

TAMARA REGINA CALVO

**Uso sustentável da biodiversidade brasileira - prospecção
químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea
glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera
truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae)**

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

Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

C169u Calvo, Tamara Regina
Uso sustentável da biodiversidade brasileira - prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae) / Tamara Regina Calvo – Araraquara : [s.n], 2007
216 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Wagner Vilegas

1. Cromatografia. 2. Espectroscopia. 3. Plantas medicinais. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

Tamara Regina Calvo

Dados Pessoais

Nascimento 18/11/1979
Nacionalidade Brasileira
Naturalidade Tabatinga-SP
Profissão Química
Endereço Profissional Instituto de Química de Araraquara – Unesp, Departamento de Química Orgânica, Rua Francisco Degni, s/n, Quitandinha, CEP: 14800-900
Telefone 16 33016600 Ramal 6792
E-mail tamaracalvo@gmail.com/tamaracalvo@yahoo.com.br

Formação

Ensino Fundamental e Ensino Médio (conclusão 1996) E.E. Profa. Luzia de Abreu, Nova Europa-SP

Graduação 02/1998-12/2002 Licenciatura em Química
Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara

Pós-Graduação 02/2003-12/2007 Doutorado Direto em Química
Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara
Título: Uso sustentável da biodiversidade brasileira: Prospecção química farmacológica em plantas superiores: *Alchornea* ssp (Euphorbiaceae) e *Indigofera* ssp (Fabaceae)
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Bolsa Fapesp

Estágios Científicos

Iniciação Científica 02/1999-12/2000 Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Bioquímica e Química Tecnológica
Projeto: Síntese de compósitos polímero-cerâmica com aplicações médicas
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Zaghete Bertochi
Bolsa CNPq/PIBIC

Iniciação Científica 02/2001-12/2002 Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Química Orgânica
Projeto: Caracterização Química de *Turnera ulmifolia* (Turneraceae)
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Bolsa CNPq/PIBIC

- 02/2003-05/2003 Universitat Ramón Llull - Barcelona - Catalunya/Espanha
Institut Quimic de Sarrià
Sección Esteroides
Projeto: Síntese de Brassinoesteróides
Orientadora: Profa. Dra. Carme Brosa
Bolsa PCI/Espanha
- 02/2007-07/2007 Universidad de Salamanca - Salamanca - Castilla y León/Espanha
Facultad de Farmacia
Departamento de Química-Farmacéutica
Projeto: Síntese de compostos nitrogenados
Orientador: Prof. Dr. Arturo San Feliciano
Bolsa: Capes/PDEE

Atuação Profissional

- 01/1998-07/1998 Prefeitura Municipal de Nova Europa-SP
Secretária de Escola
- 02/1999-12/2002 EMPRODEQUI - Empresa Júnior de Projetos & Consultoria
Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara
Gerente de Marketing, Diretora de Recursos Humanos
- 07/2006-12/2006 Universidade Estadual Paulista
Instituto de Química de Araraquara
Docente da disciplina Química Orgânica
Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara

Publicações

Artigos completos publicados em periódicos

1. CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S.; BALLESTEROS, K. V. R.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA LIMA, C. A.; TAMASHIRO, J.; SOUZA BRITO, A. R. M.; TAKAHIRA, R. K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of proliferation cell in gastric mucosa during healing process. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 451-459, 2007.
2. FARIAS SILVA, E.; COLA, M.; CALVO, T. R.; BARBASTEFANO, V.; FERREIRA, A. L.; MICHELATTO, D. P.; ALMEIDA, A. B. A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antioxidant activity of indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. **Planta Medica**, v. 73, p. 1241-1246, 2007.
3. HIRUMA LIMA, C. A.; CALVO, T. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 215-224, 2006.

4. RINALDO, D.; SILVA, M. A.; RODRIGUES, C. M.; CALVO, T. R.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* ST. HILL. by high-speed counter-current chromatography. **Química Nova**, v. 29, p. 947-949, 2006.
5. COLA MIRANDA, M.; BARBASTEFANO, V.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. **Biota Neotropica**, v. 6, p. 1-9, 2006.
6. LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 9, p. 1726-1730, 2005.
7. LOPES, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; CARLI, C. B. A.; MARQUES, M. F.; JORDÃO JUNIOR, C. M.; RINALDO, D.; CALVO, T. R.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta imune. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 44-50, 2005.
8. BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. D.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.

Resumos publicados em Anais de Congressos

1. Calvo, T. R.; Cardoso, C. R. P.; Moura, A. C. S.; Varanda, E. A.; Vilegas, W. Compounds and mutagenic activity from *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). XVI Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, La Plata-Argentina, 2007. Apresentação oral.
2. Cola, M.; Barbastefano, V.; Ferreira, A. L.; Vinagre, A. M.; Farias Silva, E.; Calvo, T. R.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Fracción acetato de *Indigofera suffruticosa* Mill. en la cicatrización de la úlcera gastrica inducida por ácido acetico. XVI Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, La Plata-Argentina, 2007.
3. Farias Silva, E.; Ferreira, A. L.; Barbastefano, V.; Faria, F. M.; Almeida, A. C. A.; Michelatto, D. P.; Cola, M.; Calvo, T. R.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Efeito do indigo isolado de *Indigofera truxillensis* sobre a síntese de muco e a expressão da enzima óxido nítrico sintase em estômago de rato. XVI Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, La Plata-Argentina, 2007.
4. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Colombo, L. L.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Antiproliferative properties of indigotin alkaloid obtained from *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). XVI Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, La Plata-Argentina, 2007.
5. Pavan, F. R.; Calvo, T. R.; Sato, D. N.; Franzblau, S. G.; Vilegas, W.; Bauab, T. M.; Leite, C. Q. F. Antitubercular activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, La Plata-Argentina, 2007.
6. Calvo, T. R.; Moura, A. C. S.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Chemical fingerprint of *Alchornea triplinervia* using flow injection electrospray ionisation tandem mass spectrometry. 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP, 2007.
7. Pavan, F. R.; Calvo, T. R.; Sato, D. N.; Vilegas, W.; Leite, C. Q. F. *Indigofera truxillensis* and *Indigofera suffruticosa*: antimycobacterial activity and citotoxicity of extracts and fractions. 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP, 2007.
8. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Colombo, L. L.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Immunostimulating and antiproliferative properties of *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae) alkaloid fraction. 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP, 2007.

9. Lima, Z. P.; Calvo, T. R.; Silva, E. F.; Pellizzon, C. H.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M.; Hiruma Lima, C. A. Healing effects of *Alchornea triplinervia* on enhance the COX2 and prostaglandin E2 expression. The first Collaborative Meeting on Phytomedicine, Ascona-Suíça, 2007.
10. Moura, A. C. S.; Calvo, T. R.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Perfil químico por HPLC-UV-PDA do extrato metanólico e chá das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). I Simpósio Paulista de Farmacognosia, Araraquara-SP, 2007.
11. Benzatti, F. P.; Lopes, F. C. M.; Sassa, M. F.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Placeres, M. C. P.; Carlos, I. Z. Efeito dos extratos diclorometano e metanólico da planta *Indigofera truxillensis* na liberação do fator de necrose tumoral- α . I Simpósio Paulista de Farmacognosia, Araraquara-SP, 2007.
12. Calvo, T. R.; Moura, A. C. S.; Souza Brito, A. R. M.; Vilegas, W. Estudo químico das partes aéreas de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). 29 Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2006.
13. Calvo, T. R.; Severi, J.; Rinaldo, D.; Souza Brito, A. R. M.; Vilegas, W. Constituintes químicos do extrato metanólico das folhas de *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). 19 Simpósio de Plantas Medicinais Brasileiras, Salvador-BA, 2006.
14. Calvo, T. R.; Moura, A. C. S.; Cola Miranda, M.; Souza Brito, A. R. M.; Vilegas, W. Constituents from *Indigofera truxillensis* leaves methanolic extract. XV Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, Perugia-Itália, 2006.
15. Cola-Miranda, M.; Barbastefano, V.; Ferreira, A. L.; Farias Silva, E.; Vinagre, A. M.; Calvo, T. R.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Actividad antiulcerogénica de las fracciones acetato de las especies *Indigofera truxillensis* Kunth y *Indigofera suffruticosa* Mill. XV Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, Perugia-Itália, 2006.
16. Farias Silva, E.; Cola-Miranda, M.; Barbastefano, V.; Ferreira, A. L.; Michelatto, D. P.; Almeida, A. C. A.; Calvo, T. R.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Efectos antioxidantes y antiapoptotico del alcaloide principal obtenido de *Indigofera truxillensis* Kunth en ratones. XV Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, Perugia-Itália, 2006.
17. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Colombo, L. L.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. *In vitro* cytotoxic activity of *Alchornea triplinervia* methanolic extract on murine mammary and lung adenocarcinoma cell lines. XV Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, Perugia-Itália, 2006.
18. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. *Alchornea triplinervia* ethyl acetate fraction inhibits nitric oxide production. XV Congreso Italo-Latino Americano di Etnomedicina, Perugia-Itália, 2006.
19. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Efeito gastroprotetor seletivo do extrato metanólico das folhas de *Alchornea triplinervia*. 21º Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia-SP, 2006.
20. Benzatti, F. P.; Carli, C. B. A.; Rocha, L. R. M.; Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Placeres, M. C. P.; Carlos, I. Z. Efeito do extrato diclorometânico da planta *Indigofera suffruticosa* no sistema imune murino. 53º Jornada Farmacêutica da FCF da Unesp, Araraquara-SP, 2006.
21. Mascia-Lopes, F. C.; Benzatti, F. P.; Carli, C. B. A.; Rocha, L. R. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Placeres, M. C. P.; Carlos, I. Z. Ação do extrato diclorometânico de *Indigofera truxillensis* sobre macrófagos murinos. 53º Jornada Farmacêutica da FCF da Unesp, Araraquara-SP, 2006.
22. Moura, A. C. S.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Alcalóides de *Indigofera suffruticosa*. 36º Semana da Química do Instituto de Química da Unesp, Araraquara-SP, 2006.

23. Carlos, I. Z.; Benzatti, F. P.; Lopes, F. C. M.; Carli, C. B. A.; Rocha, L. R. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W. Immunological activity of the methanolic extract of *Indigofera suffruticosa* in peritoneal macrophage culture. XXXI Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Búzios-RJ, 2006.
24. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Indigotin alkaloid obtained from *Indigofera suffruticosa* Miller induces no and TNF- α production by murine macrophages. XXXI Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Búzios-RJ, 2006.
25. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Inhibition of LPS-induced NO production by *Alchornea triplinervia*. XXXI Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Búzios-RJ, 2006.
26. Lima, Z. P.; Hiruma Lima, C. A.; Calvo, T. R.; Vilegas, W. Investigação do mecanismo de ação envolvido na atividade antiúlcera de *Alchornea glandulosa*. XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia-SP, 2005.
27. Calvo, T. R.; Rodrigues, C. M.; Severi, J.; Tamashiro, J.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Recife-PE, 2005.
28. Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Calvo, T. R.; Tamashiro, J.; Brito, A. R. M. S.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de espécies de *Miconia* (Melastomataceae). V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Recife-PE, 2005.
29. Nasser, A. L. M.; Gallegos, R. S.; Calvo, T. R.; Hiruma Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Triterpenos pentacíclicos isolados das cascas de *Qualea parviflora* (Vochysiaceae). V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Recife-PE, 2005.
30. Severi, J.; Calvo, T. R.; Salgado, H. R. N.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Evaluation of the gastrointestinal activity of *Indigofera suffruticosa*. 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP, 2005.
31. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Inhibition of nitric oxide production by *Alchornea triplinervia* methanolic extract. 5th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto-SP, 2005.
32. Moraes, H. P.; Santos, F. V.; Calvo, T. R.; Leite, C. Q. F.; Vilegas, W.; Varanda, E. A.; Bauab, T. M. Avaliação da atividade antibacteriana e da mutagenicidade de extratos vegetais obtidos de duas espécies do gênero *Alchornea*. VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas, 2005.
33. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Carlos, I. Z.; Mendonca Junior, C.; Vilegas, W.; Colombo, L. L. Efeito do extrato metanólico obtido da planta *Alchornea triplinervia* sobre linhagem tumoral indiferenciada de adenocarcinoma de mama (LM2). VII Jornada Paulista de Plantas Mediciniais, Campinas-SP, 2005.
34. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Benzatti, F. P.; Jordão Junior, C. M.; Colombo, L. L.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. *In vitro* cytotoxic activity of *Alchornea triplinervia* ethyl acetate fraction on murine mammary and lung adenocarcinoma cell lines. 2º Congresso de Imunologia: Tumores, Botucatu-SP, 2005.
35. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Jordão Junior, C. M.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. *Alchornea glandulosa* methanolic extract inhibition H₂O₂ and TNF- α production. XXX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, São Pedro-SP, 2005.
36. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Benzatti, F. P.; Jordão Junior, C. M.; Colombo, L. L.; Vilegas, W.; CALVO, T. R. Ação da planta *Alchornea triplinervia* sobre linhagens tumorais murinas. 52º Jornada Farmacêutica da Unesp, Araraquara-SP, 2005.

37. Farias Silva, E.; Cola Miranda, M.; Calvo, T. R.; Pimentel, F. O.; Ferreira, A. L.; Barbastefano, V.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Mecanismos antioxidantes envolvidos na atividade antiulcerogênica de frações acetato e aquosa de *Indigofera truxillensis*, em modelos de lesões gástricas induzidas por etanol absoluto ou isquemia e reperusão. 20º Reunião Anual da Sociedade de Biologia Experimental, Águas de Lindóia-SP, 2005.
38. Farias Silva, E.; Cola-Miranda, M.; Calvo, T. R.; Pimentel, F. O.; Ferreira, A. L.; Barbastefano, V.; Hiruma-Lima, C. A.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Antioxidant enzymes activity of aqueous and ethyl acetate fractions obtained from *Indigofera truxillensis* against ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. Congress Phytotherapy, Funchal-Portugal, 2005.
39. Cola Miranda, M.; Calvo, T. R.; Barbastefano, V.; Ferreira, A. L.; Farias Silva, E.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Organic fraction obtained from *Indigofera truxillensis* Kunth: antiulcerogenic effects and its mechanisms. Congress Phytotherapy, Funchal-Portugal, 2005.
40. Lima, Z. P.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. *Alchornea triplinervia*: antiulcerogenic activity of methanolic extract and preliminary study of its fraction. Congress Phytotherapy, Funchal-Portugal, 2005.
41. Cola-Miranda, M.; Calvo, T. R.; Barbastefano, V.; Ferreira, A. L.; Farias Silva, E.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Atividade antiulcerogênica e mecanismo de ação da fração aquosa de *Indigofera truxillensis* Kunth. 20º Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia-SP, 2005.
42. Calvo, T. R.; Rinaldo, D.; Hiruma Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Tamashiro, J.; Vilegas, W. Esteróides e terpenos de *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). XV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Ubatuba-SP, 2004.
43. Rinaldo, D.; Rodrigues, C. M.; Calvo, T. R.; Sannomiya, M.; Santos, L. C.; Hiruma Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Tamashiro, J.; Vilegas, W. Avaliação do perfil cromatográfico de espécies do gênero *Davilla* por HPLC. XV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo, Ubatuba-SP, 2004.
44. Calvo, T. R.; Sannomiya, M.; Santos, L. C.; Cola, M.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Flavonoids from *Indigofera truxillensis* (Fabaceae) leave extract. XIII Congresso Italo-Latino Americano Di Etnomedicina, Salerno-Italia, 2004.
45. Cola Miranda, M.; Barbastefano, V.; Ferreira, A. L.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W.; Calvo, T. R.; Brito, A. R. M. S. Actividad antiulcerogénica y analgésica de las fracciones acuosa y acetato de la *I. truxillensis* Kunth. XIII Congresso Italo-Latino Americano Di Etnomedicina, Salerno-Italia, 2004.
46. Hiruma Lima, C. A.; Lima, Z. P.; Ballesteros, K. V. R.; Silva, J. S.; Rocha, L. R. M.; Brito, A. R. M. S.; Calvo, T. R.; Vilegas, W. *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae): a Brazilian Cerrado medicinal plant source of antiulcer compounds. XIII Congresso Italo-Latino Americano Di Etnomedicina, Salerno-Italia, 2004.
47. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Inhibition of LPS-induced NO production by *Alchornea glandulosa*. XIII Congresso Italo-Latino Americano Di Etnomedicina, Salerno-Italia, 2004.
48. Lopes, F. C. M.; Benzatti, F. P.; Carli, C. B. A.; Marques, M. F.; Rinaldo, D.; Calvo, T. R.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Action *Davilla elliptica* methanolic extract in the cellular immune response. XIII Congresso Italo-Latino Americano Di Etnomedicina, Salerno-Italia, 2004.
49. Calvo, T. R.; Tolledo Neto, P.; Santos, L. C.; Hiruma Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Tamashiro, J.; Vilegas, W. Constituintes químicos das folhas de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador-BA, 2004.
50. Rinaldo, D.; Calvo, T. R.; Hiruma Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Tamashiro, J.; Santos, L. C.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. Estudo químico do extrato EtOH das folhas de *Davilla elliptica* ST. Hill. XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Salvador-BA, 2004.

51. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Avaliação da atividade imunológica *in vitro* da planta *Alchornea glandulosa* Poepp. 51º Jornada Farmacêutica da Unesp, Araraquara-SP, 2004.
52. Lopes, F. C. M.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Carlos, I. Z. Action of *Alchornea glandulosa* in the immune system: role of nitric oxide. XXIX Meeting of the Brazilian Society of Immunology, Ouro Preto-MG, 2004.
53. Lima, Z. P.; Ballesteros, K. V. R.; Silva, J. S.; Hiruma Lima, C. A.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. Efeitos antiulcerogênicos dos extratos clorofórmico e metanólico de *Alchornea glandulosa*. XXXVI Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia-SP, 2004.
54. Santos, F. V.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Varanda, E. A. Mutagenicidade de plantas medicinais do gênero *Alchornea* (Euphorbiaceae). 50º Congresso Brasileiro de Genética, 2004.
55. Calvo, T. R.; Coelho, R. G.; Tolledo Neto, P.; Hiruma Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Triagem química e avaliação da atividade antioxidante das folhas de *Alchornea glandulosa* e *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). XXV Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, Campos do Jordão, 2003.
56. Batista, L. M.; Almeida, A. B. A.; Magri, L. P.; Calvo, T. R.; Coelho, R.; Vilegas, W.; Brito, A. R. M. S. Avaliação do mecanismo de ação de frações obtidas de *Syngonanthus bisulcatus* Rul. e *Syngonanthus artrotrichus* Silveira. XII Congresso Italo-LatinoAmericano de Etnomedicina, Rio de Janeiro, 2003.
57. Cola Miranda, M.; Barbastefano, V.; Kushima, H.; Hiruma Lima, C. A.; Calvo, T. R.; Vilegas, W.; Souza Brito, A. R. M. *Davilla elliptica*: atividade antiulcerogênica. XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2003.
58. Calvo, T. R.; Santos, L. C.; Hiruma Lima, C. A.; Vilegas, W. Investigação da atividade antioxidante de *Davilla elliptica* (Dilaneaceae). VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais, 2003.
59. Calvo, T. R.; Pereira, L. G. S.; Coletto Junior, U.; Carnauba, F. E. S.; Prado, D.; Furlan, E.; Oliveira, J. K. Estratégias à resistência do ensino de química no ensino médio. XXXII Semana da Química da Unesp, Araraquara-SP, 2002.
60. Calvo, T. R.; Pandochi, L.; Batista, L. M.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Flavonóides de *Syngonanthus macrolepis* (Eriocaulaceae). V Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, Botucatu, 2002.
61. Calvo, T. R.; Coelho, R. G.; Gracioso, J.; Brito, A. R. M. S.; Hiruma-Lima, C. A.; Vilegas, W. Metodologia para purificação dos flavonóides de *Turnera ulmifolia* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá-MT, 2002.
62. Calvo, T. R.; Gracioso, J.; Nasser, A. L. M.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W.; Andrade, F. D. P. Obtenção rápida dos flavonóides da infusão de *Turnera ulmifolia* por cromatografia em contracorrente de alta velocidade. 25º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas-MG, 2002.
63. Calvo, T. R.; Hiruma Lima, C. A.; Brito, A. R. M. S.; Vilegas, W. Triagem química em *Davilla elliptica*. V Workshop de Plantas Medicinais de Botucatu, Botucatu-SP, 2002.
64. Calvo, T. R.; Vilegas, W. Esteróides de *Turnera ulmifolia*. XIII Encontro Regional de Química da Sociedade Brasileira de Química, Araraquara-SP, 2001.
65. Calvo, T. R.; Zaghete, M. A.; Gimenes, R.; Paiva Santos, C. O.; Varela, J. A. Síntese e caracterização de compósitos β -PVDF/PZT, β -PVDF/BT, β -PVDF/HA. XII Congresso de Iniciação Científica da Unesp, São José do Rio Preto-SP, 2000.

*Dedico este trabalho à Toninha,
por ser “A Minha Mãe”*

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha mãe Toninha, meu irmão Thiago, minha avó Cida, meu pai Toni, meu padrasto Mário e demais familiares que diariamente contribuem para eu ser uma pessoa melhor.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Wagner Vilegas que me proporcionou grandes oportunidades de aprendizado, me mostrando sempre as opções e me apoiando nas minhas decisões. Que durante a iniciação científica despertou em mim o interesse pelo estudo das plantas. Meu padrinho de formatura, sempre presente nos momentos importantes de minha vida, me incentivando na realização do meu primeiro estágio no exterior. Que, em seguida, durante o mestrado me incentivou à passagem direta para o doutorado me convencendo que tinha capacidade para fazer muito mais. Já no doutorado, com suas atitudes e paciência, se tornou meu exemplo de docente e pesquisador. Serei sempre grata por seus ensinamentos em relação à pesquisa e, principalmente, às questões da vida e também por sua compreensão e apoio nos momentos difíceis. Meu muito obrigada por fazer parte de minha vida, contribuindo nestes nove anos de convívio para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

À estimada Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, por suas inteligentes colocações e dicas referentes à pesquisa e à vida. Obrigada por seu exemplo de dedicação, por estar presente não somente nos momentos alegres, mas também nas dificuldades. Por ter sempre uma palavra de incentivo e ser uma “mãezona”.

Aos Professores, membros da comissão examinadora, pelas valiosas sugestões.

“Al Prof. Dr. Arturo San Feliciano, por haberme dado la oportunidad de trabajar y aprender bajo su dirección. A los Profesores Dr. José María Miguel del Corral y Dra. María Angeles Castro, por su dedicación, interés y ayuda mostrados en todo momento durante mi estancia en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca. Al Pablo por ayudarme con los experimentos de RMN y a mis compañeros de investigación Simone, Ydia, Ronan, María, Patricia, Marta, Miguel y Victoria por su atención y amistad. Al Consta, Rosa, todos profesores y alumnos del Departamento, por su colaboración desinteresada y por haber hecho muy agradables los meses de trabajo.”

“Al Prof. Dr. Julián Carlos Rivas Gonzalo y José Joaquín Pérez Alonso (Universidad de Salamanca) por la realización de los análisis de HPLC-ESI-IT-MS.”

Ao Prof. Dr. Cosimo Pizza, Dra. Sonia Piacente e Dra. Virginia Carbone, da Università degli Studi di Salerno - Itália, pelos experimentos de FIA-ESI-IT-MS.

Aos Professores integrantes do Projeto Temático Biota-Fapesp e seus orientados pela realização dos ensaios farmacológicos. Em especial aos alunos Cássia, Flávia, Zeila, Djamilé, Maíra e Elis pela amizade.

Aos professores do Departamento de Química Orgânica (IQ-UNESP) pela oportunidade e aprendizado. Principalmente ao Prof. Dr. Ian Castro Gamboa, por compartilhar comigo a maravilhosa experiência de lecionar, me dando valiosas dicas nas aulas experimentais. Ao Prof. Dr. Alberto Cavalheiro por seus ensinamentos e exemplos durante o estágio docência.

Ao Dr. Nivaldo Boralle e ao Dr. Alberto Alcício pela obtenção dos espectros de RMN e MS e por nossa amizade.

À todos os funcionários, graduandos e pós-graduandos do Departamento de Química Orgânica que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação Sandra R. Pavanelli, Célia M. C. V. Coelho e Patrícia F. Ribeiro pela colaboração de sempre.

Às funcionárias da Biblioteca do IQ e à Rose e Marli (Posto Fapesp) que não pouparam esforços para auxiliar e facilitar a realização deste trabalho.

À todos os colegas que passaram pelo laboratório nestes anos, obrigada pelo convívio, troca de experiências e momentos de descontração, em especial à Roberta G. Coelho, Fábio P. Andrade, Ana Lucia M. Nasser, Juliana A. Severi, Ana Elisa Wanczinski, Marcelo Silva, Miriam Sanommya, Marcio Andreo, Clenilson Rodrigues, Daniel Rinaldo, Juliana Rodrigues, Danielle Baldo, Ana Carolina Benfatti, Carolina Gomes, Viviane Cândida, Cristiane Serra, Pedro Toledo Neto, Kamilla Lorenzi, Flavia, Júlia, Roberto Gallegos Olea e Luiz F. Rolim.

À Adriana C. da Silva Moura, minha parceira nos estudos fitoquímicos, meu agradecimento pela colaboração, dedicação e amizade.

À minhas amigas de república, que no dia-a-dia me ensinaram lições valiosas da vida, aquelas que não se aprendem com um doutorado: Tatiana M. Souza, Juliana A. Severi, Margareth Batistote, Mariana C. Cafêu e Karin Bandeira.

