

**Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Instituto de Química de Araraquara**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**

**“Estudo químico de *Zollernia ilicifolia*,  
*Wilbrandia ebracteata* e *Caesalpinia ferrea*”**

**Roberta Gomes Coelho**

**Tese de Doutorado**  
**2004**

---

**Roberta Gomes Coelho**

**“Estudo químico de *Zollernia ilicifolia*  
(Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata*  
(Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea*  
(Caesalpinaceae)”**

Tese apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em  
Química.

**Orientador: Wagner Vilegas**

**Araraquara  
2004**

---

**Roberta Gomes Coelho**

**“Estudo químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae),  
*Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e  
*Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae)”**

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química.

Araraquara, 19 de maio de 2004

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maysa Furlan  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elfriede Marianne Bacchi  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo

Prof. Dr. João Batista Fernandes  
Departamento de Química – UFSCAR, São Carlos

Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

---

## Curriculum Vitae

### 1. Dados Pessoais

Nome: Roberta Gomes Coelho

Filiação: Roberto Gomes Coelho e Maria Aparecida Vicente Coelho

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Araraquara

Estado civil: solteira

E-mail: robertacoelho@yahoo.com.br

### 2. Formação Acadêmica

#### 2.1. Graduação:

- Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química - Campus de Araraquara

- Local: Araraquara - SP

- Curso: Licenciatura em Química

- Período: 1993-1997

- Iniciação Científica:

“Estudo Químico de Plantas da Família Eriocaulaceae”.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Departamento de Química Orgânica - IQ -UNESP - Araraquara

Financiamento: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)

1995 a 1997

## 2.2. Pós-graduação:

### 2.2.1. Mestrado

- Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Química - Campus de Araraquara
- Orientação: Prof. Dr. Wagner Vilegas
- Área: Química Orgânica  
Sub área: Química de Produtos Naturais (isolamento, identificação e atividades biológicas)
- Projeto: “Investigação química de plantas da família Eriocaulaceae”  
Financiamento: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)
- Período: 03/1998 a 02/2000.

### 2.2.2. Doutorado

- Instituição: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Química - Campus de Araraquara
- Orientação: Prof. Dr. Wagner Vilegas
- Área: Química Orgânica  
Sub área: Química de Produtos Naturais (isolamento, identificação e atividades biológicas)
- Projeto: “Investigação Química de Plantas medicinais”
  - Financiamento: FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)
- Período: 02/2000 a 05/2004.

## 3. Publicações Científicas

**3.1.** SANTOS, L. C.; ANDRADE, F. D. P.; VASCONCELOS, E. C.; COELHO, R. G.; DOKKEDAL, A. L.; GARCIA, A. C. L.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. Simultaneous separation of flavonoids and naphthopyrones from Brazilian everlasting plants by droplet countercurrent chromatography. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 1999, 2(1): 43-47.

---

**3.2.** COELHO, R. G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Cytotoxic activity of a new naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**, 2000, 71, 497-500.

**3.3.** COELHO, R. G.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* Vog. and comparison with *Maytenus* species. **Z. Naturforschung**, 2003, 58c, 47-52.

**3.4.** SANNOMIYA, M; RODRIGUES, C. M; COELHO R. G; SANTOS L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A; SOUZA BRITO, A. R. M; VILEGAS W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima Crassa* Niedenzu (Ik). **Journal of Chromatography A**, 2004, 1035, 47-51.

**3.5.** COELHO, R. G.; CALVO, T. R.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Separation of the toxic (z)-zierin from *Zollernia ilicifolia* by high-speed counter-current chromatography. Submetido a publicação, 2004. (Journal of Chromatography A).

**3.6.** COELHO, R. G.; BATISTA, L. M.; SOUZA BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. Phytochemical study and antiulcerogenic activity of *Syngonanthus bisulcatus* (Eriocaulaceae). Submetido a publicação, 2004. (Revista Brasileira de Plantas Mediciniais).

**3.7.** PIRES, M. C.; RODRIGUES, C. M.; SILVA, M. A; COELHO, R. G.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Chemical profile of *Eriocaulon ligulatum* (Vell. LB. Smith) (Eriocaulaceae). Submetido a publicação, 2004. (Biochemical Systematics and Ecology).

---

## **4. Estágio no Exterior**

**4.1.** Università degli Studi di Salerno – Itália – Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Período: 07/01/2004 a 05/03/2004.

Orientadores: Prof. Dr. Cosimo Pizza e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Piacente

“Deus criou os medicamentos da terra e o homem justo os usa.”

Eclesiastes XXVIII, 4

“Olhai os lírios do campo, como eles crescem: não trabalham nem fiam; e eu vos digo que nem mesmo Salomão, em toda a sua glória, se vestiu como qualquer deles.”

Mateus XI, 28 a 30.



---

## Agradecimentos

Em especial ao meu orientador e amigo Wagner Vilegas pela oportunidade oferecida desde o início, ensinando-me os primeiros passos na fitoquímica durante a iniciação científica. Depois a oportunidade de realizar o mestrado e o doutorado sob sua orientação. Obrigada pela confiança e pela formação profissional durante todos esses anos de trabalho em que estivemos juntos.

Ao Nivaldo Boralle, pela obtenção dos espectros de RMN.

À Irene, técnica do laboratório de Química Inorgânica, pela obtenção dos espectros de infravermelho.

Aos funcionários do Departamento de Química Orgânica: Hélia, Alberto, Marquinho, Luciana, Marinho, Márcia e Elaine. Obrigada pelo auxílio.

Aos funcionários da biblioteca e seção de pós-graduação.

À Marli e Rose (Posto FAPESP de Araraquara) pela presteza e atenção oferecida.

Aos colegas e amigos do Departamento de Química Orgânica. Obrigada pelo convívio durante todos esses anos.

À todos os professores do Departamento de Química Orgânica, obrigada pelos ensinamentos necessários a minha formação profissional.

À Anne Ligia Dokkedal, professora de botânica da Unesp de Bauru, obrigada pela atenção e amizade.

Não menos importantes meus amigos de laboratório, que me ensinaram muitas coisas, não só no trabalho, mas lições que me ajudaram a ver a vida diferente:

À Lourdes, que agora é professora, obrigada pela amizade e incentivo durante todos esses anos, e também pela grande ajuda nesta etapa final do trabalho.

À Tamara, companheira e amiga.

À Miriam, que foi e depois voltou.... então eu pude conhecer a pessoa amiga que você é. Obrigada pela amizade e ajuda durante todo esse tempo.

A todos os amigos e colegas de laboratório, com os quais compartilhei essa etapa de minha vida. Obrigada pelas conversas, ajuda e amizade: Ana Lúcia, Marcelo,

---

Clenilson, Danielle, Maria Eloisa, Ely, Fabrício, Ana Elisa. E também aqueles que já se foram do laboratório: Fábio, Raquel, Júlio, Regina.

Ao professor Luiz Claudio Di Stasi, obrigada pelo trabalho em conjunto, pela presteza e ajuda quando necessária.

À Fabiana (Biba), obrigada pelos resultados dos ensaios farmacológicos antiúlcera.

À professora Maria Stella G. Raddi, obrigada pelos ensaios de citotoxicidade e DPPH realizados no laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp.

À Verônica, obrigada pela realização dos ensaios biológicos realizados e pela amizade nascida desse trabalho.

Ao Najeh e Ricardo, alunos do departamento de bioquímica, obrigada pela realização do teste de cloração.

Ao professor Cosimo Pizza e professora Sonia Piacente da Università degli studi di Salerno pela oportunidade de conhecer e poder trabalhar com seu grupo de pesquisa.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram nesta caminhada. Em especial a minha mãe que sempre orou por mim, para que Deus sempre iluminasse meu caminho.

Ao Ronaldo, meu querido, meu companheiro ideal, que atravessou o Oceano Atlântico para me ver e ficar ao meu lado. Obrigada por você existir!!!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

## Resumo

Este trabalho é uma parte de uma investigação de plantas utilizadas na medicina popular pela população que habita a Floresta Tropical Atlântica (Mata Atlântica), região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo.

Foram estudadas as folhas de duas espécies usadas para o tratamento de úlceras gástricas: *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae). A terceira espécie estudada foi *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae), usada contra alergia.

Os extratos hidrometanólico 70% das espécies *Z. ilicifolia* e *W. ebracteata* foram avaliados farmacologicamente em diferentes modelos de indução de úlceras. Para o extrato metanólico de *C. ferrea* foi avaliada a secreção de mastócitos de pulmão e intestino de cobaia, visando uma comparação com drogas antialérgicas. Os extratos ativos foram fracionados por técnicas cromatográficas e as substâncias identificadas por métodos espectrométricos.

Do extrato de *Z. ilicifolia* foram isoladas saponinas, flavonóides glicosilados e glicosídeos cianogénicos. O perfil cromatográfico usando HPLC-DAD de *Z. ilicifolia* combinado ao conhecimento desta espécie permitiu distinguir entre a verdadeira e a falsa espinheiras-santas (*Maytenus ilicifolia* e *Sorocea bomplandii*).

Em *W. ebracteata* foram identificados ácidos graxos, além de agliconas de flavonóides e C-glicosídeos. Os flavonóides C-glicosilados isolados de *W. ebracteata* exibiram significativa atividade antioxidante e baixa atividade citotóxica.

Na espécie *C. ferrea* foram encontrados flavonóides C-glicosilados, triterpenos e um derivado de ácido fenólico.

Como conclusão este estudo contribuiu para o conhecimento da química dessas plantas brasileiras que ocorrem na Mata Atlântica e isto pode ser usado como base para a conservação da floresta assim como fonte de compostos para estudos fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e ecológicos.

---

## Abstract

This work is part of a systematic investigation of plants used in folk medicines by people that inhabit in Tropical Atlantic Forest (Mata Atlântica), Vale do Ribeira, State of São Paulo.

We have studied the leaves of two species used for treatment of gastric ulcers: *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) and *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae). The third species investigated was *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae), used against allergy.

The 70% methanolic extracts of *Z. ilicifolia* and *W. ebracteata* and the methanolic extract of *C. ferrea* were submitted to pharmacological assays in different models to evaluate their activities. The active extracts were fractionated by chromatography techniques and the substances were identified by spectrometric methods.

From *Z. ilicifolia* we have isolated saponin, glycosilated flavonoids and cyanogenic glycosides. The chromatographic HPLC-UV-DAD profile of *Z. ilicifolia* combined to the knowledge of the chemistry of this species allowed to distinguish between true and false “espinheiras-santas” (*Maytenus ilicifolia* and *Sorocea bomplandii*).

*W. ebracteata* afforded fatty acids as well as flavonoid aglycones and C-glycosides. The C-glycoside flavonoids showed significative antioxidant activity and low citotoxic activity.

*C. ferrea* led to the isolation of C-glycoside flavonoids, triterpenes and phenolic acid derivative.

In conclusion, this study contributed to improve the knowledge of the chemistry of Brazilian plants occurring in the Mata Atlântica and can be used as a basis for the forest conservation as well as a source of compounds for phytochemical, pharmacological, toxicological and ecological studies.

---

## Listas de Abreviaturas

AcOEt – acetato de etila

BAW – Butanol/acetic acid/water - Butanol/ácido acético/água

BuOH: Butanol

CC: Cromatografia em coluna

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

CD<sub>3</sub>OD: Metanol deuterado

COSY: Correlation spectroscopy – Espectroscopia de correlações

d: dubleto

DMSO d<sub>6</sub>: Dimetilsulfóxido deuterado

DAD: Diodo array detector - Detector de foto diodo

DPPH: 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

DTNB: Ácido 5,5'-ditio-2-nitrobenzóico

FID: Flame ionization detector - Detector ionização de chamas

GC: Gas chromatography – Cromatografia em fase gasosa

GPC: Gel permeation chromatography - Cromatografia em permeação em gel

HAc: Ácido acético

Hex: Hexano

HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation - Coerência heteronuclear com ligações múltiplas

HMQC: Heteronuclear multiple quantum coherence - Coerência heteronuclear múltiplo quântica

HPLC: High performance liquid chromatography – Cromatografia líquida de alta performance

IV: Infravermelho

MS: Mass spectrometry - Espectrometria de massas

n-PrOH: n-propanol

NP/PEG: Difenilaminoborato/polietilenoglicol

PVPP: Polivinilpolipirrolidona

Rf: fator de retenção

RMN <sup>1</sup>H: Ressonância Magnética de Hidrogênio

RMN <sup>13</sup>C: Ressonância Magnética de Carbono

---

s: singleto

t: tripleto

TNB: Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy – Espectroscopia de correlação total

UV: ultravioleta

TMS: tetrametilsilano

$\delta$ : Deslocamento químico

---

## Objetivos

Este trabalho teve por objetivo o estudo químico de plantas da Mata Atlântica do Estado de São Paulo que são usadas na medicina popular como anti-úlceras e antialérgica: *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpiniaceae).

Visamos aprofundar o conhecimento químico das espécies, bem como obter dados que possam auxiliar a compreender suas atividades biológicas e contribuir para o uso racional e seguro dessas espécies.

---

## Introdução

### 1. As plantas medicinais

As plantas têm sido um importante recurso medicinal desde os primórdios da humanidade. No momento em que a espécie humana surgiu no planeta, as plantas já existiam há mais de 400 milhões de anos. Têm-se registros como desenhos em cavernas, que revelam uma ligação muito íntima do homem com a natureza, principalmente com as plantas (CAMARGO, 1998).

Outros registros podem ser encontrados antes de 2500 a.C., como a medicina tradicional chinesa. Os egípcios, os gregos e muitas outras civilizações posteriores possuíam conhecimentos sobre o uso de vegetais, tais como azeite, figos, cebolas, alhos, etc (ROBBERS, 1997).

Ao longo da história, vemos que a arte de curar pelas plantas esteve por muito tempo associada a práticas mágicas, místicas e ritualísticas. Muitas vezes, uma planta era descoberta simplesmente por apresentar morfologia semelhante a alguma parte do corpo e, assim, ser associada a essa parte no processo de cura (FITOTERAPIA, 2000).

Durante as conquistas de novos continentes, houve uma difusão de espécies para áreas colonizadas como forma de promover a cura ou mesmo como simples continuação dos hábitos convencionais dos colonos. Esses colonos, juntamente com os povos indígenas e negros africanos, possuíam grande conhecimento sobre ervas medicinais, e ajudaram a influenciar a cultura dos países das Américas, África e Europa (CAMARGO, 1998).

Desse modo, as civilizações em todo mundo foram juntando suas experiências de forma única, deixando acumular até nossos dias um vasto conhecimento sobre as ervas.

No Brasil, têm-se relatos da utilização de plantas não somente como fonte de alimentos, mas também como fonte de medicamentos, desde que os primeiros habitantes chegaram aqui, há cerca de doze mil anos. No entanto, as primeiras informações sobre os hábitos indígenas só começaram a ser propagadas com o início da colonização portuguesa. Tempos depois, o padre José de Anchieta descreveu várias plantas comestíveis e medicinais do Brasil, como o feijão, milho, a cevada, o grão-de bico, o palmito e a mandioca. Essas



---

espécies faziam parte dos principais alimentos indígenas. Das plantas medicinais, Anchieta relatou uma planta chamada de “erva-boa”, a pimenta, que era muito utilizada pelos índios contra indigestões, para aliviar nevralgias, reumatismos e doenças nervosas (SOARES, 2004).

Uma parte do conhecimento indígena, juntamente com o herdado dos negros e europeus, foi transmitida para a população. É difícil encontrar alguém que nunca curou a cólica infantil com camomila ou erva-doce ou o mal estar de uma ressaca com chás de folhas de boldo. Numa população como a brasileira, agregar garantias científicas a essa prática traz inúmeras vantagens.

Em 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a importância das plantas medicinais e das preparações galênicas na cura de doenças, recomendando a difusão em nível mundial dos conhecimentos necessários para o uso das plantas medicinais (SOARES, 2004). Esse incentivo ajudou a formação de grupos que hoje estudam as plantas medicinais. Além disso, o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Essa grande biodiversidade chama a atenção de equipes multidisciplinares formadas por vários profissionais como botânicos, fitoquímicos, farmacólogos e biólogos.

De um modo geral, toda a história da medicina está intimamente ligada às plantas. Com o progresso das técnicas cromatográficas e de ressonância magnética nuclear, muitas espécies de diversas famílias de plantas foram e estão sendo estudadas. Contudo, existe uma gama muito grande de diversidade de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas a serem pesquisadas dessas plantas. Apesar do aumento de estudos nesta área, somente 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (CALIXTO, 2000).

A farmacologia avançou para a situação atual de elaboração de medicamentos sintéticos, que domina o mercado de fármacos há muitos anos. Apesar disso, hoje em dia, muitas plantas medicinais são amplamente comercializadas em países ricos e pobres na forma de medicamentos fitoterápicos. Nos últimos 20 anos, observou-se aumento significativo no mercado desses medicamentos na Alemanha e Estados Unidos. A indústria fitoterápica movimenta cerca de 5% do capital que circula no mercado global de

---

medicamentos sintéticos. No Brasil, os medicamentos representam 4% do total comercializado (FITOTERAPIA, 2000).

De um modo geral, a população recorre aos conhecimentos populares na hora de utilizar plantas medicinais, por acreditar que, se bem não fizer, mal também não fará. Acreditar que as plantas medicinais são totalmente benéficas somente por serem plantas pode ser muito perigoso. Muitas plantas contêm constituintes tóxicos, e o uso indiscriminado de certas plantas pode resultar em intoxicações. A toxicidade pode resultar de altas concentrações ingeridas, do estado de conservação das plantas e também da forma de uso.

No Brasil temos alguns exemplos de plantas que foram utilizadas para tratamento de câncer, como o *Symphytum officinalis* (confrei), *Alloe spp.* (babosa) e *Euphorbia tirucalli* (aveloz). O extrato aquoso de confrei obtido por maceração foi proibido para uso interno devido à grande quantidade de alcalóides pirrolizidínicos, que são hepatotóxicos. No caso da babosa, não há relatos na literatura sobre a toxicidade de sua mucilagem, mas a presença de glicosídeos hidroxiantracênicos torna-a tóxica. Um de seus efeitos é a diarreia (RATES, 2001).

Existem muitos medicamentos fitoterápicos que estão sendo usados profilaticamente para manter uma boa saúde ou prevenindo doenças. Contudo, com o uso prolongado nem sempre é possível prever o quanto são seguros e eficazes, resultando algumas vezes em intoxicações crônicas.

Alguns fitoterápicos considerados seguros apresentam problemas associados ao seu longo tempo de uso. Como exemplo, temos alguns laxativos, *Senna alexandrina* (*Cassia senna*), *Aloe vera*, *Rhamus frangula*, *Rhamus purshiana* (cáscara sagrada) que podem causar dores abdominais, diarreia, etc. As espécies *Valeriana officinalis*, *Passiflora incarnata* e *Bupleurum flacatum*, conhecidas por seus efeitos sedativos, causam dores de cabeça, palpitações e insônia. O uso prolongado do guaraná pode causar agitação e insônia (ELVIN-LEWIS, 2001).

É claro que nessa situação o fato de tomar chá para curar algum mal repentino não constitui uma negação do conhecimento científico e da necessidade de orientação médica, mas representa uma busca àquele homem dos primórdios da humanidade, época que tudo era mais natural.

---

Deste modo, estudos são necessários a fim de garantir à população uma melhor qualidade de vida e evitar alguns problemas como a utilização errada de espécies vegetais pela população, dosagens incorretas, ausência de um controle de qualidade e boas práticas de cultivo.

A qualidade da matéria-prima vegetal usada como fitoterápico é de extrema importância, pois afeta diretamente a eficácia e a segurança desses medicamentos. Para melhorar a qualidade da matéria-prima, as indústrias estão investindo mais em cultivo em larga escala. Isto permite selecionar espécies com alto teor de princípios ativos, controlar pragas e contaminações por metais pesados, inseticidas, além de poder controlar o clima, nutrientes e luminosidade. Todos esses fatores contribuem para manter a qualidade, segurança e eficácia dos fitoterápicos (CALIXTO, 2000).

A necessidade de um controle de qualidade também é importante, embora a dificuldade em fazê-lo é um fator bastante crítico. De uma maneira geral, as plantas podem possuir centenas de constituintes, alguns deles presentes em concentrações mínimas. Os constituintes das plantas variam em função de fatores externos como temperatura, umidade, luminosidade, método de coleta, secagem e transporte. Com os avanços tecnológicos ocorridos em técnicas analíticas (HPLC, RMN, etc) é possível estabelecer critérios para padronizar e manter o controle de qualidade dos fitoterápicos (FARIAS, 1999).

É necessária a conjunção de profissionais, num trabalho multidisciplinar e interativo, na busca de substâncias farmacológicas ativas com potencial terapêutico. A identidade botânica, composição química e identificação dos constituintes químicos e análise das propriedades farmacológicas faz parte desses elementos envolvendo deste modo diferentes profissionais especializados.

Um fator importante na procura de novas moléculas depende da interação entre a química e a farmacologia. Neste sentido, um diferencial a ser observado é que o estudo químico segue o caminho daqueles resultados farmacológicos que indicam uma atividade mais interessante, embora toda a composição química da planta deva ser explorada. Sendo assim, o químico deve isolar e identificar os compostos dos extratos que apresentam a atividade investigada.

Muitas vezes a alta atividade biológica de um extrato não pode ser explicada somente por uma substância, nem pela soma dos efeitos das substâncias ativas, sugerindo a

---

ocorrência de efeitos sinérgicos ou a existência de outros componentes mais ativos, mas presentes em pequenas proporções. Por esse motivo, o estudo farmacológico de frações enriquecidas não deve ser deixado de lado. Paralelamente a isso, torna-se indispensável o estabelecimento de um perfil químico (cromatográfico/espectrométrico) dessa fração enriquecida (BARATA, 2003).

A ocorrência de efeitos sinérgicos em plantas é provada por meio de vários exemplos encontrados na literatura. Um exemplo é o trabalho realizado por japoneses, que comprovaram esta hipótese no caso do fitoterápico denominado Sho-Saiko-To, que é uma mistura de sete ervas que atua na prevenção de câncer de fígado (FILHO; YUNES, 2001).

Outra explicação ainda para o suposto "desaparecimento" da atividade biológica após o fracionamento seria a biodisponibilidade de alguma substância que, quando pura, não seria absorvida da mesma forma que no extrato. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a instabilidade de substâncias ativas, que podem se degradar durante o processo de isolamento e se transformar em substâncias inativas (FILHO; YUNES, 2001).

Todas essas considerações mostram que o estudo de plantas medicinais é bastante complexo e que quanto maior for a interação entre químicos e farmacólogos, mais ampla será a possibilidade de sucesso no estudo de um extrato ativo.

Este trabalho é uma tentativa de aprofundar essa interação. Além disso, todo esse conjunto de fatos apresentados justifica a necessidade de aprofundar os estudos com os recursos naturais brasileiros, especialmente com as plantas tidas como medicinais.

Cinco regiões são especialmente importantes para o desenvolvimento de trabalhos com plantas medicinais devido ao considerável número de espécies de plantas nativas: a região Amazônica, a Mata Atlântica, o Cerrado, a Caatinga e o Pantanal (BALICK; ELISABTSKY; LAIRD, 1996).

A Mata Atlântica é disposta nas encostas serranas, boa parte delas localizadas na região costeira e nos planaltos interioranos. A Mata exuberante do litoral e das planícies próximas, vai-se transformando à medida que a altitude aumenta. Aos 800 metros permanece a floresta densa, porém apresentando características de vegetação montanhosa; a partir dos 1200 metros de altitude inicia-se a transição para os campos de altitude e ao atingir os 1800 metros a vegetação passa a ter aspecto arbustivo e herbáceo (SIQUEIRA, 2000).

---

O clima mais representativo é tropical úmido, caracterizado por um alto índice pluviométrico, com temperatura média anual de 20°C, máximas e mínimas absolutas entre 40 e -4°C (SIQUEIRA, 2000).

Antes do descobrimento e do início da colonização do Brasil, no século XVI, havia em torno de um milhão de quilômetros quadrados de Floresta Tropical Atlântica. A mata cobria do norte ao sul todo o litoral brasileiro e em alguns pontos penetrava para o interior, servindo para enriquecer a diversidade vegetal e biológica (SIQUEIRA, 2000). Da Mata Atlântica resta hoje cerca de 12% da cobertura original e somente na fachada da Serra do Mar e no Vale do Ribeira resta um pouco da vegetação original. No interior o restante de mata nativa estão extremamente fragmentados (JOLY; SPEGLICH, 2003).

A Mata Atlântica com sua imensa biodiversidade, possui muitas espécies endêmicas, como algumas espécies de palmeiras e bromélias. Inúmeras espécies de plantas de valor medicinal e outras promissoras também são encontradas nesta região. Como é o caso da espécie *Bauhinia forficata* Link. A infusão das folhas é amplamente referida como diurético, hipoglicemiante e contra hipertensão e dores nas costas (DI STASI et al., 2002a).

Estudo realizado por Di Stasi et al. (2002) com comunidades rurais e urbanas da Mata Atlântica, região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo relata a utilização de 114 espécies de plantas para a cura de males. Dentre as famílias vegetais, destacam-se a Leguminosae ou Fabaceae (como é chamada atualmente) e Cucurbitaceae, as quais abrangem espécies de interesse alimentar e medicinal.

Este trabalho tem como objetivo o estudo químico de plantas brasileiras que, testadas farmacologicamente, apresentaram propriedades anti-úlceras e antialérgica. Este trabalho foi dividido em três capítulos e descreve o estudo químico feito com as folhas de *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpinaceae). Visamos contribuir para o conhecimento químico dessas espécies e dos gêneros, bem como obter contribuir para o uso racional e seguro dessas espécies.

## Materiais e Equipamentos Utilizados

è Nas análises por cromatografia comparativa em camada delgada as placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 G (Merck) em água destilada, na proporção 1:2 (p/v), sobre placas de vidro 5 x 10 ou 20 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente. Após a preparação das placas, estas foram deixadas em repouso por cerca de 8 horas à temperatura ambiente, e depois em estufa a 120°C por cerca de 30 minutos. Foram usadas também placas compradas de sílica gel 60 (DC-FERTIGPLATTEN DURASIL – 25UV254 – MARCHEREY - NAGEL), de tamanho 10 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente.

è O fracionamento por cromatografia em permeação em gel foi feito em coluna de vidro de 80 cm x 2 cm (d.i), empacotada com Sephadex LH-20 (Pharmacia). O solvente foi bombeado na coluna por meio de uma bomba peristáltica a um fluxo de 0,5 mL/min. As frações com aproximadamente 5 mL foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

è A coluna cromatográfica usando polivinilpolipirrolidona (SIGMA, P-6755) como adsorvente foi efetuada em coluna de vidro 5 x 1 cm (d.i) e eluída com MeOH.

è A coluna cromatográfica usando sílica de fase reversa C18 (LiChroprep Rp18- Merck, 40-63 µm ) como adsorvente foi efetuada em coluna de vidro 20 x 1,0 cm (d.i).

è A filtração usando resina Amberlite XAD-2 (Supelco) como adsorvente foi efetuada em coluna de vidro 30 x 3,0 cm (d.i).

è Como reveladores para CCCD foram utilizados:

- \* Luz UV 254-366 nm ( Chromatovue )
- \* Vapores de iodo ressublimado
- \* Anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Wagner *et al.*, 1984)

0,85 mL de anisaldeído

85 mL de MeOH

10 mL de ácido acético

5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Pulveriza-se a placa cromatográfica com o revelador e pode-se observar manchas roxas para terpenos, avermelhadas para saponinas e amareladas para flavonóides.

\* NP/PEG (específico para flavonóides) (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

100 mg de difenilaminoborato (NP)

500 mg de polietilenoglicol 2000 (PEG)

20 mL de MeOH

Borrifa-se sobre a placa cromatográfica e observa-se no visível e sob luz UV. Fornece manchas amarelas para derivados do kaempferol e alaranjadas para derivados da quercetina.

\* Solução de Sulfato de Cério IV, Código 43404 da Carlo Erba. As placas após pulverizadas com essa solução eram aquecidas a 80°C em placas aquecedoras para o aparecimento das manchas.

è Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetro Bruker DRX-600, operando a 599,19 MHz para o hidrogênio e a 150,86 MHz para o carbono. As substâncias foram dissolvidas em metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD). Esses experimentos foram realizados na Universidade degli Studi de Salerno, Itália, em colaboração com o Prof. Cosimo Pizza e Profa. Sonia Piacente. Para alguns experimentos utilizou-se espectrômetro Bruker AC-200 F, operando a 200 MHz para o hidrogênio e 50 MHz para o carbono e também em espectrômetro Varian, INOVA 500, operando a 500 MHz para o hidrogênio e 125 MHz para o carbono. Os espectros foram registrados com amostras dissolvidas em DMSO d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> ou CD<sub>3</sub>OD, usando TMS como padrão interno.

è O espectro de massa foi realizado em Espectrômetro Fisons VG Platform de quadrupolo simples. Ionização Electrospray,+70 V, modo positivo.

è Os espectros de infravermelho foram feitos em Espectrômetro de Infravermelho FT-IR-Nicolet-IMACT-400 em pastilhas de KBr.

è As medidas de  $[\alpha]_D$  foram feitas em polarímetro Polamat A Carl Zeiss Jena.

è As análises por HPLC utilizando detector de arranjo diodo (DAD) foram feitas em cromatógrafo com sistema binário Varian Pro Star. Bombas: modelo 210. PDA Detector Varian Pro Star modelo 330.

Coluna Phenomenex 250 mm x 4,60 mm 5  $\mu$ , RP 18.

Coluna Phenomenex 250 mm x 10,00 mm 10  $\mu$ , RP18.

Coluna Dynamax Modular Design 100 A, RP18.

è As análises por HPLC utilizando detector índice de refração (IR) foram feitas em cromatógrafo Waters 590. Bomba: Waters modelo 6000 A, com injetor U6K e detector de índice de refração da Waters 401.

Coluna Waters 300 mm x 7,80 mm, RP 18.

è As análises realizadas por cromatografia gasosa foram feitas em cromatógrafo Varian 3380 Gas Chromatography, equipado com detector de ionização de chama (FID), Coluna LM-5 (5% fenil 95% metilpolisiloxano) com 15 metros de comprimento, 0,2 mm de diâmetro interno, 0,2  $\mu$ m de espessura do filme, fabricante L&M, CB). Condições de operação para as análises de *Wilbrandia ebracteata*: injetor: 250°C, detector: 290°C, Coluna com temperatura programada 45°C por 2 minutos com aumento de 7°C/min até 280°C/min 10 minutos. Utilizou-se Split: 1:30.

Condições de operação para as análises das frações de *Zollernia ilicifolia* e *Caesalpinia ferrea*: injetor: 250°C, detector: 300°C, Coluna com temperatura programada 150-240°C com aumento de 10°C/min, 240-280°C/min, rampa de aquecimento 5°C/min por 20 minutos. Utilizou-se Split: 1:30.



è **GC-MS**: Varian 3380 Gás Chromatography, equipado com injetor automático (8200 cx) acoplado ao espectrômetro de massas Saturn 2000, Coluna LM-5 (5% fenil 95% metilpolissiloxano) com 15 metros de comprimento, 0,2 mm de diâmetro interno, 0,2 µm de espessura do filme, fabricante L&M, CB). Injetor: 250°C, detector: 290°C, Coluna com temperatura programada 45°C por 2 minutos com aumento de 7°C/min até 280°C/min 10 minutos. Utilizou-se Split: 1:30.

è Avaliação da atividade antioxidante com DPPH

Reagente: 1,1-difenil-1-picril-hidrazila (Merck).

è Teste de cloração (atividade antioxidante)

Soluções utilizadas no teste de cloração:

\* Solução OCl<sup>-</sup> /HOCl:

HOCl foi produzido a partir de NaOCl comercial. A concentração do HOCl foi determinada através do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{292\text{nm}} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). C= 0,09 mM

\* Solução de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB):

uma solução de 1 mM preparada.  $\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . C= 0,4 mM.

\* Solução tampão PBS-D:

Solução A: NaCl: 8,0 g, KCl: 0,2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,2 g; Solução B: CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: 0,1 g, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O: 0,1 g, H<sub>2</sub>O q.s.p: 1000 mL. pH 7,4. A solução A foi dissolvida em 700 mL de H<sub>2</sub>O deionizada. A solução B foi dissolvida em ~200 mL de H<sub>2</sub>O. Adicionou-se vagarosamente, esta solução ao conteúdo da solução anterior e , posteriormente, o volume foi completado para 1000 mL. Ajustou-se o pH para 7,4. Esterilizou-se o tampão por filtração em Milipore.

\* As leituras foram feitas em um espectrofotômetro HP Agilent 8453.

è Testes de citotoxicidade

\* Substâncias:

---

As substâncias (we2, we3, we4, we6 e luteolina), foram pesadas e dissolvidas em DMSO na concentração de 10,0 mg/mL. A concentração máxima de DMSO utilizada como solvente foi de 4%, não influenciando no crescimento celular (DEVIENNE, 2000).

\* Meios de cultivo e soluções:

Tampão PBS: Solução A: 0,908 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /100 mL; Solução B: 0,9475 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  /100 mL. Misturou-se 28,5 mL de solução A para 71,5 mL de solução B e acrescentou 0,85 g de NaCl. pH = 7,2-7,4. Esterilização a 121°C por 15 minutos.

\* Solução de vermelho neutro: Solução estoque do corante vermelho neutro (0,4% em tampão PBS) (Neutralrot Redox-indikator - Riedel-De-Haën AG Seelze-Hannover - cod.326.60) foi diluída a 50 µg/mL em meio Eagle sem soro e esterilizada em membrana tipo Millipore 0,22µ. Após 24 horas, a 37°C, a solução foi submetida a centrifugação (1500 rpm - 10 minutos), para remoção dos cristais remanescentes.

\* Mistura ácido acético/etanol (1:50): Inicialmente, foi preparado álcool etílico 50%. Para a preparação da mistura, adicionou-se 1 mL de ácido acético glacial a 99,0 mL de álcool 50%.

\*Substâncias teste e de referência (luteolina): Soluções das substâncias foram preparadas nas concentrações de 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500µg/mL, utilizando-se o meio de crescimento como diluente.

\*Meio de cultivo - constituído por meio Eagle (Instituto Adolfo Lutz) adicionado de 7,5% de soro fetal bovino (Cutilab).

\*Células McCoy B (ATCC 1696), foram mantidas em garrafas, tipo xarope, contendo meio Eagle adicionado de 7,5% de soro fetal bovino.

\*Análise estatística: os dados da análise estatística de regressão, juntamente com os apresentados na tabela de estatística descritiva, foram utilizados para avaliar se o modelo de regressão linear é adequado para a compilação, validação e significância dos resultados. A reta dose-resposta das substâncias foi obtida através do gráfico de dispersão  $xy$  contendo as observações (concentração x absorvância) e o índice citotóxico ( $IC_{50}$ ) foi calculado a partir da equação da reta obtida (BARILE, 1994; LAPPONI, 1997).

#### è Reação de metilação com diazometano

2 lentilhas (~ 0,1g ) de KOH foram dissolvidas na menor quantidade possível de água e em 0,5mL de etanol. A mistura foi adicionada lentamente a um balão de destilação resfriado em banho de gelo contendo 1,0g de Diazald (N-metil-N-Nitroso-4-toluenosulfonamida) previamente dissolvido em 12mL de éter etílico (VOGEL, 1981).

Aquecimento dessa mistura levou à destilação da solução etérea de diazometano. Esta solução foi imediatamente adicionada aos frascos contendo as frações a serem metiladas, mantendo-os fechados por cerca de duas horas (VOGEL, 1981). Observou-se o desprendimento de  $N_2$ , sugerindo que houve a metilação. Em seguida, evaporou-se o solvente e as frações foram analisadas por GC-FID ou GC-MS.

## I. Estudo Químico de *Zollernia ilicifolia*

### I.1.1. A família Fabaceae

As Fabaceae pertencem à Ordem Fabales (*sensu* Cronquist, 1988) e constituem uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, visto o grande número de espécies vegetais. Esta família tem grande importância como fonte de madeiras, produtos alimentares, medicinais, ornamentais e algumas espécies têm valor econômico.

A família Fabaceae também é classificada como sub-família Papilionoideae (Faboideae) da família Leguminosae, segundo o sistema antigo de classificação de Engler (1786). Para a família Fabaceae estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de 12.000 espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais (BARROZO, 1978). Os principais gêneros estão distribuídos em 31 sub-famílias. Destacamos a seguir algumas de importância medicinal:

- Dypteryxae: *Dypteryx*; que são utilizadas como antiespasmódica, diaforética, problemas cardíacos e menstruais;
- Dalbergieae: *Dalbergia* e *Andira*;
- Abreae: *Abrus*;
- Millettieae: *Tephrosia*, *Derris* e *Lonchocarpus*, onde muitas espécies vegetais possuem importantes efeitos inseticidas, sendo amplamente utilizadas *in natura*, no combate de inúmeras pragas de lavouras e de ectoparasitas de animais;
- Robinieae: *Sesbania* e *Robinia*;
- Indigofereae: *Indigofera*;
- **Swartziae: *Swartzia* e *Zollernia*;**
- Sophoreae: *Sophora*, *Diplotropis* (as plantas desse gênero são misturadas com enxofre e aplicada no tratamento de impingem), *Myrocarpus* (são utilizadas como cicatrizante e antiinflamatório) e *Ormosia*;
- Desmodieae: *Desmodium* (antigonorreica, um banho com toda a planta combate caspa);

- Phaseoleae: *Phaseolus* do famoso feijão, importante produto alimentar no Brasil, *Canavalia*, *Cajanus* (as folhas são utilizadas contra dores de barriga, diarreia, tosses, gripes), *Cymbosena* (para desordens do fígado e estômago), *Dioclea* e *Mucuna*;
- Psoraleae: *Psoralea*;
- Galegeae: *Astragalus* e *Glycyrrhiza*;
- Viciae: *Vicia* e *Pisum*;
- Trifolieae: *Medicago*;
- Crotalariae: *Crotalaria*;
- Genisteae: *Lupinus*.

### I.1.2. A sub-família Swartziae e o gênero *Zollernia*

A sub-família Swartziae tem como principais representantes os gêneros *Swartzia* e *Zollernia*.

Os trabalhos fitoquímicos encontrados sobre o gênero *Swartzia*, que é taxonomicamente o mais próximo de *Zollernia*, destacam-se por apresentar diterpenos do tipo cassanos, saponinas, pterocarpanos, isoflavanonas, flavonas e isoflavonas (ORPHELIN et al., 1996; BOREL; HOSTETTMANN, 1987; FILHO; DEMORAES; GOTTLIEB, 1980; OSAWA et al., 1992).

Sobre o gênero *Zollernia*, foi encontrado apenas estudo químico sobre o tronco de *Zollernia paraensis*. Esta espécie é uma árvore encontrada na região norte e nordeste do país. É conhecida popularmente como pau-santo e tem grande importância econômica pela madeira dura que é procurada principalmente para trabalhos de tórno (REICHARDT, 1972). O estudo do extrato etanólico da madeira mostrou a presença de flavonóides, isoflavonas, isoflavanonas, chalconas (FERRARI; BOTTA; ALVES DE LIMA, 1983; FERRARI; ALVES DE LIMA; BETOLLO, 1983; FERRARI et al., 1984). Nenhum relato sobre atividade farmacológica desta espécie foi encontrada.

### 1.1.3. *Zollernia ilicifolia*

Como dito anteriormente, a literatura mostra que as plantas do gênero *Zollernia* pertencem à família Leguminosae segundo o sistema de classificação descrito por Engler.

Neste trabalho consideraremos a espécie *Zollernia ilicifolia* Vog. como pertencente a família Fabaceae, sub-família Swartziae (CRONQUIST, 1988).

Esta espécie é encontrada na Mata Atlântica, principalmente nos estados da Bahia, Espírito Santo, São Paulo e Santa Catarina. Nessas regiões é chamada de espinheira-santa, pois é confundida e coletada como adulterante da espinheira-santa verdadeira (*Maytenus ilicifolia*) e suas folhas são utilizadas na forma de chás. Na região do Vale do Ribeira, a infusão das folhas é usada internamente contra úlceras e problemas estomacais, inclusive dor. Em outras regiões do país, a espécie é chamada de mocitaíba, laranjeira do mato, moçataíba e orelha de onça (DI STASI et al.; 2002a).

*Zollernia ilicifolia* é uma árvore de porte médio (aproximadamente 15 metros); folhas simples coriáceas com cerca de 15 cm de comprimento e 5 cm de largura, oblongas com margens onduladas e providas de espinhos; apresentam estípulas espessas (característica marcante na diferenciação da espinheira-santa verdadeira, *Maytenus ilicifolia*); e flores rosadas (Fig.1.1). O gênero descrito por Maximilian Alexander Philipp zu Wied-Neuied e Christian Gottfried Daniel Nees von Esenbeck inclui 14 espécies tropicais e o nome deriva de *hohenzollern* nome da antiga casa regente prussiana (DI STASI et al., 2002a).

Existem outras espécies que também são consideradas adulterantes de *Maytenus* por serem morfologicamente semelhantes, como é o caso de *Sorocea bomplandii*. A adulteração, intencional ou não, é um problema sério quando se trata do emprego de espécies para uso medicinal. Isto pode ocorrer durante a coleta e a venda das plantas, principalmente quando feitas por pessoas que não têm conhecimentos sobre as espécies comercializadas (ANDRADE, 1996; NODARI; GUERRA, 1999).

Em vista destes fatos, existe a necessidade de um estudo conjunto químico-farmacológico das plantas utilizadas como medicinais. Tal esforço conjunto pode resultar na comprovação [ou não] das atividades apresentadas pela planta e, paralelamente, fornecer substâncias que possam ser marcadores para um controle de qualidade eficaz.



**Fig. 1.1:** Folhas de *Zollernia ilicifolia*

---

## I.2. Desenvolvimento, Resultados e Discussões

### I.2.1. Testes Antiúlcera

A úlcera é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Esta doença traz inúmeros custos a sociedade, torna a vida das pessoas difíceis, além de levar muitas vezes à morte.

Vários fatores estão associados ao desenvolvimento das úlceras, como o hábito de fumar, utilizar bebidas alcoólicas, a alimentação, o estresse diário, a presença da bactéria *Helicobacter pylori* na mucosa do trato intestinal e a utilização de drogas antiinflamatórias utilizadas em grande excesso como é o caso da aspirina (LIMA, 1998).

No estômago ocorre a secreção de 2,5 L de suco gástrico diariamente. O muco (secreção de bicarbonato) forma uma camada gelatinosa sobre superfície da mucosa, protegendo-a do suco gástrico. O álcool, o vinagre e a bile do fígado podem romper esta camada. As prostaglandinas (PG's), que são hormônios locais, estimulam a secreção de muco e bicarbonato, além de inibir a secreção ácida. Deste modo, alguns antiinflamatórios, como a aspirina, inibem a síntese de prostaglandinas reduzindo o efeito protetor da superfície da mucosa causando as úlceras (RANG; DALE, 1993).

Pode-se aumentar a síntese de prostaglandinas estimulando-se a enzima ciclooxigenase que faz parte do complexo prostaglandina-sintetase. Drogas sintéticas e substâncias naturais que atuam neste processo são denominadas citoprotetoras, pois protegem a mucosa gástrica (RANG; DALE, 1993).

O prof. Luiz Cláudio Di Stasi (Unesp – Botucatu) e sua aluna Fabiana Gonzalez (Unesp – Botucatu) testaram a atividade farmacológica antiúlcera em camundongos do extrato hidrometanólico 70% de *Zollernia ilicifolia* (GONZALEZ et al., 2001).

Os modelos experimentais de úlceras utilizados em camundongos atuam por mecanismos que resumem, o modo pelo qual as lesões gástricas aparecem no homem. Um dos modelos utilizado neste trabalho envolve tipos de úlceras causadas por agentes irritantes como o etanol absoluto. Este tipo de úlceras surge devido a ação do etanol que



---

ataca e mata as células da mucosa gástrica, independentemente da secreção gástrica (LIMA, 1998).

Outro modelo utilizado neste trabalho foi o da indometacina/betanecol. A indometacina (que tem ação analgésica) causa lesões hemorrágicas na mucosa gástrica decorrentes da inibição da síntese de prostaglandinas e assim diminuindo os mecanismos de citoproteção da mucosa gástrica. O betanecol atua sensibilizando a mucosa gástrica através do estímulo da secreção ácida e pepsina facilitando a irritação gástrica causada por indometacina (LIMA, 1998).

Os grupos de camundongos foram pré-tratados com 1000 mg/Kg quantidade de extrato hidrometanólico 70%, depois de 45 min. Em um grupo as lesões na mucosa gástrica foram induzidas por 0,1 mL de etanol absoluto e outro grupo por indometacina (40mg/Kg) e betanecol (5 mg/Kg) (GONZALEZ et al, 2001).

A espécie *Zollernia ilicifolia* exibiu significativo efeito nas lesões gástricas induzidas por indometacina/betanecol em camundongos. Em lesões induzidas por etanol o modelo foi inativo (GONZALEZ et al., 2001). Por esses motivos é necessário um estudo químico para esta espécie, visando a separação e identificação do maior número de substâncias presentes neste extrato ativo e posteriormente testar as substâncias que forem isoladas em maiores quantidades.

## **I.2.2. Coleta**

A coleta da espécie *Zollernia ilicifolia* foi realizada em 20 de Março de 2000 no município de Sete Barras, Vale do Ribeira, estado de S. Paulo.

A espécie foi coletada pelo professor Dr. Luiz Cláudio Di Stasi e Wagner G. Portilho. Uma exsicata foi depositada no Herbário BOTU.

Foram coletadas as folhas e os caules dessa espécie, que em seguida foram armazenadas em sacos plásticos para evitar desidratação durante o transporte até o local de trabalho.

### I.2.3. Preparação dos extratos das folhas

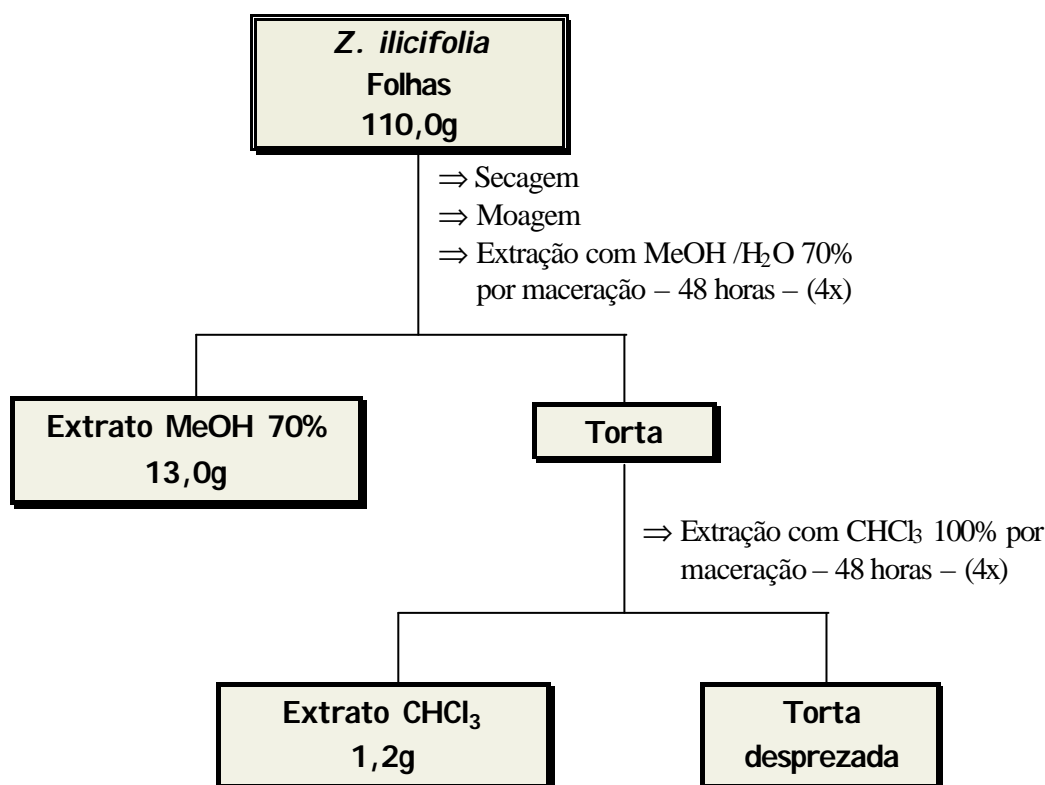
As folhas coletadas foram lavadas em água corrente, dessecadas em estufa a 60°C por 1 hora e 45°C por 48 horas. Após a secagem as folhas foram trituradas com auxílio de um liquidificador (marca Arno).

Preparou-se o extrato usando-se maceração com metanol/água 70:30 (4x, 48 h), da mesma forma como ensaiado farmacologicamente.

Com a finalidade de se extrair eventuais componentes apolares ainda restantes na planta, a torta resultante da extração anterior foi macerada com CHCl<sub>3</sub> de modo idêntico ao descrito (4x, 48h).

Os extratos foram filtrados em algodão e concentrados a pressão reduzida em rotoevaporador. A extração de cada solvente foi realizada quatro vezes, a fim de obter um bom rendimento.

O fluxograma a seguir mostra o procedimento utilizado para a preparação dos extratos.



**Fluxograma 1.1:** Preparação dos extratos das folhas de *Zollernia ilicifolia*

#### I.2.4. Análise do extrato hidrometanólico 70%

A prospecção dos constituintes químicos desse extrato foi realizada pelo prof. Luiz Cláudio Di Stasi e possivelmente podem estar presentes as seguintes classes de substâncias: ácidos fixos, flavonas, flavonóis, catequinas, saponinas, triterpenos e xantonas (MATOS, 1997).

O extrato hidrometanólico 70% foi inicialmente submetido a análise por CCDC. Os melhores sistemas de solventes foram: misturas de BAW (n-BuOH/HAc/H<sub>2</sub>O) 65:15:30, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 5:6:1:4 (fase inferior) e AcOEt/HCOOH/HAc/H<sub>2</sub>O 100:11:11:27.

Análises das cromatoplas no UV (254nm e 360nm) mostraram manchas visíveis, sugerindo a presença de clorofila (manchas vermelhas), flavonóides (amarelas e marrons) e outras manchas de cor azul claro. Quando se revelou as cromatoplas com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, estas apresentaram manchas amarelas e arroxeadas, o que sugeriu mais uma vez a presença de flavonóides, além de triterpenos e/ou saponinas como constituintes majoritários (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

Em seguida, registrou-se um espectro de RMN <sup>1</sup>H desse extrato bruto, com a finalidade obter mais informações preliminares sobre as possíveis classes de substâncias presentes.

O espectro mostrou sinais pouco intensos tanto na região dos hidrogênios alifáticos (entre 0,8δ e δ 2,0δ) quanto na dos aromáticos (entre 6,3δ e 7,5δ), e sinais bem intensos na região dos açúcares (entre 3,0δ e 5,5δ). Essas informações reforçaram a hipótese da presença de flavonóides e de saponinas no extrato e simultaneamente apontou a necessidade de se realizar uma separação preliminar dos açúcares livres. Por esse motivo, iniciou-se o estudo desse extrato eliminando-se os açúcares livres, utilizando-se como estratégia uma filtração em coluna contendo resina Amberlite XAD-2.

Para isso, montou-se uma coluna (30 x 3 cm) contendo XAD-2. Dissolveram-se 13 gramas do extrato em 1,5 L de água. A solução foi homogeneizada até se obter uma solução límpida. Essa solução foi filtrada sobre a coluna de resina XAD-2, com fluxo de 1 mL/min.

Após a eluição total da solução, a coluna foi lavada com 2 L de água destilada. Em seguida, procedeu-se a eluição utilizando-se gradiente com metanol até chegar a acetona pura.

- 1- H<sub>2</sub>O 100% (~5,0 g)
- 2- H<sub>2</sub>O/MeOH 30:70 (~2,0 g)
- 3- MeOH 100% (~5,2 g)
- 4- Acetona 100% (~0,8 g)

Todas as frações foram analisadas por CCDC eluídas em BAW 65:30:15. Verificou-se que as frações apresentaram perfis cromatográficos diferentes, com exceção das frações 2 e 3, que mostraram ser semelhantes e conter as mesmas classes de substâncias, apenas em concentrações diferentes. Essas duas frações foram juntadas. A CCDC sugeriu que esta fração metanólica (2-3) depois de revelada com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, possuía maiores quantidades de flavonóides e saponinas, pois apresentava manchas características e fortes destas classes de substâncias, clorofilas, além de outras manchas escuras de Rf's maiores e semelhantes, mas que não foi possível reconhecer a que classe de substâncias pertenciam.

