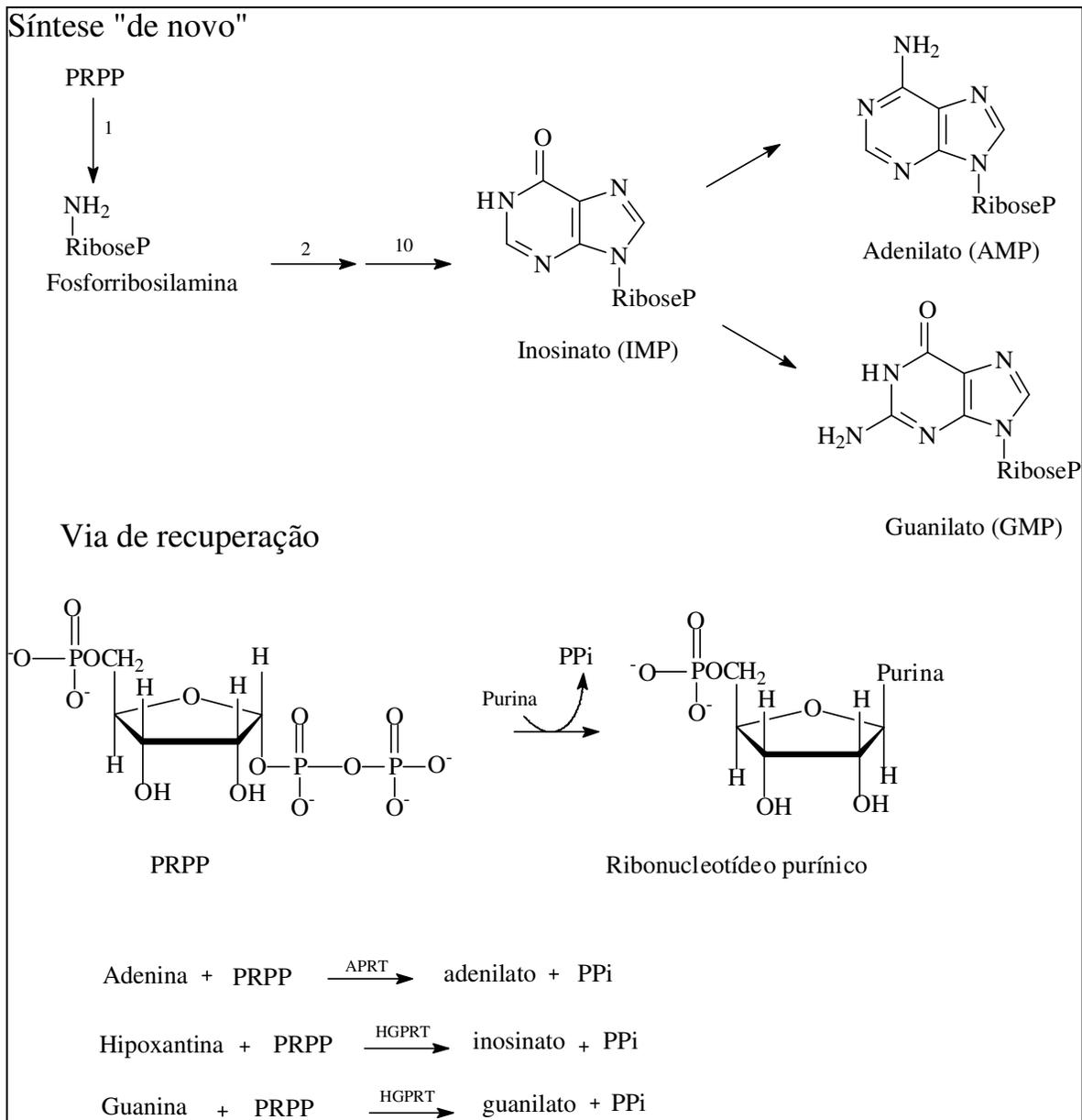


Figura 1-8- Estruturas químicas dos compostos empregados no tratamento de Leishmaníases

1.7.4. Fosforribosiltransferases (PRTases) de *Leishmania*

O metabolismo de purino-nucleotídeos, imprescindíveis na formação do DNA e RNA, de uma grande variedade de espécies de parasitas difere significativamente daquele do hospedeiro humano. Neste, os purino-nucleotídeos podem ser sintetizados por duas vias metabólicas. A primeira delas envolve um conjunto de dez reações seqüenciais catalisadas por enzimas, levando à “síntese de novo” dos purino-nucleotídeos a partir do precursor PRPP (fosforribosilpirofosfato), resultando na síntese do anel purínico e na formação do monofosfato de inosina (IMP), o qual é, por sua vez, convertido ao monofosfato de adenosina (AMP) e monofosfato de guanosina (GMP). A segunda via, “reação de poupança ou de recuperação”, consiste na formação dos nucleotídeos purínicos a partir das bases purínicas livres (adenina, guanina e hipoxantina) provenientes da degradação hidrolítica de ácidos nucléicos e nucleotídeos. Nesta reação, a porção ribose fosfato do PRPP (pirofosfato de fosforribosila) é transferida a uma base purínica para formar o ribonucleotídeo correspondente, sendo catalisada por enzimas da família das fosforribosiltransferases. A adenina fosforribosiltransferase (APRT) é específica para a formação do AMP, enquanto a hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT) catalisa a formação do IMP e GMP (Esquema 1-2; NELSON & COX, 2000).

Os protozoários do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma* são auxotróficos para purino-nucleotídeos, ou seja, não são capazes de sintetizá-los pela via “de novo”, dependendo do hospedeiro mamífero para obtê-los a partir da via “de recuperação”, sendo inteiramente dependentes das enzimas desta via durante seu ciclo de vida. Tal fato despertou o interesse de muitos pesquisadores para o estudo destas enzimas como alvos potenciais para a descoberta de novas substâncias que combatam as leishmaníases.



Esquema 1-2- Vias metabólicas para a síntese de purino-nucleotídeos

O Laboratório de Cristalografia de Proteínas do Instituto de Física da Universidade de São Paulo *campus* São Carlos (IFSC/USP) mantém uma linha de pesquisa dedicada ao estudo estrutural de enzimas e proteínas da *L tarentolae*, espécie isolada em lagartos e de toxicidade nula aos seres humanos. O Dr. Otávio Thiemann realizou a clonagem e caracterização da enzima APRT desta espécie (THIEMANN, 1998). Além disso, a mesma enzima teve sua estrutura cristalográfica recentemente determinada (SILVA, 2001). Analisando-se cuidadosamente o

sequenciamento dos aminoácidos da APRT de *L. tarentolae*, juntamente com os seus sítios ativos, pode-se notar grande semelhança com a proteína homóloga de *L. donovani*, revelando diferenças em apenas 35 resíduos. Com identidade de 85 % nas seqüências de aminoácidos, além de se tratarem de proteínas homólogas, deduziu-se que suas estruturas tridimensionais são similares e que as informações obtidas nas pesquisas com a APRT de *L. tarentolae* poderão ser utilizadas na triagem de novos agentes contra as leishmaníases humanas.

1.7.5. Produtos naturais leishmanicidas

Na Bolívia, algumas plantas são empregadas popularmente para o tratamento das leishmaníases, como, por exemplo, a *Tesseria integrifolia* (Arecaceae), *Jacaranda glabra*, *Tanaecium nocturnum* (Bignoniaceae), *Bowdichia virgiliodes* (Fabaceae), *Irbalchia alata* (Gentianaceae), *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), *Piper laevilimum* (Piperaceae), *Galipea longiflora* (Rutaceae), *Brugmansia arborea* (Solanaceae), de uso externo somente, com as partes das plantas sendo reduzidas a pó ou maceradas e aplicadas sobre as feridas em forma de compressas ou sendo administradas na forma de banhos (BOURDY et al., 2000).

Muitos produtos naturais têm sido testados contra formas promastigotas de *L. major*. A dilactona germacreno 16,17-diidrobraqicalixolídeo (Figura 1-9) mostrou Cl_{50} de 17 $\mu\text{g/mL}$ contra 67 $\mu\text{g/mL}$ do Pentostam, porém foi altamente tóxica aos linfócitos humanos na mesma concentração (OKETCH-RABAH et al., 1998). Algumas saponinas também foram testadas, como a α -hederina, sendo altamente efetivas em concentrações similares à pentamidina, no entanto foram tóxicas aos macrófagos no mesmo nível que o Glucantime. O uso de saponinas como fármacos é limitado pela baixa biodisponibilidade, reduzida absorção no trato gastrointestinal e toxicidade hemolítica quando administradas por via parenteral (KAYSER et al., 2002). Um grande número de chalconas foi testado e submetido à análise QSAR quanto ao seu efeito contra formas promastigotas de *L. donovani* e atividade supressora de linfócitos, tendo a licochalcona (Figura 1-9) apresentado Cl_{50} de 13 e 48 μM respectivamente (NIELSEN et al., 1998). O iridóide arbortristosídeo A (Figura 1-9) foi 57 % ativo contra *L. donovani*

quando administrado oralmente na dose de 100 mg/Kg/dia x 5, sendo que o Pentostam é 75 % ativo numa dose 10 vezes menor (TANDON et al., 1991).

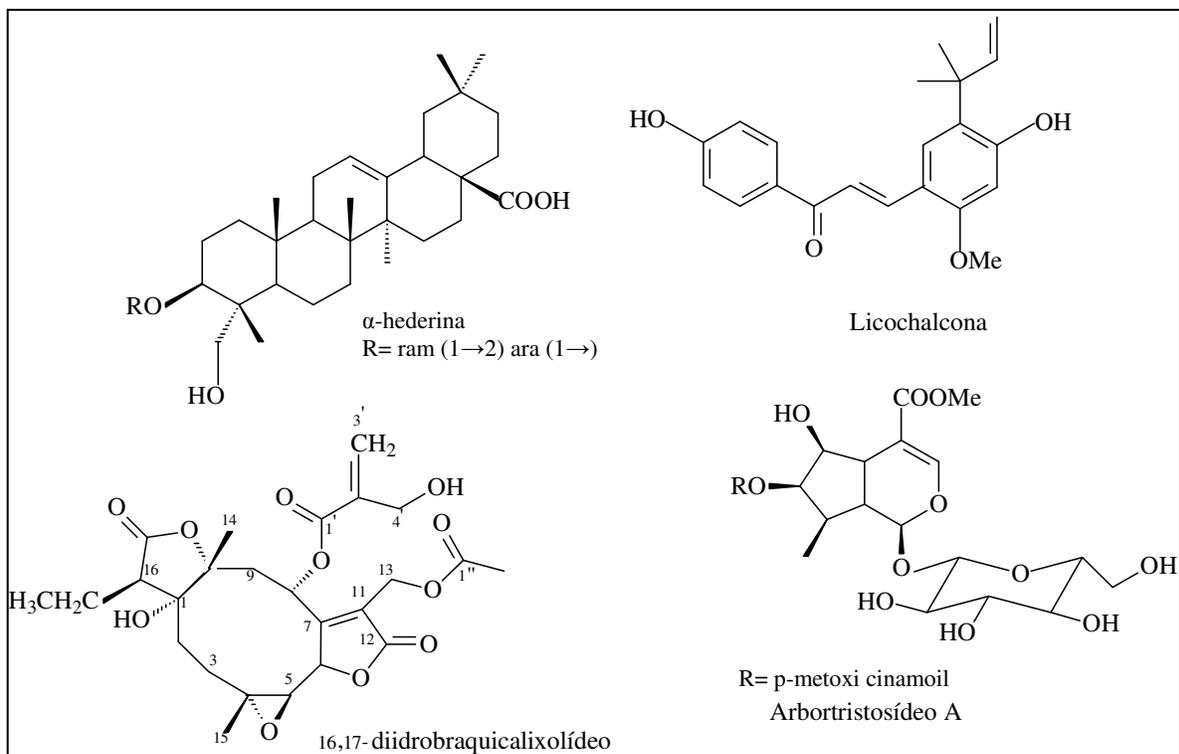


Figura 1-9- Produtos naturais com atividade leishmanicida

1.8. Insetos

A maioria dos insetos é fitófaga, isto é, alimenta-se de plantas, e sua atividade exerce forte influência sobre o equilíbrio ecológico. Apesar de existir aproximadamente um milhão de espécies de insetos já classificadas, apenas alguns milhares são considerados “pragas” e, destes, somente cerca de 500 causam grandes danos às plantas.

Acredita-se que todos os insetos foram inicialmente herbívoros polifágicos, isto é, alimentavam-se de plantas de diversos tipos. A especialização deles em determinados tipos de plantas só teria ocorrido em fases posteriores do processo evolutivo (CRAVEIRO & MACHADO, 1986). Neste processo existem vários tipos de substâncias que desempenham o papel de mensageiros químicos no mecanismo co-evolucionário e estão classificadas dentro de dois grupos: os FEROMÔNIOS, que agem

entre indivíduos da mesma espécie (intraespecíficos) como atraentes sexuais, marcadores de trilhas, propiciadores de comportamentos de agregação, alarme, dispersão, entre outros; os ALELOQUÍMICOS, que agem entre espécies (interespecíficos) e se diferenciam de acordo com o organismo que está sendo beneficiado na comunicação. Os aleloquímicos estão classificados de acordo com sua atuação: os alomônios são benéficos aos organismos que os produzem; os cairomônios beneficiam os organismos a que se destinam; os sinomônios favorecem tanto o agente emissor quanto o receptor do sinal químico e os apneumônios são liberados por material em decomposição e atraem principalmente insetos coprófagos e saprófagos. Uma mesma substância aleloquímica pode apresentar diversas funções de acordo com a variedade de indivíduos envolvida na interação, como é o caso de uma interação tri-trófica (planta-herbívoro-inimigo natural), onde a substância liberada atua como cairomônio, se atrai um determinado herbívoro ou é fagoestimulante para este; como alomônio, se repele insetos fitófagos, reduz os processos digestivos ou é tóxica para os mesmos; como sinomônio, se atrai inimigos naturais do herbívoro o qual está atacando-a (FERREIRA et al., 2001).

Para que um inseto possa usar uma planta como hospedeira, é necessário que ocorra a sequência de cinco etapas complementares: localização da planta, reconhecimento da mesma, aceitação do inseto e adequação inseto/hospedeira. Tudo indica que, nessas cinco etapas, não só os produtos de valor nutricional, mas também os metabólitos secundários, desempenham papel destacado. Alguns podem ser repelentes (agem à distância), supressantes (inibem o ato de provar o alimento), deterrentes (inibem a alimentação ou oviposição), intoxicantes (causam intoxicações crônicas ou agudas) e redutores da digestão (inibem a utilização dos alimentos). Todos os componentes devem estar presentes no tempo apropriado e na quantidade exata. A resistência de uma planta ao ataque de insetos decorre do rompimento de qualquer um dos elos da sequência normal de eventos (CRAVEIRO & MACHADO, 1986).

1.8.1. Inseticidas

Os insetos têm sua função no equilíbrio ecológico, mas também, desde tempos remotos, vêm causando prejuízos ao homem, sejam como transmissores de

doenças ou como destruidores de lavouras ou grãos estocados e não é por acaso que os insetos figuram, no livro de Êxodo da Bíblia, como uma das “pragas do Egito”. Na prática milenar da agricultura, o homem sempre teve de se haver com esse flagelo e, há muito, se empenha em evitar que ele destrua alimentos e outros vegetais. O cultivo de uma única ou de algumas espécies em grandes extensões de terra – fornecendo aos insetos biomassa abundante e contínua – facilitou ainda mais sua ação nefasta (VILELA et al., 1989).

Os inseticidas, os quais estão arrolados dentro dos termos agrotóxico ou defensivo agrícola, são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, destinadas a matar, controlar ou combater de algum modo os insetos que atacam, lesam ou transmitem enfermidades às plantas, aos animais e ao homem (ZAMBRONE, 1986).

O uso mundial destas substâncias foi introduzido a partir da década de 1940. Seus benefícios – em especial no controle de insetos que transmitem doenças ao homem – são inegáveis. Em contrapartida, ao longo de 60 anos de uso, muitas desvantagens também se evidenciaram, entre elas a de representarem riscos para o ser humano e o meio ambiente. Vários produtos chegaram a ter seu uso abolido, tal a sua periculosidade, como o ALDRIN (organoclorado), LINDANE (organofosforado), PARATION (organofosforado), entre outros, devido à longa persistência no solo, na água e nos organismos vivos, comprometendo toda a cadeia alimentar, além de serem altamente cancerígenos (SANTIAGO, 1986).

Nos primórdios de seu uso, os inseticidas tinham amplo espectro de atividade e exterminavam indiscriminadamente tanto as pragas como os insetos benéficos ao homem. Devido a este fato, os insetos foram adquirindo resistência a essas substâncias, significando a aplicação de maiores quantidades e maiores danos ecológicos e poluição ao meio ambiente. Verificou-se que a simples introdução de substâncias mais tóxicas não garantia o controle total das pragas a médio ou curto prazo, mas só piorava as condições de poluição ambiental e da saúde dos agricultores (FERREIRA et al., 2001).

O conhecimento adquirido com o passar dos anos, levou à descoberta dos mecanismos naturais de adaptação inseto-planta. O respeito a estes mecanismos exigiu o desenvolvimento de substâncias menos tóxicas e tem favorecido a busca de inseticidas de origem natural, devido à crença pública de que os produtos naturais são mais seguros que os sintéticos. Apesar desta crença não ser sempre cientificamente comprovada, o

mercado permite preços especiais para produtos “naturalmente produzidos”, o que vem estimulando a pesquisa e desenvolvimento de inseticidas naturais nos laboratórios de pesquisa de Universidades e Indústrias em todo o mundo.

Para um inseticida natural ser comercialmente viável, ele não pode ser apenas eficaz, mas deve preencher uma série de requisitos como: seletividade contra inimigos naturais (baixa toxicidade ambiental), baixa toxicidade em mamíferos, biodegradabilidade e ausência de fitotoxicidade. Entre os critérios práticos que devem ser preenchidos, têm-se: fonte de matéria-prima abundante (se for planta, por exemplo, que seja de fácil cultivo e o princípio ativo esteja nos frutos, proporcionando uma exploração extrativa, mas não destrutiva); baixo custo e potencial para patentear a tecnologia de obtenção dos compostos inseticidas (FERREIRA et al., 2001).

1.8.2. Inseticidas de origem natural

Os inseticidas derivados de produtos naturais foram muito utilizados até 1940, sendo principalmente usado o alcalóide nicotina (Figura 1-10) – extraído das folhas de *Nicotiana tabacum* e *N. rústica* (Solanaceae) e precursor da imidacloprida – associado à nornicotina e anabasina (*Anabasis aphylla*, Chenopodiaceae; Figura 1-10). O surgimento dos inseticidas sintéticos – que foram desenvolvidos a partir da II Guerra Mundial – acabou substituindo por completo os agentes naturais por serem muito mais potentes.

A retomada dos inseticidas naturais nos últimos anos surgiu por vários motivos, entre eles a preocupação com o impacto ao meio ambiente e à saúde humana, sendo várias as fontes pesquisadas.

No passado, além da nicotina, figuravam entre as substâncias naturais inseticidas muito usadas as piretrinas, as rotenonas, a rianodina (*Ryania*, Flacourtiaceae; Figura 1-10), a sabadina (*Schoenocaulon officinale*, Liliaceae), entre outras (FERREIRA et al., 2001).

As piretrinas, ainda em uso, são ésteres extraídos das flores de crisântemos, várias espécies do gênero *Chrysanthemum* (Asteraceae). O que impulsionou a utilização e pesquisa das piretrinas e piretróides, substâncias sintéticas modeladas a partir das piretrinas naturais, foi sua baixa toxicidade aos mamíferos e alta eficiência no

combate aos insetos. Porém, as piretrinas têm baixa estabilidade fotoquímica e térmica (fato que impede de serem usadas na agricultura) e, como os piretróides, podem desencadear reações alergizantes como asma e bronquite em crianças, já que são os inseticidas mais usados em ambientes domésticos, na forma de sprays ou em aparelhos, ligados à tomada, no quarto de dormir, onde a substância é gradativamente liberada. Isto promove a inalação contínua do inseticida, costume que tem originado vários problemas relacionados ao aparelho respiratório, como asma e bronquite (ZAMBRONE, 1986).

Os rotenóides, apresentando a rotenona (Figura 1-10) como principal substância inseticida, são homoflavonóides, compostos polioxigenados com um grupamento cetônico no seu esqueleto básico e que podem ser encontrados em vários gêneros de Leguminosas, como *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea*.

A rotenona, em condições de campo, também é degradada pela luz, calor e pelo contato com o ar, de forma consideravelmente rápida (FERREIRA et al., 2001).

Atualmente, muito se tem pesquisado para se descobrir substâncias naturais com atividade inseticida com modos alternativos de ação. Uma substância pode matar diretamente o inseto (ação inseticida propriamente dita); pode inibir o seu apetite (ação fago-inibidora) e matá-lo indiretamente de fome; pode atrasar seu ciclo evolutivo, impedindo o acasalamento e, conseqüentemente, a propagação da espécie; pode gerar insetos deformados, entre outras formas (RODRIGUEZ, 1990).

Não há uma classe específica, ou com um perfil estrutural, de substâncias para que a atividade se manifeste. Num estudo feito com 140 espécies de plantas chilenas (LABBÉ et al., 2000), foram isolados compostos da classe dos cromenos (benzopiranos e benzofuranos), sesquiterpenos lactonas, furanoclerodanos e flavonas substituídas que apresentaram atividade fago-inibidora. Alguns óleos essenciais de espécies de *Vitex* (Verbenaceae) têm apresentado atividade inseticida (LEITÃO et al., 1999). O isolamento de duas naftoquinonas (Figura 1-10) da *Calceolaria andina* L. (Scrophulariaceae) com alta atividade inseticida e baixa toxidez oral e dérmica aos mamíferos resultou numa patente dos referidos compostos como praguicidas (KHAMBAY et al., 1999a). A piranociclohexenodiona ericifolia (Figura 1-10), isolada da espécie *Kunzea ericifolia* (Myrtaceae), apresentou atividade inseticida (KHAMBAY et al., 1999b). Uma mistura de sete diterpenos do grupo labdano (SERRANO et al., 1999), inibidores do crescimento larval de uma lepdóptera, foram isolados da planta *Hyptis spicigera*

(Lamiaceae). Os limonóides, como a azadiractina (Figura 1-10), são conhecidos pelo fato de apresentarem atividade em insetos tanto interferindo no crescimento quanto através da inibição alimentar e são substâncias presentes nas famílias Rutaceae e Meliaceae (FERREIRA et al., 2001). Do estudo químico da espécie *Dimorphandra mollis* (Caesalpinaceae), tóxica às abelhas na época da floração, isolou-se o flavonóide astilbina, o qual provocou 100 % de letalidade no bioensaio com abelhas após 12 dias (CINTRA et al., 2002; Figura 1-10).

É sabido que o conceito de um “inseticida ideal” ainda constitui uma utopia e, dentro de uma determinada lógica, este tipo de produto, por si só, nunca conseguiria a completa solução das infestações de insetos na agricultura. Mesmo um produto natural, com todas as qualidades possíveis e desejáveis, pode repetir o “desastre” que ocorreu há cerca de 40 anos com o DDT e outros. A natureza e seus próprios mecanismos acabam se adaptando e advém a resistência. Por isso, é importante a constante pesquisa nesta área, mantendo-se uma consciência e respeito a todos os requisitos exigidos e ainda aos que surgirão, à medida que o conhecimento cresce.

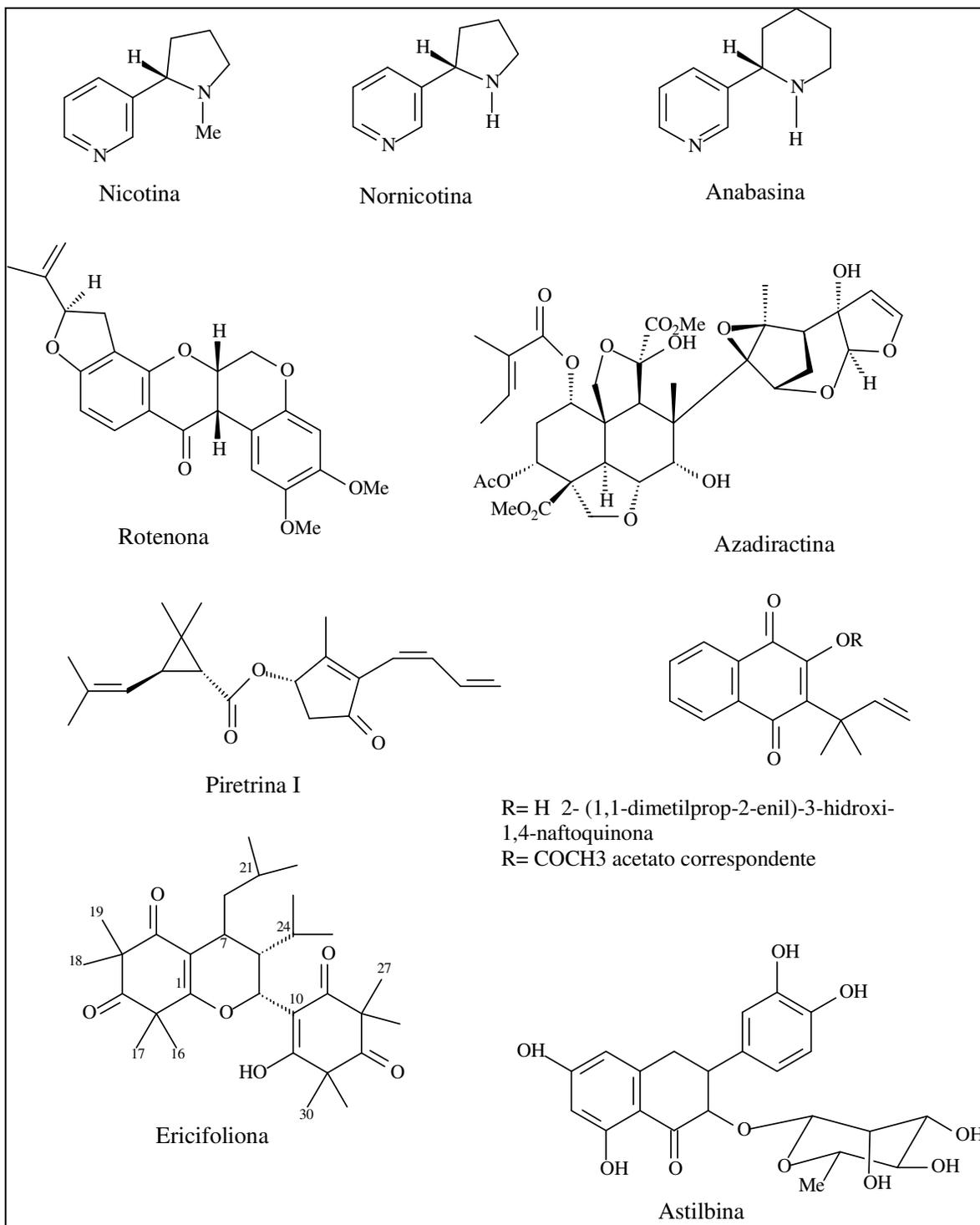


Figura 1-10- Produtos naturais com atividade inseticida

2.Objetivos

Este projeto visou colaborar com o conhecimento fitoquímico e das atividades biológicas das plantas brasileiras, coletadas em Poços de Caldas - MG, *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) e *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) através da busca de princípios bioativos. Para tanto, foram propostos os seguintes passos:

1- Preparação dos extratos hexânicos, metanólicos e hidrometanólicos das diversas partes dos vegetais a serem estudados.

2- Fracionamento e isolamento das substâncias constituintes dos extratos, através de métodos convencionais como cromatografia em coluna de vidro, camada delgada preparativa, de gotas em contra-corrente de alta velocidade, CLAE e partição.

3- Identificação e elucidação das estruturas destes constituintes químicos por métodos físicos instrumentais (UV, IR, EM, RMN ¹³C, RMN ¹H, COSY homo e heteronuclear, NOESY e outros) e químicos (obtenção de derivados ou modificação estrutural).

4- Realização dos ensaios biológicos e bioquímicos para verificação das possíveis atividades:

- a) Tripanocida, verificada *in vitro*
- b) Inibidora enzimática, frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*
- c) Inibidora enzimática, frente à enzima APRT de *L. tarentolae*
- d) Inseticida, verificada *in vitro*, sobre *Spodoptera frugiperda*
- e) Inseticida, verificada *in vitro*, sobre *Atta sexdens rubropilosa*
- f) Inibidora enzimática, frente à enzima pectinase de *Leucoagaricus gongilophorus*, fungo simbiote de *A. sexdens rubropilosa*
- g) Fungicida sobre *Leucoagaricus gongilophorus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus laurentii*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Trichosporon cutaneum*
- h) Bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Micrococcus roseus*

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e materiais utilizados

**Solventes utilizados na preparação dos extratos e em cromatografia CCD e CCV: solventes comerciais destilados no DQ-UFSCar como *n*-butanol; metanol, acetonitrila, tetrahidrofurano (THF) e ácido trifluoracético (TFA) para CLAE da Mallincrodt AR

**Fases estacionárias para cromatografia:

Sílica gel 60, comum, (63-230 μm), Merck; Sílica gel 60 silanizada (23-70 mesh), Merck; Sílica gel “flash” (230-400 mesh / 0,04-0,06 mm); FLORISIL® (0,15-0,25 μm); SEPHADEX® LH-20 (dextrana hidroxipropilada) (Amersham Pharmacia Biotech); celulose microcristalina-VETEC química fina; XAD 7® (Aldrich Chemical Company, Inc.)

**Placas para CCDA e CCDP:

Placas de vidro 4,5 x 10,0 cm, 0,25 mm de espessura, com Aluminium oxide-G, Merck, preparadas no DQ-UFSCar; Cromatofolhas Al/TLC 20,0 x 20,0 cm, com sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck; Placas de vidro 24,0 x 20,0 cm, cobertas com sílica comum / gesso, preparadas no DQ-UFSCar

**Solventes para RMN:

Deuterados da Merck e Aldrich

3.2. Equipamentos

3.2.1. Separação de substâncias em geral

** Cromatógrafo de contra-corrente de alta velocidade centrífuga HSCCC, P. C. Inc ser. # 403, coluna preparativa de 80 ml, injetor de 1 ml. Bomba LC -10AD (SHIMADZU LIQUID CHROMATOGRAPHY)

**Evaporador rotativo Buchi-rotavapor R-114

**Ultra Sonic Cleaner – UNIQUE USC 1400

**Coluna Lobar GROBE β (310-25)- Lichroprep Si 60 (40-83 μm) com bomba Delivery pump LP-1100 / Eyela-Tokyo Rikakikai Co., LTDA ou LAB PUMP Jr / MODEL RHSY (Fluid Metering Inc.)

**SHIMADSU LC-8A, Preparative Liquid Chromatography acoplado ao detector espectrofotométrico SHIMADSU SPD-GAV UV-VIS

**Coluna polimérica preparativa SHODEX Asahipak GS-310 (álcool polivinil octadecanoílico/ ODPVA), 2,5 cm DI x 50,0 cm

**Coluna fase reversa preparativa C18 (octadecilsílica) Hypersil ODS, 30,0 cm x 2,5 cm DI

**Coluna fase reversa analítica C18 spherical 5 μ /Waters, 150,0 mm x 4,6 mm DI

**Coluna Hibar NH₂ (5 μm) analítica, 150,0 mm x 4,6 mm DI

3.2.2. Análise das substâncias

**Luz UV Spectroline-Longlife TM filter, com Câmara cromato-UV, Ultra - Violet Products, INC.

**Espectrômetro de RMN Bruker ARX-200 e Avance DRX-400

**Espectrômetro Micromass Quattro LC – triple quadrupole (ESI/APCI) - Micromass CE Instruments; equipado com Bomba PHOENIX 40). As análises foram feitas no modo de ionização por eletrospray, com amostras diluídas em MeOH grau analítico, inseridas via injetor (10 μL), utilizando-se como solvente de ionização MeOH, bombeado por uma seringa Carlo Erba Phoenix. O gás de nebulização e dissolvatação foi o N₂ (White Martins). Valores de voltagem do capilar de 3,9 ou 2,9 KV, cone 26-28 v, extrator 4v, RF da lente 0,23 v, temperatura da fonte 130°C, temperatura de dissolvatação 300°C. O programa para operação do equipamento, coleta e tratamento dos dados foi Masslynx 3,3 (Micromass).

**CG-EM – QP 500, SHIMADSU, com ionização química (voltagem de ionização de 70e⁻volts), coluna DB-5 da J. & W. Scientific e coluna HP-5MS da Agilent Technologies (30,0 m, 0,25 mm de diâmetro, espessura da fase estacionária de 0,25 μm)

- **Analisador elementar Fision Instruments, modelo EA 1108 (CHNS-O)
- **Aparelho Fusatom Brasil-430 série 389736
- **Espectrômetro de IR Bomem M-102 série SZM040012
- **Espectrômetro VARIAN CARY 500 SCAN/ UV-VIS-NIR

3.2.3. Quantificação da 20-hidroecdisona

**SHIMADSU LC-10AD, Preparative Liquid Chromatography acoplado ao detector espectrofotométrico SHIMADSU SPD-10AD UV-VIS, detector UV com arranjo de diodo, autoinjeter SHIMADSU SIL-10AF, 2 bombas SHIMADSU LC-10AD e controladora CBM -10A . O sistema foi operado e as análises adquiridas e processadas utilizando-se o programa CLASS LC10.

- **Coluna 5µ/Luna hexil/fenil 250,0 mm x 4,6 mm DI
- **Coluna 10µ/Luna hexil/fenil 150,0 mm x 4,6 mm DI
- **Cartucho Supelclean LC-18 1 mL para extração em fase sólida
- ** Filtro PHENOMENEX-AFO-0415. 2NY
- ** Empacotadora de coluna SHANDON Southern Products, LTD.
- ** Câmara de filtração a vácuo para cartucho spe (extração fase sólida) de micro extração VARIAN
- ** Bomba de vácuo TE-058 Tecnal

3.2.4. Ensaio com enzima pectinase

- **Agitador de tubos Phoenix AP 56
- **Eppendorf Centrifuge 5417 R
- **Espectrofotômetro Beckman DU 640
- **Espectrofotômetro UV-1650 PC/SHIMADZU
- **Controlador de temperatura das reações enzimáticas CPS-Controller/SHIMADZU

3.3. Métodos

3.3.1. Colunas cromatográficas

Para o fracionamento dos extratos estudados, foram utilizados diversos métodos cromatográficos (MARSTON & HOSTETTMAN, 1994; MOHRIG et al., 1998; HOSTETTMAN et al., 1986; TOUCHSTONE, 1992) tais como cromatografia de adsorção em sílica gel comum para as substâncias de baixa e média polaridade (CCV, CLV); cromatografia de exclusão com SEPHADEX LH-20 (HENKE, 1995; CARDELLINA, 1983); cromatografia de contra-corrente (FOUCAULT, 1991) e cromatografia de adsorção em sílica silanizada para as substâncias mais polares (CCV), usando CLAE (BIDLINGMEYER, 1992; HARBORNE, 1988; CASS & DEGANI, 2001) para purificação de frações, etc. Foram usadas colunas de vidro com tamanhos e diâmetros variados, dependendo das quantidades de extratos a serem fracionadas.

Nos fracionamentos em geral, optou-se geralmente pela técnica de eluição gradiente e a isocrática foi usada conforme conveniência.

Nos fracionamentos de extratos hidroalcoólicos, usou-se o método de partição líquido-líquido ou a cromatografia de adsorção usando-se a resina polimérica não iônica Amberlite® XAD-7 e também SEPHADEX LH-20.

3.3.2. Cromatografia de CCDA e CCDP

Estas técnicas (MATOS, 1997) foram utilizadas para monitoramento das frações e subfrações obtidas das separações por colunas cromatográficas. Para análise em CCDA foram utilizados os seguintes reveladores:

Radiação UV (254 e 360 nm)

Vapor de iodo

Borrifação com solução de vanilina em H₂SO₄/MeOH e aquecimento

Borrifação com solução de Na₂CO₃ 20% e reagente de FOLIN (eluição com *n*-BuOH/HAc/H₂O (4:1:5 ou 5:1:4) para frações provenientes de HSCCC e CLAE dos extratos e frações mais polares

Solução ácida de FeCl₃

3.3.3. “Cromatografia de Spins”

Em 1992, Morris e Johnson desenvolveram uma técnica analítica não invasiva, baseada na metodologia dos ecos de spin com gradientes de campo magnético pulsado (PFGSE), que permite discriminar e caracterizar os diversos componentes de uma mistura. Esta técnica foi denominada DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) e se baseia nos diferentes coeficientes de difusão das substâncias (SOUZA & LAVERDE, 2002). Foi usada em nosso trabalho para identificar flavonóides em mistura.

3.4. Espectrometria de absorção no UV

A adição de reagentes de deslocamento a uma solução metanólica de compostos aromáticos, um flavonóide, por exemplo, provoca deslocamentos nos máximos de absorção (λ) do espectro de ultra-violeta que são considerados diagnóstico para a atribuição de certos grupos hidroxilas livres (ROITMAN & JAMES, 1985; VOIRIN, 1983; WOLFENDER, 1993).

3.5. Espectrometria de massas, IV e RMN

Estes métodos foram usados na determinação estrutural das substâncias (KEMP, 1986; BREITMEYER & VOELTER, 1987; BREITMEYER, 1993; SILVERSTEIN, 1991; AGRAWAL, 1989).

3.6. Coleta do Material

As plantas foram primeiramente coletadas em julho de 2000, numa mata próxima à área de mineração de bauxita da ALCOA, Retiro Branco, Poços de Caldas-MG a 46°30' de longitude e 21°46' de latitude. Posteriormente, frutos da *V. polygama* foram coletados no Bairro do Teixeira, Poços de Caldas, em maio de 2002 e galhos em abril de 2004. Todas as coletas foram realizadas pela autora.

A *V. polygama* teve sua identificação taxonômica confirmada pela professora Fátima Regina Salimena-Pires, da Universidade Federal de Juiz de Fora - MG, em cujo herbário está depositada uma exsicata.

A *S. densiflora* teve sua identificação taxonômica confirmada pelo professor Marcos Sobral, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - RS. Uma exsicata de número 1 está depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo-SP.

4. Estudo fitoquímico de *Vitex polygama* Cham.- Experimental

4.1. Preparação dos extratos brutos

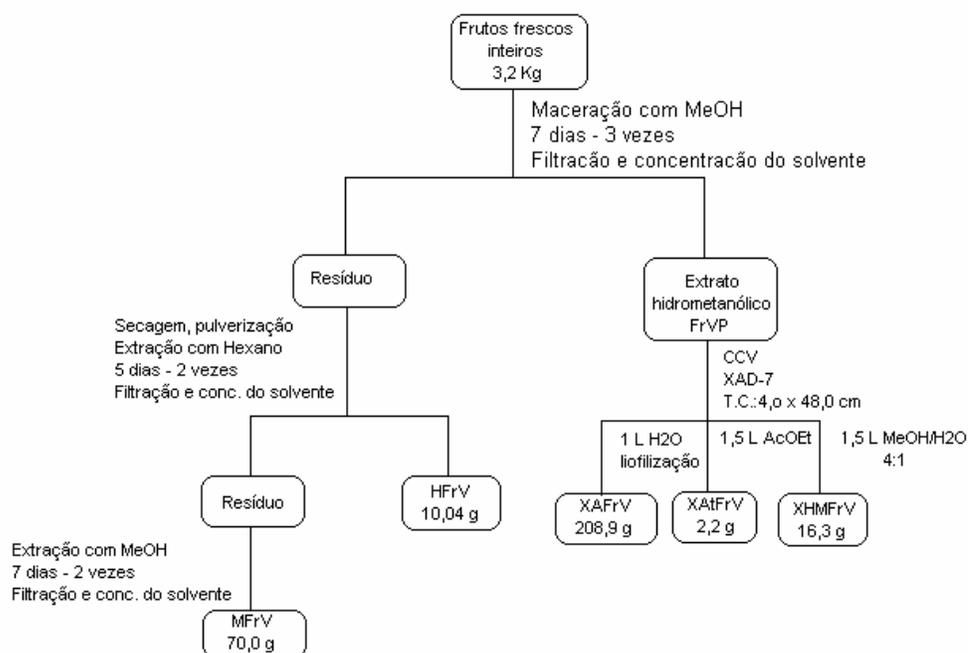
As respectivas partes vegetais foram coletadas e submetidas à secagem em estufa de circulação de ar entre 45-55°C e pulverizadas em moinho elétrico tipo Willey. Os pulverizados foram extraídos com hexano, metanol e solução MeOH/H₂O destilada 1:1. A extração com hexano foi realizada durante 12 dias (trocando o solvente de 6 em 6 dias) à temperatura ambiente e em repouso. A extração com MeOH foi realizada da mesma forma, sendo os extratos filtrados e concentrados em rotaevaporador. Na extração hidroalcoólica, o resíduo a ser extraído foi dividido em 3 partes e, a cada parte, foram adicionados 200 mL da solução MeOH/H₂O 1:1. Essa mistura foi levada ao ultra som para agitação por 10 minutos e depois filtrada e concentrada em rotaevaporador, sendo essa operação repetida por 6 vezes. Após esse procedimento, o extrato aquoso obtido foi liofilizado. Os resultados podem ser observados na Tabela 4-1.

Tabela 4-1- Extratos brutos de *V. polygama*

Material vegetal seco (g)	Solvente	Massa de extrato obtida (g)	Código
Folhas (423)	hexano	5,1	HVF
	metanol	40,4	MVF
	MeOH/H ₂ O 1:1	31,0	HMVF
Frutos (171)	hexano	1,1	HVFr
	metanol	2,0	MVFr
	MeOH/H ₂ O 1:1	0,9	HMVFr
Galhos (415)	hexano	0,85	HVG
	metanol	19,3	MVG
	MeOH/H ₂ O 1:1	2,3	HMVG

Foi realizada uma segunda coleta de frutos para se obter maior quantidade de extrato. Os frutos foram colocados frescos dentro de um recipiente e deixados em maceração com MeOH por uma semana para retirada do excesso de açúcar e água (operação repetida 3 vezes; o extrato obtido foi denominado extrato

hidrometanólico). Logo após, foram submetidos à secagem e moagem e macerados com hexano e metanol, respectivamente. O extrato hidrometanólico desta segunda extração foi adsorvido em XAD-7 e eluído com água (1L), MeOH/H₂O 4:1 (1,5 L) e AcOEt (1,5 L). Ver fluxograma abaixo.



4.2. Fracionamento dos extratos brutos de *V. polygama*

4.2.1. Extrato hexânico dos frutos

1,1 g foi submetido a CCV ($\Phi \times h = 3,0 \times 15,0$ cm) sendo que a F.E. foi sílica comum e a F.M. hexano, quantidades crescentes de AcOEt até MeOH, obtendo-se 25 frações. A fração HFr1 foi identificada, através de CG-IE (biblioteca eletrônica de compostos) como uma mistura de hidrocarbonetos: eicosano; hexatriacontano e tetratriacontano. As outras frações foram analisadas por CCDA, sendo constituídas de outras misturas de hidrocarbonetos não identificados.

4.2.2. Extrato hidrometanólico dos frutos

900 mg foram dissolvidos em 300 mL de água destilada e submetidos a partição líquido-líquido com AcOEt e *n*-BuOH (3 x 300 mL cada) e as frações obtidas foram concentradas no rotaevaporador e depois secas na capela de exaustão, à temperatura ambiente. O resíduo aquoso foi liofilizado. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4-2.

Tabela 4-2- Resultados da partição líquido/líquido do extrato hidrometanólico de frutos

Extrato (mg)	Solvente	Massa obtida (mg)	Código
900	AcOET	120	AHMFVr
	<i>n</i> -BuOH	184	BHMFVr
	resíduo aquoso	522	RHMFVr

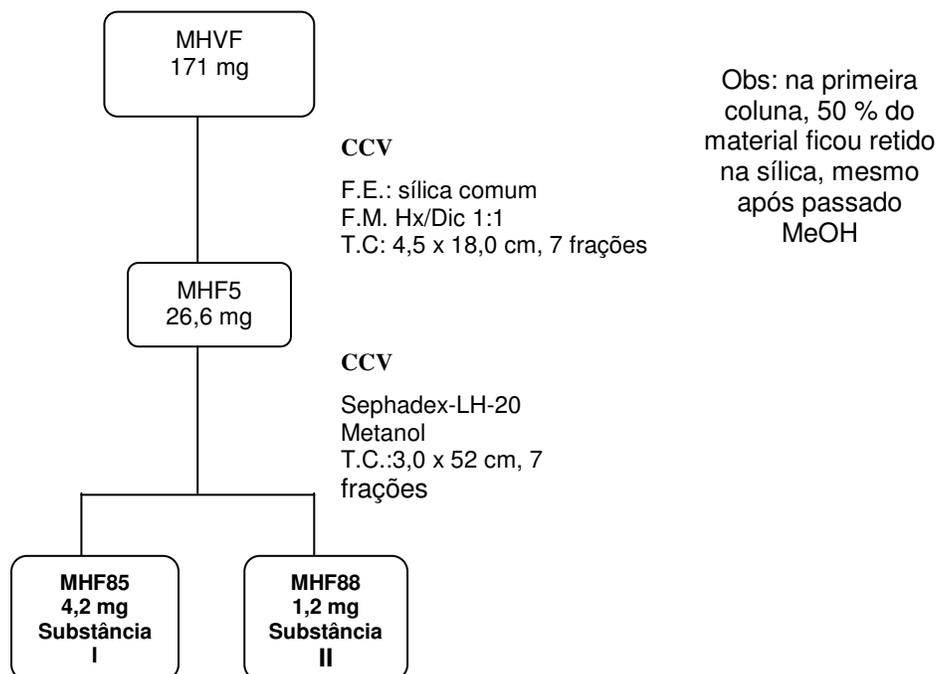
4.2.3. Extrato hexânico das folhas

5,1 g foram submetidos a CLV em funil de placa sinterizada (Φ x h= 6,5 x 30,0 cm), utilizando-se hexano, diclorometano, AcOET e MeOH como eluentes (1,5 L de cada) e sílica comum como fase estacionária. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4-3.

Tabela 4-3- Resultados da partição líquido/líquido do extrato hexânico de folhas

Extrato (g)	Solvente	Massa obtida (g)	Código
5,1	hexano	1,08	HHVF
	diclorometano	1,84	DHVF
	AcOET	1,94	AHVF
	MeOH	0,19	MHVF

4.2.4. Fração metanólica do extrato hexânico de folhas



4.2.5. Extrato hidrometanólico das folhas

31 g foram dissolvidos em 500 mL de água destilada e submetidos à partição líquido-líquido com AcOET e *n*-BuOH (5 x 300 mL cada) e as frações obtidas foram concentradas no rotaevaporador e depois secas na capela de exaustão, à temperatura ambiente. O resíduo aquoso foi liofilizado. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4-4.

Tabela 4-4- Resultados da partição líquido/líquido do extrato hidrometanólico de folhas

Extrato (g)	Solvente	Massa obtida (g)	Código
31	AcOET	2,2	AHMF
	<i>n</i> -BuOH	10,7	BHMF
	resíduo aquoso	22,6	RHMF

4.2.6. Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos de galhos e folhas

Cada extrato, MVG e MVF, foi misturado a uma solução de MeOH/H₂O 1:3 e deixado no ultra-som até se dissolver completamente. Depois foi submetido à partição líquido-líquido usando-se os solventes diclorometano e acetato de etila (3 x 250 mL cada) e as frações obtidas foram concentradas no rotaevaporador. Após isto, foram deixadas na capela de exaustão para completar a secagem. O resíduo aquoso foi liofilizado. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4-5 e Tabela 4-6.

Tabela 4-5- Resultados da partição líquido-líquido do extrato metanólico de galhos

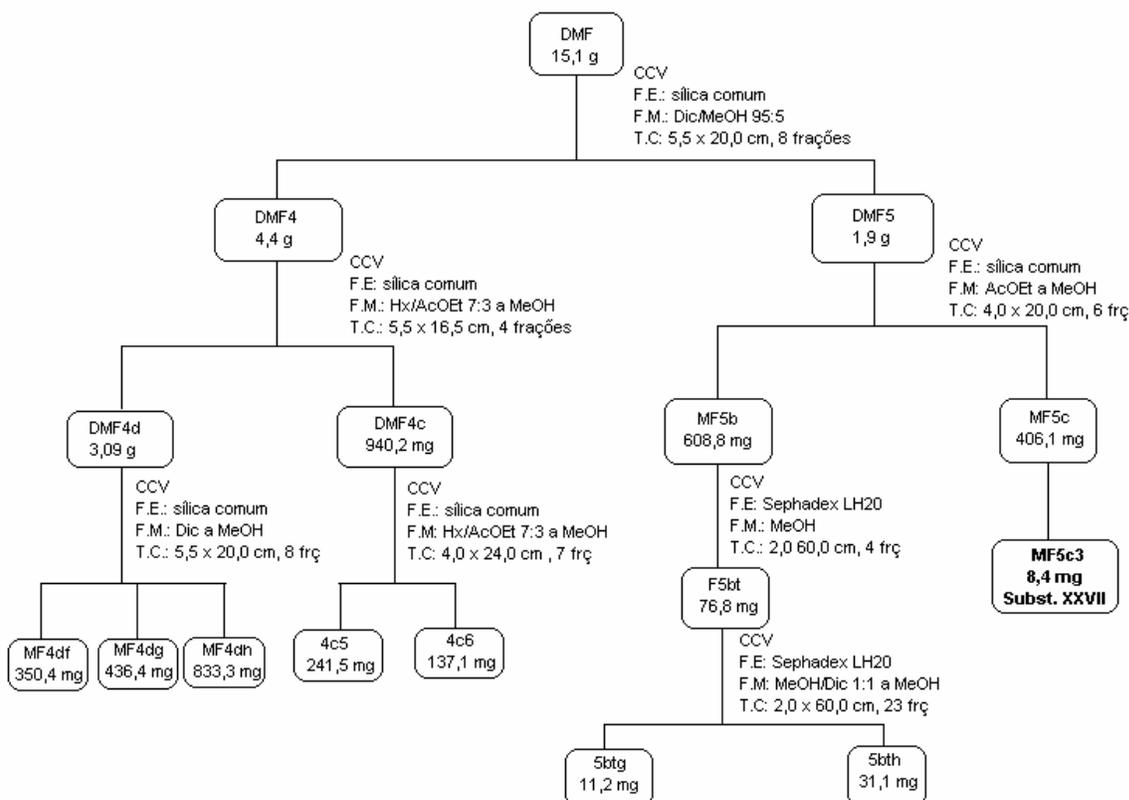
MVG (g)	Solvente	Massa obtida (g)	Código da fração
17,6	diclorometano	2,6	DMG
	AcOEt	3,9	AMG
	resíduo aquoso	8,4	RMG

Tabela 4-6- Resultados da partição líquido-líquido do extrato metanólico de folhas

MVF (g)	Solvente	Massa obtida (g)	Código da fração
38,1	diclorometano	15,1	DMF
	AcOEt	8,0	AMF
	resíduo aquoso	15,4	RMF

4.2.7. Fração em diclorometano do extrato metanólico de folhas

A fração DMF, 15,1 g, foi submetida a CCV (T.C. 5,5 x 20,0 cm) usando-se como F.E. sílica comum e F.M. inicial Dic/ MeOH 95:5 até MeOH. Após reunidas as frações semelhantes, foram obtidas 8 subfrações. Destas, duas subfrações, DMF4 e DMF5, foram escolhidas para sofrerem sucessivos refracionamentos, conforme fluxograma abaixo.

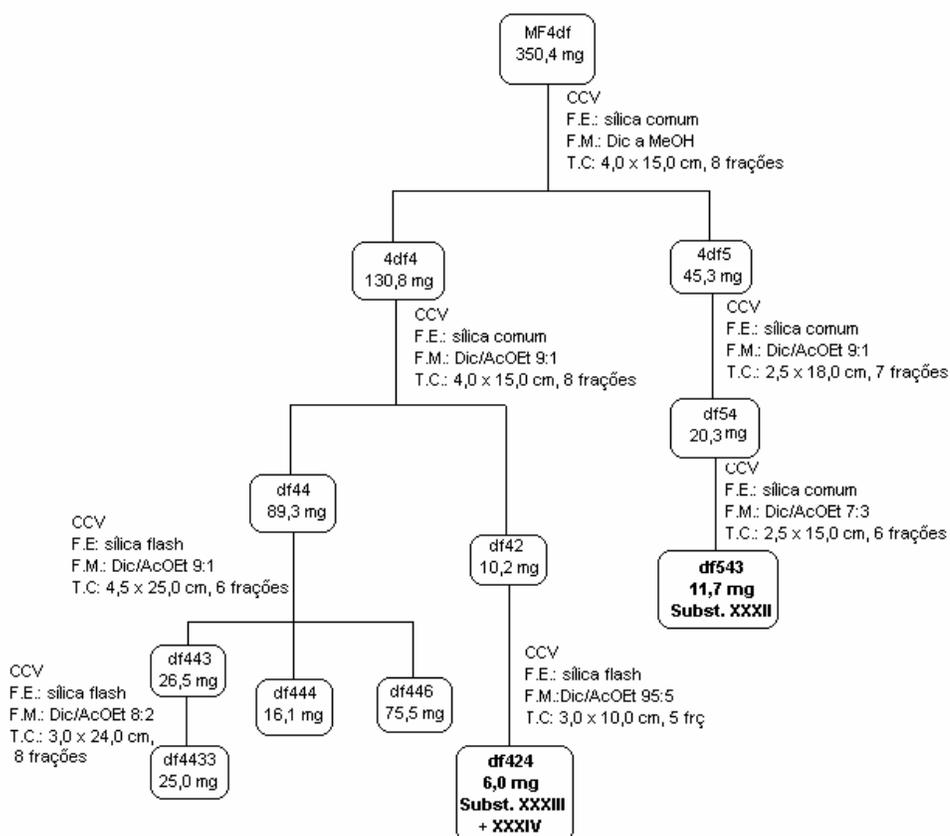


4.2.7.1. Obtenção Substância XXVII

A fração MF5c (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 406,1 mg, foi submetida a CCV (T.C. 4,0 x 24,0 cm) usando-se como F.E. sílica comum e F.M. inicial CH₂Cl₂/AcOEt 1:1 até MeOH. Após reunidas as frações semelhantes, foram obtidas 7 frações. A fração MF5c3, 8,4 mg, foi identificada como o 3-O-β-D-glucopiranosil sitosterol.

4.2.7.2. Obtenção da Substância XXXII e das Substâncias XXXIII e XXXIV em mistura

A fração MF4df (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 350,4 mg, sofreu refração conforme fluxograma abaixo.

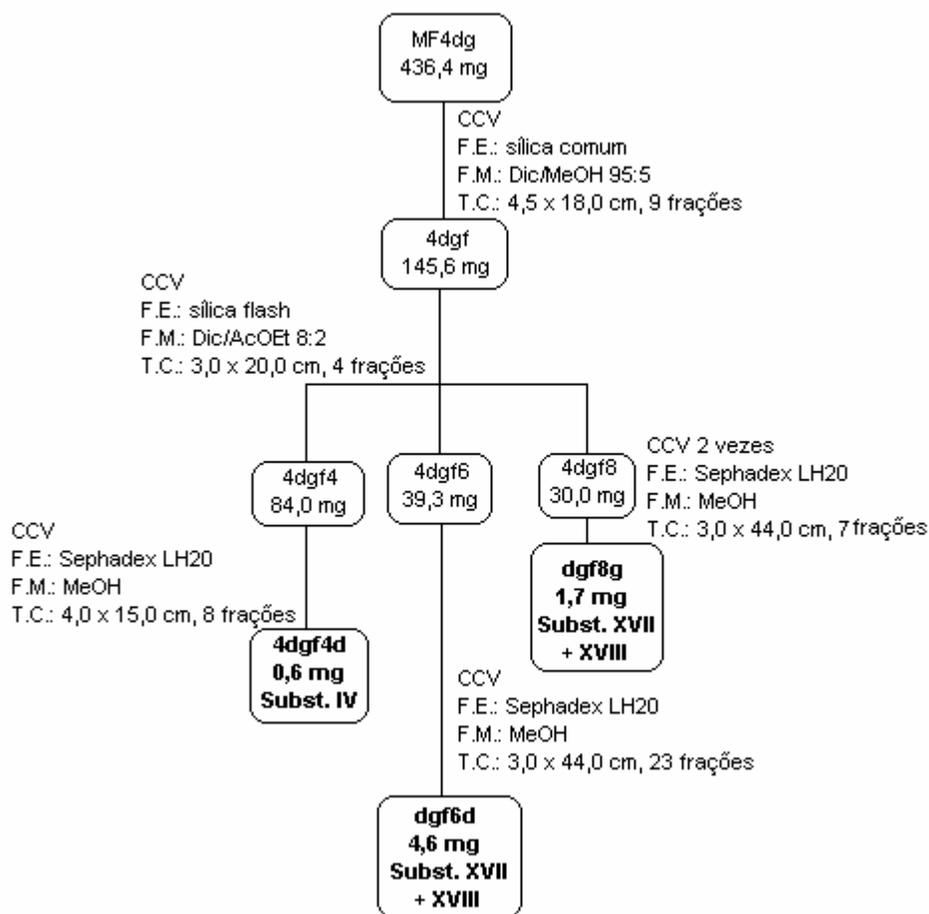


4.2.7.3. Obtenção da Substância III

A fração df446 (Vide fluxograma sessão 4.2.7.2), 75,5 mg, foi submetida a CCV (T.C. 2,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 5 frações. A fração df446T, 11,7 mg, foi submetida a CCV (T.C. 1,0 x 24,0 cm) usando-se como F.E. sílica flash e F.M. inicial Dic/AcOEt 8:2. Foram obtidas 3 frações. A fração df446Ta, 4,0 mg, foi identificada como a 3'-O-metiluteolina.

4.2.7.4. Obtenção da Substância IV e das Substâncias XVII e XVIII em mistura

A fração MF4dg (Vide fluxograma sessão 4.2.7) sofreu vários refracionamentos, como indicado no fluxograma abaixo.



4.2.7.5. Obtenção das Substâncias V e XXVIII

A fração df4433 (Vide fluxograma sessão 4.2.7.2), 25,0 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 55,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 10 frações. A fração df4433P, 0,6 mg, foi identificada como a 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Substância V). A fração df4433K, 5,1 mg, foi identificada como o ácido 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico (Substância XXVIII).

4.2.7.6. Obtenção da Substância VI

A fração 4c5 (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 241,5 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 7 frações. A fração 4c5I, 11,0 mg, foi submetida a CCV (T.C. 2,0 x 56,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 4 frações. A fração 4c5Iac, 0,8 mg, foi identificada como a casticina.

4.2.7.7. Obtenção das Substâncias VII e IX

A fração 5btg (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 11,2 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 13 frações. A fração 5btg20, 4,0 mg, foi identificada como a luteolina (Substância VII). A fração 5btg17, 1,0 mg, foi identificada como a 5,7,3',4'-tetraidroxi-3-metoxiflavona (Substância IX).

4.2.7.8. Obtenção da Substância VIII

A fração 4c5 (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 241,5 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 7 frações. A fração 4c5J, 11,3 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 5 frações, porém não houve a separação desejada, fato este observado no espectro de massas. No entanto, usando-se uma pré-coluna com fase G-ODS (4/8246) no momento da injeção da amostra, houve a separação (Figura 4-1). Logo, pensamos que poderíamos obter a mesma separação em escala preparativa, e as frações foram novamente reunidas e submetidas à CLAE reciclante, usando-se uma coluna preparativa com fase RP-ODS (30,0 x 2,5cm), λ 254 e 365 nm, fluxo de 3mL/min, eluição isocrática com MeOH/H₂O 1:1 e volume de injeção de 1mL. A amostra precipitou dentro da coluna e MeOH foi passado para retirá-la, coletando-se frações conforme picos observados no cromatograma da tela do monitor do cromatógrafo. As frações c5JK3 e c5JK5 eram mistura das Substâncias VI e VIII e a fração c5JK4, 1,5 mg, foi identificada como a 5,7,4'-triidroxi-3,3'-dimetoxiflavona (Substância VIII).

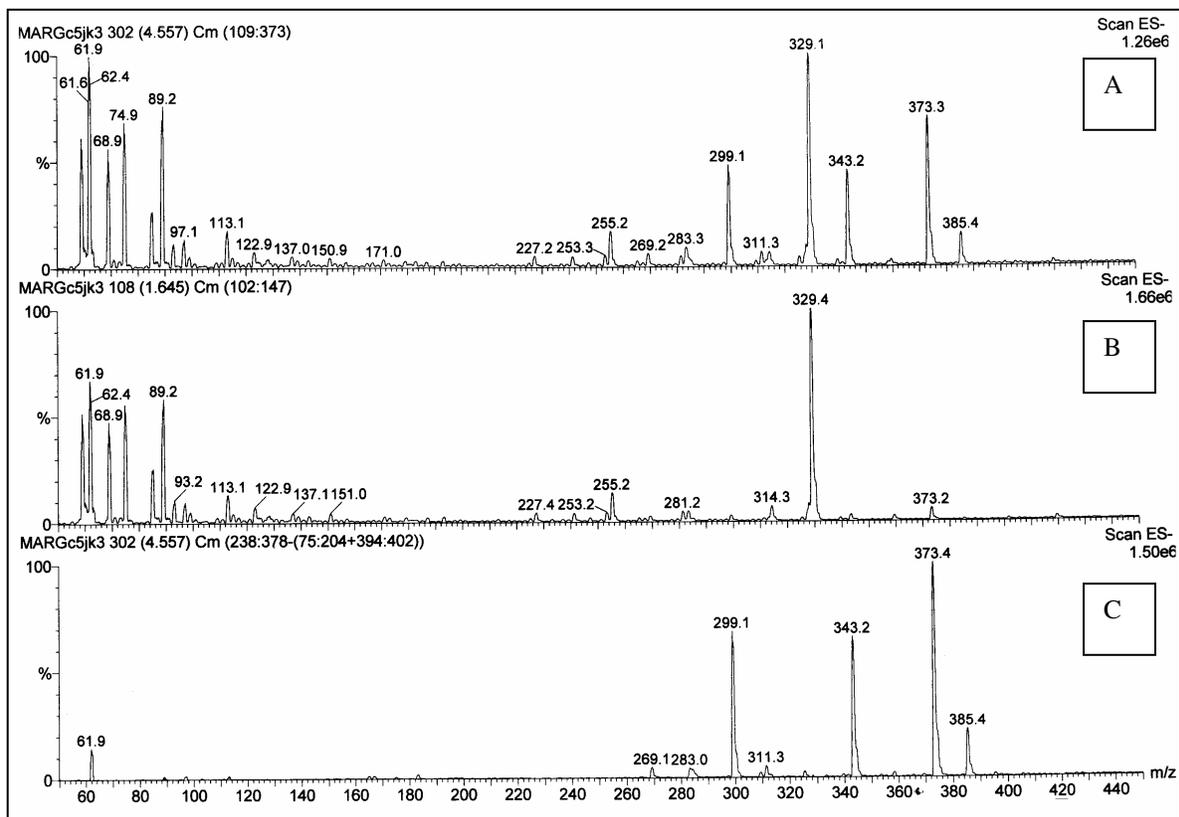


Figura 4-1- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias VI e VIII

Legenda da figura: A: espectro da mistura sem uso da pré-coluna G-ODS; B: espectro obtido após injeção da amostra usando-se a pré-coluna, a Substância VIII saiu separada; C: espectro obtido após lavagem da pré-coluna com MeOH, a Substância VI, que havia ficado retida na pré-coluna, saiu separada.

4.2.7.9. Obtenção das Substâncias XXX e XXXI em mistura

A fração MF4dh (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 833,3 mg, foi submetida a CCV (T.C. 4,5 x 18,0 cm) usando-se como F.E. sílica comum e F.M. inicial Dic/Ace 95:5. Foram obtidas 7 frações. A fração MF4dh5, 172,4 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 25,0 cm) usando-se como F.E. sílica flash e F.M. inicial CH₂Cl₂/Ace 9:1. Foram obtidas 7 frações. A fração 4dh5e, 49,8 mg, foi submetida a CCV, usando-se sephadex LH-20 (54,0 x 3,0 cm) como F. E. e MeOH como eluente. Foram coletadas 15 frações de 15 mL cada. Após reunidas as frações semelhantes, a fração dh5eX, 11,4 mg, foi

identificada como uma mistura dos ácidos 2 α ,3 β -diidroxiolean-12-en-28-óico e 2 α ,3 β -diidroxiolean-12-en-28-óico.

4.2.7.10.Obtenção das Substâncias XXVIII e XXIX em mistura

A fração df444 (Vide fluxograma sessão 4.2.7.2), 16,1 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 10,0 cm) usando-se como F.E. sílica flash e F.M. Dic/AcOEt 8:2 a MeOH. Foram obtidas 6 frações. Não houve uma boa separação, por isto a fração, agora denominada df4442, foi submetida a CCV (T.C. 2,5 x 32,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 6 frações. A fração df4442c, 9,7 mg, foi identificada como uma mistura dos ácidos 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico e 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico (Substâncias XXVIII e XXIX). A fração df4442e, 0,4 mg, foi identificada como a Substância V.

4.2.7.11.Obtenção das Substâncias XIX, XX e XXI em mistura

A fração 4c6 (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 137,1 mg, foi submetida a CCV (T.C. 2,5 x 32,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 4 frações. A fração 4c6l, 64,7 mg, foi identificada como uma mistura dos ácidos vanílico, *p*-hidroxibenzóico e 5-hidroxivanílico (Substâncias XIX, XX e XXI). Desta fração, 6,4 mg foram submetidos a CCDP, 20,0 x 20,0 cm, usando-se CH₂Cl₂/MeOH 9:1 como eluente. Foram obtidas as frações c6lab2 e c6lab3, 4,4 e 1,2 mg respectivamente, dos ácidos vanílico e *p*-hidroxibenzóico respectivamente (Substâncias XIX, XX).

4.2.7.12.Obtenção das Substâncias XXII e XXIII em mistura e XXIV e XXV em mistura

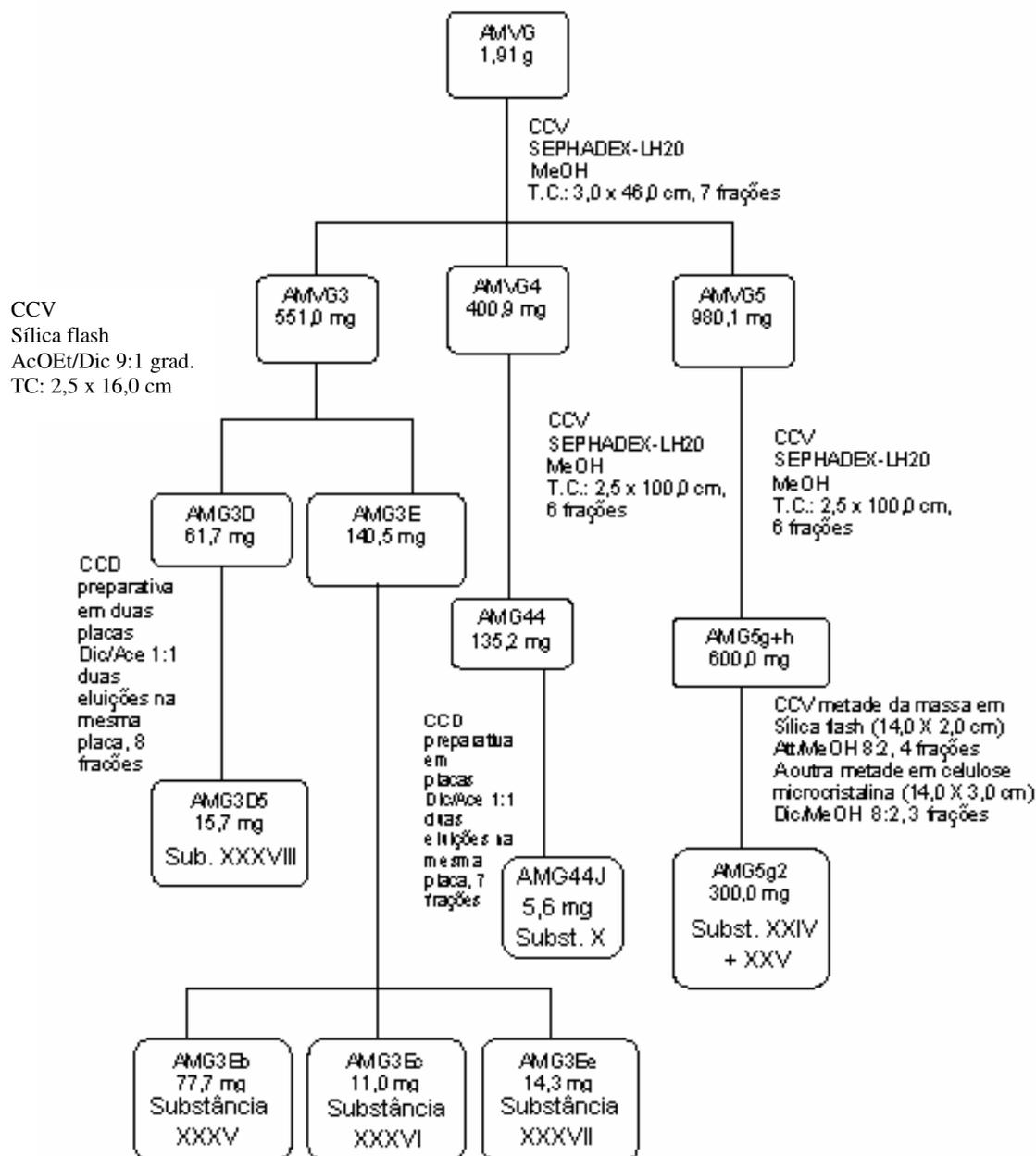
A fração 5bth (Vide fluxograma sessão 4.2.7), 31,1 mg, foi submetida a CCV, usando-se sephadex LH-20 (3,0 x 52,0 cm) como F.E. e MeOH como eluente. A fração 5bth2, 3,0 mg, foi identificada como uma mistura dos ácidos cafeico e protocatéquico (Substâncias XXII e XXIII). A fração 5bth3, 3,0 mg, como uma mistura

dos 6'-*O*-cafeoil- β e α -D-glicopiranosídeo (Substâncias XXIV e XXV) e a fração 5bth8, 1,9 mg, identificada como a Substância VII.

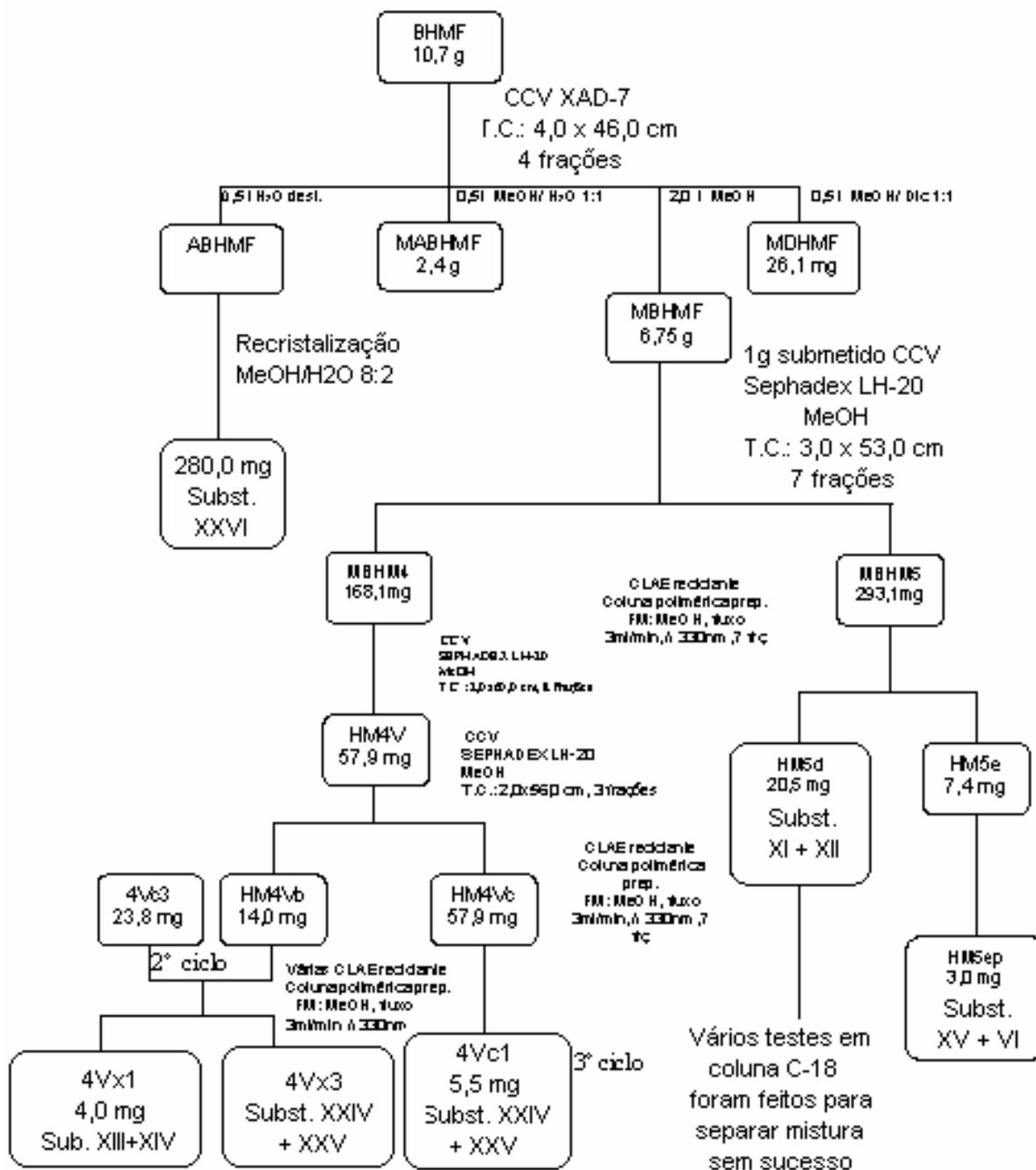
4.2.8. Fração em diclorometano do extrato metanólico de galhos

2,6 g da partição DMVG foram submetidos a CCV. A fração DMG5, 390,6 mg, foi submetida a CCV, usando-se sílica flash como fase estacionária (TC= 34,0 cm x 4,0 cm) e uma eluição gradiente, partindo-se de Dic/Hex/Ace 9:0,5:0,5; Dic/Ace 3:7 e MeOH. Após reunião das alíquotas semelhantes foram obtidas 19 frações. A fração DMG5L, 58,4 mg, foi identificada como o ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxiurs-12-en-28-óico (Substância XXXII).

4.2.9. Fração em acetato de etila do extrato metanólico de galhos

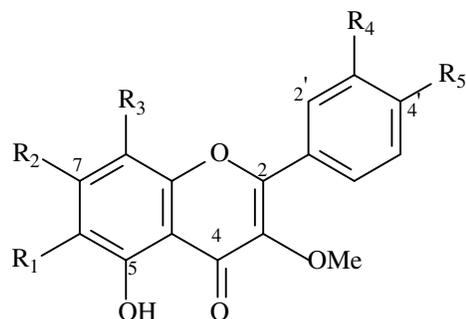
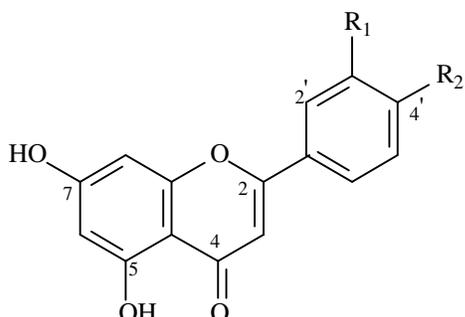


4.2.10. Fração em *n*-butanol do extrato hidrometanólico de folhas



5. Estudo fitoquímico de *Vitex polygama* Cham.- Resultados e Discussões

5.1. Identificação das Substâncias I a IX



	R ₁	R ₂	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Substância III (crisoeriol)	OMe	OH			H	H	OMe
Substância IV (acacetina)	H	OMe			H	H	OMe
Substância VII (luteolina)	OH	OH			H	H	OH
Substância I (4'-metoxipenduletina)	OMe	OMe			H	H	OMe
Substância II (5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona)	H	OMe			H	H	OMe
Substância V (3-metoxikaempferol)	H	OH			H	H	OH
Substância VI (casticina)	OMe	OMe			H	OH	OMe
Substância VIII (5,7,4'-triidroxi-3,3'-dimetoxiflavona)	H	OH			H	OMe	OH
Substância IX (3-metoxiquercetina)	H	OH			H	OH	OH

O extrato hexânico, partição metanólica de folhas de *V. polygama*, após sofrer várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu a fração MHF85, 4,2 mg (Substância I), e a fração MHF88 (Substância II), 1,2 mg. O extrato metanólico de folhas, partição diclorometânica, forneceu as frações df446Ta, 4,0 mg (Substância III); dgf4d, 0,6 mg (Substância IV); df4442e, 0,8 mg (Substância V); c5lac, 0,8 mg (Substância VI); F5bt20 4,0 mg (Substância VII); c5JK4, 1,5 mg (Substância VIII) e 5btG17, 1,0 mg (Substância IX). Todas as frações se apresentaram como um pó amarelo amorfo.

A análise dos espectros de RMN ^1H (Tabela 5-3) das substâncias I, II, V, VI, VIII e IX indicou serem de flavonas 3-metoxiladas, enquanto os espectros das substâncias III, IV e VII mostraram pertencerem à classe das flavonas, por apresentarem o sinal característico referente ao H-3.

Os espectros de RMN ^1H de sete das substâncias (II, III, IV, V, VII, VIII e IX) apresentaram sinais característicos de um sistema de acoplamento AB no anel A, correspondentes a dois hidrogênios que mantêm uma relação *meta* entre si (H-6 e H-8; J cerca de 2 Hz).

Os espectros de RMN ^1H das substâncias I, II, IV e V (Figuras 5-2, 5-4, respectivamente) revelaram, cada um, um par de sinais do tipo dubleto (J cerca de 9,5 Hz), típico de hidrogênios acoplados pertencentes a um anel B *para*-substituído (H-2' e 6'; H-3' e 5'). Já os espectros das substâncias III, VI, VII, VIII e IX (Figuras 5-8, 5-11, 5-14, 5-16 e 5-17) mostraram um modelo de multiplicidade entre três hidrogênios onde um deles acoplava com os outros dois, enquanto estes dois não acoplavam entre si. O valor médio das constantes de acoplamento (2 e 8,5 Hz) foi característico de acoplamento *meta* e *orto* de flavonóides com o anel B 3',4'-dissubstituído.

A presença do grupo hidroxila fortemente quelado no C-5 originou um sinal muito desblindado em todos os espectros de RMN ^1H (Tabela 5-3), com exceção da substância IV. A solução metanólica da Substância IX apresentou efeito batocrômico à adição tanto de acetato de sódio junto com ácido bórico, reagente de deslocamento específico para grupos *orto*-diidroxil, quanto de AlCl_3 (Tabela 5-1), o qual é característico para grupos hidroxilas quelados ou *orto*-diidroxil do anel B e instável na presença de HCl (VOIRIN, 1983), confirmando o padrão de substituição proposto.

Além dos modelos de substituição, os espectros de RMN ^1H forneceram o número de grupos metoxila em cada flavonóide. Segundo HARBORNE et al. (1975), o sinal de H-2' (da Substância VI) em δ 7,66, estando mais blindado que o sinal de H-6', em δ 7,72, é um indicativo de que um dos grupos metoxila se liga ao C-4'. Outra técnica utilizada para se caracterizar o grupo OH-4' livre foi a adição de metóxido de sódio a uma solução metanólica da Substância VI. A não observação, no espectro de UV (Tabela 5-1), de efeito hipsocrômico, de 38-70 nm, na banda I do flavonóide indicou que não havia hidroxila livre nesta posição (ROITMAN & JAMES, 1985).

Os espectros de massas de todas as substâncias, ESI modo negativo (Figuras 5-1, 5-3, 5-5, 5-9, 5-13, 5-15; Tabela 5-2), mostraram picos intensos relativos aos íons pseudo moleculares $[M-H]^-$ e também picos referentes a fragmentos originados da perda de grupos metoxila $[M-H-30]^-$, de água $[M-H-18]^-$, monóxido de carbono $[M-H-28]^-$ e da reação RDA. No caso das Substâncias I e VI, os fragmentos de RDA em m/z 151 e 221, juntamente com a perda de molécula de água, foram essenciais para a confirmação do número e posição de grupos metoxila no anel A (proposta de fragmentação da Substância VI na Figura 5-18, baseada nos fragmentos revelados no espectro Figura 5-10).

Somente a Substância III foi analisada através do espectro de RMN ^{13}C (Figura 5-7, Tabela 5-4). A substância foi confirmada como flavona devido deslocamentos característicos de C-2 (δ 164,9) e C-3 (δ 104,4), além do deslocamento em δ 183,1 (C-4), o qual reiterou a presença de carbonila quelada (ARRUDA, 1990). As flavonas 3-metoxiladas poderiam ter esta posição do grupo metoxila confirmada através do espectro de RMN ^{13}C , pois é conhecido (ROITMAN & JAMES, 1985) que grupos metoxila ligados a carbonos di-*orto* substituídos apresentam valores de deslocamento mais desblindados ($\sim \delta$ 60) em relação aos grupos metoxila atados a carbonos que suportam um ou nenhum substituinte na posição *orto* ($\sim \delta$ 55). Porém a quantidade destas flavonas foi muito pequena, o que impossibilitou a análise por esta técnica.

A Substância VI teve a posição de um dos seus grupos metoxila corroborada a partir do experimento de RMN NOEDIFF. Pode-se observar no espectro diferença (Figura 5-12) que a irradiação no sinal em δ 4,00 afetou significativamente o sinal em δ 6,86, sendo este então atribuído ao H-8. A irradiação dos outros sinais referentes aos outros grupos metoxila não provocou aumento observável nos espectros diferença. Porém, esperava-se que houvesse NOE dos sinais relativos aos H-2' e H-6' quando se irradiasse o sinal pertencente ao grupo metoxila ligado no C-3. O efeito NOE também não foi observado ao se realizar o mesmo experimento com as outras flavonas 3-metoxiladas.

A Substância III também foi submetida ao experimento de RMN NOEDIFF com irradiação do sinal referente ao grupo metoxila. Foi observado um aumento de

intensidade no sinal relativo ao H-2' (δ 7,64) no espectro diferença (Figura 5-6), confirmando a posição da metoxila em C-3'.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e nos dados relatados na literatura (referências na Tabela 5-2), foram propostas as estruturas das Substâncias I a IX (Tabela 5-1 a 5-5) conforme esquematizado acima. Com exceção das Substâncias VII e IX, todas são inéditas para a espécie.

Tabela 5-1- Dados dos espectros de absorção ultra-violeta das Substâncias VI e IX

Substância	UV máx (λ) nm			
	MeOH	NaOMe	AlCl ₃	NaOAc + H ₃ BO ₃
VI	249; 263; 336	263	259; 293 *; 361	-
IX	251; 263 *; 346	-	267; 298 *; 346 *; 424	255; 366

*ombro; -: experimento não realizado

Tabela 5-2- Dados dos espectros de massas, ESI modo negativo, das Substâncias I a IX

Substância	Referência	[M-H] ⁻ íon	Fragmentos neutros perdidos	Íon fragmento RDA	Fórmula molecular
I	Southwick et al., 1972	357	18; 28; 30; 32	151	C ₁₉ H ₁₈ O ₇
II	Méndez & Rosquete, 1988	327	28; 30	-	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
III	Brieskorn & Riedel, 1977	299	30	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
IV	Giner et al., 1982	283	30	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
V	Agrawal, 1989	299	30	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
VI	Dayrit et al., 1987	373	28; 30; 60	151; 221	C ₁₉ H ₁₈ O ₈
VII	Dayrit et al., 1987	285	-	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
VIII	Chiapini et al., 1982	329	18; 28; 30	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
IX	Roitman & James, 1985	315	30	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₇

Tabela 5-3- Dados dos espectros de RMN ¹H das Substâncias I a IX ^a

Substância	H-3	H-6	H-8	H-2'	H-3'	H-5'	H-6'	OH-5	OMe
I	-	-	6,50 (s)	8,07 (d; 9,0)	7,02 (d; 9,0)	7,02 (d; 9,0)	8,07 (d; 9,0)	12,66 (s)	3,96; 3,92; 3,90; 3,86
II	-	6,33 (d; 2,0)	6,68 (d; 2,0)	8,13 (d; 9,1)	7,13 (d; 9,1)	7,13 (d; 9,1)	8,13 (d; 9,1)	12,74 (s)	3,93; 3,92; 3,89
III	6,71 (s)	6,26 (d; 2,1)	6,56 (d; 2,1)	7,64 (d; 2,1)	-	7,01 (d; 8,3)	7,61 (dd; 8,3 e 2,1)	13,10 (s)	4,00
IV	6,70 (s)	6,20 (d; 2,1)	6,50 (d; 2,1)	8,00 (d; 9,0)	7,00 (d; 9,0)	7,00 (d; 9,0)	8,00 (d; 9,0)	*	3,90
V	-	6,26 (d; 2,1)	6,50 (d; 2,1)	8,03 (dl; 9,1)	7,02 (d; 9,1)	7,02 (d; 9,1)	8,03 (dl; 9,1)	12,90 (s)	3,87
VI	-	-	6,86 (s)	7,66 (d; 2,2)	-	7,14 (d; 8,6)	7,72 (dd; 8,6 e 2,2))	12,70 (s)	3,99; 3,96; 3,89; 3,80
VII	6,56 (s)	6,14 (d; 2,1)	6,42 (d; 2,1)	7,39 (d; 2,2)	-	6,89 (d; 8,3)	7,36 (dd; 8,3 e 2,2)	12,90 (s)	-
VIII	-	6,30 (d; 2,1)	6,65 (d; 2,1)	7,71 (d; 2,1)	-	6,99 (d; 8,5)	7,59 (d; 8,5 e 2,2)	12,76 (s)	3,92; 3,86
IX	-	6,24 (d; 2,1)	6,48 (d; 2,1)	7,68 (d; 2,2)	-	6,97 (d; 8,5)	7,57 (d; 8,5 e 2,2)	12,83 (s)	3,86

^a Substâncias II, IV, V, VI e VIII (200 MHz, acetona-d₆); Substâncias III, VII e IX (400 MHz, acetona-d₆)

*sinal não observado; -, sinal inexistente; multiplicidade e *J* (Hz) entre parênteses

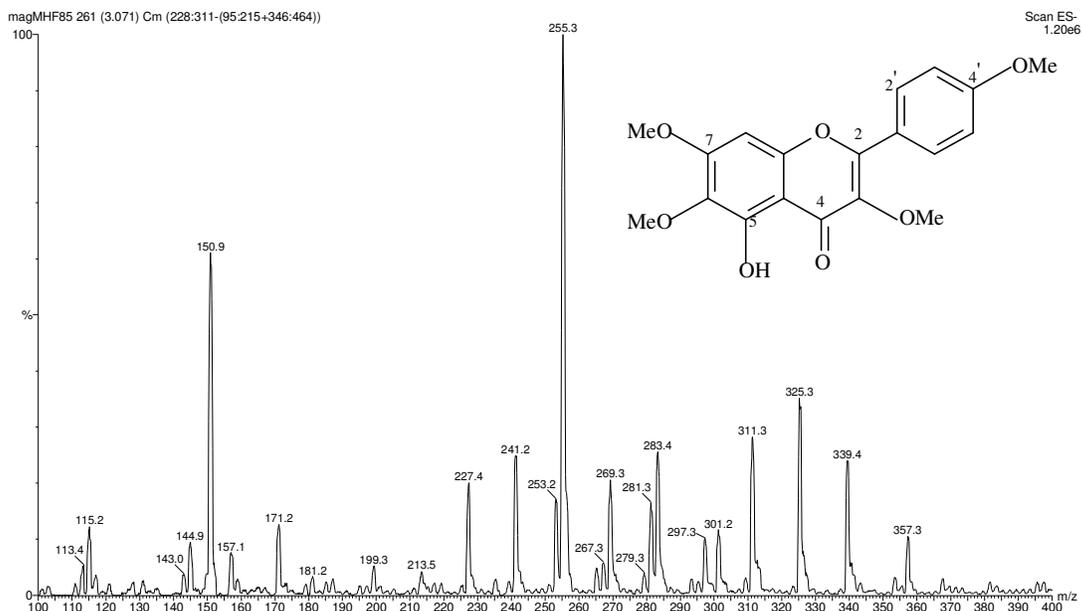


Figura 5-1- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância I

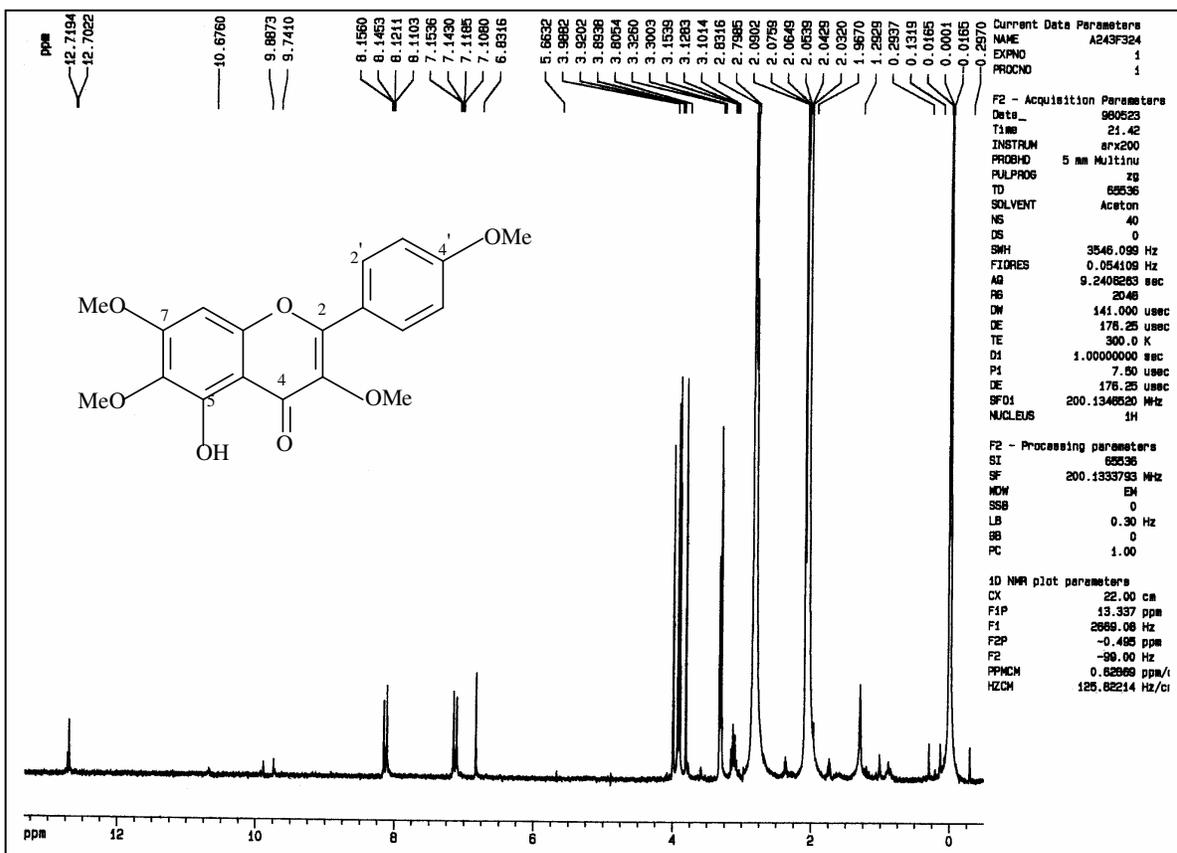


Figura 5-2- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6), da Substância I

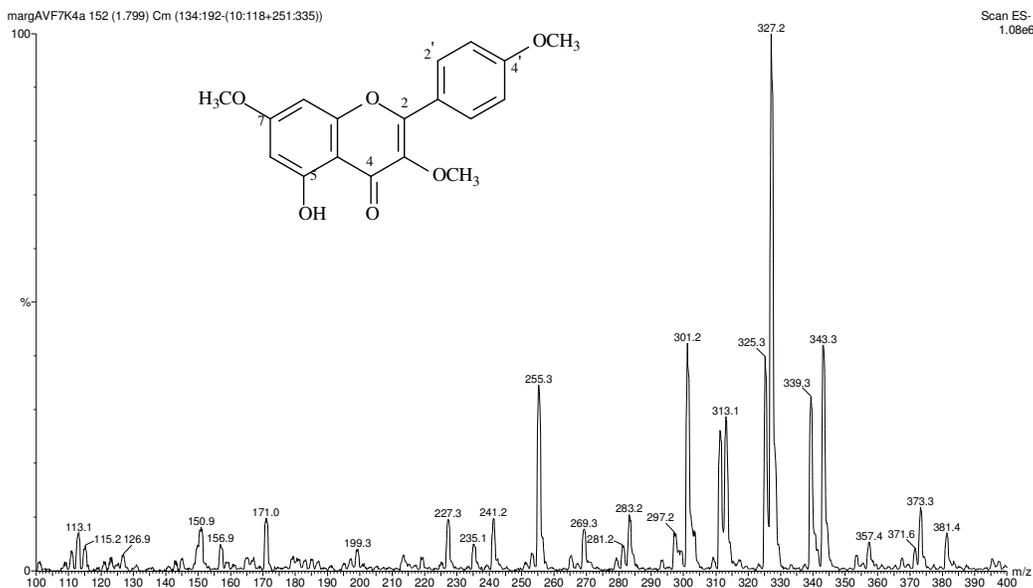


Figura 5-3- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância II e VI em mistura

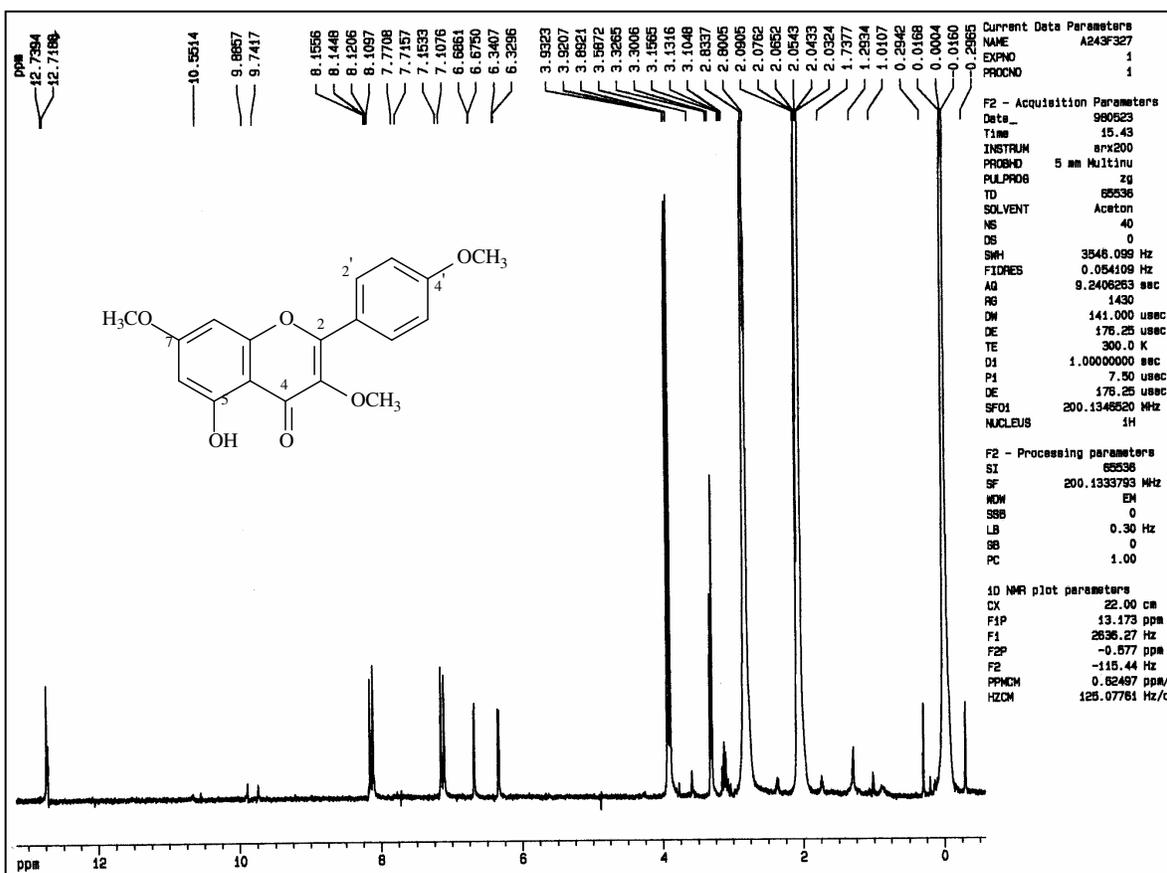


Figura 5-4- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância II

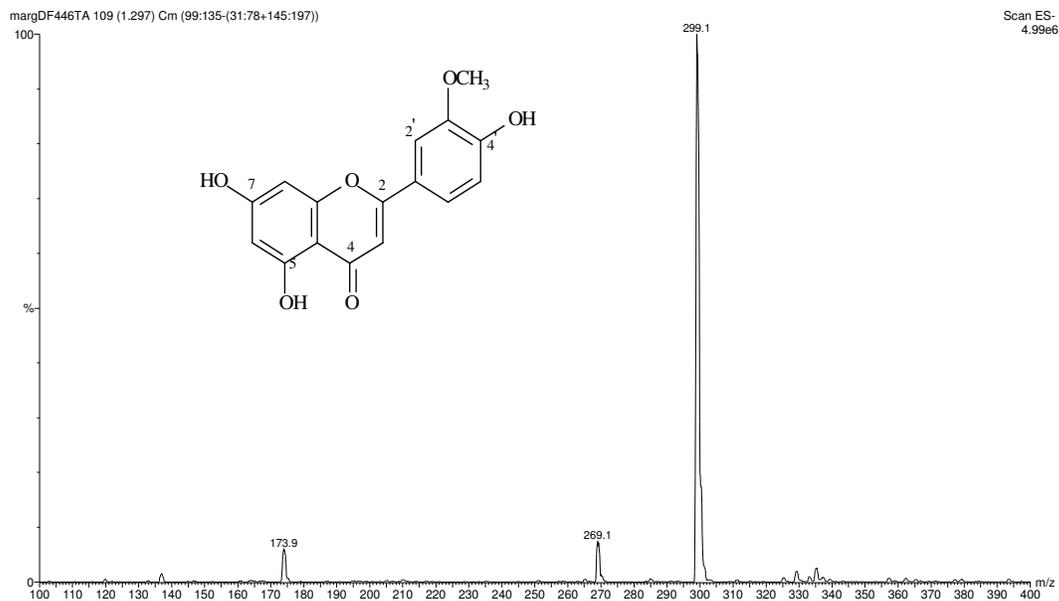


Figura 5-5- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância III

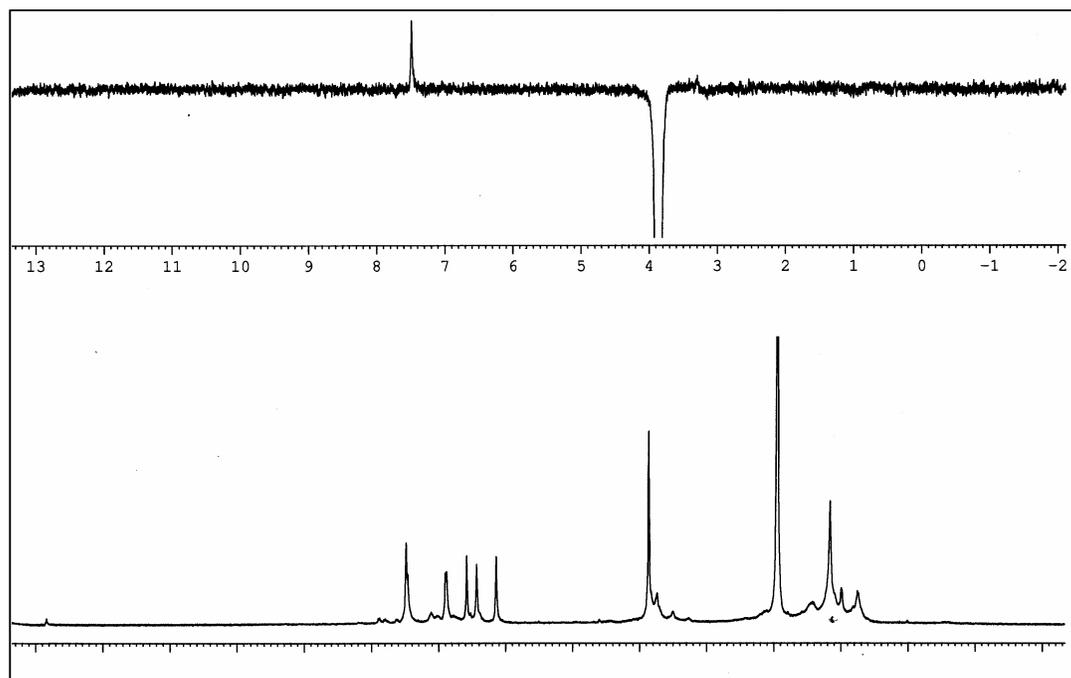


Figura 5-6- Espectro de RMN de NOEDIFF (400 MHz, acetona-d₆, irradiação OMe em δ 4,00) da Substância III

Tabela 5-4- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, acetona- d_6) da Substância III e da 3'-*O*-metil luteolina

Posição	δ C da Substância III	3'- <i>O</i> -metil luteolina ^a
2	164,9	163,7
3	104,4	103,8
4	183,1	181,8
5	163,4	161,6
6	99,7	98,8
7	164,9	164,2
8	94,8	94,0
9	158,8	157,4
10	*	103,3
1'	123,6	120,4
2'	110,5	110,2
3'	151,5	150,8
4'	148,9	148,0
5'	116,8	115,8
6'	121,3	120,4

^a (AGRAWAL, 1989); * Sinal não observado

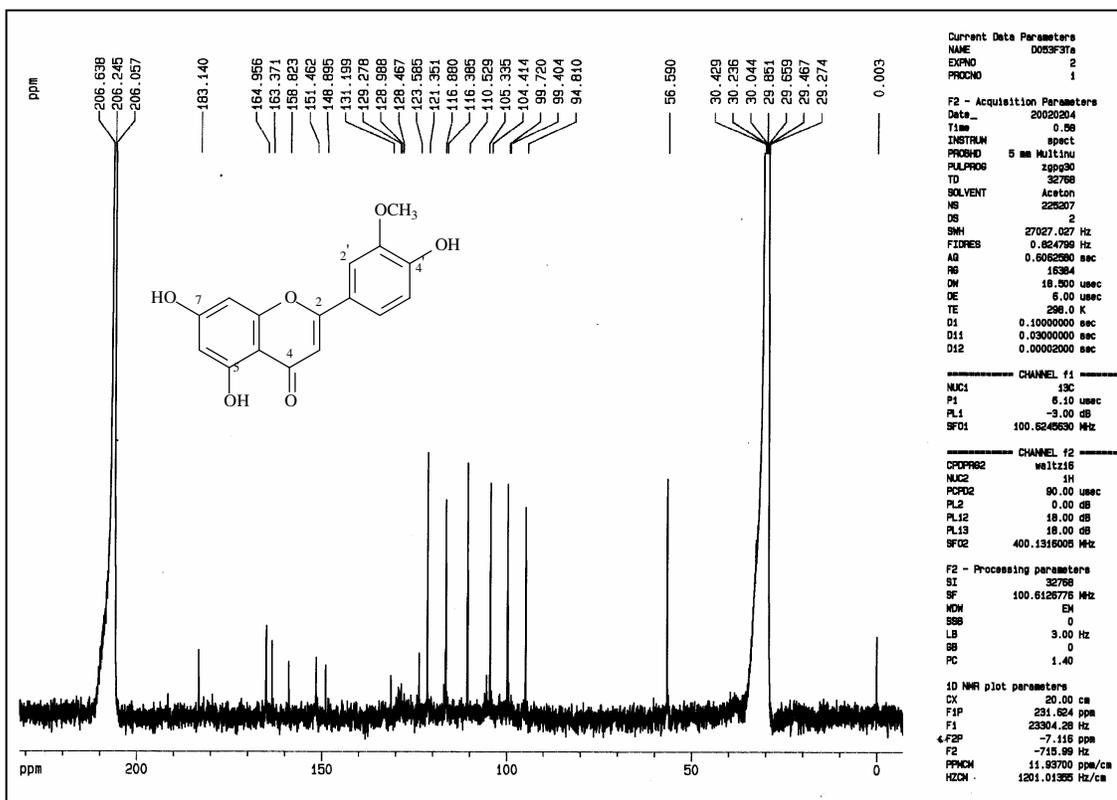


Figura 5-7- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da Substância III

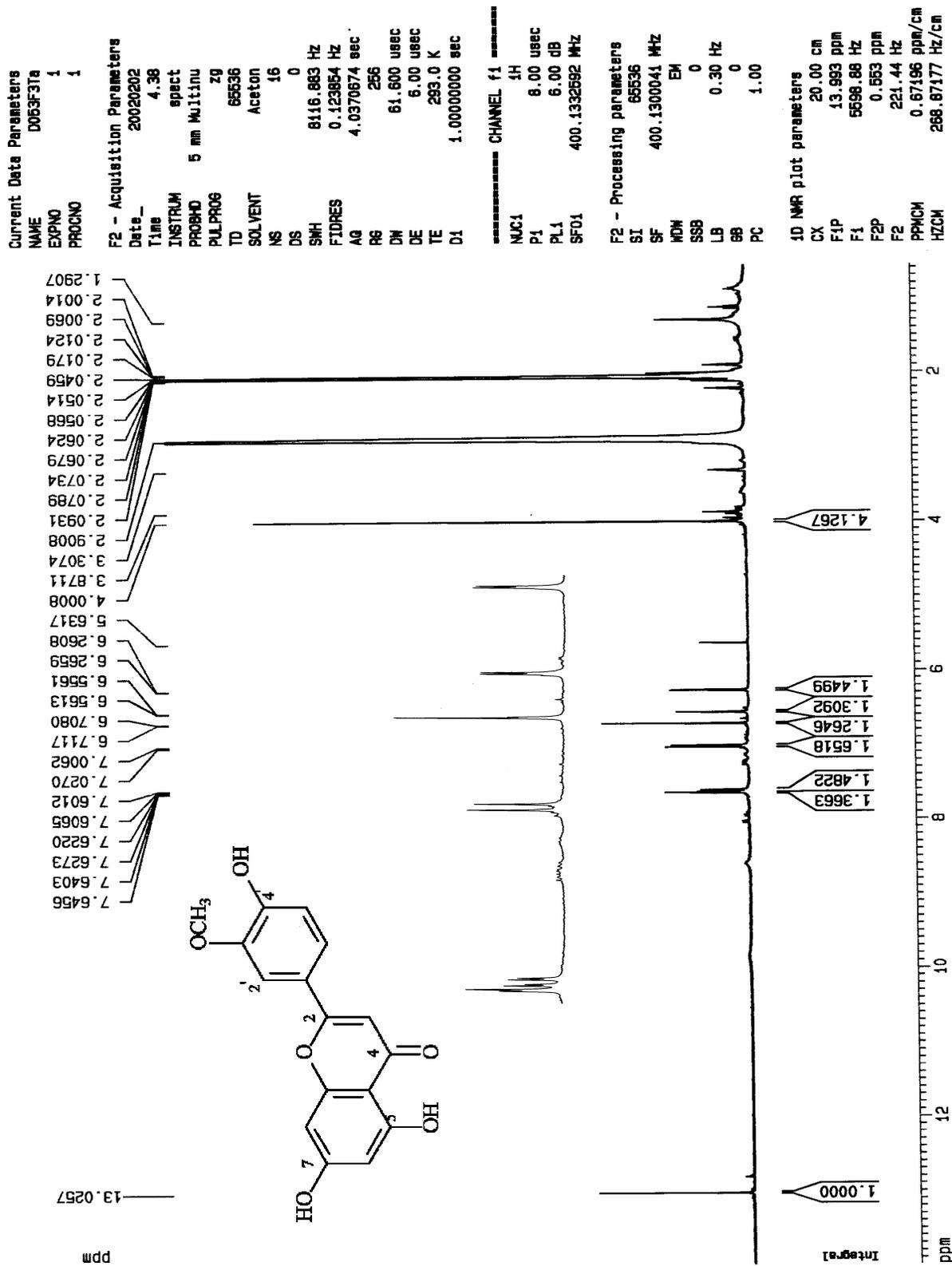


Figura 5-8- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) da Substância III

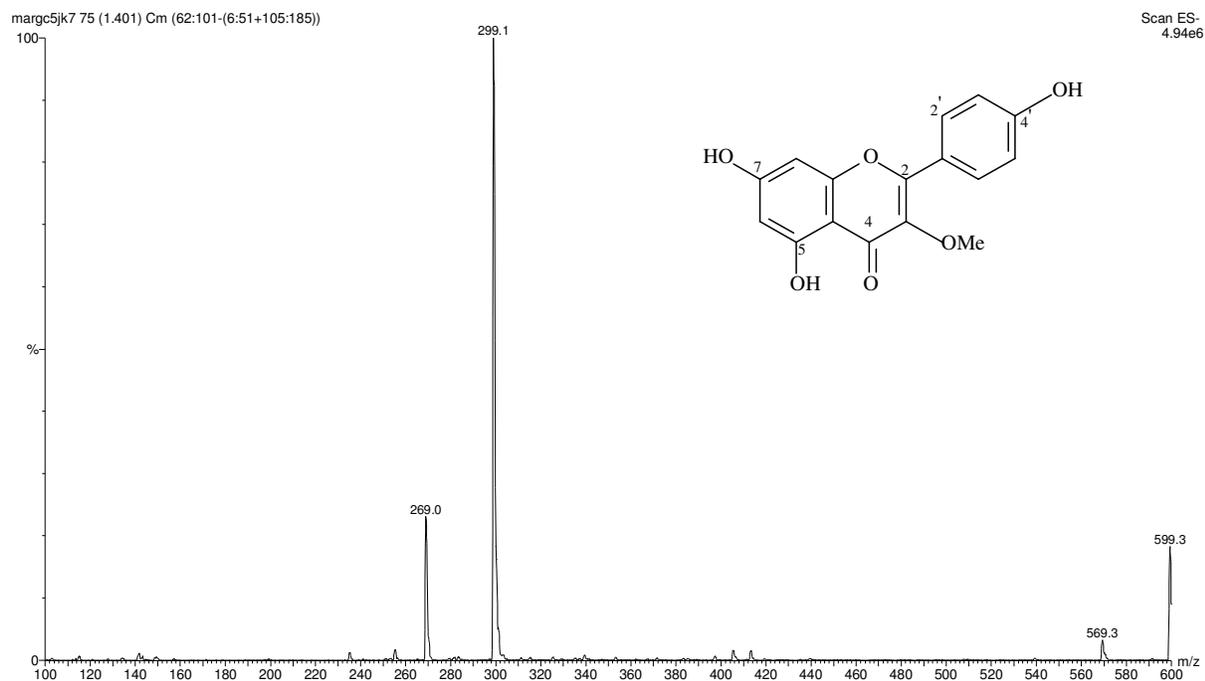


Figura 5-9- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância V

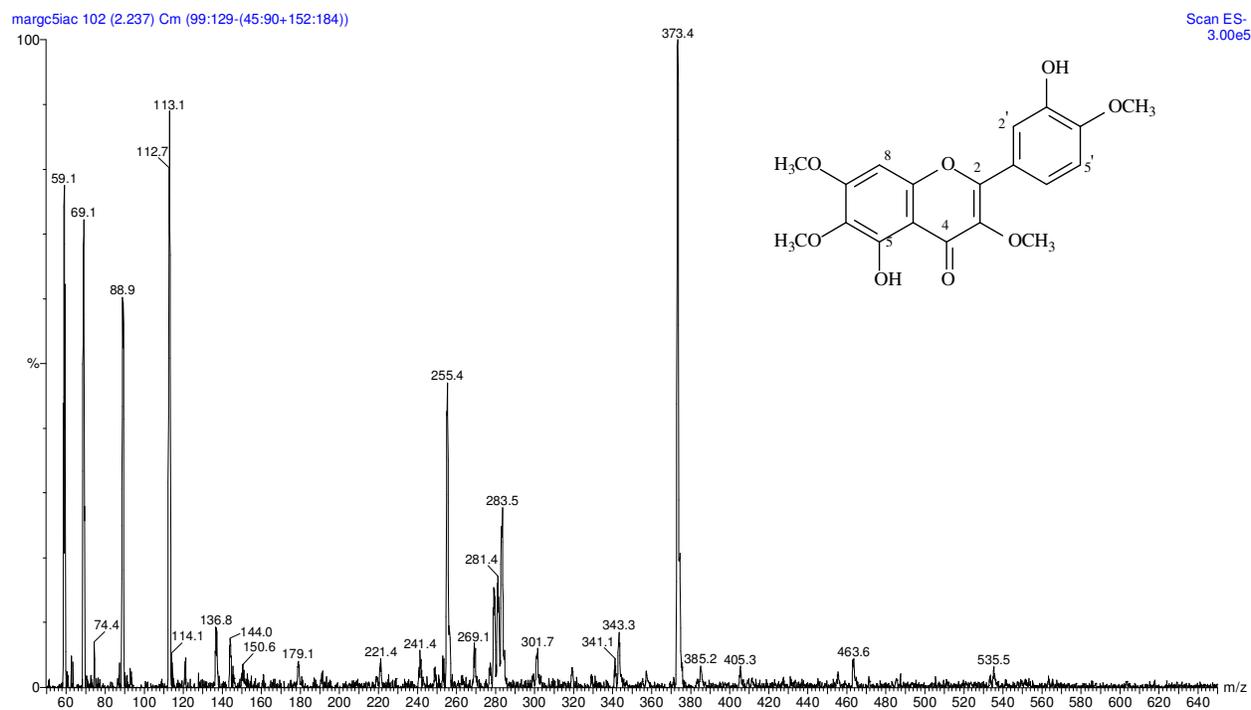


Figura 5-10- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância VI

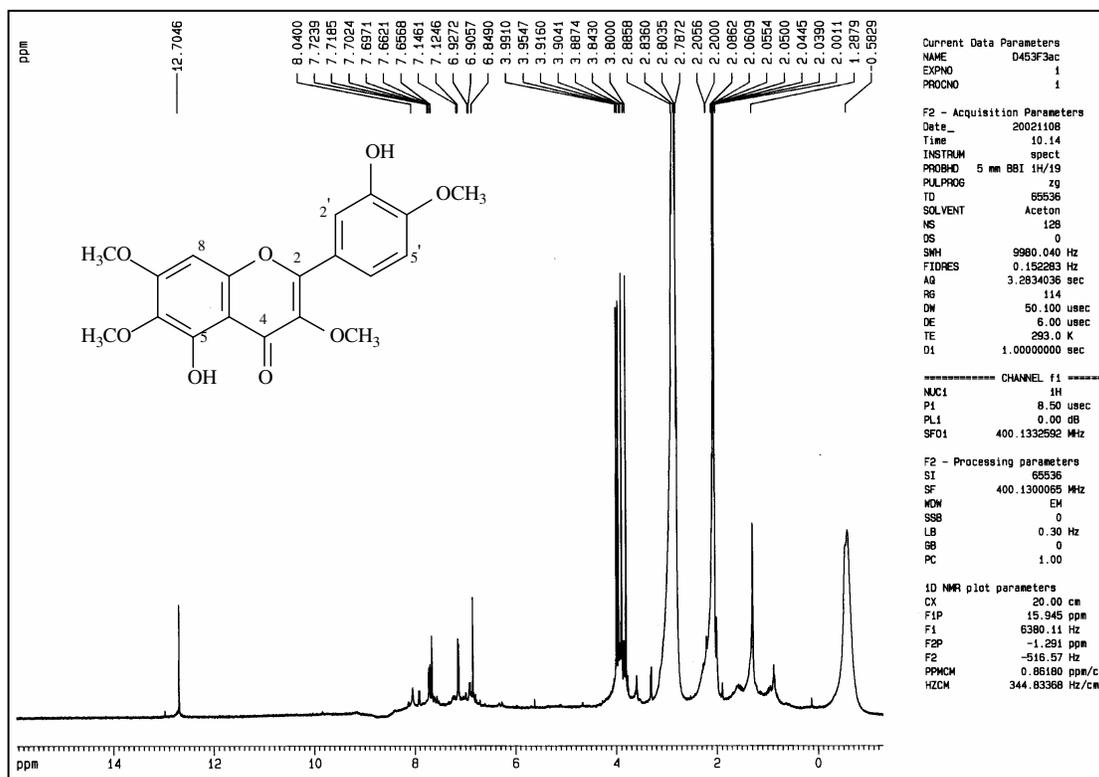


Figura 5-11- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância VI

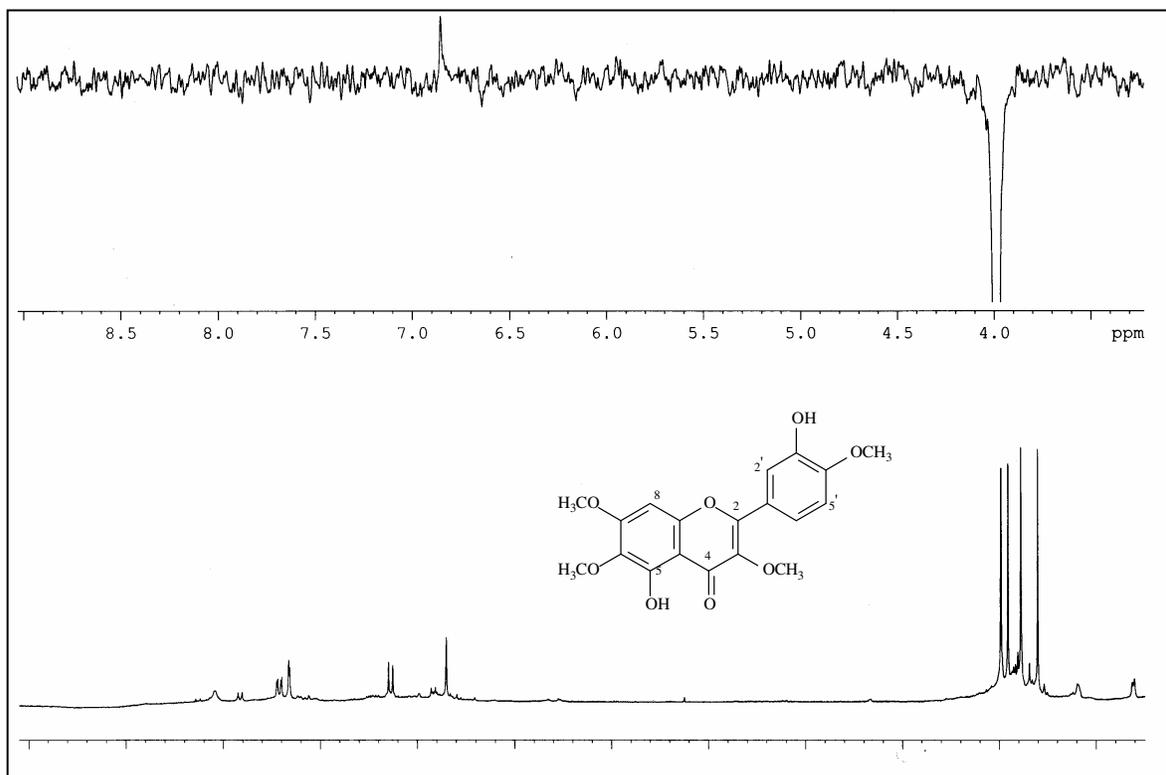


Figura 5-12- Espectro de RMN de NOEDIFF (400 MHz, acetona- d_6 , irradiação da OMe em δ 4,00) da Substância VI

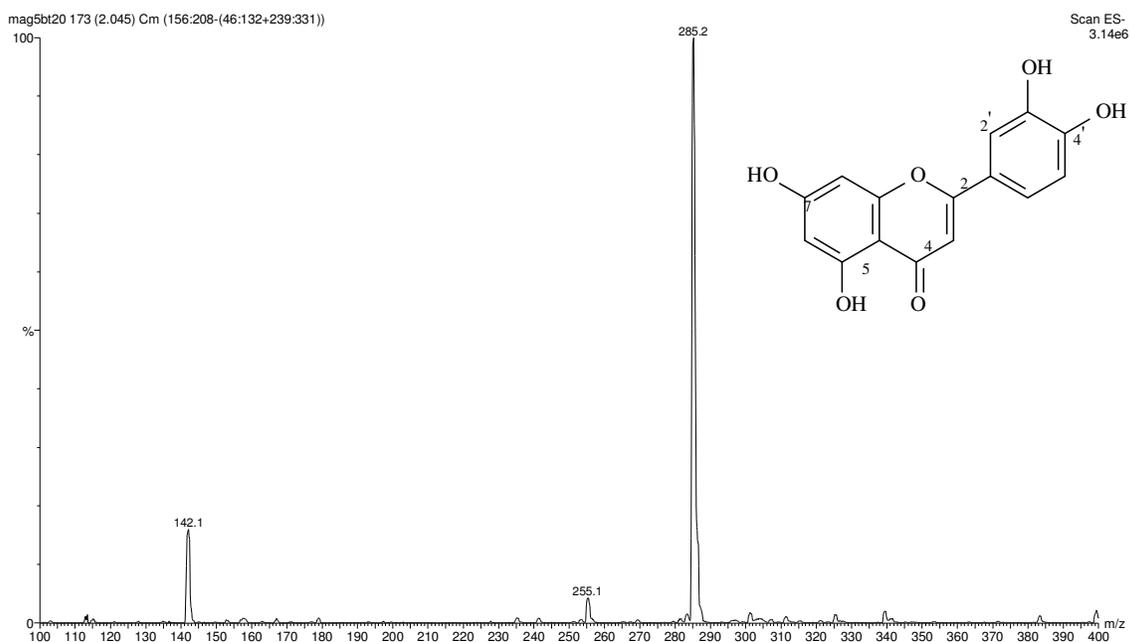


Figura 5-13- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância VII

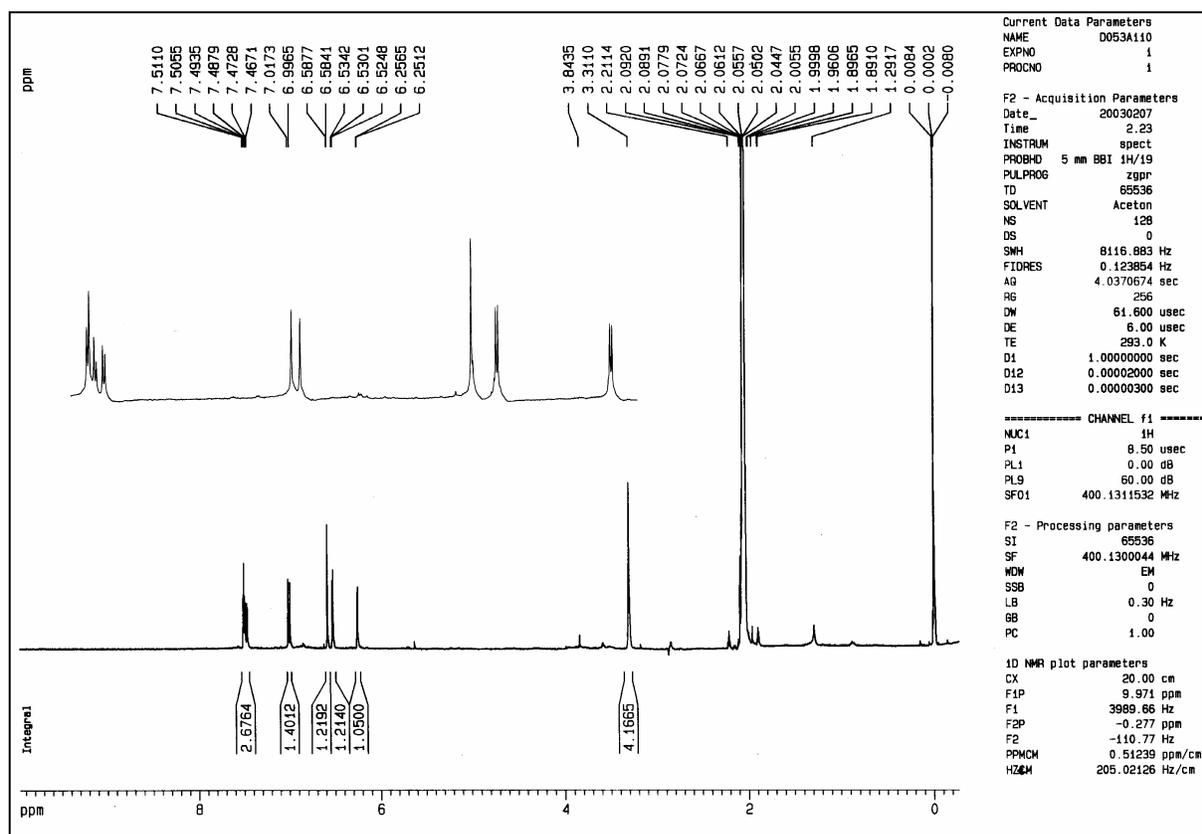


Figura 5-14- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância VII

MARGc5JK4(ES-)

MARGc5JK4 60 (0.925) Sm (Mn, 4x1.20); Cm (43:62-(6:39+90:143))

Scan ES-
1.14e6

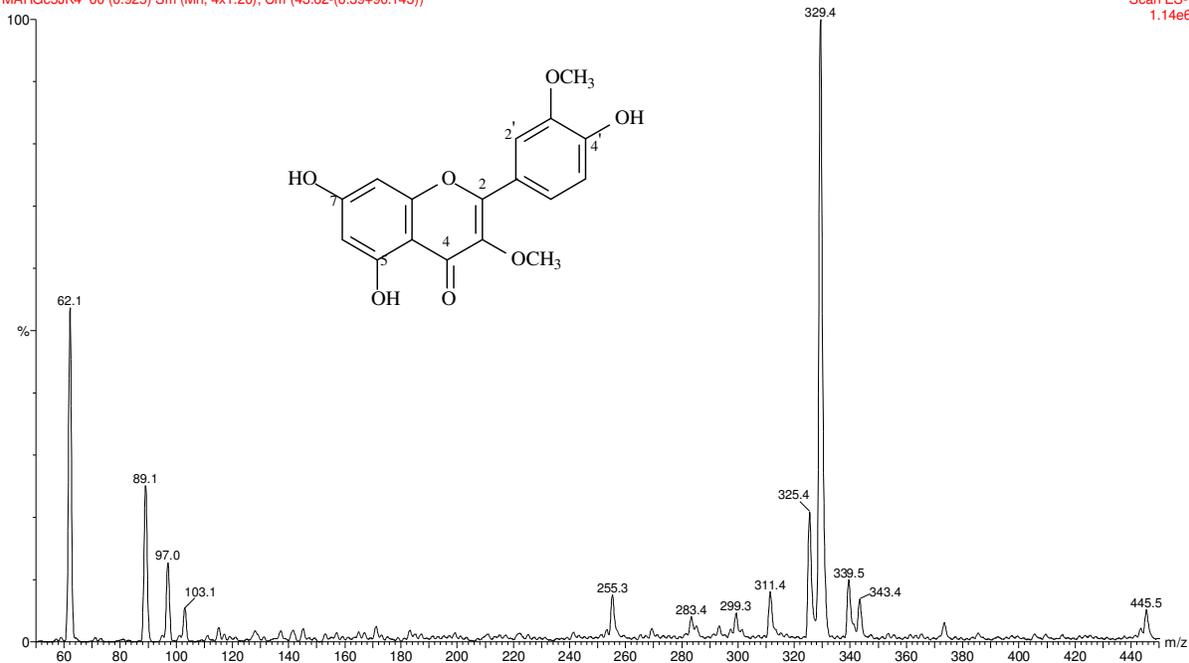


Figura 5-15- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância VIII

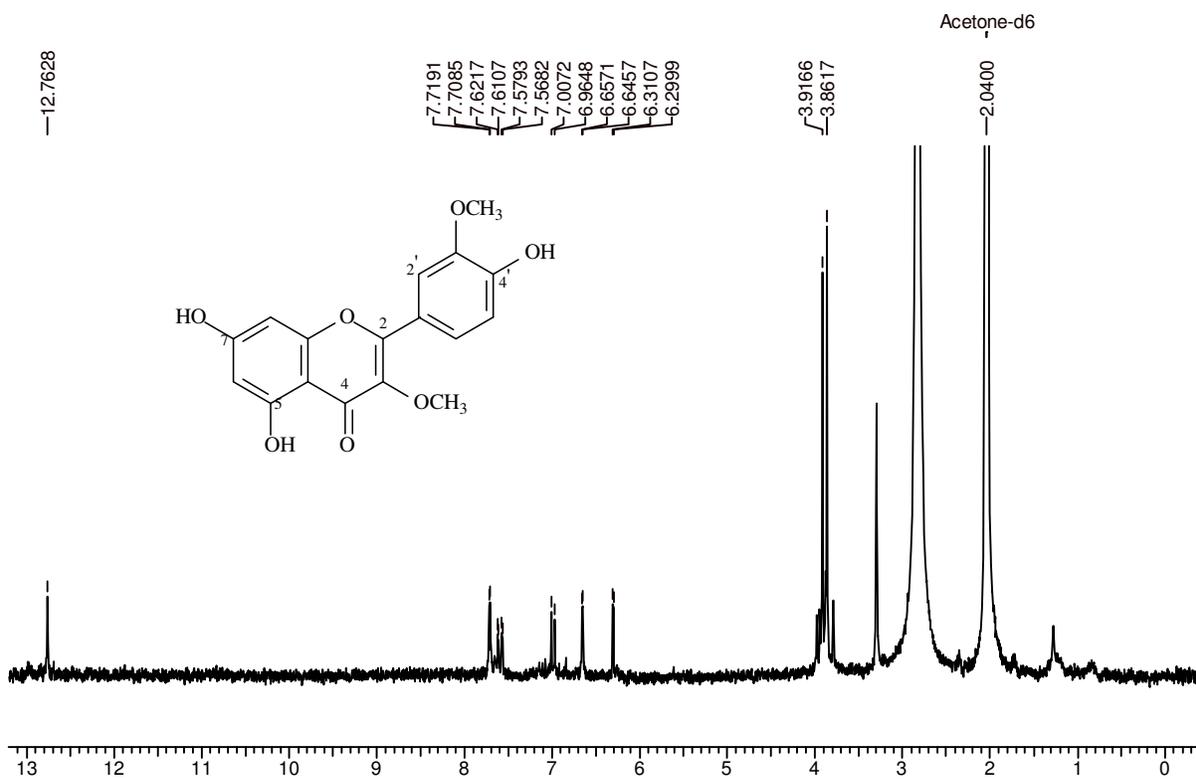


Figura 5-16- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância VIII

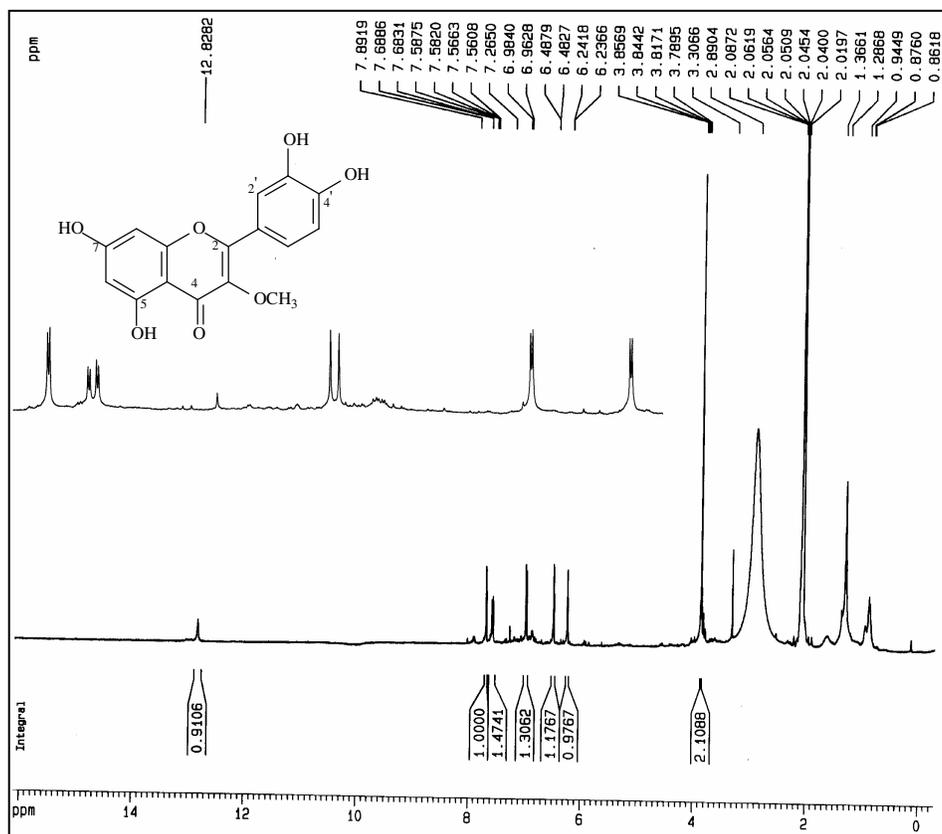


Figura 5-17- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância IX

Tabela 5-5- Dados dos espectros de RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância IX e da 3-*O*-metilquercetina

H / Posição	Substância IX*	3- <i>O</i> -metilquercetina* ^a
<u>OH</u> -5	12,83 (s)	12,81(s)
2'	7,68 (d; 2,2)	7,72 (d; 2)
5'	6,97 (d; 8,5)	7,00 (d; 8,5)
6'	7,57 (dd; 2,2 e 8,5)	7,59 (dd; 2 e 8,5)
6	6,24 (d; 2,1)	6,25 (d; 2)
8	6,48 (d; 2,1)	6,48 (d; 2)
OMe-3	3,86 (s)	3,87 (s)

* δ em ppm, J em Hz; ^a (100 MHz, acetona- d_6 ; ROITMAN & JAMES, 1985)

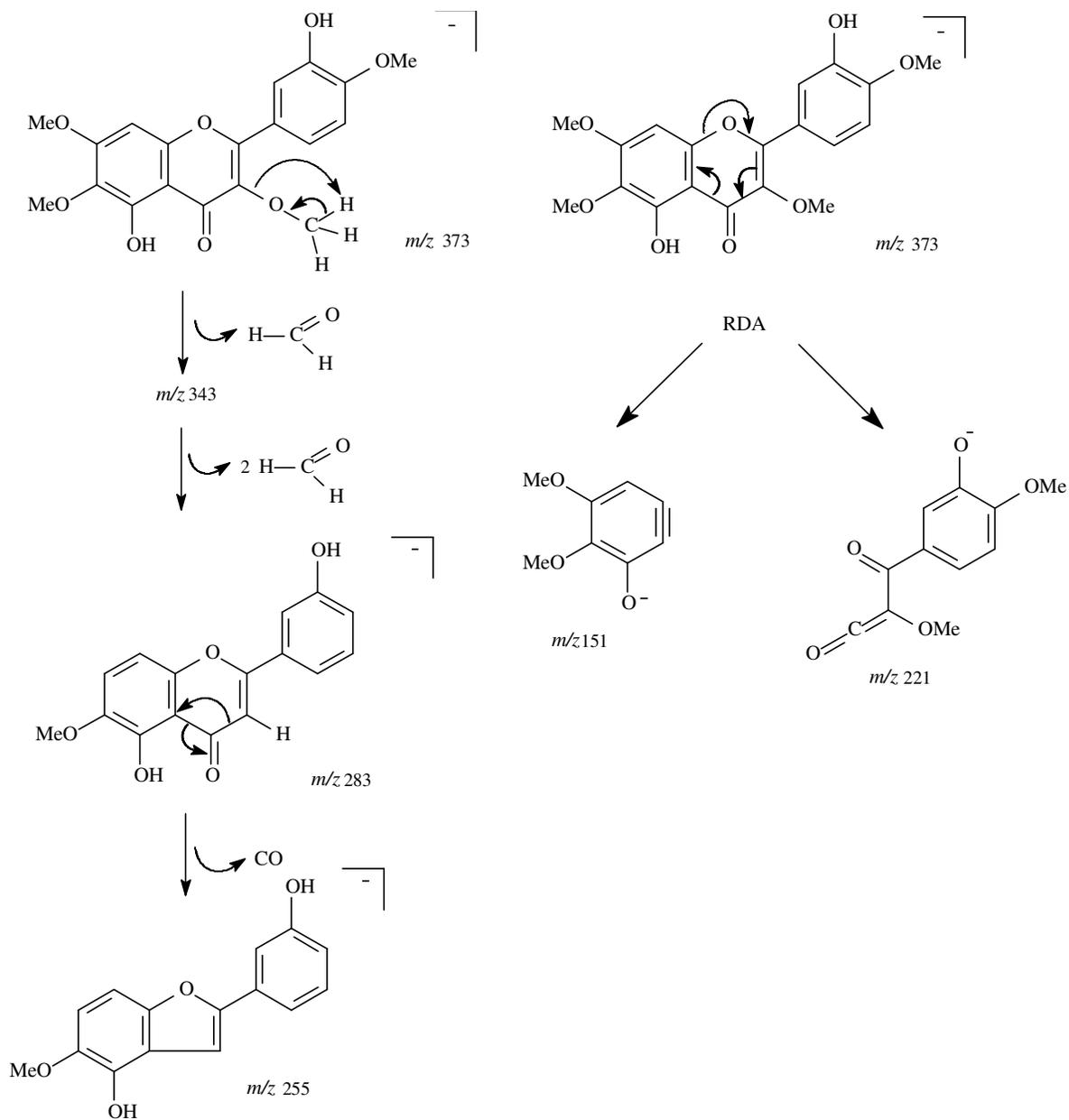
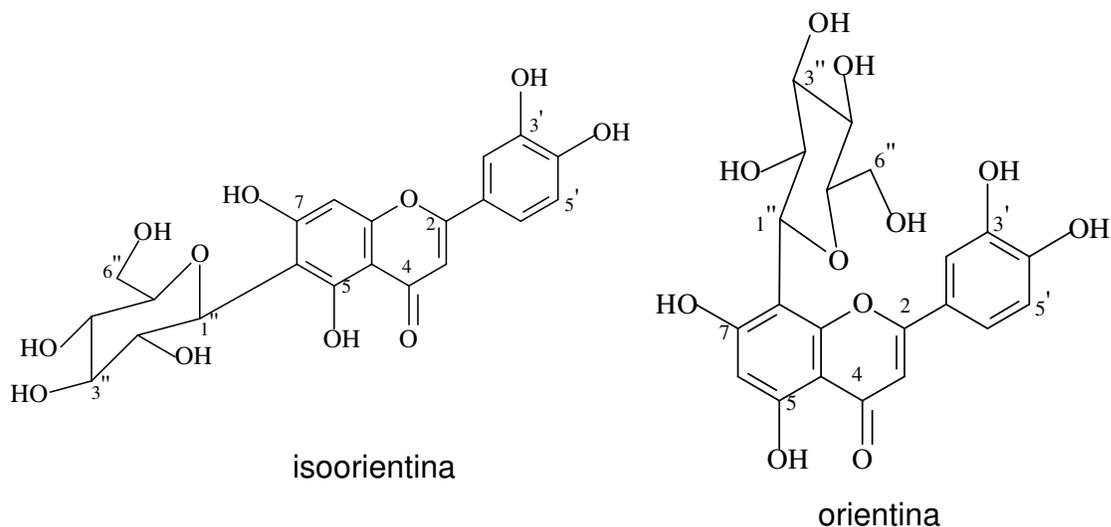


Figura 5-18- Proposta de fragmentação da Substância VI

5.2. Identificação das Substâncias XI e XII



O extrato hidrometanólico, partição n-butanólica, de folhas de *V. polygama* depois de sofrer fracionamento em XAD-7, originou a porção metanólica, a qual foi submetida a várias etapas cromatográficas em sephadex LH-20 e CLAE, que forneceu a fração HM5d, 20,5 mg, de aspecto oleoso e amarelo limão.

A análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6 , Figura 5-20, Tabela 5-6) revelou dois sinais em δ 13,58 e 13,18 (ambos s, com intensidades diferentes) referentes aos grupos hidroxilas quelados ligados ao C-5, indicando tratar-se de uma mistura de flavonóides; dois conjuntos de sinais característicos do anel B 3',4'-dissubstituído em intensidades diferentes e sinais em δ 6,61 (s); 6,59 (s, de menor intensidade) e 6,51, referentes aos H-3, 8 e 6 respectivamente reforçou a idéia de uma mistura. Um sinal centrado em δ 4,98 (d, $J = 9,7$ Hz, integrando para 2H) relativo a H anoméricos, indicando a presença de duas moléculas de açúcar em configuração β ligada à aglicona, e vários sinais na região entre δ 3,87 a 3,47, pertencentes a H carbinólicos dos carboidratos, corroboraram com a hipótese de ser uma mistura de flavonóides glicosilados, provavelmente de isômeros. Em solução, um isômero pode se transformar no outro e vice-versa.

A fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI, modo negativo (Figura 5-19), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Baseados nos dados espectrais acima expostos e dados da literatura (SANTOS, 2000; DAYRIT et al., 1987), foram propostas as estruturas 8-C- β -D-glucopiranosil luteolina (orientina) e a 6-C- β -D-glucopiranosil luteolina (isorientina) para as Substâncias XI e XII.

Tabela 5-6- Dados do espectro de RMN de ^1H (J em Hz, 400 MHz, acetona- d_6) das Substâncias XI e XII

H	XI	mistura	XII
3		6,61 (s)	
6	6,51 (s)		-
8	-		6,59 (s)
2'		7,51 (d, 2,1)	
5'	7,01 (d, 8,3)		6,99 (d, 8,3)
6'	7,49 (dd, 2,2 e 8,3)		7,54 (d, 2,1 e 8,3)
1''		4,98 (d, 9,7)	
OH	13,59 (s)		13,18 (s)

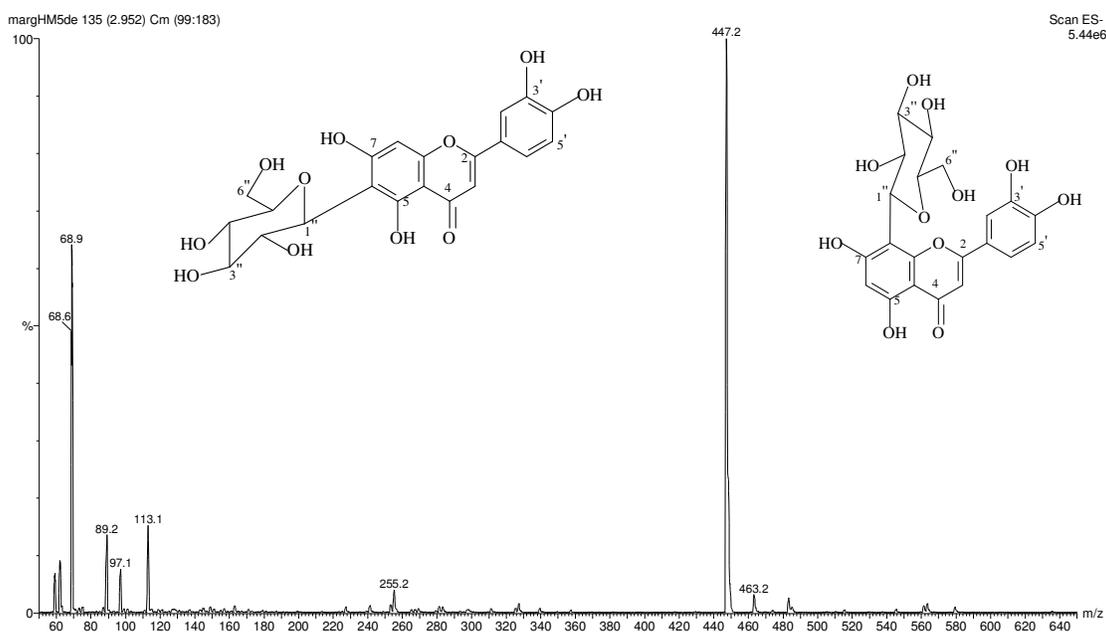


Figura 5-19- Espectro de massas (ESI, modo negativo) das Substâncias XI e XII

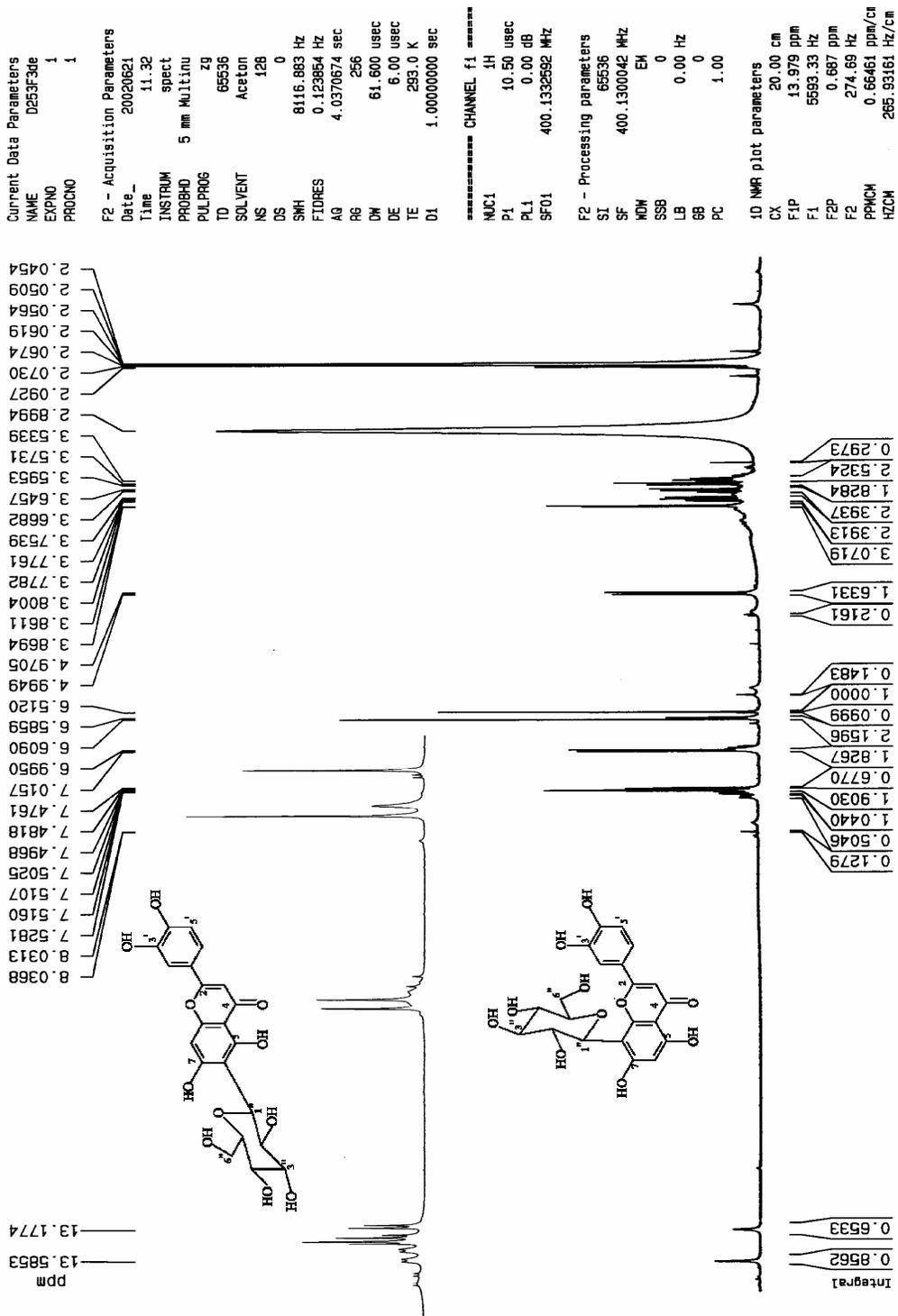
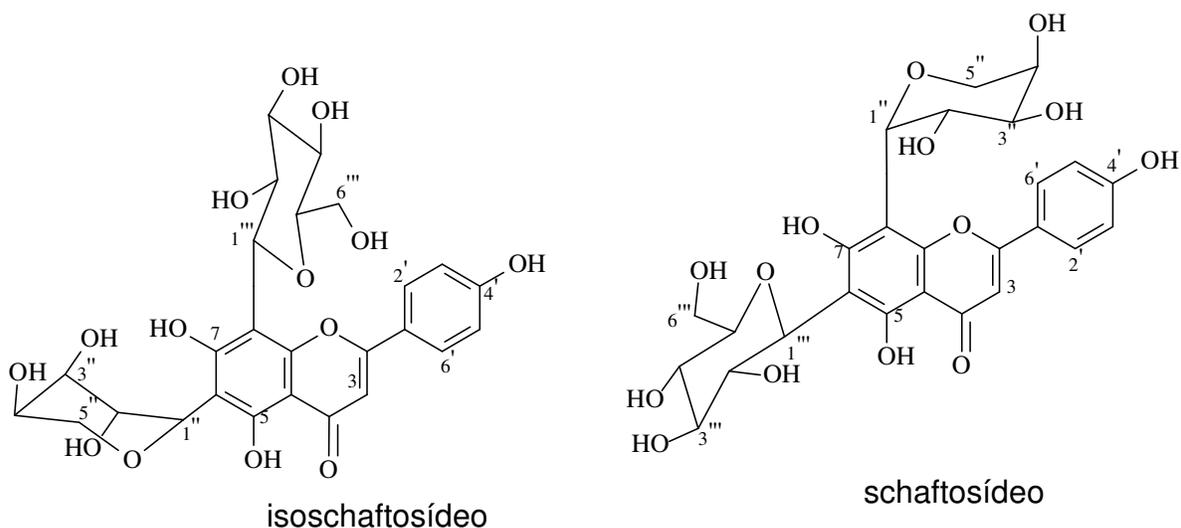


Figura 5-20- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) das Substâncias XI e XII

5.3. Identificação das Substâncias XIII e XIV



O extrato hidrometanólico, partição *n*-butanólica, de folhas de *V. polygama* depois de sofrer fracionamento em XAD-7, originou a porção metanólica, a qual foi submetida a várias etapas cromatográficas em sephadex LH-20 e CLAE, que forneceu a fração 4Vx1, 4,0 mg, sob a forma de sólido amarelo.

A análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , Figura 5-23) revelou ser uma mistura de flavonas glicosiladas com o anel B *p*-substituído, devido apresentar os seguintes sinais em intensidades diferentes: um em δ 7,98 (d, 8,7 Hz, H-2' e 6'); um em δ 6,93 (d, 8,7 Hz, H-3' e 5'); um em δ 6,92 (d, 8,7 Hz, H-3' e 5'); um em δ 6,63 (s, H-3); os sinais em δ 5,05 (d, 9,9 Hz), em δ 5,02 (d, 9,8 Hz) e outro em δ 4,86 (d, 9,8 Hz) referentes a H anoméricos, juntamente com os sinais entre δ 4,08 a 3,45 relativos aos H carbinólicos, corroboraram com a hipótese de flavonas glicosiladas, as quais pensamos ser a vitexina e seu isômero. Porém, ao se fazer a análise da amostra por espectrometria de massas, usando-se a ionização por eletrospray no modo negativo (Figura 5-21), o espectro revelou um pico relativo ao íon pseudo molecular a m/z 563 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e um pico a m/z 431 $[\text{M}-\text{H}-132]^-$, indicando a presença de uma pentose ligada à possível molécula de vitexina. Para confirmação da massa molecular, foi adicionada uma ínfima quantidade de NaCl à amostra, para se realizar a análise da mesma no espectrômetro de massas, usando-se a ionização por eletrospray no modo positivo, já que sem a adição do sal não foi possível a realização desta análise. Assim, foi observado o pico (Figura 5-22) referente ao aduto de sódio a m/z 587 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

confirmando a massa molecular de 564 g/mol relativa à fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{14}$ pertencente a uma flavona diglicosilada.

A hipótese acima foi reiterada com os resultados obtidos através das análises dos espectros de RMN ^{13}C , HSQC e COSY.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , Figura ; Tabela) revelou dois sinais em δ 184,5 e 184,3 referentes às carbonilas queladas localizadas no C-4, além de vários outros sinais duplicados, entre eles doze sinais referentes a C carbinólicos. O espectro de HSQC (400 MHz, CD_3OD , Figura 5-27) foi decisivo para a elucidação da mistura como sendo de di-C-glicosídeos, já que mostrou a correlação dos H anoméricos em δ 5,02 e 4,86 com os carbonos em δ 75,2 e 76,7, pois os C anoméricos mais blindados são característicos de flavonas C-glicosiladas. O espectro de COSY (400 MHz, CD_3OD , Figura 5-25) contribuiu para a atribuição dos H-2 dos açúcares devido revelar os acoplamentos entre estes H, sinais em δ 4,08 (d, 9,6 Hz) e 4,00, e o H anomérico em δ 5,02 (d, 9,8 Hz). No espectro de HSQC estes mesmos sinais estavam correlacionados com os C em δ 73,3 e 70,6 respectivamente.

Os açúcares foram identificados como a glicose e arabinose, devido dados dos espectros de massas e por seus deslocamentos no espectro de RMN ^{13}C estarem em concordância com os dados da literatura (BESSION et al., 1985).

Baseados nos dados espectrais obtidos e nos dados da literatura (BESSION et al., 1985), foram propostas as estruturas das flavonas di-C-glicosiladas 5,7,4',-triidroxil,6-C- β -D-glucopiranosil, 8-C- α -L-arabinopiranosil apigenina (schaftosídeo) e a 5,7,4',-triidroxil,8-C- β -D-glucopiranosil,6-C- α -L-arabinopiranosil apigenina (isoschaftosídeo), sendo estas inéditas para o gênero *Vitex*.

Tabela 5-7- Dados dos espectros de RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) das Substâncias XIII e XIV, schaftosídeo e isoschaftosídeo

C	schaftosídeo ^a		isoschaftosídeo ^a		Substâncias XIII + XIV	
2	164,1		164,2		166,9	
3	102,4		102,6		103,9	
4	182,4		182,4		184,5; 184,3	
5	159,5		161,1		157,6	
6	108,4		108,1		108,5	
7	161,2		158,3		163,0; 162,9	
8	104,3		105,1		105,9	
9	154,3		155,2		*	
10	103,5		103,7		104,1	
1'	121,3		121,5		123,5	
2'	129,2		129,0		130,3; 129,9	
3'	116,1		116,0		117,2; 117,1	
4'	161,5		161,3		160,5	
5'	116,1		116,0		117,2; 117,1	
6'	129,2		128,5		130,3; 129,9	
Açúcar	Glic	Ara	Glic	Ara	Glic	Ara
1''	73,6	74,7	72,9	71,4	72,1; 73,3	75,2; 72,5
2''	70,7	68,8	70,8	63,1	70,6	*
3''	78,7	75,1	79,0	72,3	80,4; 75,4	76,7
4''	69,8	68,8	69,8	69,9	71,4	70,6
5''	81,2	70,7	81,6	67,1	83,1; 82,8	70,6
6''	61,5		61,6		63,2	

^a (DMSO-d₆; BESSON et al., 1985); * Sinal não observado

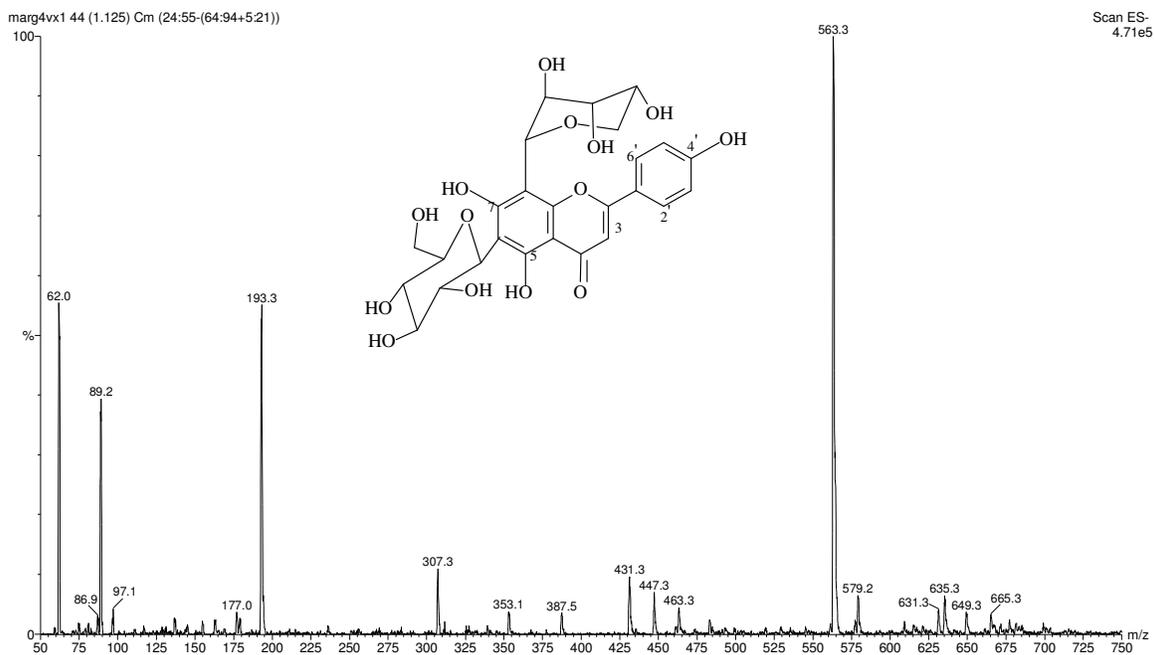


Figura 5-21- Espectro de massas (ESI, modo negativo) das Substâncias XIII e XIV

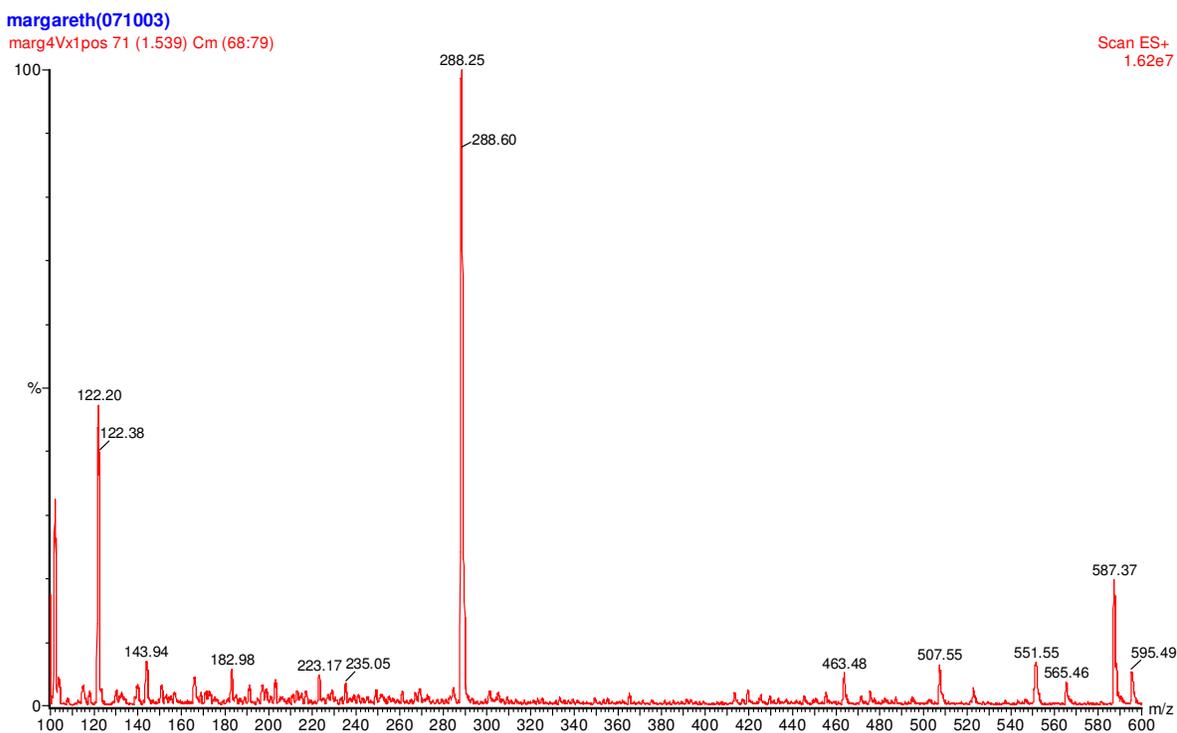


Figura 5-22- Espectro de massas (ESI, modo positivo) das Substâncias XIII e XIV

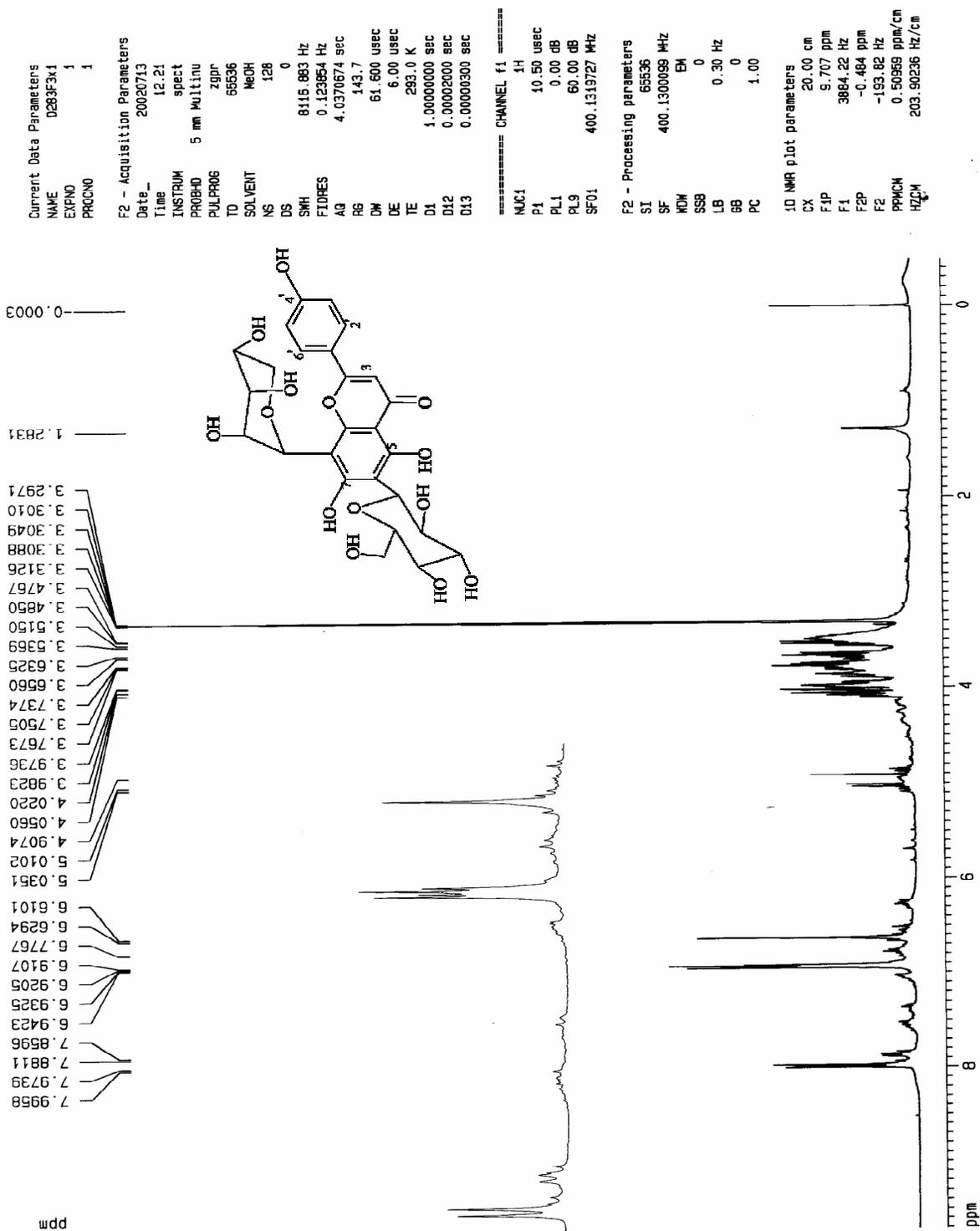


Figura 5-23- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XIII e XIV

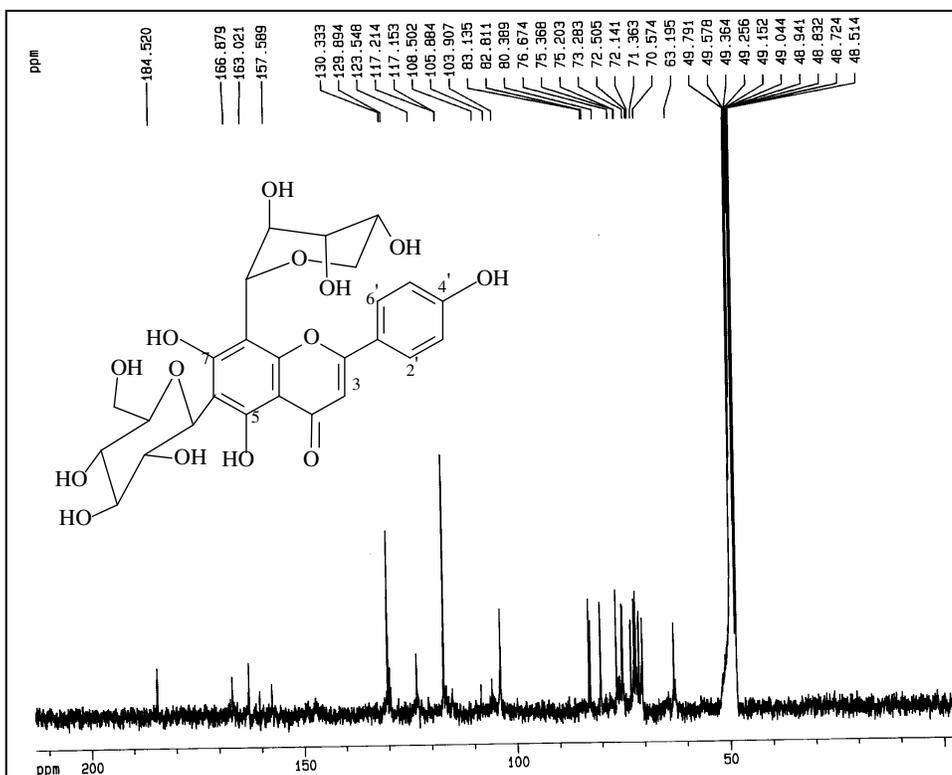


Figura 5-24- Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) das Substâncias XIII e XIV

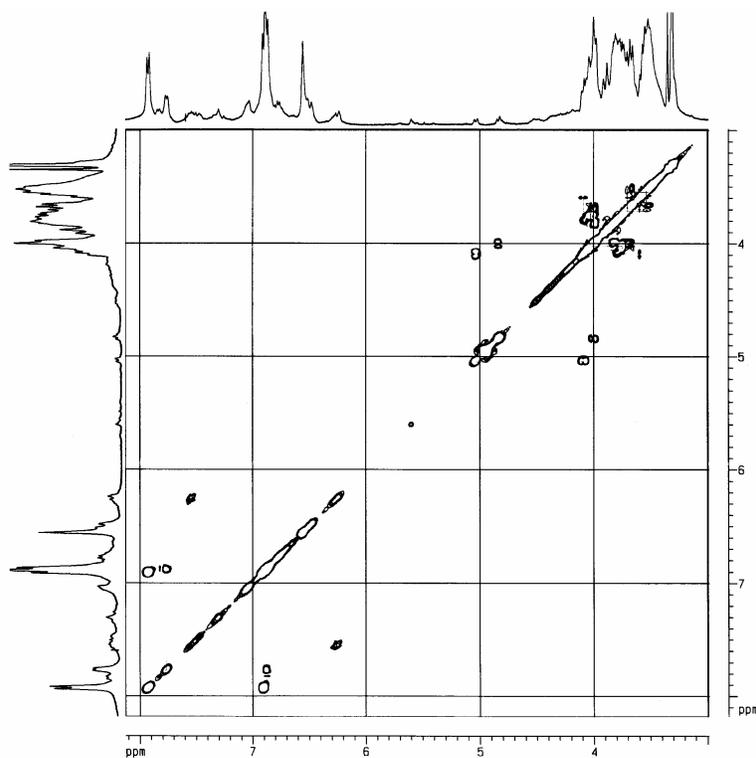


Figura 5-25- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CD_3OD) Substâncias XIII e XIV

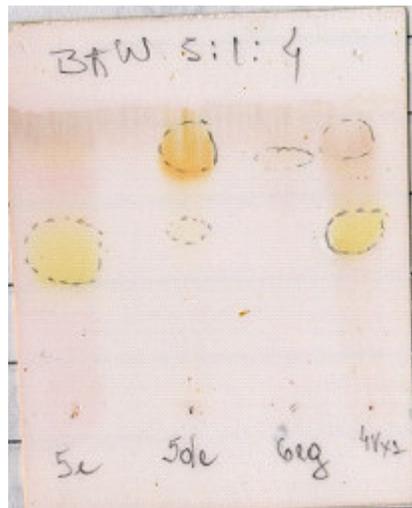


Figura 5-26- CCDA das Flavonas Glicosiladas

Legenda da figura: 5e: Substâncias XV e XVI; 5de: Substâncias XI e XII; 4Vx1: Substâncias XIII e XIV
(eluente: BAW 5:1:4; revelador: vanilina sulfúrica e aquecimento; manchas amarelas intensas)

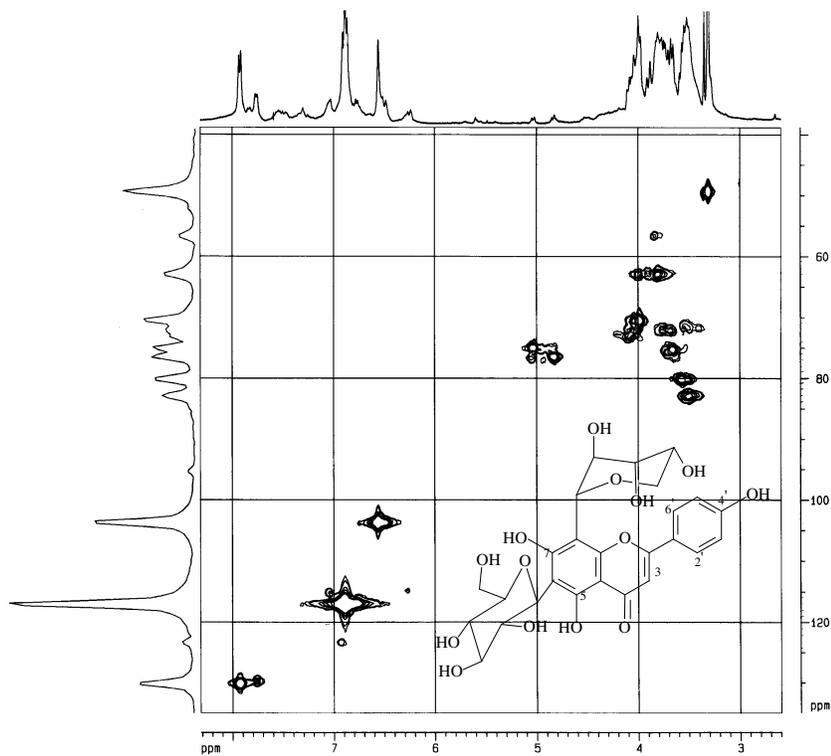
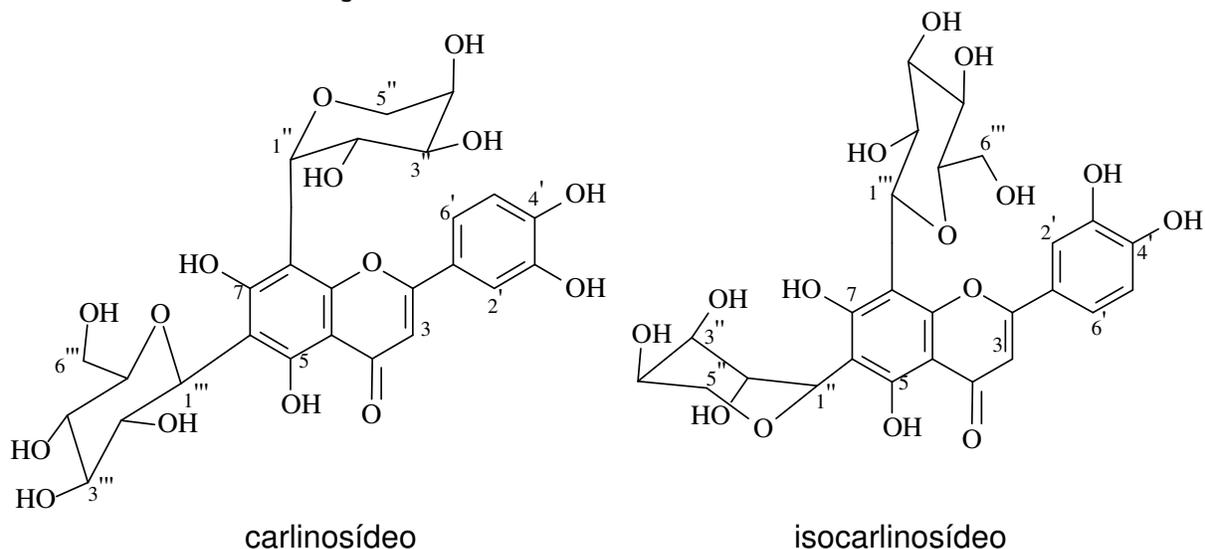


Figura 5-27- Espectro de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XIII e XIV

5.4. Identificação das Substâncias XV e XVI



O extrato hidrometanólico, partição *n*-butanólica, de folhas de *V. polygama* depois de sofrer fracionamento em XAD-7, originou a porção metanólica, a qual foi submetida a várias etapas cromatográficas em CLAE, que forneceu a fração HM5ep, 3,0 mg, sob a forma de sólido amarelo.

A análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD ; Figura 5-29) revelou uma mistura de flavonas glicosiladas com o anel B 3',4'-dissubstituído, devido apresentar os seguintes sinais: um em δ 7,55 (d, 2,0 Hz, H-2'); um em δ 7,51 (dd, 8,3 e 2,0 Hz, H-6'); um em δ 7,39 (m); um em δ 7,36 (sl); um em δ 6,90 (d, 8,4 Hz, H-5'); um em δ 6,89 (d, 8,4 Hz, H-5'); um em δ 6,56, que a princípio foi interpretado como um sinal de multiplicidade dubleto com constante de acoplamento 3,8 Hz, mas depois foi considerado como dois sinais em δ 6,57 e 6,56 (ambos s) respectivamente. Os sinais em δ 5,08 (d, 9,7 Hz), em δ 5,02 (d, 10,0 Hz) e outro em δ 4,86 (d, 10,0 Hz) referentes a H anoméricos, juntamente com os sinais entre δ 4,17 a 3,42 relativos aos H carbinólicos, corroboraram com a hipótese de flavonas glicosiladas, as quais pensamos ser a orientina e seu isômero, devido a fração anterior conter esta mistura, com um outro possível flavonóide monoglicosilado, já que a intensidade do sinal em δ 5,02 era o dobro dos sinais em δ 5,08 e 4,86. Porém, ao se fazer comparação em CCDA (Figura 5-26) entre as flavonas glicosiladas, foi observada grande diferença no fator de retenção (R_f) das mesmas, logo as substâncias eram diferentes. Além disso, a amostra era pouco solúvel em acetona deuterada, enquanto a mistura contendo as Substâncias

XI e XII era perfeitamente solúvel. Somando-se a estes fatos, o espectro de RMN de ^1H (200 MHz) mostrou tratar-se de uma mistura de duas flavonas, por apresentar dois sinais em δ 13,84 e 13,71, referentes a dois grupos de hidroxila quelada ligada ao C-5, e vários outros sinais de intensidade diferentes. Logo, foi realizado um espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 / D_2O (400 MHz, Figura 5-30), o qual exibiu os seguintes sinais: um em δ 7,66 (sl); um em δ 7,62 (dl, 8,3 e 9,9 Hz); um em δ 7,57 (s); um em δ 7,50 (dl, 7,6 Hz); um em δ 7,03 (dl, 8,4 Hz); um em δ 7,00 (d, 8,5 Hz); dois em δ 6,66 e 6,65, sobrepostos na linha de base, assemelhando-se a um sinal tipo singleto largo. Esses sinais pertencentes à aglicona perderam resolução, quando comparados com os sinais apontados no espectro realizado em metanol deuterado. Porém, os sinais referentes aos H anoméricos ficaram bem diferenciados evidenciando-se dois sinais em δ 5,15 (d, 9,6 Hz) e 4,83 (d, 10,7 Hz), de menor intensidade, e outros dois em δ 5,02 e 4,88 (ambos d, 9,7 Hz) de maior intensidade, levando-se à hipótese de uma mistura contendo duas flavonas diglicosiladas.

A análise da amostra por espectrometria de massas, usando-se a ionização por eletrospray no modo negativo, produziu um espectro (Figura 5-28) que revelou um pico relativo ao íon pseudo molecular a m/z 579 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Para confirmação da massa molecular, foi adicionada uma pequena quantidade de NaCl à amostra, para se realizar a análise da mesma por espectrometria de massas, usando-se a ionização por eletrospray no modo positivo, já que sem a adição do sal não foi possível a realização desta análise. Assim, foi observado o pico referente ao aduto de sódio a m/z 603 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ confirmando a massa molecular de 580 g/mol relativa à fórmula molecular $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$ pertencente a uma flavona diglicosilada e seu isômero.

A hipótese acima foi reiterada com os resultados obtidos através das análises dos espectros de RMN de HSQC, HMBC e COSY.

O espectro de HSQC (400 MHz, CD_3OD , Figura 5-33) foi decisivo para a elucidação da mistura como sendo de di-C-glicosídeos, já que mostrou a correlação dos H anoméricos em δ 5,02 e 4,86 com os carbonos em δ 76,0 e 78,0, pois os C anoméricos mais blindados são característicos de flavonas C-glicosiladas. O espectro de COSY (400 MHz, CD_3OD , Figura 5-31) contribuiu para a atribuição dos H-2 dos açúcares devido revelar os acoplamentos entre estes H, sinais em δ 4,07, 3,53 e 3,99, e os H anoméricos em δ 5,02 e 4,86. No espectro de HSQC estes mesmos sinais

estavam correlacionados com os C em δ 73,0 e 70,0 respectivamente. O espectro de HMBC (400 MHz, CD₃OD, Figura 5-32) revelou as correlações entre os H anoméricos com os C-6/8 (δ 106,0) e C-9 (δ 158,0) comprovando os locais de ligação dos açúcares, os quais também foram identificados da mesma forma que as Substâncias XIII e XIV.

Baseados nos dados espectrais obtidos e nos dados da literatura (BESSION et al., 1985; Tabela 5-8), foram propostas as estruturas das flavonas di-*C*-glicosiladas 5,7,3',4',-tetraidroxi,6-*C*- β -D-glucopiranosil,8-*C*- α -L-arabinopiranosil luteolina (carlinosídeo) e a 5,7,3',4',-tetraidroxi,8-*C*- β -D-glucopiranosil,6-*C*- α -L-arabinopiranosil luteolina (isocarlinosídeo). Sendo estas substâncias inéditas para o gênero *Vitex*. Anteriormente, em só um artigo de 1966 (SEIKEL et al., 1966) havia sido relatada a presença de flavonóides di-*C*-glicosilados derivados da luteolina e apigenina, as luceninas e viceninas, respectivamente, do caule de *Vitex lucens*. Sabe-se que os flavonóides di-*C*-glicosilados também ocorrem em plantas da família Lamiaceae (DOU et al., 2002), o que reforça mais a semelhança química destas famílias.

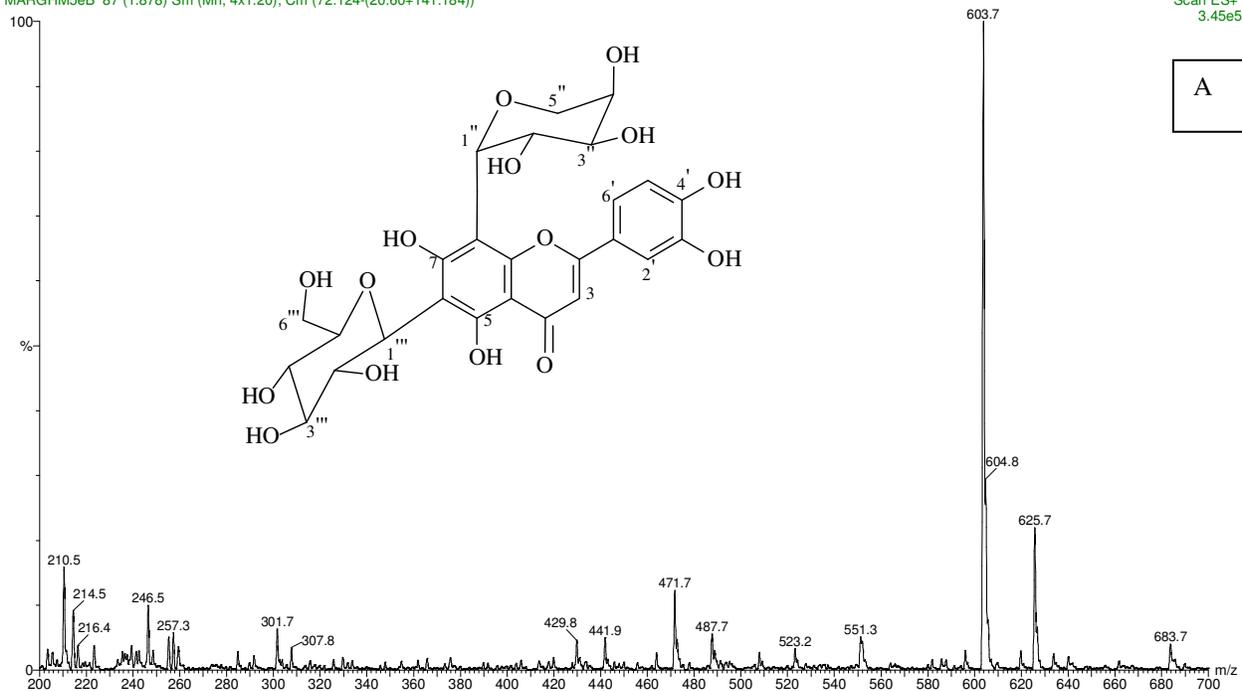
Tabela 5-8- Dados das projeções dos C dos espectros de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC e HSQC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV + XVI e carlinosídeo e isocarlinosídeo

C	carlinosídeo ^a		isocarlinosídeo ^a		Mistura	
2	164,0		163,2		166,0	
3	102,5		102,5		104,0	
4	182,3		182,2		184,0	
5	159,8		160,1		*	
6	108,8		109,3		*	
7	162,0		163,2		*	
8	104,2		102,5		106,0	
9	154,0		153,0		158,0	
10	103,3		103,1		105,0	
1'	121,6		121,6		124,0	
2'	113,8		113,7		114,0; 115,0	
3'	145,8		146,0		147,0	
4'	150,0		150,1		151,0	
5'	116,2		116,1		117,0	
6'	119,9		119,2		121,0; 122,0	
Açúcar	Glic	Ara	Glic	Ara	Glic	Ara
1''	73,5	74,4	73,2	71,5	75,0	76,5
2''	70,8	68,9	71,0	63,3	73,0	70,0
3''	78,9	75,3	79,2	72,6	80,0	76,0
4''	70,4	69,3	70,0	70,2	72,0	71,5
5''	81,7	70,8	81,8	67,2	83,0	72,5
6''	61,2		61,9		63,0	

* Sinal não observado; ^a (20 MHz, DMSO-d_6 ; BESSON et al., 1985)

MARG030902

MARGHM5eB 87 (1.878) Sm (Mn, 4x1.20); Cm (72:124-(20:60+141:184))



MARG030902

MARGHM5eA 94 (2.026) Sm (Mn, 4x1.20); Cm (70:115)

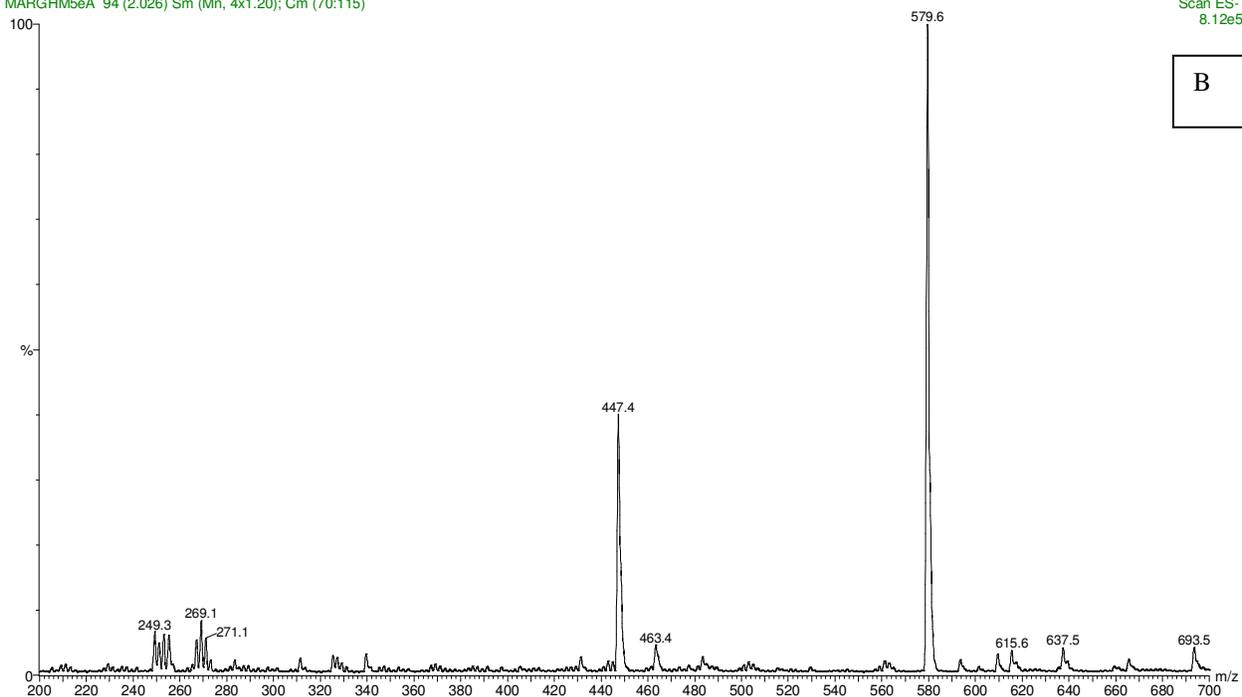


Figura 5-28- Espectros de massas das Substâncias XV e XVI

(EM/ESI, A: modo positivo; B: negativo)

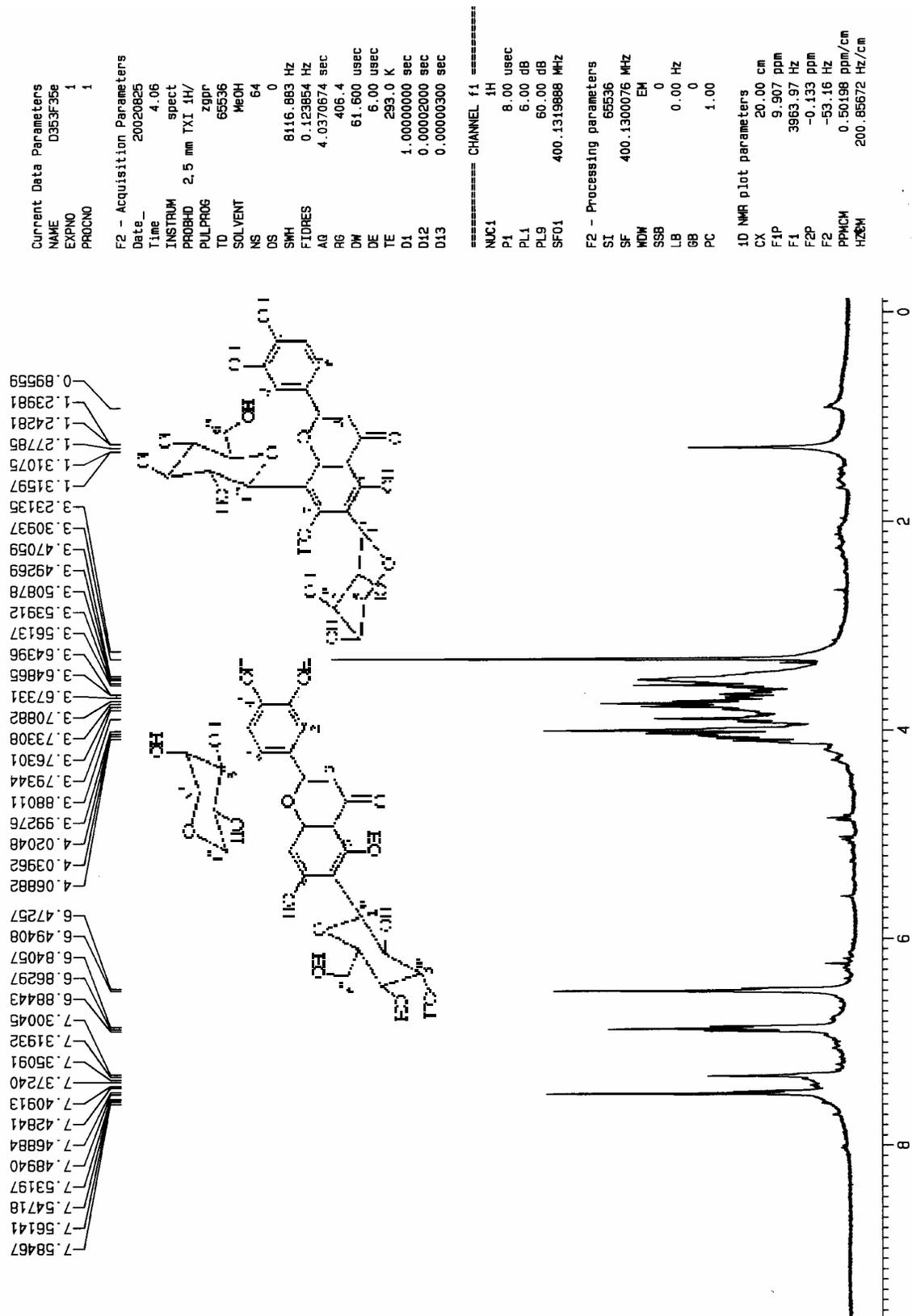


Figura 5-29- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI

Current Data Parameters
 NAME D283A15e
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20030707
 Time 3.38
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zgpr
 TD 65536
 SOLVENT Aceton
 NS 128
 DS 0
 SWH 8116.893 Hz
 FIDRES 0.123654 Hz
 AQ 4.0370574 sec
 RG 812.7
 CW 61.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 293.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D12 0.00002000 sec
 D13 0.00000300 sec

CHANNEL f1 -----
 NUC1 1H
 P1 10.50 usec
 PL1 0.00 dB
 PL9 60.00 dB
 SFO1 400.1335894 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1320667 MHz
 MDW EH
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 10.028 ppm
 F1 4012.71 Hz
 F2P -0.254 ppm
 F2 -101.71 Hz
 PPMCK 0.51413 ppm/cm
 HZCM 205.72101 Hz/cm

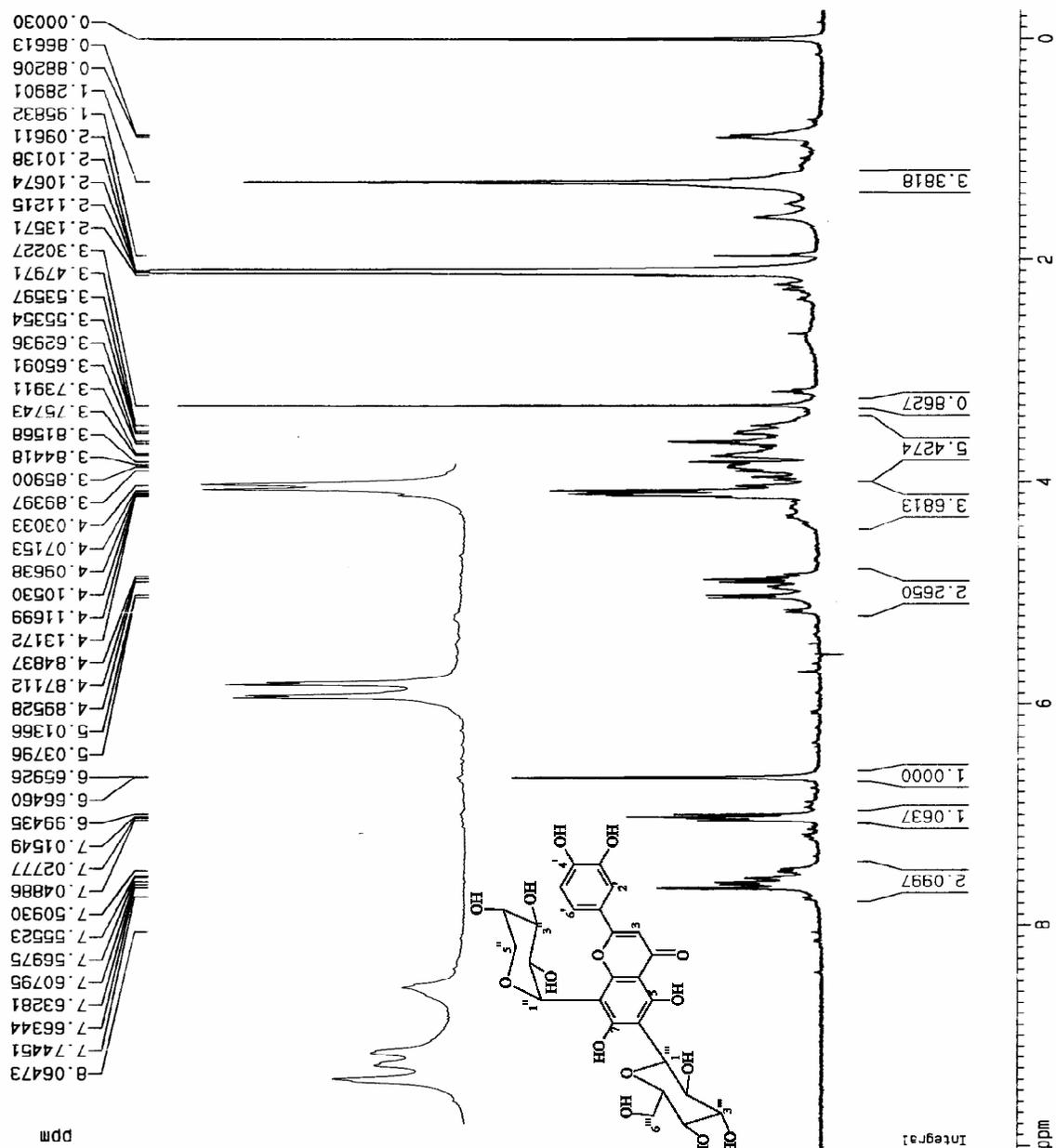


Figura 5-30- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{acetona-d}_6$) das Substâncias XV e XVI

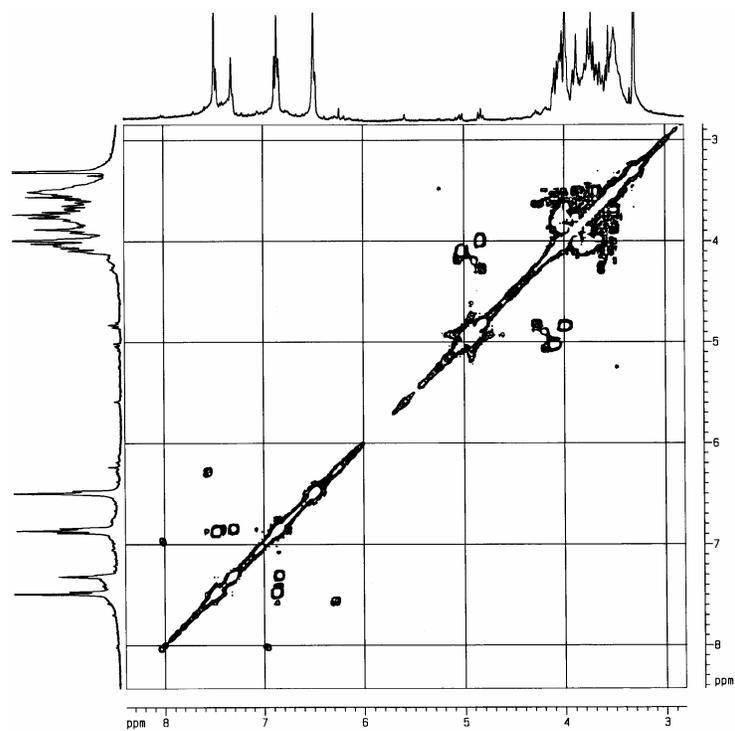


Figura 5-31- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI

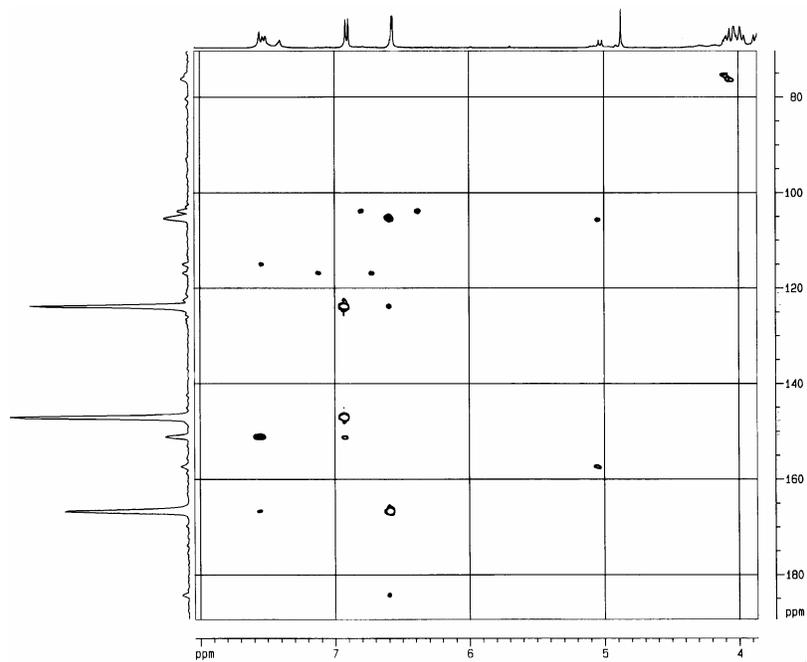


Figura 5-32- Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI

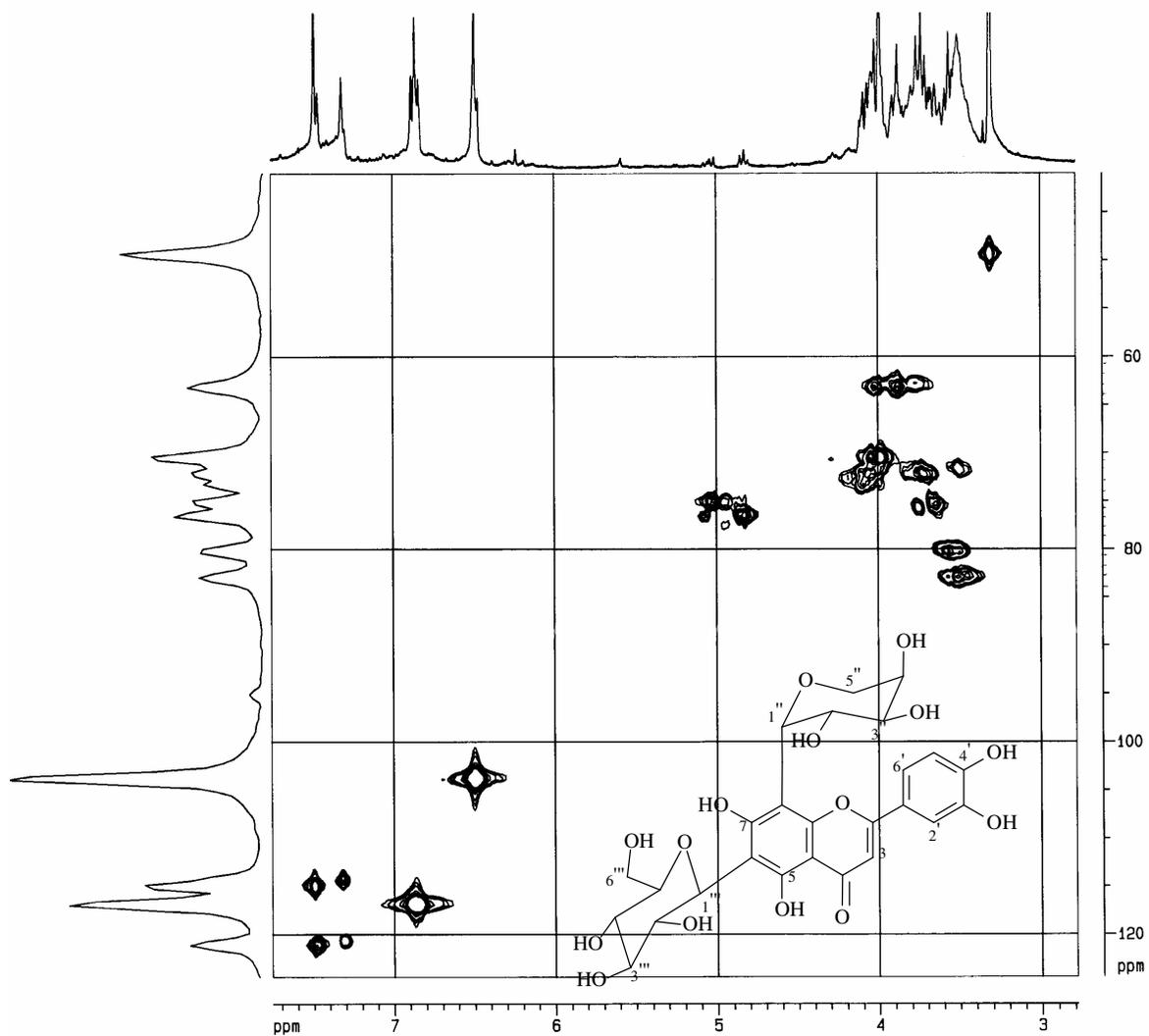
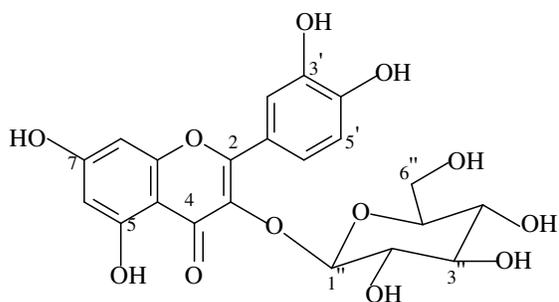
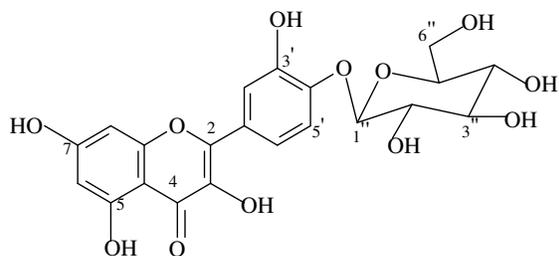


Figura 5-33- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias XV e XVI

5.5. Identificação Substâncias XVII e XVIII



3-O- β -D-glucopiranosil
quercetina ou isoquercitrina



4'-O- β -D-glucopiranosil
quercetina

O extrato metanólico de folha de *V. polygama*, partição diclorometânica, após sofrer várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu as frações dh5dR5, 4dgr4f, dgr6d e dgr8d, que reunidas renderam 8,0 mg, sob a forma de pó amarelo brilhante amorfo.

A análise do espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, Figura 5-40) revelou que a amostra, inicialmente, era uma mistura de flavonóides (Substâncias III, VIII, XVII e XVIII) com sinais característicos para flavona (Sub. III) como o conjunto em δ 6,92 (sl; H-3), δ 6,35 (sl; H-6) e δ 6,04 (sl; H-8); sinais referentes a mais de um anel B *orto*-dissubstituído e sinais que indicavam presença de açúcar em δ 4,90 (d; $J = 7,7$ Hz; H-1) e em δ 3,27 (dd; $J = 12,3$ e $4,5$ Hz; H-6). Após várias etapas cromatográficas em HPLC, somente a graxa foi retirada. Vários espectros de RMN de ^1H (Tabela) foram realizados em diferentes solventes deuterados, sendo evidenciada a presença de dois sinais adicionais referentes a hidrogênios de metoxilas em δ 3,89 e 3,88, referentes à Substância VIII (CD $_3$ OD, 400 MHz, Figura 5-43), e o restante dos sinais permaneceu semelhante à mistura inicial. O experimento de RMN de ^1H de duas dimensões, HMBC, foi realizado para se detectar o carbono de conexão do açúcar à aglicona e também permitiu a atribuição de alguns outros sinais (Figura 5-42, Tabela 5-11). O experimento de NOEDIFF (400MHz, CD $_3$ OD) foi realizado com o intuito de se atribuir a localização das metoxilas. Foi realizada a irradiação dos sinais em δ 3,88-3,89, causando aumento de intensidade no sinal em δ 7,1, não muito conclusivo por se tratar de uma área com muita sobreposição de sinais.

A técnica denominada DOSY (SOUZA & LAVERDE, 2002) foi usada na tentativa de se identificar os flavonóides da mistura, porém não houve sucesso, pois apesar de esperarmos coeficientes de difusão bem diferentes para os constituintes da mesma, a sobreposição dos sinais referentes a mais de um anel B orto-dissubstituído impediu a distinção dos sinais.

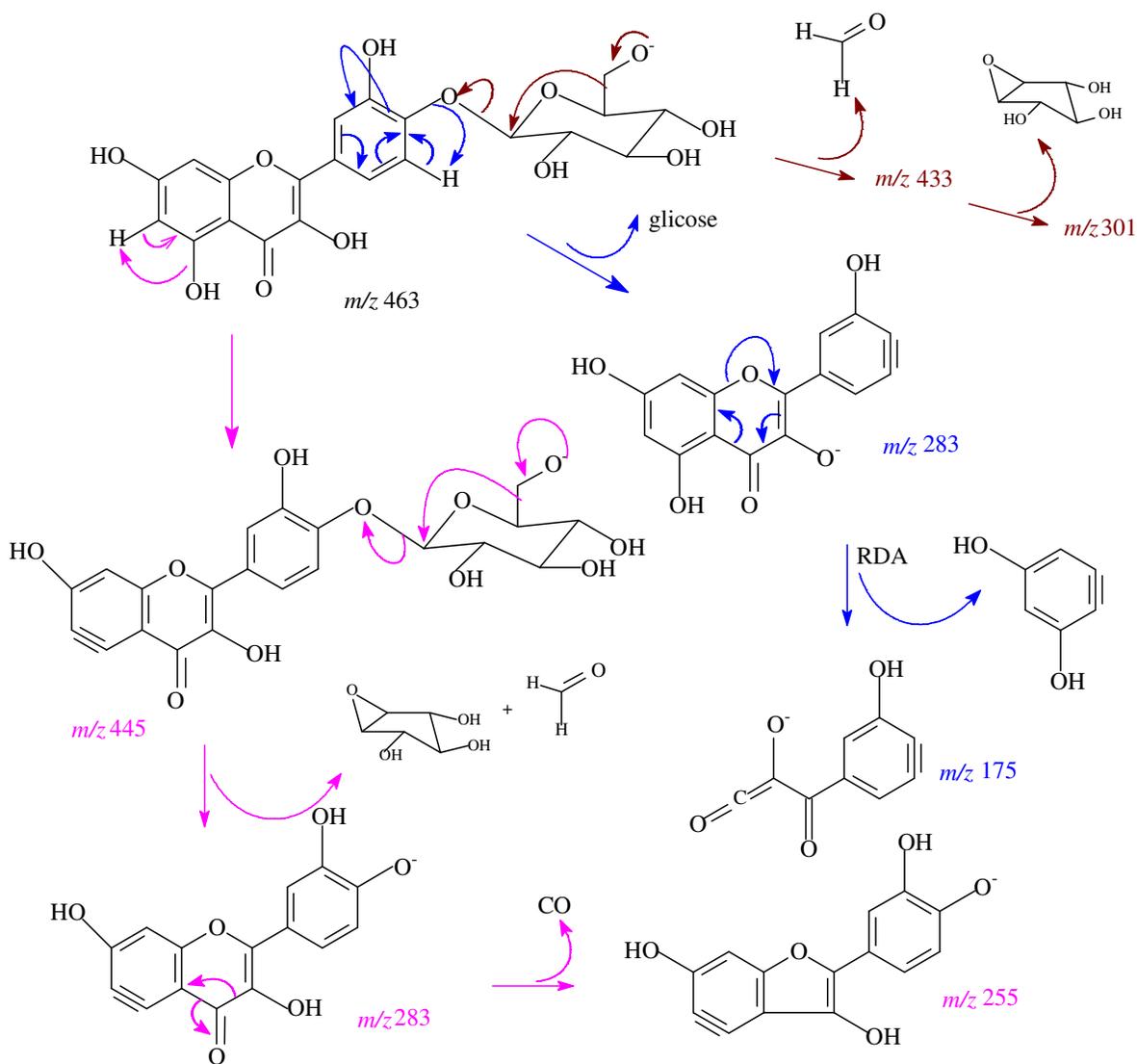
A análise do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6 , Figura 5-39) revelou um sinal para carbonila quelada de flavona em δ 181,9 corroborando com o sinal de OH quelada observado nos espectros de RMN de ^1H realizados em acetona e piridina deuteradas (Figura 5-41, Figura 5-43); vários sinais entre δ 167,0 e 94,7 podendo pertencer à classe flavona (Sub. III) ou flavonol (Subst. VIII, XVII e XVIII); confirmou a presença da molécula de açúcar pelos sinais referentes aos carbonos carbinólicos em δ 78,4; 76,8 e 60,5 e mostrou o sinal relativo ao C de metoxila (Sub. VIII) em δ 56,1.

Foi realizado um espectro de massas no modo negativo usando-se uma pré-coluna C-18 no injetor (Figura 5-34), com o intuito de promover a separação das possíveis substâncias da mistura na análise por massas, o que não foi conseguido. Foram revelados um pico (100%), referente a uma das possíveis substâncias (XVII e XVIII) da mistura e em maior quantidade, relativo ao íon pseudo molecular a m/z 463 $[\text{M-H}]^-$; um pico (88%) a m/z 299 $[\text{M-H}]^-$, relativo à segunda substância (Sub. III); um pico (40%) a m/z 329 $[\text{M-H}]^-$, relativo à terceira substância (Sub. VIII). Os picos a m/z 299 e 329 foram atribuídos às flavonas 3'-O-metil luteolina (Substância III) e 3,3'-dimetoxi,5,7,4'-triidroxiflavona (Substância VIII), encontradas anteriormente em frações próximas a esta estudada.

O espectro de massas, ESI/modo negativo (voltagem do cone de 9,7 eV; Figura 5-35), de uma amostra passada várias vezes no sephadex, revelou um pico (100%) relativo ao íon pseudo molecular a m/z 463 $[\text{M-H}]^-$. Usando-se as mesmas condições, porém com uma voltagem maior (30 eV; Figura 5-36), foi revelado um pico (100%) a m/z 283 $[\text{M-H-180}]^-$, confirmando ser uma mistura de flavonóides glicosilados e isômeros. No modo positivo, o pico de maior intensidade foi o relativo a m/z 465 $[\text{M+H}]^+$. Também foi realizado o espectro no modo positivo com adição de cloreto de sódio para se confirmar a massa e um pico (30%), referente ao aduto de sódio, a m/z 487 $[\text{M+Na}]^+$ foi observado. No modo negativo com adição de cloreto de sódio foi

observado um pico (20%), aduto de cloro, a m/z 499 $[M+Cl]^-$ (Figura 5-37). As informações obtidas pelos espectros de íons filhos do pico a m/z 463 (Figura 5-38) nos forneceu dados para a proposição de um modelo de fragmentação (Esquema 5-1) que possibilitou a identificação dos flavonóides como glicosídeos de fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{12}$. As correlações obtidas pelo espectro de HMBC (Figura 5-42) indicaram serem dois flavonóis isômeros de posição do açúcar.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e na comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; Tabela 5-9), as estruturas 3-*O*- β -D-glucopiranosil quercetina e 4'-*O*- β -D-glucopiranosil quercetina foram propostas, sendo inéditas para a espécie.



Esquema 5-1- Proposta de fragmentação da Substância XVIII

MAR5dR 110 (1.676) Sb (3,20.00); Cm (104:152-(170:209+56:92))

Scan ES-
1.79e5

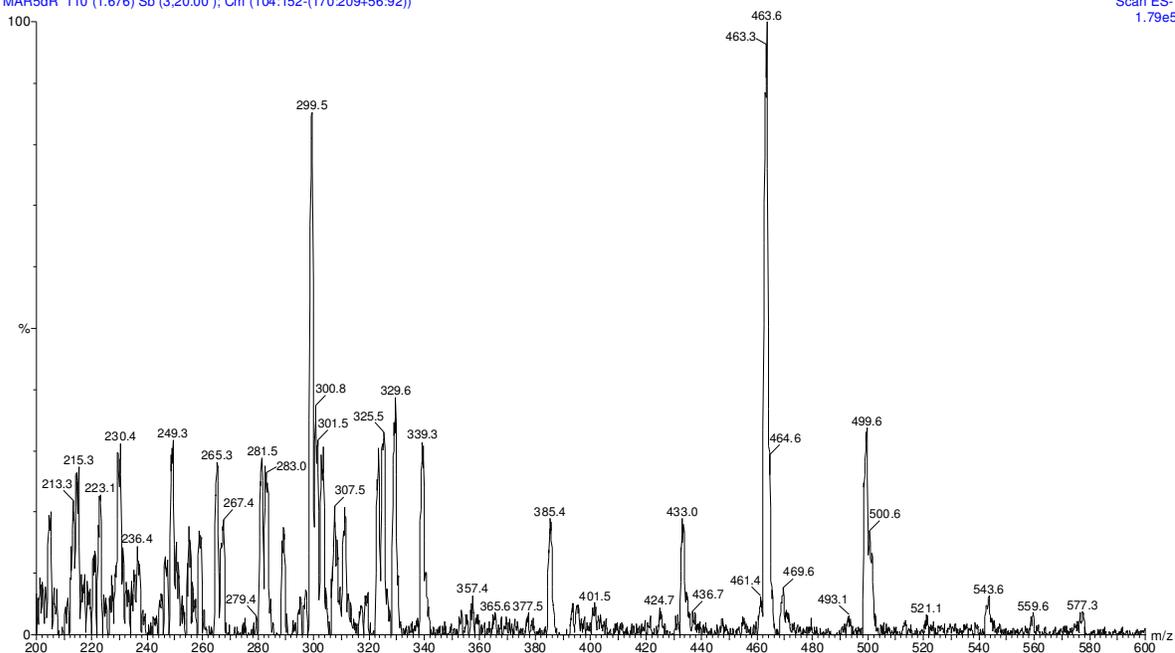


Figura 5-34- Espectro de massas (ESI, modo negativo, pré-coluna G-ODS) da mistura das Substâncias XVII e XVIII e Substâncias III e VIII

Margareth1802neg 62 (1.370) Sm (Mn, 2x1.00)

Scan ES-
9.76e5

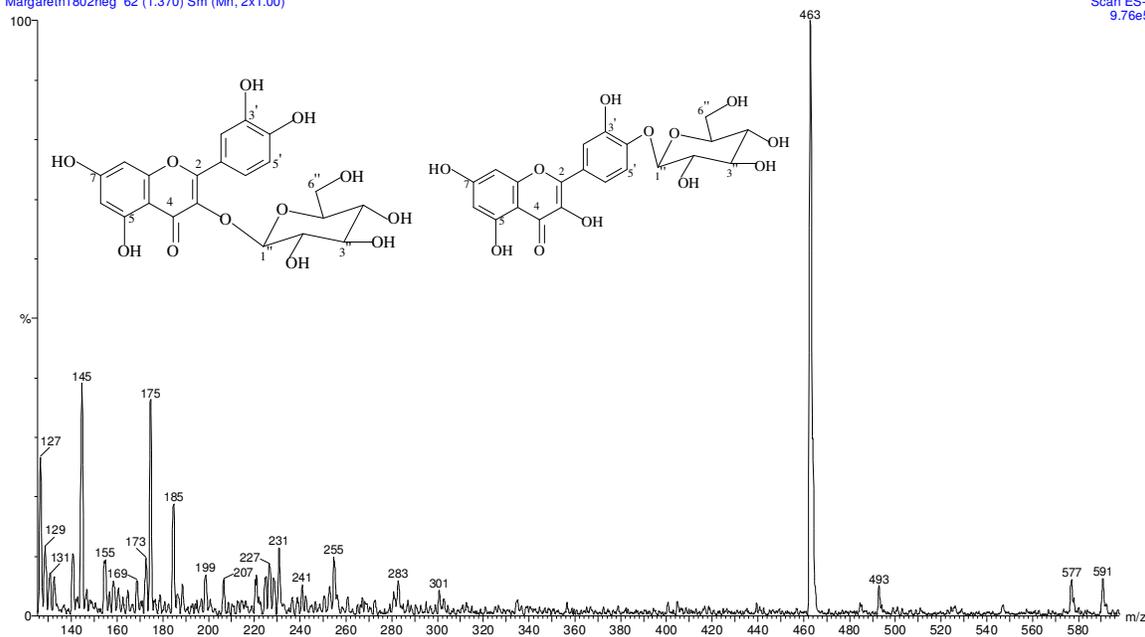


Figura 5-35- Espectro de massas (ESI, modo negativo, 9,7 eV) da mistura das Substâncias XVII e XVIII

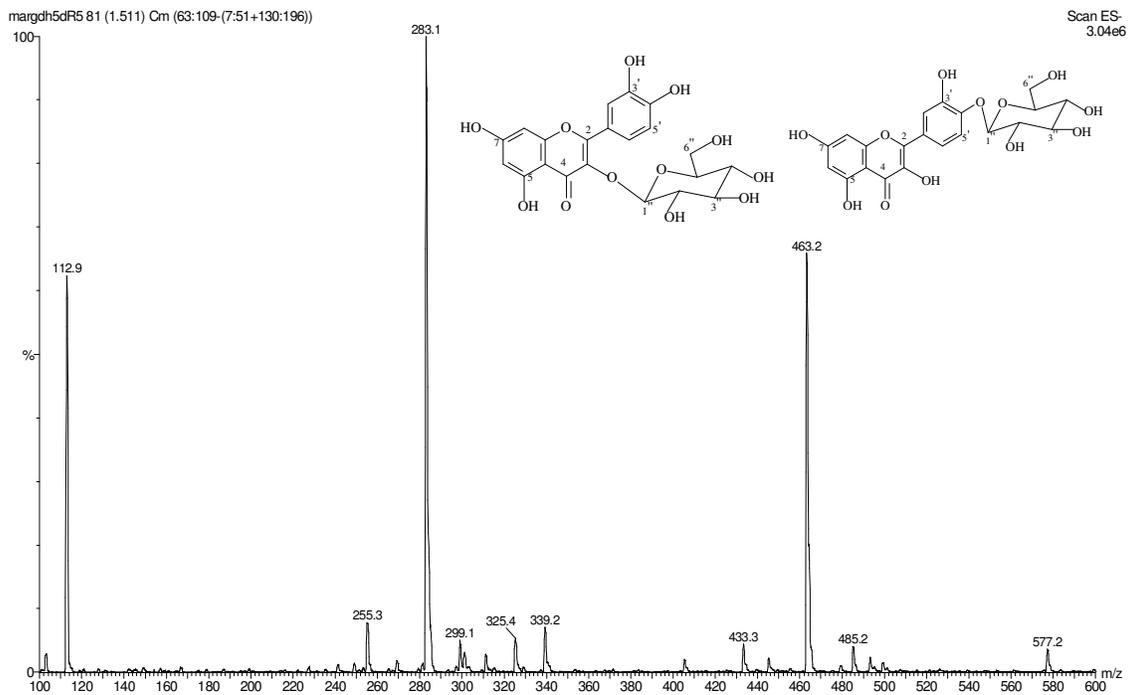


Figura 5-36- Espectro de massas (ESI, modo negativo, 30,0 eV) da mistura das Substâncias XVII e XVIII

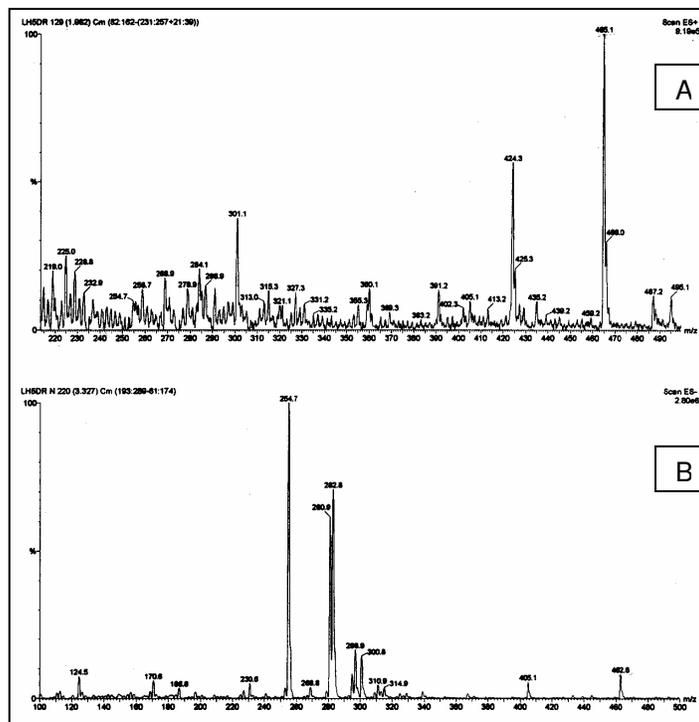


Figura 5-37- Espectro de massas da mistura das Substâncias XVII e XVIII (ESI, A: modo negativo, B: modo positivo, com adição de NaCl)

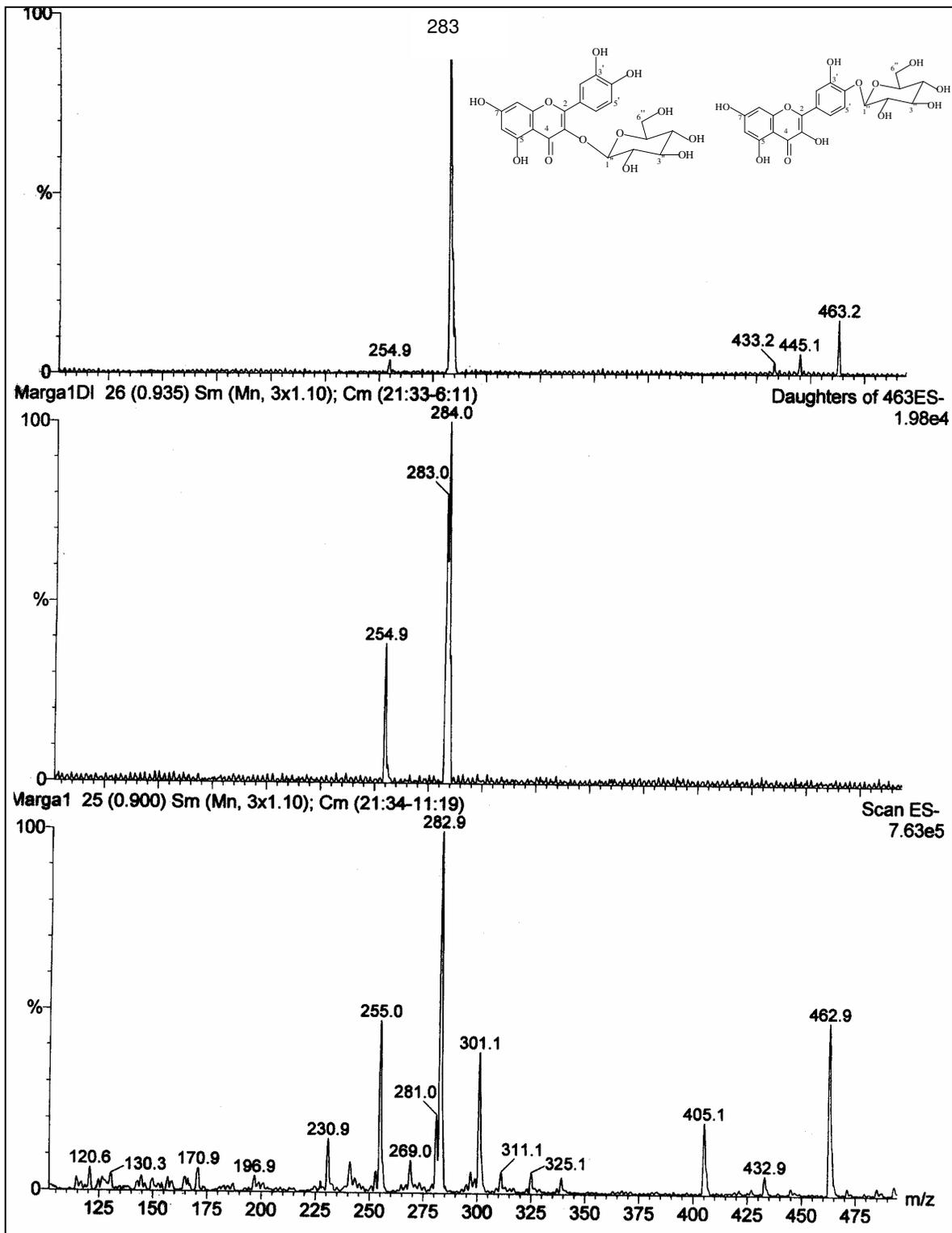


Figura 5-38- Espectro de massas (ESI, modo negativo, 25 eV) da mistura das Substâncias XVII e XVIII

Tabela 5-9- Dados do espectro de RMN ¹H da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII em vários solventes deuterados ^a

C ₅ D ₅ N (400 MHz)	DMSO-d ₆ (400 MHz)	CD ₃ OD (400 MHz)	(CD ₃) ₂ CO (200 MHz)
13,73 (s)	8,03 (s)	8,5 (s)	12,98 (s)
7,77-7,76 (d; 2,2)	7,53 (d; 1,8)	7,60 (d; 2,2)	7,61 (m)
7,57-7,56 (d; 2,2)	7,48 (dl; 8,7)	7,54 (d; 1,8)	7,19-6,98 (vários m)
7,41 (d; 1,4)	6,97 (d; 8,5)	7,51-7,49 (dd; 8,4; 2,2)	6,93 (sl)
7,34 (sl)	6,92 (sl)	7,12-7,10 (d; 8,5)	6,88-6,86 (m)
7,33 (d; 1,5)	6,77 (dl; 8,4)	7,06-7,04 (d; 8,5)	6,70 (sl)
7,02 (sl)	6,72 (sl)	7,05-7,03 (dd)	6,61 (t; 1,8)
6,88 (d; 2,0)	6,56 (d; 8,7)	6,94-6,91 (m)	6,28 (t; 2,0)
6,81 (d; 2,0)	6,35 (sl)	6,87-6,85 (d; 8,1)	5,13-5,09 (d; 8,1)
5,52-5,50 (d; 8,0)	6,04 (sl)	6,86-6,84 (d; 8,1)	5,09-5,05 (d; 8,4)
5,51-5,49 (d; 8,1)	4,90 (d; 7,7)	6,85-6,83 (d; 8,6)	4,28-4,21 (m)
4,48-4,47 (m)	4,16 (m)	6,56 (sl)	3,89 (s)
4,26-4,23 (dd)	3,47 (dd)	6,35 (d; 2,1)	3,88 (s)
3,97-3,95 (dd)	3,27 (dd; 12,3; 4,5)	6,13-6,12 (t; 2,1)	3,87-3,82 (m)
3,85 (s)		4,15-4,12 (m)	3,60-3,52 (dd; 12,4; 4,4)
3,80 (s)		3,89 (s)	
		3,88 (s)	
		3,84-3,82 (d; 8,4)	
		3,76-3,73 (dd; 12,4; 2,4)	
		3,53-3,47 (dd; 12,4; 4,3)	

^a δ em ppm; multiplicidade e J (Hz) entre parênteses

Tabela 5-10- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII, da 3'-O-metil luteolina (1), 3-O- β -D-glucopiranosilquercetina (2) e 4'-O- β -D-glucopiranosilquercetina (3)

C	1 ^a	2 ^a	3 ^a	Mistura
2	163,7	156,5	147,0	167,0; 163,1 148,1
3	103,8	133,7	136,5	103,6
4	181,8	177,6	176,3	181,9
5	161,6	161,3	161,0	161,8
6	98,8	98,8	98,7	99,7
7	164,2	164,2	164,3	163,1
8	94,0	93,6	93,9	94,7
9	157,4	156,5	156,7	157,9
10	103,3	104,2	103,5	104,2; 103,6
1'	120,4	121,4	125,8	120,2; 121,0 124,2; 127,3
2'	110,2	115,2	115,7	112,1; 115,2 115,7
3'	150,8	144,8	147,0	144,0; 147,5
4'	148,0	148,5	146,4	148,1
5'	115,8	116,5	117,0	115,7; 117,9
6'	120,4	121,6	120,0	120,2; 121,0
1''		101,4	102,2	99,7
2''		74,3	73,7	*
3''		76,8	76,4	76,8
4''		70,3	70,5	*
5''		77,5	77,5	78,4
6''		61,3	61,4	60,5

* Sinais não observados; ^a (AGRAWAL, 1989)

Tabela 5-11- Dados do espectro de RMN ¹H /HMBC da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII

H	δ ppm ^a	C correlacionados ^a
H-2'	7,53 (d; 1,8)	167 (<i>J</i> ₃ ; C-2 flavona)
H-6'	7,48 (dl; 8,7)	167 (<i>J</i> ₃ ; C-2 flavona)
H-5'	6,97 (d; 8,5)	145 (<i>J</i> ₃ ; C-3' flavona)
H-3	6,92 (sl)	165 (<i>J</i> ₄ ; C-2 flavona)
H-6'	6,77 (dl; 8,4)	167 (<i>J</i> ₃ ; C-2 flavona)
H-2'	6,72 (sl)	125 (<i>J</i> ₂ ; C-1' flavonol)
H-3		133 (<i>J</i> ₄ ; C-3 flavonol)
		148 (<i>J</i> ₃ ; C-2 flavonol)
H-6	6,35 (sl)	167 (<i>J</i> ₂ ; C-2 flavona)
H-8	6,04 (sl)	183 (<i>J</i> ₂ ; C-4 flavona)
		176 (<i>J</i> ₄ ; C-4 flavonol)
		185 (<i>J</i> ₄ ; C-4 flavona)
H-anomérico	4,90 (d; 7,7)	116 e 125
		99,7 (<i>J</i> ₁)
		133 (C-3 flavonol)
		148 (C-3' ou 4' flavonol)

^a (400 MHz;DMSO-d₆); multiplicidade e *J* (Hz) entre parênteses

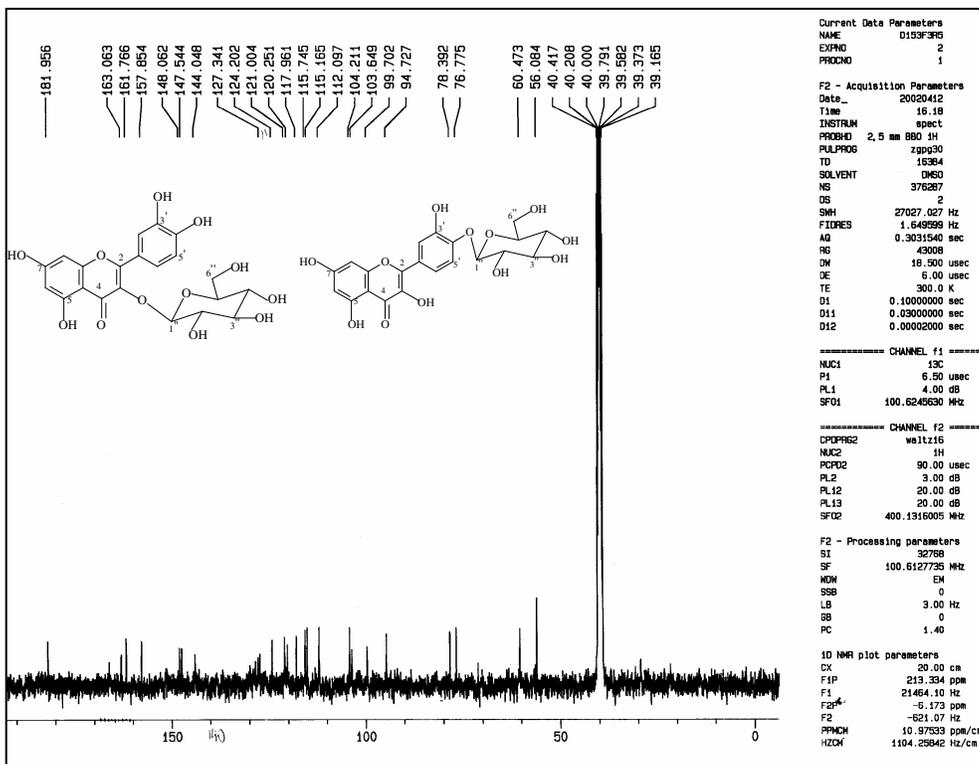


Figura 5-39- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO-d_6) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII

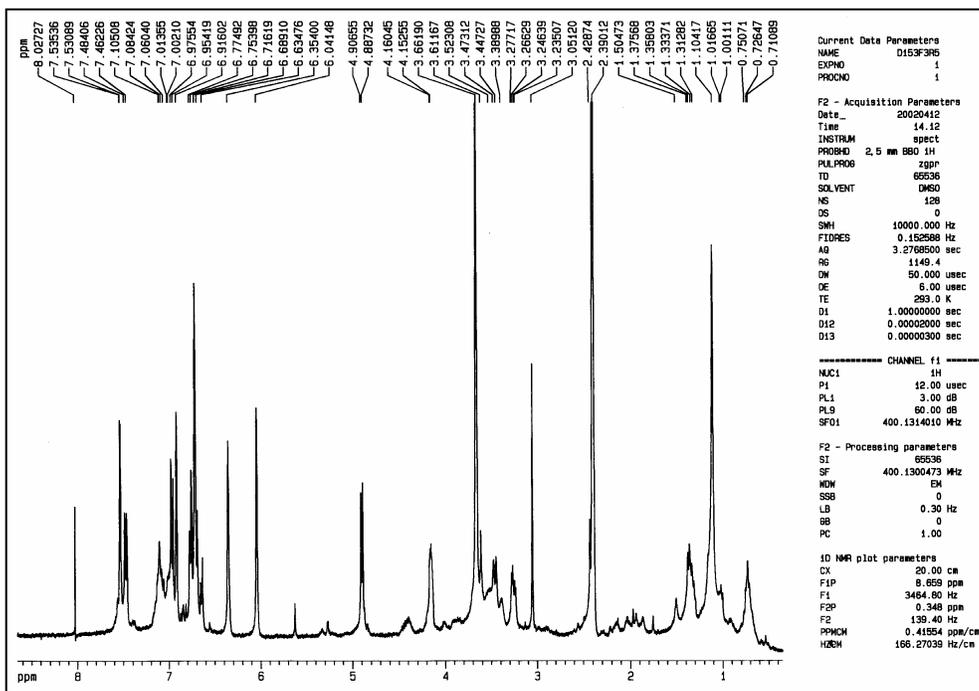


Figura 5-40- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) da mistura de Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII

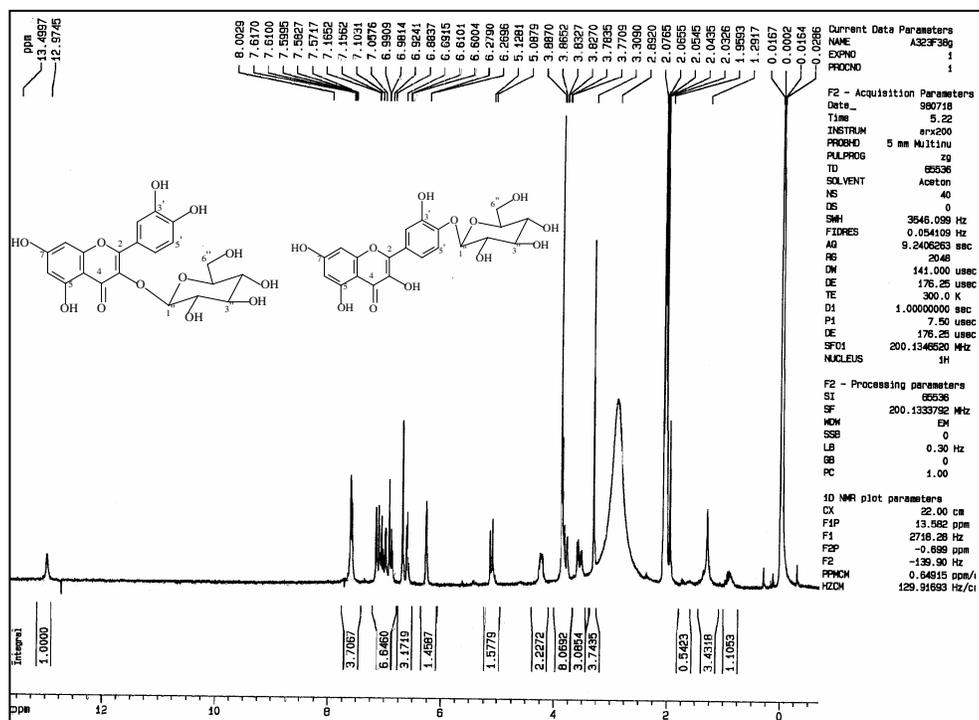


Figura 5-41- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII

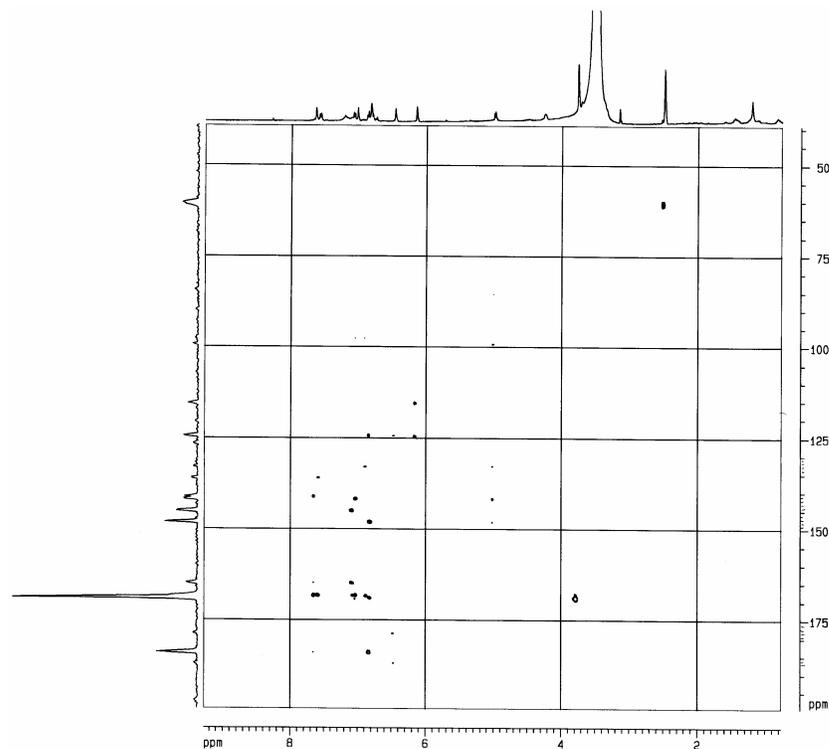


Figura 5-42- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, DMSO- d_6) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII

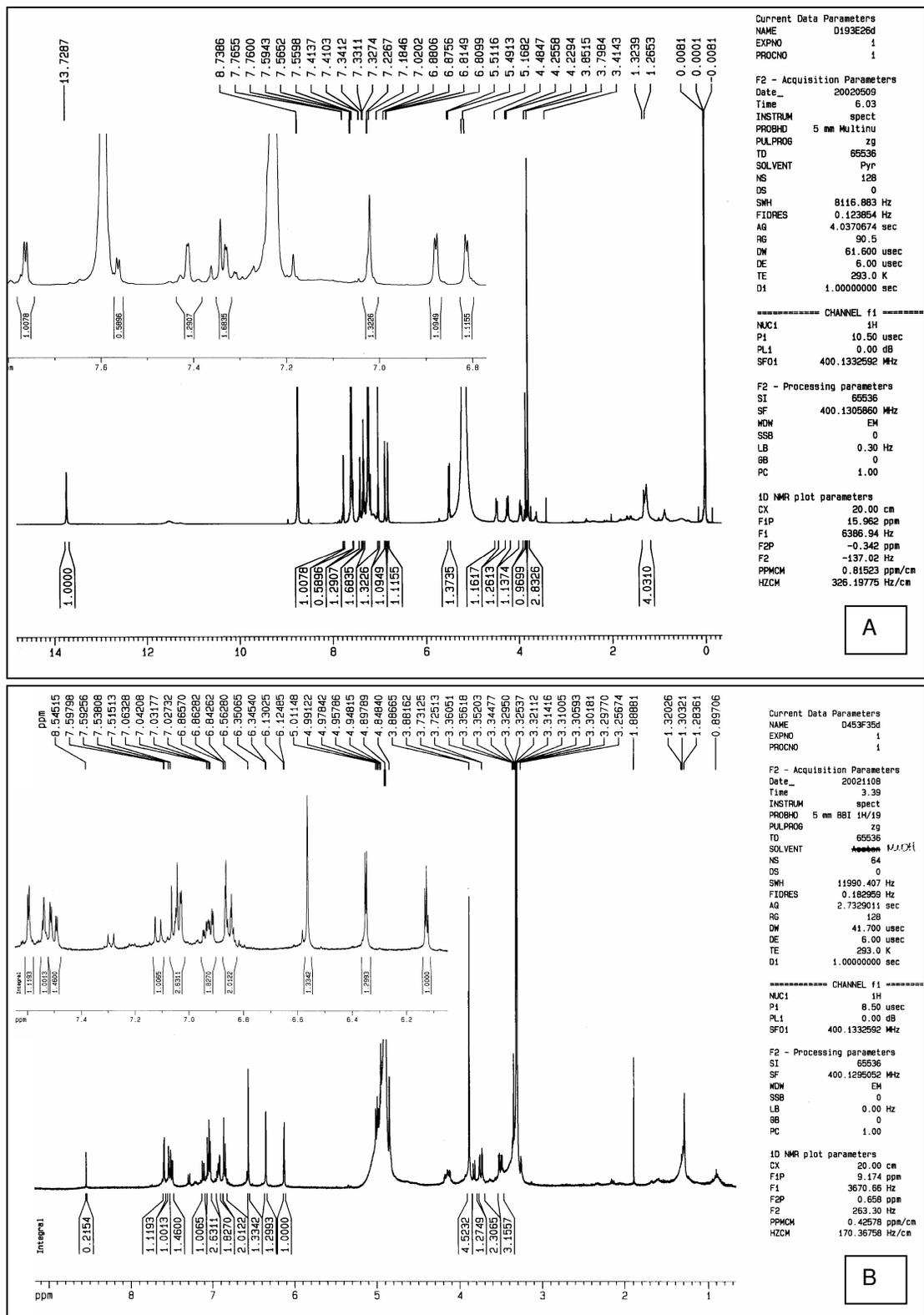


Figura 5-43- Espectro de RMN 1H (400 MHz, A: C_5D_5N ; B: CD_3OD) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII

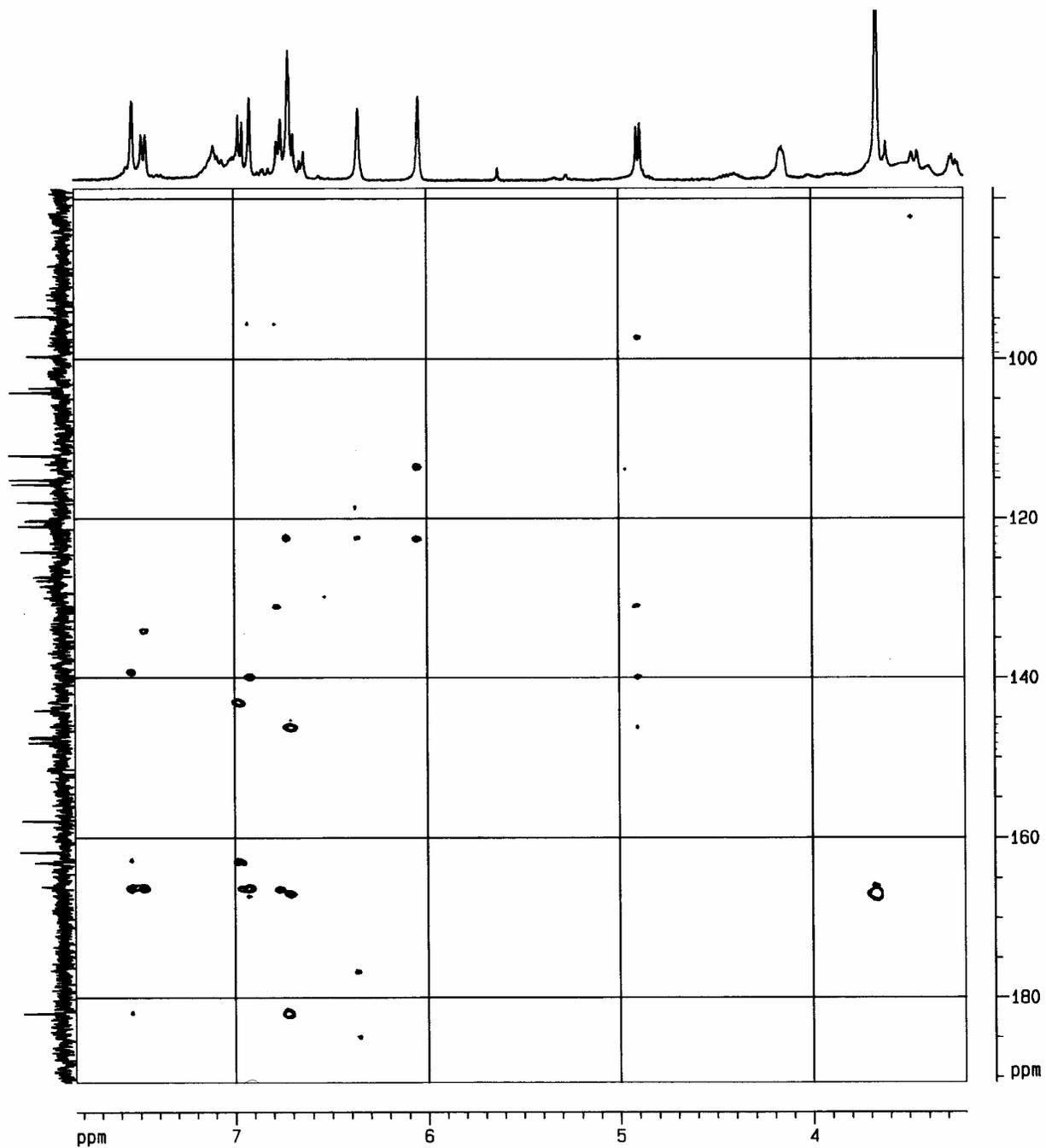
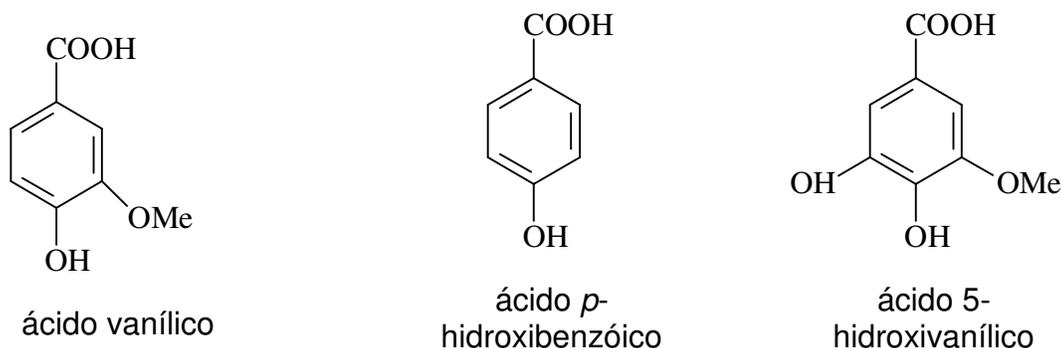


Figura 5-44- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, DMSO-d_6) da mistura das Substâncias III e VIII e das Substâncias XVII e XVIII

5.6. Identificação das Substâncias XIX, XX e XXI em mistura



O extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas de *V. polygama* após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu as frações F4c6l, 64,7 mg, c5lab2 e c5lab3, 4,4 e 1,2 mg, respectivamente, as quais se apresentaram como um pó branco e amorfo.

O espectro de massas, EM/ESI modo negativo, da fração c5lab2 revelou picos referentes aos íons pseudo moleculares $[M-H]^-$ a m/z 137, 167 e 183 (Figura 5-47) sugerindo uma mistura de ácidos fenólicos.

A análise do espectro de RMN de 1H (400 MHz, acetona- d_6 , Figura 5-48) mostrou sinais que, a princípio e em conjunto, pareciam com os de um flavonóide, porém a CCDA indicava duas manchas bem próximas que se revelavam marrons no λ 254 nm da lâmpada de UV e azuis brilhantes no λ 365 nm. As mesmas manchas ficavam incolores quando borrifadas com o revelador vanilina sulfúrica e posterior aquecimento, diferentemente dos flavonóides anteriormente isolados. O sinal revelado em δ 7,34 (s) poderia ser atribuído a um H de um anel aromático cujos H são química e magneticamente equivalentes (Subst. XXI). Os sinais centrados em δ 7,92 e 6,92 (ambos d; $J = 8,7$ Hz), seriam característicos de H de um anel *p*-substituído (subst. XX). O conjunto de sinais em δ 7,59 (dd; $J = 8,2$ e 1,8 Hz); δ 7,57 (d; $J = 1,8$ Hz) e δ 6,91 (d; $J = 8,2$ Hz) poderia ser relacionado a hidrogênios de um anel trissubstituído (Subst. XIX).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C da mistura (100 MHz, acetona- d_6 ; Figura 5-45; Tabela 5-12), mostrou 3 sinais de carbonilas carboxílicas confirmando a presença dos ácidos.

A preparação de uma placa preparativa 20,0 x 20,0 cm, usando-se Dic/MeOH 9:1 como eluente, apesar de não apresentar boa resolução, foi suficiente para separar pequenas porções de duas substâncias, as quais puderam ser, então, identificadas pelos seus respectivos espectros de RMN de ^1H .

Um dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6 ; Figura 5-50), revelou um sinal centrado em δ 7,61 (dd, $J = 8,2$ e $1,8$ Hz, H-6); um sinal em δ 7,57 (d, $J = 1,8$ Hz, H-2) e um em δ 6,95 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5), confirmando ser uma das substâncias composta de um anel benzênico 1,3,4-trissubstituído, sendo um dos substituintes uma metoxila, cujo sinal foi revelado em δ 3,95 (s). O espectro de massas dessa substância, ESI modo negativo (Figura 5-46), revelou um pico referente ao íon pseudo molecular $[\text{M-H}]^-$ a m/z 167, corroborando para uma fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ atribuída à Substância XIX, ácido vanílico (SAKUSHIMA et al., 1995).

O outro espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6 , Figura 5-49) revelou um sinal de base alargada centrado em δ 7,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2 e H-6) e um sinal também de base alargada em δ 6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3 e H-5) referentes a um sistema de acoplamento AA'XX' de um anel benzênico *para*-substituído, condizente com a Substância XX, de fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ (DAYRIT et al., 1987).

Tabela 5-12- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI e do ácido vanílico

C	XIX	ácido vanílico ^a	XX	XXI
1	122,9	122,7	123,3	*
2	124,9	124,8	116,7	108,1
3	148,0	148,0	115,9	130,9
4	152,0	152,1	148,4	132,8
5	113,5	115,5 [#]	115,9	*
6	115,5	113,4 [#]	116,7	*
COOH	167,8	167,7	162,6	167,9
OMe	56,3	56,3	-	56,6

^a (SANTOS, 2000) ; * Sinais não observados; [#] Sinais trocados

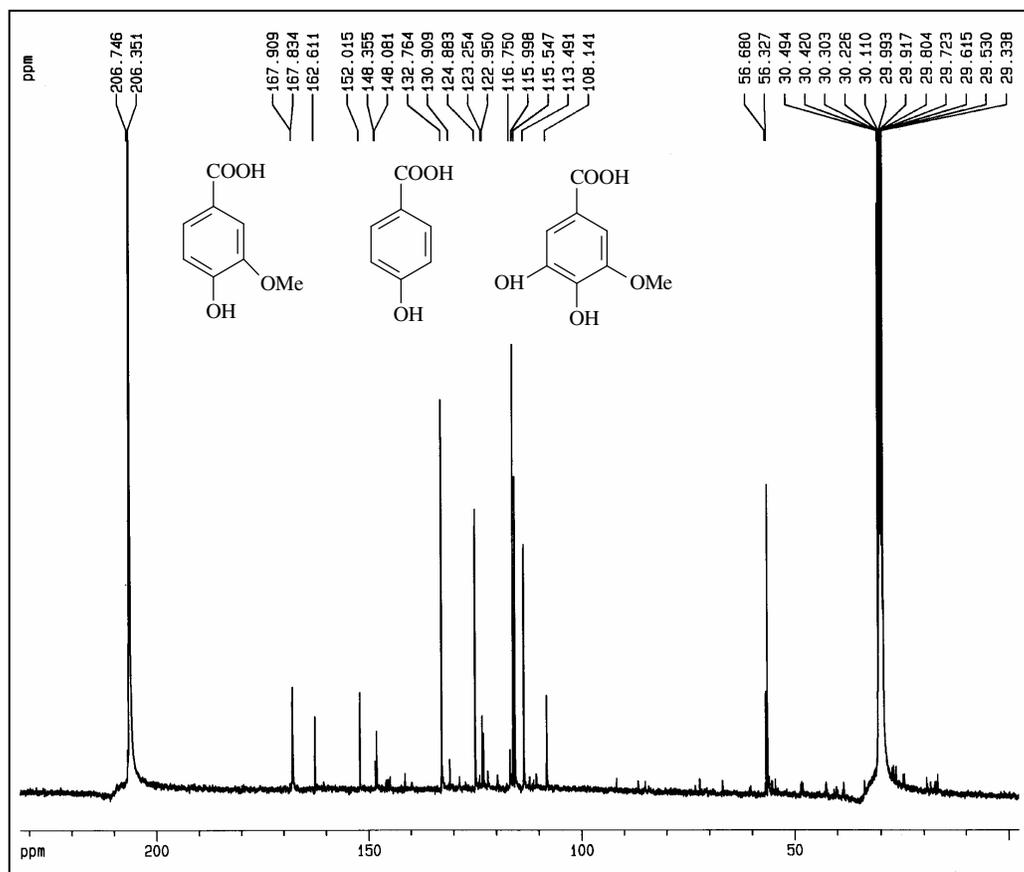


Figura 5-45- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI

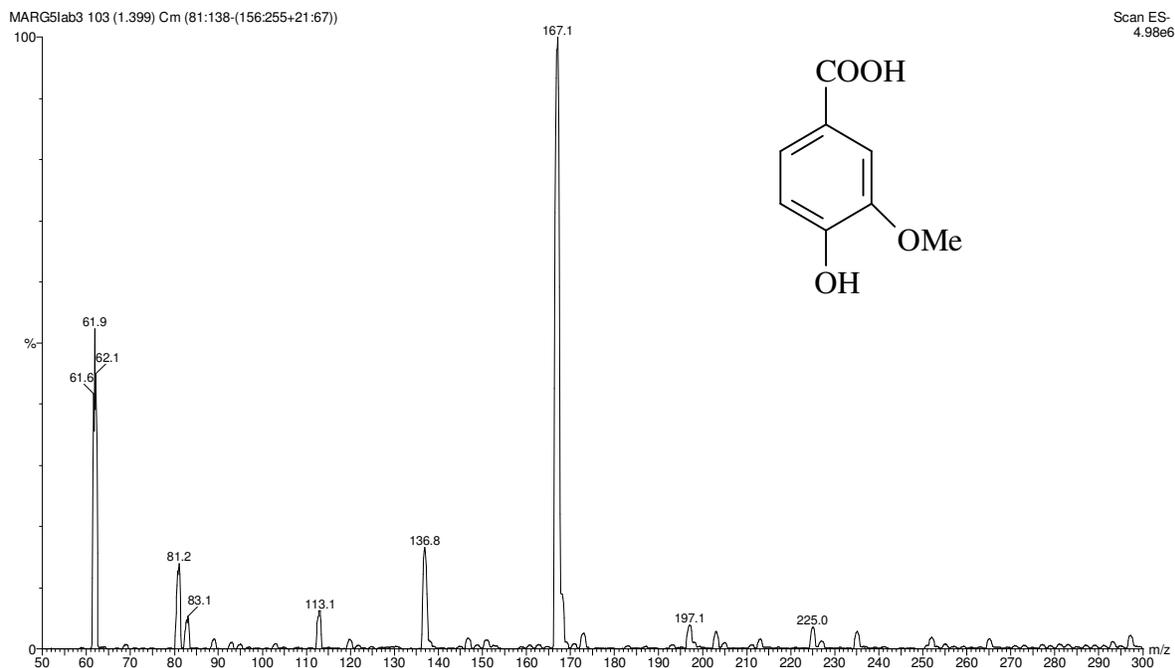


Figura 5-46- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XIX

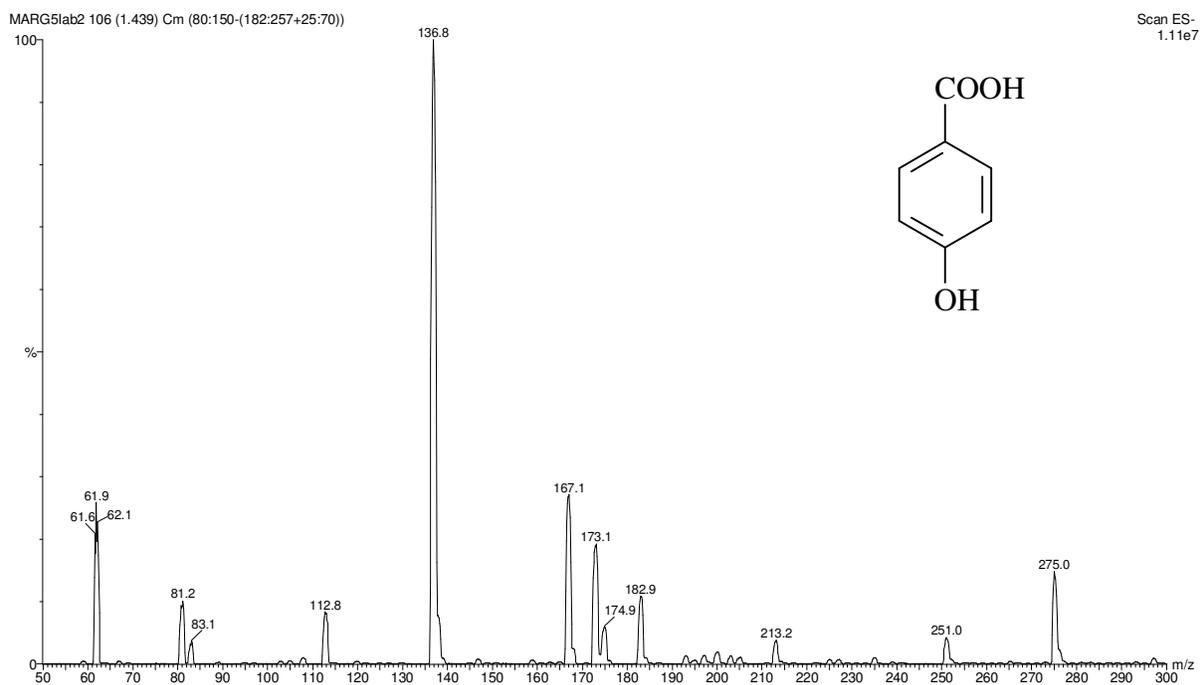


Figura 5-47- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI

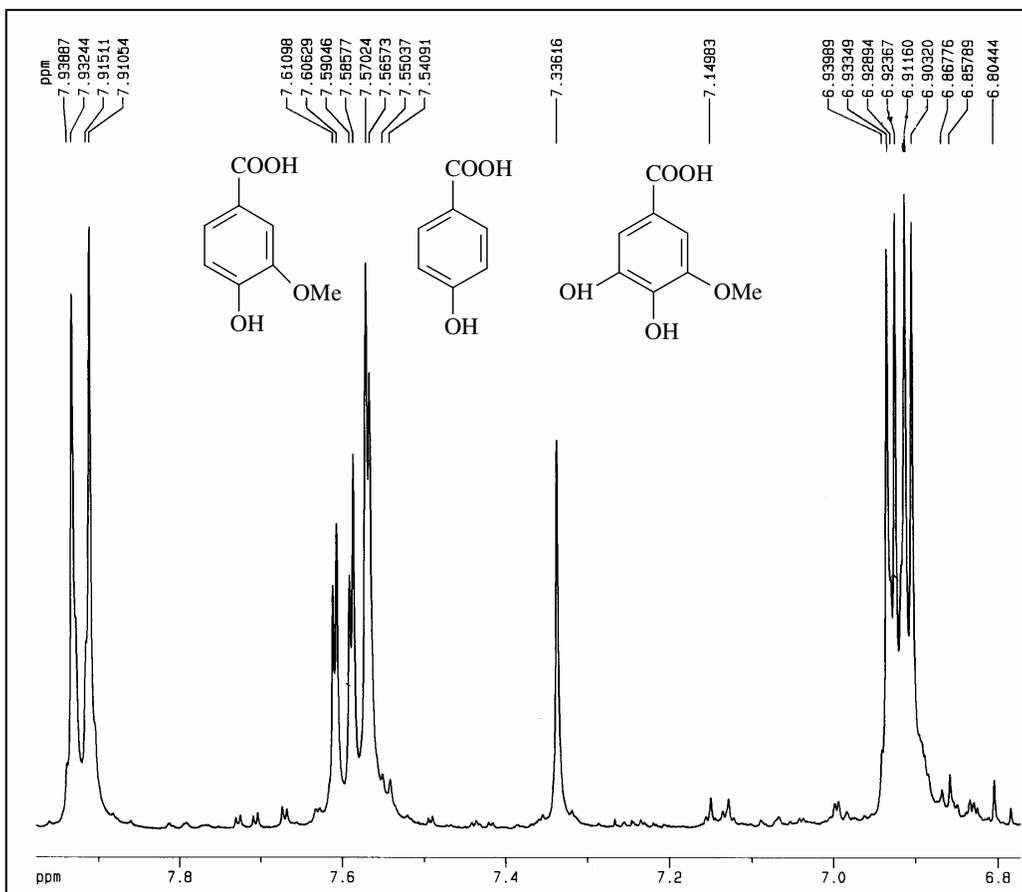


Figura 5-48- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XIX, XX e XXI

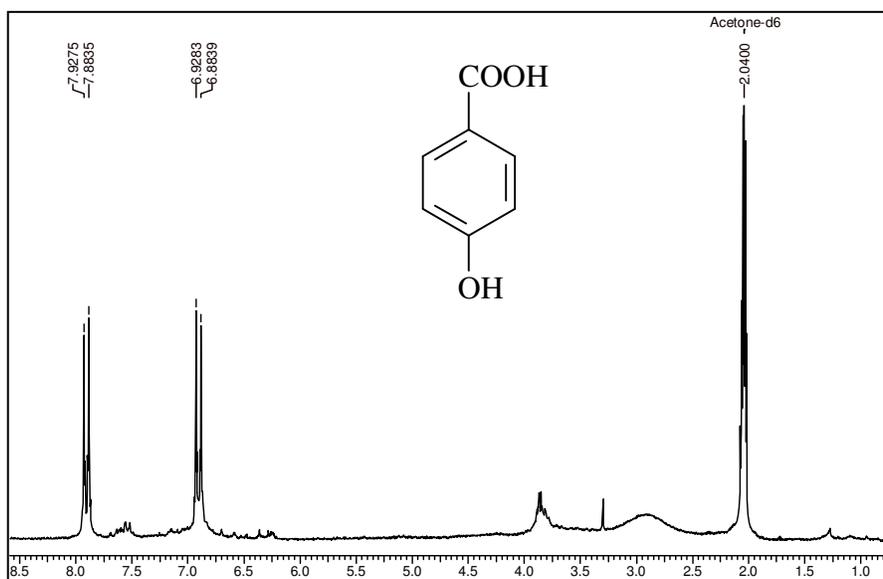


Figura 5-49- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância XX

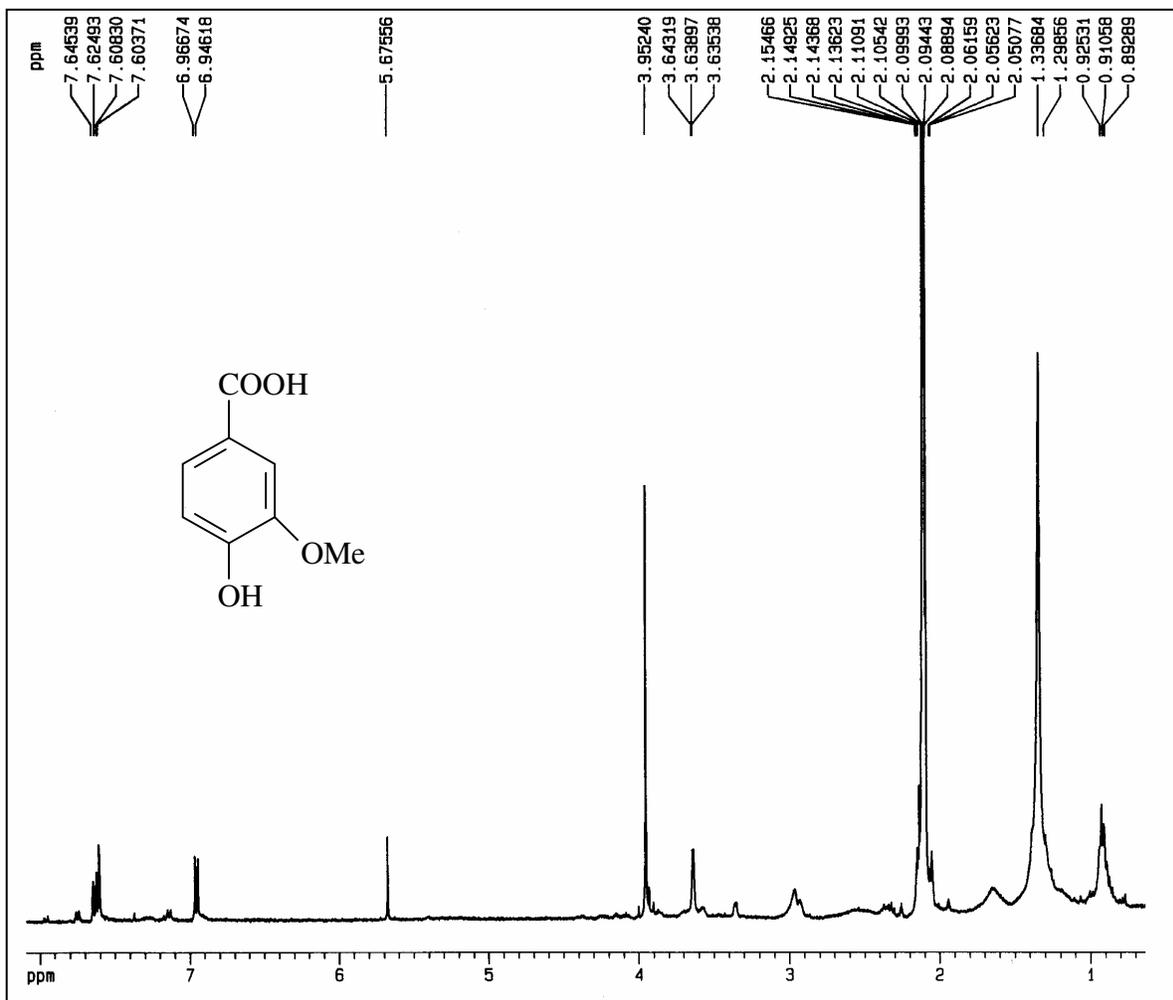
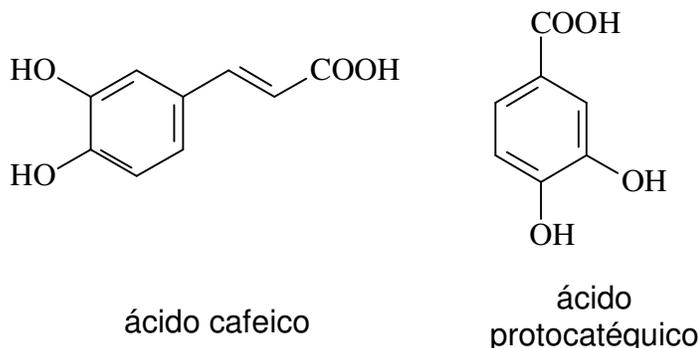


Figura 5-50- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) da Substância XIX

5.7. Identificação das Substâncias XXII e XXIII em mistura



O extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas de *V. polygama* após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu a fração F5btH2, a qual se apresentou como um pó branco e amorfo.

A análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6 , Figura 5-52) indicou ser uma mistura de ácidos fenólicos por apresentar os sinais característicos de uma porção fenilpropanoídica com os H olefínicos em configuração *trans*, devido aos dois sinais centrados em δ 7,52 e 6,25 (d, $J = 15,9$ Hz), além de dois conjuntos de sinais característicos de anel benzênico 3,4-dissubstituído em δ 7,51 e 7,43 sobrepostos ao sinal de um dos H olefínicos, um sinal em δ 7,14 (d, $J = 2,0$ Hz, H-2'); um em δ 7,03 (dd, $J = 8,1$ e 2,0 Hz, H-6'); um em δ 6,88 (d, $J = 8,1$ Hz, H-5') e outro em δ 6,85 (d, $J = 8,2$ Hz, H-5').

A constituição da mistura foi confirmada com base nos dados obtidos pelo espectro de massas EM/ESI, modo negativo (Figura 5-51), o qual apresentou dois picos relativos aos íons pseudo-moleculares a m/z 179 $[\text{M-H}]^-$, correspondendo a 100%, e m/z 153 $[\text{M-H}]^-$, correspondendo a 70%, das respectivas substâncias em questão, relativos a fórmulas moleculares $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ e $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e dados da literatura (WANG et al., 2000; GERONTHANASSIS et al., 1998) foram propostas as estruturas dos ácidos cafeico e protocatéquico, como constituintes da mistura em questão.