À amiga de sempre Patrícia E. Fiscarelli.

À Cássia R. Gomes da Silva, pelo convívio e paciência enquanto eu redigia a tese.

Às pessoas que me acolheram em Salamanca e tornaram aquele período ainda mais especial: David, Seven, Alberto, Lida, Klébia, Rose, Ângela, Nallely, Federica, Claudia e Manuel.

Aos funcionários e amigos do Instituto de Química de Araraquara pela convivência e amizade.

À todos do programa BIOTA-FAPESP.

À FAPESP pela bolsa de Doutorado concedida.

À Capes pela bolsa de estágio no exterior concedida.

*O destino não é uma questão de chance,
é uma questão de escolha.
Não é algo para ser esperado,
é algo para ser alcançado.
(Willian Jennings)*

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas a composição química e atividades farmacológicas de folhas de *Alchornea glandulosa* e *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) e partes aéreas de *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae), usadas na medicina popular brasileira no tratamento de problemas gástricos. Nos extratos clorofórmicos das espécies de *Alchornea* foram identificados estigmasterol, campesterol, sitosterol, lupeol, friedelan-3-ol, friedelan-3-ona e pteroginidina. O estudo dos extratos metanólicos das espécies de *Alchornea* forneceu ácido gálico, galato de metila, ácido carboxílico da brevifolina, amentoflavona, isocorilagina, miricetina 3-*O*- α -L-raminopiranosídeo, quercetina e quatro derivados glicosilados. Análise por FIA-ESI-IT-MS indicou a presença de derivados do ácido galoilquínico, elagitaninos e proantodicianidinas em *A. triplinervia*. Nos extratos clorofórmicos das espécies de *Indigofera* foram identificados índigo (indigotina) e indirubina. O extrato metanólico de *I. truxillensis* forneceu índigo, indirubina, indicana, pinitol, sitosterol 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e cinco derivados glicosilados do kaempferol, entre eles a substância inédita kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo. O extrato metanólico de *I. suffruticosa* forneceu as mesmas substâncias descritas para *I. truxillensis*, exceto derivados do kaempferol, além do ácido gálico, alantoína e quatro derivados glicosilados da quercetina. Deste extrato também foram isoladas as substâncias inéditas 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisindirubina, indigotina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, dioxindol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo. O uso de FIA-ESI-IT-MS possibilitou a identificação de glicerolipídeos, enquanto o emprego de HPLC-ESI-IT-MS permitiu estabelecer o perfil químico destas espécies. As espécies de *Alchornea* apresentaram atividades antiulcerogênica e antiinflamatória, enquanto as espécies de *Indigofera* demonstraram propriedades antiulcerogênica, antiinflamatória, antioxidante e anti-*Mycobacterium tuberculosis*, confirmando as indicações de uso popular. Foram sintetizados indirubina, hidrazonas e outros derivados da isatina, os quais demonstraram citotoxicidade, mutagenicidade e indícios de atividade antiinflamatória.

Palavras-chave: *Alchornea glandulosa*, *A. triplinervia*, *Indigofera truxillensis*, *I. suffruticosa*, flavonóis glicosilados, alcalóides bis-indólicos e bioatividade.

ABSTRACT

In this work we studied the chemical composition and pharmacological activities of the leaves of *Alchornea glandulosa* and *A. triplinervia* (Euphorbiaceae), as well as aerial parts of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* (Fabaceae), used in Brazilian folk medicine against gastric problems. In the chloroform extracts of the *Alchornea* species we identified stigmasterol, campesterol, sitosterol, lupeol, friedelan-3-ol, friedelan-3-one and pterogynidine. The study of the methanolic extracts of the *Alchornea* species afforded gallic acid, methyl gallate, brevifolin carboxylic acid, amentoflavone, isocorilagin, miricetin 3-*O*- α -L-rhamnopyranoside, quercetin and four glycosilated derivatives. Analyses by FIA-ESI-IT-MS helped to detect the presence of galloylquinic acid derivatives, ellagitannins and proanthocyanidins in *A. triplinervia*. The chloroform extract of both *Indigofera* species led to the identification of indigo (indigotin) and indirubin. The methanolic extract of *I. truxillensis* gave indigo, indirubin, indican, pinitol, sitosterol-3-*O*- β -D-glucopyranoside and five glycosilated kaempferol derivatives, among them the new substance kaempferol 3-*O*-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside]-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside. The methanolic extract of *I. suffruticosa* contained the same substances described for *I. truxillensis*, except for kaempferol derivatives, besides gallic acid, allantoin and four quercetin derivatives, besides the new substances 6'-methoxy-2,5,6-trihydroxiindirubin, indigotin-3-*O*- β -D-glucopyranoside, dioxindol-3-*O*- β -D-glucopyranoside and quercetin-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranoside. The use of FIA-ESI-IT-MS led the identification of glicerolipids, whereas the use of HPLC-ESI-IT-MS allowed to establish the chemical fingerprint of these species. The *Alchornea* species presented antiulcerogenic and antiinflammatory activities, while the *Indigofera* species demonstrated antiulcerogenic, antiinflammatory, antioxidant and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activities, which might support their folk uses. We synthesized indirubin, hydrazones and isatin derivatives, which displayed citotoxicity, mutagenicity and signs of the antiinflammatory activity.

Keywords: *Alchornea glandulosa*, *A. triplinervia*, *Indigofera truxillensis*, *I. suffruticosa*, glycosilated flavonols, bis-indolic alkaloids, bioactivity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
DNA	Ácido desoxiribonucleíco
TFA	Ácido trifluoroacético
Ag	<i>Alchornea glandulosa</i>
At	<i>Alchornea triplinervia</i>
AINE	Antiinflamatório não esteroideal
Api	Apiose
Ara	Arabinose
BAW	<i>n</i> -Butanol/ácido acético/água
COX-1	Ciclooxigenase tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
λ_{\max}	Comprimento de onda máximo
CIM	Concentração inibitória mínima
<i>J</i>	Constante de acoplamento
CPG	Cromatografia de permeação em gel
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
δ	Deslocamento químico
NP/PEG	Difenilaminoborato/polietilenoglicol
DMSO	Dimetilsulfóxido
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ESI-MS	<i>Electrospray ionization - Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas com ionização por electrospray)
ECHCl ₃	Extrato clorofórmico
EMeOH	Extrato metanólico
FM	Fase móvel
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
Rf	Fator de retenção
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow injection analysis - Electrospray ionization - Ion trap - Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas acoplada a um <i>ion-trap</i> com interface de ionização por electrospray e inserção direta da amostra)
PMA	Forbol miristato/acetato
GC-FID	<i>Gas chromatography - Flame ionization detector</i> (Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama)
GC-MS	<i>Gas chromatography - Mass spectrometry</i> (Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas)
Gli	Glicose
gCOSY	<i>Gradient correlated spectroscopy</i>

gHMBC	<i>Gradient heteronuclear multiple bond correlation</i>
gHMQC	<i>Gradient heteronuclear through multiple quantum coherence</i>
Hz	Hertz
Hex	<i>n</i> -Hexano
HPLC-ESI-IT-MS	<i>High performance liquid chromatography coupled with ion trap-mass spectrometry electrospray interface</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um <i>ion-trap</i> com interface de ionização por electrospray)
HPLC-UV-PAD	High performance liquid chromatography - Ultraviolet - Photodiode array detector (Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjo de fotodiodos)
HSCCC	High speed counter current chromatography (Cromatografia de contra corrente de alta velocidade)
IR	Índice de refração
IM	Índice mutagênico
Is	<i>Indigofera suffruticosa</i>
It	<i>Indigofera truxillensis</i>
IV	Infravermelho
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	Mass spectrometry (Espectrometria de massas)
MPLC	<i>Medium pressure liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de média pressão)
MeOH	Metanol
m	Multiplete
4-NFD	4-Nitrofenilenodiamina
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PTFE	Politetrafluoroetileno (teflon)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
<i>n</i> -PrOH	<i>n</i> -Propanol
PGE ₂	Prostaglandina E2
Ra	Raminose
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
Rend	Rendimento
RMN	Ressonância magnética nuclear
Si gel	Sílica gel
s	Singleto
t _R	Tempo de retenção
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
t	Triplete
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível
Xil	Xilose

LISTA DE FIGURAS

Estruturas dos compostos isolados das espécies de <i>Alchornea</i>	31
Estruturas dos compostos isolados das espécies de <i>Indigofera</i>	33
Figura 1.1. Fotografia <i>Alchornea glandulosa</i>	41
Figura 1.2. Fotografia <i>Alchornea triplinervia</i>	41
Figura 1.3. Fluxograma da obtenção dos extratos das espécies de <i>Alchornea</i>	42
Figura 1.4. Análise fitoquímica do ECHCl₃ de <i>A. glandulosa</i>	42
Figura 1.5. Estruturas de Ag1-Ag3	43
Figura 1.6. Estrutura de Ag4	44
Figura 1.7. Análise fitoquímica do EMeOH de <i>A. glandulosa</i>	44
Figura 1.8. Estruturas de Ag5-Ag6	45
Figura 1.9. Estrutura de Ag7	46
Figura 1.10. Estrutura de Ag10	48
Figura 1.11. Análise do EMeOH de <i>A. glandulosa</i> por HPLC-UV-PAD.....	49
Figura 1.12. Espectros no UV das substâncias do EMeOH de <i>A. glandulosa</i>	49
Figura 1.13. Estruturas de Ag8-9 e Ag11-12	50
Figura 1.14. Análise fitoquímica do ECHCl₃ de <i>A. triplinervia</i>	50
Figura 1.15. Estruturas de At4-At6	51
Figura 1.16. Análise dos EMeOH de <i>A. glandulosa</i> , <i>A. triplinervia</i> e <i>A. castaneifolia</i> por HPLC-UV-PAD.....	52
Figura 1.17. Análise semi-preparativa do EMeOH de <i>A. triplinervia</i> por HPLC-UV-PAD.....	53
Figura 1.18. Estruturas de At10-At14	54
Figura 1.19. Estrutura de At16	57
Figura 2.1. Fotografia <i>Indigofera suffruticosa</i>	63
Figura 2.2. Fotografia <i>Indigofera truxillensis</i>	63
Figura 2.3. Biossíntese dos pigmentos indigóides (alcalóides bis-indólicos) em plantas.....	65
Figura 2.4. Fluxograma da obtenção dos extratos das espécies de <i>Indigofera</i>	66
Figura 2.5. Análise fitoquímica do ECHCl₃ de <i>I. truxillensis</i>	67
Figura 2.6. CCDC de It1 e It2	67
Figura 2.7. Espectro no UV de It1	68
Figura 2.8. Estrutura de It1	68
Figura 2.9. Espectro no UV de It2	69
Figura 2.10. Estrutura de It2	70
Figura 2.11. Análise fitoquímica do EMeOH de <i>I. truxillensis</i>	71
Figura 2.12. Estrutura de It3	72
Figura 2.13. Estrutura de It4	73
Figura 2.14. Estruturas de It5-It9	76
Figura 2.15. Estrutura de It10	79
Figura 2.16. Análise fitoquímica do EMeOH de <i>I. suffruticosa</i>	81
Figura 2.17. Fotografia do fracionamento por CPG do EMeOH de <i>I. suffruticosa</i>	82
Figura 2.18. Espectro no UV de Is3	84
Figura 2.19. Estrutura de Is3	84

Figura 2.20. Estrutura de Is5	86
Figura 2.21. Estrutura de Is6	87
Figura 2.22. Espectro no UV de Is8	88
Figura 2.23. Estrutura de Is8	89
Figura 2.24. Estruturas de Is9-Is13	93
Figura 3.1. Análise por FIA-ESI-IT-MS (<i>full scan</i>) do EMeOH de <i>A. triplinervia</i> (At).....	98
Figura 3.2. Análise por FIA-ESI-IT-MS (segunda ordem) de <i>m/z</i> 633 do EMeOH de At	99
Figura 3.3. Análise por FIA-ESI-IT-MS (segunda ordem) de <i>m/z</i> 951 do EMeOH de At	99
Figura 3.4. Análise por FIA-ESI-IT-MS (segunda ordem) de <i>m/z</i> 615 do EMeOH de At	100
Figura 3.5. Classes de metabólitos identificados no EMeOH de At por FIA-ESI-IT-MS.....	100
Figura 3.6. Análise por FIA-ESI-IT-MS (<i>full scan</i>) da fração inicial do EMeOH de <i>I.suffruticosa</i> (Is).....	102
Figura 3.7. Análise por FIA-ESI-IT-MS (segunda ordem) de <i>m/z</i> 721 da fração inicial do EMeOH de Is	102
Figura 3.8. Proposta estrutural exemplificando um glicerolípido de <i>m/z</i> 721 da fração inicial do EMeOH de Is	103
Figura 3.9. Análise por FIA-ESI-IT-MS (<i>full scan</i>) da fração inicial do EMeOH de <i>I. truxillensis</i> (It).....	104
Figura 3.10. Exemplos de glicerolídeos isolados de plantas.....	105
Figura 3.11. Análise por HPLC-UV-ESI-IT-MS do EMeOH de It	108
Figura 3.12. Cromatogramas extraídos dos íons de <i>m/z</i> 725, 593, 695, 563, 577 e 431 do EMeOH de It	109
Figura 3.13. Espectros de massas (MS, MS ² e MS ³) do pico 1 (<i>m/z</i> 725) do EMeOH de It	110
Figura 3.14. Espectros de massas (MS, MS ² e MS ³) do pico 3 (<i>m/z</i> 593) do EMeOH de It	110
Figura 3.15. Espectros de massas (MS, MS ² e MS ³) do pico 4 , It9 (<i>m/z</i> 695) do EMeOH de It	111
Figura 3.16. Espectros de massas (MS, MS ² e MS ³) do pico 5 , It8 (<i>m/z</i> 563) do EMeOH de It	111
Figura 3.17. Espectro de massas do pico 6 , It7 (<i>m/z</i> 577) do EMeOH de It	112
Figura 3.18. Espectro de massas do pico 7 , It5 e do pico 8 , It6 (<i>m/z</i> 431) do EMeOH de It	112
Figura 3.19. Análise por HPLC-UV-ESI-IT-MS do EMeOH (A), fr. alcalóides (B) e fr. flavonóides (C) de It	113
Figura 3.20. Análise por HPLC-UV-ESI-IT-MS do EMeOH de Is	116
Figura 3.21. Cromatogramas extraídos dos íons de <i>m/z</i> 325, 741, 595, 609, 463 e 261 do EMeOH de Is	117
Figura 3.22. Espectro de massas (MS) do pico 1 , Is3 (<i>m/z</i> 325) do EMeOH de Is	118
Figura 3.23. Espectro de massas (MS) do pico 7 , Is1 (<i>m/z</i> 261) do EMeOH de Is	118
Figura 3.24. Espectros de massas (MS e MS ²) do pico 2 , Is12 (<i>m/z</i> 741) do EMeOH de Is	118
Figura 3.25. Espectros de massas (MS e MS ²) do pico 3 , Is11 (<i>m/z</i> 595) do EMeOH de Is	119
Figura 3.26. Espectros de massas (MS e MS ²) do pico 5 , Is13 (<i>m/z</i> 609) do EMeOH de Is	119
Figura 3.27. Espectros de massas (MS e MS ²) do pico 6 , Is9 (<i>m/z</i> 463) do EMeOH de Is	120
Figura 3.28. Análise por HPLC-UV-ESI-IT-MS do EMeOH (A), fr. alcalóides (B) e fr. flavonóides (C) de Is	121
Figura 3.29. Espectro de massas do pico 2 , Is8 (<i>m/z</i> 425) da fração alcalóides de Is	122
Figura 4.1. Estruturas dos derivados sintéticos da isatina (T1-T9).....	127
Figura 4.2. Estrutura de T10	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Panorama químico-farmacológico de espécies de <i>Alchornea</i>	38
Tabela 1.2. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de Ag4	44
Tabela 1.3. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de Ag5 e Ag6	45
Tabela 1.4. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações do experimento gHMBC de Ag7	46
Tabela 1.5. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de Ag8 e Ag9	47
Tabela 1.6. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de Ag10	48
Tabela 1.7. Substâncias identificadas no EMeOH de Ag por HPLC-UV-PAD.....	50
Tabela 1.8. Substâncias identificadas no EMeOH de At por HPLC-UV-PAD.....	53
Tabela 1.9. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de At10-At12	55
Tabela 1.10. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações do experimento gHMBC de At16	57
Tabela 2.1. Panorama químico-farmacológico de espécies de <i>Indigofera</i>	58
Tabela 2.2. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações do experimento gHMBC de It2	70
Tabela 2.3. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações dos experimentos gCOSY e gHMBC de It3	72
Tabela 2.4. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações do experimento gCOSY de It4	73
Tabela 2.5. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H de It5, It6, It7, It8 e It9	77
Tabela 2.6. Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de It5, It6, It7, It8 e It9	78
Tabela 2.7. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de It10	79
Tabela 2.8. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações do experimento gHMBC de Is3	85
Tabela 2.9. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações dos experimentos gCOSY e gHMBC de Is5	86
Tabela 2.10. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H, ¹³ C e ¹⁵ N e correlações do experimento gHMBC de Is6	87
Tabela 2.11. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações do experimento gHMBC de Is8	89
Tabela 2.12. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H de Is9, Is10, Is11, Is12 e Is13	93
Tabela 2.13. Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de Is9, Is10, Is11, Is12 e Is13	95
Tabela 3.1. Substâncias detectadas por FIA-ESI-IT-MS no EMeOH de At	101
Tabela 3.2. Propostas estruturais para fragmentos de glicerolipídeos de Is determinados por FIA-ESI-IT-MS.....	103
Tabela 3.3. Propostas estruturais para fragmentos de glicerolipídeos de It determinados por FIA-ESI-IT-MS.....	104
Tabela 4.1. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlações dos experimentos gCOSY e gHMBC de T1	124
Tabela 4.2. Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de T10	129
Tabela 5.1. Resultados dos ensaios farmacológicos realizados com extratos das espécies de <i>Alchornea</i>	135
Tabela 5.2. Resultados dos ensaios farmacológicos realizados com extratos das espécies de <i>Indigofera</i>	138
Metabólitos secundários isolados e/ou identificados nas espécies de <i>Alchornea</i>	145
Metabólitos secundários isolados e/ou identificados nas espécies de <i>Indigofera</i>	146

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1.1. Espectro de RMN ^1H de Ag4	160
Espectro 1.2. Espectro de RMN ^{13}C de Ag4	160
Espectro 1.3. Espectro de RMN ^1H de Ag7	161
Espectro 1.4. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 4,34, de Ag7	162
Espectro 1.5. Espectro de RMN ^{13}C de Ag7	162
Espectro 1.6. Espectro de RMN ^1H de At16	163
Espectro 1.7. Espectro de RMN ^{13}C de At16	163
Espectro 2.1. Espectro de ESI-MS (modo positivo) de It1	164
Espectro 2.2. Espectro de RMN ^1H de It2	164
Espectro 2.3. Experimento gCOSY ^1H - ^1H de It2	165
Espectro 2.4. Experimento gHMQC de It2	166
Espectro 2.5. Experimento gHMBC de It2	167
Espectro 2.6. Espectro de RMN ^1H de It3	168
Espectro 2.7. Espectro de RMN ^{13}C de It3	168
Espectro 2.8. Espectro de RMN ^1H de It9	169
Espectro 2.9. Espectro de RMN ^{13}C de It9	169
Espectro 2.10. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,54, de It9	170
Espectro 2.11. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 1,11, de It9	170
Espectro 2.12. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,44, de It9	171
Espectro 2.13. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,13, de It9	171
Espectro 2.14. Experimento gHMQC de It9	172
Espectro 2.15. Experimento gHMBC de It9	172
Espectro 2.16. Experimento gCOSY ^1H - ^1H de It9	173
Espectro 2.17. Espectro de ESI-MS (modo negativo) de It9	173
Espectro 2.18. Espectro na região do IV de Is3	174
Espectro 2.19. Espectro de ESI-MS (modo negativo) de Is3	174
Espectro 2.20a. Espectro de RMN ^1H de Is3	175
Espectro 2.20b. Espectro de RMN ^1H de Is3 , após 15 dias.....	176
Espectro 2.20c. Espectro de RMN ^1H de Is3 , após 30 dias.....	176
Espectro 2.21. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 6,48, de Is3	177
Espectro 2.22. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 6,54, de Is3	177
Espectro 2.23. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 7,61, de Is3	178
Espectro 2.24. Experimento NOESY-1D, irradiação em δ 6,54, de Is3	178
Espectro 2.25. Experimento gCOSY ^1H - ^1H de Is3	179
Espectro 2.26. Experimento gHMQC de Is3	179
Espectro 2.27. Ampliações do experimento gHMQC de Is3	180
Espectro 2.28. Experimento gHMBC de Is3	181
Espectro 2.29. Espectro de RMN ^1H de Is5	182
Espectro 2.30. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 7,66, de Is5	182

Espectro 2.31. Experimento gHMQC de Is5	183
Espectro 2.32. Experimento gHMBC de Is5	184
Espectro 2.33. Espectro na região do IV de Is8	185
Espectro 2.34. Espectro de ESI-MS (modo negativo) de Is8	185
Espectro 2.35. Espectro de RMN ¹ H de Is8	186
Espectro 2.36. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 6,93, de Is8	187
Espectro 2.37. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 6,94, de Is8	187
Espectro 2.38. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 7,60, de Is8	188
Espectro 2.39. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 7,06, de Is8	188
Espectro 2.40. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 4,56, de Is8	189
Espectro 2.41. Experimento NOESY-1D, irradiação em δ 7,50, de s8	189
Espectro 2.42. Experimento gCOSY ¹ H- ¹ H de Is8	190
Espectro 2.43. Espectro de RMN ¹³ C de Is8	190
Espectro 2.44. Experimento gHMQC de Is8	191
Espectro 2.45. Ampliações do experimento gHMQC de Is8	192
Espectro 2.46. Experimento gHMBC de Is8	193
Espectro 2.47. Ampliações do experimento gHMBC de Is8	194
Espectro 2.48. Espectro de RMN ¹ H de Is1+Is12	195
Espectro 2.49. Experimento gCOSY ¹ H- ¹ H de Is11+Is12	196
Espectro 2.50. Espectro de RMN ¹³ C de Is11+Is12	197
Espectro 2.51. Experimento gHMQC de Is11+Is12	198
Espectro 2.52. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,59, de Is11	199
Espectro 2.53. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 4,57, de Is11	199
Espectro 2.54. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,46, de Is12	200
Espectro 2.55. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,32, de Is12	200
Espectro 2.56. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 4,35, de Is12	201
Espectro 2.57. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 0,95, de Is12	201
Espectro 2.58. Experimento gHMBC de Is11+Is12	202
Espectro 2.59. Ampliações do experimento gHMBC de Is11+Is12	203
Espectro 2.60. Ampliações do experimento gHMBC de Is11+Is12	204
Espectro 4.1. Espectro de RMN ¹ H de T1	205
Espectro 4.2. Espectro de RMN ¹³ C de T1	205
Espectro 4.3. Espectro de massas TOF-MS (modo positivo) de T1	206
Espectro 4.4. Espectro de RMN ¹ H de T2	206
Espectro 4.5. Espectro de RMN ¹ H de T3	207
Espectro 4.6. Espectro de RMN ¹ H de T4	207
Espectro 4.7. Espectro de RMN ¹ H de T5	208
Espectro 4.8. Espectro de RMN ¹ H de T6	208
Espectro 4.9. Espectro de RMN ¹ H de T7	209
Espectro 4.10. Espectro de RMN ¹ H de T8	209

Espectro 4.11. Espectro de RMN ¹ H de T9	210
Espectro 4.12. Espectro de massas TOF-MS (modo positivo) de T10	210
Espectro 4.13. Espectro de RMN ¹ H de T10	211
Espectro 4.14. Experimentos HOMODEC de T10	212
Espectro 4.15. Experimento gHMQC de T10	213
Espectro 4.16. Experimento gHMBC de T10	214
Espectro 4.17. Ampliações do experimento gHMBC de T10	215
Espectro 4.18. Experimento NOESY-1D, irradiação em δ 11,32, de T10	216

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	27
OBJETIVOS.....	30
MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	35
CAPÍTULO 1: <i>Alchornea</i> (EUPHORBIACEAE).....	38
EXPERIMENTAL/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES	
1.1. Coletas.....	41
1.2. Secagem, moagem e extração.....	42
1.3. Estudo fitoquímico de <i>Alchornea glandulosa</i> (Ag)	
1.3.1. Extrato clorofórmico (EChCl ₃).....	42
1.3.2. Extrato metanólico (EMeOH).....	44
1.4. Estudo fitoquímico de <i>Alchornea triplinervia</i> (At)	
1.4.1. Extrato clorofórmico (EChCl ₃).....	50
1.4.2. Extrato metanólico (EMeOH).....	51
CAPÍTULO 2: <i>Indigofera</i> (FABACEAE).....	58
EXPERIMENTAL/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES	
2.1. Coletas.....	66
2.2. Secagem, moagem e extração.....	66
2.3. Estudo fitoquímico de <i>Indigofera truxillensis</i> (It)	
2.3.1. Extrato clorofórmico (EChCl ₃).....	67
2.3.2. Extrato metanólico (EMeOH).....	70
2.4. Estudo fitoquímico de <i>Indigofera suffruticosa</i> (Is)	
2.4.1. Extrato clorofórmico (EChCl ₃).....	80
2.4.2. Extrato metanólico (EMeOH).....	80
CAPÍTULO 3: ANÁLISES POR HPLC-UV-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS.....	97
3.1. Perfil cromatográfico do EMeOH de <i>Alchornea triplinervia</i> por FIA-ESI-IT-MS.....	97
3.2. Perfil cromatográfico da fração inicial dos EMeOH de <i>I. suffruticosa</i> e <i>I. truxillensis</i> por FIA-ESI-IT-MS.....	101
3.3. Perfil cromatográfico do EMeOH e frações flavonóides/alcalóides de <i>I. truxillensis</i> utilizando HPLC-UV-ESI-IT-MS.....	106
3.4. Perfil cromatográfico do EMeOH e frações flavonóides/alcalóides de <i>I. suffruticosa</i> utilizando HPLC-UV-ESI-IT-MS.....	114
CAPÍTULO 4: SÍNTESE.....	123
EXPERIMENTAL/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES	
4.1. Hidrazonas de isatina e outros derivados.....	124
4.2. Síntese e acetilação da indirubina.....	127
CAPÍTULO 5: ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	130
EXPERIMENTAL/ RESULTADOS/ DISCUSSÕES	
5.1. <i>Alchornea</i>	133
5.2. <i>Indigofera</i>	135
5.3. Isatina e seus derivados sintéticos.....	139

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
CONCLUSÕES.....	147
REFERÊNCIAS.....	148
ESPECTROS.....	160

INTRODUÇÃO

Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável

O último informe do Programa para o Meio Ambiente das Nações Unidas (GEO4-ONU) destacou as ameaças graves referentes às variações climáticas, ao índice de extinção das espécies e alimentação de uma população em crescimento exponencial. A quantidade de recursos necessários para sustentar a população atual supera as disponibilidades do planeta, onde a demanda da humanidade sobre o meio ambiente é de 21,9 hectares por pessoa, enquanto a capacidade biológica média da terra é de tão somente 15,7 hectares/pessoa. As mudanças atuais na biodiversidade são mais rápidas que as observadas em toda história da humanidade (Organização das Nações Unidas, disponível em www.unep.org/geo/geo4).