Para o fracionamento desta fração metanólica (2-3) utilizou-se uma coluna de Sephadex LH-20 como fase estacionária. Este tipo de adsorvente proporciona boa separação de compostos polares, não causando muita adsorção.

Tomaram-se 2,5 g da fração metanólica, dissolveram-se em 10 mL de metanol e centrifugou-se a mistura. Injetou-se a amostra na coluna e procedeu-se a eluição com metanol puro, em fluxo de 0,5 mL/min. Obteve-se 108 frações de 5 mL cada.

Foi realizada cromatografia comparativa em camada delgada das frações obtidas da coluna em BAW 65:15:30. As frações foram reveladas sob luz ultravioleta e em seguida com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NP/PEG. As frações semelhantes foram agrupadas.

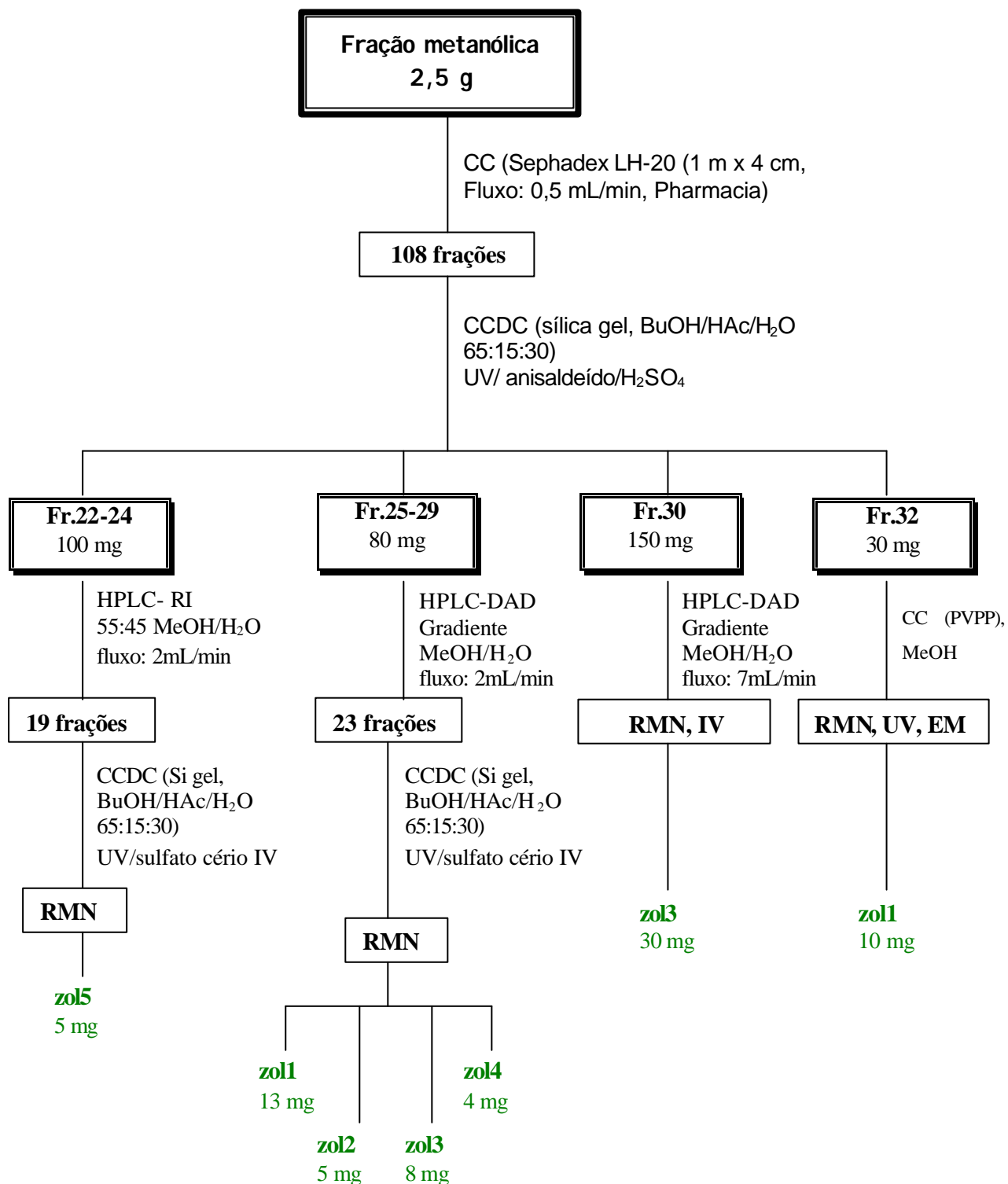
A fração 32 (30 mg, sólido amarelo) apresentou-se quase pura e com mancha amarela quando pulverizada com os dois reveladores, sugerindo a presença de um flavonóide. Foi purificada utilizando-se uma coluna de PVPP eluída com metanol, pois este adsorvente é indicado para separar substâncias fenólicas. Obteve-se uma fração pura (10 mg) que foi analisada por CCDC de maneira análoga à descrita. A substância pura foi denominada **zoll** e analisada espectrometricamente.

A fração 25-29 também foi escolhida para a separação por HPLC-DAD usando coluna semi-preparativa. Para isso, utilizou-se o gradiente MeOH/H<sub>2</sub>O iniciando-se com 20% MeOH até 95% durante 45 min, com fluxo de 2 mL/min. Injetou-se 80 mg de amostra e obteve-se 15 frações. Essas frações foram analisadas por CCDC em BAW 65:15:25 e agrupadas de acordo com sua semelhança. Essas frações foram enviadas para análise espectrométrica e denominadas **zol1** (13 mg), **zol2** (5 mg), **zol3** (8 mg) e **zol4** (4 mg).

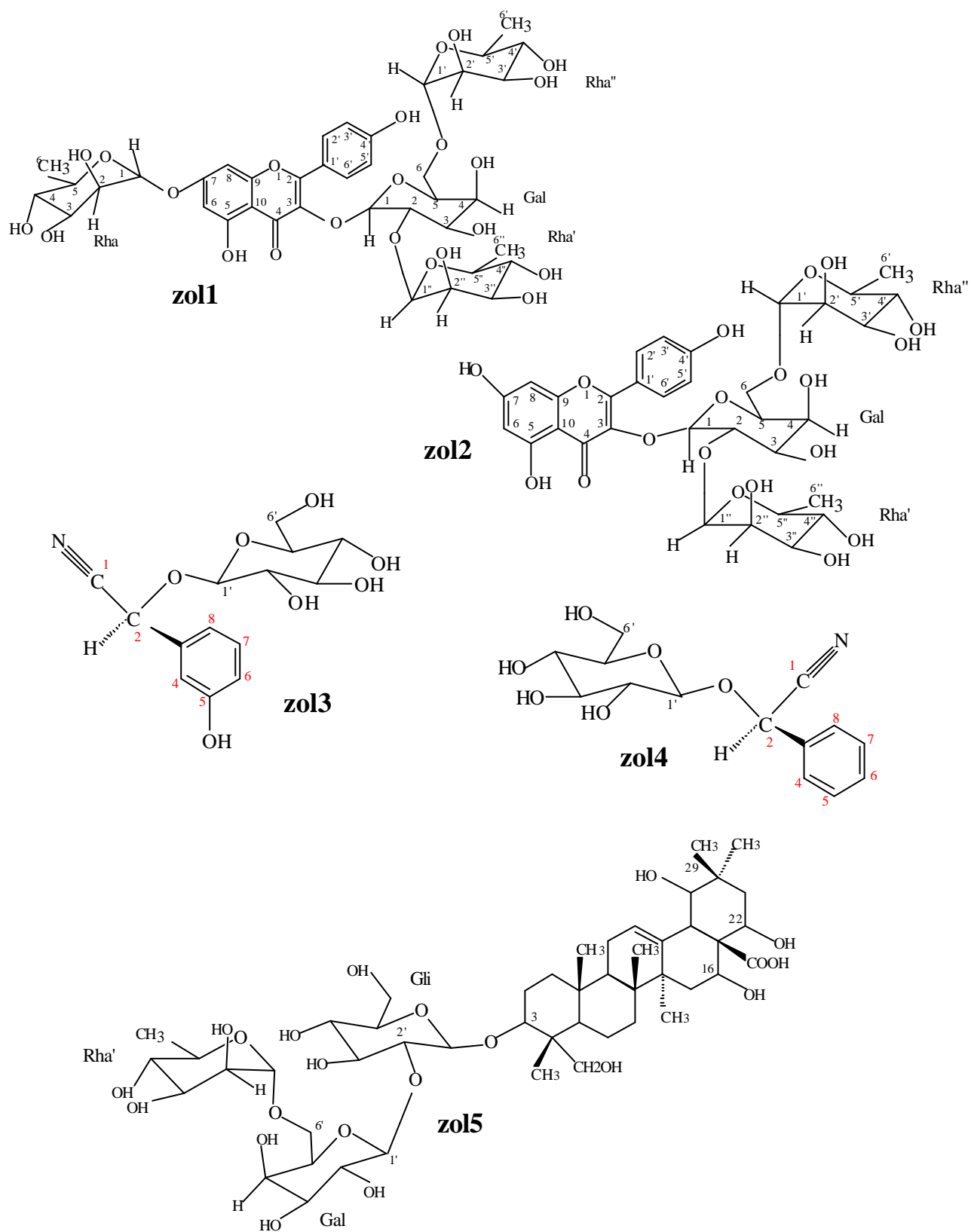
A fração agrupada 30 foi submetida a fracionamento por HPLC-DAD. A amostra(150 mg) foi dissolvida na fase móvel escolhida e em seguida filtrada em filtro Millex. Desta vez, utilizou-se uma coluna preparativa com fluxo de 7 mL/min. O gradiente utilizado iniciou-se com 50% de MeOH até 100%. A eluição durou cerca de 70 min e obteve-se 61 frações que foram analisadas por CCDC como anteriormente e as semelhantes foram agrupadas. A fração 24-25 apresentou-se com apenas uma mancha quando revelada com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e também se apresentou na forma de um sólido cristalino branco que foi enviado para análise espectrométrica de infravermelho e RMN e denominada **zol3** (30 mg).

A fração 22-24 também foi fracionada por HPLC com detector índice de refração. Para isso, foi utilizada uma coluna semi-preparativa e 100 mg foram dissolvidos em MeOH. Como eluente utilizou-se MeOH/H<sub>2</sub>O, que foram testados em várias proporções: 65:45, 60:40, 55:45. O que apresentou melhor separação foi a mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O 45:55. Esse procedimento resultou no isolamento de uma fração pura que foi denominada **zol5**.

O fluxograma a seguir mostra o procedimento experimental desenvolvido para esta etapa do fracionamento para esta espécie.



**Fluxograma. 1.2:** Fluxograma representativo do procedimento de fracionamento, isolamento e identificação dos componentes de *Z. ilicifolia*.

Substâncias isoladas das folhas de *Z. ilicifolia*

## *Identificação de zoll*

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 1.2, pg. 32; tabela 1.1, pg. 30) forneceu um perfil de uma molécula aromática com dois dubletos de  $J = 2$  Hz em  $6,44\delta$  e  $6,79\delta$  referentes aos H6 e H8, respectivamente, do anel aromático A de um flavonóide substituído nas posições 5 e 7 (HARBORNE, 1996). Observou-se ainda dois dubletos ( $J = 8,0$  Hz) integrando para 2H cada em  $6,87\delta$  e  $8,09\delta$ , atribuídos aos hidrogênios H3'/H5' e H2'/H6' do anel B de um flavonóide derivado do kaempferol quando comparados com dados da literatura (HARBORNE, 1996).

A presença de unidades de açúcares pôde ser deduzida a partir dos sinais entre  $5,58\delta$  e  $3,12\delta$ . Embora os sinais dos hidrogênios anoméricos não estejam bem definidos, a ampliação permitiu observar a presença de quatro hidrogênios anoméricos (Fig. 1.3, pg. 33) em  $5,58\delta$  ( $J=8,0$  Hz),  $5,54\delta$  ( $J=1,5$  Hz),  $5,05\delta$  ( $J=1,5$  Hz) e  $4,37\delta$  ( $J=1,5$  Hz). Pôde-se observar também a presença de três dubletos com  $J=6,5$  Hz em  $0,79\delta$ ,  $J=6,0$  Hz em  $1,05\delta$  e  $J=6,0$  Hz em  $1,13\delta$ , característicos do  $\text{CH}_3$  de unidades de ramnose (HARBORNE, 1996). De acordo com a literatura, o deslocamento químico da metila de uma unidade de ramnose quando está ligada ao C3 do flavonóide aparece em frequência baixa ( $0,72$ - $0,86\delta$ ), quando ligada à posição 7 ocorre em frequência mais alta ( $1,04$ - $1,21\delta$ ) e têm deslocamento químico entre valores intermediários a esses quando está ligada a outras unidades de açúcares (HARBORNE, 1996). Baseado nisso, pôde-se sugerir que pelo menos uma das unidades de ramnose está ligada à posição 7.

Pôde-se determinar a configuração relativa das unidades de açúcares pelas suas constantes de acoplamentos entre H1 e H2. Valores próximos a  $1,5$  Hz indicam configuração  $\alpha$ , enquanto que valores próximos a  $7$ - $9$  Hz indicam a configuração  $\beta$  (HARBORNE, 1996).

Deste modo, estabeleceu-se a configuração  $\alpha$  para as três unidades de ramnose e  $\beta$ , para a outra unidade de açúcar ainda não identificada.

O espectro de RMN $^{13}\text{C}$  (Fig. 1.6, p. 34; tabela 1.1, p. 30) apresentou claramente 15 sinais referentes a um derivado do kaempferol. O sinal em  $177,6\delta$  é característico da



carbonila, enquanto que os sinais em 155,9 $\delta$  e 132,9 $\delta$  correspondem aos C2 e C3 de um flavonol glicosilado na posição 3 (AGRAWAL,1989).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Fig.1.4) exibiu também os 4 carbonos anoméricos em 98,9 $\delta$ , 100,5 $\delta$ , 99,9 $\delta$  e 98,4 $\delta$ . A região entre 65,0 – 74,9 $\delta$  apresentou-se complexa com vários sinais. O sinal em 17,2 $\delta$  refere-se a uma metila de uma das unidades de ramnose, enquanto que o sinal em 17,8 $\delta$  corresponde às outras duas metilas (AGRAWAL, 1989).

Compararam-se os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da parte região dos açúcares e do anel A de **zoll** com os da isoramnetina-3-O- $\alpha$ -L-diramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactopiranosídeo-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo, que também possui quatro unidades de açúcares (AGRAWAL, 1989). Os valores podem ser observados na tabela 1.1.

Como pôde ser observado pelos valores de **zoll** quando comparados aos dados da literatura, que a diferença entre essas duas substâncias está no anel B do flavonóide, pois a molécula da literatura é um derivado da quercetina com uma metoxila na posição C3' e uma hidroxila na posição C4', enquanto **zoll** possui apenas uma hidroxila na posição C4'.

Os valores das unidades de açúcares estão bem próximos podendo-se sugerir a presença de uma unidade de ramnose na posição 7 da aglicona e as outras três unidades ligadas ao C3 e correspondem a uma unidade de galactose e duas de ramnose em **zoll** (AGRAWAL, 1989).

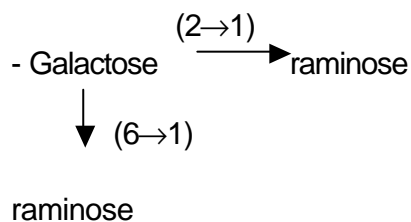
O experimento HMQC (Fig. 1.5, p. 35; Tabela 1.1) fornece as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos. No caso dos hidrogênios de posições 2'/6' e 3'/5' do anel B da aglicona kaempferol, observou-se a correlação com os carbonos 130,9 $\delta$  e 115,0 $\delta$  respectivamente, e os hidrogênios das posições 6 e 8 do anel A com os carbonos 9,3 $\delta$  e 94,5 $\delta$ .

Também verificou-se a correlação dos carbonos em 98,4, 98,9, 99,9 e 100,5 $\delta$  com os hidrogênios anoméricos em 5,54, 5,58, 4,37, 5,05 $\delta$ , respectivamente. As duas metilas das unidades de ramoses foram observadas em 17,8 $\delta$  para a ramnose ligada na posição 7 do anel aromático A e 17,2 e 17,8 $\delta$  para as outras duas unidades de ramoses ligadas à galactose na posição 3 do anel C (Fig. 1.5).

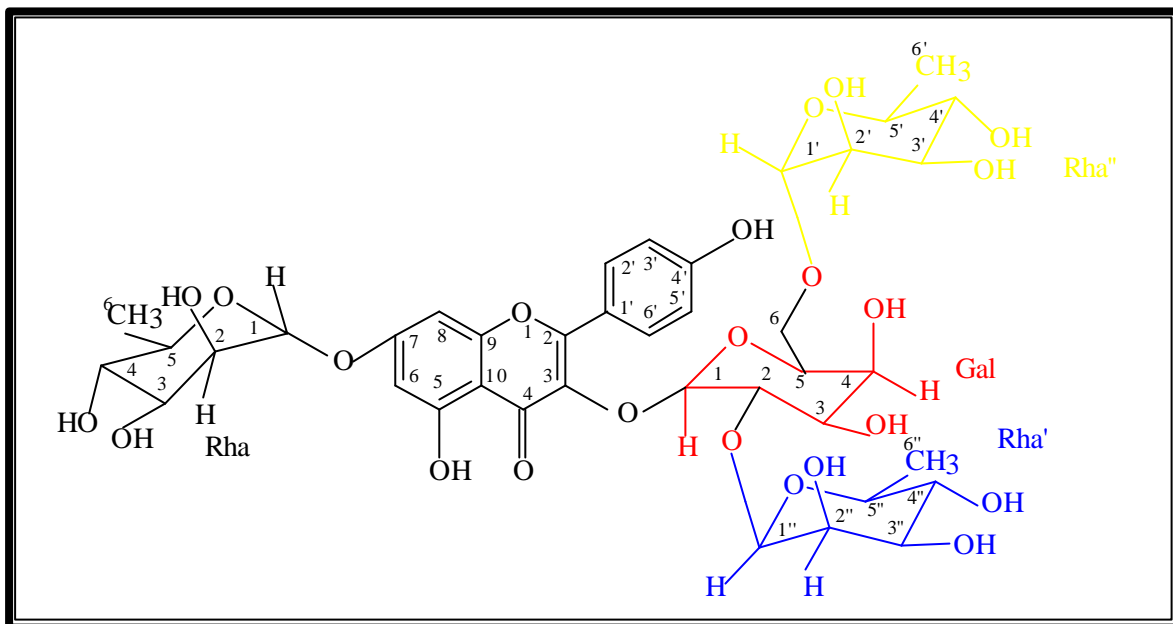
No espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Fig. 1.6, p. 36) pôde-se observar apenas os sinais dos hidrogênios aromáticos. Na região dos açúcares, este espectro apresentou muitos sinais que não puderam ser analisados detalhadamente.

Especialmente importante é o experimento HMBC que fornece as interações à longa distância. Por meio desta técnica pôde-se confirmar as atribuições dos hidrogênios e carbonos da aglicona do kaempferol, além de determinar de que forma estão ligados os açúcares. Neste espectro (Fig. 1.7, p. 37) verificou-se o acoplamento entre o H1- Rha (5,54 $\delta$ ) com o C7 (160,8 $\delta$ ) da aglicona confirmando que uma unidade de ramnose está ligada nessa posição. Pôde-se observar também o acoplamento entre H1 (5,05 $\delta$ ) de Rha' com o C2 (74,9 $\delta$ ) da galactose.

Outro acoplamento observado é entre H1- Rha'' (4,37 $\delta$ ) com C6 (65,0 $\delta$ ) da galactose. Deste modo pôde-se concluir que uma unidade de ramnose está ligada à posição 2 da galactose e a outra unidade de ramnose está ligada na posição 6 da mesma unidade de galactose, como é mostrado a seguir:



Dessa forma, **zoll** é o kaempferol-7-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 2) – [ $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo} (Fig. 1.8).



**Fig. 1.8:** Estrutura do flavonóide tetraglicosilado isolado de *Zollernia ilicifolia*

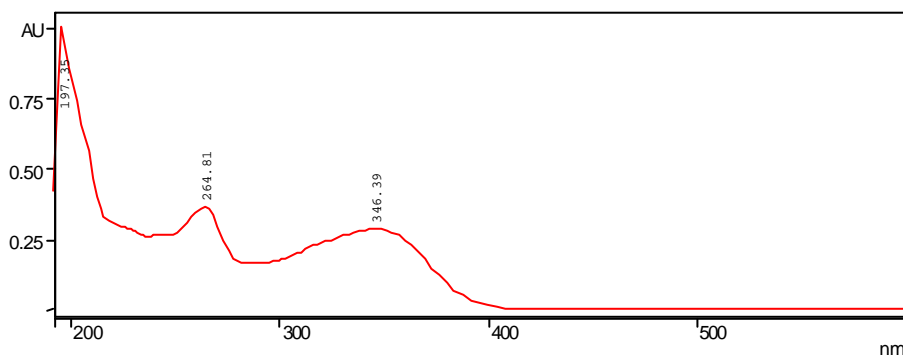
**Tabela 1.1:** Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C de **zol1** comparado ao da literatura(500 MHz e 125 MHz, respectivamente, DMSO d<sub>6</sub>, TMS, δ).

zol2			Isorhamnetina-3-O-a-L-diramnopiranosil-(1®2),(1®6)-b-D-galactopiranosídeo-7-O-a-L-ramnopiranosídeo
Posição	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C	RMN <sup>13</sup> C
2		155,9	156,6
3		132,9	132,8
4		177,6	177,3
5		161,6	160,8
6	6,44 (J=2,0 Hz) d	99,3	98,9
7		160,8	161,5
8	6,79 (J=2,0Hz) d	94,5	94,6
9		156,8	155,9
10		105,5	105,5
1'		120,6	120,8
2'	8,09 (J=8,5Hz) d	130,9	113,3
3'	6,87 (J=9,0 Hz) d	115,0	149,5
4'		160,0	146,9
5'	6,87 (J=9,0Hz) d	115,0	115,0
6'	8,09 (J=8,5 Hz) d	130,9	121,9
<b>3-Gal</b>			
<b>1</b>	5,58	98,9	99,5
<b>2</b>		74,9	75,1
<b>3</b>		73,7	73,3
<b>4</b>		68,1	68,1
<b>5</b>		73,3	73,3
<b>Gal6</b>		65,0	64,9
<b>(2®1)Rha</b>			
<b>1'</b>	5,05	100,5	100,7
<b>2'</b>		70,6	70,0
<b>3'</b>		70,5	70,5
<b>4'</b>		71,5	71,7
<b>5'</b>		71,5	69,7
<b>6'</b>	0,79	17,2	16,9
<b>(6®1) Rha</b>			
<b>1''</b>	4,37	99,9	99,9
<b>2''</b>		70,5	70,2
<b>3''</b>		70,2	70,3
<b>4''</b>		71,8	71,5
<b>5''</b>		71,8	68,2
<b>6''</b>	1,05	17,8	17,8
<b>7-Rha</b>			
<b>1</b>	5,54	98,4	99,2
<b>2</b>		70,0	70,3
<b>3</b>		70,3	70,5
<b>4</b>		71,8	71,8
<b>5</b>		69,8	68,4
<b>6</b>	1,13	17,8	18,4

O espectro no UV de flavonóides quando dissolvido em metanol apresenta dois máximos de absorção: Banda I (330-370 nm) e Banda II (240-280 nm), variando os valores de acordo com a classe de substâncias analisadas (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Alterações no anel A podem ser observadas na absorção da Banda II, enquanto que alterações nos anéis B e C aparecem na absorção da Banda I (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Para os flavonóis a Banda I apresenta valores entre 352-385 nm. Quando o flavonol aparece substituído na posição 3 este valor passa a ser 328-357 nm. O espectro de zoll1 apresentou Banda I em 346 nm, indicando que este flavonóide é substituído na posição 3 como pode ser observado na Fig. 1.9.

A Banda I influencia no grau de oxidação do anel A. Se o espectro apresentar uma banda somente, o flavonol é derivado do kaempferol e se mostrar duas é um derivado da quercetina. O espectro da Fig. 1.9 apresenta apenas uma banda em 346 nm, confirmando ser um derivado do kaempferol.

O espectro de massas forneceu o pico de  $m/z$  887  $[M+H]^+$ ,  $m/z = 741$   $[M-rha+H]^+$ ,  $m/z = 595$   $[M-2rha+H]^+$  e  $m/z = 431$   $[M-3rha-H_2O+H]^+$  e o pico da aglicona protonada em  $m/z = 287$ , comprovando mais uma vez a estrutura proposta.



**Fig. 1.9:** Espectro de absorção de zoll1 na região do ultravioleta



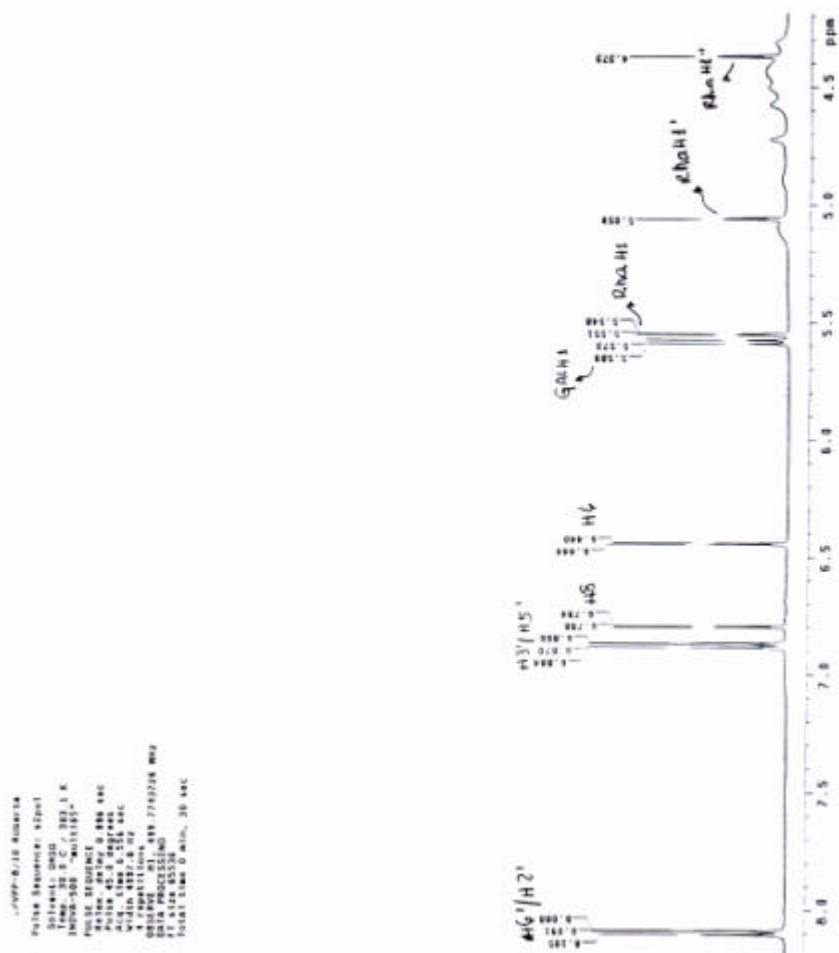


Fig. 1.3: Espectro ampliado de RMN <sup>1</sup>H de **zo11** (500 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, TMS, δ)





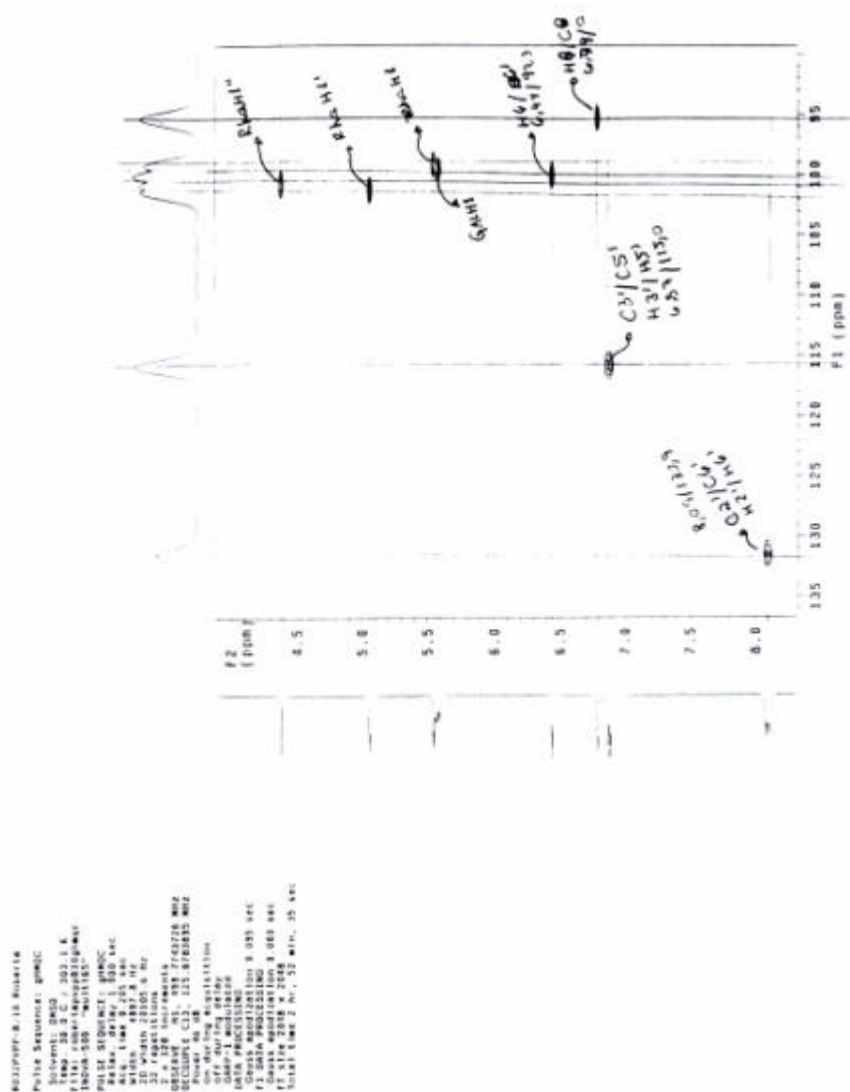
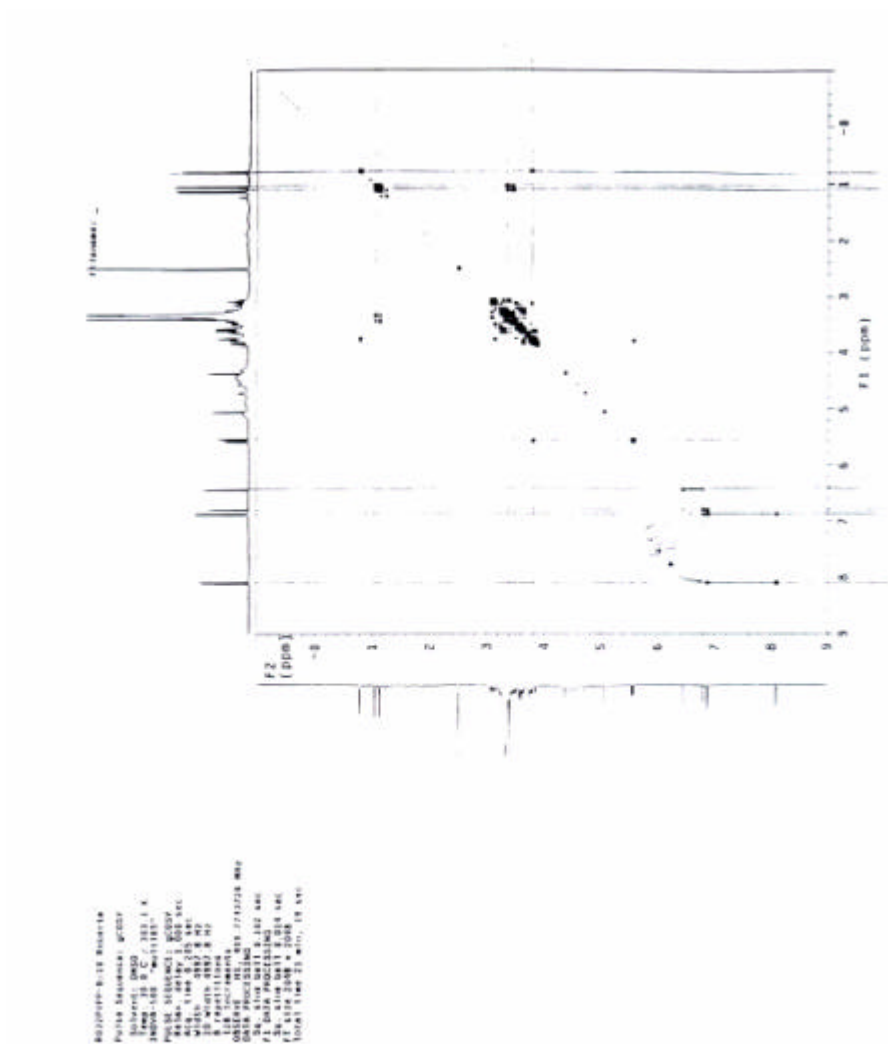


Fig. 1.5: Experimento HMQC (500 MHz, DMSO  $d_6$ ,  $\delta$ ) de **zoll1** (Expansão de área de 95 a 135 $\delta$ )



**Fig.1.6:** Espectro COSY  $^1\text{H}$  de **zol1** (500 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

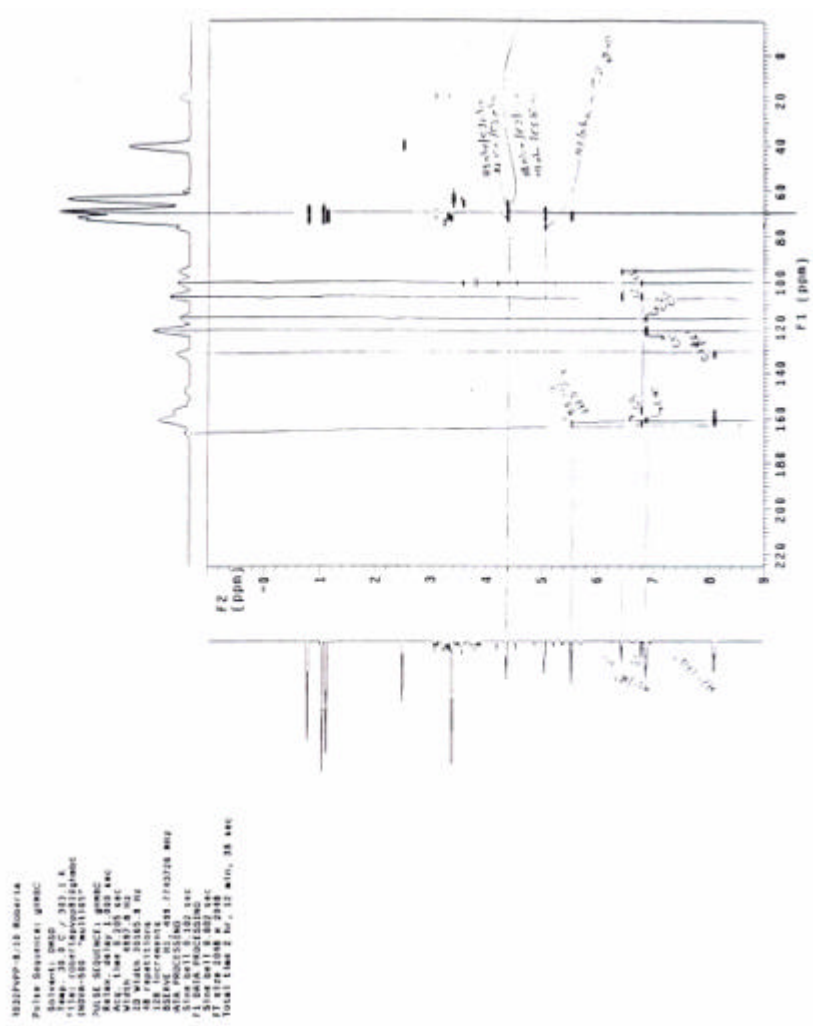


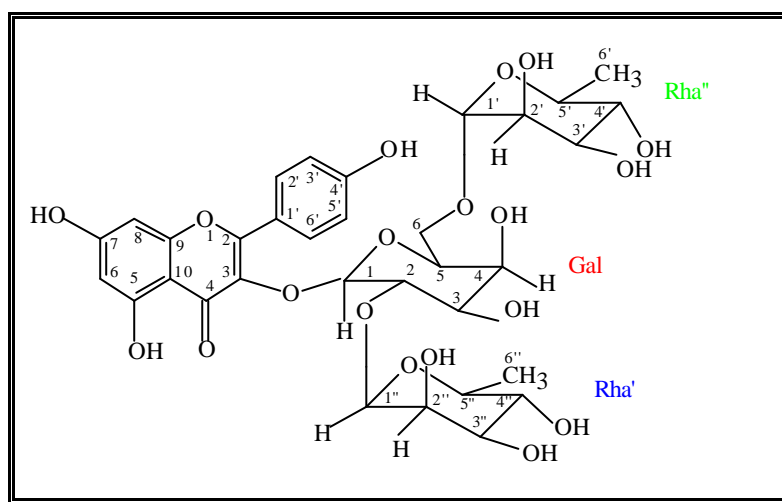
Fig. 1.7: Experimento HMBC de **zol1** (500 MHz, DMSO  $d_6$ ,  $\delta$ )

## Identificação de *zol2*

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **zol2** (Fig. 1.10, p. 40) mostrou-se semelhante ao de **zol1**. A principal diferença é a ausência do sinal em  $5,54\delta$  referente ao hidrogênio anomérico e do dubleto da metila em  $1,13\delta$ , ambos pertencentes a unidade de ramnose localizada na posição 7 do anel A de **zol1**. Além disso, na aglicona, ocorreu uma variação nos deslocamentos químicos dos sinais dos hidrogênios H6 e H8 para valores de frequência baixa (do que o de **zol1**). Isto sugeriu que OH-7 está livre, sem a unidade de ramnose (tabela 1.3).

O experimento HSQC (Fig. 1.11, p.41; tabela 1.2) forneceu a correlação dos hidrogênios e seus respectivos carbonos. A seqüência dos deslocamentos químicos de cada unidade de açúcar foi obtida através de experimentos 1D-TOCSY (Fig. 1.12, p. 42). A irradiação seletiva em cada um dos hidrogênios anoméricos em  $4,53\delta$ ,  $5,23\delta$  e  $5,62\delta$  possibilitaram individualizar os sistemas de spins de cada unidade de açúcar. Deste modo, a seqüência de açúcares ligados na posição 3 do flavonóide é igual a de **zol1**.

Assim sendo, a estrutura sugerida para **zol2** é kaempferol-7-hidróxi-3-O- $\{\alpha\text{-L-ramnopiranosil (1}\rightarrow\text{2)} - [\alpha\text{-L-ramnopiranosil (1}\rightarrow\text{6)}]\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosídeo}\}$  (Fig. 1.13).



**Fig. 1.13:** Estrutura do kaempferol-7-hidróxi-3-O- $\{\alpha\text{-L-ramnopiranosil (1}\rightarrow\text{2)} - [\alpha\text{-L-ramnopiranosil (1}\rightarrow\text{6)}]\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosídeo}\}$  isolado de *Z. ilicifolia*

**Tabela 1.2:** Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  de **zol2** (600 MHz e 150 MHz, respectivamente, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

<i>Posição</i>	<b>zol2</b>	
	<i>RMN <math>^1\text{H}</math></i>	<i>RMN <math>^{13}\text{C}</math></i>
<b>2</b>		
<b>3</b>		
<b>4</b>		
<b>5</b>		
<b>6</b>	6,20 sl	100,5
<b>7</b>		
<b>8</b>	6,40 sl	95
<b>9</b>		
<b>10</b>		
<b>1'</b>		
<b>2'</b>	8,13 (J=9,0Hz)	133,0
<b>3'</b>	6,94 (J=8,5Hz)	115,0
<b>4'</b>		
<b>5'</b>		115,0
<b>6'</b>	6,94 (J=8,5Hz)	133,0
<b>OH-5</b>	8,13 (J=9,0Hz)	
<b>3-Gal</b>		
<b>1</b>	5,62	100,8
<b>2</b>	3,96	77,9
<b>3</b>	3,70	75,8
<b>4</b>	3,80	70,8
<b>5</b>	3,60	75,5
<b>Gal6</b>	3,75, 3,48	67,1
<b>(2<sup>®</sup> 1)Rha</b>		
<b>1'</b>	5,23	102,7
<b>2'</b>	4,02	72,5
<b>3'</b>	3,82	72,5
<b>4'</b>	3,36	74,1
<b>5'</b>	4,09	69,8
<b>6'</b>	1,01	17,7
<b>(6<sup>®</sup> 1) Rha</b>		
<b>1''</b>	4,53	101,8
<b>2''</b>	3,58	72,2
<b>3''</b>	3,53	72,4
<b>4''</b>	3,36	74,1
<b>5''</b>	3,54	69,6
<b>6''</b>	1,22	18,3

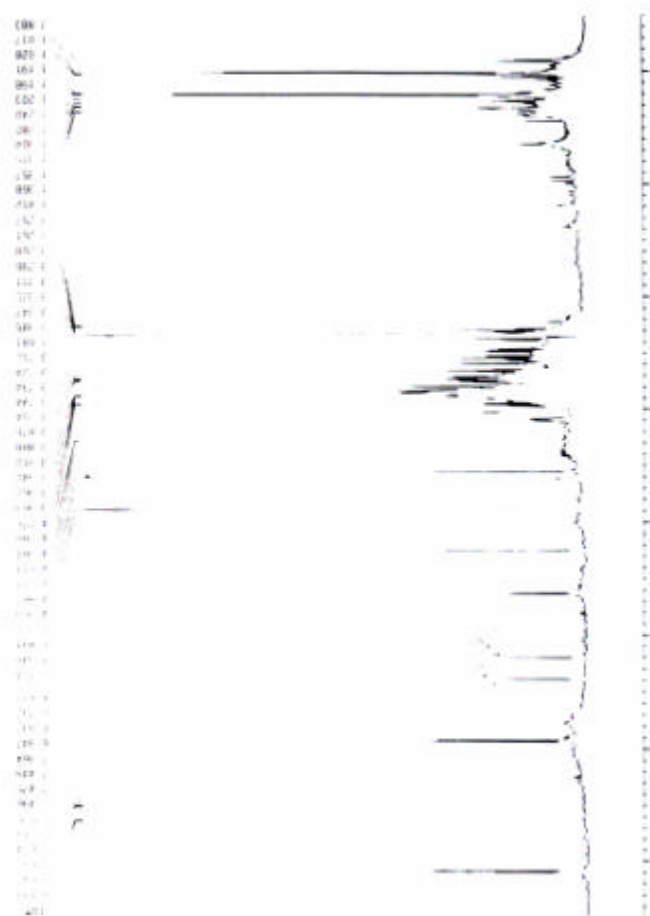


Fig. 1.10: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2012** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 1.10: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **2012** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

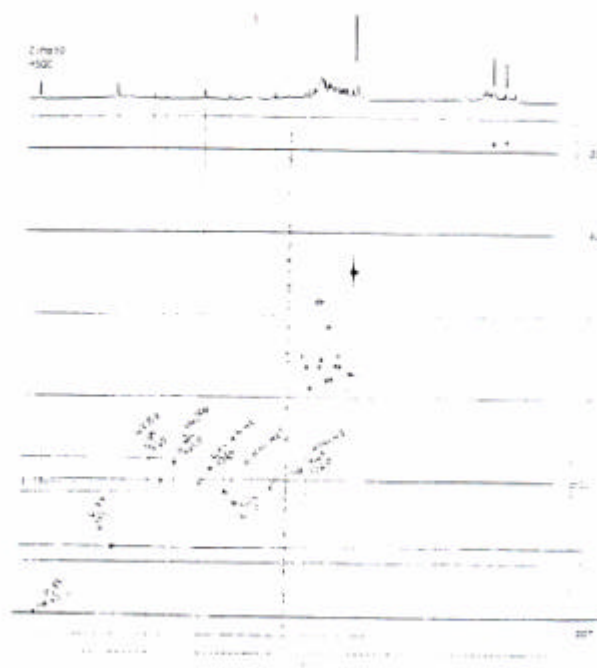


Fig. 1.11: Experimento HSQC de **zol2** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

Fig. 1.11: Experimento HSQC de **zol2** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

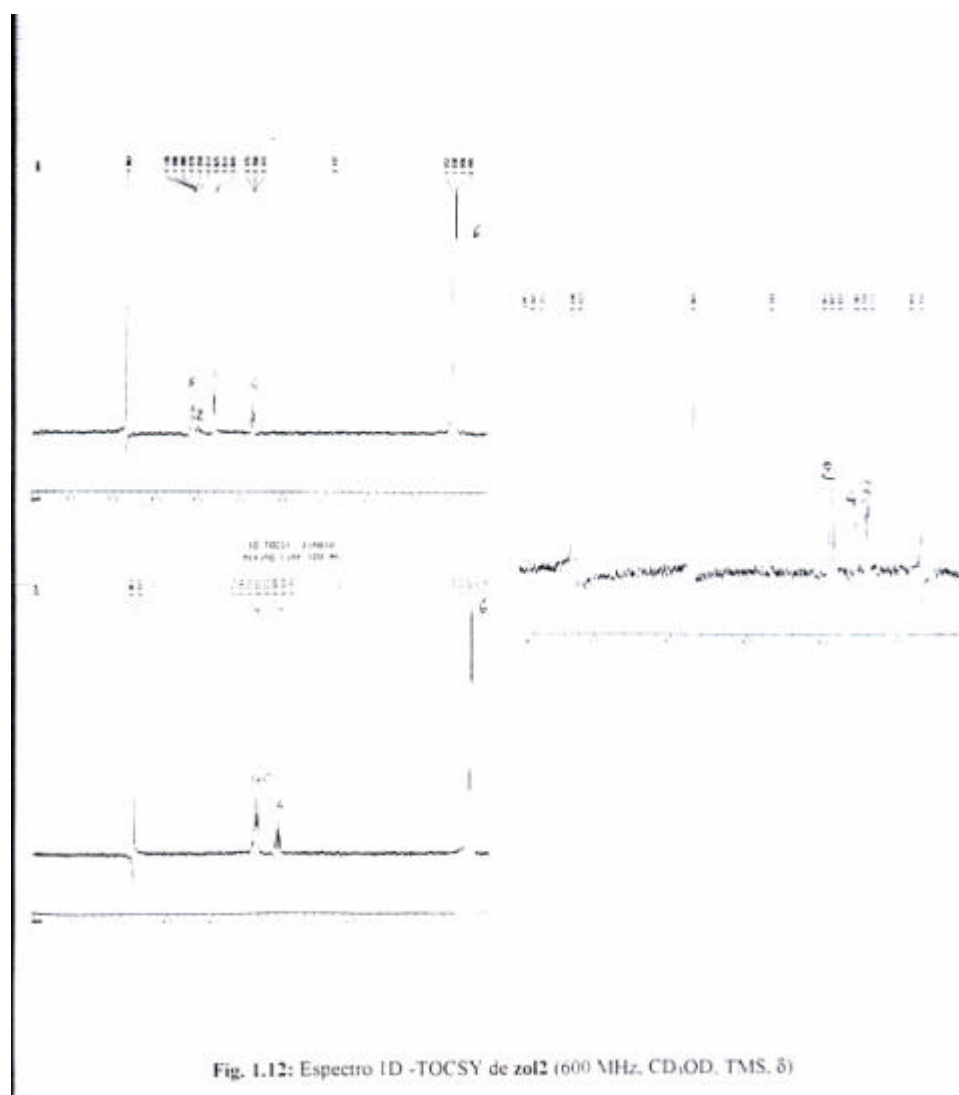


Fig. 1.12: Espectro 1D -TOCSY de **zol2** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )

**Fig. 1.12:** Espectro 1D -TOCSY de **zol2** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )

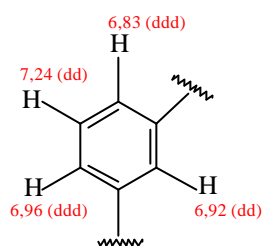


### Identificação de **zol3**

O espectro no infravermelho (Fig. 1.14, p. 47) de **zol3**, apresentou banda larga de  $\nu_{\text{OH}}$  em  $3264\text{ cm}^{-1}$ . O  $\nu_{\text{C-H}}$  alifático pôde ser observado em  $2881\text{ cm}^{-1}$  e o  $\nu_{\text{C-H}}$  aromático em  $2927\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1458$  e  $1605\text{ cm}^{-1}$  têm as bandas  $\nu_{\text{C=C}}$  aromático e em  $695$ ,  $773$  e  $886\text{ cm}^{-1}$  as bandas que mostraram que o anel aromático é metasubstituído. Por fim, a banda em  $2476\text{ cm}^{-1}$  mostrou a presença de um  $\nu_{\text{C}\equiv\text{N}}$  (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figs. 1.15, p. 48 e 1.16, p. 49) de **zol3** mostrou um padrão complexo na porção aromática. Observou-se um t em  $7,24\delta$ , um ddd ( $J= 8,0, 1,5, 1,5\text{ Hz}$ ) em  $6,96\delta$ , um dd ( $J= 1,5, 1,5\text{ Hz}$ ) em  $6,92\delta$  e um ddd ( $J= 8,0, 1,5$  e  $1,5\text{ Hz}$ ) em  $6,83\delta$ .

O espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Fig. 1.17, p. 50) confirmou estas relações dos hidrogênios no anel aromático. Deste modo, o padrão de substituição no anel aromático sugerido pode ser observado abaixo:



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 1.18, p. 51) forneceu 14 carbonos e o DEPT  $135^\circ$  (Fig. 1.19, p. 52) mostrou a presença de 3 carbonos quaternários, 5 carbonos  $-\text{CH}$  que têm deslocamentos na região de carbonos aromáticos, 6 carbonos que correspondem a  $-\text{CH}$  alifático e um carbono  $-\text{CH}_2$  alifático. O espectro HMQC (Figs. 1.20, p. 53 e 1.21, p. 54) mostrou a correlação direta entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos, como é mostrado na tabela 1.3.

**Tabela 1.3:** Correlação direta entre H e  $^{13}\text{C}$  de **zol3** (500 MHz e 125 MHz, respectivamente, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

<i>Deslocamentos Químicos (d)</i>		
<i>Posição</i>	<i>RMN <math>^1\text{H}</math></i>	<i>RMN <math>^{13}\text{C}</math></i>
<b>1</b>	–	118,8
<b>2</b>	5,90 s	66,5
<b>3</b>	–	134,9
<b>4</b>	6,92 dd ( $J=1,5; 1,5$ Hz)	114,2
<b>5</b>	–	157,8
<b>6</b>	6,83 ddd ( $J=8,0; 1,5; 1,5$ Hz)	116,6
<b>7</b>	7,24 t	130,0
<b>8</b>	6,96 ddd ( $J=8,0; 1,5; 1,5$ Hz)	118,0
<b>1'</b>	4,18 d ( $J= 8,0$ Hz)	100,9
<b>2'</b>	3,07	73,2
<b>3'</b>	3,07	77,2
<b>4'</b>	3,07	69,9
<b>5'</b>	3,07	76,6
<b>6'</b>	3,48, 3,69 d,d	61,1

No experimento HMBC (Fig. 1.22, p. 55) as principais correlações observadas são entre o hidrogênio em 5,90 $\delta$  (H2) e os carbonos aromáticos em 114,2 $\delta$  (C4), 118,0 $\delta$  (C8), 134,9 $\delta$  (C3) e 118,8 $\delta$  (C1). Este último deslocamento químico não faz parte do sistema aromático.