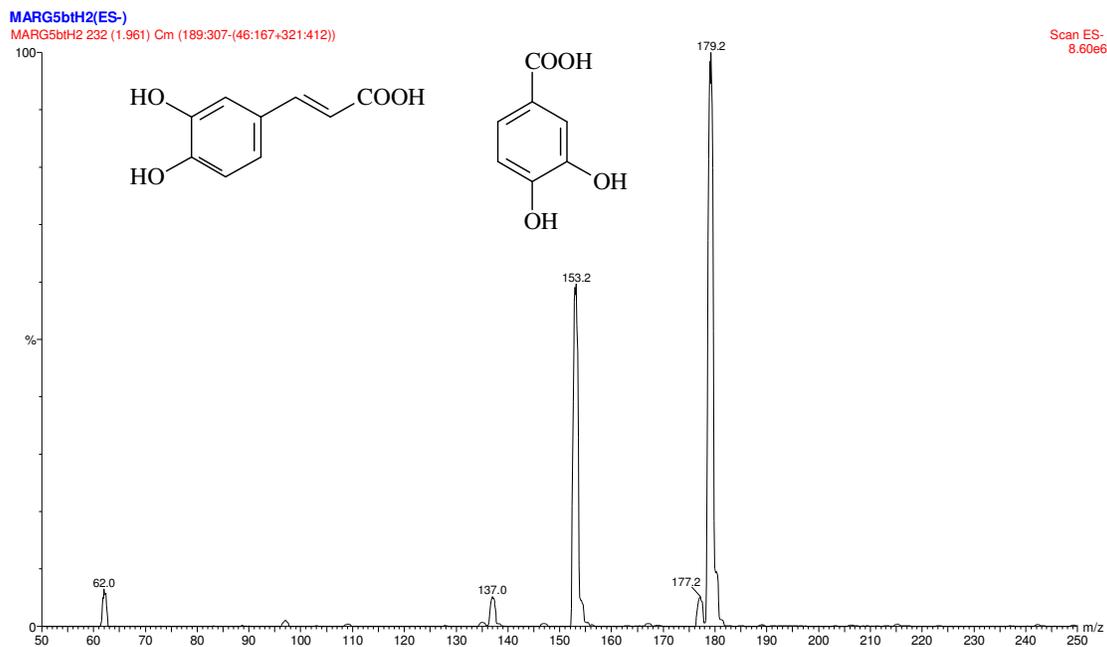


Figura 5-51- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXII e XXIII

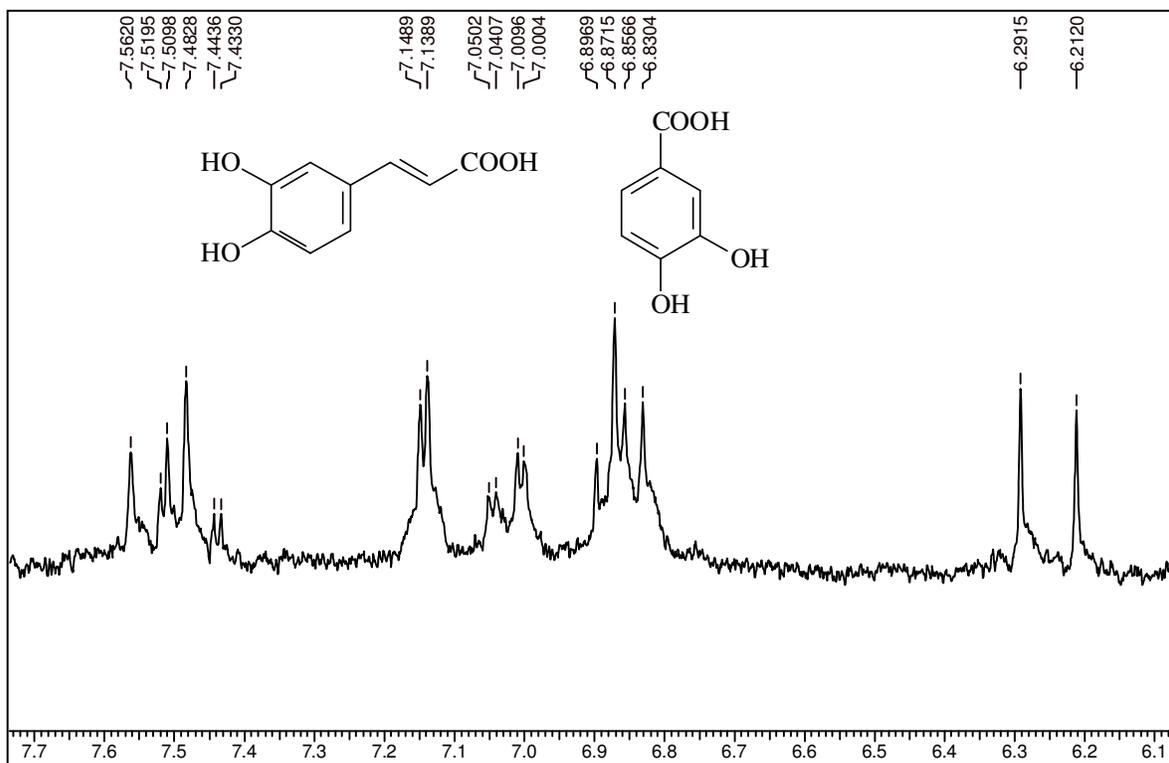
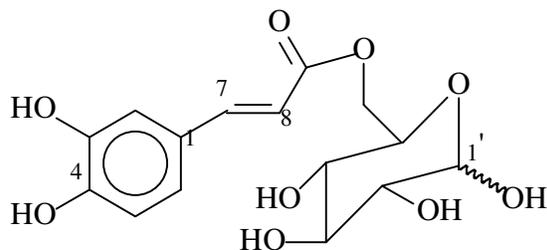


Figura 5-52- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XXII e XXIII

5.8. Identificação das Substâncias XXIV e XXV em mistura

6'-*O*-cafeoil- β -D-glucopiranosídeo
e o 6'-*O*- α -D-glucopiranosídeo



O extrato hidrometanólico de folhas de *V. polygama*, partição *n*-butanólica, depois de sofrer fracionamento em XAD-7, originou a porção metanólica, a qual foi submetida a várias etapas cromatográficas em sephadex LH-20 e CLAE no modo reciclante, fornecendo a fração 4Vc1 e 4Vx3, 8,0 mg, de aspecto oleoso e amarelo pálido. Também as partições diclorometânica do extrato metanólico de folhas e acetato de etila do extrato metanólico de galhos forneceram as frações 5bth3 e AMG5g2, 3,0 e 300,0 mg respectivamente.

A análise dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6 ; Figura 5-53, Tabela 5-13) revelou sinais característicos de duas porções fenilpropenoídicas com os H olefínicos em configuração *trans*, devido aos quatro sinais com valores altos de *J* em δ 7,56; 7,55; 6,31 e 6,30 (d; 15,9 Hz). Um sinal centrado em δ 7,18 (t; *J* = 2,5 Hz) juntamente com dois sinais exatamente iguais, centrados em δ 7,08 e 7,06 (ambos m), estando sobrepostos, e um sinal em δ 6,88 (d; *J* = 8,2 Hz) poderiam pertencer aos H do anel benzênico trissubstituído de duas moléculas de ácido cafeico. A presença de um sinal em δ 5,12 (d; *J* = 3,3 Hz) e outro em δ 4,53 (d; *J* = 7,7 Hz), juntamente com sinais de H carbinólicos entre δ 4,50-3,14, fortaleceu a idéia de que se tratava de uma mistura de fenilpropenóides glicosilados, derivados do ácido cafeico e diferindo entre si apenas pela configuração dos H anoméricos. O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6 , Figura 5-54) contribuiu para a definição das estruturas, inclusive para indicar o local da ligação glicosídica, já que os valores de δ relativos aos C-6' estão deslocados em +3,0 ppm se comparados com a molécula não esterificada.

A fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_9$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelos espectros de massas, EM/ESI modo negativo (Figura 5-57), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 341 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e nos dados descritos na literatura (SHIMOMURA et al., 1988; PAULI, 2000; AGRAWAL, 1989; Figura 5-55, Figura 5-56), as substâncias foram identificadas como os isômeros 6'-*O*-cafeoil- β -D-glucopiranosídeo e o 6'-*O*-cafeoil- α -D-glucopiranosídeo.

Tabela 5-13- Dados dos espectros de RMN de ^1H , de RMN ^{13}C , Correlações homonuclear ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) e heteronuclear ($^1\text{H} - ^{13}\text{C}$) da mistura das Substâncias XXIV e XXV

	H	RMN de ^1H (J em Hertz) ^a	$^1\text{H} - ^1\text{H}$ (COSY 45°) ^a	$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (HSQC) ^a	RMN de ^{13}C ^b
Aglicona A	2	7,18 (tl; 2,5)		C-2	115,3
	5	6,88 (d; 8,2)		C-5	116,4
	6	7,08 (m)		C-6	122,6
	7	7,56 (d; 15,9)	H-8	C-7A	146,0
	8	6,31 (d; 15,9)	H-7	C-8A	115,6
Aglicona B	2	7,18 (tl; 2,5)		C-2	115,3
	5	6,88 (d; 8,2)		C-5	116,4
	6	7,06 (m)		C-6	122,6
	7	7,55 (d; 15,9)	H-8	C-7B	145,9
	8	6,30 (d; 15,9)	H-7	C-8B	115,5
α -glucose	1'	5,12 (d; 3,6)	H-2'	C-1'	93,7
	2'	3,38 (m)*	H-1'	C-2'	73,8
	3'	3,71 (t; 9,1)	H-2'	C-3'	74,9
	4'	3,36 (m)*	H-5'	C-4'	71,5
	5'	3,54 (ddd; 9,4; 6,2; 2,0)	H-6'b; H-4'	C-5'	75,0
	6'b	4,26 (dd; 11,8; 6,2)			
	a	4,43 (dd; 11,8; 2,1)	H-5'	C-6'	64,4
β -glucose	1'	4,53 (d; 7,7)	H-2'	C-1'	98,3
	2'	3,17 (t; 8,0)	H-1'	C-2'	76,3
	3'	3,42 (m)		C-3'	77,9
	4'	3,39 (m)*		C-4'	71,8
	5'	4,03 (m)		C-5'	70,6
	6'	4,49 (dd; 11,8; 2,0) 4,30 (dd; 11,8; 5,8)		C-6'	64,6
Aglicona A e B		C-1 127,6	C-3 146,4	C-4 148,9	C-9 167,6

^a(400 MHz, acetona- d_6); ^b(100 MHz, acetona- d_6)

* Estes sinais podem estar trocados

O artigo de PAULI (2000) foi usado para as atribuições dos valores de deslocamento do espectro de RMN de ^1H pertencentes aos H das moléculas de glicose e a referência de AGRAWAL (1989) para a atribuição dos C.

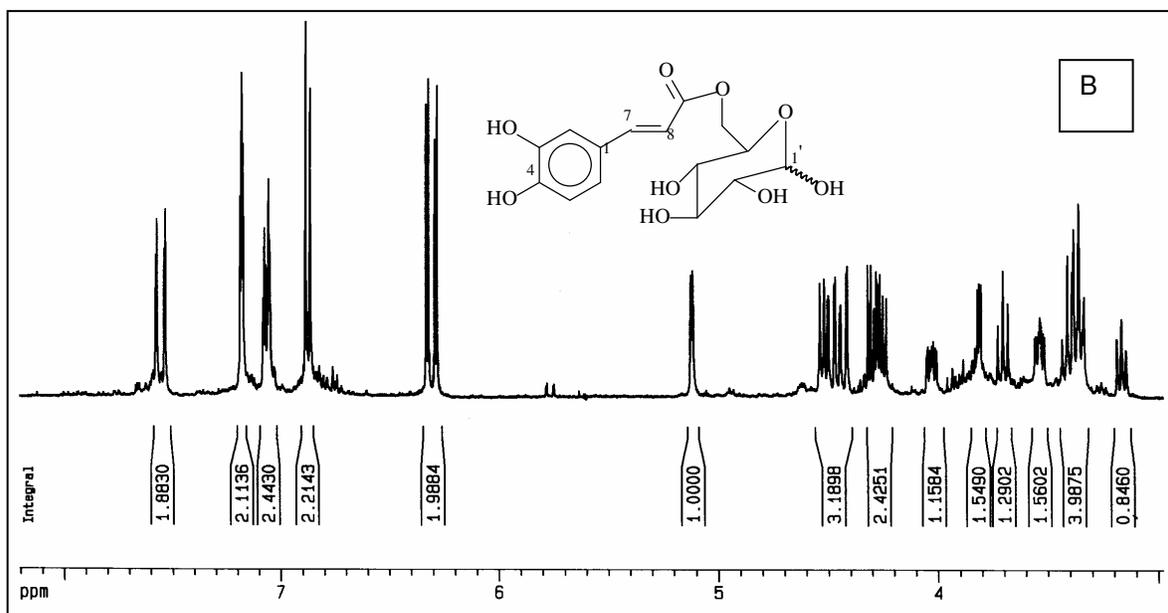
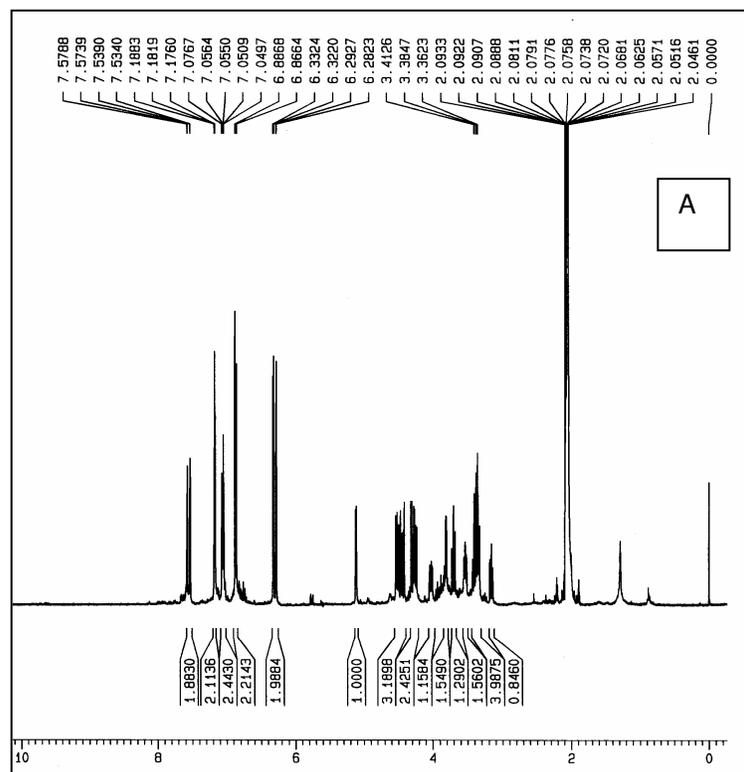


Figura 5-53- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆) da mistura das Substâncias XXIV e XXV

A: espectro completo; B: área ampliada

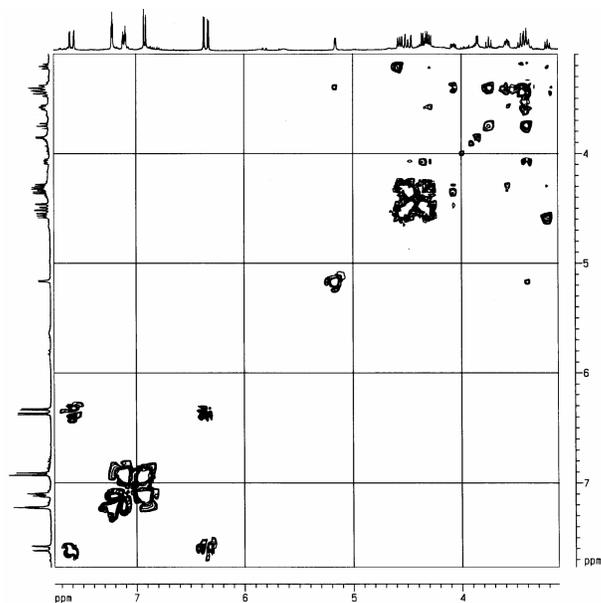


Figura 5-56- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias XXIV e XXV

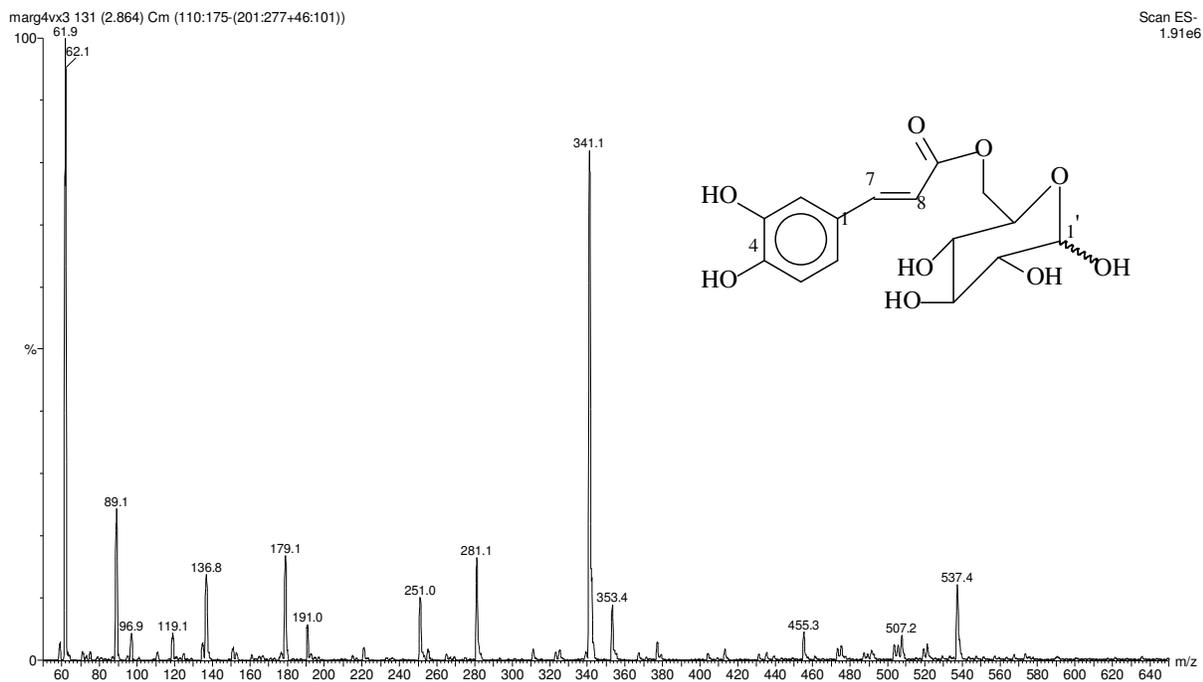
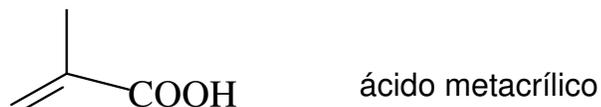


Figura 5-57- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXIV e XXV

5.9. Identificação da Substância XXVI



Do extrato hidrometanólico das folhas de *V. polygama*, fração aquosa, foram obtidos 280,0 mg deste ácido através de recristalização.

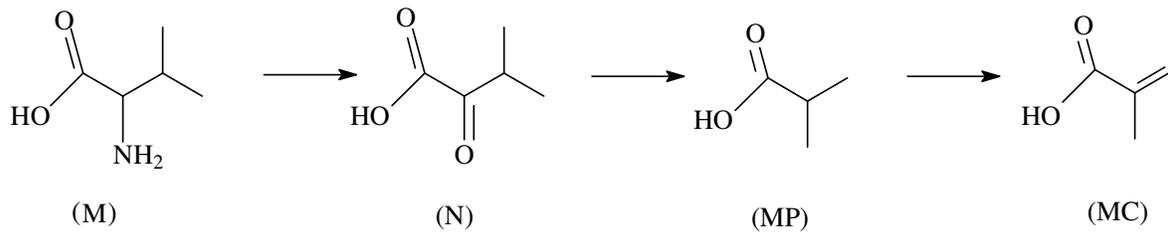
A análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, D_2O , Figura 5-58) mostrou dois sinais em δ 5,68 e 5,38 (sl) integrando para 1H cada e um sinal em δ 1,89 (s) integrando para 3H.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, D_2O , Figura 5-60) revelou dois sinais característicos de C sp_2 em δ 144,4 e 122,7, além de evidenciar a presença de C carboxílico em δ 179,9 e C metílico, ligado a C sp_2 , em δ 21,2. As multiplicidades foram confirmadas pelo espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}-135$ (50 MHz, D_2O , Figura 5-60), sendo o sinal em δ 122,7 positivo, CH_2 , e o sinal em δ 21,2, negativo, para CH_3 (DEPT invertido).

A fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI, modo negativo (Figura 5-59), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 85 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Segundo KITAGAWA (1984), o ácido metacrílico pode ser considerado como marcador sistemático de dicotiledôneas, acumulando-se em várias famílias, entre elas a Verbenaceae. Encontra-se esterificado como um bom número de metabólitos secundários, pertencentes aos mais diferentes grupos biogénéticos. Nunca foi isolado de plantas, mas já foi identificado na secreção de fêmeas do besouro *Pasimachus subsulcatus* (DAVIDSON et al., 1989). O aldeído correspondente, α -metil acroleína ou artemisal, já foi isolado naturalmente de *Artemisia tridentata*, Asteraceae (GIBBS, 1974). Acredita-se que a transaminação do ácido aminado valina (M) resulta na formação do ácido α -cetoisovalérico (N), que pela reação de descarboxilação oxidativa converter-se-ia em ácido metilpropanóico (MP). Este, por sua vez, se transformaria em ácido metacrílico (MC) através de uma reação de desidrogenação (Esquema 5-2). Logo, a grande quantidade deste ácido encontrado no extrato hidroalcoólico pode ser

em decorrência da decomposição de aminoácidos ou açúcares, através da grande exposição ao aquecimento em rotaevaporador e resfriamento em liofilizador.



Esquema 5-2- Reações de formação do ácido metacrílico (KITAGAWA, 1984)

Legenda: (M)= Valina; (N)= ácido α -cetoisovalérico; (MP)= ácido metilpropanóico; (MC)= ácido metacrílico

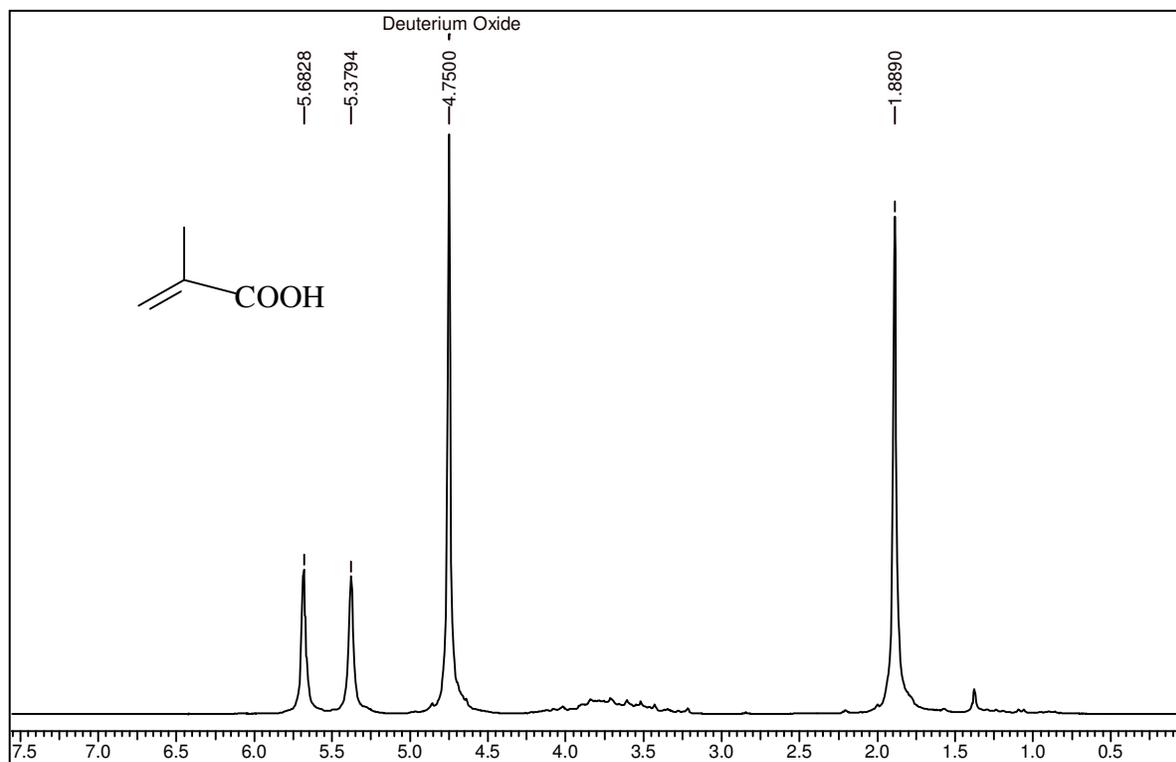


Figura 5-58- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, D_2O) da Substância XXVI

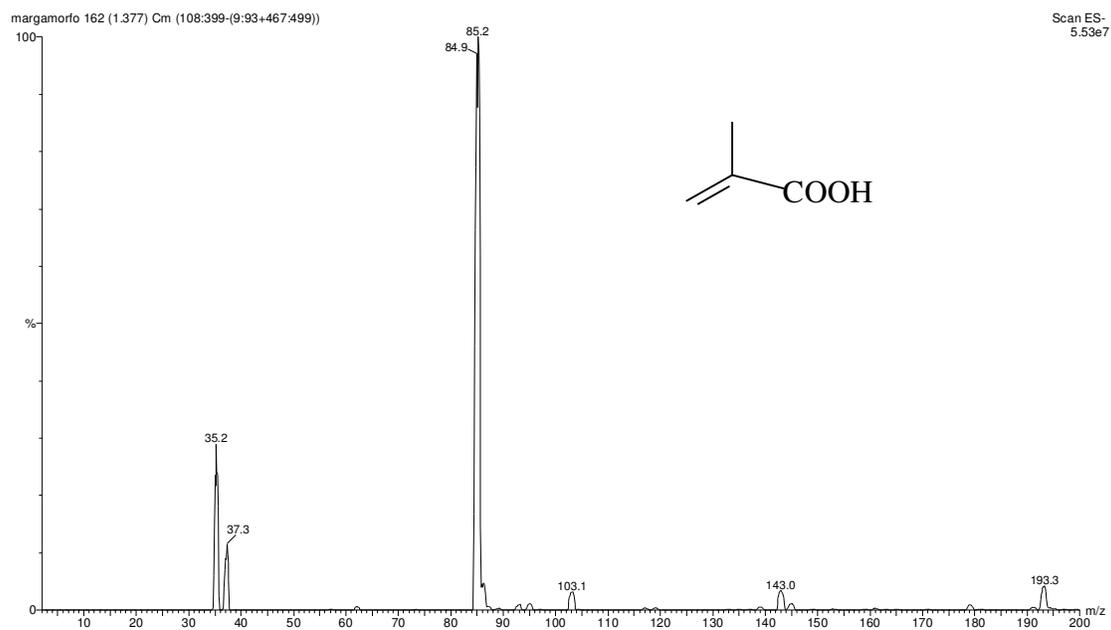


Figura 5-59- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XXVI

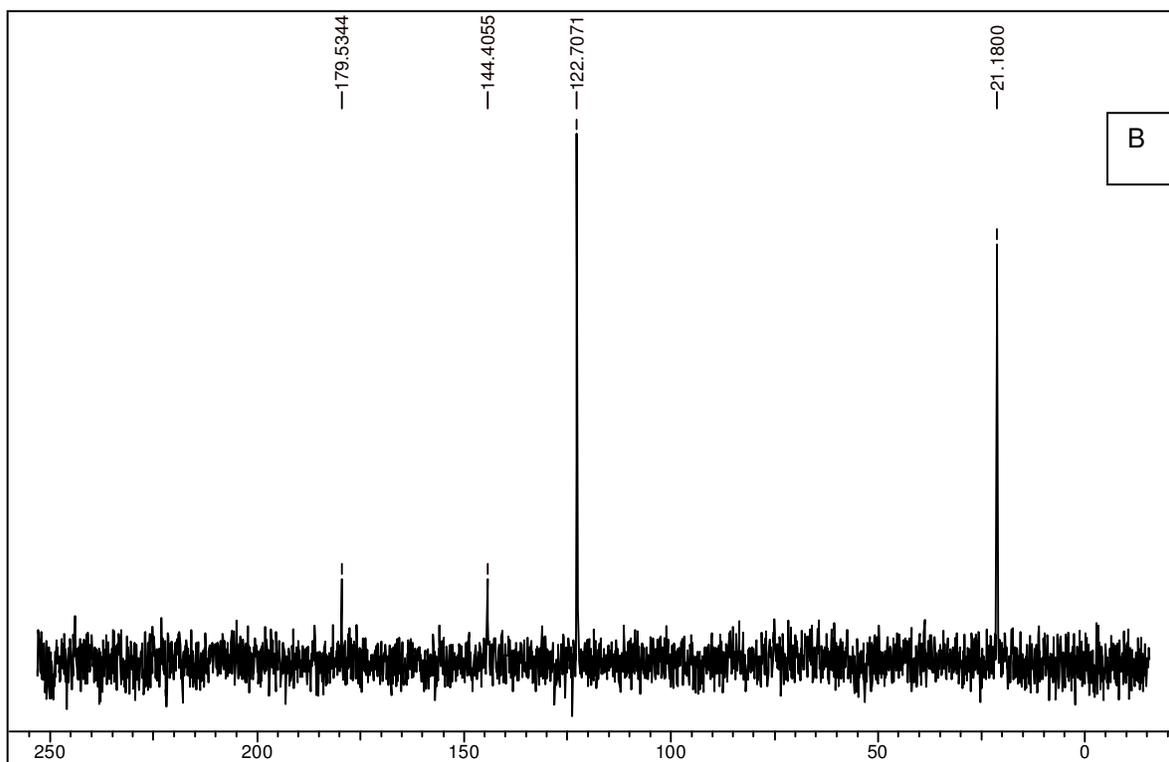
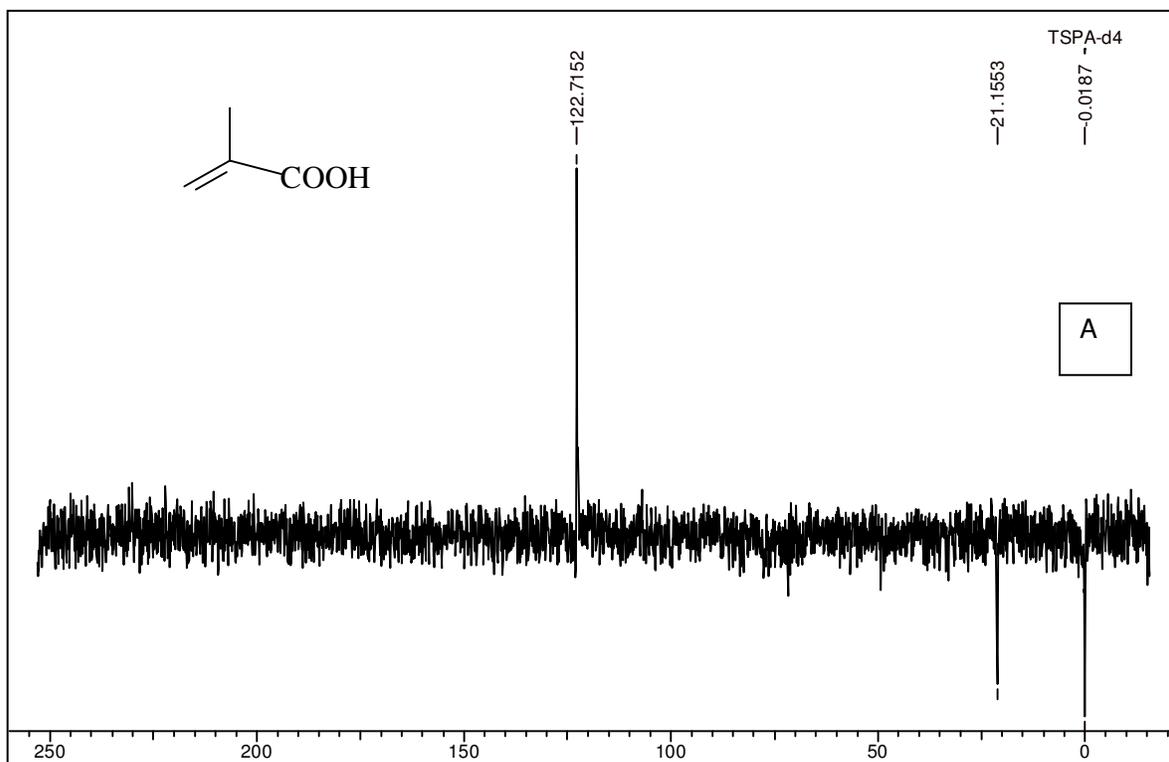
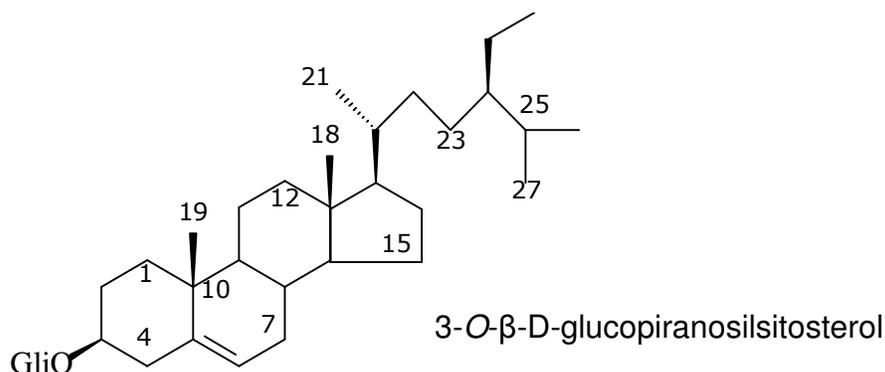


Figura 5-60- Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, D_2O) da Substância XXVI

A: espectro de DEPT-135 com fase invertida; B: espectro de RMN de ^{13}C / referência TSPA-d₄ (sal de sódio do ácido trimetilsililpropiónico deuterado)

5.10. Identificação da Substância XXVII



Do extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas de *V. polygama*, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, foram obtidas as frações F5c3n e 5d7b4, 19,7 mg, as quais se mostraram como cristal branco e brilhante. Também em mistura com outros esteróis na fração F5c4c, 90,0 mg, como pó branco amorfo.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, Figura 5-62) revelou dois sinais característicos de C sp_2 em δ 141,1 e 122,0, além de evidenciar a presença de C carbinólicos em δ 102,7; 78,4; 78,5; 75,4; 71,9 e 62,9 pertencentes a uma molécula de açúcar.

A análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, Figura 5-61) apresentou um sinal em δ 5,37 (dl), característico do H-6 dos fitoesteróis, assim como os sinais entre δ 1,02-0,67 (todos s) referentes aos H metílicos. Entre δ 4,62-3,70 foram observados vários sinais de H carbinólicos, confirmando a presença de açúcar na molécula. O sinal característico de H anomérico em configuração β se revelou em δ 5,07 (d, $J = 7,6$ Hz). O sinal típico de H-3 (m) não foi observado devido sobreposição de sinais dos H carbinólicos.

A identificação da substância foi confirmada por comparação com dados obtidos na literatura (TANDOM, M. et al., 1990; Tabela 5-14).

Tabela 5-14- Dados do espectro de RMN de ^{13}C das Substâncias XXVII (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e XLVIII (50 MHz, CDCl_3); do 3-O- β -D-glucopiranosilsterol (TANDOM et al., 1990) e do sitosterol (FURUYA et al., 1987)

C	SUBSTÂNCIA XXVII		3-O- β -D- GLUCOPIRANOSIL	SUBSTÂNCIA XLVIII	SITOSTEROL
1		37,7	37,5	37,5	37,4
2		30,4	30,2	31,9	31,7
3		78,7	78,5	72,0	71,9
4		40,1	40,0	42,5	42,4
5		141,1	140,9	140,9	141,1
6		122,0	121,8	121,9	121,9
7		32,3	32,1	31,9	32,0
8		32,2	32,1	32,1	32,0
9		50,5	50,3	50,4	50,3
10		37,1	36,9	36,7	36,6
11		21,4	21,3	21,3	21,2
12		39,5	39,3	40,0	39,9
13		42,7	42,5	42,5	42,4
14		57,0	56,9	56,9	56,9
15		24,7	24,5	24,5	24,4
16		28,7	28,6	28,4	28,3
17		56,4	56,3	56,3	56,3
18		12,1	12,0	12,0	11,9
19		19,4	19,4	19,6	*
20		36,5	36,4	36,3	36,2
21		19,1	19,1	19,2	19,1
22		34,4	34,3	34,2	34,1
23		26,6	26,5	26,3	26,3
24		46,2	46,1	46,1	46,0
25		29,7	29,5	29,9	29,3
26		19,2	19,2	18,9	18,8
27		20,1	20,0	20,0	19,9
28		23,6	23,4	23,3	23,2
29		12,3	12,2	12,2	12,0
1'	4'	102,7	71,9	102,5	71,7
2'	5'	75,4	78,5	75,2	78,2
3'	6'	78,4	62,9	78,3	62,8

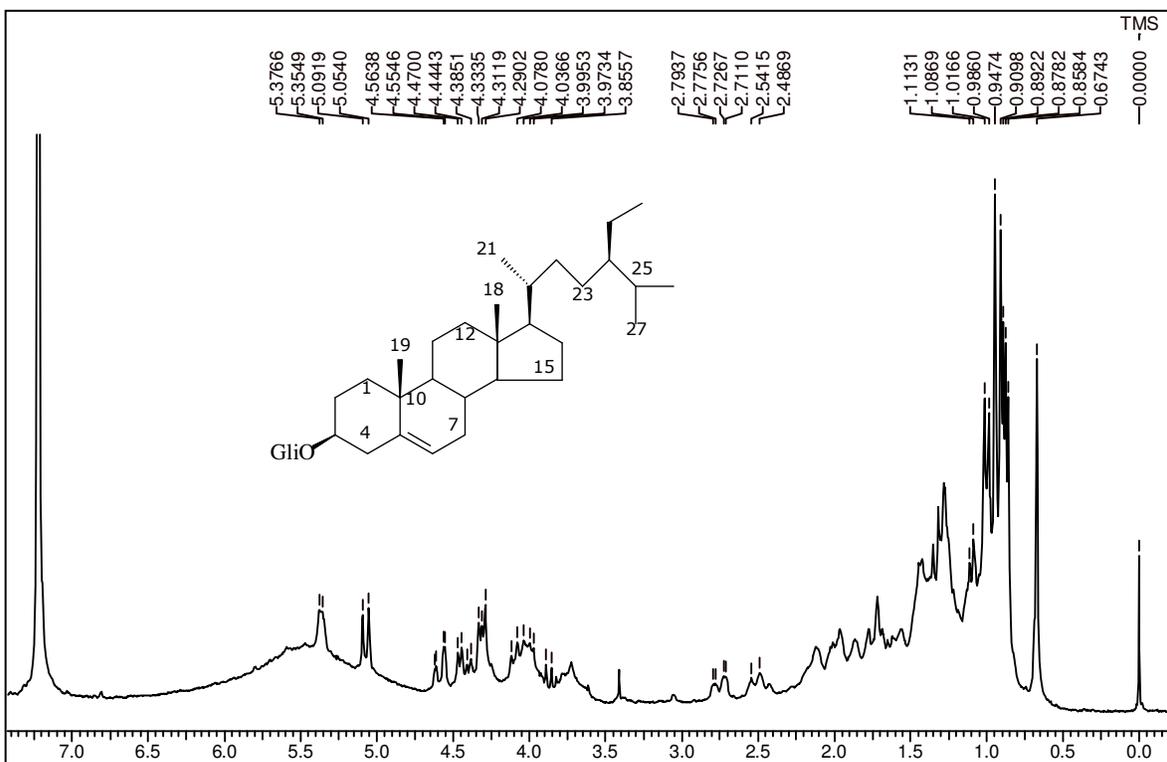


Figura 5-61- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXVII

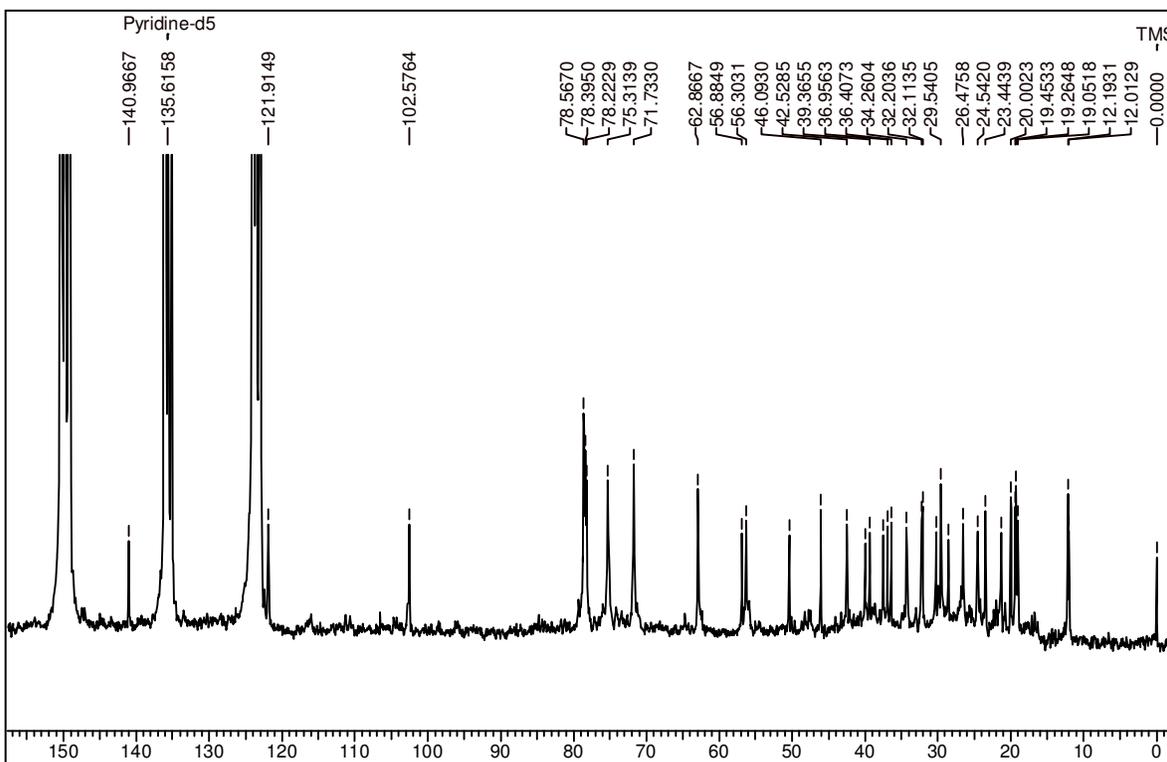
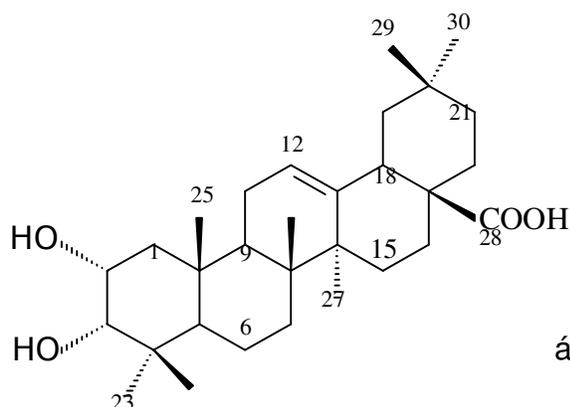


Figura 5-62- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXVII

5.11. Identificação da Substância XXVIII



ácido 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico

Do extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas de *V. polygama*, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, foram obtidas as frações df4433K e df4436C que se mostraram como um pó branco e amorfo.

A fórmula molecular C₃₀H₄₈O₄ foi deduzida a partir dos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI, modo negativo (Figura 5-64), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 471 [M-H]⁻, do experimento de PENDANT e de RMN de ¹H.

O espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, Figura 5-66) apresentou sinais característicos de triterpeno com esqueleto do tipo 12-oleaneno como os sete sinais para as metilas entre δ 1,14-0,74 (todos s); sinal do H-12 olefínico em δ 5,28 (tl, $J = 3,3$ Hz) e sinal em δ 2,80 (dd, $J = 4,0$ e $9,5$ Hz) referente ao H-18 acoplado aos H-19 (δ 1,2 e 1,6) como determinado pelo espectro de COSY-45^o (200 MHz, CDCl₃, Figura 5-65). Em adição, o espectro de COSY exibiu dois H carbinólicos em acoplamento em δ 3,40 (d, $J = 2,7$ Hz, H-3) e δ 4,00 (td, $J = 2,9$ e $10,5$ Hz, H-2). O valor da constante de acoplamento $J_{H2-3} = 2,65$ Hz foi o indicativo da configuração α do grupo OH ligado ao C-3, por ser um valor pequeno, mostrando que H-3 está orientado equatorialmente. Os valores das constantes de acoplamento $J_{H2-H1} = 2,9$ e $10,5$ Hz determinaram também a configuração α do grupo OH ligado ao C-2 e a orientação axial para o H-2 do composto em questão.

O espectro de PENDANT (50 MHz, CDCl₃, Figura 4-70), exibiu sinais para um C carboxílico em δ 183,2; dois C olefínicos em δ 143,8 e 122,6 e dois C carbinólicos em δ 79,1 e 66,7, além dos outros correspondentes aos C metílicos, metilênicos e metínicos.

Os dados espectrais descritos foram comparados com os do éster metílico do ácido 2 α ,3 α -diidroxi-olean-12-en-28-óico (MAHATO & KUNDU, 1994; Tabela 5-15), e mostraram-se plenamente similares, sendo a substância identificada como ácido 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico.

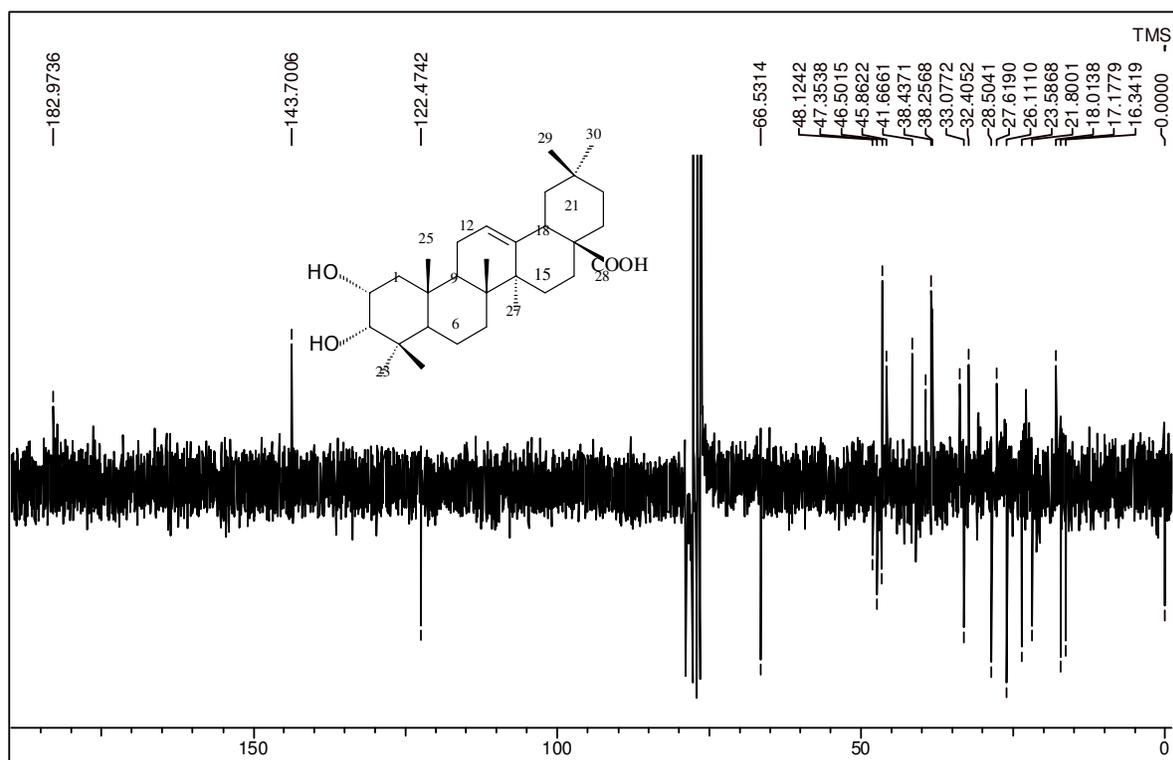


Figura 5-63- Espectro de RMN de ¹³C/PENDANT/fase invertida (50 MHz, CDCl₃) da Substância XXVIII

Tabela 5-15- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT da Substância XXVIII (50 MHz, CDCl_3) e do éster metílico do ácido 2 α ,3 α -diidroxiolean-12-en-28-óico

C/ MULTIPLICIDADE	SUBSTÂNCIA	ÉSTER METÍLICO ^a
	XXVIII	
1 (t)	41,8	41,7
2 (d)	66,7	66,5
3 (d)	79,1	78,9
4 (s)	38,6	38,5
5 (d)	48,3	48,1
6 (t)	18,9	18,1
7 (t)	32,6	32,5
8 (s)	39,6	39,7
9 (d)	47,5	47,4
10 (s)	38,4	38,3
11 (t)	23,5	23,2
12 (d)	122,6	122,1
13 (s)	143,8	143,8
14 (s)	41,8	41,9
15 (t)	27,7	27,7
16 (t)	23,1	23,2
17 (s)	46,6	46,8
18 (d)	41,1	41,3
19 (t)	46,0	46,0
20 (s)	30,9	30,7
21 (t)	34,0	34,0
22 (t)	32,6	32,5
23 (q)	28,7	28,5
24 (q)	21,9	21,9
25 (q)	16,5	16,4
26 (q)	17,3	17,0
27 (q)	26,3	26,2
28 (s)	183,2	178,1
29 (q)	33,2	33,2
30 (q)	23,7	23,6

^a (MAHATO & KUNDU, 1994)

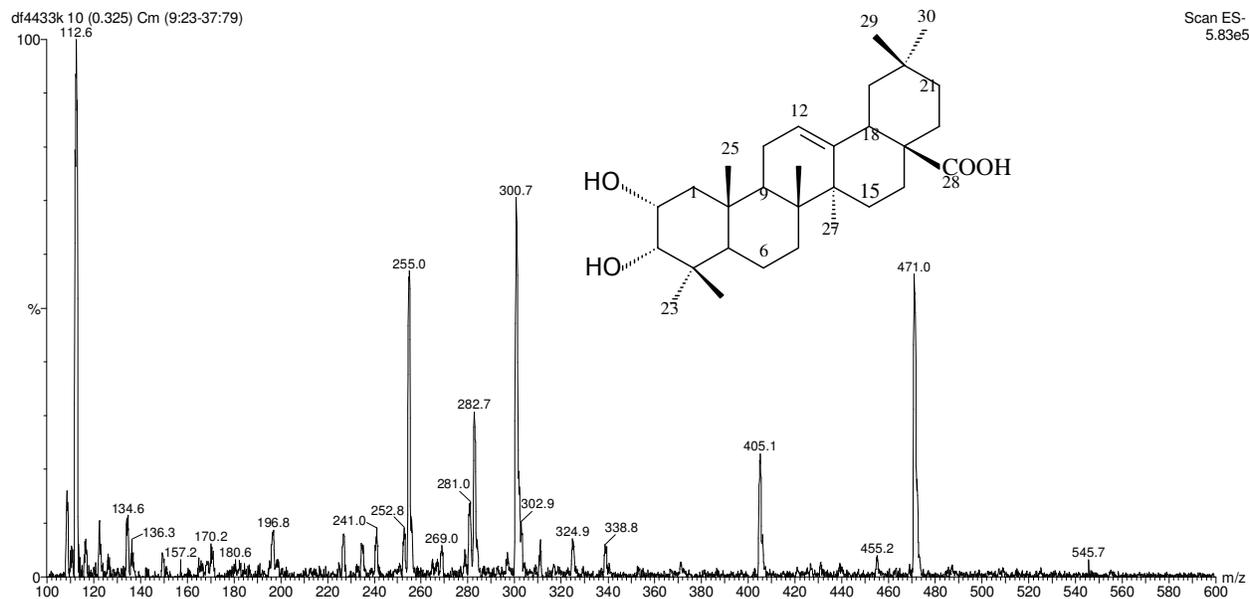


Figura 5-64- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XXVIII

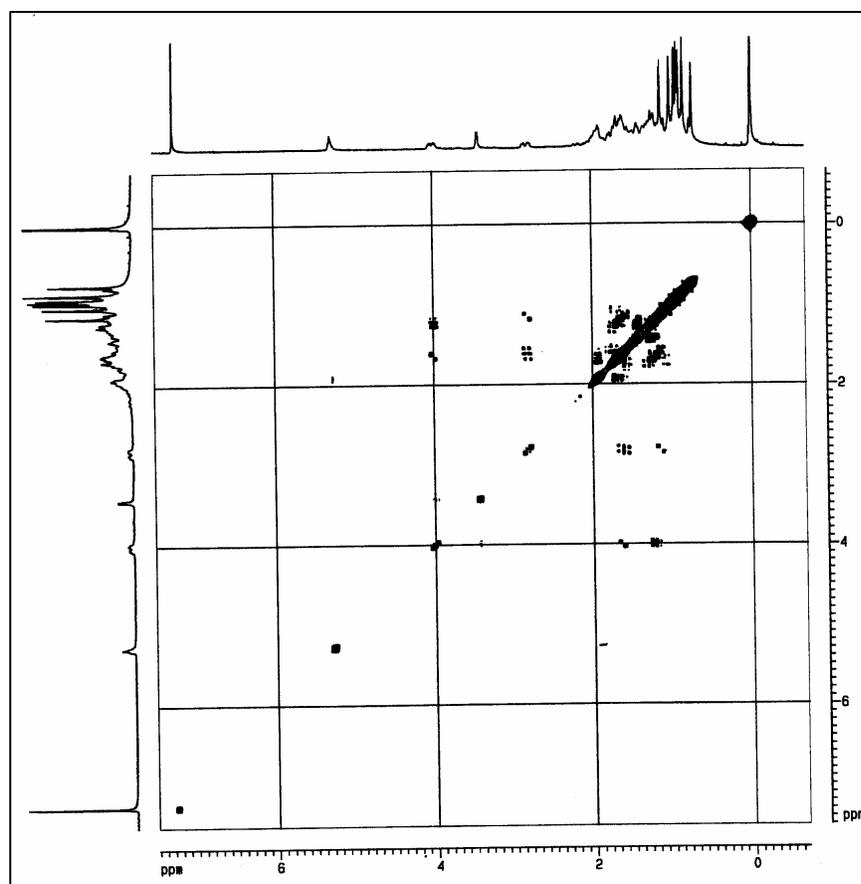


Figura 5-65- Espectro de ^1H - ^1H COSY (200 MHz, CDCl_3) da Substância XXVIII

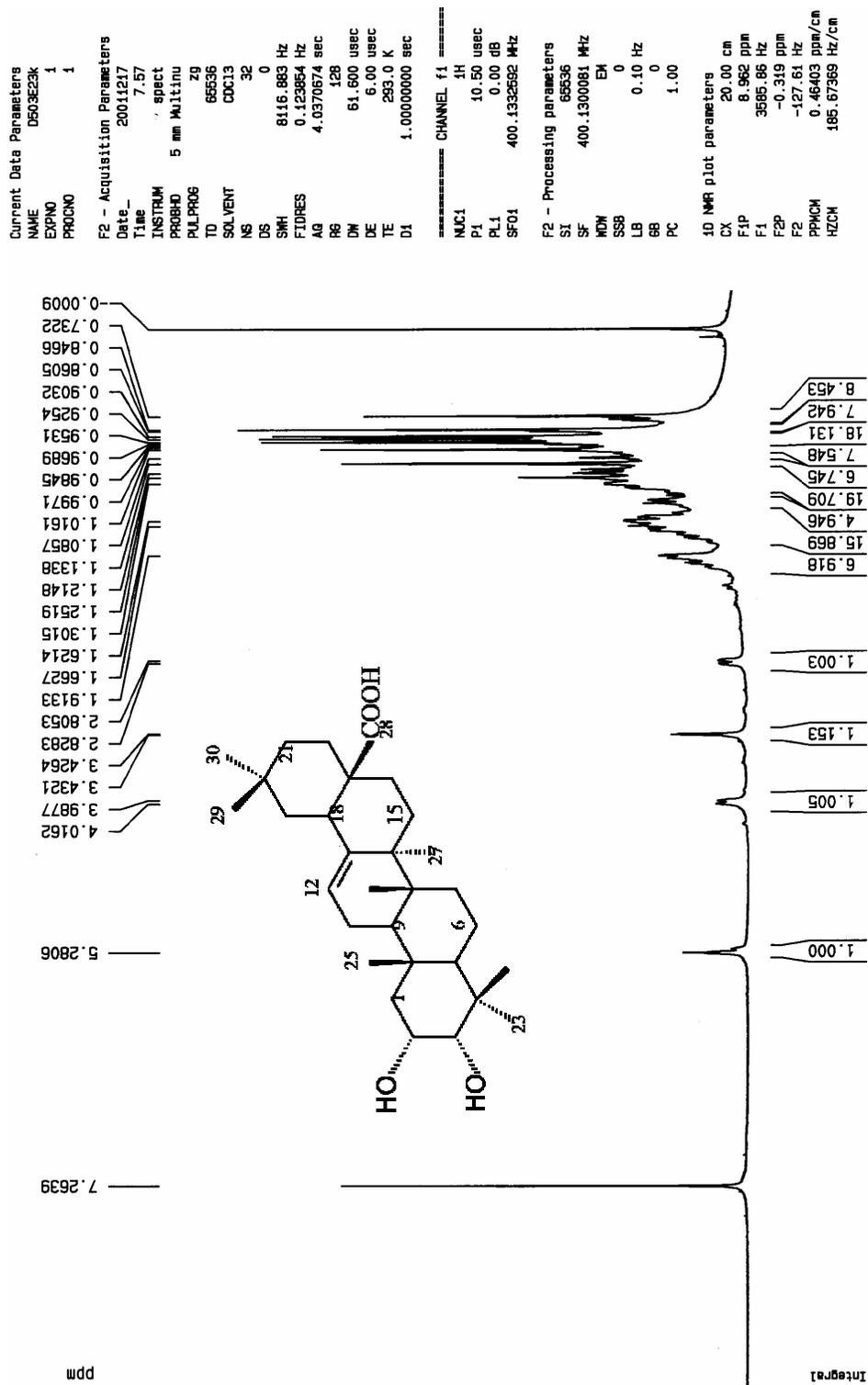
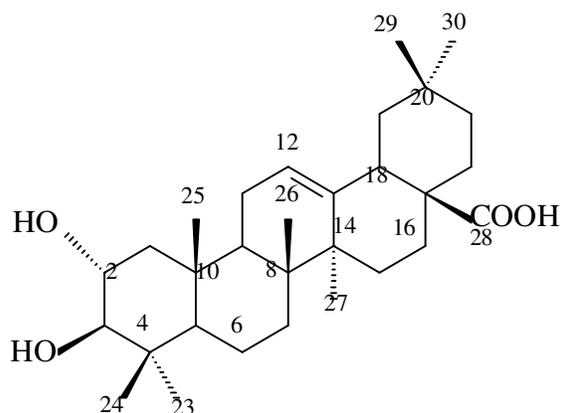
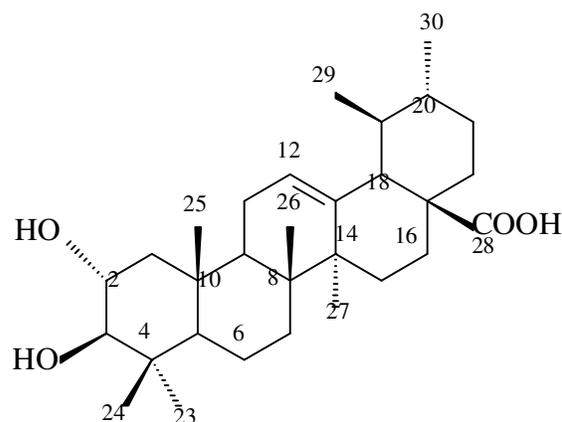


Figura 5-66- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância XXVIII

5.12. Identificação das Substâncias XXX e XXXI em mistura



ácido 2 α ,3 β -dihidroiolean-12-en-28-óico
ou ácido maslínico



ácido 2 α ,3 β -dihidrours-12-en-28-óico

O extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas de *V. polygama*, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu a fração 4dh5eX, 11,4 mg, a qual se mostrou como um pó branco e amorfo.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, Figura 5-70) totalmente desacoplado mostrou com clareza que a fração era constituída pela mistura de dois triterpenos do tipo 12-oleaneno e 12-urseno através dos deslocamentos característicos dos seus C sp_2 , C-12 e 13, em δ 144,9-122,5 e 139,3-125,6, respectivamente. Foram revelados dois sinais de C carbonílicos em δ 83,8 (C-3) e em δ 68,6 (C-2), sem que fosse mostrado algum C carboxílico.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, Figura 5-68) mostrou um sinal em δ 5,48 (sl, H-12); um em δ 4,12 (m, H-2), um em δ 3,42 e outro em δ 3,41 (ambos d, com $J = 9,3$ Hz), referentes ao H-3 com configuração α ; um sinal centrado em δ 3,31 (dd, $J = 4,0$ e 12,0 Hz), pertencente ao H-18 de esqueleto oleaneno, e um sinal em δ 2,64 (d, $J = 11,3$ HZ), relativo ao H-18 de esqueleto urseno. Os sinais referentes aos H metílicos foram observados entre δ 1,29-0,96. Do espectro de HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, Figura 5-69) foram obtidas principalmente as correlações entre H-2 em δ 4,12 com C-2 em δ 68,6; os H-3 em δ 3,42 e 3,41 com C-3 em δ 83,8; o H-18 em δ 3,31 com C-18 em δ 42,2 e o outro H-18 em δ 2,64 com o C-18 em δ 55,9.

A fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_4$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 5-67), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 471 $[M-H]^-$.

Comparando-se os dados relatados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; Tabela 5-16) com os dados espectrais acima expostos, foram propostas as estruturas dos ácido $2\alpha,3\beta$ -diidroxi-olean-12-en-28-óico (ácido cratególico ou maslínico) e ácido $2\alpha,3\beta$ -diidroxi-urs-12-en-28-óico.

Tabela 5-16- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI e do $2\alpha,3\beta$ -diidroxii-urs-12-en-28-ato de metila e maslinato de metila

C/ MULTIPLICIDADE	MIISTURA	$2\alpha,3\beta$ -ursenato ^a	Maslinato ^a
1 (t)	46,8	46,8	46,4
2 (d)	68,6	68,9	68,8
3 (d)	83,8	83,8	83,8
4 (s)	39,8	39,1	39,1
5 (d)	55,4	55,4	55,3
6 (t)	18,9	18,4	18,3
7 (t)	*	32,9	32,6
8 (s)	39,8	39,6	39,1
9 (d)	48,1	47,5	47,5
10 (s)	38,6	38,3	38,3
11 (t)	23,7	23,4	23,1
12 (d)	122,5 e 125,6	125,3	122,0
13 (s)	144,9 e 139,3	138,1	143,6
14 (s)	42,2	42,1	41,7
15 (t)	28,3	28,0	27,6
16 (t)	24,9	24,3	23,5
17 (s)	48,0	48,1	46,6
18 (d)	42,2 e 55,9	52,8	41,3
19 (d)	39,4	39,1	45,8
20 (d)	*	38,9	30,7
21 (t)	31,0	30,7	33,8
22 (t)	*	36,7	32,3
23 (q)	29,4	28,7	28,6
24 (q)	17,1	17,0	16,8
25 (q)	16,7	17,0	16,8
26 (q)	16,3	17,0	16,8
27 (q)	23,8	23,7	26,0
28	*	177,9	178,0
29 (q)	16,2	17,0	33,1
30 (q)	21,4	21,2	23,5

^a (MAHATO & KUNDU, 1994) ; *Sinal não observado

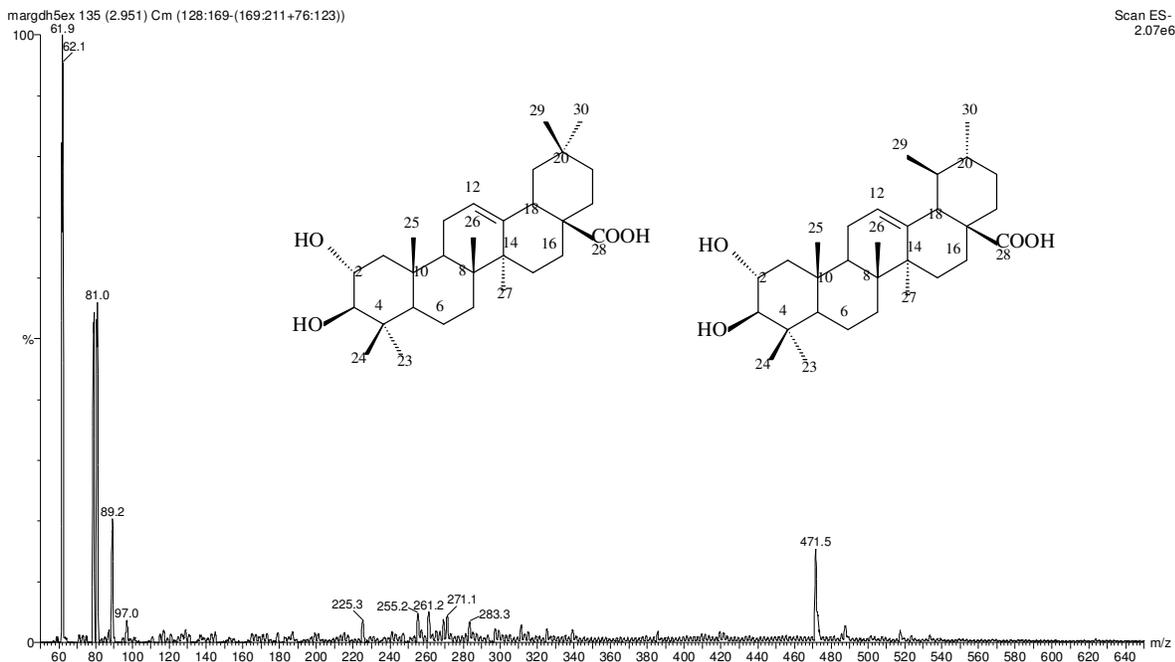


Figura 5-67- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXX e XXXI

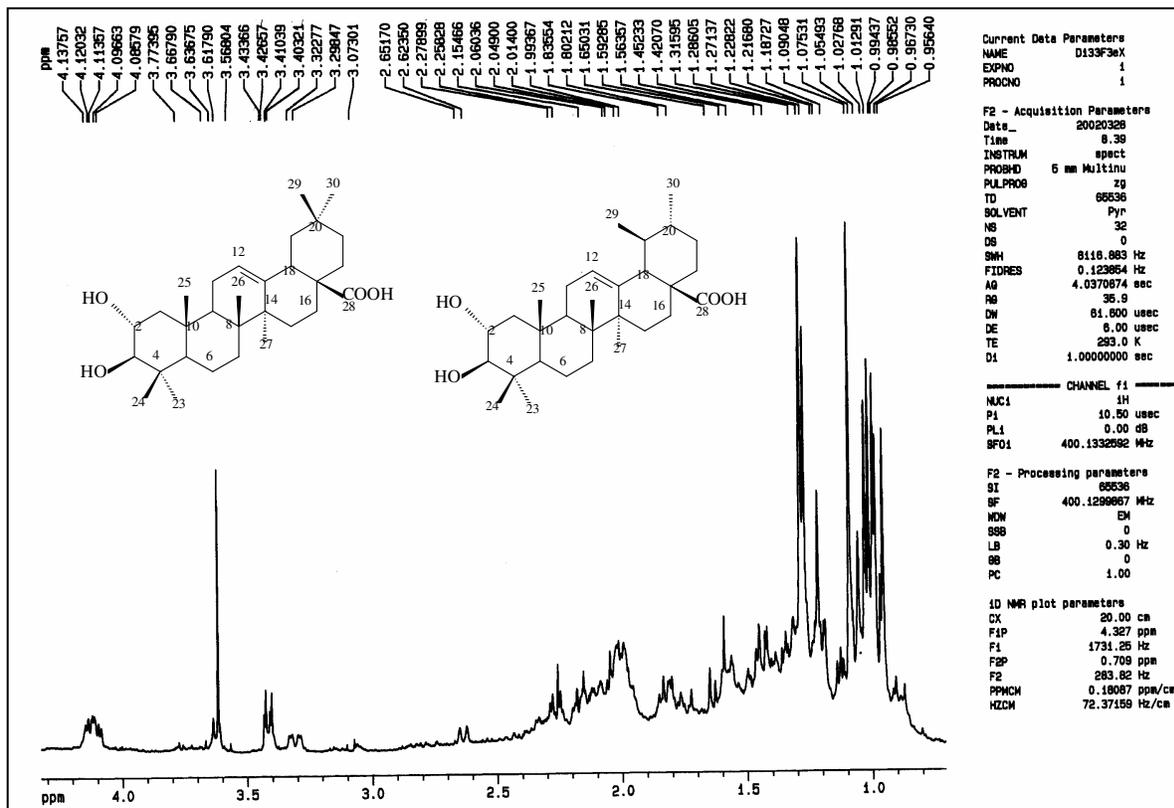


Figura 5-68- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI

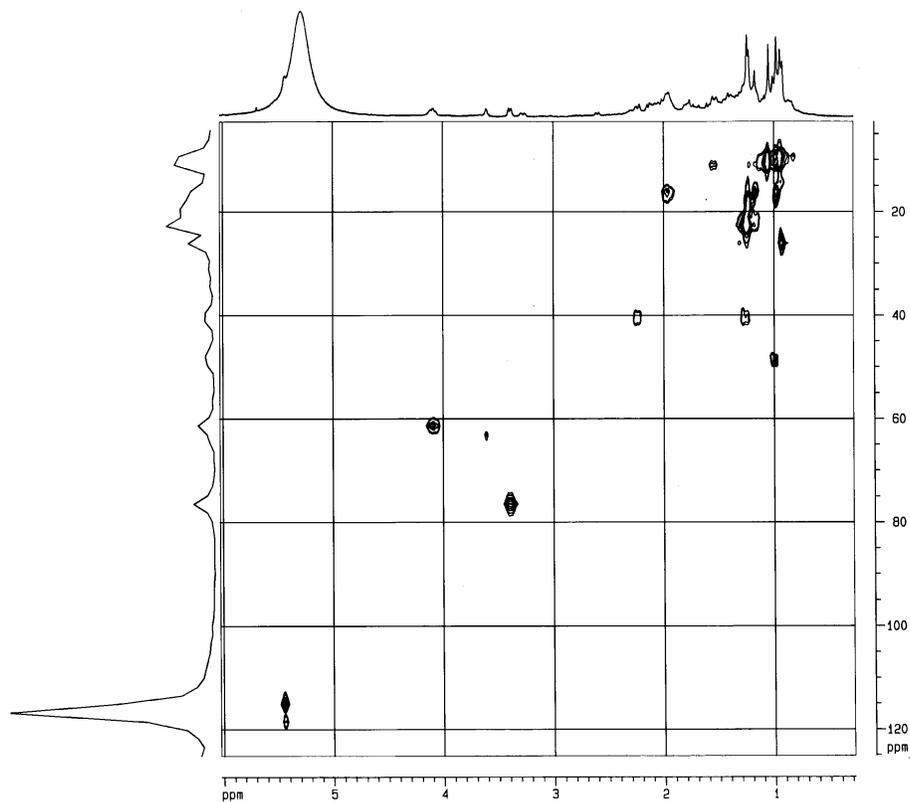


Figura 5-69- Espectro de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI

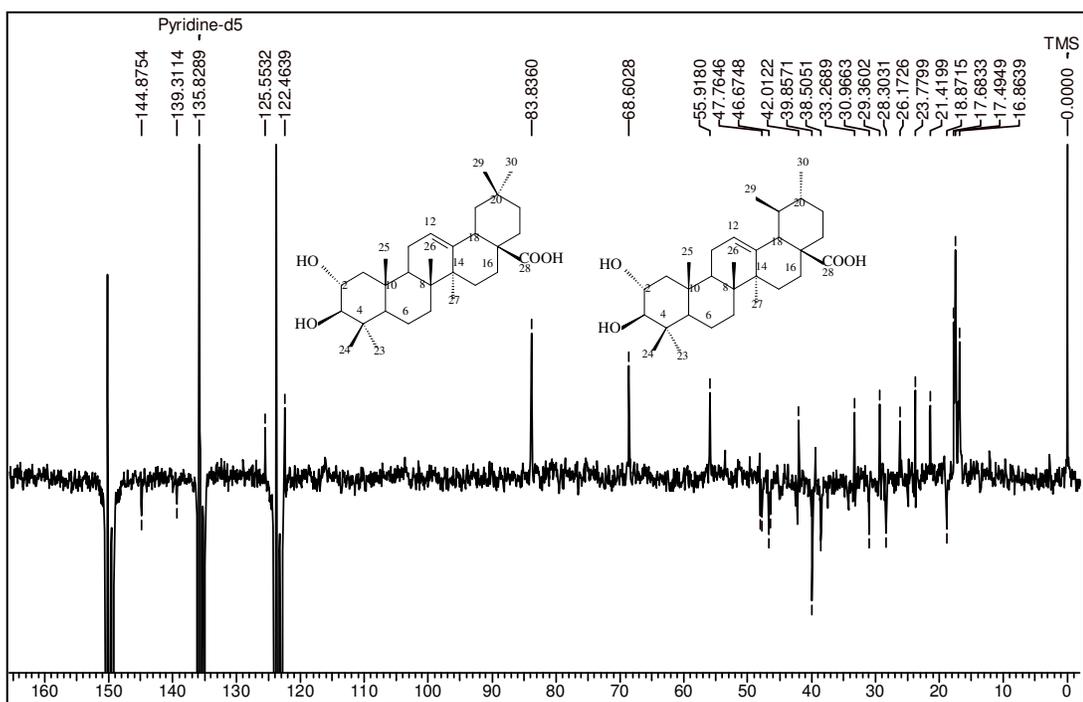
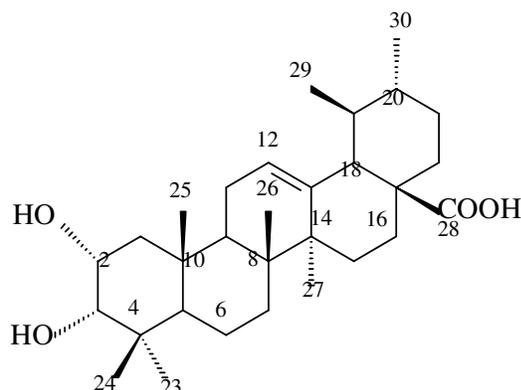
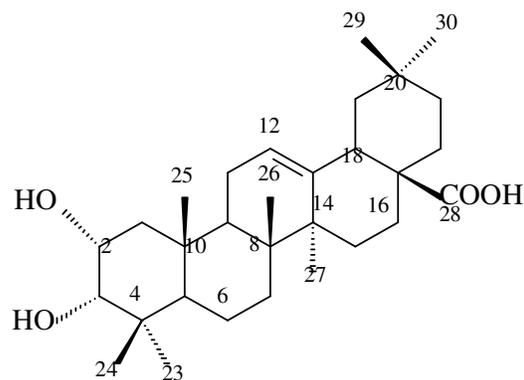


Figura 5-70- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXX e XXXI

5.13. Identificação das Substâncias XXVIII e XXIX em mistura



ácido 2 α ,3 α -dihidrours-12-en-28-óico



ácido 2 α ,3 α -dihidroiolean-12-en-28-óico

Do extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas de *V. polygama*, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, foi obtida a fração df4442c, 9,7mg, que se mostrou como um pó branco e amorfo.

A fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_4$ foi deduzida a partir dos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 5-72), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 471 $[M-H]^-$.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (C_5D_5N , 50 MHz, Figura 5-71) mostrou com clareza que a fração era constituída pela mistura de dois triterpenos do tipo 12-oleaneno e 12-urseno através dos deslocamentos característicos dos seus C sp^2 , C-12 e 13, em δ 144,9 e 122,5; 139,3 e 125,6, respectivamente. O estudo de vários modelos, com esqueletos ursânico e oleanânico (MAHATO & KUNDU, 1994), mostrou que os carbonos C-12, C-13, C-18, C-19, C-27 e C-29 possuem deslocamentos bem distintos para cada um destes tipos de esqueleto. Os demais carbonos têm seus sinais iguais ou semelhantes em ambos os sistemas. O sinal em δ 180,2 indicou a existência de carbonila carboxílica, sendo o mesmo para ambos, fato que também ocorreu com os C carbinólicos em δ 79,4 e 66,1. O espectro de RMN de ^{13}C /DEPT 135 (C_5D_5N , 50 MHz), usando uma transferência de pulso de 135° para obter sinais positivos para CH e CH_3 e negativo para CH_2 , permitiu caracterizar os C metínicos, metilênicos e metílicos e, por diferença com o espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT, os quaternários.

O espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 200 MHz) revelou um sinal em δ 5,48 (sl) referente ao H-12; um sinal centrado em δ 4,32 (m, H-2); um sinal em δ 3,78 (sl, H-3), característico da configuração β do H-3; um sinal centrado em δ 3,29 (dd, $J = 4,0$ e $12,0$ Hz), referente ao H-18 do esqueleto oleaneno; um sinal em δ 2,63 (d, $J = 11,0$ Hz) referente ao H-18 do esqueleto urseno e sinais entre δ 1,18-0,91 (todos s) relativos aos H dos grupos metílicos. Na CCDA, foram observadas duas manchinhas roxas azuladas, bem próximas uma da outra, sendo o eluente Dic/AcOEt 7:3. A superior em maior concentração (oleaneno) que a inferior (urseno), conclusão baseada nas intensidades dos sinais de RMN de ^{13}C .

Comparando-se os dados relatados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; Tabela 5-17) com os dados espectrais acima expostos, foram propostas as estruturas dos ácido 2α , 3α -diidroxiolean-12-en-28-óico e ácido 2α , 3α -diidroxieurs-12-en-28-óico respectivamente.

Tabela 5-17- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXVIII e XXIX e do $2\alpha,3\alpha$ -diidroxius-12-en-28-ato de metila

C/ MULTIPLICIDADE	MISTURA	URSENATO ^a
1 (t)	42,9	42,2
2 (d)	66,1	66,7
3 (d)	79,4	79,2
4 (s)	38,8	39,3
5 (d)	48,8	48,3
6 (t)	18,1	18,2
7 (t)	33,2	33,0
8 (s)	40,2	40,0
9 (d)	47,9	47,6
10 (s)	38,7	38,4
11	*	23,4
12 (d)	122,5 e 125,6	125,8
13 (s)	144,9 e 139,3	138,7
14 (s)	42,3	42,2
15 (t)	28,6	28,2
16 (t)	23,9	24,4
17	*	48,3
18 (d)	53,6	53,2
19 (d)	39,4	39,1
20	*	38,5
21 (t)	31,1	30,8
22 (t)	37,4	36,8
23 (q)	29,5	28,6
24 (q)	22,3	22,0
25 (q)	16,7	16,5
26 (q)	17,5	17,1
27 (q)	23,8	23,9
28 (s)	180,2	178,4
29 (q)	*	17,1
30 (q)	21,4	21,2

^a (MAHATO & KUNDU, 1994); * Sinais não observados

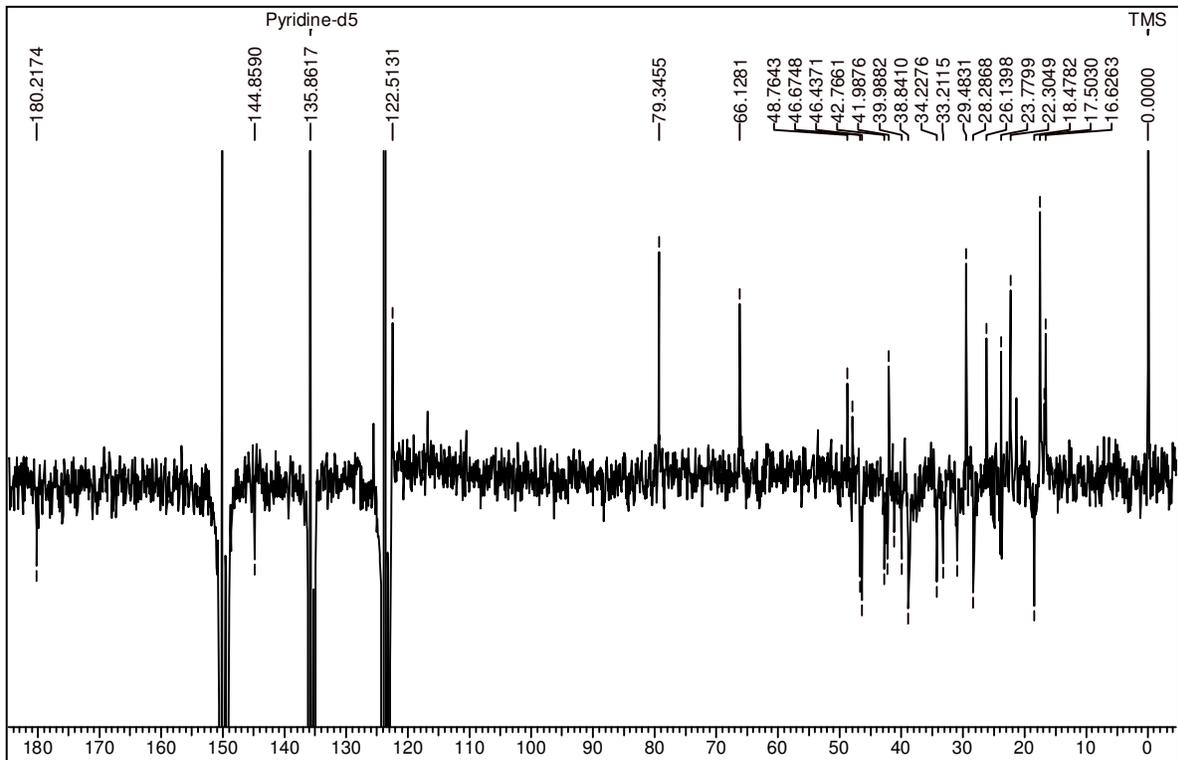


Figura 5-71- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXVIII e XXIX

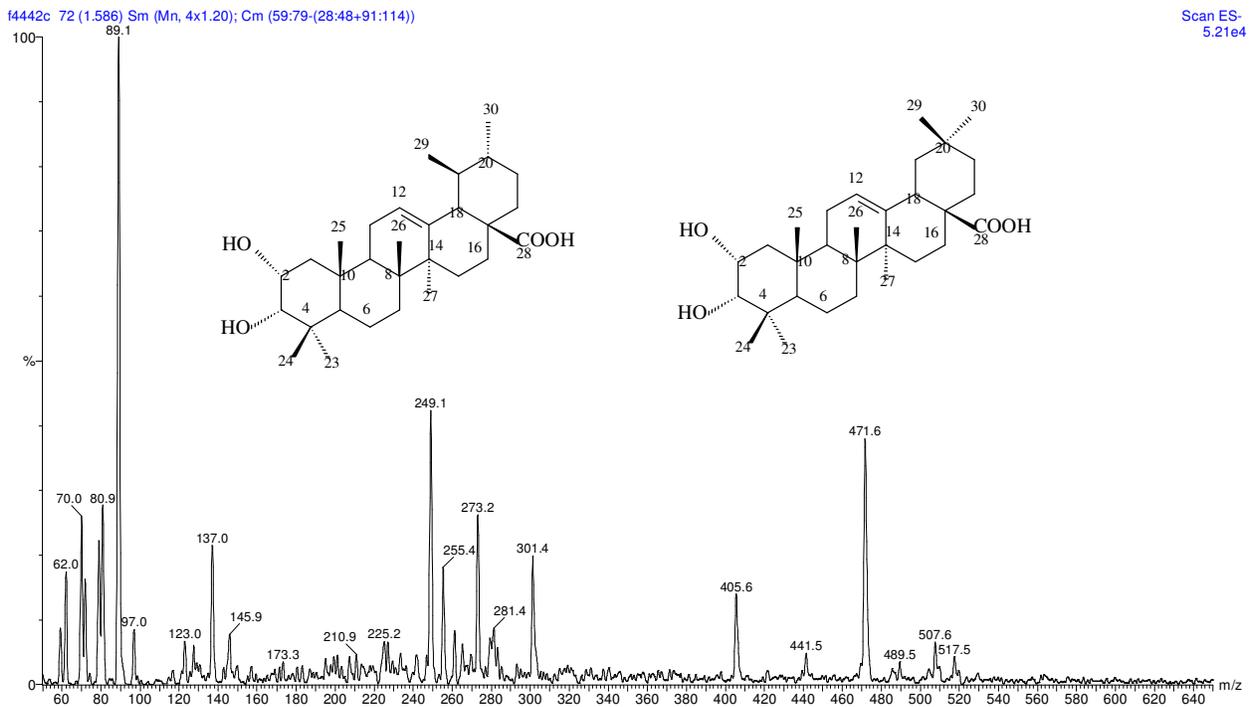
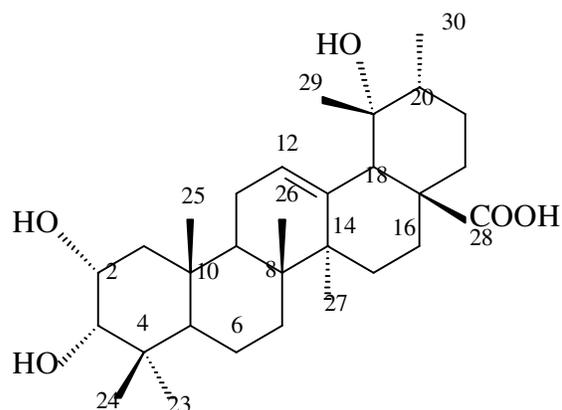


Figura 5-72- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXVIII e XXIX

5.14. Identificação da Substância XXXII

ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxiurs-12-en-28-óico
ou ácido euscáfico



Do extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas e galhos de *V. polygama*, após várias etapas cromatográficas em sílica, foram obtidas as frações f543, 11,3 mg (em mistura com a Substância XXX) e DMG5L, 58,4 mg (puro), as quais se mostraram como um pó branco e amorfo.

A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT135 da respectiva fração indicou ser um triterpeno pentacíclico. O espectro de RMN de ^{13}C , PENDANT e DEPT135 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz; Figura 5-75, Figura 5-77 e Figura 5-76) revelaram um sinal em δ 180,9 referente à carbonila carboxílica; dois sinais pertencentes a C sp^2 em δ 140,1 e 128,1, foram atribuídos a um esqueleto triterpênico do tipo 12-urseno. Três sinais referentes a C carbinólicos em δ 79,5, 72,9 e 66,3 mostraram que o triterpeno continha três grupos hidroxila.

Os sinais exibidos pelo espectro RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, Figura 5-74) foram: um em δ 5,58 (sl) referente ao H-12 olefínico; um em δ 4,31 (dl, 9,8 Hz), atribuído ao H-2, o qual determinou a configuração α do grupo hidroxila, devido ao valor alto da constante de acoplamento entre H-2 e H-1a ou 1b; o sinal em δ 3,78 (sl, H-3) também revelou a configuração α do outro grupo hidroxila; um sinal em δ 3,03 (s), atribuído ao H-18, indicou a localização do terceiro grupo hidroxila no C-19, também em configuração α , devido a metila localizada neste mesmo C ter configuração β por origem biossintética.

As correlações observadas no espectro de HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, Figura 5-78), como a do sinal em δ 5,58 com os carbonos 14 e 18; a do sinal em δ 3,78 com os carbonos 1, 5 e 2; a do sinal em δ 3,03 com os carbonos 14, 17, 28; a do sinal

em δ 1,90 (dd, H-1) com os carbonos 2, 5, 10 e 3; a do sinal em δ 1,63 (s, Me 27) com os carbonos 14 e 15; a do sinal em δ 1,43 (s, Me 29) com os carbonos 13,18 e 19; a do sinal em δ 1,26 (s, Me 26) com os carbonos 11,8 e 9; a do sinal em δ 1,13 (s, Me 30) com os carbonos 19 e 21; a do sinal em δ 1,09 (s, Me 25) com os carbonos 10, 1 e 5; a do sinal em δ 0,97 (s, Me 23) com os carbonos 4 e 5; a do sinal em δ 0,89 (s, Me 24) com os carbonos 23, 4, 3 e 5 confirmaram as atribuições mencionadas acima.

A fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_5$ foi deduzida a partir dos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 5-73), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 487 $[M-H]^-$.

A comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; Tabela 5-18) veio corroborar com a identificação do ácido $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -trihidroxiurs-12-en-28-óico ou ácido euscáfico.

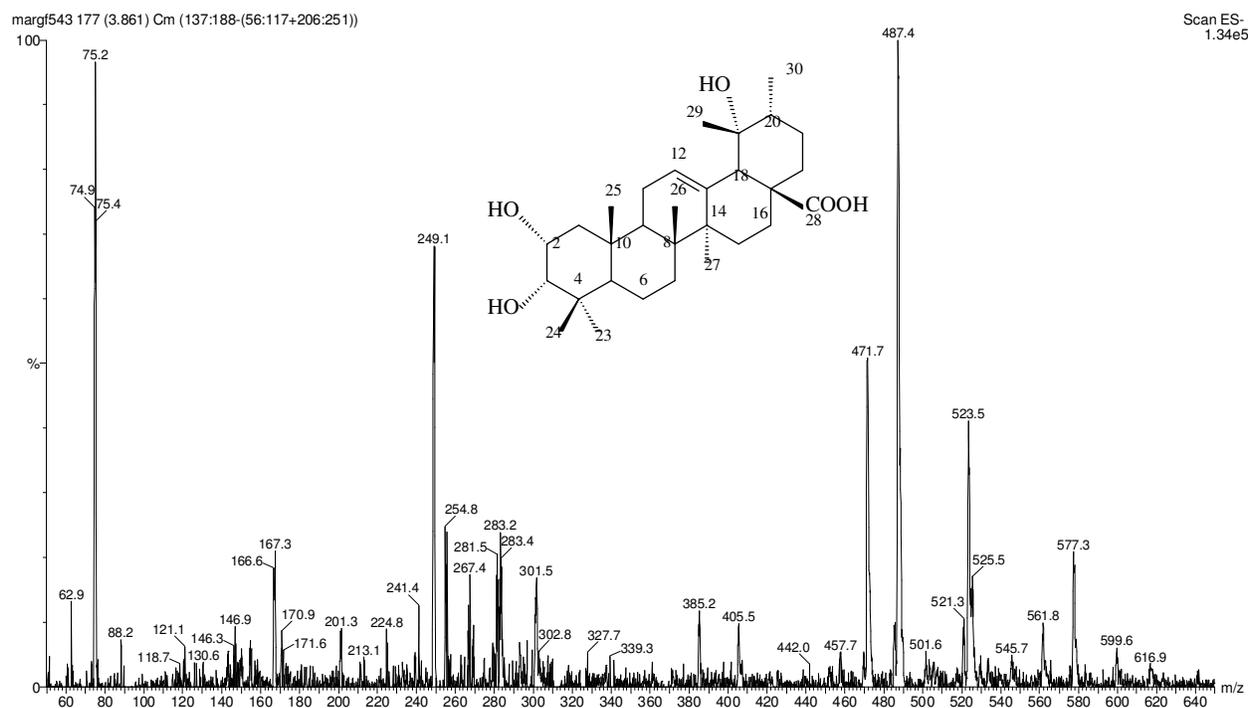


Figura 5-73- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXX e XXXII

Tabela 5-18- Dados do espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII e do $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -triidroxiurs-12-enato de β -D-glucopiranosila

C/MULTIPLICIDADE	SUBSTÂNCIA XXXII	URSENATO ^a
1 (t)	42,9	42,8
2 (d)	66,3	66,0
3 (d)	79,5	79,0
4 (s)	38,8	38,6
5 (d)	48,9	48,4
6 (t)	18,8	18,5
7 (t)	33,7	33,4
8 (s)	40,7	40,7
9 (d)	47,8	47,6
10 (s)	38,9	38,6
11 (t)	24,2	24,1
12 (d)	128,1	128,2
13 (s)	140,1	139,1
14 (s)	42,5	42,0
15 (t)	29,4	29,3
16 (t)	26,5	26,0
17 (s)	48,4	48,4
18 (d)	54,7	54,3
19 (s)	72,9	72,5
20 (d)	42,3	42,0
21 (t)	27,1	26,9
22 (t)	38,6	37,6
23 (q)	29,6	29,0
24 (q)	22,4	22,2
25 (q)	16,7	16,7
26 (q)	17,4	17,4
27 (q)	24,8	24,5
28 (s)	180,9	176,8
29 (q)	27,2	26,7
30 (q)	16,9	16,7

^a (JUNGES, 1994)

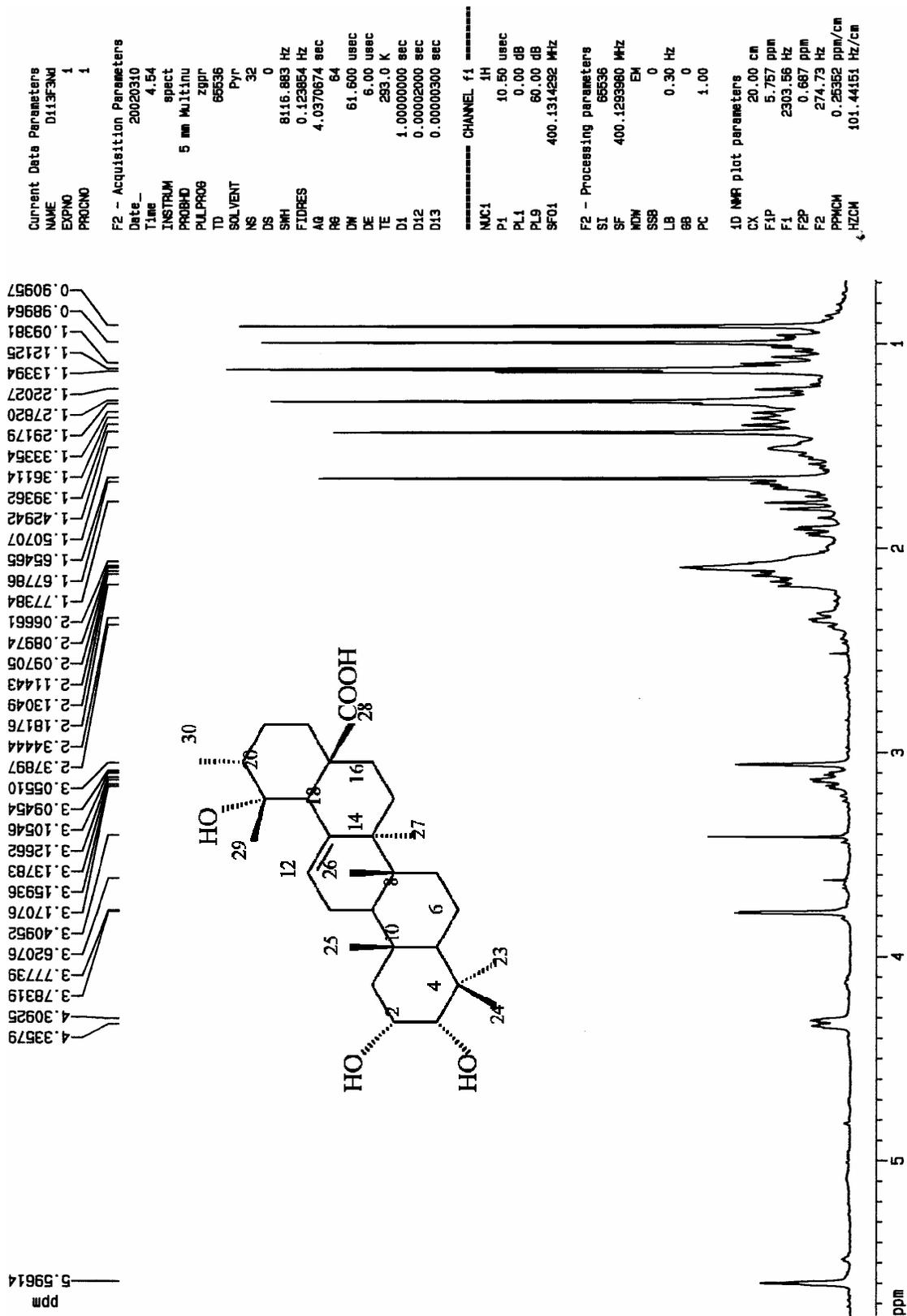


Figura 5-74- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII

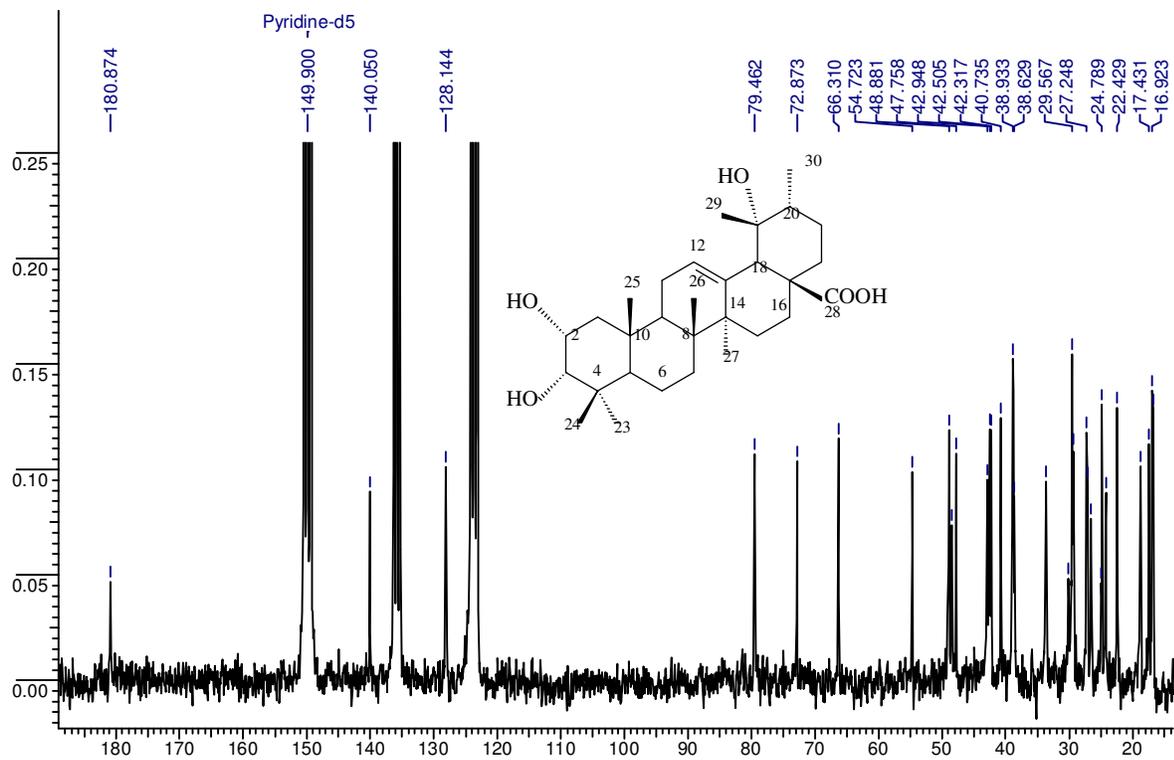


Figura 5-75- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII

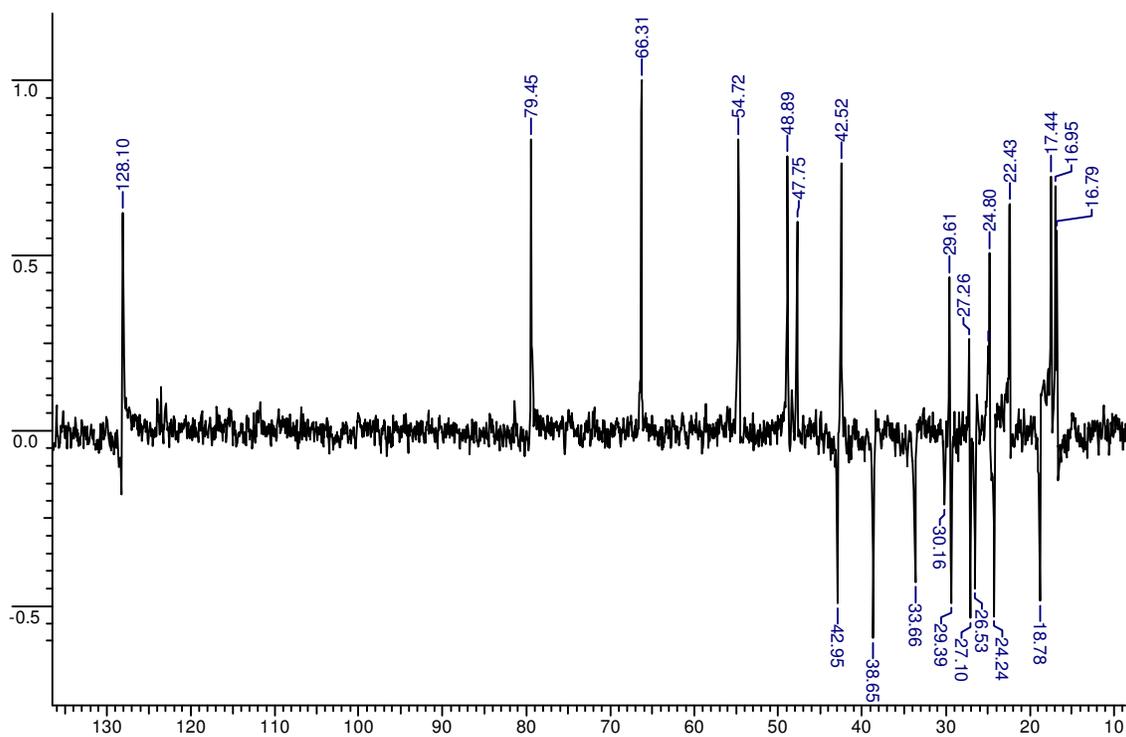


Figura 5-76- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII

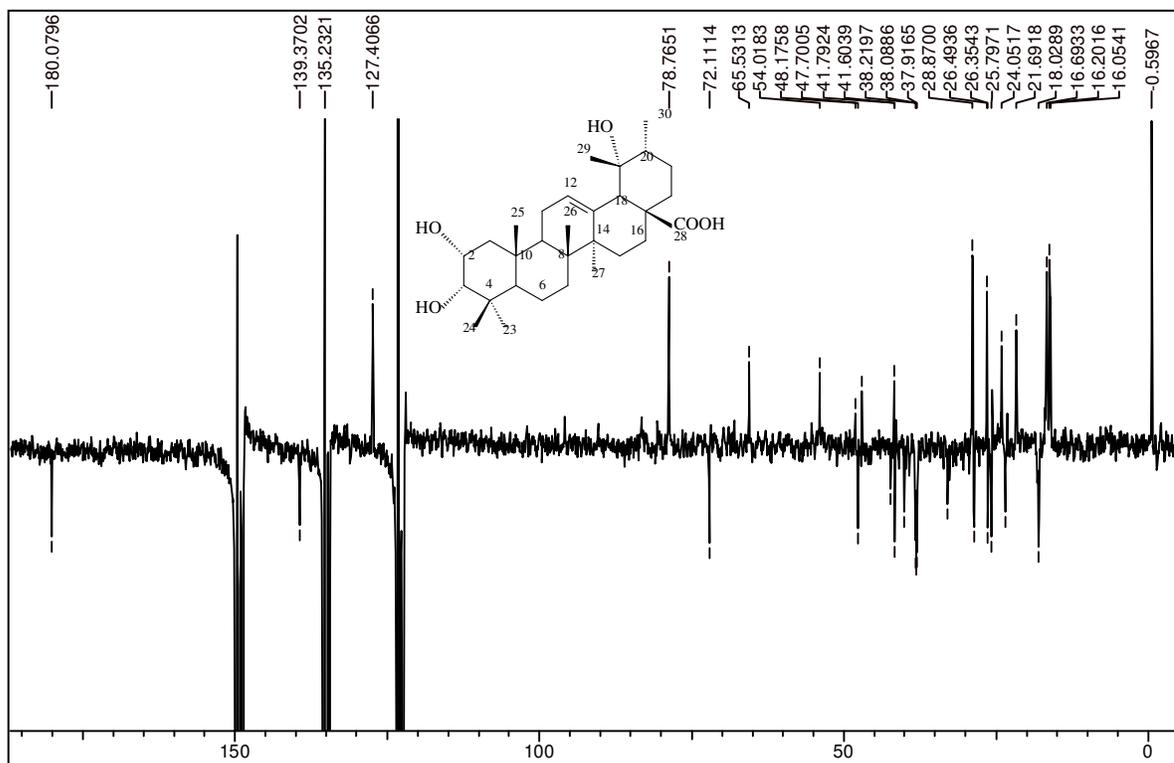


Figura 5-77- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII

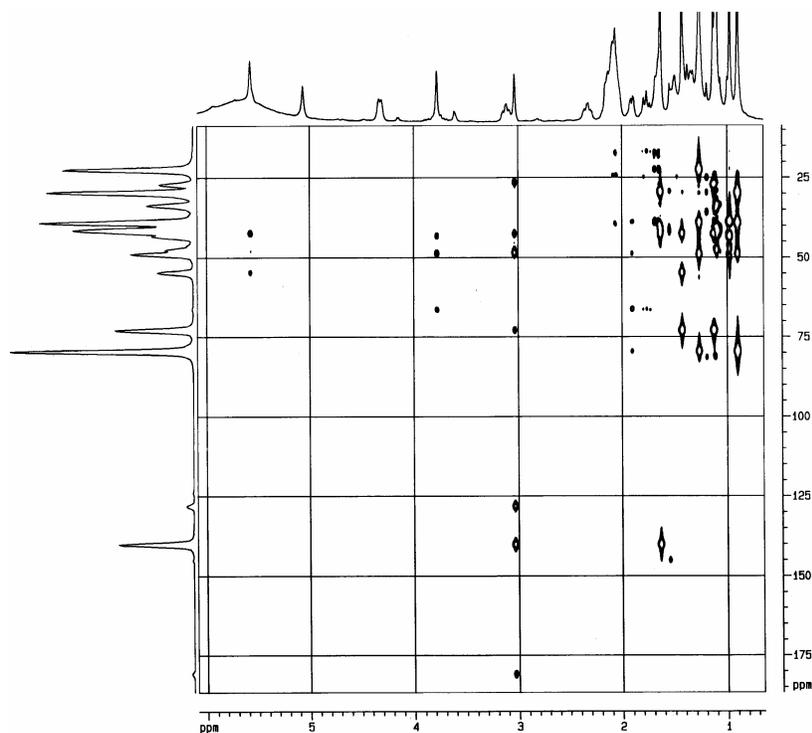
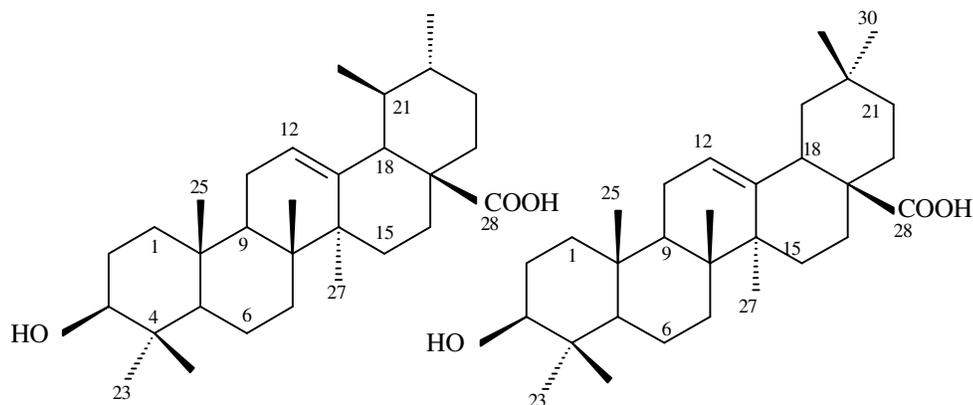


Figura 5-78- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXII

5.15. Identificação das Substâncias XXXIII e XXXIV em mistura



ácido ursólico

ácido oleanólico

Do extrato metanólico, partição diclorometânica, de folhas de *V. polygama*, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, foram obtidas as frações df424 e df433, 11,3mg, as quais se mostraram como um pó branco e amorfo e uma única mancha roxa na CCDA, usando-se Dic/AcOEt 85:25.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C /PENDANT das respectivas frações indicou tratar-se de uma mistura de substâncias, devido à complexidade e número de sinais. O espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz, Figura 5-80, Figura 5-81) revelou dois sinais em δ 180,0 e 176,1 referentes a C carboxílicos; quatro sinais pertencentes a C sp_2 , sendo que dois deles, δ 139,4 e 125,8, foram atribuídos a um esqueleto triterpênico do tipo 12-urseno e os outros dois, δ 144,9 e 122,7, a um esqueleto triterpênico do tipo 12-oleaneno. Um só sinal referente a C carbinólico em δ 78,3 foi observado.

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz, Figura 5-82) mostrou um sinal centrado em δ 5,27 (m), referente ao H-12 olefínico. O espectro realizado com acetona- d_6 revelou dois sinais centrados em δ 5,28 e 5,22 (t, $J = 3,6$ Hz) referentes aos mesmos H-12 olefínicos, dos ácidos oleanólico e ursólico respectivamente. O sinal referente ao H-3, carbinólico, apareceu centrado em δ 3,22 (m) e os sinais referentes aos H metílicos entre δ 1,25-0,78.

A fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelos espectros de massas, ESI modo negativo (Figura 5-79), medida no pico do íon pseudomolecular a m/z 455 $[M-H]^-$.

A identificação das estruturas das Substâncias XXXIII e XXXIV em mistura foi confirmada por comparação com dados relatados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; JUNGES, 1994; Tabela 5-19) como os ácidos oleanólico e ursólico.

Tabela 5-19- Dados do espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV e do RMN de ^{13}C dos ácidos ursólico e oleanólico

C	SUBSTÂNCIA	A.	SUBSTÂNCIA	A.	MISTURA
MULTIPLICIDADE	XXXIV	URSÓLICO ^a	XXXIII	OLEANÓLICO ^b	
1 (t)		38,9		38,5	39,2
2 (t)	23,8	23,5	28,3	27,4	
3 (d)		78,3		78,7	78,3
4 (s)	37,6	37,3	40,1	38,7	
5 (d)		55,7		55,2	55,9
6 (t)		18,7		18,3	18,9
7 (t)	33,7	33,3	*	32,6	
8 (s)		39,3		39,3	39,4
9	*	46,7	*	47,6	*
10 (s)		37,2		37,0	37,6
11 (t)		23,8		23,1	23,8
12 (d)	125,8	125,5	122,7	122,1	
13 (s)	139,4	139,2	144,9	143,4	
14 (s)	42,6	42,0	*	41,6	
15 (t)	28,8	28,4	28,4	27,7	
16 (t)		22,7		23,4	25,1
17	*	47,9	*	46,6	*
18 (d)	53,7	53,4	*	41,3	
19 (d)	39,5	39,3	*	45,8	
20 (d)	39,6	39,8	30,1(s)	30,6	
21 (t)	31,2	30,9	*	33,8	
22 (t)	37,4	37,3	31,1	32,3	
23 (q)		28,6		28,1	28,9
24 (q)	16,7	16,5	15,7	15,6	
25 (q)		15,6		15,3	15,8
26 (q)		16,5		16,8	16,7
27 (q)	24,0	23,5	26,3	26,0	
28 (s)	180,0	179,8	176,1	181,0	
29 (q)	17,7	17,3	*	33,1	
30 (q)	21,5	21,3	23,9	23,6	

^a (JUNGES, 1994); ^b (MAHATO & KUNDU, 1994); * Sinais não observados

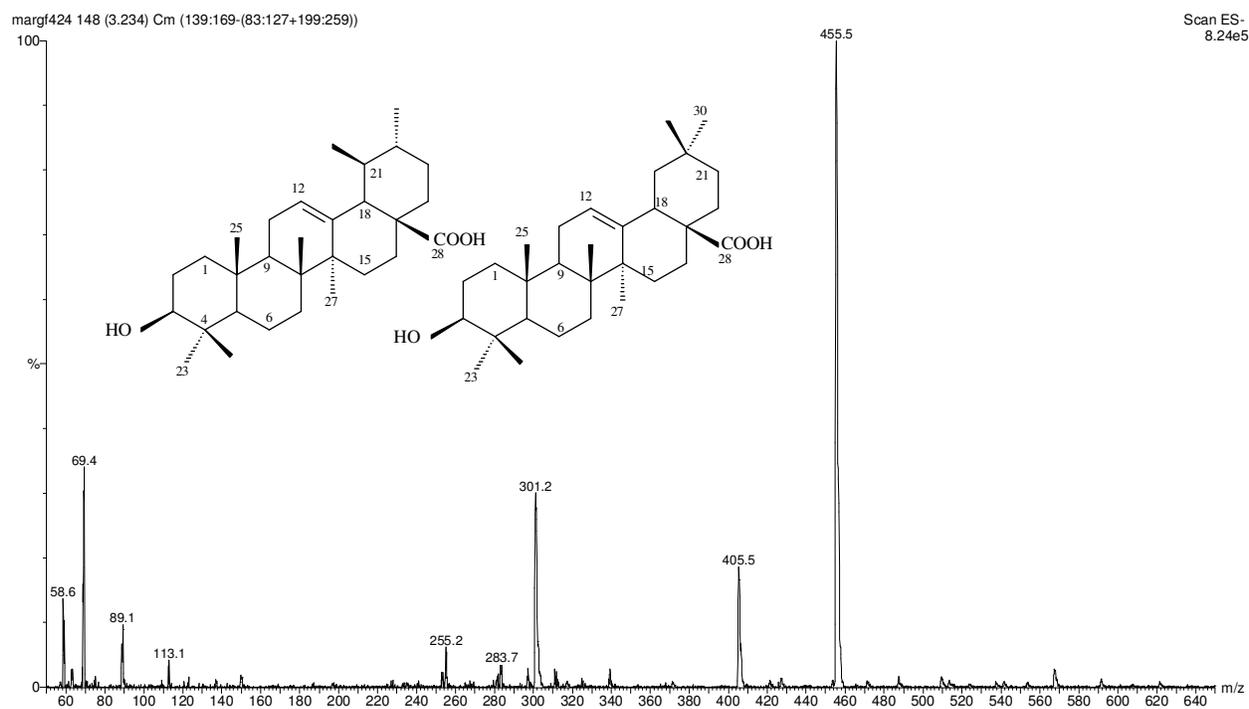


Figura 5-79- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV

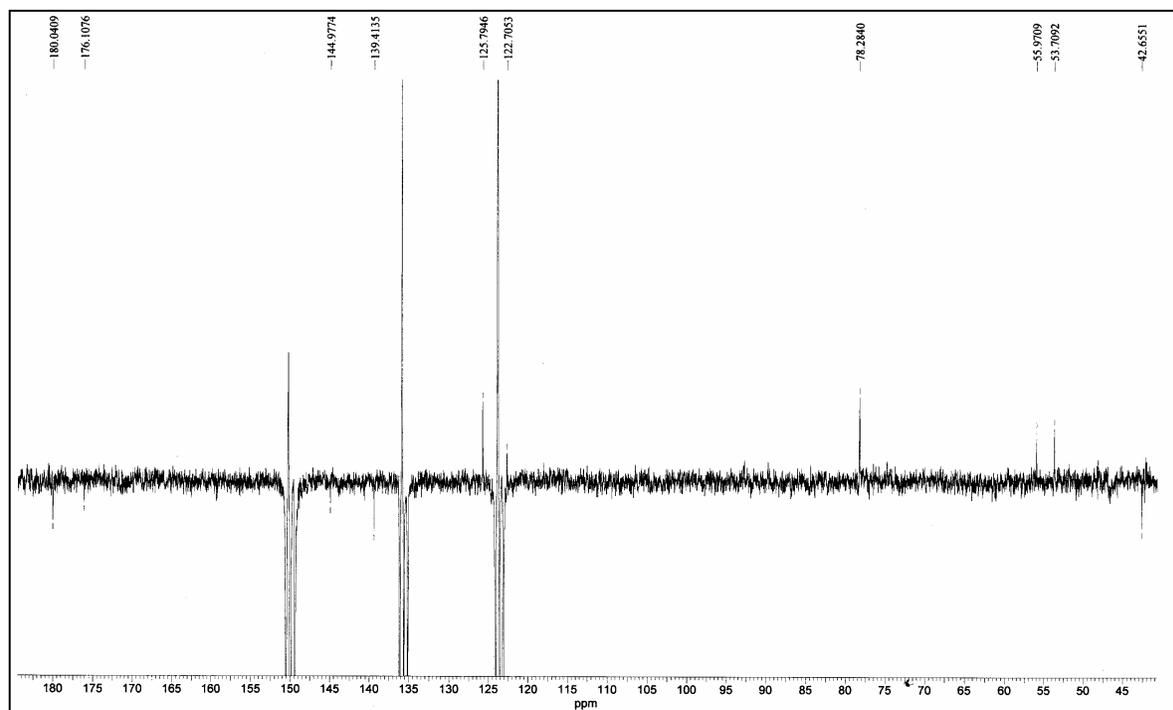


Figura 5-80- Espectro de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV

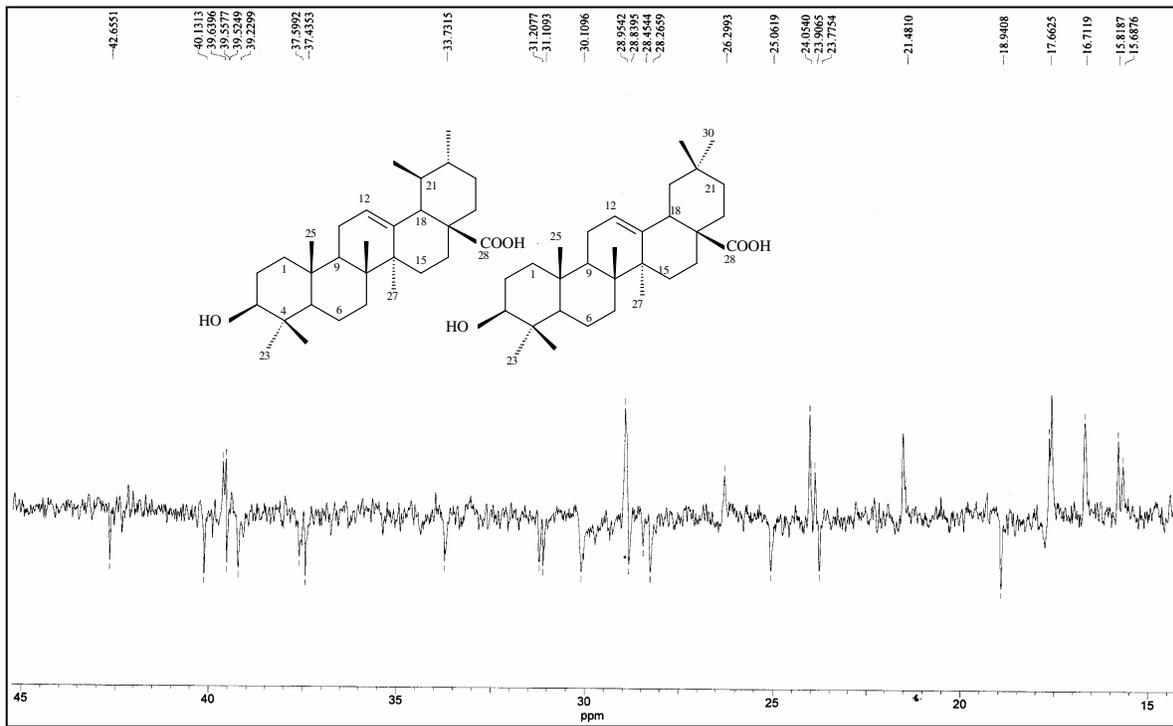


Figura 5-81- Espectro ampliado de RMN de ^{13}C /PENDANT (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV

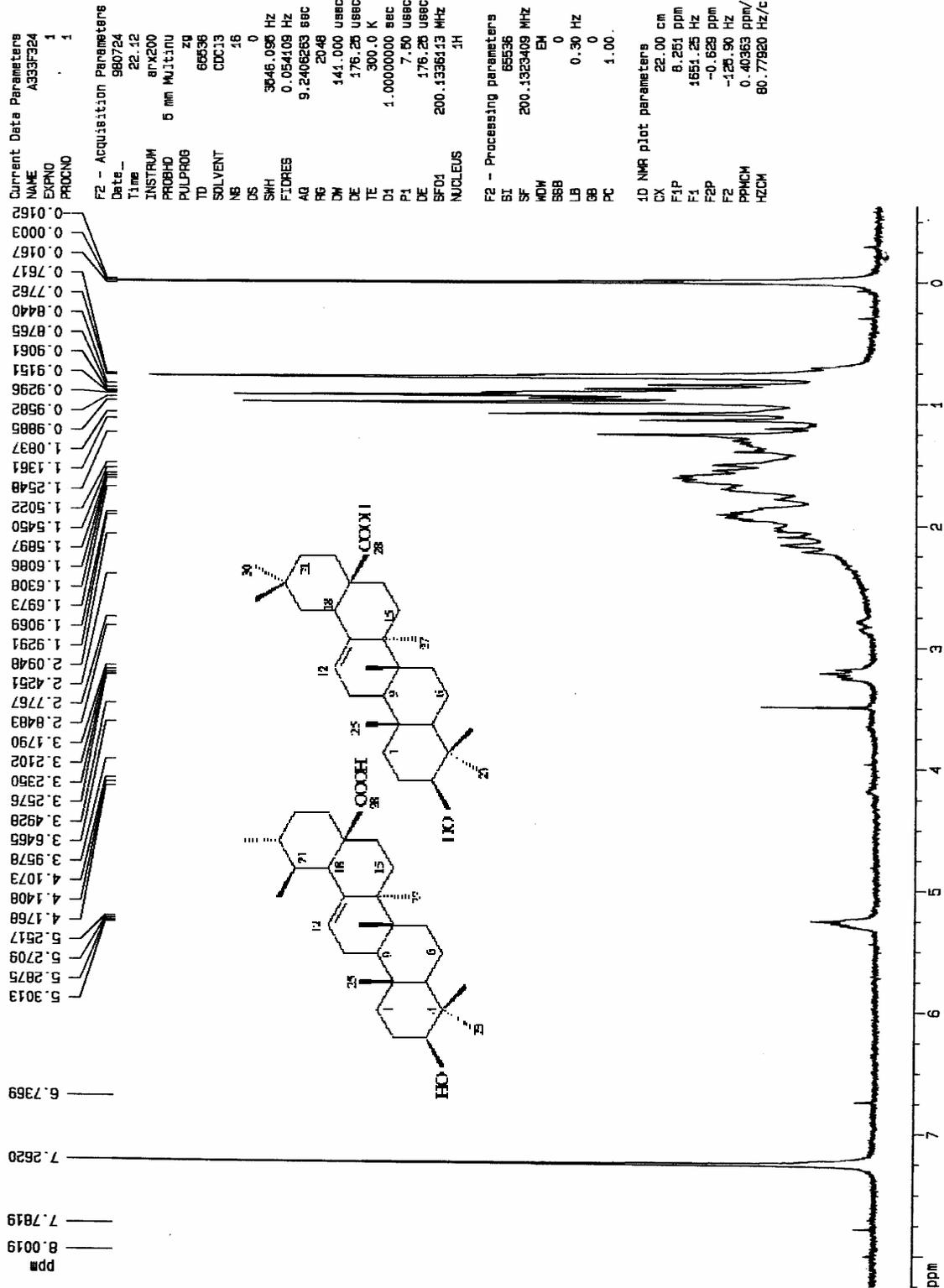
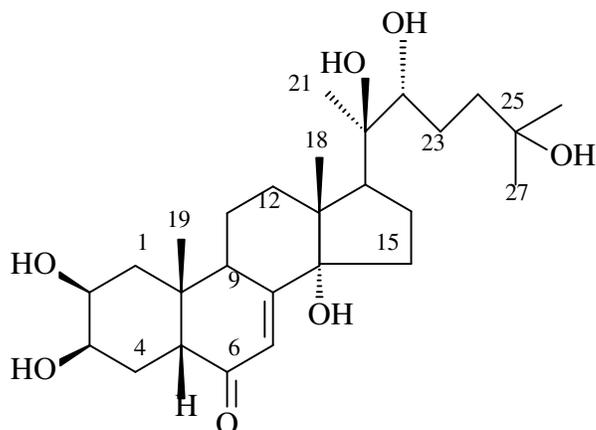


Figura 5-82- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da mistura das Substâncias XXXIII e XXXIV

5.16. Identificação da Substância XXXV



20-hidroxiectdisona

Do extrato metanólico, partição acetato de metila, de galhos de *V. polygama*, após vários fracionamentos cromatográficos em sílica flash, sephadex LH-20 e em placa preparativa, foi obtida a fração AMG3Eb, 77,7 mg, a qual se mostrou como um pó incolor de aspecto cristalino.

Após a substância ser eluída com Dic/Ace 1:1 na CCDA e revelada com vanilina sulfúrica, foi observada uma mancha verde oliva.

A fórmula molecular $C_{27}H_{44}O_7$ foi deduzida a partir dos dados provenientes do espectro de massas, ESI modo negativo, que revelou um pico (100%) relativo ao íon pseudomolecular a m/z 479 $[M-H]^-$ (Figura 5-84). No modo positivo, o espectro revelou um pico referente ao aduto de sódio a m/z 503 $[M+Na]^+$ (Figura 5-83).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, C_5D_5N , Figura 5-85) totalmente desacoplado revelou três sinais em δ 204,1, 166,6 e 121,9 indicando a existência de carbonila cetônica α,β -insaturada, a qual corresponde ao grupo 7-en-6-ona característico dos ecdisteróides e responsável pela sua absorção no UV observada em 254 nm. O espectro de $^{13}C/DEPT$ 135° (C_5D_5N , 50 MHz, Figuras 5-85 e 5-86) forneceu evidências de que a substância possuía 5 grupos metila, 3 carbonos quaternários oxigenados, três oximetínicos e 8 metilênicos.

O espectro de RMN de 1H (C_5D_5N , 400 MHz, Figura 5-88) revelou os seguintes sinais: quatro em δ 1,62, 1,40, 1,23 e 1,08 (s, integrando para 5 grupos de metilas: Me-21, 26 e 27, 18 e 19 respectivamente); um sinal em δ 6,27 (dl, $J = 2,2$ Hz) referente ao H olefínico H-7, o qual mostrou acoplamento à longa distância com H-9 no espectro de COSY (C_5D_5N , 400 MHz, Figura 5-87); um em δ 4,23 (m; H-2 e 3); um em

δ 3,90 (dl; $J = 9,4$ Hz; H-22); um em δ 3,61 (m; H-9); um em δ 3,03 (m; H-5 e 17); um em δ 2,58 (dt, 13,0 e 4,8 Hz) atribuído ao H-11 através do acoplamento, revelado no espectro de COSY, com o outro H-11 em δ 1,8, que por sua vez acopla com o H-9.

Baseados nos dados espectrais acima e na comparação com os dados relatados da literatura (SUKSAMRARN & SOMMECHAI, 1993; Tabela 5-20, Tabela 5-21), foi proposta a estrutura da 20-hidroxiecdisona, ou polipodina A.

Tabela 5-20- Dados do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV e da 20-hidroxiecdisona

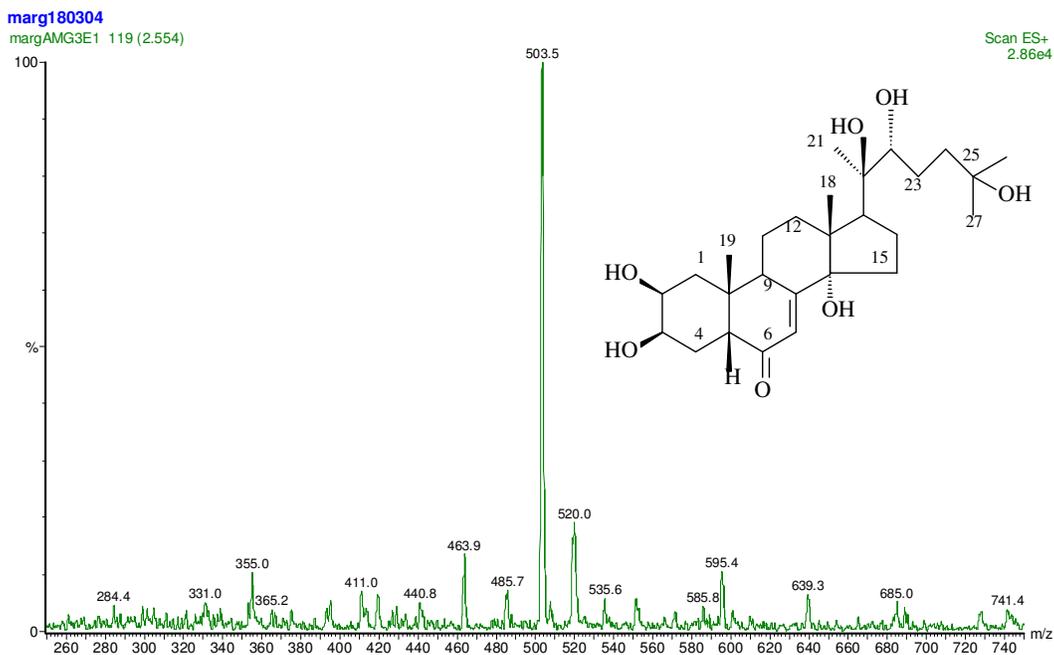
C/ MULTIPLICIDADE	SUBSTÂNCIA	
	XXXV	20-HIDROXIECDISONA ^a
1 (t)	38,1	38,0
2 (d)	68,5	68,3
3 (d)	68,3	68,2
4 (t)	32,7	32,5
5 (d)	51,6	51,4
6 (s)	204,1	203,5
7 (d)	121,9	121,7
8 (s)	166,6	166,1
9 (d)	34,7	34,6
10 (s)	38,9	38,8
11 (t)	21,4	21,2
12 (t)	32,3	32,1
13 (s)	48,4	48,2
14 (s)	84,5	84,4
15 (t)	31,9	31,8
16 (t)	21,7	21,6
17 (d)	50,4	50,2
18 (q)	18,2	17,9
19 (q)	24,7	24,5
20 (s)	77,2	77,0
21 (q)	21,9	21,7
22 (d)	77,9	77,7
23 (t)	27,7	27,5
24 (t)	42,8	42,6
25 (s)	70,1	69,8
26 (q)	30,4	30,1
27 (q)	30,1	30,1

^a (SUKSAMRARN & SOMMECHAI, 1993)

Tabela 5-21- Dados do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, J em Hz) da Substância XXXV e da 20-hidroxiecdisona

H	Substância XXXV	20-hidroxiecdisona ^a
2	4,23 (m)	4,17 (m)
3	4,23 (m)	4,21 (m)
5	3,03 (m)	3,01
7	6,27 (sl)	6,25 (d, 2,5 Hz)
9	3,61 (m)	3,58 (m)
17	3,03 (m)	3,00
22	3,90 (dl, 9,4 Hz)	3,87 (m)
24	*	1,81 e 2,28
18	1,23 (s)	1,21 (s)
19	1,08 (s)	1,06 (s)
21	1,62 (s)	1,58 (s)
26	1,40 (s)	1,36 (s)
27	1,40 (s)	1,36 (s)

^a (SUKSAMRARN & SOMMECHAI, 1993); * sinal não observado



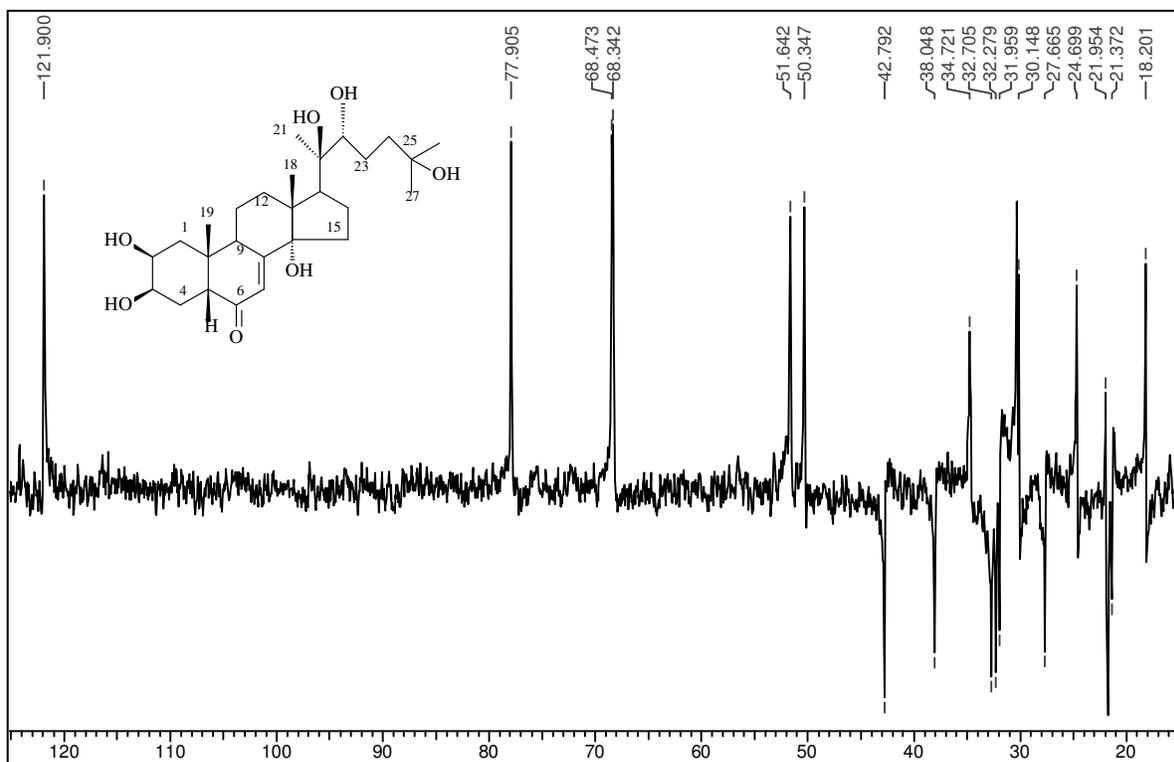


Figura 5-86- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV

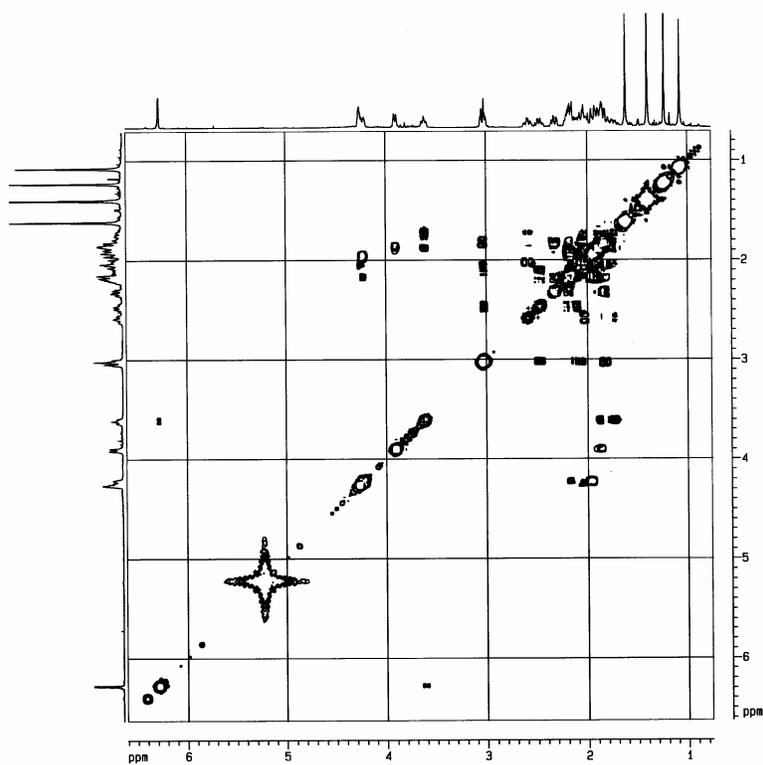


Figura 5-87- Espectro de $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV

```

Current Data Parameters
NAME      D623A1E1
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20031227
Time     1.13
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBI 1H/19
PULPROG  zgpr
TD        65536
SOLVENT  Pyr
NS        64
DS        0
SWH       5175.982 Hz
FIDRES   0.078979 Hz
AQ        6.3308287 sec
RG        114
DM        96.600 usec
DE        6.00 usec
TE        298.0 K
D1        1.00000000 sec
D12       0.0002000 sec
D13       0.00000300 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        8.50 usec
PL1       0.00 dB
PL9       60.00 dB
SFO1     400.1314880 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        400.1293996 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

ID NMR plot parameters
CX        20.00 cm
F1P       6.489 ppm
F1        2696.64 Hz
F2P       0.786 ppm
F2        307.44 Hz
PPMCM     0.28606 ppm/cm
HZCM      114.46010 Hz/cm

```

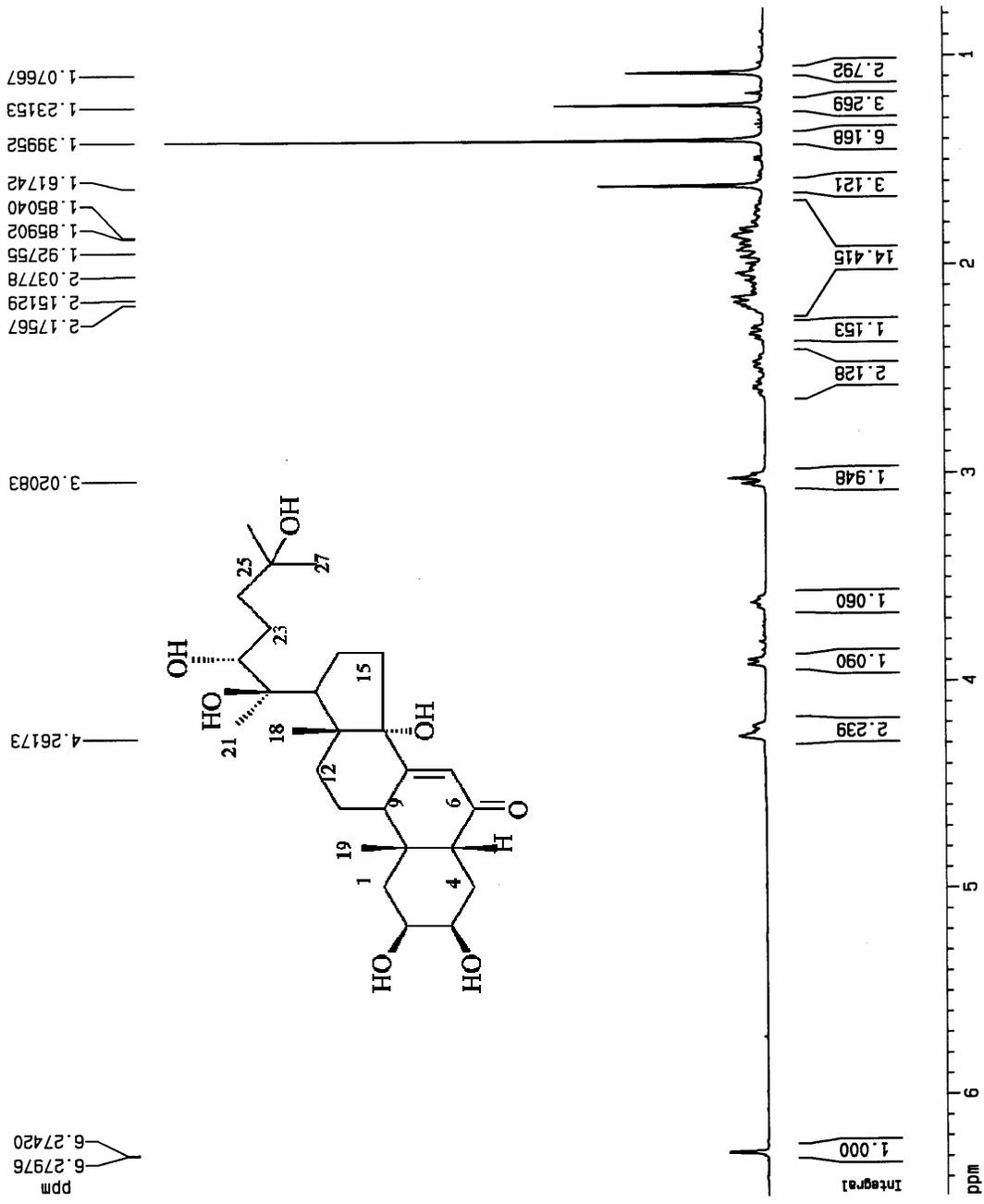
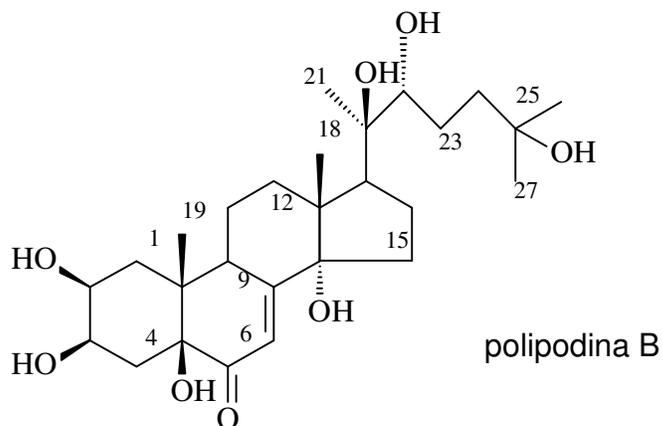


Figura 5-88- Espectro RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXV

5.17. Identificação da Substância XXXVI



Do extrato metanólico, partição acetato de etila, dos galhos de *V. polygama*, depois de vários fracionamentos cromatográficos em sílica flash, sephadex LH-20 e em placa preparativa, foi obtida a fração AMG3Ec, 11,0 mg, a qual se mostrou como um pó incolor de aspecto cristalino.