Atualmente, a devastação de meio ambiente tem maior destaque devido ao impacto causado nas condições climáticas e ecológicas (extinção da fauna e flora). Baseado na falta de recursos e políticas eficientes para controlar a extinção progressiva de espécies vegetais nos diferentes biomas foram apontadas prioridades de conservação em função do endemismo e do avanço da degradação desses ecossistemas. Dentre as áreas designadas *hotspots* destacamos os biomas da Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado Brasileiro (Myers *et al.*, 2000; Brandon *et al.*, 2005).

O Cerrado Brasileiro

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira. Em termos de riqueza de espécies é superada apenas pela flora dos Biomas Amazônia e Mata Atlântica. Originalmente ocupava uma área de 2 milhões de km², abrangendo 10 Estados da região central do Brasil, hoje restam apenas 20% desse total. Típico de regiões tropicais, o cerrado apresenta duas estações definidas: inverno seco e verão chuvoso. Com solo de savana tropical, deficiente em nutrientes e rico em ferro e alumínio, abriga plantas de aparência seca, e o cerradão, um tipo mais denso de vegetação, de formação florestal. A presença de três das maiores bacias hidrográficas da América do Sul (Tocantins-Araguaia, São Francisco e Prata) na região favorece sua biodiversidade. Ainda que incompletamente conhecida a flora do Cerrado é riquíssima, constituída por cerca de 3.000 espécies, sendo 1.000 delas arbóreo-arbustivas e 2.000 herbáceo-subarbustivas. Como famílias de maior expressão têm destaque a Leguminosae (Mimosaceae, Fabaceae e Caesalpiniaceae) entre as lenhosas, e as Gramíneas (Poaceae) e Compostas (Asteraceae) entre as herbáceas. Nos últimos 30 anos, a pecuária extensiva, as monoculturas e a abertura de estradas destruíram boa parte do cerrado, sendo o ecossistema brasileiro que mais sofreu alteração com a ocupação

humana. Hoje, menos de 2 % está protegido em parques ou reservas (Cerrado brasileiro, disponível em www.portalbrasil.eti.br/cerrado.htm).

Desenvolvimento de novos fármacos e produtos naturais

Produtos naturais possuem um papel altamente significativo no desenvolvimento de novos fármacos. Isto é particularmente evidente no caso de doenças infecciosas e câncer, em que 70 e 60 % destas drogas, respectivamente, são de origem natural (Newman *et al.*, 2003). No geral, foi estimado que mais de um terço dos fármacos atualmente comercializadas estão relacionadas a produtos naturais. Os princípios ativos provêm de uma ampla variedade de fontes naturais: vegetais, produtos marinhos ou microrganismos (Van Elswijk & Irth, 2003).

Mesmo assim, é considerada baixa a produtividade em relação à identificação de produtos naturais efetivamente úteis como ferramentas de pesquisas biológicas ou como candidatos a protótipos de fármacos e outras substâncias de interesse, sugerindo que a integração entre a Biologia e a Química não tem sido feita de forma eficiente na pesquisa em produtos naturais no Brasil (Pupo *et al.*, 2007).

A investigação etnofarmacológica no Brasil apresenta um grande desafio. A flora brasileira, rica e diversificada, está sendo destruída progressivamente. A medicina popular, uma mistura dos conhecimentos africano, europeu e indígena, baseada em plantas medicinais tropicais, é modificada através da cultura moderna (Souza-Brito & Souza-Brito, 1996).

As informações técnicas ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais, de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança de uso das mesmas. As plantas medicinais da flora nativa brasileira são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes, sendo usadas inclusive para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas (Veiga Junior & Pinto, 2005).

Estas informações são preocupantes, visto que aproximadamente 82% da população brasileira utiliza produtos à base de ervas. Por outro lado, o setor fitoterápico movimenta anualmente R\$ 1 bilhão e emprega mais de 100 mil pessoas no Brasil (Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos, disponível em www.abifito.com.br).

A Secretaria de Vigilância Sanitária (Resolução RDC nº 48/2004) definiu como requisitos para o registro de um medicamento fitoterápico o conhecimento da composição química e da atividade farmacológica da planta, controle de qualidade e preparo de formulações fitoterápicas (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, disponível em e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php). O Decreto nº 5.813/2006, assinado pelo governo, estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, visando garantir

o acesso seguro e o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, o manejo sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da indústria nacional (Brasil: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, disponível em <http://www.fiocruz.br/far/media/Decreto%205813.pdf>). Neste sentido, é de fundamental importância o estudo de nossas plantas.

Por isso, nos propomos a dar continuidade ao estudo integrado químico-farmacológico avaliando espécies que possuem informações etnofarmacológicas, como é o caso da região do Cerrado, onde muitas plantas são usadas popularmente no tratamento de diversas doenças sem qualquer comprovação de sua eficácia ou existência de efeitos colaterais. Este é o enfoque do Projeto Temático (Biota-Fapesp) “Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica em Plantas Superiores”, do qual o presente trabalho faz parte.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

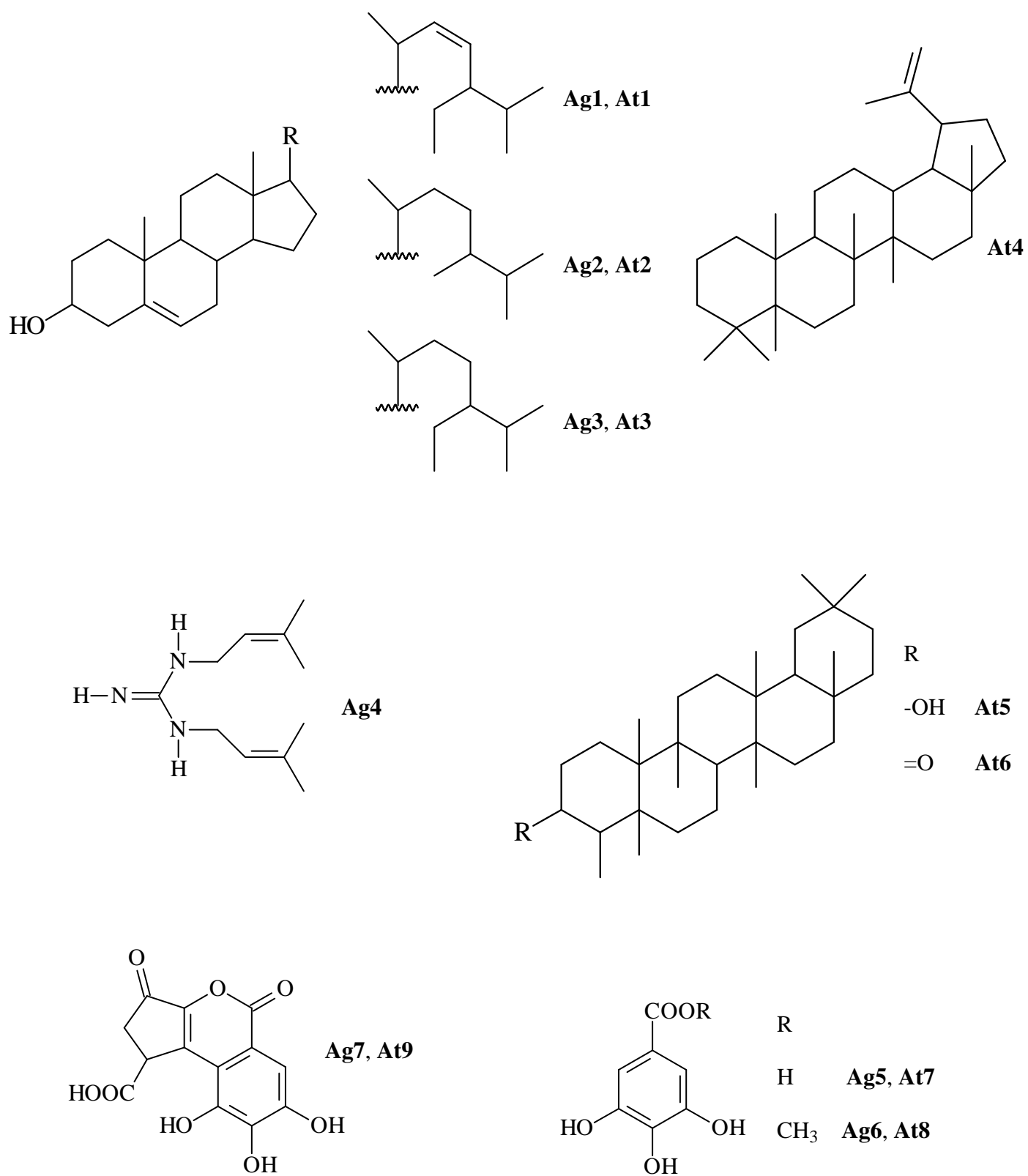
Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a composição química e atividade farmacológica, avaliando a biodiversidade de espécies vegetais pertencentes ao bioma Cerrado.

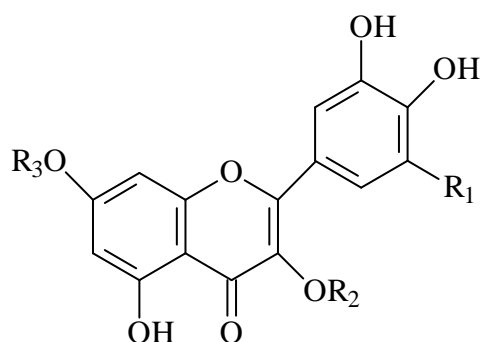
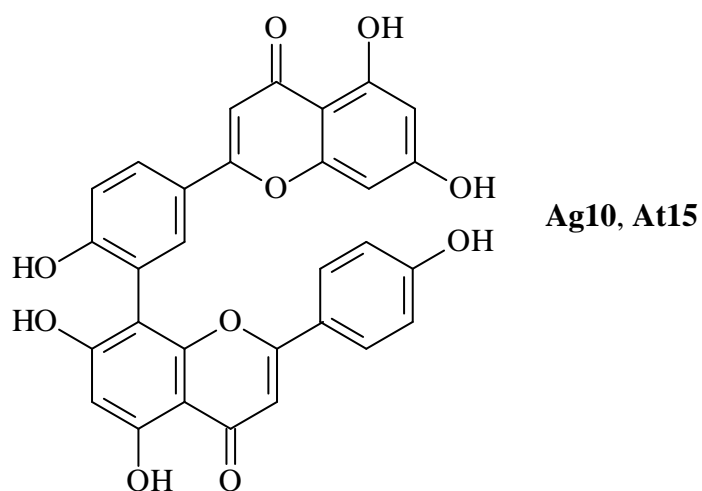
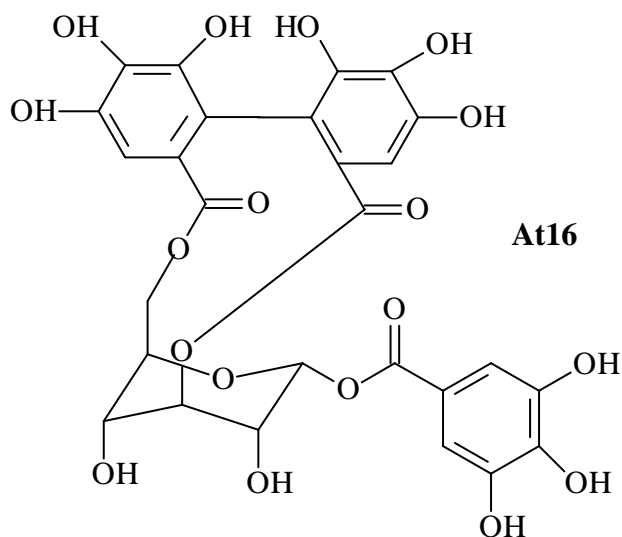
Objetivo Específico:

Estudar a composição química das folhas de *Alchornea glandulosa* e *A. triplinervia* (Euphorbiaceae) e das partes aéreas (galhos, folhas e frutos) de *Indigofera truxillensis* e *I. suffruticosa* (Fabaceae).

Contribuir com extratos, frações e substâncias puras destas plantas para a realização de ensaios farmacológicos: citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, genotoxicidade, mutagenicidade, atividades antimicrobiana, antiinflamatória, analgésica, antiulcerogênica, antioxidante e imunomodulatória.

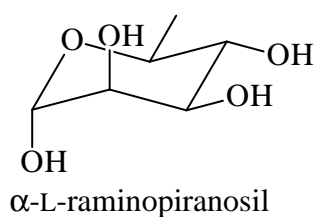
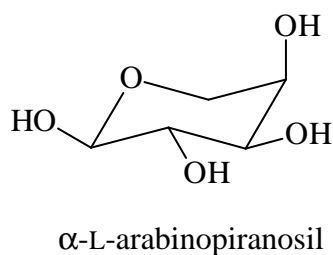
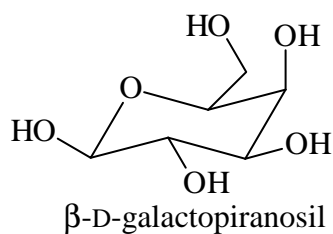
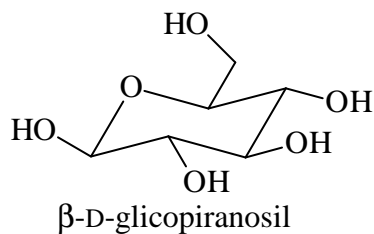
Estruturas das substâncias isoladas das espécies de *Alchornea*



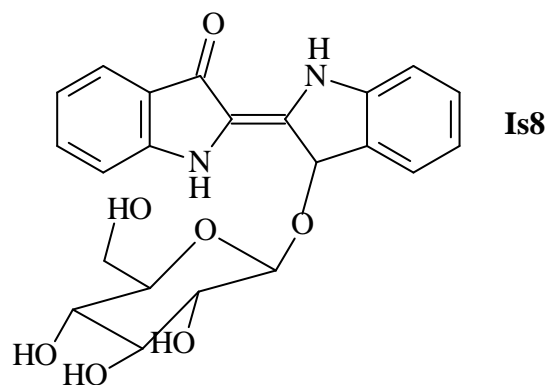
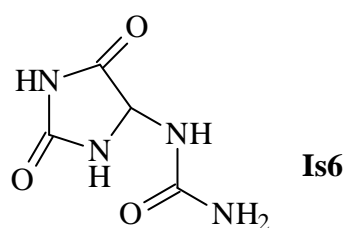
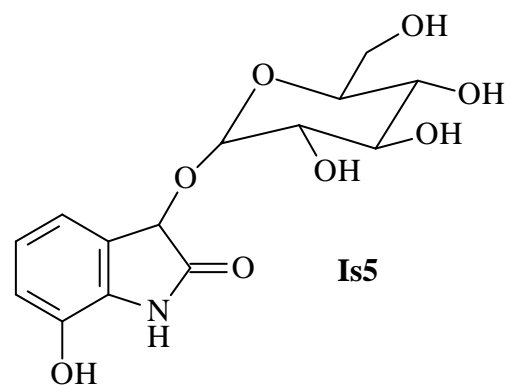
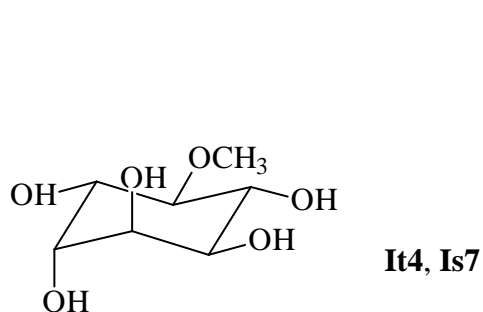
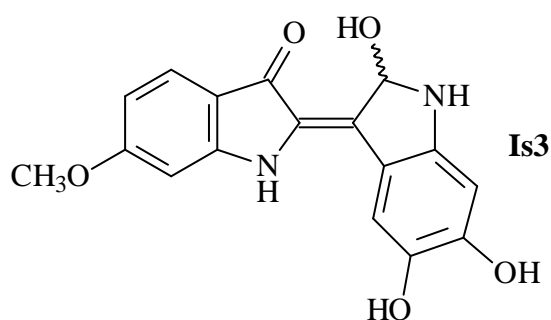
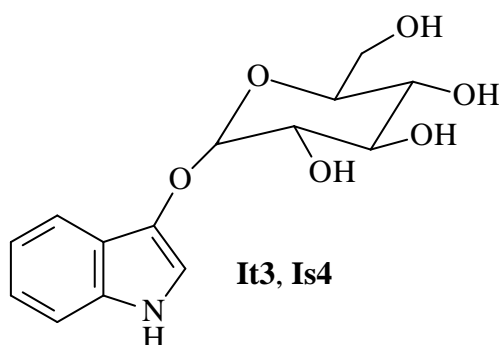
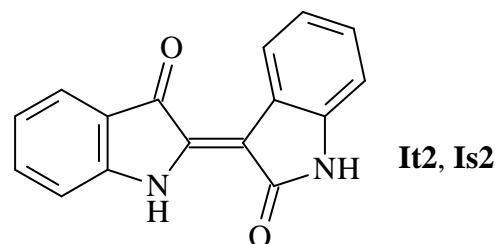
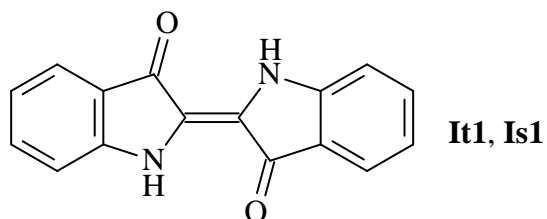


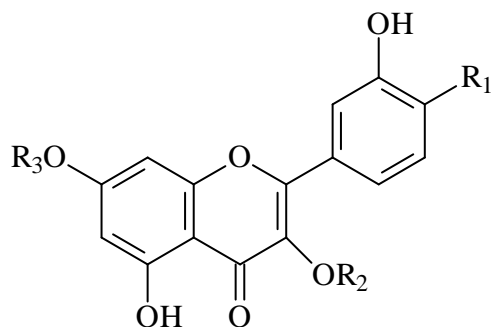
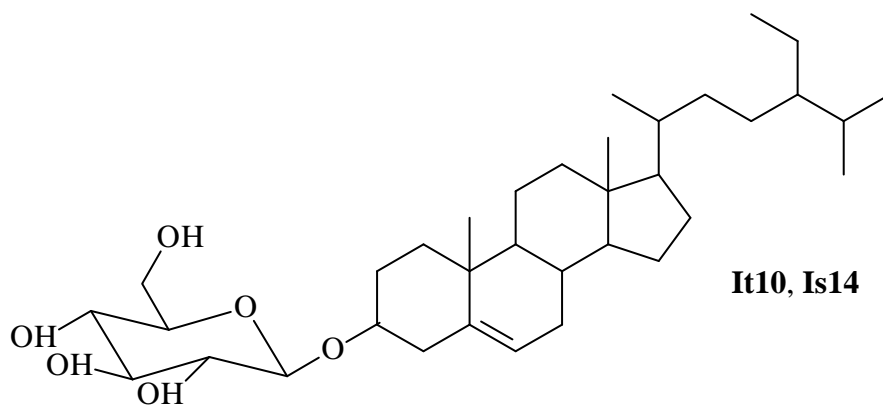
R ₁	R ₂	R ₃	Flavonóide
H	H	H	Ag8, At14
H	α-L-arabinopiranosil	H	Ag9, At13
H	β-D-galactopiranosil	H	Ag12, At11
H	β-D-glicopiranosil	H	At12
H	H	β-D-glicopiranosil	At10
OH	α-L-raminopiranosil	H	Ag11

Glicosídeos dos flavonóides isolados das espécies de *Alchornea*



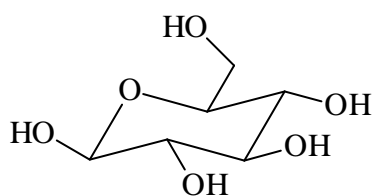
Estruturas das substâncias isoladas das espécies de *Indigofera*



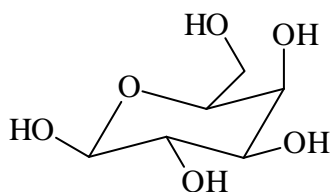


R ₁	R ₂	R ₃	Flavonóide
H	α-L-raminopiranosil	H	It5
H	H	α-L-raminopiranosil	It6
H	α-L-raminopiranosil	α-L-raminopiranosil	It7
H	α-L-arabinopiranosil	α-L-raminopiranosil	It8
H	α-L-arabinopiranosil-(2→1)-α-L-apiofuranosil	α-L-raminopiranosil	It9
OH	H	β-D-glicopiranosil	Is9
OH	β-D-glicopiranosil-(2→1)-β-D-glicopiranosil	H	Is10
OH	β-D-galactopiranosil-(2→1)-β-D-xilopiranosil	H	Is11
OH	β-D-glicopiranosil-[(4→1)-α-L-raminopiranosil]- (6→1)-α-L-apiofuranosil	H	Is12
OH	β-D-glicopiranosil-(6→1)-α-L-raminopiranosil	H	Is13

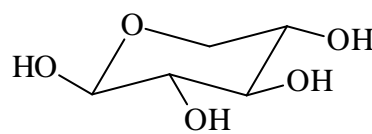
Glicosídeos dos flavonóides isolados das espécies de *Indigofera*



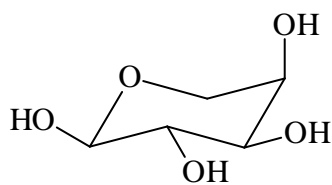
β-D-glicopiranosil



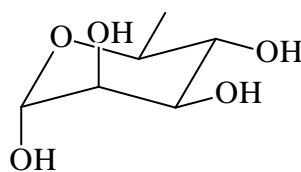
β-D-galactopiranosil



β-D-xilopiranosil



α-L-arabinopiranosil



α-L-raminopiranosil



α-L-apiofuranosil

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Solventes grau analítico (PA): *n*-hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, ácido acético, butanol, *n*-propanol, metanol (Synthlab).

Solventes grau HPLC: metanol, acetonitrila (Merck, Mallinkrodt) e água purificada em sistema Milli-Q.

Solventes deuterados: clorofórmio, dimetilsulfóxido e água (Merck, Aldrich).

CCD (Cromatografia em Camada Delgada): placas de sílica gel 60 em suporte de alumínio ou vidro (Merck, Fluka, Aldrich).

Reveladores (Wagner *et al.*, 1984): Dragendorff, anilsaldeído/H₂SO₄, difenilaminoborato/polietilenoglicol (NP/PEG) e vapores de iodo sublimado.

CC (Cromatografia em coluna). **Adsorventes:** sílica gel 60, 63-200 μm (Merck); sílica gel 60H, 5-40 μm (Merck); sílica imobilizada com octadecilsilano (fase reversa: C-18), 33 μm (Stratax Phenomenex); polivinilpolipirrolidona, P-6755 (PVPP, Sigma); sephadex LH-20 (CPG, Pharmacia).

CPG (Cromatografia de permeação em gel): coluna de vidro, bomba peristáltica (Pharmacia) modelo P1 18-1110-91, coletor com capacidade para 95 frações (Pharmacia RediFrac).

MPLC (cromatografia líquida de média pressão): sistema MPLC Baeckström Separo AB, equipado com uma bomba peristáltica FMI 50, modelo QSY, coluna de vidro de 1,0 cm d.i. com tamanho regulável.

HSCCC (Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade): sistema P.C. Inc. equipado com coluna de teflon de 130 m x 1,6 mm d.i., volume 325 mL, injetor P.C. Inc. com *loop* de 16 mL, bomba FMI Q2.

HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência). *Clean-up* das amostras: cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase normal (SiO₂) 360 mg (55 μm, Classic, Waters) e de fase reversa (C18) com 500 mg (33 μL, Supelco). Filtração: membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*, Millipore), com poro de 0,45 ou 0,20 μm.