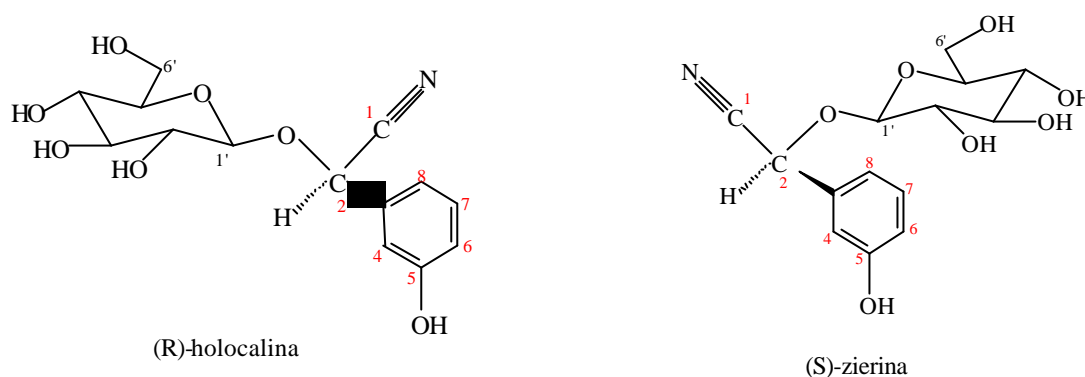
O sinal em 6,83 $\delta$  (H6) mostra correlação também com os carbonos 114,2 $\delta$  (C4) e 118,0 $\delta$  (C8). O mesmo espectro mostra a correlação do hidrogênio em 6,92 $\delta$  (H4) com 118,0 $\delta$  (C8) e 157,8 $\delta$  (C5) e em 6,96 $\delta$  (H8) com 114,2 $\delta$  (C4) e 116,6 $\delta$  (C6). Por fim, o sinal em 7,24 $\delta$  (H7) correlaciona com os carbonos 134,9 $\delta$  (C3) e 157,8 $\delta$  (C5) (Fig. 1.23, p. 56).

Na região alifática pôde-se observar as interações à longa distância do hidrogênio em 3,07 $\delta$  (H2') com os carbonos 73,2 $\delta$  (C2') e 69,9 $\delta$  (C4'). Os hidrogênios 4,18 $\delta$  (H1') e 6,92 $\delta$  (H4) mostrou correlação com o carbono em 66,5 $\delta$  (C2). Dessa forma, pode-se propor a existência de uma unidade de glicose ligada ao carbono em 66,5 $\delta$  (C2).

O experimento TOCSY (Fig. 1.24, p. 57) mostra as interações dos spins que estão associados entre si. Neste espectro pôde-se observar principalmente as interações dos

hidrogênios alifáticos que mostraram sinais em  $3,07\delta$  ( $H3'$ ,  $H4'$  e  $H5'$ ) com os hidrogênios em  $3,48\delta$  ( $H6'$ ),  $3,69\delta$  ( $H6'$ ) e  $4,18\delta$  ( $H1'$ ).

Assim, esses dados são compatíveis com a estrutura de um glicosídeo cianogênico. Dependendo da estereoquímica assumida pelo C2 quiral esta molécula vai ser denominada (*R*)-holocalina ou (*S*)-zierina (Fig. 1.25), que não são enantiômeros, mas sim diastereoisômero.



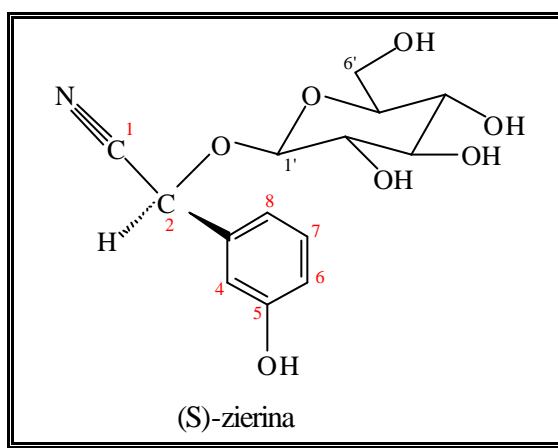
**Fig. 1.25:** Estruturas possíveis dos glicosídeos cianogênicos (**zol3**) detectados em *Zollernia ilicifolia*

Estudos espectrométricos realizados para auxiliar a determinação da configuração absoluta de substâncias quirais mostram que existem diferenças nos deslocamentos químicos dos hidrogênios metínicos do C2 de glicosídeos cianogênicos. Carbonos que possuem configuração absoluta S em seu centro estereogênico apresentam deslocamentos químicos do C2 em frequência mais baixa ( $66,0\delta$ ) do que o C2 do seu respectivo isômero R ( $69,0\delta$ ) (SEIGLER, 1975; ROCKENBACH; NAHRSTEDT; WRAY, 1992). Além disso, o hidrogênio anomérico do composto com configuração S absorve em frequência mais alta ( $4,50\delta$ ) do que o hidrogênio anomérico do isômero R ( $3,99\delta$ ) (SEIGLER, 1975).

Deste modo, comparando os resultados obtidos para **zol3** com os da literatura, observou-se que a substância **zol3**, identificada como (*S*)-zierina, apresentou deslocamento no C2 igual  $66,6\delta$  (SEIGLER, 1975; ROCKENBACH; NAHRSTEDT; WRAY, 1992). Além disso, o hidrogênio anomérico apresentou deslocamento químico semelhante ao da (*S*)-zierina.

Com a ajuda de um polarímetro, mediu-se o  $[\alpha]_D$  que foi igual a  $-28,5$ . Comparação com dados da literatura mostra que este valor se aproxima daquele referente à da (S)-zierina, que apresenta  $[\alpha]_D$  de  $-29,5$  (SEIGLER, 1975). O seu estereoisômero, (R)-holocalina, apresenta  $[\alpha]_D$  igual a  $59,0$ .

Assim, sugeriu-se que **zol3** seja a substância (S)-zierina (2S- $\beta$ -D-glicopiranosiloxi-[3-hidroxifenil]acetonitrila (Fig. 1.26).



**Fig. 1.26:** Estrutura proposta para **zol3**, isolada de *Z. ilicifolia*

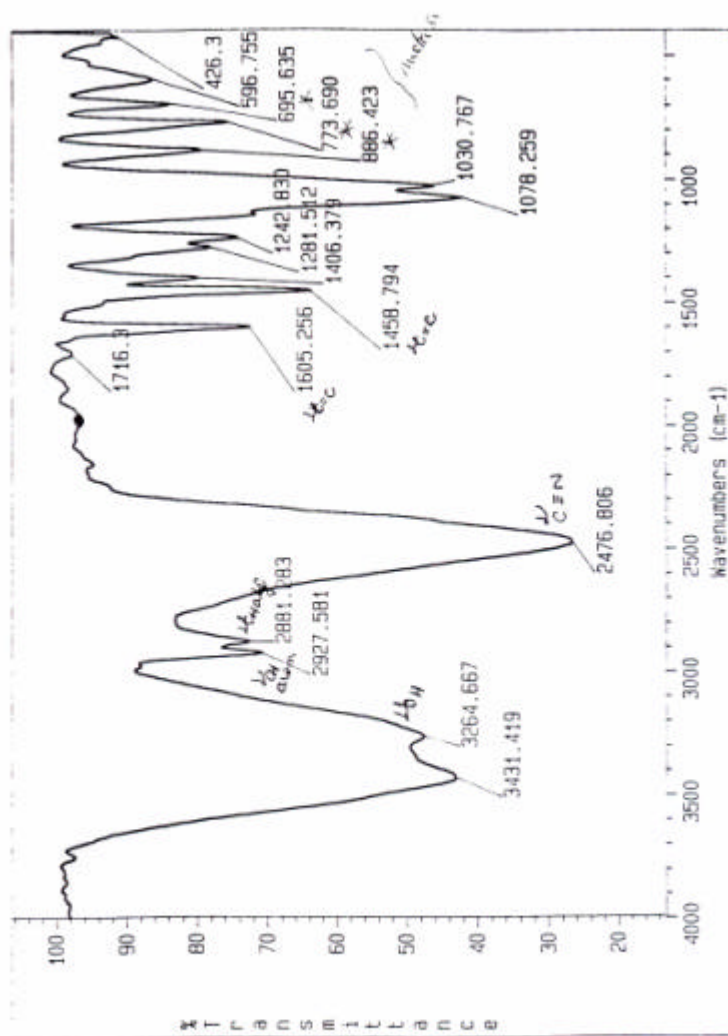


Fig. 1.14: Espectro de absorção de **2013** na região do infravermelho (KBr)

**Fig. 1.14:** Espectro de absorção de **2013** na região do infravermelho (KBr)

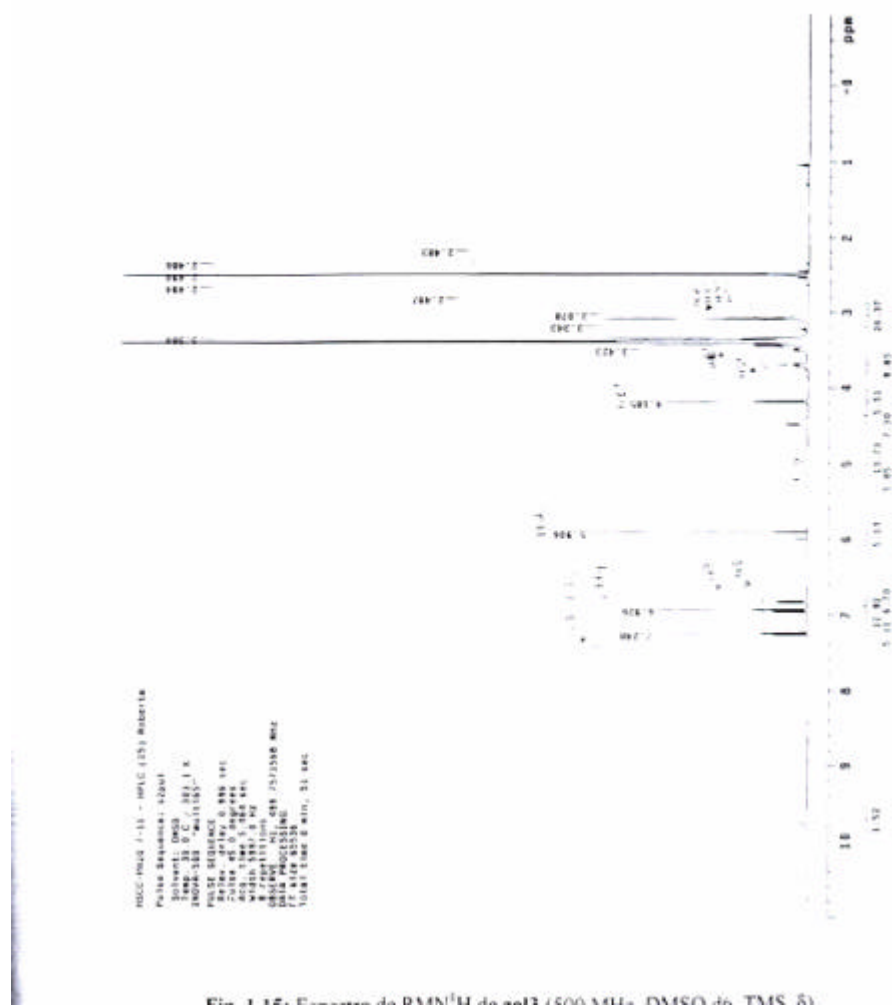


Fig. 1.15: Espectro de RMN<sup>1</sup>H de **zol3** (500 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, TMS,  $\delta$ )



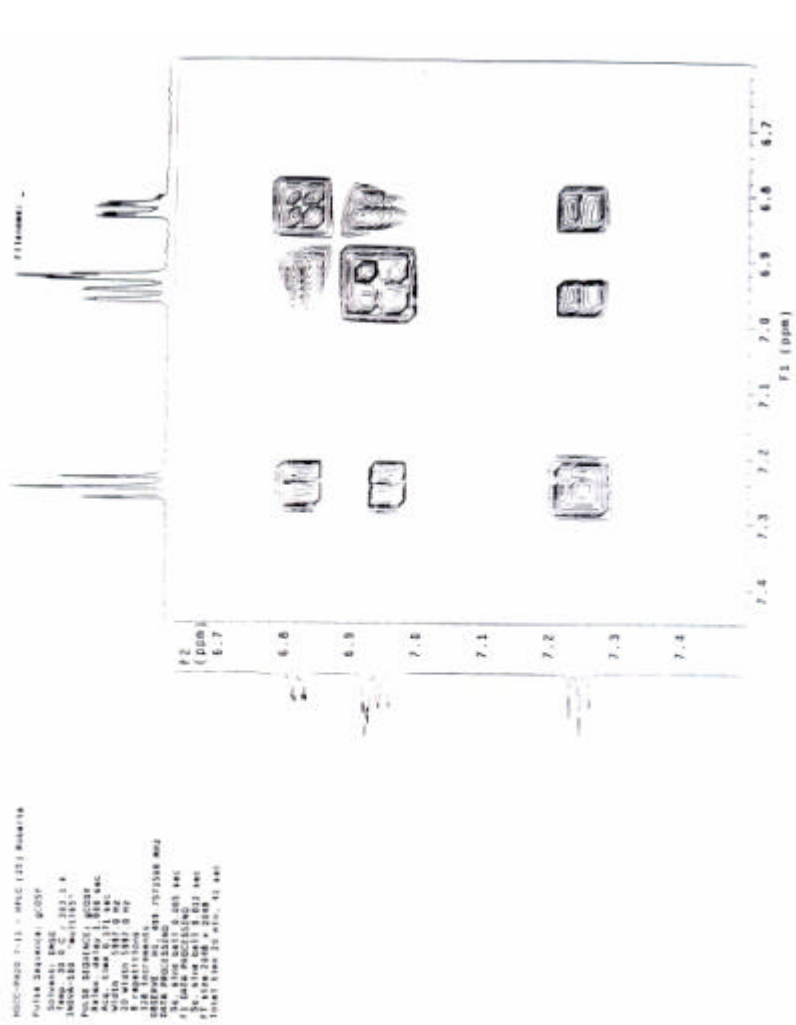


Fig. 1.17: Espectro COSY  $^1\text{H}^1\text{H}$  de **zol3** (expansão da região aromática)

Fig. 1.17: Espectro COSY  $^1\text{H}^1\text{H}$  de **zol3** (expansão da região aromática)





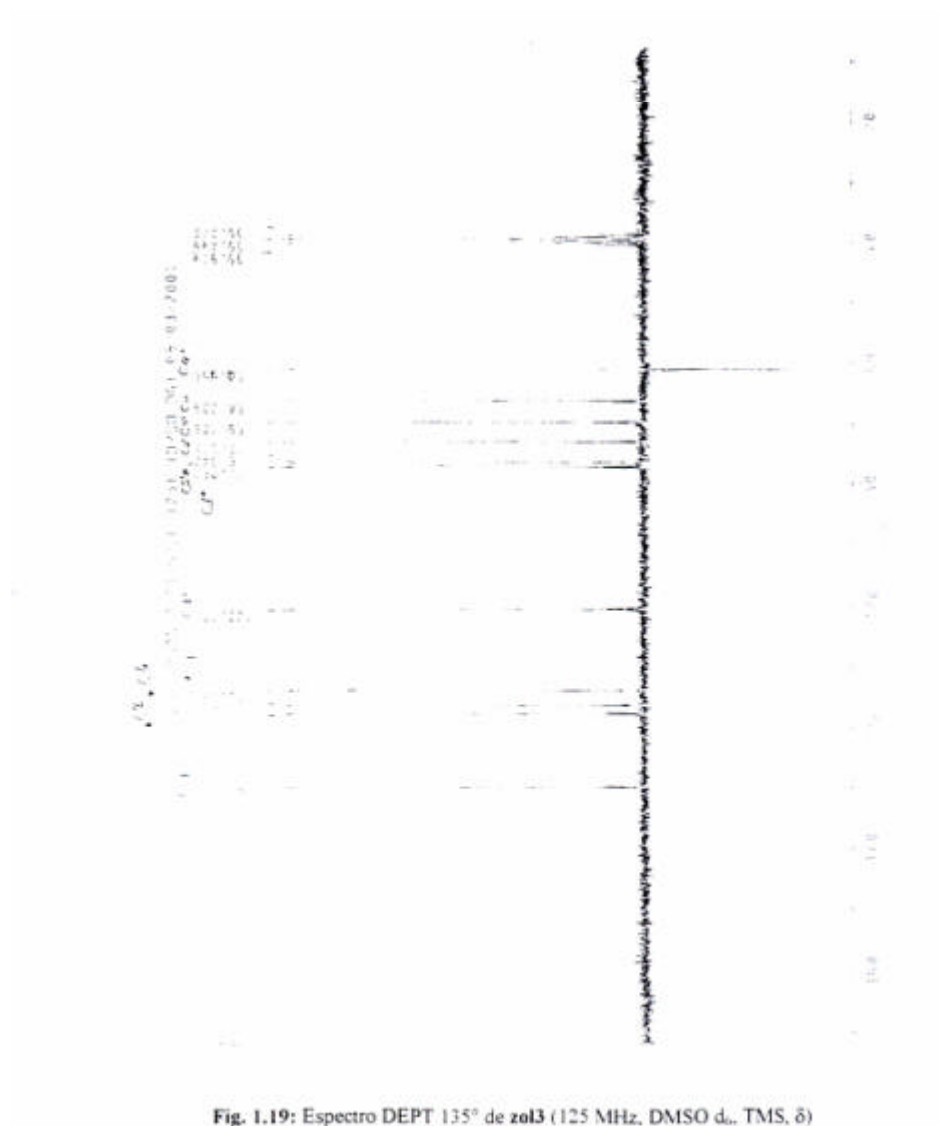


Fig. 1.19: Espectro DEPT 135° de zol3 (125 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, TMS, δ)

**Fig. 1.19:** Espectro DEPT 135° de **zol3** (125 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, TMS, δ)





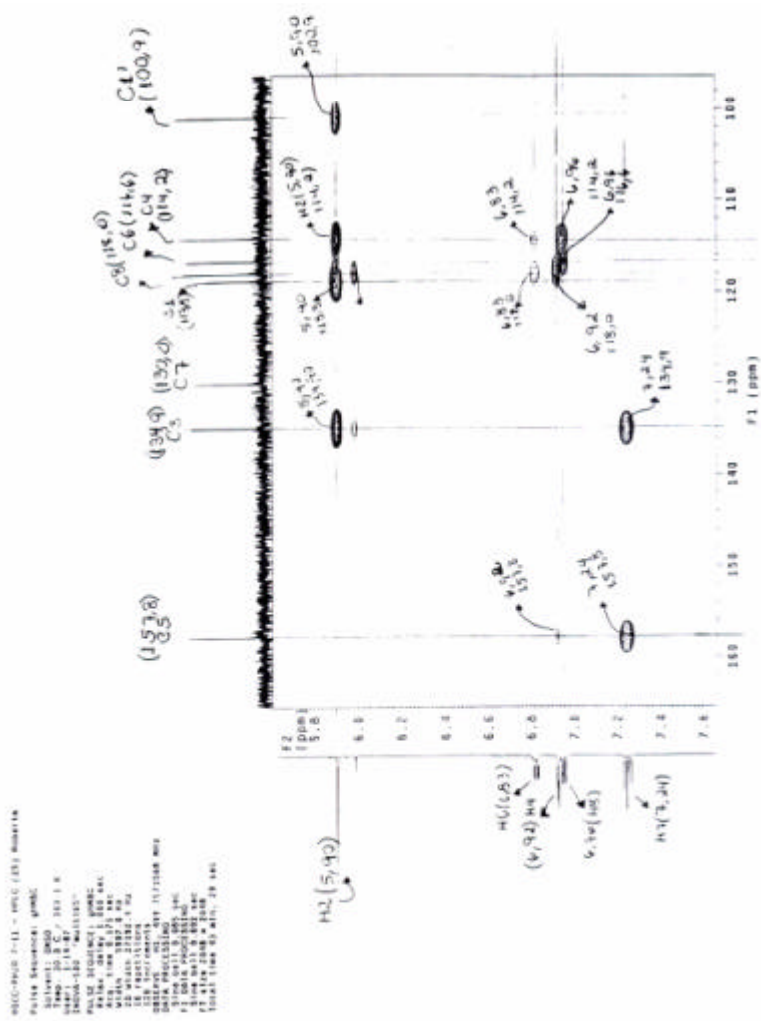


Fig. 1.22: Experimento HMBC de zo13 (500 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 1.22: Experimento HMBC de zo13 (500 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

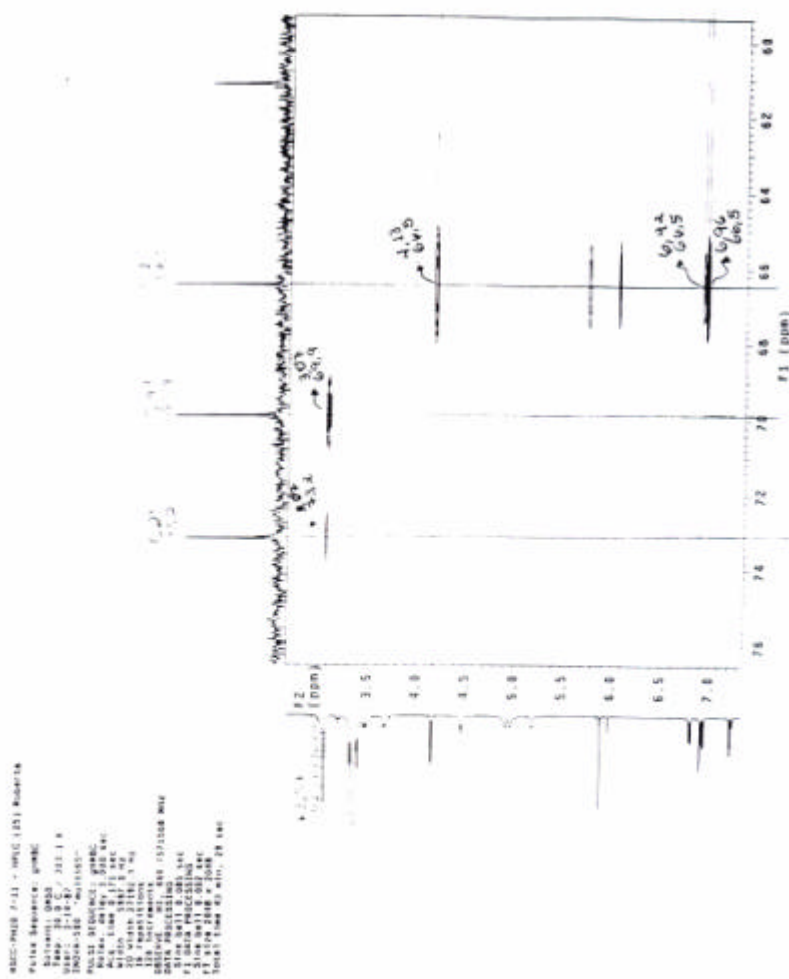


Fig. 1.23: Experimento HMBC de **2ol3** (500 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 1.23: Experimento HMBC de **2ol3** (500 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

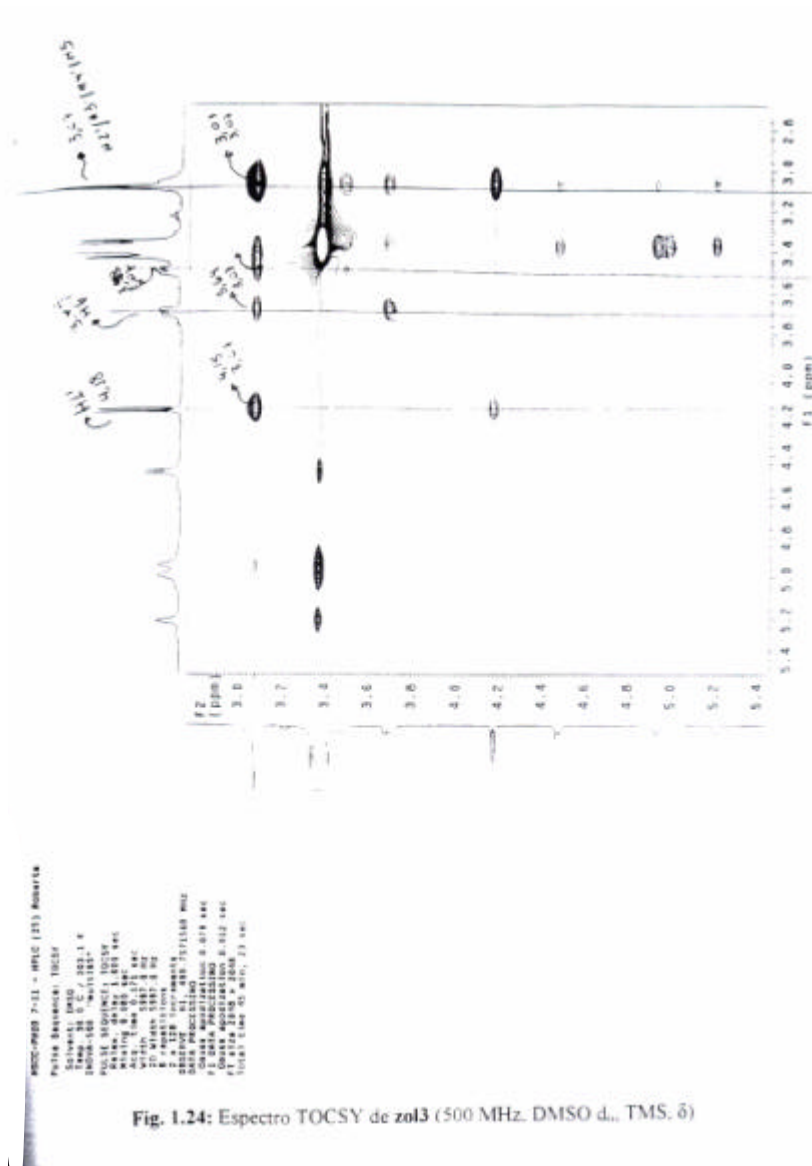


Fig. 1.24: Espectro TOCSY de zol3 (500 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, TMS, δ)

**Fig. 1.24:** Espectro TOCSY de **zol3** (500 MHz, DMSO d<sub>6</sub>, TMS, δ)

### Identificação de zol4

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 1.27, p. 60 e 1.28, p. 61) apresentou um padrão de substituição um pouco menos complexo que o apresentado por **zol3**. Além do sinal do H2 em 5,90 $\delta$ , observaram-se sinais sobrepostos de difícil determinação das constantes de acoplamentos em 7,45 $\delta$  e 7,58 $\delta$ . Comparando-se com os dados espectrais da (S)-zierina, observou-se que os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos estão em frequência mais alta. O espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Fig. 1.29, p. 62) mostrou que esses hidrogênios aromáticos estão relacionados entre si.

A análise conjunta dos experimentos HMQC (Fig. 1.30, p. 63), que apresenta as interações diretas entre hidrogênios e seus carbonos e o experimento HMBC (Fig. 1.31, p. 64), que apresenta as interações à longa distância entre hidrogênios e carbonos, possibilitou a construção de uma tabela de valores de hidrogênios e carbonos e, por comparação com dados da literatura, pôde-se identificar um outro glicosídeo cianogênico (Tabela 1.4) (NAHRSTEDT; ROCKENBACH, 1993). Comparação com dados da literatura permitiu identificar a (R)-prunasina (Fig. 1.32).

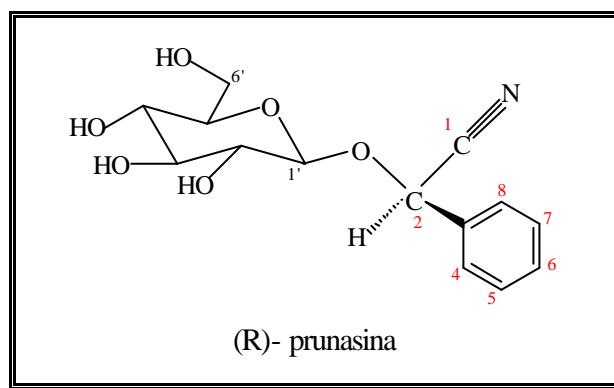


Fig. 1.32: Estrutura de **zol4** isolada de *Zollernia ilicifolia*



**Tabela 1.4:** Valores de RMN H e  $^{13}\text{C}$  de **zol4** (500 MHz e 125 MHz, respectivamente,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

<i>Deslocamentos Químicos (<math>\delta</math>)</i>		
<b>(R)-prunasina</b>		
<i>Posição</i>	<i>RMN <math>^1\text{H}</math></i>	<i>RMN <math>^{13}\text{C}</math></i>
<b>1</b>	-	119,7
<b>2</b>	5,91 s	68,5
<b>3</b>	-	134,9
<b>4</b>	7,44-7,50 m	129,0
<b>5</b>	7,55-7,61 m	130,2
<b>6</b>	-	131,0
<b>7</b>	7,44-7,50 m	129,0
<b>8</b>	7,55-7,61 m	130,2
<b>1'</b>	4,26 (d,7,7)	102,1
<b>2'</b>	-	74,8
<b>3'</b>	3,34	77,9
<b>4'</b>	3,20	71,5
<b>5'</b>	-	78,4
<b>6'</b>	3,93 (dd, 2,3; 12,1) 3,70 (dd, 5,5; 11,9)	62,9



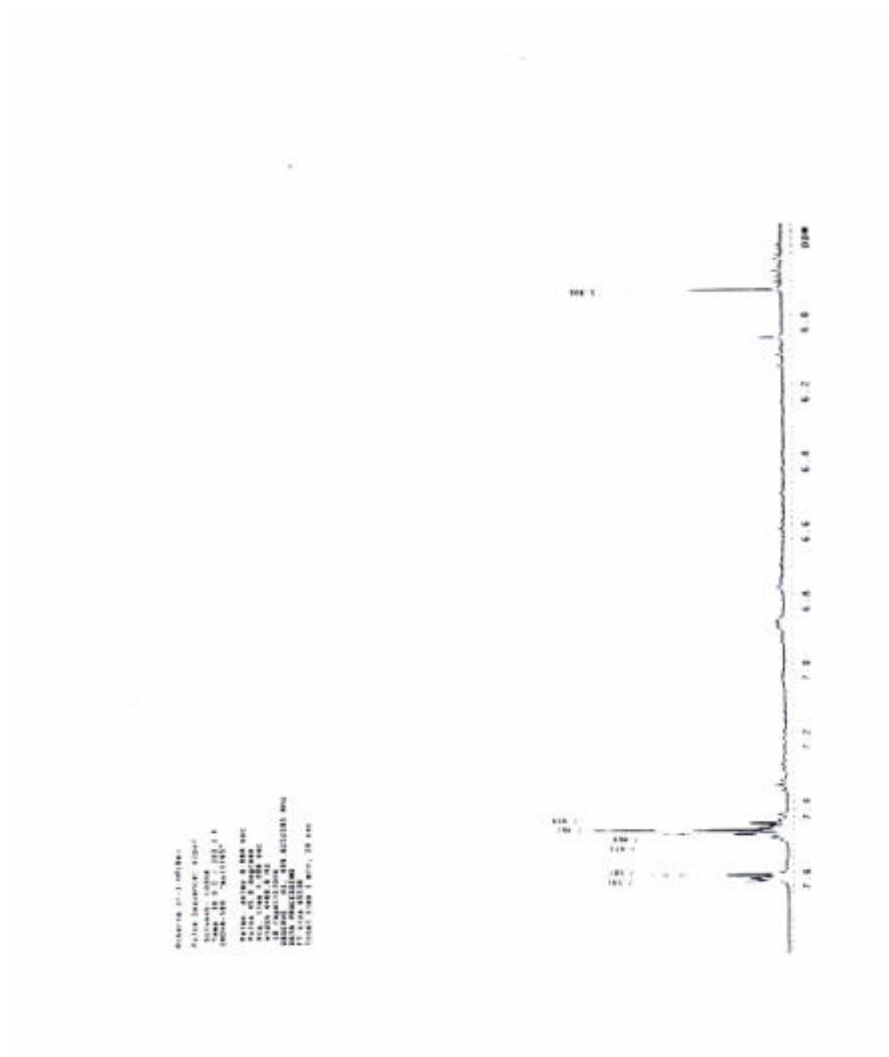
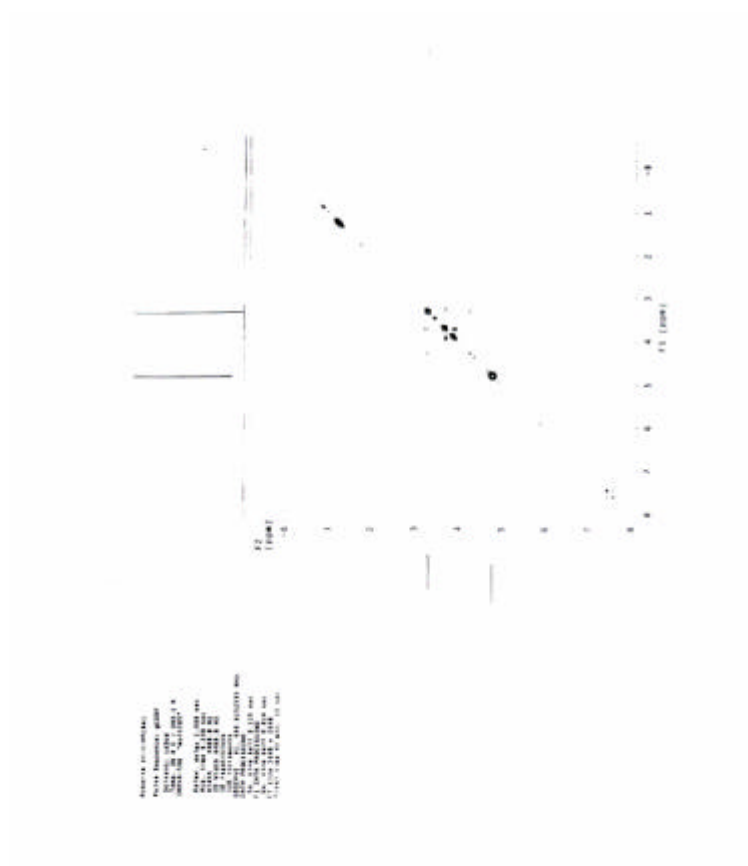


Fig. 1.28: Espectro de RMN<sup>1</sup>H de zol4 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ) (expansão da região aromática)

Fig. 1.28: Espectro de RMN<sup>1</sup>H de zol4 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ) (expansão da região aromática)



**Fig. 1.29:** Espectro COSY  $^1\text{H}^1\text{H}$  de **zol4** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

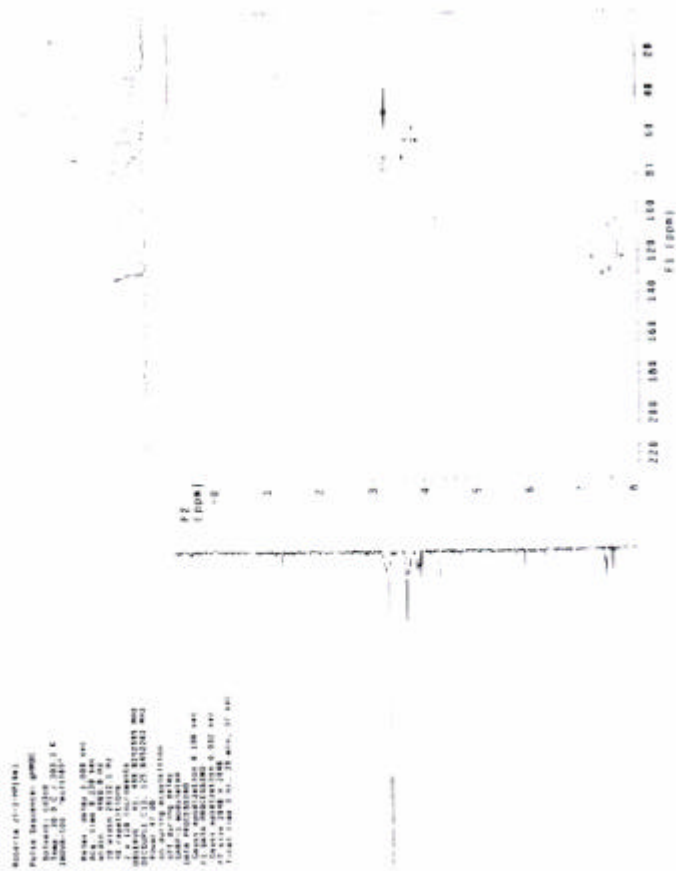


Fig. 1.30: Experimento HMQC de **zol4** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )

Fig. 1.30: Experimento HMQC de **zol4** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )

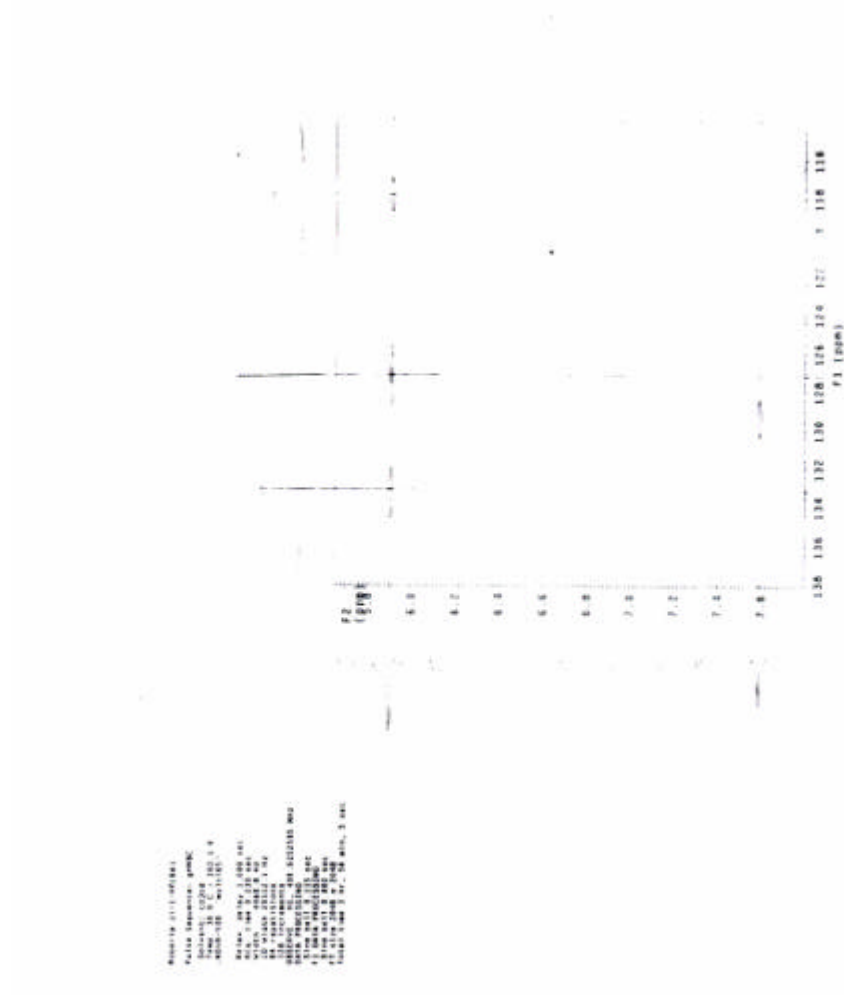
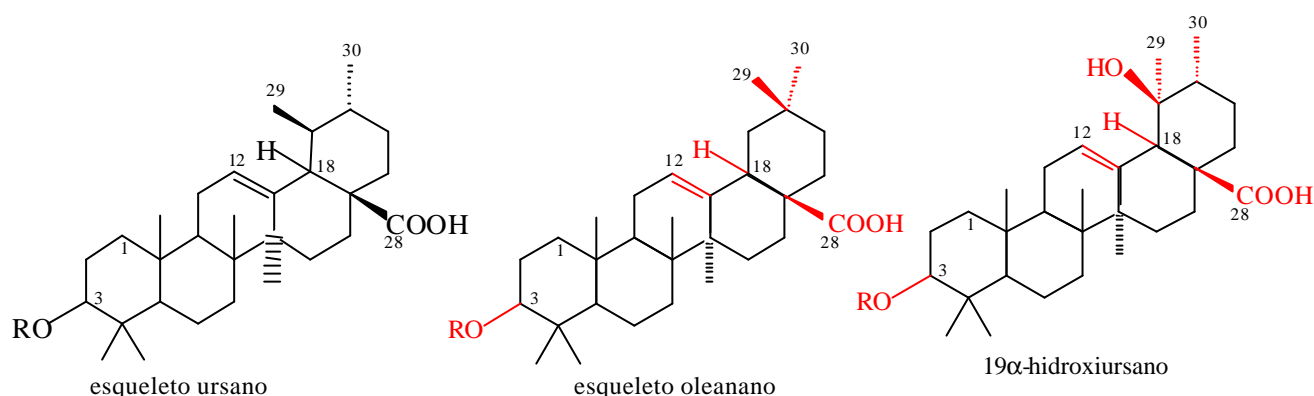


Fig. 1.31: Experimento HBMC de **zol4** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )

Fig. 1.31: Experimento HBMC de **zol4** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )

## Identificação de *zol5*

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **zol5** apresenta um conjunto de características peculiares do esqueleto de uma saponina. Isto o torna muito complexo. Inicialmente apresentaremos as características principais que podem ser encontradas em um espectro de RMN  $^1\text{H}$  de uma saponina. A Fig. 1.33 representa o esqueleto de saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos oleanólico e ursólico. A cor vermelha representa as principais características que devem ser observadas.



**Fig. 1.33:** Estrutura de esqueleto saponinas triterpênicas

Para substâncias derivadas do esqueleto oleanano observam-se sete singletos. Já para os derivados do ácido ursólico verificam-se cinco singletos e dois dubletos, referentes às metilas C29 e C30. Os derivados dos 19 $\alpha$ -hidroxiursanos apresentam 6 metilas na forma de singletos e a metila em 30 como dubleto. Nos exemplos apresentados acima, a metila 28 apresenta-se na forma de ácido carboxílico, como no caso de **zol5** (GUO; KENNE, 2000; AQUINO et al., 1997).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 1.34, p. 70) de **zol5**, observaram-se seis sinais referentes a unidades de metilas como singletos em 0,87 $\delta$ , 0,94 $\delta$ , 1,01 $\delta$ , 1,19 $\delta$ , 1,26 $\delta$  e 1,31 $\delta$ . Um dubleto foi observado em 1,33 $\delta$ .

Na região entre 2,1 $\delta$  e 2,8 $\delta$  observam-se os sinais correspondentes a H18. Para derivados do esqueleto oleanano, o sinal de H18 apresenta-se em 2,8 $\delta$  com constante de  $J=4$  e 12 Hz, mas que normalmente é observado como dubleto largo (RASTRELLI et al., 1996). Para o esqueleto ursano, o H18 apresenta sinal na região de 2,1 a 2,5 $\delta$ , que pode

estar na configuração  $\alpha$  ( $J=12$  Hz) ou  $\beta$  ( $J=5$  Hz). Quando o esqueleto é  $19\alpha$ -hidroxiursano, H18 apresenta-se em  $2,6\delta$  e apresenta-se como um singlete (Fig. 1.34, p. 70) (RASTRELLI et al., 1996).

Outra característica a ser observada é o sinal de H3. Este sinal pode ser visto entre  $3,2\delta$  e  $3,4\delta$ . Esta pequena variação entre esses deslocamentos químicos e suas constantes de acoplamentos pode indicar se o grupo hidroxila está na posição equatorial (H3 apresenta sinal em  $3,2\delta$  com constantes de  $J= 5$  e  $11$  Hz) ou axial (H3 ocorre em  $3,4\delta$  com um  $J=2,0$  e  $2,0$ Hz) (AQUINO et al., 1997). Algumas vezes esse valor está sobreposto aos dos açúcares não possibilitando a distinção dos sinais, como no caso de **zol5**.

O carbono olefínico H12 pode ser observado em  $\sim 5,3\delta$ . Em **zol5** observou-se este sinal em  $5,29\delta$ .

Nesse mesmo espectro de RMN  $^1\text{H}$ , foi possível observar a presença de três hidrogênios anoméricos em  $4,18\delta$ ,  $4,48\delta$  e  $4,95\delta$  (Fig. 1.34, p. 70), o que sugere que **zol5** deve possuir três unidades de açúcares.

O experimento HSQC (Fig. 1.35, p. 71; fig. 1.36, p. 72 e fig. 1.37, p. 73) permitiu obter as correlações entre os sinais de hidrogênios e seus respectivos carbonos (Tabela 1.6). Deste modo, foi possível observar, além dos carbonos oxigenados dos açúcares, a presença de mais três carbonos oxigenados em  $76,9\delta$ ,  $72,0\delta$  e  $92,5\delta$ , sendo este último atribuído ao C3.

O experimento HMBC apresentou principalmente as correlações dos hidrogênios das metilas com os carbonos do anel triterpênico (Fig. 1.38, p. 74). Neste espectro pudemos observar os acoplamentos de uma metila em  $1,31\delta$  com os carbonos em  $44,5$ ;  $57,3$ ;  $92,5$ . Deste modo, atribuiu-se esse sinal à metila C23 do anel triterpênico. Outra metila em  $0,94\delta$  correlaciona com os carbonos os valores em  $37,8\delta$ ,  $39,9\delta$ ,  $48,9\delta$  e  $57,3\delta$ , sugerindo ser este sinal correspondente ao C25. Outro sinal de metila pode ser observado em  $1,01\delta$ , que correlaciona com os carbonos em  $34,1$ ,  $40,5$ ,  $43,3$  e  $48,9\delta$ . Esse sinal foi atribuído ao C26. A metila em  $1,19\delta$  correlaciona com os valores de deslocamentos em  $40,5\delta$  e  $43,3\delta$  que foi atribuído ao C27. Outro sinal em  $0,87\delta$  mostra correlações com os carbonos em  $29,8\delta$ ,  $38,5\delta$ ,  $46,6$  e  $76,9\delta$  sugerindo ser  $0,87\delta$  a metila C29. O sinal em  $1,26\delta$  atribuído a C30 correlaciona com o carbono em  $38,5\delta$  atribuído ao C20.



Análise dos experimentos HMBC e HSQC e comparação com dados da literatura, sugere a presença de duas hidroxilas em 16 e 22 (YESILADA, TAKAISHI, 1999; MAHATO, KINDU, 1994).

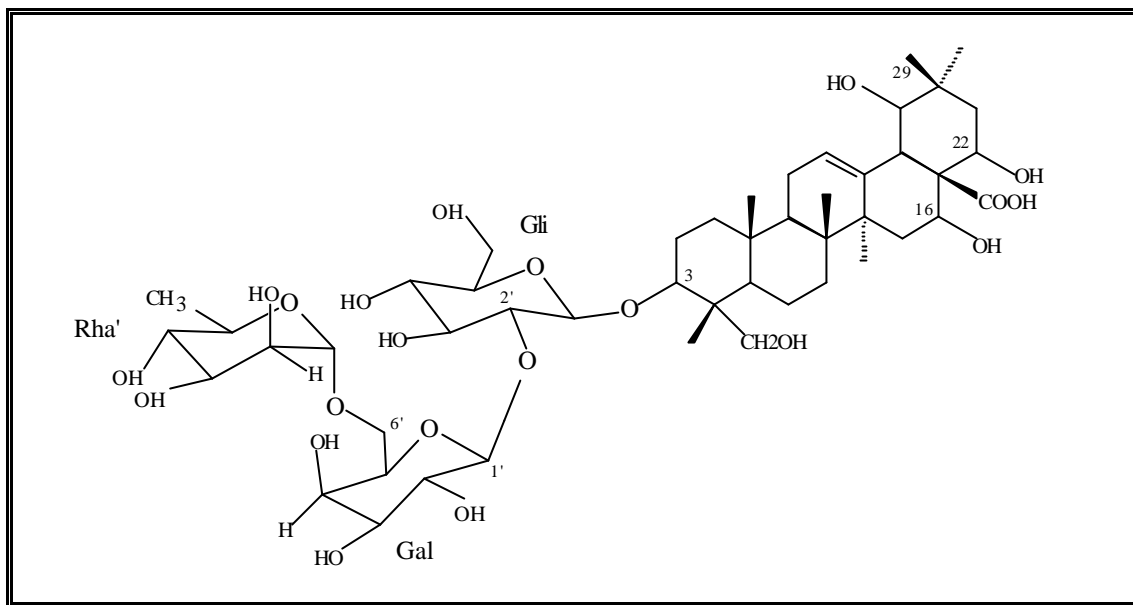
O sinal em 2,71 $\delta$  (H18) mostra correlações com os carbonos em 70,3 $\delta$  e 173,1 $\delta$ , que foram atribuídos aos C22 (quando este está substituído por uma hidroxila) e por C28. Este sinal de C28 em 173,1 sugere a presença de um ácido carboxílico ligado a este carbono.

Outros sinais observados são referentes à unidades de açúcares. Um sinal em 5,2 $\delta$  (H1-Rha) correlaciona com o carbono em 71,7 $\delta$  e outro sinal em 4,48 $\delta$  com o 83,1 $\delta$ . Além disso, pôde-se observar o sinal de uma metila em 1,33 $\delta$  (H6-Rha) que foi atribuída ao -CH<sub>3</sub> de uma unidade de ramnose. Este valor de metila mostra correlações com 69,4 $\delta$  e 74,2 $\delta$ , que são característicos de C4 e C5.

O espectro HOHAHA (Fig. 1.39, p. 75) mostrou a presença de uma unidade de glicose, galactose e ramnose. O experimento HSQC (Fig. 1.36, p. 72) mostrou a correlação entre esses sinais e seus respectivos carbonos (Tabela 1.6).

O espectro COSY <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H (fig. 1.40, p. 76) apresentou correlações que possibilitaram a confirmação das identidades dos açúcares.

Deste modo, sugerimos que **zol5** seja um derivado do ácido 3-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-glicopiranosil]-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,22 $\beta$ ,19-tetraidróxi-olean-12-eno (Fig. 1.41).