Após a substância ser eluída com Dic/Ace 1:1 na CCDA e revelada com vanilina sulfúrica, foi observada uma mancha amarela/verde oliva.

A fórmula molecular $C_{27}H_{44}O_8$ (massa = 496 g/mol) foi deduzida a partir dos dados provenientes dos espectros de RMN de ^{13}C e $^{13}C/DEPT$ 135 (C_5D_5N , 50 MHz) usando uma transferência de pulso de 135° para obter sinais positivos para CH e CH_3 e negativo para CH_2 , e de RMN de 1H .

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, C_5D_5N , Figura 5-89) totalmente desacoplado revelou três sinais em δ 201,2, 167,0 e 120,1 indicando a existência de carbonila cetônica α,β -insaturada, a qual corresponde ao grupo 7-en-6-ona característico dos ecdisteróides e responsável pela sua absorção no UV observada em 254 nm. O espectro de $^{13}C/DEPT$ 135 (C_5D_5N , 50MHz, Figura 5-90) forneceu evidências de que a substância possuía cinco grupos metila, 4 carbonos quaternários oxigenados, três oximetínicos e 8 metilênicos.

O espectro de RMN de 1H (C_5D_5N , 200 MHz, Figura 5-91) revelou os seguintes sinais: quatro em δ 0,94, 0,99, 1,16 e 1,38 (s, integrando para 5 grupos de metilas: Me-19, 18, 26 e 27, 21 respectivamente); um sinal em δ 6,06 (sl) referente ao H olefínico H-7; um em δ 4,05 (m; H-2 e 3); um em δ 3,66 (dl; $J = 7,8$ Hz; H-22); um em

δ 3,43 (m; H-9); um em δ 2,79 (m; H-5 e 17). Os sinais relativos aos carbonos 10 e 9 apresentaram-se 6 e 4 ppm mais desblindados respectivamente do que os mesmos carbonos referentes à 20-hidroxiecdisona; os carbonos 3 e 4 apresentaram-se cerca de 2 ppm mais desblindados, enquanto o C-1 estava 2 ppm mais blindado e a Me-19 estava 7 ppm mais blindada (Tabela 5-22). Segundo KREPINSKY et al. (1977), a hidroxilação no C-5 resulta no deslocamento do sinal deste carbono de $\sim \delta$ 51,0 para $\sim \delta$ 80,0, ocorrendo outras mudanças pequenas, mas significantes, no C-6 ($\sim \delta$ 2,0 mais blindado); C-19 ($\sim \delta$ 5,0-6,0 mais blindado); C-3 ($\sim \delta$ 1,5-2,0 mais desblindado); C-4 e 10 ($\sim \delta$ 4,0 e 7,0 mais desblindados respectivamente). Estas observações levaram-nos a situar uma das hidroxilas no C-5 e o restante nas mesmas posições da substância 20-hidroxiecdisona.

Baseados nos dados acima, foi proposta a estrutura da polipodina B, ou 5,20-diidroxiecdisona, obtida através da comparação com os dados relatados na literatura (KREPINSKY et al., 1977; Tabela 5-22).

Tabela 5-22- Dados do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVI e da polipodina B

C (MULTIPLICIDADE)	SUBSTÂNCIA XXVI	POLIPODINA B ^a
1 (t)	36,1	34,9
2 (d)	68,1	68,1
3 (d)	70,0	70,0
4 (t)	34,9	36,1
5 (s)	80,1	80,0
6 (s)	201,2	201,2
7 (d)	120,1	120,0
8 (s)	167,0	167,0
9 (d)	38,5	38,4
10 (s)	44,9	44,9
11 (t)	22,2	21,0
12 (t)	32,3	31,8
13 (s)	48,3	48,2
14 (s)	84,2	84,2
15 (t)	31,8	32,3
16 (t)	21,6	21,8
17 (d)	50,2	50,1
18 (q)	17,3	17,3
19 (q)	18,3	18,0
20 (s)	77,1	77,0
21 (q)	21,8	21,5
22 (d)	77,8	77,7
23 (t)	27,6	27,6
24 (t)	42,8	42,6
25 (s)	69,8	69,7
26 (q)	30,1	30,1
27 (q)	30,3	30,3

^a (KREPINSKY et al., 1977)

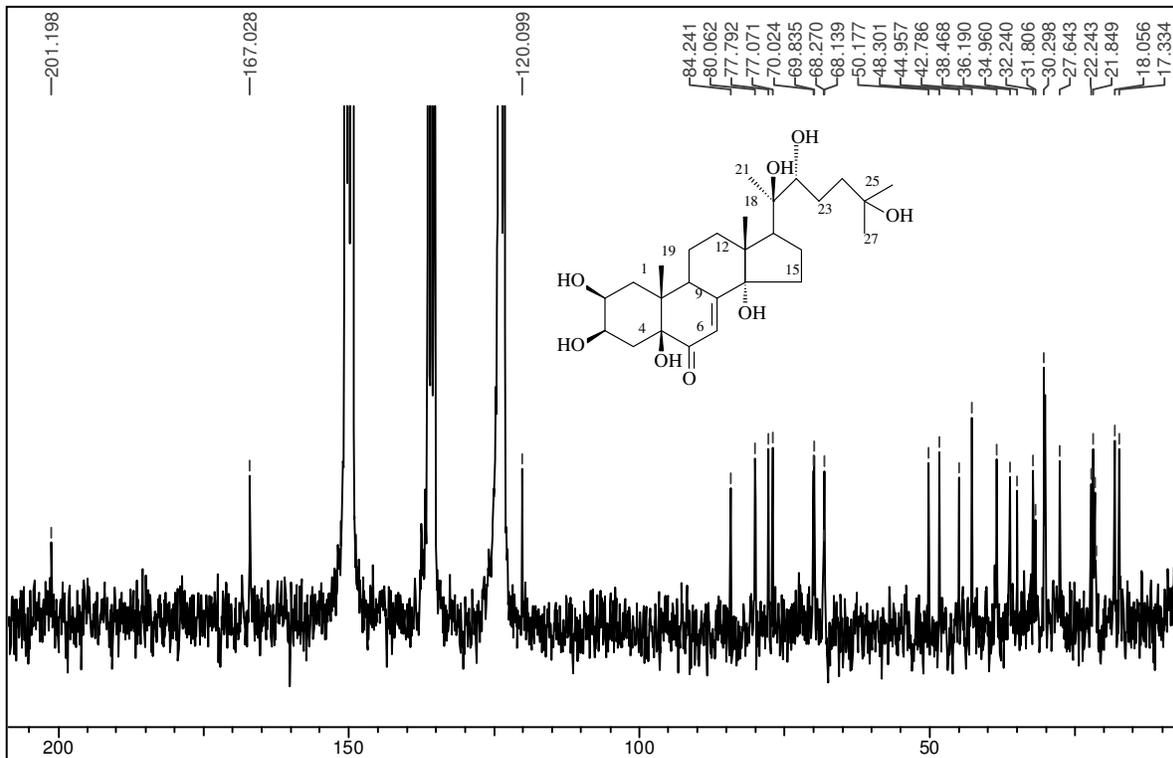


Figura 5-89- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVI

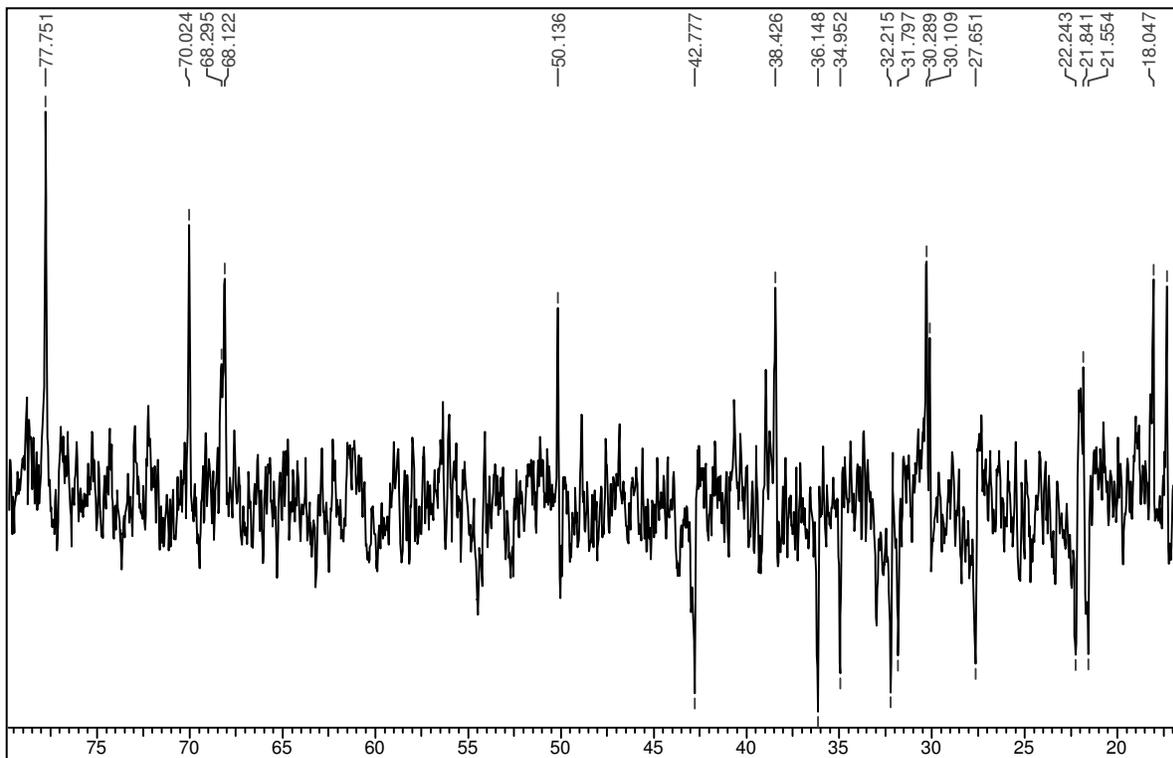


Figura 5-90- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVI

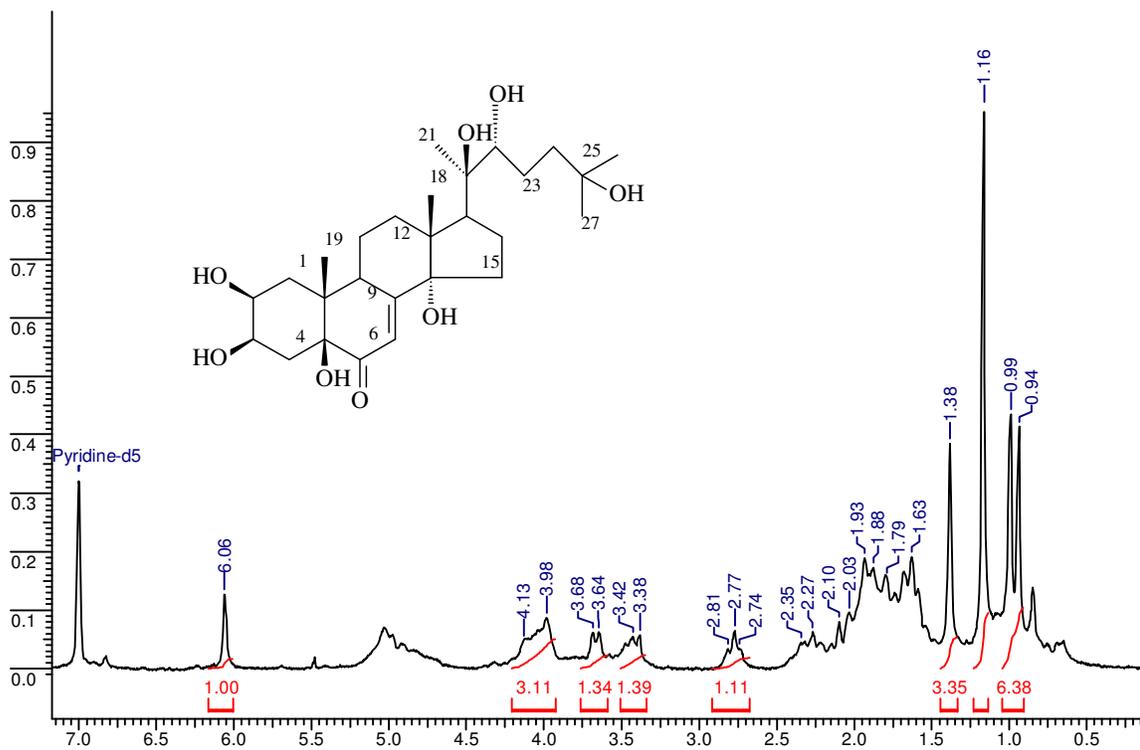
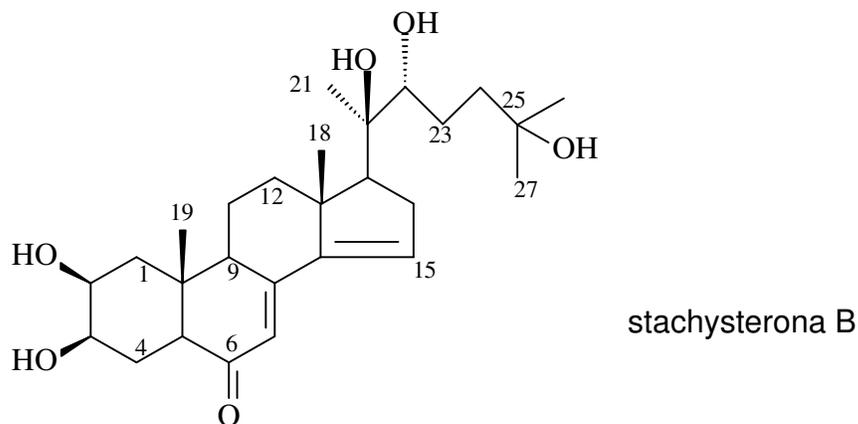


Figura 5-91- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, com supressão do sinal da água em 4,9 ppm) da Substância XXXVI

5.18. Identificação da Substância XXXVII



Do extrato metanólico, partição acetato de etila, dos galhos de *V. polygama*, depois de vários fracionamentos cromatográficos em sílica flash, sephadex LH-20 e em placa preparativa, foi obtida a fração AMG3Ee, 14,3 mg, a qual se mostrou como um pó incolor de aspecto cristalino.

Após a substância ser eluída com Dic/Ace 1:1 na CCDA e revelada com vanilina sulfúrica, foi observada uma mancha amarelo ouro.

A fórmula molecular $C_{27}H_{42}O_6$ (massa = 462 g/mol) foi deduzida a partir dos dados provenientes dos espectros de RMN de ^{13}C , $^{13}C/DEPT$ 135 (C_5D_5N , 50 MHz) usando uma transferência de pulso de 135° para obter sinais positivos para CH e CH_3 e negativo para CH_2 e de RMN de 1H .

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, C_5D_5N , Figura 5-93) totalmente desacoplado revelou quatro sinais em δ 203,2, 155,8, 128,9 e 121,3 indicando a existência de carbonila cetônica $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada, a qual corresponde ao grupo 7-en-6-ona característico dos ecdisteróides e responsável pela sua absorção no UV observada em 254 nm. O sinal referente ao outro C_{sp^2} foi encoberto pelo sinal do solvente. O espectro de $^{13}C/DEPT$ 135° (C_5D_5N , 50 MHz, Figura 5-94) forneceu evidências de que a substância possuía 5 grupos metila, 2 carbonos quaternários oxigenados, três oximetínicos e 7 metilênicos. Os sinais relativos aos carbonos 17 e 16 apresentaram-se 8 e 20 ppm mais desblindados respectivamente do que os mesmos carbonos referentes a 20-hidroxicdisona (Tabela 5-24) e os carbonos 9 e 18

apresentaram-se cerca de 4,5 e 2 ppm mais desblindados. Estas observações levaram-nos a situar a ligação dupla extra entre os carbonos 14 e 15.

O espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, com o sinal da piridina calibrado em δ 8,96, Figura 5-92) revelou sinais que estão expostos na Tabela 5-23.

Baseados nos dados acima, foi proposta a estrutura da Δ^{14-15} 20-hidroxiecdisona ou stachysterona B, confirmada através da comparação com os dados relatados na literatura (IMAI et al., 1970; Tabela 5-23, Tabela 5-24, respectivamente).

Segundo IMAI et al. (1970), a ocorrência desta substância, juntamente com a Shidasterona, é de interesse biogénético.

Tabela 5-23- Dados do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII e da stachysterona B

H	Substância XXXVII (δ ppm, J em Hz)	stachysterona B (δ ppm, J em Hz) ^a
Me-19	1,24 (s)	1,00 (s)
Me-18	1,61 (s)	1,33 (s)
Me-26 e 27	1,74 e 1,73 (s)	1,42 (s)
Me-21	1,81(s)	1,49 (s)
H-5	3,17 (m)	2,96 (dd, 5,0 e 13,5 Hz)
H-22	4,09 (dd; 9,3 e 2,2 Hz)	3,76 (m)
H-1	*	3,76 (m)
H-2	4,57 (dl, 11,5 Hz)	4,82 (m, $W_{1/2} = 21$ Hz)
H-3	4,79 (s; 11,8 Hz)	4,40 (m, $W_{1/2} = 7,5$ Hz)
H-15	6,22 (s)	5,94 (dd, 3,0 e 3,0 Hz)
H-7	6,62 (s)	6,31 (d, 2,5 Hz)
H-17	3,03 (m)	

^a (IMAI et al., 1970); * Sinal não observado

Tabela 5-24- Dados do espectro de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII e da 20-hidroxiecdisona

C/ MULTIPLICIDADE	SUBSTANCIA	
	XXXVII	20-HIDROXIECDISONA ^a
1 (t)	37,7	38,0
2 (d)	68,5	68,3
3 (d)	68,4	68,2
4 (t)	32,9	32,5
5 (d)	51,4	51,4
6 (s)	203,2	203,5
7 (d)	121,3	121,7
8 (s)	155,8	166,1
9 (d)	39,1	34,6
10 (s)	39,5	38,8
11 (t)	21,2	21,2
12 (t)	31,7	32,1
13 (s)	48,4	48,2
14 (s)	*	84,4
15 (t)	128,9	31,8
16 (t)	40,5	21,6
17 (d)	58,5	50,2
18 (q)	20,3	17,9
19 (q)	24,2	24,5
20 (s)	76,4	77,0
21 (q)	20,9	21,7
22 (d)	77,9	77,7
23 (t)	27,5	27,5
24 (t)	42,7	42,6
25 (s)	69,9	69,8
26 (q)	30,8	30,1
27 (q)	29,9	30,1

^a(SUKSAMRARN & SOMMECHAI, 1993); * Sinal encoberto pelo sinal do solvente

Current Data Parameters
 NAME D163A1Ee
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20040413
 Time 3.24
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H/19
 PULPROG zgpg
 TD 65536
 SOLVENT Pyr
 NS 32
 DS 0
 SMH 6265.661 Hz
 FIDRES 0.095606 Hz
 AG 5.2298255 sec
 RG 64
 DM 79.800 usec
 DE 6.00 usec
 TE 293.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D12 0.00002000 sec
 D13 0.00000300 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 8.50 usec
 PL1 0.00 dB
 PL9 60.00 dB
 SF01 400.1326063 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1303341 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 6.798 ppm
 F1 2701.98 Hz
 F2P 0.770 ppm
 F2 307.94 Hz
 PPMCH 0.29911 ppm/cm
 HZQM 119.68338 Hz/cm

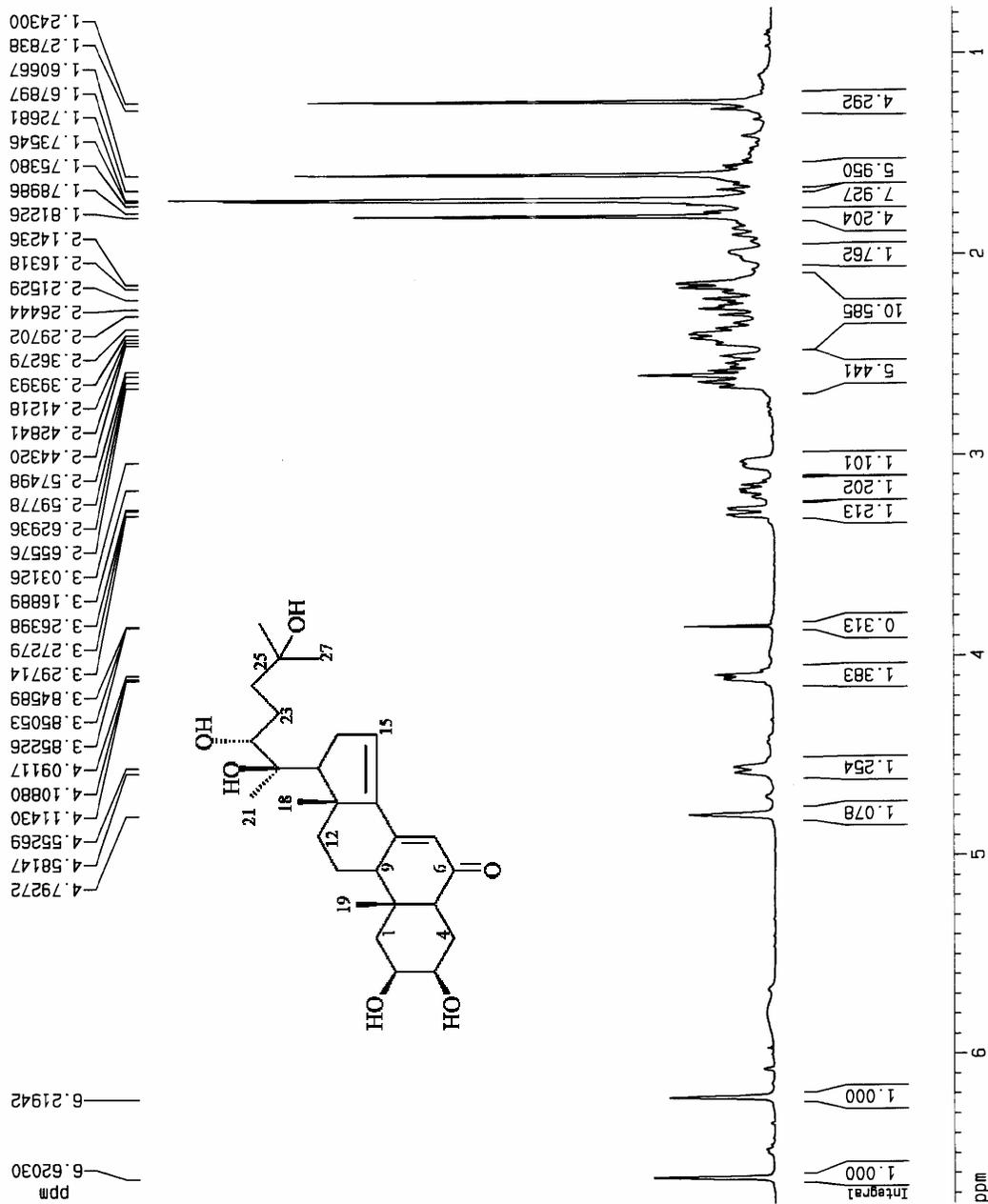


Figura 5-92- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, C₅D₅N) da Substância XXXVII

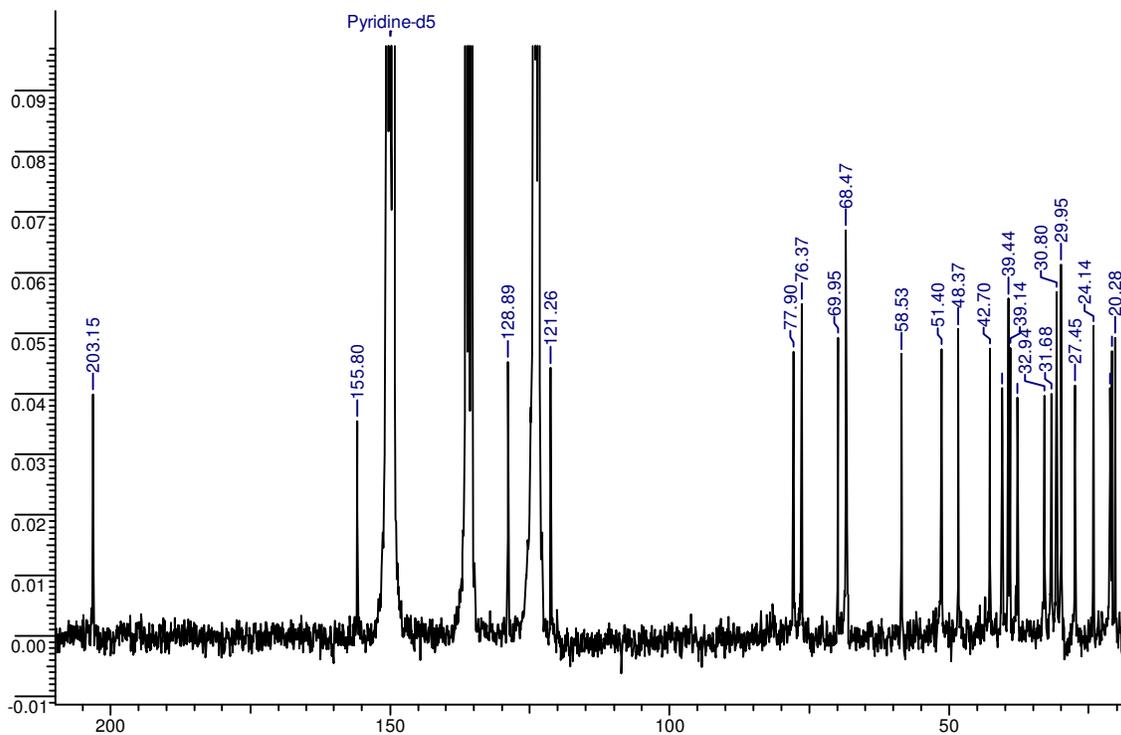


Figura 5-93- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII

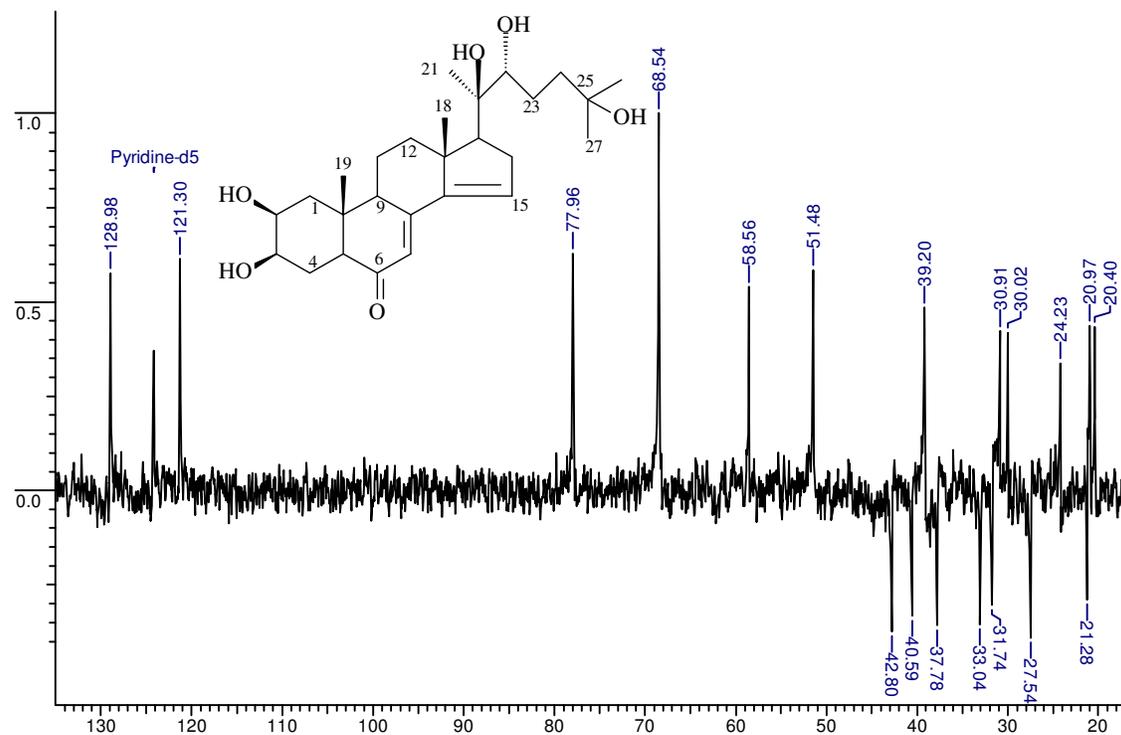
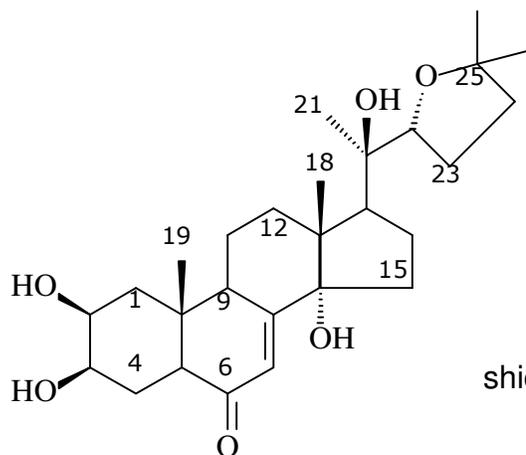


Figura 5-94- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVII

5.19. Identificação da Substância XXXVIII



shidasterona ou stachysterona D

Do extrato metanólico, partição acetato de etila, dos galhos de *V. polygama*, depois de vários fracionamentos cromatográficos em sílica flash, sephadex LH-20 e em placa preparativa, foi obtida a fração AMG3D5, 15,7 mg, a qual se mostrou como um pó incolor de aspecto cristalino.

Após a substância ser eluída com Dic/Ace 1:1 na CCDA e revelada com vanilina, foi observada uma mancha amarelo ouro.

A fórmula molecular $C_{27}H_{42}O_6$ (massa = 462 g/mol) foi deduzida a partir dos dados provenientes dos espectros de RMN de ^{13}C , $^{13}C/DEPT$ 135 (C_5D_5N , 50 MHz), usando uma transferência de pulso de 135° para obter sinais positivos para CH e CH_3 e negativo para CH_2 , e de RMN de 1H .

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, C_5D_5N , Figura 5-97) totalmente desacoplado revelou três sinais em δ 203,8, 166,4 e 121,9 indicando a existência de carbonila cetônica α,β -insaturada, a qual corresponde ao grupo 7-en-6-ona característico dos ecdisteróides e responsável pela sua absorção no UV observada em 254 nm. O espectro de $^{13}C/DEPT$ 135 (C_5D_5N , 50 MHz, Figura 5-96) forneceu evidências de que a substância possuía 5 grupos metila, 3 carbonos quaternários oxigenados, três oximetínicos e 7 metilênicos. A presença de sinais de carbonos oxigenados em δ 85,2 (CH) e 80,6 (C) chamaram a atenção para o fato de que a cadeia lateral da substância poderia estar modificada, formando um quinto anel com uma ligação éter (hemicetálica) entre os carbonos 22 e 25 (Tabela 5-25).

O espectro de RMN de 1H (C_5D_5N , 400 MHz,; Figura 5-95) revelou sinais expostos na Tabela 5-25. Segundo ROUSSEL et al. (1995), a configuração 22R pode

ser confirmada quando no experimento NOE a irradiação de H-17 resulta em aumento do sinal de H-22 e a irradiação deste, resulta em aumento dos sinais referentes ao H-17 e H-16 α . Estes resultados indicam que a molécula adota uma conformação na qual os átomos de hidrogênios 17 e 16 α estão espacialmente próximos. Esta conformação pode estar sendo estabilizada por ligação de hidrogênio entre o grupo OH ligado ao C-20 e o átomo de oxigênio ligado ao C-22/25. Devido à grande estabilidade termodinâmica do anel furânico, e dependendo das condições de manipulação do extrato (fase de alumina), esta substância pode ser um artefato originado da transformação da 20-hidroxiecdisona. A ocorrência desta substância, juntamente com a Stachysterona B, é de interesse biogenético, pois é concebido que na planta a 20-hidroxiecdisona pode ser precursora destas substâncias (IMAI et al., 1970).

Baseados nos dados espectrais de HMBC (C_5D_5N , 400 MHz, Figura 5-100), COSY (C_5D_5N , 400 MHz, Figura 5-98), HSQC (C_5D_5N , 400 MHz, Figura 5-99) e nos acima apresentados, foi proposta a estrutura da shidasterona, confirmada através da comparação com os dados relatados na literatura (ROUSSEL et al., 1995; Tabela 5-25).

Tabela 5-25- Dados do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII e da shidasterona

H (J EM HZ) [§]	C/ MULTIPLICIDADE	SUBSTÂNCIA XXXVIII	SHIDASTERONA ^a
1,97 (m)			
2,17 (dd, 4,3 e 14,0)	1 (t)	38,1	37,3
4,23 (dl, 11,3)	2 (d)	68,4	68,6
4,29 (sl)	3 (d)	68,3	68,4
2,07 (m)			
1,86 (m)	4 (t)	32,7	32,7
3,02 (dd)	5 (d)	51,6	51,7
	6 (s)	203,8	206,4
6,26 (s)	7 (d)	121,9	122,0
	8 (s)	166,4	167,9
3,61 (m)	9 (d)	34,7	35,0
	10 (s)	38,9	39,2
1,88 (m)			
1,71 (m)	11 (t)	21,9	21,6
2,60 (dt, 4,3 e 12,8)	12 (t)	32,7	32,2
	13 (s)	47,9	48,6
	14 (s)	84,4	85,2
1,93 (m)	15 (t)	31,8	31,6
2,37 (dl, 9,0)			
2,11 (m)	16 (t)	21,4	21,4
2,84 (t, 9,0)	17 (d)	51,6	51,7
1,06 (s)	18 (q)	18,1	18,0
1,07 (s)	19 (q)	24,6	24,3
	20 (s)	75,8	76,9
1,44 (s)	21 (q)	20,6*	20,6
4,12 (t, 7,6)	22 (d)	85,2	85,4
1,82 (m)			
1,63 (m)	23 (t)	27,9	28,4
	24 (t)	39,1	39,5
	25 (s)	80,6	81,7
1,24 (s)	26 (q)	28,5	28,3
1,23 (s)	27 (q)	29,0	28,9

^a (ROUSSEL et al., 1995); * Sinal observado na projeção de C do espectro de HSQC

[§] Dados atribuídos segundo observações dos espectros de RMN ^1H , $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC, $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY e $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC

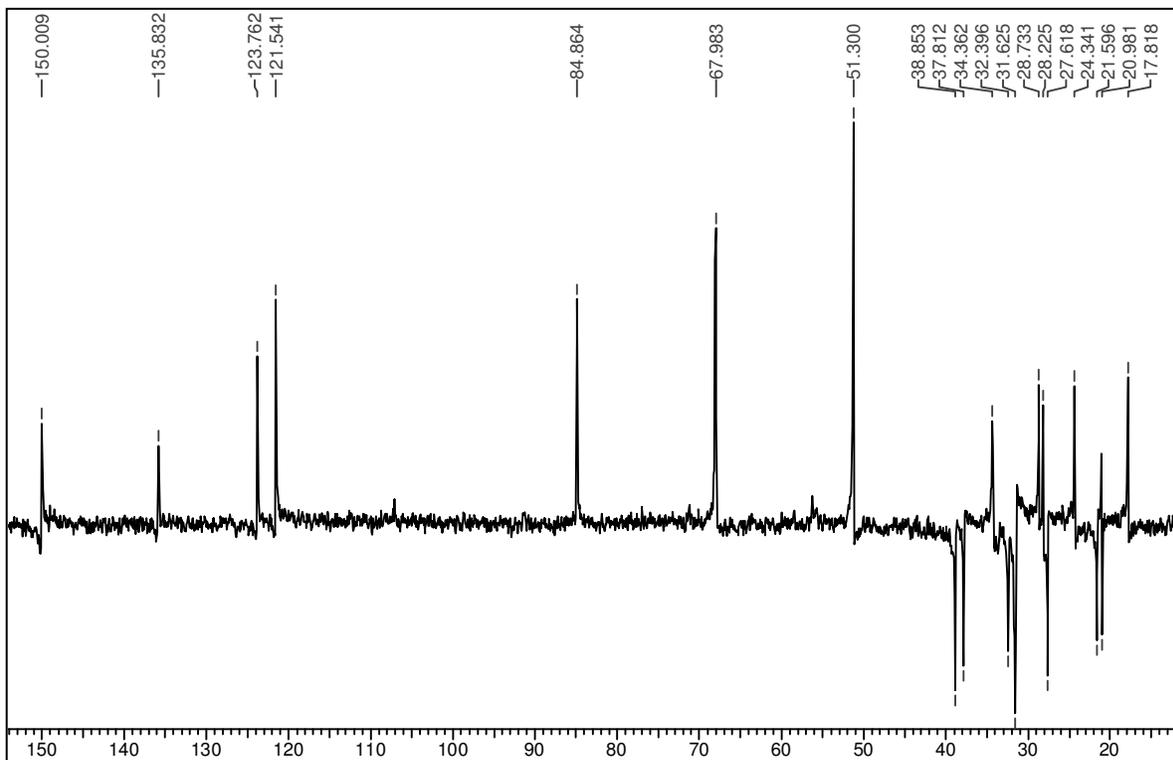


Figura 5-96- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII

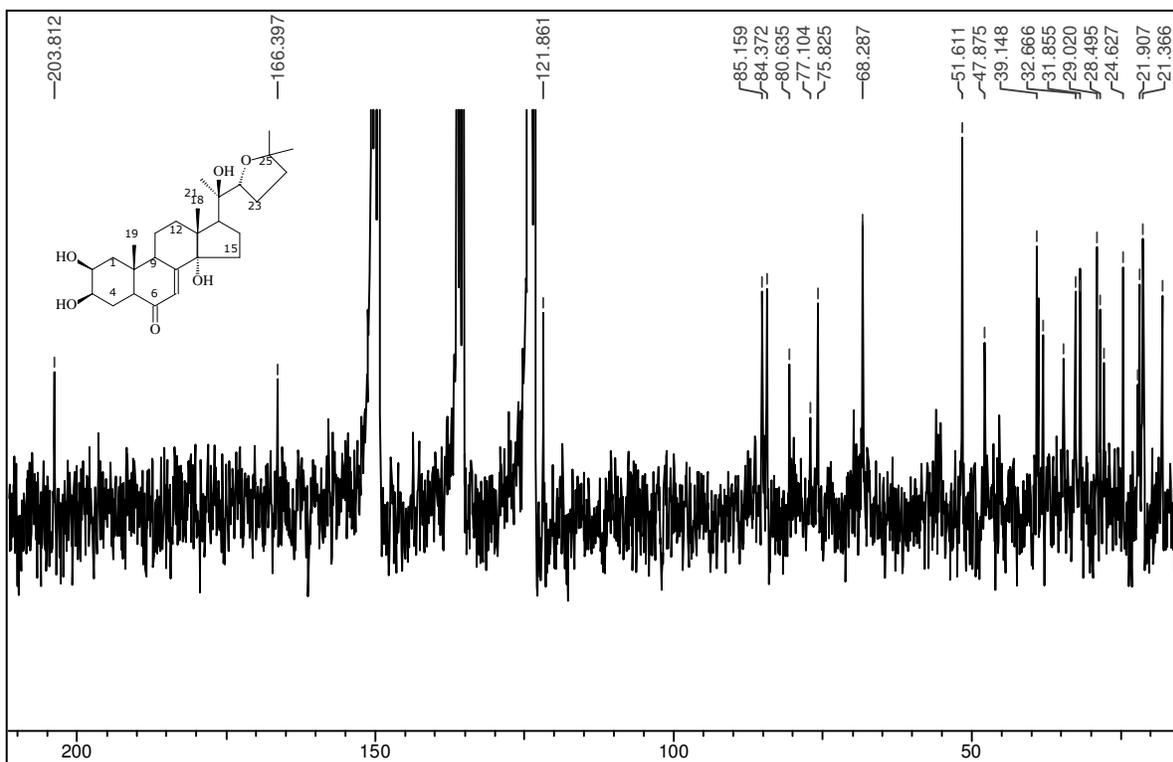


Figura 5-97- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII

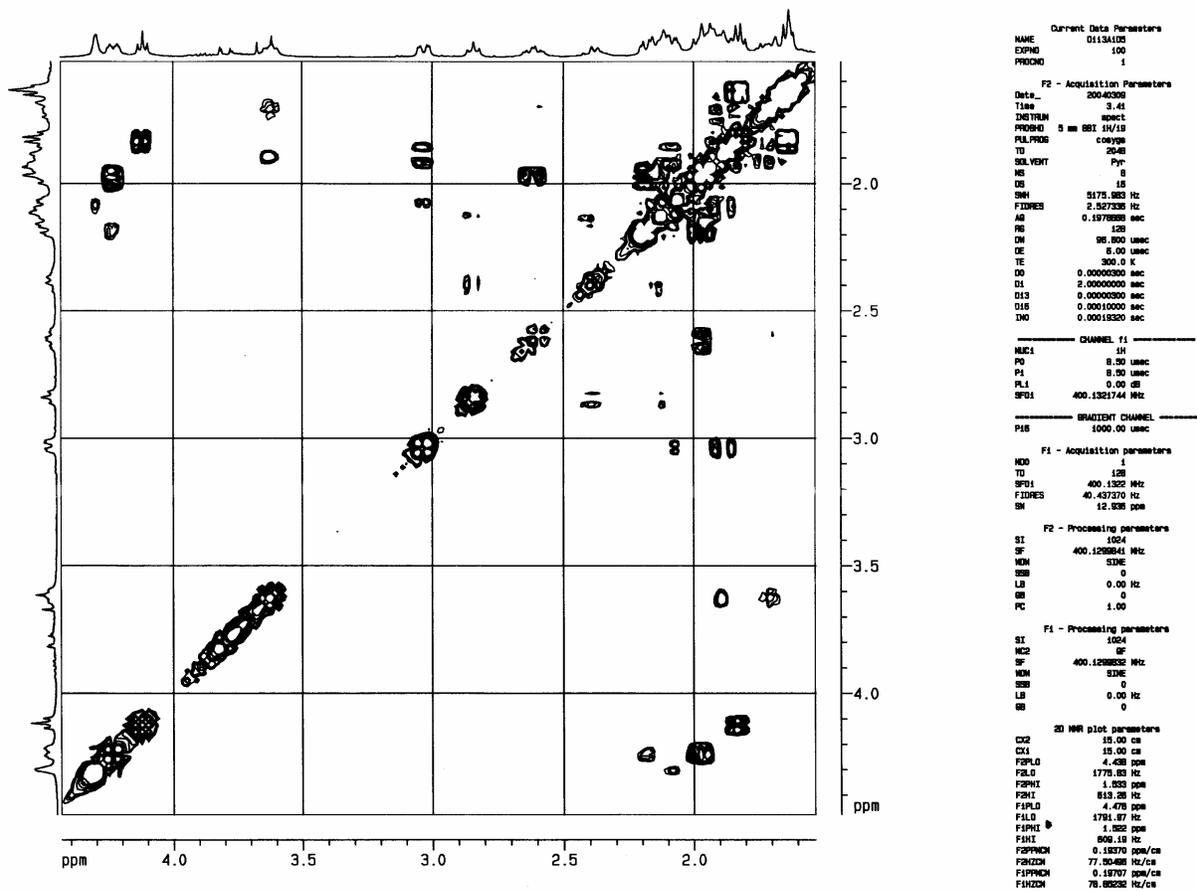


Figura 5-98- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII

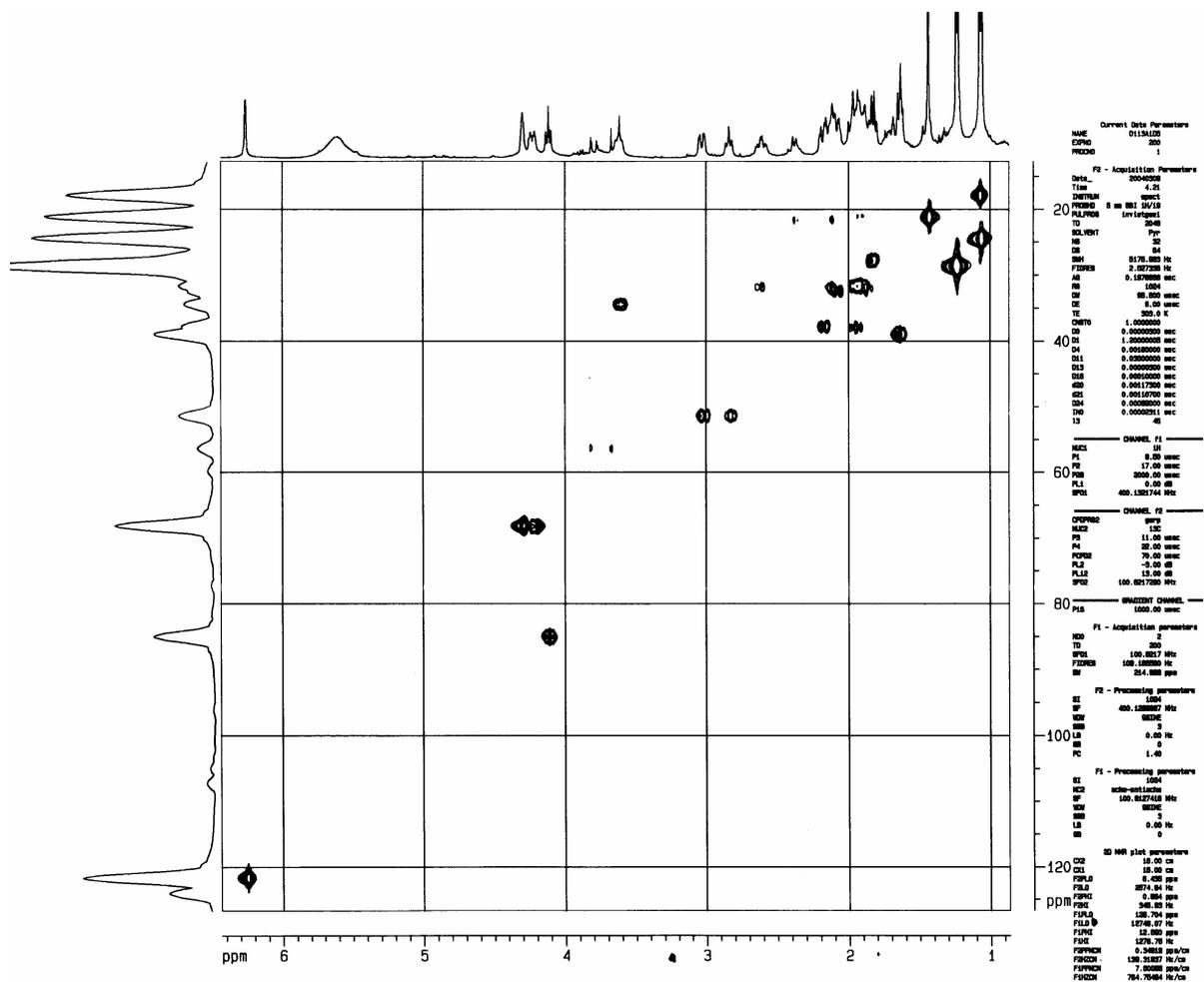


Figura 5-99- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII

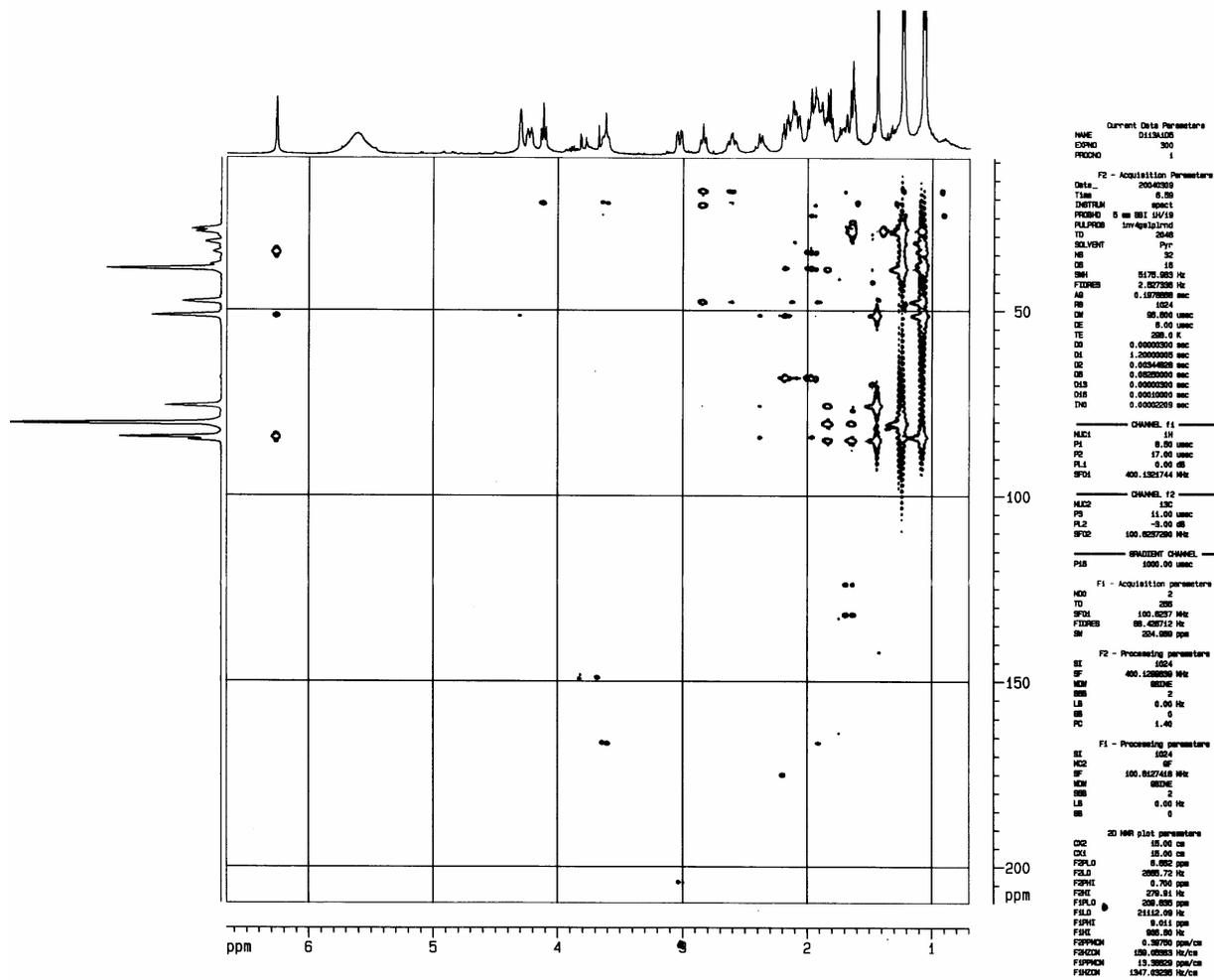


Figura 5-100- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XXXVIII

6. Estudo fitoquímico de *S. densiflora* Berg - Experimental

6.1. Preparação dos extratos brutos

Para a preparação destes, as respectivas partes vegetais coletadas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar entre 45-55°C e pulverizadas em moinho elétrico tipo Willey. As partes pulverizadas foram extraídas com hexano, metanol e solução MeOH/H₂O destilada 1:1. A extração com hexano e MeOH foi realizada durante 12 dias (trocando o solvente de 6 em 6 dias) à temperatura ambiente e em repouso para cada solvente, sendo os extratos filtrados e concentrados em rotaevaporador. Na extração hidroalcoólica, a 100 g da torta a ser extraída foram adicionados 200 mL da solução MeOH/H₂O 1:1. Essa mistura foi levada ao ultra som para agitação por 30 min e depois filtrada e concentrada em rotaevaporador, sendo essa operação repetida por 6 vezes. Após esse procedimento, o extrato aquoso obtido foi liofilizado. Os resultados se encontram na Tabela 6-1.

Tabela 6-1- Extratos brutos de *S. densiflora*

Material vegetal seco (kg)	Solvente	Massa de extrato obtida (g)	Código
Folhas (0,923)	hexano	8,2	HSF
	metanol	164,8	MSF
	MeOH/H ₂ O 1:1	22,1	HMSF
Caule (2,247)	hexano	0,9	HSC
	metanol	177,6	MSC
	MeOH/H ₂ O 1:1	5,5	HMSC
Galhos (1,288)	hexano	1,0	HSG
	metanol	131,1	MSG
	MeOH/H ₂ O 1:1	5,7	HMSG
Casca da raiz (0,4)	hexano	0,3	HSCr
	metanol	73,2	MSCr
	MeOH/H ₂ O 1:1	2,4	HMSCr

6.2. Fracionamento dos extratos brutos e frações de *S. densiflora*

6.2.1. Partição líquido/líquido do extrato metanólico do caule

60,7 g do extrato metanólico de caule foram dissolvidos em 400 mL de uma solução de MeOH/H₂O 1:1 e submetidos à partição líquido/líquido, sendo extraídos três vezes consecutivas, com 300 mL cada, com os solventes diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol na ordem crescente de polaridade. As frações obtidas e suas respectivas massas encontram-se na Tabela 6-2.

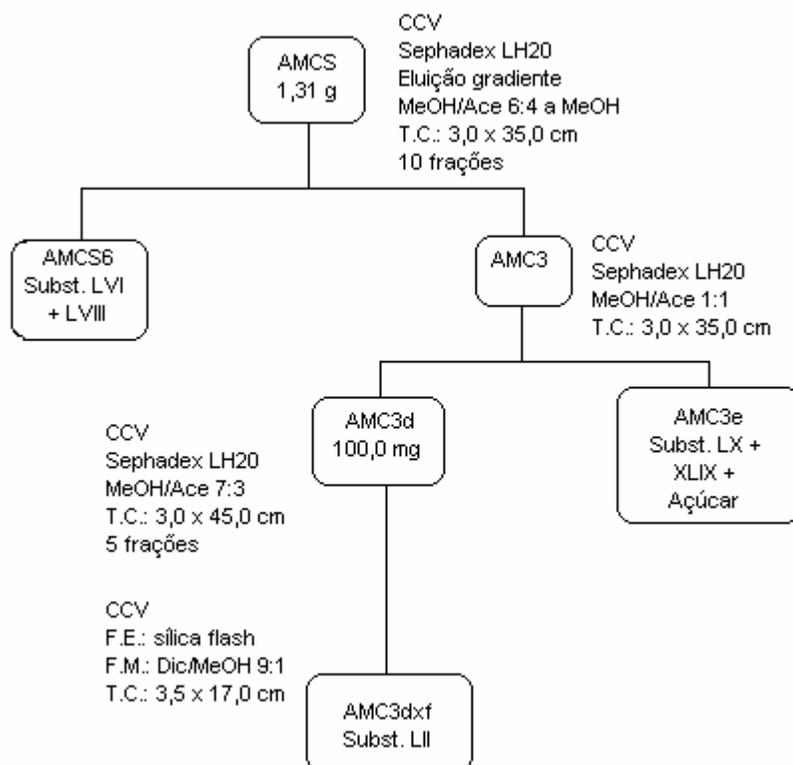
Tabela 6-2- Resultados da partição líquido/líquido do extrato metanólico do caule

Solvente	Código	Massa obtida g
diclorometano	DMCS	1,62
acetato de etila	AMCS	7,67
<i>n</i> -butanol	BMCS	12,7
água	AgMCS	35,4

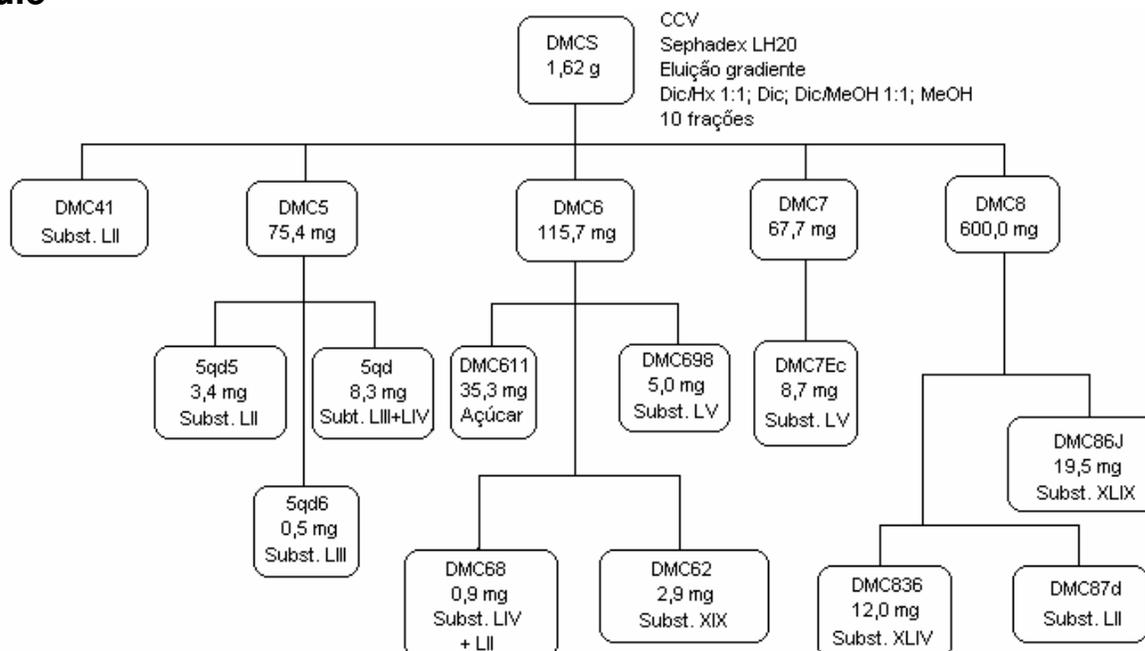
6.2.2. Fração em *n*-butanol do extrato metanólico de caule e obtenção das Substâncias LVIII e LXV

1,54 g da BMCS foram submetidos a CCV, usando-se Sephadex LH-20 (TC= 34,0 cm x 3,0 cm) e MeOH com eluente. Após reunião das alíquotas semelhantes foram obtidas 20 frações. A fração BMCI, 118,2 mg, foi identificada como a castalagina (Substância LVIII) e a fração BMCj, 66,7 mg, como a β -pedunculagina (Substância LXV).

6.2.3. Fração em acetato de etila do extrato metanólico de caule



6.2.4. Fração em diclorometano do extrato metanólico de caule



6.2.4.1. Obtenção das Substâncias LIII e LIV em mistura e da Substância LII

75,4 mg da fração DMC5 (Fluxograma sessão 6.2.4) foram submetidos a CCV (T.C. 2,0 x 45,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas cinco frações. A fração DMC5q, 25,9 mg, foi submetida a CCD preparativa, placa 20,0 x 20,0 cm, usando-se Dic como eluente e fazendo-se quatro eluições consecutivas na mesma placa. Foram obtidas sete frações. A fração 5qd, 8,3 mg, foi identificada, por RMN ¹H, como uma mistura do 2,4,6-trimetoxibenzaldeído e do *trans*-2,4,6-trimetoxifenilpropenaldeído (Substâncias LIII e LIV). Parte desta fração foi submetida novamente a CCD preparativa, placa 20,0 x 20,0 cm, usando-se Dic: Ace 9:1 como eluente e fazendo-se uma eluição. Foram obtidas sete frações. A fração 5qd5, 3,4 mg, foi identificada como o ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico (Substância LII), um artefato proveniente da oxidação da Substância LIII, já que ele não havia sido detectado, por RMN ¹H e espectrometria de massas, na fração de origem. A fração 5qd6, 0,5 mg, foi identificada como a substância LIII pura.

6.2.4.2. Obtenção das Substâncias XIX e LV

A fração DMC6, 115,7 mg (Fluxograma sessão 6.2.4), foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 23,0 cm) usando-se como F.E. sílica flash e F.M. inicial Dic, Dic/AcOEt a MeOH. Foram obtidas 55 frações. A fração DMC62 foi identificada como o ácido vanílico (Substância XIX). A fração DMC68 como uma mistura das Substâncias LIV e LII. A fração DMC611 foi caracterizada como um açúcar. A fração DMC69, 10,4 mg, foi submetida a CCD preparativa, placa 20,0 x 20,0 cm, usando-se Dic como eluente e fazendo-se três eluições consecutivas na mesma placa. Foram obtidas seis frações. A fração DMC698, 5,0 mg, foi identificada como o 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (Substância LV).

A massa da fração DMC7 (Fluxograma sessão 6.2.4) foi dividida em duas e também submetida a CCD preparativa como a fração DMC69. Foram obtidos 8,7 mg da Substância LV.

6.2.4.3. Obtenção da Substância XLIV e XLIX

600,0 mg da fração DMC8 (Fluxograma sessão 6.2.4) foram submetidos a CCV (T.C. 3,0 x 28,0 cm) usando-se Sephadex LH20 como F.E. e eluição gradiente a partir de Dic, Dic/Ace a MeOH. Foram obtidas 16 frações. A fração DMC836, 12,0 mg, foi identificada como o ácido arjunólico (Substância XLIV). A fração DMC86, 51,9 mg, foi submetida a CCV (T.C. 2,0 x 23,0 cm) usando-se como F.E. sílica flash e F.M. inicial Dic, Dic/Ace a MeOH. Foram obtidas 11 frações. A fração DMC86J, 19,5 mg, foi caracterizada como o ácido gálico (Substância XLIX).

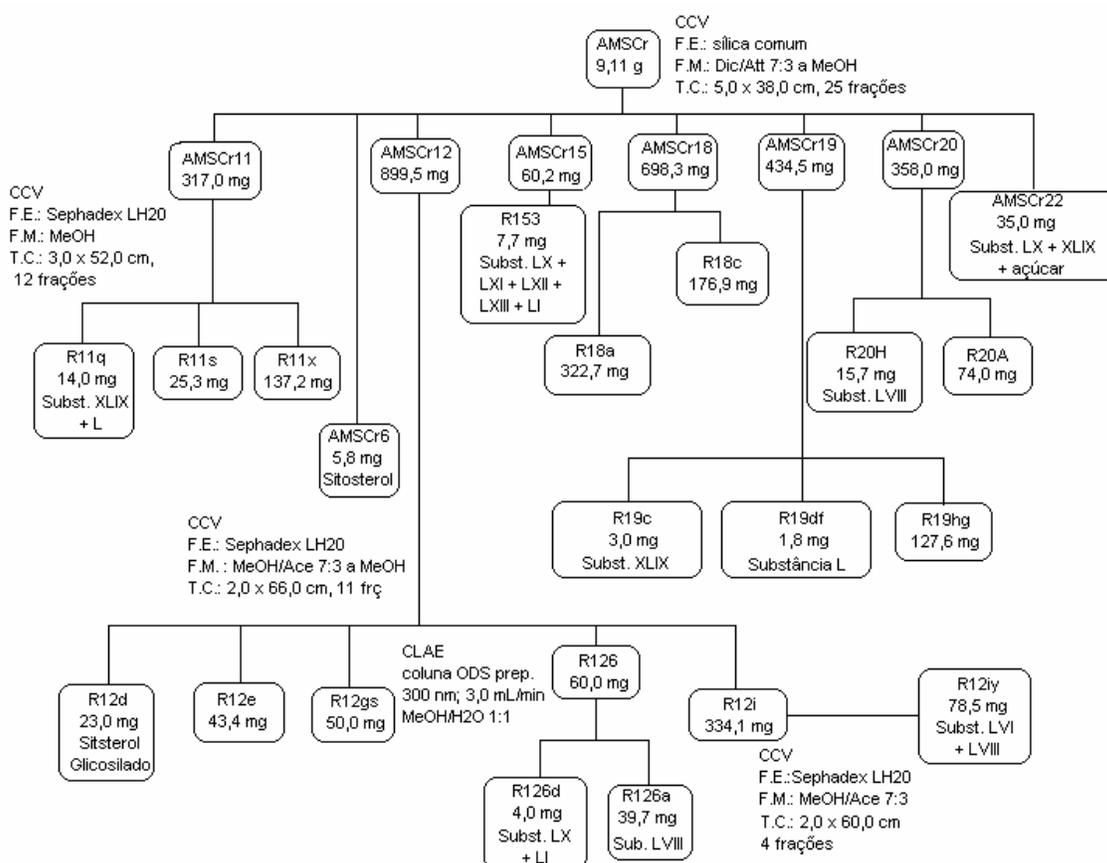
6.2.5. Partição líquido/líquido do extrato metanólico da casca da raiz

73,2 g do extrato metanólico de caule foram dissolvidos em 400 mL de uma solução de MeOH/H₂O 1:1 e submetidos à partição líquido/líquido, sendo extraídos três vezes consecutivas, com 300 mL cada, com os solventes diclorometano e acetato de etila na ordem crescente de polaridade. As frações obtidas e suas respectivas massas encontram-se na Tabela 6-3.

Tabela 6-3- Resultados da partição líquido/líquido do extrato metanólico da casca da raiz

Solvente	Código	Massa obtida g
diclorometano	DMSCr	0,9
acetato de etila	AMSCr	10,5
água	RMSCr	52,0

6.2.6. Fração em acetato de etila do extrato metanólico da casca da raiz



6.2.6.1. Obtenção das Substâncias L e XLIX

A fração R11s, 25,3 mg (Fluxograma sessão 6.2.6), foi submetida à CLAE reciclante, usando-se coluna preparativa com fase polimérica (PVA), λ 270 nm, eluente MeOH e fluxo de 2,0 mL/min. No segundo ciclo coletaram-se duas frações. A fração R11se2, 1,9 mg, foi identificada como o ácido síringico (L) e a fração R11se4, 10,0 mg, foi identificada como o ácido gálico (XLIX).

6.2.6.2. Obtenção da Substância LVI

A fração R11x, 137,2 mg (Fluxograma sessão 6.2.6), foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 6 frações. A fração SR11xe, 59,3 mg, foi identificada como casuarinina.

6.2.6.3. Obtenção das Substâncias LXVI, LXVII e LXIV

A fração SR12e, 43,4 mg (Fluxograma sessão 6.2.6), foi submetida a CCV (T.C. 2,0 x 60,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 8 frações. A fração SR12e3, 8,7 mg, foi identificada como a ramnose (LXVI); a fração R12e4, 4,0 mg, como a γ -lactona do ácido 3,4,5,6-tetraidroxihexanóico (LXVII). A fração R12e6, 10,9 mg, foi identificada como o ácido 4'-O- β -D-glucopiranosil-3',5'-dimetoxifenil-[1',4]-dioxinil-2-hidroxigálico (LXIV) ou siphoneugenina.

6.2.6.4. Obtenção da Substância LX

A fração SR12gs (Fluxograma sessão 6.2.6) foi submetida a CLAE, usando-se coluna preparativa com fase ODS/C18, λ 375 nm, eluente MeOH/água 6:4 e fluxo de 2,5 mL/min. Foram obtidas 7 frações. A fração R12gs4, 10,0 mg, foi identificada como o 4-O- α -L-raminopiranosídeo do ácido elágico.

6.2.6.5. Obtenção da Substância LI

A fração AMSCr18 (Fluxograma sessão 6.2.6), 698,3 mg, foi submetida a CCV (T.C. 4,0 x 67,0 cm) usando-se como F.E. XAD-7 e F.M. MeOH. Foram obtidas 45 frações. A fração R18a, 322,7 mg, foi subdividida em várias partes e submetida a CLAE reciclante, usando-se coluna com fase polimérica preparativa, λ 270 e 330 nm, eluente MeOH e fluxo de 2,0 mL/min. Reunidas as frações semelhantes, a fração R18a2, 109,4 mg, foi identificada como o ácido elágico (LI). A fração R18c (Fluxograma sessão 6.2.6), 38,2 mg, foi submetida a CLAE, usando-se coluna preparativa com fase ODS; fluxo de 3,0 mL/min; 280 nm; H₂O/MeOH 7:3 como eluente. Não houve separação da mistura das substâncias LI, LX, LXI, LXII e LXIII, fração denominada R18cB, 5,0 mg.

6.2.6.6. Obtenção das Substâncias LVIII e LIX em mistura e LVI e LVII em mistura

A fração AMSCr19, 434,5 mg (Fluxograma sessão 6.2.6), foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram

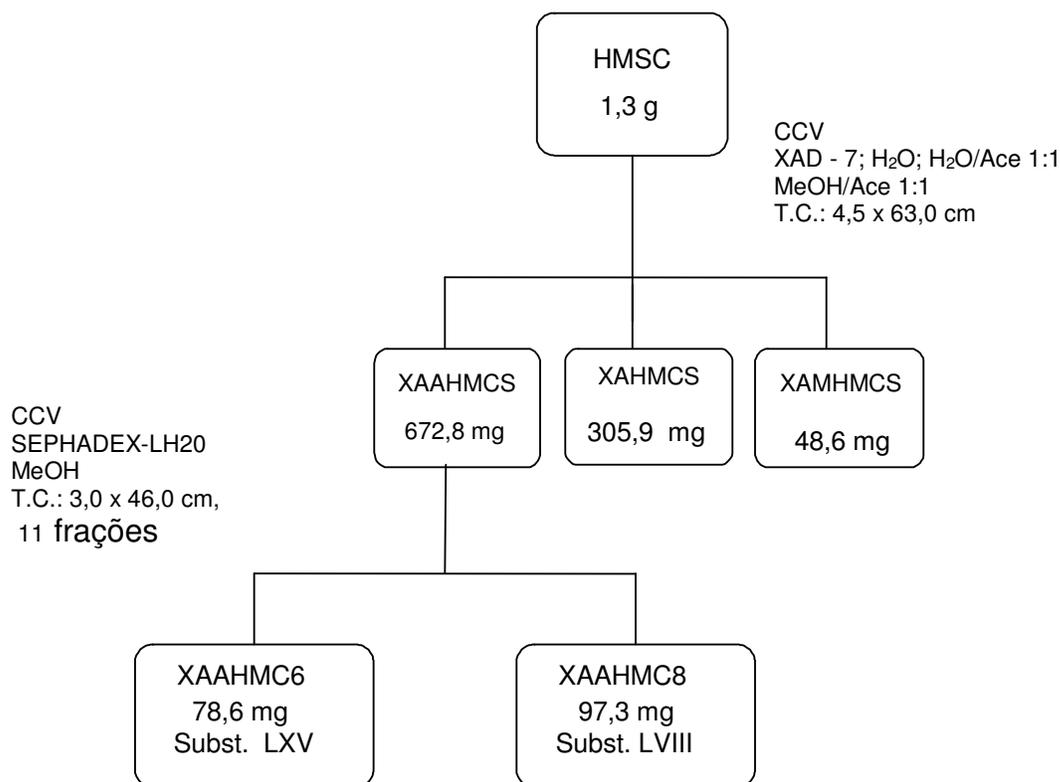
obtidas 7 frações. A fração R19h, 127,6 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 52,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 10 frações. A fração R19hg, 31,0 mg, foi identificada como a castalagina (LVIII), que, após ficar uma semana dissolvida em MeOH deuterado dentro do tubo de análise de RMN, se transformou numa mistura contendo as Substâncias LIX e LXVIII como artefatos. A fração R19hj, 19,6 mg, foi identificada como a casuarinina (LVI) que, sob as mesmas condições anteriores, formou uma mistura com a stachyurina (LVII) como artefato.

6.2.6.7. Obtenção das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII em mistura

A fração AMSCr20, 358,0 mg (Fluxograma sessão 6.2.6), foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 31,0 cm) usando-se como F.E. Sephadex LH20 e F.M. MeOH. Foram obtidas 8 frações. A fração R20H, 15,7 mg, foi identificada como a Substância LVIII. A fração R20A, 74,0 mg, foi submetida a CLAE, usando-se coluna preparativa com fase ODS/C18, λ 300 nm, eluente MeOH/água 7:3 e fluxo de 2,0 mL/min. Foram obtidas 5 frações. A fração R20A5, 8,2 mg, foi identificada uma mistura de taninos acetilados derivados do 4-O- α -L-raminopiranosídeo do ácido elágico.

A fração AMSCr15 (Fluxograma sessão 6.2.6) também teve uma parte, 20,0 mg, submetida a CLAE nas mesmas condições acima especificadas, originando uma subfração, R153, contendo a mesma mistura.

6.2.7. Extrato hidrometanólico do caule



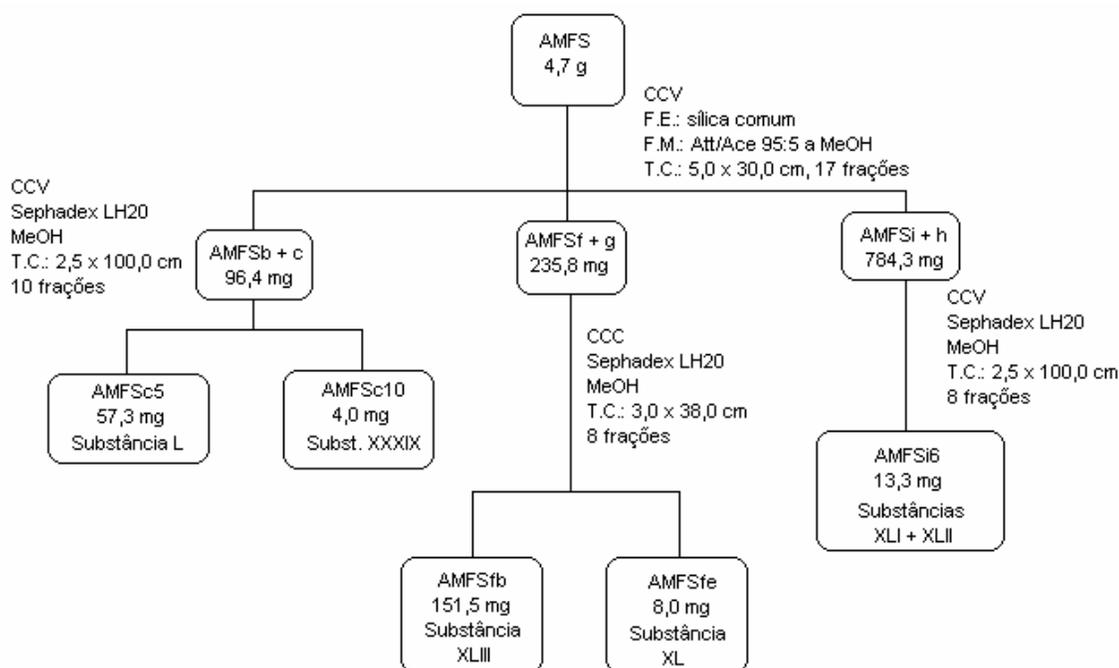
6.2.8. Partição líquido/líquido do extrato metanólico de folhas

70,0 g do extrato metanólico de folhas foram dissolvidos em 400 mL de uma solução de H₂O/MeOH 1:1 e submetidos à partição líquido-líquido, sendo extraídos três vezes consecutivas, com 300 mL de cada um dos seguintes solventes: diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, na ordem crescente de polaridade, obtendo-se as frações determinadas na tabela 6-4.

Tabela 6-4- Resultado da partição líquido/líquido do extrato metanólico de folhas

Solvente	Código	Massa obtida g
diclorometano	DMFS	9,5
acetato de etila	AMFS	14,6
<i>n</i> -butanol	BMFS	12,0
água	AgMFS	12,5

6.2.9. Fração em acetato de etila do extrato metanólico de folhas



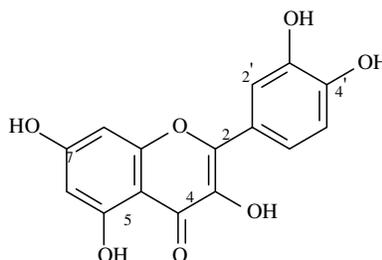
6.2.10. Fração em diclorometano do extrato metanólico de folhas e obtenção das Substâncias XLV, XLVI e XLVII em mistura

A partição DMFS, 9,2 g, foi submetida a CCV (T.C. 5,5 x 30,0 cm) usando-se como F.E. sílica comum, e sobre a mesma 5,0 cm de florisil, e F.M. inicial Hx até MeOH. Após reunidas as frações semelhantes, foram obtidas 17 frações. A fração DMFg, 381,8 mg, foi submetida a CCV (T.C. 3,0 x 25,0 cm) usando-se como F.E. sílica flash e F.M. inicial Dic/Ace 1:1 até MeOH. Após reunidas as frações semelhantes, foram obtidas 18 frações. A fração DMFg7, 32,5 mg, foi identificada como uma mistura dos triterpenos α -amirina, β -amirina e lupeol.

7. Estudo Fitoquímico de *S. densiflora* Berg – Resultados e Discussões

7.1. Identificação da Substância XXXIX

quercetina



O extrato metanólico de folhas de *S. densiflora*, partição acetato de etila, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu a fração AMFSc10, 4,0 mg, sob a forma de pó amarelo brilhante amorfo.

A análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6 , Figura 7-1) mostrou sinais característicos de um flavonol com um sistema de substituição 3',4' no anel B: um sinal em δ 7,82 (d, 2,0 Hz, H-2'), um sinal em δ 7,70 (dd, 8,0 e 2,0 Hz, H-6'), um sinal em δ 7,00 (d, 8,0 Hz, H-5'); um sinal em δ 12,17 (s, OH quelada na posição C-5); dois sinais característicos de um sistema de acoplamento AB no anel A, correspondentes a 2H que mantêm uma relação meta entre si, em δ 6,52 (d, 2,0 Hz, H-8) e o outro em δ 6,26 (d, 2,0 Hz, H-6).

Baseados nos dados acima e dados da literatura, foi proposta a estrutura da quercetina (AGRAWAL, 1989).

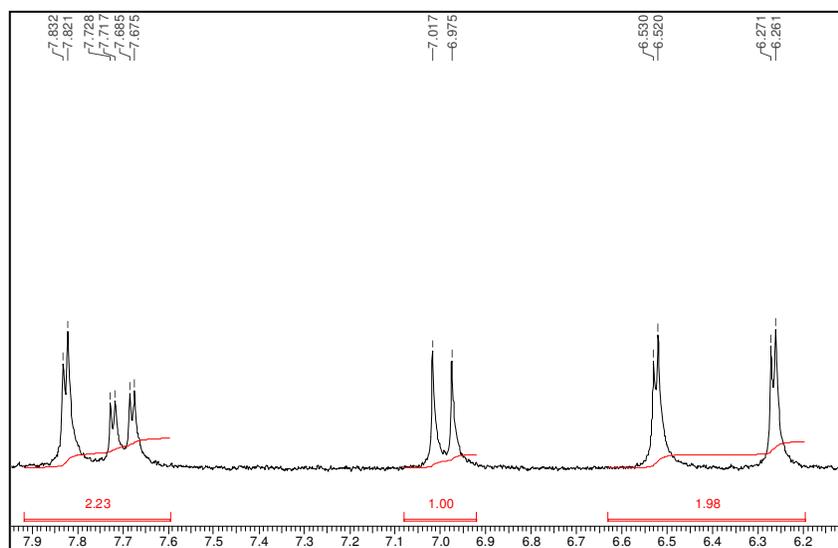
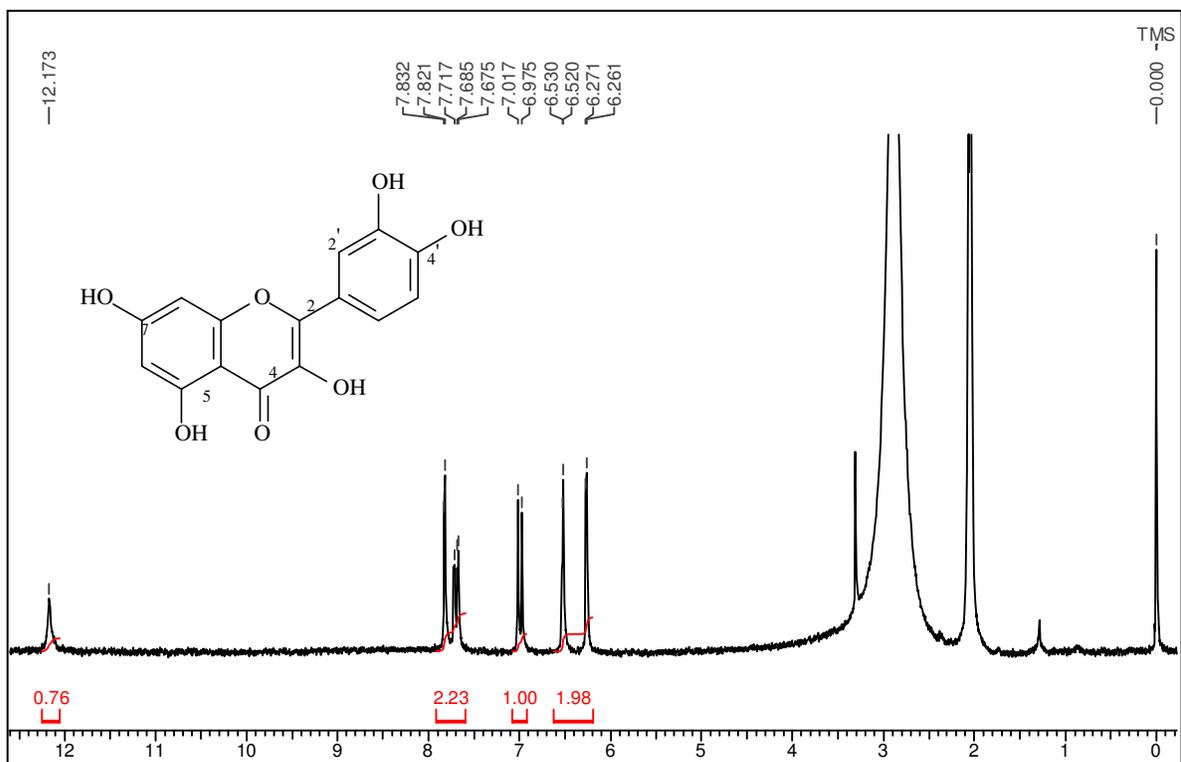
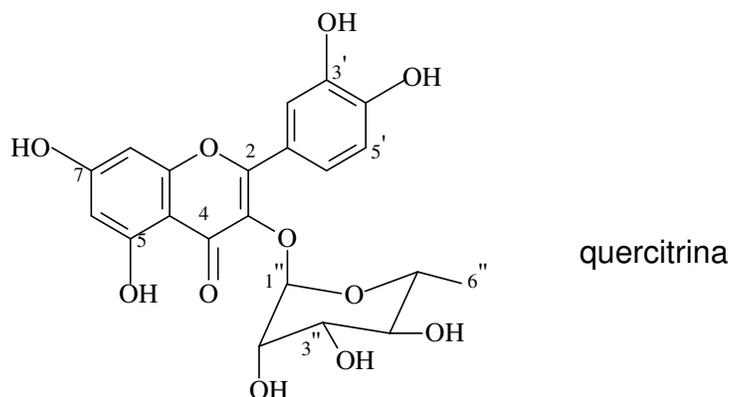


Figura 7-1- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância XXXIX

7.2. Identificação da Substância XL



O extrato metanólico de folhas de *S. densiflora*, partição acetato de etila, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu a fração AMFSfe, 8,0 mg, sob a forma de sólido amarelo brilhante.

A análise do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz, Figura 7-6) revelou que a amostra era um flavonol glicosilado com um sistema de substituição 3',4' no anel B: um sinal em δ 7,33 (d, 2,1 Hz H-2'), um sinal em δ 7,31 (dd, 8,3 e 2,1 Hz, H-6'), um sinal em δ 6,91 (d, 8,3 Hz, H-5'); dois sinais característicos de um sistema de acoplamento AB no anel A, correspondentes a 2H que mantêm uma relação meta entre si, em δ 6,36 (d, 2,1 HZ, H-8) e o outro em δ 6,19 (d, 2,1 HZ, H-6); sinais que indicavam a presença de açúcar em δ 5,34 (d; 1,5 Hz; H-1''), confirmando a ligação de configuração α do açúcar à aglicona), sinal em δ 4,21 (dd; 3,3 e 1,7 Hz; H-2''); um sinal em δ 3,75 (dd, 3,3 e 9,3, H-3''); um sinal em δ 3,41 (m, H-5''); um sinal em δ 3,35 (d, 9,4 Hz, H-4'') e um sinal em δ 0,93 (d, 6,1 Hz) caracterizando o grupo metila do açúcar ramnose.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, CD_3OD ; Figura 7-2; Figura 7-3; Tabela 7-1) revelou um sinal para carbonila quelada de flavonol em δ 180,0; vários sinais entre δ 166,5 a 95,2 pertencentes à aglicona; os sinais referentes aos carbonos carbinólicos entre δ 73,7 a 72,3 e o sinal em δ 18,1 confirmou a presença da molécula de ramnose.

O espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 7-5), revelou um pico relativo ao íon pseudo molecular a m/z 447 $[\text{M}-\text{H}]^-$, referente a uma fórmula molecular com $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$.

As correlações obtidas pelo espectro de HMBC (Figura 7-4) entre o H anomérico, δ 5,34, e o C-3, δ 136,6, indicaram a localização da ligação do açúcar à aglicona no C-3.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e na comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; Tabela 7-1), a estrutura da 3-O- α -L-ramnopiranosilquercetina ou quercitrina foi proposta.

Tabela 7-1- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da Substância XL e da 3-O- α -L-ramnopiranosilquercetina

C (MULTIPLICIDADE)	SUBSTANCIA XL	3-O- α -L- RAMNOPIRANOSIL QUERCETINA ^a
2 (s)	158,9	156,4
3 (s)	136,6	134,4
4 (s)	180,0	177,7
5 (s)	163,6	161,2
6 (d)	100,3	98,6
7 (s)	166,5	164,0
8 (d)	95,2	93,5
9 (s)	159,7	157,0
10 (s)	106,3	104,2
1' (s)	123,4	121,0
2' (d)	116,8	115,4
3' (s)	146,8	145,1
4' (s)	150,2	148,3
5' (d)	117,4	115,8
6' (d)	123,3	121,0
1'' (d)	103,9	101,9
2'' (d)	72,5	70,4
3'' (d)	72,6	70,6
4'' (d)	73,7	71,5
5'' (d)	72,3	70,1
6'' (q)	18,1	17,3

^a (DMSO- d_6 ; AGRAWAL, 1989)

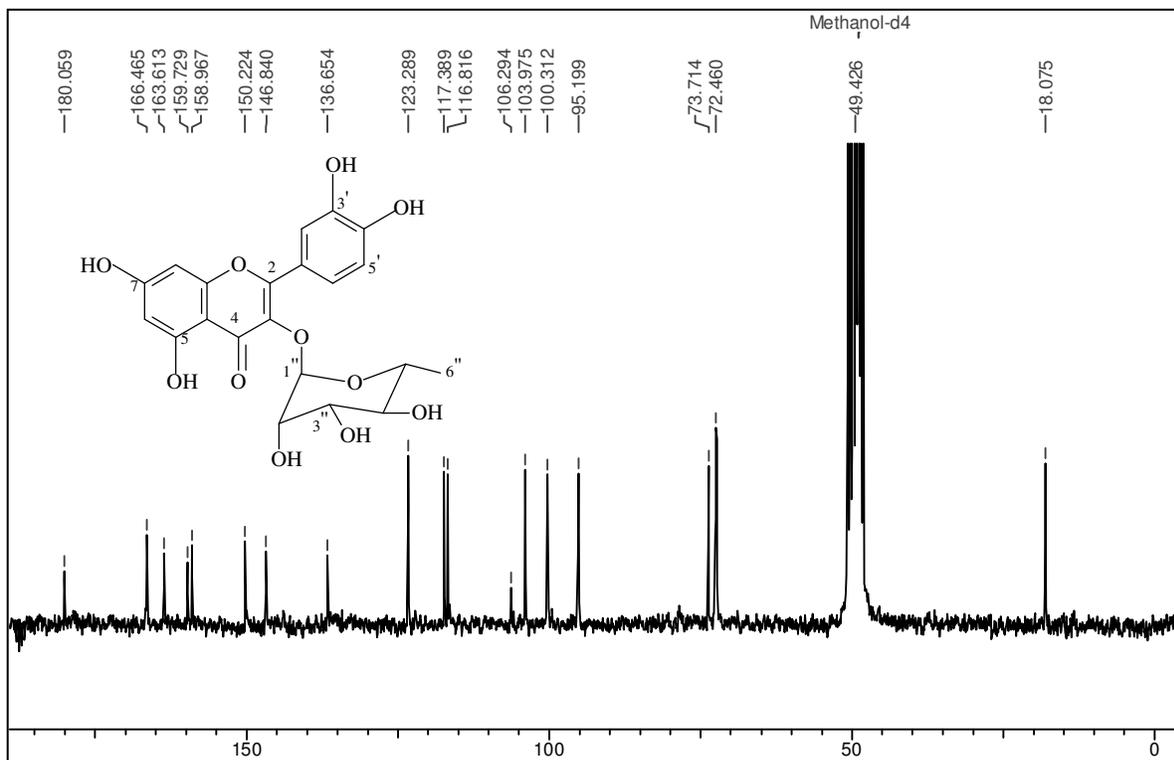


Figura 7-2- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da Substância XL

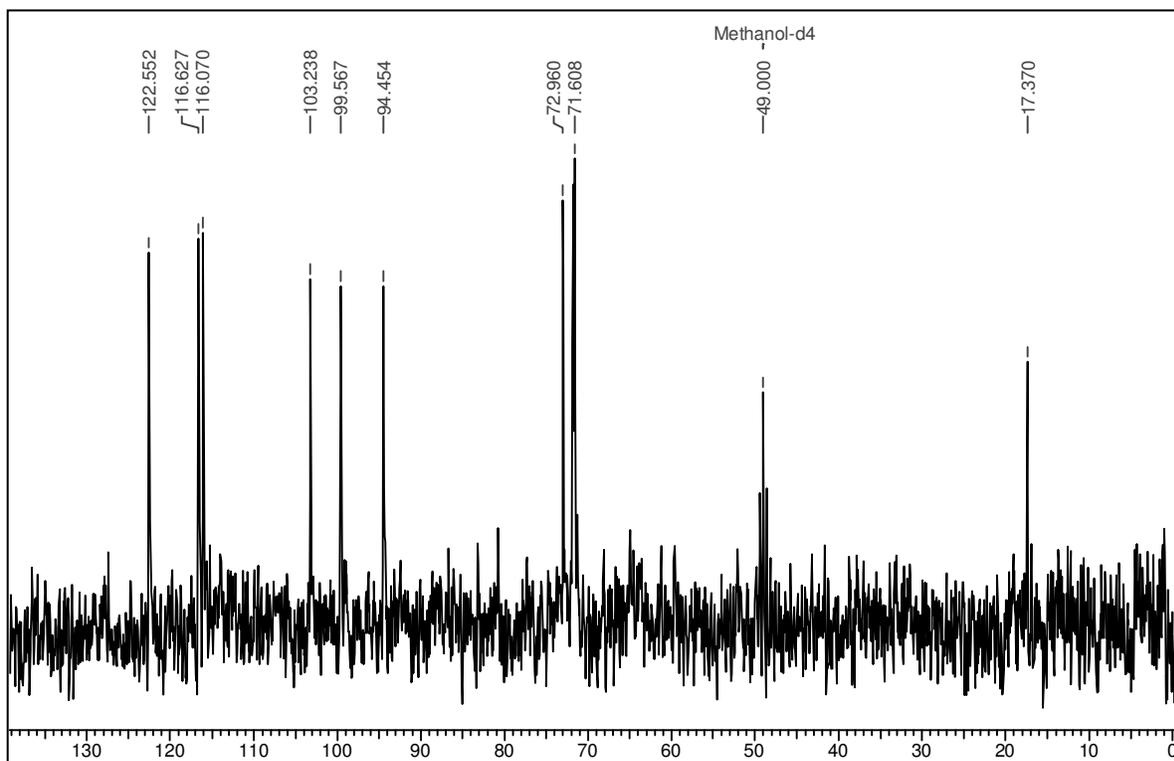


Figura 7-3- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, CD_3OD) da Substância XL

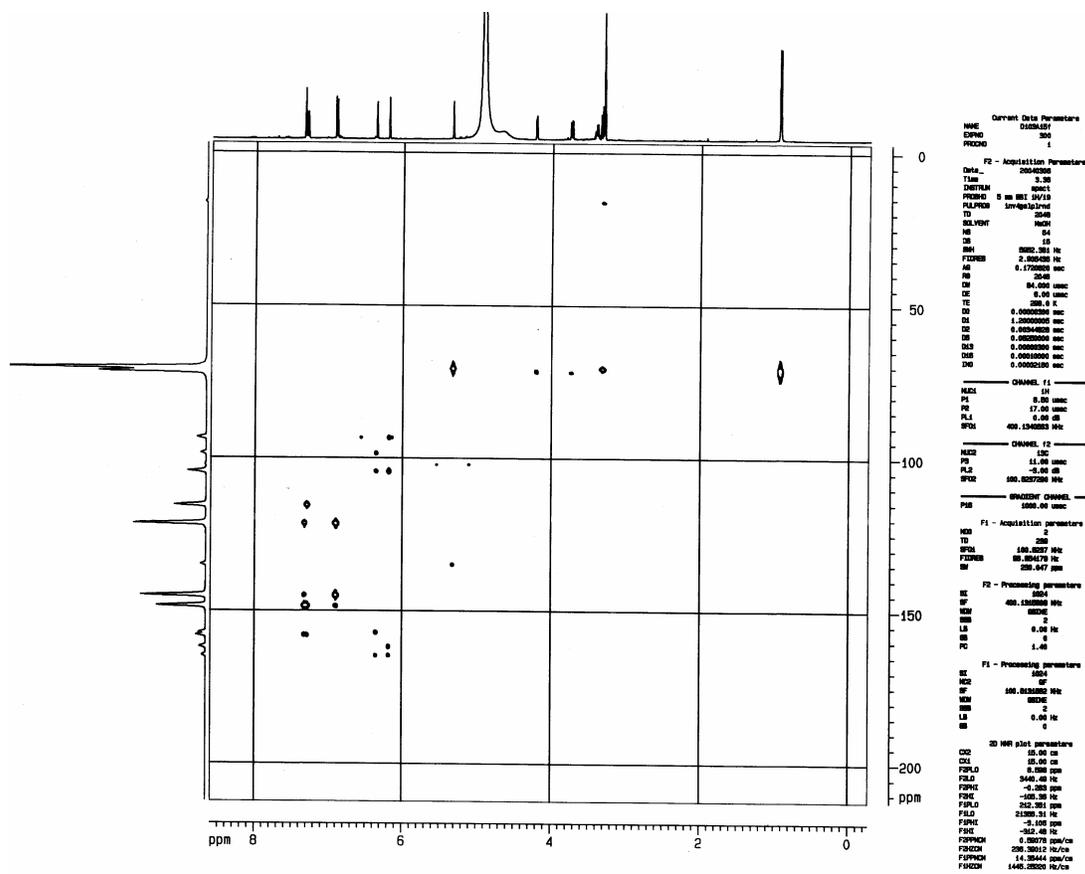


Figura 7-4- Espectro de $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da Substância XL

20/05/04

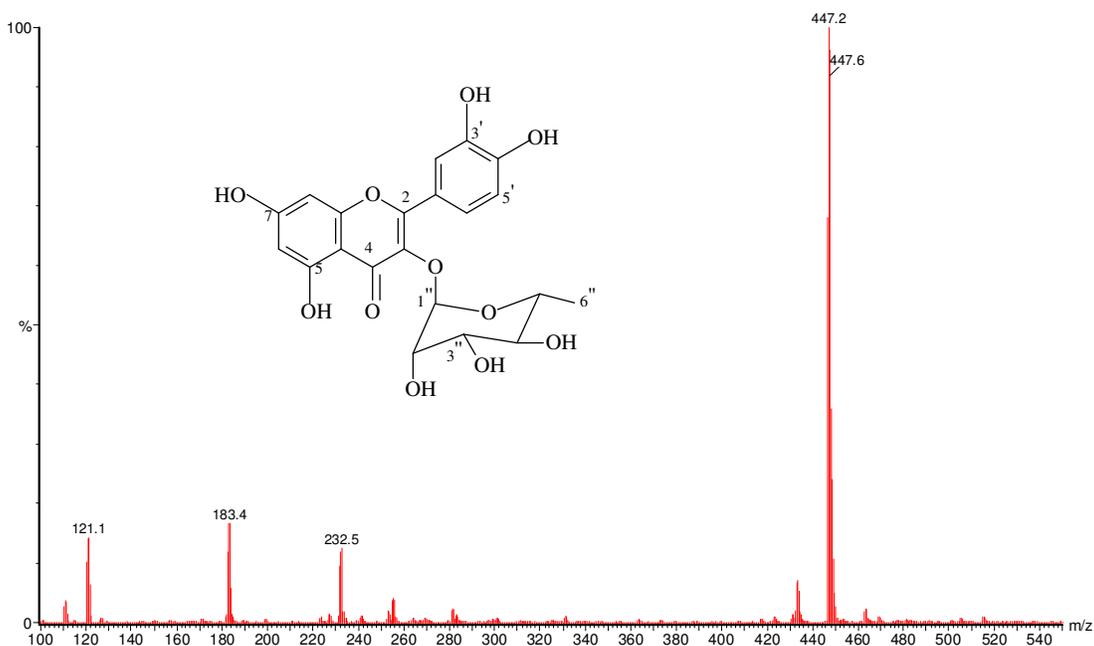


Figura 7-5- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XL

```

Current Data Parameters
NAME      D103A15f
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20040306
Time     3.30
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm BBI 1H/19
PULPROG  zg
TD        65536
SOLVENT  MeOH
NS        16
DS        0
SMH      5992.381 Hz
FIDRES   0.090826 Hz
AQ        5.5050740 sec
RG        40.3
DM        84.000 usec
DE        6.00 usec
TE        298.0 K
D1        1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        8.50 usec
PL1       0.00 dB
SFO1      400.1340663 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        400.1315840 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.10 Hz
GB        0
PC        1.00

1D NMR plot parameters
CX        20.00 cm
F1P       10.041 ppm
F1        4017.91 Hz
F2P       -0.184 ppm
F2        -73.73 Hz
PPM1CM   0.51129 ppm/cm
HZCM     204.58182 Hz/cm

```

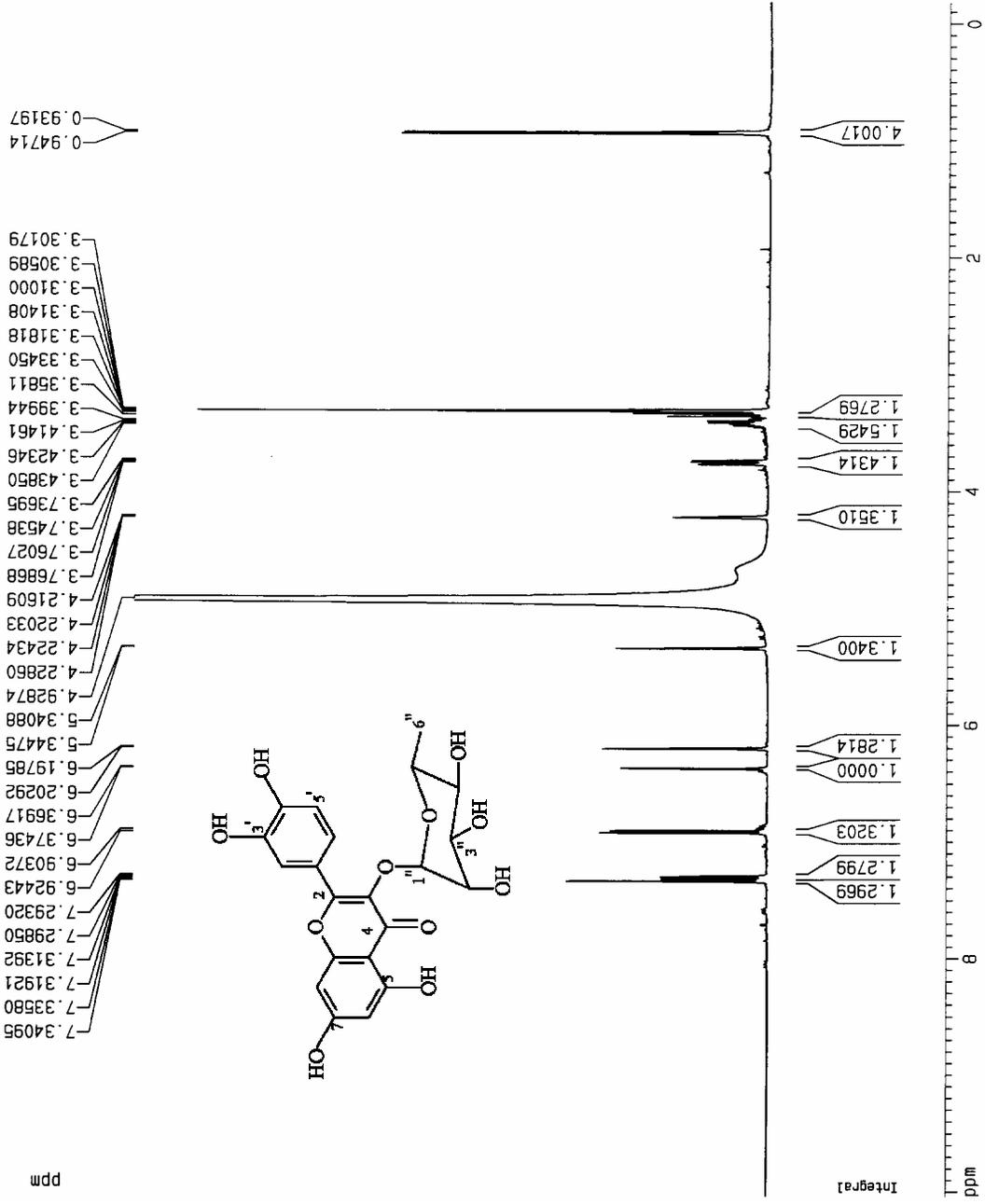
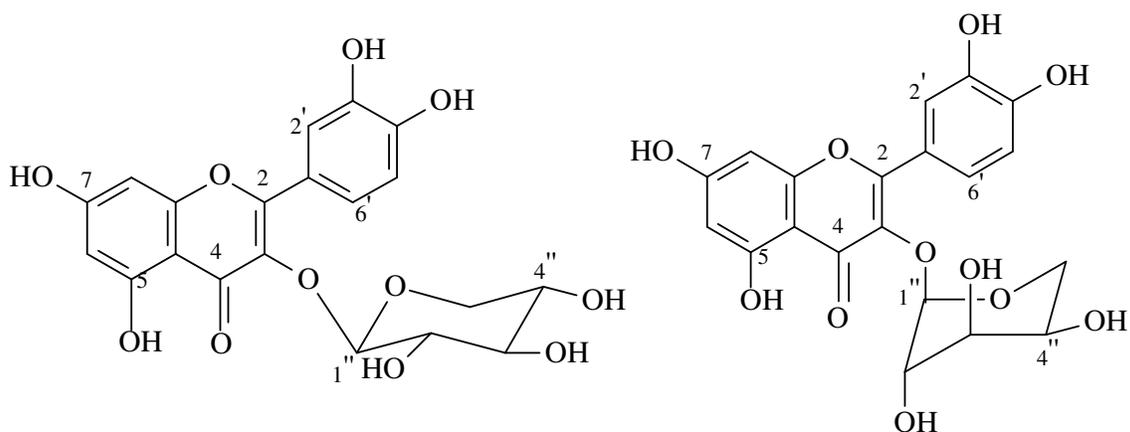


Figura 7-6- Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) da Substância XL

7.3. Identificação das Substâncias XLI e XLII em mistura



3-O-β-D-xilopiranosilquercetina

3-O-α-L-arabinopiranosilquercetina
ou guaijaverina

O extrato metanólico de folhas de *S. densiflora*, partição acetato de etila, após sofrer várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu a fração AMFSi6, 13,3 mg, sob a forma de sólido amarelo brilhante.

A análise do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz, Figura 7-11) revelou que a amostra era uma mistura de dois flavonóis glicosilados com um sistema de substituição 3',4' no anel B: um sinal em δ 7,74 (d, 2,2 Hz, H-2'), um sinal em δ 7,58 (m), um sinal em δ 6,86 (d, 8,5 Hz, H-5') e outro em δ 6,85 (d, 8,4 Hz, H-5'); dois sinais característicos de um sistema de acoplamento AB no anel A, correspondentes a 2H que mantêm uma relação meta entre si, em δ 6,38 (d, 2,1 Hz, H-8) e o outro em δ 6,19 (d, 2,0 Hz, H-6). Também revelou sinais que indicavam a presença de açúcar em ambos flavonóis em δ 5,17 (d; 7,2 Hz; H-1''), confirmando a ligação de configuração β do açúcar à aglicona) e δ 5,14 (d; 6,6 Hz; H-1''), ligação em configuração α , além de vários sinais referentes a H carbinólicos em δ 3,89 (dd, 6,6 e 8,4 Hz); em δ 3,82 (m); em δ 3,77 (dd, 5,2 e 11,6 Hz); em δ 3,64 (dd, 3,1 e 8,4 Hz); 3,51 (dd, 7,4 e 8,7 Hz); em δ 3,43 (dd, 3,1 e 11,6 Hz); em δ 3,39 (t, 8,7 Hz); em δ 3,10 (d, 11,5 Hz) e em δ 3,75 (d, 11,6 Hz).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, CD_3OD , Figura 7-8, Figura 7-9) revelou um sinal para carbonila de flavonol em δ 179,7; vários sinais entre δ 166,9 a 95,2 pertencentes às agliconas, sendo alguns duplicados, o que também corroborou com a hipótese de uma mistura. O sinal em δ 104,9, relativo ao C

anomérico, juntamente com os sinais referentes aos carbonos carbinólicos entre δ 77,8 a 67,2, também duplicados e em número de oito, sendo dois metilênicos e seis oximetínicos, confirmaram ser os açúcares do tipo pentoses.

O espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 7-10) revelou um pico relativo ao íon pseudo molecular a m/z 433 $[M-H]^-$, pertencente, pois, a dois isômeros com uma fórmula molecular de $C_{20}H_{18}O_{11}$.

Através das correlações observadas no espectro de HMBC (400 MHz, CD_3OD , Figura 7-7) entre os H anoméricos em δ 5,17 e 5,14 com o carbono em δ 135,9, foi possível determinar o local da ligação dos açúcares no C-3 da aglicona.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e na comparação com dados da literatura (PLAZA et al., 2003; AGRAWAL, 1989; Tabelas 7-2 e 7-3), as estruturas da 3-O- β -D-xilopiranosilquercetina e 3-O- α -L-arabinopiranosilquercetina foram propostas.

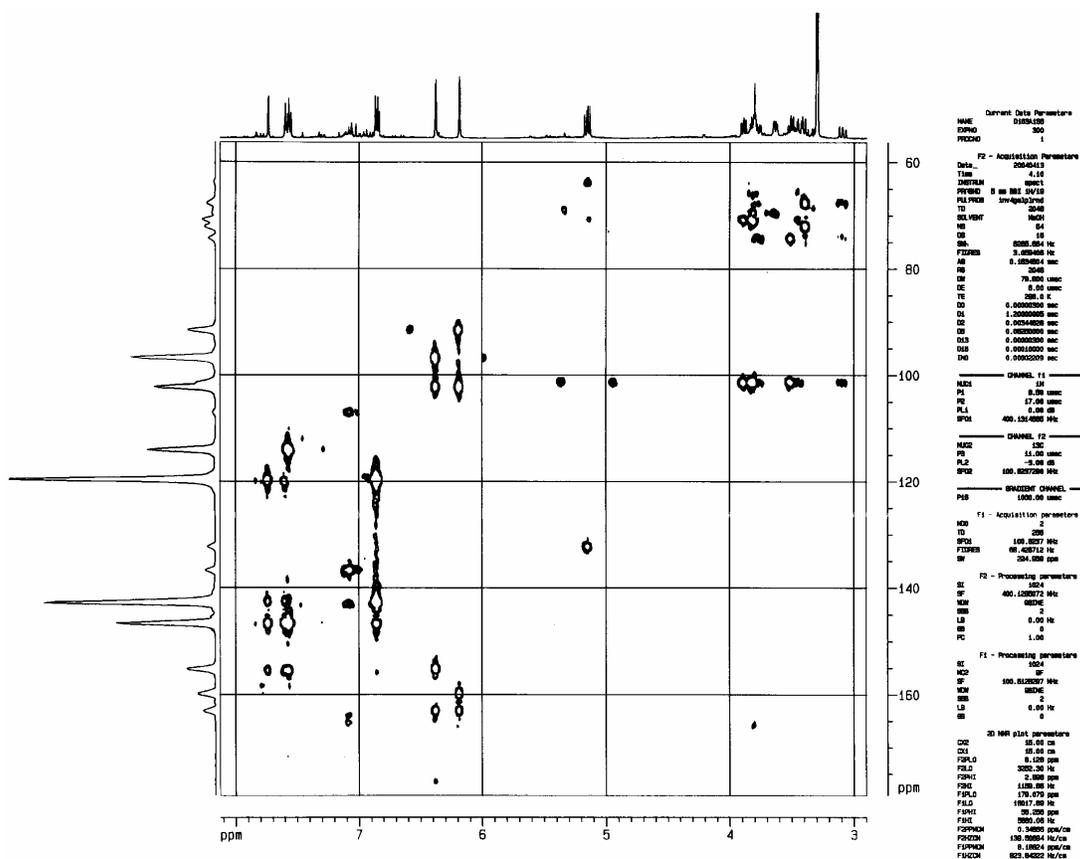


Figura 7-7- Espectro de $^1H^{13}C$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII

Tabela 7-2- Dados do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII e de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) e ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) dos grupos $\alpha\text{-L-arabinopiranosila}$ e $\beta\text{-D-xilopiranosila}$ ^a

Posição	^1H Substância XLI	^1H (δ em ppm, J em Hz) xilopiranosila	^{13}C xilopiranosila	^1H Substância XLII	^1H (δ em ppm, J em Hz) arabinopiranosila	^{13}C arabino- piranosila
1''	5,17 (d, 7,2)	4,59 (d, 7,5)	105,0	5,14 (d, 6,6)	4,43 (d, 7,0)	106,6
2''	3,51 (dd, 7,4 e 8,7)	3,31 (dd, 7,5 e 9,0)	74,9	3,89 (dd, 6,6 e 8,4)	3,76 (dd, 7,0 e 8,2)	73,8
3''	3,39 (t, 8,7)	3,36 (t, 9,0)	78,0	3,64 (dd, 3,1 e 8,4)	3,82 (dd, 3,0 e 8,2)	74,6
4''	3,82 (m)	3,56 (ddd, 4,5; 9,0 e 11,0)	71,4	3,82 (m)	4,10 (m)	69,5
5''	3,77 (dd, 5,2 e 11,6) 3,10 (d, 11,5)	3,28 (t, 11,0) 3,96 (dd, 4,5 e 11,0)	67,1	3,75 (d, 11,6) 3,43 (dd, 3,1 e 11,6)	3,59 (dd, 3,0 e 12,0) 3,87 (dd, 2,0 e 12,0)	66,8

^a (PLAZA et al., 2003)

Tabela 7-3- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII e da 3-O- β -D-xilopiranosilquercetina e 3-O- β -D-arabinopiranosilquercetina

C (MULTIPLICIDADE)	MISTURA	3-O- β -D-XILOPIRANOSIL QUERCETINA ^a	3-O- β -D- ARABINOPIRANOSIL QUERCETINA ^b
2 (s)	158,8	156,4	158,4
3 (s)	135,9	134,4	135,6
	135,7		
4 (s)	179,7	177,7	179,5
5 (s)	163,3	161,2	162,9
6 (d)	100,4	98,6	99,9
7 (s)	166,9	164,0	165,9
8 (d)	95,2	93,5	94,8
9 (s)	158,8	157,0	158,8
10 (s)	105,4	104,2	105,6
1' (s)	123,6	121,0	122,9
2' (d)	116,5	115,4	*
	116,3		
3' (s)	146,8	145,1	145,9
	146,3		
4' (s)	150,2	148,3	149,9
	150,3		
5' (d)	117,7	115,8	*
	117,5		
6' (d)	123,3	121,0	123,1
	123,2		
1'' (d)	104,9	104,8	104,6
2'' (d)	74,4	73,9	72,8
	73,2		
3'' (d)	77,8	76,7	74,0
	75,5		
4'' (d)	71,3	70,1	69,1
	69,4		
5'' (t)	67,4	66,0	67,0
	67,2		

^a (DMSO- d_6 ; AGRAWAL, 1989); ^b(CD_3OD ; AGRAWAL, 1989); * Sinais não observados

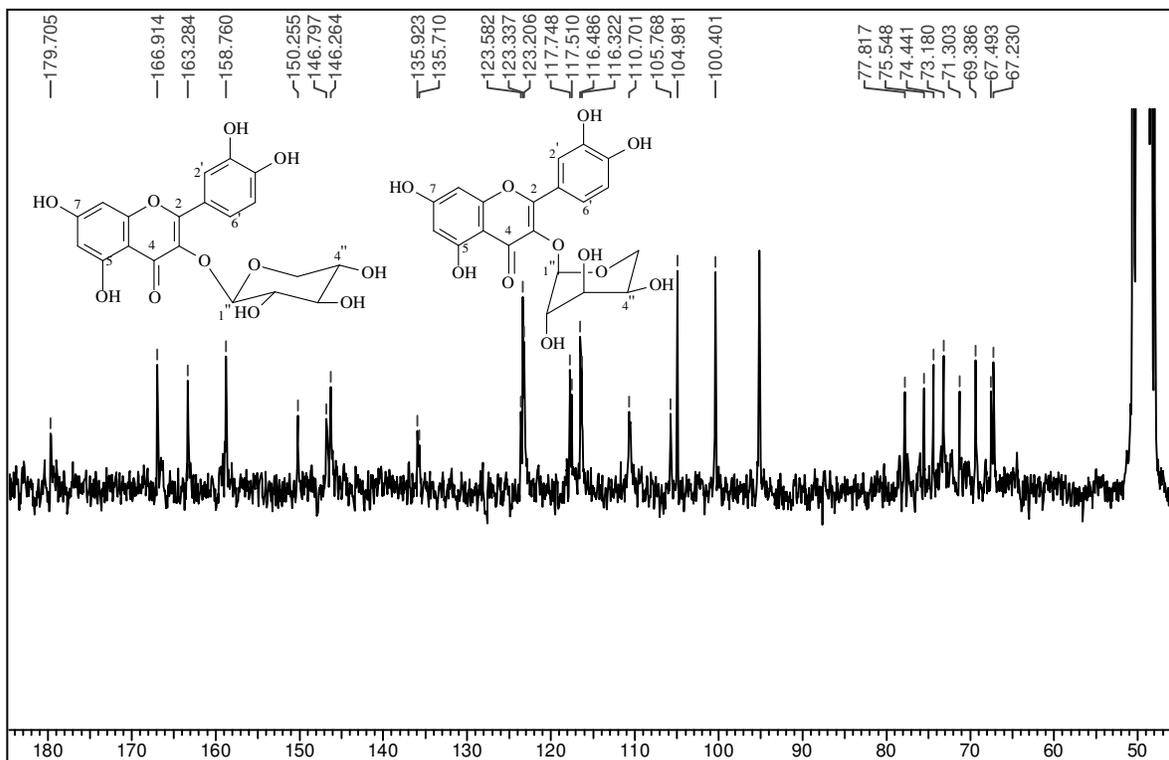


Figura 7-8- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII

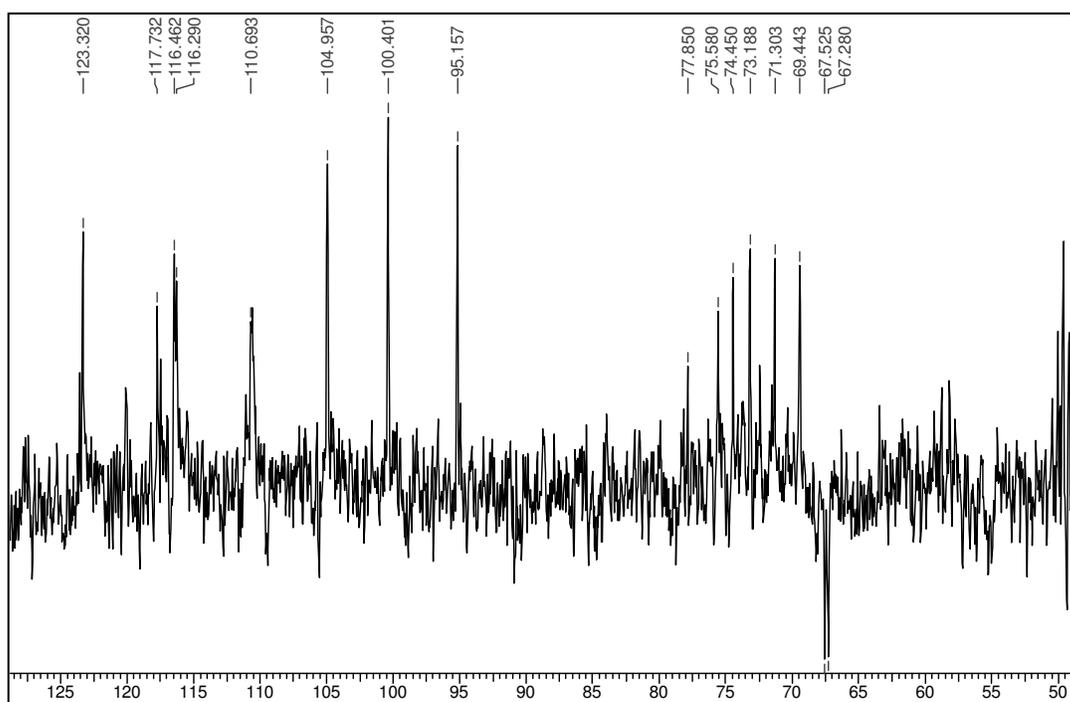


Figura 7-9- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII

20/05/04

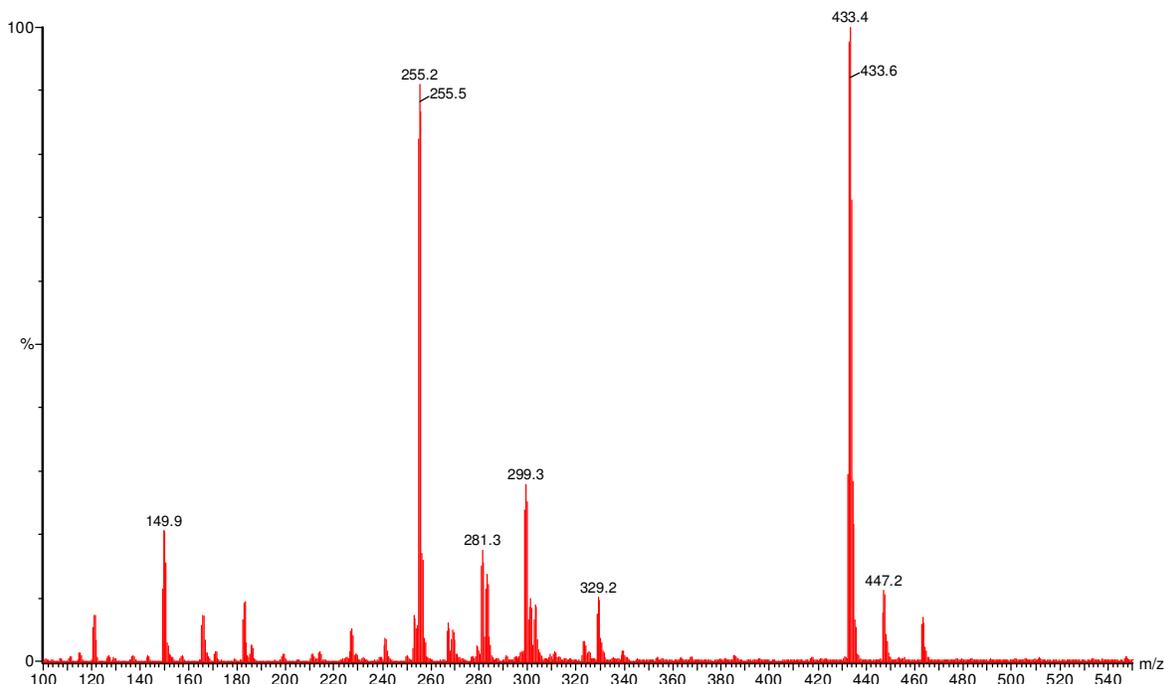


Figura 7-10- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da mistura das Substâncias XLI e XLII

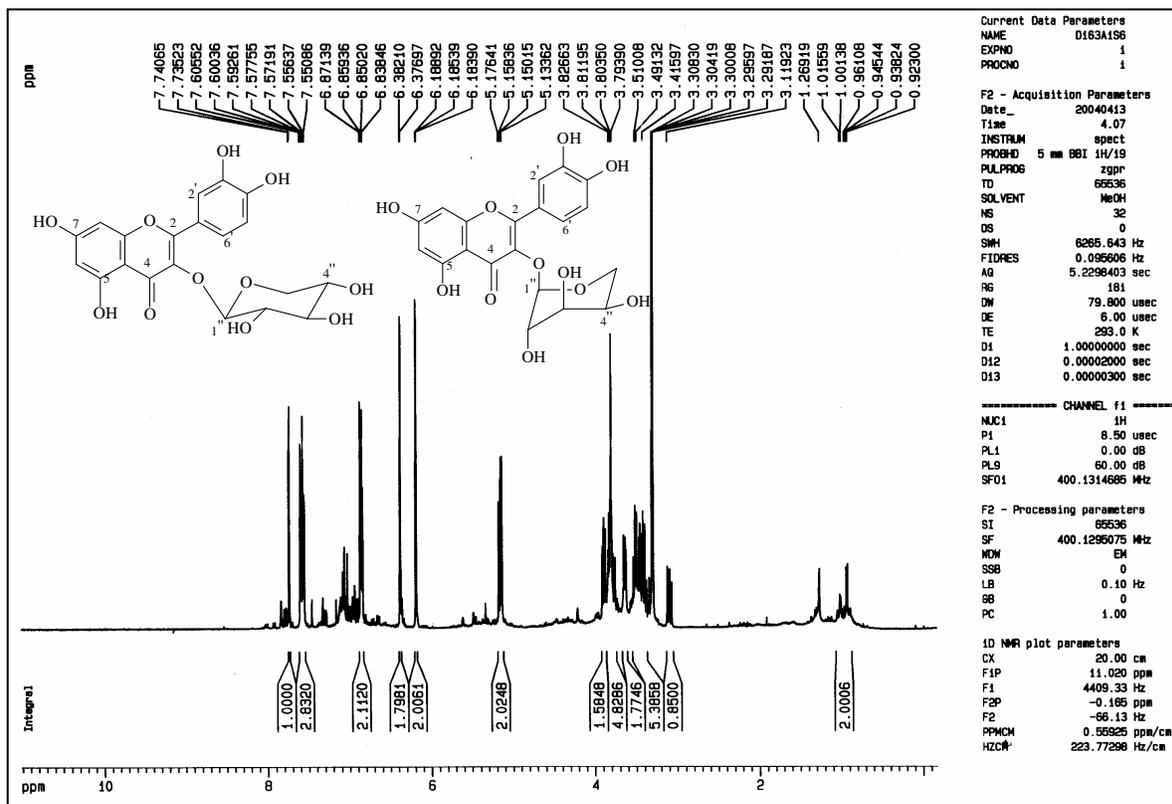
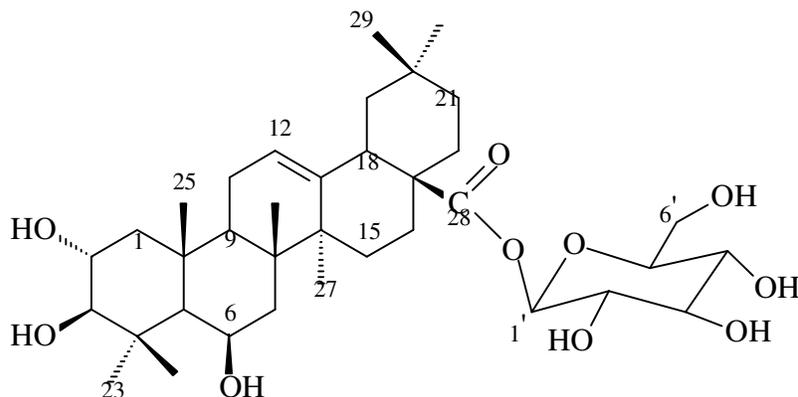


Figura 7-11- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) da mistura das Substâncias XLI e XLII

7.4. Identificação da Substância XLIII



2 α ,3 β ,6 β -trihydroxiolean-12-en-28-oato de β -D-glucopiranosila ou
6 β -hidroximaslinato de β -D-glucopiranosila

Do extrato metanólico, partição acetato de etila, de folhas de *S. densiflora*, após sofrer várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, foi obtida a fração AMFSfb, 151,5 mg, que se mostrou como um pó branco e amorfo em mistura com outras substâncias não identificadas, mas detectadas pela CCDA.

A fórmula molecular $C_{36}H_{58}O_{10}$ foi deduzida a partir dos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 7-16), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 649 $[M-H]^-$. O pico a m/z 487 $[M-H-162]^-$ indicou a saída de um fragmento de açúcar. Acredita-se que o pico em m/z 695 seja um artefato. O ponto de fusão foi observado a 144 $^{\circ}$ C. O espectro de infravermelho revelou bandas características de grupo hidroxila (3389 cm^{-1}), de C-H de metila (2941, 1462, 1378 cm^{-1}), de C-H de metileno (2880 cm^{-1}), de C=O de éster alifático (1734 cm^{-1}), de C=C (1646 cm^{-1}), C-O de álcool (1069 cm^{-1}) e C-O-C de éster (1028 cm^{-1}).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, C_5D_5N , Figura 7-17; Tabela 7-4) totalmente desacoplado revelou um sinal em δ 176,9, indicando a existência de carbonila de éster, por ser mostrar muito blindada para um grupo ácido de triterpeno; um sinal em δ 143,9 (o outro sinal em δ 123,5 só foi observado no espectro de RMN de $^{13}C/DEPT$ 135 $^{\circ}$, Figura 7-18) relacionados a C_{sp^2} de triterpeno com esqueleto oleaneno; sinais em δ 96,1, 84,4 e 79,5 a 62,5 corroboraram a presença de açúcar, juntamente com três carbonos carbinólicos situados no esqueleto triterpênico.

O espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT } 135^\circ$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 50 MHz, Figura 7-18), usando uma transferência de pulso de 135° para obter sinais positivos para CH e CH_3 e negativo para CH_2 , permitiu caracterizar 3 C metínicos, 8 C metilênicos, só um CH_2 carbinólico, 7 metílicos e, por diferença com o espectro de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado, os quaternários.

O espectro de RMN de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, Figura 7-12; Tabela 7-4) revelou os seguintes sinais : um em δ 6,28 (d, 8,0 Hz) referente ao H anomérico; um em δ 5,52 (sl) referente ao H olefínico H-12; um em δ 4,29 (m; H-2); um em δ 3,43 (d, $J = 9,4$ Hz), referente ao H-3 com configuração α /axial devido ao grande valor de J (logo OH em beta/equatorial), determinando também a configuração do H-2 (β /axial) e do respectivo grupo hidroxila (α /equatorial); vários sinais entre δ 4,35 a 4,01, referentes aos H carbinólicos; um em δ 3,19 (dd, 4,1 e 13,2 Hz), referente ao H-18 do esqueleto oleaneno e 7 sinais entre δ 1,46 a 0,88 (s), confirmando que uma das 8 metilas, característica de triterpeno de esqueleto oleaneno, suportava um grupo carbonila de éster. Sugere-se que o sinal referente ao grupo metila-24 esteja tão desblindado (δ 1,79) por se encontrar excluído do cone de blindagem do grupo β -OH ligado ao C-6.

No espectro de HMBC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, Figura 7-14) foi observada a correlação entre o H cujo sinal estava em δ 6,28 com o sinal referente à carbonila em δ 176,9, determinando o local da ligação do açúcar ao C-28 da aglicona. As correlações existentes entre os sinais em δ 1,72 (Me-25, β) e 2,50 (H-7) com o C em δ 67,9 reforçou a posição de uma das hidroxilas no C-6. Segundo valores dos C da tabela de MAHATO & KUNDU (1994), o fato do grupo hidroxila se encontrar no C-6 em configuração beta, somado ao conjunto $2\alpha,3\beta$ -diOH, pode provocar um deslocamento maior do C-1, variando de $\sim \delta$ 38,0 para $\sim \delta$ 50,0, o que foi observado e confirmado através do espectro de COSY ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, Figura 7-13) pelo acoplamento entre o H com sinal em δ 2,30 e os hidrogênios em δ 1,39 (H-1b) e 4,29 (H-2) e a correlação, obtida no espectro de HSQC ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 400 MHz, Figura 7-15), entre o H com sinal em δ 2,30 e o C em δ 50,4.

De acordo com os dados espectrais expostos acima, foi proposta a estrutura do 6β -hidroximaslinato de β -D-glucopiranosila, embasada em comparação com os dados relatados na literatura para substâncias correlatas (MAHATO & KUNDU,

1994 ; ZUCARO et al., 2000; ARRAGON et al., 2002; Tabela 7-4). Esta substância é inédita na literatura.