HPLC-IR: cromatógrafo Knauer Chance 330 acoplado com índice de refração e detector de comprimento de onda fixo (254 nm), injetor Rheodyne com loop de 100 μ L e registrador L250E. Análises em modo semi-preparativo, coluna de fase reversa C-18 modelo Luna (Phenomenex) de 25 cm x 1 cm x 10 μ m, com eluição isocrática. A atenuação e constante de tempo utilizadas foram 1. As condições do registrador foram: atenuação 10 V e velocidade do papel 2 mm/min.

HPLC-UV-PAD: cromatógrafo Varian, modelo ProStar 210/330 (sistema analítico/preparativo, gradiente binário), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 190-800 nm. Análises no modo analítico: coluna de fase reversa C-18, modelo Luna (Phenomenex) de 250 x 4,6 mm, 5 μ m, e coluna de guarda C-18 (Phenomenex) de 4 x 3 mm, loop de 20 μ l. Análises no modo semi-preparativo: coluna de fase reversa C-18, modelo Luna (Phenomenex) de 250 x 10 mm, 10 μ m. As amostras foram injetadas utilizando injetor Rheodyne 7125 com *loop* de 20 μ L (modo analítico) e 100 μ L (modo semi-preparativo).

HPLC-UV-ESI-IT-MS (análises dos extratos e frações das espécies de *Indigofera*): cromatógrafo Waters, modelo BP 608, sistema analítico, coluna de fase reversa C-18 modelo Aqua (Phenomenex) de 150 x 4,6 mm, 5 μ m, 125 A, com *loop* do injetor de 100 μ L, operando a 35°C acoplado a um espectrômetro de massas (ESI) modelo LCQ, Thermo Finnigan, equipado com analisador de *ion trap*. As análises foram realizadas em modo negativo (*full MS*, MS^2 , MS^3) com intervalo de massas 230-1500 Da; voltagem da fonte: 2,5 kV; voltagem do capilar: -10 V; temperatura do capilar: 175 °C; gás de arraste: 80 u.a.; gás auxiliar: 20 u.a.

FIA-ESI-IT-MS (análises do extrato MeOH de *Alchornea triplinervia* e das frações iniciais das espécies de *Indigofera*): espectrômetro de massas, modelo LCQ Deca (ESI-IT-MSⁿ, Thermo Finnigan), equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS^2 , MS^3) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). As análises foram realizadas em modo negativo (*full MS*, MS^2 , MS^3) com faixa de aquisição de 50-2000 Da, sob as seguintes condições: voltagem do capilar: -4 V; voltagem do spray: - 5 kV; temperatura do capilar: 280°C; gás de arraste (N₂) fluxo 60 u.a. O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS^n realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25-30% da energia total do instrumento.

GC-FID: cromatógrafo a gás modelo CP-3380 (Varian), equipado com injetor split/splitless, coluna LM-5 (5% fenil 95% metilpolissiloxano), 15 m x 0,2 mm d.i. x 0,2 μ m. Detector de ionização em chama (FID), Workstation Varian Star.

GC-MS: cromatógrafo a gás modelo CP-3380 (Varian), equipado com injetor automático (8200 CX), coluna LM-5 (5% fenil 95% metilpolissiloxano), 15 m x 0,2 mm d.i. x 0,2 μ m. Acoplado a um espectrômetro de massas Saturn 2000.

MS (análises dos compostos isolados das plantas): espectrômetro Fisons VG Platform II, de quadrupolo simples, ionização *electrospray*.

MS (análises dos compostos sintentizados): espectrômetro de massas de quadrupolo-tempo (alta resolução), modelo Applied Biosystems QSTAR XL, empregando *electrospray* como modo de ionização a 5500 V e um detector de tempo de voo (ESI-Q-TOF).

Os softwares Star Chromatography Workstation versão 5.31 (Varian) e Xcalibur versão 1.3 (Thermo Finnigan) foram utilizados durante a aquisição e processamento dos dados cromatográficos e espectrométricos, respectivamente.

RMN (análises dos compostos isolados das plantas): espectrômetro Varian Inova 500 de 11,7 T operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (^{13}C), os deslocamentos químicos são dados em ppm, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

RMN (análises dos compostos sintentizados): espectrômetro Bruker Avance 400 MHz DRX (400 MHz para ^1H e 50,3 MHz para ^{13}C); espectrômetro Bruker AC-200 F (200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C).

IV: Espectrômetro de Infra Vermelho Shimadzu, FT-IR, modelo 8300 em pastilhas de KBr e espectrômetro Jasco, FT/IR, modelo 4100.

UV: Espectrofotômetro HACH DR/4000 U.

Medidas de $[\alpha]_D$: Polarímetro Polamat A Carl Zeiss Jena.

CAPÍTULO 1: *Alchornea* (Euphorbiaceae)

A família Euphorbiaceae compreende 326 gêneros e cerca de 7.700 espécies, distribuídas pelos trópicos e zonas temperadas (Ribeiro, 1999), tendo destacada importância econômica mundial, como por exemplo: borracha (*Hevea brasiliensis*) na indústria, mandioca (*Manihot esculenta*) na alimentação, ornamental (gêneros *Aleurites*, *Euphorbia*) e medicinal (*Croton cajucara* - antiinflamatório e analgésico, *Phyllanthus sellowianus* - hipoglicêmico e diurético). Diversas espécies do gênero *Alchornea*, também utilizadas na medicina popular, foram investigadas apresentando interessantes atividades farmacológicas e variedade de metabólitos secundários (Tab. 1.1).

Tabela 1.1. Panorama químico-farmacológico de espécies de *Alchornea*.

Espécie	Substâncias	Atividade Farmacológica	Referência
<i>A. triplinervia</i>	ácido antranílico, ácido gentísico, ácido seneciólico, ácido cinâmico, cinamaldeído e cânfora [F]		Miles & Hankinson & Randle, 1985
	ácido gálico, galato de metila, amentoflavona (biflavonóide), isocorilagina (tanino) [F]		Braca <i>et al.</i> , 2002
<i>A. glandulosa</i>	kaempferol glicosilado, pteroginina e pteroginidina (alcalóides)	antioxidante e antitumoral	Higa, 2001
	sitosterol e campesterol (esteróides), loliolida (terpeno), triisopentenilguanidina (alcalóide), corilagina [F]	antimicrobiana e antiproliferativa (melanoma, mama e pulmão)	Conegero <i>et al.</i> , 2003
	ácido gálico, galato de metila, miricetina-3- <i>O</i> -raminosídeo, quercetina, quercetina-3- <i>O</i> -raminosídeo, kaempferol-3- <i>O</i> -raminosídeo [F]	Antimicrobiana	Urrea-Bulla <i>et al.</i> , 2004
		antiinflamatória [F]	Lopes <i>et al.</i> , 2005
	quercetina-3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo, quercetina-3- <i>O</i> -galactopiranosídeo, amentoflavona, pteroginidina, ácido gálico, galato de metila, miricetina-3- <i>O</i> -raminopiranosídeo, quercetina [F]	antiulcerogênica	Calvo <i>et al.</i> , 2007

<i>A. castaneifolia</i>	ácido gálico, galato de metila, quercetina, quercetina-3- <i>O</i> -galactopiranosídeo, quercetina-3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo, miricetina-3- <i>O</i> -arabinopiranosídeo, amentoflavona [F]	Antiulcerogênica	Hiruma Lima <i>et al.</i> , 2006
<i>A. sidifolia</i>	pentatronol (triterpeno friedelan-7-ol) e sitosterol [F]	antifúngico	Barbo <i>et al.</i> , 2002
<i>A. cordifolia</i>		antimicrobiana [F]	Igbeneghu & Iwalewa & Lamikanra, 2007
		hepatoproteção [F]	Olaleye & Adegboye & Akindahunsi, 2006
	N1, N2-diisopentenilguanidina e N1,N2,N3-triisopentenilguanidina [F]		Mavar-Manga <i>et al.</i> , 2006
		antidiarreica [F]	Agbor & Talla & Ngogang, 2004
		antiinflamatória	Manga <i>et al.</i> , 2004
	terpenos, esteróides, saponinas, flavonóides, taninos, carboidratos, glicosídeos e alcalóides [F]	antiinflamatória	Osadebe & Okoye, 2003
		inibidor da replicação de HIV-1 e HIV-2 [F]	Ayisi & Nyadedzor, 2003
		tripanocida	Adewunmi <i>et al.</i> , 2001
	compostos fenólicos [F]	antidiarreica [F, C], antiamebíase [F]	Tona <i>et al.</i> , 1999; Tona <i>et al.</i> , 2000
	compostos fenólicos e terpenos [F]	antimicrobiana (malária)	Abo & Ashidi, 1999; Okeke <i>et al.</i> , 1993; Ebi, 2001
	ácido elágico [F]	antiplasmodial	Mustofa <i>et al.</i> , 2000; Banzouzi <i>et al.</i> , 2002
		antibacteriana [C]	Ajali, 2000
	alchorneína, alchorneinona, isoalchorneína, yoimbina (alcalóides), ácido antranílico, ácido gentísico	relaxante muscular	Ogungbamila & Samuelsson, 1990
<i>A. latifolia</i>	taxaxerona, friedelina, epifriedelina, triterpenos taraxerol, seco-3,4-friedelina e seco-3,4-taraxerona [F]	citotóxica para células tumorais Hep-G2 e A-431, inibidor da topoisomerase II	Setzer <i>et al.</i> , 2000

<i>A. floribunda</i>	yoimbina,, alchorneína, isoalchorneína e alchorneinona [F,C]	afrodisíaca, efeito estimulante e alucinógena	Khuong Huu & Le Forestier & Goutarel, 1972; De Smet, 1996
<i>A. hirtella</i>	alchorneína [C]		De Smet, 1996
<i>A. laxiflora</i>	quercetina, quercetina-7,4'-disulfato, quercetina-3',4'-disulfato, quercetina-3.4'-diacetato, rutina, quercetrina [F]	antibacteriana e antifúngica	Ogundipe <i>et al.</i> , 2001; Ogundipe & Moody & Houghton, 2001
	terpenos [F, C]	antioxidante	Farombi <i>et al.</i> , 2003
<i>A. javanensis</i>	alchornina, alchornidina, isoalchornina, diisopentenilguanidina, triisopentenilguanidina e dimetilacrilamida [F, C]		Hart & Johns & Lambertos, 1969; Hart <i>et al.</i> , 1970
<i>A. davidii</i>	pinoresinol, monometilpinoresinol, siringaresinol, graminona A, boemenano, ácido gálico, galato de metila, ácido 3,3'-dimetilelágico, 4- <i>O</i> -arabinofuranosídeo e ácido 3,3'-di- <i>O</i> -metilelágico- 4- <i>O</i> -(5'-acetil)-arabinofuranosídeo		Cui & Tan, 2004
<i>A. coelophylla</i>		atividade antioxidante	Mosquera <i>et al.</i> , 2007

[F]: folhas; [C]: cascas.

As espécies *Alchornea glandulosa* e *A. triplinervia*, selecionadas para estudo neste projeto, são usadas na medicina popular brasileira no tratamento de afecções gastro-intestinais.

A. glandulosa Poepp. & Endl. (syn. *Alchornea iricurana* Casar) é uma árvore de 10-20 m, conhecida como tapiá, tanheiro-de-folha redonda e canela-raposa (**Fig. 1.1**). No Brasil é encontrada em SP, RJ, PA, MG e RS, sendo característica de beira de rios e planícies da Floresta Pluvial Atlântica (Lorenzi, 1998).

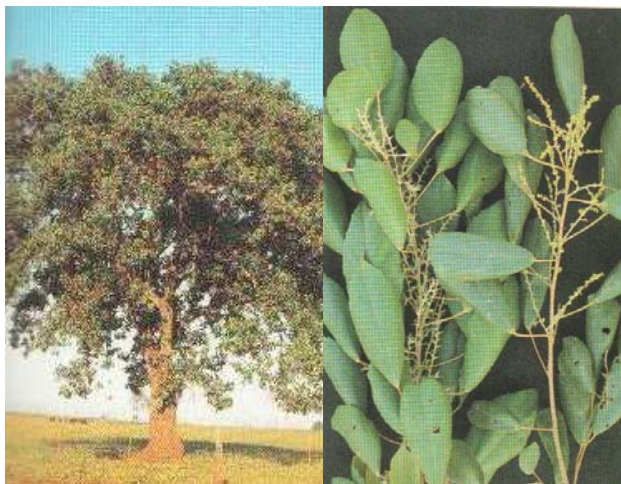


Figura 1.1 *Alchornea glandulosa*
(Lorenzi, 1998).

A. triplinervia (Spreng.) M. Arg. (syn. *Andistema triplinervium* Spreng, *Alchornea nemoralis* Mart e *Alchornea janeirensis* Casar) é uma árvore de 15-30 m, conhecida como tanheiro, boleiro, tapiá-guaçu, tapiá-mirim, caixeta, canela-raposa ou tamanqueiro (**Fig. 1.2**). No Brasil é encontrada da BA ao RS, na Floresta Pluvial da Encosta Atlântica. (Lorenzi, 1998).



Figura 1.2. *Alchornea triplinervia*
(Lorenzi, 1998).

EXPERIMENTAL / RESULTADOS / DISCUSSÕES

1.1. Coletas

Folhas de *Alchornea glandulosa* (**Ag**) foram coletadas na ESALQ-USP (Piracicaba-SP) por Tamara R. Calvo em agosto de 2003 e identificada pelo Prof. Jorge Y. Tamashiro. Uma exsicata foi depositada no Herbário da UNICAMP (Campinas-SP) com *voucher* n° 132828.

Folhas de *Alchornea triplinervia* (**At**) foram coletadas no Horto Florestal da UNESP (Botucatu-SP) por Tamara R. Calvo e Luís F. Rolim em setembro de 2003 e identificada pelo Prof. Jorge Y. Tamashiro. Uma exsicata foi depositada no Herbário da UNESP-Botucatu-SP com *voucher* n° 14873.

1.2. Secagem, moagem e extração

As folhas das espécies de *Alchornea* foram secas e moídas. Em seguida, foram preparados os extratos conforme descrito abaixo (**Fig. 1.3**).

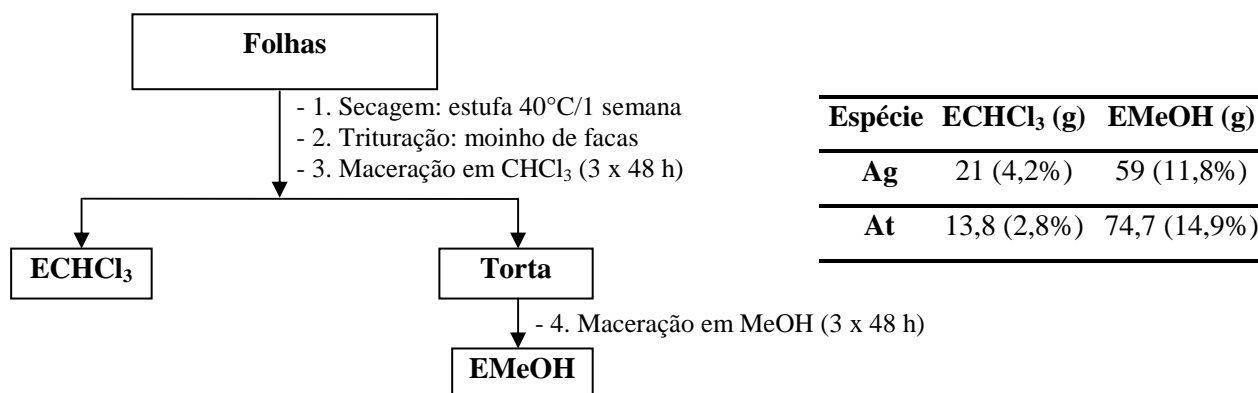


Figura 1.3. Obtenção dos extratos a partir de 500 g de folhas secas de **Ag** e **At**.

1.3. Estudo fitoquímico de *Alchornea glandulosa* (Ag)

1.3.1. Extrato clorofórmico (ECHCl₃)

O ECHCl₃ (9,0 g) foi filtrado em coluna de carvão ativo/sílica gel (1:1), eluída em metanol. Uma porção do extrato clorofórmico desclorofilado (ECHCl₃d) foi fracionada (**Fig. 1.4**), levando ao isolamento de **Ag1-Ag4**.

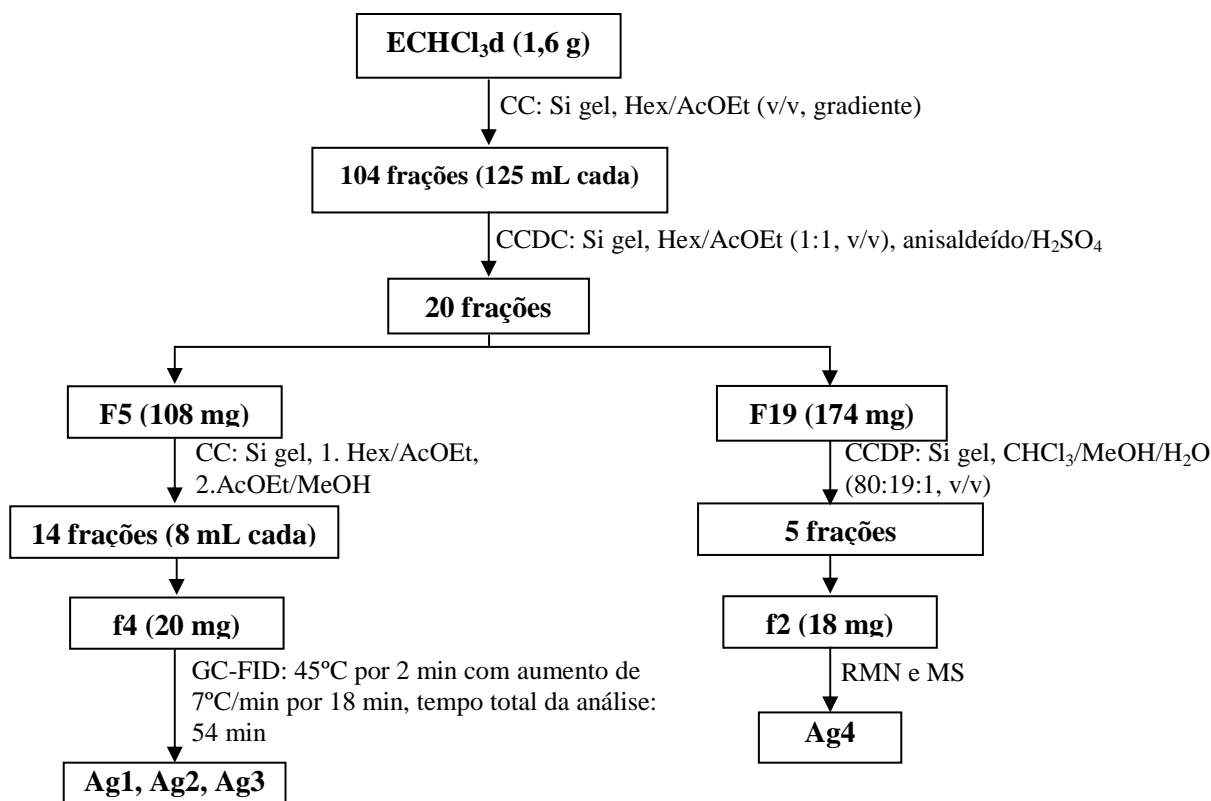


Figura 1.4. Análise fitoquímica do ECHCl₃ de *A. glandulosa*.

Identificação de Ag1-Ag3: Com a purificação de **F5** foi possível obter os esteróides **Ag1-Ag3**, identificados por análise em GC-FID e comparação dos tempos de retenção com padrões autênticos, como sendo **estigmasterol**, **campesterol** e **sitosterol**, respectivamente (**Fig. 1.5**).

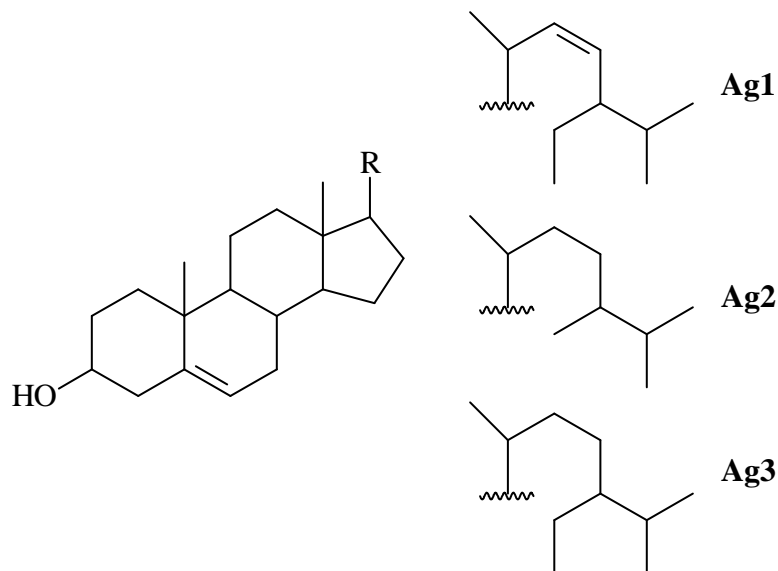


Figura 1.5. Estruturas do estigmasterol (**Ag1**), campesterol (**Ag2**) e sitosterol (**Ag3**).

Identificação de Ag4: O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 1.1**, **Tab. 1.2**) mostrou sinais em δ 3,75 e 5,16 atribuídos aos $\text{H1}'$ e $\text{H2}'$, respectivamente, além de um sinal em δ 7,30. Outros sinais em δ 1,69 e 1,63 corresponderam aos hidrogênios metílicos $\text{H4}'$ e $\text{H5}'$, respectivamente. Espectro de RMN de ^1H em $\text{DMSO-d}_6 + \text{D}_2\text{O}$ mostrou todos os sinais observados anteriormente, exceto o δ 7,30. O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 1.2**, **Tab. 1.2**) apresentou sinais correspondentes a um sistema guanidínico (Bolzani & Gunatilaka & Kingston, 1995). Os hidrogênios e carbonos foram atribuídos pela análise do experimento $g\text{HMQC}$. As correlações a longa distância observadas no experimento $g\text{HMBC}$ estão descritas na **Tab. 1.2**. De acordo com os dados espectrométricos, o alcalóide guanidínico possui duas unidades isoprenila. O experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ (**Tab. 1.2**) não mostrou correlação entre $\text{H3}/\text{H1}'$ ou $\text{H4}/\text{H1}'$ (sugerindo que as unidades isoprenila poderiam estar no mesmo átomo de nitrogênio). O experimento TOCSY-1D foi decisivo para determinação de **Ag4**, ao irradiar δ 1,63 ($\text{H4}'$) houve transferência de coerência para os prótons δ 1,69 ($\text{H5}'$), 3,75 ($\text{H1}'$), 5,16 ($\text{H2}'$) e 7,36 (NH), o que evidenciou que tanto N3 quanto N4 estavam ligados a uma unidade de isoprenila e a um hidrogênio. O espectro de massas (modo positivo) mostrou um pico com m/z 196, referente à molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$. Estes dados permitiram identificar a substância **Ag4** como sendo a ***N1,N2*-diisopentenilguanidina (pteroginidina)** (**Fig. 1.6**).

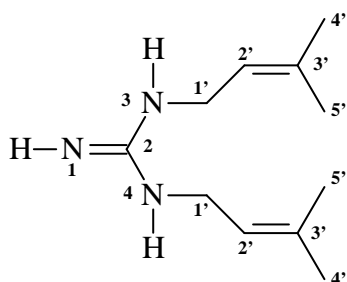


Figura 1.6. Estrutura da pteroginidina (Ag4).

Tabela 1.2. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e correlações observadas nos experimentos gCOSY ^1H - ^1H e gHMBC de Ag4.

Posição	$^{13}\text{C}^* \delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	gCOSY ^1H - ^1H	gHMBC
2	154,1	-	-	H1'
1'	39,5	3,75 d (6,5)	H5'/H2'	-
2'	119,6	5,16 t (6,5)	H5'/H1'	H4'/H5'/H1'
3'	135,4	-	-	H4'/H5'/H1'
4'	17,8	1,63 s	-	H5'
5'	25,3	1,69 s	H1'/H2'	H4'

* Sinais atribuídos com base nas correlações observadas nos experimentos gHMBC e gHMBC.

1.3.2. Extrato metanólico (EMeOH)

O fracionamento do EMeOH de *A. glandulosa* resultou no isolamento de Ag5-Ag10 (Fig. 1.7).