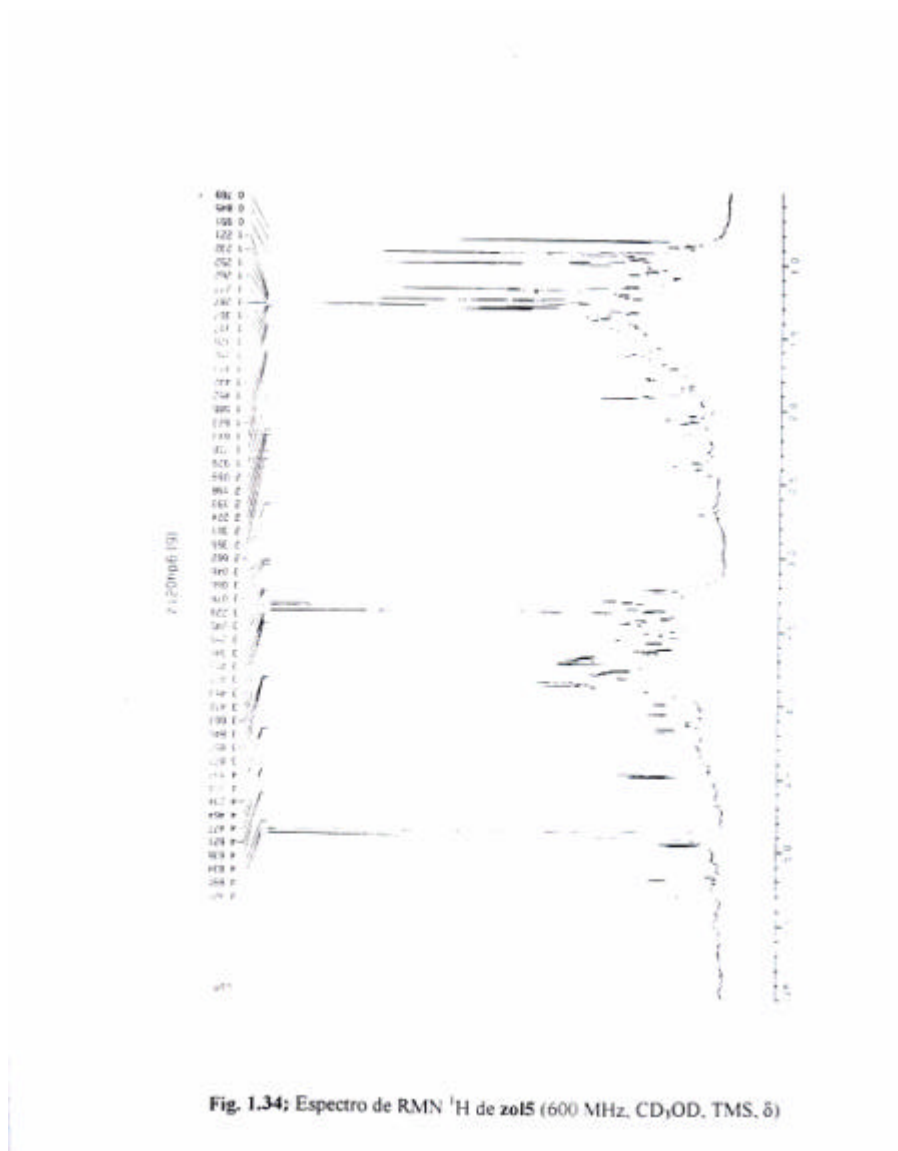
**Fig. 1.41:** Estrutura de **zol5** isolada de *Zollernia ilicifolia*

**Tabela 1.6:** Valores de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **zol5** (600 MHz e 150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

\* valores da literatura (AQUINO et al., 1997; YESILADA; TAKAISHI, 1999; GARAI; MAHATO, 1997)

\*\* valores não observados

Posição	RMN $^1\text{H}$ (zol5)	RMN $^{13}\text{C}$ (zol5)	RMN $^{13}\text{C}$ (*)
1	1,69	39,7	38,6
2	2,17	26,9	26,7
3	3,45	92,5	91,3
4	-	44,5	43,9
5	0,99	57,3	56,2
6	**	**	18,5
7		34,1	33,3
8		40,5	39,9
9	1,63	48,9	47,8
10	-	37,8	38,0
11	1,92	24,7	24,0
12	5,29	123,5	122,3
13	**	**	144,8
14	-	43,3	42,4
15	**	27,3	26,4
16	4,00	72,0	69,4
17	**	36,4	36,4
18	2,71	45,8	45,3
19	3,81	76,9	46,7
20		38,5	30,9
21	2,06	46,6	42,3
22	**	70,3	75,6
23	1,31	23,3	23,0
24	3,79	62,1	61,6
25	0,94	16,4	15,8
26	1,01	17,4	17,0
27	1,19	24,9	25,7
28	-	173,1	28,7
29	0,87	29,8	33,3
30	1,26	26,1	21,2
<b>Glicose</b>			
1	4,95	101,9	102,0
2	3,52	83,1	83,4
3	3,63	78,3	78,4
4	3,31	71,6	71,7
5	3,30	77,9	78,0
6	3,69; 3,88	62,5	62,7
<b>Galactose</b>			
1	4,48	105,6	105,2
2	3,30	75,0	74,8
3	3,21	75,1	74,9
4	4,07	71,1	70,9
5	3,30	75,0	75,0
6	4,18	64,3	64,2
<b>Ramnose</b>			
	5,20	102,4	101,9
	3,73	72,0	72,4
	3,43	71,2	71,9
	3,43	74,1	74,3
	4,13	69,4	69,5
	1,33	18,2	19,0



**Fig. 1.34:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **zol5** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

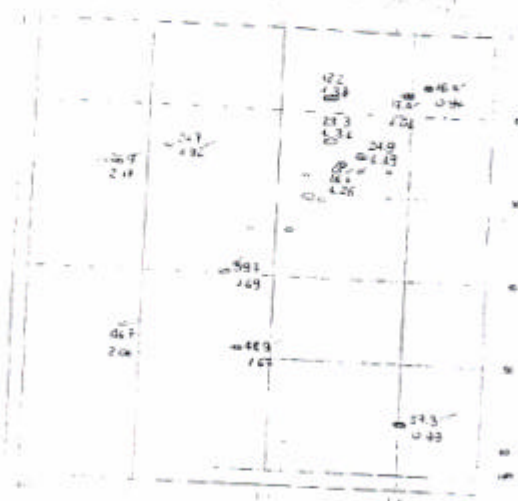


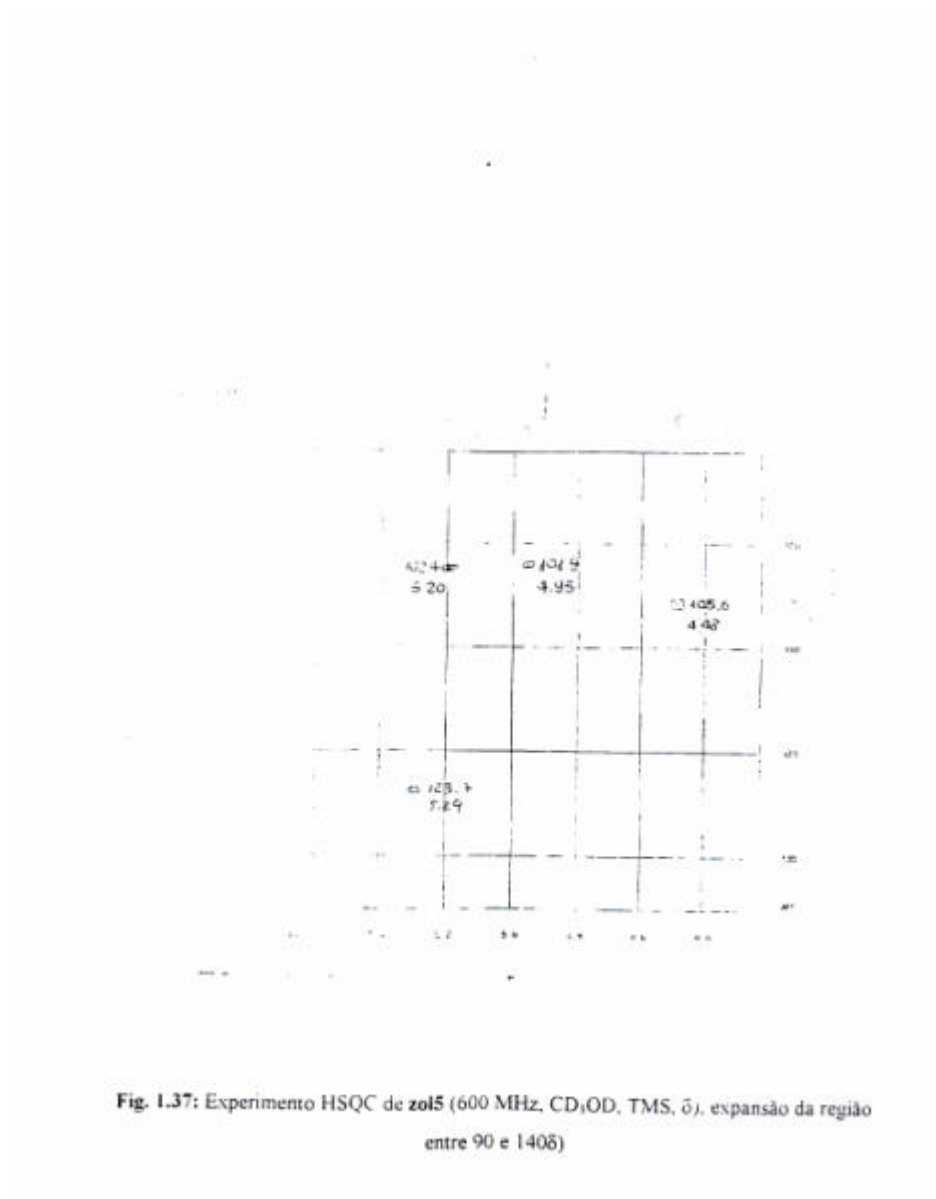
Fig. 1.35: Experimento HSQC de **zol5** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ ), expansão da região entre 10 e 60 $\delta$ )

**Fig. 1.35:** Espectro HSQC de **zol5** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ ), expansão da região entre 10 e 60 $\delta$ )



Fig. 1.36: Experimento HSQC de **zo15** (600 MHz,  $CD_3OD$ , TMS,  $\delta$ ), expansão da região entre 40 e 100 $\delta$ )

Fig. 1.36: Experimento HSQC de **zo15** (600 MHz,  $CD_3OD$ , TMS,  $\delta$ ), expansão da região entre 40 e 100 $\delta$ )



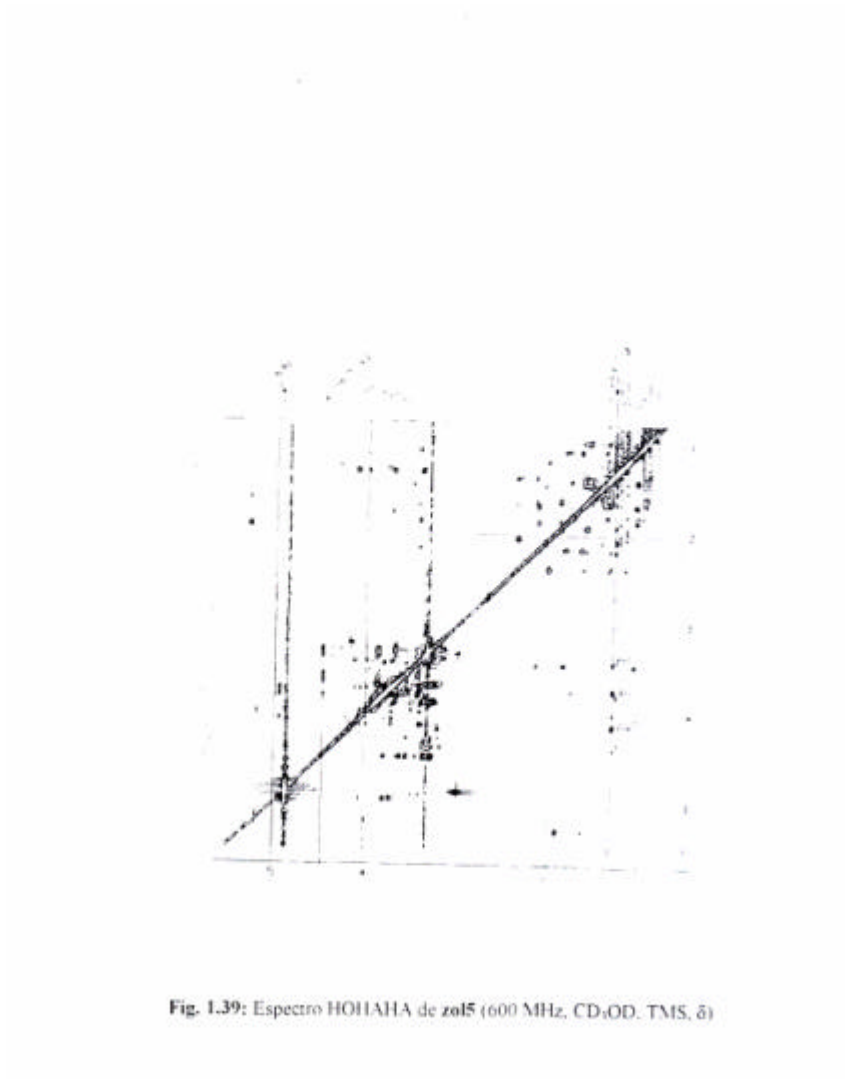
**Fig. 1.37:** Espectro HSQC de **zol5** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ ), expansão da região entre 90 e 140 $\delta$ )



Fig. 1.38: Experimento HMBC de **15** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )

**Fig. 1.38:** Espectro HMBC de **15** (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ )





**Fig. 1.39:** Espectro HOHAHA de **zol5** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

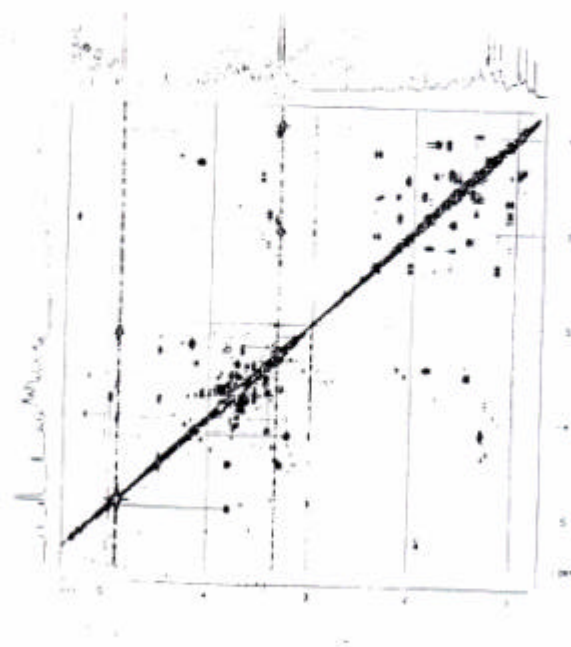


Fig. 1.40: Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  de **zol5** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

**Fig. 1.40:** Espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  de **zol5** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

### I.2.5. Considerações parciais

Existem inúmeros trabalhos que relatam a atividade antiúlcera envolvendo flavonóides. C. La Casa et al. (2000) descrevem o efeito da rutina em lesões gástricas induzidas por etanol 70%. De acordo com o autor, a rutina, um flavonol glicosilado derivado da quercetina, induziu um aumento significativo na atividade enzimática, mais alto que o grupo do controle. Esse resultado sugere um efeito gastroprotetor da rutina nesse modelo experimental através de um efeito anti-lipoperoxidante e também por um aumento da atividade enzimática.

Outros flavonóides como o kaempferol e a quercetina foram testados e também apresentaram efeito antiulcerogênico no modelo induzido por etanol acidificado em ratos (IZZO et al., 1994). Em outro trabalho (REYES et al., 1996), o pré tratamento realizado com uma fração rica em flavonóides de *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera mostrou a diminuição de úlceras gástricas. O experimento foi realizado com a indução de úlceras por administração oral de etanol

Sannomiya et al. (1998), estudando a infusão de *Maytenus aquifolium*, encontrou os flavonóis tetraglicosilados: kaempferol-3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo} e quercetina-3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo}. A autora verificou o efeito antiúlcera de uma fração aquosa em que os flavonóides tetraglicosilado estavam presentes. A partir dos resultados obtidos, sugeriu-se uma correlação entre este flavonóide e atividade das folhas de *Maytenus*, visto que esta substância é considerada como constituinte majoritário do chá. Leite et al. (2001) realizaram um estudo com a infusão desta espécie o qual foi verificado a presença de derivados do kaempferol com duas e três unidades de açúcares (kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e o kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) e a quercetina triglicosilada (quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo). Além disso, os autores realizaram análise quantitativa dos flavonóides isolados na infusão. Esta análise apresentou como constituintes majoritários os derivados

tetraglicosilados do kaempferol e quercetina-3-O-{ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)-[ $\beta$ -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo}, assim sugerindo mais uma vez a atividade apresentada por esses flavonóides tetraglicosilados.

Alguns trabalhos encontrados na literatura sugerem que a atividade antioxidante esteja ligada com os efeitos antiúlcera dos flavonóides (YESILADA et al., 2000). Os flavonóis tri- e tetraglicosilados isolados de *Zollernia ilicifolia* podem apresentar esta atividade ou um efeito sinérgico das substâncias presentes nesse extrato.

As saponinas têm suas atividades biológicas relatadas na literatura por seus efeitos tensoativos, moluscicida, antiinflamatórios, anti-câncer, antibiótico e hemolítico. Mas poucas vezes a atividade anti-úlceras tem sido associada à presença de saponinas (MATSUDA et al., 1998).

Estudos feitos em algumas plantas do gênero *Swartzia*, que é o mais próximo de *Zollernia* sugerem que as saponinas encontradas em algumas espécies africanas deste gênero, tenham atividade moluscicida (BOREL; HOSTETTMANN, 1987).

Das flores de *Spartium junceum* (Fabaceae) foi isolada uma saponina denominada spartitriosídeo. Esta substância exibiu um potencial efeito antiulcerogênico contra úlceras induzidas por etanol em ratos (YESILADA; TAKAISHI, 1999). A saponina isolada de *Spartium junceum* apresenta algumas características estruturais semelhantes a **zol5**, como a presença de grupos hidroxilas nos carbonos 16 e 22.

Sete saponinas derivadas do ácido oleanólico foram testadas em lesões causadas pela indometacina, por etanol e ligadura do piloro na mucosa gástrica. Apresentaram efeitos gastroprotetores, mas os mecanismos precisam ser melhor analisados (MATSUDA et al., 1998).

Alguns triterpenos, como o ácido oleanólico, que está presente em várias espécies vegetais, tais como as flores de *Prosopis glanulosa*, espécies de *Calendula*, espécies de *Helianthus* e *Solidago* foram patenteados como compostos antiulcerogênicos, depois de comprovada a atividade contra úlceras induzidas por aspirina, indometacina, reserpina e tetragastrina. Como já dito anteriormente, a aspirina e indometacina abaixam os níveis de prostaglandinas inibindo sua síntese. O ácido oleanólico promove a restauração dos níveis dessas prostaglandinas (LEWIS; HANSON, 1991).

Dessa forma, é possível supor que a saponina encontrada no extrato MeOH 70% de *Zollernia ilicifolia* possui tal atividade. Mas é necessário realizar de testes para tal comprovação.

Os glicosídeos cianogênicos podem ser definidos quimicamente como glicosídeos de  $\alpha$ -hidroxinitrilas e são derivados biossinteticamente de aminoácidos. Na espécie *Zollernia ilicifolia* foi encontrado um derivado da fenilalanina (VETTER, 2000).

Os glicosídeos cianogênicos estão presentes em mais de 2500 espécies de plantas. Alguns deles foram mais estudados por pertencerem a espécies de plantas economicamente importantes, como é o caso da linamarina, encontrada em *Manihot esculenta* (mandioca), dhurrina foi encontrada em *Sorghum amygdalin* (sorgo); amydalina em espécies de Rosáceas (diversas frutas comestíveis); lotaustralina em *Lótus corniculatus*, etc (VETTER, 2000).

A ocorrência ou ausência de substâncias cianogenéticas tem possivelmente importância quimiotaconômica, mas essas relações ainda são pouco ou não foram estudadas. Em espécies de três sub-famílias de Fabaceae foram descritas algumas dessas substâncias, mas existe a necessidade de uma investigação mais profunda (VETTER, 2000).

Todos os glicosídeos cianogênicos são perigosos devidos à produção de HCN via hidrólise (espontânea ou por reações enzimáticas). Muitos estudos publicados em revistas especializadas relatam a toxicidade dessas substâncias em animais. Observaram-se diferenças na sensibilidade de diferentes espécies animais, nas doses letais de plantas, na variação de produção de HCN, etc. Partes diferentes (folhas, galhos ) de *Prunus padus* foram dadas a bezerros de três anos de idade. Esses animais exibiram sinais de anorexia, depressão, bruxismo e salivação excessiva (VETTER, 2000).

A presença de glicosídeo cianogênico em *Zollernia ilicifolia* é bastante preocupante tendo em vista que o ensaios farmacológicos preliminares com camundongos constataram a morte dos mesmos após tratamento oral com o extrato MeOH 70%. Esse extrato matou uma fêmea (2916 mg/kg), 5 fêmeas (5248 mg/kg) e 4 machos (5248 mg/kg). Embora, essa concentração seja muito elevada este fato precisa ser analisado cuidadosamente. Além disso, animais tratados com esse extrato exibiram um aumento de irritabilidade, diminuição dos batimentos cardíacos e da atividade motora.

### I.2.6. Análise do extrato clorofórmico

Para fins de conhecimento da fitoquímica de *Z. ilicifolia* realizamos o estudo do extrato clorofórmico.

O extrato clorofórmico (1,2 g) foi fracionado por coluna de sílica utilizando-se gradiente de tolueno, acetato de etila e metanol. As frações foram analisadas por CCDC e agrupadas de acordo com a semelhança.

A fração 4-7(5) foi analisada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e apresentou sinais característicos dos esteróides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol. Para confirmar a presença desses esteróides, analisamos esta fração por CG-DIC, injetando uma mistura de padrões de  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol. Esta análise permitiu confirmar a presença do  $\beta$ -sitosterol e ainda evidenciou a presença do estigmasterol e do campesterol na amostra.

As frações 45-58 e 70-77, que foram previamente metiladas com diazometano foram dissolvidas em hexano e analisadas por CG-EM e seus cromatogramas apresentaram picos em tempos de retenção coincidentes das amostras quando comparados ao padrão de ésteres metílicos. Desse modo, verificou-se que a fração 45-58 apresentou picos majoritários relativos aos ácidos  $\text{C}_{12}$  (láurico),  $\text{C}_{14}$  (mirístico),  $\text{C}_{16}$  (palmítico) e  $\text{C}_{18}$  (esteárico) e a fração 70-77 apresentou picos majoritários relativos aos ácidos  $\text{C}_{14}$  (mirístico),  $\text{C}_{16}$  (palmítico) e  $\text{C}_{18}$  (esteárico). Desse modo, o extrato clorofórmico de *Zollernia ilicifolia* apresentou em sua composição os esteróides campesterol, estigmasterol e sitosterol e também ácidos graxos.

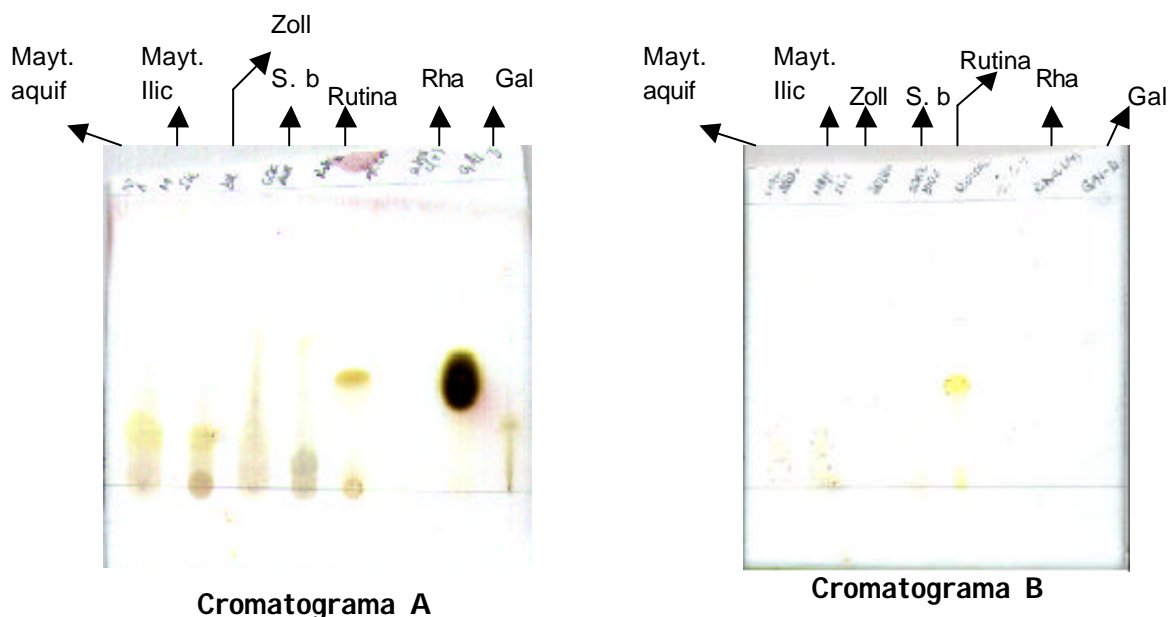
### I.3. Análise comparativa dos chás de espinheiras-santas

Como parte deste trabalho, realizou-se a análise comparativa das infusões das folhas das espécies *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae), *Maytenus aquifolium* (Celastraceae), *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) e *Sorocea bomplandii* (Moraceae). Visando verificar possíveis diferenças químicas entre estas espécies, as análises foram realizadas por CCDC e por HPLC-DAD.

Prepararam-se infusões tomando 1 g de folhas moídas de cada planta acrescentando 10 ml de água fervente. Abafou-se com papel alumínio e deixou-se em repouso até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, filtrou-se em algodão e concentrou-se em rotoevaporador.

#### I.3.1. Análises por CCDC

A análise das infusões por CCDC foi realizada em placas de sílica gel, eluindo-se com misturas de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-ProOH}/\text{H}_2\text{O}$  5:6:1:4, fase inferior. Uma vez que as espécies *Maytenus aquifolium* e *Maytenus ilicifolia* já possuem seus constituintes majoritários identificados sendo flavonóides (VILEGAS et al., 1999), optou-se colocar padrão de açúcares ramnose e galactose, visto que estes açúcares são encontrados como constituintes dos flavonóides glicosilados das espécies de *Maytenus*, e a rutina por ser um flavonóide polar derivado da quercetina com duas unidades de açúcares (quercetina-3-O-glucoranosídeo) na posição 3. Além disso pudemos obter informações sobre a glicosilação dos constituintes dos chás. Foram eluídas duas placas cromatográficas, uma revelada com solução de NP/PEG e outra com solução de anisaldeído/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Fig. 1.42).



**Fig. 1.42:** Cromatograma dos chás de espinheiras-santas ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-ProOH}/\text{H}_2\text{O}$  5:6:1:4, fase inferior)  
**A:** Revelador anisaldeído/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ .  
**B:** Revelador NP/PEG

Observaram-se manchas de Rf's muito pequenos (entre  $\sim 0,1$  e  $\sim 0,4$ ) nas frações dos chás. Na placa revelada com solução de anisaldeído, observou-se a presença de manchas amareladas de Rf  $\sim 0,2$  e  $\sim 0,4$ , que podem ser atribuídas aos flavonóides nos chás de *Maytenus ilicifolia*, *Maytenus aquifolium* e *Zollernia ilicifolia*. Tais manchas não foram observadas no chá de *Sorocea bomplandii*. O chá de *Sorocea bomplandii* revelou manchas marrons de Rf  $\sim 0,1$  que podem atribuídas aos açúcares, uma vez que carbonizam quando em contato com o ácido sulfúrico. Este resultado está de acordo com o obtido por Andrade (1996). O autor evidencia a presença de grande quantidade de açúcares (ANDRADE, 1996).

Os chás das duas espécies de *Maytenus* apresentaram manchas de Rf  $\sim 0,1$  e  $0,2$ , que se tornaram amareladas e alaranjadas quando reveladas com NP/PEG, confirmando a presença dos flavonóides derivados do kaempferol e da quercetina isolados anteriormente (SANNOMIYA et al., 1998; VILEGAS et al., 1999). *Zollernia ilicifolia* revelou manchas levemente amareladas, com Rf's entre  $\sim 0,1$  e  $\sim 0,4$ . O chá de *Sorocea bomplandii* não indicou a presença significativa de flavonóides, conforme anteriormente constatado (ANDRADE, 1996).



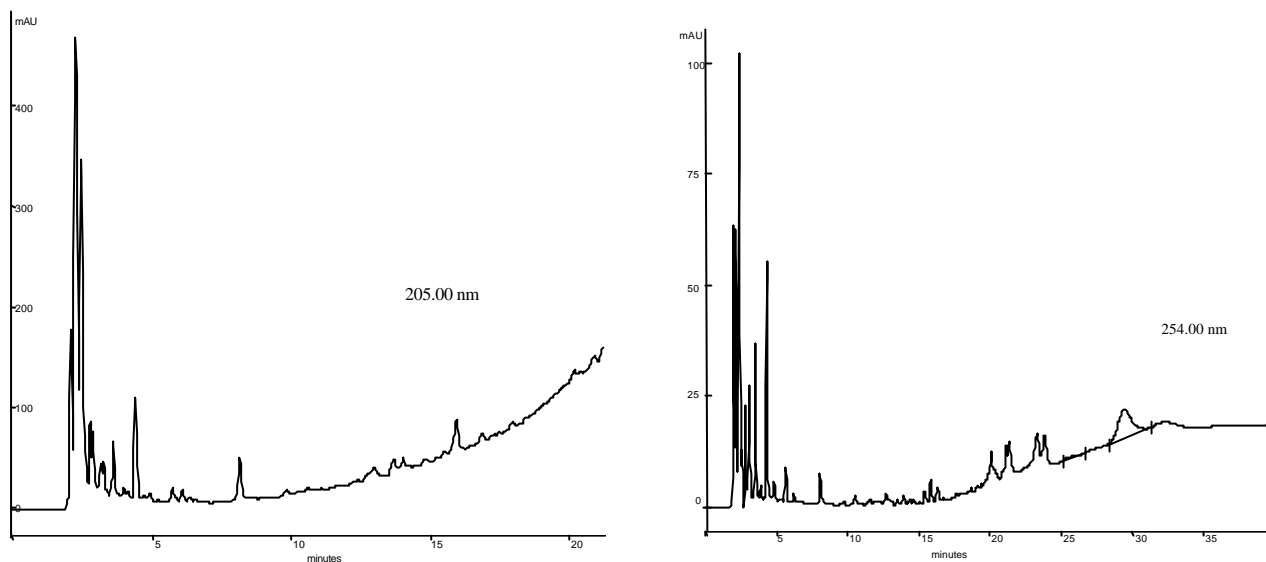
Nota-se os Rf's dos açúcares correspondem a ~0,3 para a galactose e ~0,4 para a raminose. A rutina, com duas unidades de açúcares, apresentou Rf ~0,4. A pouca diferença entre estes Rf's pode ser atribuída às suas estruturas químicas. Uma análise do conjunto mostra que, conforme o grau de glicosilação aumenta, os Rf's das substâncias diminuem, como podemos observar nos cromatogramas das espécies de *M. ilicifolia* e *M. aquifolium* comparado com o padrão de rutina. Dados da literatura indicam que os chás dessas espécies contêm flavonóides altamente glicosilados com três a quatro unidades de açúcares (SANNOMIYA et al., 1998; VILEGAS et al., 1999; LEITE et al., 2001). Em *Zollernia ilicifolia* observou-se manchas de Rf's maiores e iguais as duas espécies de *Maytenus*, o que sugere a presença de flavonóides tetra-, tri- e talvez diglicosilados. Era também esperado encontrar saponinas no chá de *Zollernia ilicifolia*, uma vez que estas foram detectadas no extrato MeOH 70%, mas o cromatograma revelado com solução de anisaldéido/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> não mostrou claramente a presença dessa classe de substâncias. A única evidência é que, quando os chás estavam sendo preparados, observou-se a formação de espumas no chá de *Zollernia ilicifolia*, o que pode sugerir a presença de saponinas.

### 1.3.2. Análises por HPLC

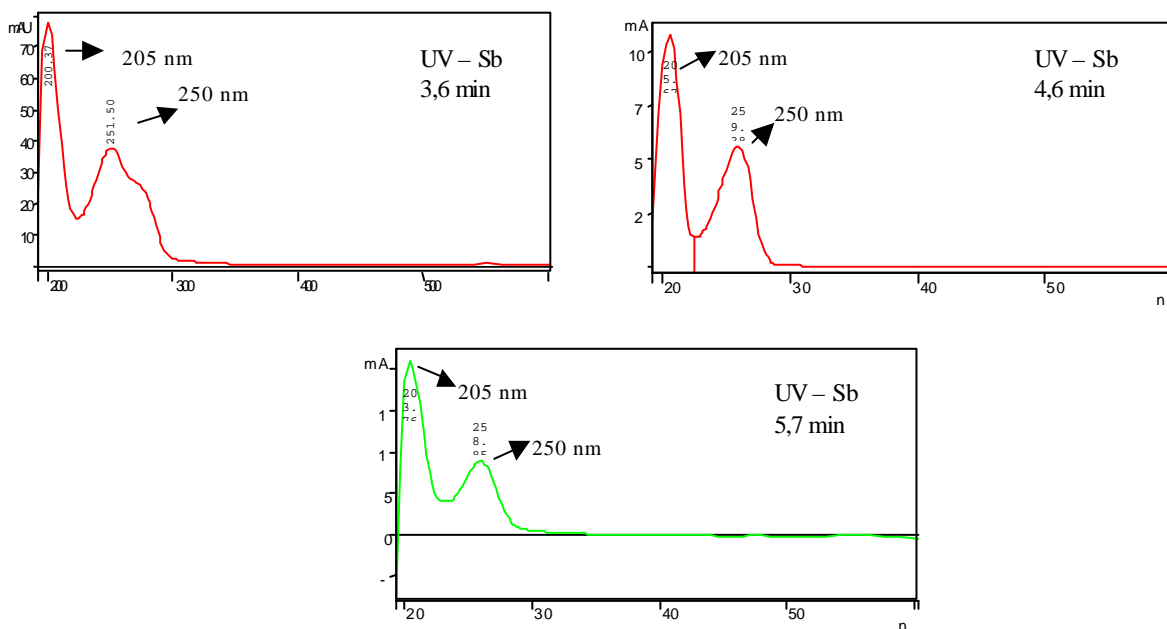
Para a análise por HPLC, as amostras foram filtradas em filtros Millex 0,45 µm e injetou-se 20 µL de solução em uma coluna C18. Utilizou-se como gradiente uma mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O. Iniciou-se com 20% de MeOH até 100% em um fluxo de 1 mL/min durante 30 min, permanecendo por mais 10 min em 100% de MeOH. A eluição foi monitorada com o detector de fotodiodo em cinco comprimentos de onda diferentes: 205 nm, 254 nm, 273 nm, 330 nm e 360 nm. Estes comprimentos de onda foram escolhidos porque a análise por CCDC mostrou a presença principalmente de flavonóides, e de substâncias que estes comprimentos abrangem desde substâncias alifáticas até as aromáticas.

A análise do cromatograma da infusão de *Sorocea bomplandii* (Fig. 1.43) apresentou poucos picos que absorvem no UV nestes comprimentos de onda, quando comparado com os cromatogramas de *Zollernia ilicifolia* e das espécies de *Maytenus*. Este resultado está de acordo com as análises por CCDC feitas anteriormente, confirmando que

o extrato é pobre em substâncias fenólicas ou que contenham grupos que absorvem pouco ou não absorvem no UV. São observados picos maiores na região entre 2 e 5 minutos, cujos espectros no UV apresentam bandas em 205 nm e 250 nm. (Fig.1.44).

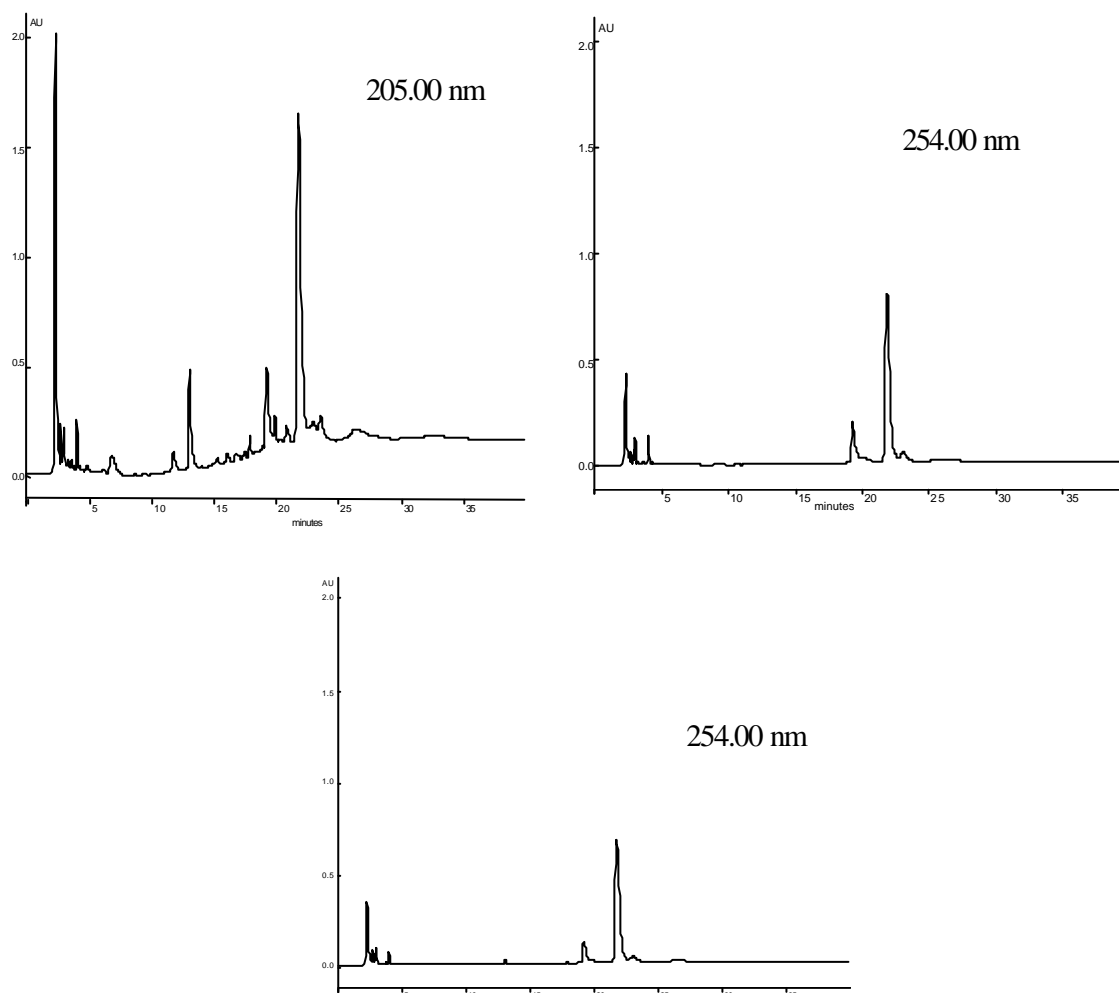


**Fig. 1.43:** Cromatograma obtido por HPLC da infusão de *Sorocea bomplandii* (C18, gradiente, MeOH/H<sub>2</sub>O, 1 mL/min, 205 e 254 nm)

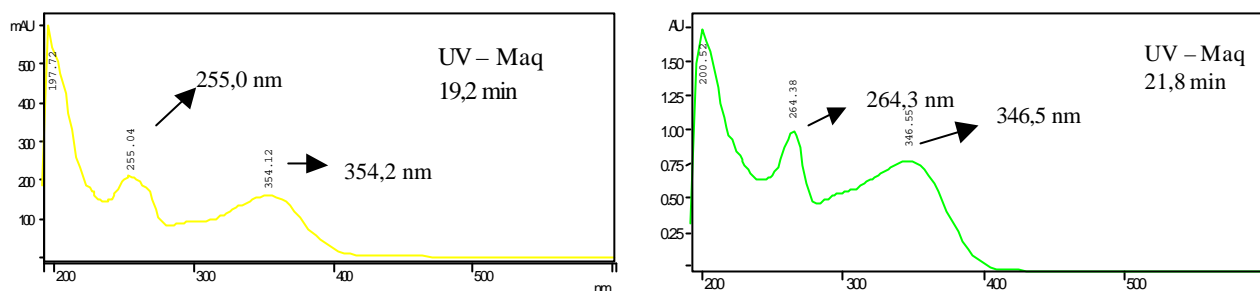


**Fig. 1.44:** Alguns espectros ultravioleta do chá de *Sorocea bomplandii*

Os cromatogramas de *Maytenus aquifolium* (Fig. 1.45) apresentam diversos picos, principalmente no cromatograma observado a 205 nm. Picos majoritários eluem em 19,2 min e 21,8 min e seus espectros UV mostram bandas em 255,0 nm e 354,2 nm, 264,3 nm e 346,5 nm, respectivamente (Fig. 1.46). De acordo com a literatura, a infusão de *Maytenus aquifolium* apresenta como constituintes majoritários os flavonóides tetraglicosilados kaempferol-3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- $[\beta$ -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo} e quercetina-3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)- $[\beta$ -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (SANNOMYA et al., 1998; VILEGAS et al., 1999). Assim, com base nestes trabalhos podemos verificar que o derivado da quercetina elui em 19,2 min e o do kaempferol em 21,8 min.

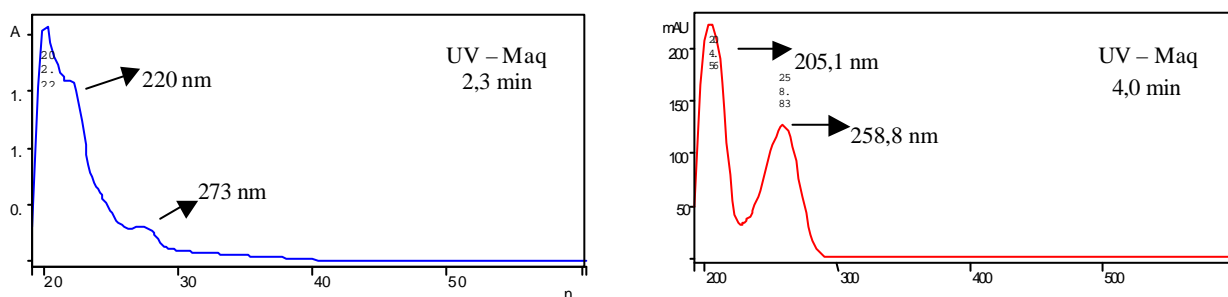


**Fig. 1.45:** Cromatograma obtido por HPLC da infusão de *Maytenus aquifolium*. (C18, gradiente MeOH/H<sub>2</sub>O, 1 mL/min, 205 nm e 254 nm, 273 nm)



**Fig. 1.46:** Alguns espectros no ultravioleta da infusão de *M. aquifolium*

Os relatos da literatura mostram apenas o isolamento e identificação de dois flavonóides existentes na infusão de *Maytenus aquifolium* (SANNOMIYA et al., 1998; VILEGAS et al., 1999), e a CCDC realizada anteriormente também mostrou a presença predominantemente desses flavonóides glicosilados. Por outro lado, a análise por HPLC mostrou picos que eluem entre 2,3 e 4,0 min. Os espectros de UV dos picos de maiores intensidades que eluiu em 2,3 min, apresentou bandas em 220 nm e 273 nm (Fig.1.47) e a que eluiu em 4,0 min, apresentou bandas em 205,1 nm e 258,8 nm (Fig. 1.47). Desse modo, podemos concluir que existem outras substâncias que também fazem parte da constituição química da infusão dessa espécie que eluem e apresentam espectro UV semelhantes as de *Sorocea bomplandii*.

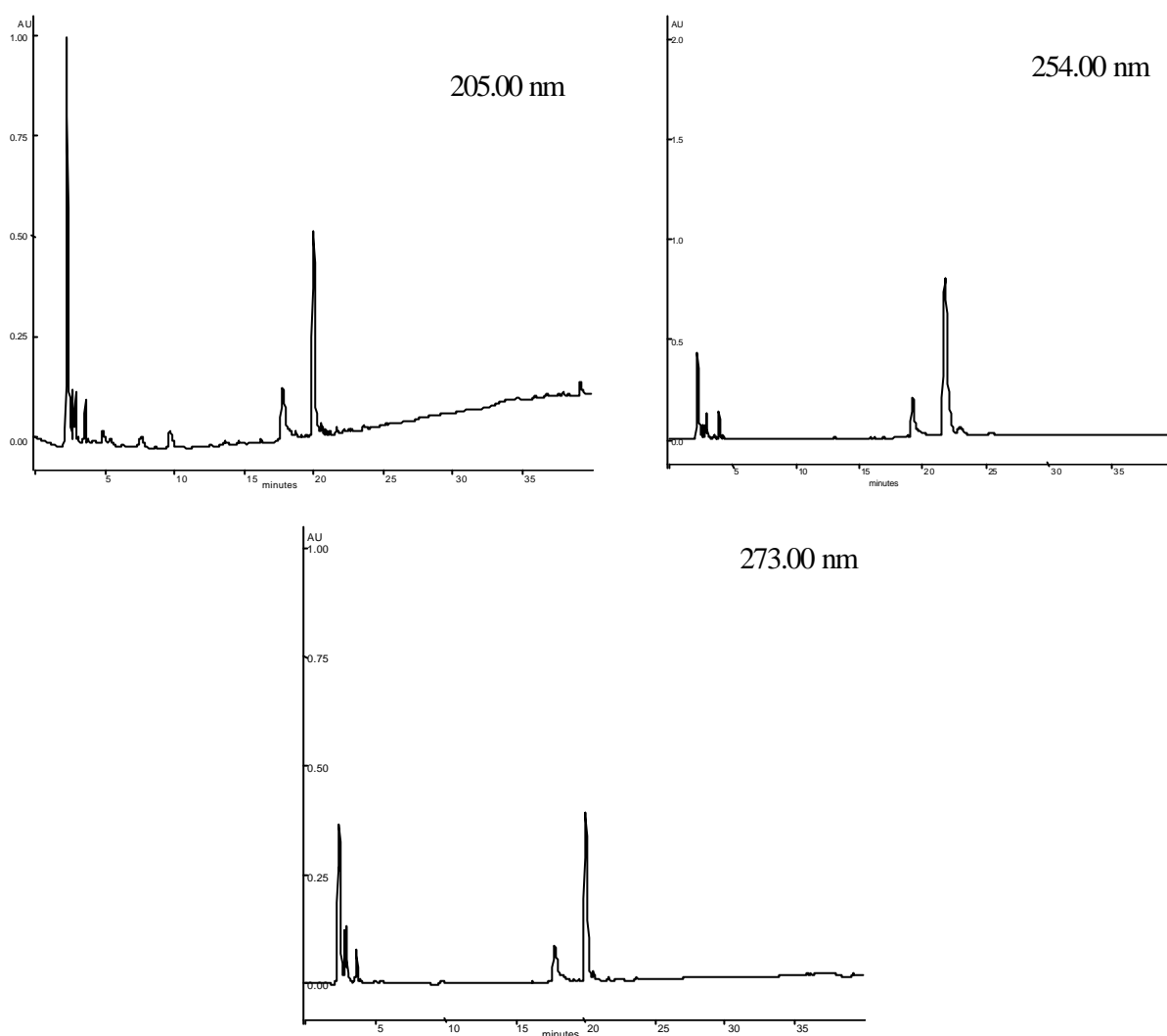


**Fig. 1.47:** Espectros no ultravioleta de *M. aquifolium* dos picos com tempos de retenção 2,3 min e 4,0 min

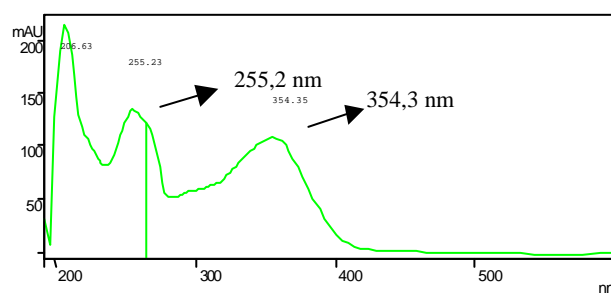
Um perfil cromatográfico semelhante pôde ser observado no cromatograma referente à espécie *Maytenus ilicifolia* (Fig. 1.48). Este cromatograma apresentou poucos constituintes majoritários. A literatura relata a existência de flavonóides di-, tri- e tetraglicosilado derivados do kaempferol (LEITE et al., 2001). O cromatograma apresentou um pico em 18,9 min e o espectro de ultravioleta apresenta bandas em 255,2 nm e 354,3 nm (Fig. 1.49). Este pico pode ser devido ao flavonóide tetraglicosilado isolado das folhas de *M. ilicifolia* é o kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)-O-[ $\alpha$ -L-arabinopiranosil(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]-O- $\beta$ -D-galactopiranosídeo. Este difere do açúcar encontrado em *M. aquifolium* apenas por apresentar uma unidade de arabinose ligada a ramnose, ao invés da glicose que está ligada nesta mesma posição na outra substância.

Com bases nesses dados, podemos concluir que, para estas condições cromatográficas de HPLC, os flavonóides tetraglicosilados encontrados em *M. aquifolium* eluem em 19,2 e 21,8 min e o isolado de *M. ilicifolia* elui em 18,9 min.

Outros picos de menor intensidades eluem em 20,8 min e 30,1 min. O espectro UV apresenta bandas em 264,9 e 346,6 nm. Também pudemos observar picos em 2,9 min e 3,5 min, que são devidos a outras classes de substâncias que absorvem no UV nos comprimentos de 205,2 nm e 258,8 nm, semelhantes às de *M. aquifolium* e *Sorocea bomplandii*.



**Fig. 1.48:** Cromatograma obtido por HPLC da infusão de *Maytenus ilicifolia*. (C18, gradiente MeOH/H<sub>2</sub>O, 1 mL/min, 205 nm, 273 nm e 254 nm)

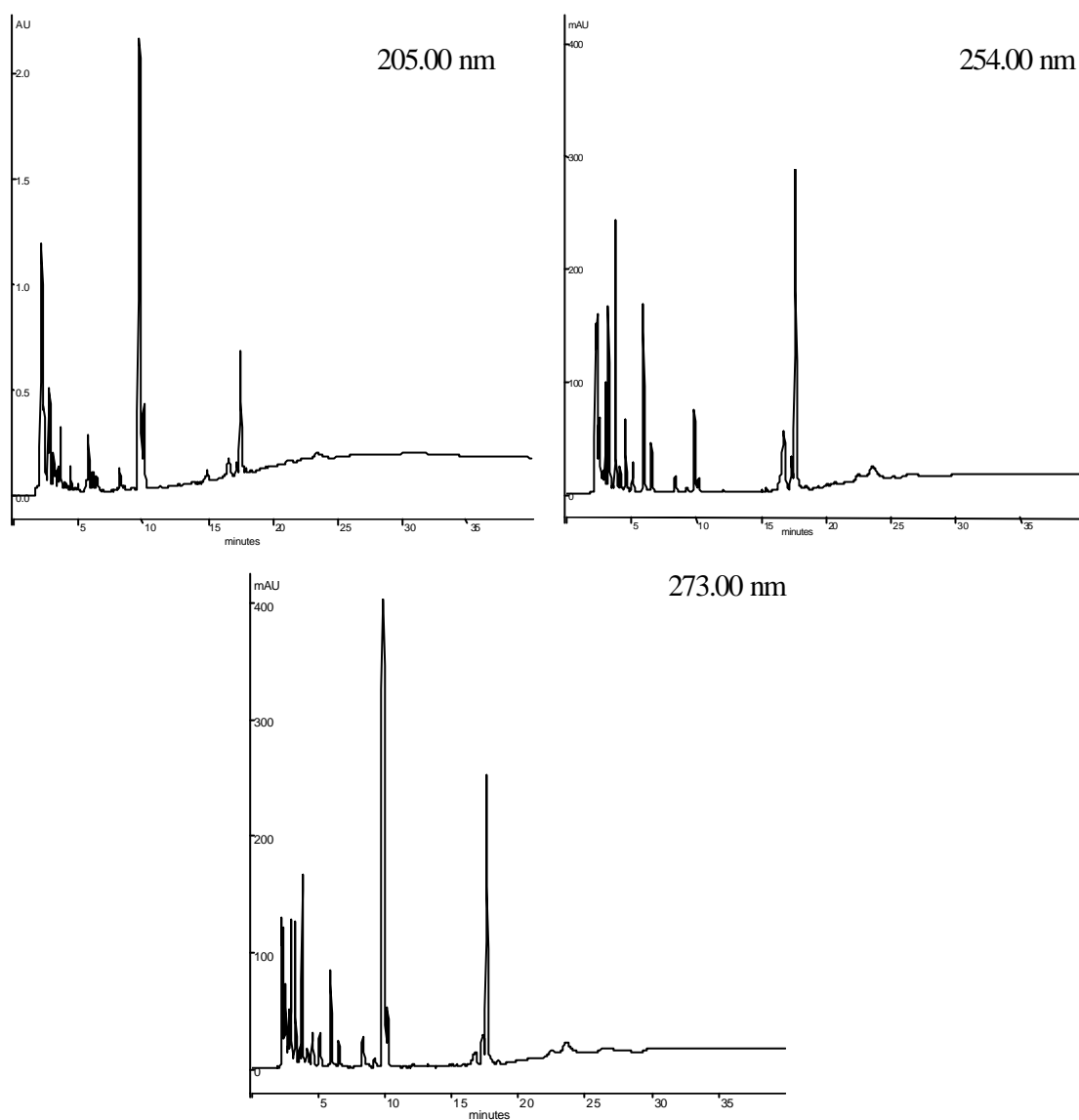


**Fig. 1.49:** Espectro no ultravioleta de *M. ilicifolia* no tempo de retenção 18,9 min

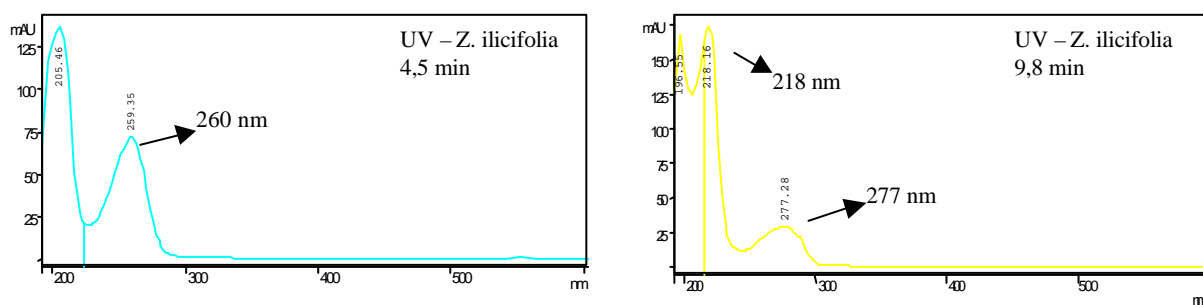
A análise do cromatograma de *Zollernia ilicifolia* (Fig. 1.50) mostrou um padrão mais complexo, porém melhor resolvido. Pode-se observar vários picos de grande intensidade eluindo até 23 min., principalmente nos comprimentos de onda 254 e 273 nm. Na região próxima a 17 min observam-se 2 picos em 16,7 min e 17,6 min, cujos espectros UV apresentam bandas em 254 e 273 nm e 264 e 346 nm. Tais resultados, comparados com os da literatura (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) e com os dos cromatogramas anteriores, mostra que essas substâncias são derivados tetraglicosilados da quercetina e do kaempferol, respectivamente. Adição do padrão isolado de **zoll1** confirmou que o pico que elui em 17,6 min é **zoll1**. Embora não tenha sido isolado, o tempo de retenção do pico em 16,7 min e seu espectro UV permitem sugerir que se trata do respectivo derivado tetraglicosilado da quercetina. Evidentemente, para comprovação será necessário obter outros dados. Contudo, como mostra o cromatograma, essa substância encontra-se em pequena quantidade e prevê-se que seu isolamento seja difícil.