Tabela 7-4- Dados dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT135 (400 e 50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII (P), do ácido $2\alpha,3\beta,6\beta$ -trihidroiolean-12-en-28-óico (Q) e $2\alpha,3\beta,19\alpha$ -trihidroiolean-12-en-24-óico-28-oato de β -D-glucopiranosila (R)

$^1\text{H}/\text{P}$ (J EM HZ)	C/ MULTIPLICIDADE	$^{13}\text{C}/\text{P}$	$^{13}\text{C}/\text{Q}$ ^a	$^{13}\text{C}/\text{R}$ ^b	$^1\text{H}/\text{Q}+\text{R}$ ^{* (J EM HZ)} a,b
2,30 (dd) e 1,39 (m)	1 (t)	50,4	49,9	48,0	1,83 e 1,29
4,29 (m)	2 (d)	69,2	68,2	68,6	4,28 (dt; 9,5 ;4,5)
3,43 (d, 9,4)	3 (d)	84,4	83,9	84,3	3,42 (d; 9,5)
	4 (s)	39,7	39,2	50,1	
1,16 (m)	5 (d)	56,9	56,4	57,0	1,18
4,39 (m)	6 (d)	67,9	67,4	20,8	4,85
2,50 e 1,23 (m)	7 (t)	32,8	41,1	33,0	1,86
	8 (s)	41,1	40,6	40,2	
	9 (d)	49,1	48,6	47,9	1,99
	10 (s)	38,7	38,3	39,1	
2,14 (t, 3,8)	11 (t)	24,4	23,9	24,4	
5,52 (sl)	12 (d)	123,5	122,7	124,0	5,57 (tl)
	13 (s)	143,9	144,0	144,3	
	14 (s)	43,2	42,6	42,2	
	15 (t)	28,6	28,1	28,9	
	16 (t)	24,4	23,6	28,0	2,20
	17 (s)	47,4	43,3	46,5	
3,19 (dd, 4,1 e 13,2)	18 (d)	42,2	41,9	44,7	3,33 (dd; 14 e 4)
1,30 e 1,78 (m)	19 (t)	*46,7	46,5	80,9	2,32 e 1,40
	20 (s)	31,1	30,8	35,6	
	21 (t)	34,4	34,1	29,1	
	22 (t)	28,6	33,1	33,4	1,85
1,46	23 (q)	*29,0	29,0	25,2	1,46 (s)
1,79	24 (q)	19,6	19,1	180,1	1,78 (s)
1,72	25 (q)	19,2	18,4	17,5	1,71 (s)
1,70	26 (q)	19,6	18,3	15,2	1,61 (s)
1,25	27 (q)	26,5	26,2	24,8	1,30 (s)
	28 (s)	176,9	180,0	177,3	
0,92	29 (q)	33,5	33,2	28,8	0,96 (s)
0,88	30 (q)	24,1	23,6	24,6	1,02 (s)
6,28 (d, 8,0)	1'	96,2		95,9	6,32 (d, 8,0) ^{*k}
4,21 (t, 8,3 e 8,9)	2'	74,4		74,1	4,18 (t) ^{*k}
4,27 (m)	3'	78,9		78,9	4,25 (t) ^{*k}
4,35 (d, 9,4)	4'	71,5		71,0	4,40 ^{*k}
4,01 (m)	5'	79,5		79,4	4,00 (t) ^{*k}
4,45 (dd, 2,1 e 11,7)	6'	62,5		62,1	4,41 (sl) ^{*k}
4,39 (m)					

^a (300 e 75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; ZUCARO et al., 2000); ^b (400 e 100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; ARRAGON et al., 2002); * valores obtidos no espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC

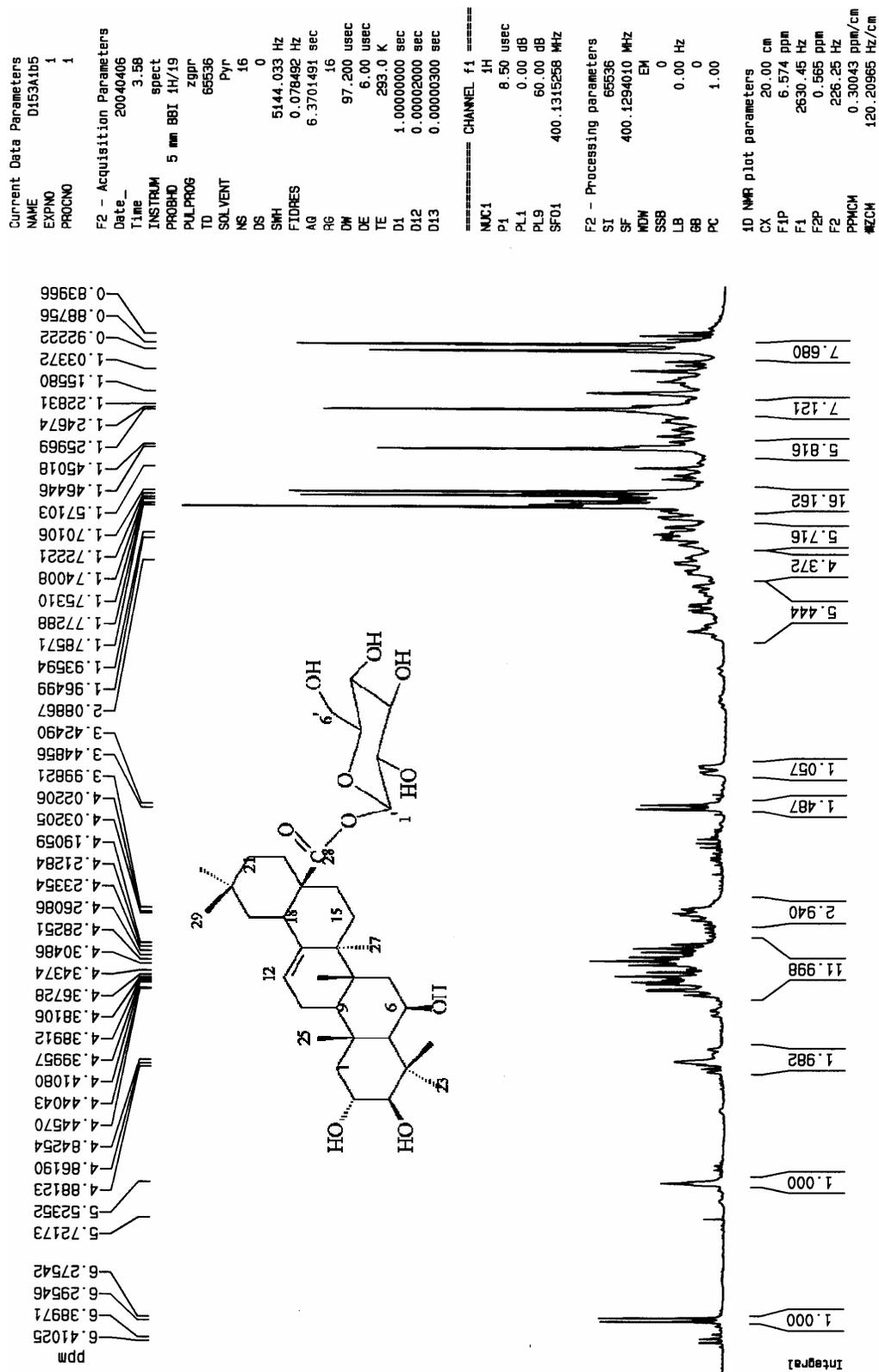


Figura 7-12- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII

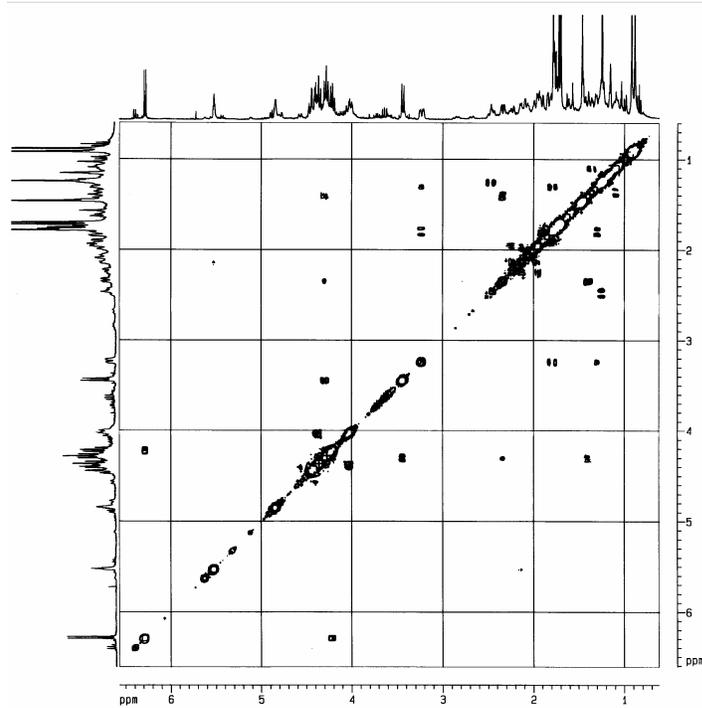


Figura 7-13- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII

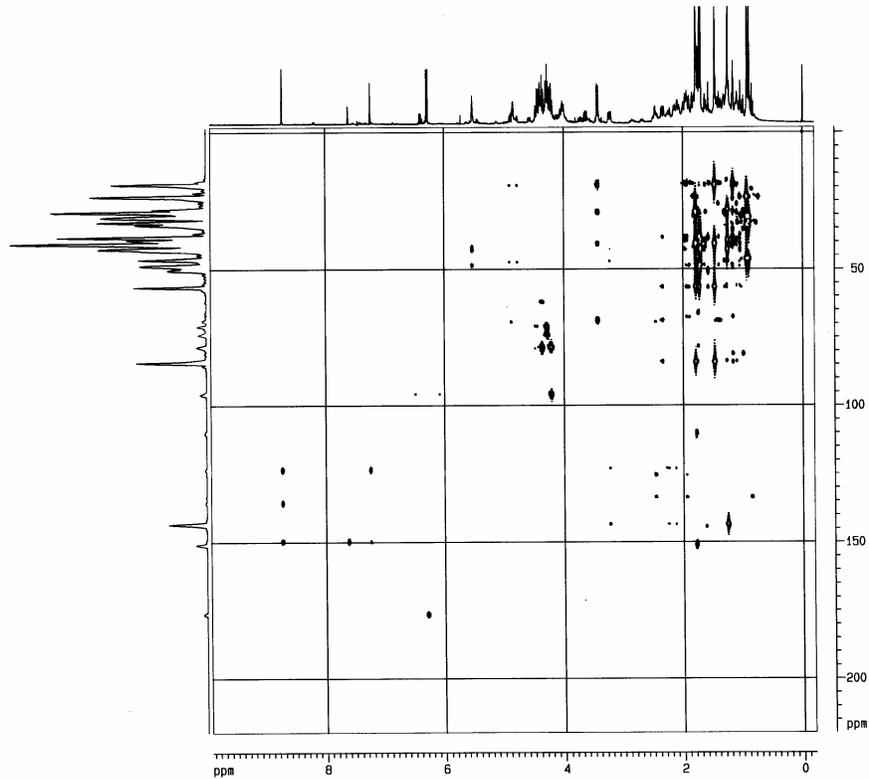


Figura 7-14- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII

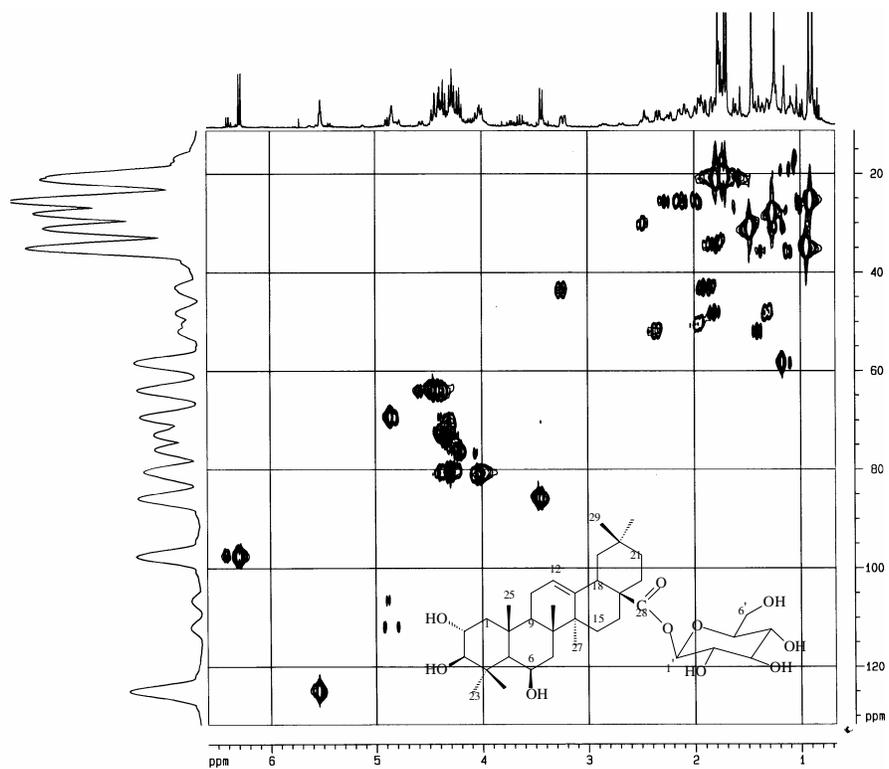


Figura 7-15- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII

20/05/04

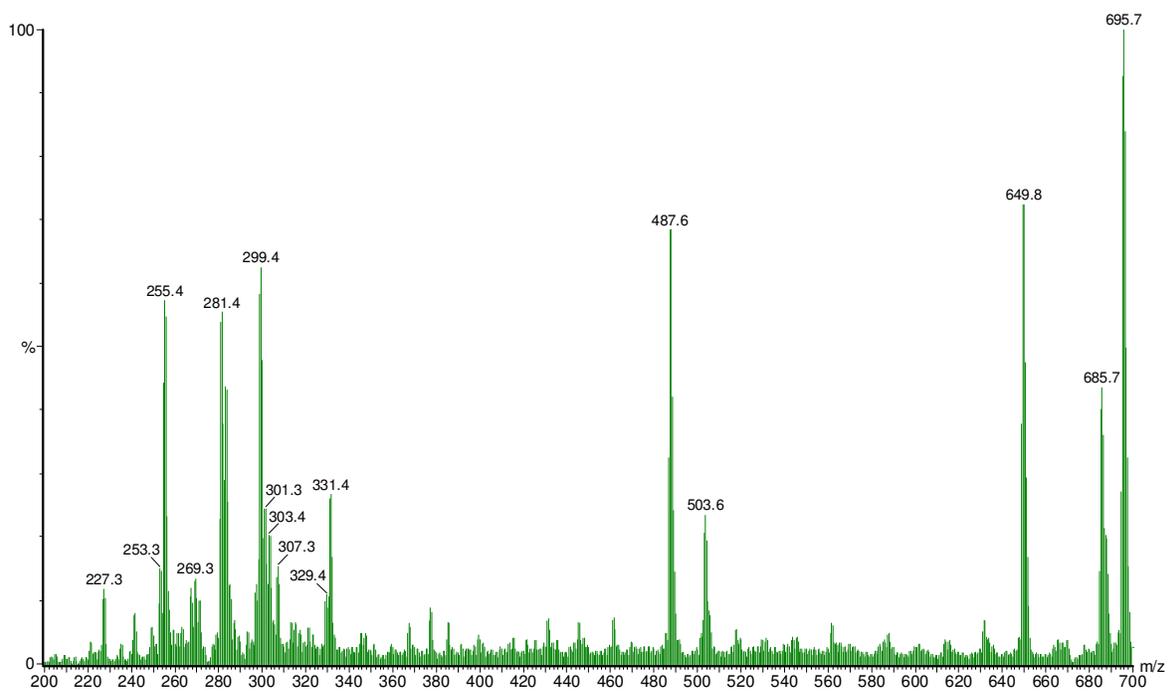


Figura 7-16- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XLIII

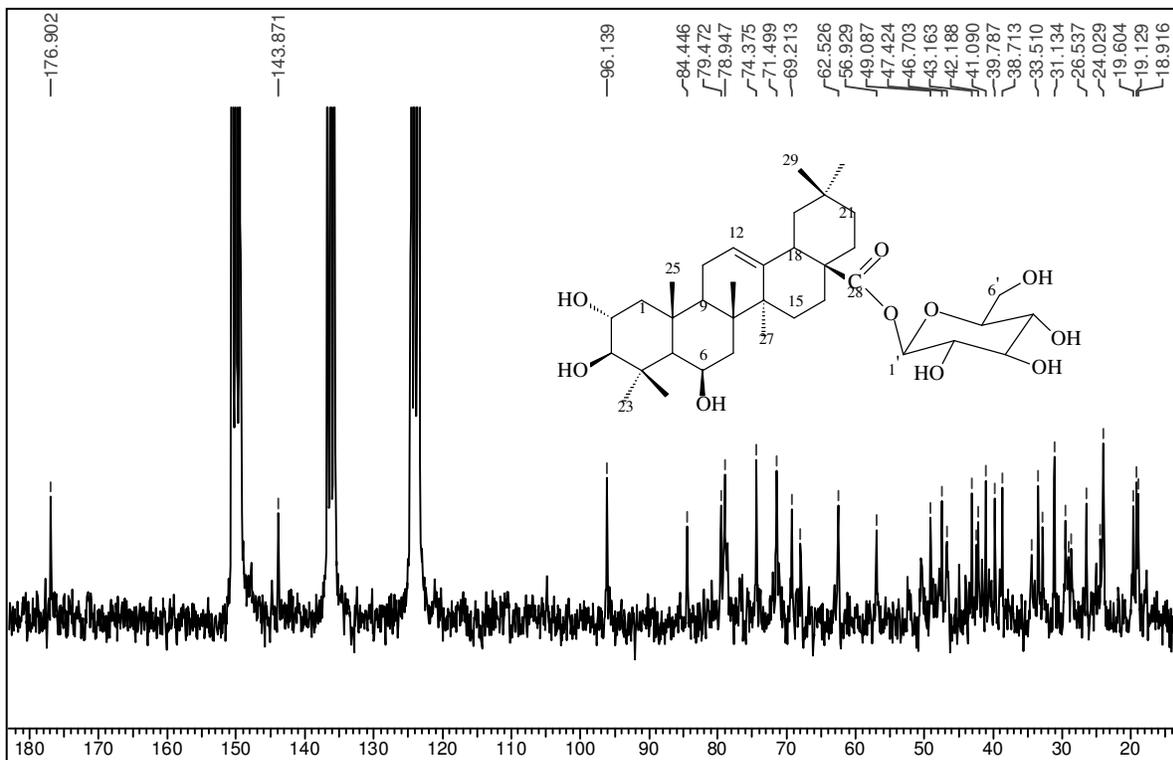


Figura 7-17- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII

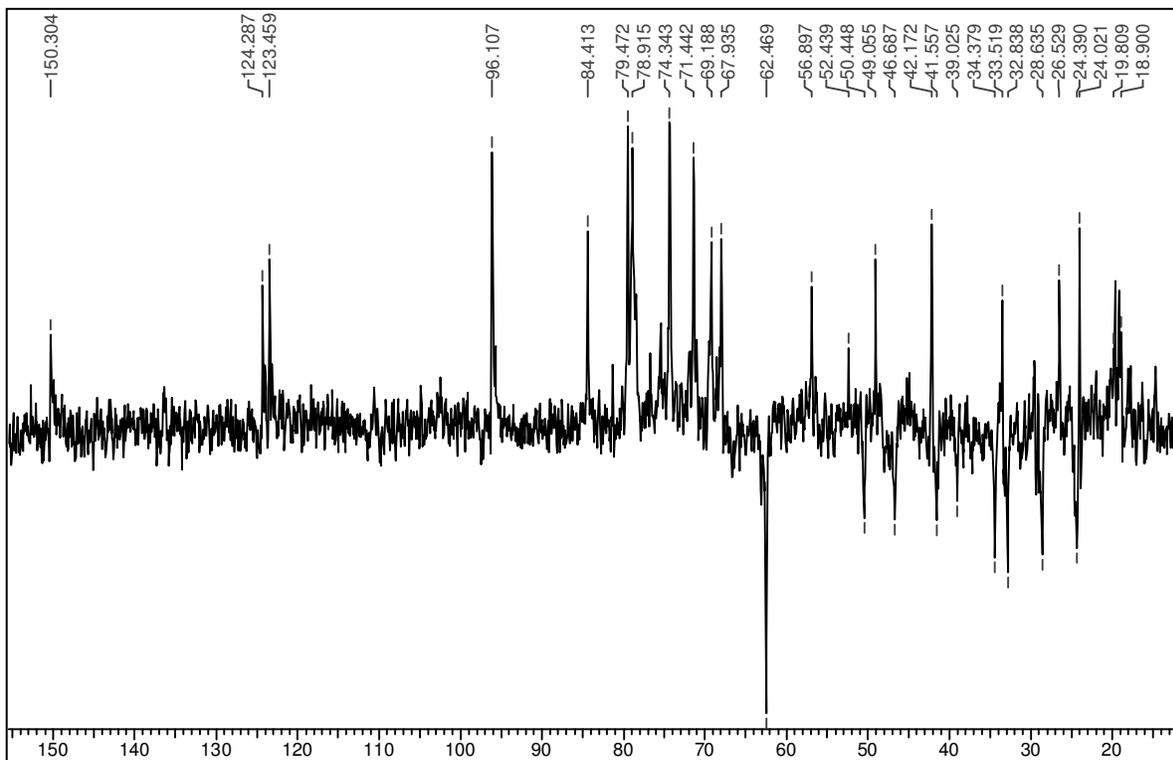
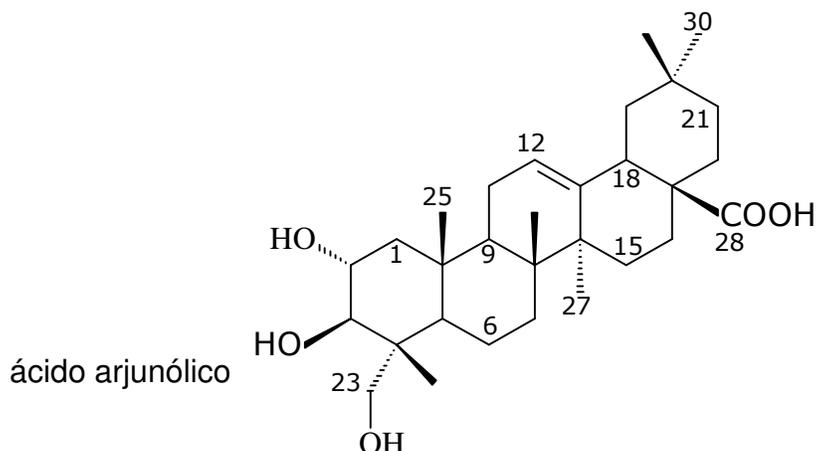


Figura 7-18- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIII

7.5. Identificação da Substância XLIV



Do extrato metanólico, partição diclorometânica, de caule de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em sílica flash e sephadex LH-20, foi obtida a fração DMC836, 12,0 mg, a qual se mostrou como um pó branco e amorfo. Após a fração ser eluída com Dic/Ace 8:2 com duas gotas de HAc na CCDA e revelada com vanilina sulfúrica, foi observada uma mancha azul.

A fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_5$ foi deduzida a partir dos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 7-20), medida no pico do íon pseudomolecular a m/z 487 $[M-H]^-$.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, C_5D_5N , Figura 7-19, Tabela 7-5) totalmente desacoplado revelou um sinal em δ 180,4, indicando a existência de carbonila carboxílica; dois sinais em δ 145,0 e 122,6 relacionados a Csp_2 de triterpeno com esqueleto oleaneno e três sinais em δ 78,4; 69,1 e 66,6 para carbonos carbinólicos.

O espectro de RMN de $^{13}C/DEPT135^\circ$ (C_5D_5N , 50 MHz, Figura 7-23), usando uma transferência de pulso de 135° para obter sinais positivos para CH e CH_3 e negativo para CH_2 , permitiu caracterizar os C metínicos, metilênicos, incluindo um CH_2 carbinólico, metílicos e, por diferença com o espectro de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado, os quaternários.

O espectro de RMN de 1H (acetona- d_6 , 400 MHz, Figura 7-24) revelou os seguintes sinais : um em δ 5,25 (t, $J = 3,5$ Hz) referente ao H olefínico H-12; um em δ 3,67 (m; H-2); um em δ 3,55 e outro em δ 3,28 (ambos d; $J = 10,8$ Hz; H-23 geminais);

um em δ 3,39 (d; $J = 9,5$ Hz) referente ao H-3 em configuração axial e, conseqüentemente com os grupos hidroxila nos C-2 e 3 em equatorial/alfa e beta respectivamente; um em δ 2,29 (dd; $J = 3,4$ e $12,1$ Hz) ainda atribuído ao H-1, devido acoplamento deste com o outro H-1 em δ 1,43 e com o H-2 em δ 3,67 observado no espectro de COSY (C_5D_5N , 400 MHz, Figura 7-21); seis sinais em δ 1,17; 1,03; 0,94; 0,92; 0,80 e 0,72 (todos s) relativos aos 6 grupos metilas, confirmando que uma das 8 metilas, característica de triterpeno de esqueleto oleaneno, continha um grupo OH e a outra havia se oxidado, formando um grupo carboxila. O mesmo espectro realizado em piridina deuterada não ficou suficientemente resolvido na área dos H carbinólicos.

Foi proposta a estrutura do ácido arjunólico, ou ácido $2\alpha,3\beta,23$ -triidroxiolean-12-en-28-óico, confirmada através da comparação com os dados relatados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; Tabela 7-5; Figura 7-22).

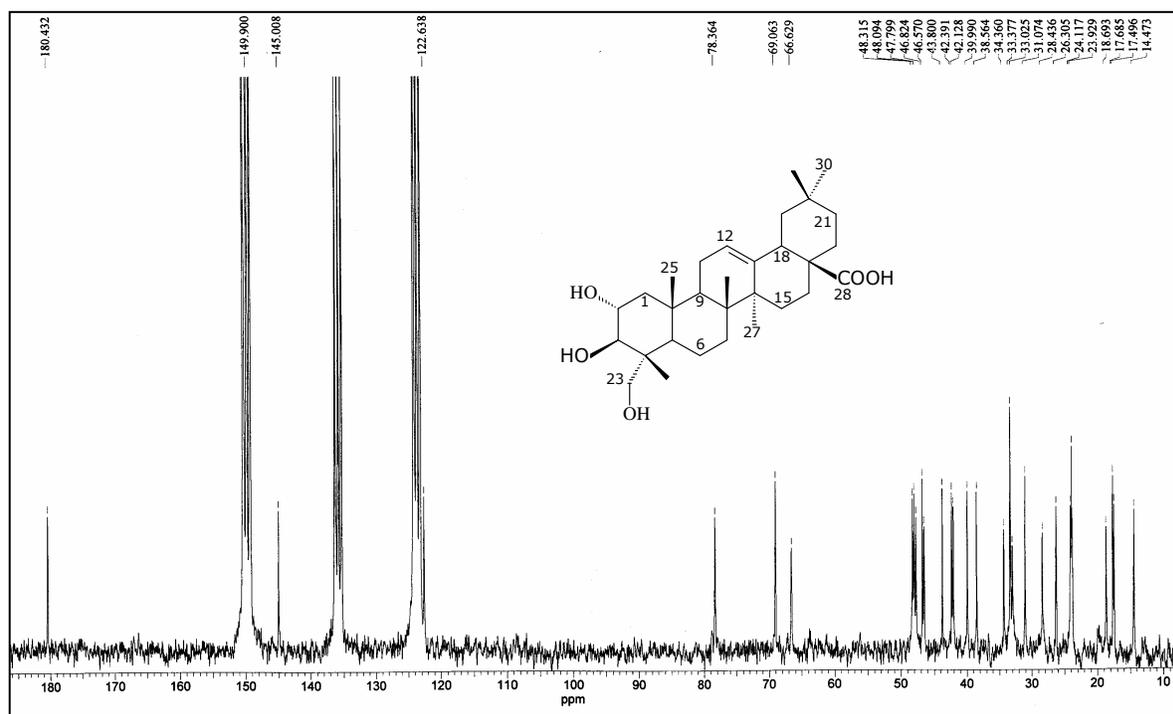


Figura 7-19- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, C_5D_5N) da Substância XLIV

Tabela 7-5- Dados dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT135 (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV e do ácido arjunólico

C/ MULTIPLICIDADE	SUBSTANCIA XLIV	ÁCIDO ARJUNÓLICO ^a
1 (t)	47,8	47,1
2 (d)	69,0	68,9
3 (d)	78,3	78,7
4 (s)	43,8	43,5
5 (d)	48,3	48,4
6 (t)	18,7	18,6
7 (t)	33,4	33,1
8 (s)	39,9	40,1
9 (d)	48,1	48,5
10 (s)	38,6	38,5
11 (t)	23,9	23,8
12 (d)	122,6	123,5
13 (s)	145,0	144,1
14 (s)	42,4	42,4
15 (t)	28,4	28,3
16 (t)	24,1	23,9
17 (s)	46,8	47,0
18 (d)	42,1	43,5
19 (t)	46,6	46,3
20 (s)	31,1	30,7
21 (t)	34,4	34,2
22 (t)	33,0	33,0
23 (t)	66,6	67,2
24 (q)	14,5	14,0
25 (q)	17,7	17,6
26 (q)	17,5	17,2
27 (q)	26,3	26,1
28 (s)	180,4	178,6
29 (q)	*33,0	32,9
30 (q)	23,7	23,7

^a (MAHATO & KUNDU, 1994); * Sinal observado na projeção de carbono do espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC

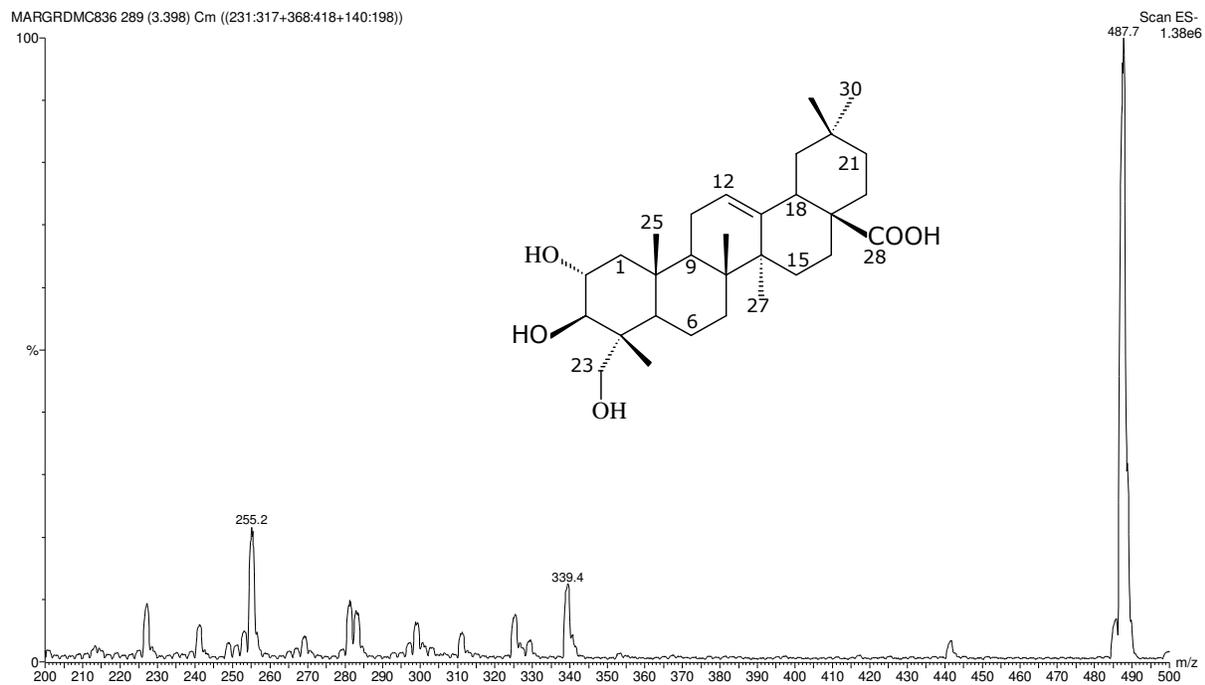


Figura 7-20- Espectro de massas (ESI, modo negativo) da Substância XLIV

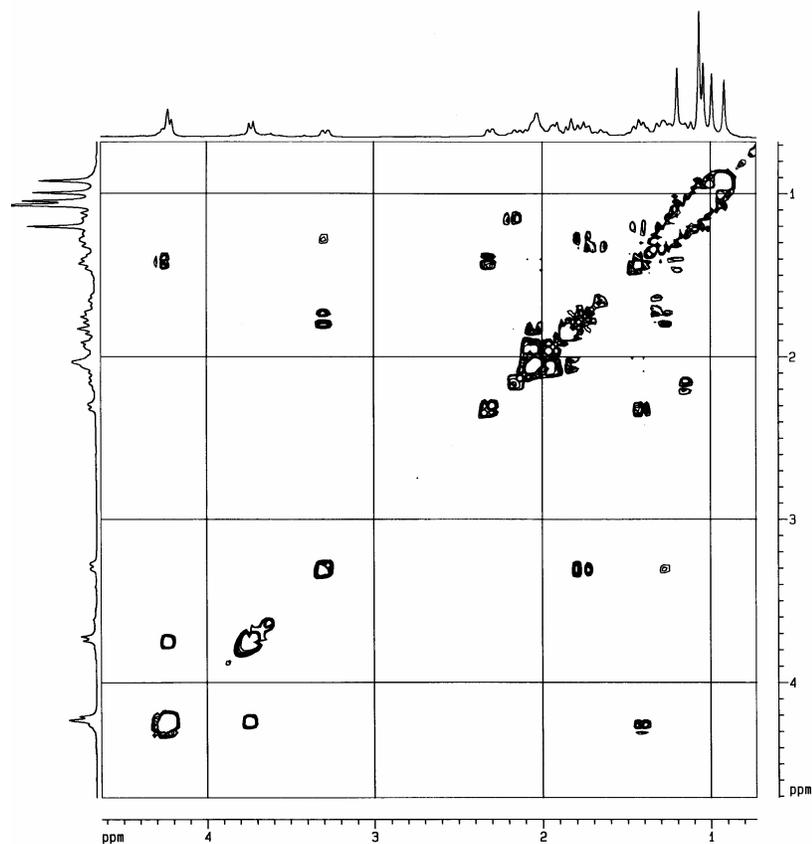


Figura 7-21- Espectro de ^1H - ^1H COSY (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV

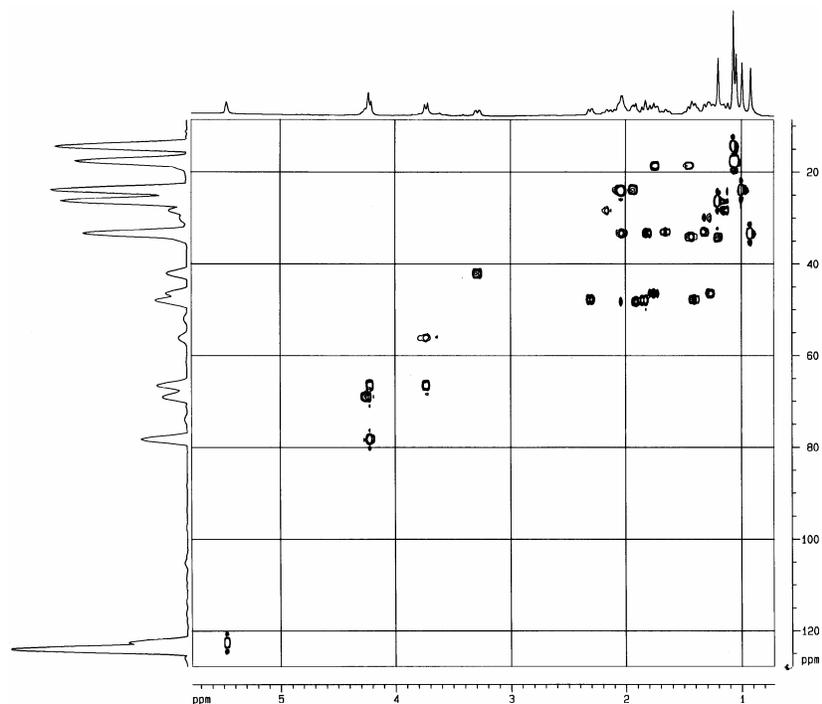


Figura 7-22- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV

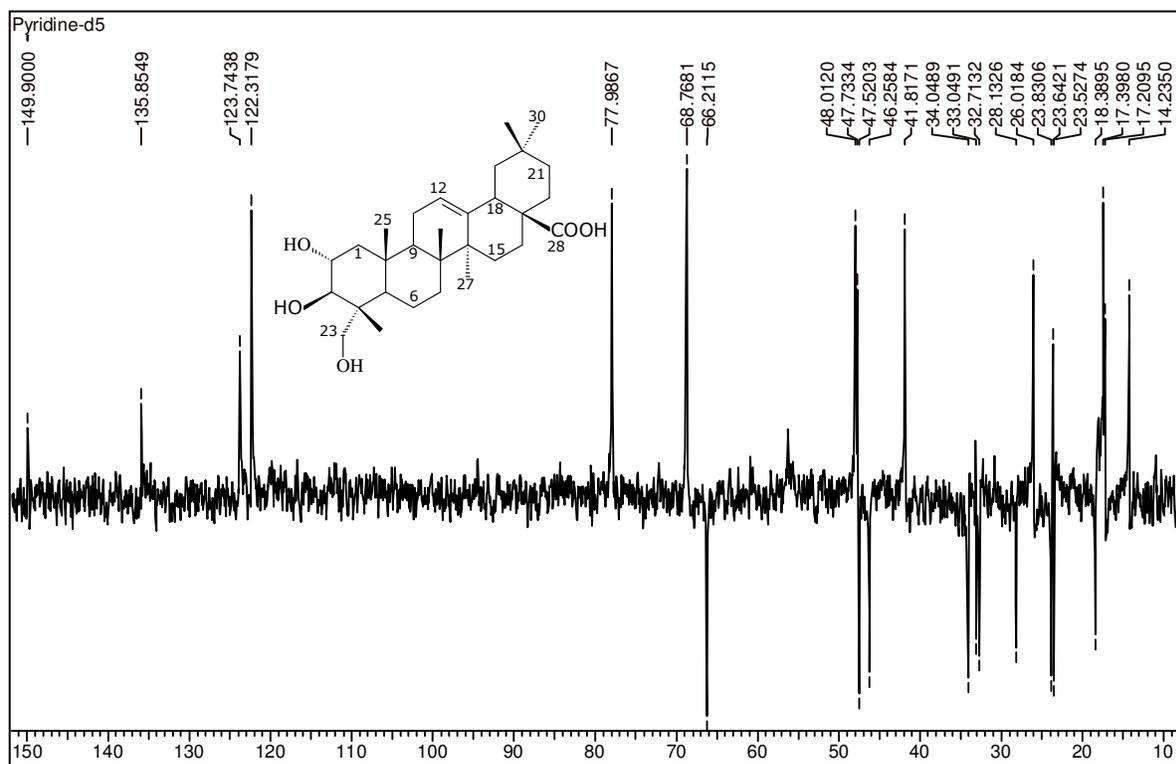


Figura 7-23- Espectro de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135^\circ$ (50 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da Substância XLIV

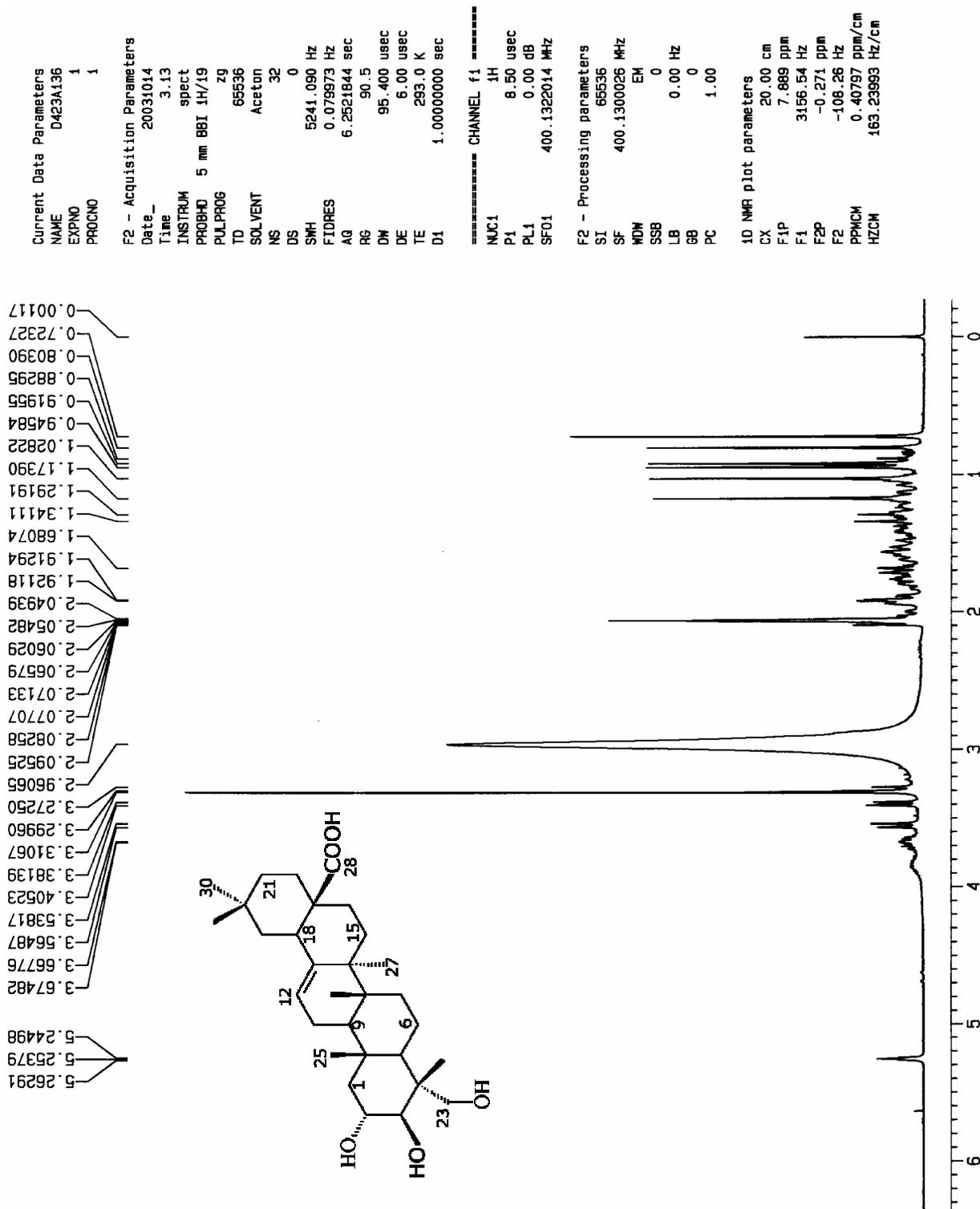
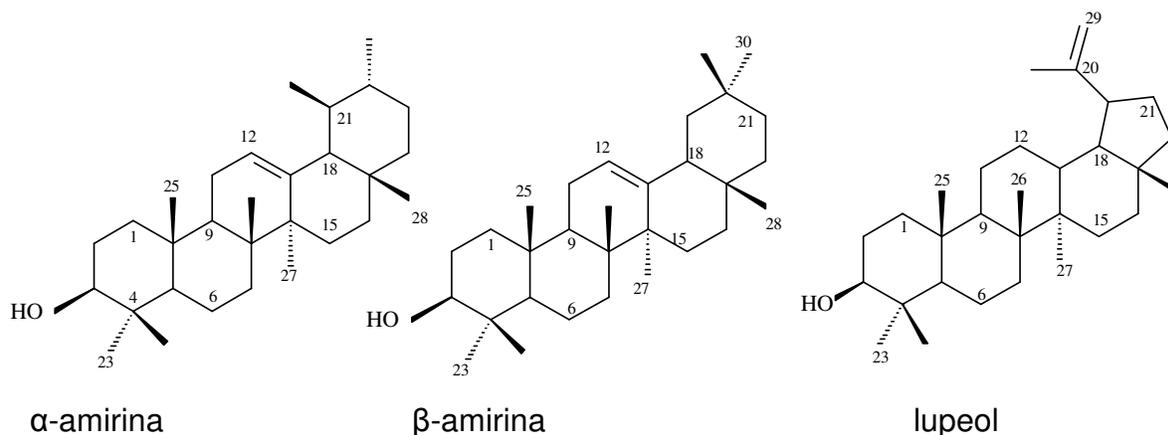


Figura 7-24- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância XLIV

7.6. Identificação das Substâncias XLV, XLVI e XLVII em mistura



O extrato metanólico de folhas de *S. densiflora*, partição diclorometânica, após sofrer várias etapas de fracionamento em sílica, forneceu a fração DMFgh78, 32,5 mg, que se apresentou como um sólido branco e amorfo.

A análise do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, Figura 7-28) revelou ser uma mistura de triterpenos devido aos seguintes sinais: seis sinais em δ 0,76; δ 0,79; δ 0,83; δ 0,94; δ 0,96 e δ 1,03 (todos s) referentes aos hidrogênios de grupos metila; um sinal em δ 1,68 (s) referente a um grupo metila ligado a carbono sp_2 ; um sinal em δ 2,38 (m) referente a um hidrogênio alílico (H-19); um sinal em δ 3,18 (dd, $J = 11,1$ e $5,1$ Hz) relativo a um hidrogênio carbinólico em configuração α , e conseqüentemente o grupo hidroxila se encontra em configuração β ; um sinal em δ 3,23 (dd, $J = 10,2$ e $5,9$ Hz) de intensidade pequena (parcialmente encoberto pelo sinal em δ 3,18, com intensidade muito maior) também referente a hidrogênio carbinólico em configuração α ; um sinal em δ 4,56 (dd, $J = 2,5$ e $1,3$ Hz) e em δ 4,69 (d, $J = 2,4$ Hz) referentes a H de dupla exocíclica; um sinal em δ 5,18 (m) e outro em δ 5,13 (m) com intensidades bem menores que os dois primeiros, todos dois referentes a hidrogênios olefínicos característicos de triterpenos com esqueleto 12-oleaneno e 12-urseno (AHMAD & RAHMAN, 1994).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz, Figura 7-25) revelou vários sinais referentes a carbono sp_2 em δ 150,8; 145,1; 139,3; 124,4; 121,7 e outro em 109,3. O conjunto de sinais em 150,8 e 109,3 foi atribuído a carbonos de ligação dupla exocíclica característica de triterpenos com esqueleto lupânico. O conjunto de

sinais em δ 145,1 e δ 121,7 foi atribuído a carbonos olefínicos característicos de triterpenos com esqueleto 12-oleaneno e o outro conjunto de sinais em δ 139,3 e δ 124,4 foi atribuído a carbonos sp_2 característicos de triterpenos com esqueleto 12-urseno. Foram ainda observados um sinal em δ 78,9, referente a carbono carbinólico, e vários sinais entre δ 59,0 a 15,3. Não foram observados todos os sinais referentes aos grupos metilas das três substâncias (Tabela 7-6)

A fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ionização por impacto eletrônico (Figuras 7-26 e 7-27), o qual forneceu o pico do íon molecular a m/z 426 $[M]^+$.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e na comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994; Tabela 7-6) foram propostas as estruturas do α -amirina, β -amirina e lupeol.

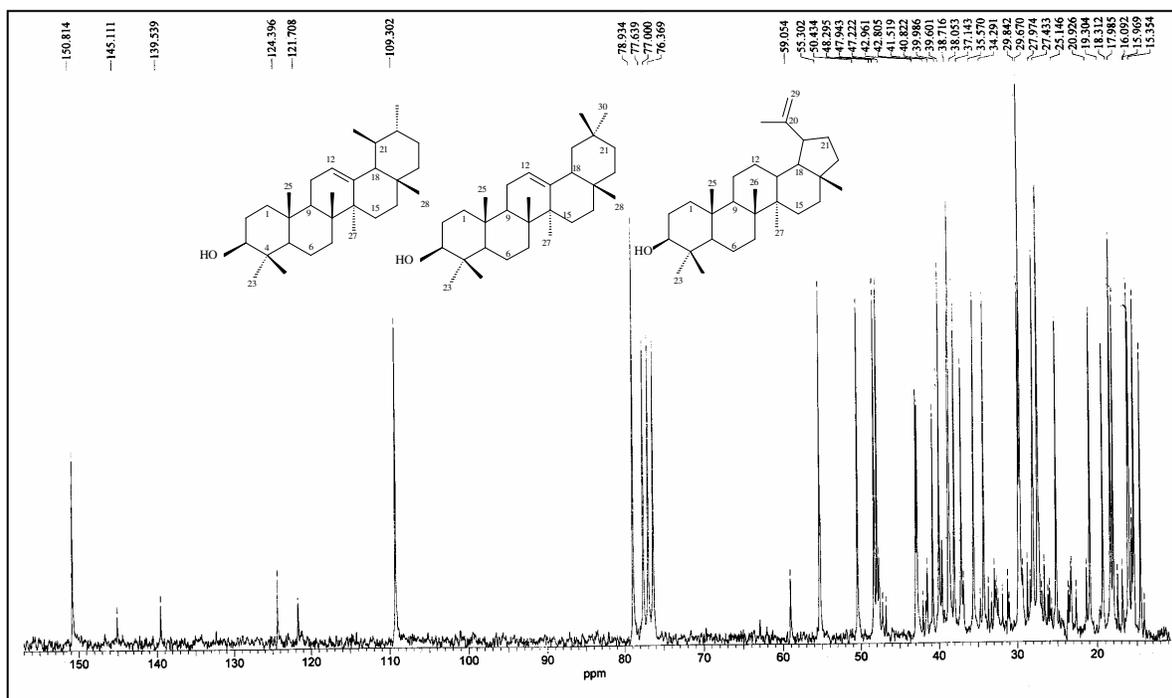


Figura 7-25- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII

Tabela 7-6- Dados do espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII; do lupeol, α -amirina e β -amirina

Carbono	Mistura	Lupeol ^a	α -amirina ^a	β -amirina ^a
1	38,7	38,7	38,7	38,7
2	27,4	27,4	27,3	27,2
3	78,9	78,9	79,0	78,3
4	38,8	38,8	38,8	38,7
5	55,3	55,3	55,3	55,2
6	18,3	18,3	18,5	18,3
7	34,3	34,2	32,8	32,9
8	40,8	40,8	38,8	40,0
9	50,4	50,4	47,7	47,7
10	37,1	37,1	37,6	36,9
11	20,9	20,9	23,6	23,3
12	25,1; 124,4 e 121,7	25,1	121,8	124,3
13	38,0; 139,3 e 145,1	38,0	145,1	139,3
14	42,8	42,8	41,8	42,0
15	27,4	27,4	26,2	28,7
16	35,5	35,5	27,0	26,6
17	43,0	43,0	32,5	33,7
18	48,3	48,2	47,4	58,9
19	47,9	47,9	46,9	39,6
20	150,8	150,9	31,1	39,6
21	29,8	29,8	34,8	31,2
22	40,0	40,0	37,2	41,5
23	28,0 *	28,0	28,2	28,1
24	15,3 *	15,4	15,5	15,6
25	16,1 *	16,1	15,6	15,6
26	16,0 *	15,9	16,9	16,8
27	14,5 *	14,5	26,0	23,3
28	18,0 *	18,0	28,4	28,1
29	109,3	109,3	33,3	17,4
30	19,3 *	19,3	23,7	21,3

^a (MAHATO & KUNDU, 1994); * só foram observados estes sinais referentes aos grupos metilas

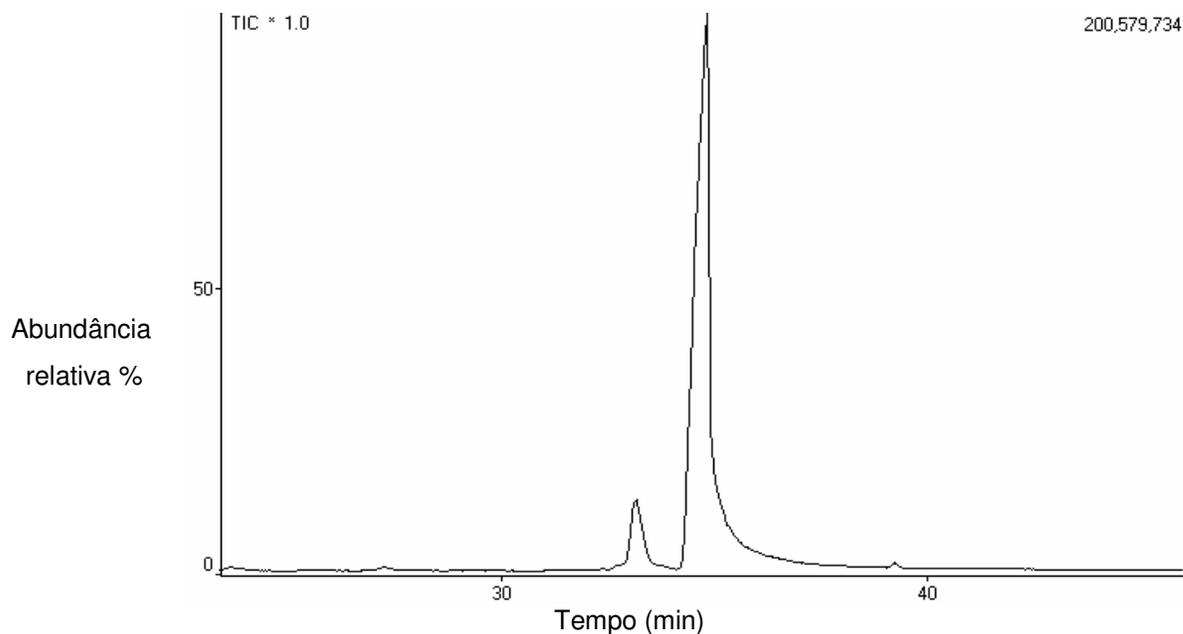


Figura 7-26- Cromatograma da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII
(Tr= 33,3 min, β e α -amirina; Tr= 34,6 min lupeol)

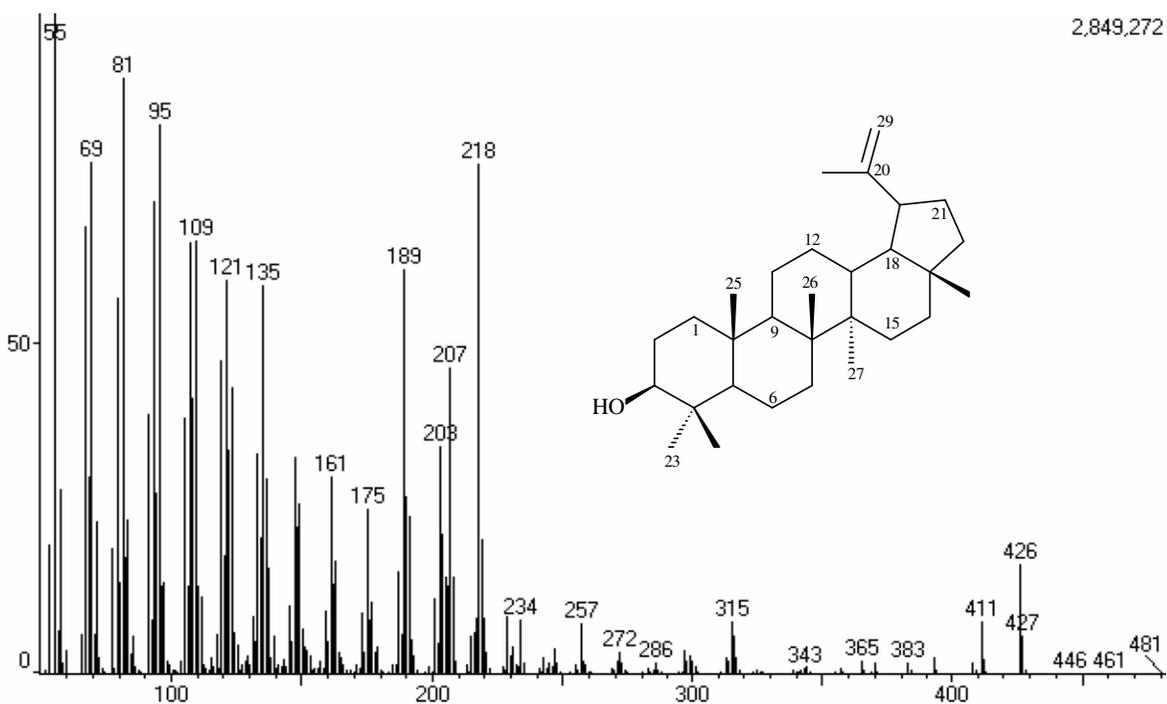


Figura 7-27- Espectro de massas, CG/EM-IE, da Substância XLVII
(Tr = 34,6 min.)

```

Current Data Parameters
NAME      DL23A178
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20030320
Time     7.38
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Multinu
PULPROG  zg
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        16
DS        0
SNH       8116.893 Hz
FTDRES   0.123654 Hz
AQ        4.0370574 sec
RG        9
DN         61.600 usec
DE         6.00 usec
TE        293.0 K
D1        1.00000000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        10.50 usec
PL1       0.00 dB
SFO1      400.1332592 MHz

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        400.1300048 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.00 Hz
GB        0
PC        1.00

ID NMR plot parameters
CX        20.00 cm
FAP       5.298 ppm
F1        2119.99 Hz
F2        0.418 ppm
PPMCM     167.41 Hz
HZCM      0.24399 ppm/cm
          97.62881 Hz/cm

```

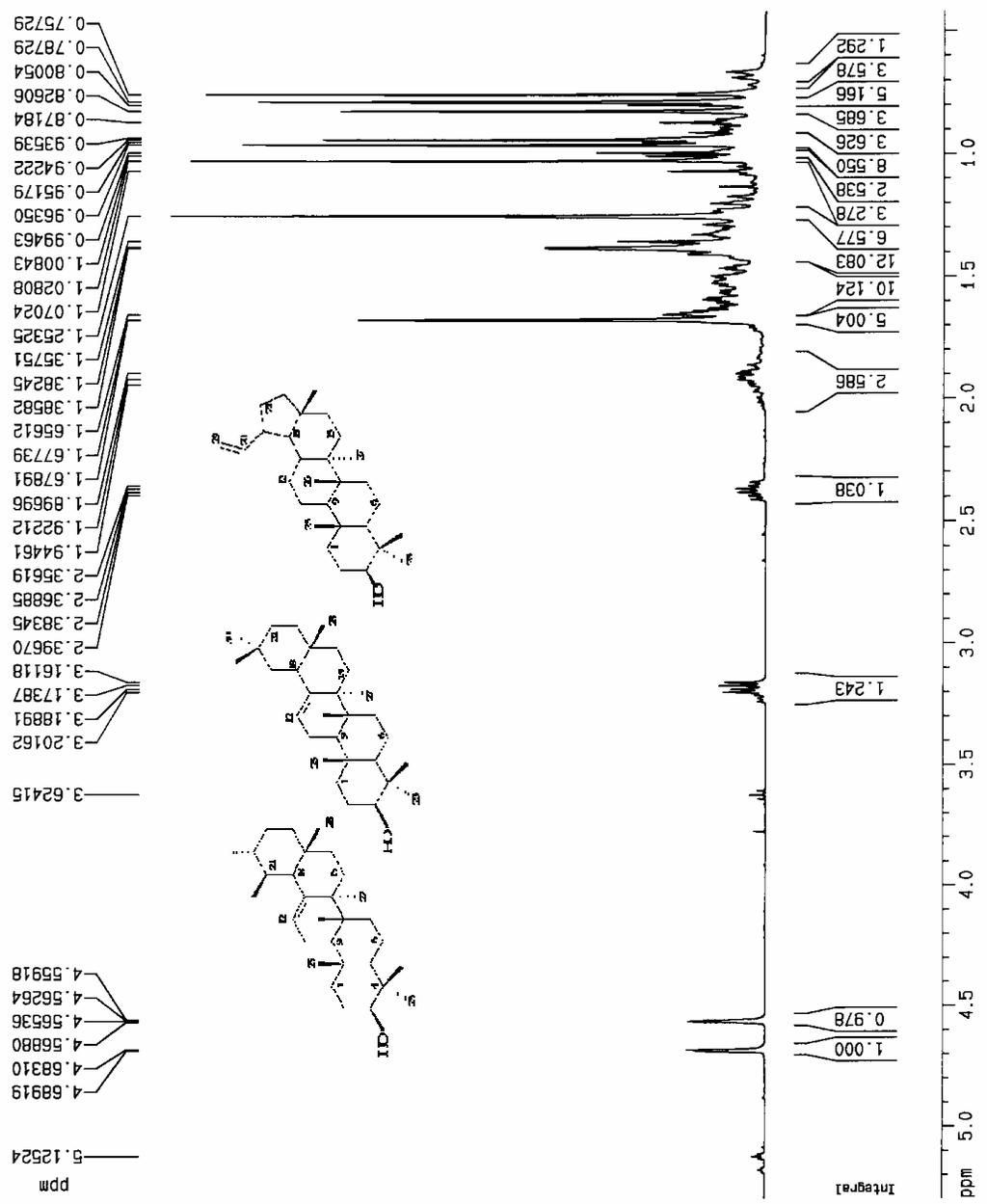
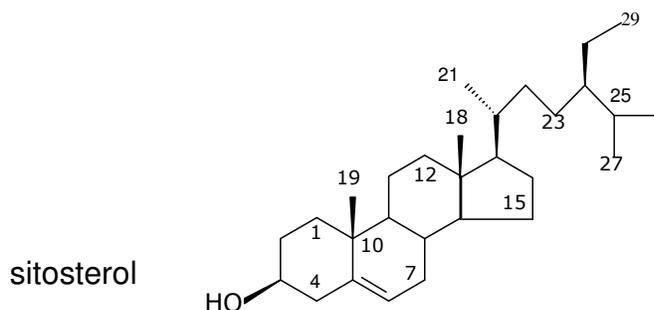


Figura 7-28- Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da mistura das Substâncias XLV, XLVI e XLVII

7.7. Identificação da Substância XLVIII



Do extrato metanólico, partição acetato de etila, da casca da raiz de *S. densiflora*, após uma etapa cromatográfica em sílica, foi obtida a fração AMSCR6, 5,8 mg, a qual se mostrou como um sólido branco amorfo.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) revelou dois sinais característicos de C sp_2 em δ 140,9 e 121,9, além de evidenciar a presença de um C carbinólico em δ 72,0 e outros sinais característicos de esterol (FURUYA et al., 1987; TANDOM et al., 1990; Tabela 5-14).

A análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3 , Figura 7-29) apresentou um sinal em δ 5,35 (dl, $J = 4,8$ Hz) característico do H-6 dos fitoesteróis, assim como os sinais entre δ 1,02-0,67 (todos s) referentes aos H metílicos. Em δ 3,58 (m) foi observado o sinal característico do H-3 carbinólico.

Baseando-se nos dados espectrais acima e dados da literatura (FURUYA et al., 1987; TANDOM et al., 1990; Tabela 5-14) foi proposta a estrutura do sitosterol.

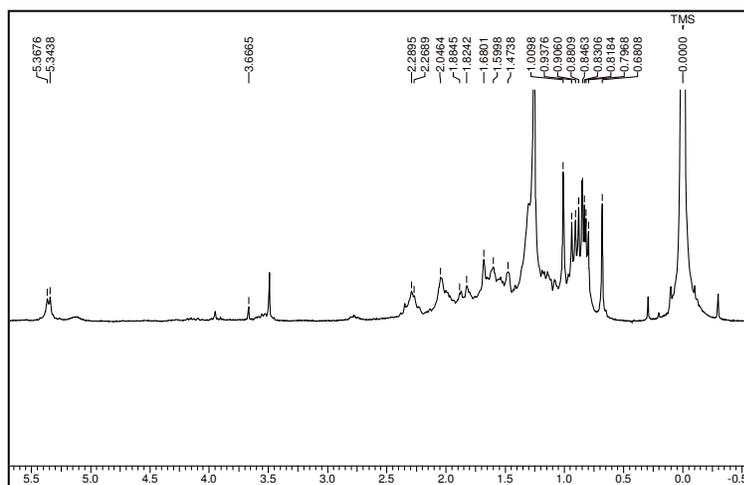


Figura 7-29- Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da Substância XLVIII

7.8. Identificação da Substância XIX

Do extrato metanólico, partição diclorometânica, do caule de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em placa preparativa de sílica e sephadex LH-20, foram obtidos, da fração DMC62, 2,9 mg de uma substância incolor de cheiro vanilado.

A análise do espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6 , 400 MHz, Figura 7-30) mostrou um conjunto de sinais característicos de anel benzênico trissubstituído em δ 6,99 (dd; $J= 8,2$ e $2,0$ Hz, H-6'), em δ 7,19 (d; $J= 2,0$ Hz, H-2') e em δ 6,81 (d; $J= 8,2$ Hz, H-5'), além de um sinal em δ 3,89 (s) referente a uma metoxila.

A fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI, modo negativo, medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 167 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Com base nos dados espectrais obtidos e nos dados relatados na literatura (SAKUSHIMA et al., 1995), a substância foi identificada como ácido vanílico.

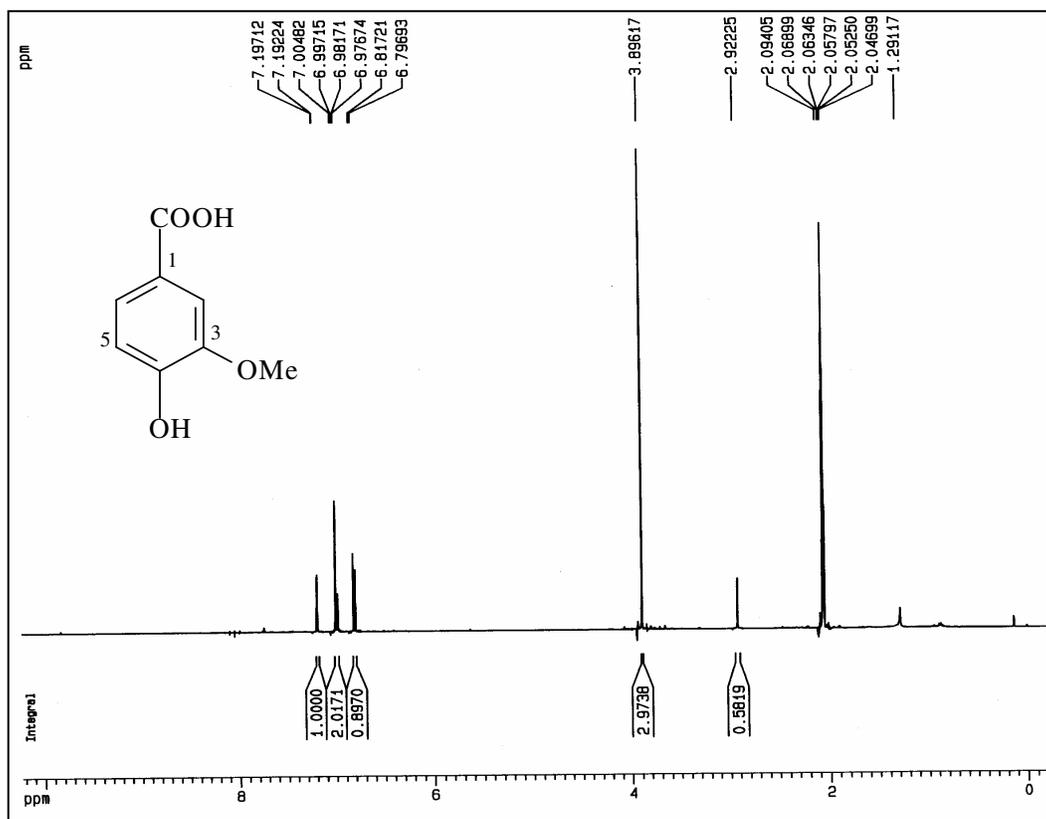


Figura 7-30- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância XIX

7.9. Identificação da Substância XLIX

O extrato metanólico, partição acetato de etila, da casca da raiz de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em sílica, sephadex LH-20 e CLAE, forneceu as frações 11se4, R19df, 11xd4 e R19c, 15,0 mg. O extrato metanólico, partição acetato de etila, do caule forneceu a fração AMC3e e a partição diclorometânica forneceu a DMC865, 15,0 mg, as quais se apresentaram como um pó branco em forma de cristais aciculares finos.

A análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) mostrou um sinal em δ 7,12 (s) integrando para 2H.

A fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 7-31), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 169 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Com base nos dados espectrais obtidos e nos dados relatados na literatura (TIAN et al., 2000), foi proposta a estrutura do ácido gálico.

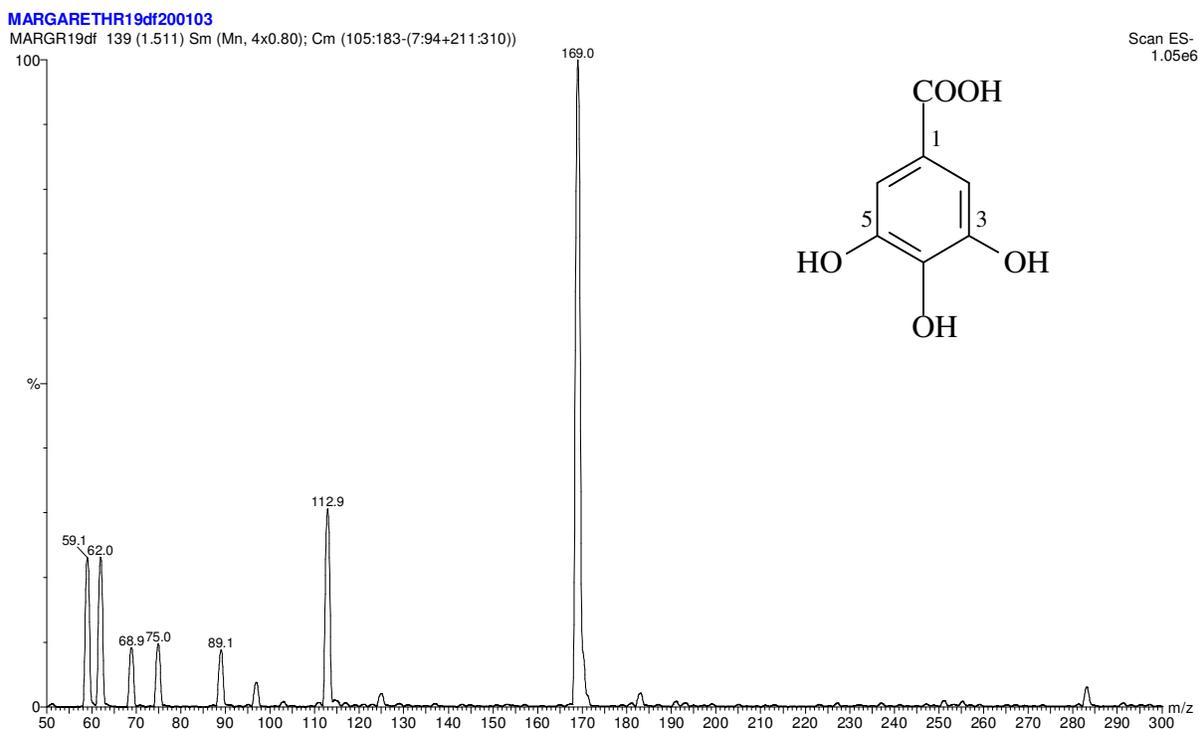


Figura 7-31- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância XLIX

7.10. Identificação da Substância L

O extrato metanólico da casca da raiz, partição acetato de etila, de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em sílica, sephadex LH-20 e CLAE, forneceu a fração 11se2, 3,5 mg, e o extrato metanólico das folhas, partição acetato de etila, forneceu a fração AMFSc5, 57,3 mg, as quais se apresentaram como um pó branco em forma de cristais aciculares finos.

A análise do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, acetona- d_6) mostrou um sinal em δ 7,25 (s) integrando para 2H e um sinal em δ 3,61(s) integrando para 6H .

A fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 7-32), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 197 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Com base nos dados espectrais obtidos e nos dados da literatura (HUNG & YEN, 2002), foi proposta a estrutura do ácido siríngico.

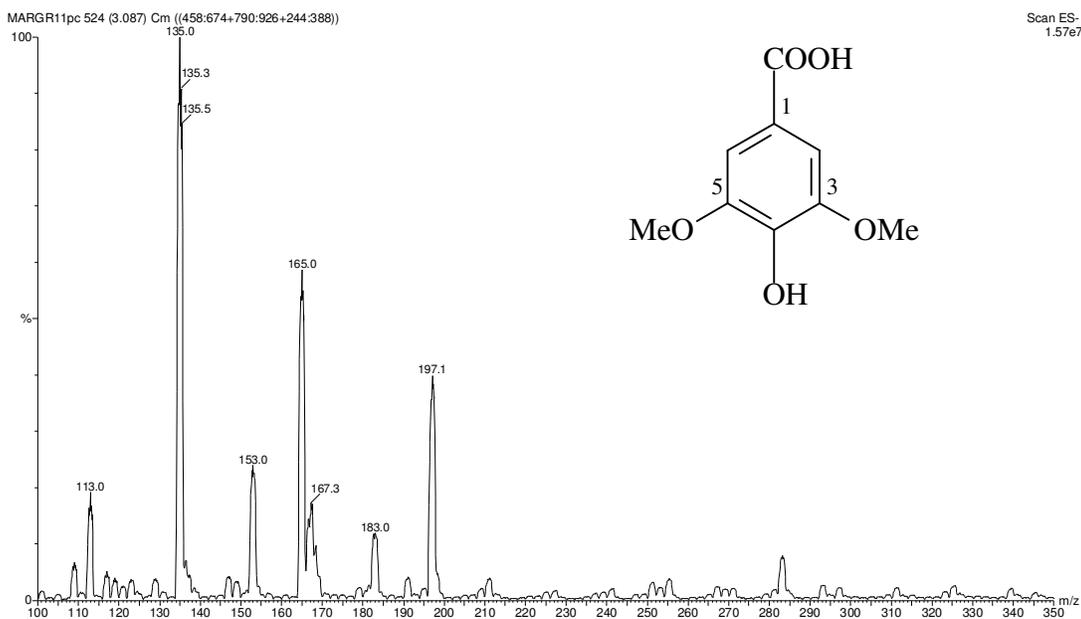


Figura 7-32- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância L

7.11. Identificação da Substância LI

Do extrato metanólico, partição acetato de etila, da casca da raiz de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, foram obtidos 100,0 mg deste ácido, como pó amarelo pálido amorfo, das frações R126d e R18a2.

A análise do espectro de RMN de ^1H (CD_3OD , 200 MHz) mostrou um sinal em δ 7,47 (s).

A fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo negativo, medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 301 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Figura 7-33).

Com base nos dados espectrais obtidos e nos dados da literatura (MÄMMELÄ et al., 2000; NAWWAR et al., 1994), foi proposta a estrutura do ácido elágico.

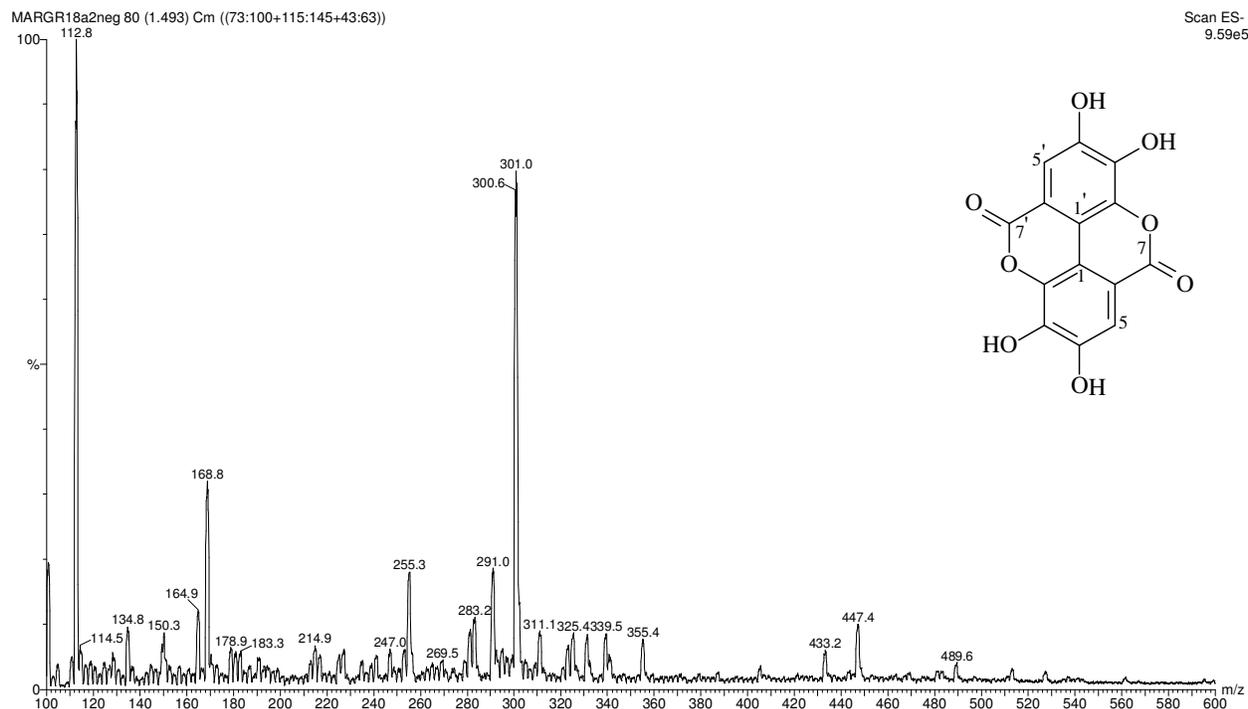
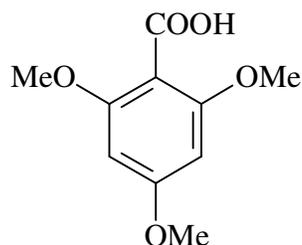


Figura 7-33- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LI

7.12. Identificação da Substância LII

ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico



Do extrato metanólico, partição diclorometânica, do caule de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em placa preparativa de sílica e sephadex LH-20, foram obtidos, da fração DMC5d5, 2,6 mg de uma substância amarela de cheiro adocicado.

A análise do espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6 , 400 MHz, Figura 7-34) revelou um sinal em δ 7,33 (s), integrando para 2H, e dois sinais em δ 3,95 e 3,90 (singletos), integrando para nove hidrogênios no total. O espectro de RMN de ^{13}C (acetona- d_6 , 100 MHz, Figura 7-35) revelou somente quatro sinais, sendo dois referentes à porção aromática em δ 146,7 e 106,7 e dois referentes às metoxilas em δ 56,5 e 52,1. Se as posições das metoxilas fossem 3, 4 e 5, a metoxila 4 deveria ter um deslocamento em cerca de δ 60,0, característica de metoxila ligada a carbono orto diortossustituído (ARRUDA, 1990), o que não foi observado no espectro.

A fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_5$, referente a 212 g/mol, não pode ser confirmada com base nos dados obtidos pelo espectro de massas devido este não haver revelado o pico do íon pseudo molecular, tanto pelo tipo de ionização por eletrospray quanto pelo APCI, no modo positivo ou negativo.

Com base nos dados espectrais obtidos e de dados relatados na literatura (RUSSEL et al., 1990), foi proposta a estrutura do ácido 2,4,6-trimetoxibenzóico.

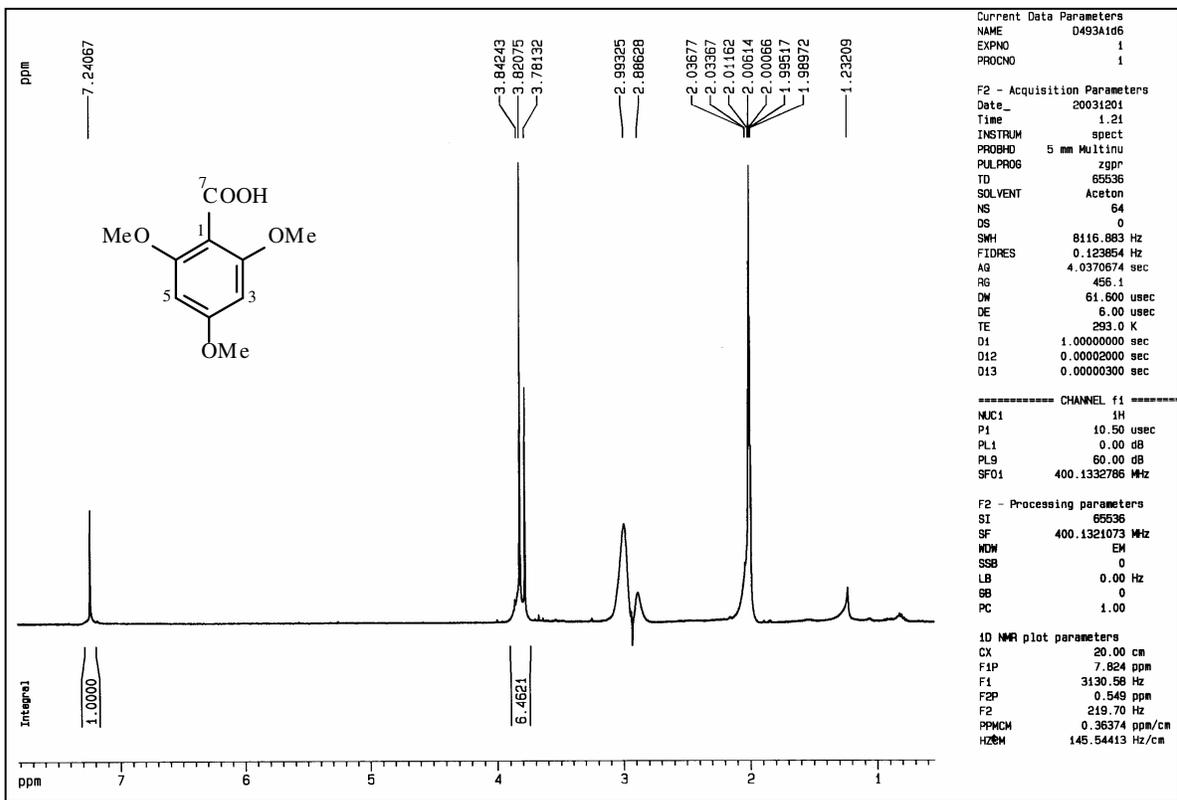


Figura 7-34- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LII

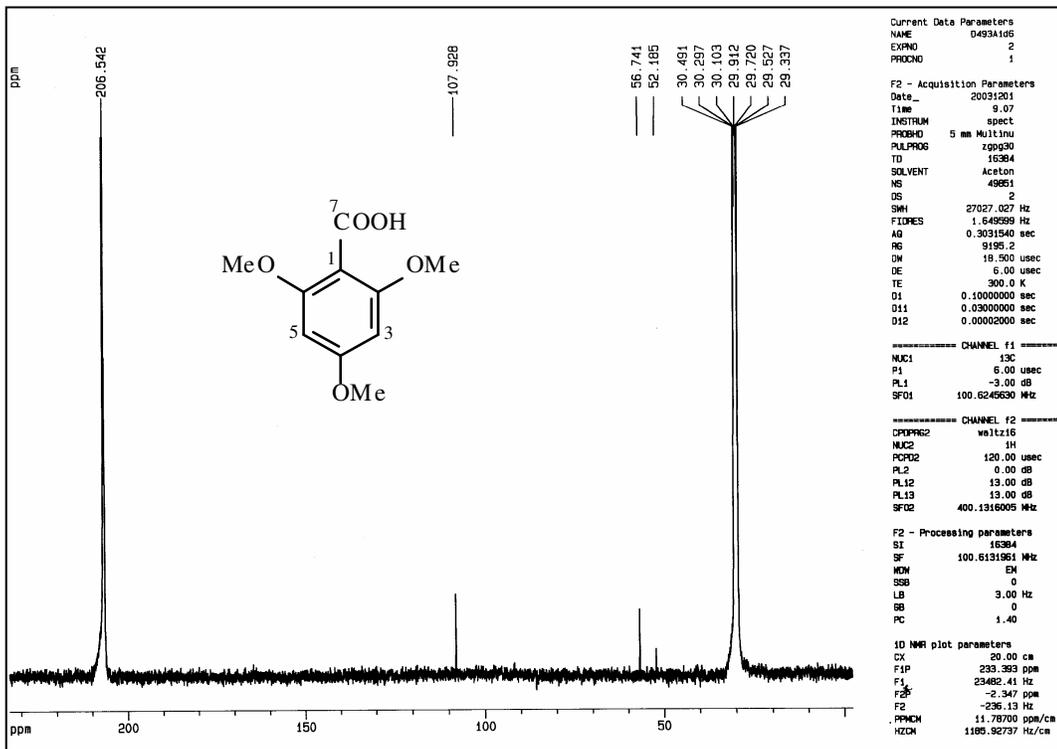
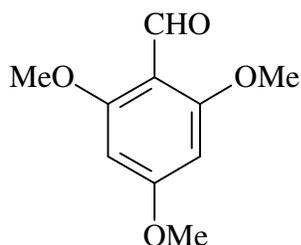
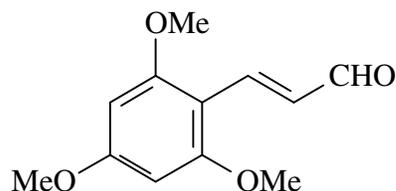


Figura 7-35- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da Substância LII

7.13. Identificação das Substâncias LIII e LIV em mistura



2,4,6-trimetoxibenzaldeído



trans-2,4,6-trimetoxifenilpropenaldeído

Do extrato metanólico, partição diclorometânica, do caule de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em placa preparativa de sílica e sephadex LH-20, foram obtidos, da fração DMC5qd, 8,3 mg de um pó amorfo amarelo, de cheiro adocicado.

A análise do espectro de RMN de ^1H (acetona- d_6 , 400 MHz, Figura 7-36) revelou um sinal em δ 9,80 (s) e um em δ 9,62 (d; $J = 7,8$ Hz), característicos de H aldeídicos; dois sinais atribuídos a uma porção fenilpropenoídica com os H olefínicos em configuração *trans*, devido apresentarem valores altos de J em δ 7,55 (d; $J = 15,8$ Hz) e δ 6,67 (dd; $J = 15,8$ e $7,6$ Hz); dois sinais em δ 7,22 e 7,07 (singletos) referentes aos hidrogênios aromáticos, química e magneticamente equivalentes; dois sinais em δ 3,97 e 3,96 (singletos intensos) relativos aos H dos grupos metoxilas.

A constituição da mistura foi confirmada com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI modo positivo, o qual apresentou três picos relativos aos respectivos íons pseudo moleculares a m/z 283 $[\text{M}+\text{H}]^+$, referente a uma substância ou aduto não identificado; m/z 223 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 197 $[\text{M}+\text{H}]^+$ das respectivas substâncias em questão com fórmulas moleculares $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ e $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

Com base nos dados espectrais obtidos e nos dados de substâncias relatadas na literatura (NEVILLE, 1972), foi proposta a estrutura do *trans*-2,4,6-trimetoxifenilpropenaldeído e do 2,4,6-trimetoxibenzaldeído.

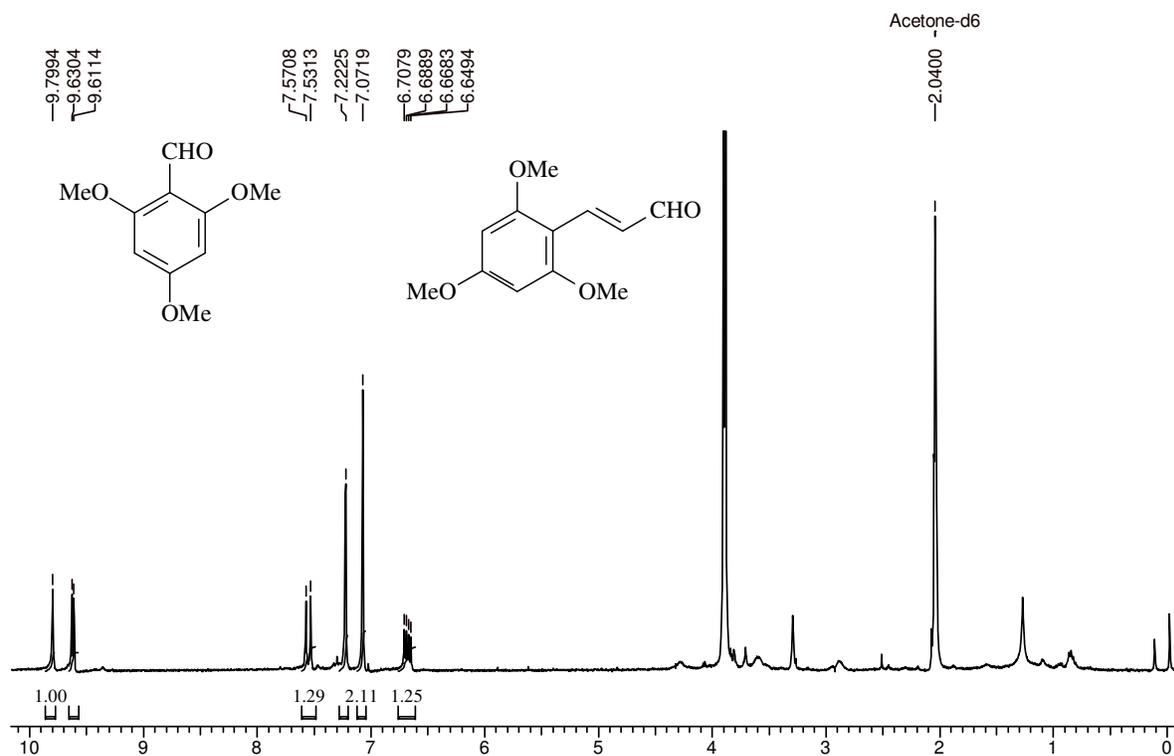
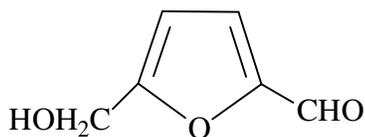


Figura 7-36- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da mistura das Substâncias LIII e LIV

7.14. Identificação da Substância LV



5-hidroxi metil-2-furfuraldeído

Do extrato metanólico, partição diclorometânica, do caule de *S. densiflora*, após várias etapas cromatográficas em sílica flash, placa preparativa de sílica e sephadex LH-20, foram obtidas as frações DMC698 e DMC7Ec, 10,0 mg, sob a forma de um óleo amarelo.

A análise do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, Figura 7-38) revelou um sinal em δ 9,60 (s, 1H) característico de H aldeídico; dois sinais em δ 7,21 e 6,52 (d, 3,6 Hz, 1H cada) peculiares de H ortoacoplados de um penta heterociclo aromático, podendo ser do tipo furano ou pirrol (KEMP, 1986; Tabela 7-7) e um sinal em δ 4,73 (s, 2H). Este mesmo sinal, no espectro realizado com acetona (acetona-d_6 , 400 MHz, Figura 7-40), se modificou em um sinal do tipo dubleto em δ 4,63 (6,0 Hz, 2H) e 4,80 (t, 6,0, 1H), mais tarde atribuídos aos H do grupo hidroximetílico e hidroxila respectivamente.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz, Tabela 7-8, Figura 7-42) mostrou um sinal em δ 178,1 que, a princípio, poderia ser atribuído a uma carbonila carboxílica, porém, consultando-se uma tabela de valores de deslocamento para C (SILVERSTEIN, 1991; Tabela 7-7), também se encaixaria como uma carbonila aldeídica conjugada pertencente a um 2-furano ou 2-pirrolcarboxialdeído, fato mais condizente com o sinal de H aldeídico observado no espectro de RMN de ^1H . Além deste, foram observados quatro sinais relativos a C sp_2 e um sinal em δ 57,5, o qual poderia ser referente a um grupo metoxila, porém sua correlação, no espectro de HSQC (acetona-d_6 , 400 MHz), com o H em δ 4,73 descartou esta hipótese, devido o sinal estar muito desblindado para ser do tipo metoxílico.

As correlações observadas nos espectros de HSQC e HMBC (acetona-d_6 , 400 MHz, Figura 7-39, Figura 7-43) contribuíram para a definição dos valores de deslocamento imputados aos respectivos átomos da molécula.

A fórmula molecular $C_6H_6O_3$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, EM/CG-IE (Figura 7-41), o qual apresentou o pico relativo ao respectivo íon molecular a m/z 126 $[M]^+$.

A estrutura da substância LV foi confirmada com base nos dados espectrais, a partir da biblioteca de compostos do CG e de dados da literatura (KULKARNI et al., 1989) como o 5-hidroximetil-2-furanocarboxaldeído ou 5-hidroximetil-2-furfuraldeído.

Segundo dados do Chemical Abstracts (1987-1991), esta substância já foi isolada de raízes de *Cirsium chlorolepis* (Asteraceae), entre outras plantas. É precursora de aminoácidos e proteínas; produto de degradação de glicose em infusão e, por isto, indicador de qualidade do café. Também é uma das substâncias responsáveis pelo aroma de biscoitos assando e chocolate.

O furfuraldeído é um produto característico de pentoses quando tratadas com ácido (MORRISON & BOYD, 1972; Figura 7-37). Como o extrato não foi submetido a tratamento semelhante, talvez a substância identificada seja produto de degradação natural de hexoses ou pentoses, muito abundantes na planta.

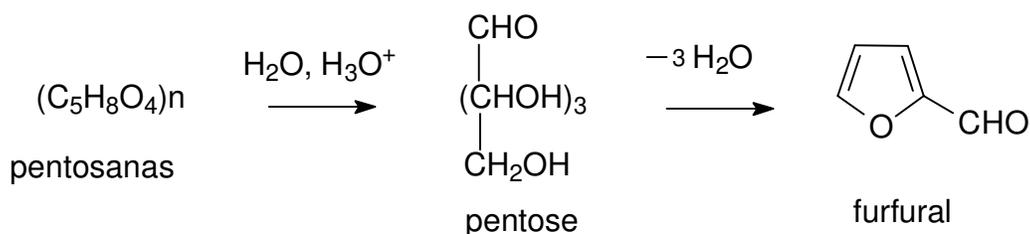
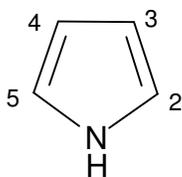


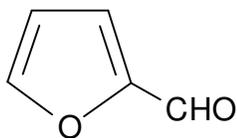
Figura 7-37- Reação de degradação ácida de pentoses (MORRISON & BOYD, 1972)



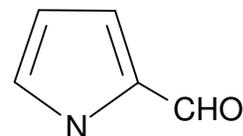
furano



pirrol



furano-2-carboxaldeído



pirrol-2-carboxaldeído

Tabela 7-7- Dados de deslocamentos de RMN ^{13}C , ^1H e J para o pirrol, furano e respectivos 2-carboxaldeídos ^a

J	(1-2)	(1-3)	(2-3)	(2-4)	(2-5)	(3-4)
J (Hz) furano			1,3-2,0	0-1	1-2	3,1- 3,8
J (Hz) pirrol	2-3	2-3	2-3	1-2	1,5-2,5	3-4
Posição	2	3	4	5	CHO	
δ ^{13}C furano	144,0	111,0				
δ ^1H furano	7,4	6,3				
δ ^{13}C pirrol	118,0	108,0				
δ ^1H pirrol	6,5	6,1				
δ ^{13}C furano- 2- carboxaldeído	153,3	121,7	112,9	148,5	178,2	
δ ^{13}C pirrol-2- carboxaldeído	134,0	123,0	112,0	129,0	178,9	

^a (SILVERSTEIN, 1991; KEMP, 1986)

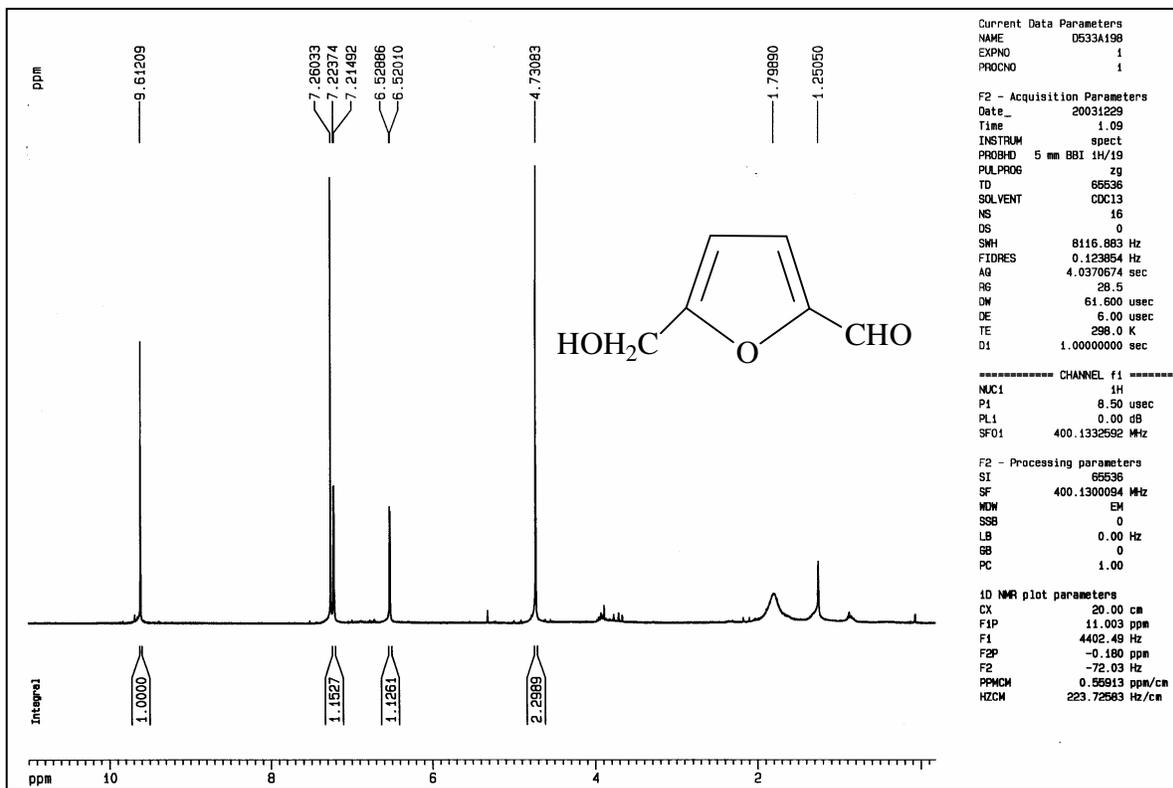


Figura 7-38- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da Substância LV

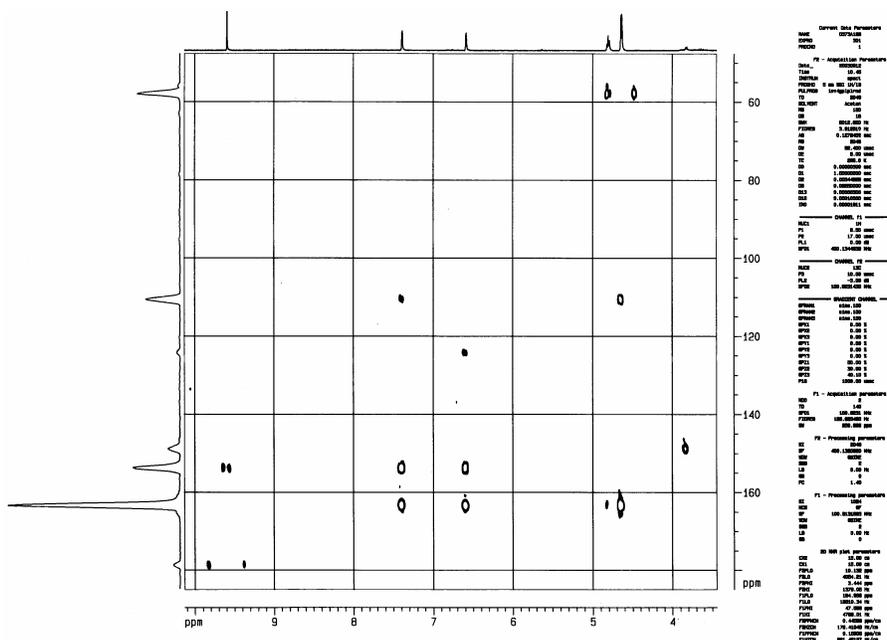


Figura 7-39- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LV

Current Data Parameters
 NAME D373A198
 EXPNO 10
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20030912
 Time 10.29
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 4H/19
 PULPROG zg
 TD 65536
 SOLVENT Aceton
 NS 128
 DS 0
 SWH 8012.820 Hz
 FIDRES 0.122266 Hz
 AQ 4.0684866 sec
 RG 2.5
 DW 62.400 usec
 DE 6.00 usec
 TE 293.0 K
 D1 1.00000000 sec

CHANNEL f1

NUC1 1H
 P1 8.50 usec
 PL1 0.00 dB
 SF01 400.134638 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.132087 MHz
 MW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 9.960 ppm
 F1 3993.18 Hz
 F2P 1.559 ppm
 F2 623.84 Hz
 PPM0H 0.42103 ppm/cm
 HZ0H 168.46744 Hz/cm

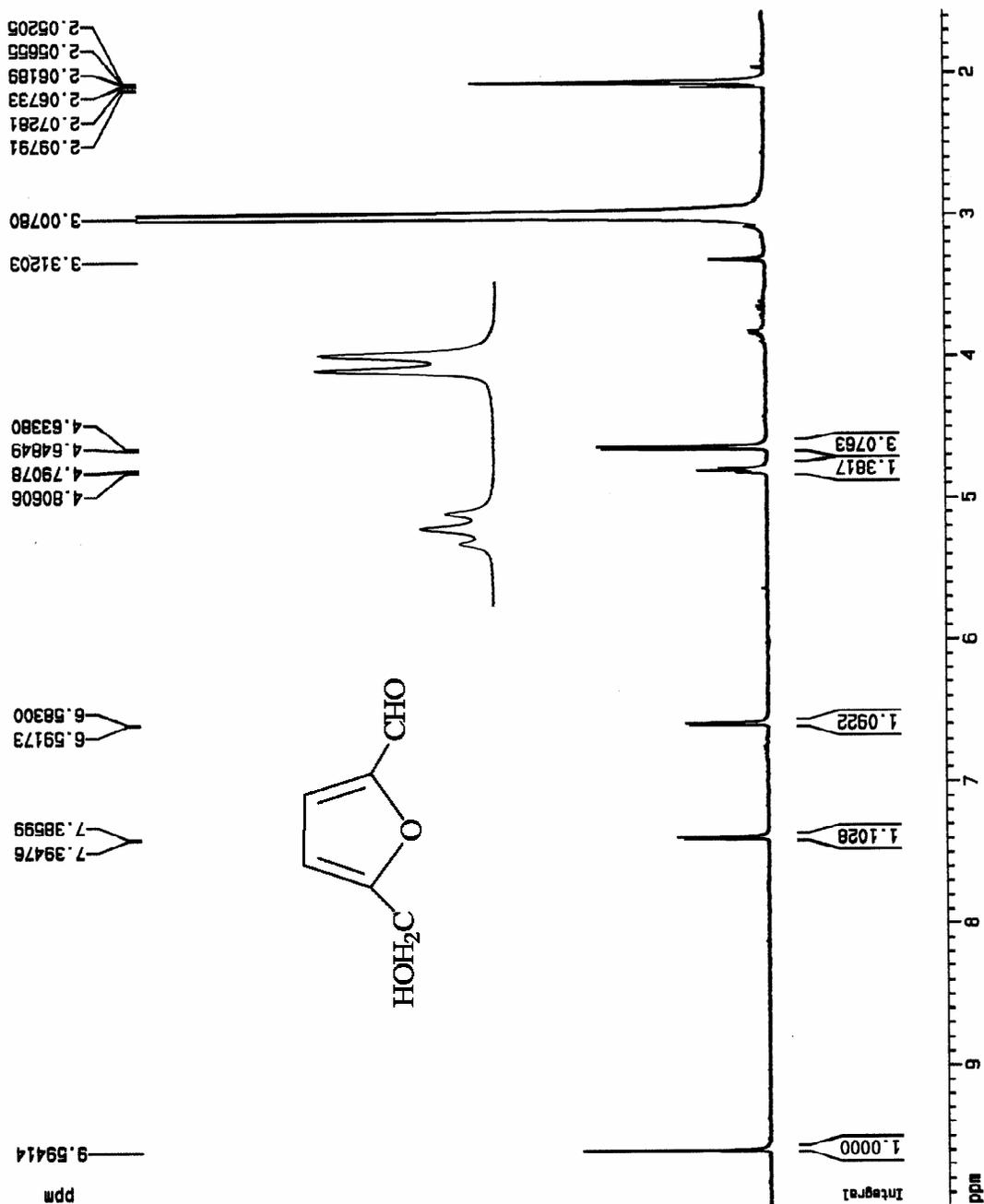


Figura 7-40- Espectro de RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆) da Substância LV

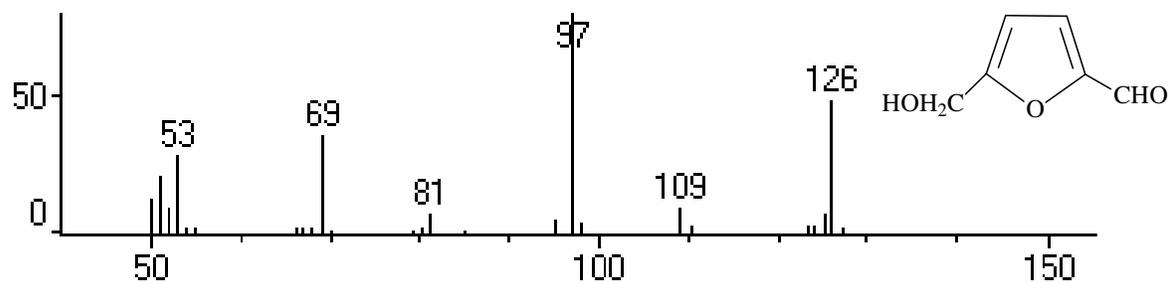


Figura 7-41- Espectro de massas, EM/CG-IE, da Substância LV

Rampa: 100/1/7/250/5; tempo de retenção do aldeído: 5,4 minutos

Tabela 7-8- Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), ^1H (400 MHz, acetona- d_6) e $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LV

Posição	δ C	δ H (J em Hz)	HMBC
2	153,4		
3	123,7	7,38 (d, 3,5)	H3-C4, C2, C5
4	110,2	6,58 (d, 3,5)	H4-C3, C2, C5
5	162,9		
CHO	178,1	9,59 (s)	CHO-C2
CH ₂ OH	57,5	4,63 (d, 6,0)	CH ₂ OH-C4 e C5
CH ₂ OH		4,80 (t, 6,0)	CH ₂ OH-C5

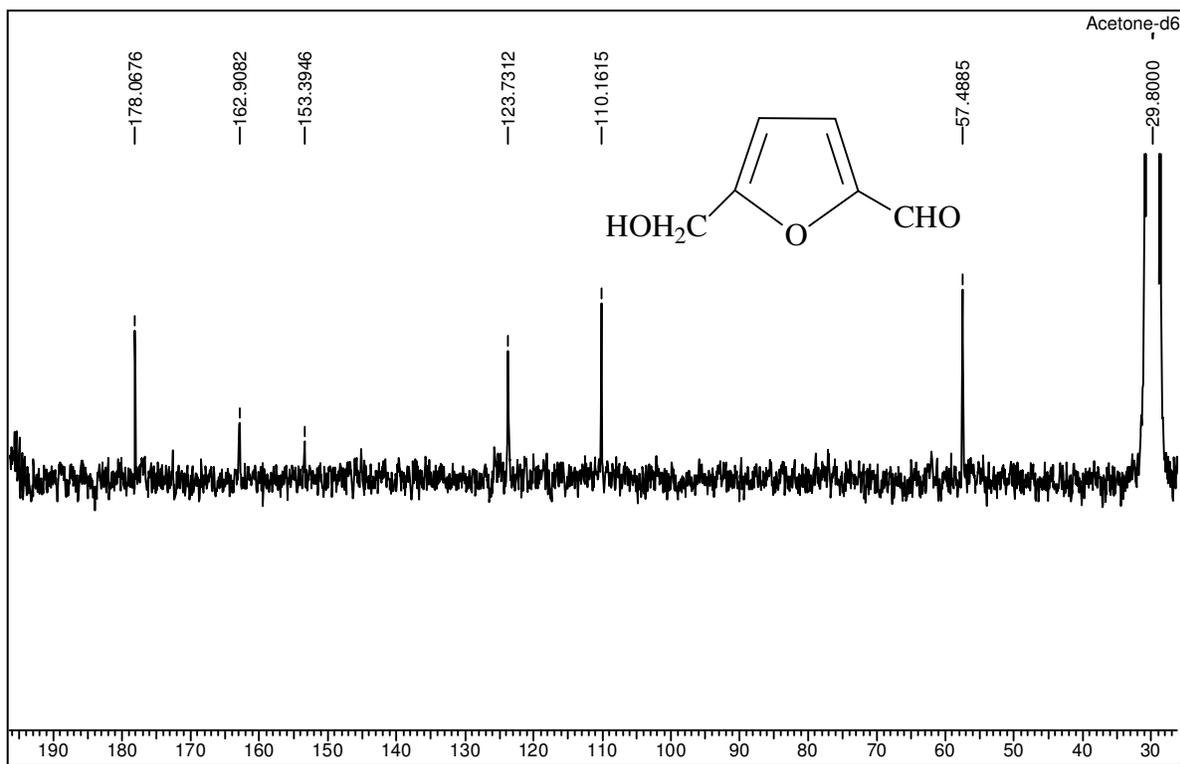


Figura 7-42- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da Substância LV

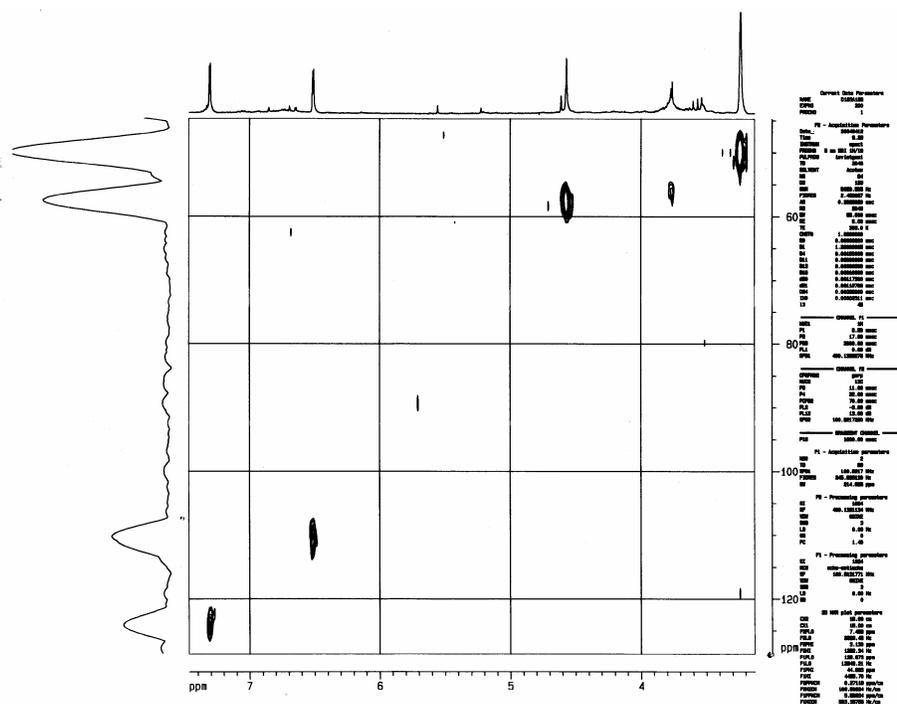
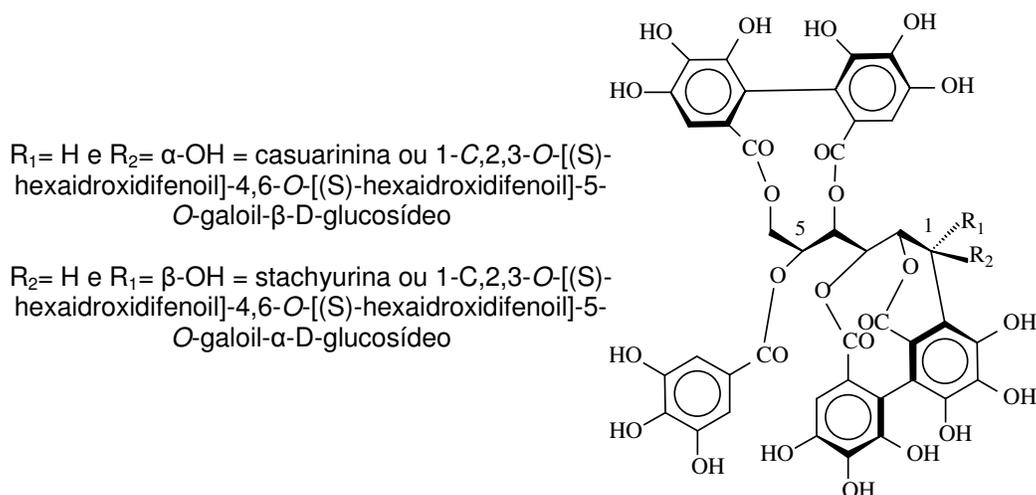


Figura 7-43- Espectro de ^1H ^{13}C HSQC (400 MHz, acetona-d₆) da Substância LV

7.15. Identificação das Substâncias LVI e LVII em mistura



O extrato metanólico de casca da raiz, de caule e folhas de *S. densiflora*, partição acetato de etila, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceu as frações R11xf, R19hj, R12j, R12h, R127, R20H e AMC6w, 130,0 mg, sob a forma de pó marrom avermelhado cristalino brilhante.

A fração R20H foi eluída com AcOEt/HAc 95:5 em CCDA e revelada com vanilina sulfúrica, originando uma mancha verde; com FeCl_3 , uma mancha azul escura.

A análise do espectro de RMN de ^1H da fração R19hj (200 MHz, CD_3OD) revelou sinais característicos de tanino hidrolisável: um sinal em δ 7,06 (1 singlete para 2H, grupo galoil) e três sinais em δ 6,80; 6,48 e 6,36 (3 singletos, 1H cada, referente ao grupo hexaidroxidifenoil-HHDP), e sinais de H carbinólicos entre δ 5,51-4,01, sendo o sinal em δ 5,50 (d; $J = 4,8$ Hz) atribuído ao H anomérico em configuração β (conseqüentemente OH em α). Uma semana após, sem retirar-se a amostra do tubo de ressonância, o espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , Figura 7-46) revelou ainda um sinal em δ 6,00 (d; $J = 1,9$ Hz), o qual foi atribuído ao H anomérico em configuração α (conseqüentemente OH em β), devido à constante de acoplamento pequena. Segundo a literatura (MULLER, 1994; SPENCER et al., 1990), os taninos são muito sensíveis ao solvente em que se encontram, e a solvatação tem papel muito importante na determinação das propriedades dos polifenóis, podendo a unidade de açúcar assumir conformações diferentes, o que explicaria o aparecimento de valores de deslocamentos e J diferentes para os hidrogênios carbinólicos, mas não um sinal de H anomérico em configuração α se revelando posteriormente, o qual se manteve no

espectro, mesmo depois de 2 semanas passadas no tubo, e em maior proporção do que o sinal do H anomérico referente à configuração β . Após seca a amostra anterior e redissolvida em acetona- d_6 /D $_2$ O (Figura 7-47), o fenômeno de mistura também ocorreu, ficando em maior proporção os sinais referentes à substância de hidrogênio anomérico em configuração β . Mais tarde, foi realizado o espectro da fração AMC6w, sendo esta identificada como a casuarinina pura (400 MHz, acetona- d_6 /D $_2$ O, Figura 7-48).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD $_3$ OD, Figura 7-45, Tabela 7-9), feita no mesmo dia em que se fez o primeiro espectro de RMN de ^1H em CD $_3$ OD, porém 8h depois, revelou 4 sinais de carbonila de éster (sendo que o sinal em δ 167,6 estava de intensidade duplicada), diversos sinais entre δ 147,6-105,5 e 9 sinais de C carbonílicos, caracterizando uma mistura. O espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, CD $_3$ OD, Figura 7-44, Tabela 7-9), realizado uma semana depois, revelou somente 6 sinais referentes ao açúcar, sendo o de valor mais desblindado, δ 79,7, atribuído a C-2, característica de taninos C-glicosídicos com o centro anomérico em configuração α . Apenas um sinal referente a CH $_2$ em δ 65,1, com o restante relativo a CH, incluindo-se 4 sinais entre δ 110,2-106,8 de CH aromático. Foi feito um espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, acetona- d_6 , Figura 7-51), de outra fração, R11xe, identificada como a Substância LVI pura e somente 6 sinais de açúcar foram observados, sendo o de valor mais desblindado, δ 76,5, atribuído a C-2, característica de taninos C-glicosídicos com o centro anomérico em configuração β .

A hipótese para explicar tal fato é que talvez possa ter ocorrido uma reação de epimerização da casuarinina (já que o centro anomérico se encontra livre de acilação) devido presença de impurezas ácidas no solvente deuterado, ou mesmo uma solvólise, formando-se como intermediário um carbocátion benzílico no C-1 (segundo QUIDEAU & FELDMAN (1996), esta espécie tem sido sugerida como intermediário na geração de taninos elágicos C-glicosídicos substituídos na posição 1 por flavan-3-ol), sendo este atacado na face mais estável e desimpedida pelo grupo hidroxila da água e a stachyurina, com a hidroxila em β , seja um artefato (proposta de reação no Esquema 7-1), pois ela não foi encontrado em outras frações dos extratos pesquisados.

Segundo YOSHIDA et al. (1991), a vescalagina e stachyurina sofreram solvólise em condições brandas (37 $^\circ$ C, 12 h), quando tratadas com MeOH/F $_3$ CCOOH

ou MeOH, transformando-se nos respectivos produtos C-1 metoxilados, mantendo-se a configuração β . Já a castalagina e casuarinina não foram afetadas sob as mesmas condições (100 h depois ou 4 dias). A explicação para tal fato baseou-se no menor impedimento estérico na posição β de C-1 e/ou a estabilização do grupo α -hidroxila de C-1 por ligação hidrogênio com o grupo hidroxila vizinho da parte HHDP no C-1/O-2/O-3. No nosso caso, a exposição ao solvente/água foi maior, o que pode justificar a reação ocorrida.

O grupo HHDP apresenta atropoisomerismo. Sua configuração absoluta pode ser determinada através da análise do espectro de dicroísmo circular do tanino correspondente, o qual deve ser previamente metilado e depois degradado por metanólise ou por via enzimática: o efeito Cotton positivo corresponde à configuração R e o negativo é devido à configuração S. Estes efeitos Cotton estão associados às bandas do espectro de UV originadas da conjugação do grupo bifênil (OKUDA et al., 1982). A teoria de Schmidt e Haslam, para a estereoquímica de taninos elágicos que suportam grupos HHDP nas posições 2,3- e 4,6- do esqueleto de açúcar na conformação 4C_1 , o mais termodinamicamente estável, é que os (S)-atropisômeros são predominantes (FELDMAN & SMITH, 1996).

Os deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios e carbonos foram baseados na interpretação das correlações obtidas nos espectros de ${}^1\text{Hx}{}^{13}\text{C}$ de HMBC e HSQC (Figura 5-49, Figura 7-52, Tabela 7-11).

A fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{28}\text{O}_{26}$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas, ESI, modo negativo (Figura 7-50), medida no pico do íon pseudo molecular a m/z 935 $[\text{M-H}]^-$. Além deste, o espectro apresentou fragmentos característicos da perda de ácido gálico $[\text{M-H-152}]^-$ e moléculas de HHDP $[\text{M-H-302}]^-$.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e na comparação com dados da literatura (OKUDA et al., 1983; OKUDA et al., 1989; Tabela 7-9, Tabela 7-10), foram propostas as estruturas da casuarinina, ou 1-C,2,3-O-[(S)-hexaidroxidifenoil]-4,6-O-[(S)-hexaidroxidifenoil]-5-O-galoil β -D-glucosídeo, e da stachyurina, ou 1-C,2,3-O-[(S)-hexaidroxidifenoil]-4,6-O-[(S)-hexaidroxidifenoil]-5-O-galoil α -D-glucosídeo.

Tabela 7-9- Dados dos espectros de RMN ¹³C e DEPT135 (50 MHz) das Substâncias LVI e LVII e da casuarinina e stachyurina

Posição	Substância LVII		Substância LVI	
	δ de RMN ¹³ C/DEPT-135 (CD ₃ OD)	δ de RMN ¹³ C stachyurina ^a	δ de RMN ¹³ C/DEPT-135 (CD ₃) ₂ CO	δ de RMN ¹³ C casuarinina ^a
Glicose				
C-1	63,2	65,0	67,3	71,1
C-2	79,7	81,0	76,5	76,7
C-3	67,3	70,9	69,6	67,8
C-4	73,9	73,3	73,9	74,3
C-5	69,8	72,0	70,9	69,8
C-6	65,1	64,5	64,3	64,5
C=O	167,6 (2); 169,9; 170,8; 171,4	168,9; 168,8; 168,4; 165,7; 165,2		170,3; 169,5; 169,2; 166,4; 165,0
Galoil				
C-1	125,5	125,2		125,4
C-2, -6	110,2 e 108,9	110,1 (2)	109,7	110,5
C-4	140,7	139,1		139,6
HHDP e galoil				
C-3, 5	143,3; 147,6;	144,5; 146,5; 145,9		145,0; 146,8;
C-3', 5'	145,1; 145,8; 146,1 (3); 140,7; 146,8 (2)	(2); 145,7; 145,2 (2); 144,4; 144,1; 143,4		146,4 (3); 145,7 (2); 145,2; 144,0; 144,1
HHDP				
C-1, 1'	127,3; 127,9; 127,1; 121,0	127,0; 127,9; 127,0; 122,8; 120,9		127,5; 128,0; 121,4; 121,0
C-2, -2'	118,3; 117,3	115,7; 116,0 (2); 115,2		116,3; 116,5; 116,1; 115,4
C-4, -4'	136,2; 138,2; 137,5	136,7; 137,8; 135,9; 135,0		137,3; 138,8; 136,3; 135,3
C-6, 6'	107,4; 106,8	108,6; 107,3; 105,7; 119,1*	108,0; 106,7; 104,9	108,7; 107,5; 105,7; 117,4*

^a (50 MHz, (CD₃)₂CO; OKUDA et al., 1983; OKUDA et al., 1989); *Carbono ligado ao C da glicose

Tabela 7-10- Dados dos espectros de RMN ¹H (400 MHz, δ em ppm e *J* em Hertz) das Substâncias LVI e LVII e da casuarinina e stachyurina

Posição	stachyurina ^a	Substância LVII (CD ₃ OD)	casuarinina ^a	Substância LVI pura (acetona-d ₆ /D ₂ O)	Mistura LVI + LVII (acetona-d ₆ /D ₂ O)
Glicose					
1	4,93 (d; 2,0)	6,00 (d; 1,9)	5,64 (d; 5,0)	5,53 (d; 5,0)	5,63 (d; 5,0)
2	4,86 (t; 2,0)	5,26 (m)	4,67 (dd; 2,0 e 5,0)	4,58 (dd; 2,0 e 5,0)	5,48 (m)
3	4,98 (t; 2,0)	5,26 (m)	5,39 (sl)	5,39 (m)	5,48 (m)
4	5,62 (dd; 2,0 e 9,0)	5,53 (dd; 9,7 e 2,0)	5,39 (sl)	5,39 (m)	5,50 (dd; 2 e 8,7)
5	5,36 (dd; 3,0 e 9,0)	5,34 (dd; 9,7 e 3,9)	5,39 (sl)	5,26 (dd; 8,7 e 2,6)	5,36 (dd; 3,1 e 8,7)
6	4,84 (dd; 3,0 e 13,0)	3,95 (d; 13,2)	4,18 (dd; 3,0 e 13,0)	4,80 (dd; 13,7 e 3,8)	4,90 (dd; 3,5 e 13,3)
	4,02 (d; 13,0)	5,00 (dd; 13,2 e 3,9)	4,06 (d; 13,0)	4,02 (d; 13,1)	4,03 (d; 13,3)
Galoil H-2 e 6	7,14 (s)	7,12 (s)	7,12 (s)	7,13 (s)	7,14 (s)
HHDP H-6 e 6'	6,50 (s)	6,38 (s)	6,49 (s)	6,53 (s)	6,53 (s)
	6,55 (s)	6,54 (s)	6,56 (s)	6,58 (s)	6,58 (s)
	6,82 (s)	6,85 (s)	6,78 (s)	6,88 (s)	6,88 (s)

^a (200MHz, (CD₃)₂CO; OKUDA et al., 1983; OKUDA et al., 1989)

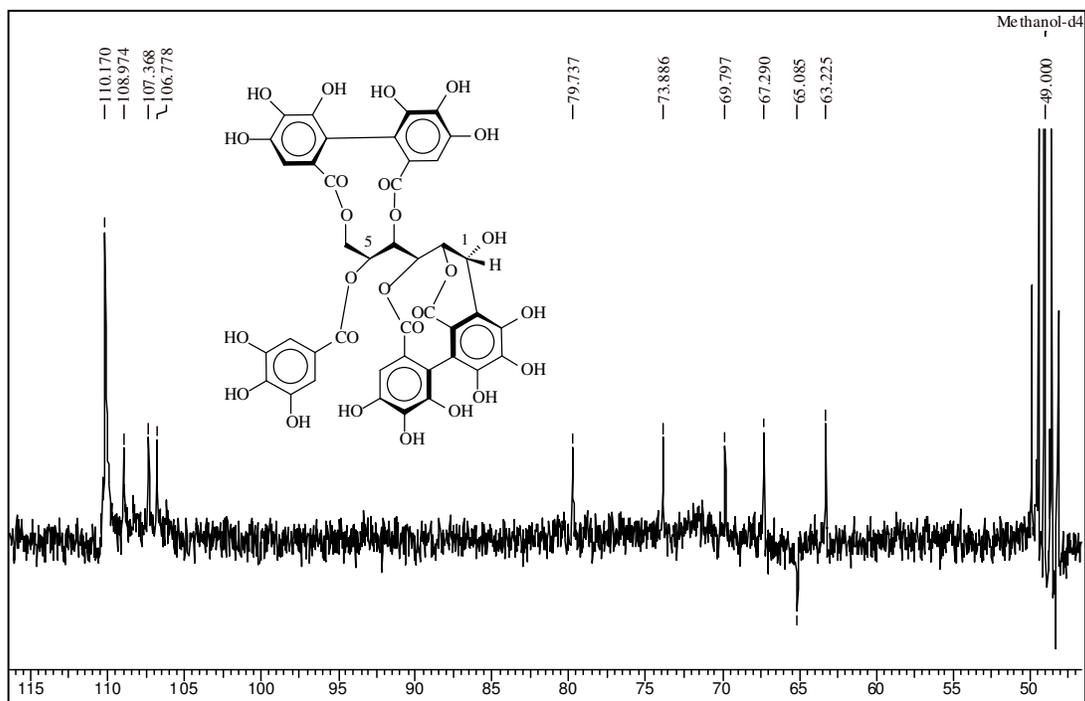


Figura 7-44- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, CD_3OD) da Substância LVII

Observação: espectro obtido com amostra depois de uma semana no tubo de RMN

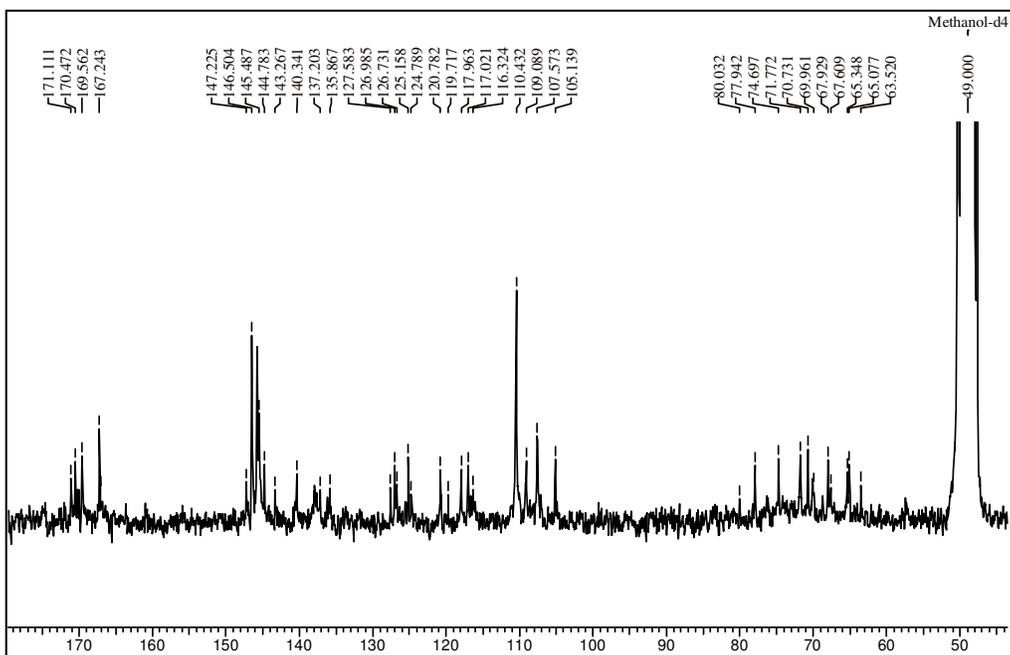


Figura 7-45- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVI e LVII

Espectro obtido no mesmo dia em que se colocou a amostra no tubo, porém 8h depois da preparação.