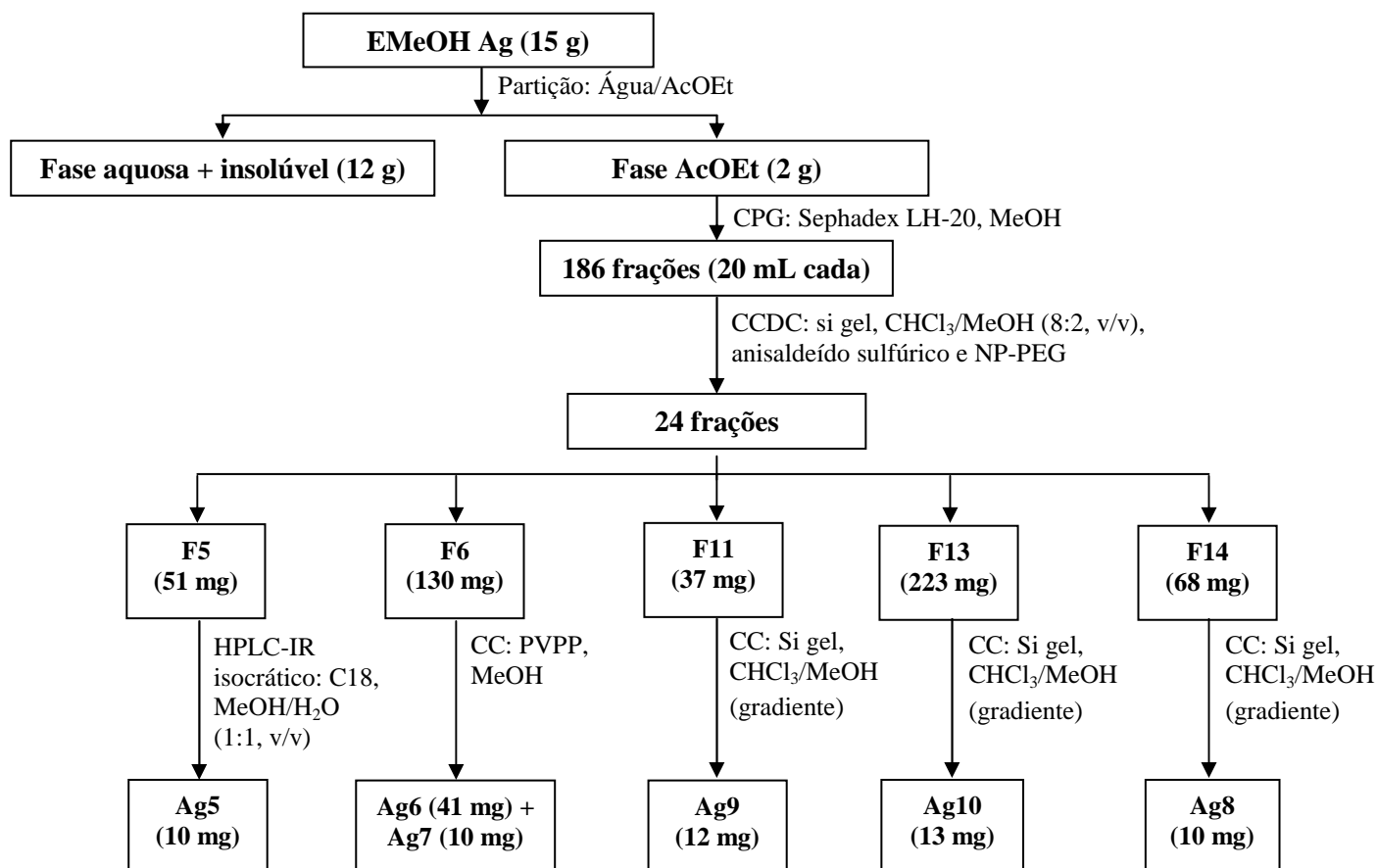


Figura 1.7. Análise fitoquímica do EMeOH de *A. glandulosa*.

Identificação de Ag5: A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou um singlete em δ 6,93, correspondente aos H2 e H6 de um anel aromático. No espectro de RMN de ^{13}C foram detectados 5 sinais, indicando a presença de um anel aromático substituído simetricamente por grupos hidroxilas e mostrou a presença de um carbono quaternário em δ 167,5 referente à carbonila do ácido carboxílico. Os dados espectrais e comparação com informações da literatura permitiram a identificação do **ácido gálico (Ag5)** (Tab. 1.3) (Binutu & Cordell, 2000) (Fig. 1.8).

Identificação de Ag6: A análise do espectro de RMN de ^1H mostrou singletos em δ 6,94 e 3,74. No espectro de RMN de ^{13}C foi detectada a presença de 6 sinais, sendo um deles correspondente a uma carbonila (δ 166,3) e outro a uma metoxila (δ 51,5). Por comparação com dados da literatura a substância **Ag6** foi identificada como sendo o **galato de metila** (Tab. 1.3) (Binutu & Cordell, 2000) (Fig. 1.8).

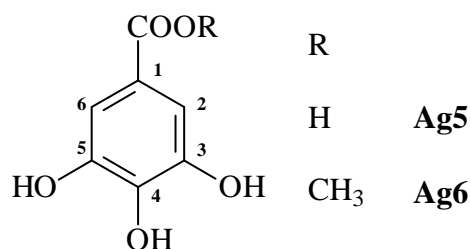


Figura 1.8. Estruturas do ácido gálico (Ag5) e do galato de metila (Ag6).

Tabela 1.3. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de Ag5 e Ag6.

Ag5			Ag6		
Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)	Posição	^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm)
1	120,6	-	1	119,3	-
2	108,7	6,93 s (2H)	2	108,6	6,92 s (2H)
3	145,6	-	3	145,7	-
4	137,9	-	4	138,6	-
5	145,4	-	5	145,7	-
6	108,7	6,93 s (2H)	6	108,6	6,92 s (2H)
COOH	167,5	-	<u>COOCH</u> ₃	166,4	-
-	-	-	<u>COOCH</u> ₃	51,7	3,73 s (3H)

Identificação de Ag7: O espectro de RMN de ^1H (Espectro 1.3, Tab. 1.4) apresentou sinais em δ 8,30 (1H, s), 7,13 (2H, s), 4,34 (1H, d, $J = 6,0$ Hz), 2,99 (1H, d, $J = 18,0$ Hz) e 2,49 (1H, dd, $J = 6,0$ e $18,0$ Hz). Adição de D_2O ao DMSO- d_6 causou desaparecimento do sinal em δ 8,30. Irradiação do sinal em δ 4,34 no experimento TOCSY-1D (Espectro 1.4) confirmou a existência do sinal em δ 2,49, mostrando correlação também com δ 2,99, esclarecendo a multiplicidade destes sinais. O experimento gCOSY ^1H - ^1H mostrou a correlação direta do hidrogênio em δ 2,49 com os hidrogênios δ 2,99 e 4,34 evidenciando que faziam parte de um mesmo sistema. Com

auxílio do experimento gHMQC (Tab. 1.4) os sinais em δ 37,9 e 43,0, observados no espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 1.5, Tab. 1.4) e atribuídos aos carbonos alifáticos C3 metilênico e C2 metínico, foram correlacionados aos H3a e (δ 2,99) e H2 (δ 4,34), respectivamente, enquanto o sinal δ 108,7 (C7), de um sistema aromático, mostrou interação direta com o sinal em δ 7,13 (H7). A partir das correlações observadas no experimento gHMBC (Tab. 1.4) os sinais δ 162,0, 173,1 e 195,6, de carbonos carbonílicos, foram identificados como pertencentes aos carbonos C6, C1 e C4, respectivamente. Os carbonos oxigenados C8 (δ 143,4) e C10 (δ 148,9) foram atribuídos devido às correlações à longa distância com o H7 (δ 7,13). Os demais carbonos C4a, C4b, C6a, C9 e C10a foram atribuídos por comparação com os deslocamentos químicos da literatura (Nawwar & Hussein & Merfort, 1994). O espectro de massas (modo negativo) mostrou um pico com m/z 291 atribuído à molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$. Deste modo, Ag7, foi identificado como sendo o ácido carboxílico da brevifolina, uma isocumarina (Fig. 1.9).

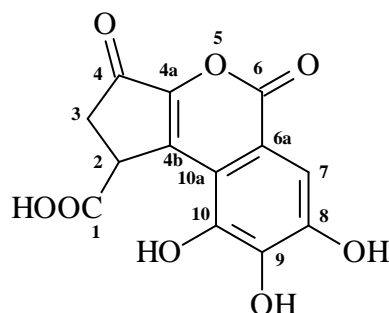


Figura 1.9. Estrutura do ácido carboxílico da brevifolina (Ag7).

Tabela 1.4. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e correlações observadas no experimento gHMBC de Ag7.

Posição	^{13}C * δ (ppm)	^1H δ (ppm), J (Hz)	gHMBC
1	173,1 (C=O)	-	H2, H3a, H3b
2	43,0	4,34 d (6,0), 1H	H3a
3a	37,9	2,99 d (18,0), 1H	-
3b	37,9	2,49 dd (6,0 e 18,0), 1H	-
4	195,6 (C=O)	-	H2, H3a, H3b
4a	149,1	-	-
4b	116,2	-	-
6	162,0 (C=O)	-	H7
6a	113,3	-	-
7	108,7	7,13 s, 2H	-
8	143,4	-	H8
9	141,7*	-	-
10	148,9	-	H7
10a	141,7*	-	-

* sinais sobrepostos.

Identificação de Ag8: O perfil espectral do RMN de ^1H apresentado pelos picos entre δ 6,18 e 7,67 sugeriu um padrão de substituição no anel B com a presença de duas hidroxilas em *orto* nas posições 3' e 4' de um flavonóide, sendo H2', H6' e H5' pertencentes aos sinais δ 7,67 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,52 (1 H, dd, $J = 8,5$ e 2,0 Hz) e 6,88 (1 H, d $J = 8,5$ Hz), respectivamente.

Os H8 e H6 do anel A foram observados em δ 6,40 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz) e 6,18 (1 H, d, $J = 2,0$ Hz). Este conjunto de dados permitiu identificar o flavonóide como sendo a **quercetina** (Tab. 1.5, Fig. 1.13) (Harborne, 1996).

Identificação de Ag9: Comparação com o espectro de RMN de ^1H de **Ag8** permitiu identificar a aglicona como sendo a quercetina. Além disso, o espectro de RMN de ^1H apresentou um hidrogênio anomérico em δ 5,27 (d, $J = 5,0$ Hz) e demais sinais referentes a uma pentose. Os experimentos $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ e TOCSY-1D evidenciaram o sistema de *spin* da arabinose. A arabinose pode existir na forma piranosídeo (H anomérico em δ 5,25) ou furanosídeo (H anomérico em δ 5,60). Harborne (1996) apresenta as seguintes possibilidades de configuração para arabinopiranosídeo com $\beta\text{-L}$: 2,5 Hz e $\alpha\text{-L}$: 8,0 Hz, para arabinofuranosídeo com $\beta\text{-L} = 4,0$ Hz e $\alpha\text{-L} = 1,0$ Hz. A constante de acoplamento do hidrogênio anomérico indicou a configuração α para arabinose de **Ag9**. A análise dos espectros de RMN de ^{13}C juntamente com experimentos bidimensionais permitiu identificar a substância como sendo a **quercetina-3-O- $\alpha\text{-L}$ -arabinopiranosídeo** (Tab. 1.5, Fig. 1.13).

Tabela 1.5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **Ag8** e **Ag9**.

Posição	Ag8		Ag9	
	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm), J (Hz)
2	148,3	-	156,3	-
3	136,5	-	133,7	-
4	177,5	-	177,5	-
5	161,2	-	161,2	-
6	98,7	6,18 d (2,0)	98,7	6,19 d (2,0)
7	164,1	-	164,3	-
8	93,5	6,40 d (2,0)	93,5	6,39 d (2,0)
9	156,3	-	156,2	-
10	103,9	-	103,9	-
1'	121,1	-	121,9	-
2'	115,9	7,67 d (2,0)	115,7	7,50 d (2,5)
3'	144,8	-	144,9	-
4'	148,5	-	148,6	-
5'	115,2	6,88 d (8,5)	115,3	6,84 d (8,5)
6'	122,0	7,52 dd (8,5 e 2,0)	122,1	7,66 dd (8,5 e 2,5)
3-O-Ara				
1			101,4	5,27 d (5,0)
2			70,7	3,75 dd (8,0 e 5,0)
3			71,6	3,51 dd (3,5 e 8,0)
4			66,1	3,64 m
5			64,3	3,21 e 3,59 m

Identificação de Ag10: Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C mostraram sinais consistentes com duas unidades de apigenina unidas por ligação C-C entre as posições C3'-C8''. O espectro de massas (modo negativo) mostrou o sinal referente à molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 537,

compatível com a fórmula $C_{30}H_{18}O_{10}$, sugerindo um biflavonóide. As correlações observadas nos experimentos bidimensionais $gCOSY$ 1H - 1H , $gHMQC$ e $gHMBC$ juntamente com dados da literatura confirmaram a estrutura como sendo a **amentoflavona** (Tab. 1.6, Fig. 1.10) (Agrawal, 1989, Harborne, 1996).

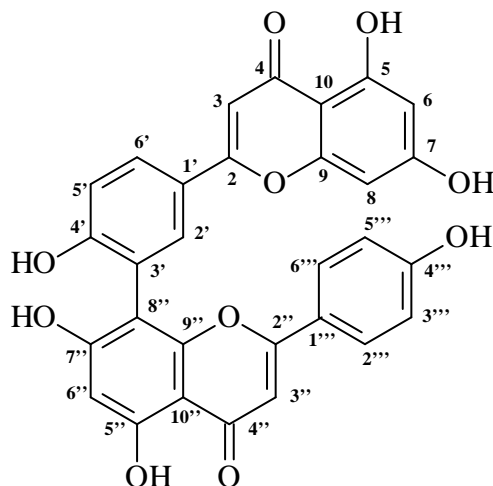


Figura 1.10. Estrutura da amentoflavona (Ag10).

Tabela 1.6. Deslocamentos químicos de RMN de 1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de Ag10.

Posição	^{13}C δ (ppm)	1H δ (ppm), J (Hz)	Posição	^{13}C δ (ppm)	1H δ (ppm), J (Hz)
2	163,7	-	2''	163,8	-
3	102,9	6,79 s (1H)	3''	102,6	6,74 s (1H)
4	181,7	-	4''	182,2	-
5	161,4	-	5''	161,5	-
6	98,7	6,28 d (1H, 2,5)	6''	98,9	6,17 s (1H)
7	164,1	-	7''	160,5	-
8	94,0	6,40 d (1H, 2,0)	8''	104,0	-
9	159,7	-	9''	157,4	-
10	103,6	-	10''	103,7	-
1'	121,4	-	1'''	120,9	-
2'	131,4	8,07 d (2H, 2,2)	2'''	128,2	7,59 d (1H, 8,5)
3'	120,0	-	3'''	115,8	6,67 d (2H, 8,5)
4'	154,5	-	4'''	161,0	-
5'	116,3	7,19 d (2H, 8,6)	5'''	115,8	6,67 d (1H, 8,5)
6'	127,8	7,90 dd (1H, 8,6; 2,2)	6'''	128,2	7,59 d (2H, 8,5)

Perfil químico do EMeOH de *A. glandulosa* utilizando HPLC-UV-PAD

Inicialmente foi realizado *clean-up* do EMeOH: 30 mg/5 mL de $H_2O/MeOH$ (8:2, v/v) filtrado em cartucho Sep-Pak (C18, 500 mg). Em seguida, o cartucho foi lavado com 5 mL de $H_2O/MeOH$ (1:1, v/v) e MeOH, respectivamente. A fração metanólica, que continha maior quantidade de substâncias, foi filtrada em filtro Millex (0,45 μm) e analisada por HPLC-UV-PAD (Fig. 1.11 e 1.12).

Os picos referentes às substâncias isoladas do *A. glandulosa* (**Ag4-Ag10**) foram identificados por co-injeção e por comparação dos tempos de retenção e espectros no UV (Mabry & Markham & Thomas, 1970). Também foram identificados por co-injeção os flavonóides denominados **Ag11** e **Ag12**, previamente isolados de outras plantas por nosso grupo de pesquisa (**Tab. 1.7, Fig. 1.13**). As estruturas de **Ag11** e **Ag12** foram confirmadas por análises de RMN.

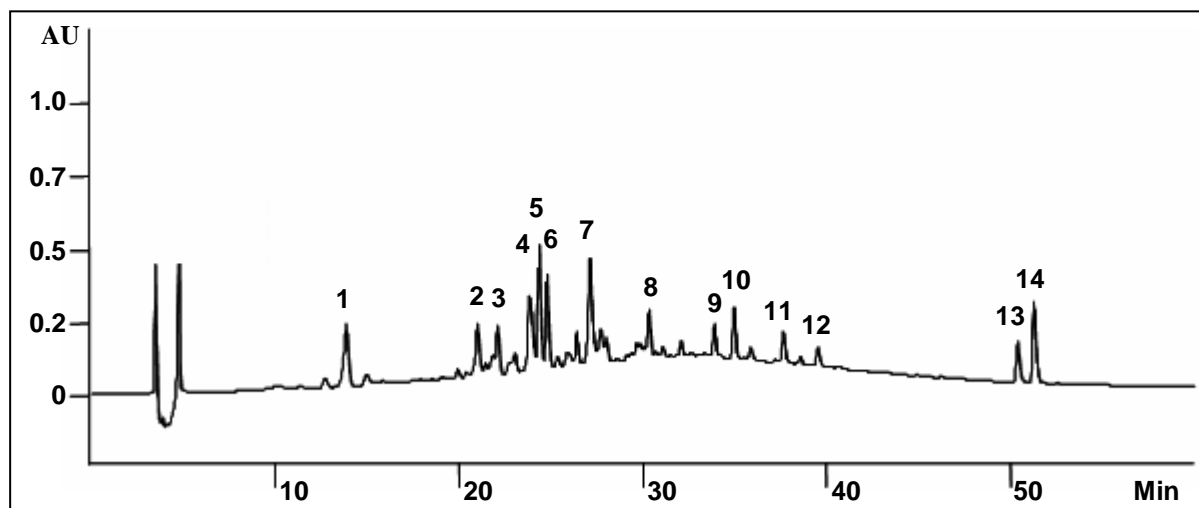


Figura 1.11. Cromatograma da fração metanólica do EMeOH de Ag. Condições: C18, 250 x 4,6 mm d.i. x 5 μ m, FM [H₂O (TFA 0,0 5%)/ACN (TFA 0,05 %)] 30-70 % de ACN em 60 min, fluxo 1,0 mL/min, λ 210 nm.

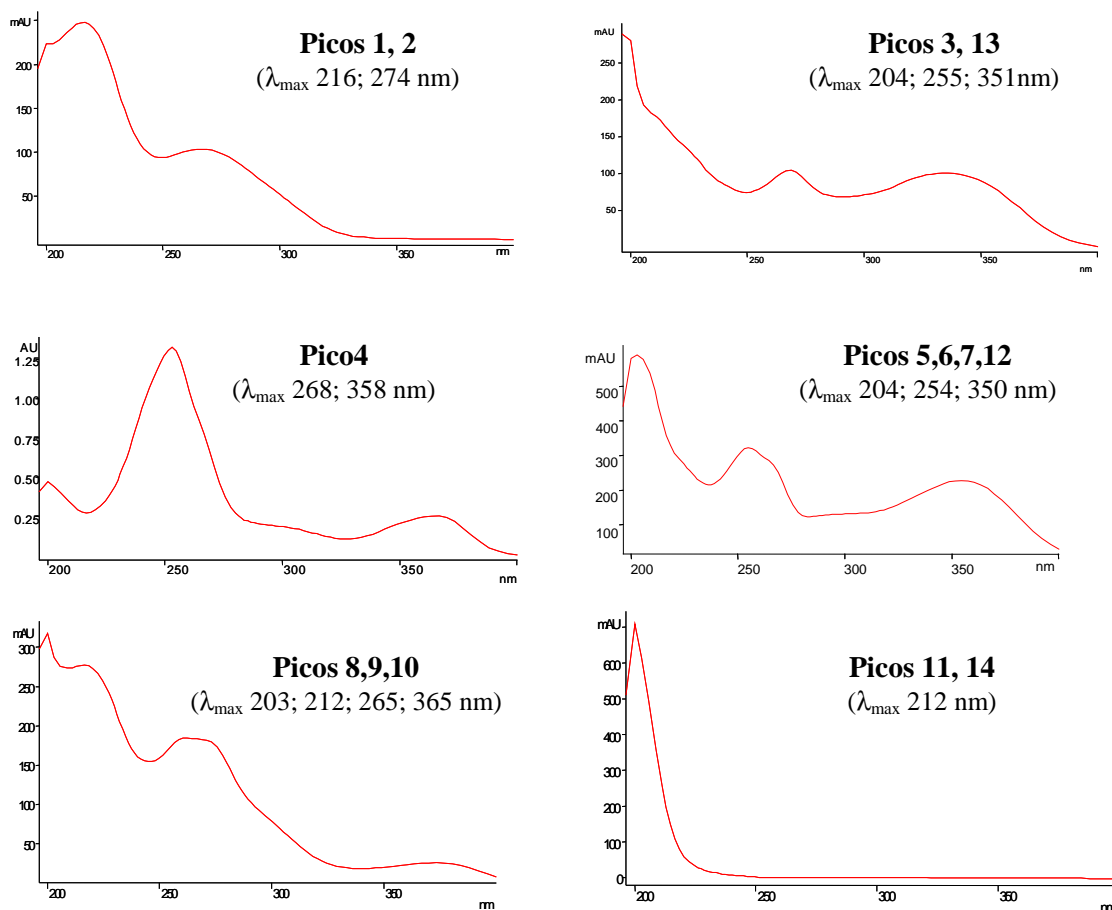


Figura 1.12. Espectros no UV referentes aos picos do cromatograma do EMeOH de Ag.

Tabela 1.7. Substâncias identificadas no **EMeOH** de **Ag** por HPLC-UV-PAD.

Picos	Substâncias
1	ácido gálico (Ag5)
2	galato de metila (Ag6)
3	derivado da amentoflavona (não identificado)
4	ácido carboxílico da brevifolina (Ag7)
5	miricetina 3- <i>O</i> - α -L-raminopiranosídeo (Ag11)
6	quercetina 3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosídeo (Ag12)
7	quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosídeo (Ag9)
8,9,10	substâncias não identificadas
11	alcalóide guanidínico (não identificado)
12	quercetina (Ag8)
13	amentoflavona (Ag10)
14	pteroginidina (Ag4)

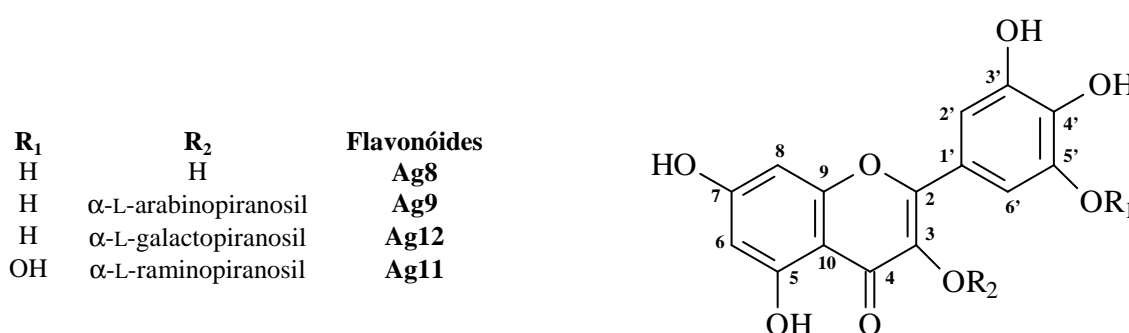


Figura 1.13. Estruturas dos derivados da quercetina (**Ag8**, **Ag9** e **Ag12**) e miricetina (**Ag11**).

1.4. Estudo fitoquímico de *Alchornea triplinervia* (*At*)

1.4.1. Extrato clorofórmico ($ECHCl_3$)

O $ECHCl_3$ (5,0 g) de *A. triplinervia* foi fracionado por CC (**Fig. 1.14**), as frações obtidas foram analisadas por GC-FID e comparadas com padrões, levando ao isolamento e identificação de **At1-At6** (**Fig. 1.15**).

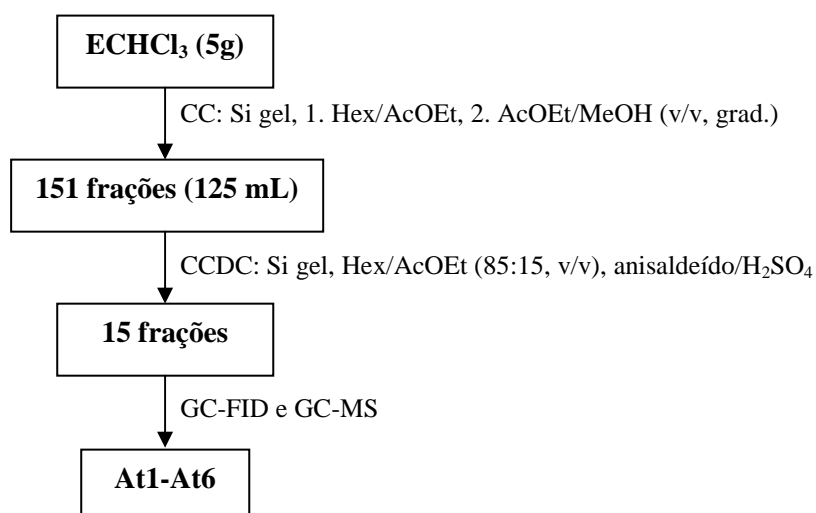


Figura 1.14. Análise fitoquímica do $ECHCl_3$ de *A. triplinervia*.

Identificação de At1, At2, At3, At4, At5 e At6: Nos cromatogramas obtidos por GC-FID das frações do ECHCl_3 foram identificados os esteróides **estigmasterol (At1)**, **campesterol (At2)** e **sitosterol (At3)** e os triterpenos **lupeol (At4)**, **friedelan-3-ol (At5)** e **friedelan-3-ona (At6)** (**Fig. 1.15**), cujas identidades foram constatadas por comparação dos t_R com padrões e confirmadas pelas fragmentações obtidas por análises de GC-MS.