Os picos com tempos de retenção 2,9, 3,2, 4,5, 5,1, 5,9 e 6,5 min apresentam bandas de UV em 260 nm. Os picos com tempos de retenção 3,8 e 4,1 min absorvem em 252 e 280 nm.  $R_t = 8,4$  e  $9,8$  min apresenta bandas em 218 e 277nm (Fig. 1.51).

Tendo em vista que os chás de *M. ilicifolia*, *M. aquifolium* e *Zollernia ilicifolia* apresentam picos de flavonóides tetraglicosilados na região de ~20 min, um eventual controle de qualidade poderia se tornar um pouco dificultado. Contudo, a presença do pico com tempo de retenção 10 min no chá de *Zollernia ilicifolia* distingue claramente *Zollernia* das espécies de *Maytenus*. Deste modo, tencionamos contribuir para o estudo das espinheiras-santas no controle de qualidade. Também existe a necessidade de um estudo sazonal envolvendo as espécies de *Maytenus*, a fim de verificar exatamente todos os constituintes dessas espécies em várias épocas do ano.



**Fig. 1.50:** Cromatograma obtido por HPLC da infusão de *Zollernia ilicifolia*. (C18, gradiente MeOH/H<sub>2</sub>O, 1 mL/min, 205 nm, 254 nm)



**Fig. 1.51:** Espectro no ultravioleta de *Zollernia ilicifolia* dos picos com tempos de retenção 4,5 min e 9,8 min



## II. Estudo Químico de *Wilbrandia ebracteata*

### II.1.1. A família Cucurbitaceae

A ordem Violales (*sensu* Cronquist) contém 23 famílias de plantas, dentre elas a família Cucurbitaceae. No Brasil, a família possui cerca de trinta gêneros, com aproximadamente duzentas espécies (BARROZO, 1978). As Cucurbitaceae são plantas herbáceas, trepadeiras ou rastejantes com caule com feixes bilaterais, com folhas geralmente grandes, inteiras ou profundamente lobadas, de disposição interna, sem estípulas. Possuem frutos e sementes numerosas (JOLY, 1998).

A maioria das espécies da família Cucurbitaceae é de plantas comestíveis e de importante valor econômico. Dentre as mais comuns temos: abóbora, moranga, abobrinha, jerimum (*Cucurbita*), melancia (*Citrullus*), bucha-de-metro, bucha, cabacinha, maxirão (*Luffa*), cabaça, cuia (*Lagenaria*), pepino, melão, maxixe (*Cucumis*). O popular chuchu (*Sechium*) é o fruto carnoso contendo uma única semente, também conhecido por maxuxo (DI STASI et al., 2002b).

Dentre as plantas nativas, destaca-se o conhecido melão-de são-caetano, melãozinho (*Momordica*), com seus característicos frutos carnosos deiscentes, de cor abóbora e sementes com testa carnosa vermelha tão comum nas cercas do litoral e interior do país (JOLY, 1998).

Di Stasi et al. (2002c) relatam o uso de 114 espécies medicinais da Mata Atlântica, dentre as quais as folhas e raízes da espécie *Wilbrandia ebracteata* Cogn (Cucurbitaceae), são usadas no tratamento de úlceras e gastrites pelas comunidades tradicionais do Vale do Ribeira.

Dos Santos; Dos Santos, Schenkel (1996), demonstraram em estudos fitoquímicos, que as raízes de *W. ebracteata* são consumidas e comercializadas como a verdadeira taiuiá, denominada *Cayaponia tayuya*, espécie oficial descrita na primeira Farmacopéia Brasileira e suprimida nas posteriores.

### II.1.2. As espécies de “taiuiá”

Outras espécies da família Cucurbitaceae também são conhecidas popularmente como taiuiá. Como a taiuiá-de-felpas, taiuiá-de-Goiás (ou abóbora do mato) (*Cayaponia racemosa* Cogn), taiuiá-do-Pará (*Cayaponia glandulosa*), taiuiá grande (*Bryonia Cordatifolia*) (PIO CÔRREA, 1975).

Nos estados de Minas Gerais e São Paulo temos a taiuiá-de-fruta-envenenada (*Trianosperma tayuya*, *Bryonia tayuya* Vell., *Bryonia tayuya* M). Suas raízes apresentam um amargor insuportável e são utilizadas na forma de infusão, decocção, xarope ou tintura, sendo útil contra todas as enfermidades da pele, sífilis, etc (PIO CORREA, 1975).

São plantas empregadas na medicina popular por seus efeitos curativos, tais como: depurativo, analgesia, anti-úlceras, antiepilepsia, enfermidades da pele, antiescorbútico, antissifílico etc (PIO CÔRREA, 1975).

O taiuiá-de-comer (*Cyclanthera pedata* Schrad var *edulis* Naud) apresenta frutos que servem de alimento. Em alguns países da Europa, como Itália, essa planta é livremente comercializada.

As folhas e as raízes de *Wilbrandia ebracteata* Cogn (Fig. 2.1), mencionada anteriormente, são comercializadas pela população do Vale do Ribeira como sendo a verdadeira taiuiá e tal prática representa uma fonte adicional de recursos econômicos para população da mata Atlântica. Outros dados etnobotânicos referem-se ao uso exclusivo das raízes desta espécie no tratamento de reumatismo, afecções da pele, tumores e distúrbios gastrointestinais servindo como laxativo (DI STASI et al., 2002).

PETERS et al. (1999) demonstraram que os efeitos antiinflamatórios e analgésico das raízes de *W. ebracteata* devem-se à presença de cucurbitacina B e são decorrentes da redução dos níveis de prostaglandinas. Este mecanismo de ação analgésica e anti-inflamatória, apresenta como efeito adverso e tóxico o aparecimento de úlceras, visto que as prostaglandinas são um dos fatores protetores da mucosa gástrica. Neste contexto, torna-se claro que o uso popular das raízes da espécie no tratamento de úlceras e gastrites só se justificaria se esta espécie produzisse constituintes químicos ativos como antiulcerogênicos, diferentes das cucurbitacinas (GONZALEZ, 2001).

Um estudo químico das folhas dessa espécie torna-se importante, tendo em vista que os testes farmacológicos realizados com o extrato apresentaram significativa atividade antiulcerogênica. Além disso, é possível que a composição química das folhas seja diferente da composição química das raízes e justificar o efeito antiulcerogênico referido popularmente para as folhas.

Além desses aspectos, a exploração comercial das folhas não compromete a sobrevivência da espécie, como é o caso da exploração das raízes. Isso também é importante quando se considera que populações, principalmente do Vale do Ribeira, se utilizam muito dessa espécie. A exploração racional da espécie representaria uma melhora na qualidade de vida da população, visto que o produto poderia ser explorado de forma sustentável e possuir um maior valor agregado devido aos estudos realizados com base científica.



**Fig. 2.1:** Folhas de *Wilbrandia ebracteata* (foto original por M. S. Reis)

## II.2. Desenvolvimento, Resultados e Discussões

### II.2.1. Testes Antiúlcera, Analgesia e Toxicidade Aguda e DL<sub>50</sub>

Os testes farmacológicos foram realizados por Fabiana Gonzalez (Unesp-Botucatu) e seu orientador Prof. Luiz Claudio Di Stasi (Unesp- Botucatu). Os ensaios foram antiulcerogênico, analgesia e toxicidade aguda e DL<sub>50</sub>.

Os modelos experimentais usados para avaliação dos extratos de *Wilbrandia ebracteata* foram de indução de ulceração por etanol, etanol/HCl e indometacina/betanecol.

O agente irritante etanol provoca redução do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, que contribui para o desenvolvimento de hemorragias (RANG; DALE, 1993).

O modelo experimental induzido por indometacina causa a inibição da síntese de prostaglandinas. Estas contribuem para a citoproteção gástrica, aumento da síntese de muco, proteção celular primária, etc. O betanecol estimula a secreção gástrica principalmente o ácido e pepsina (RANG; DALE, 1993).

As ulcerações induzidas por etanol e indometacina também causam danos diretos sobre as células da mucosa gástrica, resultando no desenvolvimento de radicais livres e hiperoxidação de lipídeos (GONZALEZ, 2001)

Os grupos de camundongos foram pré-tratados com 1000 mg/kg de quantidade de extrato MeOH 70%, fração aquosa e AcOEt obtida da partição H<sub>2</sub>O/AcOEt. Os grupos pré-tratados com extratos de *W. ebracteata* não produziram proteção contra lesões gástricas induzidas por indometacina associada a betanecol.

Já os grupos que sofreram lesões gástricas induzidas por etanol, etanol/HCl apresentaram um elevada porcentagem de cura, 73%. O extrato MeOH 70% um efeito mais pronunciado a essas lesões quando comparado às drogas de referência (omeprazol e carbenoxolona).

A fração AcOEt mostrou-se tão eficaz quanto a carbenoxolona na proteção da mucosa gástrica contra o agente nocivo EtOH absoluto.

A atividade analgésica foi obtida com a administração de 1000 mg/kg, via oral, de extrato MeOH 70% de folhas de *W. ebracteata*, nos seguintes modelos de analgesia: teste da imersão da cauda e teste das contorções abdominais. O teste da imersão da cauda baseia-se na determinação do tempo de reação do animal após a imersão de 1/3 da sua cauda em banho-maria, com água na temperatura de 55°C. O método utilizado neste trabalho foi adaptado por Di Stasi, 1987 para camundongos, utilizando-se água à temperatura constante de 51°C. Esta metodologia baseia-se no tempo de reação do animal ao estímulo nocivo, caracterizado pelo comportamento de retirada da cauda da água aquecida (GONZALEZ, 2001).

O teste das contorções abdominais é feito com a administração de um agente irritante (ácido acético 0,8%) capaz de provocar dor, sendo esta caracterizada por um comportamento de contorções abdominais, seguida de torções do corpo e estiramento dos membros, principalmente os posteriores (GONZALEZ, 2001). Em seguida, conta-se o número de contorções abdominais feitas durante um intervalo de tempo.

Estes testes não produziram efeitos significativos com o extrato MeOH 70% e demonstram que a espécie *W. ebracteata* não possui atividade analgésica detectável pelos modelos experimentais utilizados (teste da imersão da cauda e teste das contorções abdominais), demonstrando que o alívio de sintomas de gastrite, reumatismo e distúrbios gastrointestinais referidos popularmente não dependem da atividade analgésica da espécie. Ao passo que, estudos recentes demonstraram que extrato e cucurbitacinas isoladas da raiz desta espécie vegetal produziram inúmeras atividades farmacológicas incluindo o efeito anti-inflamatório e analgésico (ALMEIDA; RAO; MATOS, 1992; PETERS et al., 1999). Peters et al. (1999) mostraram que a atividade analgésica da raiz de *W. ebracteata* está relacionada à inibição de prostaglandina do tipo PGE<sub>2</sub> e provavelmente tal efeito se deve a presença de cucurbitacinas. Dessa forma, o efeito ulcerogênico deve ser esperado, após a utilização da raiz. Ao contrário desses resultados, os ensaios fitoquímicos preliminares realizados com as folhas de taiuiá reagiram negativamente à presença de cucurbitacinas e apresentaram um importante efeito antiulcerogênico (GONZALEZ, 2001).

O teste para verificar a dose letal mediana de DL<sub>50</sub> também foi realizado. A dose letal mediana ou DL<sub>50</sub> é um valor estatisticamente derivado da administração de uma dose única de uma substância que pode provocar a morte de 50% dos animais da experiência. É

uma avaliação preliminar e estimada das propriedades tóxicas de uma substância teste, fornecendo informações acerca dos riscos para a saúde, resultantes de uma exposição de curta duração pela via escolhida (GONZALEZ, 2001). Os resultados obtidos evidenciaram, que as doses crescentes dos extratos MeOH 70% não foram capazes de promover visíveis efeitos tóxicos no período de 48 h após a administração aguda, por via oral, do extrato de *W. ebracteata* não sendo possível determinar a DL<sub>50</sub>, dose letal mediana e a margem de segurança desse extrato vegetal de folhas de taiuiá.

O extrato MeOH 70% das raízes dessa mesma espécie vegetal apresentou DL<sub>50</sub> de 22,10 mg/kg para as fêmeas e 58,31 mg/kg para machos, além de inúmeros efeitos tóxicos como diarreia, diminuição da atividade motora e frequência respiratória até parada cardíaco-respiratória e morte.

## II.2.2. Coleta

A coleta da espécie *Wilbrandia ebracteata* foi realizada em 31 de Maio de 2001, na comunidade de Rio Preto, no município de Sete Barras, Vale do Ribeira, S. Paulo.

A espécie foi coletada pelo professor Dr. Luiz Cláudio Di Stasi e Wagner G. Portilho. Para montagem da exsicata foi coletado o material fértil da espécie, em seguida depositada no Herbário BOTU.

Coletou-se as folhas dessa espécie, que em seguida foram armazenadas em sacos plásticos para evitar desidratação durante o transporte até o local de trabalho.

## II.2.3. Preparação dos Extratos das Folhas

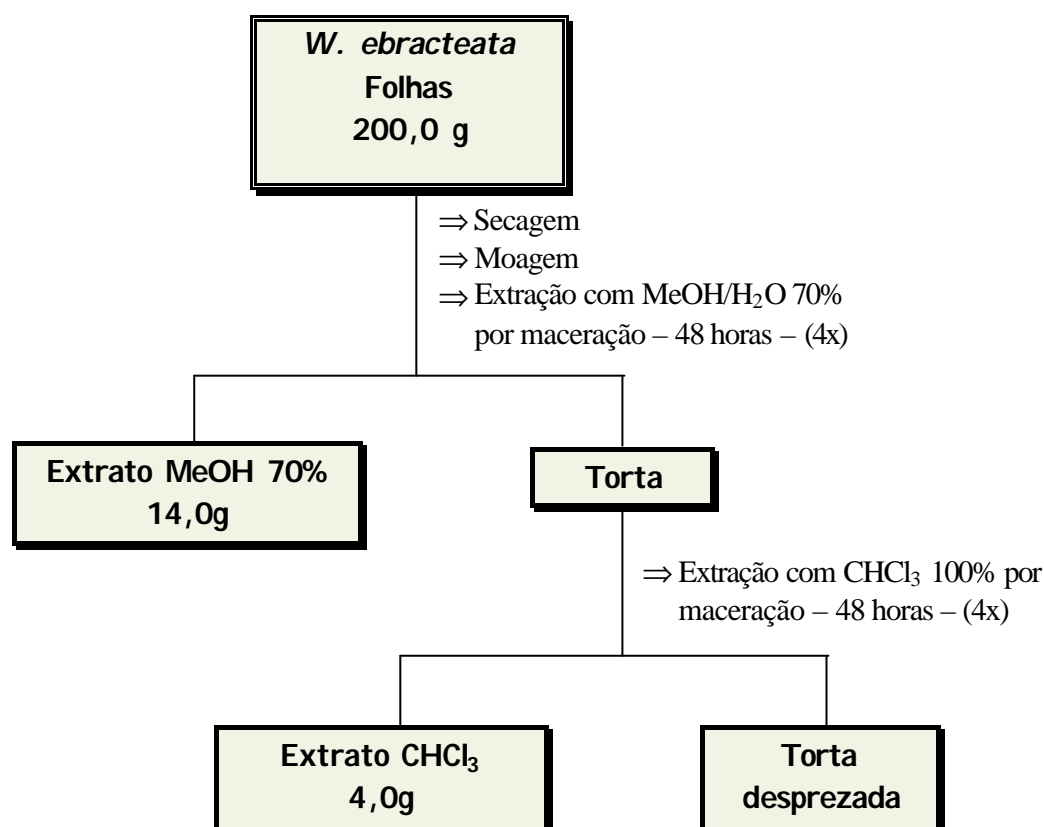
Os extratos de *W. ebracteata* foram preparados como os de *Zollernia ilicifolia*. Depois de lavadas em água corrente, as folhas foram dessecadas em estufa a 60°C por 1 hora e 45°C por 48 horas. Em seguida, as folhas foram trituradas manualmente com auxílio de um liquidificador (marca Arno).

Preparou-se o extrato usando-se maceração com metanol/água 70:30 (4x, 48 h), do mesmo modo como foram testados farmacologicamente.

A torta resultante da extração anterior foi macerada com  $\text{CHCl}_3$  de modo idêntico ao descrito (4x, 48h) a fim de se extrair componentes apolares ainda restantes na planta, visto que as folhas desta planta não foram estudadas.

Os extratos foram filtrados em algodão e evaporados na capela. A fim de obter um bom rendimento, a extração de cada solvente foi realizada três vezes.

O fluxograma 2.1 mostra o procedimento utilizado para a preparação dos extratos.



**Fluxograma 2.1:** Preparação dos extratos das folhas de *Wilbrandia ebracteata*

## 11.2.4. Análise do Extrato Hidrometanólico 70%

A análise prévia dos constituintes químicos desse extrato foi realizada pelo prof. Luiz Cláudio Di Stasi, o qual concluiu a presença das seguintes classes de substâncias: ácidos fixos, bases quaternárias, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, saponinas, taninos e xantonas (MATOS, 1997).

O extrato MeOH 70% foi primeiramente submetido a análise por CCDC. Utilizou-se sistemas de solventes usualmente usados em nosso laboratório. O melhor sistema de solvente foi:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{n-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$  5:6:1:4 (fase inferior).

Análises das placas mostraram manchas visíveis a olho nú, sugerindo a presença de clorofila e flavonóides. Quando observado no UV, a CCDC apresentou manchas de cor vermelha (clorofila) e manchas amareladas e marrons, sugerindo a presença de flavonóides. Diferentes placas foram reveladas com solução de anisaldeído/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  e outras ainda com solução de NP/PEG, e apresentaram predominantemente de manchas amarelas com os dois reveladores, o que mais uma vez sugere a presença de flavonóides (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

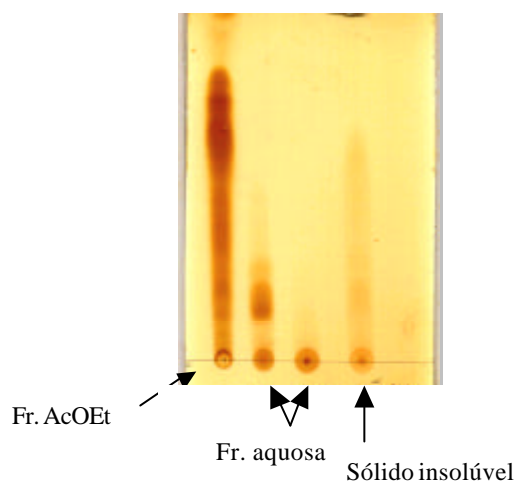
Registrou-se o espectro de RMN  $^1\text{H}$  desse extrato bruto com a finalidade obter mais informações preliminares sobre as possíveis classes de substâncias presentes.

O espectro mostrou picos nas regiões dos hidrogênios ligados a anéis aromáticos (entre 6,0 $\delta$  e 8,0 $\delta$ ) e de hidrogênios ligados a núcleos alifáticos (entre 0,8 $\delta$  e  $\delta$  2,0 $\delta$ ), além de picos na região dos açúcares (entre 3,0 $\delta$  e 5,5 $\delta$ ).

Iniciou-se o estudo do extrato MeOH 70% seguindo um dos esquemas feito pelo Prof. Luiz Cláudio Di Stasi e sua aluna Fabiana P. Gonzalez, para a realização dos testes farmacológicos.

Tomaram-se 14,0 g de extrato e fez-se uma partição utilizando AcOEt e  $\text{H}_2\text{O}$  1:1. Com esse procedimento, obteve-se uma separação prévia de substâncias mais polares das menos polares, além de retirar-se a clorofila. A análise por CCDC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{n-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$  5:6:1:4, fase inferior, revelador iodo) mostrou que a clorofila e substâncias menos polares ficaram na fase AcOEt, enquanto que as substâncias mais polares passaram para a fase aquosa (Fig. 2.2). Um sólido de difícil solubilização foi retirado e depois de seco mediu-se a sua massa (2,0 g).





**Fig. 2.2:** Cromatograma das frações obtidas da partição AcOEt/H<sub>2</sub>O a partir do extrato bruto (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 5:6:1:4, fase inferior, revelador iodo)

### II.2.5. Estudo da fração acetato de etila

Foi dada preferência ao estudo do extrato AcOEt, visto que este apresentou resultados significativos nos testes biológicos antiulcerogênicos.

Análise por CCDC mostrou que a fração AcOEt obtida a partir da partição do extrato bruto apresentou grande concentração de flavonóides. Para a separação dos componentes desta fração utilizou-se uma coluna contendo Sephadex LH-20 como fase estacionária. Este tipo de adsorvente tem demonstrado bons resultados na separação de flavonóides.

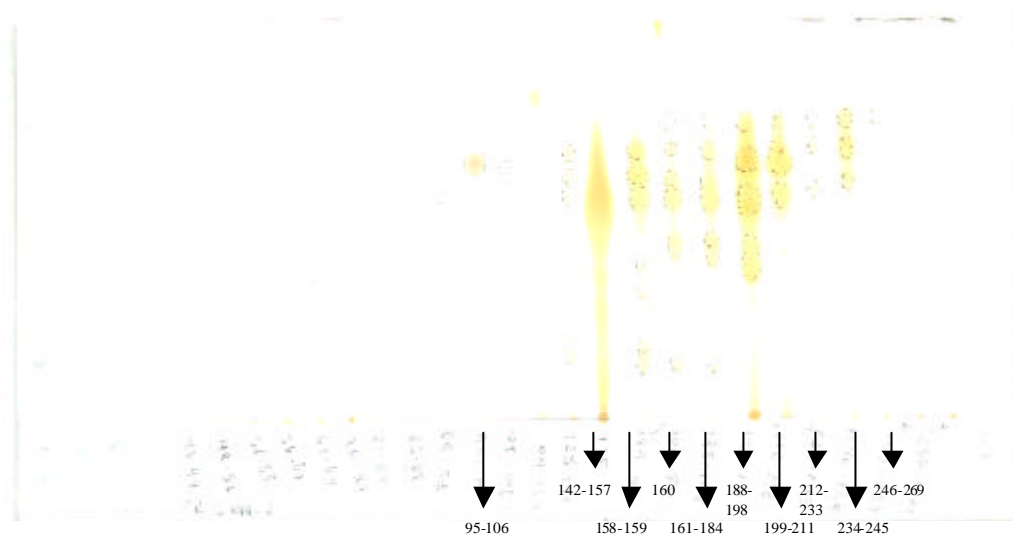
Tomaram-se 2,0 g da fração AcOEt, dissolveram-se em 10 mL de metanol e centrifugou-se a mistura. Injetou-se a amostra na coluna e procedeu-se a eluição com metanol puro, em fluxo de 0,5 mL/min. Obtiveram-se 286 frações de 5 mL cada.

Foi realizada cromatografia em camada delgada comparativa das frações obtidas da coluna em AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior. As frações foram reveladas sob luz ultravioleta e em seguida com iodo, solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NP/PEG. As frações semelhantes foram agrupadas.

Tendo em vista que a atividade antiulcerogênica e atividade antioxidante têm sido correlacionadas entre si (C. LA CASA et al, 2000; LEWIS; HANSON, 1991), e que flavonóides têm importantes atividades antioxidantes (RICE-EVANS; MILLER;

PAGANGA, 1996), as frações obtidas a partir da separação do extrato AcOEt foram novamente cromatografadas em CCDC (AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior), desta vez pulverizando-se a placa com solução de 5% betacaroteno em DCM, usando rutina como padrão.

A Fig. 2.3 mostra o cromatograma das frações após a reação com o betacaroteno. Na placa, observa-se que as frações 95-106 até a fração 246-269 apresentaram atividade antioxidante, pois mantém a cor amarela forte do betacaroteno. De acordo com as análises realizadas anteriormente, essas frações contêm flavonóides.



**Fig. 2.3:** Cromatograma das frações obtidas do fracionamento da fração AcOEt (AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior) e reveladas com  $\beta$ -caroteno

As frações 56-61 (30 mg) e a fração 62-64 (20 mg) apresentaram-se puras e com Rf's semelhantes. Foram então agrupadas e analisadas espectrometricamente, denominando-as **we1** (50 mg). Pelo mesmo motivo as frações 95-105 (8 mg) e 106-108 (5 mg), denominadas **we2** (13 mg), foram agrupadas e também submetidas a análises espectrométricas.

A fração 109-120 (40 mg) apresentou partículas insolúveis em MeOH. Centrifugou-se várias vezes a amostra, lavando-se o sólido com MeOH e obteve-se um pó amarelo que foi analisado por CCDC (AcOEt/ n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior) e apresentou uma mancha de cor amarela, que foi identificada como **we3** (20 mg). O mesmo procedimento foi

usado para a fração 125-141 (50 mg). A CCDC apresentou novamente apenas uma mancha amarelada e foi denominada de **we4** (25 mg).

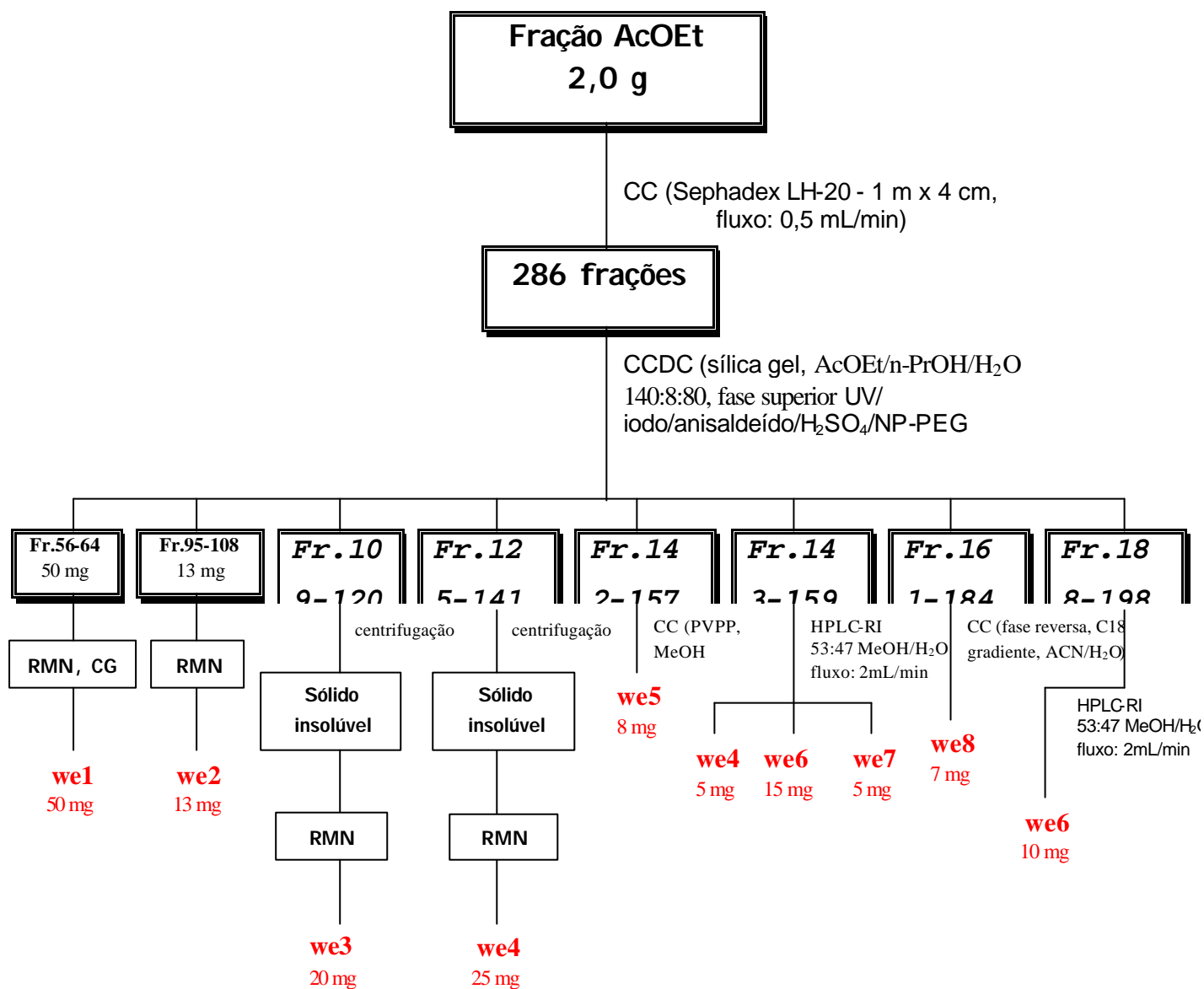
A fração 142-157 (30 mg) foi purificada utilizando-se uma coluna contendo PVPP como adsorvente e eluída em metanol. Obteve-se uma fração pura (8 mg) que foi analisada por CCDC de maneira análoga à descrita. A substância pura foi denominada **we5** e analisada espectrometricamente.

As frações 158-159 (40 mg) e 188-198 (30 mg) foram refractionadas por HPLC-RI eluídas em MeOH/H<sub>2</sub>O 53:47 com fluxo de 2,0 mL/min. Da fração 143-159 obteve-se três substâncias puras que foram analisadas por CCDC, como as anteriores e denominadas **we4** (5 mg), **we6** (15 mg) e **we7** (5 mg). Da fração 188-198 obteve-se a substância **we6** (10 mg) novamente.

A fração 161-184 (30 mg) foi purificada em uma coluna contendo sílica de fase reversa C18 e eluída com gradiente de ACN/H<sub>2</sub>O, iniciando-se com 20% de ACN até 100%. Foram coletadas 10 frações de 5 mL cada que foram analisadas por CCDC (AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior). A fração 5/6 apresentou apenas uma mancha e foi enviada para análise espectrométrica, sendo denominada **we8** (7 mg).

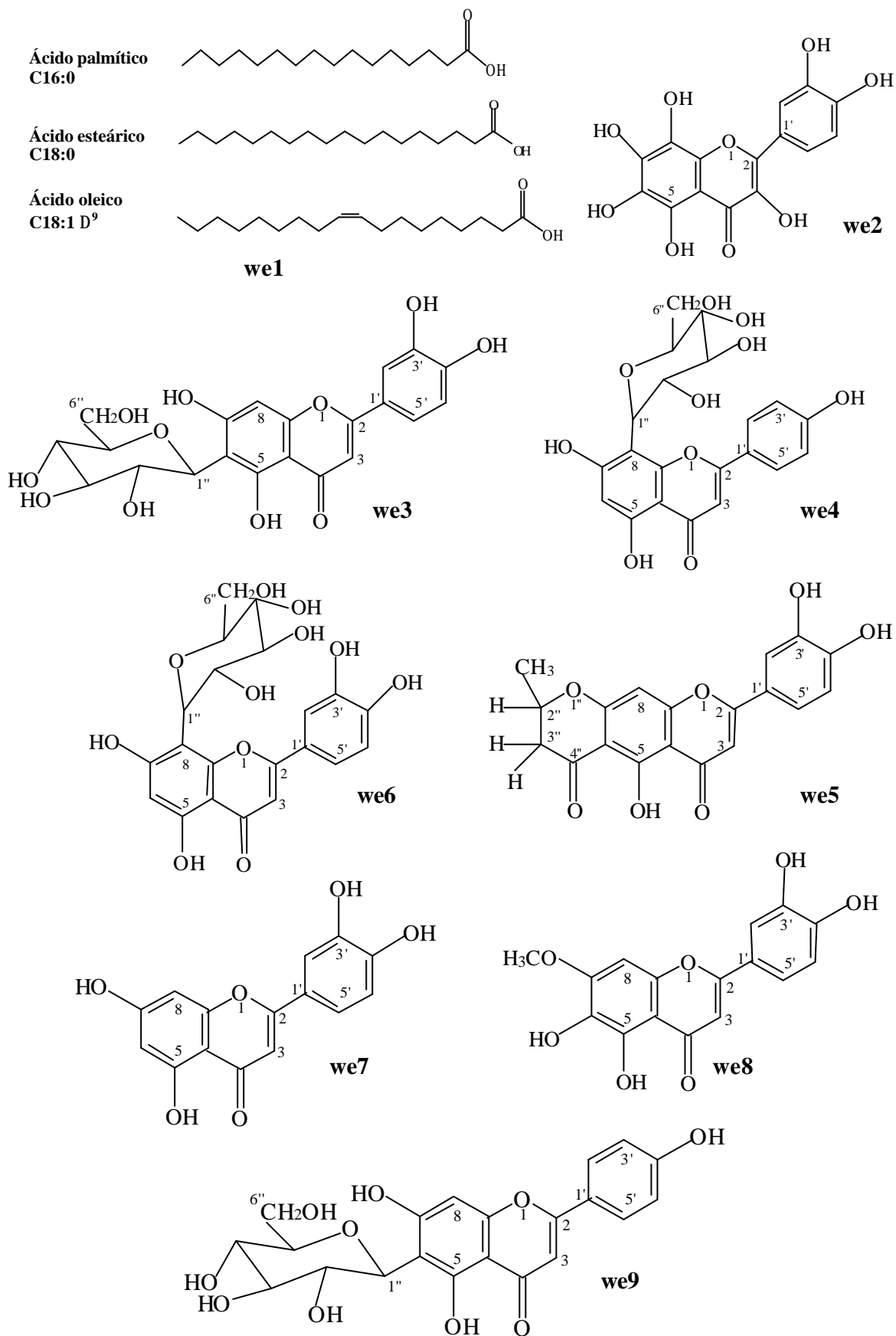
O fluxograma 2.2 mostra o procedimento experimental desenvolvido para esta etapa do fracionamento de *W.ebracteata*.

Em seguida, será apresentado as identificações das substâncias isoladas de *W.ebracteata*. E terá início por ordem de complexidade das moléculas. Primeiro as agliconas, seguido dos flavonóides glicosilados.



**Fluxograma 2.2:** Fluxograma representativo dos procedimentos de fracionamento, isolamento e identificação dos componentes de *W. ebracteata*

### Substâncias isoladas das folhas de *W. ebracteata*



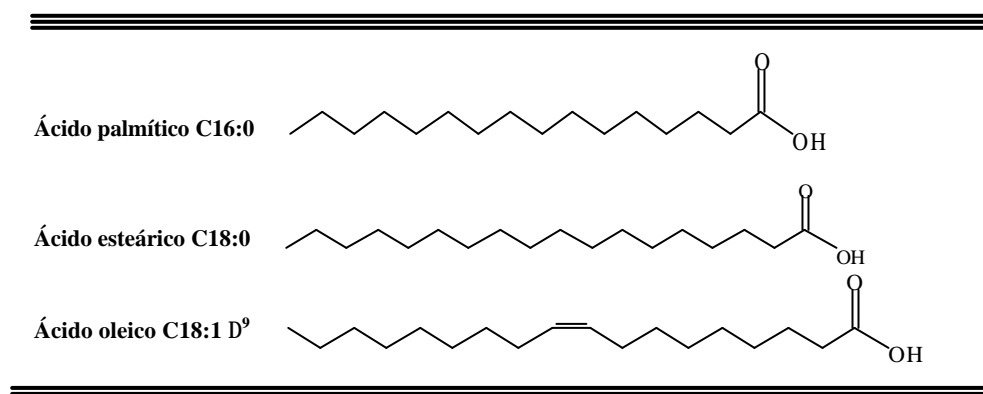
### **Identificação de *we1*.**

O espectro no infravermelho observou-se uma banda em  $1711\text{ cm}^{-1}$  característica de  $\nu_{\text{C=O}}$  de ácidos carboxílicos. Em  $2858$  e  $2927\text{ cm}^{-1}$  verificou-se a presença de bandas devido aos  $\nu_{\text{C-H}}$  e em  $1455\text{ cm}^{-1}$  bandas de  $\delta_{\text{C-H}}$ . Bandas largas aparecem entre  $3000$  e  $3500\text{ cm}^{-1}$  e correspondem aos  $\nu_{\text{O-H}}$ . No caso de ácidos carboxílicos pode haver a formação de dímeros devido à forte ligação hidrogênio.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 2.4, p. 105) apresentou deslocamentos químicos na região de hidrogênios alifáticos. Observou-se um tripleto em  $0,96\delta$  atribuído a presença de uma metila terminal. Na região entre  $1,28$  e  $2,80\delta$  observou-se vários multipletos que podem ser atribuídos a ligações  $-\text{CH}_2$  e outro multiplete em  $5,33\delta$  devido à presença de ligações duplas. O tripleto em  $2,25\delta$  indica a presença do  $\text{CH}_2$  ligado a carboxila.

O espectro de  $^{13}\text{C}$  confirmou a presença dos sinais desses carbonos alifáticos e das ligações duplas. Esses dados sugeriram ser a molécula um ácido graxo de cadeia longa. Para a confirmação, optou-se por fazer uma reação de metilação com diazometano, a fim de transformar o ácido graxo em seu derivado metilado, e posteriormente identificá-lo por cromatografia gasosa e comparação com padrões de ésteres metílicos.

A fração metilada apresentou pico de tempo de retenção similar ao padrão ésteres graxos (Fig. 2.5, p. 106). Realizou-se também o enriquecimento da amostra com o padrão autêntico, verificando a intensificação da área do respectivo pico. Logo, a fração ***we1*** corresponde a uma mistura e os ácidos palmítico, esteárico e oleico são constituintes majoritários (Fig. 2.6).



**Fig. 2.6:** Estruturas de alguns ácidos graxos detectados em *we1*

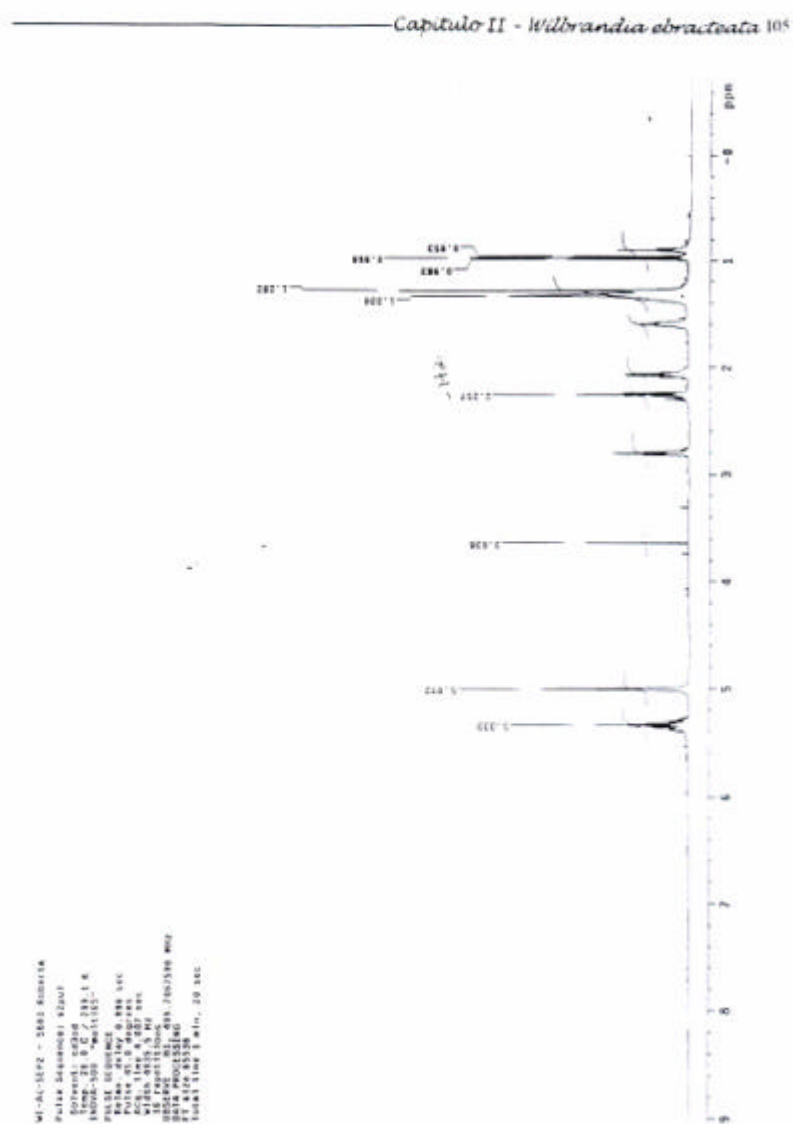


Fig. 2.4: Espectro de RMN<sup>1</sup>H de **we1** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

Fig. 2.4: Espectro de RMN<sup>1</sup>H de **we1** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

Capítulo II - *Willbrandia ebracteata* 100

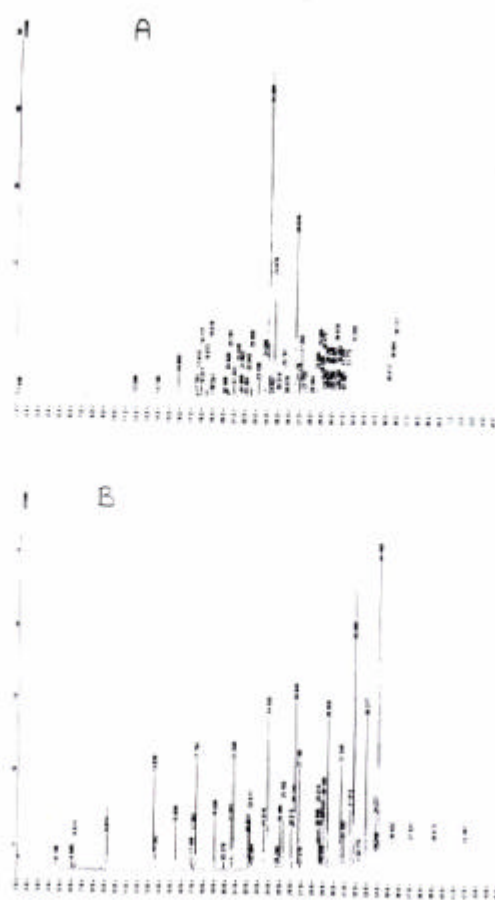


Fig. 2.5 :Cromatograma A (we1)  
Cromatograma B (Padrão de ésteres graxos)

**Fig. 2.5** :Cromatograma A (we1)  
Cromatograma B (Padrão de ésteres graxos)



## Identificação de *we2*

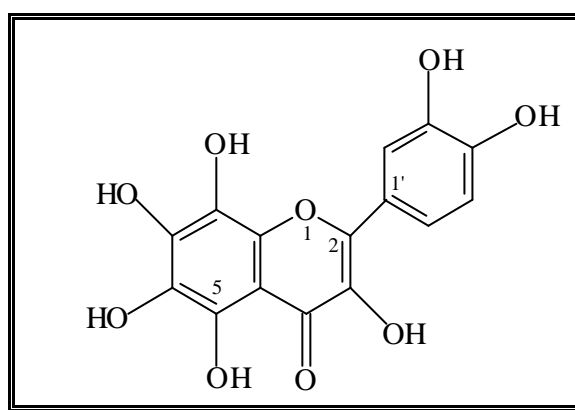
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 2.7, p. 108; tabela 2.1) de *we2* apresentou picos somente na região dos hidrogênios aromáticos. Observou-se em 6,79 $\delta$  um dubleto de  $J=8,5$  Hz (*orto*) referente ao H5', um duplo dubleto em 7,41 $\delta$  ( $J=2,0$  e 8,5 Hz) e em 7,43 $\delta$  ( $J=2$  Hz) referentes ao H2'e H6', respectivamente, ambos do anel aromático B (HARBORNE, 1996).

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e comparação com dados da literatura indicam que esta molécula trata-se do 3',4',5,6,7,8-hexaidroxiflavonol (Fig. 2.8) (SANTOS, 2001).

**Tabela 2.1:** Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ ) do 3',4',5,6,7,8-hexaidroxiflavonol \* e de *we2*

Deslocamentos Químicos ( $\delta$ )		
Posição	RMN $^1\text{H}$ (*)	RMN $^1\text{H}$ ( <i>we2</i> )
2'	7,77 d (2,0 Hz)	7,43 d (2,0 Hz)
5'	6,92 d (8,0 Hz)	6,79 (8,5 Hz)
6'	7,67 dd (2,0; 8,0 Hz)	7,41 (2,0; 8,5 Hz)

\* SANTOS, 2001



**Fig. 2.8:** Estrutura de 3',4',5,6,7,8-hexaidroxiflavonol isolado de *Wilbrandia ebracteata*.

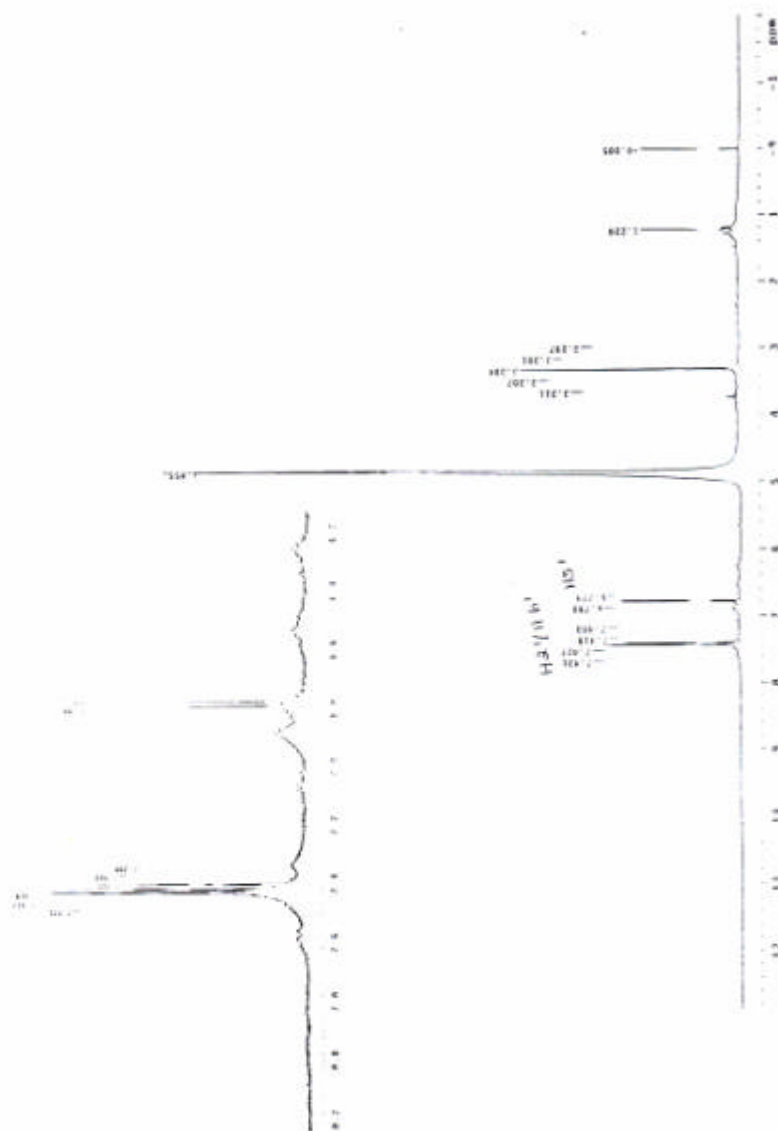


Fig. 2.7: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we2** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 2.7: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we2** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

### **Identificação de *we5*.**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 2.9, p. 112) mostrou-se semelhante a *we2* para o anel B, mas que difere porque apresentou picos na parte alifática do espectro.

Visualizou-se um dubleto em 7,64 $\delta$  ( $J=2$  Hz) referente ao hidrogênio H2' do anel substituído em *meta*. Um duplo dubleto em 7,35 $\delta$  ( $J= 2,5$  e 8,0 Hz) atribuído ao H6' e um dubleto em 6,91 $\delta$  ( $J= 8,5$  Hz) referente ao H5', ambos do anel B. Esses deslocamentos químicos são característicos de hidrogênios do anel B, indicando que existem duas hidroxilas em *orto*. Observou-se também dois singletos em 6,28 $\delta$  e 6,65 $\delta$  (Tabela 2.2).

O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 2.10, p. 113) apresentou os carbonos da molécula e o experimento HMQC (Fig. 2.11, p. 114, tabela 2.2) forneceu as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos. No caso dos hidrogênios de posições 2', 5' e 6' do anel B da aglicona quercetina, observou-se correlação entre o sinal em 114,8 $\delta$  e o H2'(7,64 $\delta$ ), entre o sinal em 116,7 $\delta$  e o H5'(6,91 $\delta$ ) e entre o sinal em 120,4 $\delta$  e o H6'(7,35 $\delta$ ).

Também verificou-se a correlação do sinal em 100,9 $\delta$  com um singlete em 6,28 $\delta$  e entre o sinal em 105,1 $\delta$  com o hidrogênio em 6,65 $\delta$ .

Na região dos hidrogênios alifáticos, visualizaram-se dois duplo dubletos em 2,64 $\delta$  e 2,84 $\delta$ , ambos referentes a dois hidrogênios ligados ao carbono que absorve em 44,9 $\delta$ . Um acoplamento entre o dubleto devido a uma metila (3H, 1,40 $\delta$ ) pôde ser observado com o carbono que absorve em 20,4 $\delta$ . O multipletto em 5,90 $\delta$  correlaciona com o sinal em 73,3 $\delta$ , característico de uma ligação -CH-O- (Fig. 2.11, p.114).

No espectro COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Fig. 2.12, p. 115) pôde-se observar acoplamentos independentes entre si nas partes aromática e alifática da molécula, ou seja, um conjunto de acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos e outro conjunto de acoplamentos entre os hidrogênios alifáticos.

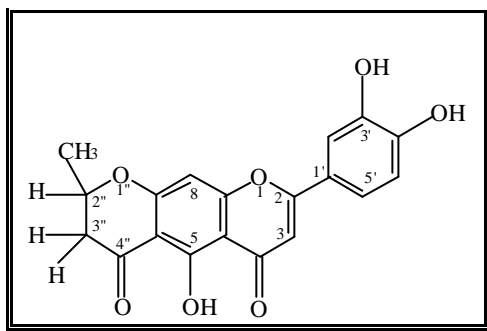
O experimento de HMBC (Fig. 2.13, p. 116) foi importante, pois é por meio desta técnica que observamos os acoplamentos à longa distância e também pudemos atribuir os valores de deslocamento químico aos carbonos do anel A.

O valor em 7,35 $\delta$  (H6') correlaciona com 151,3 (C4') e 167,8 $\delta$ , atribuiu-se assim o valor em 167,8 $\delta$  a C2.

O sinal em 6,65 $\delta$  acopla com os carbonos 123,5 $\delta$  (C1'), 167,8 $\delta$  (C2) e 182,5 $\delta$ (C4), podendo ser este sinal de hidrogênio atribuído ao H3 do flavonóide. Observou-se também os sinais das correlações do hidrogênio 7,64 $\delta$  (H2') com os carbonos 147,5 $\delta$  (C3'), 151,3 $\delta$  (C4') e 167,8 $\delta$  (C2).

Uma das principais correlações observadas é entre o hidrogênio em 6,28 $\delta$ , atribuído ao H8 do anel A, e os carbonos aromáticos em 167,8 $\delta$  (C2) e 170,7 $\delta$  (C7). O mesmo espectro mostra a correlação dos hidrogênios em 2,64 $\delta$  e 2,84 $\delta$  com o sinal em 178,5 $\delta$  (C4''). Por fim, o sinal em 1,40 $\delta$  acopla com o carbono 73,3 $\delta$  (C2'') (Fig. 2.13, p. 116). Dessa forma, pôde-se propor a existência de um cicloanel alifático ligado aos carbonos C6 e C7, como o proposto na Fig. 2.14.

Esta proposta é a que está mais próxima da biossíntese dos flavonóides que apresenta usualmente o carbono oxigenado ligado ao C7. Além disso, *W. ebracteata* apresenta a substância **we3**, que apresenta ligação C-C com o substituinte na posição 6. Não foi encontrado na literatura substância com essa estrutura. Deve-se ainda ressaltar que o C2'' é um carbono quirático, sendo necessária a realização de experimentos para a determinação de sua estereoquímica.