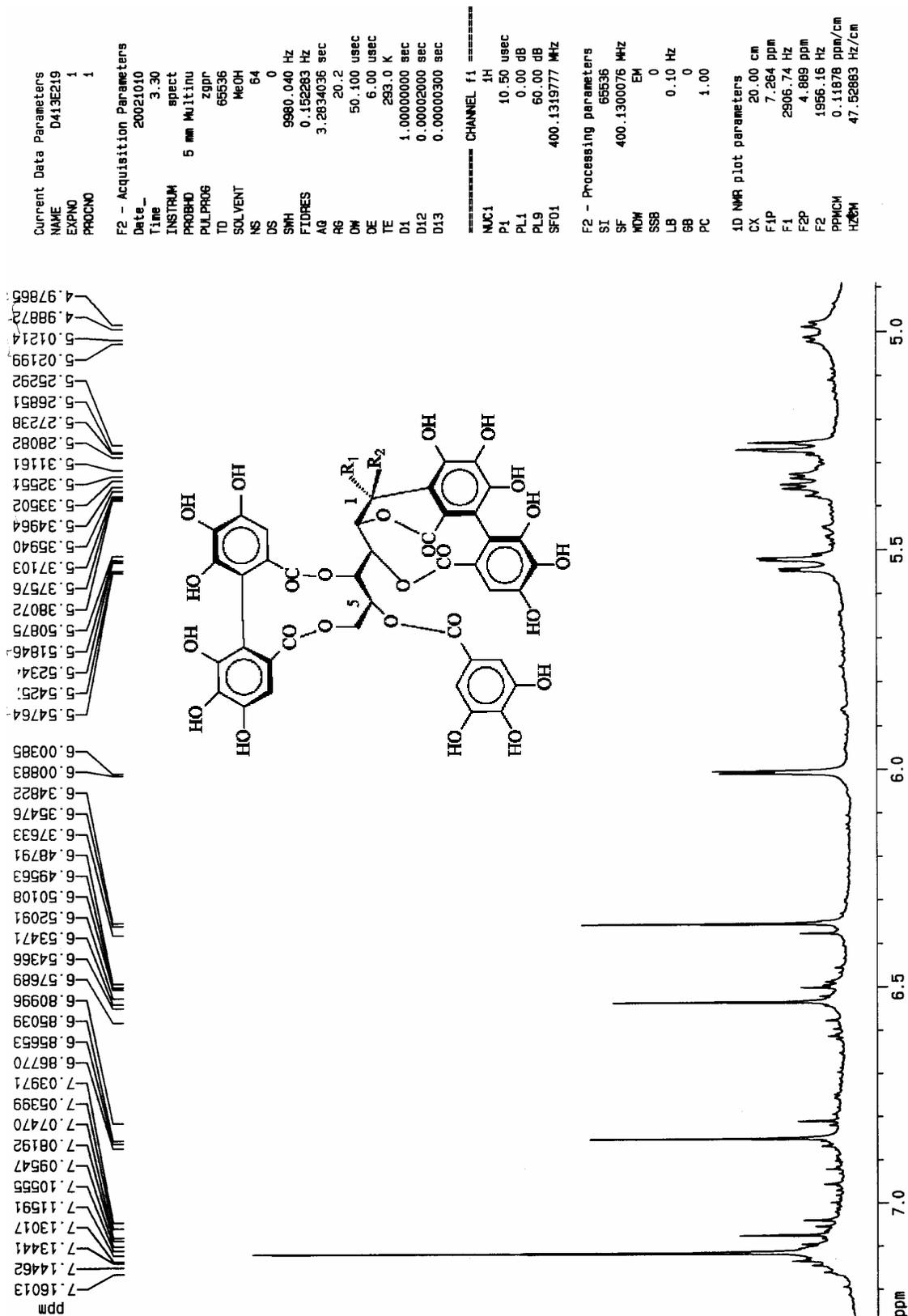


Figura 7-46- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) da mistura das Substâncias LVI e LVII

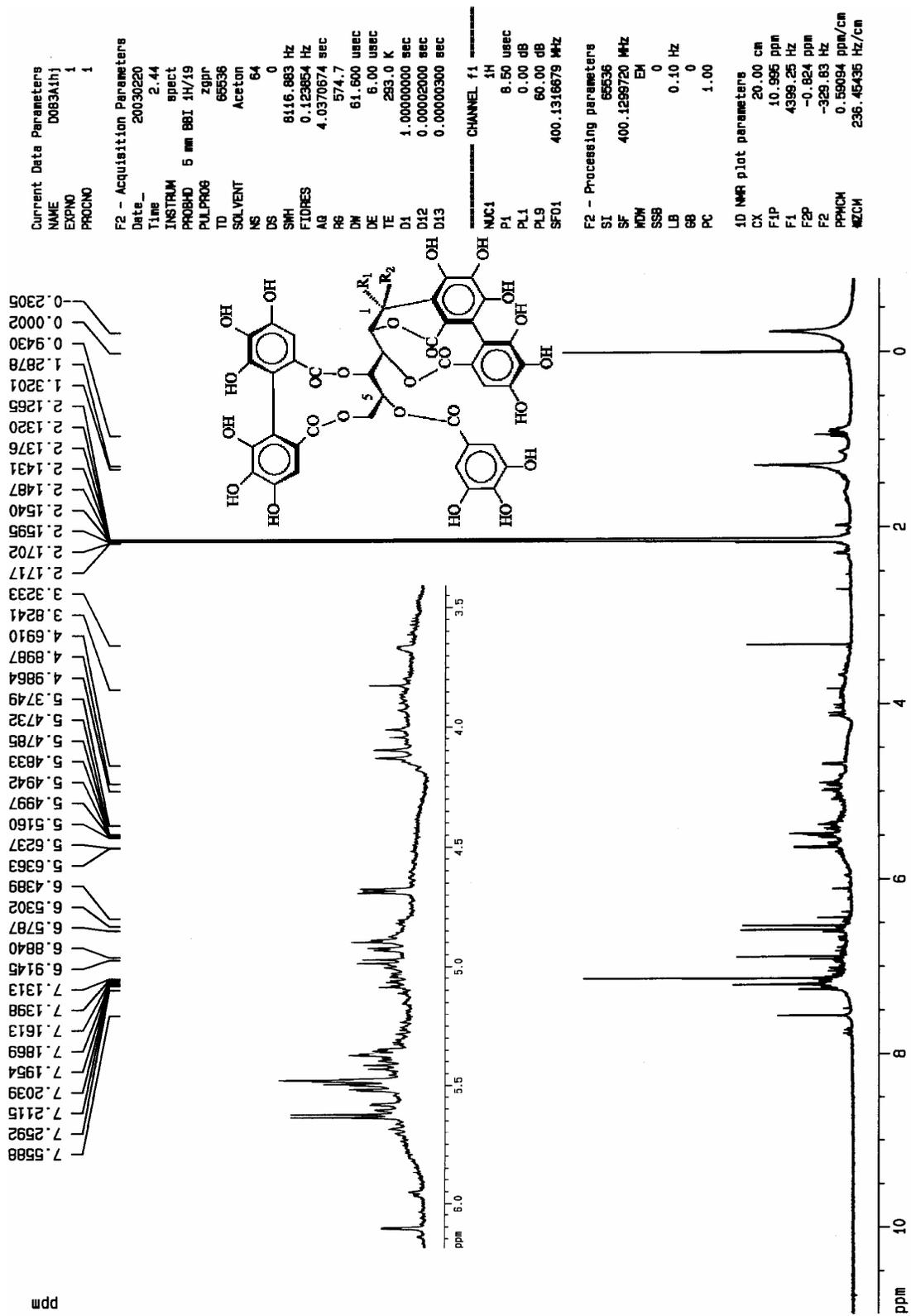


Figura 7-47- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆/D₂O) da mistura das Substâncias LVI e LVII

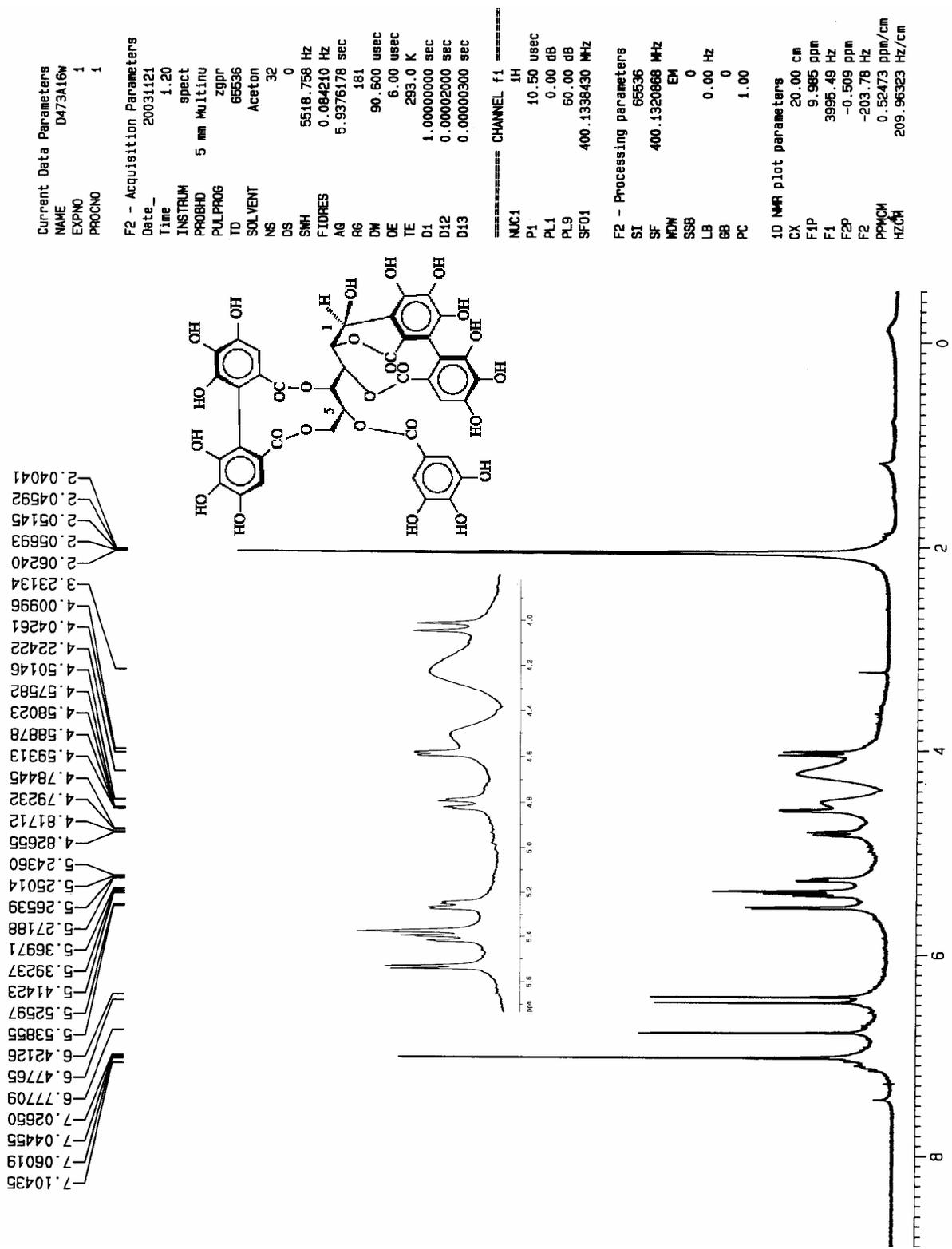


Figura 7-48- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, acetona-d₆/D₂O) da Substância LVI

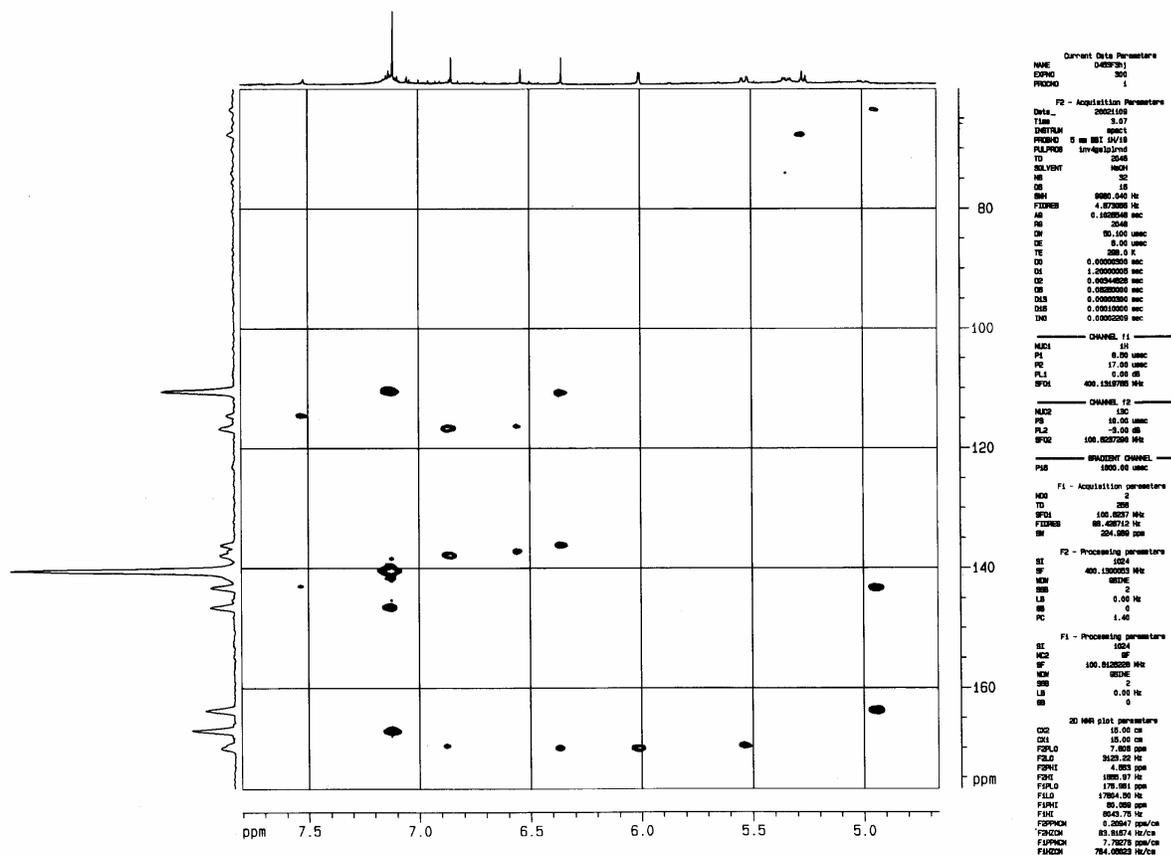


Figura 7-49- Espectro de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da Substância LVII

Tabela 7-11- Dados dos espectros de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) e HSQC (400 MHz, acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$) da mistura das Substâncias LVI e LVII

Posição	δ H CD_3OD	$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC	δ H Acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$	$^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC
1	6,00 (d; 1,9)	171,4 (C=O)	5,63 (d; 5,0)	67,3
2	5,26 (m)	67,3 (C3)	5,48 (m)	-
3	5,26 (m)	-	5,48 (m)	69,6
4	5,53 (dd; 9,7 e 2,0)	170,8 (C=O)	5,50 (dd; 2,0 e 8,7)	73,9
5	5,34 (dd; 9,7 e 3,9)	74,0 (C4)	5,36 (dd; 3,1 e 8,7)	70,9
6	5,00 (dd; 13,2 e 3,9)	167,6 (C=O)	4,03 4,90	64,3

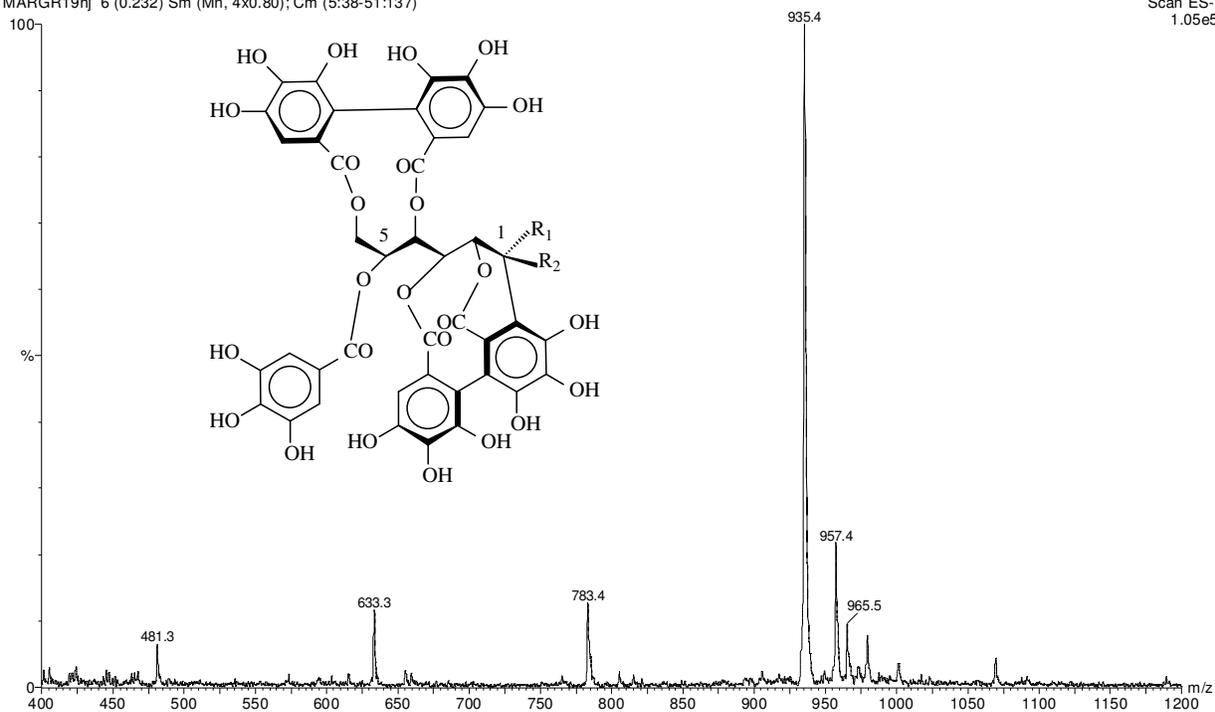


Figura 7-50- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LVI e LVII

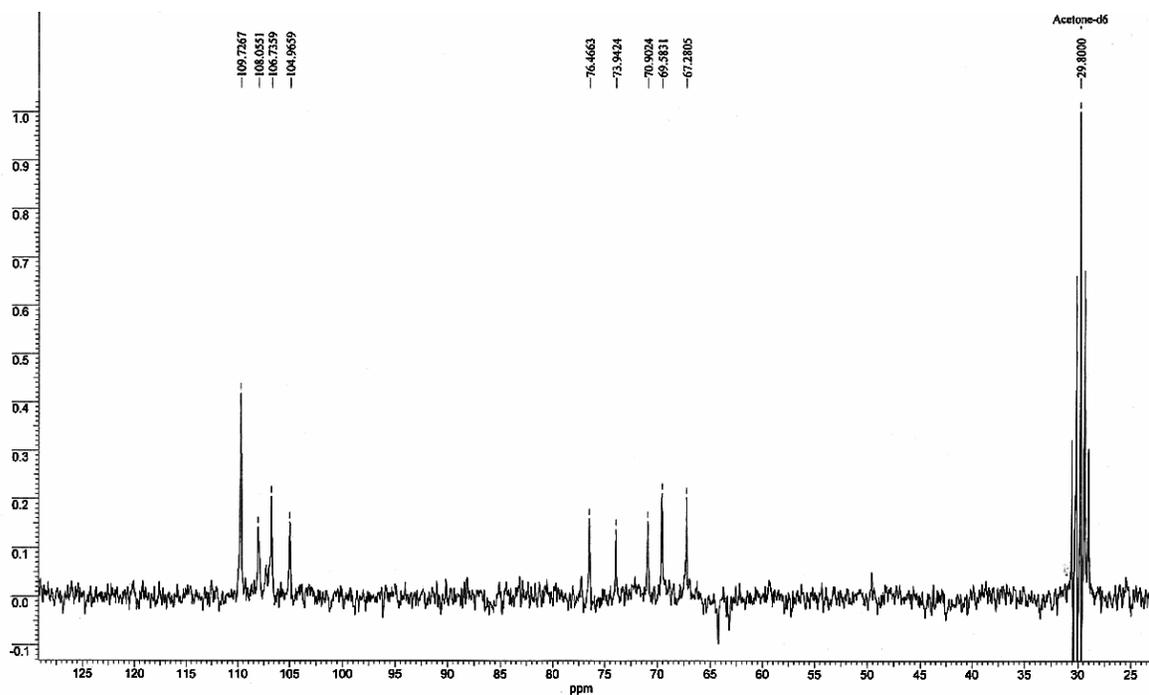


Figura 7-51- Espectro de RMN de ¹³C/DEPT135 (50 MHz, acetona-d₆) da Substância LVI

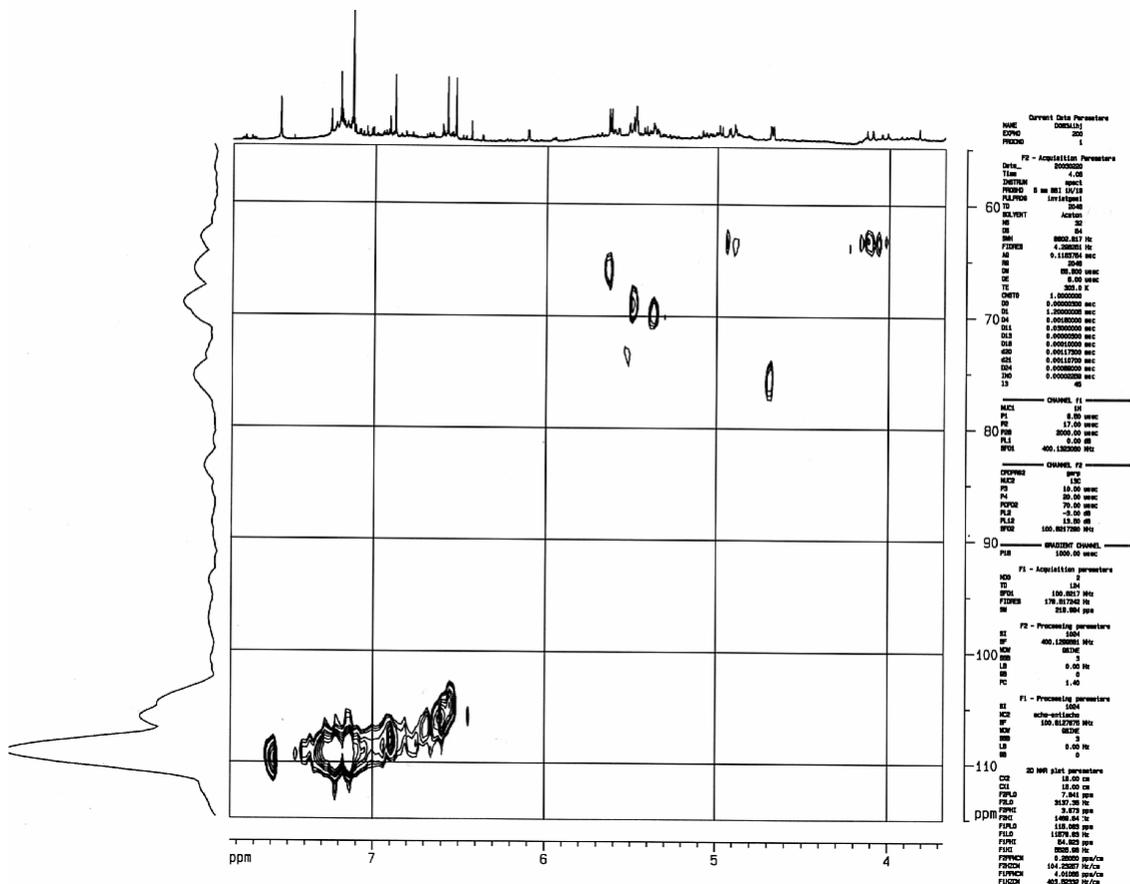
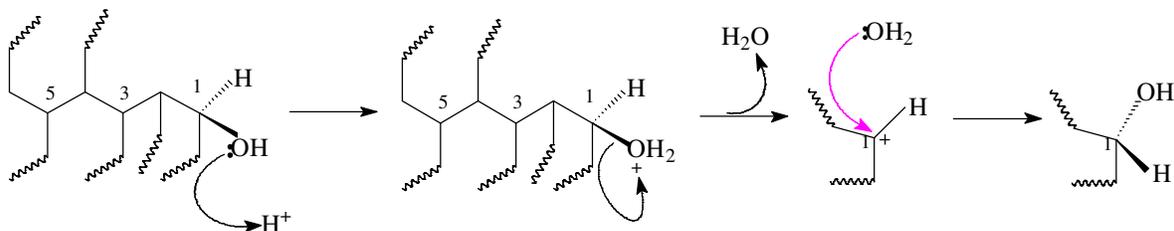
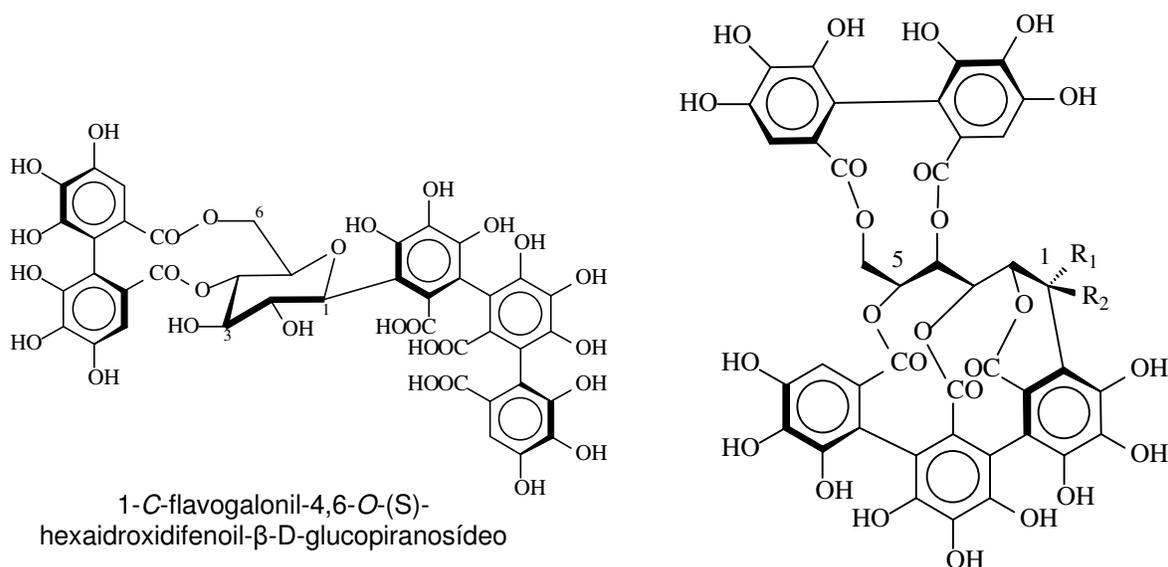


Figura 7-52- Espectro de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$) da mistura das Substâncias LVI e LVII



Esquema 7-1- Proposta de reação ocorrida com a Substância LVI para troca de configuração do centro anomérico

7.16. Identificação das Substâncias LVIII, LXVIII e LIX em mistura



O extrato metanólico da casca da raiz e do caule de *S. densiflora*, partição acetato de etila, e o extrato metanólico de caule, partição *n*-butanol, após várias etapas cromatográficas em sílica e sephadex LH-20, forneceram as frações R19hg, R126a, R12i7, R20F, AMC6z e BMCl, 200,0 mg, sob a forma de pó marrom avermelhado cristalino brilhante.

O eluente usado em CCDA foi AcOEt/HAc 95:5. Revelada com vanilina sulfúrica, a fração originou uma mancha verde e com FeCl₃, uma mancha azul escura. A análise do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO/D₂O, Figura 7-53) da fração R20F revelou sinais característicos de tanino hidrolisável: 3 sinais em δ 6,70, 6,67 e 6,55 (3 singletos, 1H cada, podendo pertencer a um grupo hexaidroxidifenoil (HHDP) e outro nonaidroxitrifenoil ou valeonil), e sinais de H carbinólicos entre δ 5,61-3,94, sendo o sinal em δ 5,60 (d; *J* = 4,6 Hz) atribuído ao H anomérico de um tanino C-glicosídico em configuração β (OH em configuração α). Este espectro não mudou após a amostra ficar uma semana dissolvida dentro do tubo de RMN. A análise do espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD, Figura 7-54, Tabela 7-13) da fração R19hg revelou os mesmos sinais da fração mencionada acima, porém, uma semana depois da amostra estar no tubo, surgiu um sinal em δ 5,92 (d; *J* = 8,1 Hz), relativo ao H anomérico de tanino

hidrolisável (açúcar na forma cíclica; LATTÉ & KOLODZIEJ, 2000) em configuração β , ou, segundo YOSHIDA et al. (1991) seria o sinal referente ao H-5 do epímero da castalagina, a vescalagina, além de observarmos outros sinais se duplicando, como os de deslocamentos químicos em δ 3,97 e 3,95 (ambos d; $J = 13,3$ e $11,5$ Hz; H-6' do açúcar) e os referentes aos hidrogênios aromáticos (6 singletos). Após a amostra ser retirada do tubo, seca e dissolvida novamente em acetona, seu espectro revelou sinais referentes aos dois/três taninos, porém com a Substância LVIII em maior proporção. Pode ter ocorrido hidrólise das ligações ésteres, já que os taninos hidrolisáveis são susceptíveis à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (KHAMBABAE & REE, 2001), e ciclização do açúcar, formando um artefato que é menos solúvel ou menos estável em acetona, o qual denominamos Substância LIX (proposta de formação no Esquema 7-3) e também ter ocorrido epimerização, como foi observado com a casuarinina, formando a Substância LXVIII.

Segundo VIVAS et al. (1995), a castalagina é ligeiramente mais estável que a vescalagina ($471,42$ versus $472,98$ kJ mol⁻¹) devido à ligação de hidrogênio que se forma através da função alcoólica enantiomérica na posição 1, a qual não é possível na vescalagina, isso explicaria porque a castalagina/casuarinina não reagiram, quando submetidas à metanólise (37° C, 100 horas), e a vescalagina/estaquiurina reagiram (em meio ácido em 6 h, 100 %; em meio neutro, em 100 h, 95 %; YOSHIDA et al., 1991), produzindo o composto C-1-OMe com retenção de configuração. Quanto ao espectro de RMN de ¹H, ocorrem duas principais diferenças. Na castalagina (Tabela 7-13), o sinal de H-1 e H-3 são mais desblindados do que na vescalagina. Nas duas substâncias, estes hidrogênios se encontram à mesma distância do centro do anel aromático (3,50 Å), mas na castalagina H-1 está 0,53 Å acima deste plano (dentro do cone de desblindagem) enquanto que na vescalagina está abaixo 1,1 Å (dentro da área de blindagem). Na castalagina, H-3 é mais desblindado por se encontrar mais próximo do grupo OH-1, resistindo ao forte efeito anisotrópico presente.

A análise do espectro de RMN de ¹³C (50 MHz, CD₃OD, Tabela 7-13), obtido minutos depois em que se fez o primeiro espectro de H em CD₃OD, revelou 4 sinais de carbonila de éster entre δ 170,5-166,4; diversos sinais entre δ 146,5-108,2 e 6 sinais referentes a C carbonílicos. O espectro de RMN de ¹³C/DEPT135 (50 MHz, CD₃OD, Figura 7-55), realizado uma semana depois, revelou 9 sinais referentes aos C

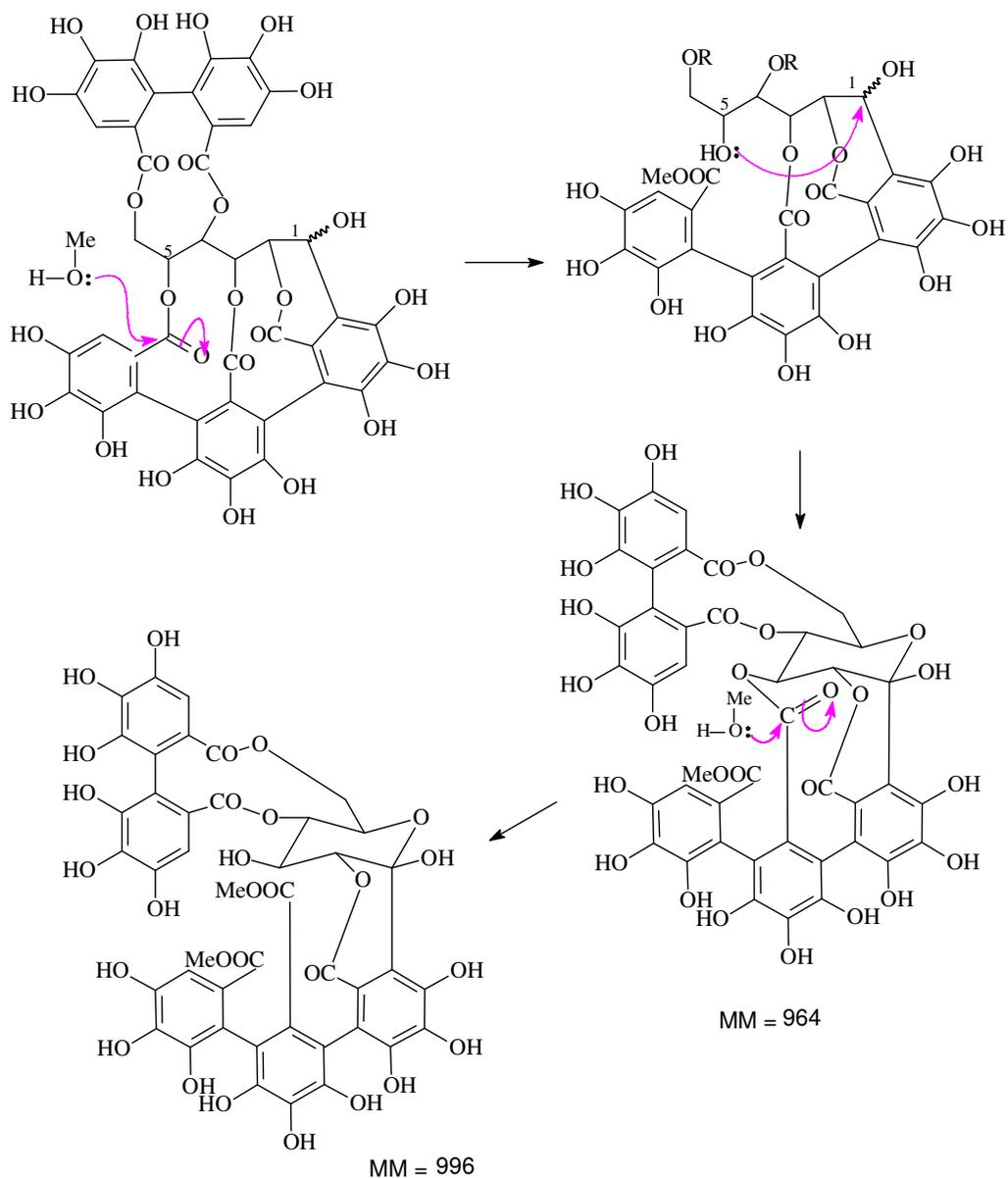
carbinólicos do açúcar, com o carbono mais desblindado em δ 76,7, característica de C-2 de taninos C-glicosídicos com o H anomérico em configuração α (no caso, a vescalagina); os três sinais entre δ 109,6-108,2 apareceram duplicados entre δ 110,4-107,6 referentes aos CH aromáticos. No espectro de outra amostra, R12i7, realizado em acetona- d_6 , esse fenômeno não ocorreu, revelando-se no espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6 , Figura 7-56) cinco sinais de carbonila de éster entre δ 169,5-164,6 e somente 6 sinais de C referentes ao açúcar, sendo o de valor mais desblindado, δ 74,7, atribuído a C-2, característica de taninos C-glicosídicos com o H anomérico em configuração β , o mesmo ocorrendo com o espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, Figura 7-59), realizado uma semana depois.

Os deslocamentos químicos atribuídos aos hidrogênios e carbonos foram baseados na interpretação das correlações obtidas nos espectros RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC e HSQC (Figura 7-57, Figura 7-58, Tabela 7-12).

A fórmula molecular da Substância LVIII/LXVIII, $\text{C}_{41}\text{H}_{26}\text{O}_{26}$, foi deduzida com base nos dados obtidos do espectro de massas, ESI/EM (Figura 7-60), modo negativo, medida no pico do íon pseudomolecular a m/z 933 $[\text{M}-\text{H}]^-$. No modo positivo, o pico de maior intensidade foi o relativo ao aduto de sódio de m/z 957 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, confirmando a massa molecular (Figura 7-61). Foram realizados espectros da amostra R19hg, contendo a mistura dos taninos, no momento da redissolução e após ficar algumas semanas dissolvida em metanol. O espectro de massas da mistura (Figura 7-62) revelou um pico de maior intensidade a m/z 933 $[\text{M}-\text{H}]^-$, referente à Substância LVIII, e outro de menor intensidade a m/z 969 $[\text{M}-\text{H}]^-$, referente à Substância LIX, de fórmula molecular $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{O}_{28}$ (proposta de formação no Esquema 7-3). O espectro da mistura, depois de algumas semanas (Figura 7-63), mudou completamente, apresentando um pico de maior intensidade a m/z 963 $[\text{M}-\text{H}+30]^-$, outro a m/z 995 $[\text{M}-\text{H}+62]^-$ e o relativo ao pico do íon pseudomolecular a m/z 933 $[\text{M}-\text{H}]^-$ foi mínimo, indicando produtos de solvólise da Substância LVIII (proposta de reação ocorrida Esquema 7-2), pois os taninos hidrolisáveis podem ter suas ligações ésteres quebradas pelo metanol à temperatura ambiente em pH neutro (MUELLER-HARVEY, 2001; Esquema 5-2). Também pode ocorrer metanólise em presença de MeOH 90 %, a 37° C e pH 5-6 (HASLAM et al., 1961). Foram realizados espectros de massas, ESI modo negativo (Figura 7-60), das Substâncias LVI e LVIII puras, separadamente, e a análise

dos espectros demonstrou picos muito semelhantes, referentes aos fragmentos, com diferenças de intensidade de uma ou duas unidades de massa, valendo ressaltar que a Substância LVI, casuarinina, originou um pico mais intenso relativo ao ácido elágico, m/z 301, que a Substância LVIII.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e nos relatados pela literatura (VIVAS et al., 1995), as estruturas foram propostas como castalagina ou 1-C,2,3,5-O-(nonaidroxitrifenoil)-4,6-O-(S)-hexaidroxidifenoil- β -D-glucosídeo; vescalagina e o 1-C-flavogalonil-4,6-O-(S)-hexaidroxidifenoil- β -D-glucopiranosídeo.



Esquema 7-2- Proposta de formação dos adutos de massa 964 e 996 a partir da Substância LVIII

Current Data Parameters
 NAME D093A1hc
 EXPNO 10
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20030227
 Time 4.33
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm Multinu
 PULPROG zgpg
 TD 65536
 SOLVENT Aceton
 NS 64
 DS 0
 SWH 8116.863 Hz
 FIDRES 0.123864 Hz
 AQ 4.0370674 sec
 RG 57
 DW 61.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 293.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D12 0.0002000 sec
 D13 0.00000300 sec

CHANNEL F1
 NUC1 1H
 P1 10.50 usec
 PL1 0.00 dB
 PL9 60.00 dB
 SF01 400.1316621 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1300232 MHz
 MDW EN
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

3D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 FIP 9.938 ppm
 F1 3976.46 Hz
 F2 -1.066 ppm
 F2 -426.16 Hz
 PPMCM 0.55015 ppm/cm
 HZCM 220.13103 Hz/cm

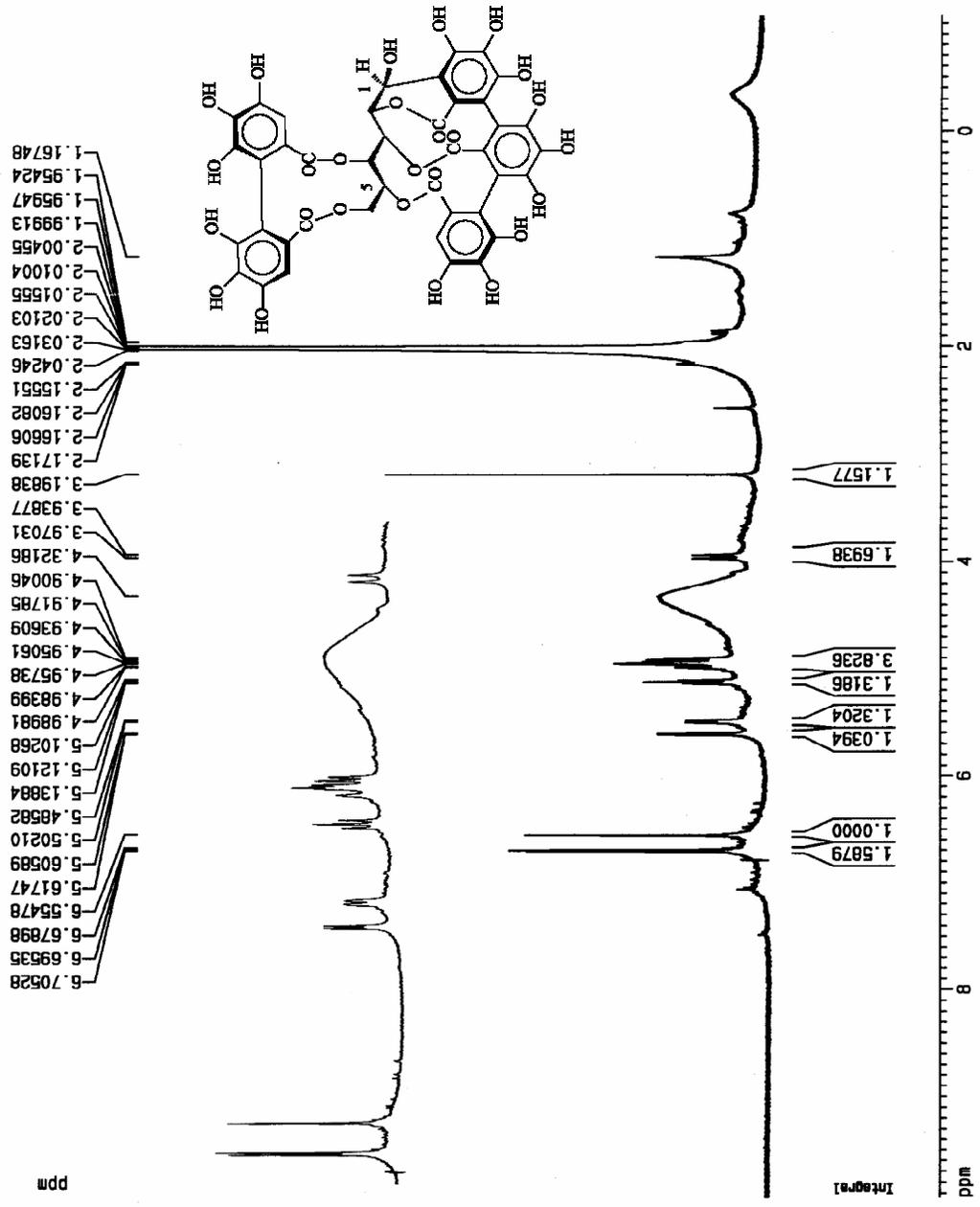


Figura 7-53- Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, (CD₃)₂CO/D₂O) da Substância LVIII

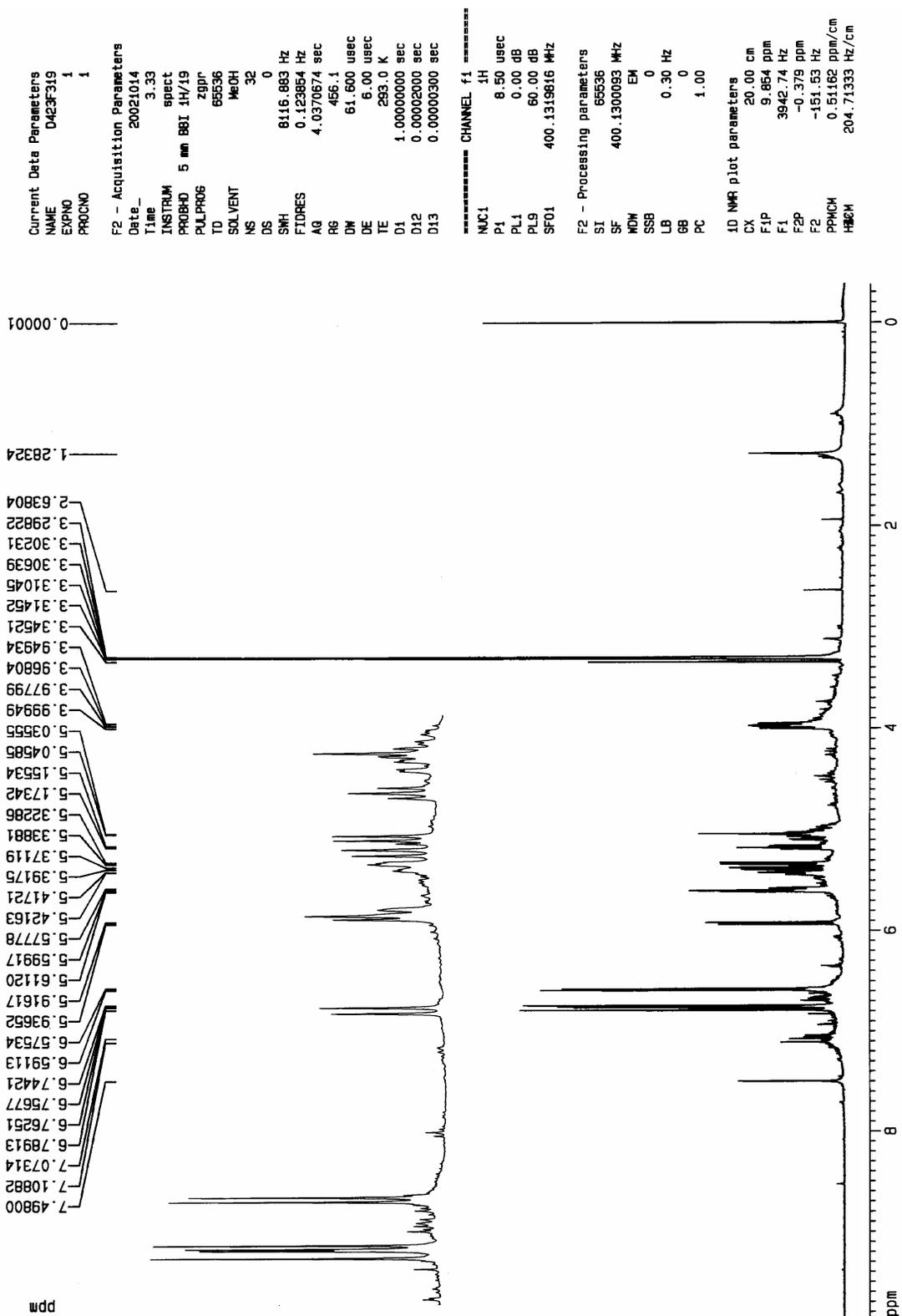


Figura 7-54- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVIII e LXVIII

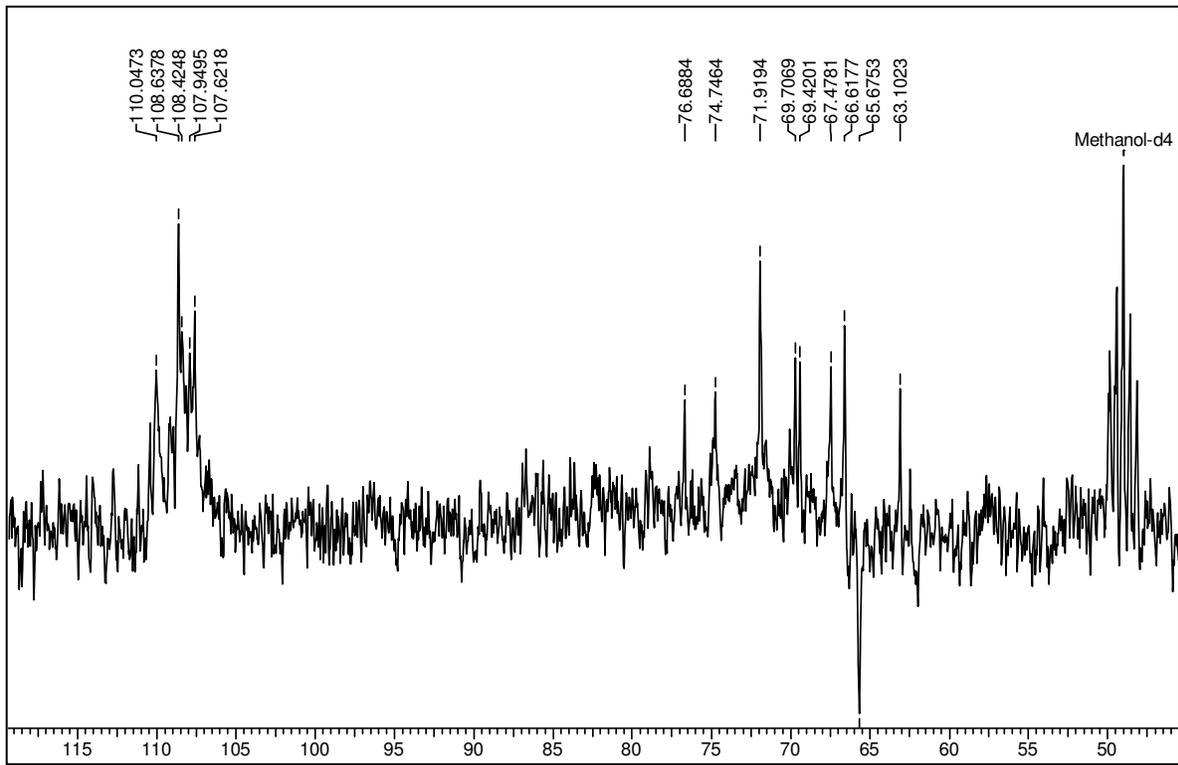


Figura 7-55- Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT135 (50 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LVIII e LXVIII

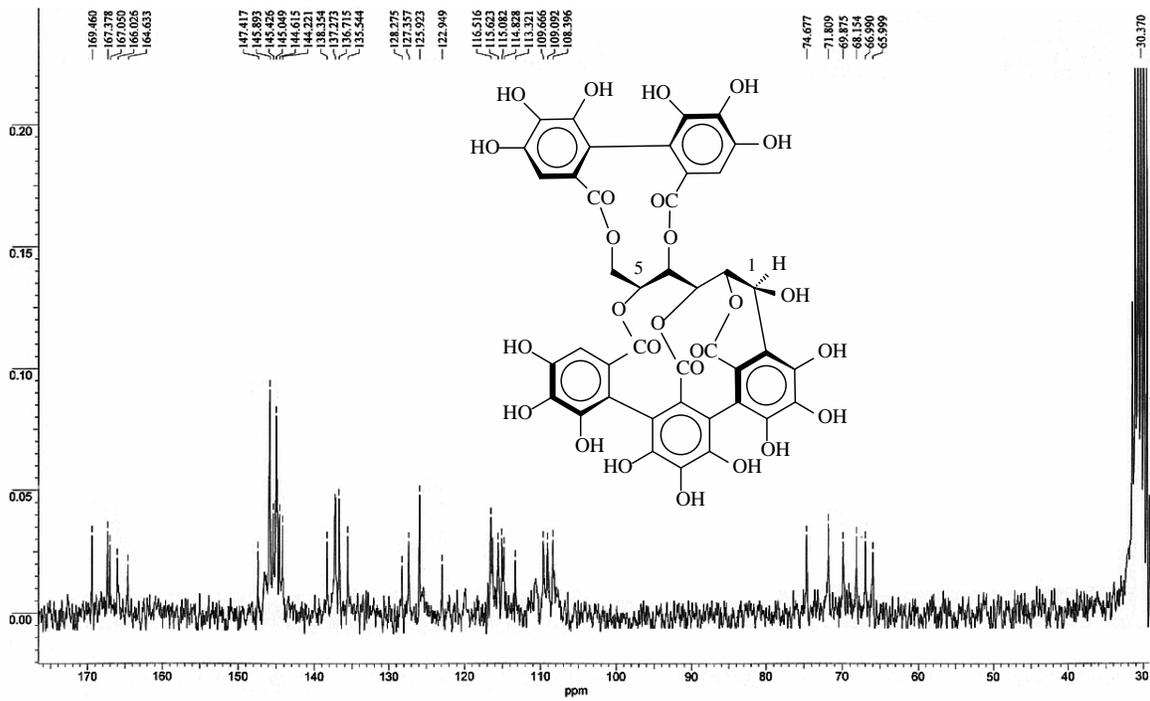


Figura 7-56- Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) da Substância LVIII

Tabela 7-12- Dados dos espectros de RMN ^1H e RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) das Substâncias LVIII e LXVIII e da castalagina e vescalagina

H	δ H	δ H	δ H	δ H	Correlação
Glicose	castalagina ^a	LVIII	vescalagina ^b	LXVIII	HMBC
1	5,69 (d; 4,8)	5,60 (d; 4,8)	4,91 (d; 2,0)	5,04 (sl)	167,7 (C=O)
2	5,00 (d)	5,03 (m)	5,28 (dd, 2,0 e 2,5)	5,04 (sl)	
3	5,02 (d)	5,03 (m)	4,57 (dd; 2,0 e 7,0)	5,38 (d; 8,2)	
4	5,12	5,17 (t; 7,1)	5,22 (t; 7,0)	5,58 (dl; 8,7)	163,0 (C=O)
5	5,61	5,33 (d; 6,4)	5,63 (ddd; 1,0; 2,5 e 7,0)	5,92 (d; 8,1)	
6	5,09 (d)	5,43 (dl; 12,1)	4,04 (dd; 1,0 e 13,0)	3,95 (d; 11,5)	
	4,18 (d)	3,97 (d; 12,6)	5,10 (dd; 3,0 e 13,0)	5,08 (dd; 2,6 e 13,2)	

^a (400 MHz; DMSO-d_6 ; VIVAS et al., 1995); ^b (400 MHz; acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$; YOSHIDA et al., 1991); δ em ppm e J em Hertz

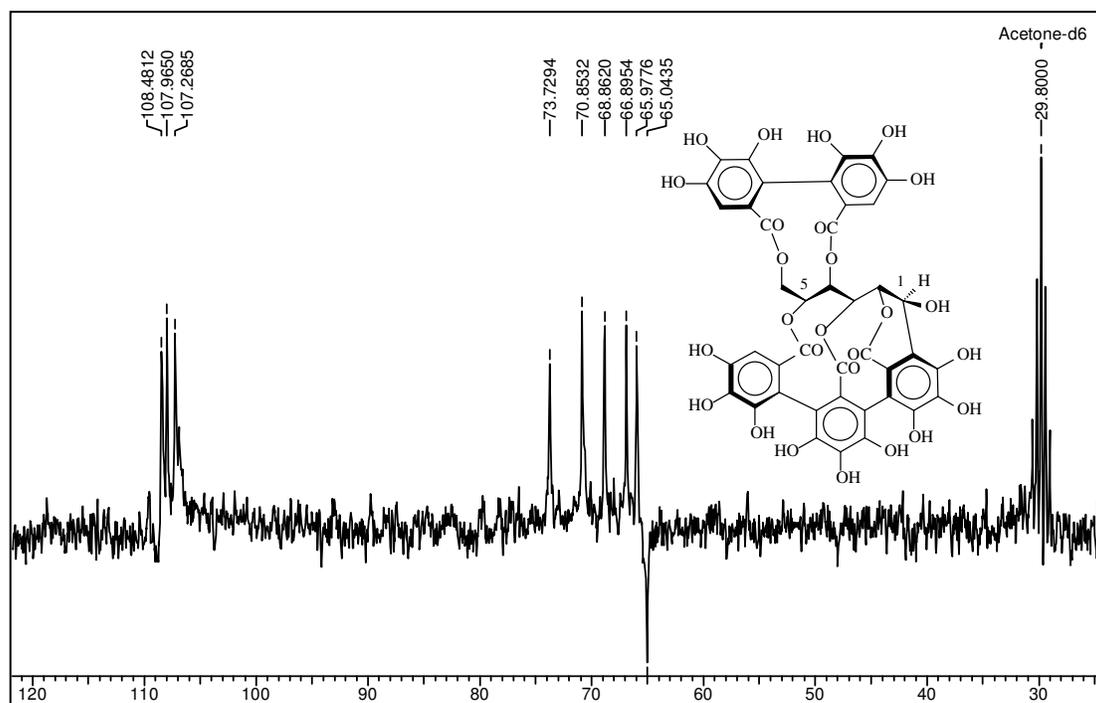


Figura 7-59- Espectro de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT}135$ (50 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da Substância LVIII

Tabela 7-13- Dados dos espectros de RMN ^{13}C e ^1H (50 e 400 MHz) da Substância LVIII

Posição	δ ^{13}C (CD_3OD)/DEPT (acetona- $\text{d}_6/\text{D}_2\text{O}$) Substância LVIII	δ ^1H (CD_3) $_2\text{CO}/\text{D}_2\text{O}$) Substância LVIII
Glicose		
1	67,9 / 65,9	5,60 (d; 4,6)
2	75,1 / 73,7	4,94 (m)
3	66,9 / 66,9	4,94 (m)
4	70,0 / 68,8	5,12 (t; 7,1)
5	72,2 / 70,8	5,49 (dl; 6,5)
6	65,9 / 65,0	4,94 (m)
		3,95 (d; 12,6)
C=O Éster		
	170,5; 168,3; 167,7 166,4 (x2)	
HHDP		
1, 1', 1''	128,1; 126,8; 125,4 125,2; 121,8	
HHDP		
2, 2', 2''	117,0; 116,6; 116,3; 115,4; 114,9; 113,8	
HHDP		
3, 3', 3''	147,5; 146,5; 146,1	
5, 5', 5''	145,8 (x3); 145,7; 145,4; 145,0; 144,7	
HHDP		
4, 4', 4''	139,8; 138,1; 137,9; 137,5; 136,2	
HHDP		
6, 6'	109,8; 108,9; 108,2	6,70; 6,69; 6,55
6''	117,4*	

*Carbono ligado ao C da glicose; atribuições dos carbonos segundo correlações observadas no espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC

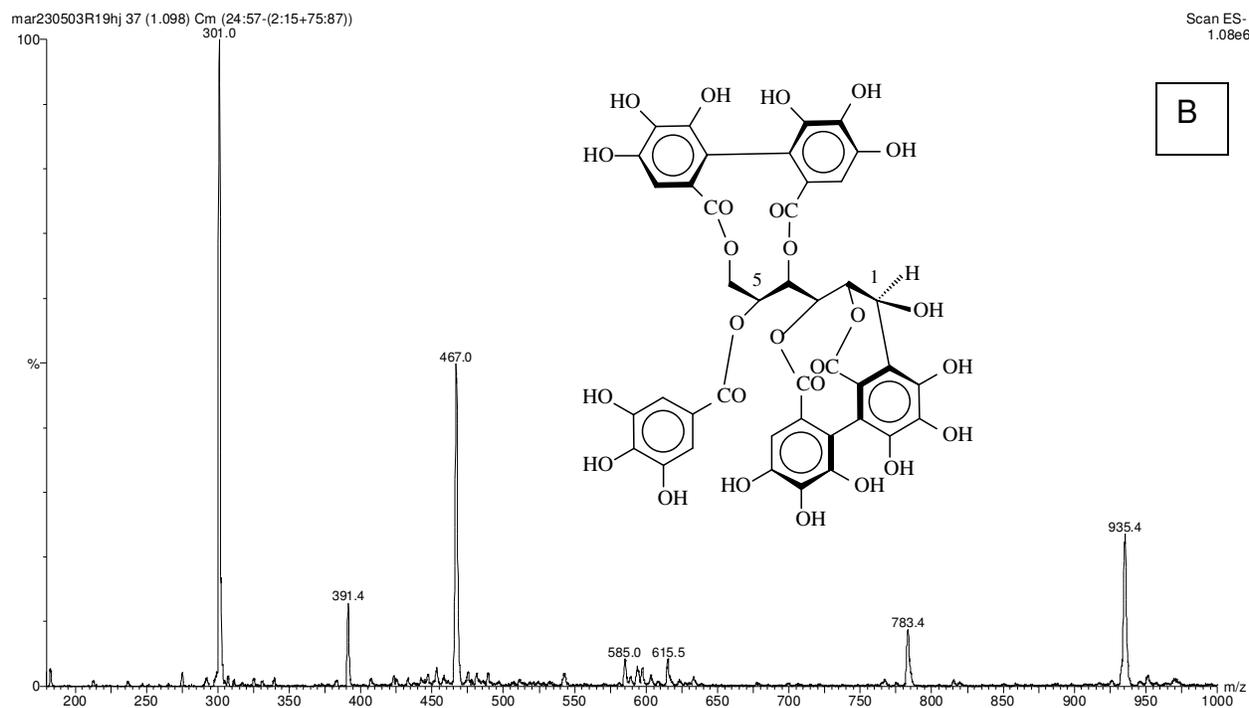
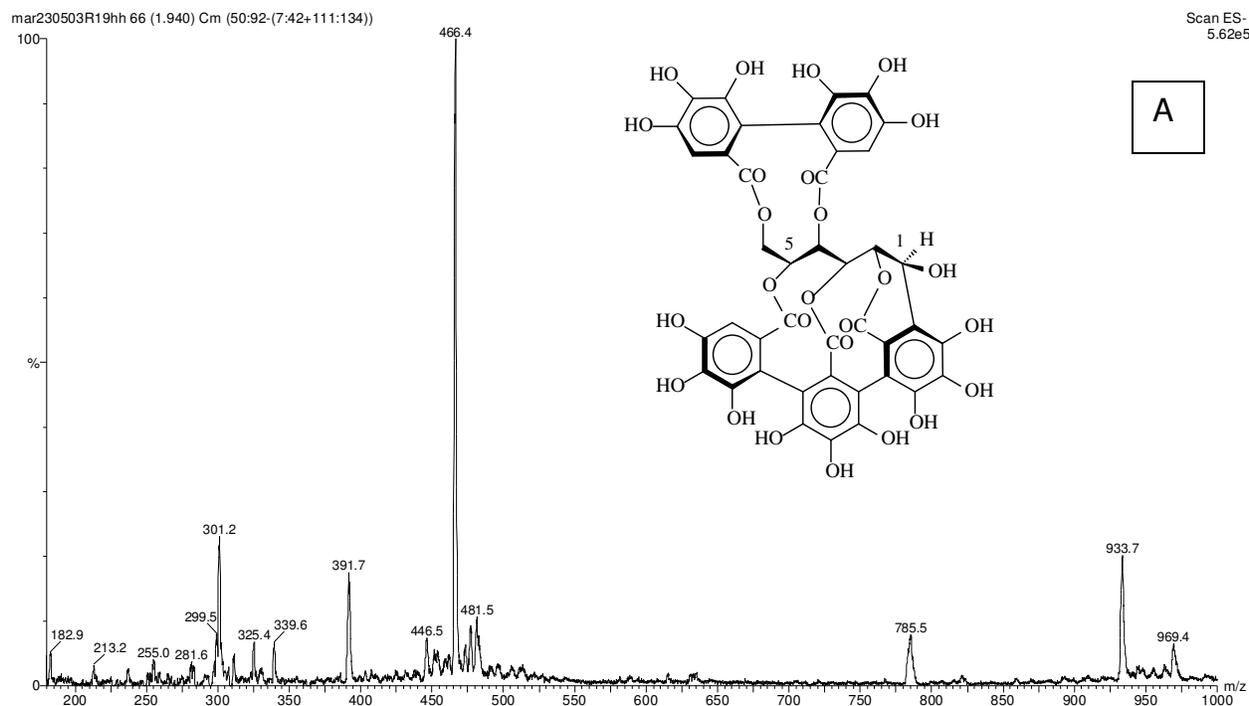


Figura 7-60- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LVIII (A) e da Substância LVI (B)

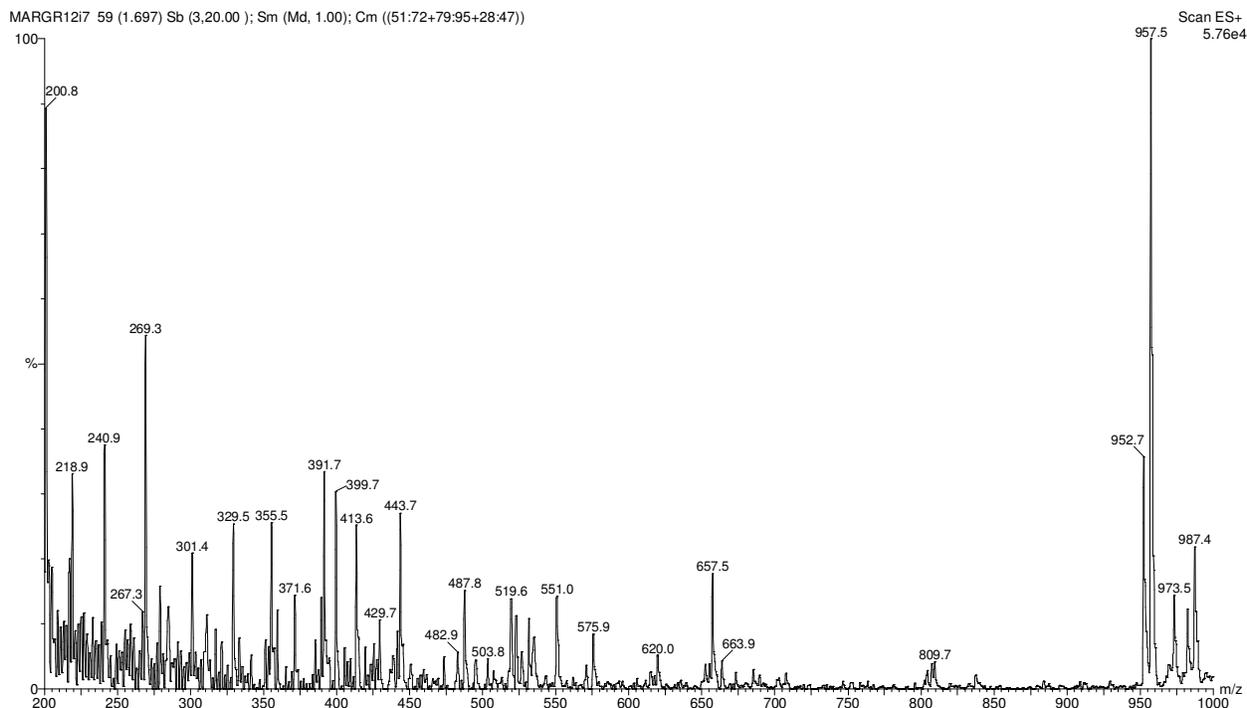


Figura 7-61- Espectro de massas, ESI modo positivo, da mistura das Substâncias LVIII e LIX

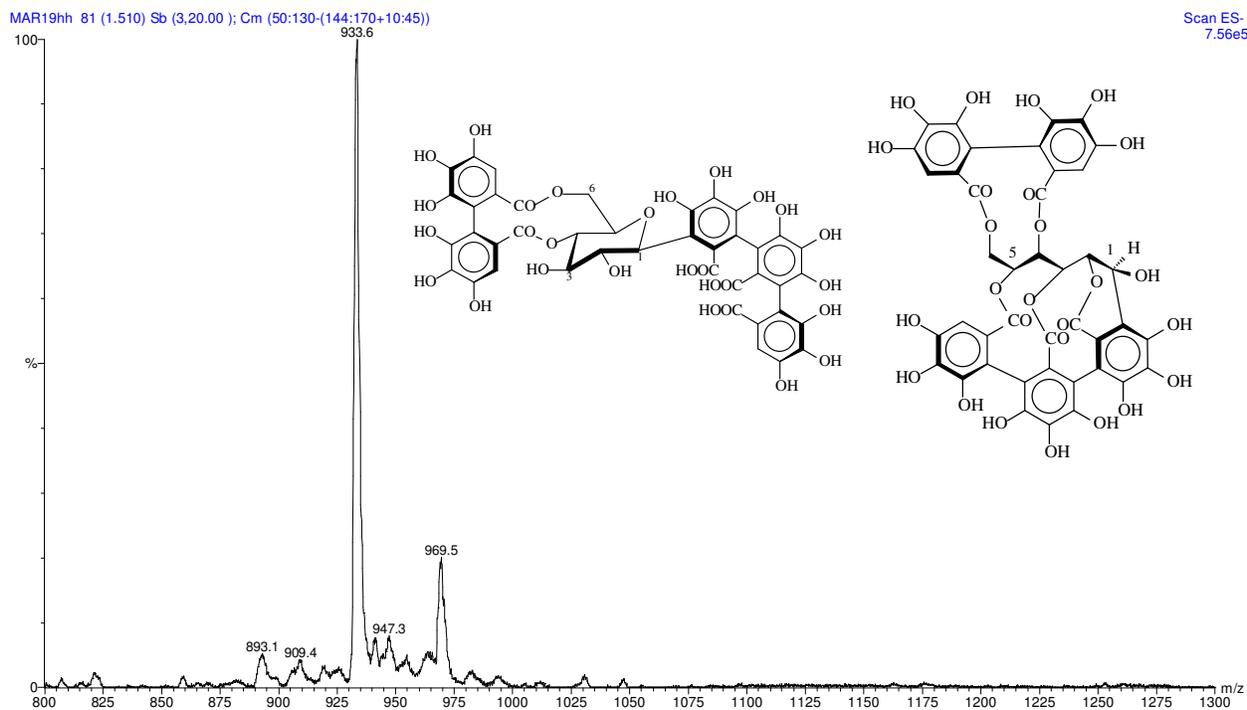


Figura 7-62- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LVIII, LXVIII e LIX

Espectro realizado no momento da dissolução da amostra

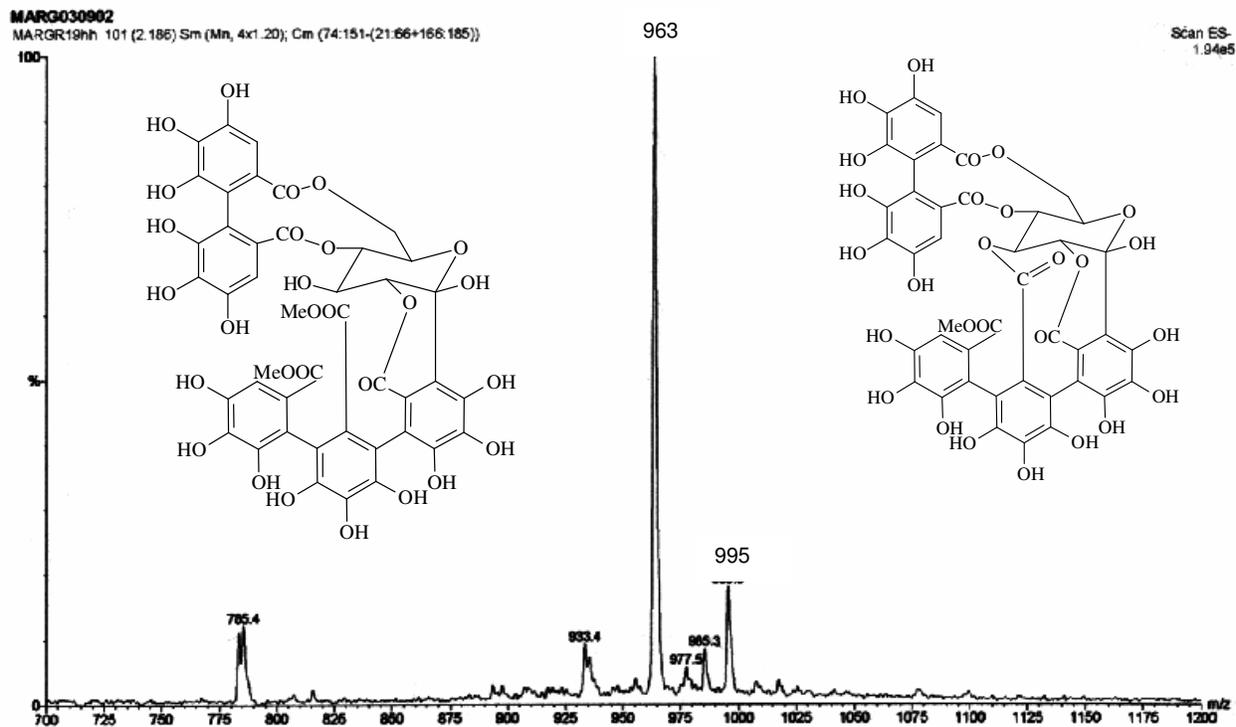
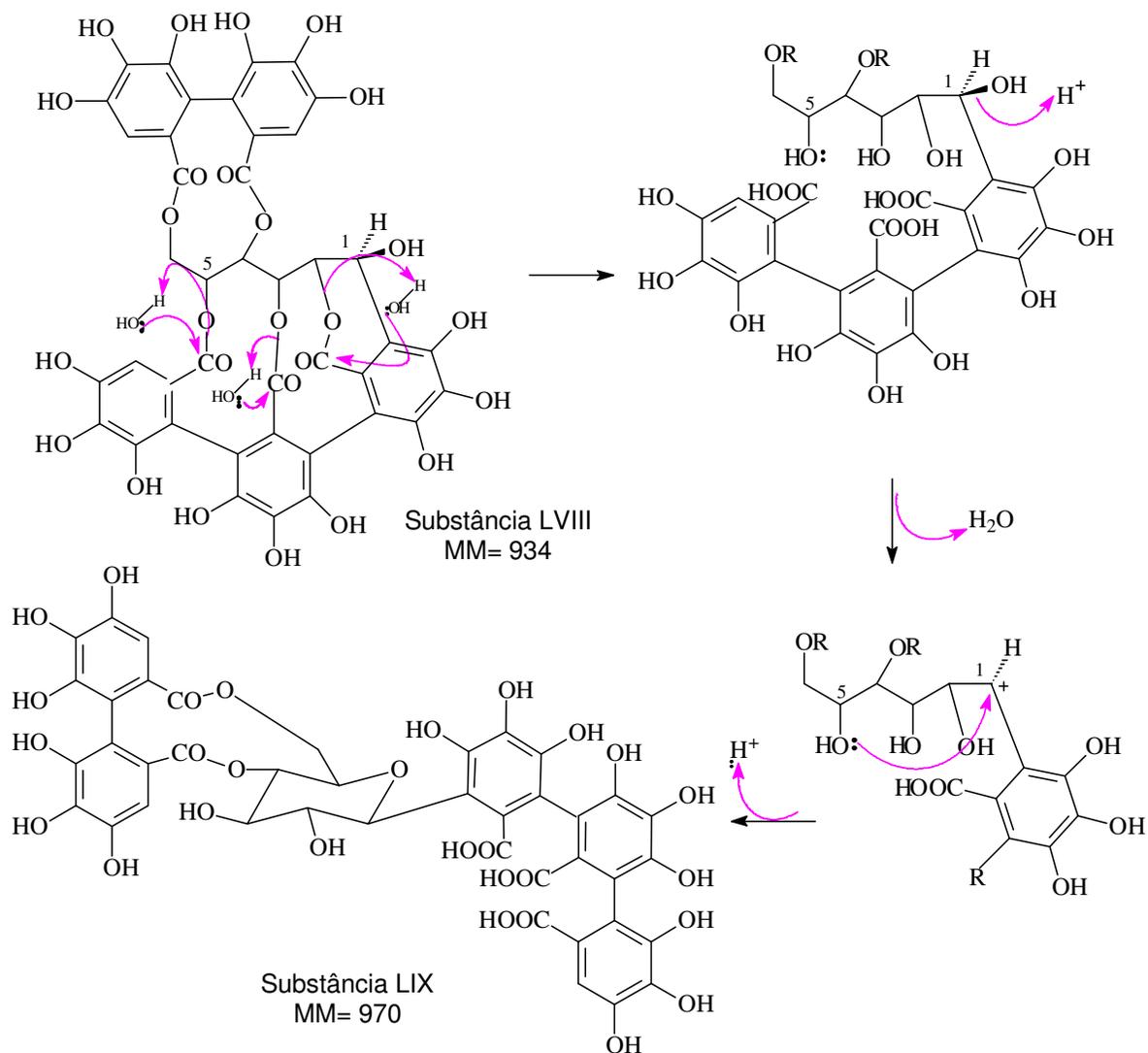


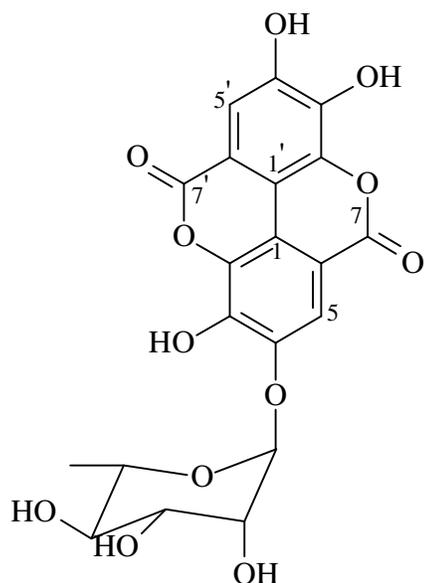
Figura 7-63- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LVIII e LIX

Espectro realizado algumas semanas depois da dissolução da amostra em metanol.



Esquema 7-3- Proposta de formação da Substância LIX, artefato, a partir da Substância LVIII

7.17. Identificação da Substância LX



4-O- α -L-ramnopiranosídeo do ácido elágico ou eschweilenol C

Do extrato metanólico, partição acetato de etila, da casca da raiz e do caule de *S. densiflora*, depois de várias etapas cromatográficas em sílica comum, sephadex LH20 e CLAE em fase reversa C-18, isolaram-se 14,0 mg de uma substância amorfa, de cor amarela pálida, pouco solúvel até nos solventes mais polares, soma das frações R12fh2, R12gs4, R20B5 e AMSCR22.

A fórmula molecular $C_{20}H_{16}O_{12}$ foi deduzida a partir dos dados obtidos pelos vários espectros analisados. No espectro de massas, EM/ESI modo negativo (Figura 7-64), observou-se o pico do íon pseudomolecular a m/z 447 $[M-H]^-$ e ainda um pico a m/z 301 $[M-H-146]^-$, pertencente ao fragmento de ácido elágico, caracterizando a perda de uma molécula de pentose. O espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O , TSPA- d_4 padrão interno; Figura 7-66), revelou um sinal em δ 162,0, característico de função lactona α,β -insaturada, corroborando a presença do ácido elágico, além dos sinais em δ 102,2, 74,9, 72,8, 72,7, 72,1 e 19,8, indicando a existência de uma 6-desoxiaçúcar. A análise do espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD ; Figura 7-65) revelou oito sinais, incluindo dois na região de aromáticos em δ 7,84 e 7,49 (singletos) e os sinais referentes à molécula do açúcar entre δ 5,52-3,77 e em δ 1,27 (d; $J = 6,2$ Hz). O açúcar foi facilmente determinado como a raminose através dos deslocamentos químicos característicos e acoplamentos entre os hidrogênios. O sinal referente ao H anomérico apareceu como um duplete em δ 5,52 com constante pequena de 1,6 Hz, o que

possibilitou a atribuição da configuração da ligação açúcar-ácido elágico como sendo α . A posição 4-*O* desta ligação foi determinada através da correlação entre o H anomérico em δ 5,52 e o C-4 da aglicona em δ 149,0 presente no espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD ; Tabela 7-16; Figura 7-67).

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e na comparação com dados da literatura (KIM et al., 2001; YANG et al., 1998; Tabelas 7-14 e 7-15), a estrutura da Substância LX foi proposta como 4-*O*- α -L-ramnopiranosídeo do ácido elágico ou eschweilenol C.

Esta é uma substância inédita para a família Myrtaceae, porém ela foi primeiramente isolada na planta *Eschweilera coriacea*, Lecitidaceae, em 1998 (YANG, et al., 1998).

Tabela 7-14- Dados do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , *J* em Hz) da Substância LX, do eschweilenol C e do 3'-*O*- α -L-ramnopiranosídeo do ácido elágico

H	3'- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo ^a	eschweilenol C ^b	Substância LX
5	7,46 (s)	7,72 (s)	7,84 (s)
5'	7,47 (s)	7,46 (s)	7,49 (s)
1''	5,73 (d, 1,6)	5,44 (sl)	5,52 (d, 1,6)
2''	4,34 (dd, 1,6 e 3,4)	3,98 (sl)	4,20 (dd, 1,8 e 3,4)
3''	4,05 (dd, 3,4 e 9,6)	3,82 (dl, 9,4)	4,02 (dd, 3,4 e 9,5)
4''	3,46 (t, 9,6)	3,27 (dd, 9,4)	3,48 (t, 9,5)
5''	4,46 (dd, 9,6 e 6,2)	3,50 (m)	3,77 (dd, 9,4 e 6,2)
6''	1,21 (d, 6,2)	1,12 (d, 5,8)	1,27 (d, 6,2)

^a (400 MHz, CD_3OD ; KIM et al., 2001); ^b (400 MHz, DMSO-d_6 ; YANG, et al., 1998)

Tabela 7-15- Dados do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) da Substância LX, do eschweilenol C e do 3'-O- α -L-ramnopiranosídeo do ácido 3-O-metilelágico

C	3'-O- α -L ramnopiranosídeo ^a	eschweilenol C ^b	Substância LX
1	112,3	108,4	107,9
2	142,3	136,8	137,3
3	143,5	141,0	143,0
4	154,4	146,4	149,0
5	114,0	111,7	112,8*
6	113,3	114,6	113,5 *
7	161,8	159,3	162,0
1'	110,6	107,8	107,5
2'	143,6	136,5	137,3
3'	140,3	139,5	143,0
4'	153,7	148,6	150,3
5'	115,2	110,5	112,8 *
6'	114,6	112,0	113,5 *
7'	161,8	159,1	162,0
1''	102,9	100,3	102,2
2''	72,0	69,9	72,7
3''	72,2	70,1	72,8
4''	73,9	71,8	74,9
5''	71,7	70,1	72,1
6''	17,9	18,0	19,8

^a(100 MHz, CD_3OD ; KIM et al., 2001); ^b(100 MHz, DMSO-d_6 ; YANG, et al., 1998); *Valores intercambiáveis

Tabela 7-16- Dados do espectro de RMN de $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD , J em Hz) da Substância LX, do eschweilenol C e do 3'- O - α -L-ramnopiranosídeo do ácido elágico

HMBC	3'- O - α -L ramnopiranosídeo ^a	eschweilenol C ^b	Substância LX
H-5	C-1, C-3, C-7	C-1, C-3, C-4, C-6, C-7	C-4, C-6, C-7
H-5'	C-1', C-3', C-7'	C-1', C-3', C-4', C-6', C-7'	C-3', C-4', C-6', C-7'
H-1''	C-3'	C-4, C-3''	C-4, C-2'', C-3''
H-2''	-	-	C-3''
H-3''	-	-	C-5''
H-4''	-	-	C-6''
H-5''	-	-	-
H-6''	-	C-4'', C-5''	C-3'', C-5''

^a (400 MHz, CD_3OD ; KIM et al., 2001); ^b (400 MHz, DMSO-d_6 ; YANG, et al., 1998)

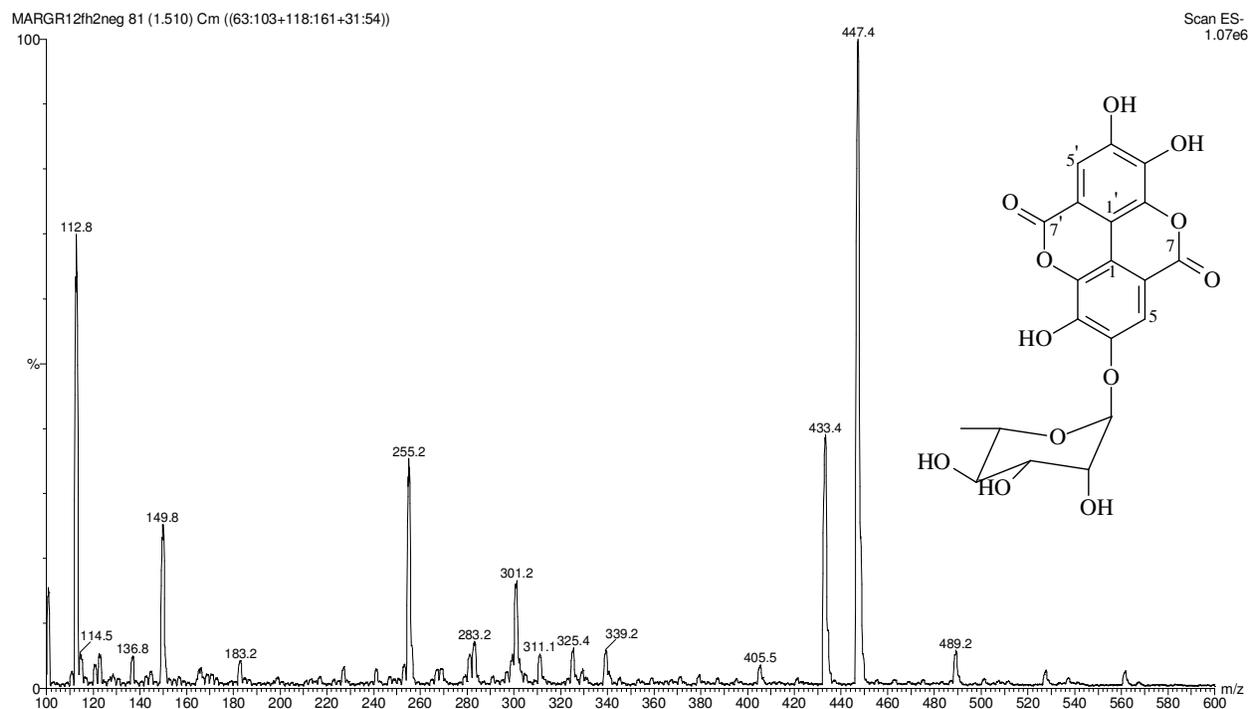


Figura 7-64- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LX

Current Data Parameters
 NAME D223A1N2
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20030529
 Time_ 12.31
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H/19
 PULPROG zgpg
 TD 65536
 SOLVENT MeOH
 NS 128
 DS 0
 SMH 8116.883 Hz
 FIDRES 0.123854 Hz
 AQ 4.0370574 sec
 RG 90.5
 DM 61.600 usec
 DE 6.00 usec
 TE 283.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D12 0.00002000 sec
 D13 0.00000300 sec

CHANNEL f1 ---
 NUC1 1H
 P1 8.50 usec
 PL1 0.00 dB
 PL9 60.00 dB
 SFO1 400.1326331 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1305662 MHz
 MDW EH
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 BB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 9.989 ppm
 F1 3996.71 Hz
 F2P -0.561 ppm
 F2 -224.63 Hz
 PPMCH 0.52750 ppm/cm
 HZCM 211.06729 Hz/cm

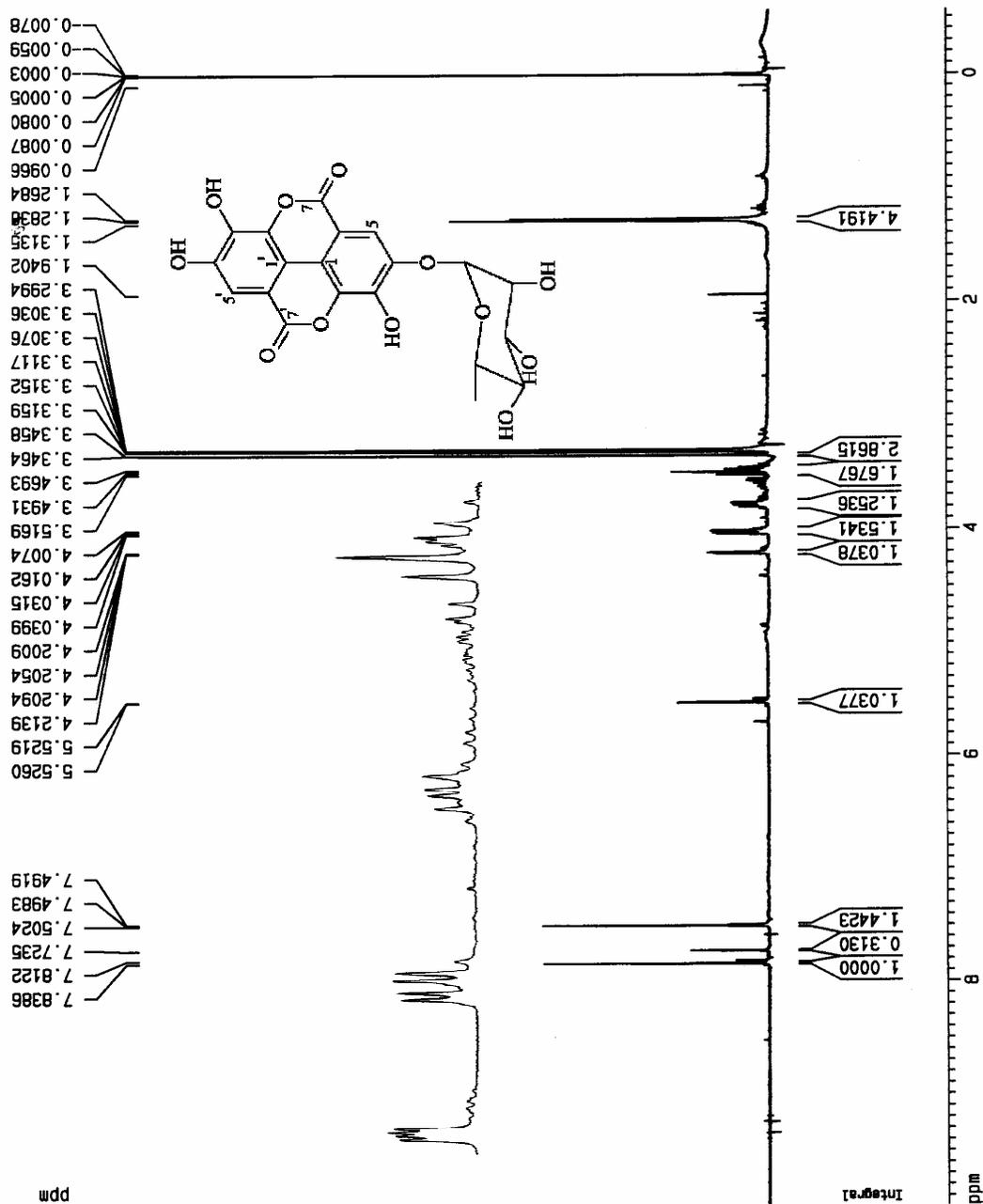


Figura 7-65- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da Substância LX

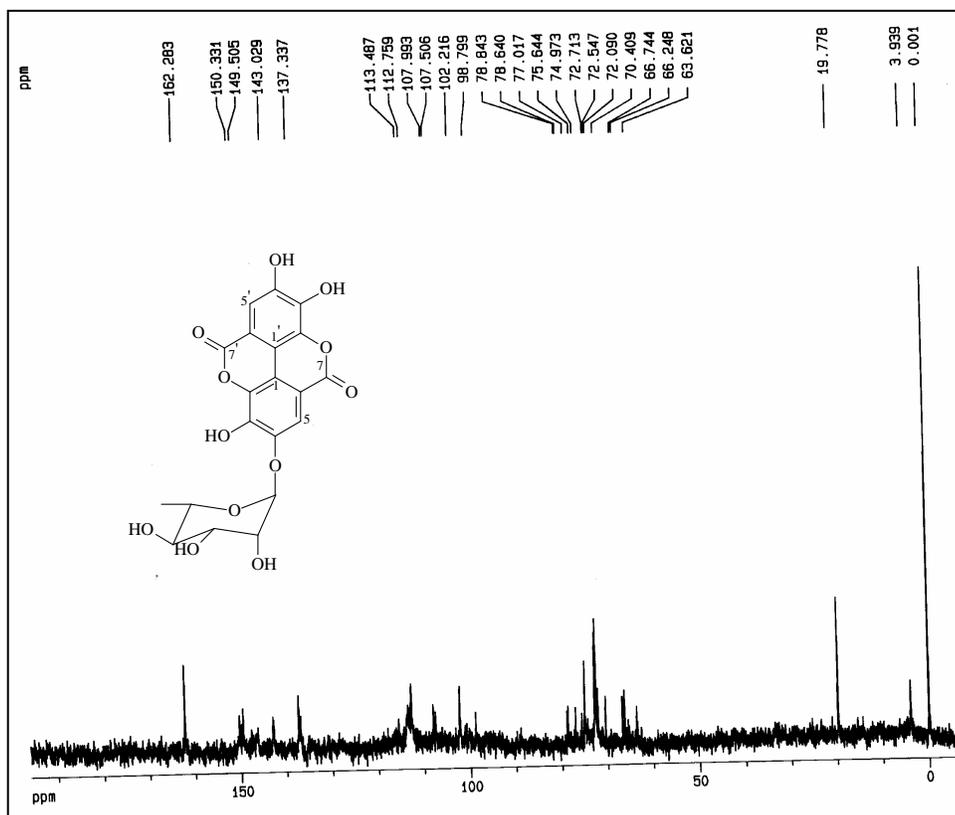


Figura 7-66- Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O , TSPA- d_4 padrão interno) da Substância LX

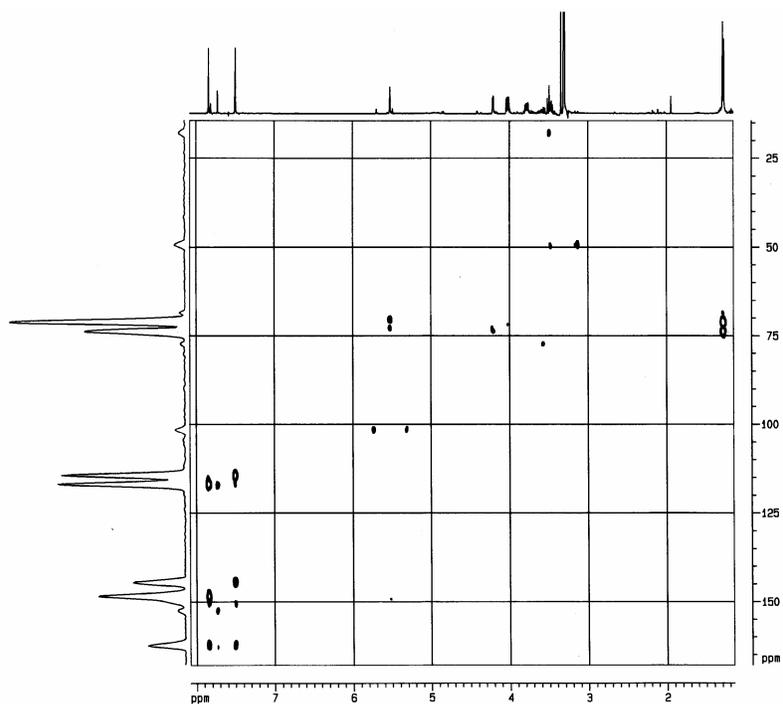
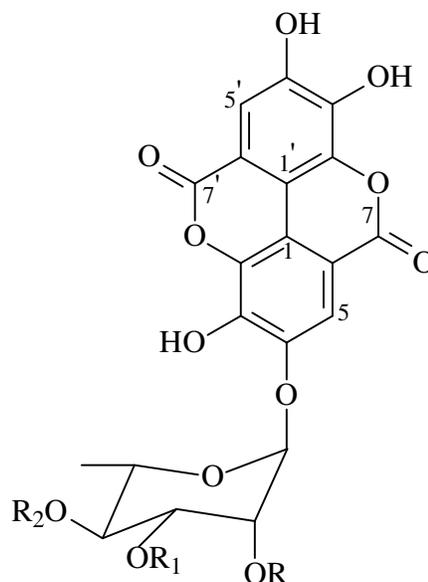


Figura 7-67- Espectro de RMN de $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da Substância LX

7.18. Identificação das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII em mistura

R=R1=R2=H Substância LX
R= acetil; R1=R2=H 4-O- α -L-2''-O-acetilraminopiranosídeo do ácido elágico (LXI)
R=R2=H; R1=acetil 4-O- α -L-3''-O-acetilraminopiranosídeo do ácido elágico (LXII)
R=R1=H; R2=acetil 4-O- α -L-4''-O-acetilraminopiranosídeo do ácido elágico (LXIII)



Do extrato metanólico, partição acetato de etila, da casca da raiz de *S. densiflora*, depois de várias etapas cromatográficas em sílica comum, sephadex LH20 e CLAE em fase reversa C-18, foi obtida a fração R20A5, 8,2 mg, como uma substância amorfa, de cor amarela pálida.

A análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD , Figura 7-70, Tabela 7-17) revelou diversos sinais de intensidades diferentes do tipo singleto, na região de aromáticos; do tipo singleto na região de metilas do grupo acetato de etila e do tipo dubleto, na região de metilas de ramnose, indicando ser uma mistura de derivados acetilados da Substância LX. Foram observados que alguns dos sinais referentes aos H carbinólicos estavam mais desblindados do que os pertencentes à Substância LX, o que possibilitou a localização dos grupos acetilas no açúcar no C-2''/H-2'' em δ 5,42 (dd; 1,6 e 3,4 Hz); C-3''/H-3'' em δ 5,23 (dd; 3,4 e 9,6 Hz) e C-4''/H-4'' em δ 5,03 (t, 9,6 Hz). Porém, poderiam ser isômeros de posição de um grupo acetila ou compostos com dois ou com os três grupos acetila na mesma molécula de açúcar. No entanto, a análise do espectro de massas, ESI modo negativo (Figura 7-68), revelou somente dois picos referentes aos íons pseudo moleculares a m/z 447 $[\text{M-H}]^-$, 100%, e a m/z 489, $[\text{M-H}]^-$, 45%, corroborando com a hipótese dos derivados serem isômeros de posição de um grupo acetila e de fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , Figura 7-69, Tabela 7-18) confirmou a presença do grupo acetila pelos sinais revelados em δ 173,2 e 21,3, referentes aos carbonos da carbonila e da metila. Além disso, mostrou vários sinais duplicados, evidenciando a mistura dos isômeros. Os valores dos deslocamentos relacionados aos átomos de C do açúcar, que suportavam os grupos acetilas, puderam ser atribuídos através das correlações observadas no espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, CD_3OD , Figura 7-72) entre o H em δ 5,42 com o C em δ 74,1; entre o H em δ 5,23 com o C em δ 75,3 e entre o H em δ 5,03 com o C em δ 75,6. A posição da ligação entre o açúcar e a aglicona foi determinada através da correlação obtida no espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD , Figura 7-71) entre o H anomérico em δ 5,52 e o C-4 da aglicona em δ 149,2.

A substância LXIII foi isolada recentemente de uma espécie da família Combretaceae (ASAMI et al., 2003) e apresenta atividade inibitória do crescimento de células tumorais resistentes à adriamicina; também apresentou inibição da enzima HIV-protease com CI_{50} de 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Baseando-se nos dados obtidos através dos espectros e nos dados de substâncias correlatas relatados na literatura (KIM et al., 2001), foram propostas as estruturas 4-*O*- α -L-2''-*O*-acetilaminopiranosídeo do ácido elágico, 4-*O*- α -L-3''-*O*-acetilaminopiranosídeo do ácido elágico, ambas inéditas na natureza, e o 4-*O*- α -L-4''-*O*-acetilaminopiranosídeo do ácido elágico (ASAMI et al., 2003) respectivamente.

Tabela 7-17- Dados dos espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII, da Substância LX pura e dos 3'-*O*- α -L-2''; 3'' e 4''-*O*-acetilramnopiranosídeos do ácido 3-*O*-metilelágico

H	Substância LX	2''- <i>O</i> -acetil ^a	3''- <i>O</i> -acetil ^a	4''- <i>O</i> -acetil ^a	Mistura
5	7,84 (s)	7,46 (s)	7,47 (s)	7,47 (s)	7,83; 7,81; 7,79; 7,78 (s)
5'	7,49 (s)	7,48 (s)	7,51 (s)	7,48 (s)	7,47 (s)
1''	5,52 (d, 1,6)	5,67 (d; 1,6)	5,64 (d; 1,6)	5,68 (d; 1,6)	5,56; 5,55; 5,54; 5,52 (sl)
2''	4,20 (dd, 1,8 e 3,4)	5,49 (dd; 1,6 e 3,4)	4,44 (dd; 1,6 e 3,4)	4,38 (dd; 1,6 e 3,4)	5,42 (dd); 4,39; 4,21 (dd; 3,2 e 1,6)
3''	4,02 (dd, 3,4 e 9,5)	4,18 (dd; 3,4 e 9,6)	5,24 (dd; 3,4 e 9,6)	4,19 (dd; 3,4 e 9,6)	5,23 (dd; 3,3 e 9,8); 4,02 (dd; 3,4 e 9,5)
4''	3,48 (t, 9,5)	3,40 (t; 9,6)	3,65 (t; 9,6)	5,04 (t; 9,6)	5,03 (t; 9,6); 3,70 (t; 9,6); 3,49 (t; 9,5)
5''	3,77 (dd, 9,4 e 6,2)	4,32 (dq, 9,6 e 6,2)	4,50 (dq, 9,6 e 6,2)	4,60 (dq, 9,6 e 6,2)	3,78 (dd; 9,6 e 6,2)
6''	1,27 (d, 6,2)	1,17 (d; 6,2)	1,21 (d; 6,2)	1,09 (d; 6,2)	1,32; 1,15 e 1,12 (d; 6,3); 1,28 (d; 6,2);
H_3CCOO		2,09 (s)	2,12 (s)	2,14 (s)	2,18; 2,16; 2,11; 2,09 (s)

^a (400 MHz, CD_3OD ; KIM et al., 2001)

Tabela 7-18- Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII e dos 3'-O- α -L-2''; 3'' e 4''-O-acetilramnopiranosídeos do ácido 3-O-metilelágico

C	acetilramnopiranosídeos ^a	Mistura
1, 1'	113,2; 113,5; 113,0; 112,9	107,4; 105,3
2, 2'	142,2; 142,3; 143,6	138,9; 138,3
3, 3'	142,0; 138,6	*
4, 4'	154,4; 154,3; 154,8; 153,7	150,9; 149,2
5, 5'	114,4; 113,0; 113,4; 114,0	110,7; 110,3
6, 6'	113,5; 113,2; 114,6; 114,4	114,7; 114,6; 114,1
7, 7'	160,4; 160,3	162,5; 162,6
1''	103,8; 100,0; 103,6	101,5; 101,3; 101,2
2''	70,9; 71,8	69,7; 68,9
2'' acet	75,4	74,1
3''	73,6; 70,1	72,0; 72,3
3'' acet	75,4	75,7
4''	71,9	71,4; 71,1
4'' acet	75,1	75,6
5''	69,6; 70,4	70,2
6''	17,8; 20,5; 17,7	18,2; 17,9
H ₃ C <u>C</u> OO	21,1; 20,9; 21,0	21,3; 21,2
H ₃ C <u>C</u> OO	172,7; 172,0; 172,6	173,2

^a (100 MHz, CD_3OD ; KIM et al., 2001); * Sinais não observados

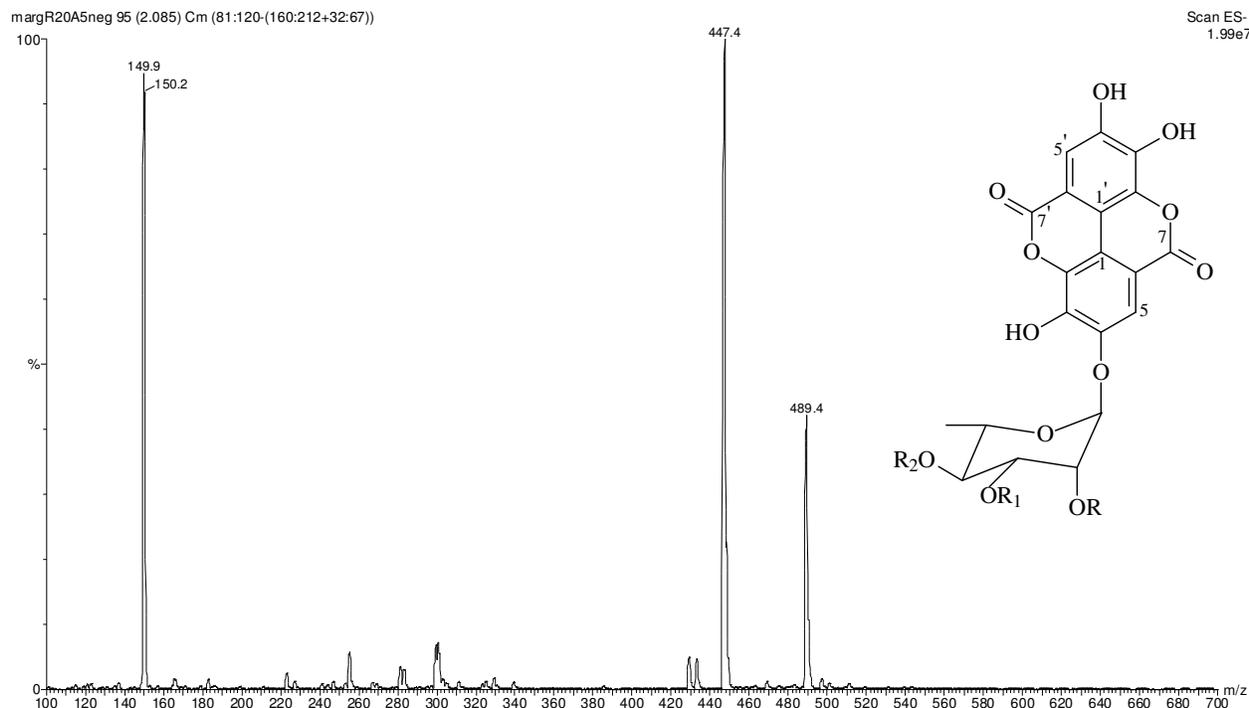


Figura 7-68- Espectro de massas, ESI modo negativo, da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII

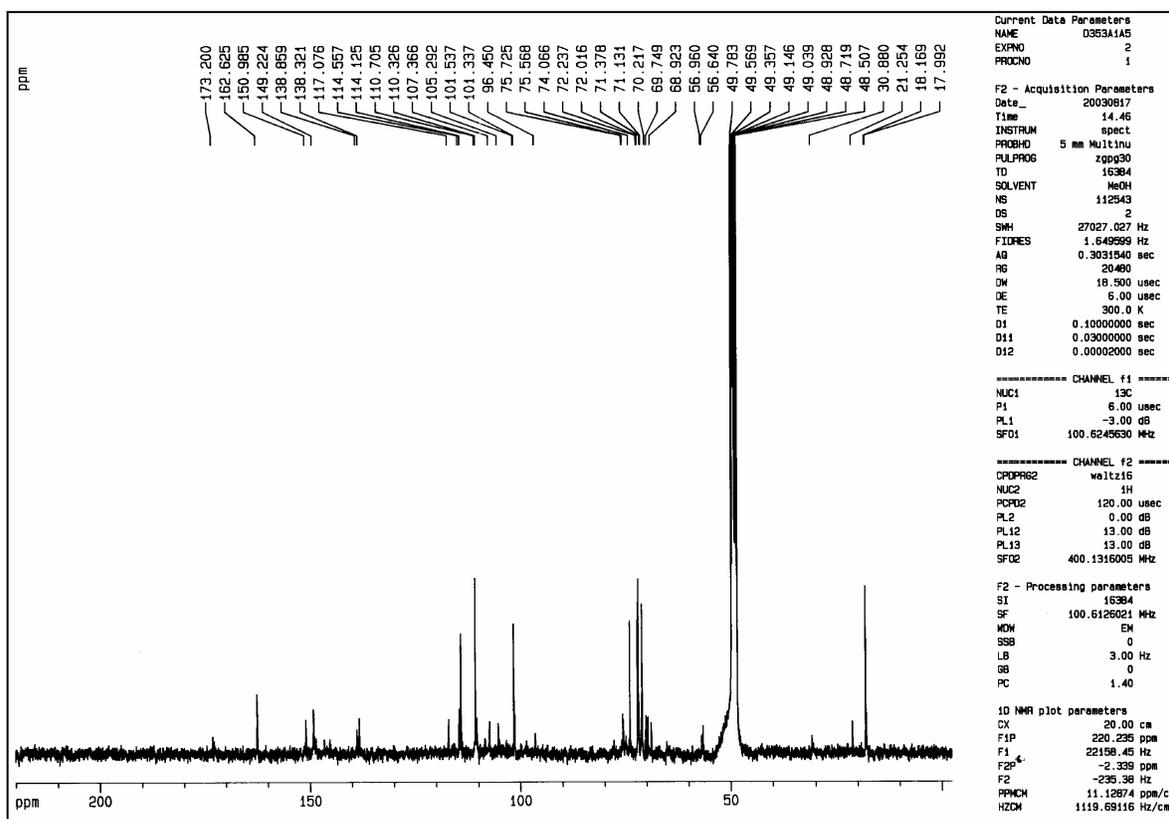


Figura 7-69- Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII

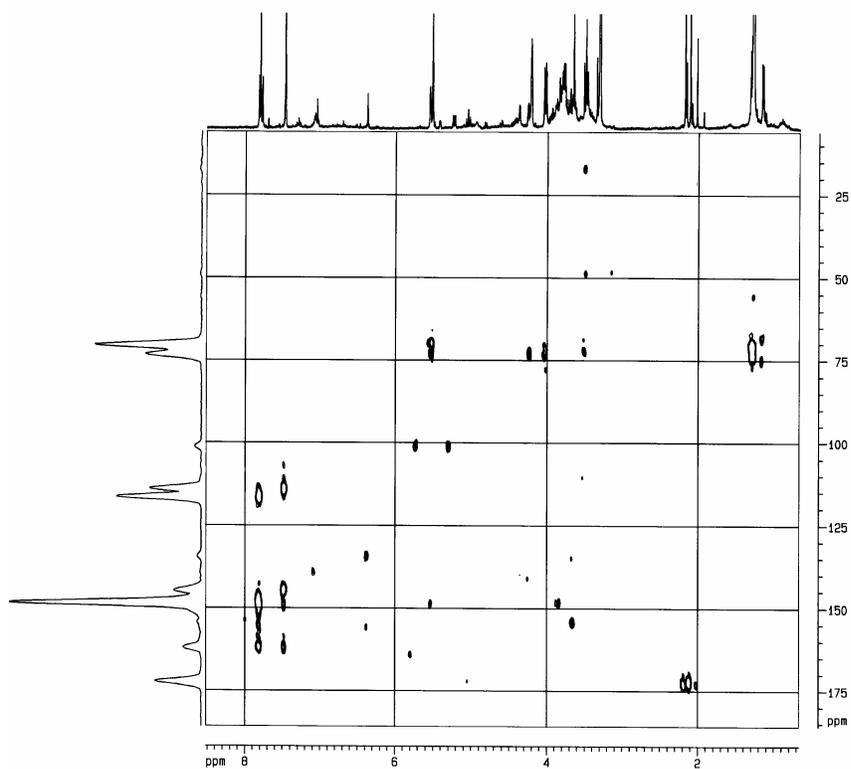


Figura 7-71- Espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII

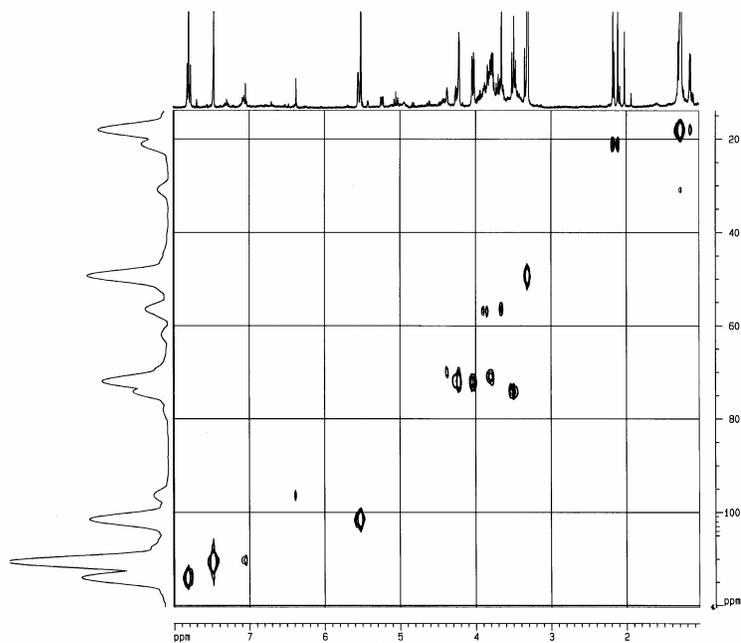


Figura 7-72- Espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, CD_3OD) da mistura das Substâncias LX, LXI, LXII e LXIII

7.19. Identificação da Substância LXIV

Do extrato metanólico, partição acetato de etila, da casca da raiz de *S. densiflora*, depois de várias etapas cromatográficas em sílica comum e sephadex LH20, foi obtida a fração R12e6, 8,2 mg, como uma substância amorfa, de cor amarela pálida.

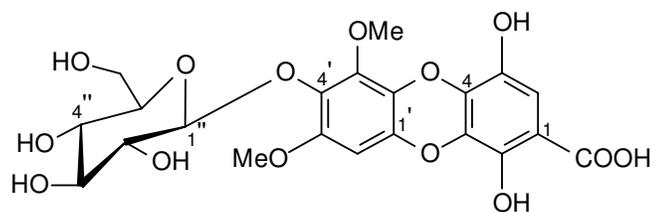
Na CCDA, usando-se AcOEt/MeOH 9:1 / 5% HAc como eluente, o R_f da substância foi de 1,2 cm. Revelada na vanilina sulfúrica, apresentou uma mancha marrom avermelhada. O espectro de infravermelho (Figura 7-76) revelou absorções características para grupos hidroxila (3386 cm⁻¹); metoxila (2925 cm⁻¹); ácido carbonílico (1705 cm⁻¹) e anel aromático (1613, 1507, 1425 cm⁻¹).

A análise do espectro de RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆, Figura 7-77; Tabela 7-19) revelou que a substância não estava totalmente pura. Dois sinais em δ 7,13 e 6,40 (ambos singletos), juntamente com os sinais de H carbinólicos e de H metoxílicos, indicaram que poderia ser um tanino hidrolisável com um grupo HHDP e que este se encontraria metoxilado. No entanto, quando o espectro de massas foi realizado, o pico de maior intensidade, relativo ao íon pseudo molecular, foi de *m/z* 497 [M-H]⁻ (Figura 7-74), sendo que a massa esperada era de 496, ou esta massa mais adição de 14 unidades relativas a grupos metoxilas adicionais. Além deste, os outros picos revelados em *m/z* 447 e 489 já eram esperados como sendo da mistura de taninos descrita anteriormente. Outro fato não esperado foi constatado no espectro de RMN ¹Hx¹³C HSQC (400 MHz, acetona-d₆, Figura 7-78) onde o H em δ 6,40 se correlacionava com o C em δ 95,5, valor bem mais blindado do que o esperado para um C aromático do grupo HHDP ou ácido elágico. A análise do espectro de RMN ¹Hx¹³C HMBC (400 MHz, acetona-d₆; Figura 7-79; Tabela 7-20) mostrou que o H em δ 6,40 se correlacionava com outros carbonos aromáticos mas nenhum referente à carboxila, enquanto o H em δ 7,13 se correlacionava com um C carboxílico em δ 167,5. O H anomérico mostrou correlação com um carbono em δ 154,9, valor muito baixo para ser atribuído a uma carboxila, mas que poderia ser assinalado ao C-4' aromático ligado a um grupo *O*-glucopiranosil.

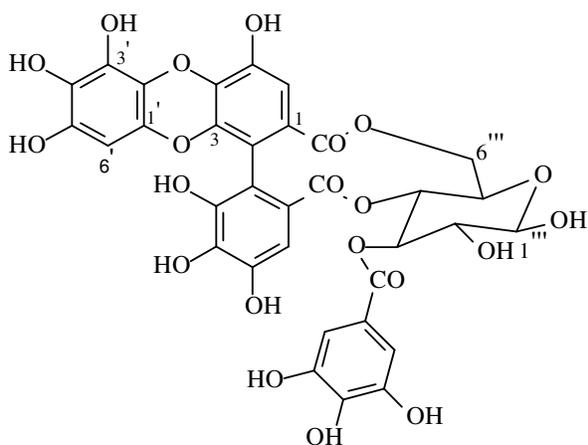
A irradiação do sinal em δ 3,72 causou um efeito NOE no sinal referente ao H-6', porém, a irradiação do sinal em δ 3,63 não provocou nenhum efeito. Todos os

dados obtidos, somados à simetria da molécula, levantaram a hipótese de vários isômeros possíveis. Foi proposta uma estrutura, de fórmula molecular $C_{21}H_{22}O_{14}$, contendo uma dibenzo-1,4-dioxina ligada à molécula da glicose, que teria sua biossíntese a partir de um acoplamento fenólico oxidativo entre grupos hidroxila de uma molécula de ácido gálico com uma molécula de ácido siríngico, seguida de uma oxidação do anel aromático (DEWICK, 1997; Esquema 7-4). No entanto, isto não seria o suficiente para se assinalar a estrutura. A estratégia considerada para se solucionar o problema estrutural de localização dos grupos hidroxilas foi o uso de reagentes deslocadores no espectro de UV. A solução metanólica da substância apresentou absorções máximas no UV de 276 e 356 nm. Quando o espectro foi determinado em metanol contendo ácido bórico e acetato de sódio, não houve mudanças nas absorções, indicando a ausência de um sistema *orto*-diidroxilado. Porém, a adição de $AlCl_3$ causou efeito batocrômico de 14 nm na banda de 370 nm, corroborando a hipótese de um grupo hidroxila quelado a um grupo ácido (VOIRIN, 1983).

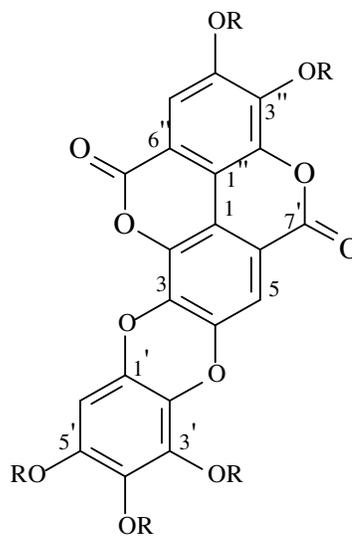
Baseados nos dados espectrais obtidos (Figura 7-75), na comparação com um tanino obtido de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), a syzyginina B (TANAKA et al., 1996; Figura 7-73) e com um derivado do ácido elágico, o eschweilenol B, juntamente com seu derivado metoxilado (YANG et al., 1998; Figura 7-73), foi proposta a estrutura da siphoneugenina, inédita na literatura, apresentando um novo tipo de aglicona para os taninos hidrolisáveis. Porém, a quantidade de substância isolada não foi suficiente para se promover as reações de metilação e metanólise necessárias para a comprovação desta hipótese. Sugere-se que a substância está ocorrendo juntamente com um isômero de posição, devido duplicação de vários sinais de C na mesma região, no entanto os dados não foram suficientes para se posicionar a ligação do açúcar.



ácido 4'-O-β-D-glucopiranosil-3',5'-dimetoxifenil-[1',4]-dioxinil-2-hidroxigálico ou siphoneugenina



syzyginina B



R = H eschweilenol B
R = Me Penta-O-metil-eschweilenol B

Figura 7-73- syzyginina B; Substância LXIV; eschweilenol B e seu derivado metilado

Tabela 7-19- Dados dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV; do eschweilenol B (M; 400 e 100 MHz, DMSO- d_6) e penta-*O*-metil-eschweilenol B (Q; CD_3COD)

Posição	$\delta^{13}\text{C M}^a$	$\delta^1\text{H M}^a$	$\delta^{13}\text{C Q}^a$	$\delta^1\text{H Q}^a$	$\delta^{13}\text{C LXIV}$	$\delta^1\text{H LXIV}$
1	107,9		111,8		120,9	
2	135,8		*		139,1	
3	139,8		134,6		139,1	
4	149,0		141,5		148,2	
5	110,6	7,48 (s)	112,5	7,60 (s)	145,9	
6	111,9		114,7		109,8	7,13 (s)
7	158,2		158,0		167,5	
1'	141,8		127,6		*	
2'	132,3		135,7		133,9	
3'	131,3		141,7		138,1	
4'	123,0		139,5		154,9	
5'	136,6		148,7		148,4	
6'	94,1	6,14 (s)	96,0	6,39 (s)	95,5	6,40 (s)
1''					101,9	4,99 (d; 7,6)
2''					74,7	3,86 (m)
3''					76,7	3,57 (m)
4''					70,8	3,55 (m)
5''					73,9	3,49 (m)
6''						4,64 (dd; 1,8 e 12)
					64,7	4,39 (dd; 6,0 e 12)
3'-OMe			61,6	4,11 (s)	60,8	3,63 (s)
4'-OMe			56,5	3,93 (s)		
5'-OMe			56,0	3,72 (s)	56,3	3,72 (s)

^a (YANG et al., 1998) ; * Sinal não observado

Tabela 7-20- Dados do espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV

Posição	δ ^1H	δ ^{13}C correlacionados
6	7,13	120,9 (C-1); 145,9 (C-5); 167,5 (C-7)
6'	6,40	133,9 (C-2'); 154,9 (C-4')
1''	4,99	154,9 (C-4')
3''	3,57	74,7 (C-2''); 70,8 (C-4'')
4''	3,55	101,9 (C-1'')
5''	3,49	76,7 (C-3'')
OMe-5'	3,72; 3,63	154,9 (C-4'); 148,4 (C-5')
OMe-3'		133,9 (C-2')

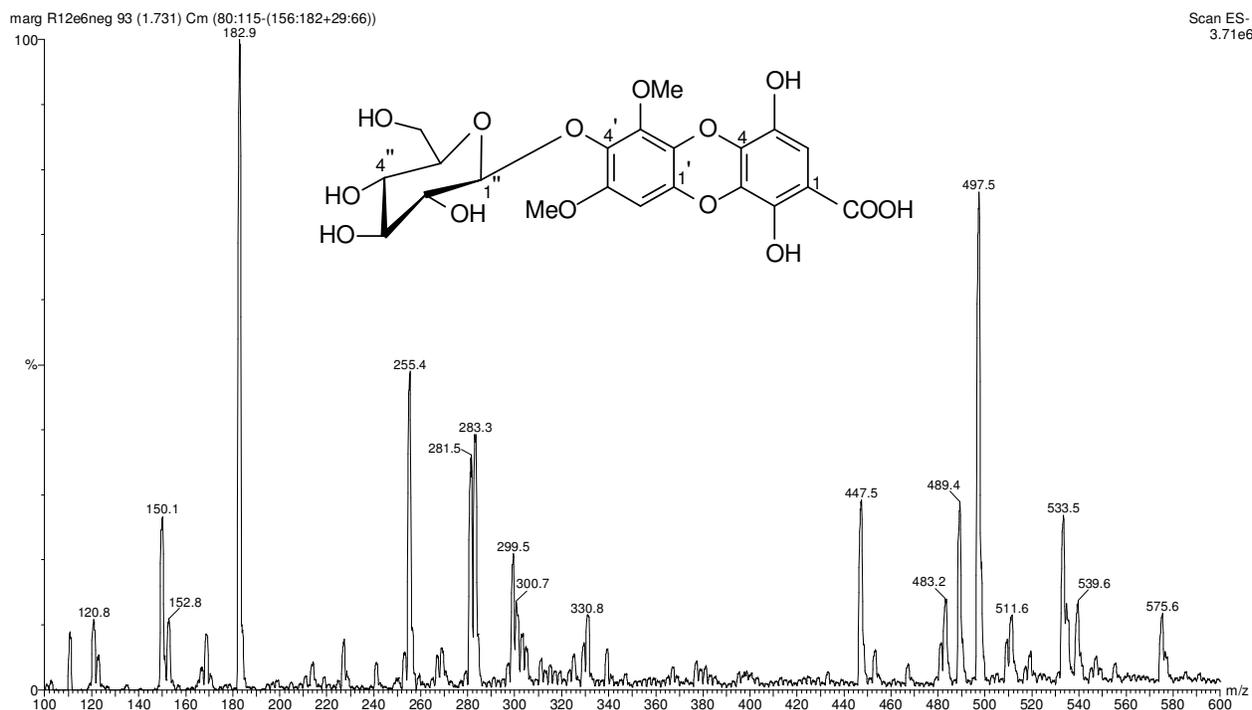


Figura 7-74- Espectro de massas, ESI modo negativo, da Substância LXIV

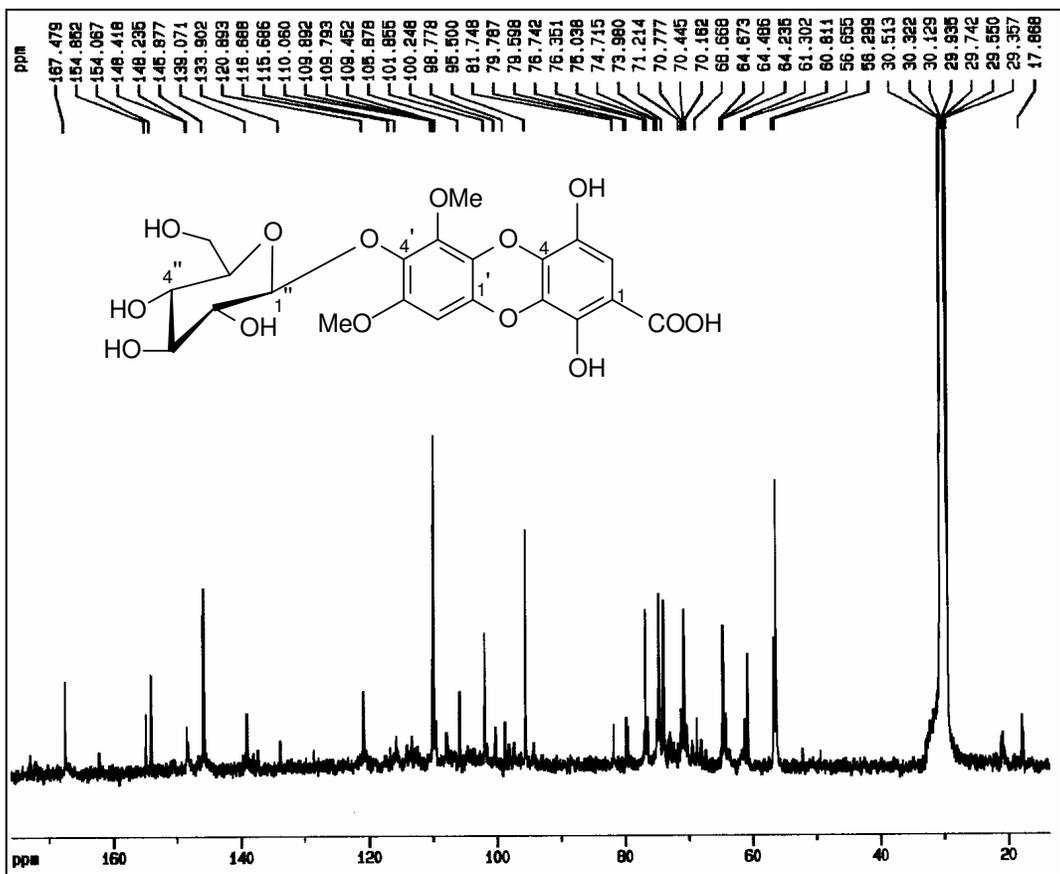


Figura 7-75- Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV

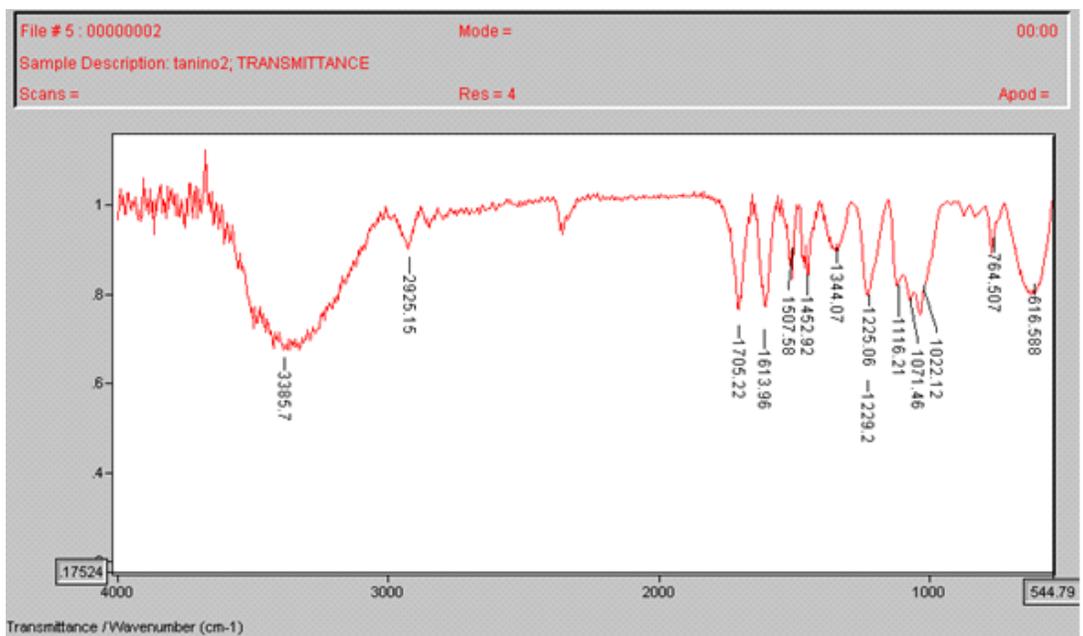


Figura 7-76- Espectro de IV da Substância LXIV

Current Data Parameters
 NAME D233A1e6
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20030605
 Time 13.16
 INSTRUM spect
 PULPROG zgpg30
 FFOBHD 5 mm BBI 1H/19
 TD 65536
 SOLVENT Aceton
 NS 64
 DS 0
 SMH 11990.407 Hz
 FIDRES 0.182669 Hz
 AQ 2.7329011 sec
 RG 114
 DW 41.700 usec
 DE 6.00 usec
 TE 293.0 K
 D1 1.00000000 sec

----- CHANNEL f1 -----
 NUC1 1H
 P1 8.50 usec
 PL1 0.00 dB
 SFO1 400.1327450 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 400.1300033 MHz
 NDW EM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 F1P 8.234 ppm
 F1 3284.57 Hz
 F2P 0.987 ppm
 F2 234.96 Hz
 PPMCM 0.38233 ppm/cm
 HZCM 152.98015 Hz/cm

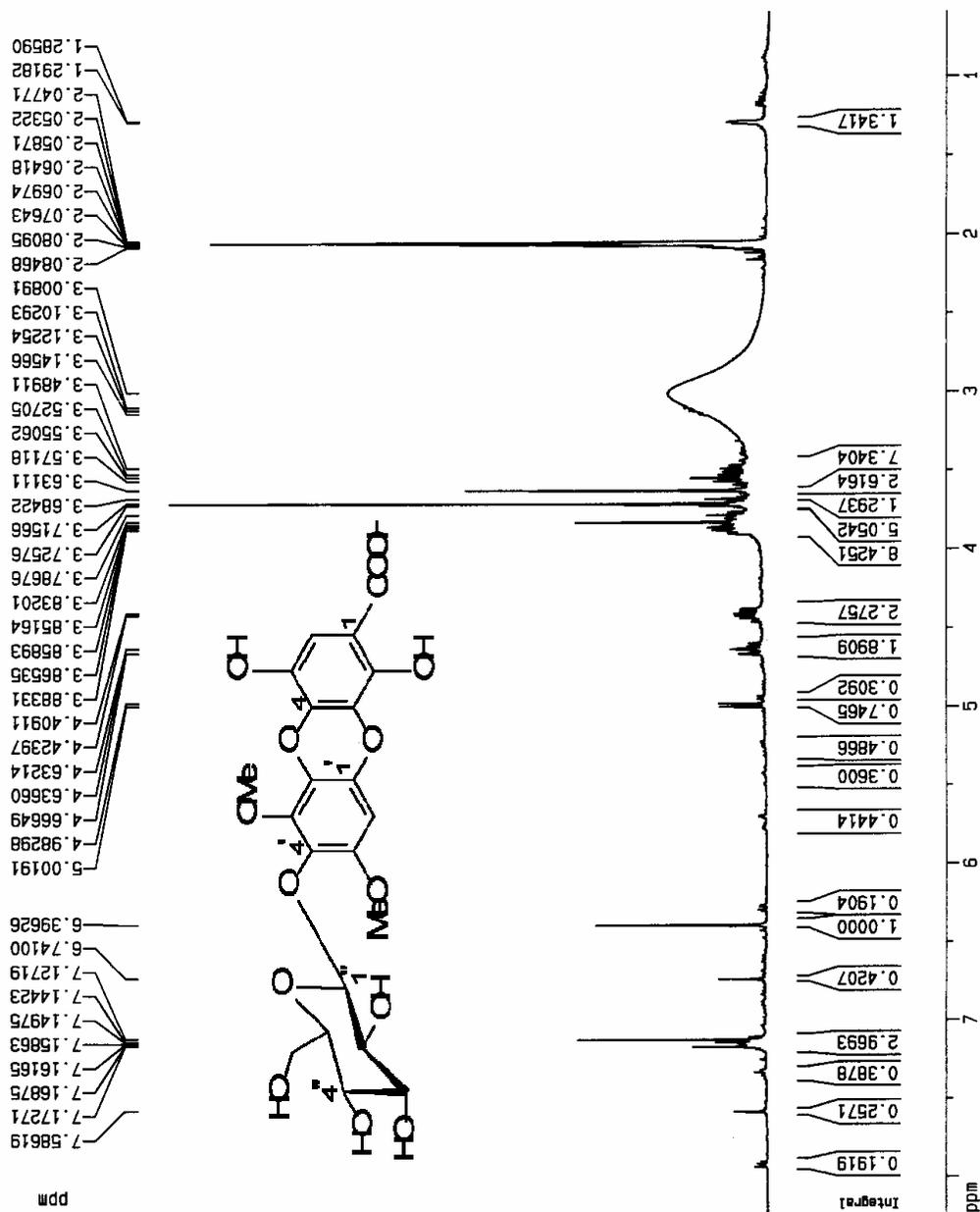


Figura 7-77- Espectro de RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆) da Substância LXIV

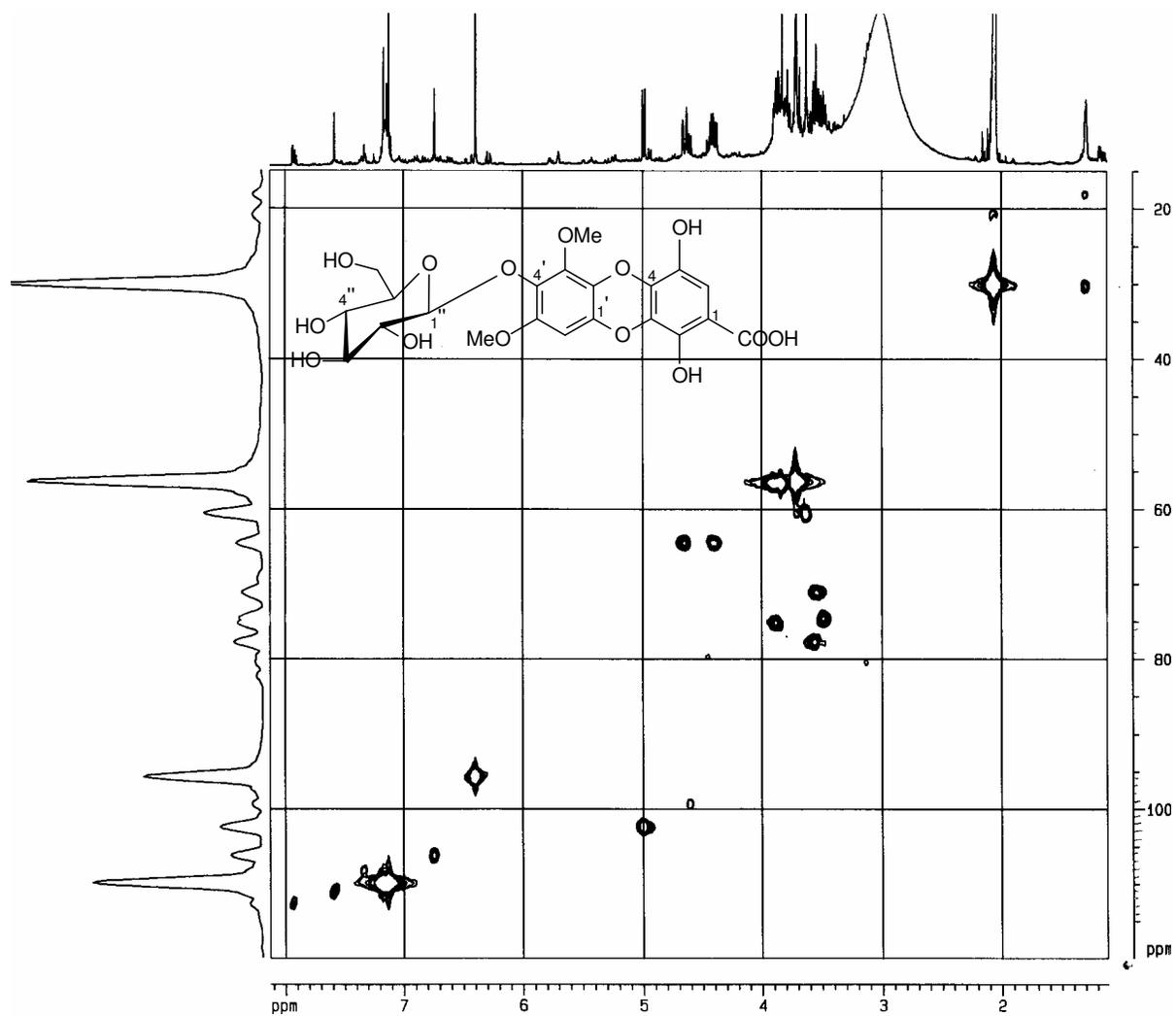


Figura 7-78- Espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV

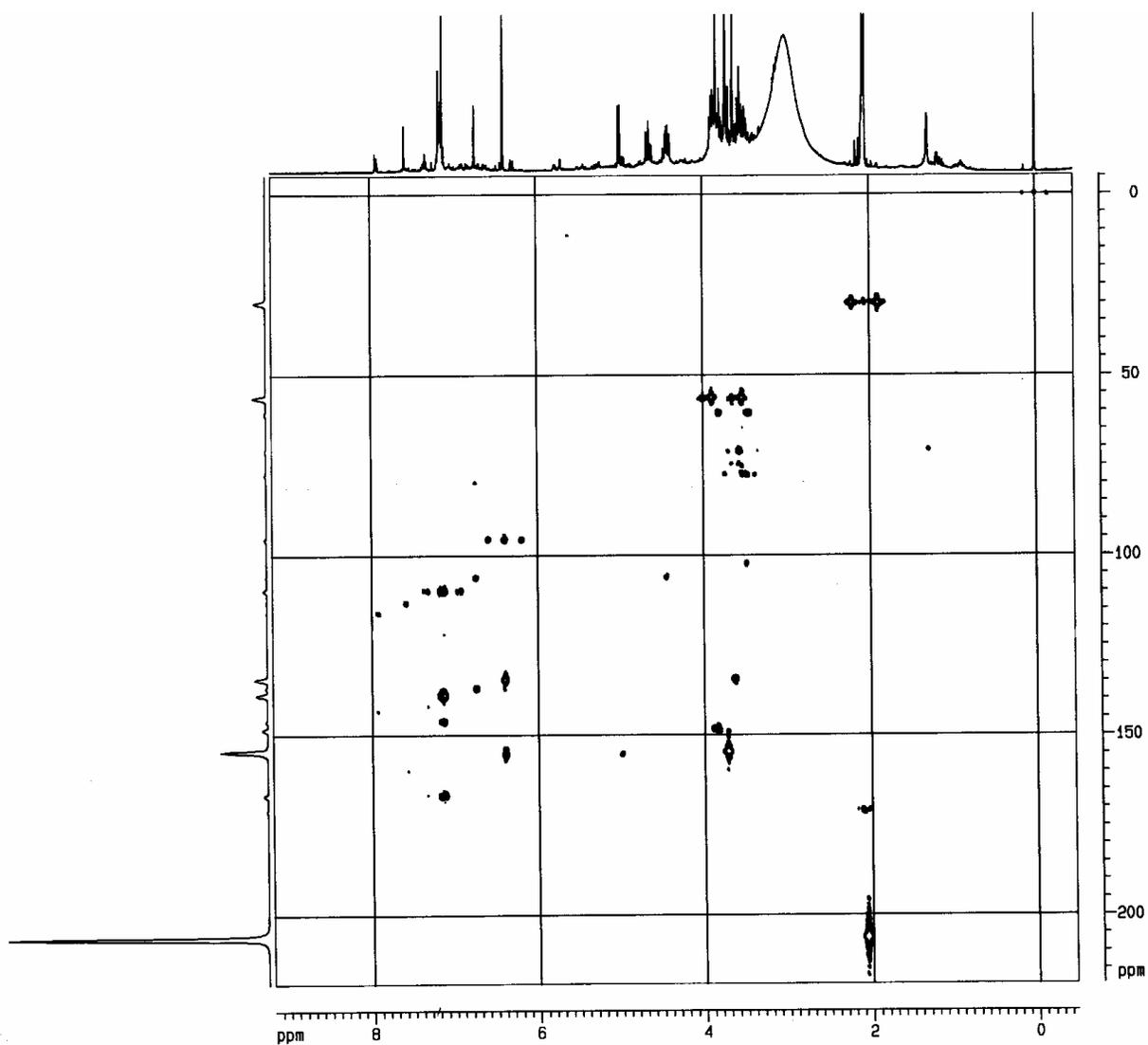
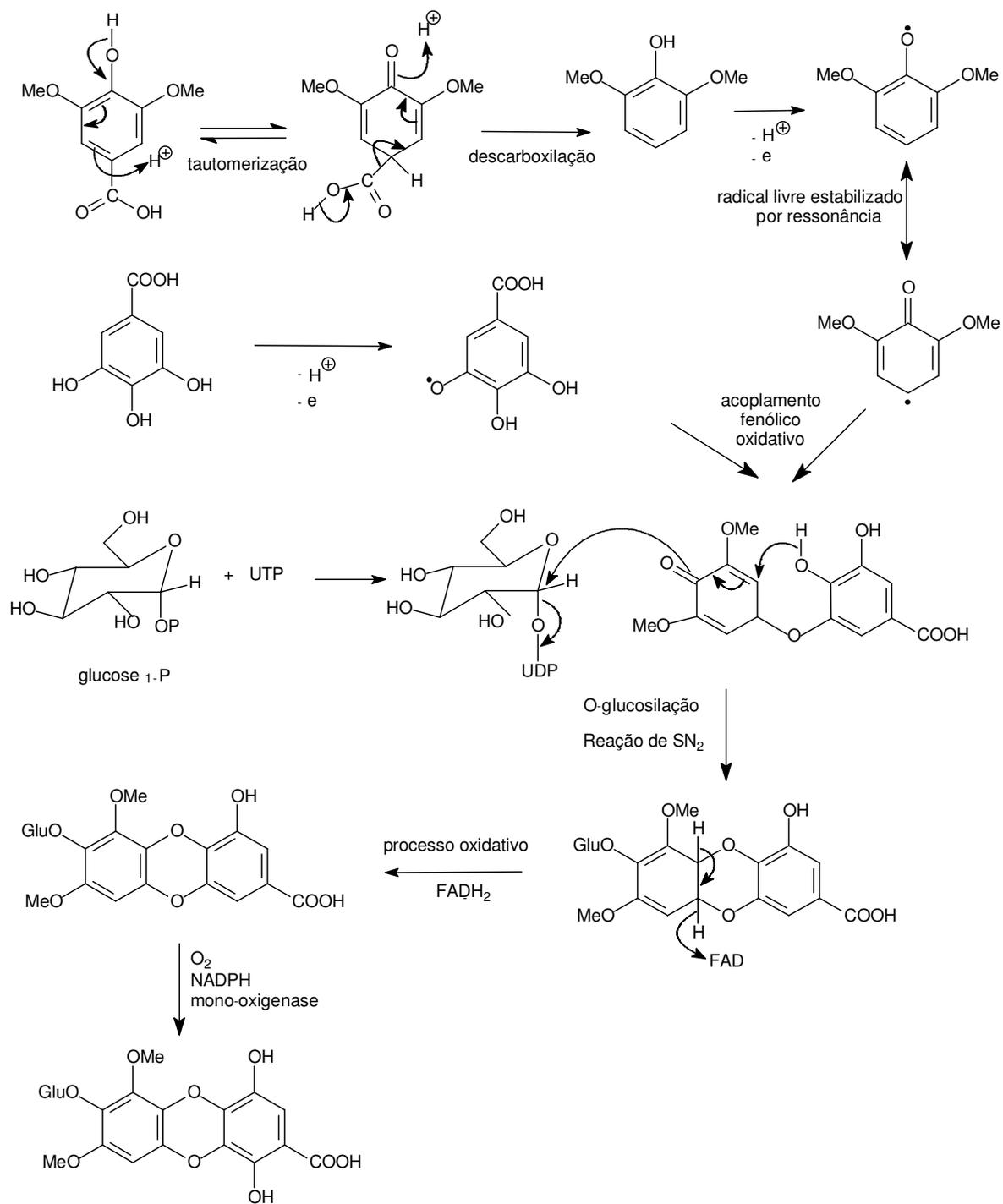
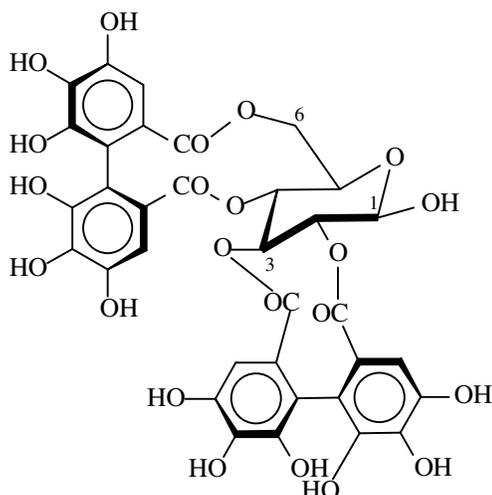


Figura 7-79- Espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HMBC (400 MHz, acetona- d_6) da Substância LXIV



Esquema 7-4- Proposta de formação biossintética da Substância LXIV (DEWICK, 1997)

7.20. Identificação da Substância LXV



2,3:4,6-di-O-[(S)-4,4',5,5',6,6'-hexaidroxidifenoil]- β -D-glucopiranoose ou β -pedunculagina

O extrato metanólico de caule de *S. densiflora*, partição *n*-butanol, após sofrer várias etapas cromatográficas em sephadex LH-20, forneceu a fração BMCjd, 66,7 mg; e o extrato hidrometanólico de caule, a fração XAAHMCS, 78,6 mg sob a forma de pó marrom avermelhado cristalino brilhante.

A análise do espectro de RMN ^1H (200 MHz, acetona- d_6 ; Figura 7-81; Tabela 7-21) revelou dois sinais em δ 6,71 e 6,56 (sl) referentes a dois grupos HHDP e sinais referentes a H carbinólicos entre δ 5,70 a 3,22, estando o sinal referente ao H anomérico em δ 5,53 (d, 6,9 Hz) e sua constante de acoplamento indicando tratar-se de um isômero β da glicose na sua forma cíclica.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6 ; Figura 7-80; Tabela 7-21) corroborou com a hipótese da existência de dois grupos HHDP quando revelou quatro sinais relativos às carbonilas destes grupos em δ 169,4; 167,3; 166,7 e 166,3. Não foram observados todos os sinais de carbonos carbinólicos, mas o sinal em δ 99,8 foi atribuído ao C anomérico.