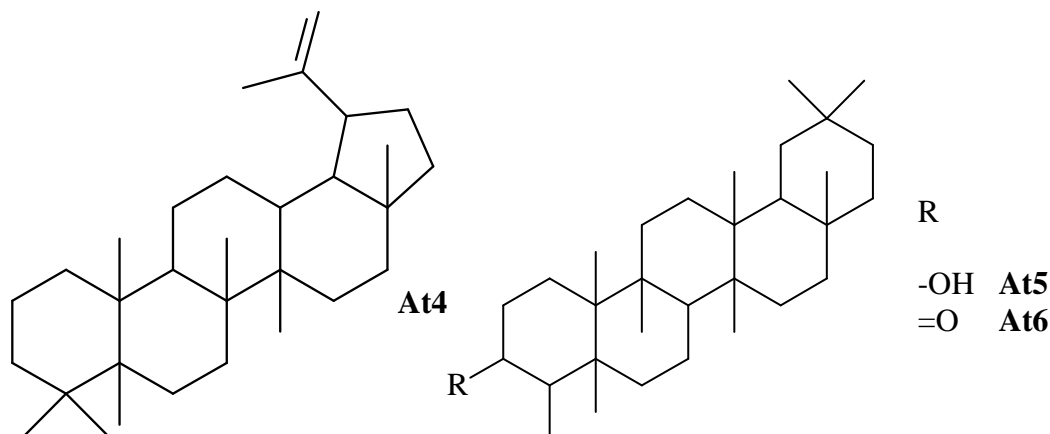


Figura 1.15. Estruturas do lupeol (**At4**), friedelan-3-ol (**At5**) e friedelan-3-ona (**At6**).

1.4.2. Extrato metanólico (EMeOH)

Foram obtidos os perfis químicos dos **EMeOH** das folhas de *A. glandulosa*, *A. triplinervia* e *A. castaneifolia* por HPLC-UV-PAD. Os cromatogramas (**Fig. 1.16**) demonstraram que as três espécies possuem composições químicas qualitativamente semelhantes, mas quantitativamente diversas. A espécie *A. castaneifolia* foi previamente estudada em nosso grupo, sendo encontrados quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, quercetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, miricetina 3-*O*- α -L-arabinopiranosídeo, quercetina, amentoflavona, ácido gálico, galato de metila, açúcares livres e glicolipídeos (Andrade, 2002; Hiruma Lima *et al.*, 2006).

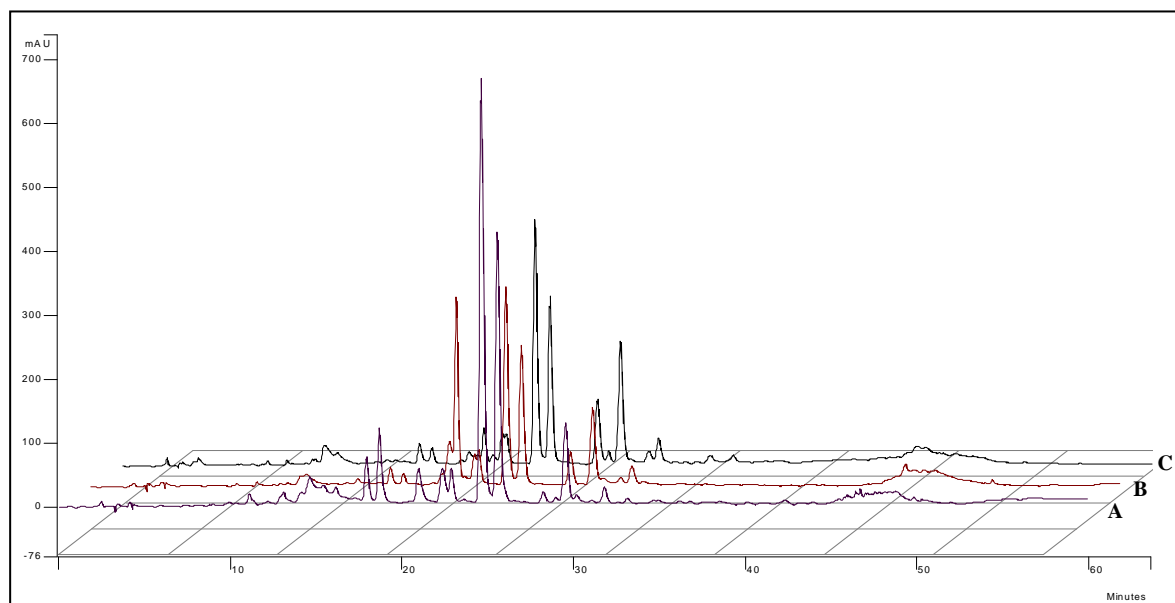


Figura 1.16. Cromatograma das frações hidroalcoólicas dos **EMeOH** de *A. castaneifolia* (**A**), *A. glandulosa* (**B**) e *A. triplinervia* (**C**). Condições: C18, 250 x 4,6 mm d.i. x 5 μ m, FM [H₂O (TFA 0,05 %)/ACN (TFA 0,0 5%)] 25-35 % de ACN em 40 min, 35-100 % em 55 min e 100 % de ACN por 5 min, fluxo 1,0 mL/min, λ 330 nm.

Estudo da fração AcOEt obtida do EMeOH de A. triplinervia

Foi realizada extração líquido-líquido do **EMeOH** (28,3 g) de **At** em AcOEt/água (1:1,v/v), rendendo 7,8 g (27,6%) e 15,0 g (53%) das frações AcOEt e aquosa, respectivamente. Análise por CCDC indicou que a fração aquosa era constituída por taninos e a fração AcOEt por flavonóides.

Os constituintes da fr. **AcOEt** foram isolados por HPLC-UV-PAD modo semi-preparativo. A fr. **AcOEt** (150 mg) foi dissolvida em 10 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v) e filtrada em filtros Millex de 0,45 e 0,20 μ m. Foram realizadas 10 injeções de 1 mL cada, sendo coletados 15 picos com monitoramento a 254 nm (**Fig. 1.17**). As frações coletadas foram analisadas por CCDC, algumas por apresentarem mais de uma mancha e foram purificadas por CPG em Sephadex LH-20, eluída com MeOH, possibilitando o isolamento e identificação de 9 constituintes do **EMeOH** (**Tab. 1.8**).

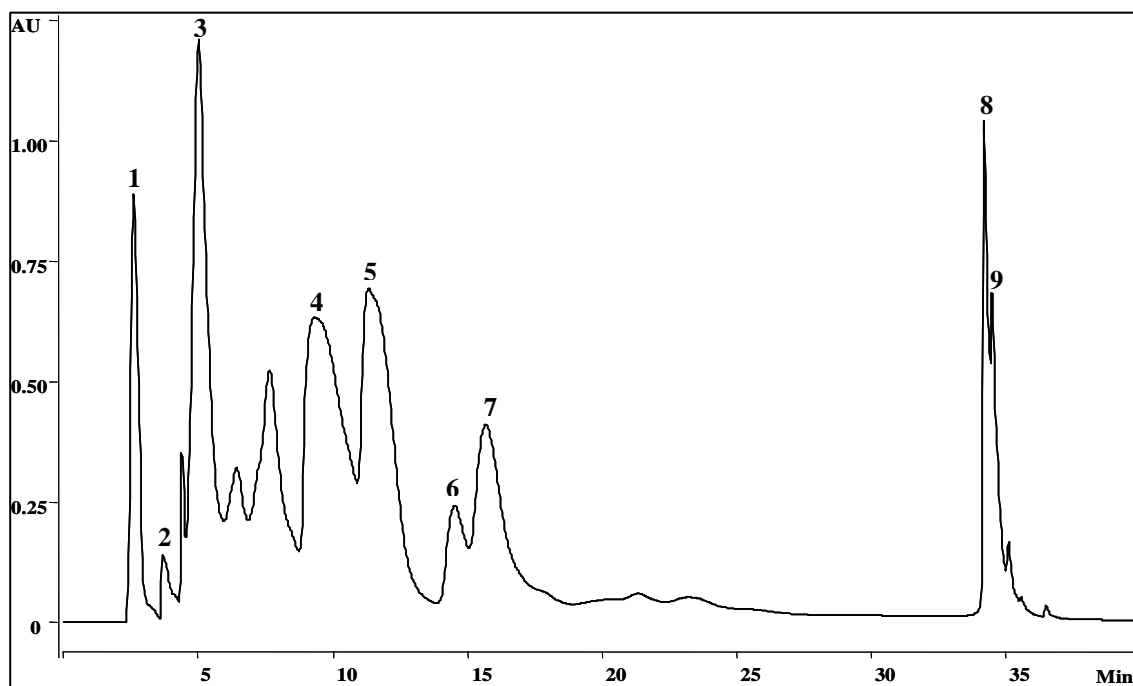


Figura 1.17. Cromatograma (semi-preparativo) da fr. AcOEt do EMeOH de At. Condições: C18, 250 x 10 mm d.i. x 10 μ m, FM [H₂O (TFA 0,05 %)/ACN (TFA 0,05 %)] 22-24 % de ACN em 20 min, 24-100 % em 1 min e 100 % de ACN por 10 min, fluxo 4,7 mL/min, λ 254 nm.

Tabela 1.8. Substâncias identificadas no EMeOH de At por HPLC-UV-PAD.

Fração	Substância	Massa (mg)
1	ácido gálico (At7)	8,0
2	galato de metila (At8)	3,0
3	ácido carboxílico da brevifolina (At9)	6,0
4	quercetina 7-O- β -D-glicopiranosídeo (At10)	7,0
5	quercetina 3-O- β -D-galactopiranosídeo (At11)	11,0
6	quercetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo (At12)	4,0
7	quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (At13)	10,0
8	quercetina (At14)	10,0
9	amentoflavona (At15)	5,0

Identificação de At7-At9 e At13-At15: identificadas por comparação de dados de RMN com substâncias isoladas de *A. glandulosa* e *A. castaneifolia* (Fig. 1.8-1.10 e 1.13).

Identificação de At10: O espectro de RMN de ¹H (Tab. 1.9) apresentou sinais semelhantes aos de Ag9 confirmando que a aglicona se tratava da quercetina. Um hidrogênio anomérico foi observado em δ 5,43 (d, J = 8,0 Hz). Experimento TOCSY-1D com irradiação em δ 5,43 mostrou sinais referentes a uma unidade de glicose. Os experimentos gHMQC e gHMBC possibilitaram a atribuição dos carbonos e hidrogênios da aglicona e da glicose (Tab. 1.9). No experimento gHMBC os acoplamentos de δ 5,43 (H1-Gli) e δ 3,22 (H2-Gli) com δ 163,8

indicaram que a glicose estava ligada ao C7, evidenciando que o flavonóide era a **quercetina 7-O-β-D-glicopiranosídeo (Fig. 1.18)** (Agrawal, 1989, Harborne, 1996).

Identificação de At11: Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H (**Tab. 1.9**) foram atribuídos a uma unidade de quercetina (Harborne, 1996). O sinal em δ 5,34 (d, $J = 7,5$ Hz), referente a um hidrogênio anomérico, foi irradiado no experimento TOCSY-1D evidenciando o sistema de *spin* da galactose. O experimento gHMQC (**Tab. 1.9**) possibilitou a identificação dos carbonos ligados à hidrogênios. No experimento gHMBC a correlação entre δ 5,34 (H1-Gal) e δ 134,6 (C3) mostrou que o açúcar estava ligada ao C3 do flavonóide, indicando a estrutura da **quercetina 3-O-β-D-galactopiranosídeo (Fig. 1.18)**.

Identificação de At12: Pela análise do espectro de RMN de ^1H (**Tab. 1.9**) foi possível constatar que se tratava de outro derivado da quercetina monoglicosilada. Experimentos TOCSY-1D, gCOSY ^1H - ^1H , gHMQC e gHMBC, juntamente com dados da literatura (Harborne, 1986; Agrawal, 1989) corroboraram com a proposta estrutural da **quercetina-3-O-β-L-glicopiranosídeo (Fig. 1.18, Tab. 1.9)**.

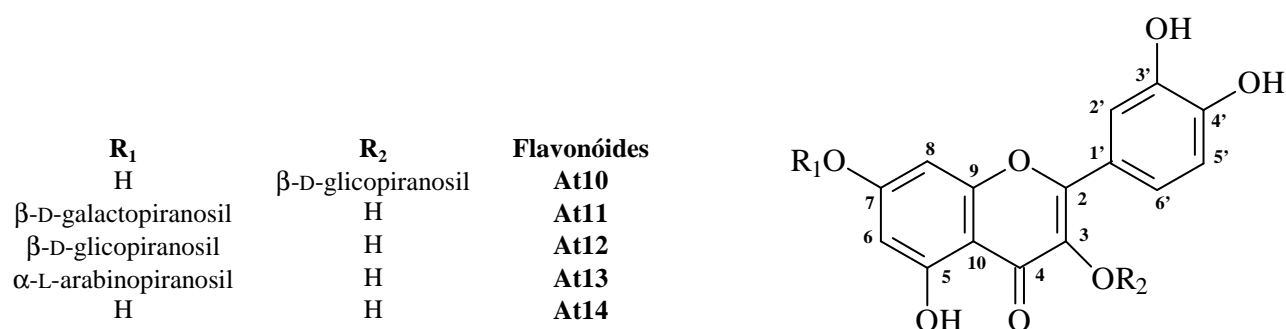


Figura 1.18. Estruturas dos derivados da quercetina **At10-At14**.

Tabela 1.9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **At10-At12**.

Posição	At10		At11		At12	
	$^{13}\text{C}^*$ δ (ppm)	^1H δ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^*$ δ (ppm)	^1H δ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}^*$ δ (ppm)	^1H δ (ppm), J (Hz)
2	157,0	-	157,0	-	157,0	-
3	134,6	-	134,6	-	133,4	-
4	174,4	-	177,5	-	177,5	-
5	162,3	-	162,3	-	162,5	-
6	99,0	6,17 d (2,0)	99,0	6,12 d (2,0)	98,7	6,18 d (2,0)
7	163,8	-	163,8	-	164,2	-
8	94,2	6,37 d (2,0)	94,2	6,36 d (2,0)	93,8	6,39 d (2,0)
9	157,2	-	157,2	-	156,6	-
10	104,5	-	104,5	-	104,0	-
1'	122,0	-	122,0	-	121,8	-
2'	116,8	7,54 d (2,0)	116,8	7,52 d (2,0)	116,8	7,54 d (2,0)
3'	146,0	-	146,0	-	144,8	-
4'	149,4	-	149,4	-	148,5	-
5'	115,8	6,82 d (9,0)	115,8	6,79 d (9,0)	116,2	6,83 d (8,5)
6'	122,5	7,56 dd (2,0; 9,0)	122,5	7,56 dd (2,0; 9,0)	121,5	7,52 dd (2,0; 8,5)
7-O-Gli						
1	100,8	5,43 d (8,0)				
2	74,8	3,22 m				
3	78,0	3,07 m				
4	70,0	3,07 m				
5	76,2	3,56 m				
6	61,5	3,32 m				
3-O-Gal						
1			101,8	5,34 d (7,5)		
2			71,2	3,64 m		
3			73,3	3,56 m		
4			70,1	3,35 m		
5			75,7	ND		
6			60,1	ND		
3-O-Gli						
1					102,0	5,32 d (7,5)
2					73,8	3,35 m
3					77,0	2,98 m
4					69,8	3,31m
5					76,0	3,20 m
6					60,0	3,61; 3,64 m

* sinais obtidos pelos experimentos gHMQC e gHMBC, ND: não detectados.

Estudo da fração aquosa obtida do EMeOH de A. triplinervia

A fração aquosa era constituída majoritariamente por uma substância polar ($R_f = 0,3$), conforme averiguado por CCDC com AcOEt/ácido acético/ácido fórmico/água (100:11:11:27, v/v), a qual foi denominada **At16**.

Identificação de At16: O espectro no IV apresentou bandas em 3376 e 1720 cm^{-1} , referentes à absorção de grupos hidroxila e carbonila (éster), respectivamente. O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 1.6, Tab. 1.10**) mostrou 3 singletos na região de hidrogênios pertencentes a sistemas aromáticos em δ 7,06 (2H), 6,68 (1H) e 6,70 (1H), sinais característicos de uma

unidade sacarídica na região de δ 4,00 a 4,96, além de um sinal correspondente a um hidrogênio anomérico em δ 6,37 ($J = 1,5$ Hz, 1H), cuja desproteção indicou que esta posição deveria estar acilada (Nonaka & Sakai & Nishioka, 1984). No espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 1.7, Tab. 1.10**) a presença de grupos galoil e hexaidroxidifenólico foi evidenciada principalmente pelos sinais característicos de carbonilas de ésteres em δ 166,6, 168,4 e 170,0 e de carbonos fenólicos na região de δ 146,3 a 137,5, indicando que **At16** era um elagitanino, além de apresentar sinais característicos de uma hexose. Experimento TOCSY-1D com irradiação em δ 6,37 ($\text{H1}''''$, $J = 3,5$ Hz) mostrou um singlete largo em δ 4,00 ($\text{H2}''''$). Irradiação do sinal em δ 4,96 ($\text{H6a}''''$) mostrou os sinais em δ 4,17 ($\text{H6b}''''$) e 4,53 ($\text{H5}''''$). O conjunto dessas informações demonstrou que a unidade sacarídica pode ser melhor interpretada em termos de uma conformação ${}^1\text{C}_4$ da unidade de glicose (Nawwar & Hussein & Merfort, 1994), tendo em vista que a pequena J entre $\text{H1}''''$ - $\text{H2}''''$ é compatível com o arranjo *equatorial-axial* para esses hidrogênios. No experimento gHMBC (**Tab. 1.10**) as correlações do sinal δ 166,6 ($\text{C7}''$) com 6,37 ($\text{H1}''''$) e 7,06 ($\text{H2}''$) indicaram que a unidade galoil estava conectada ao hidrogênio anomérico. Correlação entre os sinais em δ 4,96 ($\text{C6b}''''$)/170,0 (C7), juntamente com o sinal desprotegido de $\text{C3}''''$ (δ 71,4) em relação aos demais hidrogênios carbinólicos, revelou a ligação da unidade hexaidroxidifenólico em $\text{C6}''''/\text{C3}''''$ (Latté & Kolodziej, 2000). No experimento NOESY-1D, irradiação sobre δ 6,37 mostrou interação com os sinais em δ 4,00 ($\text{H2}''''$) e 7,06 ($\text{H2}''$). Mais importante, irradiação sobre o sinal em δ 7,06 ($\text{H2}''$) mostrou correlação com δ 6,68 ($\text{H2}'$), o que evidenciou que essas duas unidades estavam posicionadas na mesma face da unidade glicosídica. O espectro de massas (modo negativo) mostrou pico da molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 633, coerente com a fórmula $\text{C}_{27}\text{O}_{18}\text{H}_{22}$. Investigação na literatura mostrou que o 1-*O*-galoil-3,6-hexaidroxidifenoilglicopiranosose (corilagina), configuração β , é bastante comum em plantas, tendo sido isolada inclusive de *A. glandulosa* (Conegero *et al.*, 2003). Desse modo, **At16**, que apresentou configuração α para glicose, foi elucidada como sendo a **isocorilagina** (**Fig. 1.19**), tanino pouco usual descrito por Latté & Kolodziej (2000).

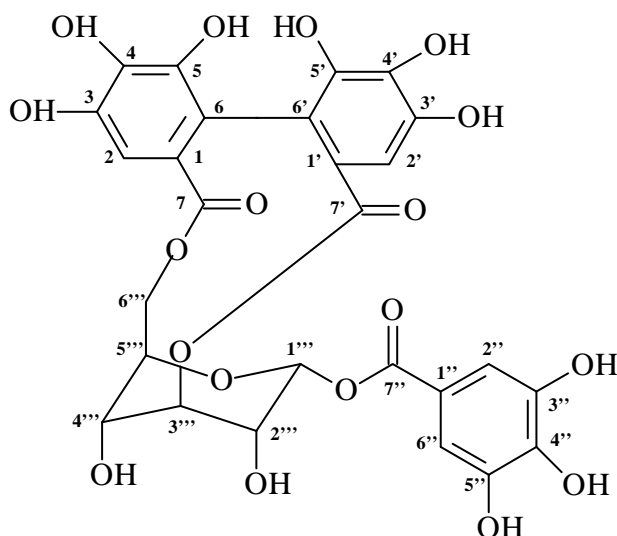


Figura 1.19. Estrutura de At16.

Tabela 1.10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) e correlações observadas no experimento gHMBC de At16.

Posição	$^{13}\text{C}^* \delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	gHMBC
hexaidroxidifenoil			
1	125,5*	-	-
2	108,3	6,68 s, 1H	-
3	145,9	-	H2
4	137,5	-	H2
5	145,2**	-	-
6	116,6	-	H2
7	170 (C=O)	-	H2, H6b'''
1'	125,3*	-	-
2'	110,2	6,70 s, 1H	-
3'	145,5	-	H2'
4'	138,1	-	H2'
5'	145,1**	-	-
6'	117,1	-	H2'
7'	168,4	-	H2'
galoil			
1''	120,5	-	H2'', H6''
2''	110,9	7,06 s, 2 H	-
3''	146,3	-	H2'', H6''
4''	140,3	-	H2'', H6''
5''	146,3	-	H2'', H6''
6''	110,9	7,06 s, 2 H	-
7''	166,6	-	H-2'', H6'', H1'''
glicose			
1'''	95,0	6,37 d (1,5), 1 H	H5'''
2'''	69,3	4,00 d (1,5), 1H	H3''', H1'''
3'''	71,4	4,79 m, 1H	H1''', H2''', H4''', H5'''
4'''	62,4	4,47 m, 1H	H2'', H5'''
5'''	76,1	4,53 d (8), 1 H	H1''', H6a''', H6b'''
6a'''	64,9	4,17 dd (8 e 11), 1H	H5'''
6b'''	64,9	4,96 dd (8 e 11), 1 H	H5'''

* sinais podem estar invertidos, ** sinais podem estar invertidos.

CAPÍTULO 2: *Indigofera* (Fabaceae)

A ordem Fabales inclui a família Leguminosae, que é uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, visto o grande número de espécies vegetais e a sua importância como fonte de produtos alimentares, medicinais, ornamentais e madeireiros. A família Leguminosae originalmente descrita por Antoine Laurent de Jussieu inclui 642 gêneros, nos quais estão distribuídas 18.000 espécies cosmopolitas, incluindo árvores, arbustos, lianas e ervas. Compreende 3 subfamílias, muitas vezes tratadas individualmente como famílias botânicas distintas, dependendo do arranjo sistemático adotado. De acordo com o arranjo de Kubitzki, a partir do sistema de Cronquist, são adotadas as seguintes divisões (Di Stasi & Hiruma Lima, 2002):

- Caesalpinioideae (Leguminosae I) ou família Caesalpiniaceae;
- Mimosoideae (Leguminosae II) ou família Momosaceae e
- Papilionoideae (Leguminosae III) ou família Fabaceae.

Para a família Fabaceae estão descritos aproximadamente 482 gêneros e cerca de 12.000 espécies de ampla distribuição mundial. Plantas desta família são ricas em flavonóides, alcalóides, terpenos e saponinas (Harborne & Boulter & Turner, 1971), os quais possuem interessantes atividades farmacológicas comprovadas (Al Meshal *et al*, 1982).

O gênero *Indigofera*, pertencente à família Fabaceae, compreende aproximadamente 700 espécies herbáceas e arbustivas com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África, Austrália e Ásia (Moreira & Azevedo Tozzi, 1997). Na cultura tradicional essas plantas são utilizadas no tratamento de diversos problemas de saúde (Hastings, 1990), daí a grande necessidade de averiguação destas informações para maior segurança da população que frequentemente utiliza plantas medicinais. Compostos fenólicos e terpenos são os metabólitos secundários majoritários em espécies de *Indigofera*, os quais possuem interessantes atividades biológicas. Dessas plantas também é obtido o índigo, um corante natural utilizado desde a antiguidade (**Tab. 2.1**).

Tabela 2.1. Panorama químico-farmacológico de espécies de *Indigofera*.