**Fig. 2.14:** Estrutura proposta do flavonóide **we5** isolado de *W. ebracteata*

**Tabela 2.2:** Deslocamentos de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  de **we5** (500 MHz e 125 MHz, respectivamente,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Posição	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$
2		167,8
3	6,65 s	105,1
4		182,5
5		159,1
6		*
7		170,7
8	6,28 s	100,9
9		*
10		*
1'		123,5
2'	7,64 d ( $J= 2,0$ Hz)	114,8
3'		147,5
4'		151,3
5'	6,91 d ( $J=8,0$ Hz)	116,7
6'	7,35 dd ( $J= 2,0$ e 8,0 Hz)	120,4
2''	5,90 m	73,3
3''	2,64 dd; 2,84 dd	44,9
4''		178,5
$\text{CH}_3$	1,40 d ( $J= 6,5$ Hz)	20,4

\* valores não observados (pequena intensidade)



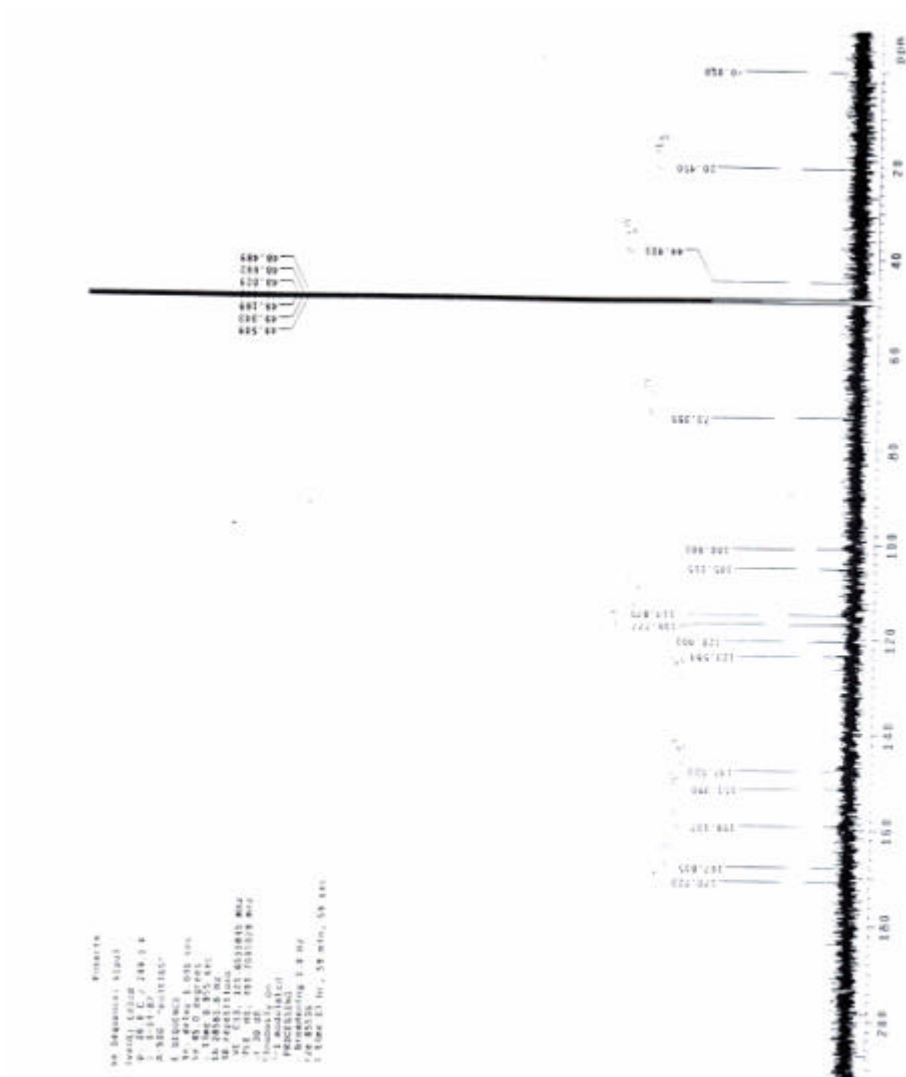


Fig. 2.10: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de we5 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

Fig. 2.10: Espectro de RMN <sup>13</sup>C de we5 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

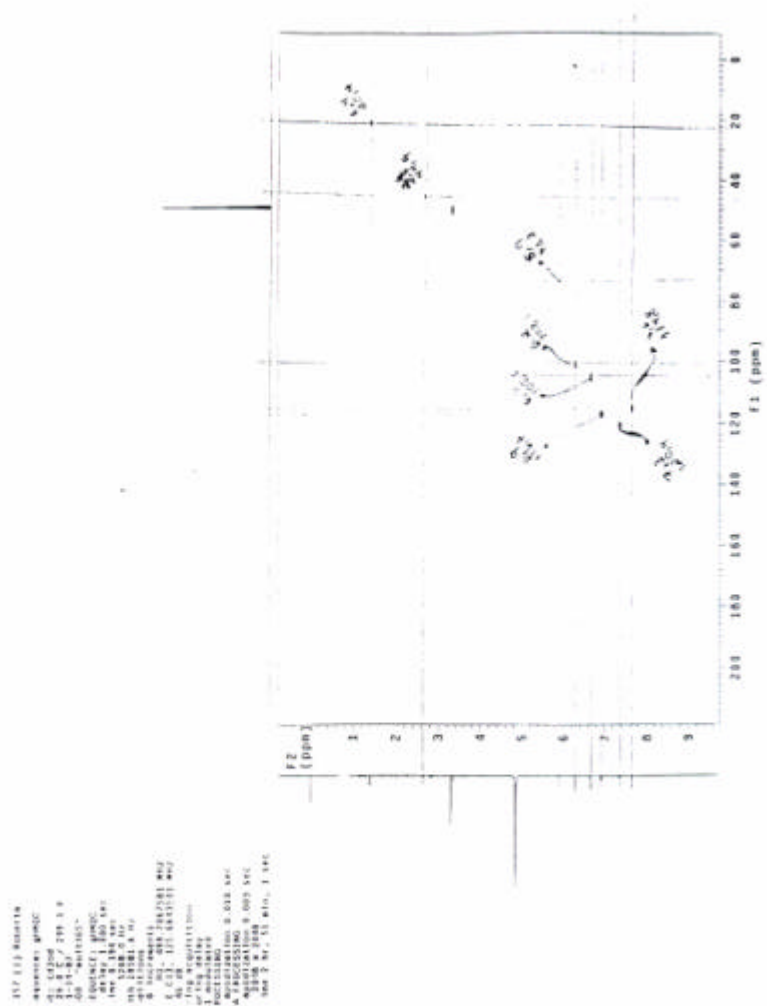
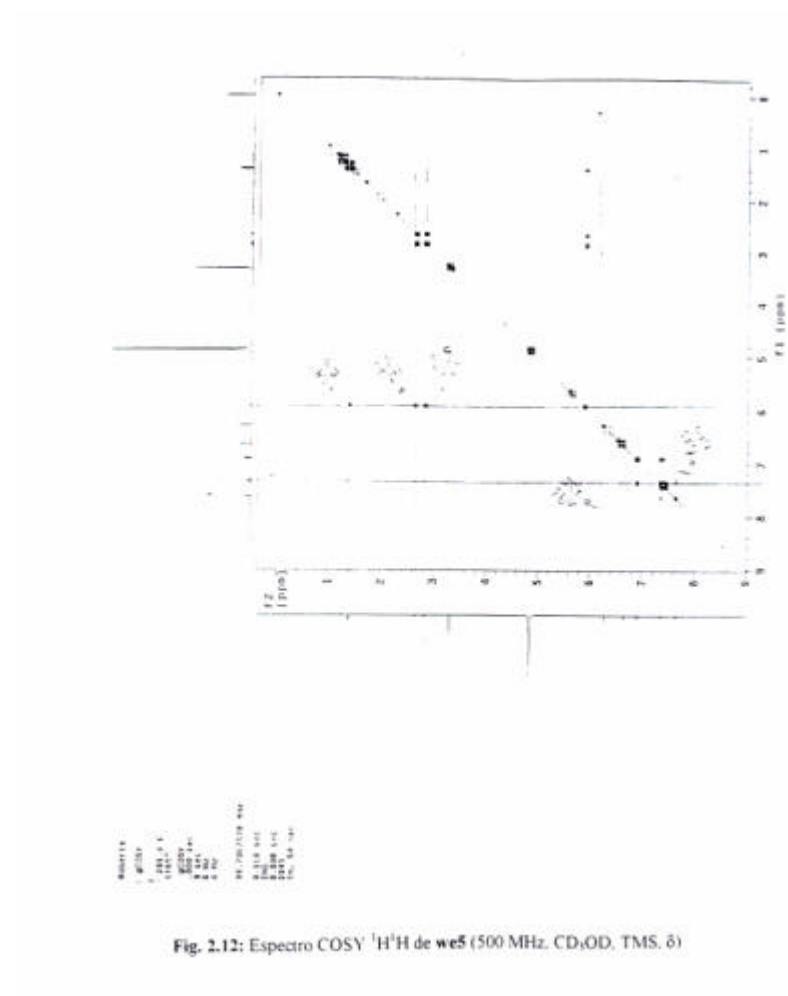


Fig. 2.11: Experimento HMQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) de we5

**Fig. 2.11:** Espectro HMQC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ) de we5





**Fig. 2.12:** Espectro COSY  $^1\text{H}^1\text{H}$  de **we5** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

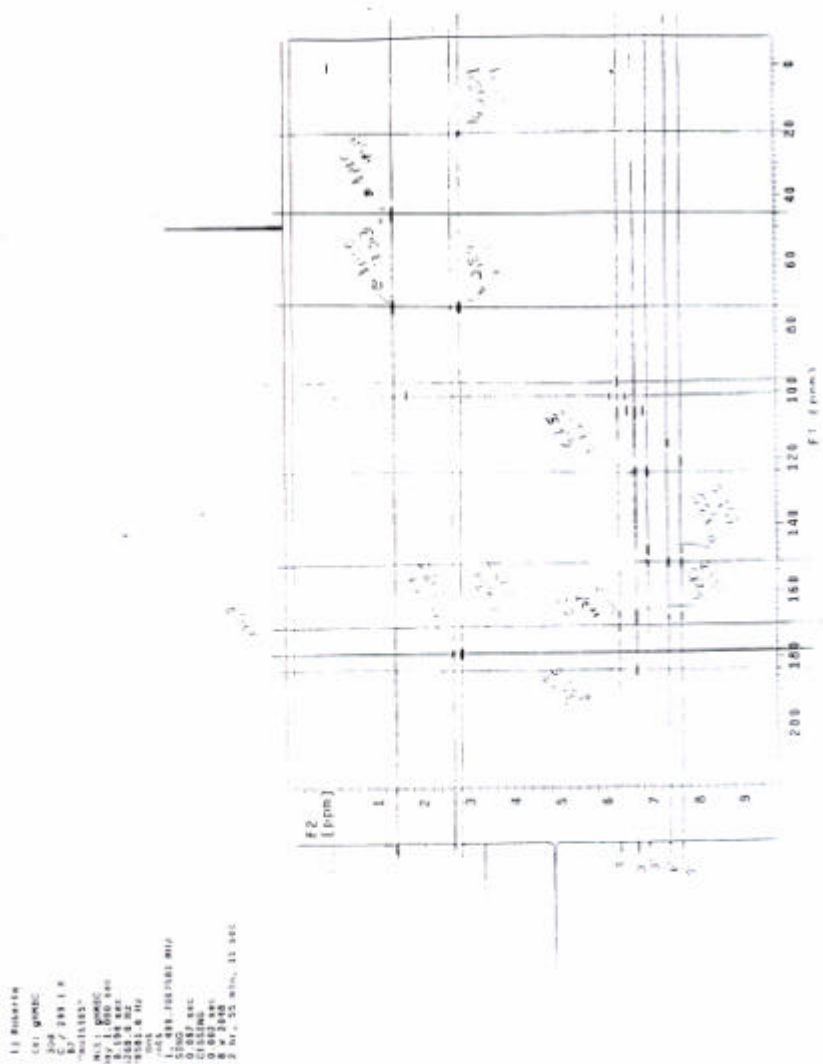


Fig. 2.13: Experimento HMBC de we5 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ)

Fig. 2.13: Espectro HMBC de we5 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, δ)

*Identificação de we7*

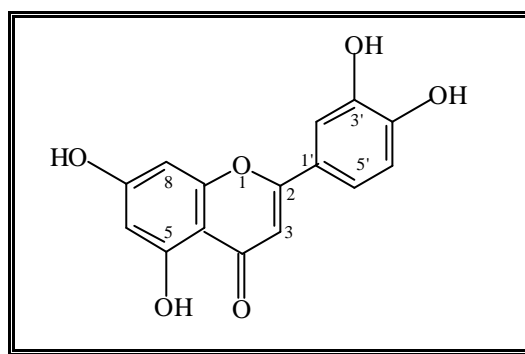
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 2.15, p. 118, tabela 2.3) apresentou picos somente na região aromática. Em 6,90 $\delta$  observa-se um dubleto de  $J = 8,0$  Hz (*orto*) referente ao H5' do anel aromático B. Na região de 7,50 $\delta$  pôde-se observar uma série de sinais sobrepostos referentes a H2' e H6' (HARBORNE, 1996).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou também os sinais de H6 em 6,15 $\delta$  e o H8 em 6,40 $\delta$  do anel aromático A. Devido a constante de acoplamento que é baixa observou-se dois singletos largos. Além disso, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou um singlete em 6,55 $\delta$  referente ao H3 (HARBORNE, 1996).

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e comparação com dados da literatura indicaram que esta molécula trata-se da luteolina (HARBORNE, 1996).

**Tabela 2.3:** Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS,  $\delta$ ) da luteolina e de we7

Posição	RMN $^1\text{H}$	
	Dados da literatura (Harborne, 1996)	we7
3	6,69 s	6,55 s
6	6,22 d (2,0 Hz)	6,15 sl
8	6,47 d (2,0 Hz)	6,40 sl
2'/6'	7,43 d (2,0 Hz); 7,44 dd (2,0; 9,0 Hz)	7,50 m
	6,92 d (9,0 Hz)	6,90 (8,5 Hz)



**Fig. 2.16:** Estrutura da luteolina isolada de *W. ebracteata*



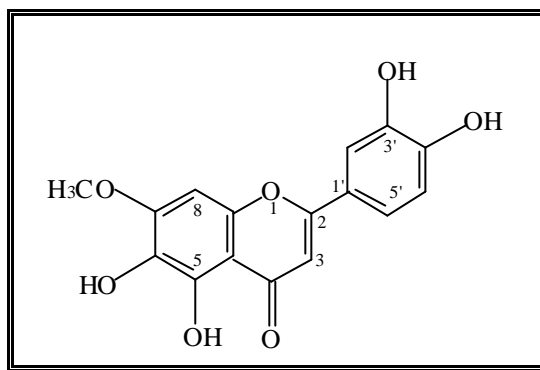
Fig. 2.15: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we7** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 2.15: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we7** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

*Identificação de we8*

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 2.17, p. 120) dessa fração sugeriu um perfil espectral semelhante aquele apresentado por **we7** para o anel B, com a presença de sinais sobrepostos referentes a H2' e H6' em 7,50 $\delta$ . O sinal em 6,95 $\delta$  pode ser atribuído ao H5' do anel B.

É possível observar também outros sinais. Em 6,40 $\delta$  e 6,60 $\delta$  observa-se os sinais de H3 e H8, respectivamente. E em 3,91 $\delta$  observa-se a presença de um de singlete referente a uma metoxila ligada no anel aromático. Comparação com dados da literatura (VILEGAS et al., 1998) sugerem que a metoxila esteja ligada na posição 7 do anel A. Deste modo, sugerimos **we8** como sendo 5,6,3',4'-tetraidróxi-7-metóxi-flavona (Fig. 2.18).



**Fig. 2.18:** Estrutura da 5,6,3',4'-tetraidróxi-7-metóxi-flavona isolada de *W. ebracteata*

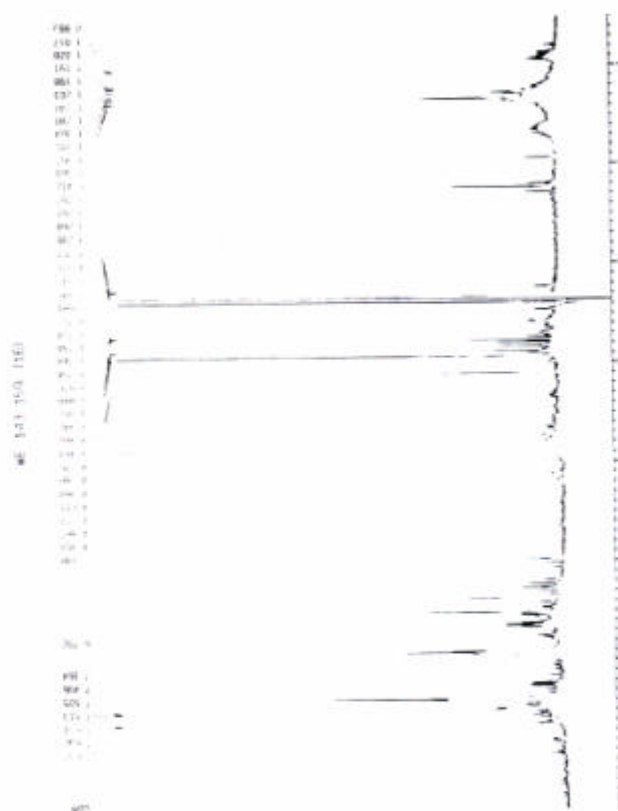


Fig. 2.17: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we8** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 2.17: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we8** (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

### *Identificação de we3, we4 e we6*

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das frações **we3**, **we4** e **we6** (Fig. 2.19, p. 124; 2.20, p. 125 e 2.21, p. 126, respectivamente) apresentaram semelhanças. Observaram-se sinais na região de hidrogênios aromáticos entre 6,00 $\delta$  e 8,00  $\delta$ .

Para as frações **we3** e **we6** os perfis espectrais apresentados pelos picos entre 6,90 $\delta$  e 7,50 $\delta$  sugeriram um padrão de substituição no anel B com a presença de duas hidroxilas em 3' e 4'.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we3** mostrou também um singlete devido ao H8 em 6,54 $\delta$  do anel aromático A e outro singlete em 6,50 $\delta$  referente ao H3 (HARBORNE, 1996). Já o espectro de **we6** apresentou dois singletos observados em 6,28  $\delta$  e 6,56  $\delta$  e, por comparação com dados da literatura (HARBORNE, 1996), o primeiro refere-se ao H6 do anel A e o segundo ao H3 do anel C.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we4** (Fig. 2.20, p. 124; tabela 2.4) apresentou um padrão de substituição do anel B diferente daquele de **we3** e **we6**.

Observou-se dois dubletos em 8,02 $\delta$  ( $J = 8,5$  Hz) e 6,89 $\delta$  ( $J = 8,5$  Hz) foram atribuídos respectivamente a H2'/H6' e H3'H5' e são relativos ao anel B do flavonóide, indicando que este anel apresenta-se com uma única oxigenação na posição 4' do anel (HARBORNE, 1996).

Dois singletos têm deslocamentos em 6,27 $\delta$  e em 6,77 $\delta$ . Comparação com dados da literatura mostraram que o primeiro é referente ao H8 e o último ao H3 (HARBORNE, 1996).

O hidrogênio anomérico do açúcar (4,59 $\delta$ ) apareceu sobreposto ao pico da água do  $\text{CD}_3\text{OD}$  em **we3**. Para **we4** e **we6** podem-se observar esse pico do hidrogênio anomérico em 4,69 $\delta$  e 4,92 $\delta$ , respectivamente. Esses valores de deslocamentos químicos são compatíveis com H1 de C-glicosídeos, uma vez que o hidrogênio anomérico aparece em frequência mais baixa ( $\sim 4,5$ -5,0 ppm) do que um O-glicosídeo ( $\sim 5,0$  - 5,6 ppm) (HARBORNE, 1996). Além disso, a constante de acoplamento em uma ligação C-glicosídica é de 10 Hz, em contraste com constantes de acoplamentos menores ( $\sim 1,5$  - 7,5 Hz) nos O-glicosídeos (HARBORNE, 1996).

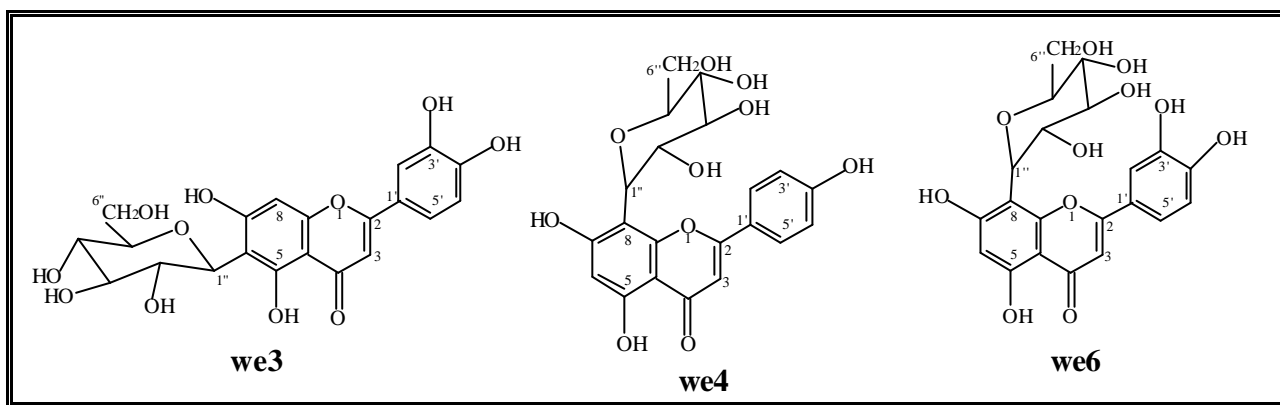
Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (tabela 2.4) observaram-se o sinal da carbonila C4 entre 182,0 $\delta$  e 183,9 $\delta$ , o sinal de C2 entre 163,9 $\delta$  e 164,8 $\delta$  e o de C3 em 102,4 $\delta$  a 103,8 $\delta$ , sugerindo que as moléculas devem ser uma flavona (AGRAWAL, 1989).

Seis sinais entre 62,7 $\delta$  e 82,5 $\delta$  característicos de C-glicosídeos podem ser atribuídos a uma unidade de  $\beta$ -D-glicopiranosídica e os outros 13 sinais são atribuídos à aglicona (AGRAWAL, 1989).

Com relação ao anel A, para **we3** observou-se em 95,2 $\delta$  e 109,1 $\delta$  o valor de C8 e C6, respectivamente. Comparação com dados da literatura referentes a esses deslocamentos químicos mostraram que a unidade  $\beta$ -glicosídica deve estar ligada à posição 6 do anel A, enquanto que para **we6** observou-se C6 e C8 em 100,2 $\delta$  e 104,8 $\delta$ , respectivamente. Diferentemente de **we3**, para esta molécula a unidade  $\beta$ -glicosídica deve estar ligada à posição 8 do anel A (AGRAWAL, 1989).

Do mesmo modo, por comparação com dados da literatura, os deslocamentos químicos observados para **we4** dos carbonos C6 (98,1) e C8 (104,6) mostram que a unidade  $\beta$ -glicosídica também deve estar ligada à posição 8 do anel A como em **we6** (AGRAWAL, 1989).

Assim, esses dados apresentados são compatíveis com os da isoorientina (5,7,3',4',-tetraidróxi-6-C- $\beta$ -D-glicopiranosilflavona) (**we3**), vitexina (5,7,4'-triidróxi-8-C- $\beta$ -D-glicopiranosilflavona) (**we4**), orientina (5,7,3',4'-tetraidróxi-8-C- $\beta$ -D-glicopiranosilflavona) (**we6**) (Fig. 2.22) (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996).



**Fig. 2.22:** Estrutura da isoorientina (**we3**), vitexina (**we4**) e orientina (**we6**) isoladas de *W. ebracteata*.

**Tabela 2.4:** Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}^*$  e RMN  $^{13}\text{C}^{**}$  de **we3**, **we4** e **we6** comparado ao da literatura (500 MHz e 125 MHz, respectivamente,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )



Posição	we3 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz)		We4 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz)		we6 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz)	
	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
2		164,8		163,9		166,6
3	6,50 s	103,8	6,77 s	102,4	6,56 s	103,8
4		183,9		182,1		183,9
5		158,6		156,0		158,6
6		109,1		98,1		100,2
7		166,2		162,2		164,7
8	6,54 s	95,2	6,27 s	104,6	6,28 s	104,8
9		161,9		161,1		162,8
10		105,1		104,0		104,8
1'		123,4		121,6		123,7
2'	7,36 d	114,1	8,02 d (J=8,5 Hz)	128,9	7,40 d	114,6
3'		146,9	6,89 d (J=8,5 Hz)	115,8		146,8
4'		151,0		160,4		150,9
5'	6,90 d (J=9,0 Hz)	116,7	6,89 d (J=8,5 Hz)	115,8	6,91 d (J=8,5 Hz)	116,8
6'	7,36 dd	120,3	8,02 d (J=8,5 Hz)	128,9	7,40 dd	121,2
<b>Glicose</b>						
1''		80,0		78,6	4,92 (J= 9,5 Hz)	75,0
2''		75,2		73,3		70,8
3''		72,4		70,8		76,8
4''		71,6		70,5		68,1
5''		82,5		81,8		-
6''		62,7		61,2		-
<b>OH-5</b>	-	-	-	-	-	-

\* HARBORNE, 1996. \*\* AGRAWAL, 1989.

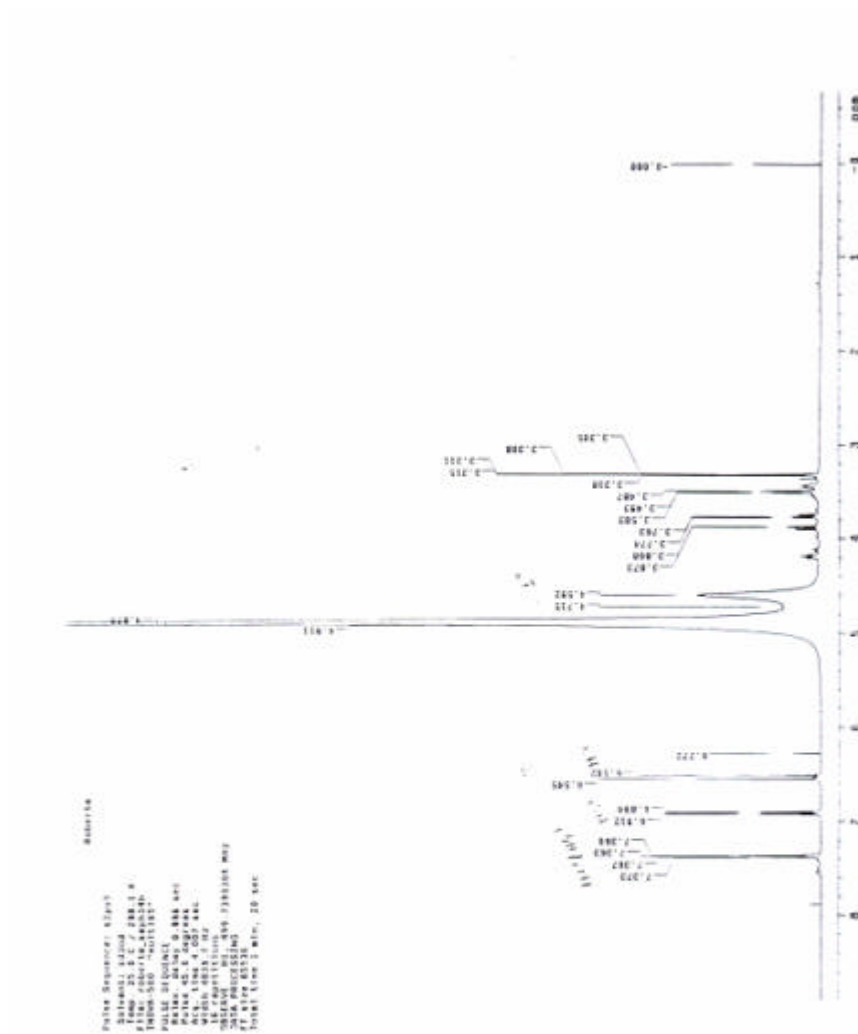


Fig. 2.19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de we3 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 2.19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de we3 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

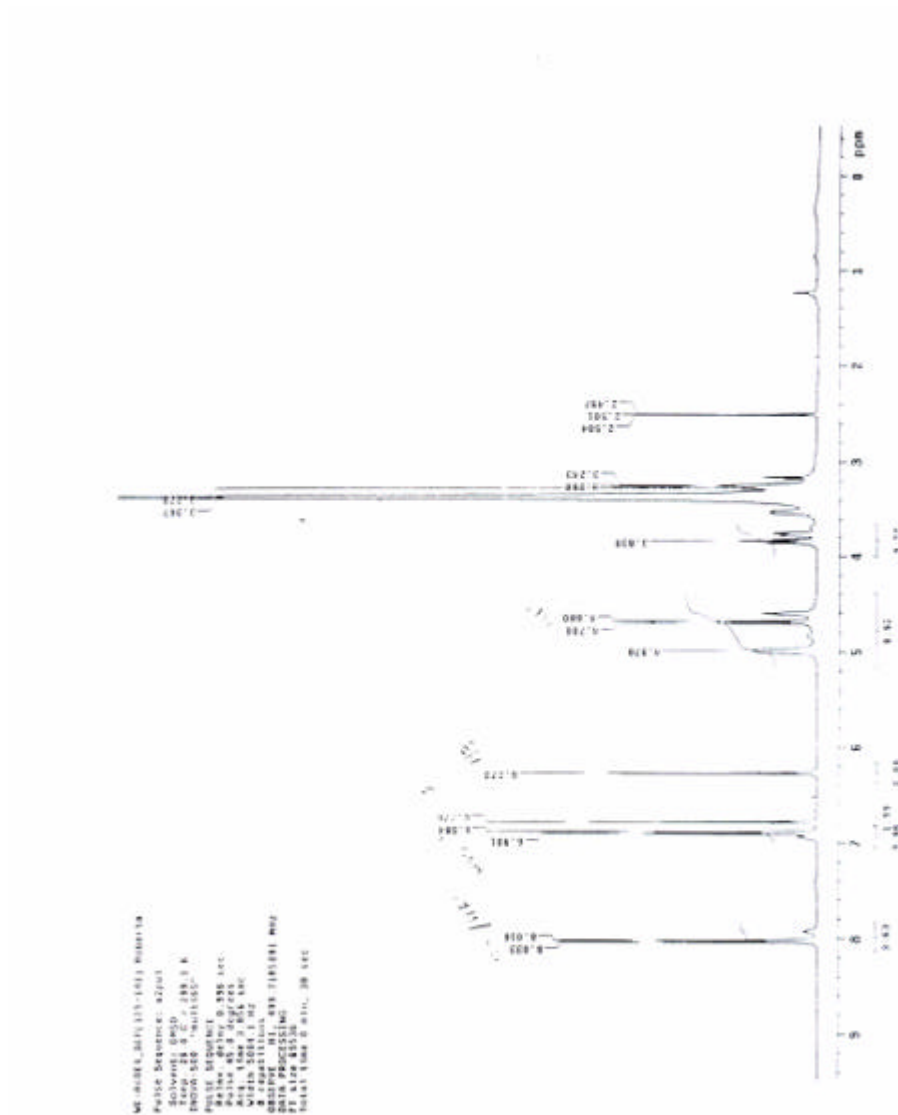


Fig. 2.20: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we4** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 2.20: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **we4** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

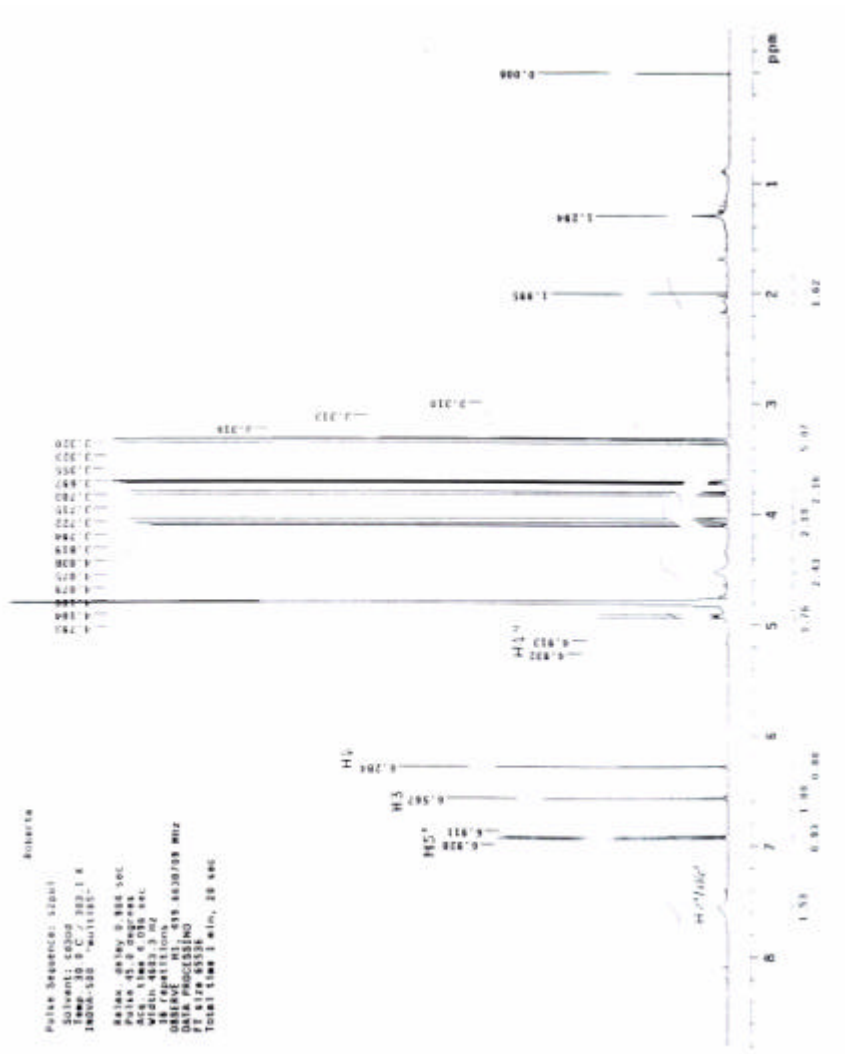


Fig. 2.21: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de we6 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

Fig. 2.21: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de we6 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS, δ)

## II.2.6. Estudo da fração metanólica

A fração aquosa foi filtrada em uma coluna contendo resina Amberlite XAD-2 para retirar os açúcares livres. Para isso, montou-se uma coluna (30 x 3 cm) contendo XAD-2. Dissolveu-se ~9 gramas da fração aquosa em 1,5 L de água. A solução foi homogeneizada até se obter uma solução límpida. Essa solução foi filtrada sobre a coluna de resina XAD-2, com fluxo de 1 mL/min. Após a eluição total da solução, a coluna foi lavada com 2 litros de água destilada. Em seguida, procedeu-se à eluição utilizando-se 1 L metanol e por último 300 mL acetona pura. Obteve-se então 3 frações:

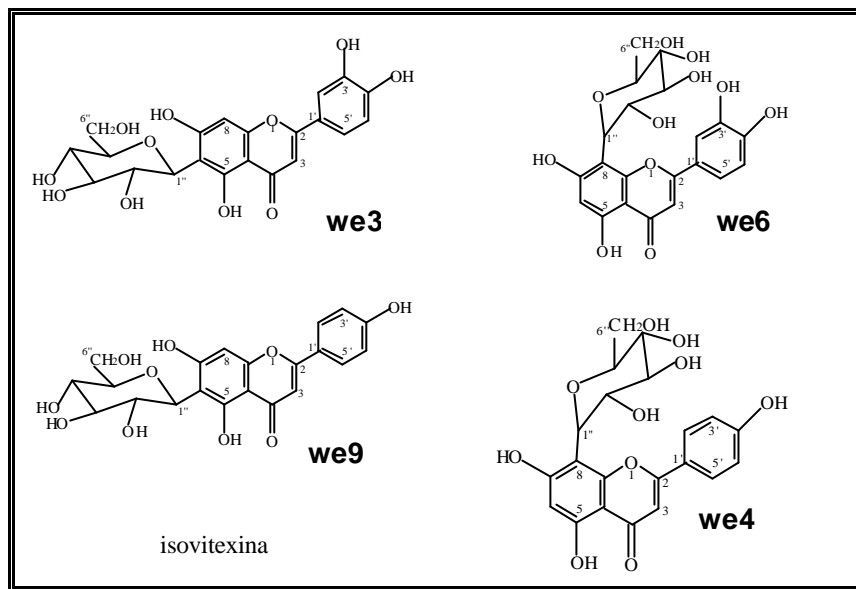
- 5- H<sub>2</sub>O 100% (~6,7 g)
- 6- MeOH 100% (~ 3,0g)
- 7- Acetona 100% (~0,3 g)

As frações obtidas foram analisadas por CCDC eluídas em CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 5:6:1:4, fase inferior. Verificamos que a fração 1 (aquosa) apresentou um odor característico de açúcar. Seu espectro de RMN mostrou apenas picos entre 3,0 e 5,5 δ evidenciando a presença de açúcares livres. A fração acetônica foi desprezada por conter apenas manchas verdes devido à presença de clorofila.

A fração metanólica apresentou um perfil cromatográfico predominantemente com manchas amareladas quando reveladas com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, devido à presença de flavonóides glicosilados. Para a análise dessa fração, tomou-se 2,0 g da fração metanólica. Dissolveu-se a amostra em 15 mL de metanol e centrifugou-se. Injetou-se a amostra na coluna de Sephadex LH-20 e procedeu-se a eluição com metanol puro, em fluxo de 0,7 mL/min. Obtiveram-se 100 frações de 6 mL cada.

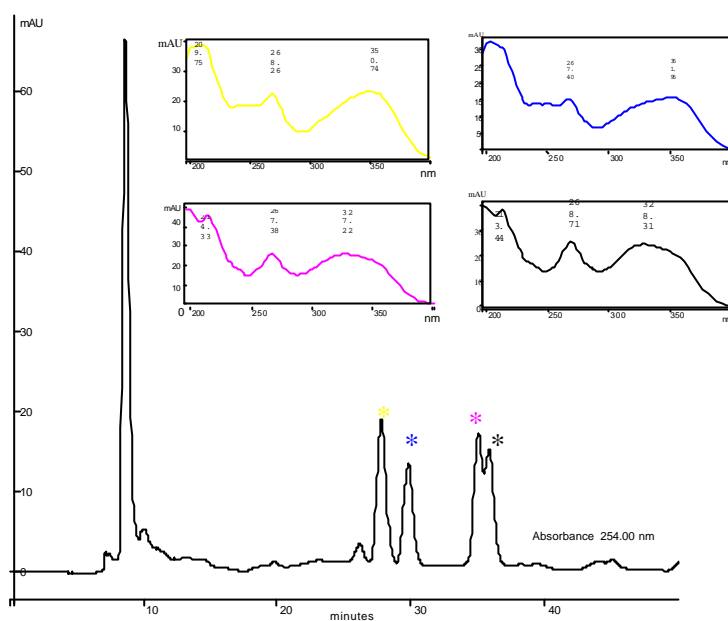
Foi realizada CCDC das frações obtidas da coluna em CHCl<sub>3</sub>/MeOH/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 5:6:1:4, fase inferior. Diferentes placas foram reveladas sob luz ultravioleta e em seguida com iodo, solução de anisalaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NP/PEG. As frações semelhantes foram agrupadas.

O perfil cromatográfico apresentado por todas as frações mostrou a presença predominante manchas de cor amarelada, sugerindo a presença de flavonóides e de Rf's semelhantes a **we3**, **we4** e **we6**. Análise das frações por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, HMQC, HMBC e comparação com dados da literatura (HARBORNE, 1996; AGRAWAL, 1989) permitiu constatar a presença de isoorientina (**we3**), orientina (**we6**), vitexina (**we4**) e isovitexina (**we9**) (Fig. 2.23).



**Fig. 2.23:** Substâncias detectadas no extrato metanólico de *Wilbrandia ebracteata*

O perfil cromatográfico realizado por HPLC (Fig. 2.24) do extrato metanólico de *W. ebracteata* apresentou predominantemente os flavonóides C-glicosilados iguais aos mostrados na figura 2.24. Para a confirmação dos tempos de retenção de cada substância do cromatograma foi injetado nas mesmas condições as substâncias isoladas. Os espectros ultravioleta estão dispostos de acordo com a eluição. Primeiro eluíram a orientina e isoorientina, seguida da vitexina e isovitexina.



**Fig. 2.24:** Cromatograma obtido por CLAE do extrato metanólico de *W. ebracteata* (C18, MeOH/H<sub>2</sub>O 82:18, 2 mL/min, 254 nm)

Dentre os flavonóides isolados das folhas de *Wilbrandia ebracteata*, quatro flavonóides C-glicosilados foram encontrados em suas folhas: vitexina, isovitexina, isoorientina e orientina.

Estudo químico realizado com as raízes mostrou que essa classe de flavonóides (spinosina, swertisina, isoswertisina, vitexina, isovitexina, vicenina-2, orientina e isoorientina) estão presentes no extrato metanólico dessa mesma espécie (DOS SANTOS; DOS SANTOS; SCHENKEL, 1996).

Relatos da literatura mostram que várias espécies da família Cucurbitaceae apresentam flavonóides C-glicosilados, como as espécies *Bryonia dioica*, *Bryonia alba*, *Cayaponia tayuya*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Lagenaria siceraria*. Das folhas do melão foi isolada a isovitexina-2''-O- $\beta$ -glicopiranosídeo. Por outro lado, o gênero *Marah* não acumula esses tipos de substâncias. É importante notar que as folhas das espécies da família Cucurbitaceae têm tendência a produzir flavonas C-glicosiladas, enquanto que as flores produzem flavonóis O-glicosilados (KRAUZE-BARANOWSKA; CISOWSKI, 2001).

Do ponto de vista químico, flavonóides C-glicosilados são importantes como marcadores taxonômicos em famílias de plantas onde há dificuldades em classificar as espécies e seus gêneros, como é o caso do gênero *Syngonanthus*, pertencente à família Eriocaulaceae (RICCI et al., 1996).

Além da importância taxonômica, os flavonóides C-glicosilados apresentam inúmeras atividades biológicas. Os efeitos hipotensivos de quatro flavonóides isolados do gênero *Citrus* foram testados. As substâncias 2''-O-xilosilvitexina e vicenina-2 apresentaram forte efeito hipotensor, enquanto 3,8-di-C-glicosilapigenina e 3,8-di-C-glicosildiosmetina não mostraram tais efeitos (HARBORNE, 1996).

O extrato MeOH 70% de *Lavandula stoechas* L. (Lamiaceae) apresentou atividades anticonvulsivante, sedativa e antipasmódica em camundongos. Esse extrato é constituído por flavonóides como luteolina, acacetina e vitexina (GILIAN et al., 2000).

Outras atividades têm sido exibida por flavonóides C-glicosilados, como antibacterial. As flavonas apigenina e seus derivados glicosilados, lucenina-2, luteolina, saponarina e vitexina apresentaram efeitos pronunciados contra alguns tipos de bactérias (*Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes* e *Pseudomas aeruginosa*) (BASILE et al., 1999). Outros flavonóides como quercetina, kaempferol e miricetina apresentaram também outras atividades farmacológicas, como antimutagênica e anticarcinogênica *in vitro* e *in vivo* (KARAKAYA; NEHIR, 1999).

Um dos principais efeitos dos flavonóides é a capacidade de atuar como substâncias antioxidantes.

Relatos da literatura sobre ulcerações gástricas induzidas por etanol e analgésicos não-esteroidais, como a aspirina, informam que tais moléculas podem causar danos diretos sobre as células da mucosa gástrica, resultando no desenvolvimento de radicais livres e hiperoxidação de lipídeos (KARAKAYA; NEHIR, 1999). Estudos têm demonstrado que os radicais livres derivados de oxigênio estão diretamente relacionados às lesões provocadas pelo etanol e/ou pela associação deste com o HCl, o qual acarreta injúria isquêmica no estômago, levando desta forma à hipóxia e conseqüentemente ao aumento da concentração de íons superóxidos. Assim, estes dados sugerem que substâncias antioxidantes podem ser ativas nestes modelos experimentais, produzindo efeito antiulcerogênico, visto que estas



substâncias são capazes de se instalarem sobre a membrana gástrica, de inibirem a peroxidação lipídica e de inativarem os ânions superóxido (GONZALEZ, 2001).

Essa atividade antioxidante é correlacionada a determinadas características estruturais dos flavonóides, como por exemplo (FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001):

- a) presença de grupamento hidroxila na posição 3 do anel C;
- b) ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C;
- c) grupo carbonila na posição 4 do anel C;
- d) atividade quelante pela associação do grupo carbonila no carbono 4 e uma hidroxila no carbono 3 ou 5;
- e) padrão e número de grupos hidroxilas dos anéis A, B, C.

Essas características podem ser observadas principalmente na molécula *we2* (3',4',5,6,7,8-hexaidroxiflavonol) que apresenta o conjunto de características necessárias a essa atividade.

O teste preliminar com betacaroteno para verificar a presença de substâncias antioxidantes no extrato bruto confirma esta proposta. Outros flavonóides que possuem unidades de açúcares isolados neste trabalho de *W ebracteata* apresentaram também essa atividade.

A presença de unidades de açúcares ainda é discutida, pois existem poucos dados na literatura que atribuem atividades farmacológicas ou como é o nosso caso, atividade antiulcerogênica a flavonóides glicosilados. Geralmente é proposto que a glicosilação dessas substâncias reduz a atividade antioxidante quando comparado à correspondente aglicona (FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001). Outros dados mostram que substâncias glicosiladas mantêm sua atividade antioxidante *in vivo*, pois as ligações glicosídicas são provavelmente hidrolizadas em condições gástricas fornecendo grupos hidroxílicos livres (YESILADA et al., 2000).

Alguns flavonóides glicosilados, como é o caso de quercetina-3',4'-diglicosídeo e quercetina 4'-glicosídeo apresentaram atividades antioxidantes *in vitro* (YESILADA et al., 2000).

Esta propriedade antioxidante dos flavonóides tem sido alvo de grande interesse e atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois pode contribuir para a prevenção de importantes doenças.

Alguns tipos flavonóides podem ocorrer na natureza com uma cadeia alifática ligada à parte aromática, como a encontrada em *we5*. As cadeias alifáticas mais comumente encontradas podem ser grupos prenila, isoprenila, furano, dimetilcromano e seus derivados (BARRON; IBRAHIM, 1996).

São relatados na literatura cerca de 700 flavonóides prenilados que pertencem à classe das chalconas, flavonas e flavonóis, além de seus derivados diidro. As flavonas são a segunda classe mais abundante na natureza que apresenta esse tipo de esqueleto carbônico. Esses tipos de substâncias são encontrados principalmente nas famílias Moraceae e Leguminosae (BARRON; IBRAHIM, 1996).

Quanto à atividade biológica, há relatos de flavonóides prenilados que possuem atividade antifúngica, antimicrobiana e hipotensora (BARRON; IBRAHIM, 1996; MONACHE et al., 1996). A flavona vexibinol exibiu significativa ação antiúlcera, inibindo a secreção ácida (BARRON; IBRAHIM, 1996).

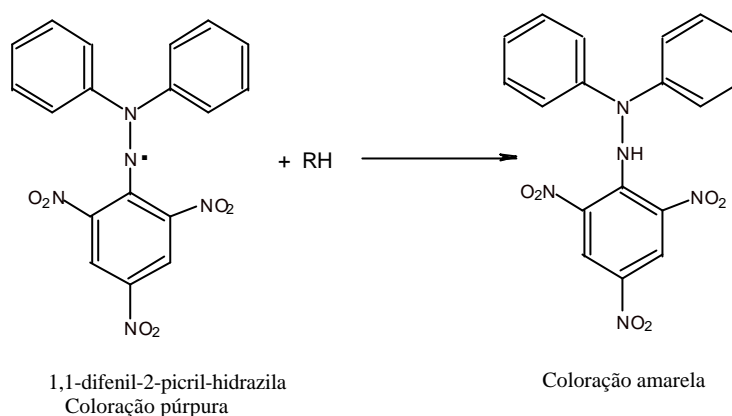
## **II.2.7. Avaliação da atividade antioxidante**

Vários testes são relatados na literatura com a finalidade de observar a atividade antioxidante. Com este intuito realizamos dois ensaios para verificar a atividade antioxidante de alguns flavonóides isolados de *Wilbrandia ebracteata*.

### **II.2.7.1. Avaliação da atividade antioxidante com DPPH.**

O ensaio espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH é um dos testes que permite fazer uma avaliação indireta da capacidade antioxidante da substância em análise.

A capacidade sequestradora de radicais livres pode ser verificada pelo método de Blois, 1958. O DPPH apresenta coloração violeta, tendo assim uma absorção em 517 nm, quando se encontra reduzido torna-se amarelo. Esta redução é devida à ação de algumas substâncias capazes de doar hidrogênio radicalar ao DPPH, formando assim um radical estável, o qual é associado à propriedade antioxidante (SROKA; CISOWSKI, 2003).

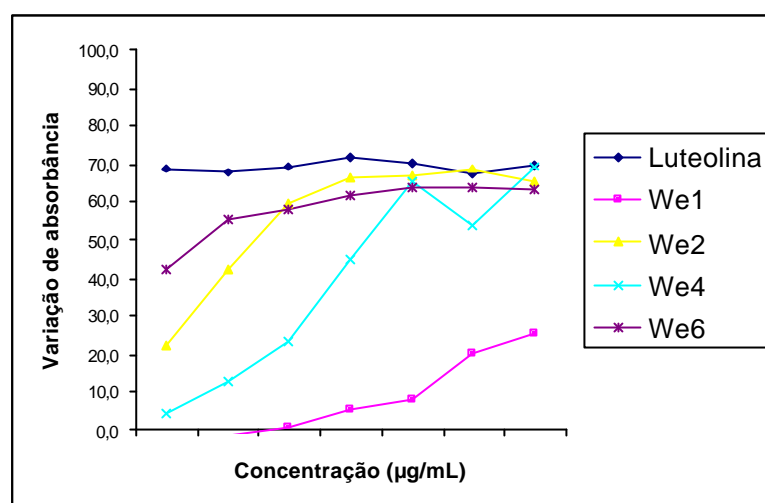


**Figura. 2.25:** Representação da reação de doação de hidrogênios para uma substância sequestradora de radicais livres, no caso DPPH

Neste ensaio espectrofotométrico utiliza-se uma solução de DPPH a 0,004% em metanol, o qual é misturado à solução da amostra em análise. As amostras são preparadas a 10mg/ml em DMSO, preparando-se soluções de concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 100 µg/ml. A cada 50µL da amostra é adicionado 100µL da solução de DPPH, sendo que as absorbâncias resultantes são medidas a 540 nm em espectrofotômetro de microplaca (Tecan-Spectra) após o intervalo de 30 minutos de reação. É tomado como referência de máxima absorção, 100µL da solução de DPPH adicionado a 50µL de DMSO. Utilizou-se como padrão de antioxidante a luteolina. Por meio dos valores das absorbâncias obtidas e plotado um gráfico de variação da absorbância pela concentração da amostra.

$$\% D_o = \frac{A_o - A}{A_o} \times 100$$

**Fig. 2.26:** Equação utilizada para verificação da variação da absorbância (%Δ), onde A<sub>o</sub> é a absorbância do DPPH em DMSO e A, corresponde a absorbância verificada após 30 minutos de reação



**Fig. 2.27:** Esta figura mostra o gráfico da capacidade sequestradora de radicais livres das substâncias isoladas e das frações de *W. ebracteata* sobre o DPPH, comparadas com o padrão de luteolina. Absorbância em 540 nm, após 30 minutos de reação

**Tabela. 2.5:** Variação percentual de absorbância obtida das substâncias isoladas e das frações de *W. ebracteata* pelo ensaio antioxidante com DPPH

Concentração (µg/mL)	Luteolina (D%)	we1 (D%)	We2 (D%)	We4 (D%)	We6 (D%)
5	68,8	0	22,3	4,5	42,3
10	67,6	0	42,8	12,7	55,4
20	69,2	1,2	59,6	23,3	58,0
40	72,1	5,6	66,4	45,1	61,5
50	70,2	8,0	66,9	65,3	63,6
80	67,4	20,2	69,0	54,0	63,6
100	69,7	25,4	65,5	69,5	63,4

Análise do gráfico obtido a partir do ensaio com DPPH (Fig. 2.27, p. 134) permite verificar que as substâncias **we2**, **we4** e **we6** (Fig. 2.8, p. 107 e fig. 2.23, p. 128) tiveram perfis semelhantes de absorção nas concentrações usadas no ensaio. Esses flavonóides apresentaram absorção comparável à da luteolina em concentrações acima de 50 µg/mL. A substância **we2** é um flavonol inteiramente hidroxilado no anel A e não possui nenhuma unidade de açúcar ligado ao esqueleto flavonóidico. Essa molécula possui características necessárias para atividade antioxidante descritas por vários autores, como por exemplo a presença de grupamento hidroxila na posição 3 do anel C, dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, grupo hidroxila na posição 4 do anel B, etc (FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001).