Baseados nos dados obtidos dos espectros e nos dados relatados na literatura (OKUDA et al., 1982; OKUDA et al., 1983), foi proposta a estrutura do anômero β da pedunculagina.

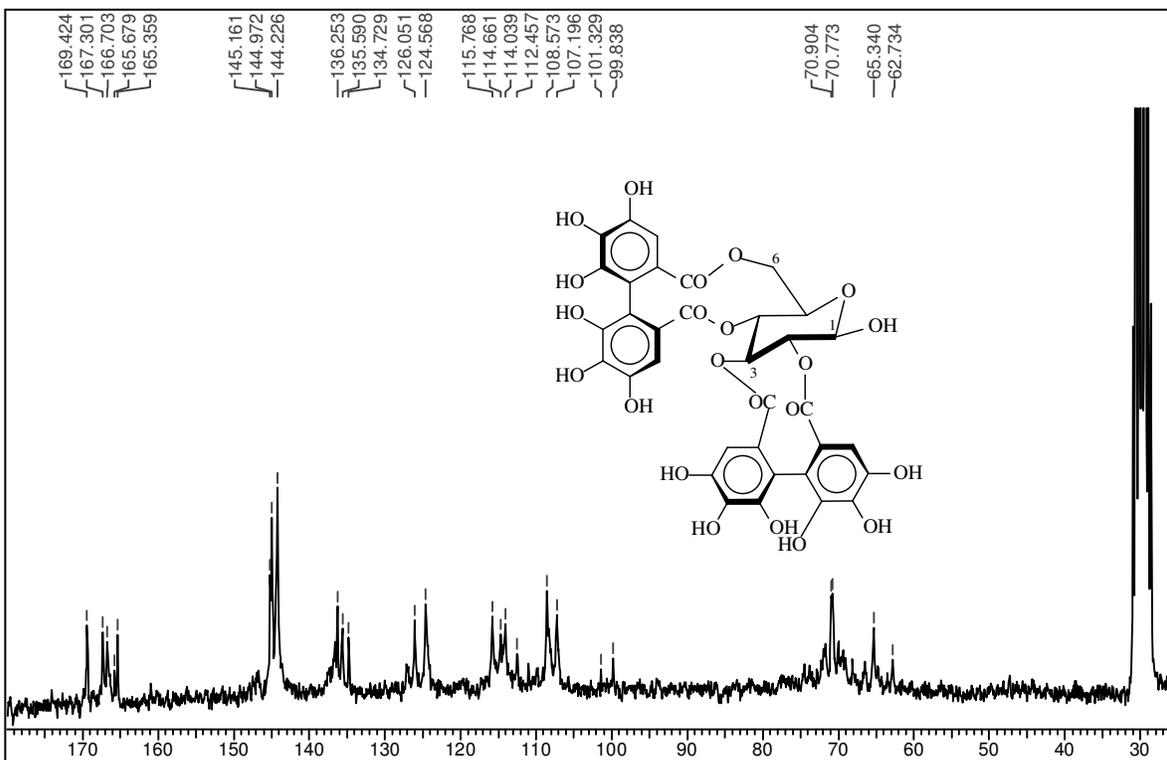


Figura 7-80- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6) da Substância LXV

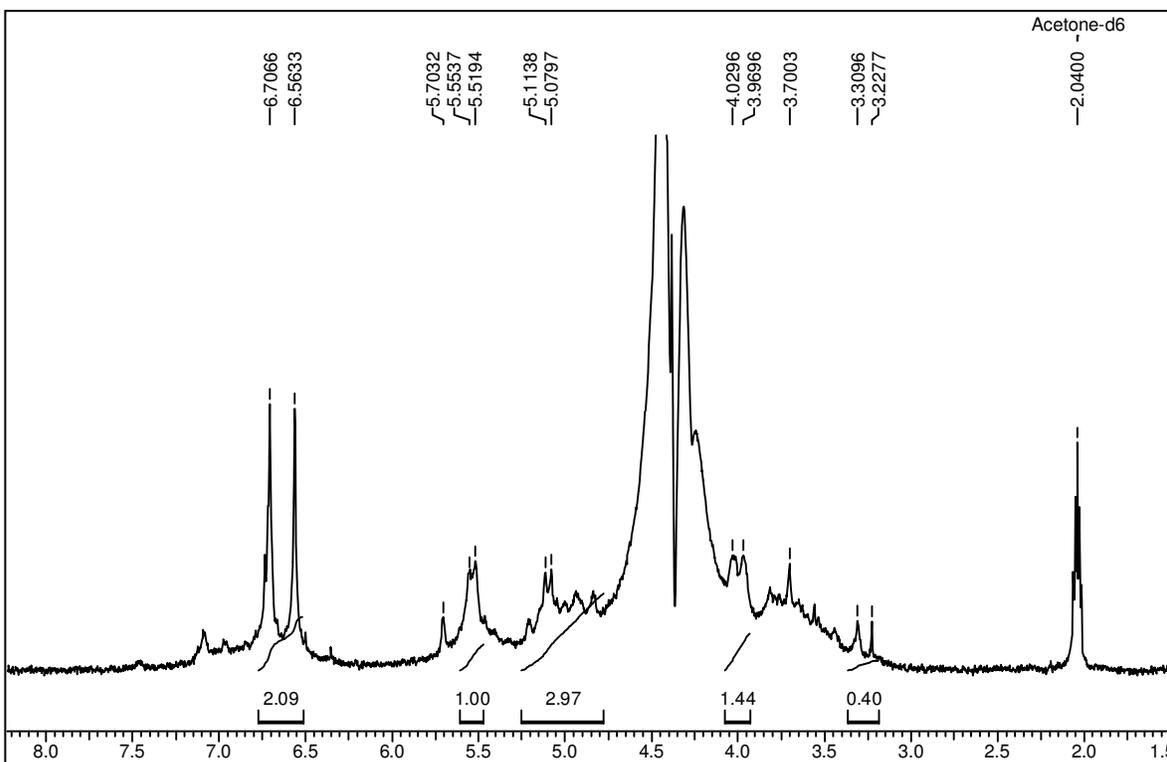


Figura 7-81- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, acetona- d_6) da Substância LXV

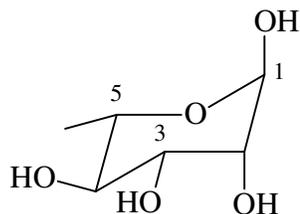
Tabela 7-21- Dados dos espectros de RMN ^{13}C e ^1H (50 e 200 MHz, acetona- d_6) da Substância LXV e da β -pedunculagina ^a

Posição ^{13}C glicose	1	2	3	4	5	6
Substância LXV	99,8	*	*	70,8	70,9	65,3
β -pedunculagina	95,4	78,3	77,6	69,6	72,5	63,6
Posição ^1H	3	3'	3''	3'''	anomérico	
Substância LXV	6,71	6,56	6,71	6,56	5,53 (d; 6,9 Hz)	
β -pedunculagina	6,68	6,60	6,56	6,33	5,22 (d; 9 Hz)	

^a (OKUDA et al., 1983; OKUDA et al., 1982); * Sinais não observados

7.21. Identificação da Substância LXVI

ramnose



O extrato metanólico de casca da raiz de *S. densiflora*, partição acetato de etila, após sofrer várias etapas cromatográficas em sephadex LH-20, forneceu a fração R12e3, 8,7 mg, sob a forma de pó branco amorfo.

A análise do espectro de RMN ^1H (200 MHz, piridina- d_5 ; Figura 7-82) indicou ser uma mistura do açúcar ramnose, em maior proporção, com outras duas substâncias não identificadas também derivadas da ramnose, por apresentar diversos sinais na região de metilas e H carbinólicos. O sinal em δ 1,59 (d; 6,2 Hz) foi atribuído aos H do grupo metila e o sinal em δ 5,86 (sl) ao H anomérico em configuração β .

A análise do espectro de RMN ^{13}C (50,0 MHz, CD_3OD ; Figura 7-83) confirmou ser o açúcar a ramnose e os sinais em δ 95,8; 74,3; 73,0; 72,1; 69,3 e 18,1 foram atribuídos aos carbonos 1, 4, 3, 2, 5 e 6 respectivamente.

O espectro de massas, ESI modo negativo, revelou um pico referente ao aduto de cloro em m/z 199 $[\text{M}-\text{H}+35]^-$ e o espectro de massas, ESI modo positivo, revelou um pico referente ao aduto de sódio em m/z 187 $[\text{M}+23]^+$ (Figura 7-84). Tais dados possibilitaram a dedução da massa molecular de 164 g/mol referente à fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$. Os espectros também evidenciaram as massas de 206 e 222, relativas às duas substâncias não identificadas.

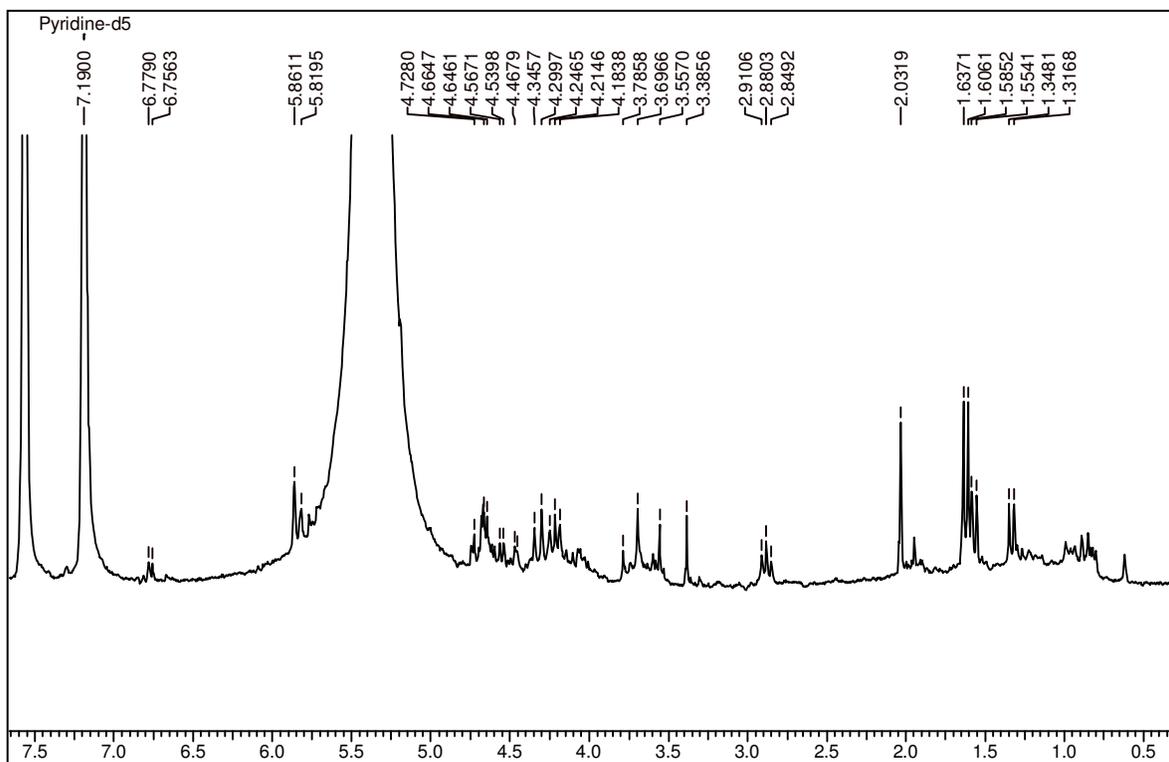


Figura 7-82- Espectro de RMN ^1H (200 MHz, piridina- d_5) da Substância LXVI

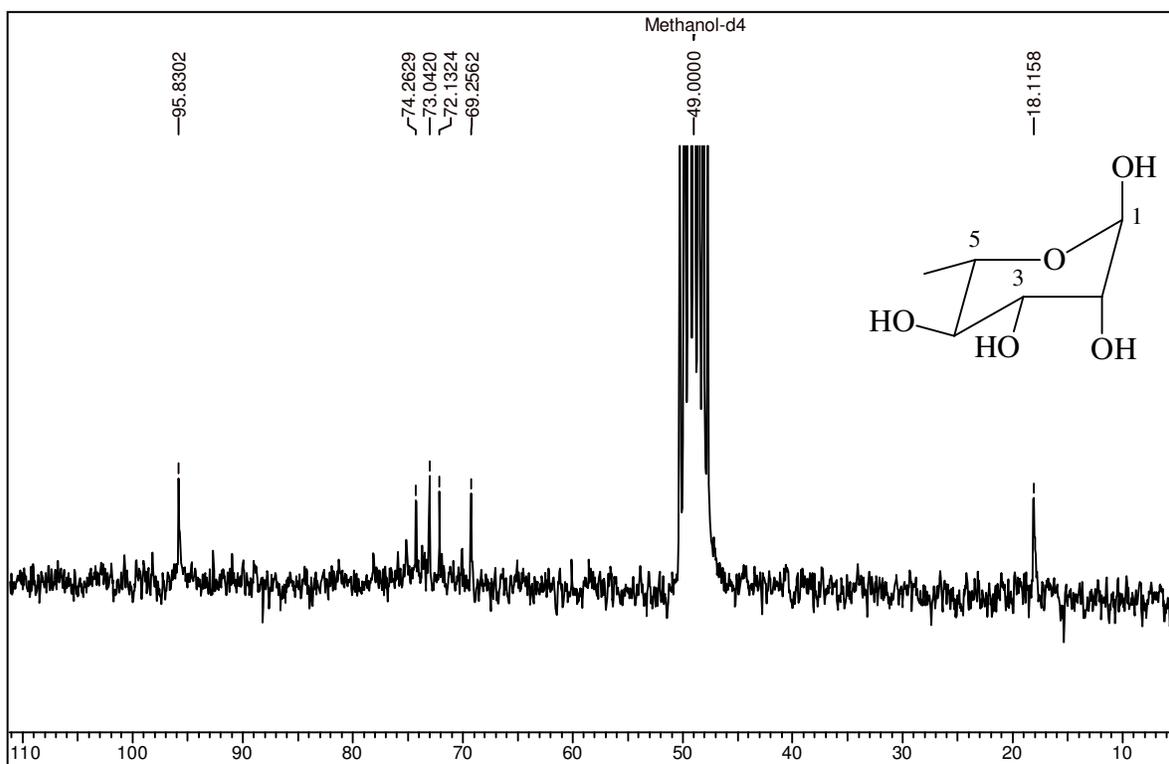


Figura 7-83- Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) da Substância LXVI

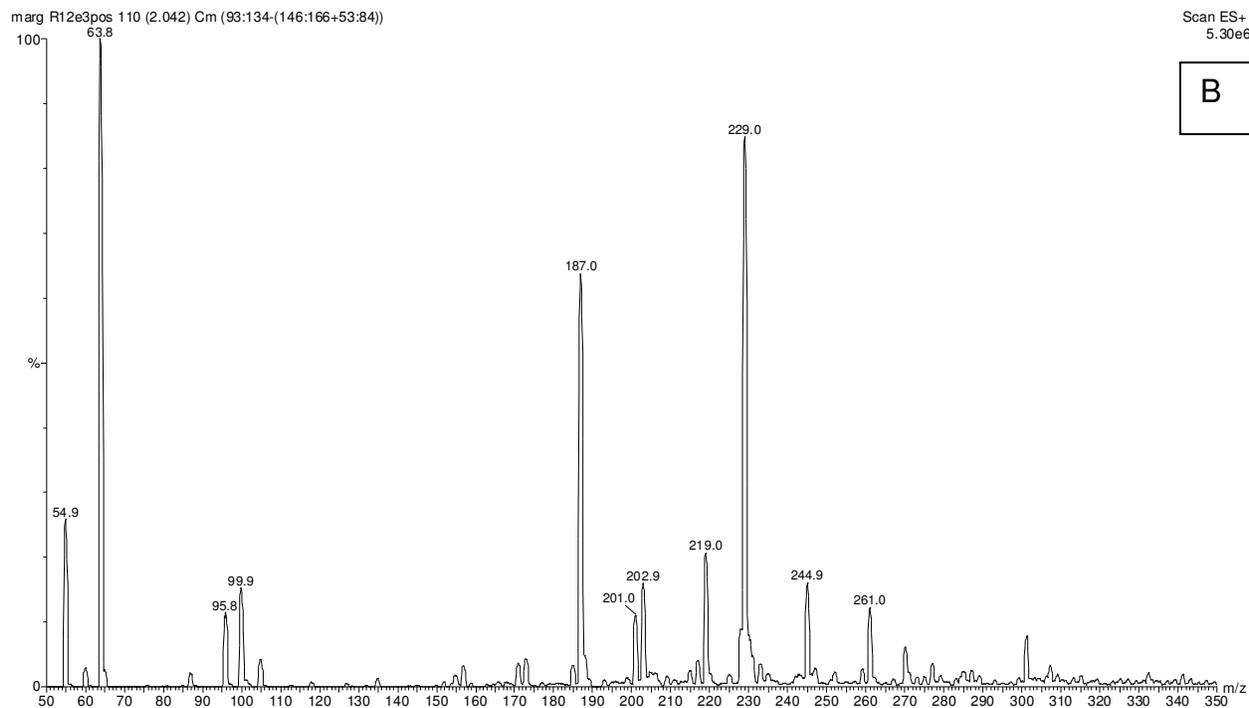
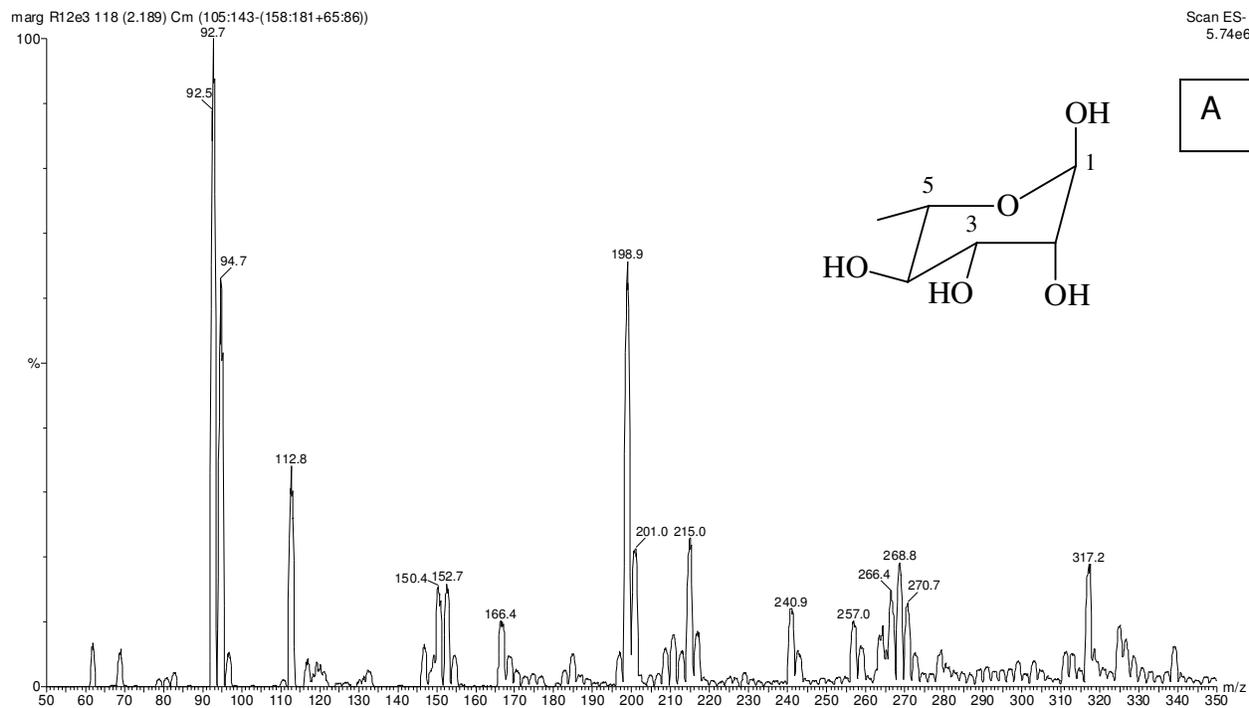
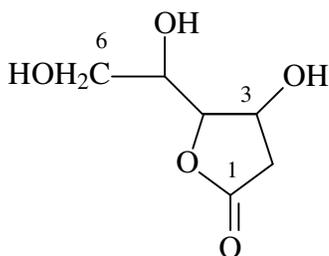


Figura 7-84- Espectros de massas, ESI modo negativo (A) e positivo (B), da Substância LXVI

7.22. Identificação da Substância LVII



γ -lactona do ácido 3, 4, 5, 6-tetraidroxihexanóico

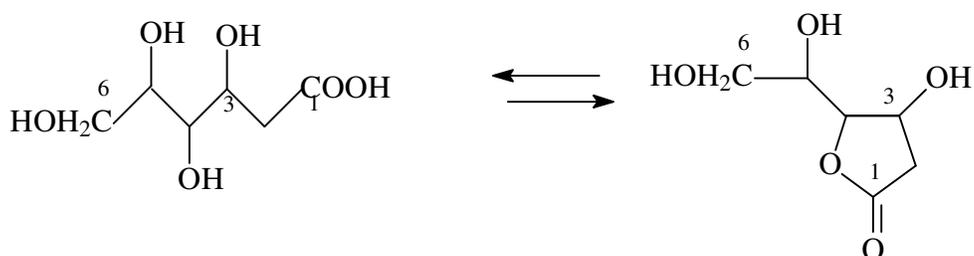
O extrato metanólico de casca da raiz de *S. densiflora*, partição acetato de etila, após sofrer várias etapas cromatográficas em sephadex LH-20, forneceu a fração R12e4, 4,0 mg, sob a forma de pó branco amorfo.

A análise do espectro de RMN ^1H (400 MHz, piridina- d_5 ; Figura 7-90) da fração mencionada indicou ser uma mistura de dois açúcares, juntamente com ácidos fenólicos metoxilados não identificados, devido aos muitos e intensos sinais presentes na região de H carbinólicos. O sinal em δ 5,94 (d; 1,4 Hz) foi atribuído a um H anomérico em configuração β . Não foi observado outro sinal referente a H anomérico, fato que indicou que o outro açúcar poderia estar modificado. A realização dos experimentos de RMN ^{13}C e DEPT 135 (50 MHz, piridina- d_5 ; Figura 7-87; Figura 7-88), NOE, HSQC e HMBC (400 MHz, piridina- d_5 ; Figura 7-92; Figura 7-93; Figura 7-94; Figura 7-91; Figura 7-89; Tabela 7-22) permitiu que os valores de deslocamentos observados fossem imputados a uma molécula de ramnose (Substância LXVI) e a uma γ -lactona do ácido 3,4,5,6-tetraidroxihexanóico (Substância LXVII), esta molécula foi identificada principalmente pelas correlações observadas no espectro de RMN $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 7-89) entre o sinal em δ 5,02 (dd; 6,6 e 4,5; H-3) e δ 4,93 (dd; 5,3 e 3,3; H-4) com o sinal em δ 176,9 e a correlação observada no espectro de RMN $^1\text{H}^{13}\text{C}$ HSQC (Figura 7-91) entre o sinal em δ 4,93 (dd; 5,3 e 3,3; H-4) com o sinal em δ 89,4, indicando tratar-se de uma lactona pentacíclica, devido aos valores observados de J .

O espectro de massas, ESI modo positivo (Figura 7-86), revelou picos referentes ao aduto de sódio em m/z 187 $[\text{M}+23]^+$, confirmando a presença da molécula de ramnose de fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$, e ao aduto de sódio em m/z 203 $[\text{M}+18+23]^+$, indicando estar a lactona na sua forma hidratada de fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. De acordo com MORRISON & BOYD (1972), os γ e δ -hidroxiácidos perdem água por esterificação. Esta reação é intramolecular e o curso da reação é determinado

pela tendência a formar-se um anel pentagonal ou hexagonal. A lactonização dá-se espontaneamente, com formação de uma mistura em equilíbrio (Esquema 7-5), constituída principalmente pela lactona, como foi detectado no espectro de RMN $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HMBC, sendo que a correlação observada entre o sinal em δ 5,02 (dd; 6,6 e 4,5; H-3) com o sinal em δ 175,9 revelou também a presença da forma aberta, em menor quantidade. Há a possibilidade desta substância ter se originado da oxidação de uma 2-desoxialdohexose.

A proposta estrutural relativa à γ -lactona foi baseada em valores de deslocamentos de C referentes a modelos de moléculas relatados na literatura (PFEFFER et al., 1979 ; Tabela 7-22; Figura 7-85; Tabela 7-23).



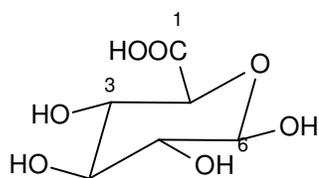
Esquema 7-5- Reação de equilíbrio da γ -lactona e do seu ácido correspondente, o ácido 3,4,5,6-tetraidroxihexanóico

Tabela 7-22- Dados dos espectros de RMN ^{13}C , DEPT135, ^1H , NOEDIFF, $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ HSQC e HMBC (50 e 400 MHz, piridina- d_5) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

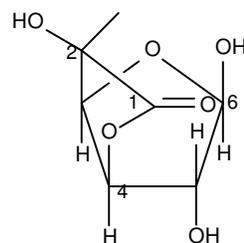
Posição/ LXVI	^{13}C (multiplicidade)	^1H /HSQC (J em Hz)	NOEDIFF	HMBC
1	95,6 (d)	5,94 (d; 1,4)		68,9 (C-5); 73,2 (C-3)
2	72,4 (d)	4,73 (dd; 1,6 e 3,4)	5,94	74,1 (C-4)
3	73,2 (d)	4,78 (dd; 3,4 e 9,2)	1,69; 5,94; 4,73; 4,37	
4	74,1 (d)	4,37 (t; 9,4)		18,6 (C-6); 68,9; 73,2
5	68,9 (d)	4,68 (dd; 6,2 e 9,3)		
6	18,6 (q)	1,69 (d; 6,2)	4,37; 4,68	68,9; 74,1
Posição/ LXVII				
1	176,9 (s)			
		3,34 (dd; 17,6 e 6,6)		89,4 (C-4);
2	39,1 (t)	2,88 (dd; 17,6 e 2,5)	3,34; 5,02	176,9 (C-1); 68,9 (C-3)
3	68,9 (d)	5,02 (dd; 6,6 e 4,5)	3,34; 2,88; 4,14; 4,05	176,9; 61,8 (C- 6); 175,9 (C-1)
4	89,4 (d)	4,93 (dd; 3,3 e 5,3)		176,9; 68,9; 73,2 (C-5)
5	73,2 (d)	4,78 (dd; 3,4 e 9,2)		
		4,14 (dd; 3,3 e 12,2)		
6	61,8 (d)	4,05 (dd; 3,3 e 12,2)		68,9; 89,4

Tabela 7-23- Dados dos espectros de RMN ^{13}C da Substância LXVII (50 MHz, piridina- d_5), do ácido β -D-glucopirranurônico e da γ -lactona do ácido β -D-glucofuranurônico

Posição	ácido β -D-glucopirranurônico	γ -lactona do ácido β -D-glucofuranurônico	Substância LXVII
1	176,9	177,8	176,9
2	76,9	70,4	39,1
3	73,0	76,7	68,9
4	73,5	85,6	89,4
5	72,2	74,8	73,2
6	92,4	99,1	61,8



ácido β -D-glucopirranurônico



γ -lactona do ácido β -D-glucofuranurônico

Figura 7-85- Modelos usados para a identificação da Substância LXVII

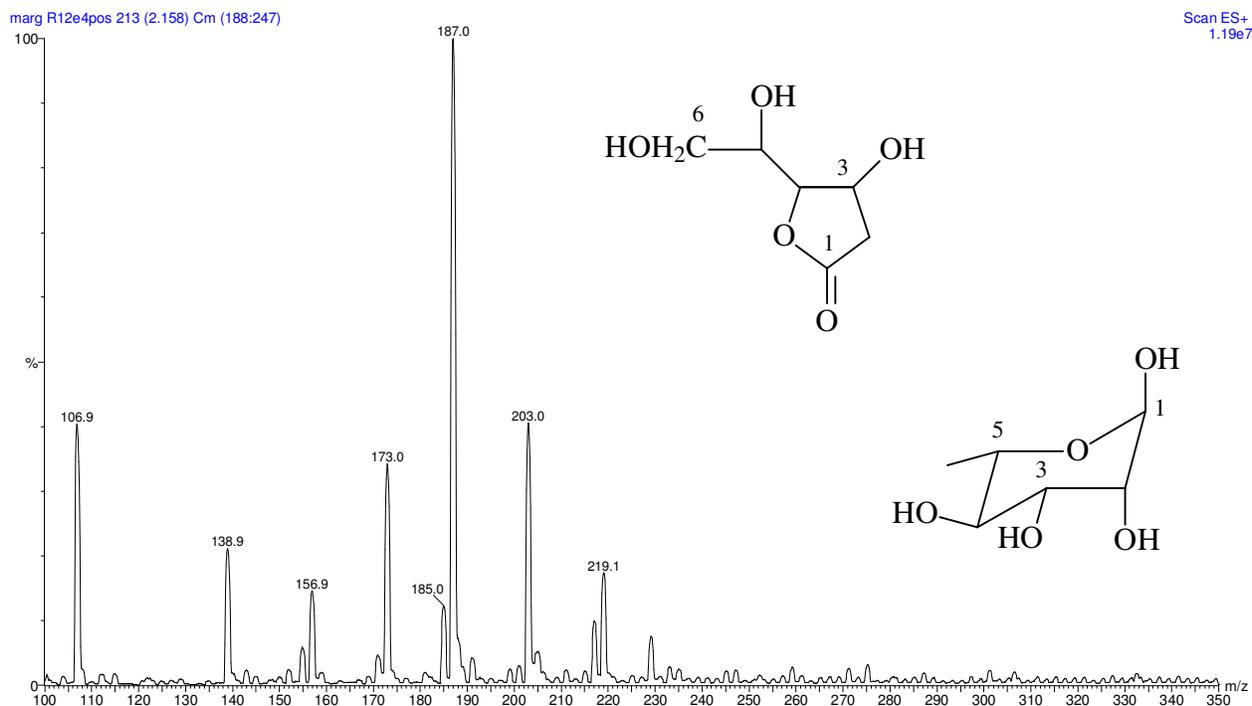


Figura 7-86- Espectro de massas, ESI modo positivo, da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

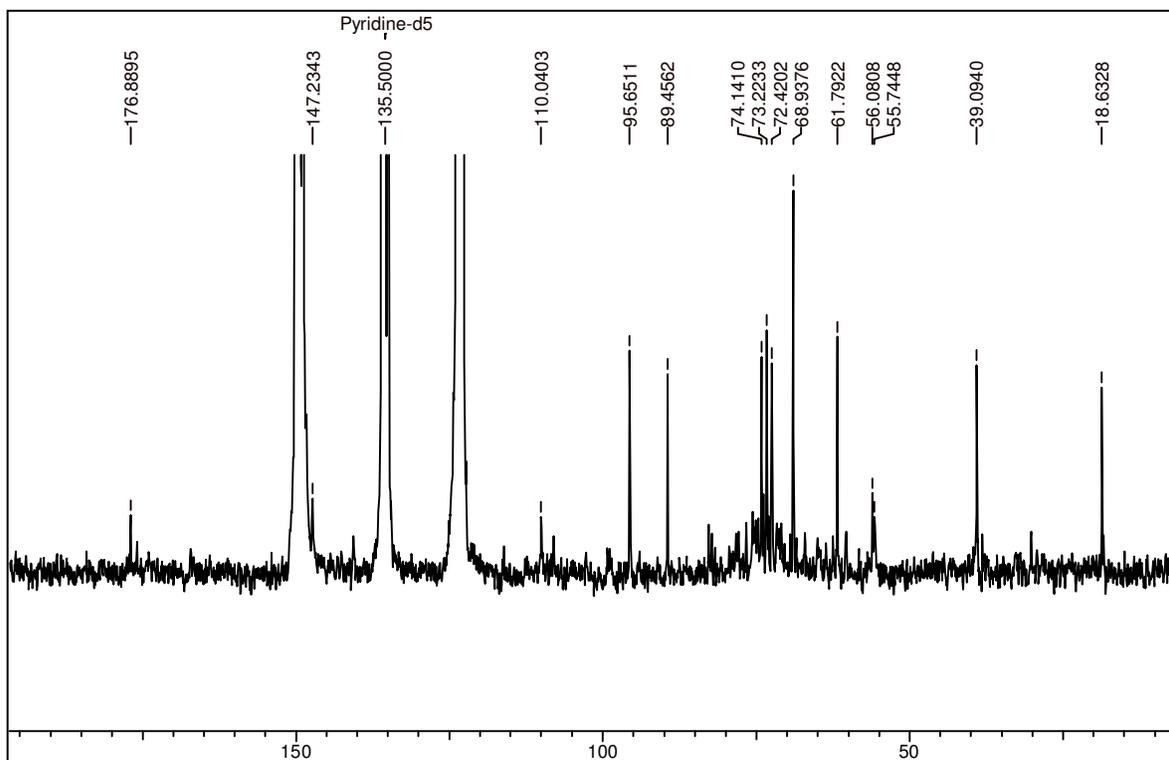


Figura 7-87- Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, piridina-d₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

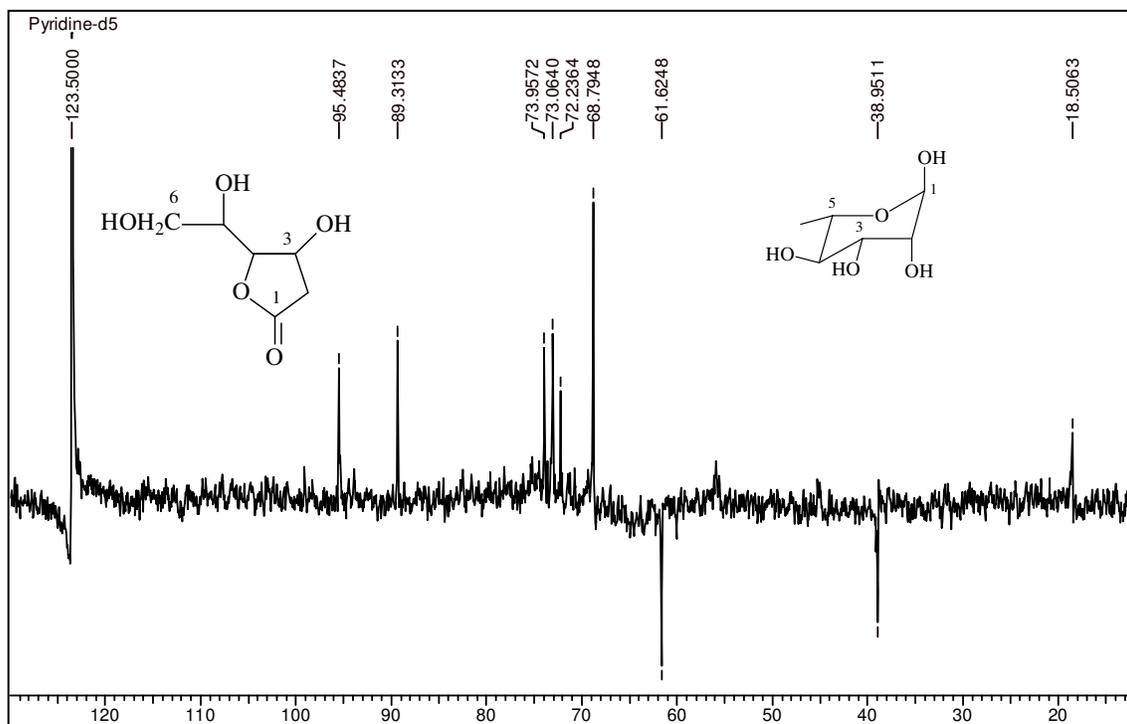


Figura 7-88- Espectro de RMN ¹³C/DEPT 135 (50 MHz, piridina-d₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

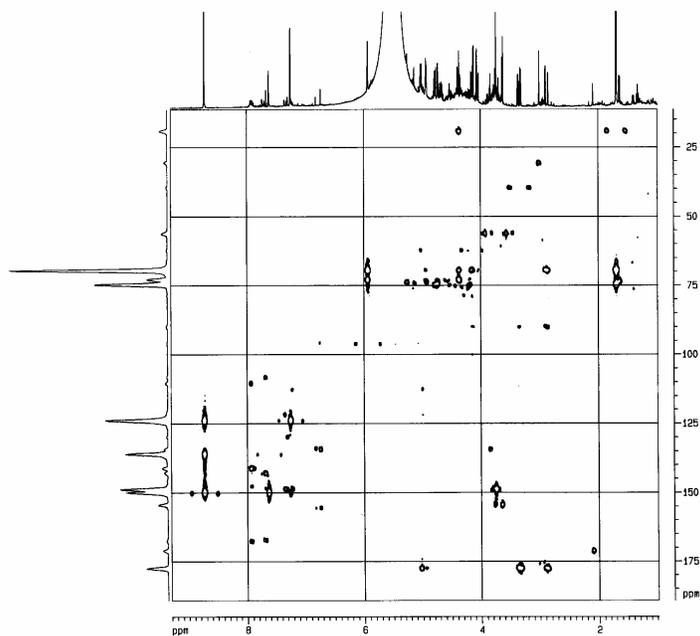


Figura 7-89- Espectro de RMN ¹Hx¹³C HMBC (400 MHz, piridina-d₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

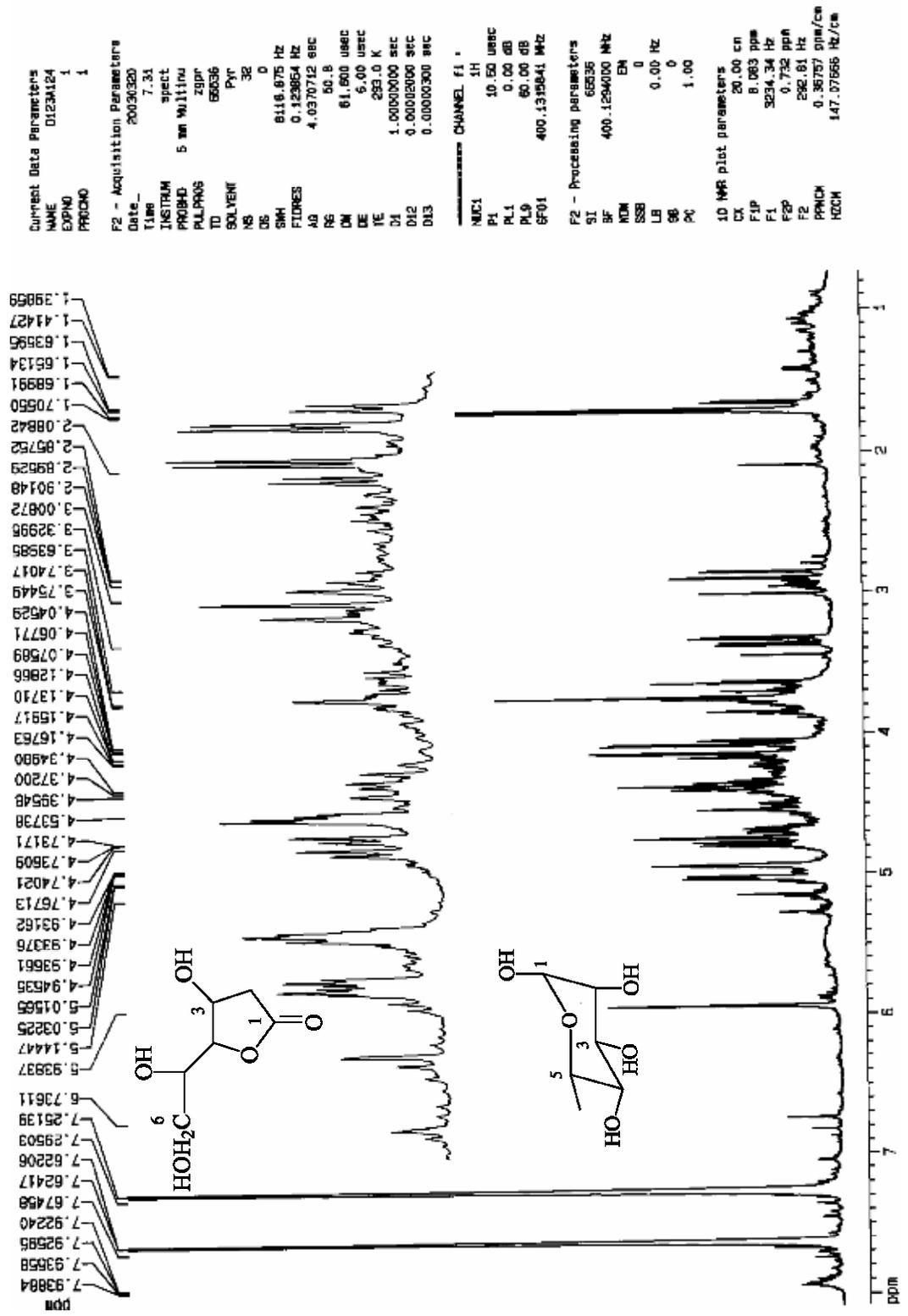


Figura 7-90- Espectro de RMN ¹H (400 MHz, piridina-d₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

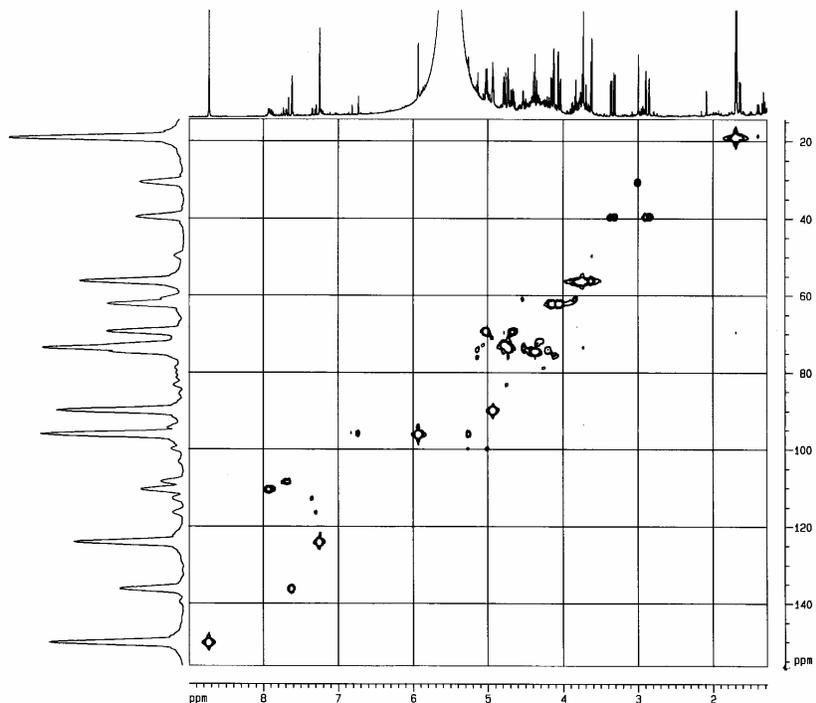


Figura 7-91- Espectro de RMN $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ HSQC (400 MHz, piridina- d_5) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

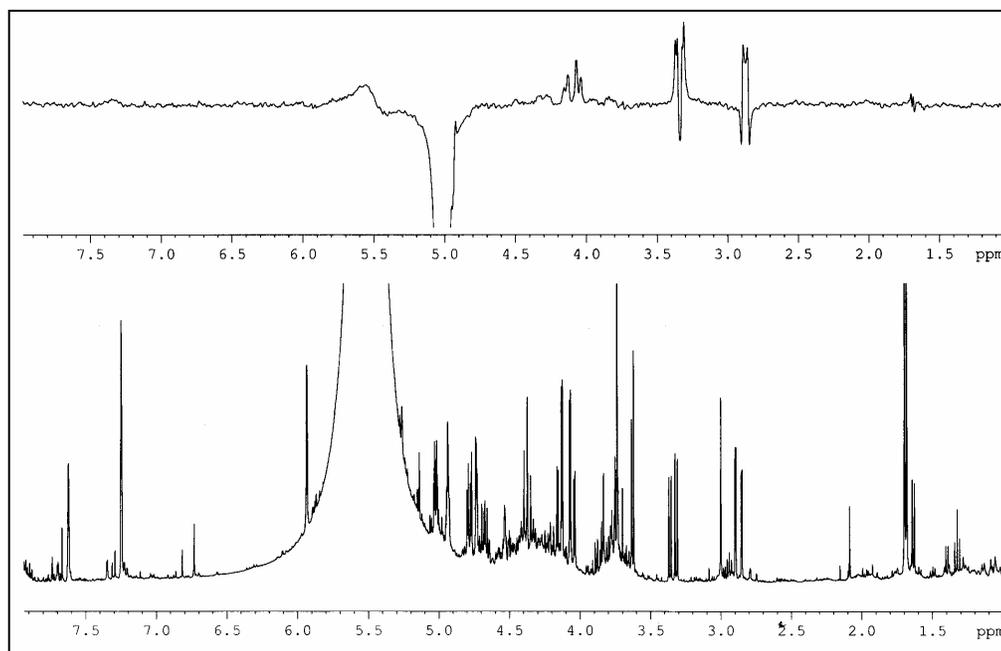


Figura 7-92- Espectro de NOEDIFF (400 MHz, piridina- d_5), irradiação em δ 5,02, da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

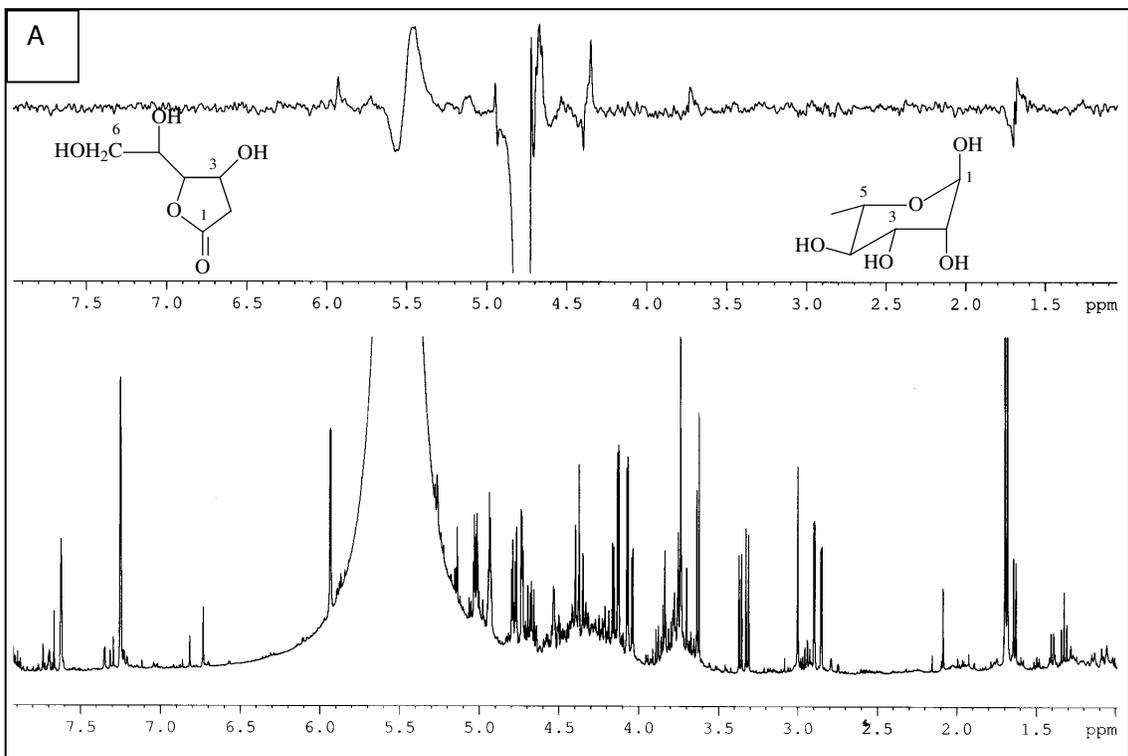
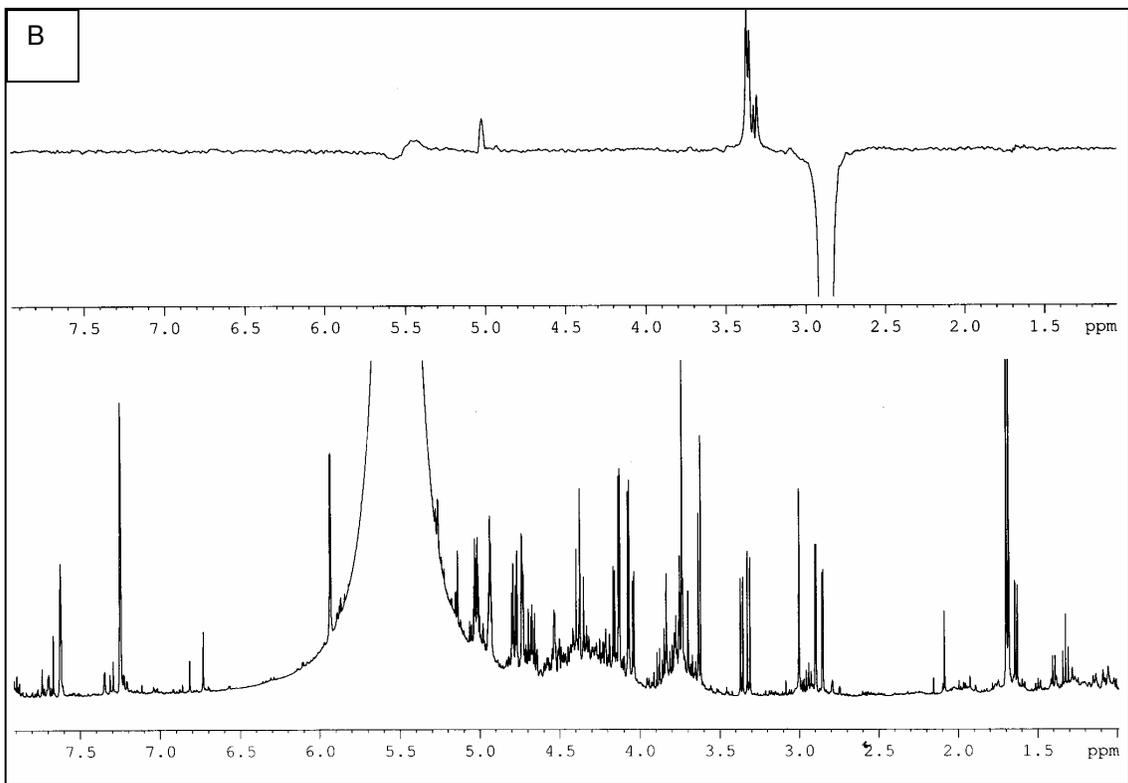


Figura 7-93- Espectro de NOEDIFF (400MHz, piridina-d₅) da mistura das Substâncias LXVI e LXVII

A: irradiação em δ 4,78 e B: em δ 2,88

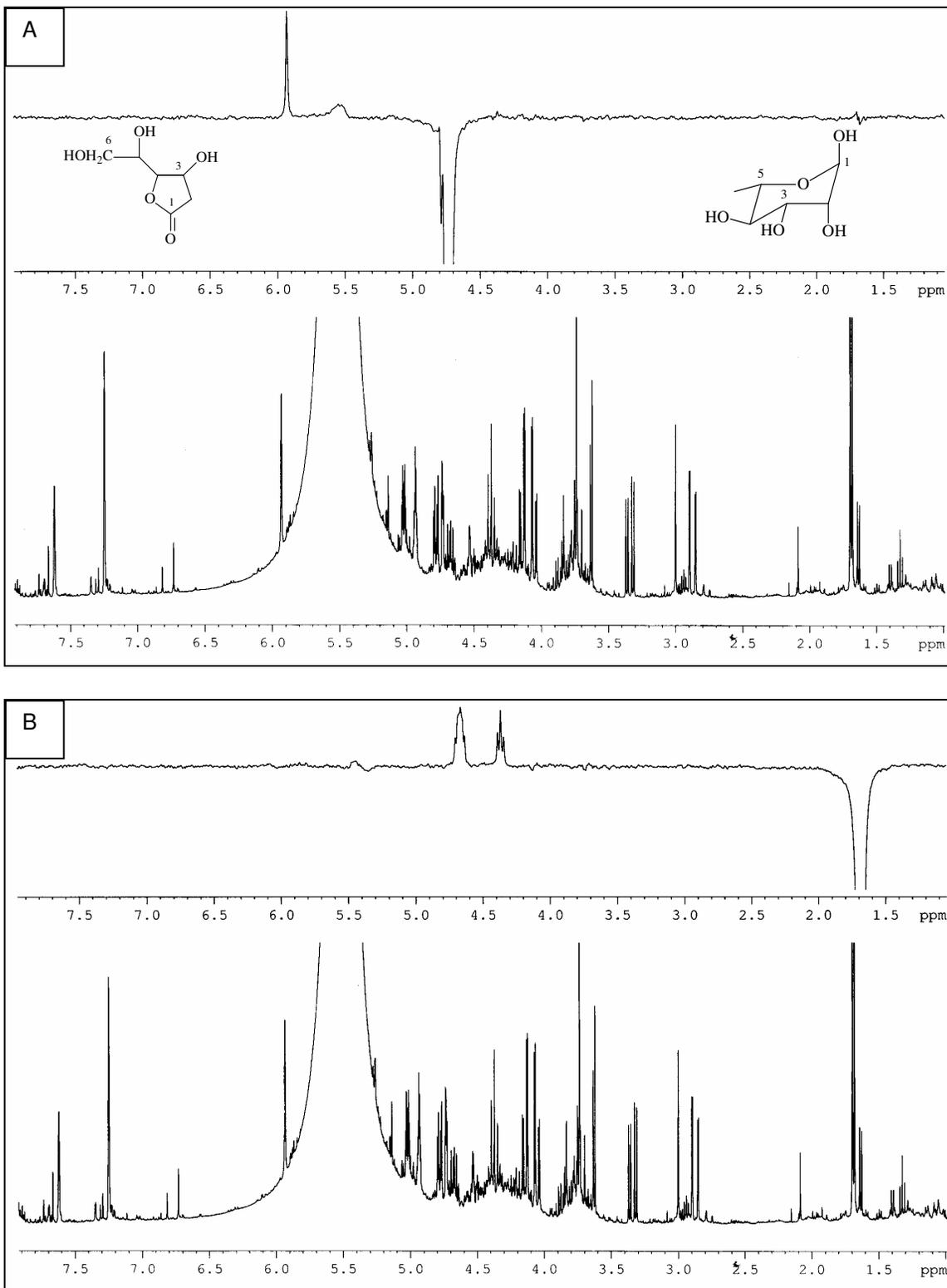


Figura 7-94- Espectro de NOE (400MHz, piridina-d₅) da mistura das Substâncias

LXVI e LXVII

A: irradiação em δ 4,73 e B: em δ 1,69

8.Desenvolvimento de um método para a análise e quantificação da 20-hidroxicdisona

8.1. Introdução

8.1.1. Ecdisteróides: estrutura química

Os ecdisteróides compreendem uma classe de esteróides naturais (ciclopentano-peridrofenantreno). Pertencem principalmente à série 5β -androstano, onde os anéis A/B têm anelação *cis*. O esqueleto básico tem de 27 a 29 átomos de C, retendo o esqueleto carbônico do colesterol (C-27) ou dos fitosteróis (C-28 ou 29), podendo conter 19, 24 ou 21 átomos, se provenientes da quebra da cadeia lateral do colesterol. Apresentam a cadeia lateral dos esteróides ou um anel lactônico na posição 17. Têm como características gerais a conjugação 7-en-6-ona no anel B (a qual é responsável pela absorção no UV) e o grupo 14α -hidroxila, além de várias outras hidroxilas (com maior ocorrência nas posições 1, 2, 3, 5, 11, 12, 16 a 18, 20 a 27; Figura 8-1). Também podem suportar outros substituintes, como carbonilas, nas posições 3, 12, 17, 20 ou 22; grupos carboxílicos, nas posições 26 ou 29, às vezes na forma lactônica, além de glicosídeos, fosfatos, acetatos, benzoatos e várias outras formas esterificadas (BÁTHORI, 1998).

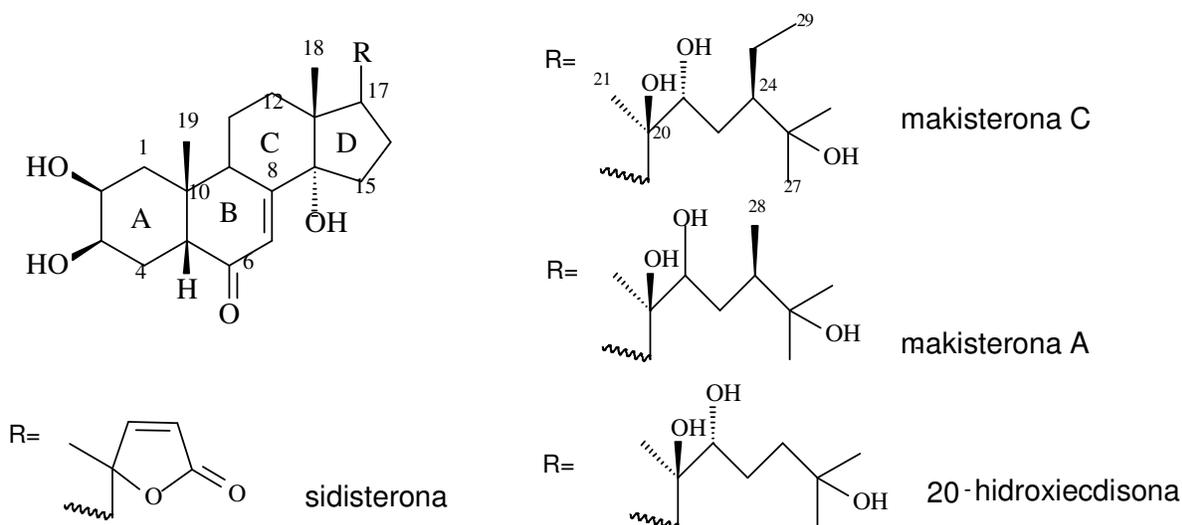


Figura 8-1- Estrutura geral dos ecdisteróides

8.1.2. Ocorrência na natureza

Os ecdisteróides foram primeiramente encontrados em insetos, onde atuam como hormônios responsáveis pela metamorfose. Mais tarde, foram descobertos em artrópodes e várias outras famílias de invertebrados, mas sempre em pequenas quantidades. Por isto, sua pesquisa foi incrementada quando foram detectados em plantas, numa concentração muita mais alta do que a encontrada nos insetos (10 a 1000 mg/Kg. No caso da *Leuzea carthamoides*, suas sementes contêm 20 g/Kg ou o extrato etanólico da raiz que contém 0,4 % da matéria seca) sendo registrados em mais de 120 famílias, com exemplares comuns como o espinafre. O número de fitoecdisteróides diferentes é três vezes maior do que os zooecdisteróides (SLÁMA & LAFONT, 1995).

O corpo humano obtém os ecdisteróides através da dieta contendo vegetais.

A função dos ecdisteróides nas plantas ainda é conjectural, acreditando-se que eles podem fornecer alguma proteção contra insetos fitófagos não adaptados. No entanto, a atuação deles tanto em plantas como em vertebrados não pode ser considerada como hormonal (BÁTHORI, 1998).

8.1.3. Atividade biológica

Estudos realizados sobre os efeitos dos ecdisteróides em vertebrados foram iniciados com os trabalhos pioneiros de Burdette entre 1960-1974, inicialmente com extratos de insetos e, posteriormente, com a ecdisona sintética (SLÁMA & LAFONT, 1995).

Atualmente, sabe-se que a 20-hidroxiecdisona (20E) influencia a diferenciação da epiderme humana *in vitro*, aumentando o número de camadas celulares e melhorando a expressão de marcadores de diferenciação e maturação. Tal conhecimento rendeu a patente de uma formulação que contém a 20E, lecitina e sitosterol num lipossomo que se encontra incorporado a um gel, o qual é usado para estimular a cicatrização de ferimentos e regeneração da pele e no tratamento de

psoríase, porém ainda não está sendo comercializada. É usada na preparação de cremes hidratantes (50-300 mg/100 g) (SLÁMA & LAFONT, 1995).

Todos os fitoecdisteróides, tanto quanto a 4-clorotestosterona usada como controle, estimulam a síntese de proteínas em fígado e tecido nervoso de mamíferos. A 20E aumenta a atividade da enzima acetilcolinesterase no cérebro humano, com atuação semelhante ao estradiol. Diminui a atividade da proteína quinase em ratos. É estimulante do metabolismo geral, produzindo efeitos anabólicos (aumento de massa corporal devido ao aumento de tecido muscular, promovendo mais força e eficiência dos músculos esqueléticos). Tal função é a responsável pela existência e comercialização de cerca de 180 formulações contendo a 20E pura sintética ou extratos de plantas como a *Leuzea carthamoides* (Asteraceae; planta russa usada como anabólico e rejuvenescedor); *Pfaffia paniculata* (Amaranthaceae; Ginseng brasileiro, usado como estimulante geral); *Ajuga decumbens* (Lamiaceae); *Polypodium vulgare* (Polypodiaceae); *Cyanotis arachnoidea* da Somália (Commelinaceae) entre outras, juntamente com vitaminas e sais minerais, sendo a maioria indicada como suplemento alimentar ou anabólico, com um preço médio de \$ 30 a 60 dólares (<http://ecdybase.org/>).

Em contraste com hormônios esteroidais anabólicos de vertebrados, a ação anabólica da 20E não está associada com efeitos colaterais adversos androgênicos, antigonadotrópicos ou timolítico e não é prontamente detectada em testes antidrogas corriqueiros (SLÁMA & LAFONT, 1995).

A 20E atua ainda sobre o coração (antiarrítmico); sobre funções neuromusculares (anestésico fraco); é antioxidante; estimulante leve de reações imunes e fagocitose; antiinflamatório (na dose de 10-20 mg/Kg/dia é tão ativo quanto o acetato de cortisona), espermicida e agente quimiopreventivo do câncer (SLÁMA & LAFONT, 1995).

A toxicidade aos mamíferos é extremamente baixa, sendo cerca de 9 g/Kg da 20E em ratos e não tem efeito genético direto (SLÁMA & LAFONT, 1995).

Na Rússia e no Japão, sementes ou raízes pulverizadas de *Leuzea* são adicionadas à ração de gados, porcos e codornas, na concentração de 20 %, como aditivo alimentar que produz efeito anabólico sem efeitos adversos nos órgãos internos como intestino, cólon, fígado e rins (SLÁMA & LAFONT, 1995).

A preparação farmacêutica mais importante, cujo princípio ativo está baseado na presença de ecdisteróides, é o “Ecdisten”, comercializado desde 1982 na antiga União Soviética pela Medexport, Moscou. Foi desenvolvida no Instituto de Compostos Naturais da Academia Uzbek de Ciências, em Tashkent. Originalmente foi intitulada como composto natural obtido de raízes de *L. carthamoides*. O produto é indicado para estados de astenia ou astênico-depressivo; fraqueza orgânica; intoxicações; doenças somáticas e infecciosas; neurastenia; neurose; hipotensão; fadiga e efeito tônico geral sob tensão física e mental. As doses recomendadas são de 5 a 10 mg (1-2 pílulas) oralmente, 3 vezes ao dia, antes das refeições, por 15 a 20 dias, podendo o tratamento ser repetido, se necessário, dentro de 1-2 semanas (SLÁMA & LAFONT, 1995).

8.1.4. Separação cromatográfica de ecdisteróides para fins analíticos

Muitos métodos podem ser usados para se analisar os ecdisteróides. A cromatografia gasosa é um deles. Geralmente a fase estacionária usada é a OV-101 CG com um detector de captura de elétrons, que proporciona alta sensibilidade.

No entanto, é necessário se preparar derivados trimetilsilílicos ou heptafluorobutíricos para se aumentar a volatilidade dos compostos, sendo que estas reações exigem condições severas, tendo seus rendimentos reduzidos mesmo por traços de água (BÁTHORI, 1998).

Quanto à cromatografia de camada delgada, várias fases estacionárias podem ser usadas. A sílica é a mais comum, contanto que a fase móvel contenha, no máximo, 5% de água, juntamente com diclorometano e vários tipos de álcoois como constituintes (BÁTHORI, 1998). Esta técnica requer de 10 a 30 min para o seu desenvolvimento, resultando numa boa resolução. Vários ecdisteróides podem ser separados numa única corrida. Porém, quando são usadas placas de alumina, a ocorrência de decomposição dos compostos é freqüente. A fase reversa é preferível nos casos específicos de ecdisteróides que migram conjuntamente na fase normal. A cromatografia planar utiliza várias possibilidades de detecção das substâncias separadas. A luz UV (254 nm), se a placa contém aditivos fluorescentes (sílica F₂₅₄); a

luz solar, observando-se a reação de cor com ácido sulfúrico; reações cromáticas com vários outros reagentes como a 2,4-dinitrofenilidrazina, anisaldeído, tricloreto de antimônio e vanilina sulfúrica, o mais comum, originando cores turquesa, amarela, marrom etc. A resolução da separação e sensibilidade de detecção podem ser aumentadas através da automação da aplicação da amostra e desenvolvimento múltiplo. A CCDA bidimensional pode ser usada para se detectar traços do componente. A cromatografia planar com fluxo forçado reduz o tempo de separação (BÁTHORI, 1998).

Na cromatografia líquida de alta eficiência, de todas as fases estacionárias estudadas, a Zorbaxsil® é a mais resistente às mudanças na concentração de água do eluente (LAFONT et al., 1994). A sílica normal origina boas separações de ecdisteróides contendo 7 hidroxilas (como a Polipodina B) ou que diferem um do outro na cadeia lateral (25-R e 25-S diastereoisômeros da 26-hidroxiecdisona). O diclorometano, como eluente, pode causar uma redução na sensibilidade de detecção. Para resolver este problema, usa-se tanto o cicloexano quanto o isooctano, juntamente com o isopropanol, já que não interferem na detecção. Sugere-se também o uso de sílica trimetilsililada como fase estacionária ou a fase reversa (octadecilsílica), que é capaz de cobrir a vasta gama de polaridade dos ecdisteróides. Neste caso, como fase móvel usa-se misturas aquosas com metanol ou acetonitrila. Usualmente, 0,1-0,01 % de ácido trifluoracético ou tampões, como o fosfato de trietanolamina, são adicionados para se otimizar o formato das curvas de eluição, tornando-as simétricas. Em fase reversa, tanto a 20E quanto a Polipodina B não são bem separadas, tendo que se usar MeOH-0,1 M fosfato de trietanolamina em pH 1,8 (45:55 v/v) para se melhorar a resolução. A fase reversa é preferível para ecdisteróides de média polaridade que não contêm a cadeia lateral ou para os glicosídeos. Devido à conjugação 7-en-6-ona, a detecção por UV em 254 nm é usada para se monitorar a análise, porém este comprimento de onda sofre interferências causadas pela absorção dos solventes da fase móvel e impurezas, como os ftalatos (BÁTHORI, 1998).

Outras combinações como a cromatografia planar com detecção por FAB-EM; CCDA com TANDEM/EM; a extração e cromatografia com fluido supercrítico acoplada ao detector de captura de elétrons e a eletroforese capilar usando-se

cromatografia eletrocínética micelar são exemplos de vários dos métodos promissores para separação preparativa e analítica dos ecdisteróides (BÁTHORI, 1998).

8.2. Metodologia

8.2.1. Análise quantitativa da 20-hidroxicadisona

Devido aos vários empregos, já citados, que a 20E pode ter, decidiu-se quantificar a mesma no extrato metanólico de galhos de *V. polygama*, para se verificar a viabilidade de sua exploração comercial.

A concentração de uma substância contida em uma amostra pode ser determinada utilizando-se CLAE, através da construção de curvas de calibração, as quais podem ser obtidas por 3 métodos diferentes: padrão externo, padrão interno e adição de padrão (RIBANI et al., 2004). A seguir, descrevem-se os métodos empregados neste trabalho.

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com áreas obtidas de soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão. Preparam-se soluções da substância a ser quantificada em diversas concentrações; obtém-se o cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações (RIBANI et al., 2004).

O método de adição de padrão consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Estas amostras, que têm o padrão incorporado, são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição de padrão. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração da substância na amostra analisada. Este método é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e a

matriz não é isenta da substância de interesse (RIBANI et al., 2004), que é o nosso caso.

O método desenvolvido para a quantificação da 20E foi validado seguindo-se uma série de parâmetros analíticos recomendados pela ANVISA (2003) e INMETRO (2003): seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

8.2.2. Preparação do extrato

1,4 Kg de galhos frescos (coletados em Poços de Caldas, em abril de 2004) foram raspados superficialmente para retirada de musgos e líquens. Logo depois, foram deixados à temperatura ambiente por quatro dias e, posteriormente, secos em estufa a 40°C por 3 dias. O material seco foi moído e deixado em maceração com 6 litros de MeOH por 5 dias; depois foi filtrado e evaporado em rotaevaporador, sendo o restante evaporado na capela de exaustão. Tal procedimento foi repetido quatro vezes, usando-se um total de 10 L de MeOH, sempre reutilizando-se o mesmo solvente após evaporação.

8.2.3. Preparação da coluna analítica

2,5 g de sílica fenil-hexil Luna 10 µ foram suspensos em 45 mL de MeOH grau CLAE, previamente filtrado, e sonicados por 2 minutos.

Uma coluna de aço inox de 150 x 4,6 mm (DI) foi muito bem limpa interiormente com algodão embebido em metanol. Após este procedimento, foi acoplada ao aparelho empacotador de colunas e a suspensão de sílica foi transferida para o interior da coluna com o auxílio de um funil. A seguir, o sistema foi fechado e foram bombeados 100 mL de MeOH através da coluna no sentido de cima para baixo e, depois, 150 mL de MeOH no sentido inverso, para se retirar possíveis bolhas formadas. Depois, desligou-se o aparelho e esperou-se a pressão (7000 psi) zerar para se abrir o sistema, observando se a cabeça da coluna ficou completa com a fase.

A coluna recém empacotada foi acoplada ao aparelho de CLAE e condicionada por quatro horas em MeOH, ao fluxo de 0,5 mL/min. Após ser condicionada, 10 µL de uma solução de padrões (benzamida 3,7 mg; acetofenona 0,6

mg e benzofenona 0,7 mg para 100 mL 70 % MeOH/H₂O) foi injetada, nas condições especificadas na Tabela 8-1, para se conferir se a coluna foi empacotada corretamente.

Tabela 8-1- Condições empregadas na CLAE para análise qualitativa dos padrões benzamida, acetofenona e benzofenona na coluna analítica recém empacotada

Coluna	Fenil-hexil Luna (150 x 4,6 mm x 10 µm)
Temperatura da coluna	Ambiente climatizado (± 25°C)
Detector	UV-VIS SPD-10A SHIMADZU λ= 254 nm
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume injetado da amostra	10 µL (solução 1 mg extrato/1mL MeOH)
Fase móvel	A: H ₂ O e B: MeOH
Eluição isocrática	50 % de B
Bombas 1 e 2	LC-10 AD, SHIMADZU
Sistema de tratamento de dados	LC-Work Station Class LC-10

8.2.4. Gradiente exploratório

Para se determinar o tipo de eluição que seria usado na análise e quantificação da 20E, empregou-se a fase estacionária fenil-hexil Luna 5 µ e a mistura MeOH/H₂O como fase móvel, no modo reverso, usando-se eluição gradiente (SNYDER, R. L. et al.; 1997). As condições de análise estão expostas na Tabela 8-2.

Tabela 8-2- Condições empregadas na CLAE para análise quantitativa da 20E presente no extrato metanólico de galhos de *V. polygama*

Coluna	Fenil-hexil Luna (250 x 4,6 mm x 5 µm)
Temperatura da coluna	Ambiente climatizado (± 25°C)
Detector	UV-VIS SPD-10A SHIMADZU λ= 254 nm
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume injetado da amostra	10 µL (solução 1 mg extrato/1 mL MeOH)
Fase móvel	A: H ₂ O e B: MeOH
Programação do gradiente	5-100 % de B em 30 min
Bombas 1 e 2	LC-10 AD, SHIMADZU
Sistema de tratamento de dados	LC-Work Station Class LC-10

8.2.5. Pré-tratamento do extrato

Baseando-se no cromatograma obtido (Figura 8-3), pode-se observar que nos primeiros 16 minutos de corrida foram detectadas várias substâncias mais hidrofílicas que a 20E e que deveriam ser previamente retiradas do extrato para se evitar interferência na análise do analito desejado após o acerto do gradiente. Optou-se, então, pela extração em fase sólida, usando-se cartucho C-18 (1 mL) e várias soluções de H₂O/MeOH em diferentes concentrações (1:1; 7:3; 8:2 e 85:15) foram testadas como eluentes de extração destes interferentes.

Cada cartucho foi previamente ativado com 4 mL de MeOH grau CLAE e condicionado com 4 mL de H₂O desionizada (desativação). Posteriormente, aplicou-se a solução, previamente preparada e sonicada de 10 mg do extrato com 1 mL H₂O/MeOH na concentração teste, no cartucho e efetuou-se uma lavagem do mesmo com mais 3 mL da solução H₂O/MeOH teste, coletando-se os 4 mL totais desta alíquota. Depois, lavou-se novamente o cartucho com 4 mL de MeOH, supondo-se que o analito de interesse ficou adsorvido no cartucho e foi eluído com esta última lavagem.

Para se verificar qual o melhor eluente de extração (o que retirou maior quantidade de interferentes, deixando todo o analito de interesse retido no cartucho),

10 µL de cada solução metanólica final, obtida após o pré-tratamento do extrato, foram injetados no aparelho de CLAE, usando-se as condições especificadas na Tabela 8-3.

Tabela 8-3- Condições empregadas na CLAE para análise qualitativa da 20E presente na solução metanólica originada do pré-tratamento do extrato metanólico de galhos de *V. polygama* em cartucho C-18

Coluna	Fenil-hexil Luna (150 x 4,6 mm x 10 µm)
Temperatura da coluna	Ambiente climatizado ($\pm 25^{\circ}\text{C}$)
Detector	UV-VIS SPD-10A SHIMADZU $\lambda = 254 \text{ nm}$
Fluxo da fase móvel	1 mL/min
Volume injetado da amostra	10 µL (solução 1 mg extrato/1 mL MeOH)
Fase móvel	A: H ₂ O e B: MeOH
Programação do gradiente	50-100 % de B em 17 min e 35-100 % de B em 20 min
Bombas 1 e 2	LC-10 AD, SHIMADZU
Sistema de tratamento de dados	LC-Work Station Class LC-10

8.2.6. Purificação e determinação da pureza do padrão 20E

20,0 mg de 20E, isolada anteriormente da partição em acetato de etila do extrato metanólico de galhos de *V. polygama*, foram aplicados numa placa preparativa com sílica F₂₅₄ de 20,0 x 20,0 cm. Uma solução de diclorometano/acetona 4:6 foi usada como eluente e foram realizadas duas eluições consecutivas (técnica do desenvolvimento múltiplo).

1 mg de 20E, obtido acima, foi dissolvido em 1 mL de MeOH. 10 µL desta solução foram injetados no aparelho de CLAE, usando-se as condições especificadas na Tabela 8-3, sendo que o gradiente foi de 40-100 % de B e usou-se o detector de UV acoplado ao arranjo de diodo (DAD/UV-VIS) para se determinar a pureza do padrão.

O mesmo volume de solução metanólica final, obtida após o pré-tratamento do extrato em cartucho C-18 empregando-se a solução extratora de

H₂O/MeOH 85:15, foi injetado no aparelho de CLAE, usando-se as mesmas condições de análise do padrão, para se estimar a concentração do analito na matriz.

8.2.7. Solução estoque do padrão externo e preparação das amostras para a construção da curva de calibração externa

Uma solução estoque do padrão 20E (1000 µg/mL) foi preparada e acondicionada sob refrigeração (4^o C). Alíquotas de 100, 75, 50, 40, 30, 20 e 10 µL foram transferidas para tubos de vidro (10 x 1,2 cm) e o solvente (MeOH) foi totalmente evaporado à temperatura ambiente, sob uma fraca corrente de ar comprimido. O resíduo seco foi redissolvido em 1000 µL de uma solução metanólica aquosa a 15 % e agitado no vortex por 10 s para se obterem então soluções de 100, 75, 50, 40, 30, 20 e 10 µg/mL, respectivamente. Foram medidas alíquotas de 50 µL de cada solução obtida para serem aplicadas em cartuchos C18 (1mL) previamente condicionados (4mL de MeOH e 4 mL de água) e, posteriormente, lavadas com 4 mL de uma solução metanólica aquosa a 15 %. Após o cartucho secar, o analito adsorvido foi retirado com 1 mL de MeOH, resultando soluções de 5, 3,75, 2,5, 2,0, 1,5, 1,0 e 0,5 µg/mL. Estas amostras, preparadas em triplicata, foram transferidas para os “vials” e alíquotas de 20 µL foram injetadas na coluna. Os dados obtidos foram usados na determinação da curva de calibração externa, a qual foi construída plotando-se as concentrações das soluções do padrão 20E pelas áreas correspondentes.

8.2.8. Solução estoque do extrato e preparação das amostras para a construção da curva de calibração por adição de padrão

A solução estoque do extrato (500 µg/mL) foi obtida através da dissolução de 2,0 mg do extrato bruto em 4 mL de metanol através de agitação por ultra som por 15 s. Alíquotas de 50 µL foram transferidas para os tubos de vidro seguidas de 50 µL de solução padrão (sessão 8.2.7) nas concentrações de 3,75, 2,5, 2,0, 1,5 e 1,0 µg/mL, respectivamente e agitadas por 10 s. O solvente (MeOH) foi totalmente evaporado à temperatura ambiente, sob uma fraca corrente de ar comprimido. O resíduo seco foi

redissolvido em 1000 μL de uma solução metanólica aquosa a 15 % e agitado no vortex por 10 s. Posteriormente a esta solução foi passada através do cartucho C18 (pré-condicionados). Depois, seguiu-se o mesmo procedimento da sessão 8.2.7. Uma alíquota da solução estoque do extrato pré-tratada sem adição do padrão foi obtida para se considerar a influência da matriz.

8.2.9. Recuperação

A recuperação relativa foi determinada usando-se soluções controle do padrão nas concentrações de 0,55, 3,0 e 4,5 $\mu\text{g/mL}$, preparadas segundo o mesmo procedimento da sessão 8.2.7. As médias das áreas dos picos de 5 amostras pré-tratadas (em cartucho C18) foram comparadas com aquelas de 5 amostras não tratadas para derivar a porcentagem de recuperação.

A recuperação absoluta foi calculada usando-se os parâmetros a e b obtidos na equação da curva de adição de padrão.

8.2.10. Precisão

Amostras nas mesmas concentrações usadas no experimento de recuperação relativa foram usadas para se avaliar a variabilidade inter- e intra-dia. O experimento foi realizado em quintuplicata e analisado em 3 dias não-consecutivos. A precisão foi expressa através da estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV).

8.2.11. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo método de adição de padrão e através do teste do duplo cego (por não dispormos de amostras certificadas), onde duas soluções de concentrações desconhecidas foram preparadas por um outro analista. As amostras também foram analisadas em triplicata.

8.2.12. Seletividade

Amostras de padrão e do extrato pré-tratado foram ensaiadas numa corrida analítica usando-se o detector de UV acoplado ao arranjo de diodo (DAD/UV-VIS) para se avaliar a pureza do pico.

8.2.13. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD foi determinado usando-se o método do sinal/ruído 3:1 (RIBANI et al., 2004). O LQ foi estabelecido analisando-se soluções do padrão 20E diluídas em série, e foi considerado como a concentração na qual o método é capaz de quantificar o analito de interesse dentro de uma faixa de 20 % de variabilidade.

8.3. Resultados e discussões

8.3.1. Preparação do extrato

A utilização de MeOH como único solvente extrator possibilitou um rendimento de 4,9 % da massa seca (galhos secos e moídos), o mesmo ocorrendo quando se usou hexano seguido de metanol. Logo, a extração usando-se apenas MeOH é eficiente e economiza tempo e solvente, porém não temos a quantia de 20 E presente em cada extrato para saber qual método é o mais eficiente na extração da substância de interesse.

8.3.2. Preparação da coluna analítica

De acordo com o cromatograma obtido (Figura 8-2), pode-se observar que os tempos de retenção dos padrões benzamida, acetofenona e benzofenona (2,2; 3,8 e 9,7 min) estão próximos dos recomendados pelo fabricante. A coluna apresentou boa resolução, com um número de pratos teóricos $N = 7900$ (CASS & DEGANI, 2001), similar ao de uma coluna comercial ($N = 6000-12000$).

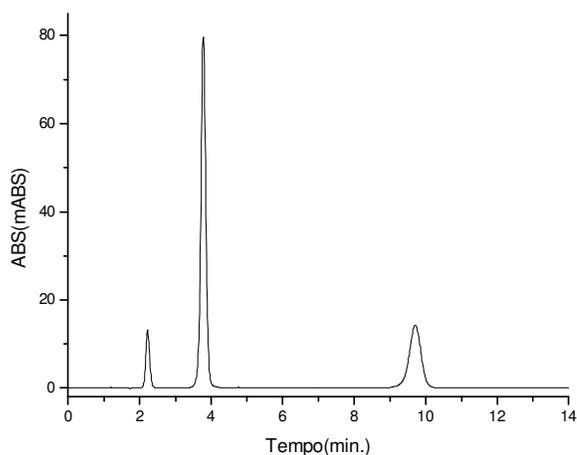


Figura 8-2- Cromatograma da mistura de padrões

Vide condições cromatográficas na Tabela 8-1

8.3.3. Gradiente exploratório

A partir do cromatograma obtido (Figura 8-3), observou-se que seria necessária a retirada das substâncias mais hidrofílicas do extrato. Além disso, foram possíveis os cálculos da inclinação da curva do solvente e da concentração de MeOH necessária para extração do analito de interesse da coluna, como se segue abaixo:

Fluxo de MeOH/min (inclinação da curva) = variação de MeOH no gradiente exploratório / tempo da corrida

$$\text{Inclinação da curva} = (100-5) / 30 \rightarrow 3,17\text{mL/min}$$

O pico referente à 20E foi detectado aos 23 minutos (na coluna de 5 μ), logo, a concentração de B na fase móvel necessária para a extração do analito, nas condições especificadas na Tabela 8-2, foi:

$$\text{Conc. B} = 23 \times 3,17 \rightarrow 72,7 + 5 \text{ (início do gradiente)} \rightarrow 78 \% \text{ MeOH}$$

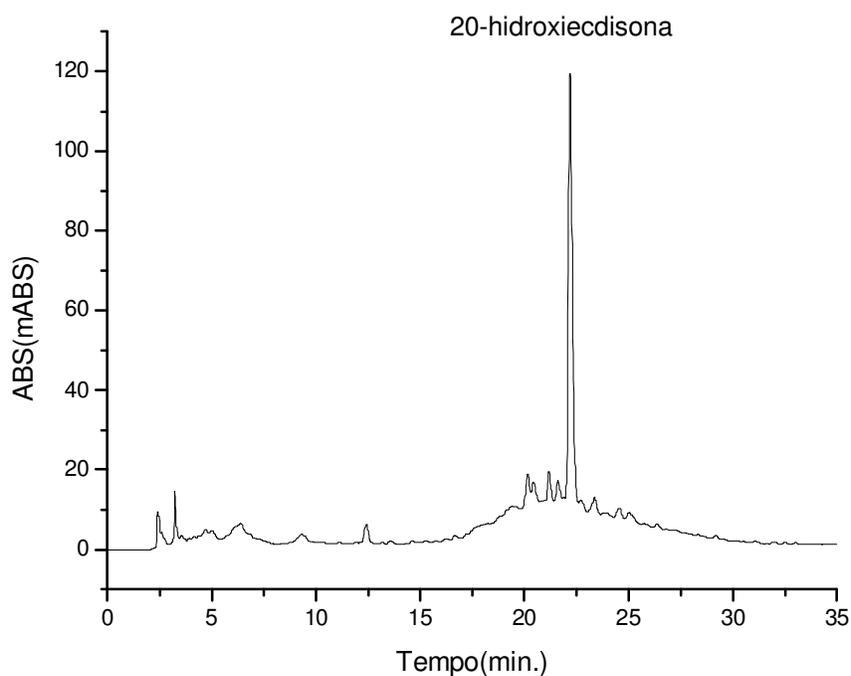


Figura 8-3- Cromatograma do extrato metanólico de galhos de *V. polygama*
Vide condições cromatográficas na Tabela 8-2

8.3.4. Pré-tratamento do extrato

A solução de H₂O/MeOH 85:15 foi escolhida como melhor eluente de extração dos interferentes sem carrear conjuntamente o analito de interesse. Mantendo-se a mesma inclinação da curva, a variação de gradiente de 35-100 % de B em 20 minutos mostrou-se a melhor condição para a análise quantitativa da 20E na solução metanólica final. Baseando-se no tempo de retenção do analito e na concentração de MeOH na qual o analito saiu da coluna, concluiu-se que a análise poderia ser realizada no modo de eluição isocrática. Após serem testadas as fases móveis na concentração de 50, 45 e 40 % de B, a última foi escolhida como a ideal, pois proporcionou uma separação de linha de base (Figura 8-4).

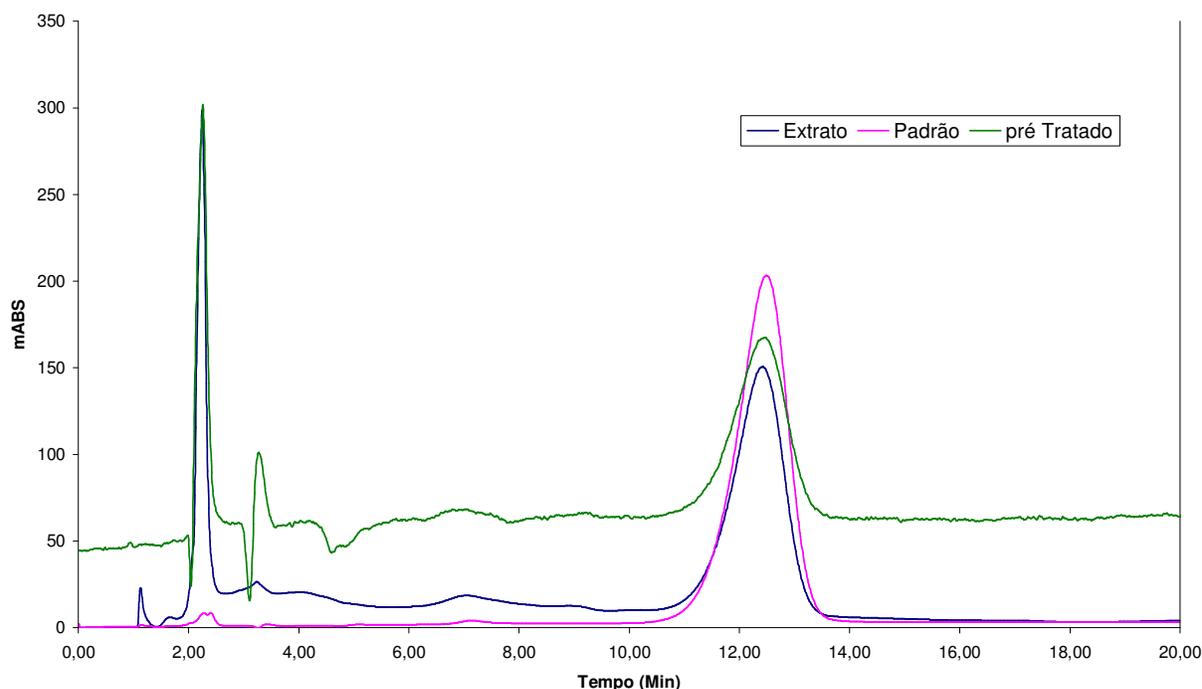


Figura 8-4- Cromatograma da análise da 20-hidroxiciclopentanona no extrato metanólico de galhos de *V. polygama*: (azul) extrato; (verde) extrato pré-tratado em cartucho C-18; (rosa) padrão

Condições cromatográficas vide Tabela 8-3 (isocrático 40 % B)

8.3.5. Determinação da pureza do padrão 20E e seletividade

Após o término da corrida de 10 μ L da solução padrão, nas condições já especificadas na sessão 8.2.6, a leitura do UV, acoplado ao dispositivo diodo, indicou que a banda cromatográfica do padrão apresentava pureza de 99,51 % (boa seletividade do método) e a área correspondente ao pico de 12975544 (Figura 8-4). A área correspondente ao pico da solução metanólica final, proveniente do pré-tratamento do extrato com a solução H₂O/MeOH 85:15, foi de 1502445. Como a solução padrão foi preparada na concentração de 1000 μ g/mL, fez-se a relação direta:

$$10 \mu\text{l} = (0,01 \times 0,9951) \text{ mg} \rightarrow \text{Conc. 20E em } 10 \mu\text{l do extrato pré-tratado} = (1502445 \times 0,009951) : 12975544 \rightarrow 0,0011522 \text{ mg} \rightarrow \text{conc. em } 4 \text{ ml} = 0,46089 \text{ mg} \rightarrow \text{conc. em } 69,2 \text{ g de extrato bruto} = 3,19 \text{ g 20E, o que corresponde, aproximadamente, a } 0,23 \% \text{ do peso seco dos galhos (1,4 Kg).$$

8.3.6. Validação do método

8.3.6.1. Linearidade

Os dados adquiridos da curva de calibração do padrão externo (Figura 8-5) e o valor do coeficiente de correlação (r) acima de 0,999 permitiram verificar que não houve desvio da linearidade dentro da faixa de concentrações de 20-hidroxicodona selecionadas. A curva de calibração com adição do padrão foi obtida para se verificar a influência da matriz. Esta curva também revelou uma boa linearidade, com coeficiente de correlação (r) igual a 0,990 (Figura 8-5).

8.3.6.2. Precisão e exatidão

A precisão intra- e inter-dia foi avaliada usando os dados obtidos das concentrações controle analisadas num período de 3 dias não-consecutivos. Os resultados estão na Tabela 8-4 e estão expressos como coeficientes de variação (CV). A exatidão obtida através do cálculo empírico entre a quantidade encontrada e a quantidade adicionada de padrão nas três concentrações examinadas está expressa em porcentagem. As duas soluções de concentrações desconhecidas (cego) apresentaram CV de 1,56 e 0,32 %, com exatidão de 102,8 e 103,6 %, respectivamente.

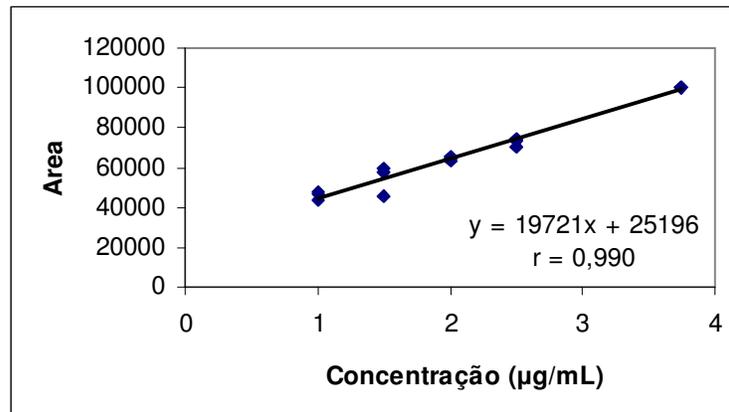
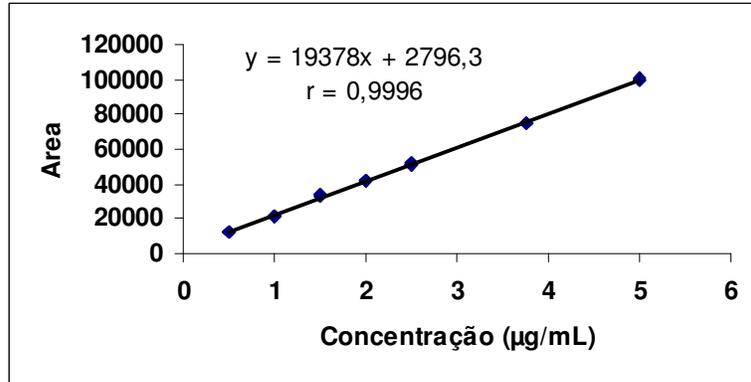


Figura 8-5- Curvas de calibração para a 20-hidroxiecdisona: padrão externo (acima), adição de padrão (abaixo)

Tabela 8-4- Dados da precisão e exatidão da quantificação da 20-hidroxiecdisona, inter-dia (n = 5)

Concentração (µg/mL)	1º dia		2º dia		3º dia	
	CV %	exatidão %	CV %	exatidão %	CV %	exatidão %
0.55	1.76	97.5	1.73	97.1	1.18	95.0
3.0	1.22	100.2	1.05	101.4	1.16	99.4
4.5	0.91	106.5	0.62	107.2	0.52	103.4

8.3.6.3. Limite de quantificação e limite de detecção

O LQ para a 20-hidroxiecdisona foi de 400 ng/mL, com um CV de 0,25 % e 81 % exatidão.

O LD foi de 180 ng/mL.

8.3.6.4. Recuperação

A recuperação relativa foi de 100 ± 4 ($n = 5$). A recuperação absoluta foi de 91 %, sendo determinada através da comparação da concentração do analito obtida através da curva de calibração externa com aquela originada dos parâmetros obtidos da equação da curva de calibração com adição de padrão. A análise dos dados revelou que o conteúdo de 20E no extrato metanólico de galhos de *V. polygama* é equivalente a 0,27 % do peso seco dos galhos (2528 µg/g), a qual é relativamente alta em comparação com outras plantas que têm sido comercializadas, por exemplo, o extrato etanólico de raízes da planta russa *Leuzea* (0,4 % da matéria seca; SLÁMA & LAFONT, 1995). Vale ressaltar que estamos trabalhando com uma planta brasileira e que 25 mg de 20E sintética custam \$ 242,80 dólares.

9. Ensaio bioquímico e biológico

9.1. Verificação de inibição das enzimas gliceraldeído 3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) e adenina fosforribosiltransferase (APRT)

9.1.1. Local de realização

Estes experimentos foram realizados pelo técnico de laboratório Eli F. Pimenta, no laboratório de cristalografia do IFSC/USP/SÃO CARLOS, com reagentes preparados por técnicos do departamento sob a orientação dos professores doutores Glaucius Oliva e Otávio Henrique Thiemann.

9.1.2. Método para avaliação de inibição enzimática da gGAPDH

A medida da atividade enzimática baseou-se em procedimento previamente descrito por VIEIRA et al. (2001).

A atividade da enzima foi medida colocando-a na presença do substrato, gliceraldeído-3-fosfato (G3P), do cofator NAD^+ e do arseniato de sódio, inibidor da reação inversa, em cubeta de quartzo, nas seguintes concentrações finais: tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,6 (1mM EDTA, 1mM p-mercaptoetanol), NAD^+ (2 mM), arseniato de sódio 30 mM, G3P (~300 μM) e 5 μL de enzima (~100 nM; concentração determinada pelo método de BRADFORD, 1976) e 100 μL da solução do extrato a ser testado (1mg de extrato em 1 mL DMSO ou, para substâncias puras, soluções de 200 ou 100 μM). Imediatamente após a adição de todos os reagentes, iniciou-se a leitura. A reação foi acompanhada através da absorção de UV a 340 nm ao longo de 30 s de produto formado, o NADH. O teste foi feito em triplicata. Como controle, fez-se um teste para verificação da atividade enzimática, onde foram adicionados 437,5 μL de tampão e nada de extrato aos reagentes mencionados acima. O teste testemunha foi realizado substituindo-se os 100 μL de solução de extrato por 100 μL de DMSO, também sendo repetido 3 vezes. A atividade específica da enzima pura foi de 150 μl de NADH formado por mg/min.

9.1.3. Método para avaliação de inibição enzimática da APRT

A atividade da enzima APRT foi medida adicionando-se 3,8 µL da mesma numa mistura reacional com a concentração final de 0,01 mM de adenina, 0,5 mM de PRPP (5-fosforribosil-1-pirofosfato), 5 mM de MgCl₂ e tampão Tris/HCl 100 mM, pH 7,4 (TUTTLE & KRENITSKY, 1980). Para cada teste foram usados 475 µL da mistura reacional e 25 µL das soluções dos possíveis inibidores, de forma que a concentração final do extrato (ou fração) a ser testado fosse de 50 µg/mL. Imediatamente após a adição de todos os reagentes, iniciou-se a leitura. A reação foi acompanhada através da absorção a 259 nm, durante 60 s, do produto formado, AMP. A atividade específica da enzima pura foi de 0,0011668 mM de AMP formado por mg/min.

9.1.4. Metodologia para o ensaio de inibição da atividade da enzima GAPDH em placa ELISA

Os experimentos para verificação da atividade inibitória dos extratos e substâncias puras sobre a GAPDH também foram realizados em placa ELISA com 96 poços de 300 µL cada. Em cada poço foram adicionados 9 µL do substrato G3P (10 mM), 15 µL do cofator NAD⁺ (40 mg/mL), 9 µL do arseniato de sódio (1 M), 232,5 µL do tampão Tris/HCL 50 mM, pH 8,6 (1 mM EDTA, 1mM β-mercaptoetanol), 1,5 µL da enzima e 30 µL da solução (1 mg/1 mL DMSO) da substância ou extrato a ser testado. Imediatamente após a adição de todos os reagentes, foi efetuada a leitura num espectrofotômetro de luz ultravioleta no comprimento de onda de 340 nm. A reação foi acompanhada ao longo de 60 s em intervalos de 12 s.

9.1.5. Metodologia para o ensaio de inibição da atividade da enzima APRT em placa ELISA

Os experimentos para verificação da atividade inibitória dos extratos e substâncias puras sobre a APRT também foram realizados em placa ELISA com 96 poços de 300 µL cada. Em cada poço foram adicionados 2,5 µL da enzima, 132,5 µL

de água desionizada, 15 µL da solução (1 mg/1 mL DMSO) da substância ou extrato a ser testado e 150 µL da mistura reacional contendo 0,01 mM de adenina, 0,5 mM de PRPP (5-fosforribosil-1-pirofosfato), 5 mg de MgCl₂ e tampão Tris 100 mM, pH 7,4. Porém, este ensaio não foi considerado, já que a placa era meio fosca e interferiu na leitura do resultado fornecido através da absorção no espectrofotômetro de luz ultravioleta do produto formado.

9.1.6. Cálculo dos resultados

A partir dos valores observados de absorbância na reação sem inibidor (controle) e na reação na presença do pretenso inibidor, calculou-se a atividade específica da enzima e a porcentagem de inibição da atividade enzimática, equações 1.1 e 1.2, respectivamente, para uma dada concentração do inibidor na cubeta (ou poço) de reação.

$$\text{Ativ. Espec. (U/mg)} = \{[\Delta\text{absorbância}/\Delta t] \times \text{volume da cubeta}\} / \{\epsilon_{\text{NADH}} \times \text{volume da enzima} \times [\text{enzima}]\} \quad [1.1]$$

Onde, para a GAPDH, $\Delta t = 1/60$ min; volume da cubeta = 0,5 mL ou 0,3 mL (placa de ELISA); $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; volume da enzima = 0,0025 ou 0,0015 mL; [enzima] = variável e dada em mg/mL; $\Delta\text{absorbância}$ = coeficiente angular da reta (calculado através do programa Origin ou Excel).

Onde, para a APRT, os valores que mudam são o $\epsilon_{\text{NADH}} = 1,24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e o volume da enzima = 0,0038 mL ou 0,0025 mL.

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \{[(\text{Ativ. Espec. (controle)} - \text{Ativ. Espec. (c/ inibidor)}) / (\text{Ativ. Espec. (controle)})] \times 100\} \quad [1.2]$$

No caso dos cálculos de CI_{50} , levou-se em conta que a absorção é a única variável e a equação 1.3 foi usada:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \{[\text{média } \Delta\text{absorbância (com inibidor)} / \text{média } \Delta\text{absorbância (controle)}] \times 100\} \quad [1.3]$$

9.1.7. Determinação da CI_{50}

Até o presente momento, a CI_{50} era tratada como a concentração de inibidor que causava uma redução de 50 % na atividade da enzima. Porém, os estudos de fármacos exigiram um tratamento desse conceito e a determinação da CI_{50} seguiu o seguinte procedimento: após determinada a faixa de inibição da substância, foi realizado um teste de inibição numa concentração próxima à CI_{50} . Além disso, foram efetuados mais quatro ensaios, sendo dois com concentrações inferiores à CI_{50} e dois com concentrações superiores à CI_{50} . A partir destes dados, extrapolou-se o valor da CI_{50} por regressão linear dos cinco pontos (\pm entre 20-80 % de inibição), sendo cada ponto correspondente à média de três resultados. Posteriormente, tais dados foram tratados estatisticamente pelo programa Sigma Plot. Por isso, em alguns artigos, tal valor, obtido através deste cálculo, é chamado de I_{50} . Com o objetivo de também se padronizar as concentrações, todas as substâncias foram testadas nas concentrações de 200 ou 100 μ M.

9.1.8. Teste de interação química entre os taninos e a APRT

Os taninos são substâncias naturais polifenólicas que se encontram classificadas, de acordo com suas características estruturais, em quatro grandes grupos:

- a) Galotaninos, que apresentam unidades galoil, ou derivados meta-depsídicos, ligadas a diversos polióis, catequinas ou triterpenóides.
- b) Elagitaninos, nos quais pelo menos duas unidades galoil se encontram unidas por ligações C-C e não contêm ligações com catequinas.
- c) Taninos complexos, onde uma unidade de catequina está ligada a um galotanino ou elagitanino.
- d) Taninos condensados, sendo todos do tipo proantocianidinas oligoméricas ou poliméricas formadas por ligações entre o C-4 de uma unidade de catequina com o C-8 ou C-6 de outro monômero de catequina.

Os três primeiros grupos são passíveis à hidrólise quando tratados com água fervente, enzimas ou em meios levemente ácidos ou básicos. Tal propriedade fez

com que fossem denominados de taninos hidrolisáveis. Os taninos condensados, que não sofrem hidrólise, foram incluídos no grupo dos taninos não hidrolisáveis (KHANBABAEE & REE, 2001).

O termo tanino originou-se da palavra francesa “tanin” que significa curtir a pele dos animais transformando-a em couro. Isso é possível devido à propriedade que os taninos apresentam de formar ligações hidrogênio entre os seus grupos hidroxílicos fenólicos e os grupos amina ou amida livres da proteína da pele (colágeno), enfraquecendo as ligações que mantêm a forma desta proteína, formando um dímero da proteína envolvido com o polifenol, precipitando-a e tornando o couro imputrescível (CHARLTON et al., 2002).

Em virtude da grande diversidade química, esta classe pode proporcionar outros tipos de interações biológicas. As propriedades reacionais dos taninos têm sido investigadas nas mais diversas áreas científicas. Eles são frequentemente associados ao sabor amargo e à sensação oral de adstringência, conseqüência de suas interações com proteínas básicas, ricas em prolina, presentes na saliva. Podem causar alguns efeitos prejudiciais aos animais, incluindo seqüestro de ferro e outros minerais, por formar quelatos com aqueles, além de inibirem enzimas digestivas, reduzindo a digestibilidade e a palatabilidade dos alimentos. São capazes de coagular as albuminas das mucosas e tecidos, sendo empregados, por isto, em preparações contra as inflamações da cavidade bucal ou antidiarréicas. Em baixas concentrações (1-5 μM) atuam como antimutagênicos e anticarcinogênicos por funcionarem como capturadores de radicais livres (antioxidantes) e reguladores do ciclo celular (JAMART, 2000).

Como os taninos podem se ligar a proteínas, precipitando-as (CHARLTON et al., 2002), produzindo uma ação inibitória não específica sobre as mesmas, foi realizada uma investigação para se observar o comportamento de alguns dos taninos identificados, que são do grupo dos taninos hidrolisáveis, frente às enzimas APRT, GAPDH e pectinase e todos os outros reagentes do ensaio bioquímico.

9.1.8.1. Preparo das soluções

Foram preparadas soluções 1mg/mL dos taninos em água (ST); solução do PRPP + tampão + MgCl_2 (PRPP); adenina + tampão + MgCl_2 (AD) e enzima +

tampão (EZ). Todas as soluções foram conservadas em gelo para se minimizar a degradação que podem sofrer. O comprimento de onda usado foi o mesmo do ensaio original, 259 nm.

9.1.8.2. Teste com a enzima

Foram feitas leituras no UV usando-se uma cubeta com a mistura de 250 μL de tampão + 225 μL H_2O + 25 μL ST (para zerar o aparelho) e 250 μL de tampão + 225 μL H_2O + 25 μL ST + 3,8 μL EZ na outra cubeta.

9.1.8.3. Teste com o PRPP

Foram feitas leituras no UV usando-se uma cubeta com a mistura de 250 μL de PRPP + 250 μL H_2O (para zerar o aparelho) e 250 μL de PRPP + 225 μL H_2O + 25 μL ST na outra cubeta.

9.1.8.4. Teste com a Adenina

Foram feitas leituras no UV usando-se uma cubeta com a mistura de 250 μL de AD + 250 μL H_2O (para zerar o aparelho) e 250 μL de AD + 225 μL H_2O + 25 μL ST na outra cubeta.

9.1.9. Teste de interação química entre os taninos e a enzima GAPDH

9.1.9.1. Preparo das soluções

Foram preparadas soluções de 200 μM dos taninos castalagina, casuarinina e ramnopiranosídeo do ácido elágico em DMSO (STT); soluções tampão no pH 8,6 e 7,5; solução 100 μM de NAD^+ e as demais soluções reagentes foram preparadas como especificadas na sessão 9.1.3.

Foram realizados os espectros de UV dos taninos e feita uma sobreposição ao espectro de UV do NADH (produto da reação) com o objetivo de se

verificar se as bandas de absorção dos taninos eram semelhantes às do NADH, o que poderia estar mascarando a leitura referente ao resultado final.

9.1.9.2. Teste com NAD⁺

Foram feitas leituras no UV usando-se uma cubeta com a mistura de 390 μL de tampão (pH 8,6) + 40 μL NAD⁺ + arseniato (para zerar o aparelho) e 390 μL de tampão (pH 8,6) + 40 μL NAD⁺ + arseniato + 50 μL STT 10 μM na outra cubeta.

9.1.9.3. Teste com G3P

Foram feitas leituras no UV usando-se uma cubeta com a mistura de 390 μL de tampão (pH 8,6) + 40 μL NAD⁺ + arseniato + 15 μL G3P (para zerar o aparelho) e 390 μL de tampão (pH 8,6) + 40 μL NAD⁺ + arseniato + 15 μL G3P + 50 μL STT 10 μM na outra cubeta.

9.1.9.4. Teste com a enzima

Foram feitas leituras no UV usando-se uma cubeta com a mistura de 390 μL de tampão (pH 8,6) + 40 μL NAD⁺ + arseniato + 15 μL G3P + 5 μL da enzima (para zerar o aparelho) e 390 μL de tampão (pH 8,6) + 40 μL NAD⁺ + arseniato + 15 μL G3P + 5 μL da enzima + 50 μL STT 10 μM na outra cubeta.

9.1.9.5. Teste com tampão TEA em pH 7,5

Foram feitas leituras no UV usando-se uma cubeta com a mistura de 390 μL de tampão trietanolamina (TEA, pH 7,5) + 40 μL NAD⁺ + arseniato + 15 μL G3P + 5 μL da enzima (para zerar o aparelho) e 390 μL de tampão (pH 7,5) + 40 μL NAD⁺ + arseniato + 15 μL G3P + 5 μL da enzima + 50 μL STT 10 μM na outra cubeta.

9.2. Verificação de atividade inseticida sobre *Spodoptera frugiperda*

9.2.1. Introdução

A *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida por lagarta dos milharais, ataca o cartucho do milho, chegando a destruir completamente a planta. Pode reduzir até cerca de 20 % da produção de milho. Ataca também as culturas de tomate, arroz, algodão, cana, amendoim, hortaliças e capinzais (GALLO et al., 1988).

9.2.2. Local de realização

Este experimento foi realizado no Laboratório de bioensaios do DQ-UFSCar pela doutora Luciane Gomes Batista Pereira, Waldirene Caldas Rocha, Milana R. de Souza, Marina T. M. da Silva e por mim, Margareth B. C. Gallo, ou no Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP Piracicaba, pelos alunos Uemerson Silva da Cunha e Fernanda Alessandro Diogo, sob a orientação do professor doutor José Djair Vendramim.

9.2.3. Criação artificial da *S. frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* foram obtidas a partir de uma criação artificial, mantida no laboratório de bioensaios, onde as pupas foram sexadas e colocadas separadamente em gaiolas de 40,0 x 40,0 cm e, como alimento, foram fornecidas soluções açucaradas para os adultos que emergem das pupas. Os machos e as fêmeas recém-emergidos foram coletados e transferidos para as gaiolas de PVC (tubos com Φ 20,0 cm) forradas com papel branco e cobertas com filó. Foram alimentados diariamente com solução açucarada de mel 5 %. Os ovos foram recortados e colocados sobre papel toalha ou sobre dieta, dentro de placas de Petri (Figura 9-1), e as lagartas recém eclodidas foram transferidas para os tubos de vidro

contendo a dieta artificial (KASTEN et al., 1978) onde foram realizados os experimentos.



Figura 9-1- Lagartas de *S. frugiperda* dentro do tubo de vidro contendo dieta artificial (A); recém eclodidas na placa de Petri (B) e na forma adulta, mariposa (C)

Fotos de Waldir Tavares de Lima

9.2.4. Metodologia

Os bioensaios foram divididos em duas etapas: teste preliminar, com adição dos extratos na dieta, para verificação de atividade dos extratos brutos; teste de confirmação, com contaminação superficial da dieta, para verificação de atividade das substâncias puras.

No teste preliminar, os extratos e as frações provenientes das partições dos mesmos foram dissolvidos em acetona/hexano, juntamente com o ácido ascórbico (ingrediente da dieta), e deixados na capela de exaustão para secagem do solvente, o qual poderia mascarar o resultado do teste por ter atividade também. Após isso, foram incorporados à dieta artificial, a uma concentração de 1000 ppm, sendo misturados manualmente, a qual foi derramada em 10 tubos de vidro (8,5 X 2,5 cm, previamente esterilizados em estufa a 170°C por 1 h) que foram tampados com algodão hidrófugo (também previamente esterilizado). Após isto, os tubos foram mantidos por 24 h em grades de arame para eliminação do excesso de umidade das suas paredes. A seguir, foi feita a inoculação de uma lagarta recém eclodida (1º instar) e os tubos foram mantidos sob condições de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ U.R. e 12 h de fotofase (Figura 9-2). Os 10 tubos testemunhas foram confeccionados adicionando-se ao ácido ascórbico

apenas o solvente utilizado na diluição do extrato, seguindo-se a metodologia citada. Foram avaliados os seguintes parâmetros: duração da fase larval e pupal, massa das pupas e porcentagem de insetos vivos (viabilidade) e mortos ao final de cada fase. Cada recipiente contendo um inseto, independente da fase de desenvolvimento, foi considerado uma repetição, portanto o número de repetições foi variável para cada tratamento.

Os extratos selecionados no teste preliminar foram fracionados e as substâncias identificadas, com quantidades suficientes, foram submetidas à segunda etapa de testes. Nesta etapa, para os flavonóides orientina/isoorientina, foram utilizados 30 tubos de vidro, contendo uma lagarta cada, e 30 tubos para as testemunhas. Os parâmetros avaliados foram os mesmos do teste preliminar. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A comparação das médias foi feita pelo Teste de Tukey ou Duncan ao nível de 1 e 5 % de significância.

Para os taninos e ecdisteróides ensaiados, a segunda etapa de testes foi modificada em função da disponibilidade de massas das substâncias, mantendo-se a avaliação dos parâmetros massa das lagartas e porcentagem de lagartas vivas (viabilidade) e mortas ao final de 10 dias.

Nesta etapa, 12 mg de cada substância foram dissolvidos em 3 mL de água destilada (concentração de 4000 ppm). 30 µL desta solução foram derramados sobre a dieta artificial, a qual se encontrava acondicionada em placa ELISA de acrílico (24 poços X 1,5 mL). Cada experimento foi realizado com quatro placas, logo, com 4 repetições. Esperou-se secar o excesso de água da solução derramada sobre a superfície dos poços dentro de uma capela de fluxo laminar. A seguir, foi feita a inoculação de uma lagarta de dois dias de eclosão (ainda 1^o instar) em cada poço (Figura 9-3). As placas foram bem fechadas e mantidas sob condições de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 5\%$ U.R e 12 h de fotofase por 10 dias. Ao fim destes, as lagartas vivas foram pesadas e o número de mortes foi computado. A comparação das médias foi feita pelo Teste de Duncan ao nível de 1 % e 5 % de significância.



Figura 9-2- Teste preliminar dos extratos com lagartas de *S. frugiperda* (foto menor/autora) nos tubos de vidro, mantidas sob condições controladas (foto maior/Waldir T. de Lima)



Figura 9-3- Aplicação da dieta em placa ELISA (foto maior) e inoculação das lagartas (1º instar; foto menor) de *S. frugiperda* para o ensaio com substâncias puras

Fotos de Waldir Tavares de Lima

9.3. Verificação de atividade inseticida sobre a formiga *Atta sexdens rubropilosa*

9.3.1. Introdução

As formigas cortadeiras (ordem Hymenoptera; família Formicidae; tribo Attini; gênero *Atta*), também conhecidas como saúvas, vivem em simbiose com o fungo do tipo basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, o qual fornece alguns nutrientes e enzimas às formigas, enquanto que estas provêm os fungos com grande variedade de substratos, estimulando o crescimento dos mesmos.

Essas formigas, quando presentes em ambientes ecologicamente equilibrados, estimulam o crescimento das plantas por poda, fertilizam o solo e também contribuem na disseminação de sementes. Porém, quando ocorrem em áreas de monoculturas agrícolas, podem se transformar em pragas, causando imensos danos econômicos (CHERRET, 1995).

A ação das formigas cortadeiras como pragas está relacionada à sua notável capacidade de coletar folhas e outros materiais vegetais, os quais são usados para cultivar o fungo simbiótico no interior de seus ninhos. Isto porque as formigas sustentam seu trabalho predominantemente com a energia extraída de carboidratos (ABOTT, 1991), entre os quais parecem ser essenciais os polissacarídeos, os quais representam até 60 % da matéria sólida vegetal (BERNAYS & CHAPMAN, 1994). Para assimilar estes compostos, as formigas adultas necessitam de despolimerases, as quais são produzidas pelo fungo simbiote (SIQUEIRA et al., 1988).

Os materiais vegetais são levados até ao formigueiro e cortados em pequenos pedaços. Em seguida, os insetos aplicam saliva sobre a matéria vegetal com o objetivo de se retirar toda a cera da cutícula foliar. Após a salivação, as operárias defecam sobre o substrato, depositando enzimas que auxiliam na degradação de proteínas e polissacarídeos. O fungo é então inoculado sobre essa matéria vegetal recém-preparada e se desenvolve (QUINLAN & CHERRET, 1979).

A cultura do fungo dentro dos ninhos é denominada esponja ou jardim de fungo e é uma parte vital nos ninhos de Attini. Em condições normais, as formigas mantêm o fungo na fase vegetativa. Neste estágio, o fungo produz hifas espessas com

extremidades arredondadas chamadas gongilídeos. Estas estruturas são agrupadas em cachos, chamados de estáfilos, os quais são ricos em proteínas e também consistem numa fonte energética, tanto para o fungo quanto para as larvas das formigas, as quais os consomem.

As larvas, por sua vez, produzem um líquido anal rico em glicose, o qual é ingerido pelas formigas adultas (SCHNEIDER et al., 2000).

Outra fonte excelente de nutrientes para as formigas adultas são os produtos da degradação fúngica extracelular, presentes na esponja, decorrentes da ação das pectinases, além de outros complexos enzimáticos fúngicos, sobre os polissacarídeos amido e xilana, principalmente, gerando a glicose e a xilose (SIQUEIRA et al., 1988).

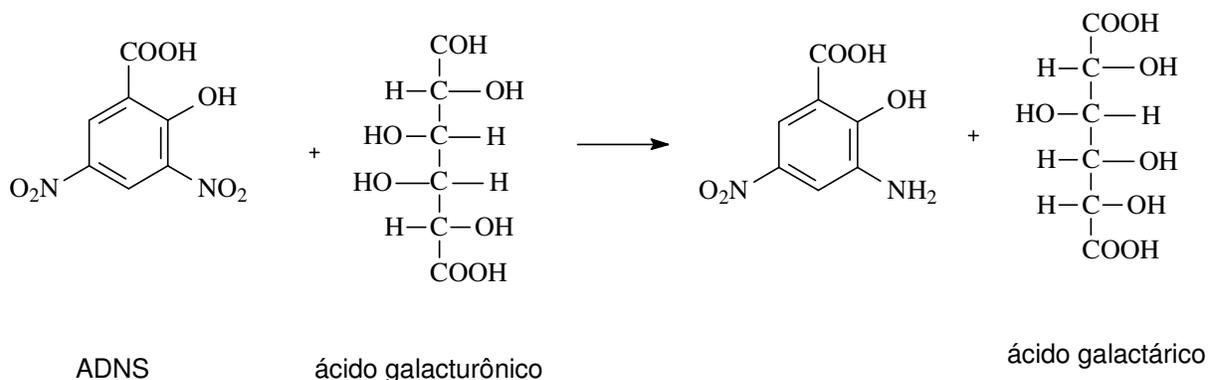
Formigas do gênero *Atta* estão envolvidas em grande parte das ocorrências de pragas agrícolas no Brasil. Para seu combate, os agricultores se valem de várias técnicas, desde receitas caseiras, barreiras físicas, métodos biológicos e químicos. Neste caso, existem as iscas tóxicas ou os inseticidas que, na maioria das vezes, não são muito eficientes, são altamente tóxicos devido ao seu amplo espectro de ação, além de não serem biodegradáveis, trazendo conseqüências nocivas ao meio ambiente (MARICONI, 1974). A crescente compreensão de como funciona o relacionamento simbiótico entre a formiga e o fungo proporcionou o desenvolvimento de ensaios que possibilitam testar substâncias que possam interferir mais especificamente nesta relação, sejam como inibidores enzimáticos, fungicidas, bactericidas ou inseticidas com o intuito de se descobrir novos produtos no combate das formigas saúvas como praga.

9.3.2. Local de realização

Os ensaios com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, com as polissacaridases fúngicas e os ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/UNESP/Rio Claro) pelas alunas Cíntia Zavan, sob a orientação do professor doutor Maurício Bacci Júnior e Roberta Novaes de A. Almeida, sob a orientação do professor doutor Fernando Carlos Pagnocca.

9.3.3. Metodologia do ensaio enzimático com as pectinases fúngicas

4 µL da solução da amostra a ser testada (1 mg substância pura em 20 µL DMSO) foram adicionados a uma mistura contendo 150 µL de pectina cítrica Sigma P-9135 (2 g de pectina em 100 mL de solução tampão citrato/fosfato de sódio 50 mM, pH 5,0 -o mesmo do formigueiro-) e deixados em banho-maria para a solução ficar mais homogênea por alguns minutos. Após isto, foram adicionados 75 µL de líquido fecal (As formigas operárias são acondicionadas numa câmara fria, a -15°C por 10 min, para entrarem em estado de dormência. Depois deste tempo, cada formiga tem o seu abdômem comprimido por uma pinça, sendo o líquido obtido puxado com uma pipeta e transferido para uma solução de tampão fosfato 50 mM, pH 6,0. Ao final da coleta, o total obtido é diluído 500 vezes com água) e 71 µL de água ultra pura. Como experimento controle, a mesma mistura reacional foi preparada, contendo DMSO puro, ao invés da solução da amostra a ser testada. Como experimento "branco" (serve para zerar o aparelho de UV), a mistura reacional foi de 150 µL de água ultra pura e 150 µL de pectina cítrica e só um experimento foi realizado. As misturas reacionais do controle e da amostra teste, preparadas em duplicata, foram incubadas a 37°C (A temperatura ambiente do formigueiro é de cerca de 25°C). O experimento foi realizado a 37°C (tem por finalidade acelerar a atuação da enzima) sob agitação por 30 min e duas alíquotas de 50 µL foram coletadas nos tempos de incubação zero e final de cada experimento, a partir daqui ficando o ensaio em quadruplicata. A estas amostras foram adicionados 100 µL de reagente ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico, oxidante dos monossacarídeos redutores de cadeia aberta – principalmente o ácido galacturônico - formados nas reações de hidrólise enzimática; Esquema 7-1; HOSTETTLER et al., 1951) e 100 µL de água ultra pura e as misturas resultantes foram fervidas por 5 min. Após isto, foram submetidas a um banho de gelo por 2 min, com a finalidade de se parar a reação enzimática, e, logo em seguida, centrifugadas (1500 g/3 min), sendo o sobrenadante utilizado para a determinação da absorbância a 540 nm.



Esquema 9-1 - Reação de oxirredução (HOSTETTLER et al., 1951) ocorrida no ensaio bioquímico de determinação da inibição de atividade das pectinases fúngicas

As diferenças de absorbância (A) entre o tempo zero e final são calculadas tanto para os experimentos feitos com a amostra em teste (A_T) quanto para o controle (A_C), sendo feita uma média dos quatro valores obtidos para cada experimento. Assim, o efeito da amostra teste sobre a atividade enzimática foi calculado pela equação $(A_T/A_C) \times 100$ e os resultados foram submetidos ao Teste Estatístico T-student (este requer, no mínimo, três valores a serem analisados, sendo, por isto, o experimento realizado em quadruplicata).

9.3.3.1. Teste de interação dos taninos com a pectinase

Além da habilidade dos taninos de se ligarem às proteínas, precipitando-as (CHARLTON et al., 2002), os taninos hidrolisáveis podem ser hidrolisados em meios ácidos, básicos ou por ação de enzimas (KHAMBABAE & REE, 2001). Sendo assim, o resultado do experimento pode ser interpretado de maneira errônea. Por isso, foi realizada uma investigação para se observar o comportamento da castalagina, casuarinina e pedunculagina frente à enzima pectinase e todos os outros reagentes do ensaio bioquímico, seguindo-se o procedimento já exposto (Figura 9-4).



Figura 9-4- Material para o ensaio bioquímico com as pectinases

9.3.3.2. Teste com a pectinase

Foram preparados os conjuntos de misturas reacionais referentes ao teste, controle do solvente e branco, sendo o teste constituído de 4 μL da solução de tanino em DMSO (ST); 75 μL do líquido fecal e 221 μL de água ultra pura. No controle, o volume relativo à ST foi substituído por igual volume de DMSO. No branco, foram misturados 150 μL de líquido fecal com igual volume de água ultra pura.

9.3.3.3. Teste com a pectina

Foram preparados os conjuntos de misturas reacionais referentes ao teste, controle do solvente e branco, sendo o teste constituído de 4 μL da solução ST; 150 μL da pectina e 146 μL de água ultra pura. No controle, o volume relativo à ST foi substituído por igual volume de DMSO. No branco, foram misturados 150 μL de pectina com igual volume de água ultra pura.

9.3.3.4. Teste com o tampão

Foram preparados os conjuntos de misturas reacionais referentes ao teste, controle do solvente e branco, sendo o teste constituído de 4 µL da solução ST; 150 µL da tampão e 146 µL de água ultra pura. No controle, o volume relativo à ST foi substituído por igual volume de DMSO. No branco, foram misturados 150 µL de tampão com igual volume de água ultra pura.

9.3.3.5. Teste com o ADNS

Foram preparados os conjuntos de misturas reacionais referentes ao teste, controle do solvente e branco, sendo o teste constituído de 4 µL da solução ST e 296 µL de água ultra pura. No controle, o volume relativo à ST foi substituído por igual volume de DMSO. O branco foi constituído apenas de 300 µL de água ultra pura.

9.3.4. Metodologia para o ensaio com o fungo simbiote

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* foi isolado de um ninho de formigas *Atta sexdens rubropilosa*, e foi mantido em condições de laboratório por repiques mensais em meio de cultura (composição em g/L: dextrose = 10; cloreto de sódio = 5; peptona = 5; extrato de malte = 10; ágar = 17) com pH de aproximadamente 6,5.

9.3.4.1. Preparo dos tubos contendo o meio de cultura

Cinco tubos de ensaio (15,0 x 2,0 cm) foram preenchidos com 9,0 mL de meio de cultura (PAGNOCCA et al., 1990) e 1,0 mL da solução da substância, ou extrato, a ser testada (1000 µg/mL), de modo que a concentração final da substância fosse de 100 µg/mL. Para os controles, também realizados em quintuplicata, aos 9,0 mL de meio de cultura foi adicionado 1,0 mL do solvente usado na preparação da solução teste. As testemunhas continham 10,0 mL do meio. Depois disto, o conjunto de tubos, meio e substância foram autoclavados a 120°C/15 min e homogeneizados com o auxílio de um agitador tipo Vortex, por 2 min, para se propiciar uma boa incorporação

da substância ao meio. Em seguida, os tubos foram inclinados e resfriados, à temperatura ambiente, por três dias, para se observar se não houve contaminação dos mesmos. Após este tempo, 1,0 mL do inóculo foi aplicado em cada tubo, sendo cuidadosamente manuseado para se obter uma distribuição uniforme dos fragmentos de micélio na superfície do meio. Os tubos foram mantidos inclinados em sala climatizada à temperatura de 25°C por 30 dias.

9.3.4.2. Preparo do inóculo

Para obtenção do inóculo, foram utilizadas culturas com 30 dias de desenvolvimento. O micélio, bem desenvolvido, de dois tubos foi transferido assepticamente para um erlenmeyer contendo 100 mL de água peptonada estéril (0,1 % p/v) para ser triturado de forma branda, num homogeneizador de Potter, visando a obtenção de uma suspensão micelial homogênea. Em seguida, uma amostra desta suspensão foi observada ao microscópio óptico para a constatação de possíveis danos do material desagregado e da sua pureza.

9.3.4.3. Determinação da massa seca

Alíquotas de 5,0 mL de inóculo foram empregadas para a determinação da massa seca em cada série de experimentos, com o intuito de se conhecer a concentração do fungo na solução (4-6 mg/mL é o ideal). A alíquota foi transferida para um vidro de relógio e levada a uma estufa de esterilização a uma temperatura de 70°C por 24 h, ou até a massa ficar constante.

9.3.4.4. Avaliação do crescimento do fungo simbiote

Após 30 dias de incubação, a leitura do experimento foi realizada, baseando-se na quantidade e densidade do micélio, conforme padrão pré-estabelecido, a saber:

5+ = crescimento idêntico ao do controle = 100 %

4+ = crescimento equivalente a 80 % do controle

3+ = crescimento equivalente a 60 % do controle

2+ = crescimento equivalente a 40 % do controle

1+ = crescimento equivalente a 20 % do controle ou inferior

0 = ausência de crescimento

Os resultados foram baseados no valor modal entre as 5 repetições.

9.3.5. Ensaio antimicrobiano

Além do fungo simbiote da formiga saúva, alguns extratos e substâncias, conforme a disponibilidade de massa, foram testados quanto ao potencial antimicrobiano em outras cinco bactérias e quatro leveduras, descritas abaixo respectivamente:

- a) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- b) *Bacillus cereus* (CCT 1436)
- c) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)
- d) *Escherichia coli* (CCT 1457)
- e) *Micrococcus roseus* (CCT 1469)
- f) *Candida albicans* (RJ/50008)
- g) *Cryptococcus laurentii* (RJ/50359)
- h) *Saccharomyces cerevisiae* (CCT 0758)
- i) *Trichosporon cutaneum* (UCD 121)

Os extratos, ou substâncias, foram dissolvidos nos solventes de melhor miscibilidade, na concentração de 1000 µg/mL, e foram submetidos ao método de difusão em ágar. Caso os resultados fossem muito bons, determinava-se a MIC.

9.3.5.1. Método de difusão em ágar utilizando-se discos de papel de filtro (BAUER et al., 1966)

Alíquotas de 10 µL da solução teste, previamente preparada, foram aplicada aos discos, aguardando-se a evaporação do solvente entre as aplicações. Os discos foram colocados em estufa a 45°C durante uma noite para a secagem final.

Em placas de Petri contendo 15,0 mL de meio (Ágar Mueller-Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud para fungos) foi espalhada, por meio de um “swab” estéril,

uma suspensão de microrganismos recentemente preparados e diluídos em solução salina 0,9 % (previamente autoclavada, inoculada com porções do microrganismo utilizando-se uma alça de inoculação), correspondente à escala McFarland 0,5. Aguardou-se um período de 10 a 15 min para, a seguir, se distribuir regularmente os discos (até 12 por placa) na superfície das placas com o auxílio de uma pinça, pressionando-os levemente sobre o ágar. Foi mantida uma distância mínima de 1,5 cm entre os discos e de 1,0 cm da borda para se evitar interferência entre os halos de inibição. 15 min após a semeadura, as placas foram invertidas e incubadas. Discos controle contendo antibióticos, antifúngicos e solvente foram preparados de modo semelhante ao relatado acima.

Após o período de incubação, 24 h para as bactérias e 48 h para os fungos, foi realizada a leitura dos resultados.

Os extratos ou substâncias que provocaram um halo de inibição de 8 mm, ou superior, foram considerados ativos, sendo os microrganismos susceptíveis a estes.

9.3.5.2. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pelo método da microdiluição com Alamar Blue (MABA)

Esta técnica (SALVAT et al., 2001) foi utilizada somente com bactérias, pois o meio adequado para leveduras (RPMI-1640) não estava disponível.

Em uma microplaca estéril de 96 poços, foram depositados 100 µL de meio Mueller-Hinton, com exceção da coluna A, o controle das amostras, que recebeu 150 µL. Na coluna A foram acrescentados 50 µL da solução da substância, ou extrato, a ser testada (uma substância diferente para cada número); na coluna B, 100 µL da mesma substância foram homogeneizados com o meio e transferidos para o pocinho seguinte, repetindo-se este procedimento até à coluna H, de modo a se obter uma concentração decrescente da substância. Os 100 µL finais foram desprezados. Logo após, foram adicionados, nos pocinhos (com exceção da coluna A), 100 µL de uma suspensão do microrganismo teste de crescimento recente (24 h), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland 0,5, e diluídos para a concentração final de 10^4 células/mL. Por último, foram adicionados 20 µL de Alamar Blue (indicador de óxido-redução). As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 35°C/24 h. A MIC foi

definida como a menor concentração da substância capaz de impedir a mudança de cor azul para róseo, ou a menor concentração do composto que inibi completamente o crescimento macroscópico do microrganismo.

Uma das colunas (a de número 1) sempre foi utilizada para um controle com antibiótico conhecido (tetraciclina ou cloranfenicol) e em outra (geralmente a coluna de número 12) os pocinhos foram utilizados para os respectivos controles, a saber: controle do microrganismo, do solvente e do meio de cultura.

9.3.5.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pelo método do TTC

Esta técnica (ELOFF, 1998, modificado) foi utilizada para a determinação da MIC nas bactérias e o procedimento de preenchimento dos pocinhos da microplaca foi idêntico, alterando-se apenas o corante utilizado, cloreto de trifetil tetrazolium a 0,5 %, e o tempo de incubação, pois só após 24 h de incubação é que foram adicionados 20 µL do corante, sendo o experimento incubado por mais 2 h. A MIC foi definida como a menor concentração da substância capaz de impedir o aparecimento da cor vermelha (Figura 9-5). Esta coloração provém de alterações químicas que o corante sofre ao ser incorporado na cadeia respiratória (ciclo de Krebs) do microrganismo. Se não houver o aparecimento da mesma, significa que o microrganismo não está realizando atividade respiratória, ou seja, está sendo inibido.

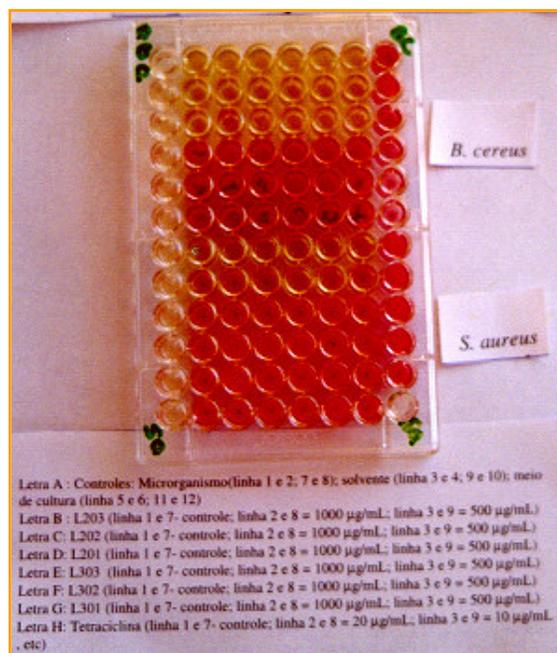


Figura 9-5- Placa contendo resultado da determinação da MIC pelo método do TTC

9.4. Verificação de atividade sobre o *T. cruzi*

9.4.1. Introdução

O experimento foi realizado, primeiramente, com o objetivo de se descobrir substâncias quimioprolifáticas para a Doença de Chagas, que pudessem ser adicionadas ao sangue, dos bancos de sangue, para esterilizá-lo, já que a única substância em uso, a violeta genciana, um derivado do trifenilmetano, apresenta o inconveniente de alterar a coloração do sangue e a função das plaquetas no estancamento de hemorragias (função hemostática), sendo que o contato da violeta genciana com o tecido de granulação pode resultar em pigmentação permanente da pele (GILMAN et al., 1983).

9.4.2. Local de realização

Este experimento foi realizado no Departamento de Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP) por alunos pós-graduandos e técnicos sob a orientação do professor doutor Sérgio Albuquerque.

9.4.3. Metodologia

O sangue de camundongos albinos Swiss, infectados pela cepa Y do *T. cruzi* (isolada pelo professor Pedreira de Freitas), foi obtido por punção cardíaca no pico da parasitemia (7º dia) e diluído em soro fisiológico, ou em sangue obtido de animal sadio, de forma a se obter uma concentração final de 2×10^6 formas de tripomastigotas por mL de sangue. Os ensaios foram realizados em microplacas de titulação (96 poços), onde o sangue infectado e as substâncias (1-2 mg) ou extratos brutos (4 mg), previamente dissolvidos em DMSO, foram solubilizados e o ensaio realizado em triplicata, sendo todo o conjunto incubado por 24 h a 4°C (temperatura na qual o sangue é estocado nos bancos de sangue). Após este tempo, as leituras foram efetuadas. As contagens das formas tripomastigotas foram realizadas seguindo-se a técnica de BRENER (1962). Como controle, foram utilizados sangue de camundongo infectado, sem a adição de nenhuma substância ou extrato; sangue infectado contendo a mesma concentração de DMSO utilizada no preparo das soluções e sangue infectado contendo violeta de genciana (controle positivo) na concentração 1:4000 (PEREIRA & NUSSENZWEIG, 1953).

Os resultados foram demonstrados na forma de % de formas celulares tripomastigotas destruídas (lise) em decorrência da ação do extrato, ou substância, em teste em comparação com o controle contendo DMSO.