Espécie	Substância	Atividade Farmacológica	Referência
<i>I. suffruticosa</i>	índigo [PA]	antioxidante e antiulcerogênica	Farias Silva <i>et al.</i> , 2007
		antitumoral [F]	Vieira <i>et al.</i> , 2006
		antiinflamatória, embriotoxicidade e antimicrobiana [F]	Leite <i>et al.</i> , 2003; 2004; 2006

<i>I. suffruticosa</i>		antiparasitária para plantas	Panizzi, 1992; Morris & Walker, 2002
		anemia hemolítica em gado [PA]	Barbosa Neto <i>et al.</i> , 2001
		tóxica [FT]	Ribeiro <i>et al.</i> , 1991
		estimulante do sistema nervoso central, antimicrobiana	Hastings, 1990
	pinitol, sitosterol e lousifieserone (flavona) [PA]		Dominguez, 1978a,b
	glicosídeos do ácido 3-nitropropanóico [C, R]		Garcez <i>et al.</i> , 1989; 2003
<i>I. truxillensis</i>		antioxidante e antiulcerogênica [PA]	Cola Miranda <i>et al.</i> , 2006; Barbastefano <i>et al.</i> , 2006
		antiparasitária para plantas	Panizzi, 1992; Santos & Panizzi, 1998
<i>I. oblongifolia</i>	sitosterol, sitosterol 3- <i>O</i> -glucopiranosídeo, lupeol 3-coumaroil <i>N</i> -acetil-homoveratrilamina, ácido ursólico, 7- <i>O</i> -metileriodictiol, crisocriol-7- <i>O</i> -glucopiranosídeo		Sharif <i>et al.</i> , 2006
		antibacteriana	Awadh-Ali <i>et al.</i> , 2001
	peptídios	antibacteriana e fungicida	Umar-Dahot, 1999
<i>I. hetrantha</i>	hetrantinas A e B, 7,3',4'-triidroxiflavanona, 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavanona	inibidor da enzima lipoxigenase	Aziz-Ur-Rehman <i>et al.</i> , 2004
	4'-hidroxi-3',5,7-trimetoxiflavona, 5-hidroxi-2',4',5',7-tetrametoxiflavona, 3',5-diidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, 4',7-diidroximetoxiflavanona, 3,3',4',7-tetraidroxiflavanona, 3',4',5,7-tetraidroxiflavona 3- <i>O</i> -arabinosídeo		Aziz-Ur-Rehman <i>et al.</i> , 2005a
	lioniresinol 4,4'-bis- <i>O</i> -glucopiranosídeo (lignana), 1-[(3-metilbutanoil)floroglucinil-glucopiranosídeo e 1-[(pentanoil)-floroglucinil-glucopiranosídeo (acilfloroglucinóis)	inibidor da enzima lipoxigenase	Aziz-Ur-Rehman <i>et al.</i> , 2005b
	apigenina, acacetina, isoquercitrina, ácido ursólico e sitosterol		Thusoo & Raina & Ahmed, 1982
<i>I. heterantha</i>	ácidos protocateíco, genetíscico e <i>p</i> -metoxicinamico [F, FL]		Hasan & Waterman & Iftikhar, 1989

<i>I. hebeptala</i>	morina, isoramnetina, quercetina, fisetina, kaempferol, kaempferol-5-deoxi, ácido protocateíco, ácido gentísico, cianidina		Hasan & Farman, 1993
	kaempferol-7-alosídeo, kaempferol 3,7-diarabinosídeo, kaempferol-3-arabinosil-7-rhamnosídeo e kaempferol-3-rhamnosil-7-arabinosídeo [F]		Hasan & Farman & Ahmed, 1994
	kaempferol 3- <i>O</i> -galactopiranosil-(2→1)-rhamnopiranosil-7- <i>O</i> -arabinofuranosídeo, kaempferol-3- <i>O</i> -galactopiranosil (6→1)-rhamnopiranosil-7- <i>O</i> -arabinofuranosídeo e kaempferol-7- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosídeo, kaempferol-3-arabinopiranosil-7-rhamnopiranosídeo, kaempferol-3-rhamnopiranosil-7-arabinofuranosídeo e kaempferol-7-rhamnopiranosídeo [FL]		Hasan <i>et al.</i> , 1996
<i>I. tinctoria</i>	flavonóides glicosilados e furano-flavonóides	antiipoglicemiante	Narender <i>et al.</i> , 2006
	fração indigotina [PA]	hepatoproteção	Singh <i>et al.</i> , 2001
	ácido <i>trans</i> -tetracos-15-enóico	hepatoproteção	Singh <i>et al.</i> , 2006
		antiparasitária para plantas	Morris & Walker, 2002
	tefrosina, dequelina, deidrodegulina, rotenona e sumatrol (rotenóides) [F, C, S]	antiparasitária para seres humanos	Kamal & Mangla, 1987
	apigenina, kaempferol, luteolina e quercetina [F, C]		Kamal & Mangla, 1990
	histamina		Kamal & Mangla, 1992
	rotenóides	eficiente contra larvas de <i>Anopheles stephensi</i> e <i>Callosobruchus chinensis</i>	Kamal & Mangla, 1993
		hepatoproteção [PA]	Anand & Chand & Ghatak, 1979; Anand <i>et al.</i> , 1981
<i>I. hirsuta</i>		antiparasitária para plantas	Panizzi, 1992; Morris & Walker, 2002
	kaempferol 3,5-digalactosídeo [F]		Rao <i>et al.</i> , 1984

<i>I. microcarpa</i>	taninos, flavanonas, esteróides, terpenóides e saponinas [F, C]		Lima <i>et al.</i> , 2003
	2-aril-3-metilbenzofuranos [F]		Moraes e Souza <i>et al.</i> , 1988
	2-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-3-metil-6-metoxibenzofurano e 2-(2'-hidroxi-4'-metoxifenil)-3-metil-5,6-dioximetilenebenzofurano	antimicrobiana	Moraes e Souza <i>et al.</i> , 1991
<i>I. longeracemosa</i>	acetoxi-6-butil-3-isotiocianatodecaidropirido-(2,1)-quinolina (decaidropiridoquinolina) [C]		Thangadurai & Viswanathan & Ramesh, 2001
	indigoferabietona (diterpeno) [C]	antibacteriana e ativa contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Thangadurai & Viswanathan & Ramesh, 2002
<i>I. aspalathoides</i>		antiinflamatória	Amala-Bhaskar <i>et al.</i> , 1982
		hepatoproteção	Raj Kapoor <i>et al.</i> , 2006
		antitumoral	Christina <i>et al.</i> , 2003
	indigocarpana e mucronulatol	antiinflamatória	Selvam <i>et al.</i> , 2004
	flavona glicosilada	antitumoral	Balasubramanian <i>et al.</i> , 2005; 2007
<i>I. mysorensis</i>		antiipoglicemiante	Chakrabarti <i>et al.</i> , 2006
	ácido protocateíco, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, apigenina-7,4'-diglicosídeo, apigenina-7-rhamnoglicosídeo e kaempferol-3-neoesperidosídeo [F]		Adinarayana & Sarada, 1987
<i>I. daleoides</i>		antidiarreíca	Mathabe <i>et al.</i> , 2006
<i>I. pulchra</i>		antiofídica	Abubakar <i>et al.</i> , 2006
<i>I. endecaphylla</i>		antiparasitária para plantas	Panizzi, 1992
	3-nitropropionato	tóxica (inativador da succinato desidrogenase)	Alston & Mela & Bright, 1977

<i>I. endecaphylla</i>	3-nitropropionato de etila, ácido 3-nitropropanóico, ácido succínico, metil-glucopiranosídeo, endecafilinas I, A, A1, A2, B, B1, C, C1, D, E e X (nitro compostos alifáticos)	tóxica	Finnegan & Mueller, 1965
		tóxica [S, F]	Hutton & Windrum & Kratzing, 1958a,b; Coleman & Windrum & Hutton., 1960
	ácido hiptagênico		Morris & Pagan & Warmke, 1954
<i>I. spicata</i>		antiparasitária para plantas	Morris & Walker, 2002
	hiptagina e kararina (glicosídeos do ácido 3-nitropropanóico)	problemas neurológicos em cavalos (doença de Birdsville)	Majak <i>et al.</i> , 1992
	indospicina (aminoácido) [S, F]	hepatotóxica	Hegarty & Pound, 1968, 1970
	indospicina	teratogênico	Pearn & Hegarty, 1970
	galactomanano (galactose + manose) [S]		Ford, 1969
<i>I. linnaei</i> (<i>I. enneaphylla</i>)	glicosídeos do ácido 3-nitropropanóico		Majak <i>et al.</i> , 1992
<i>I. dendroides</i>		gastrointestinal [F]	Amos <i>et al.</i> , 2003
<i>I. nummularifolia</i>		antiparasitária para plantas	Morris & Walker, 2002
<i>I. carlesii</i>	coronarina e corolina (nitro compostos alifáticos), ácido 3-nitropropionico, lupeol, ácido betulínico, sitosterol, daucosterol, estigmasterol-3-glucopiranosídeo e ácido succínico [C]		Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>I. hartwegii</i>	indicana, apigenina, rutina, hesperidina	antiespasmódica	Ortiz de Montellano & Browner, 1985
<i>I. sabulicola</i>	índigo	tóxica	Hastings, 1990
<i>I. thibaudiana</i>	índigo	tóxica	Hastings, 1990
<i>I. lespedezioides</i>		antiulcerogênica	Hastings, 1990

[PA]: partes aéreas; [F]: folhas; [FT]: frutos; [FL]: flores; [C]: cascas; [R]: raízes; [S]: sementes.

I. suffruticosa por apresentar diversas indicações terapêuticas não avaliadas e poucos estudos químicos foi selecionada para este projeto, bem como *I. truxillensis* da qual não havia avaliações químico-biológicas na literatura.

Indigofera suffruticosa Miller (syn. *I. añil* L.) é um arbusto ereto e ramificado de até 2,5 m (**Fig. 2.1**), encontrado principalmente na América do Sul (Moreira & Azevedo-Tozzi, 1997). Conhecida como anil e jiquelite, é uma planta usada contra problemas de saúde em diferentes países, possuindo atividades antiinflamatória, analgésica e digestiva indicadas por comunidades indígenas da América Central. A esta planta ainda são atribuídas propriedades febrífuga, purgante, antiespasmódica, sedativa e diurética, sendo a planta utilizada ainda no tratamento de epilepsia, problemas estomacais, icterícia, hepatite, inseticida e antiofídica (Hastings, 1990), das quais algumas foram averiguadas e comprovadas.



Figura 2.1. *Indigofera suffruticosa*.
(Adriana C. S. Moura, Botucatu, 2006)

I. truxillensis Kunth é um arbusto ereto e ramificado com até 1,5 m de altura (**Fig. 2.2**), encontrado no Brasil (cerrado de SP e MS), Peru e do México até a Bolívia (Moreira & Azevedo-Tozzi, 1997).



Figura 2.2. *Indigofera truxillensis*.
(Maira Cola-Miranda, Botucatu, 2003)

Neste projeto, das espécies de *Indigofera* foram isolados majoritariamente flavonóis e alcalóides derivados do índigo. Esta classe de alcalóides é citada em inúmeros estudos químico-farmacológicos atuais, majoritariamente na área de câncer (Guengerich *et al.*, 2004).

Pigmentos indigóides (alcalóides bis-indólicos)

Há mais de quatro milênios praticantes da medicina chinesa tradicional têm acumulado uma farmacopéia considerável que ainda é usada na China e em muitas outras partes do mundo. A última enciclopédia de medicina chinesa tradicional (1977) lista mais de 5.500 fontes naturais (82,8 % de plantas) que dão base para as 100.000-500.000 prescrições da medicina tradicional chinesa. Destas, algumas são prescritas no tratamento de câncer (Hoessel *et al.*, 1999).

Várias plantas chinesas têm proporcionado compostos com atividade antitumoral significativa. Por exemplo, a *Camptotheca acuminata* (camptotecina) e espécies de *Cephalotaxus* (homoarringtonina/harringtonina) são dois exemplos famosos. Leucemia mielocítica crônica tem sido tratada com a receita chinesa tradicional *Danggui Longhui Wan*, uma mistura de 11 ervas medicinais. Em 1966, o Institute of Haematology of the Chinese Academy of Medical Sciences identificou o princípio ativo desta mistura. A atividade foi detectada de um ingrediente, *Qing Dai*, um pó azul-escuro preparado das folhas de *Indigofera suffruticosa*, *Indigofera tinctoria* (Fabaceae), *Baphicacanthus cusia* (Acanthaceae), *Polygonum tinctorium* (Polygonaceae) e *Isatis indigotica* (Brassicaceae). Este pó continha um nível alto de corante azul índigo, mas a atividade antileucêmica foi atribuída ao corante vermelho indirubina, isômero do índigo, um componente secundário da mistura (Hoessel *et al.*, 1999).

Indigóides pertencem à classe de alcalóides bis-indólicos e são produtos naturais que têm uma longa história em razão do uso como tinturas (Ensley *et al.*, 1983). Índigo foi sintetizado em 1878 e o primeiro processo industrial foi desenvolvido em 1890 (Gillam *et al.*, 2000). Atualmente, processos envolvendo bactérias (*Escherichia coli*) são utilizados para obtenção destes corantes para uso comercial. Esses alcalóides estão sendo estudados para fins medicinais (Nam *et al.*, 2005). Alcalóides indigóides são encontrados em plantas (Maugard *et al.*, 2001), fungos (Hosoe *et al.*, 1999) e na urina humana (Gillam *et al.*, 2000). No corpo humano, o indol é produto do catabolismo do triptofano através de bactérias do intestino e é absorvido em quantidades significativas. Ele é oxidado para indoxil e excretado na urina como indoxil (3-hidroindol) sulfato. Adicional oxidação e dimerização do indoxil levam a formação dos pigmentos indigóides. Em plantas esses pigmentos são característicos das espécies *Indigofera* (África, Ásia, América do Sul), *Polygonum tinctorium* (China e Coréia) e *Isatis tinctoria* (Europa) (Maugard *et al.*, 2001). *Indigofera* e *Polygonum* contêm indicana (indoxil- β -D-glucosídeo) que é precursora dos pigmentos indigóides, enquanto *Isatis* contém isatana B (indoxil- β -cetogluconato) como material de partida da biossíntese destes metabólitos (Garcia-Macias & John, 2004). Quando as folhas envelhecem os precursores são hidrolisados e o indoxil

é oxidado espontaneamente gerando o índigo. Isatina é gerada paralelamente ao indoxil. A condensação de indoxil com isatina produz indirubina. Assim há formação de *trans*-índigo (indigotina) e *trans*-indirubina (isoindigotina), além de *cis*-índigo, isoíndigo, *cis*-indirubina (isoindirubina) (Maugard *et al.*, 2001) (**Fig. 2.3**).

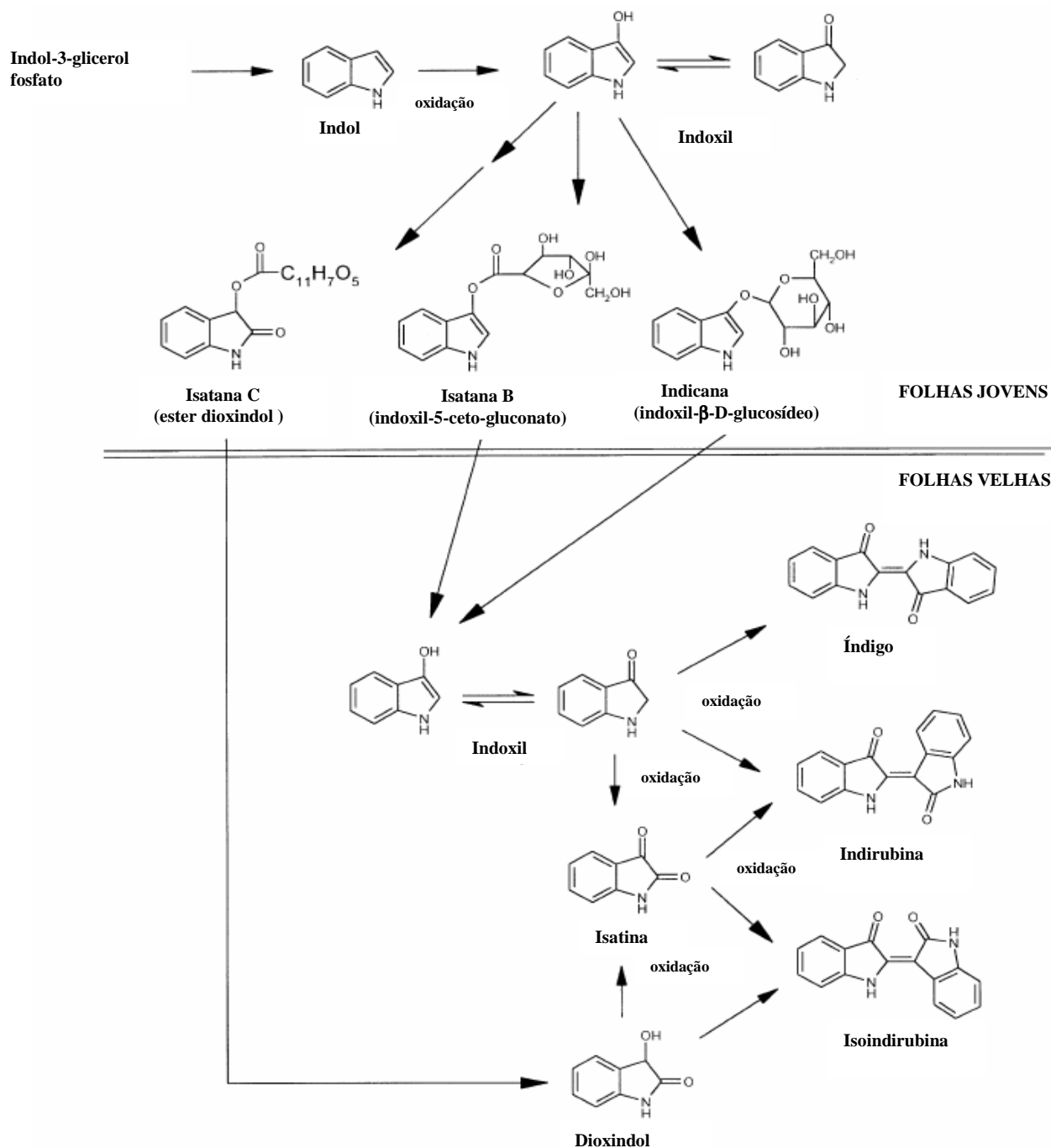


Figura 2.3. Biossíntese dos pigmentos indigóides (alcalóides bis-indólicos) em plantas (Maugard *et al.*, 2001).

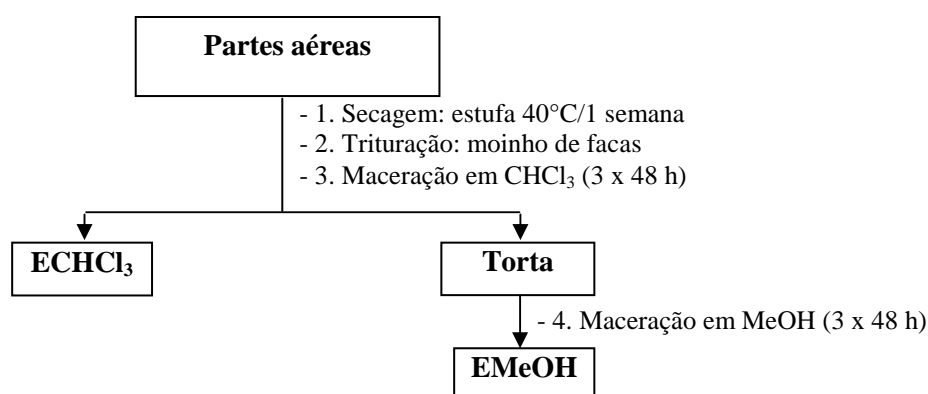
EXPERIMENTAL / RESULTADOS / DISCUSSÕES

2.1. Coletas

As partes aéreas (galhos, folhas e frutos) de *Indigofera truxillensis* (**It**) e *I. suffruticosa* (**Is**) foram coletadas na Rodovia Domingos Sartori (Botucatu-SP) por Maira Cola Miranda em junho de 2003, e identificadas pelo Prof. Jorge Y. Tamashiro. Exsiccatas de **It** e **Is** foram depositadas no Herbário da UNICAMP (Campinas-SP) com *vouchers* UEC 131.827 e UEC 129.598, respectivamente.

2.2. Secagem, moagem e extração

As partes aéreas (galhos, folhas e frutos) das espécies de *Indigofera* foram secas e moídas. Em seguida, foram preparados os extratos conforme descrito abaixo (**Fig. 2.4**).



Espécie	ECHCl ₃ (g)	EMeOH (g)
It	14,3 (2,8%)	36,5 (7,3%)
Is	6,0 (1,2%)	13,5 (2,7)

Figura 2.4. Obtenção dos extratos a partir de 500 g das partes aéreas secas de **It** e **Is**.

2.3. Estudo fitoquímico de *Indigofera truxillensis* (It)

2.3.1. Extrato clorofórmico (ECHCl₃)

Uma porção do ECHCl₃ de *I. truxillensis* foi fracionada (Fig. 2.5) por CC em sílica gel. A fração inicial era composta por uma mistura de isoprenóides, as frações seguintes levaram ao isolamento/identificação dos alcalóides It1-It2. Parte do material aplicado ficou retido na coluna.

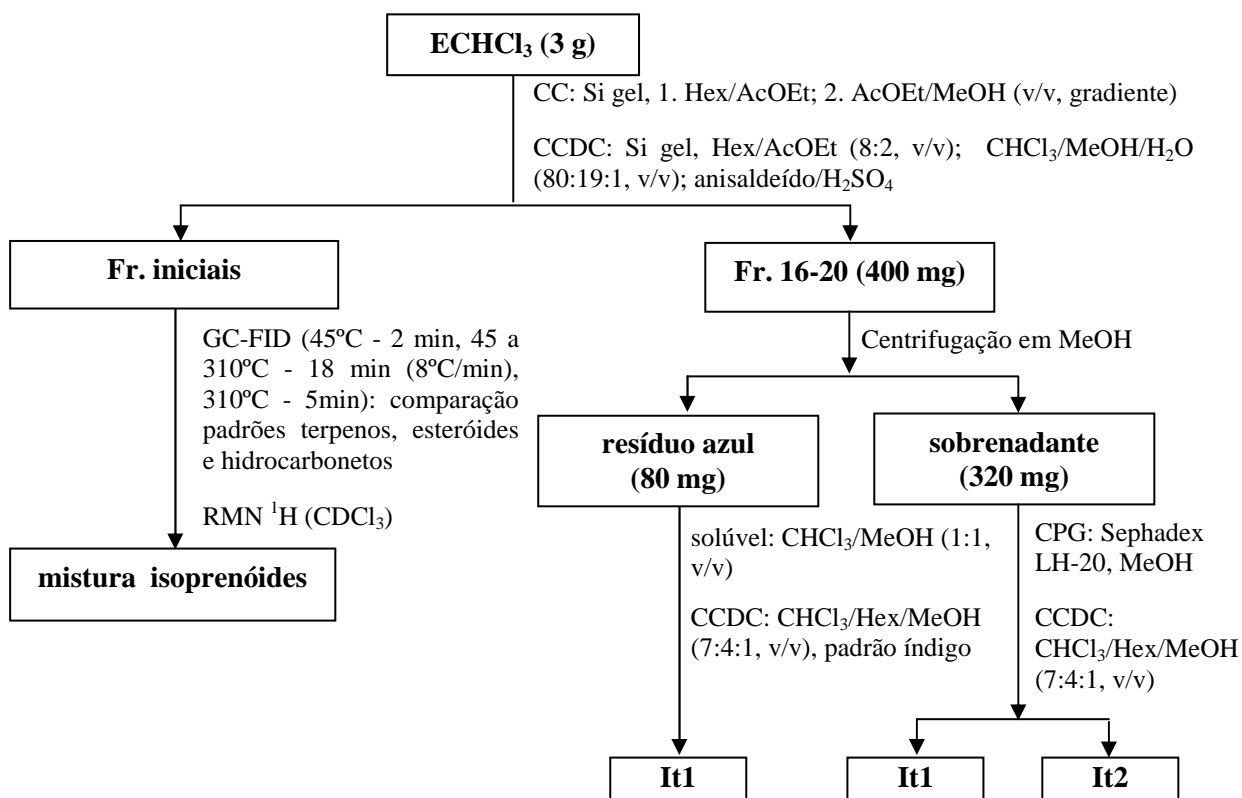


Figura 2.5. Análise fitoquímica do ECHCl₃ de *I. truxillensis*.

Identificação de It1: O resíduo da Fr. 16-20 foi solubilizado em CHCl₃/MeOH (1:1, v/v) em banho ultrassônico. A solução azul foi analisada por CCDC (CHCl₃/Hex/MeOH [7:4:1, v/v]) e comparada com um padrão de índigo e ambas apresentaram o mesmo Rf 0,75 (Fig. 2.6).

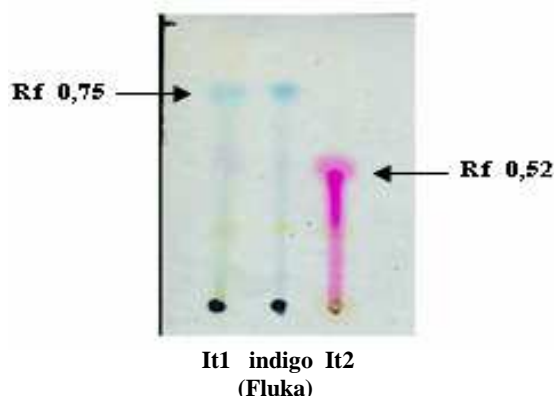


Figura 2.6. CCDC dos alcalóides isolados It1 e It2 e do índigo sintético (Fluka).

A substância **It1** era solúvel apenas em misturas de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ o que inviabilizou a realização dos experimentos de RMN. A literatura relata dificuldade na solubilização de indigóides, mas apresenta dados de RMN do índigo (indigotina) em CDCl_3 (Chanayath & Lhiochaiphant & Phutrakul, 2002). No entanto, além do índigo isolado de **It** também não foi possível solubilizar o índigo sintético (Fluka) em solventes puros.

Desse modo, **It1** foi caracterizado pela comparação de R_f 's por CCDC com padrão autêntico, MS, UV e IV. Foi obtido o espectro de massas (modo positivo) (**Espectro 2.1**) da fração azul que apresentou a molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 263,08 correspondente à fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$. O espectro no UV-VIS em DMSO (**Fig. 2.7**) apresentou bandas em 201, 231, 286, 330 e 609 nm, característico do índigo (Maugard *et al.*, 2001). No espectro no IV foram observadas bandas intensas de deformação axial de amina secundária em 3400 cm^{-1} e carbonila conjugada em 1650 cm^{-1} . Assim, **It1** foi caracterizado como sendo o índigo (indigotina) (**Fig. 2.8**).