Os outros dois flavonóides (**we4** e **we6**) avaliados são flavonóides C-glicosilados com a unidade de açúcar localizada na posição 8 do anel A. A diferença entre eles está no anel B. **We4** possui apenas uma hidroxila no anel B (4'), enquanto **we6** possui duas hidroxilas (3',4'). De acordo com vários autores (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996); além dos requisitos apresentados anteriormente, o padrão de substituição nos anéis A, B e C também é um dos pré-requisitos para esse tipo de atividade.

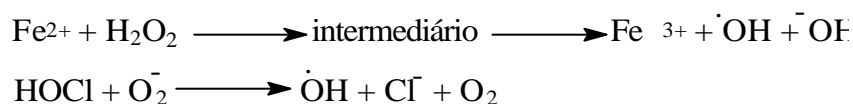
A atividade antioxidante dos flavonóides já é bastante reportada na literatura. Por outro lado, a literatura relata que a presença de uma unidade de açúcar na forma de C-glicosídeo diminui ou elimina completamente tal atividade para essa classe de flavonóides (YESILADA et al., 2000). Contudo, observamos que as substâncias isoladas de *W. ebracteata* apresentaram atividade semelhante à do padrão, sugerindo que a presença de açúcar não interfere nessa atividade.

A atividade apresentada por **we1**, que é uma mistura de ácidos graxos, não foi muito significativa, apresentando baixo potencial antioxidante no ensaio realizado. Deve-se salientar, contudo, que derivados de ácidos graxos tendem a apresentar melhores resultados quando avaliadas pelo teste de peroxidação lipídica, devido às suas características lipofílicas (SANTOS, 2001).

### II.2.7.2. Teste de cloração

As oxidações biológicas realizadas por meio do oxigênio molecular representam a principal fonte de energia utilizada pela grande maioria de plantas e animais. Através do processo fotossintético e biológico, as reações bioquímicas se desenvolvem de tal maneira que geram produtos secundários ( $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$ ). Os intermediários dessas reações são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), e possuem reatividades químicas mais acentuadas que o oxigênio molecular (FILHO; SILVA; BOVERIS, 2001).

Estas EROs são o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical hidroxila ( $\text{OH}$ ), o  $^1\text{O}_2$  singlete e mais recentemente foi também descoberto o radical peroxila ( $\text{ROO}^\cdot$ ). Estas espécies reativas são formadas a partir do  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}$  e  $\text{HOCl}$ , que vêm de sucessivas reações bioquímicas, sendo que na formação das EROs estão envolvidos reações não enzimáticas. Na formação do radical hidroxila ( $\text{OH}$ ), por exemplo, dois mecanismos estão envolvidos: reação de Fenton entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  e um metal de transição e a reação de  $\text{HOCl}$  com  $\text{O}_2^-$  (KITAGAWA, 2002).



O  $\text{HOCl}$  pode ser considerado o oxidante mais tóxico e é produzido em grandes quantidades pelos neutrófilos, que são células orientadas para a defesa imune celular de um hospedeiro contra infecções (CHING; JONG; BAST, 1994). Tendo em vista a presença de oxigênio nos tecidos, plantas e animais desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes para compensar os efeitos deletérios associados à constante formação de EROs.

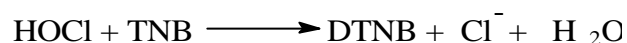
Recentemente houve um aumento nas pesquisas com plantas envolvendo a busca por substâncias capazes de capturar essas espécies reativas de oxigênio. Nesse contexto, destacam-se os efeitos de extratos brutos, de frações ou de componentes isolados e/ou modificados. As plantas estudadas até o momento, e que apresentam propriedades antioxidantes, compreendem desde algas, passando por todos os grupos taxonômicos vegetais (FILHO; YUNES, 2001).

As espécies antioxidantes são de natureza variada. Dentre elas, os flavonóides constituem o grupo mais representativo. Além desses, encontram-se os carotenóides, terpenóides, cumarinas, saponinas, ácido cafeico, ácidos hidrocínâmicos, entre outros.

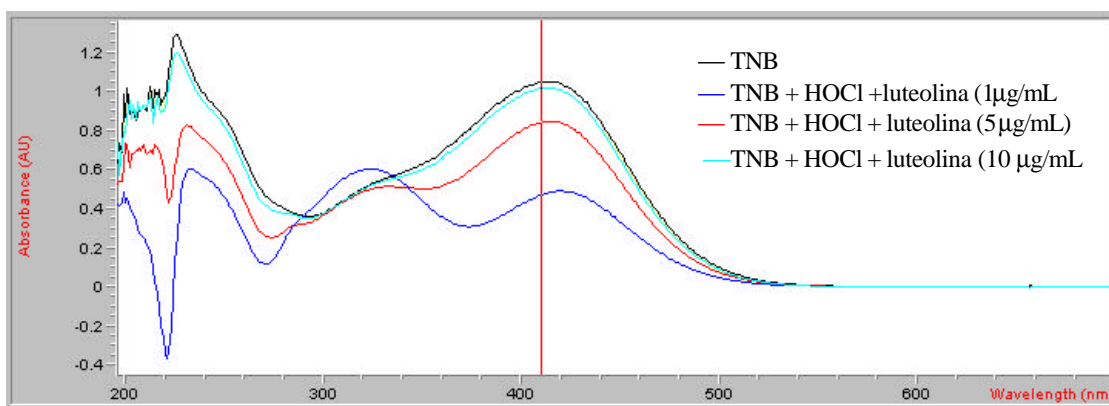
Por esses motivos, realizamos o teste de cloração para avaliar uma possível atividade antioxidante de alguns flavonóides isolados de *Wilbrandia ebracteata*.

O teste de cloração é um ensaio alternativo para verificar a atividade antioxidante de um substância, que envolve a captura do HOCl (CHING; JONG; BAST, 1994).

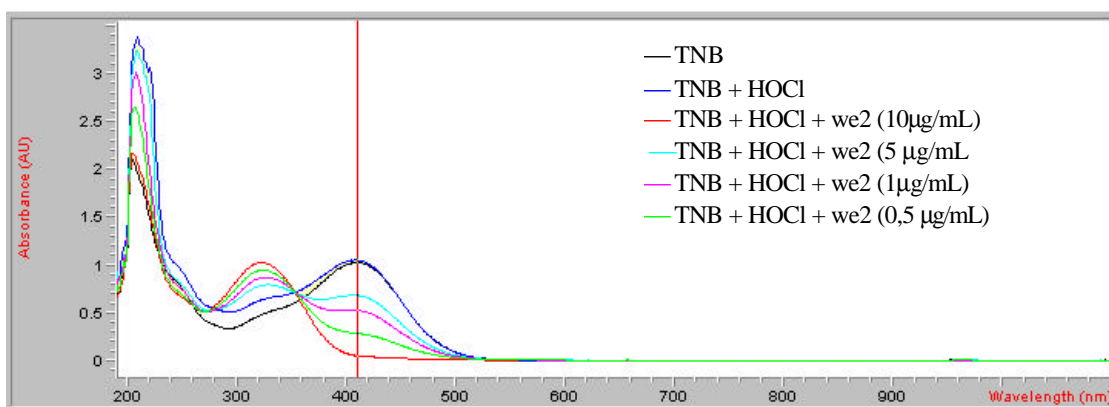
O método de cloração baseia-se na oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) pelo HOCl formando o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), conforme a seguinte reação (CHING; JONG; BAST, 1994):



A absorvância do TNB a 412 nm diminui na presença de HOCl pela formação do DTNB que absorve em 325 nm. Neste teste, colocou-se HOCl (26 µL) com diferentes concentrações (1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL) das substâncias **we2**, **we4** e **we6** e luteolina (utilizada como padrão) mais solução tampão PBS por 1 minuto e, posteriormente, adicionou-se a solução contendo TNB (40 µL). Em seguida, mediu-se a absorvância utilizando um espectrofotômetro. As figs. 2.28, 2.29, 2.30, 2.31 apresentam os espectros obtidos da reação das substâncias com o HOCl.

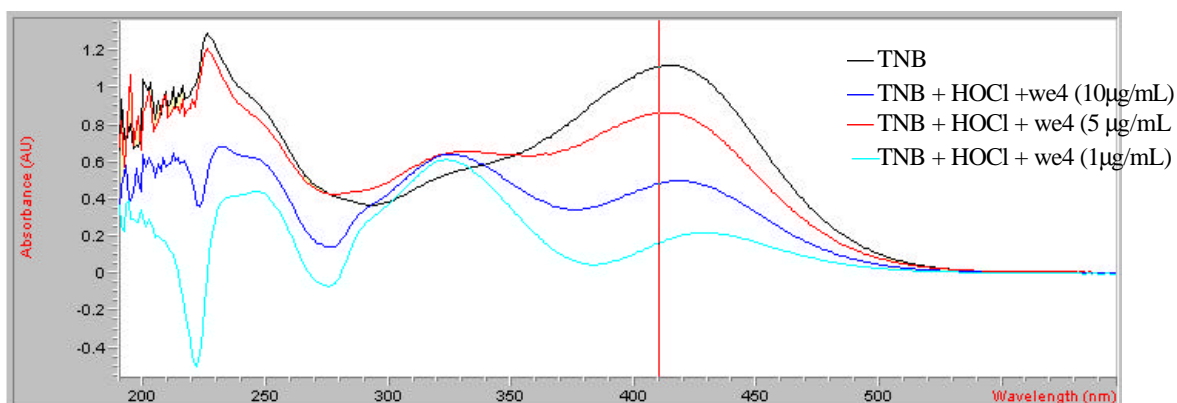


**Fig. 2.28:** Efeito do HOCl sobre o espectro da luteolina em tampão PBS

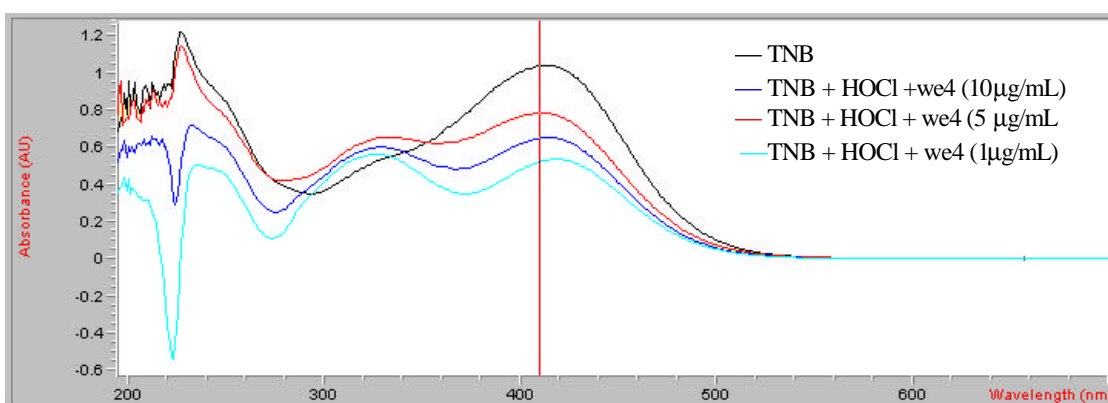


**Fig. 2.29:** Efeito do HOCl sobre o espectro de we2 em tampão PBS





**Fig. 2.30:** Efeito do HOCl sobre o espectro de **we4** em tampão PBS



**Fig. 2.31:** Efeito do HOCl sobre o espectro de **we6** em tampão PBS

Uma substância é considerada um bom “capturador” de HOCl quando é capaz de competir como o HOCl na oxidação do TNB (CHING; JONG; BAST, 1994). O HOCl não oxida o TNB quando está na presença das substâncias **we2**, **we4** e **we6** e luteolina, por esses flavonóides sequestrarem o HOCl impedindo a formação do DTNB. Essa observação é decorrente da manutenção da absorvância a 412 nm do sistema químico, comprimento de onda de absorção do TNB.

Os flavonóides testados teriam importância biológica por capturar o HOCl, principalmente nas condições de excessiva produção de EROs. HOCl é importante para a

morte bacteriana, mas também é capaz de produzir considerável dano tecidual pela sua reatividade biológica.

## II.2.8. Atividade citotóxica

Apesar de a literatura apontar vários efeitos benéficos para a saúde, já foi demonstrado que um número apreciável de diferentes classes de flavonóides podem possuir atividade citotóxica (HARBORNE, 1996). No estudo químico de *Wilbrandia ebracteata*, isolou-se, entre outras, as seguintes substâncias: **we2**, **we3**, **we4**, **we6**, que ainda não foram avaliadas quanto a atividade biológica.

Tendo em vista os problemas discutidos na introdução deste trabalho com relação à toxicidade de alguns produtos naturais, enviamos algumas substâncias isoladas de *Wilbrandia ebracteata* para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara no Laboratório de Cultivo Celular com a supervisão da profa. Maria Stella Gonçalves Raddi, a fim de se realizar testes visando a classificação quanto a atividade citotóxica, sobre células de linhagem contínua, em relação a luteolina.

Testes iniciais *in vitro* são aplicados em estudos piloto como um modelo econômico na triagem de xenobióticos. Cerca de 20 diferentes métodos são utilizados na determinação da toxicidade geral. Células são expostas a diferentes concentrações da substância por um período de tempo. Posteriormente, avaliam-se a viabilidade e as condições funcionais celulares. Os métodos mais utilizados são: análise histológica através de microscopia comum, número, morfologia, crescimento, divisão e metabolismo celular, integridade de membrana, atividade mitocondrial, lisossomal e ribossomal. Critérios menos comuns, mas também de grande valor (estudos mecanísticos) são: análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão, frequência mitótica utilizando análise cariótica, retenção do azul de tripan entre outras (BARILE, 1994).

Algumas técnicas para determinação da citotoxicidade utilizam substâncias que são incorporadas ou transformadas em produtos coloridos apenas por células vivas, mas não por células mortas ou pelo próprio meio de cultivo. A formação desses produtos reflete o *endpoint* tóxico e quantifica o número de células viáveis, mostrando uma relação linear

entre esses dois parâmetros (WILSON, 1992). Essas técnicas foram consideradas pela Convenção Farmacopéia dos Estados Unidos como um dos componentes alternativos para os testes de toxicidade *in vivo* (GOLDBERG; STARK; 1987).

Os métodos colorimétricos que são realizados em placas de microtitulação seguido por leitura em espectrofotômetro multicanal automático oferecem vantagens como simplicidade, rapidez, custo e segurança. Um dos métodos utiliza o vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazina), corante supra vital, fracamente básico, catiônico e solúvel em água que é absorvido pelas células, por pinocitose ou transporte ativo, através da membrana plasmática e acumula-se apenas nos lisossomas de células vivas (BABICH; BORENFREUND, 1992).

Para a determinação da citotoxicidade *in vitro* células McCoy B (ATCC 1696) foram mantidas em meio Eagle (Instituto Adolfo Lutz, adicionado de 7,5% de soro fetal bovino - Cutilab). Após tripsinização (2 mL de solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz), as células foram contadas em câmara de Neubauer e 200 µL do meio, contendo aproximadamente  $10^4$ - $10^5$  células/mL, inoculados em microplacas (96 orifícios) para cultura de tecido (Corning cod. 25860) as quais foram incubadas a 35-37°C. Após 24 horas, o meio foi removido e cada orifício tratado com diferentes concentrações das substâncias teste. Após incubação por 24 horas, as placas foram preparadas para o teste do vermelho neutro (FRESHNEY, 1994; MOSMANN, 1983). Os testes foram acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, 3 vezes.

Nesses ensaios para avaliação de citotoxicidade foi possível estabelecer uma curva de regressão linear para **we2**, **we3**, **we4**, **we6** e luteolina, obtidas através de 3 experimentos independentes pela técnica do vermelho neutro (gráficos 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4, respectivamente). Para **we3** não foi possível estabelecer uma reta de regressão linear para a relação dose-efeito, pois a concentração necessária de DMSO para ressuspender a fração, que apresentou baixo rendimento na purificação, ultrapassou os 4% estabelecidos para não interferir no crescimento celular (DEVIIENNE, 2000).

**Tabela 2.6-** Índice citotóxico (IC<sub>50</sub>) das substâncias teste sobre células McCoy obtido pela equação da reta de regressão linear

Substâncias	IC <sub>50</sub> (µg/mL) Vermelho Neutro
We2	399 <sup>a</sup> ± 10 <sup>b</sup>
We4	383 <sup>a</sup> ± 6 <sup>b</sup>
We6	263 <sup>a</sup> ± 1 <sup>b</sup>
Luteolina	75 <sup>a</sup> ± 1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> n= média dos 3 experimentos independentes, <sup>b</sup> Desvio Padrão

Avaliação biológica de novas substâncias é sem dúvida uma atividade multidisciplinar, onde os estudos sobre eficácia, mecanismos de ação, potencial tóxico e genotóxico dependem de bioensaios fármaco-toxicológicos *in vitro* e *in vivo* para que esses agentes possam ser utilizados como fitofármacos.

Os flavonóides são conhecidos por contribuírem para a resistência das plantas à doenças, como agentes antifúngicos (fitoalexinas) e mais recentemente aumentam as evidências de que alguns desses compostos, especialmente flavonas e proantocianidinas proporcionam defesa, de plantas, contra herbívoros. Alguns experimentos que mostram interações ente animais-plantas têm comprovado essas observações (HARBORNE, 1996).

O interesse pela descoberta de agentes citotóxicos antitumorais levou ao isolamento e identificação de um grande número de flavonóides ativos. Entre eles a quercetagetina-6,7,3',4'-tetrametileter, isolado das partes aéreas de *Artemisia annua* (Compositae), que mostrou significativa toxicidade para células tumorais P-388, A549, HT-29, MCF-7 e KB (ZHENG, 1994). Outra descoberta foi a 5,2'-diidroxí-6,7,8,6'-tetrametoxiflavona isolada de raízes de *S. baicalensis*, que mostrou atividade *in vitro* (IC<sub>50</sub>) de 1,5 µg/ml em células L1210 (RYU, 1985).

As atividades antitumoral e citotóxica de agentes químicos estão intimamente relacionadas. A citotoxicidade é um complexo evento *in vivo*, cuja expressão pode ser manifestada através de um amplo espectro de efeitos, desde aberrações metabólicas, com alterações funcionais, até a morte celular (FRESHNEY, 1994).

O valores médios de IC<sub>50</sub> obtidos para as substâncias e os respectivos desvios padrão são apresentados na Tabela 2.6. As frações ensaiadas demonstraram menor

citotoxicidade que o padrão de referência utilizado ( $p < 0,05$ ), sendo que **we2** e **we4** foram menos tóxicas que **we6** ( $p < 0,05$ ). A ordem crescente de citotoxicidade obtida para as frações e substância padrão foi: **we2** ~ **we4** < **we6** < luteolina.

Comparando-se a estrutura química da luteolina com a dessas frações observamos que a introdução de uma unidade de glicose na posição 8 (**we6**) reduz em 4 vezes a citotoxicidade da luteolina. Aparentemente, a hidroxila da posição 3' contribui para aumentar a citotoxicidade, pois quando comparamos as estruturas de **we6** e **we4** verificamos que a retirada do OH-3' contribui para uma diminuição ainda maior da citotoxicidade. Por outro lado, quando comparamos a estrutura de **we2** com a da luteolina percebemos que a introdução as duas hidroxilas nas posições 6 e 8 do anel A também contribuem para diminuir a citotoxicidade em cerca de 5 vezes.

A citotoxicidade de uma substância pode ser relacionada à sua característica lipofílica/hidrofílica, uma vez que essa atividade está relacionada à capacidade de uma substância de penetrar na membrana lipídica e, portanto, exercer atividade no interior da célula (WANG; JAMES, 1999).

Quanto maior o número de grupamentos hidroxila menor a lipofilicidade da flavona. Isso fornece uma explicação para a diminuição da citotoxicidade de todas as substâncias quando comparadas à luteolina, tendo em vista que todas elas são menos lipofílicas, seja pelo aumento do número de hidroxilas fenólicas, seja pela introdução de hidroxilas alcoólicas presentes na unidade do açúcar.

Visto que as flavonas por nós ensaiadas apresentaram atividades citotóxicas menores do que a da luteolina, isso estimula a investigação de outras pesquisas para possível utilização em clínica médica.

### II.2.9. Análise do extrato clorofórmico

Assim como foi feito para o extrato apolar de *Z. ilicifolia*, o extrato clorofórmico (4,0 g) de *W. ebracteata* foi fracionado por meio de CC de sílica com gradiente de tolueno, acetato de etila e metanol. A fração 9 foi purificada por CCPC obtendo a subfração 9(3), que foi identificada como sendo uma mistura de esteróides (epinasterol e estigmasta-7-en-3 $\beta$ -ol). As frações de 1 a 13 apresentaram características semelhantes a da fração 9. As frações 14-16, 28-32 e 42-47 metiladas com diazometano, foram dissolvidas em hexano e analisadas por GC-MS e seus cromatogramas apresentaram picos em tempos de retenção coincidentes das amostras quando comparados ao padrão de ésteres metílicos.

Essas frações apresentaram um mesmo perfil cromatográfico e picos majoritários relativos aos ésteres dos ácidos pentadecanóico (C15), ácido esteárico (C18) e eicosanóico (C20).

### III. Estudo Químico de *Caesalpinia ferrea*

#### III.1.1. A família Caesalpinaceae

Como anteriormente, adotaremos o sistema de Cronquist (1988), que considera Caesalpinaceae como uma família. Ela foi descrita originalmente por Antoine Laurent de Jussieu e redefinida em 1983 por Leslie Watson e M.J. Dalwitz, pertence à Ordem Fabales. As espécies desta família estão distribuídas em 4 tribos, conforme indicado abaixo para os principais gêneros:

⇒ Caesalpinieae, que inclui o gênero *Caesalpinia*, no qual estão distribuídas inúmeras espécies medicinais com uso em inúmeros países, das quais se destacam as espécies *C. bonduc*, *C. bonducella*; *C. sapan* e *C. pulcherrima*. No Brasil, destaca-se o conhecido pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) e pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*).

⇒ Cassieae, que inclui os gêneros *Cassia*, *Dialium* e *Senna*, todos contendo várias espécies de valor medicinal amplamente usadas e comercializadas como medicamento, dentre as quais a *C. senna*, *C. angustifolia* e *C. occidentalis* (utilizada no tratamento de anemias e contra doenças do fígado, estômago e baço; o sumo das folhas é usado topicamente em locais com coceira e na cura de micoses. A infusão das folhas também é utilizado contra a malária, contra dores de barriga, gripes, febre, enquanto que o macerado da raiz em aguardente de cana é usado como diurético e contra infecções gerais).

⇒ Cercideae, que inclui o gênero *Bauhinia*, no qual pode-se referir a conhecida pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) espécie vegetal com grande utilização medicinal em todo o território brasileiro (na região da Mata Atlântica, a infusão das folhas é amplamente referida como diurética, hipoglicemiante e contra hipertensão e dores nas costas, os mesmo usos atribuídos à decocção das folhas (SANGUINETTI, 1989).

⇒ Detarieae, que inclui os gêneros *Copaifera*, que inclui a famosa copaíba encontrada no Norte e Nordeste do país, de onde se extrai um importante óleo com grande valor na indústria.

### III.1.2. O gênero *Caesalpinia*

O nome do gênero *Caesalpinia* descrito por Carl Linnaeus foi dado em homenagem a Andrea Caesalpino, botânico italiano. A madeira da espécie é muito usada na construção civil, além de possuir um intenso uso como espécie ornamental, especialmente de ruas e avenidas.

Dos caules de *Caesalpinia pulcherrima* foram isolados homoisoflavonóides, peltoginóides, chalconas (PARMAR; SINGH; JACOBSEN, 1987), diterpenos do tipo cassano (PATIL; FREYER; WEBB, 1997; CHE et al, 1986) (Fig. 3.1). De diferentes partes de *C. pulcherrima* foram isolados quinona, terpenóides e aminoácidos (MCPHERSON, 1983; AWASTHI; MISRA, 1977; WATSON; FOWDEN, 1973).

De *Caesalpinia bonducella* foram isolados furanoditerpenos, triterpenos e esteróides. (PASCOE; BURKE; CHAN, 1986; PETER; TINTO; MACLEAN, 1997a; KINOSHITA; KANEKO; NOGUCHI, 1996; PETER; TINTO; MACLEAN, 1997b; AHMAD; ALI; USMANGHANI, 1997) (Fig. 3.1).

Da madeira de *C. sappan* foram isolados esteróides, chalconas, diterpenos e flavonóides (NAMIKOSHI; NAKATA; YAMADA, 1987; NAMIKOSHI; NAKATA; SAITOH, 1987; KIM; BAEK; OH, 1997), Das raízes de *C. major* foram isolados diterpenos (KITAGAWA; SIMANJUNTAK; MAHMUD, 1996), da madeira de *C. japonica* foi encontrado chalconas (NAMIKOSHI; NAKATA; NUNO, 1987) e alcalóides em *C. digyna* (MAHATO; 1983).

Dentre as atividades farmacológicas encontradas, os dibenzoatos das pulcherriminas A e B, que são diterpenos de *C. pulcherrima*, foram ativos na reparação de DNA de leveduras (PATIL; FREYER; WEBB, 1997).

O diterpeno brasilina isolado de várias espécies de *Caesalpinia* também foi capaz de modular a função imune, principalmente pelo aumento da atividade das células T em camundongos com halotano (CHOI; YANG; JEON, 1997).

Embora as sementes de *C. occidentalis* sejam utilizadas na medicina tradicional e ainda, em muitos países, como substituinte do café, estudos clínicos têm demonstrado sua toxicidade, seja na forma fresca, seca e/ou torrada. A ingestão de grandes quantidades dessa semente tem causado problemas de toxicidade e até mesmo de morte em vacas, cavalos e

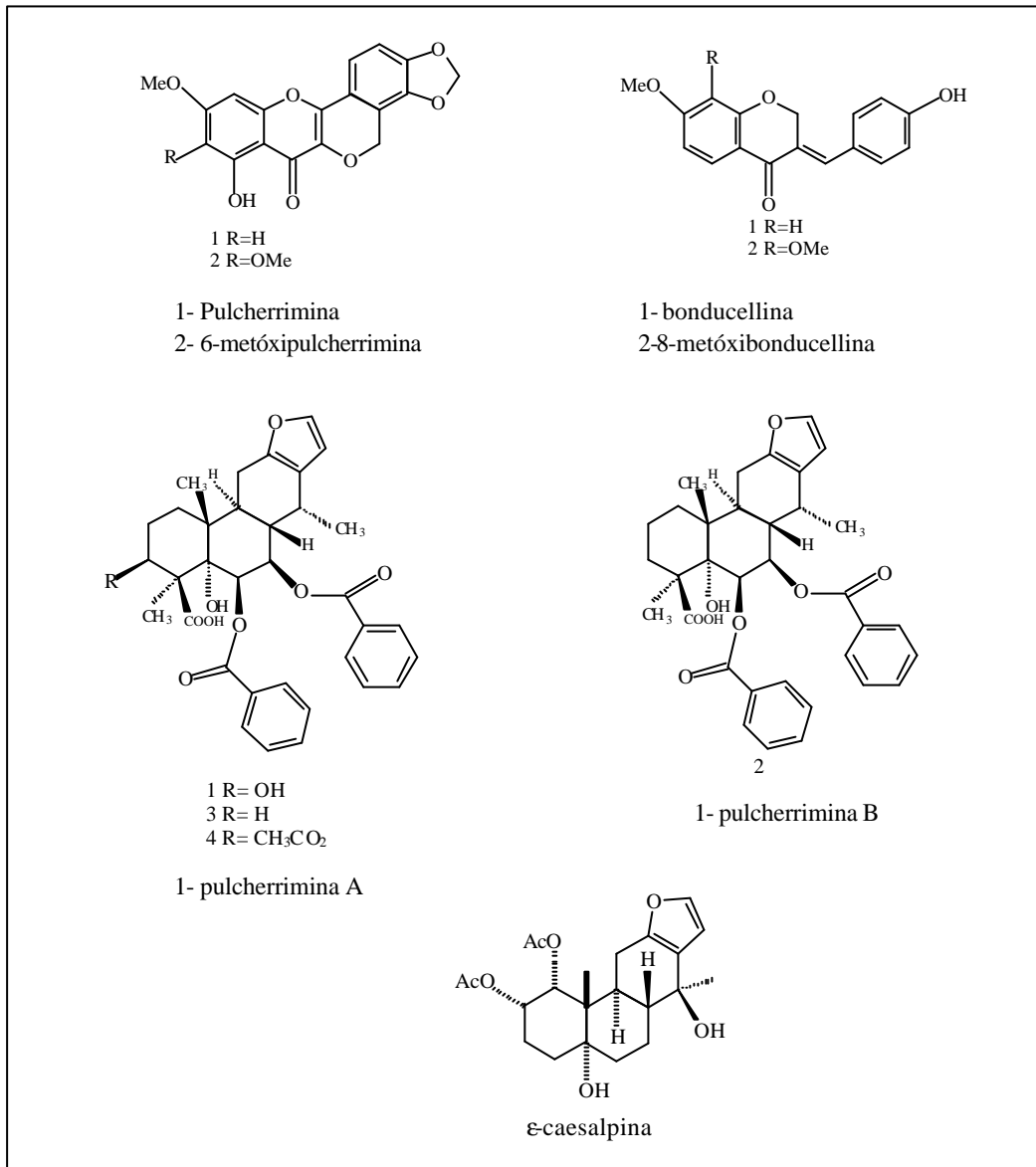


cabras. Isto pôde ser verificado em intoxicação de suínos, que apresentaram um quadro ataxia, apatia, diarreia, dispnéia, anorexia e morte após 8 a 12 dias da ingestão, com degeneração de músculos esqueléticos e cardíaco. Dessa forma, essas sementes são referidas como tóxicas, produzindo sintomas como fígado aumentado com áreas amareladas e hemorrágicas e musculatura lisa com estrias amarelas (DI STASI et al., 2002a).

A espécie *C. pulcherrima* é considerada planta de uso perigoso devido a seus efeitos tóxicos e abortivos da casca (MACPHERSON, 1983).

Com a administração de folhas de *C. talica* em cabras e carneiros verificou-se um quadro de ataxia, anemia, cansaço e dores, além de lesões renais e disfunção hepática, enquanto que um quadro de envenenamento foi verificado com *C. roenwilana* (DI STASI et al., 2002a).

Dessa forma, mesmo que extratos, frações enriquecidas ou substâncias apresentem atividade biológica promissora, é indispensável que estudos de toxicidade também sejam realizados.



**Fig. 3.1:** Exemplos de substâncias (peltoginóides, homoisoflavanona, furanoditerpenos) isoladas de espécies do gênero *Caesalpinia*.

### III.1.3. *Caesalpinia ferrea* Mart.

A espécie é denominada na região amazônica como Jucá, mas conhecida em todo o Brasil como pau-ferro ou pau-ferro verdadeiro, além dos nomes indígenas ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi e muirá-itá (LORENZI, 1998).

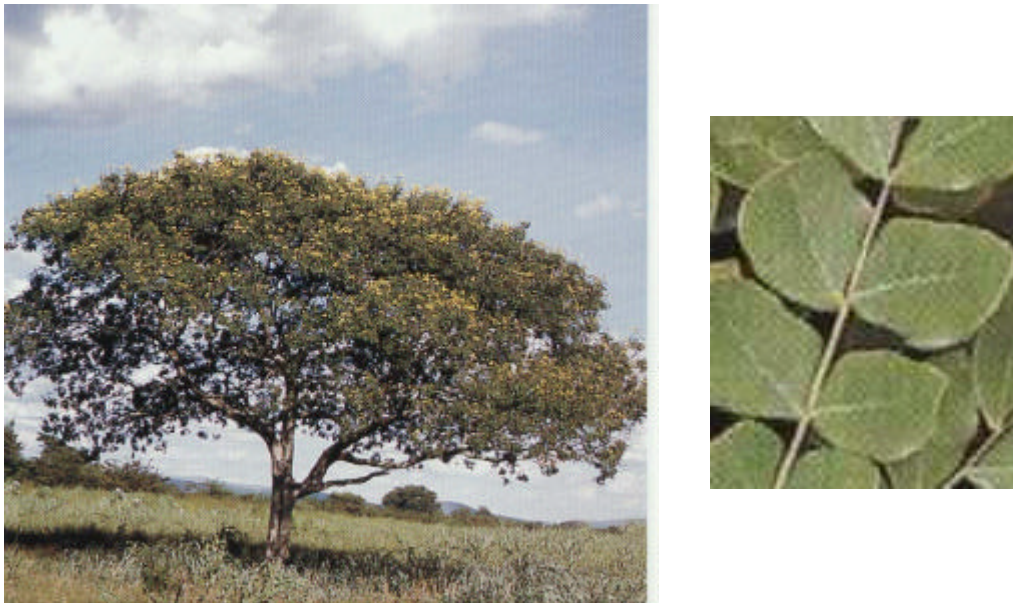
Árvore de grande porte com tronco liso e cerne duro, podendo chegar a 15 metros de altura; folhas bipinadas com folíolos oblongos, ovalados ou obovais; flores diclamídeas, hermafroditas com corola de 4 pétalas subiguais e uma quinta superior, séssil, ultrapassando o cálice gamossépalo; 10 estames, ovário séssil e pubescente com 10-12 óvulos; fruto levemente estipitado, quase reto (Fig. 3.2). A espécie é heliófita com característica de mata pluvial com ampla dispersão. São muito comuns duas variedades a *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* e a *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *leiostachya* Benth (LORENZI, 1998).

Várias utilizações medicinais desta espécie são encontradas na região amazônica. As folhas desta espécie, na forma de decocto, são utilizadas externamente e no local, contra hemorróides, enquanto que o uso interno desta decocção é útil contra amebíase e problemas hepáticos, além de ser usado como fortificante para crianças. O sumo das folhas é usado internamente para problemas cardíacos. A infusão conjunta das folhas e frutos é útil para tratar inflamações do fígado e tuberculose, enquanto que a decocção da casca é usada internamente como anti-disentérico. O preparado da casca com 1 litro de água e 1 kg de açúcar, aquecido até formar um xarope, é utilizado contra asma e bronquite. A infusão conjunta da raspa da casca com folhas de manga é útil como antigripal e anti-tussígeno, enquanto que os preparados das cascas de jucá, cascas de jatobá, folhas de manga, açúcar e água, após aquecimento são utilizados como anti-catarral. A vagem crua é útil contra tosse, inflamações do fígado e baço, desarranjo menstrual, problemas renais e menstruais (SANGUINETTI, 1989).

Na região da Mata Atlântica, a infusão das folhas da espécie é usada para problemas respiratórios, especialmente bronquites, além do uso comum contra gripes, resfriados e tosses (DI STASI et al., 2000).

Outros usos medicinais desta espécie são referidos por vários autores tais como o uso das raízes como febrífugas e anti-dirreicas; do fruto com propriedades anti-diabéticas; da casca como desobstruente e da madeira como anti-catarral e contra feridas. No Piauí a espécie também é utilizada contra feridas e contusões e em Alagoas contra tosse crônica, asma e como cicatrizante (PIO CORRÊA, 1975).

Estudos com extratos brutos dos frutos e caules de *C. ferrea* revelaram a presença de atividade antiúlcera (BACCHI et al, 1995) e de restrição ao fluxo coronariano por possível ação sobre a musculatura lisa dos vasos, com alterações eletrocardiográficas secundárias (PINTO, 2000). De *C. ferrea* foram ainda caracterizadas as atividades cardiotônica, antimicrobiano, analgésico e antiinflamatório (CARVALHO et al, 1996), antihistaminico e antialérgico, anticoagulante e hepatotóxico (DI STASI et al, 2002a).



**Fig. 3.2:** *Caesalpinia ferrea* Mart

## III.2. Desenvolvimento, Resultados e Discussões

### III.2.1. Testes Farmacológicos

Diferente das espécies *Zollernia ilicifolia* e *Wilbrandia ebracteata*, para esta espécie apresentaremos alguns resultados de testes farmacológicos que foram realizados pela aluna Eliane Ap. Toledo Pinto, no laboratório de farmacologia da Unesp de Botucatu, sob a orientação dos professores Luiz C. Di Stasi e José Carlos Gomes. Os ensaios preliminares permitiram detectar a atividade do extrato bruto metanólico das folhas de *C. ferrea* sobre a secreção de mastócitos de pulmão e intestino de cobaia, visando uma comparação com drogas antialérgicas.

No animal vivo, as reações antígeno-anticorpo produzem uma resposta do hospedeiro a fim de protegê-lo contra doenças. Antígeno é qualquer substância ou partícula estranha que ao ser introduzida no corpo, provoca a reação de defesa imunitária, com produção de anticorpos (GOODMAN et al, 1996). A resposta fisiológica do hospedeiro imune pode produzir sintomas de hipersensibilidade ao antígeno, um fenômeno denominado alergia. Os antígenos que podem causar sintomas alérgicos são chamados de alérgenos. Uma alergia é o efeito colateral de um sistema imune que funciona corretamente (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

Uma das formas de alergia mais comum é o tipo de reação a picada de insetos. Se o alérgeno é inalado e reage nos pulmões restringi assim o fluxo de ar, causando asfixia nos casos graves de asma. Uma das principais células-alvo das reações de hipersensibilidade imediata são os mastócitos, que armazenam maiores quantidades de histamina. Histamina é uma substância que exerce um papel central nas reações de hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas. Além disso, alguns fármacos comumente usados podem agir diretamente nos mastócitos para liberar histamina, explicando assim alguns dos seus efeitos indesejáveis (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). A histamina também tem um papel importante na regulação da secreção gástrica de ácido e como neurotransmissor do sistema nervoso central (GOODMAN et al, 1996).

Os princípios ativos de *Caesalpinia férrea*, que se encontram no extrato metanólico das folhas, mostram atividade inibitória da secreção de histamina em mastócitos de pulmão e intestino de cobaia. Essa atividade é maior do que a do cromoglicato de sódio e de seus análogos, que são exemplos clássicos de drogas antialérgicas utilizadas no tratamento profilático da asma brônquica leve a moderada. Essas drogas também são tão eficazes quanto a teofilina, mas sem possuir seus efeitos indesejáveis, tais como anorexia, náusea, vômito, desconforto abdominal, diarreia, etc (PINTO, 2000).

A atividade apresentada em mastócitos de intestino sugere que os princípios ativos de *Caesalpinia ferrea* possam ser úteis em moléstias intestinais como doença de Crohn, colite ulcerativa e alergias a alimentos, que estão relacionadas com mastócitos (PINTO, 2000).

### **III.2.2. Coleta**

As folhas da espécie *Caesalpinia ferrea* Mart. foram coletadas no mês de dezembro de 2000 junto ao Jardim Botânico do Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, estado de São Paulo.

Exsicata contendo flores e frutos foram depositados no Herbário BOTU, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, São Paulo. As espécies foram autenticadas pelo prof. Dr. Ayrton Amaral Jr.

Coletou-se as folhas dessa espécie, que foram armazenadas em sacos plásticos para evitar desidratação durante o transporte até local de processamento.

### **III.2.3. Preparação dos Extratos das Folhas**

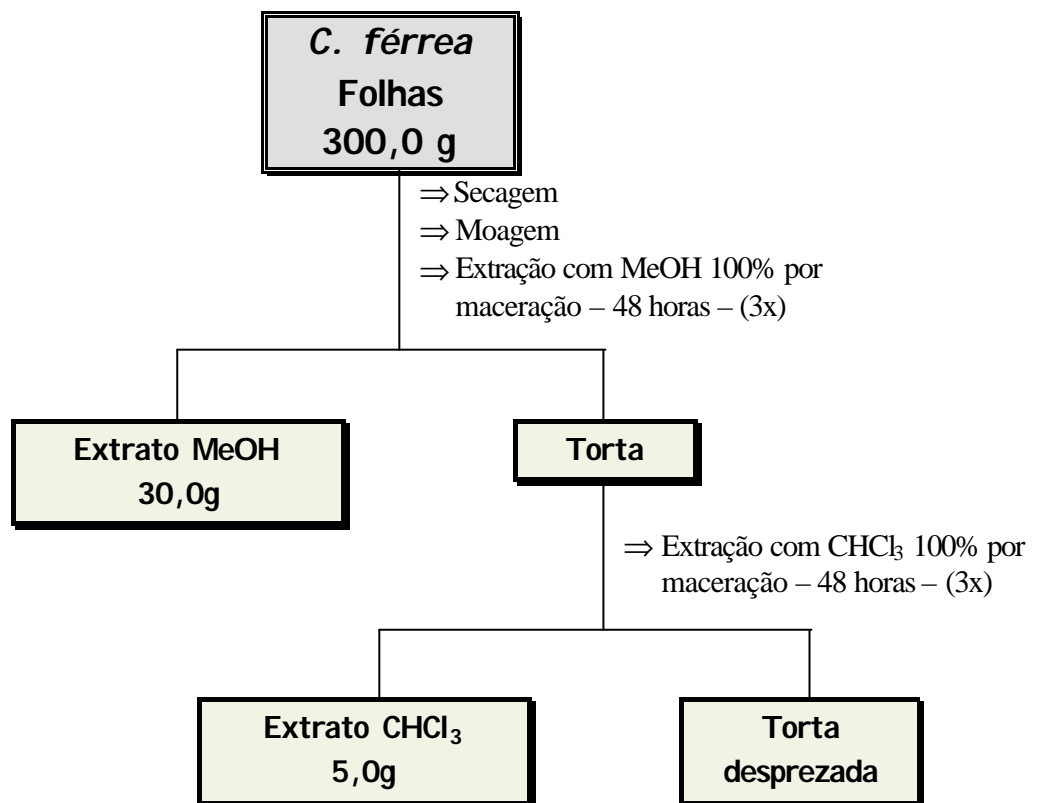
Os extratos de *Caesalpinia ferrea* foram preparados como os de *Zollernia ilicifolia* e *Wilbrandia ebracteata*. Depois de lavadas em água corrente, as folhas foram dessecadas

em estufa a 60°C por 1 hora e 45°C por 48 horas. Em seguida, as folhas foram trituradas manualmente com auxílio de um liquidificador (marca Arno).

Preparou-se o extrato usando-se maceração com metanol (3x, 48 h), do mesmo modo como foi testado farmacologicamente.

A torta resultante da extração anterior foi macerada com CHCl<sub>3</sub> de modo idêntico ao descrito (3x, 48h) a fim de se extrair componentes menos polares restantes na planta. A extração foi realizada três vezes para obter um maior rendimento.

O fluxograma 3.1 mostra o procedimento utilizado para a preparação dos extratos.



**Fluxograma 3.1:** Preparação dos extratos das folhas de *Caesalpinia ferrea*

### III.2.4. Análise do Extrato Metanólico

Uma análise preliminar utilizando reações químicas foi realizada pelo prof. Luiz Cláudio Di Stasi e apresentou o seguinte perfil fitoquímico: esteróides, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis, saponinas, taninos e xantonas (MATOS, 1997).

Seguindo o mesmo esquema utilizado para as plantas anteriormente estudadas, o extrato metanólico foi inicialmente submetido a análise por CCDC. Os melhores sistemas de solventes foram: misturas de AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80 (fase inferior), CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 8:13:7 (fase inferior).

Análises dos cromatogramas no UV (254nm e 365nm) apresentaram manchas vermelhas sugerindo a presença de clorofilas, amarelas e marrons, que podem sugerir a presença de flavonóides e xantonas, vermelhas (taninos ou terpenóides) e outras manchas de cor azul claro (triterpenos e/ou saponinas). Quando se revelou os cromatogramas com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, estes apresentaram manchas amarelas e arroxeadas, o que sugere a presença de flavonóides ou xantonas, saponinas e/ou triterpenos como constituintes majoritários (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

Registrou-se um espectro de RMN <sup>1</sup>H desse extrato bruto, a fim de se obter mais informações sobre as possíveis classes de substâncias presentes.

O espectro mostrou picos intensos tanto na região dos hidrogênios alifáticos (entre 0,8δ e δ 2,0δ) e de menores intensidade na região dos aromáticos (entre 6,0δ e 8,0δ), além de picos bem intensos na região dos açúcares (entre 3,0δ e 5,5δ).

Tomaram-se 25,0 g de extrato e fez-se uma partição utilizando AcOEt e H<sub>2</sub>O 1:1. Com esse procedimento, obteve-se uma separação prévia de substâncias mais polares das menos polares. A análise por CCDC (AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase inferior, revelador anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) mostrou que a clorofila e substâncias menos polares ficaram na fase AcOEt, enquanto que as substâncias mais polares passaram para a fase aquosa. Durante a evaporação do solvente da fração acetato de etila, observou-se a formação de um precipitado vermelho, que foi retirado por filtração simples (0,5 g). Análise por CCDC sugere ser taninos.

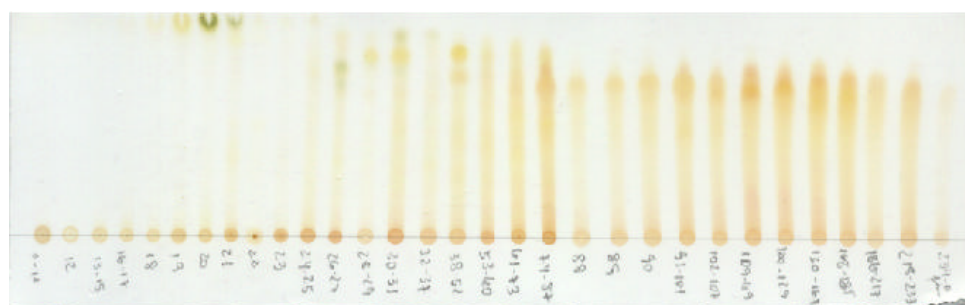


Iniciou-se o estudo da fração AcOEt obtida da partição AcOEt/H<sub>2</sub>O 1:1, pois análise por CCDC indicou a presença de um maior número de substâncias. Para o fracionamento, utilizou-se uma coluna de Sephadex LH-20 como fase estacionária.

Tomaram-se 2,5 g da fração metanólica 3, dissolveram-se em 10 mL de metanol e centrifugou-se a mistura. Injetou-se a amostra na coluna e procedeu-se a eluição com metanol puro, em fluxo de 0,5 mL/min. Obteve-se 234 frações de 5 mL cada.

Foi realizada análise das frações obtidas por CCDC em AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior. As frações foram reveladas sob luz ultravioleta e em seguida com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e NP/PEG. As frações semelhantes foram agrupadas.

As frações obtidas a partir da separação do extrato AcOEt foram novamente cromatografadas em CCDC (AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior), desta vez pulverizando-se a placa com solução 5% de betacaroteno em DCM. Este procedimento foi realizado a fim de verificar uma possível atividade antioxidante das substâncias presentes nesse extrato.



**Fig. 3.3:** Cromatograma das frações obtidas do fracionamento da fração AcOEt (AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80, fase superior) e reveladas com betacaroteno

A fração 22-23 (50 mg) foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna de sílica, utilizando inicialmente como sistema de solventes uma mistura de CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 43:37:20 (fase inferior) e em seguida AcOEt/n-PrOH/H<sub>2</sub>O 140:8:80 (fase superior). Obteve-se 50 frações de 5 mL cada. As frações foram analisadas por CCDC utilizando como fase móvel a mistura de CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 43:37:20 (fase inferior). Observaram-se duas manchas de R<sub>f</sub> semelhantes nas frações 17 e 18, e que quando reveladas com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mostraram manchas arroxeadas. Essa fração

foi enviada para análise espectrométrica e denominada **cf1** (10 mg). A fração 45 (3 mg) apresentou apenas uma mancha arroxeadada quando revelada com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, mas devido à pouca massa de substância foi registrado apenas o espectro de RMN <sup>1</sup>H.

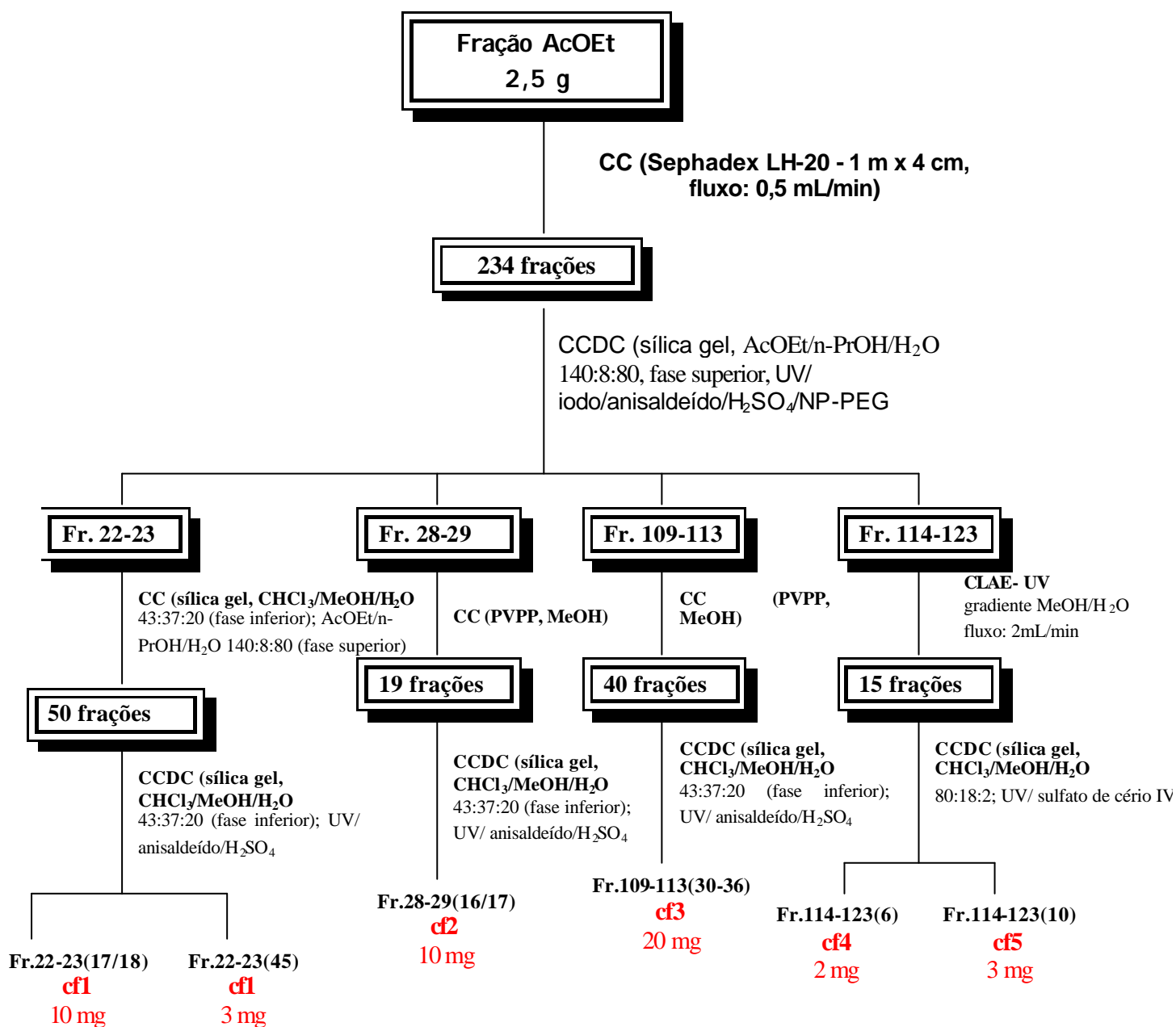
As frações 28 (10 mg) e 29 (20 mg) obtidas da coluna de sephadex LH-20, apresentaram-se com Rf's semelhantes. Foram então agrupadas e submetidas a um fracionamento por cromatografia em coluna utilizando com adsorvente PVPP (polivinilpolipirrolidona) e como solvente MeOH. Obteve-se 19 frações. As frações foram analisadas por CCDC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 43:37:20, fase inferior). Observou-se apenas uma mancha nas frações 16 e 17, quando reveladas com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Essas frações foram agrupadas e analisadas espectrometricamente, denominando-as **cf2** (10 mg).

Com a fração 109-113 (40 mg) também seguiu-se o mesmo procedimento, utilizando PVPP como adsorvente para separação em coluna e MeOH como eluente. Análise das frações por CCDC das frações evidenciou manchas amareladas quando reveladas com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e as frações foram agrupadas de acordo com os Rf's semelhantes. A fração 30-36 apresentou-se mais pura e foi enviada para análises espectrométricas, sendo denominada **cf3**.