9.5. Resultados e Discussões

9.5.1. Atividade inibitória enzimática de *V. polygama* sobre a GAPDH

O extrato hexânico de folhas (HVF) de *V. polygama* não pode ser testado, pois não se dissolveu na quantidade de DMSO, o solvente do ensaio, exigida para se realizar o ensaio. Então, ele sofreu partição e as frações resultantes foram solúveis e testadas. Destas, a fração acetato, AHVF, com 22 % de inibição (Figura 9-6), foi fracionada e suas frações foram testadas, porém, a fração com maior atividade apresentou inibição de 37 %, sendo dela isolado o flavonóide 3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxi-flavona que, a uma concentração de 305 μM , causou uma inibição de 41 %, corroborando o resultado inicial da fração da qual se originou. Da fração metanólica,

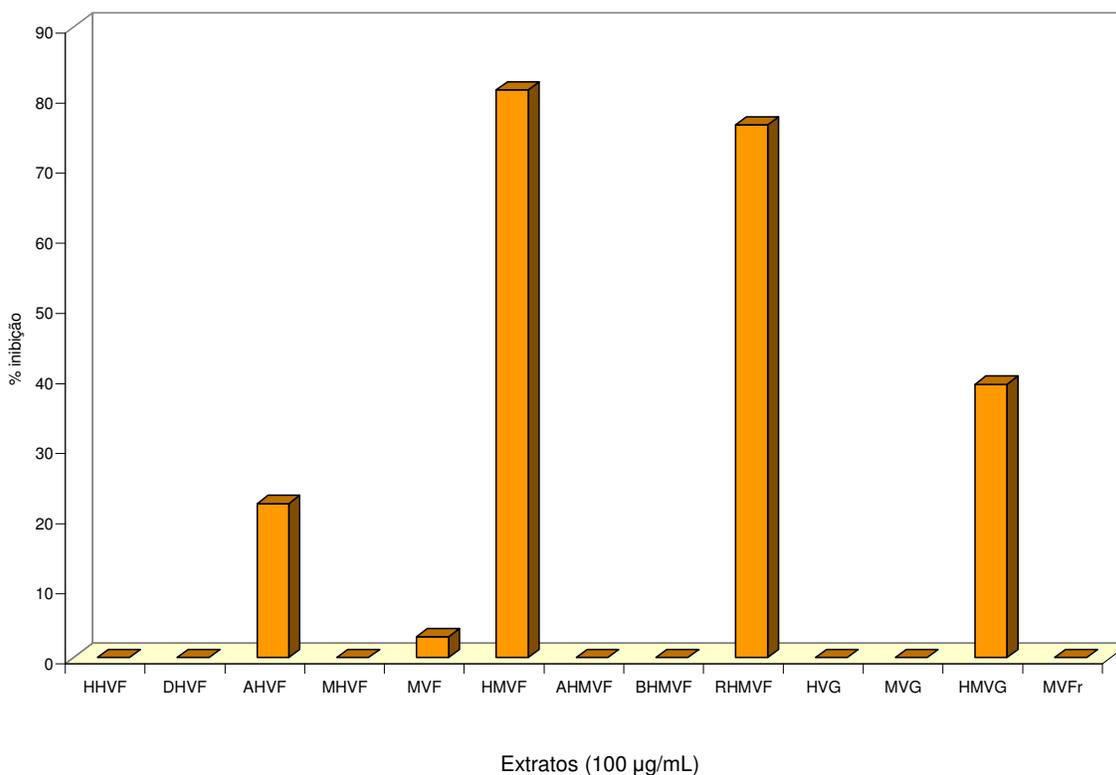


Figura 9-6- Atividade inibitória enzimática de extratos e frações de *V. polygama* sobre a GAPDH

MHVF, inativa, isolou-se o mesmo flavonóide e, ainda, a 4'-metoxipenduletina (200 μ M, 20 %).

O extrato metanólico de folhas, MVF, com 3 % de atividade (Figura 9-6), sofreu partição. A partição diclorometânica, DMF, foi fracionada e dela foram isoladas várias substâncias, cujas atividades foram expostas na Tabela 9-1 e Tabela 9-2. Entre os flavonóides, ficou evidente que a introdução de um grupo metoxila na molécula melhorou a atividade, como revelou a 3-*O*-metilquercetina, com uma CI_{50} de $36 \pm 9,6$ μ M (Figura 9-7). No entanto, a presença de dois ou mais grupos tende a reduzir a atividade inibitória, indicando que muitos grupos metoxila não são um requisito para a atividade destas flavonas testadas sobre a GAPDH. A surpreendente CI_{50} de 20 μ M, referente à mistura dos flavonóides 3 e 4'-*O*- β -D-glucopiranosilquercetina, mostrou que estes flavonóides *O*-glicosilados são bem mais ativos que a orientina, que é um flavonóide *C*-glicosilado. Em relação aos triterpenos, os que suportavam apenas dois grupos hidroxilas foram mais ativos que os que continham três. O contrário ocorreu entre os ecdisteróides, isolados do MVG (também inativo inicialmente), sendo a Polipodina B o mais ativo de todos, apesar de ser uma atividade inexpressiva. O ácido vanílico não foi ativo na concentração de 595 μ M. O *p*-hidroxibenzóico teve uma atividade inibitória de 39 % só a uma concentração de 1,3 mM.

Da fração BHMVF, que não havia apresentado atividade inicialmente (Figura 9-6), foram isoladas misturas de flavonóides glicosilados, a saber: orientina + isoorientina (223 μ M, 63 % inibição), relativamente ativo; schaftosídeo + isoschaftosídeo (200 μ M, 10 %); a mistura de 6-*O*-cafeoil α + β -D-glucopiranosídeo (322 μ M, 33 %) e o ácido metacrílico (1,2 mM inativo). Notou-se que a presença de uma molécula adicional de açúcar no schaftosídeo diminuiu sensivelmente sua atividade em relação à orientina (Tabela 9-3).

Tabela 9-1- Atividade inibitória enzimática de substâncias originadas da fração DMF de *V. polygama* sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $CI_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT

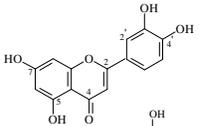
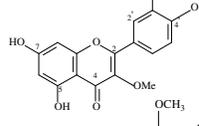
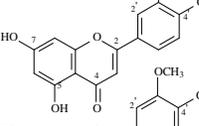
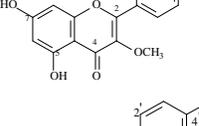
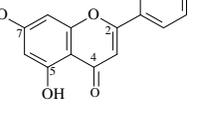
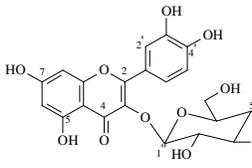
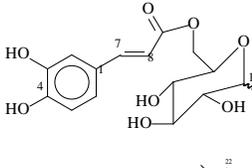
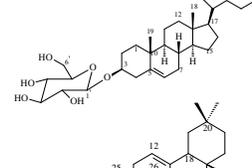
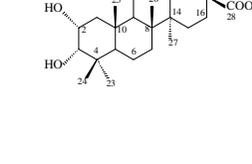
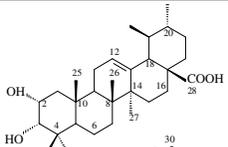
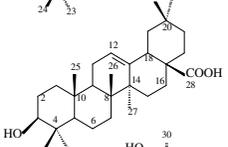
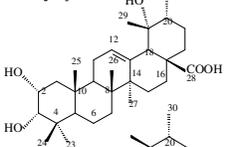
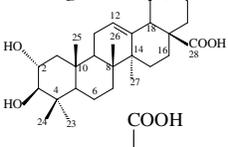
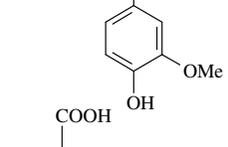
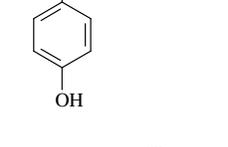
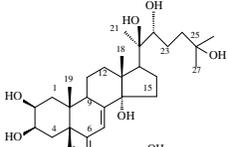
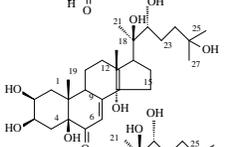
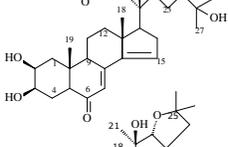
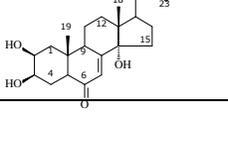
Substância	Nome	Concentração μM	% Inibição GAPDH	% Inibição APRT
	luteolina	200	56	
		100		40
	3-O-metil quercetina	200	73	
		100		84
	3'-O-metil luteolina	200	75	
		100		80
	5,7,4'-triidroxi- 3,3'- dimetoxiflavona	200	37	
		100		25
	acacetina	200	22	
		100		16
	3 + 4'-O- β -D- glucopiranosil quercetina	200	92	
		20	50	
		100		95
	6-O-cafeoil α + β -D- glucopiranosídeo	322	33	
		161		24
	sitosterol 3-O- β - D- glucopiranosídeo	170	0	
		90		46
	ácido 2 α , 3 α - diidroxiolean- 12-en-28-óico	210	44	
		110		71

Tabela 9-2- Atividade inibitória enzimática de substâncias originadas da fração DMF e do extrato MVG de *V. polygama* sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $CI_{50} = 64 \mu M$) e APRT

Substância	Nome	Concentração μM	% Inibição GAPDH	% de Inibição APRT
	ácidos 2 α ,3 α -diidroxí	210	0	
	urs + olean-12-en-28-óico	120		26
	ácidos oleanólico + ursólico	219	41	
		110		68
	ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxíurs -12-en-28-óico	200	0	
		100		10
	ácidos 2 α ,3 β -diidroxí urs + olean-12-en-28-óico	200	27	
		100		67
	ácido vanílico	595	0	
		298		27
	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	1,3 mM	39	
		725		55
	ácidos <i>p</i> -hidroxibenzoico + vanílico	100 $\mu g/mL$	60	
		50 $\mu g/mL$		62
	20-hidroxiecdisona	200	6	
		100		41
	polipodina B	200	27	
		100		84
	stachysterona B	200	10	
		100		12
	shidasterona	200	14	
		100		58

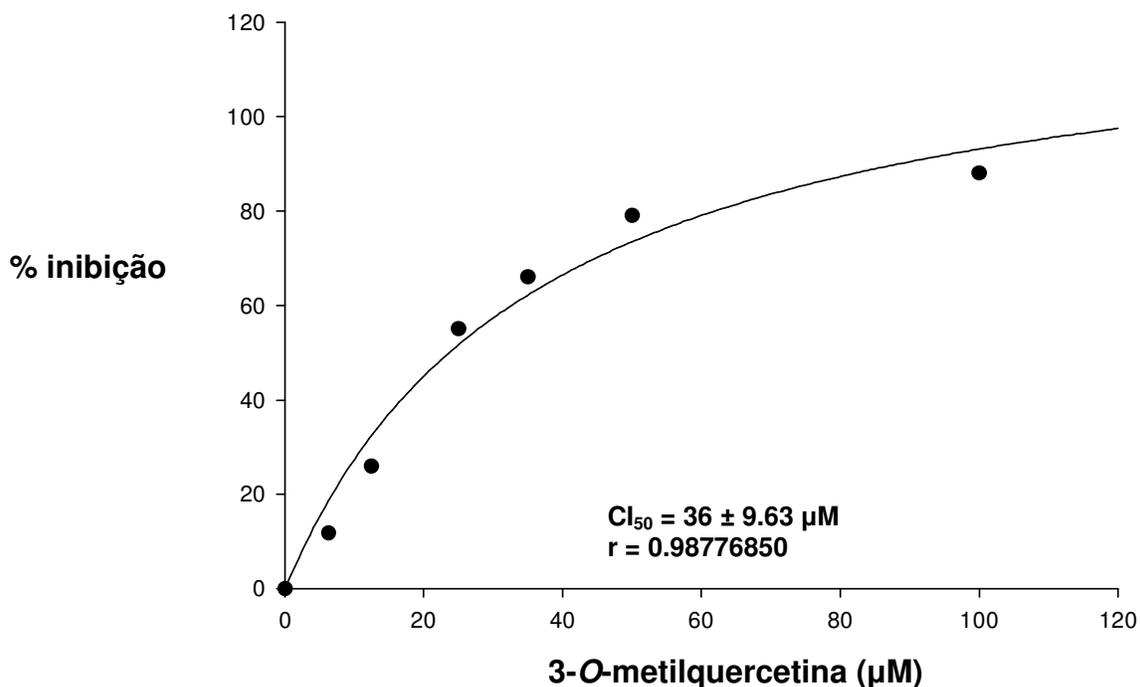


Figura 9-7- Gráfico da curva dose resposta para a determinação da CI_{50} da 3-O-metil quercetina sobre a GAPDH

Segundo VAN ACKER et al. (1996), o grupo 3-OH pode ser bloqueado, quando na presença da ligação dupla C2-C3, para render um composto que não é útil no cicloredox. A posição 3 é, por isso, uma excelente escolha de substituição para originar flavonóides com uma lipofilicidade maior, que permitam tanto melhor aplicação quanto facilidade de penetração na membrana celular, em se tratando de flavonóides terapêuticos interessantes. Por este motivo, a 3-O-metilquercetina se torna atrativa para estudos futuros de modelagem molecular para se descobrir estruturas mais ativas contra a GAPDH.

9.5.2. Atividade inibitória enzimática de *V. polygama* sobre a APRT

Nem todos os extratos puderam ser testados sobre a enzima APRT, pois inicialmente houve um problema de falta de reagentes para o ensaio bioquímico. Porém, os extratos e frações ensaiados foram relativamente ativos, mostrando uma certa especificidade na atuação enzimática. Da fração metanólica do extrato hexânico de folhas, MHVF, inicialmente não testada, isolou-se o flavonóide 4'-metoxipenduletina, o qual apresentou 12 % de inibição a 100 μ M.

O extrato metanólico dos frutos e a fração AMF não foram fracionados, pois sua composição química já era conhecida segundo estudos anteriores (LEITÃO, S. G. et al., 1997) e, conforme relato, ricos em flavonóides como a quercetina, 3-O-metilquercetina, luteolina e as C-glucosil flavonas orientina, isoorientina, vitexina e seu isômero, além do ácido *p*-hidroxibenzóico. Algumas destas substâncias também foram encontradas na fração DMF e ensaiadas e os resultados foram demonstrados na Tabela 9-1 e Tabela 9-2, justificando as inibições iniciais dos extratos e frações (Figura 9-8).

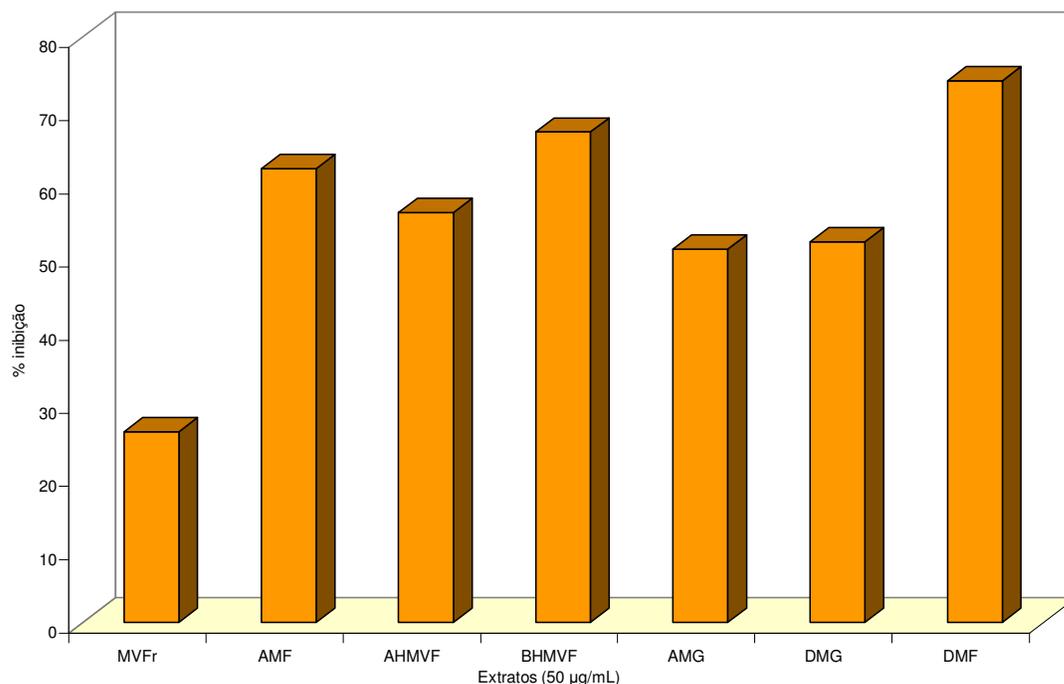
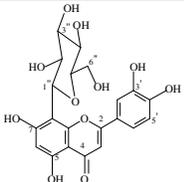
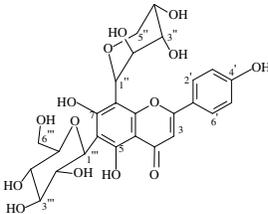
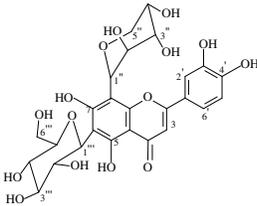
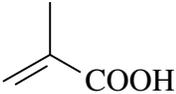


Figura 9-8- Atividade inibitória enzimática de extratos de *V. polygama* sobre a APRT

Da fração *n*-butanol do extrato hidrometanólico de folhas, BHMVF, isolou-se, entre outros, a mistura dos flavonóides orientina e seu isômero (Tabela 9-3). Estes apresentaram a maior atividade, indicando serem, talvez, os responsáveis pela atividade inicial da fração, 67 % de inibição (50 µg/mL; Figura 9-8).

Quanto aos ecidisteróides isolados da fração DMF (Figura 9-8), a polipodina B, contendo somente um grupo hidroxila a mais do que a 20-hidroxi-ecdisona, foi duas vezes mais ativa que esta (Tabela 9-2). Os outros ecidisteróides também tiveram a intensidade de suas atividades correlacionadas com a polaridade.

Tabela 9-3- Atividade inibitória enzimática de substâncias originadas da fração BHMVF de *V. polygama* sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $CI_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT

Substância	Nome	Concentração µM	% Inibição GAPDH	% Inibição APRT
	orientina + isoorientina	223	63	
		112		63
	schaftosídeo + isoschaftosídeo	200	10	
		100		47
	carlinsídeo + isocarlinsídeo	200	7	
		100		14
	ácido metacrílico	1,2 mM	0	
		580		14

9.5.3. Atividade inibitória enzimática de *S. densiflora* sobre a GAPDH

Como pode ser observado na Figura 7-9, os extratos hexânicos das diversas partes vegetativas de *S. densiflora* foram praticamente inativos frente à GAPDH, enquanto que os extratos metanólicos e hidrometanólicos causaram altíssimas inibições. A realização de vários fracionamentos e análises espectroscópicas levou à identificação de alguns taninos, ácidos fenólicos, flavonóides e triterpenos, estando suas respectivas atividades relatadas na Tabela 9-4.

O extrato metanólico de folhas, MSF, com atividade inicial de 74 %, sofreu partição. Da partição acetato, AMFS, 90 % de inibição, isolou-se a quercetina, a qual apresentou uma atividade muito elevada, com uma CI_{50} de $24 \pm 3,9 \mu\text{M}$ ($200 \mu\text{M}$, 91 %, Tabela 9-4, Figura 9-10), quando comparada com a luteolina (Tabela 9-1), o que nos indicou que a presença de um grupo hidroxila extra na posição 3 parece ser uma condição favorável para a inibição da enzima. De acordo com MORAES et al. (2003),

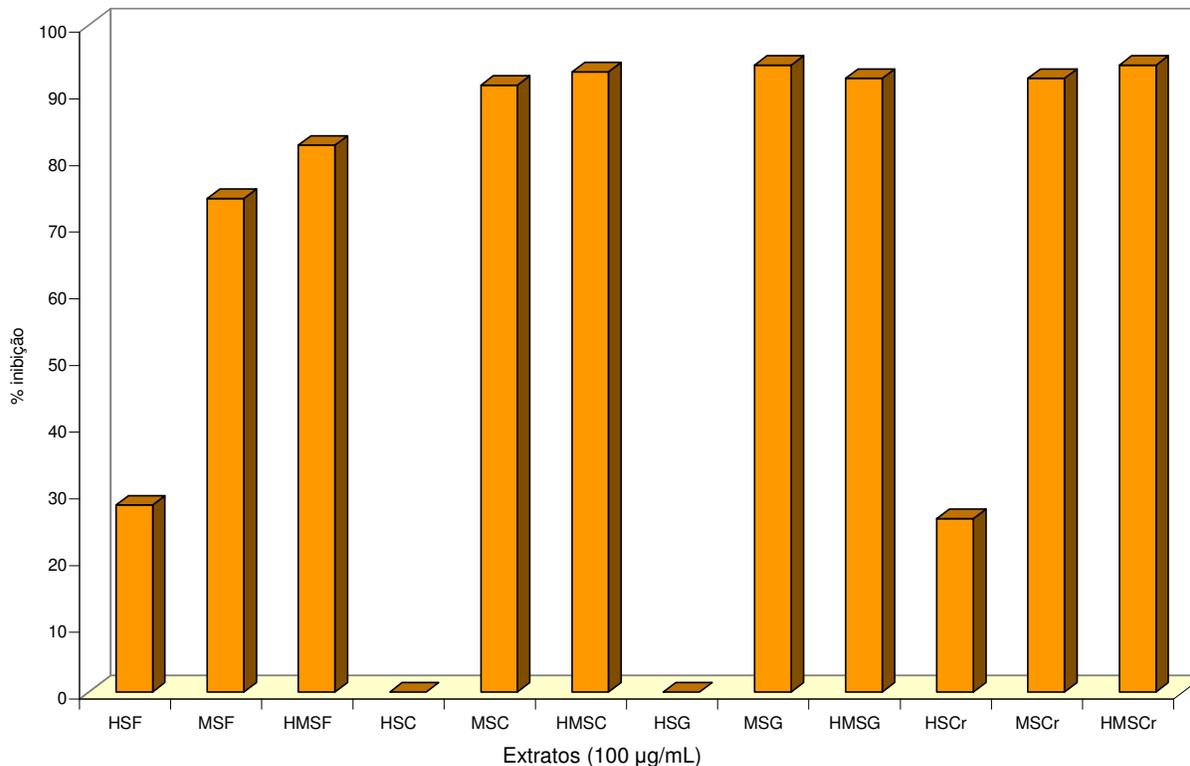


Figura 9-9- Atividade inibitória enzimática de extratos de *S. densiflora* sobre a GAPDH

flavonas altamente oxigenadas parecem possuir as exigências estruturais ideais para a inibição da GAPDH. No entanto, seu respectivo derivado glicosilado, a 3-O- α -L-ramnopiranosilquercetina, causou uma atividade inexpressiva de 19 %, muito diferente da atividade produzida pela mistura de 3 + 4-O- β -D-glucopiranosilquercetina (talvez tenham um efeito inibitório sinérgico, Tabela 9-1), daí a importância de se conseguir isolar as substâncias, para se detectar suas atividades isoladamente. Segundo LIO et al. (1985), a quercetina também produziu uma inibição de 90 % da xantina oxidase (166 μ M), enquanto que seu derivado glicosilado teve a inibição diminuída devido ser muito hidrofílico e volumoso, reduzindo, por isso, o seu contato com a enzima. VAN ACKER et al. (1996), relaciona potencial antioxidante e inibidor enzimático melhores para agliconas do que para glicosídeos. Para a captura de $O_2^{\cdot -}$, o grupo 3-OH, em associação com a dupla C2-C3, tem papel importante, assim como o grupo 5-OH em combinação com a parte 4-oxo da molécula pirano do flavonóide. Eles ainda citam que a quercetina é completamente conjugada, o que dá maior estabilidade aos radicais formados, devido às possibilidades de deslocalização. Já os glicosídeos são mais volumosos, o que pode dificultar a conjugação completa devido impedimentos estéricos.

Entre os triterpenos ensaiados, a presença de uma molécula de açúcar, ou mais que dois grupos hidroxila, destrói a atividade, enquanto que a função ácido parece ser requisito extremamente importante para que ocorra a inibição da enzima. Tais fatos puderam ser comprovados quando foram comparadas as atividades das misturas dos ácidos oleanólico + ursólico (41 %, Tabela 9-2) e lupeol + α e β -amirina (0 %, Tabela 9-4); ácido arjunólico (0 %), 6 β -hidroximaslinato (0 %) e ácido 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiurs-12-en-28-óico (0 %) com o ácido 2 α ,3 α -dihidroiolean-12-en-28-óico (44 %).

Inicialmente, os taninos castalagina, casuarinina e ramnosídeo do ácido elágico se mostraram extremamente ativos sobre a enzima, porém suas atividades foram contestadas pelos testes que serão discutidos posteriormente (sessão 9.5.11).

Os ácidos gálico e siríngico foram praticamente inativos, nas concentrações testadas, sobre a GAPDH e as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Porém, um estudo do efeito tripanocida do ácido gálico sobre as formas tripomastigotas e amastigotas do *T. brucei* (KOLDE et al., 1998) relata que sua CI_{50} foi de 15,6 μ M,

enquanto a CI_{50} do ácido siríngico foi de 465 μM . Neste mesmo estudo, o ácido gálico não se mostrou citotóxico à *L. major*, enquanto que nos nossos testes bioquímicos sobre a APRT de *L. tarentolae* sua CI_{50} foi de 352 μM e a do ácido siríngico de 319,5 μM . Pode se notar, através destes resultados, que essas duas substâncias apresentam um modo de atuação diferenciado sobre as espécies de protozoários citados.

O ácido elágico causou uma CI_{50} de $25 \pm 2,2 \mu\text{M}$ (Figura 9-11). Têm sido reportadas muitas e diferentes atividades biológicas a este composto, tais como inibidor do crescimento de algumas cepas de levedura; inibidor das enzimas N-acetiltransferase e DNA girase; antimutagênico e antioxidante potente (DENG et al., 2002).

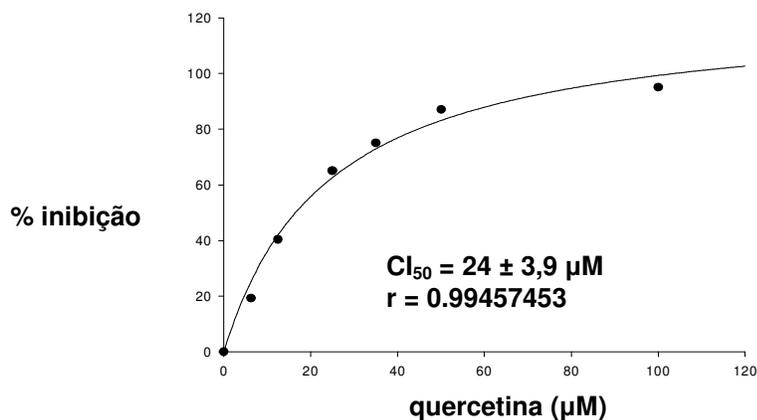


Figura 9-10- Gráfico da curva dose-resposta para a determinação da CI_{50} da quercetina sobre a GAPDH

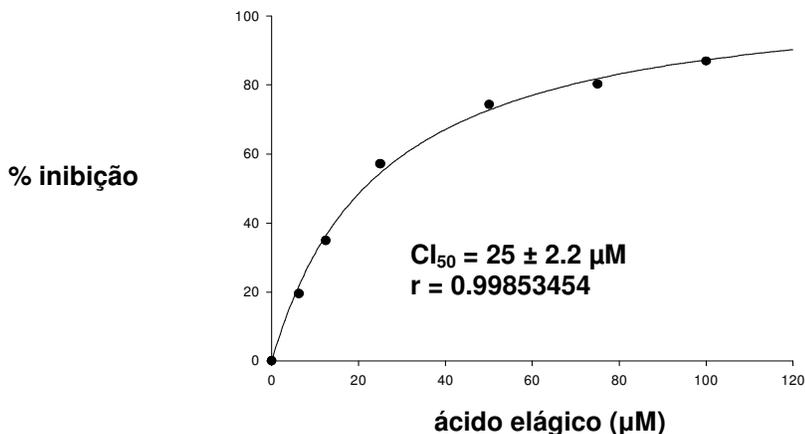
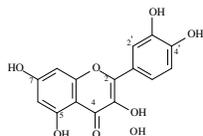
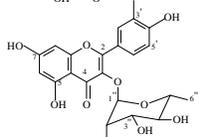
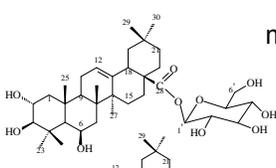
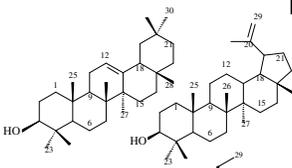
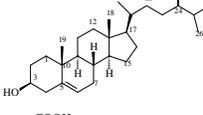
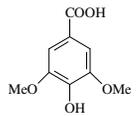
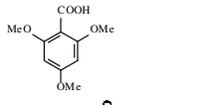
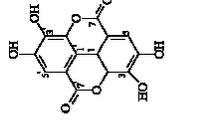
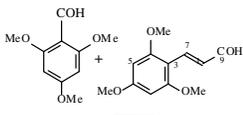
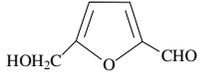


Figura 9-11- Gráfico da curva dose-resposta para a determinação da CI_{50} do ácido elágico sobre a GAPDH

Tabela 9-4- Atividade inibitória enzimática de substâncias isoladas de *S. densiflora* sobre a GAPDH (controle positivo, chalepina $CI_{50} = 64 \mu\text{M}$) e APRT

Substância	Nome	Concentração μM	% Inibição GAPDH	% Inibição APRT
	quercetina	200	91	
		100		97
	3-O- α -L- ramnopiranosil quercetina	200	19	
		100		89
	6 β -hidroxi maslinato de β -D- glucopiranosila	200	0	
		100		6
	ácido arjunólico	202	0	
		102		13
	lupeol + α e β - amirina	200	0	
	sitosterol	100		59
		314	31	
		157		42
	ácido gálico	824	0	
		412		58
	ácido siríngico	505	11	
		253		40
	ácido 2,4,6- trimetoxibenzílico	200	0	
		100		24
	ácido elágico	200	90	
		100		80
	2,4,6-trimetoxi benzaldeído + <i>trans</i> -2,4,6- trimetoxi fenilpropenaldeído	100 $\mu\text{g/mL}$	19	
		50 $\mu\text{g/mL}$		29
	5-hidroxi metil-2- furfuraldeído	794	25	
		397		21

9.5.4. Atividade inibitória enzimática de *S. densiflora* sobre a APRT

Nem todos os extratos mais polares de *S. densiflora* puderam ser ensaiados, pois absorveram no mesmo comprimento de onda do teste. Dentre aqueles que foram testados, os mais polares apresentaram as maiores inibições, como ocorreu com a GAPDH.

As três substâncias mais ativas, excetuando-se os taninos (discussão na sessão 9.5.11), foram o ácido elágico (100 μ M, 80 %, Tabela 9-4), presente em todos os extratos polares estudados; a quercetina (100 μ M, 97 %, Tabela 9-4) e seu derivado glicosilado, a quercitrina (100 μ M, 89 %, Tabela 9-4), ambas provenientes do extrato metanólico de folhas (MSF), partição AMFS.

Os triterpenos se mostraram semelhantes quanto ao seu modo de atuação em ambas as enzimas. Os ácidos fenólicos foram bem mais ativos sobre a APRT, porém numa concentração muito elevada.

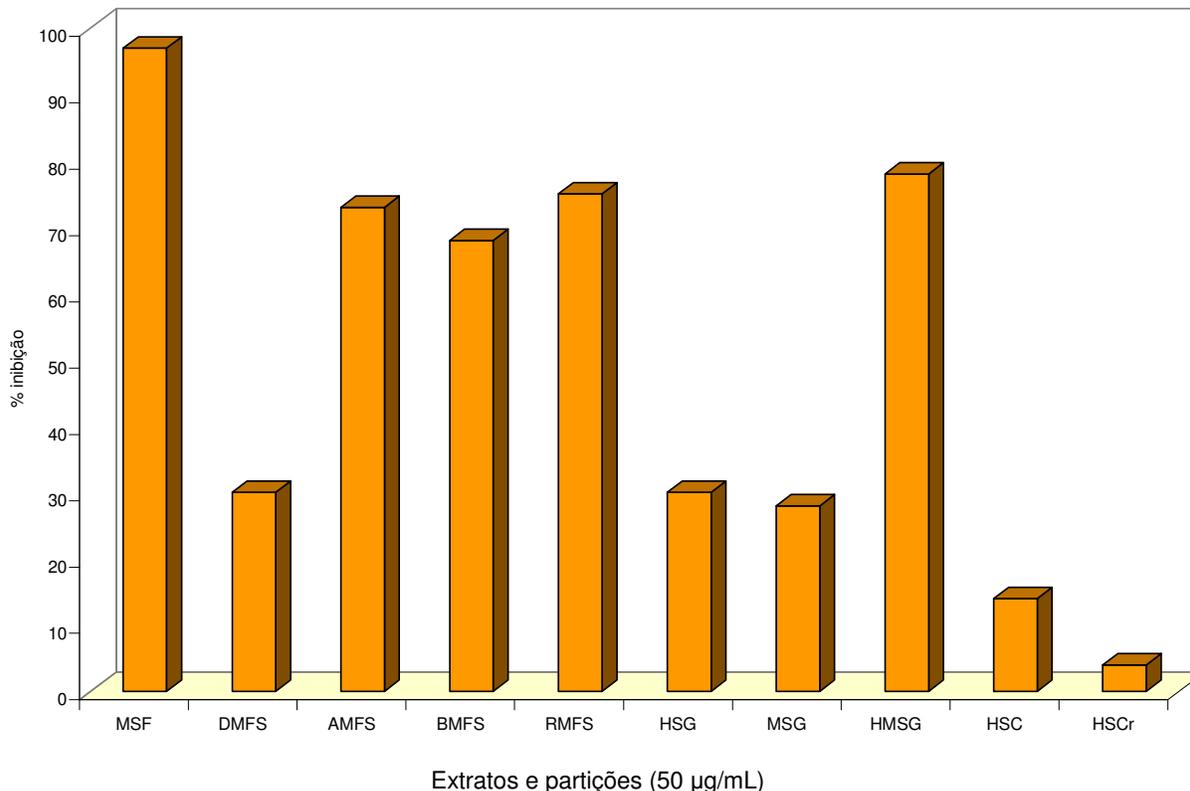


Figura 9-12- Atividade inibitória enzimática de extratos de *S. densiflora* sobre a APRT

9.5.5. Atividade de *S. densiflora* sobre *S. frugiperda*

Como pode ser observado na Figura 9-13, os extratos mais polares foram os mais ativos, atuando, inicialmente, como inibidores alimentares e, posteriormente, como inseticidas no teste preliminar, mesmo após fracionamento. De todos os extratos ativos estudados, foram identificadas as seguintes substâncias em comum: os taninos castalagina, casuarinina, ramnopiranosídeo do ácido elágico, ácido gálico e elágico. Sabendo-se que folhas de eucalipto (*Myrtaceae*), rico em taninos elágicos, são misturadas às espigas de milho em paiol, para protegerem os grãos contra o ataque de vários insetos pragas (GALLO et al., 1988) e que os taninos podem ser responsáveis pela diminuição da absorção de nutrientes, do crescimento, da metabolização energética e digestibilidade de proteínas, inclusive de animais domésticos e do homem, além de serem fagoinibidores e inseticida (CHUNG et al., 1998), pensou-se que eles poderiam ser os responsáveis pela atividade inicial daqueles extratos. No entanto, os taninos isolados, ao serem testados através do ensaio de contaminação superficial da

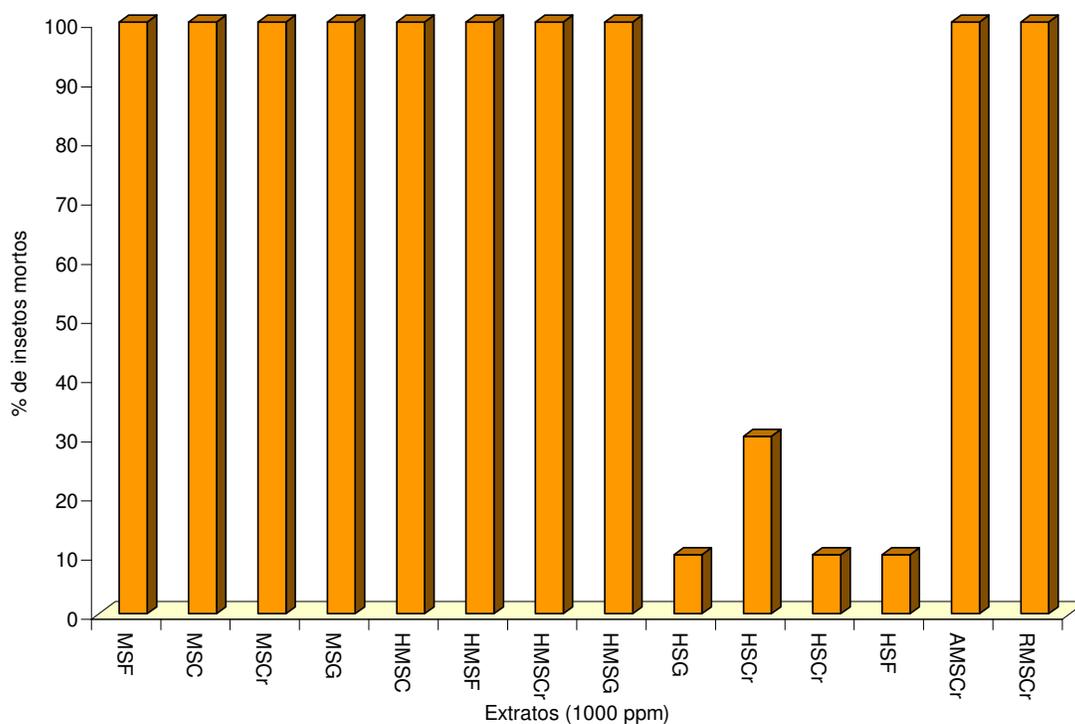


Figura 9-13- Atividade dos extratos (adição à dieta) de *S. densiflora* sobre *S. frugiperda*

dieta, não demonstraram a atividade inseticida ou inibidora alimentar esperada (Figura 9-14).

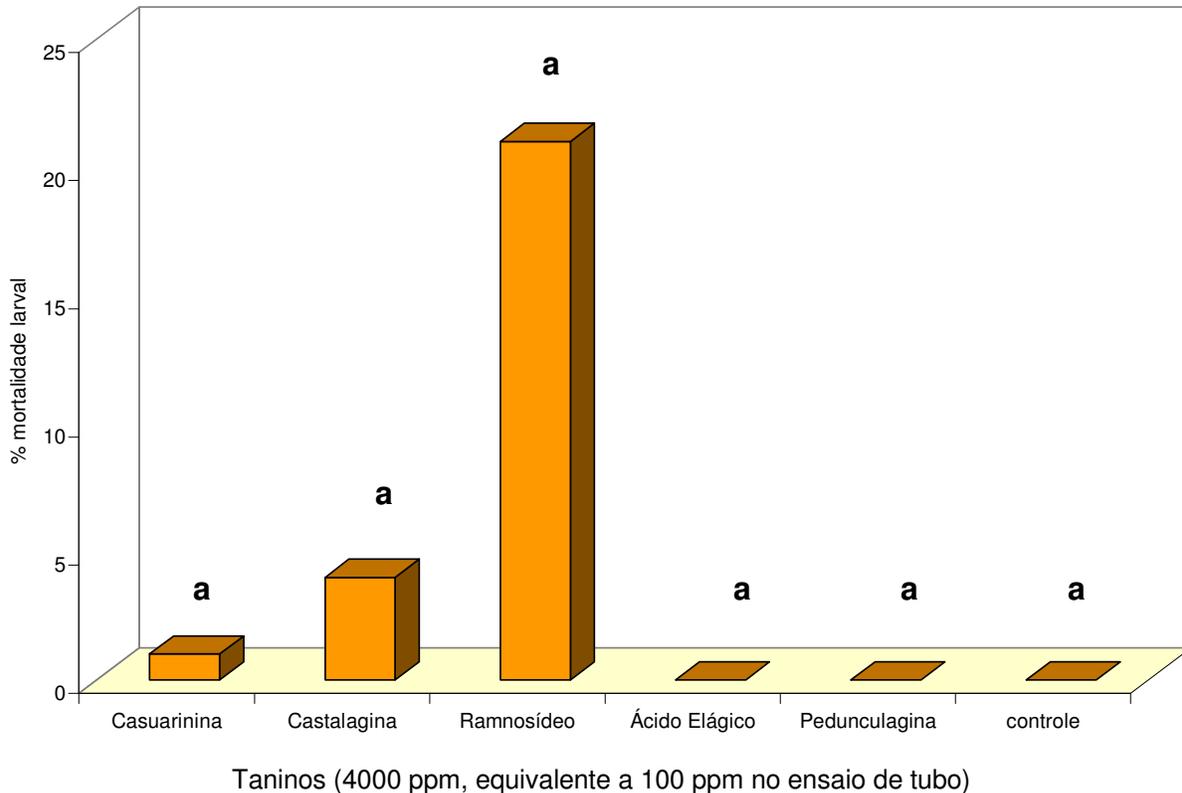


Figura 9-14- % de mortalidade, ao 10^o dia, de lagartas (1^o instar) de *S. frugiperda* alimentadas em dieta contaminada superficialmente com taninos

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($P \leq 0,05$)

Realizou-se, então, o mesmo tipo de ensaio, o de contaminação superficial da dieta, com os extratos hidrometanólicos da casca da raiz e folhas para se checar o quanto o modo de aplicação do extrato, ou substância, poderia estar influenciando nos resultados dos ensaios. Assim, pode-se observar que os resultados foram realmente diferentes do ensaio com adição à dieta (Figura 9-15, Figura 9-16), sendo significativo apenas no parâmetro redução da massa larval. Várias hipóteses foram levantadas para se tentar explicar o fato ocorrido: os taninos em questão não são ativos separadamente, agindo de modo sinérgico; pode ter ocorrido oxidação dos mesmos, já que a dieta ficou ligeiramente escurecida após algumas horas da aplicação, e suas atividades foram reduzidas; existem, no extrato, substâncias capazes

de impedir a oxidação dos taninos; os taninos identificados não são os responsáveis pela atividade inseticida, podendo esta ser imputada a alguma substância não caracterizada. Para se provar a primeira hipótese, seriam necessárias grandes quantidades de cada tanino, para se preparar várias misturas dos mesmos e ensaiá-las, o que infelizmente não foi possível. Quanto às hipóteses segunda e terceira, já é conhecido há tempos que os taninos hidrolisáveis podem sofrer oxidação, degradação, hidrólise ou transesterificação por vários fatores (KHANBABAEE & REE, 2001) e têm atividades antioxidante e anticorrosiva (MARTINEZ & ŠTAGLJAR, 2003), ressaltando-se dentre eles a casuarinina > ácido elágico > ácido gálico > α -tocoferol na concentração de 10 μ M (SU et al., 1988). Além disso, foram encontrados no extrato MSF os flavonóides quercetina e derivados que também detêm a propriedade de antioxidantes (VAN ACKER et al., 1996). Somando-se a estes fatos, os flavonóides poderiam estar sendo os responsáveis pela atividade inseticida do extrato metanólico de folhas (MSF).

Segundo SIMMONDS (2001), flavonóides glicosilados com o esqueleto básico da quercetina, quando ingeridos por alguns insetos, têm a ligação glicosídica hidrolisada. A quercetina liberada na hidrólise pode inibir a enzima mitocondrial ATPase e oxidases de função mista (MFO) dependentes do citocromo P450 destes insetos, explicando o efeito deterrente que causam no desenvolvimento de larvas, por exemplo, da *Spodoptera litura*. Os níveis de MFO aumentam com o grau de desenvolvimento das larvas. Logo, as larvas estariam mais susceptíveis nos seus estágios iniciais, quando não teriam quantidade de MFO suficiente para destoxicar a quercetina. No entanto, esta atividade é específica. A *S. eridania* e *S. littoralis* (polífaga) não sofrem influência destes flavonóides no seu comportamento alimentar, enquanto que a *S. exempta* (oligófaga) sofre deterrência causada por vários deles, o que poderia explicar seu hábito alimentar restrito, já que estes tipos de flavonóides são comuns a várias espécies de plantas.

Testes realizados com a quercetina e quercitrina, isoladas da fração AMSF, no ensaio de contaminação superficial da dieta (4000 ppm, equivalente a 100 ppm no ensaio de adição; ROCHA, 2004), sobre larvas de 1^o instar de *S. frugiperda* revelaram 78 e 85 % de mortes respectivamente. Logo, a atividade inseticida de ambas substâncias adicionadas à atividade fago-inibidora dos taninos explicariam os resultados

iniciais do extrato MSF. Sabe-se também que o ácido gálico pode ser tóxico para alguns insetos (BERNAYS & WOODHEAD, 1982). Além disso, para o propósito de defesa da planta, é suficiente que um composto, ou vários deles, tenham atividade biológica moderada sobre o ataque de um inseto. Por esta razão, existem poucas substâncias que, sozinhas, apresentarão uma potência tal que as designem “inseticidas” (ELLIGER & WAISS, 1989).

De acordo com YU & ABO-ELGHAR (2000), alguns metabólitos secundários como a quercetina (I_{50} 2,4 μM), ácido elágico (I_{50} 1,2 μM), luteolina (I_{50} 5,5 μM), acacetina (I_{50} 6,3 μM) e quercitrina (I_{50} 24 μM) são excelentes inibidores das glutatona S-transferases, enzimas que participam da destoxificação inseticida nos lepidópteros, além de metabolizarem vários aleloquímicos tóxicos. Tal fato também poderia estar contribuindo para a atividade dos extratos. No entanto, no caso do ácido elágico, este foi testado, no ensaio de contaminação superficial da dieta (4000 ppm, equivalente a 100 ppm no ensaio de adição), sobre larvas de 1º instar de *S. frugiperda* e não se mostrou ativo, naquela concentração, quanto aos parâmetros avaliados, indicando que a atuação de uma substância sobre uma enzima *in vitro* nem sempre é garantia de atividade *in vivo*.

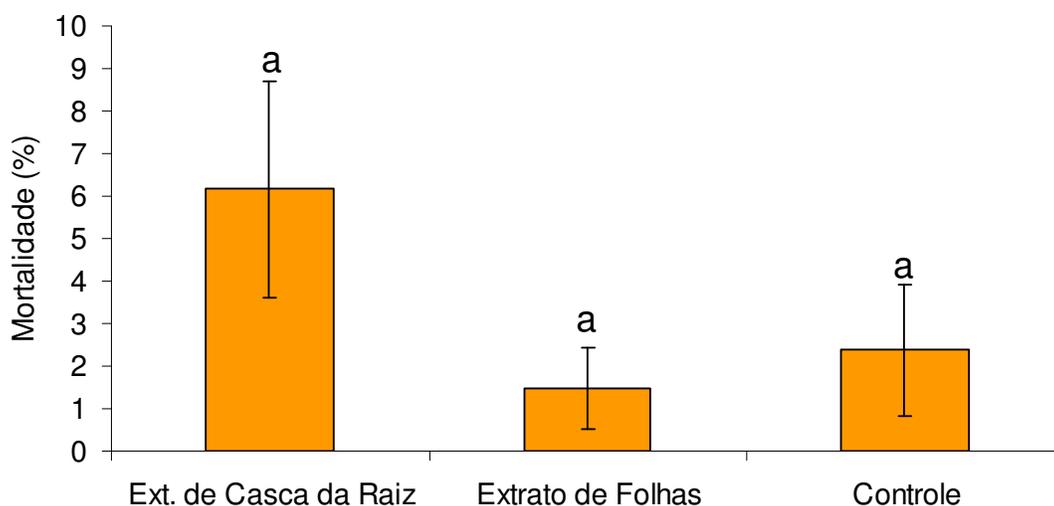


Figura 9-15- % de mortalidade, ao 10º dia, das lagartas (2º instar) de *S. frugiperda* alimentadas em dieta contaminada superficialmente com extratos hidrometanólicos de *S. densiflora* a 5 % (equivalente a 1000 ppm no ensaio do tubo)

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan ($P \leq 0,05$)

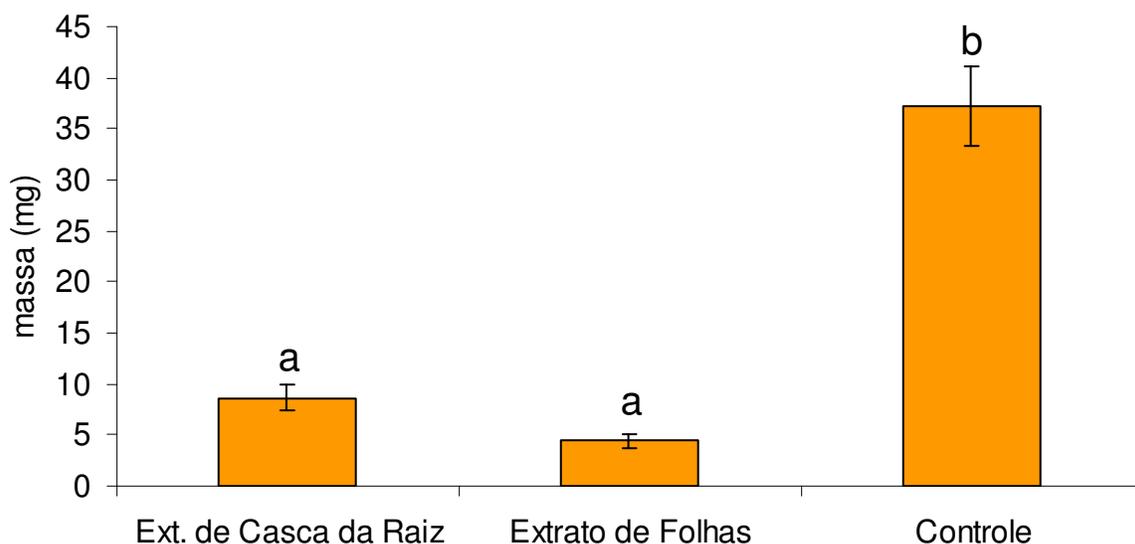


Figura 9-16- Média das massas (mg), ao 10^o dia, das lagartas (2^o instar) de *S. frugiperda* alimentadas em dieta contaminada superficialmente com extratos de *S. densiflora* a 5 % (equivalente a 1000 ppm no ensaio do tubo)

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo Teste de Duncan ($P \leq 0,05$)

9.5.6. Atividade de *V. polygama* sobre *S. frugiperda*

O extrato hexânico de folhas (HVF, Figura 9-17), além de causar 40 % de mortes, atrasou a entrada das larvas vivas na fase de pupa e a emergência dos adultos em cerca de 6 dias em relação à testemunha. A massa média das pupas ficou cerca de 29,2 mg abaixo da média da testemunha. Após o HVF ser fracionado, produziu a fração hexânica (HHVF) que não causou mortes, porém aumentou a massa das pupas em 13,3 mg e adiantou a entrada das larvas na fase pupal em 1 dia em relação à testemunha.

A fração diclorometânica (DHVF), além de causar 30 % de mortalidade nos insetos, reduziu a massa das pupas em 29,1 mg e atrasou a entrada das larvas na fase pupal em 4 dias. A fração acetato (AHVF), na concentração de 1000 ppm, reduziu a massa das pupas em 42,2 mg, atividade maior do que o extrato bruto, e atrasou a entrada das larvas na fase pupal em 2,5 dias. Estes resultados se assemelharam ao resultado inicial do extrato bruto, podendo-se concluir que a(s) substância(s) ativa(s) estaria(m) concentrada(s) nesta fração. Pelas análises espectrométricas da fração

AHVF, estas substâncias foram identificadas como graxas. A fração metanólica não foi testada na concentração de 1000 ppm por falta de material.

A menor massa pupal pode significar que o extrato testado provocou uma inibição de alimentação (diminuição do consumo ou aproveitamento do alimento) e poderia gerar adultos pequenos, o que causaria um problema físico na cópula daqueles com indivíduos normais, além do que as fêmeas menores poderiam ser menos férteis. O aumento na duração do estado larval, nas condições de campo, deixaria o inseto mais propenso ao ataque de parasitas, predadores e entomopatógenos. Neste sentido, os adultos que emergissem destas larvas teriam assincronia com a população normal. Em consequência, a cópula se tornaria dificultada, mas se esta acontecesse, ocorreria a consanguinidade com o aparecimento de indivíduos da mesma geração (RODRIGUEZ, 1990). Também seria diminuído o número de gerações do inseto por ciclo agrícola. O prolongamento da fase larval se relaciona, geralmente, com um crescimento mais lento e pouca ingestão de alimento, devido à existência, naquele, de um ou vários aleloquímicos tóxicos ou que provocam um desequilíbrio nutricional. Nas condições de campo, o crescimento lento das larvas causaria menor consumo de alimento e, portanto, menores danos à plantação.

O extrato hexânico dos galhos (HVG), apesar de causar 30% de mortalidade, provocou um aumento médio de 21,5 mg na massa das pupas dos insetos sobreviventes, o que poderia significar a presença de alguma(s) substância(s) fagoestimulante para o inseto. No entanto, do extrato metanólico de galhos (MVG), partição acetato (AMVG), que não causou mortes e também teve ação estimulante alimentar, foram isolados vários ecdisteróides. Dentre estes, a 20-hidroxiecdisona foi testada através do ensaio de contaminação superficial da dieta a 4000 ppm (que equivaleria à concentração de 100 ppm no ensaio de adição da substância), não ocasionando morte do inseto, mas causando uma redução significativa, ao nível de 1 e 5 % de significância (Teste de Tukey), na massa das lagartas em comparação com o controle. De acordo com WILSON (1987), o efeito dos ecdisteróides pode variar com a concentração, com o estágio de desenvolvimento e durante o ciclo de vida de cada espécie. Sua atuação também é dependente do tipo de dieta usada, sendo mais potente em dietas à base de caseína (nosso tipo). Deste modo, podem agir como inseticidas (atuando como hormônios, causando distúrbios na ecdise) ou fago-inibidores

(agindo no metabolismo e excreção do inseto). Assim, a 20-hidroxicecdisona não produziu efeito deterrente nem inseticida em *Spodoptera littoralis*, em concentrações acima de 50 ppm (adição na dieta), porém causou entre 56-88 % de mortes de larvas (2º instar) de *Bombyx*, quando aplicada em concentrações de 25 a 100 ppm. As exigências para a atividade incluem a presença da conjugação 7-en-6-ona, a 3β- e 14α-OH, o grupo hidroxila no C-22 com configuração R e o H ou OH no C-5 em β,

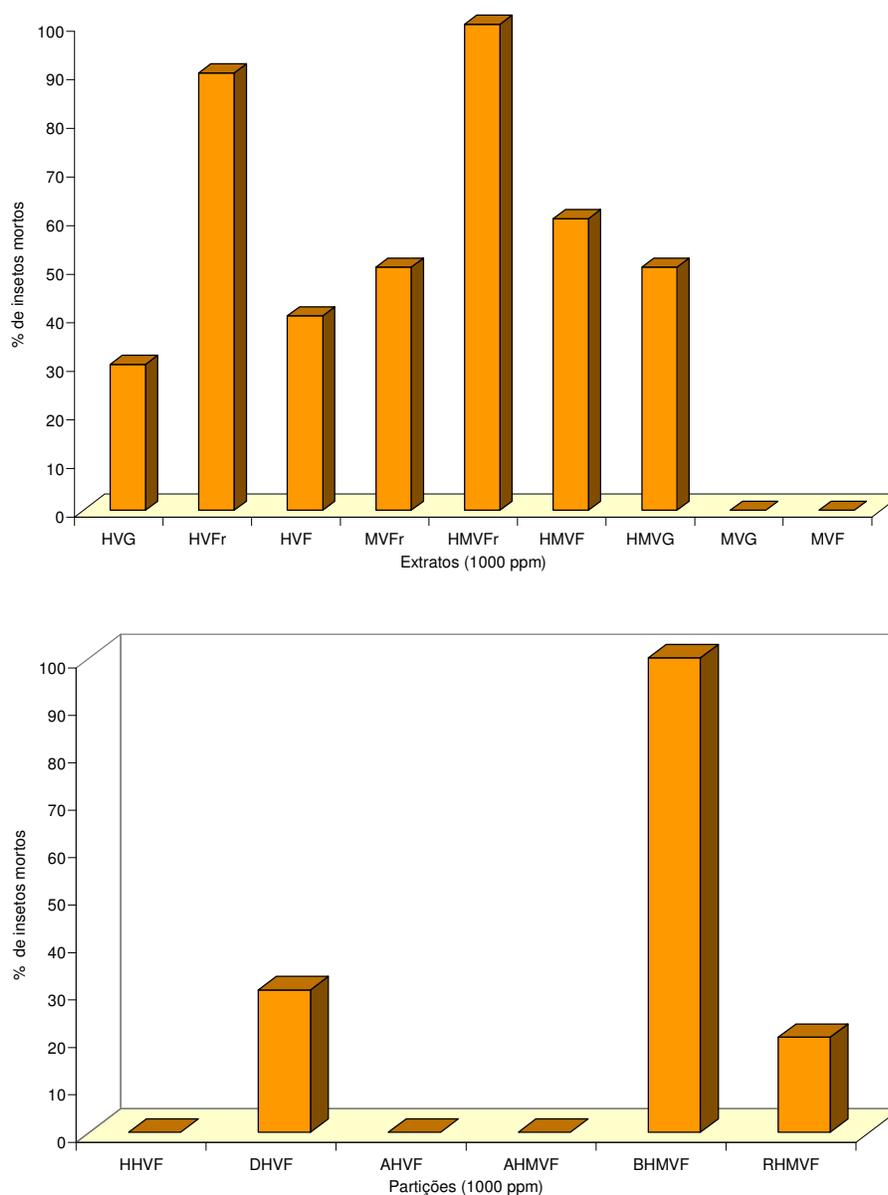


Figura 9-17- Atividade dos extratos (adição à dieta) e partições de *V. polygama* sobre *S. frugiperda*

originada da fusão *cis* entre os anéis A e B. A hidroxilação no carbono 5 torna a polipodina B quatro vezes mais ativa que a 20-hidroxicedisona.

O extrato hexânico dos frutos causou 90 % de mortalidade dos insetos e nos 10 % restantes atrasou o ciclo biológico em 13 dias em relação ao controle. A análise das frações do HVFr indicou que as mesmas eram constituídas de vários hidrocarbonetos e ácidos graxos.

O extrato hidroalcoólico dos frutos apresentou atividade 100 % inseticida em apenas 15 dias de experimento, mas não houve quantidade suficiente para ser estudado quimicamente. Após nova coleta de material (frutos parcialmente maduros, para se conseguir uma quantidade maior de frutos), os ensaios foram realizados novamente e a atividade não se repetiu, fato que nos indicou que o estágio de maturação dos frutos é importante para se encontrar o princípio ativo.

O extrato hidroalcoólico de folhas (HMFV) causou 60 % de mortes dos insetos. Após fracionamento, a fração acetato (AHMFV) não provocou mortalidade nos insetos, mas agiu como inibidor alimentar, reduzindo o peso das pupas em 25,1 mg em relação à testemunha.

A fração butanólica (BHMVF) foi dividida em duas: o precipitado amarelo que foi 100 % inseticida, apresentando um aumento de 40 % de atividade em relação ao extrato bruto, e o sobrenadante que, após seco, adquiriu a cor marrom e de aspecto liquefeito, cuja atuação se deu somente na redução da massa das pupas em 68,7 mg (fago-inibidor). Do precipitado amarelo foram identificados os flavonóides *C*-glicosilados orientina, isorientina, schaftosídeo e seu isômero e carlinosídeo e seu isômero, porém em quantidades insuficientes para serem submetidos ao ensaio de contaminação superficial da dieta. É conhecido (SIMMONDS, 2001) que os flavonóides podem atuar de diversas maneiras nos insetos: como inibidores alimentares ou fagoestimulantes; inseticidas; estimulantes da oviposição, etc. Como exemplo, o schaftosídeo pode modificar o comportamento alimentar da esperança marrom (*Nilaparvata lugens*), praga do arroz. Ninfas expostas a uma dieta artificial contaminada com este flavonóide (tanto na concentração de 250 quanto de 500 ppm) morreram entre 5-10 dias. Acredita-se, ainda, que a presença desta flavona di-*C*-glicosilada em certos tipos de arroz cumpra papel fundamental na resistência que eles apresentam em relação a este inseto.

9.5.7. Atividade de *V. polygama* sobre o *T. cruzi*

O extrato hexânico de folhas, que provocou 94 % de lise nas formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Tabela 9-5), foi fracionado. As atividades das frações foram determinadas, como pode ser visto na Tabela 9-6. No entanto, após suas frações sofrerem refracionamento e as substâncias isoladas serem testadas novamente, pode-se notar que a fração relativa à mistura de esteróides, originada da DHVF, apresentou atividade similar à inicial mostrada pelo extrato (500 µg/mL, 93 % lise). As misturas de hidrocarbonetos isoladas das frações HHVF e DHVF causaram uma lise média de 55 % (500 µg/mL). Da fração AHVF, foi isolado o flavonóide 3,7,4'-trimetoxi,5-hidroxi flavona, cuja atividade foi de 31 % de lise (1,5 mM), talvez sendo o responsável pela atividade inicial da fração. A fração MHVF rendeu o mesmo flavonóide anterior, além da 4'-metilpenduletina (16 % lise a 1,4 mM). Baseando-se na porcentagem inicial de lise da fração, estes flavonóides parecem produzir um efeito somatório.

Do extrato metanólico de folhas (MVF), partição diclorometânica, foram isoladas várias substâncias cujas atividades foram relatadas na Tabela 9-7. Interessante notar que os flavonóides não tiveram uma boa atuação, diferentemente do que ocorreu na enzima GAPDH, com exceção da mistura do 3 e 4'-*O*-β-D-glucopiranosilquercetina, que foi muito ativa em ambos os testes. No entanto, TAKEARA et al. (2003) relatam que o flavonóide 3-*O*-metil luteolina teve uma atividade de 63 % (1,7 mM ou 500 µg/mL), mostrando-se duas vezes mais potente que a 3'-*O*-metil luteolina (Tabela 9-7), sendo que a única diferença entre ambos é a posição da metoxila. O mesmo trabalho reporta que a vicenina 2 (flavonóide 6,8-di-*C*-glucosilado derivado da apigenina; 0,8 mM ou 500 µg/mL) demonstrou a mesma atividade da orientina (Tabela 9-7), indicando que a introdução de uma molécula de açúcar não melhorou a atividade do flavonóide sobre o *T. cruzi*. A penduletina (Figura 1-6; RIBEIRO & PILÓ-VELOSO, 1997; 1,4 mM), com um grupo metoxila a menos que a 4'-metoxipenduletina, causou 86 % lise, enquanto a calicopterina (suportando um grupo a mais de metoxila na posição 8) não foi ativa.

Tabela 9-5- Atividade dos extratos (4 mg/mL) de *V. polygama* sobre o *T. cruzi*

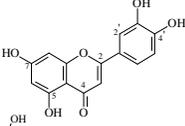
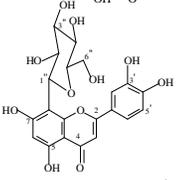
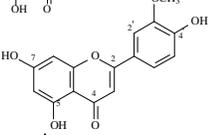
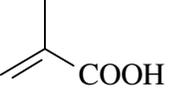
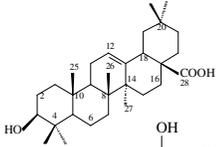
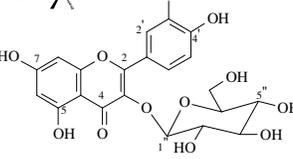
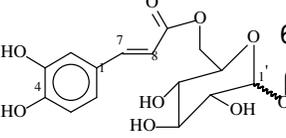
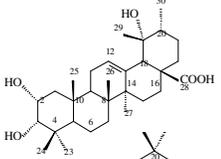
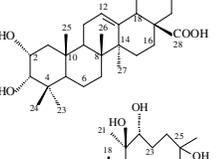
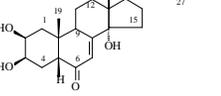
Código do extrato	Número de parasitas	% de lise
HVG	16	75
	13	
HVFr	12	80
	08	
	16	
HVF	10	94
	04	
	04	
MVFr	02	80
	08	
	10	
HVMFr	15	39
	40	
	28	
HVMF	34	41
	40	
	30	
HVMG	28	81
	12	
	10	
MVG	10	28
	39	
	40	
MVF	42	58
	28	
	22	
CONTROLE	20	0
	58	
	53	
	56	

Tabela 9-6- Atividade das frações (4 mg/mL) de *V. polygama* sobre o *T. cruzi*

CÓDIGO DA FRAÇÃO	NÚMERO DE PARASITAS	% DE LISE
	22	
HHVF	34	53
	30	
DHVF	30	
	40	38
	44	
AHVF	36	
	48	36
	44	
MHVF	28	
	28	52
	32	
AHMF	24	
	20	62
	25	
BHMF	26	
	18	60
	30	
RHMF	40	
	24	40
	32	
CONTROLE	60	
	68	0
	56	

Quanto aos triterpenos, foram mais ativos aqueles que suportavam mais grupos hidroxilas (Tabela 9-7), diferentemente do comportamento com a enzima, indicando que a atividade dos mesmos pode estar relacionada com outros fatores. Vale ressaltar que o ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxiurs-12-en-28-óico apresentou 87 % de lise (250 μ g/mL ou 0,5 mM), atuação próxima da violeta genciana (0,6 mM ou 250 μ g/mL = 100 % ou CI₅₀ = 31 μ g/mL ou 76 μ M), porém a atividade foi reduzida para 16 % a uma concentração de 100 μ g/mL ou 0,2 mM. Por isso, esta substância poderia ser usada como líder na busca de compostos mais ativos.

Tabela 9-7- Atividade de substâncias isoladas de *V. polygama* sobre *T. cruzi* (controle positivo violeta genciana, $CI_{50} = 31 \mu\text{g/mL}$ ou $76 \mu\text{M}$)

Substância	Nome	Concentração mM	% lise
	luteolina	1,7	27
	orientina + isorientina	1,1	13
	3'-O-metil luteolina	1,7	33
	ácido metacrílico	5,8	8
	ácido oleanólico + ursólico	1,1	38
	3 + 4'-O- β -D- glucopiranosil quercetina	1,1	97
	6-O-cafeoil α + β -D-glucopira- nosídeo	1,5	11
	ácido 2 α ,3 α ,19 α -triidroxi urs- 12-en-28-óico	0,5	87
	ácido 2 α ,3 α - diidroxi olean- 12-en-28-óico	1,1	76
	20- hidroxiecdisona	1,0	70

9.5.8. Atividade de *S. densiflora* sobre o *T. cruzi*

O extrato hexânico de folhas (HSF), diferentemente dos outros, apresentou uma grande atividade, 82 %. Como os extratos de *Vitex* apresentaram resultados semelhantes devido presença de esteróides e ácidos graxos, foi decidido que não se iria trabalhar com o mesmo.

O extrato metanólico de casca da raiz (MSCr), com 88 % de lise celular (Tabela 9-9), foi fracionado. A fração diclorometânica, DMSCr, causou 74 % de lise. Desta foram isolados os ácidos gálico e siríngico, os quais não se mostraram muito ativos, e o ácido arjunólico, que causou 89 % de lise a uma concentração de 1 mM (Tabela 9-8). Da fração AMSCr, 12 % de lise, foram isolados os taninos castalagina, casuarinina e raminopiranosídeo do ácido elágico e o ácido elágico, todos com atividades inexpressivas.

O extrato metanólico de folhas (MSF), 34 % de lise, também sofreu partição. A fração acetato, AMFS, rendeu os flavonóides quercetina e quercitrina, os quais também causaram pequenas atividades (Tabela 9-8).

Tabela 9-8- Atividade de substâncias isoladas de *S. densiflora* sobre *T. cruzi* (controle positivo violeta genciana, IC₅₀ = 31 µg/mL ou 76 µM)

Substância	Concentração mM (ou 500 µg/mL)	% lise
quercetina	1,7	34
quercitrina	1,1	30
ácido gálico	2,9	19
ácido elágico	1,7	41
ácido siríngico	2,5	16
casuarinina	0,5	28
castalagina	0,5	11
raminopiranosídeo do ácido elágico	1,1	12
	1,0 (500 µg/mL)	89
ácido arjunólico	0,5 (250 µg/mL)	61
	0,2 (100 µg/mL)	9
sitosterol glucosilado	0,9	14

Tabela 9-9- Atividade de extratos (4 mg/mL) de *S. densiflora* sobre *T. cruzi*

CÓDIGO DO EXTRATO	NÚMERO DE PARASITAS	% DE LISE
	64	
MSC	58	47
	80	
	48	
HSC	44	65
	44	
	01	
HMSC	-	99
	-	
HMSG	-	Lise total
	-	
	83	
HSG	86	33
	90	
	22	
MSG	22	83
	23	
	108	
MSF	94	34
	52	
	78	
HMSF	72	49
	48	
	16	
MSCR	16	88
	14	
	32	
HMSCR	68	61
	52	
	72	
HSCR	44	64
	22	
	128	
CONTROLE	132	0
	125	

9.5.9. Atividade de *S. densiflora* e *V. polygama* sobre o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* simbiote de *Atta sexdens rubropilosa*

Somente os extratos hidrometanólicos de caule, galho, folha e casca da raiz de *S. densiflora* foram testados, devido haver material suficiente. Destes, apenas o HMSC (1000 µg/mL) produziu 20 % de inibição do crescimento do fungo (controle = 0 %; peso seco do inóculo: média 7, 2 mg/mL).

Do extrato HMSC foi isolada a castalagina, a qual produziu 20 % de inibição do crescimento do fungo somente a uma concentração de 100 µg/mL. O 4-*O*-α-L-raminopiranosídeo do ácido elágico também foi testado, causando 80 % de inibição do crescimento do fungo a 100 µg/mL.

Tabela 9-10- Atividade de substâncias de *S. densiflora* e *V. polygama* sobre o crescimento do fungo *L. gongylophorus*

Substância (50 µg/mL)	% inibição crescimento fungo
ácido gálico	0
castalagina	0
casuarinina	0
ácido arjunólico	40
ácido siríngico	0
6β-hidroxiimaslinato de β-D-glucopiranosila	20
orientina + isoorientina	20
luteolina	40
cafeoil-6- <i>O</i> -α + β-D-glucopiranosídeo	60
ácido 2α,3α,19α-triidroxiurs-12-en-28-óico	40

Das substâncias testadas (Tabela 9-10), nenhuma apresentou atividade satisfatória, visto que já são conhecidas substâncias mais potentes, como o siringaldeído e ácido vanílico, que provocaram 80 % de inibição do crescimento deste fungo a uma concentração de 50 µg/mL (GODOY, 2002). A mesma referência relata que o lupeol, constituinte da fração DMFS, a uma concentração de 60 µg/mL, não inibiu o crescimento do fungo.

9.5.10. Atividade de *S. densiflora* e *V. polygama* sobre microrganismos

Somente os extratos hidrometanólicos de caule, galho, folha e casca da raiz de *S. densiflora* foram testados, devido haver material suficiente. O extrato HMSF produziu uma atividade extremamente intensa (halo 11 mm), sendo mais ativo que o antibiótico controle (10 e 12 mm) para as bactérias *P. aeruginosa* e *M. roseus*. Todos os extratos causaram 50 % de inibição sobre o *S. aureus*. Estas bactérias têm a tendência de formar cepas resistentes com muita facilidade (Figura 9-18; Figura 9-19; Figura 9-20). Devido a estas significativas atividades, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos sobre alguns dos microrganismos (Tabela 9-12). As concentrações dos extratos usadas neste teste foram de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,3 µg/mL. A atividade antifúngica não se mostrou significativa (Tabela 9-11). De todas as substâncias testadas (Tabela 9-10), a 50 µg/disco, a única que apresentou atividade significativa sobre bactérias (*S. aureus*) foi o ácido gálico, causando um halo de inibição de 15 mm, enquanto que o halo da tetraciclina é de 26 mm.

As atividades antimicrobianas dos taninos são bem documentadas (CHUNG et al., 1998), sendo possível que aqueles que não foram testados sejam os responsáveis pela atuação antimicrobiana significativa dos extratos. Além disso, flavonóides também podem apresentar ação antibacteriana. A quercitrina demonstrou atividade antidiarrêica causada por bactérias (HARBORNE & WILLIAMS, 2000) e também atividade antiinflamatória. De acordo com LI et al. (2002), a quercetina (CI₅₀ 40 µM), o raminopiranosídeo do ácido elágico (CI₅₀ 16,7 µM), ácido elágico (CI₅₀ 66 µM),

ácido arjunólico (CI_{50} 56 μ M) e ácido ursólico (CI_{50} 83 μ M) são inibidores da enzima ácido graxo sintase (presente na membrana celular de bactérias), podendo atuar como bactericidas ou bacteriostáticos, porém o ácido arjunólico e os flavonóides luteolina e orientina e isômero foram inativos, na concentração de 50 μ g/disco, sobre as bactérias testadas. Os taninos geraniina e galogeraniina, taninos elágicos, apresentaram atividade contra *Herpes simplex* (50 μ g/mL), mas não foram ativos contra as bactérias *Enterobacter aeruginosa* e *Proteus vulgaris* (500 μ g/mL) nem sobre outros fungos testados (CORTHOOUT et al., 1991). Xilopiranosídeos do ácido elágico foram citotóxicos a cepas de leveduras com CI_{50} de 3,1 e 1,1 μ M (DENG et al., 2002).

Tabela 9-11- Diâmetro dos halos (mm) de inibição dos microrganismos em presença dos extratos hidrometanólicos de *S. densiflora*

Extratos	Microrganismos								
	Tc	Bc	Ec	Pa	Mr	Sa	Ca	Cl	Sc
HMSC	8	9	9	8	9	13	0	0	0
HMSCr	10	9	9	8	10	11	0	0	0
HMSF	9	11	11	11	11	11	0	0	0
HMSG	7	9	9	9	10	14	0	0	0
Control	32	22	24	10	12	22	20	24	25

Concentração dos extratos = [1000 μ g/disco]. Concentração do antibiótico utilizado como controle: tetraciclina = 20 μ g/disco (*B. cereus* = Bc; *E.coli* = Ec; *P. aeruginosa* = Pa; *M. roseus* = Mr ; *S. aureus* = Sa); e nistatina = 20 μ g/disco (*C. albicans* = Ca; *C. laurentii* = Cl; *S. cerevisiae* = Sc; e *T. cutaneum* = Tc).

Tabela 9-12- Determinação da MIC ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hidrometanólicos de *S. densiflora* sobre alguns microrganismos

Extratos	Microrganismos				
	Bc	Ec	Pa	Mr	Sa
HMSC	> 1000	> 1000	< 31,3	> 31,3	> 250
HMSCr	> 1000	> 1000	< 31,3	> 31,3	> 250
HMSF	> 1000	> 1000	< 31,3	> 125	> 250
HMSG	> 1000	> 1000	< 31,3	> 125	> 250

Obs: Houve inibição nos microrganismos Bc e Ec, porém lenta.

MIC Tetraciclina $\mu\text{g/mL}$: Bc = 1,8; Sa e Ec = 3,7; Pa = 12,5

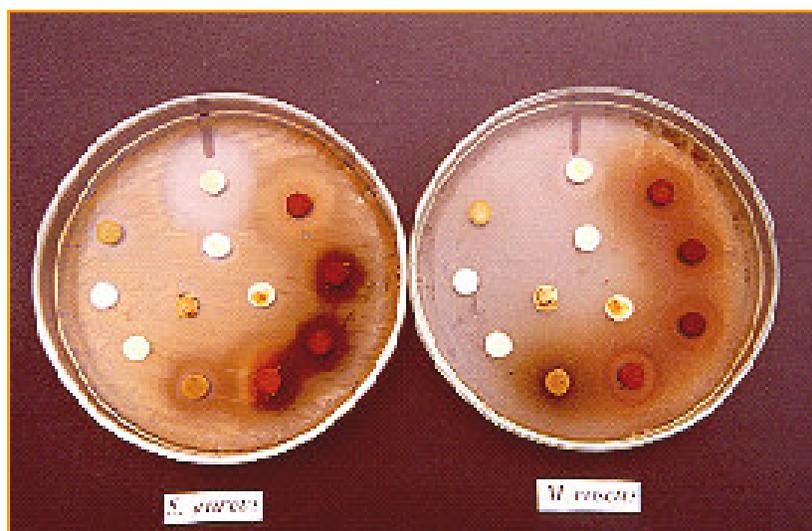


Figura 9-18- Método de difusão em ágar com discos de papel de filtro contaminados com extratos de *S. densiflora* para determinação de atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e *M. roseus*

Sentido horário, iniciando no primeiro disco vermelho: HMSG, HMSC, HMSCr e HMSF

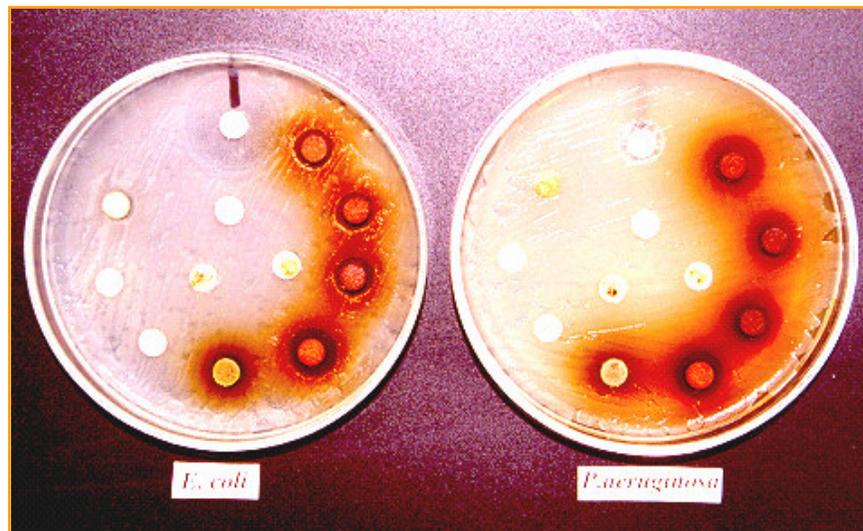


Figura 9-19- Método de difusão em ágar com discos de papel de filtro contaminados com extratos de *S. densiflora* para determinação de atividade antimicrobiana sobre *E. coli* e *P. aeruginosa*

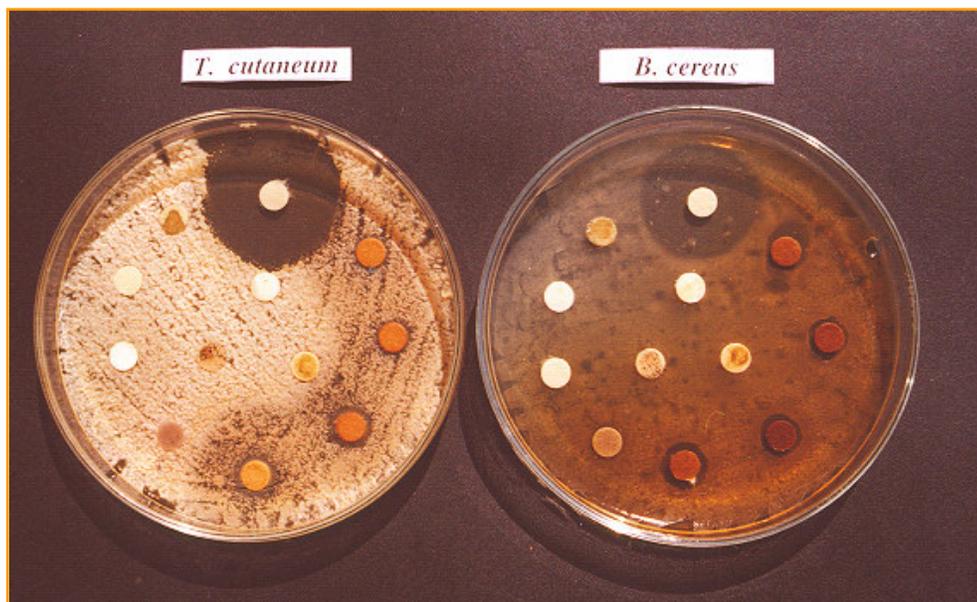


Figura 9-20- Método de difusão em ágar com discos de papel de filtro contaminados com extratos de *S. densiflora* para determinação de atividade antimicrobiana sobre *T. cutaneum* e *B. cereus*

Sentido horário, iniciando no primeiro disco vermelho: HMSG, HMSC, HMSCr e HMSF

9.5.11. Atividade de *S. densiflora* e *V. polygama* sobre a enzima pectinase

De acordo com os resultados expostos na Tabela 9-13, o extrato mais ativo de *S. densiflora*, o HMSCr, só causou 29 % de inibição enzimática. As substâncias testadas, com exceção do tanino β -pedunculagina que resultou 60 % de inibição, apresentaram a mesma tendência, sendo praticamente inativas ou aumentando a atividade enzimática, como ocorreu com as duas substâncias glicosiladas ensaiadas. Este fato pode ser explicado pela capacidade da enzima pectinase de hidrolisar ligações glicosídicas não só de polissacarídeos, mas também de outros compostos como flavonóides glicosilados e derivados glicosilados do ácido elágico (VERSARI et al., 1997).

Quanto aos resultados dos testes realizados com os taninos e cada reagente do ensaio bioquímico, visualmente não ocorreu precipitação nem turvação das soluções reagentes; os testes com o tampão e a pectina não produziram mudanças na densidade ótica em relação ao controle; no entanto, foi constatado um aumento significativo da densidade ótica no teste da casuarinina e castalagina com a enzima (análise estatística pelo Teste t-student 95 %), o que indica que a pectinase provavelmente está causando hidrólise destas substâncias, mas não totalmente, pois elas continuam parcialmente ativas (ou seus produtos de hidrólise), fato corroborado pelas suas atividades inibitórias de 28 e 4 % respectivamente (Tabela 9-13). No teste da enzima com a β -pedunculagina houve aumento da densidade ótica, porém não muito significativo. Entretanto, no teste da pedunculagina e casuarinina com o ADNS, foi observado um aumento significativo da densidade ótica. Este resultado mascara a leitura real do ensaio, apontando uma atividade inexistente para a enzima, invalidando, assim, o efeito dos taninos ensaiados sobre a pectinase.

Tabela 9-13- Atividade de extratos e substâncias de *S. densiflora* e *V. polygama* sobre a enzima pectinase

Extrato/Substância	P	Concentração mM	% atividade da pectinase
HMSC	0,002	0,67 mg/mL	73*
HMSG	0,38	0,67 mg/mL	103
HMSCr	0,0005	0,67 mg/mL	71*
HMSF	0,91	0,67 mg/mL	100
ácido gálico	0,05	4	105
ácido arjunólico	0,11	1,4	104
6 β -hidroximaslinato de β - D-glucopiranosila	0,02	1,0	105 [#]
ácido siríntrico	0,2	3,4	97
orientina+isoorientina	0,34	1,5	96
ácido 2 α ,3 α ,19 α - trihidroxiurs-12-en-28-óico	0,11	1,4	95
cafeoil-6-O- α + β -D- glucopiranosídeo	0,02	1,9	108 [#]
castalagina	0,001	0,7	96
casuarinina	0,001	0,7	72*
4-O- α -L- raminopiranosídeo do	0,003	1,5	85*
ácido elágico			
B-pedunculagina	< 0,001	0,9	40*

*Teste estatístico t-student 95 %: atividade inibitória enzimática significativa em relação ao controle

[#]Teste estatístico Mann Whitney 95 %: aumento significativo da atividade enzimática em relação ao controle

Valores de P < 0,05 foram considerados significativamente diferentes do controle

9.5.12. Atividade dos taninos sobre as enzimas GAPDH e APRT

Depois de todos os testes realizados para verificação de possíveis reações ou interferências dos taninos com as enzimas e os outros reagentes dos ensaios bioquímicos, não se constatou nenhuma alteração significativa na absorção de luz UV (máximo de 0,004 abs) ao serem efetuadas as misturas dos taninos com os reagentes, conforme detalhado no procedimento. Os taninos castalagina e casuarinina apresentaram bandas de absorção na mesma região do NADH (Figura 9-21), mas na concentração testada no ensaio, este fato não produziu alteração na leitura final. Tais observações nos foram suficientes para validar os testes dos taninos casuarinina, castalagina e raminopiranosídeo sobre a GAPDH e castalagina e casuarinina sobre a APRT.

Tabela 9-14- Atividade dos taninos sobre as enzimas GAPDH (controle positivo, chalepina $CI_{50} = 64 \mu M$) e APRT

Substância	Concentração	% inibição	
	μM	GAPDH	APRT
castalagina	7,5	50	
	3,3		50
casuarinina	1,8	50	50
4-O- α -L-	239	86	
raminopiranosídeo	119	33,5	*
do ácido elágico			

* absorveu no mesmo comprimento de onda da reação produzindo alteração na leitura (259 nm, Figura 9-21)

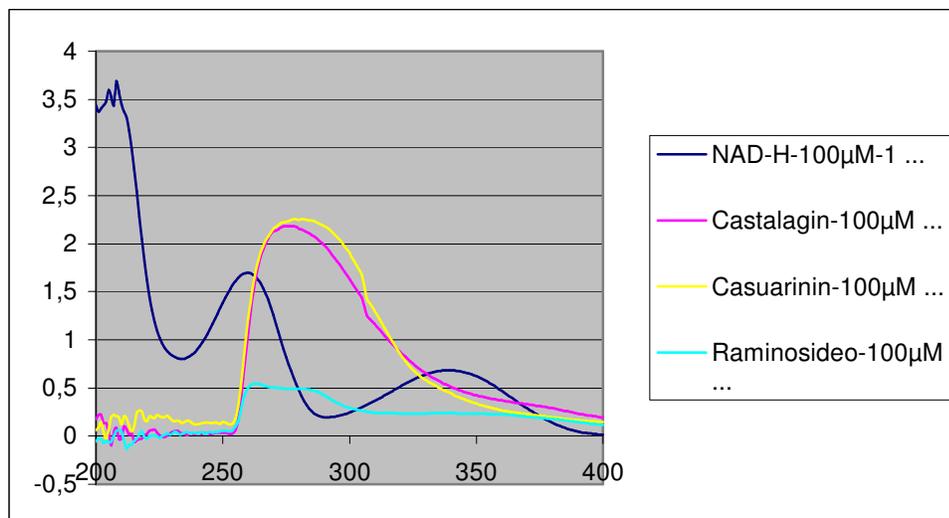


Figura 9-21- Espectro de absorção do NADH, castalagina, casuarinina e 4-O- α -L-raminopiranosídeo do ácido elágico

Densidades para soluções na concentração de 100 μ M numa cela de 1 cm de caminho óptico

Tendo a casuarinina apresentado uma Cl_{50} menor do que a da castalagina sobre ambas enzimas, pode se levantar a hipótese, em relação à estrutura-atividade, que o grupo galoiil separado da parte HHDP, na casuarinina, seja o responsável pela sua maior atividade. A pequena atuação do ramnoperanosídeo (Tabela 9-14) e do ácido gálico (Tabela 9-4), mas não a atuação do ácido elágico, reforça a conclusão de KASHIWADA et al. (1992) sobre quanto maior o número de grupos galoiil e de hidroxilas fenólicas na estrutura do tanino, mais potente este se mostra frente às enzimas testadas, porém esta afirmativa só é válida para monômeros. Eles também afirmam que a C-glicosilação não aumenta a atividade em comparação com os outros taninos. Porém, quanto maior a estrutura do tanino, mais distante se encontra de ser classificado como um inibidor competitivo (que se liga à enzima no mesmo sítio catalítico que o substrato), já que sua molécula é muito grande para interagir especificamente com o sítio ativo das enzimas em questão. Muitos fármacos eficazes atuam como inibidores competitivos. No entanto, os taninos podem estar agindo como inibidores não competitivos, se ligando em diferentes domínios da enzima (sítios alostéricos) provocando alterações na sua conformação, e conseqüentemente no sítio ativo, que podem impedir e/ou dificultar a interação com o substrato (MURRAY et al., 1993). Segundo QUIDEAU & FELDMAN (1996), a estrutura rígida dos

elagitaninos, proveniente da ligação bifênol, pode lhes proporcionar uma plataforma tridimensional bem definida capaz de fornecer *loci* potenciais de ligações hidrogênio e resíduos hidrofóbicos para uma enzima alvo.

A literatura relata que os taninos podem ter atividade seletiva sobre as enzimas, como por exemplo, a casuarinina e stachyurina apresentaram baixa inibição enzimática sobre a enzima Proteína Quinase C, enquanto a pedunculagina foi muito ativa, com uma CI_{50} de 4 μ M (KASHIWADA et al., 1992). A telimagrandina II, pedunculagina, vescalagina/castalagina são inibidores potentes da DNA topoisomerase II humana, tendo valores de CI_{100} entre 200 a 500 nM, sendo de 100 a 250 vezes mais potentes que o etoposídeo. Reforçando o interesse que esta classe de substâncias tem suscitado como potentes agentes anticancerígenos, a castalagina/vescalagina causaram citotoxicidade seletiva em células humanas do tumor sólido (melanoma RPMI-7951) com EC_{50} de 0,09 e 0,84 μ M (QUIDEAU & FELDMAN, 1996). A casuarinina e a 1-*O*-galoil-castalagina apresentaram efeito citotóxico sobre células HL-60 da leucemia humana, a partir da indução de apoptose daquelas, com uma CI_{50} de 10,8 e 12,5 μ M respectivamente (YANG et al., 2000).

10. Conclusões

O estudo fitoquímico de *V. polygama* Cham. revelou várias substâncias não identificadas em estudos anteriores, como os ecdisteróides shidasterona, stachysterona B e polipodina B, além de alguns flavonóides polimetoxilados. O relato das flavonas di-C-glicosiladas schaftosídeo, carlinosídeo e isômeros é inédito para o gênero *Vitex*.

A *Siphoneugena densiflora* Berg foi a primeira espécie do gênero a ser submetida à pesquisa fitoquímica, bem como a ensaios biológicos e bioquímicos. Todas as substâncias identificadas foram de suma importância taxonômica, chamando-se a atenção para os taninos elágicos C-glicosídicos castalagina e casuarinina, um dos tipos característicos de taninos da ordem Myrtales para o gênero *Eugenia* (OKUDA et al., 2000), do qual o gênero *Siphoneugena* foi segregado; os ramnopiranosídeos derivados do ácido elágico, encontrados em várias outras famílias, porém em Myrtaceae somente no gênero *Eucalyptus* até o presente momento, anexando grande valor taxonômico (YAZAKI & HILLIS, 1976; HILLIS & YAZAKI, 1973; KIM et al., 2001); os triterpenos pentacíclicos, muito abundantes no gênero *Eugenia* (JUNGES, 1994); o flavonol quercetina, presente em 88 % das espécies de *Eugenia* do Novo Mundo, segundo HARON et al. (1992), e seus derivados glicosilados simples, que acompanham as características morfológicas primitivas da família; e a siphoneugenina, como o primeiro representante contendo um novo tipo de aglicona para os taninos hidrolisáveis.

A espectrometria de massas demonstrou ser uma ferramenta imprescindível na identificação das substâncias, principalmente nas misturas de flavonóides e taninos. Além disso, o uso desta técnica, juntamente com a RMN ¹H, foi fundamental para a monitoração de amostras contendo taninos, visto que nem sempre se conseguiu resolução satisfatória na CCDA para a distinção entre substâncias puras ou misturas.

A inatividade biológica ou bioquímica de um extrato não pode ser levada em consideração para a busca de uma substância ativa, pois podem existir compostos antagônicos que interferem nos ensaios. Tal fato ocorreu com vários extratos, como por exemplo com a fração diclorometânica do extrato metanólico de folhas de *V. polygama*, o qual se mostrou inicialmente inativo sobre a enzima GAPDH, que forneceu a mistura de flavonóides 3-O + 4'-O-β-D-glucopiranosilquercetina e o 3-metoxiquercetina, com CI_{50} de 20 e 36 μM, respectivamente.

É esperado que os inibidores sejam seletivamente efetivos com afinidades na escala de nanomolar para enzimas, mas também afetem o crescimento dos tripanosomas na escala de micromolar (OPPERDOES & MICHELS, 2001). Em geral, as substâncias submetidas aos ensaios biológicos e bioquímicos não apresentaram resultados que justifiquem estudos posteriores, pois suas atividades se deram em concentrações relativamente altas. Exceção para a atuação dos taninos casuarinina e castalagina sobre as enzimas GAPDH e APRT e para o ácido 2α,3α,19α-triidroxiurs-12-en-28-óico, o qual causou 85 % de lise das formas tripomastigotas (0,5 mM), atuação próxima da violeta genciana (0,6 mM = 100 %; CI_{50} = 76 μM), porém a atividade foi reduzida para 16 % a uma concentração de 0,2 mM. Por isso, esta substância poderia ser usada como líder na busca de compostos mais ativos.

A análise quantitativa da 20-hidroxiecdisona (20E), no extrato metanólico de galhos de *V. polygama*, usando-se CLAE nas condições especificadas na metodologia, mostrou ser uma técnica rápida e eficiente.

A fase estacionária fenil/hexil Luna 10 μ, em conjunto com a fase móvel H₂O/MeOH, no modo reverso, comprovou ser uma fase bem seletiva para a 20E presente no extrato de galhos, com a vantagem de não ser necessária a adição de modificadores para o ajuste de pH nem o uso de tampões.

A quantidade de 20-hidroxiecdisona presente nos galhos, 0,27 % da matéria seca, justifica a exploração comercial da planta tanto para a preparação de

extratos, pílulas do material seco, quanto como fonte para a obtenção da 20E pura, levando-se em conta o alto valor agregado que a substância acumula.

Os taninos castalagina e casuarinina, ao contrário do que está constatado na literatura (YOSHIDA et al., 1991), podem sofrer solvólise em condições brandas, com mudança de configuração no C-1, dependendo do tempo que ficam submetidos a tais condições (37°C e pH ligeiramente ácido, porém num tempo maior que 100 h).

11.Perspectivas

Dar continuidade ao estudo fitoquímico dos extratos das folhas de *S. densiflora* para a identificação das substâncias ativas sobre as bactérias, trabalho que já vem sendo realizado pelo aluno de iniciação científica Fernando Cotinguiba.

Submeter a substância 20-hidroxiecdisona ao ensaio de ingestão com a formiga *Atta sexdens rubropilosa* para verificação da sua atividade inseticida (foi submetida, mas não foi tóxico às formigas na concentração de 1mg/mL).

Realizar pesquisas para o desenvolvimento de meios de propagação e germinação das sementes de *V. polygama* com o objetivo de se obter mudas, visando uma plantação e cultivo em larga escala para a sua exploração comercial, já que a parte explorada será composta inicialmente pelos galhos, os quais podem ser retirados da planta sem ter de matá-la.

Efetuar estudos comparativos entre as técnicas de recristalização e cromatografia planar com o intuito de se identificar os métodos de extração e purificação que proporcionam melhor rendimento da 20-hidroxiecdisona.

Os resultados dos ensaios com as enzimas GAPDH e APRT deveriam ser submetidos a tratamentos estatísticos para apresentarem maior confiabilidade e teor científico. Além disso, todas as substâncias deveriam ter suas CI_{50} calculadas para futuros estudos de estrutura-atividade.

Verificar a atividade de várias substâncias sobre o *Trypanosoma brucei* e sobre a enzima Tripanotiona redutase, que atua como principal e única via de proteção do *T. cruzi* contra a oxidação (foi verificada e já se encontra em fase de publicação).

Foram deixadas várias misturas de triterpenos e ecdisteróides com a aluna Elaine Cabral para o desenvolvimento de métodos de análise dos mesmos em CLAE acoplado ao espectrômetro de massas.

Foram deixadas amostras de várias das substâncias identificadas com a aluna Richelle Priscila Severino para serem testadas nas enzimas cisteíno proteases, envolvidas em processos patológicos diversos.

12.Referências bibliográficas

ABOTT, A. "Nutrient dynamics of ants". IN: *Production Ecology of Ants and Termites*. BRIAN, M. V. Cambridge University Press, 1978. Apud PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. *Ecologia Nutricional de Insetos e Suas Implicações no Manejo de Pragas*. Manole LTDA, 1991. 210 p.

ADEWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; MURPHY, N. & WANDO, J. "Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties". *J. Ethnoph.*, **77**: 19-24, 2001.

AGRAWAL, P.K. (Editor). *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Amsterdam, Elsevier, 1989. 564p.

AHMAD, V. U. & RAHMAN, A. U. *Handbook of Natural Products Data - vol. III. Pentacyclic Triterpenoids*. Amsterdam, Elsevier, 1994. p. 24.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.

ARAUJO, M. S. S.; MARTINS, O. A.; PEREIRA, M. E. S. & BRENER, Z. "A combination of benzimidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease". *J. Antimicrobial Chemot.*, **45** (6): 819-824, 2000.

ARRAMON, G.; SAUCIER, C.; COLOMBANI, D. & GLORIES, Y. "Identification of triterpenes saponins in *Quercus robur* L. and *Q. petraea* Liebl. heartwood by LC-ESI/MS and NMR." *Phytochemistry Anal.*, **13**: 305-310, 2002.

ARRUDA, A. C. *Flavonóides de Neoraputia Alba (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1990. Tese de Doutorado, 211 p.

ASAMI, Y.; OGURA, T.; OTAKE, N.; NISHIMURA, T.; XISHENG, Y.; SAKURAI, T.; NAGASAWA, H.; SAKUDA, S. & TATSUTA, K. "Isolation and synthesis of a new bioactive ellagic acid derivative from *Combretum yunnanensis*". *J. Nat. Prod.*, **66**: 729-731, 2003.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; HOWARTH, O. W.; PEREIRA, N. S. & VELOSO, D. P. "Chemical study of the leaves of *Vitex polygama*". *Fitoterapia*, **66** (3): 279-280, 1995.

BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S. & SILVA, M. L. A. "Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*". *Planta Medica*, **65**: 541-544, 1999.

BÁTHORI, M. "Purification and characterization of plant ecdysteroids of *Silene* species". *TrAC Trends Anal. Chem.*, **17** (6): 372-383, 1998.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. & TURCK, M. "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method". *Am. J. Clin. Pathology*, **45** (4): 493-496, 1966.

BERNAYS, E. A. & WOODHEAD, S. "Incorporation of dietary phenols into the cuticle in the tree locust *Anacridium melanorhodon*". *J. Insect Physiol.*, **28**: 601-606, 1982.

BERNAYS, E. A. & CHAPMAN, R. F. *Host-Plant Selection by Phytophagous Insects*. New York, Chapman & Hall, 1994. p. 25-60.

BESSON, E.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J.; MARKHAM, K. R.; KIM, M.; KOH, H. & FUKAMI, H. "C-glycosylflavones from *Oryza sativa*". *Phytochemistry*, **24** (5): 1061-1064, 1985.

BIDLINGMEYER, B. A. *Practical HPLC Methodology and Applications*. New York, John Wiley & Sons Inc., 1992. 452p.

BOURDY, G.; DEWALT, S. J.; MICHEL, L. R. C.; ROCA, A.; DEHARO, E.; MUÑOZ, V.; BALDERRAMA, L.; QUENEVO, C. & GIMENEZ, A. "Medicinal plants uses of the Tacama, an Amazonian Bolivian ethnic group". *J. Ethnoph.*, **70**: 87-109, 2000.

BRADFORD, M. M. "Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding". *Analytical Biochem.*, **72** (1-2): 248-254, 1976.

BREITMAIER, E. & VOELTER, W. *Carbon 13 NMR Spectroscopy*. Weinheim, VHC, 1987. 515p.

BREITMAIER, E. *Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry*. New York, Wiley, 1993. 265p.

BRENER, Z. "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **4** (6): 389, 1962.

BRIESKORN, V. C. H. & RIDEL, W. "Flavonoide aus *Coleus amboinicus*". *Planta Medica*, **31**: 308-310, 1977.

BRIQUET, J. "Verbenaceae". IN: *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. ENGLER, A. & PRANTL, K. (Eds.). Leipzig, Engelmann, **4** (3a), 1895. p. 132-182.

BRITO, N. R. S. Perfil Químico de Famílias de Angiospermas. Volume II. São Paulo – USP, 1986. Tese de Doutorado.

CANNATA, J. B.; VALLE, E.; DOCAMPO, R. & CAZULLO, J. "Subcellular localization of phosphoenolpyruvate carboxykinase in trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*". *J. Mol. Biochem. Parasitol.*, **6** (3): 151-160, 1982.

CANTINO, P. D.; HARLEY, R. M. & WAGSTAFF, S. J. "Genera of Labiateae: status and classification". IN: *Advances in Labiateae Science*. HARLEY, R. M. & REINOLDS, T (Eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, 1992. p. 511-522.

CARDELLINA, J. H. "Step gradient elution in gel permeation chromatography: a new approach to natural products separations". *J. Nat. Products*, **46**: 196-199, 1983.

CASS, Q. B. & DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*. São Carlos, Editora da UFSCar, 2001. 77p.

CHARLTON, A. J.; BAXTER, N. J.; KHAN, M. L.; MOIR, A. J. G.; HASLAM, E.; DAVIES, A. P. & WILLIAMSON, M. P. "Polyphenol/peptide binding and precipitation". *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 1593-1601, 2002.

CHAWLA, A. S.; HANDA, S. S. & DHAR, K. L. "A lignan from *Vitex negundo* seeds". *Phytochemistry*, **31** (12): 4378-4379, 1992a.

CHAWLA, A. S.; SHARMA, A. K. & HANDA, S. S. "Chemical investigation and anti-inflammatory activity of *Vitex negundo* seeds". *J. Nat. Products*, **55**: 163-167, 1992b.

Chemical Abstracts, 12th collective index. Vol. 106-115, Formulas C₄H₂C₁₂N₂O₂-C₆H₁₁O₇P, 1987-1991.

CHERRET, J. M. "The biology pest status and control of leaf-cutting ants". *Agric. Zool. Rev.*, **178**: 945-950, 1995.

CHIAPPINI, I.; FARDELLA, G.; MENGHINI, A. & ROSSI, C. "Flavonoids from *Dittrichia viscosa*". *Planta Medica*, **44**: 159-161, 1982.

CHUNG, K.; WONG, T. Y.; WEI, C. Y.; HUANG, Y. Y. & LIN, Y. Y. "Tannins and human health: a review". *Crit. Rev. in Food Science and Nut.*, **38** (6): 421-464, 1998.

CINTRA, P.; MALASPINA, O.; PETACCI, F.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; VIEIRA, P. C. & SILVA, M. F. G. F. da. "Toxity of *Dimorphandra mollis* to workers of *Apis mellifera*". *J. Braz. Chem. Soc.*, **13**: 115-118, 2002.

CLARKSON, A. B. & BROHN, F. H. "Trypanosomiasis: an approach by chemotherapy by the inhibition of carbohydrate metabolism ". *Science*, **194**: 204-206, 1976.

CORREA, P. M. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. 2^a ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura-IBDF, 1984. v. IV. p. 208.

CORTHOUT, J.; PIETERS, L. A.; CLAEYS, M.; VANDEN BERGHE, D. A. & VLIETINCK, A. J. "Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*". *Phytochemistry*, **30**: 1129-1130, 1991.

CRAVEIRO, A. A. & MACHADO, M. I. L. "De aromas, insetos e plantas". *Ciência Hoje*, **4** (23): 54-63, 1986.

DAVIDSON, B. S.; EISNER, T.; WITZ, B. & MEINWALD, J. "Defense mechanisms of arthropods No. 87. Defensive secretion of the carabid beetle *Pasimachus subsulcatus*". *J. Chem. Ecol.*, **15** (6): 1689-1697, 1989.

DAYRIT, F. M.; LAPID, M. R. G.; CAGAMPANG, J. V. & LAGURIN, L. G. "Phytochemical studies on the leaves of *Vitex negundo*, L. ("Lagundi") I. Investigation of the bronchial relaxing constituents". *Philipp. J. Science*, **116** (4): 403-410, 1987.

DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L. & PINTO, A. V. "Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study". *J. Braz. Chem. Soc.*, **12** (3):325-338, 2001.

DENG, J.; MARSHALL, R.; JONES, S. H.; JOHNSON, R. K. & HECHT, S. M. "DNA-damaging agents from *Crypteronia paniculata*". *J. Nat. Products*, **65**: 1930-1932, 2002.

Doença de Chagas: banco de dados. <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTest>. Acesso em: 15 nov. 2003.

DOU, H.; ZHOU, Y.; CHEN, C.; PENG, S.; LIAO, X. & DING, L. "Chemical constituents of the aerial part of *Schnabelia tetradonta*". *J. Nat. Products*, **65**: 1777-1781, 2002.

DUTTA, P. K.; CHOWDHURY, U. S.; CHAKRAVARTY, A. K.; ACHARI, B. & PAKRASHI, S. C. "Nishindaside, a novel iridoid glycoside from *Vitex negundo*". *Tetrahedron*, **39** (19): 3067-3072, 1983.

ELLIGER, C. A. & WEISS JR., A. C. "Insect growth inhibitors from *Petunia* and other solanaceous plants". IN: *Insecticides of Plant Origin*. ARNSON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R. & MORAND, P. (Eds.). Washington, Amer. Chem. Soc., 1989. p. 188-205.

ELOFF, J. N. "A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria". *Planta Medica*, **64** (8): 711-713, 1998.

EL-SHERBEINY, A. E. & SALEH, N. A. M. "Local plants as potencial sources of tannins in Egypt. IX: tanning experiments". *Leather Science (MADRAS)*, **21**: 313-315, 1974.

FANG, S. D.; WANG, L. K. & HECHT, S. M. "Inhibitors of DNA topoisomerase I isolated from the roots of *Zanthoxylum nitidum*". *J. Org. Chem.*, **58** (19): 5025-5027, 1993.

FELDMAN, K. S. & SMITH, R. S. "Ellagitannin chemistry. First total synthesis of the 2,3- and 4,6-coupled ellagitannin Pedunculagin". *J. Org. Chem.*, **61**: 2606-2612, 1996.

FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G. & VIEIRA, P. C. "Produtos Naturais no Controle de Insetos (série de textos da Escola de Verão em Química, vol. III)". São Carlos, EdUFSCar, 2001. 176 p.

FOUCAULT, A.P. "Counter-current Chromatography". *Analytical Chem.*, **63** (10): 569-579, 1991.

FURUYA, T.; ORIHARA, Y. & HAYASHI, C. "Triterpenoids from *Eucalyptus perriniana* cultured cells". *Phytochemistry*, **26** (3): 715-719, 1987.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. P. R.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B. & VENDRAMIM, J. D. *Manual de Entomologia Agrícola*. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda, 1988. p. 376-379.

GARCIA, C. F.; FERNANDES, F. P.; SILVA, M. F. G. F. da; CARVALHO, S. A.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, E. & OLIVA, G. "Flavones from *Citrus sinensis* x *C. limonea* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities". *22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products*, São Carlos-São Paulo, 2000.

GIBBS, R. D. *Chemotaxonomy of Flowering Plants*. Vol I-IV. Montreal, McGill-Queen's University Press. 1974.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 6^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 1983. p. 937-945.

GINER, F. J. A.; CASTILLO, J. B.; FERRERO, M. T. M.; RECINOS, S. P. & LUIS, F. R. "Compuestas salvadoreñas III. Componentes de la *Baccharis trinervi persoon*". *Rev. Latinoamer. Quím.*, **13**: 47-49, 1982.

GODOY, M. F. P. *Atividade de Extratos Vegetais e seus Derivados sobre o Crescimento do Fungo Simbionte de **Atta sexdens** L. e de outros microrganismos*. Rio Claro, Instituto de Biociências – UNESP, 2002. Dissertação de Mestrado, 140 p.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. & MABRY, C. H. *The Flavonoids, Part I*. N. York, Academic Press, 1975. 631 p.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 2nd ed. London, Chapman & Hall Ltd, 1988. 288p.

HARBORNE, J. B. & WILLIAMS, C. A. "Advances in flavonoid research since 1992". *Phytochemistry*, **55**: 481-504, 2000.

HARON, N. W.; MOORE, D. M. & HARBORNE, J. B. "Distribution and taxonomic significance of flavonoids in the genus *Eugenia* (Myrtaceae)". *Biochem. Syst. Ecology*, **20** (3): 266-268, 1992.

HASLAM, E.; HAWORTH, R. D.; MILLS, S. D.; ROGERS, H. J.; ARMITAGE, R. & SEARLE, T. "Gallotannins. Part II. Some esters depsides of gallic acid". *J. Chem. Soc.*, 1836-1842, 1961.

HENKE, H. *Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20*. Heidelberg, Huthig, 1995. 617p.

HERNÁNDEZ, M. M.; HERASO, C.; VILLARREAL, M. L.; VARGAS-ARISPURO, I. & ARANDA, E. "Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae)". *J. Ethnopharmacology*, **67** (1): 37-44, 1999.

HIROBE, C.; QIAO, Z.; TAKEYA, K. & ITOKAWA, H. "Citotoxic flavonoids from *Vitex agnus-castus*". *Phytochemistry*, **46** (3): 521-524, 1997.

HOSTETTLER, F.; BOREL, E. & DEUEL, H. "Über die reduction der 3, 5-dinitrosalicylsäure durch zucker". *Helv. Chim. Acta*, **34**: 2132-2139, 1951.

HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMAN, A. & MARSTON, A. *Preparative Chromatography Techniques: Applications in Natural Products Isolation*. Heidelberg, Springer-Verlog, 1986.

<http://ecdybase.org/index.php?&action=products>. The Ecdysose Handbook: banco de dados. Acesso em: 15 mar. 2004.

HUNG, C. & YEN, G. "Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona procumbens* Hemsl.". *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 2993-2997, 2002.

IMAI, S.; MURATA, E.; FUJIOKA, S.; MATSUOKA, T.; KOREEDA, M. & NAKANISHI, K. "Structures of Stachysterone A, the first natural 27-carbon steroid with rearranged methyl group, and Stachysterone B". *J. Am. Chem. Soc.*, **95**: 7510-7512, 1970.

Infectious Disease/Chagas Disease: banco de dados. <http://www.who.com> *Tropical Disease Research*. Genova, Word Health Organization. Acesso em: 25 mar. 2002.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F. *Plant Systematics. A Phylogenetic Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates. 2001.

JUNELL, S. "Zur gynäceummorphologie und systematik der Verbenaceen und Labiateen ". *Symb. Bot. Upsal.*, **1** (4): 1-219, 1934.

JUNGES, M. J. *Estudo dos Constituintes Químicos das Folhas de Eugenia florida D. C. (Myrtaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1994. Tese de Doutorado, 213 p.

KAMINSKY, R. "Miltefosine Zentaris". *Investigational Drugs*, **3** (4): 550-553, 2002.

KASHIWADA, Y.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P. & LEE, K. "Tannins as selective inhibitors of protein kinase C". *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2** (3): 239-244, 1992.

KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. "Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural". *Revista da Agricultura*, **53** (1-2): 68-78, 1978.

KAWASAKI, M. L. *A Família Myrtaceae na Serra do Cipó, Minas Gerais*. São Paulo, Departamento de Botânica – USP, 1984. Dissertação de Mestrado.

KAYSER, O. & KIDERLEN, A. F. "Natural products as potencial antiparasitic drugs". IN: *Studies in Natural Products Chemistry*. ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). UK, Elsevier Science B. V., 2002. v. 26, cht. 12, p. 779-848.

KEMP, W. *NMR in Chemistry: a Multinuclear Introduction*. London, The MacMillan Press LTD, 1986. 240p.,

KHAMBAY, B. P. S.; BACOETY, D.; CAHILL, M. & DENHOLM, I. "Isolation, characterization, and biological activity of naphthoquinones from *Calceolaria andina* L.". *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 770-775, 1999a.

KHAMBAY, B. P. S.; BEDDIE, D. G.; SIMMONDS, M. S. J. & GREEN, P. W. C. "A new insecticidal pyranocyclohexenedione from *Kunzea ericifolia*". *J. Nat. Products*, **62**: 1423-1424, 1999b.

KHANBABAEE, K. & REE, T. V. "Tannins classification and definition". *Nat. Prod. Rep.*, **18**: 641-649, 2001.

KIM, H.; FEIL, I. K.; VERLINDE, C. L. M.; PETRA, P. H. & HOL, W. G. J. "Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site". *Biochemistry*, **34** (46): 14975-14986, 1995.

KIM, J.; LEE, I.; YUN, B.; CHUNG, S.; SHIM, G.; KOSHINO, H. & YOO, I. "Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*". *Phytochemistry*, **57** (4): 587-591, 2001.

KITAGAWA, M. *Ácidos Ramificados de C4 a C7 como Marcadores Sistemáticos de Dicotiledôneas*. São Paulo, Instituto de Química – USP, 1984. Tese de Doutorado, p. 5-74.

KOLDE, T.; NOSE, M.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; YABU, Y. & OHTA, N. "Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds". *Planta Medica*, **64**: 27-30, 1998.

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J. H. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1988. p. 39-83.

KREPINSKY, J.; FINDLAY, J. A.; DANIELI, B.; PALMISANO, G.; BEYNON, P. & MURUKANI, S. "Concerning carbon-13 NMR spectroscopy of 5 β -hydroxylated phytoecdysones". *Organic Mag. Reson.*, **10**: 225, 1977.

KULKARNI, A. D.; MODAK, H. M.; JADHAV, S. J. & KHAN, R. "Preparation and commercial significance of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde: a review". *J. Science Ind. Res.*, **47** (6): 335-339, 1989.

LABBÉ, C.; FAINI, F.; COLL, J. & CONNOLLY, J. D. "Screening of the Chilean native flora in search of natural feeding deterrents". *Book of Abstracts of the 22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products*, São Carlos-São Paulo, 2000. Resumo PPA-003.

LAFONT, R.; MORGAN, E. D. & WILSON, I. D. "Chromatography procedures for phytoecdysteroids". *J. Chrom. A*, **658**: 31-53, 1994.

LARKIN, M.; BRAZIER, J.; TERNAL, B. & POLYA, G. M. "Protein kinase inhibitors in plants of the Myrtaceae, Proteaceae and Leguminosae". *Planta Medica*, **59**: 525-528, 1993.

LATTÉ, K. P. & KOLODZIEJ, H. "Pelargoniins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*". *Phytochemistry*, **54**: 701-708, 2000.

LAURIA-PIRES, I.; BRAGA, M. S.; VEXENATA, A. C.; NITZ, N.; SIMÕES-BARBOSA, A.; TINOCO, D. L. & TEIXEIRA, A. R. L. "Progressive chronic Chagas heart disease ten LEE, M.; NISHIMOTO, S.; YANG, L.; YEN, K.; HATANO, T.; YOSHIDA, T. & OKUDA, T. "Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*". *Phytochemistry*, **44**:1343-1349, 1997.

Leishmaníases: banco de dados. <http://www.who.int/tdr>. Acesso em: 25 ago. 2002.

LEITÃO, S. G.; MELO, F. P. G.; DELLE MONACHE, F.; GONÇALVES, J.L.S. & WIGG, M.D. "Inhibitory activity of *Vitex polygama* extracts against *Herpes simplex type-1*". *Boll. Chim. Farmaceutico*, **136** (2): 121, 1997.

LEITÃO, S. G. & DELLE MONACHE, F. "2"- O-caffeoylorientin from *Vitex polygama*". *Phytochemistry*, **49** (7): 2167-2169, 1998.

LEITÃO, S. G.; FONSECA, E. N. & SANTOS, T. C. "Essencial oils from two brazilian *Vitex* species". *Acta Hort.*, **500**: 89-92, 1999.

LEITÃO, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; PUPO, M. T.; DE MARCHI, A. A.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. da; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V.; SÁ, M. M.; MORAES, V. R. S.; MONTANARI, C. A. "Structure-activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**: 2199-2204, 2004.

LI, X.; JOSHI, A. S.; ELSOHLY, H. N.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; ZHANG, Z.; KHAN, I. A.; FERREIRA, D.; WALKER, L. A.; BROEDEL JR., S. E.; RAULI, R. EFE. & CIHLAR, R. L. "Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation and SAR studies". *J. Nat. Products*, **65**:1909-1914, 2002.

LIO, M.; MORIYAMA, A.; MATSUMOTO, Y.; TAKAKI, N. & FUKUMOTO, M. "Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids by folate compounds and amethopterin". *J. Biol. Chemistry*, **259**: 12-15, 1985.

LOPES, N. P.; CHICARO, P.; KATO, M. J.; ALBUQUERQUE, S. & YOSHIDA, M. "Flavonoids and lignans from *Viola surinamensis* twigs and their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*". *Planta Medica*, **64**: 667-669, 1998.

MAHATO, S. B. & KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features". *Phytochem.*, **37**: 1517-1575, 1994.

MAHATO, S. B. & SEN, S. "Advances in triterpenoid research, 1990-1994". *Phytochemistry*, **44** (7): 1185-1236, 1997.

MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M. R. & HASSAN, A. M. K. "Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves". *Phytochemistry*, **58** (8): 1239-1244, 2001.

MÄMMELÄ, P.; SAVOLAINEN, H.; LINDROOS, L.; KANGAS, J. & VARTIAINEN, T. "Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry". *J. Chrom. A.*, **891**: 75-83, 2000.

MARICONI, F. A. M. *As Saúvas: Insetos Daninhos às Plantas Cultivadas*. 3ª ed. São Paulo, Livraria Nobel, 1974. p. 97-110.

MARKELL, E. K.; JOHN, D. T. & KROTOSKY, W. A. *Parasitologia Médica*. 8ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. p. 115-149.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. "Counter-current chromatography as a preparative tool - applications and perspectives". *J. Chromatography A*, **658**: 315-341, 1994.

MARTINDALE. *The Extra Pharmacopeia*. 20th ed. London, The Pharmaceutical Press, p. 673.

MARTINEZ, S. & ŠTAGLJAR, I. "Correlation between the molecular structure and the corrosion inhibition efficiency of chestnut tannin in acidic solutions". *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **640**: 167-174, 2003.

MATOS, F. J. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, UFC, 1997.

MÉNDEZ, A. M. "Flavonoids de la *Ageratina stevioides* (Steyermark) R. M. King & H. Robinson". *Rev. Latinoam. Quím.*, **19** (2): 47-49, 1988.

MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D. & REICHLING, J. "*In vitro* effect of essential oils and isolated mono e sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*". *Planta Medica*, **66**: 366-368, 2000.

MITTERMEIER, R. A.; WERNER, T.; AYRES, J. M. & FONSECA, G. A. B. "Megadiversidade". *Ciência Hoje*, **14** (81): 20-27, 1992.

MOHRIG, J. R.; MORRIL, T. C.; HAMMOND, C. N. & NECKERS, D. C. *Experimental Organic Chemistry - A Balanced Approach: Macroscale and Microscale*. New York, W.H. Freeman and Company, 1998.

MOLDENKE, H. N. "Materials toward a monograph of the genus *Vitex*". *Phytologia*, **6** (2): 80-89, 1957.

MORAES, V. R. S.; TOMAZELA, D. M.; FERRACIN, R. J.; GARCIA, C. F.; SANNOMIYA, M.; SORIANO, M. P. C.; SILVA, M. F. G. F. da; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, E.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; PIMENTA, E. F.; SOUZA, D. H. F. & OLIVA, G. "Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae)". *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 380-387, 2003.

MORRISON, R. T. & BOYD, R. N. *Química Orgânica*. 5ª ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 1394 p.

MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, C.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMÃO, K.; CASTRO, S. L. & PINTO, A. V. "Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study". *J. Braz. Chem. Soc.*, **12** (3): 325-338, 2001.

MUELLER-HARVEY, I. "Analysis of hydrolysable tannins". *Animal Feed Science Technol.*, **91**: 3-20, 2001.

MULLER, A. H. *Constituintes Químicos de Metrodorea e Pilocarpus: Contribuição à Quimiosistemática de Pilocarpinae*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 1994. Tese de Doutorado, 187p.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. & RODWELL, V. W. *Harper's Biochemistry – A LANGE Medical Book*. 23ª ed. London, Prentice-Hall International-Inc., 1993. p. 61-93.

NAIR, A. G. R.; RAMESH, P.; SUBRAMANIAN, S. S. & JOSHI, B. S. "Rare methylated flavonols from *Angelonia grandiflora*". *Phytochemistry*, **17** (3): 591-592, 1978.

NAWWAR, M. A. M.; HUSSEIN, S. A. M. & MERFORT, I. "NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*". *Phytochemistry*, **36** (3): 793-798, 1994.

NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd Ed. New York, Worth Publishers, 2000. 1152p.

NEVILLE, G. A. "Characterization of di- and trimethoxy-benzaldehydes by analysis of deshielding gradients obtained with Eu(fod)₃ shift reagent". *Org. Mag. Resonance*, **4**: 633-649, 1972.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. & SNADER, K. M. "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002". *J. Nat. Products*, **66**: 1022-1037, 2003.

NIELSEN, S. F.; CHRISTENSEN, S. B.; CRUCIANI, G.; KHARAZMI, A. & LILJEFORS, T. "Antileishmanial chalcones: statistical design, synthesis, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis". *J. Med. Chem.*, **41**: 4819-4832, 1998.

OKETCH-RABAH, H. A.; CHRISTENSEN, S. B.; FRYDENVANG, K.; DOSSAJI, S. F.; THEANDER, T. G.; CORNETT, C.; WATKINS, W. M.; KHARAZMI, A. & LEMMICH, E. "Antiprotozoal properties of 16, 17-dihydrobrachycalixolide from *Vernonia brachycalyx*". *Planta Medica*, **64**: 559-562, 1998.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; KOGA, T.; TOH, N. & KURIYAMA, K. "Circular dichroism of hydrolysable tannins-I. Ellagitannins and gallotannins". *Tetrah. Lett.*, **23**: 3937-3940, 1982.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; ASHIDA, M. & YAZAKI, K. "Tannins of *Casuarina* and *Stachyurus* species. Part I. Structures of Pedunculagin, Casuarictin, Strictinin, Casuarinin, Casuariin, and Stachyurin". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1765-1772, 1983.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T. & HATANO, T. "New Methods of analyzing tannins". *J. Nat. Prod.*, **52**: 1-31, 1989.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T. & HATANO, T. "Correlation of oxidative transformations of hydrolysable tannins and plant evolution". *Phytochemistry*, **55**: 513-529, 2000.

ONO, M.; ITO, Y. & NOKARA, T. "A labdane diterpene glycoside from fruit of *Vitex rotundifolia*". *Phytochemistry*, **48** (1): 207-209, 1998.

OPPERDOES, F. R. & BORST, P. "Localization of 9 glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei* – glycosome". *FEBS Lett.*, **80**: 360-364, 1977.

OPPERDOES, F. R. "Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes". *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**:127-151, 1987.

OPPERDOES, F. R. & MICHELS, P. A. M. "Enzymes of carbohydrate metabolism as potential drug targets". *Inter. J. Parasitol.*, **31**: 482-490, 2001.

PAGNOCCA, F. C.; SILVA, A.; BERALDO, M. J. H.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B. & VIEIRA, P. C. "Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants". *Bull. Entom. Research*, **80**: 349-352, 1990.

PAINULY, P. & TANDOM, J. S. "Two 3-C-methylflavone glycosides from *Eugenia kurzii*". *Phytochemistry*, **22**: 243-245, 1983.

PAULI, G. F. "Higher order and substituent chemical shift effects in the proton NMR of glycosides". *J. Nat. Prod.* **63**: 834-838, 2000.

PAVÃO, F. *Desenho Racional de Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase Glicossomal (gGAPDH) de Trypanosoma cruzi – Agente Causador da Doença de Chagas*. São Carlos, Instituto de Química – USP, 1996. Dissertação de mestrado, 93 p.

PAVÃO, F. *Estudos Cristalográficos e Planejamento Racional de Inibidores Específicos da Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase Glicossomal (gGAPDH) de Trypanosoma cruzi*. São Carlos, Instituto de Química – USP, 2001. Tese de Doutorado, 171 p.

PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C. & OLIVA, G. "Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution". *FEBS Lett.*, **520**: 13-17, 2002.

PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. *Fol. Clin. Biol.*, **20**: 191, 1953.

Pesquisa FAPESP, **53**: 32-35, 2000.

PFEFFER, P. E.; VALENTINE, K. M. & PARRISH, F. W. "Deuterium-induced differential isotope shift ^{13}C NMR. 1. Resonance reassignments of mono- and disaccharides". *J. Am. Chem. Soc.*, **101**: 1265-1274, 1979.

PLAZA, A.; CINCO, M.; TUBARO, A.; PIZZA, C. & PIACENTE, S. "New triterpene glycosides from the stems of *Anomospermum grandiflorum*." *J. Nat. Products*, **66**: 1606-1610, 2003.

PROENÇA, C. "A revision of *Siphoneugena* Berg". *Edinburg. J. Botany*, **47**: 239-271, 1990.

QUIDEAU, S. & FELDMAN, K. S. "Ellagitannin chemistry." *Chem. Rev.*, **96** (1): 475-503, 1996.

QUINLAN, R. J. & CHERRET, J. M. "The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus". *Ecol. Entomol.*, **2**: 161-170, 1979.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. & MELO, L. F. C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". *Quím. Nova*, **27** (5): 771-780, 2004.

RIBEIRO, A. & PILÓ-VELOSO, D. "Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*". *J. Nat. Products*, **60**: 836-838, 1997.

RIZZINI, C. T. & RIZZINI, C. M. *Dicionário Botânico Clássico Latino-Português Abonado*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura (IBDF, Jardim Botânico do Rio de Janeiro), 1983. 283 p.

ROCHA, W. C. *Busca de Substâncias Ativas de Plantas Amazônicas: **Adiscanthus fusciflorus** (Rutaceae), **Trichilia pallida** e **T. rubra** (Meliaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2004. Tese de Doutorado. 248 p.

RODRIGUEZ, H. C. *Efeitos de Extratos Aquosos de Meliaceae no Desenvolvimento de **Spodoptera frugiperda** (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Piracicaba, São Paulo - ESALQ/USP, 1990. Tese de Doutorado, 100 p.

ROITMAN, J. N. & JAMES, L. F. "Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*". *Phytochemistry*, **24** (4): 835-848, 1985.

ROUHJ, A. M. "Rediscovering natural products". *Chem. Engin. News*, **13**: 77-107, 2003.

ROUSSEL, P. G.; TURNER, N. J. & DINAN, L. N. "Synthesis of Shidasterone and the unambiguous determination of its configuration at C-22". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 933-934, 1995.

RUSSEL, K. M.; NOLAN, P. C.; WILKINS, A. L. & HOLLAND, P. T. "Identification of some antibacterial constituents of New Zealand Manuka honey". *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 10-13, 1990.

SAKUSHIMA, A.; COSKUN, M. & MAOKA, T. "Hydroxybenzoic acids from *Boreava orientalis*". *Phytochemistry*, **40**: 257-264, 1995.

SALVAT, A.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y. & GODOY, H. M. "Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity". *Lett. App. Microbiology*, **32**: 293-297, 2001.

SANTIAGO, S. P. C. "Proibidos, mas não tanto". *Ciência Hoje*, **4**(22): 48, 1986.

SANTOS, T. C. *Estudo Químico de Espécies Brasileiras do Gênero Vitex*. Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais - UFRJ, 2000. Tese de Doutorado, Volumes I (190 p.) e II (126 p.).

SARAIVA, V. B.; GIBALDI, D.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; BOZZA, M. T.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. & HEISE, N. "Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*". *Antim. Agents Chemoth.*, **46** (11): 3472-3477, 2002.

SCHEMEDA-HIRSCHMANN, G.; ZÚÑIGA, J.; DUTRA-BEHRENS, M. & HABERMEHL, G. "Xantine oxidase inhibitory activity of flavonoids and tannins from *Hexaclamys edulis* (Myrtaceae)". *Phytoth. Research*, **10**: 260-262, 1996.

SCHNEIDER, M. O.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. & PAGNOCCA, F. C. "Observations on brood care behavior of leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae)". Abstracts of the XX International Congress of Entomology, Foz do Iguaçu-Paraná, Brasil, 2000. p. 895.

SEHGAL, C. K.; TANEJA, S. C.; DHAR, K. L. & ATAL, C. K. "2'-*p*-hydroxybenzoyl mussaenosid acid, a new iridoid glucoside from *Vitex negundo*". *Phytochemistry*, **21** (2): 363-366, 1982.

SEIKEL, M. K.; CHOW, J. H. S. & FELDMAN, L. "The glycoflavonoid pigments of *Vitex lucens* wood". *Phytochemistry*, **5**: 439-455, 1966.

SEPÚLVEDA-BOZA, S. & CASSELS, B. K. "Plant metabolites active against *Tripanosoma cruzi*". *Planta Medica*, **62**: 98-105, 1996.

SERRANO, M. F.; CHIMEO, C. G. & MIRANDA, R. P. "Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera*". *J. Nat. Products*, **62**: 45-50, 1999.

SHIMOMURA, H.; SASHIDA, Y. & ADACHI, T. "Phenylpropanoid glycoside esters from *Prunus buergeriana*". *Phytochemistry*, **27** (2): 641-644, 1988.

SILVA, M. *Estudos de Biologia Molecular e Estrutural da Enzima Adenina Fosforribosil Transferase (APRT) de Leishmania tarentolae*. São Carlos, Instituto de Química – USP, 2001. Dissertação de Mestrado, 120 p.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C. & MORRILL, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5th ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 1991. 419p.

SIMMONDS, M. S. J. "Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition". *Phytochemistry*, **56**: 245-252, 2001.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI Jr., M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. & HEBLING, M. J. A. "Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L". *App. Environm. Microbiol.*, **64**: 4820-4822, 1988.

SLÁMA, K. & LAFONT, R. "Insect hormones – ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates". *Eur. J. Entomol.*, **92**: 355-377, 1995.

SNYDER, L. R.; KIRKELAND, J. J. & GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. New York, John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOUTHWICK, L.; MABRY, T. J.; AVERETT, J. & POWELL, A. M. "Penduletin 4'-methyl ether from *Perityle vaseyi*". *Phytochemistry*, **11**: 2531, 1972.

SOUZA, A. A. & LAVERDE Jr. A. "Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY". *Quím. Nova*, **25**: 1022-1026, 2002.

SOUZA, D. H. F.; GARRAT, E. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V. & OLIVA, G. "Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and target inhibitor design". *FEBS Letters*, **424**: 131-135, 1998.

SPENCER, C. M.; CAI, Y.; MARTIN, R.; LILLEY, T. H. & HASLAM, E. "The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in higher plants part 4; polyphenol interactions part 3. Spectroscopic and physical properties of esters of gallic acid and (S)-hexahydroxydiphenic acid with D-glucopyranose (⁴C₁)". *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 651-660, 1990.

SU, J.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. & NAMIKI, M. "Tannin antioxidants from *Osbeckia chinensis*". *Phytochemistry*, **27** (5): 1315-1319, 1988.

SUKSAMRARN, A. & SOMMECHAI, C. "Ecdysteroids from *Vitex pinnata*". *Phytochemistry*, **32** (2): 303-306, 1993.

TAKEARA, R.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N. P. & LOPES, J. L. C. "Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae, Asteraceae)". *Phytomedicine*, **10**: 490-493, 2003.

TANAKA, T.; ORII, Y.; NONOKA, G.; NISHIOKA, I. & KOUNO, I. "Syzyginins A e B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*". *Phytochemistry*, **45** (6): 1345-1348, 1996.

TANDOM, J. S.; SRIVASTAVA, V. & GURU, P. Y. "Iridoids: a new class leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*". *J. Nat. Products*, **54** (4): 1102-1104, 1991.

TANDON, M.; SHUKLA, Y. N. & THAKUR, R. "Steroidal glycosides from *Asparagus adscendens*". *Phytochemistry*, **29** (9): 2957-2959, 1990.

TAVARES, E. S.; LOURENCINI, R.; LEITÃO, S. G. & VIANA, V. R. C. "Anatomia foliar e análise preliminar do óleo essencial de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae)". *Rev. Bras. Farm.*, **80** (3-4): 78-82, 1999.

THIEMANN, O. H.; ALFONZO, J. D. & SIMPSON, L. "Cloning and characterization of *Leishmania tarentolae* adenine phosphoribosyltransferase". *Mol. Bioch. Parasitol.*, **95**: 141-146, 1998.

TIANG, G.; ZHANG, T.; YANG, F. & ITO, Y. "Separation of gallic acid from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography." *J. Chrom. A*, **886**: 309-312, 2000.

TOUCHSTONE, J.C. *Practice of Thin Layer Chromatography*. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 1992. 377 p.

TRONCOSO, N. S. "Los géneros de verbenáceas de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil)". *Darwiniana*, **18**: 295-412, 1974.

TUTTLE, J. V. & KRENITSKY, T. A. "Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*". *J. Biol. Chem.*, **255** (3): 909-916, 1980.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH & BAST, A. "Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids". *Free Radical Biol. Med.*, **20** (3): 331-342, 1996.

VELLIEUX, F. M. D.; HAJDU, J.; VERLINDE, C. L. M. J.; GROENDIJK, H.; READ, R. J.; GREENHOUGH, T. J.; CAMPBELL, J. W.; KALIK, K. H.; LITTLECHILD, J. A.; WATSON, H. C. & HOL, W. G. J. "Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** (6): 2355-2359, 1993.

VERLINDE, C. L. M. J.; CALLENS, M.; VAN CALENBERGH, S.; VAN AERSCHOT, A.; HERDEWIJN, P.; HANNAERT, V.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R. & HOL, W. G. J. "Selective inhibition of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness". *J. Med. Chem.*, **37** (2): 3605-3613, 1994.

VERONESI, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 8ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. p. 674-705.

VERSARI, A.; BIESENBRUCH, S.; BARBANTI, D.; FARNELL, P. J. & GALASSI, S. "Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices". *Food Res. Intern.*, **30**: 811-817, 1997.

VICENZI, I.; MAIA, E. H.; LARA, A. I.; CARRILO, A. C.; OLIVEIRA, K. L.; BRITZ, R. M.; NORONHA, F. J. & CANESTRARO, R. V. *Manual Para as Trilhas de Interpretação da Natureza do Centro de Estudos e Pesquisas Ambientais (CEPA-ALCOA), em Poços de Caldas, Minas Gerais*. Curitiba, SPVS. 1992. p. 5-13.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G. & PAVÃO, F. "Strategies for the isolation and purification of trypanocidal compounds from the Rutales". *Pure Appl. Chem.*, **73** (3): 617-622, 2001.

VILELA, E. F.; FERREIRA, J. T. B.; GASPAROTTO, J. V. & MOURA, J. I. L. "Feromônios no controle de pragas". *Ciência Hoje*, **10** (60): 32-39, 1989.

VIVAS, N.; LAGUERRE, M.; GLORIES, Y.; BOURGEOIS, G. & VITRY, C. "Structure simulation of two ellagitannins from *Quercus robur* L". *Phytochemistry*, **39** (5): 1193-1195, 1995.

VOIRIN, B. "UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5--hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings". *Phytochemistry*, **22** (10): 2107-2145, 1983.

VON POSER, G. L.; MOULIS, C.; SOBRAL, M. & HENRIQUES, A. M. "Chemotaxonomic features of iridoids occurring in *Verbenoxylum reitzii* (Verbenaceae)". *Pl. Syst. Evol.*, **198**: 287-290, 1995.

VON POSER, G. L.; TOFFOLI, M. E.; SOBRAL, M. & HENRIQUES, A. T. "Iridoid glucosides substitution patterns in Verbenaceae and their taxonomic implication". *Pl. Syst. Evol.*, **205**: 265-287, 1997.

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E. & RASSI, A. "Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusional and clinical medicine". São Paulo: ISBT, Brazil'92- Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p. 271.

WERAWATTANAMETIN, K.; PODIMUANG, V. & SUKSAMRARN, A. "Ecdysteroids from *Vitex glabrata*". *J. Nat. Products*, **49** (2): 365-366, 1986.

WIERENGA, R. K.; NOBLE, M. E. M.; VRIEND, G.; NAUCHE, S. & HOL, W. G. J. "Refined 1.83- A structure of trypanosomal triosephosphate isomerase crystallized in the presence of 2.4-ammonium sulphate - a comparison with the structure of the trypanosomal triosephosphate isomerase-glycerol-3-phosphate complex". *J. Mol. Biol.*, **220** (4): 995-1015, 1991.

WILSON, I. D. "The ecdysteroids". IN: *CRC Handbook of Natural Pesticides*. v. III: *Insect Growth Regulators, Part A*. MORGAN, E. D. & MANDAVA, N. B. (Eds.). Florida, CRC Press, 1987. p. 15-87.

WOLFENDER, J. *Investigation Phytochimique et Analyse par Chromatographie Liquide-Spectrometrie de Masse de Quatre Species du Genre Chironia (Gentianaceae)*. França, Faculte des Sciences de L'Université de Lausanne, 1993. These de Doctorat.

YANG, L.; LEE, C. & YEN, K. "Induction of apoptosis by hydrolysable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells". *Cancer Lett.*, **157**: 65-75, 2000.

YANG, S.; ZHOU, B.; WISSE, J. H.; EVANS, R.; VAN DER WERFF, H.; MILLER, J. S. & KINGSTON, D. G. I. "Three new ellagic acid derivatives from the bark of *Eschweilera coriacea* from the Suriname Rainforest". *J. Nat. Prod.*, **61**: 901-906, 1998.

YAZAKI, Y. & HILLIS, W. E. "Polyphenols of *Eucaliptus globulus*, *E. regnans* and *E. deglupta*". *Phytochemistry*, **15**: 1180-1182, 1976.

years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **63** (3-4): 111-118, 2000.

YOSHIDA, T.; OHBAYASHI, H.; ISHIHARA, K.; OHWASHI, W.; HABA, K.; OKANO, Y.; SHINGU, T. & OKUDA, T. "Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants. I. Hydrolyzable tannins from *Tibouchina semidecandra* Cogn.". *Chem. Pharm. Bull.*, **39** (9): 2233-2240, 1991.

YU, S. J.; & ABO-ELGHAR, G. E. "Allelochemicals as inhibitors of glutathione S-transferases in the fall armyworm". *Pestic. Biochem. Physiology*, **68**: 173-183, 2000.

ZAMBRONE, F. A. D. "Perigosa família". *Ciência Hoje*, **4** (22): 44-47, 1986.

ZANINI, A. C. & OGA, S. *Farmacologia Aplicada*. 2ª ed. São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, 1982. p. 556.

ZUCARO, Y. L.; COMPAGNONE, R. S.; HESS, S. C.; DELLE MONACHE, F. "6- β -hydroxymaslinic acid, a triterpene from *Vochysia ferruginea*." *J. Braz. Chem. Soc.*, **11** (3): 241-244, 2000.