Para a separação da fração de 114-123 (50 mg), utilizou-se o gradiente MeOH/H<sub>2</sub>O iniciando-se com 30% de MeOH até 100%, com fluxo de 2 mL/min, em 35 min. Obteve-se 15 frações. Essas frações foram analisadas por CDCC em CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 80:18:2 e agrupadas de acordo com sua semelhança. A fração de número 6 e 10, e foram denominadas **cf4** e **cf5**, respectivamente, e serão discutidas a seguir.

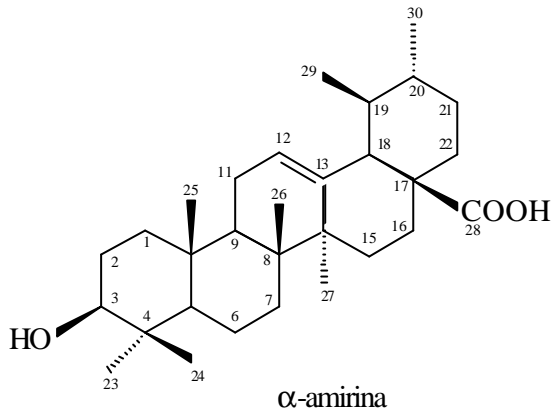
O fluxograma 3.2 mostra o procedimento experimental do fracionamento desenvolvido para a espécie *C. ferrea*.

Em seguida, apresentaremos a identificação das substâncias isoladas de *Caesalpinia ferrea*.

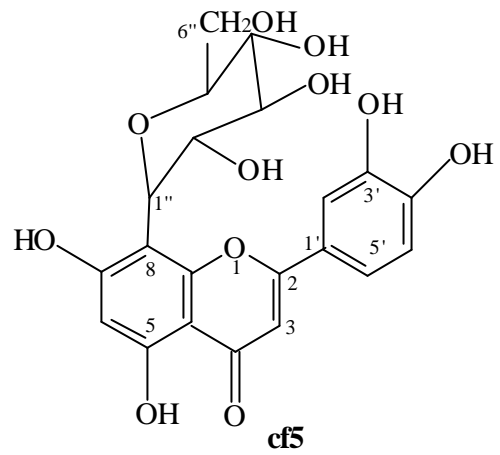
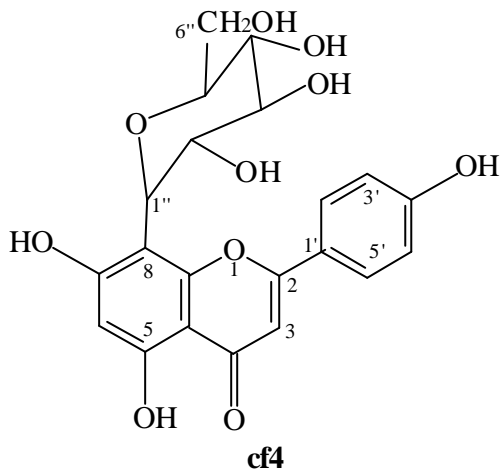
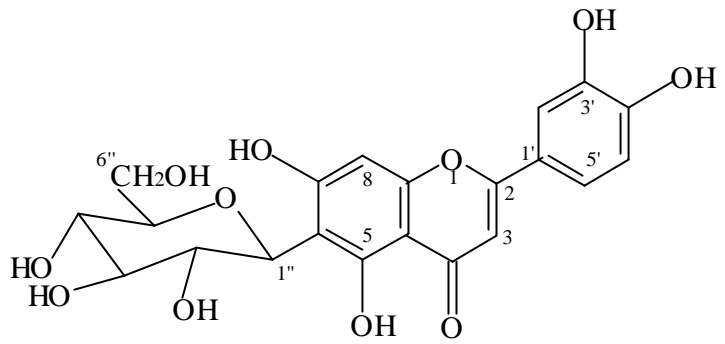
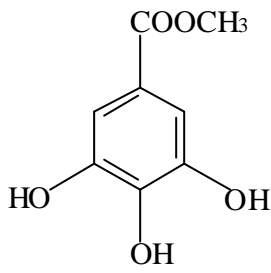
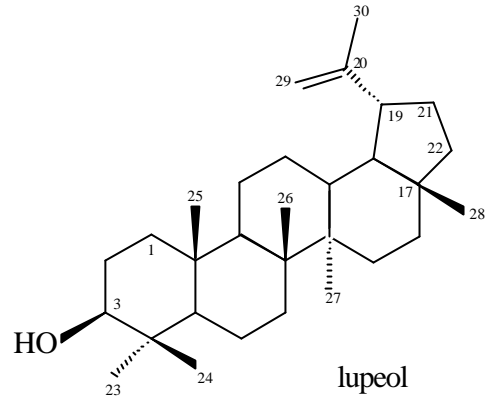


**Fluxograma 3.2:** Fluxograma representativo dos procedimentos de fracionamento, isolamento e identificação dos componentes de *C. ferrea*

**Substâncias isoladas das folhas de *C. ferrea***



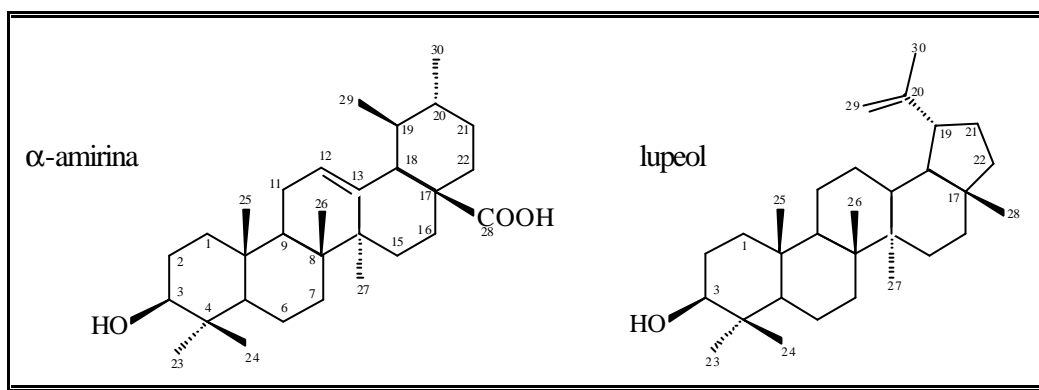
**cf1**



**Identificação de cf1.**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração **cf1** (22-23(17/18)) (Fig. 3.4 , p. 161) apresentou vários picos na região entre 0,75 $\delta$  e 2,09 $\delta$ . Outros sinais de menor intensidade foram observados na região entre 2,0 $\delta$  e 5,5 $\delta$ . Essas características indicaram que **cf1** é um triterpeno.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou picos em 109,2 $\delta$  e 151,0 $\delta$ , referentes a triterpeno com esqueleto lup-20(29)-eno. Outros picos em 124,3 $\delta$  e 139,5 $\delta$  foram atribuídos a triterpeno com esqueleto urs-12-eno. Comparando-se os outros deslocamentos com dados da literatura sugeriu-se a presença de uma mistura de lupeol e  $\alpha$ -amirina (MAHATO, 1994).



**Fig. 3.5:** Estruturas das substâncias presentes em **cf1** isolada de *C. ferrea*

**Tabela. 3.1:** Deslocamentos de RMN  $^{13}\text{C}$  de **cf1** ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz, TMS,  $\delta$ ) comparado com valores da literatura

Posição do carbono	Lupeol		a-amirina	
	Literatura*	cf1	Literatura*	cf1
1	38,7	38,9	38,7	38,8
2	27,4	27,7	27,2	27,1
3	78,9	79,0	78,3	79,0
4	38,8	38,9	38,7	38,8
5	55,3	55,6	55,2	55,7
6	18,3	18,2	18,3	18,2
7	34,2	34,3	32,9	32,2
8	40,8	41,5	40,0	39,7
9	50,4	51,1	47,7	47,8
10	37,1	37,8	36,9	36,5
11	20,9	21,6	23,3	22,7
12	25,1	25,5	124,3	124,3
13	38,0	38,1	139,3	139,5
14	42,8	42,8	42,0	42,3
15	27,4	27,1	28,7	28,5
16	35,5	35,2	26,6	26,5
17	43,0	43,5	33,7	33,9
18	48,2	48,2	58,9	59,4
19	47,9	47,8	39,6	39,6
20	150,9	151,0	39,6	39,5
21	29,8	29,8	31,2	30,8
22	40,0	39,7	41,5	41,5
23	28,0	28,0	28,1	28,3
24	15,4	15,3	15,6	15,6
25	16,1	16,7	15,6	15,6
26	15,9	15,9	16,8	16,8
27	14,5	14,4	23,3	23,3
28	18,0	18,2	28,1	28,3
29	109,3	109,2	17,4	17,9
30	19,3	19,2	21,3	21,8

\* MAHATO, 1994

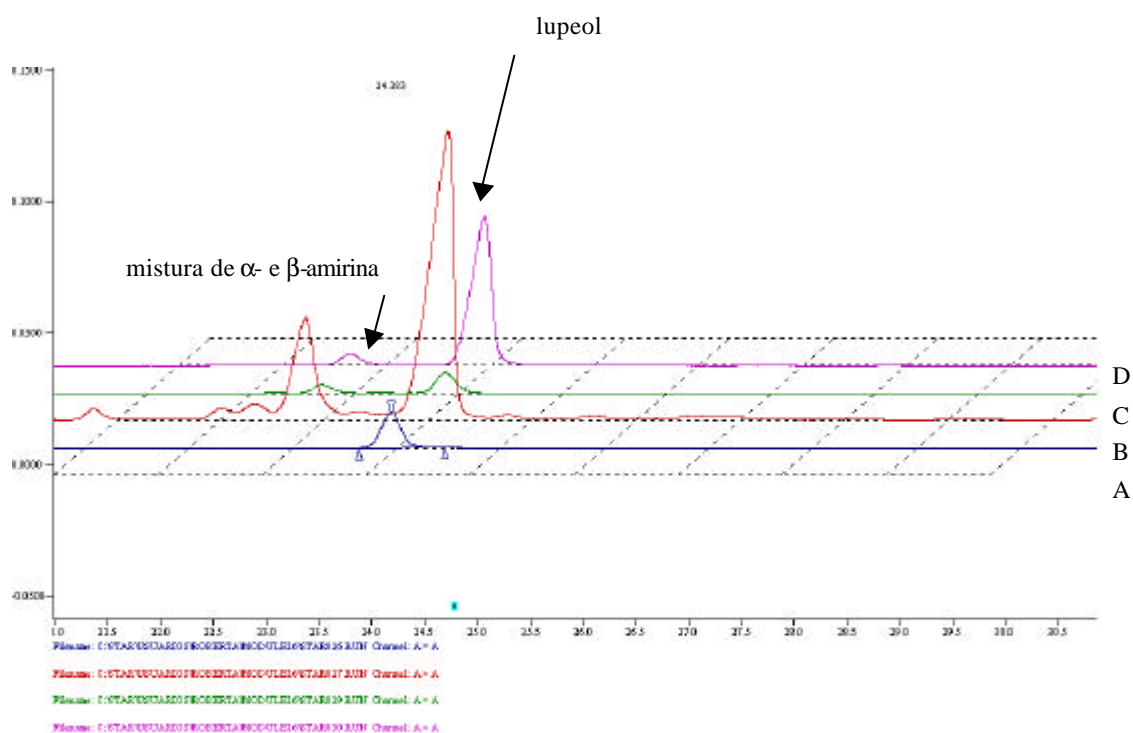


Fig. 3.4: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf1** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 3.4: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf1** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS,  $\delta$ )

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 3.6, p. 163) da fração 22-23(45) apresentou-se semelhante ao de cf1. Observaram-se sinais intensos entre 0,6 $\delta$  e 1,50 $\delta$ . Sinais de menor intensidade ocorrem entre 1,80 $\delta$  e 5,10 $\delta$ . Devido à pouca quantidade de massa não conseguiu-se obter o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Então, optou-se por analisar a fração 22-23(45) por GC-FID para identificar-se as substâncias presentes.

A fração **cf1** também foi analisada por GC-FID para confirmar a presença dos triterpenos, injetando uma mistura de padrões de  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e lupeol (Fig. 3.7). Esta análise permitiu confirmar a presença da  $\alpha$ -amirina e lupeol em **cf1** e na fração 22-23(45). Ainda, evidenciou pico mais intenso para o lupeol, sugerindo que este deve estar presente em maior quantidade em **cf1** do que a  $\alpha$ -amirina. Para a fração 22-23(45) os dois picos apresentaram iguais intensidades (Fig. 3.7).



**Fig. 3.7:** Cromatograma A (lupeol)

Cromatograma B (22-23(17/18))

Cromatograma C (22-23(45))

Cromatograma D (padrão lupeol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina)



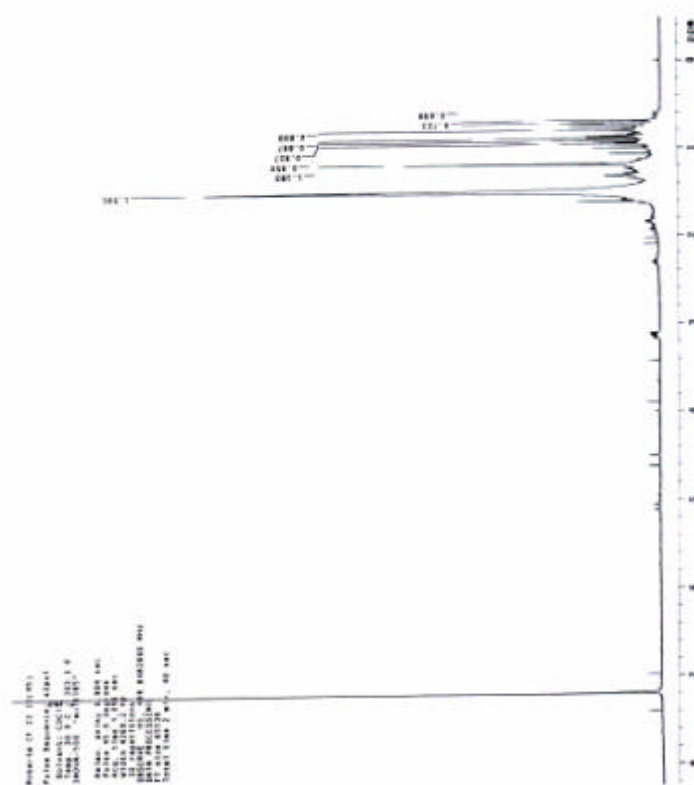


Fig. 3.6: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 22-23(45) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ)

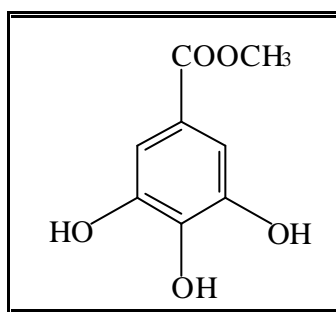
Fig. 3.6: Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 22-23(45) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, δ)

## Identificação de cf2

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf2** (Fig. 3.8, p. 165, tabela 3.2) apresentou um espectro muito simples com poucos picos. Observou-se na região dos hidrogênios aromáticos apenas um singlete em 7,04 $\delta$ . Em 3,81 $\delta$  outro singlete, sugerindo a presença de uma metoxila ligada a uma unidade de ácido carboxílico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou apenas 6 carbonos na molécula evidenciando apenas um anel aromático. O experimento HMQC (Tabela 3.2) forneceu as correlações diretas entre hidrogênios e carbonos. O único sinal observado na região aromática (7,04 $\delta$ ) mostra correlação com carbono em 110,09 $\delta$ . O sinal da metoxila (3,81 $\delta$ ) correlaciona-se com o carbono em 52,25 $\delta$ , evidenciando um sinal típico de éster de ácido carboxílico.

O experimento de HMBC forneceu as correlações necessárias para determinar-se a estrutura dessa molécula. O sinal em 7,04 $\delta$  correlaciona com os carbonos em 110,09, 121,49, 139,77, 146,51 e em 169,04. O sinal da metoxila (3,81 $\delta$ ) mostra correlação com o sinal de carbonila em 169,04 $\delta$ , comprovando a presença do éster metílico. Esses dados são compatíveis com o galato de metila.



**Fig. 3.9:** Estrutura de **cf2** isolada de *C.ferrea*

**Tabela 3.2:** Correlação direta entre H e  $^{13}\text{C}$  de **cf2** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

<i>Deslocamentos Químicos (d)</i>		
<i>Posição</i>	<i>RMN <math>^1\text{H}</math></i>	<i>RMN <math>^{13}\text{C}</math></i>
<b>1</b>	–	121,49
<b>2</b>	7,04 s	110,09
<b>3</b>	–	146,51
<b>4</b>	–	139,77
<b>5</b>	–	146,51
<b>6</b>	–	110,09
<b>Ome</b>	3,81 s	52,25

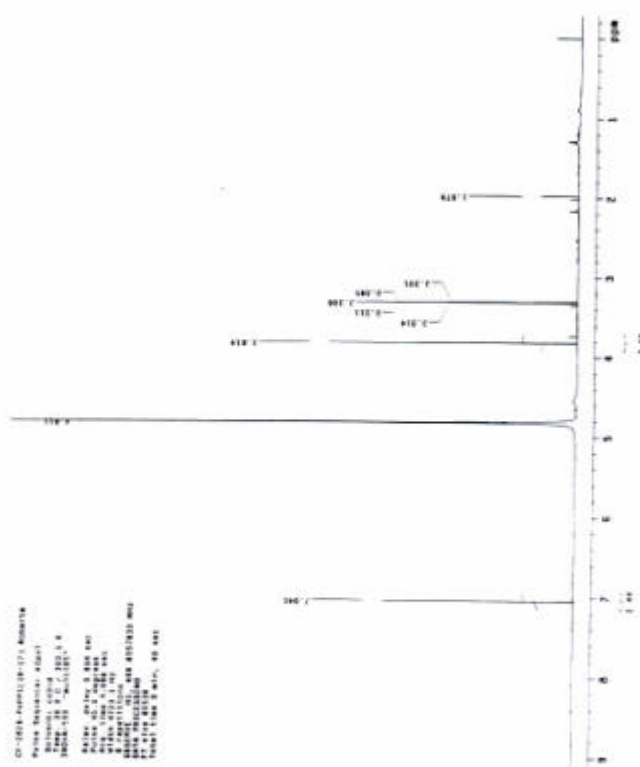


Fig. 3.8: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf2** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 3.8: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf2** (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

As substâncias cf3, cf4 e cf5 apresentaram espectros semelhantes aos flavonóides C-glicosilados de *W. ebracteata*. Deste modo, a substância cf3 foi identificada como sendo a isoorientina, cf4 como sendo vitexina e cf5 como orientina. Assim, mostraremos apenas os espectros de RMN  $^1\text{H}$  dessas substâncias.

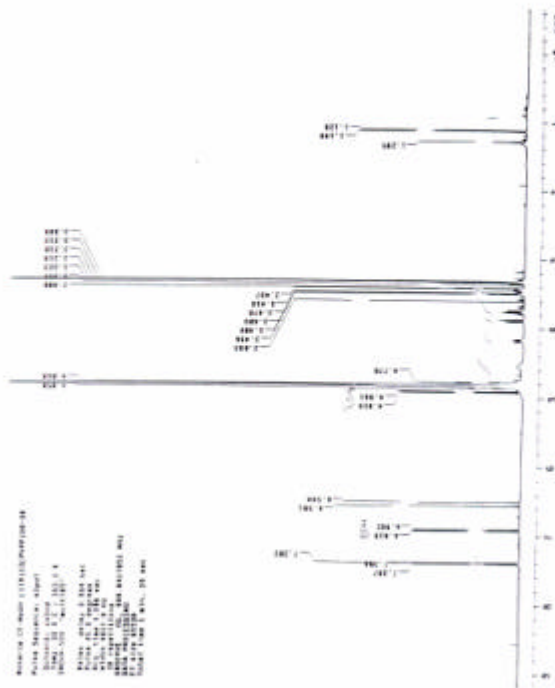


Fig. 3.10: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cf3 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

Fig. 3.10: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de cf3 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS,  $\delta$ )

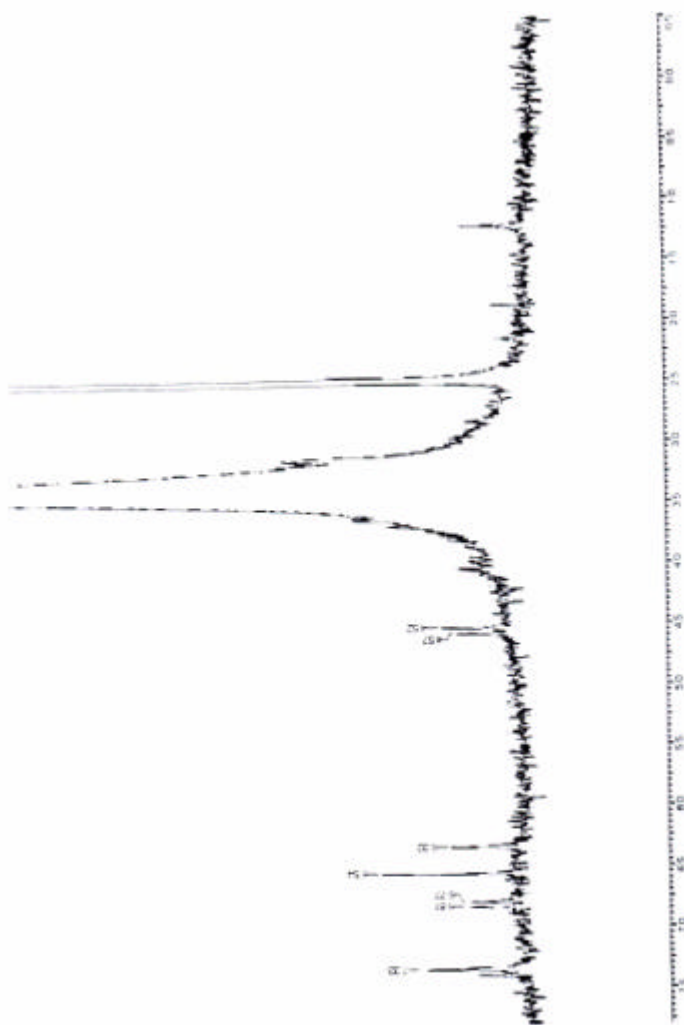


Fig. 3.11: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf4** (200 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

**Fig. 3.11:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf4** (200 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

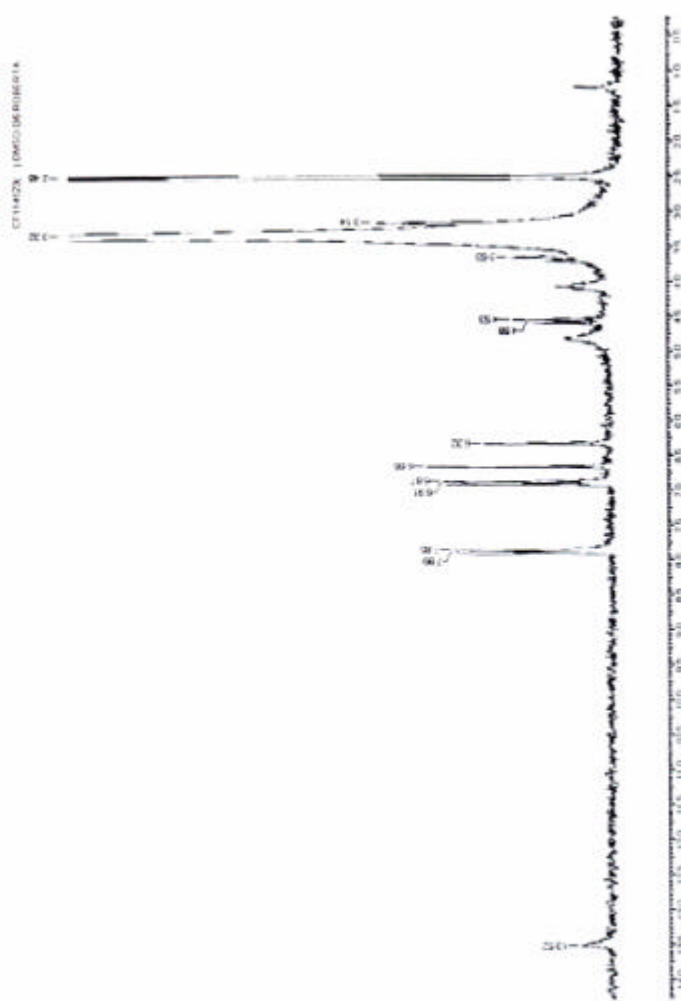


Fig. 3.12: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf5** (200 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

**Fig. 3.12:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **cf5** (200 MHz, DMSO  $d_6$ , TMS,  $\delta$ )

Estudos anteriores mostraram que o extrato benzênico de *C. ferrea* apresentou sitosterol, ácidos palmítico e octacosanóico, enquanto que o extrato alcoólico forneceu os ácidos gálico e elágico, além do galato de etila (DI STASI et al, 2002a).

O perfil fitoquímico apresentado pelas folhas do extrato metanólico de *Caesalpinia ferrea* apresentou uma mistura de triterpenos, um derivado do ácido gálico e três flavonóides C-glicosilados. Estes últimos apresentam várias atividades biológicas, discutidas anteriormente no capítulo sobre *Wilbrandia ebracteata*.

Analisando as substâncias isoladas do extrato em estudo, percebemos que o galato de metila (cf2) isolado do extrato metanólico pode ser um artefato, visto que anteriormente foi isolado do extrato alcoólico dessa mesma espécie o galato de etila. Essa última difere de cf2 apenas por apresentar um grupo metileno a mais ligado ao grupo do éster. Artefatos podem ser formados quando essas substâncias reagem com o solvente utilizado na preparação do extrato.

Outra observação interessante neste estudo é a presença de flavonóides C-glicosilados, que não tinham sido isolados até o momento neste gênero. Outros flavonóides com a rutina, miricetina e quercetina foram isolados de *C. pulcherrima* (DI STASI et al., 2002a).

Alguns flavonóides, assim como alguns ácidos (e.g. ácido clorogênico), apresentam atividade antiinflamatória (YAMURA et al. 1998; MIYASE et al, 1999; ITO et al, 1998). Substâncias dessas mesmas classes foram isoladas do extrato metanólico de *C. ferrea*. Isto sugere que a atividade apresentada pelo extrato pode estar relacionada a alguma dessas substâncias ou muitas vezes o que ocorre é sinergismo, onde não é apenas uma substância responsável pela atividade, mas um conjunto de substâncias.

### **III.2.5. Análise do extrato clorofórmico**

O extrato clorofórmico (5,0 g) foi fracionado por coluna de sílica utilizando-se como eluentes gradientes de hexano, acetato de etila e metanol. Obteve-se 105 frações de 50 mL cada, que foram analisadas por CCDC e reveladas com solução de anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. e foram agrupadas conforme a semelhança.

As frações de 1 a 46, 47 a 65 apresentaram o mesmo perfil cromatográfico quando analisadas por GC-MS. A fração 1-46 apresentou principalmente a presença de hidrocarbonetos de cadeia alifática longa.



## Considerações Finais

O principal objetivo deste projeto de pesquisas foi o de estudar três espécies vegetais, que são utilizadas pela população do Vale do Ribeira como medicinal, e que foram testadas farmacologicamente. As três espécies pertencem a diferentes famílias de plantas: Fabaceae, Caesalpiniaceae e Cucurbitaceae, sendo que as duas primeiras englobam a antiga família Leguminosae.

Essas plantas apresentaram resultados promissores frente a testes de atividade antiúlcera e sobre secreção de mastócitos de pulmão e intestino de cobaia (GONZALEZ, 2001; GONZALEZ et al, 2001; PINTO, 2000).

O estudo das folhas do extrato MeOH 70% da espécie *Zollernia ilicifolia* (Fabaceae) apresentou saponina derivada do ácido oleanólico, flavonóides tri- e tetraglicosilado e dois glicosídeos cianogênicos. Apesar de essa espécie também apresentar efeitos antiulcerogênicos, ela é considerada um adulterante da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* e *M. aquifolium*) (GONZALEZ et al, 2001). Esse efeito pode estar associado à presença dos flavonóides glicosilados, as saponinas ou ao conjunto dessas substâncias, resultando em efeito sinérgico. A partir desse estudo químico é necessário testar as frações ricas em saponinas e flavonóides a fim de descobrir qual dessas classes de substâncias é responsável por esta atividade apresentada. Esta continuidade será feita pelo grupo.

É interessante ressaltar que, embora a espécie *Zollernia ilicifolia* e as duas espécies de *Maytenus* possuam flavonóides tri- e tetraglicosilados, *Zollernia* se diferencia das espécies de *Maytenus*, por apresentar saponinas. Ainda, como foi demonstrado, *Zollernia* produz glicosídeos cianogênicos, o que é um fator preocupante para uma planta considerada como medicinal.

Não se têm estudos de outras espécies vegetais do gênero *Zollernia*, a não ser da espécie *Z. paraensis*. O gênero *Swartzia*, o mais próximo taxonomicamente, apresenta diterpenos do tipo cassano, saponinas, pterocarpanos e flavonóides (ORPHELIN et al., 1996; BOREL; HOSTETTAMN, 1987; FILHO; DEMORAES, GOTTLIEB, 1980; OSAWA et al., 1992). Desta forma, a presença de saponinas e flavonóides em *Zollernia ilicifolia* é um resultado que enriquece o conhecimento da composição química do gênero e

da espécie. A presença dos glicosídeos cianogênicos, não relatados na sub-família Swartziae, a qual pertence *Z. ilicifolia* é, assim, um diferencial entre *Swarzia* e *Zollernia*.

A outra espécie investigada neste trabalho foi *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae). Os estudos químicos e farmacológicos relatados na literatura com esta espécie foram realizados somente com as raízes dessa espécie e apresentaram em sua composição principalmente cucurbitacinas (PEREIRA; FARIAS; VARGAS, 1996).

Ensaio farmacológico com o extrato MeOH 70% das folhas de *W. ebracteata* permitiram comprovar atividade antiulcerogênica nos modelos induzido por etanol absoluto e etanol/HCl. Além disso, resultados dos testes de toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) mostraram que as folhas de “taiuiá” são mais seguras para o uso do que as raízes dessa espécie vegetal.

Das folhas de *W. ebracteata* (Cucurbitaceae) isolamos uma mistura de ácidos graxos, vitexina, isovitexina, orientina e isorientina. Os flavonóides C-glicosilados apresentam ocorrência limitada entre os vegetais, sendo que na família Cucurbitaceae encontram-se vários gêneros que produzem essas substâncias. Quanto à atividade biológica de flavonóides C-glicosilados, existem poucos relatos na literatura. Além das atividades apresentadas no capítulo II, relata-se que as flavonas saponarina, orientina 2''-O-rhamnosídeo, vicenina-2, isovitexina 2''-O-rhamnosídeo, vitexina 2''-O-rhamnosídeo, luteolina-2 e lucenina-2 apresentam atividade anti-hepatotóxica em culturas primárias de hepatócitos de ratos ativadas por CCl<sub>4</sub> e galactosamina (HARBORNE, 1996).

Os flavonóides apresentam diversas funções biológicas tanto para os organismos vegetais como animais. Inúmeros trabalhos relatam essas atividades, como antimicrobiana, antiviral, antineoplásico, antiinflamatória, antihepatotóxico, antihipertensivo, potencial antidiabético (GUARDIA et al., 2001; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Estudos que tratam da relação estrutura/atividade dos flavonóides têm se intensificado ultimamente. Algumas características estruturais parecem ser responsáveis pela bioatividade. Algumas flavonas, flavanas, biflavanas e seus derivados metoxilados ou hidroxilados tendem ser mais citotóxicos do que seus análogos menos oxigenados (WANG; JAMES, 1999). As flavonas C-glicosiladas (**we2**, **we4**, **we6**) por nós ensaiadas apresentaram atividades citotóxicas menores do que a da luteolina, que foi utilizada como padrão.

A atividade antioxidante de flavonóides é extensamente discutida na literatura (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; YESILADA et al., 2000; COOK; SAMMAN, 1996). Alguns flavonóides são capazes de seqüestrar radicais livres, e isso pode ser verificado nos testes com solução de beta-caroteno, DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) e teste de cloração. Há algum tempo, essa atividade atribuída aos flavonóides têm sido detectada tanto *in vitro* quanto em animais de experimentação, nos quais são aplicadas doses farmacológicas. Contudo, efeitos antioxidantes *in vivo* ainda não estão totalmente claros. Uma vez que as observações em seres humanos geralmente são relativas à quantidade de flavonóides ingeridas através dos alimentos, há a necessidade de se avaliar mecanismos de elucidação de absorção, metabolismo e ação bioquímica e interação com outros nutrientes *in vivo*. (COOK; SAMMAN, 1996).

Quanto à utilização medicinal pela população das espécies *Wilbrandia ebracteata* e *Zollernia ilicifolia* como antiúlceras, percebe-se uma correlação, visto que os testes farmacológicos realizados demonstraram essa tal atividade, e a presença de flavonóides pode estar relacionada a essa ação biológica (GONZALEZ, 2001, GONZALEZ et al, 2001).

A espécie *Caesalpinia ferrea* é uma espécie utilizada em várias regiões do país, na Mata Atlântica é usada para problemas respiratórios, gripes, resfriados e tosses e os testes farmacológicos realizados com o extrato dessa planta verificou resultados promissores quanto à atividade antialérgica quando comparado com drogas comerciais utilizadas no tratamento profilático de asma leve a moderada. *Caesalpinia ferrea* apresentou triterpenos, um ácido fenólico e três flavonóides C-glicosilados: isoorientina, orientina e vitexina. Não existem relatos na literatura sobre a presença de flavonóides C-glicosilados em *C. ferrea*. Esses dados aprofundam o conhecimento da composição química dessa espécie. Além de flavonoides C-glicosilados, foi isolado o galato de metila, que pode ser precursor biossintético de metabólitos secundários naturais (cumarinas, lignanas e neolignanas) (DEWICK, 1998). Os triterpenos isolados de *C. ferrea* são os mais comuns encontrados em plantas superiores. Dentre as atividades biológicas atribuídas aos triterpenos isolados, pode-se citar a atividade antiinflamatória do lupeol, da  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina (GEETHA; VARALASHMI, 2001).

Devemos salientar que este trabalho representa uma importante contribuição para o estudo do conhecimento dessa espécie presente na Mata Atlântica, à medida que apresenta os dados farmacológicos, complementado pelo estudo fitoquímico.

Esses dados são de grande importância à população do Vale do Ribeira, não só sob o ponto de vista de valorização do conhecimento tradicional da população local, mas também sob o aspecto econômico e ecológico, pois a exploração de folhas representa uma importante estratégia que permite a continuidade da exploração vegetal e manutenção da fonte de renda sem prejuízos para a conservação ambiental.

## Referências

- AGRAWAL, P. K. (Ed.). **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- AHMAD, V. U.; ALI, M. S.; USMANGHANI, K. Bondenolide, a new diterpenoid from the seeds of *Caesalpinia bonducella*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 52, n. 3, p. 410-412, 1997.
- ALMEIDA, F. R. C.; RAO, V. S. N.; MATOS, M. E. O. Antiinflammatory, antitumor and antifertility in rodents of 2 nor-curcubitacin glucosides from *Wilbrandia ebracteata* species. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 4, p. 189-193, 1992.
- ANDRADE, F. D. P. **Estudo químico de plantas que apresentam atividade biológica**. 1996. 62 f. Monografia (Bacharelado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 1996.
- AQUINO, R., DE TOMMASI, N., DE SIMONE, F., PIZZA, C. Further triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 5, p. 1035-1040, 1997.
- AWASTHI, K. K.; MISRA, K. Chemical constituents of *Caesalpinia pulcherrima* stem bark and flowers. **Journal Indian Chemical Society**, v. 54, n. 6, p. 646-647, 1977.
- BABICH, B.; BORENFREUND, E. Neutral Red assay for toxicology *in vitro*. In: WATSON, R. R. (Ed.). **In vitro methods of toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 237-251.
- BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.
- BALICK, M. J.; ELISABTSKY, E.; LAIRD, S. A. **Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996.
- BARATA, G. Medicina popular obtém reconhecimento científico. **Revista Ciência e Cultura**, n. 3, p. 12, 2003.
- BARILE, F. A. **Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 222.
- BARRON, D.; IBRAHIM, R. K. Isoprenylated flavonoids – a survey. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 921-982, 1996.
- BARROZO, G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: Edusp, 1978. v. 3.
- BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SÁEZ, J. A.; COBIANCHI, C. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1479-1482, 1999.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

- BOREL, C.; HOSTETTMANN, K. Molluscicidal saponins from *Swartzia madagascariensis* Desvaux. **Helvetica Chimica Acta**, v. 70, p. 570-576, 1987.
- C. LA CASA, I.; VILLEGAS, C.; ALARCÓN DE LA LASTRA., V.; MOTILVA, M. J.; CALERO, M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 45-53, 2000.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CAMARGO, M. T. L. A. **Plantas medicinais e de rituais afro-brasileiros II**: estudo etnofarmacobotânico. São Paulo: Ícone, 1998.
- CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; FILHO, D. S.; SARTI, S. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178, 1996.
- CHE, C. T.; MACPHERSON, D. D.; CORDELL, G. A.; FONG, H. H. S. Pulcherralpin, a new diterpene ester from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal Natural Products**, v. 49, n. 4, p. 561-569, 1986.
- CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 377-381, 1994.
- CHOI, S. Y.; YANG, K. M.; JEON, S. D. Brazilin modulates immune function mainly by augmenting T cell activity in halothane administered mice. **Planta Medica**, v. 63, n. 5, p. 405-408, 1997.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.
- CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. New York: NY Botanical Garden, 1988.
- DEVIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarina naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bormelioides***. 2000. 127 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2000.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**. Chichester: John Willey & Sons, 1998.
- DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, p. 337-353. 1999.
- DI STASI, L. C.; GUIMARÃES, E. M.; SANTOS, C. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. M. Fabales medicinais. In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, São Paulo, 2002a. cap. 18, p. 276-320.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GONZALEZ, F. G.; PORTILHO, W. G. Violaes medicinais. In: In: DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, São Paulo, 2002b. cap. 18, p. 177-199.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002c.

DOS SANTOS, R. I.; DOS SANTOS, M. A.; SCHENKEL, E. P. Analysis of the plant drug *Wilbrandia ebracteata* (Cogn) Cogn. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 300-302, 1996.

ELVIN-LEWIS, L. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141-164, 2001.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 1999. p. 197-220.

FERRARI, F.; BOTTA, B.; ALVES DE LIMA, R. Flavonoids and isoflavonoids from *Zollernia paraensis*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1663-1664, 1983.

FERRARI, F.; BOTTA, B.; ALVES DE LIMA, R.; BETOLLO, G. B. M. 7,2',4'-Trihydroxy-3'-metoxyisoflavone from *Zollernia paraensis*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 708-709, 1984.

FERRARI, F.; ALVES DE LIMA, R.; BETOLLO, G. B. M. 2,4,2'-trihydroxy-4'-metoxybenzil from *Zollernia paraensis*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 2691-2692, 1984.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos – Editora Universitária, 2001. p. 47-75.

FILHO, R. B.; DEMORAES, M. P. L.; GOTTLIEB, O. R. The chemistry of Brazilian leguminosae. Pterocarpanes from *Swartzia laevicarpa*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2003-2006, 1980.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos – Editora Universitária, 2001. p. 47-75.

FITOTERAPIA: sua história e importância. **Fitoterapia & Saúde**, n. 1, p. 8-12, 2000.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells - a manual of basic technique. 3rd ed. New York: Wiley-Less, 1994. 486 p.

GARAI, S.; MAHATO, S. B. Isolation and structure elucidation of three triterpenoid saponins from *Acacia auriculiformis*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 137-140, 1997.

GEETHA, T.; VAR ALAKSHMI, P.; LATHA, M. R. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupel linoleate in rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77-80, 2001.

GILANI, A. H.; AZIZ, N.; KHAN, M. A.; SHAHEEN, F.; JABEEN, Q.; SIDDIQUI, B. S.; HERZIG, J. W. Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant, sedative and antispasmodic activities of *Lavandula stoechas* L. **Journal Ethnopharmacology**, v. 71, p. 161-167, 2000.

- GOLDBERG, A. M.; STARK, D. M. **Pharmacopeial Forum**, p. 3235-3236, Nov.-Dec. 1987.
- GONZALEZ, F. G. **Folhas de *Wilbrandia ebracteata***: eficácia, inocuidade e controle de qualidade. 2001. 86 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.
- GONZALEZ, F. G.; PORTELLA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of three *Maytenus ilicifolia* (“espinheira-santa”) adulterants: *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zollernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.
- GOODMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W. **As bases farmacológicas da terapêutica**. New York: Mcgraw-Hill Companies, 1996.
- GUARDIA, T.; ROTELLI, E. A.; JUAREZ, O. A.; PELZER, E. L. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rats. **II Farmaco**, v. 56, p. 683-687, 2001.
- GUO, S., KENNE, L. Structural studies triterpenoid saponins with new acyl components from *Quillaja saponaria* Molina. **Phytochemistry**, v. 55, p. 419-428, 2000.
- HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1996.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- IKAN, R. **Naturally occurring glycosides**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1999.
- ITO, H; MIYASAKI, T; ONO, M; SAKURAI, H. Allergic activities of radosiin and its related compounds: chemical and biochemical evaluations. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, p.1051-1056, 1998.
- IZZO, A. A.; DICARLO, G.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F.; AUTORE, G. Antiulcer effect of flavonoids – Role of endogenous PAF. **Phytotherapy Research**, v. 3, p. 179-181, 1994.
- JOLY, A. B. **Botânica introdução à taxonomia vegetal**. Rio de Janeiro: Companhia Editora Nacional, 1998.
- JOLY, C. A.; SPEGLICH, E. Programa Biota/FAPESP: um novo paradigma no estudo da conservação e do uso sustentável da biodiversidade. **Revista Ciência e Cultura**, n. 3, p. 12-16, 2003.
- KARAKAYA, S.; EL NEHIR, S. Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. **Food Chemistry**, v. 66, p. 289-292, 1999.
- KIM, D. S.; BAEK, N. I.; OH, S. R. NMR assignment of Brazilein. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 177-178, 1997.
- KINOSHITA, T.; KANEKO, M.; NOGUCHI, H. New cassane diterpene from *Caesalpinia bonducella* (Fabaceae). **Heterocycles**, v. 43, n. 2, p. 409-414, 1996.
- KITAGAWA, R. R. **Efeito da isocumarina 9,10-dihidroxi-5,7-dimetoxi-1H-nafto(2,3c)pirano-1-ona (paepalantina) sobre *Staphylococcus aureus* e no burst oxidativo de neutrófilos**. 2002. 84 f. Dissertação



(Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2002.

KITAGAWA, I.; SIMANJUNTAK, P.; MAHMUD, T. Indonesian medicinal plants. Chemical structures of caesaldekarins c,d e e, three additional cassane-type furanoditerpenes from the roots of *Caesalpinia major* (Fabaceae). Several interesting reaction products of caesaldekarin a provided by N-bromosuccinimide treatment. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, n. 6, p. 1157-1161, 1996.

KRAUZE-BARANOWSKA, M.; CISOWSKI, W. Flavonoids from some species of the genus *Cucumis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 321-324, 2001.

LAPPONI, J. C. **Estatística usando Excel 5 e 7**. São Paulo: Lapponi Treinamento e Editora, 1997.

LAVAUD, C.; BEAUVIÈRE, S.; MASSIOT, G.; MEN-OLIVIER, L.; BOURDY, G. Saponins from *Pisonia umbellifera*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 1, p. 189-194, 1996.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 3796-3801, 2001.

LEWIS, D. A.; HANSON, D. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 201-231, 1991.

LIMA, C. A. H. **Atividade antiulcerogênica da desidrocrotônina e do óleo essencial obtidos a partir das cascas de *Croton cajuacara* Benth, uma planta da família Euphorbiaceae**. 1998. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora do Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 1998. 246 p.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACPHERSON, D. D. Peltogynoids and homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 12, p. 2835-2838, 1983.

MAHATO, S. B. Structure of Caesalpinine-A a novel spermidine alkaloid from *Caesalpinia digyna* Rottl. **Journal American Chemical Society**, v. 105, n. 13, p. 4441-4445, 1983.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições EUFC, 1997.

MATSUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. **Pharmacology Letters**, v. 63, p. 245-254, 1998.

MIYASE, T.; SANO, M.; NAKAI, H.; MURAOKA, M.; NAKAZAWA, M.; SUZUKI, M.; YOSHINO, K.; NISHIHARA, Y.; TANA, J. Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (L). **Phytochemistry**, v. 52, p. 303-310, 1999.

MONACHE, G. D.; BOTTA, B.; VINCIGUERRA, V.; MELLO, J. F.; CHIAPPETA, A. Antimicrobial isoflavanones from *Desmodium canum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 2, p. 537-544, 1996.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. 11.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAHRSTEDT, A., ROCKENBACH, J. Occurrence of the cyanogenic glucoside prunasin and its corresponding mandelic acid amide glucoside in *Olinia* species (Oliniaceae). **Phytochemistry**, v. 34, p. 433-436, 1993.

NAMIKOSHI, M.; NAKATA, H.; NUNO, M. Homoisflavonoids and related-compounds. Constituents of *Caesalpinia japonica* Sieb et zucc. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 9, p. 3568-3575, 1987.

NAMIKOSHI, M.; NAKATA, H.; SAITOH, T. Homoisflavonoids and related-compounds. Homoisflavonoids from *Caesalpinia sappan*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1831-1933, 1987.

NAMIKOSHI, M.; NAKATA, H.; YAMADA, H. Homoisflavonoids and related-compounds. Isolation and absolute-configuration of 3,4-dihydroxylated homoisoflavans and brazilins from *Caesalpinia sappan* L. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 7, p. 2761-2773, 1987.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 1999. p.25-38.

ORPHELIN, B.; BRUMBOUSQUET, M.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M.; MORETTI, C. Swartziarboreols A-E, five new cassane diterpenoids from *Swartzia arborescens* (Aubl) Pittier. **Heterocycles**, v. 43, p. 173-183, 1996.

OSAWA, K.; YASUDA, H.; MARUYAMA, T.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia-polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, p. 2970-2974, 1992.

PARMAR, V. S.; SINGH, S.; JACOBSEN, J. P. Structure of a new homoisoflavanone from *Caesalpinia pulcherrima*. **Acta Chemica Scandinavica B**, v. 4, p. 267-270, 1987.

PASCOE, K. O.; BURKE, B. A.; CHAN, W. R. Caesalpin-F- a new furanoditerpene from *Caesalpinia bonducella*. **Journal Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 913-915, 1986.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; WEBB, R. L. Pulcherrimins A-D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. **Tetrahedron**, v. 53, n. 5, p. 1583-1592, 1997.

PATIL, A. D.; CHAM, J. A.; LOIS-FLAMBERG, P.; MAYER, R. J.; WESTLEY, J. W. Novel acetylenic acids from the root bark of *Paramacrolobium caeruleum*: inhibitory of 3-hydroxi-3-methylglutaryl coenzyme reductase. **Journal Natural Products**, v. 51, n. 1, p. 153-161, 1989.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books, 1997. v. 2.

PEREIRA, A. M. C. B.; FARIAS, M. R.; VARGAS, V. M. F. Study of the mutagenic activity of extracts of the plant *Wilbrandia ebracteata*. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 512-516, 1996.

PETER, S. R.; TINTO, W. F.; MACLEAN, S. Caesalpinin, a rearranged cassane furanoditerpene of *Caesalpinia bonducella*. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 33, p. 5767-5770, 1997a.

PETER, S. R.; TINTO, W. F.; MACLEAN, S. Bonducellpins A-D, new cassane furanoditerpenes of *caesalpinia bonducella*. **Journal Natural Products**, v. 60, n. 12, p. 1219-12221, 1997b.

PETERS, R. R.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. **Planta Medica**, v. 63, p. 525-528, 1997.

PETERS, R. R.; SALEH, T. H.; LORA, M.; PATRY, C.; DE BRUM-FERNANDES, A. J.; FARIAS, M. R.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. Anti-inflammatory effects of the products from *Wilbrandia ebracteata* on carrageenan-induced pleurisy in mice. **Life Sciences**, v. 64, p. 2429-2437, 1999.

PIO CÔRREA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1975. v. 6.

PINTO, E. A. T. **Atividade de extratos de *Anchietia salutaris* St. Hil. e *Caesalpinia ferrea* Mart. sobre a secreção de mastócitos de pulmão e intestino de cobaia. Comparação com drogas antialérgicas**. 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

RASTRELLI, L., DE SIMONE, F., SCETTINO, O., DINI, A. Constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua) seeds: isolation and characterization of new triterpene saponins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3528-3533, 1996.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REICHARDT, H. **As florestas da América do Sul**. Rio de Janeiro: Editora Polígono, 1972.

REYES, M.; MARTIN, C.; delaLASTRA, C. A.; TRUJILLO, J.; TORO, M. V.; AYUSO, M. J. Antiulcerogenic of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis* Cabezudo-Rivera. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 51, p. 563-569, 1996.

RICCI, C. V., PATRÍCIO, M. C. B.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A.; GIULIETTI, A. M. Flavonoids of *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae): taxonomic implications. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 577-583, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n.7, p. 933-956, 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDI, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROCKENBACH, J.; NAHRSTEDT, A.; WRAY, V. Cyanogenic glycosides from *Psydrax* and *Oxyanthus* species. **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 567-570, 1992.

RYU, S. H. The cytotoxic principle of *Scutellariae radix* against L 1210 cells. **Planta Médica**, v. 51, p. 355, 1985.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. Porto Alegre: Rígel, 1989. 208 p.

SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 237-239, 1998.

SANTOS, L. C. **Investigação química de plantas da família Eriocaulaceae**. 2001. 188 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2001.

SEIGLER, D. S. Isolation and characterization of naturally occurring cyanogenic compounds. **Phytochemistry**, v. 14, p. 9-29, 1975.

SILVERTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1991.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Santa Catarina: Editora da UFSC, 1999.

SIQUEIRA, M. F. de. **Espécies arbóreas da Mata Atlântica**. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br>>. Acesso em: 28 nov. 2000.

SOARES, A. C. **Se bem não fizer, mal também não fará**. Disponível em: <<http://www.cdcc.sc.usp.br>>. Acesso em: 15 abr. 2004.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 753-758, 2003.

TAPIERO, H.; TEW, K. D.; NGUYEN, B. A.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v. 38, p. 11-36, 2000.

VILEGAS, W.; NEHME, C. J.; DOKKEDAL, A. L.; PIACENTE, S.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Quercetagenin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *Paepalanthus latipes*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 403-409, 1999.

VILEGAS, W.; SANNOMIYA, M.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. Isolation and structure of two new flavonoid glycoside from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 403-406, 1999.

VOGEL, A. I., **Análise orgânica qualitativa**. Rio de Janeiro: **Ao Livro Técnico**, 1981.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.

WANG, W.; JAMES, A. J. Structure activity relation ships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 6, p. 683-699, 1999.

WATSON, R.; FOWDEN, L. Amino-acids of *Caesalpinia tinctoria* and some allied species. **Phytochemistry**, v. 12, n. 3, p. 617-622, 1973.

WILSON, A. C. Cytotoxicity and viability assay. In: FRESHNEY, R. I. **Animal cell culture: a practical approach**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1992. cap. 8, p. 263-303.

YAMAMURA, S.; OZAWA, K.; OHTANI, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K. Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 1, p. 131-136, 1998.

YESILADA, E.; TAKAISHI, Y. A saponin with anti-ulcerogenic effect from the flowers of *Spartium junceum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 903-908, 1999.

YESILADA, E.; TSUCHIYA, K.; TAKAISHI, Y.; KAWAZOE, K. Isolation and characterization of free radical from the flowers of *Spartium junceum* by activity-guided fractionation. **Journal Ethnopharmacology**, v. 73, p. 471-478, 2000.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos Editora Universitária, 2001.

ZHENG, G. Q. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. **Planta Médica**, v. 60, p. 54-57, 1994.

Nome do arquivo: Roberta Coelho Tese.doc  
Pasta: C:\Cathedra\01\_colaboradores\COELHO, R.G. falta figuras  
Modelo: C:\Documents and Settings\Administrador\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot  
Título: I  
Assunto:  
Autor: Micro04  
Palavras-chave:  
Comentários:  
Data de criação: 10/06/2004 10:38  
Número de alterações: 14  
Última gravação: 15/03/2005 14:25  
Gravado por: CGB  
Tempo total de edição: 76 Minutos  
Última impressão: 15/03/2005 14:26  
Como a última impressão  
Número de páginas: 197  
Número de palavras: 30.930 (aprox.)  
Número de caracteres: 176.303 (aprox.)