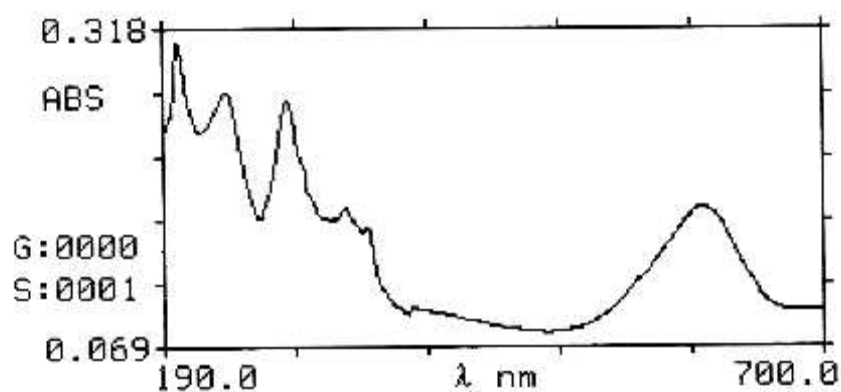


Figura 2.7. Espectro no UV do alcalóide índigo (**It1**).

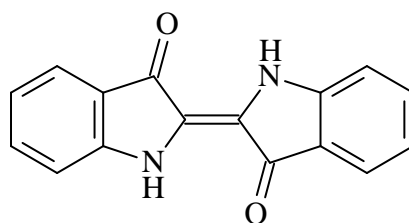


Figura 2.8. Estrutura do índigo (**It1**).

Identificação de It2: O espectro na região do IV de **It2** apresentou o mesmo perfil de bandas obtido para **It1**. O espectro de massas (modo positivo) de **It2** também foi idêntico ao obtido para **It1** (**Espectro 2.1**). O espectro na região do UV-VIS, obtido em DMSO, mostrou bandas em 191, 207, 240, 289 e 537 nm, está última característica de indirubina (**Fig. 2.9**). O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 2.2**) mostrou 10 sinais, dos quais 8 são referentes a

hidrogênios ligados a sistemas aromáticos, sendo 4 dubletos (1 H, $J = 8,0$ Hz) em δ 8,76, 7,65, 7,41, 6,90 e 3 duplo dubletos ($J = 8,0; 8,0$ Hz) em δ 7,57 (1 H), 7,25 (1 H) e 7,01 (2 H). Adição de D_2O causou o desaparecimento dos outros 2 sinais (δ 10,80 e 11,00), indicativo da presença de NH. Cabe ressaltar a existência de 2 singletos (δ 8,40 e 7,95) adicionais na região aromática que não pertencem ao sistema, o que foi constatado pelo experimento de NOESY-1D com irradiação nestes sinais, que não correlacionaram com outro sinal. Os experimentos TOCSY-1D (irradiação em δ 8,75 e 7,41) e g COSY 1H - 1H (**Espectro 2.3**) permitiram estabelecer os hidrogênios pertencentes aos dois núcleos indólicos: δ 7,65 (H4), 7,01 (H5), 7,57 (H6) e 7,41 (H7) como pertencentes ao mesmo anel aromático (A) e, conseqüentemente, os hidrogênios δ 8,76 (H4'), 7,01 (H5'), 7,25 (H6') e 6,90 (H7') ao anel aromático B. O experimento g HMQC (**Espectro 2.4, Tab. 2.2**) forneceu as interações diretas entre os carbonos e hidrogênios. As interações obtidas no experimento g HMBC (**Espectro 2.5, Tab. 2.2**) resultaram na identificação dos 8 carbonos quaternários sp^2 existentes na substância (Guengerich *et al.*, 2004). A partir dos dados espectrométricos seria possível propor 2 estruturas para **It2**, os isômeros indirubina e a isoindirubina. Os valores dos deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios e carbonos de **It2** são compatíveis com os descritos na literatura para a **indirubina**, embora as atribuições dos hidrogênios e carbonos não sejam coincidentes, inclusive entre os próprios dados da literatura (Chanayath & Lhiochaiphant & Phutrakul, 2002; Guengerich *et al.*, 2004).

O alcalóide indirubina foi sintetizado e posteriormente acetilado, conforme descrito no **Cap. 4, item 4.2**. Interpretação dos espectros mono e bidimensionais de RMN obtidos da indirubina sintética permitiu confirmar as atribuições dos carbonos e hidrogênios de **It2**, além de indicar os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários C2, C2' e C3a' como sendo δ 170,9; 138,3 e 106,5, respectivamente. Além disso, a análise dos espectros de RMN da indirubina acetilada (**T10**) corroborou a atribuição dos hidrogênios dos sistemas aromáticos A e B de **It2** (**Espectros 4.13-4.18**).

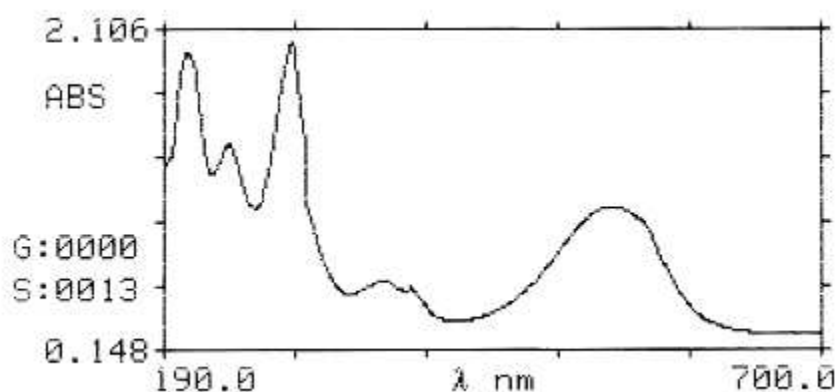


Figura 2.9. Espectro no UV do alcalóide indirubina (**It2**).

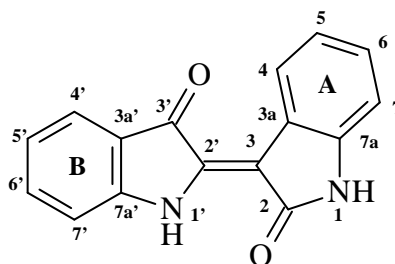


Figura 2.10. Estrutura da indirubina (It2).

Tabela 2.2. Deslocamentos químicos de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) e de ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) e correlações observadas no experimento gHMBC de It2 (Ref. Chanayath & Lhiochaiphant & Phutrakul., 2002; solvente não informado; Ref. Guengerich *et al.*, 2004; DMSO-d₆).

Posição		¹³ C* δ (ppm)	¹ H δ (ppm), J (Hz)	gHMBC	¹³ C δ (ppm) Chanayath & Lhiochaiphant & Phutrakul, 2002	¹ H δ (ppm) Chanayath & Lhiochaiphant & Phutrakul, 2002	¹ H δ (ppm) Guengerich <i>et al.</i> , 2004
1	NH	-	11,0 s	-	-	8,77	11,0 s
2	C=O	ND***	-	H4	171,5	-	-
3	C	118,6	-	H7, H5	114,0	-	-
3a	C	121,9	-	H7, H5	125,2	-	-
4	CH	124,4	7,65 d (8,0)	H6	124,9	7,41	8,76 d
5	CH	121,3	7,01 t (8,0)**	-	122,0	7,25	7,01 t
6	CH	137,2	7,57 dd (8,0; 8,0)	H4	129,8	7,25	7,25 t
7	CH	113,4	7,41 d (8,0)	H5	119,6	8,76	6,89 d
7a	C	152,4	-	H4, H6	141,0	-	-
1'	NH	-	10,8 s	-	-	4,06	10,86 s
2'	C	ND***	-	-	153,0	-	-
3'	C=O	189,0	-	-	189,0	-	-
3a'	C	ND***	-	H5', H7'	121,8	-	-
4'	CH	125,0	8,76 d (8,0)	H6'	137,6	8,30	7,66 d
5'	CH	121,2	7,01t (8,0)**	-	110,1	7,03	7,01 t
6'	CH	129,5	7,25 dd (8,0; 8,0)	H4'	138,9	7,42	7,57 t
7'	CH	109,6	6,90 d (8,0)	-	107,1	7,02	7,42 d
7a'	C	141,0	-	H4', H6'	153,0	-	-

* sinais obtidos pelos experimentos gHMQC/gHMBC, ** sinais sobrepostos, ND***: não detectado, ver texto.

2.3.2. Extrato metanólico (EMeOH)

O EMeOH foi fracionado por CPG, as frações coletadas foram analisadas por CCDC fornecendo 3 grupos de “frações enriquecidas”. As primeiras frações coletadas foram reunidas e denominadas “fr. inicial” (46,4 %). As frações intermediárias constituídas majoritariamente por flavonóides (manchas amarelas características com revelador NP-PEG) foram reunidas e denominadas “fr. flavonóides” (50,2 %). As frações finais eram coloridas (azul, rosa e tons de marrom), característica dos indigóides presentes no gênero *Indigofera* e por isso esse grupo de frações foi nomeado “fr. alcalóides” (3,2 %). Posterior purificação das frações enriquecidas resultou no isolamento e identificação de alcalóides bis-indólicos (It1-It2) e um precursor dos

mesmos (**It3**), além de um ciclitol (**It4**), flavonóis glicosilados derivados do kaempferol (**It5-It9**) e de um esteróide glicosilado (**It10**), conforme descrito abaixo (**Fig. 2.11**).

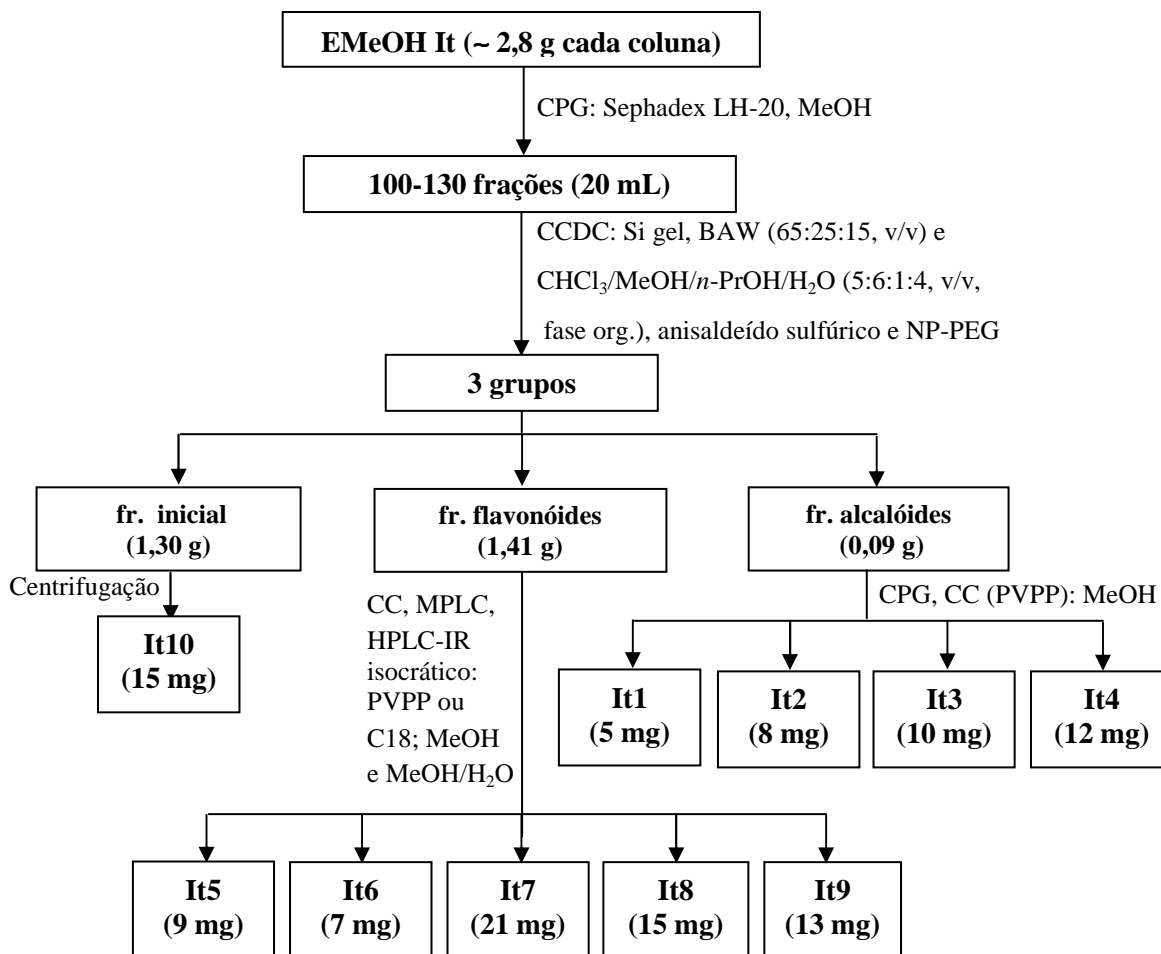


Figura 2.11. Análise fitoquímica do EMeOH de *I. truxillensis*.

Fr. Alcalóides: It1-It2

Identificação de It1-It2: análise por CCDC indicou que essas substâncias eram o **índigo** e a **indirubina**, respectivamente, também isoladas do **ECHCl₃** e descritas no item **2.3.1 (Fig. 2.8 e 2.10)**.

Identificação de It3: Essa substância mostrou duas bandas de absorção máxima no espectro na região do UV (MeOH): 218 e 280 nm. O espectro de RMN de ¹H (**Espectro 2.6**) apresentou dois dubletos definidos com $J = 8,0$ Hz (1H cada) em δ 7,61 (H4) e 7,29 (H7), um tripleto em δ 6,95 (H5, $J = 8,0$ e 15,0 Hz), além de dois sinais sobrepostos sendo, aparentemente, um singlete em δ 7,08 (H2) e um tripleto em δ 7,05 (H6, $J = 8,0$ e 15,0 Hz). O espectro mostrou ainda um singlete em δ 10,5 (H1) devido a um NH (sinal desapareceu quando adicionada D₂O ao

DMSO-d₆), um dubleto referente a hidrogênio anomérico em δ 4,59 (H1', $J = 7,5$ Hz) e sinais na região de δ 3,72-3,18 referentes aos demais hidrogênios da unidade sacarídica. O espectro de RMN de ¹³C (**Espectro 2.7**) apresentou 14 sinais, sendo 6 característicos de carbonos carbinólicos e 8 referentes a carbonos de sistema aromático. O experimento gHMQC (**Tab. 2.3**) permitiu atribuir os carbonos aos seus respectivos hidrogênios. Os experimentos TOCSY-1D, com irradiação em δ 4,59, e gCOSY ¹H-¹H permitiram identificar o açúcar como sendo a glicose. O experimento gCOSY ¹H-¹H (**Tab. 2.3**), juntamente com as constantes de acoplamento (J), auxiliou no esclarecimento das posições dos hidrogênios dos sistemas aromáticos (**Tab. 2.3**). O experimento gHMBC (**Tab. 2.3**) permitiu correlacionar todos os sinais e sugerir que **It3** seja um dos precursores dos alcalóides bis-indólicos, o **indoxil-O- β -D-glucopiranosídeo (indicana)** (**Fig. 2.12**).

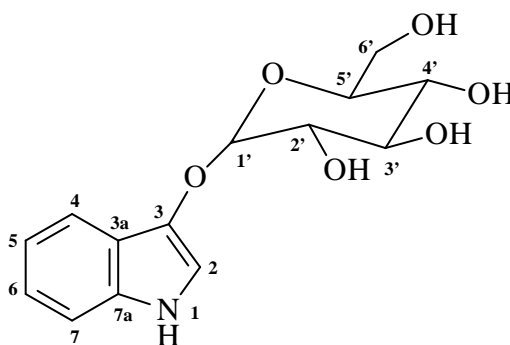


Figura 2.12. Estrutura da indicana (**It3**).

Tabela 2.3. Deslocamentos químicos de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) e de ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) e correlações observadas nos experimentos gCOSY ¹H-¹H e gHMBC de **It3**.

Posição	¹³ C* δ (ppm)	¹ H δ (ppm), J (Hz)	gCOSY ¹ H- ¹ H	gHMBC
1	N-H	10,5 s, 1H	-	
2**	111,0	7,08 s, 1H	-	H1
3	137,3	-	-	H1, H1', H2*, H4
3a	119,7	-	-	H1, H2, H5, H7*
4	117,5	7,61 d (8,0), 1 H	H5	H6
5	118,1	6,95 t (8,0), 1 H	H4, H6	H7*
6**	121,3	7,05 t (8,0), 1 H	H7	H4, H5, H7
7	111,5	7,29 d (8,0), 1 H	H6	H5
7a	133,3	-	-	H4, H6*
3-O-Gli				
1'	104,2	4,59 d (7,5), 1 H	H2'	H2'
2'	73,4	3,28 m, 1H	-	H4'
3'	76,7	3,26 m, 1H	-	H5'
4'	70,1	3,18 m, 1H	-	H3', H2'
5'	77,1	3,24 m, 1H	-	H6', H2'*
6'	61,0	3,72 e 3,50 m, 2H	H4'	-

* interações fracas; **sinais de RMN de ¹H sobrepostos.

Identificação de It4: O espectro de RMN de ^1H (Tab. 2.4) apresentou sinais referentes a 6 hidrogênios carbinólicos e a uma metila. No espectro de RMN de ^{13}C (Tab. 2.4) foram observados 6 sinais na região de δ 82,9-70,0 e outro em δ 59,9. O espectro de massas (modo negativo) apresentou como pico base a molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 193. A análise dos experimentos bidimensionais de RMN ($g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$, $g\text{HMBC}$ e $g\text{HMBC}$) levou à identificação do ciclitol **3-O-metil-chiro-inositol (pinitol)** (IUPAC, disponível em www.chem.qmul.ac.uk/iupac/cyclitol/) (Fig. 2.13).

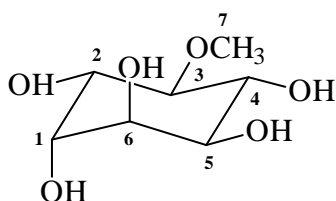


Figura 2.13. Estrutura do pinitol (It4).

Tabela 2.4. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (D_2O , 500 MHz) e de ^{13}C (D_2O , 125 MHz) e correlações observadas no experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ de It4.

Posição	$^{13}\text{C } \delta$ (ppm)	$^1\text{H } \delta$ (ppm), J (Hz)	$g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$
1*	71,9	3,95 m, 2H	H2
2	70,0	3,76 dd (9,5; 2,5), 1 H	H1; H3
3	82,9	3,29 t (9,5), 1 H	H2; H4; H7
4	72,3	3,60 t (9,5), 1 H	H3; H5
5	70,8	3,71 dd (9,5; 2,5), 1 H	H4; H6
6*	71,7	3,95 m, 2 H	H5
7 (OCH ₃)	59,9	3,54 s, 3 H	H3

* sinais de RMN de ^1H sobrepostos.

Fr. Flavanóides: It5-It9

Identificação de It5: O espectro de RMN de ^1H (Tab. 2.5) mostrou a presença de dupletos ($J = 2,0$ Hz) em δ 6,34 (1 H) e 6,15 (1 H), os quais foram atribuídos aos H8 e H6 do anel A de um flavonóide, respectivamente. Os dupletos ($J = 9,0$ Hz) em δ 7,74 (2 H) e 6,90 (2 H) foram atribuídos a H2'/H6' e H3'/H5' do anel B do flavonóide. Sendo H2'/H6' e H3'/H5' magneticamente equivalentes ficou evidente que se tratava de um derivado do kaempferol (Harborne, 1996). Também foram observados no espectro de RMN de ^1H um hidrogênio anomérico em δ 5,29 (1 H, d, $J = 1,5$ Hz) e uma metila em δ 0,79 (3 H, d, $J = 6,0$ Hz). Irradiação dos sinais em δ 5,29 e 0,79 no experimento TOCSY-1D, juntamente com as correlações observadas no experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$, levaram à identificação do sistema de *spin* da raminose. A presença de 6 sinais característicos no espectro de RMN de ^{13}C (Tab. 2.6) confirmou que o açúcar era a raminose, enquanto o experimento $g\text{HMQC}$ auxiliou na atribuição

dos sinais de hidrogênio e carbono. A raminose comumente é encontrada como piranosídeo, sendo possível as configurações β -L:1,0 Hz e α -L:2,0 Hz (Harborne, 1996); em **It5** a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico indicou a configuração α para raminose. O deslocamento químico da metila de uma unidade de raminose ligada ao C3 de um flavonóide aparece na região de δ 0,72-0,86, quando ligada à C7 absorve na região de δ 1,04-1,21 e em valores intermediários a esses quando está ligada a outras unidades de açúcares (Harborne, 1996). O sinal da metila em δ 0,79 sugeriu que a raminose estaria ligada ao C3 da aglicona. O experimento gHMBC forneceu as interações à longa distância, embora não tenha mostrado correlação entre o sinal do carbono em δ 134,1 (C3) e o sinal do hidrogênio em δ 5,29 (H1''), o deslocamento químico do C2 (δ 156,8) evidenciou que o açúcar estava ligado ao C3 da aglicona. O espectro de massas (modo negativo) apresentou o pico da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 431. A perda de uma deoxixose levou ao íon $[M - 146 - H]^-$ de m/z 285, referente ao kaempferol. Este conjunto de dados e comparação com a literatura permitiram identificar **It5** como sendo o **kaempferol 3-O- α -L-raminopiranosídeo (Fig. 2.14)**.

Identificação de It6: O espectro de RMN de ^1H (Tab. 2.5) apresentou sinais referentes a outro derivado do kaempferol monoglicosilado. Do anel B do flavonóide foram verificados H2'/H6' e H3'/H5' em δ 8,09 (2 H, $J = 9,0$ Hz) e 6,94 (2 H, $J = 9,0$ Hz), respectivamente, e os sinais de H8 em δ 6,82 (1H, $J = 2,0$ Hz) e H6 em δ 6,42 (1H, $J = 2,0$ Hz) referentes ao anel A. Irradiação do sinal em δ 5,54 (H1-Ra, $J = 1,5$ Hz), no experimento TOCSY-1D, apresentou um sinal em δ 3,85 referente ao H2 do açúcar. Ainda no experimento TOCSY-1D, a irradiação do sinal em δ 1,12 (3 H, H6-Rha, $J = 6,5$ Hz) mostrou sinais referentes aos H5 (δ 3,32), H4 (δ 3,46), H3 (δ 3,65) e H2 (δ 3,85), confirmando que se tratava da raminose (Harborne, 1996). O experimento gHMQC (Tab. 2.5, 2.6) forneceu as correlações diretas dos hidrogênios e carbonos. No experimento gHMBC a correlação a longa distância entre os sinais δ 161,7 (C7) e 5,54 (Rha-H1) evidenciou a ligação da raminose ao C7 do kaempferol. Este conjunto de dados permitiu identificar **It6** como sendo o **kaempferol 7-O- α -L-raminopiranosídeo (Fig. 2.14)**.

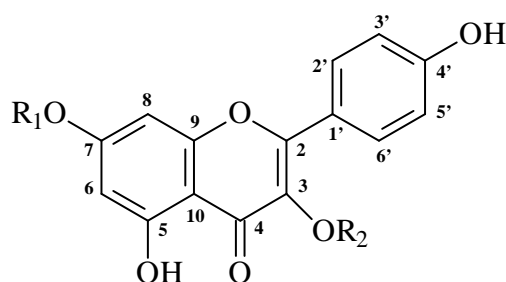
Identificação de It7: Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Tab. 2.5) apresentaram deslocamentos químicos semelhantes aos de **It5**. As principais diferenças no espectro de RMN de ^1H são referentes a um hidrogênio anomérico adicional em δ 5,54 (d, $J = 1,5$ Hz) e a mais um dubleto em δ 1,12 ($J = 6,0$ Hz), o que sugeriu uma unidade de raminose adicional ligada à aglicona de **It7**. Esses valores são compatíveis com a raminose ligada à posição 7 da aglicona,

conforme observado em **It6**. Experimentos TOCSY-1D com irradiação sobre os sinais em δ 5,54; 5,29; 1,12 e 0,81 levaram à confirmação das unidades de raminose. Os experimentos gCOSY ^1H - ^1H e gHMQC (**Tab. 2.5, 2.6**) auxiliaram na atribuição dos sinais de hidrogênio e carbono. A posição dos açúcares na aglicona foi determinada pelo experimento gHMBC, que mostrou correlação entre os sinais em δ 5,54 (Ra-1) e 161,7 (C7) e entre δ 5,29 (Ra-1) e 134,5 (C3). O espectro de massas (modo negativo) apresentou o íon m/z 577, correspondente a molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$. Perda de uma das unidades de raminose levou ao íon $[\text{M} - 146 - \text{H}]^-$ de m/z 431. Dessa forma, **It7** foi identificada como sendo o **kaempferol 3-O- α -L-raminopiranosil-7-O- α -L-raminopiranosídeo** (**Fig. 2.14**).

Identificação de It8: O padrão de substituição dos anéis A e B do flavonóide observado no espectro de RMN de ^1H indicou que se tratava de mais um derivado do kaempferol (**Tab. 2.5**). Dois hidrogênios anoméricos foram observados em δ 5,54 ($J = 1,5$ Hz) e 5,34 ($J = 5,0$ Hz). Um sinal em δ 1,11 (3 H, $J = 6,5$ Hz) indicou a possível presença de uma unidade de raminose (Harborne, 1996). O experimento TOCSY-1D com irradiação do sinal em δ 5,34 (Ara-H1) apresentou sinais intensos em δ 3,75, 3,52 e 3,65 referentes aos H2, H3 e H4 e os sinais menores δ 3,20 e 3,57 de H5a e H5b da arabinose. A constante de acoplamento de Ara-H1 indicou a configuração α -L (Harborne, 1996). Ainda no experimento TOCSY-1D, o sinal irradiado em δ 5,54 (Ra-H1) mostrou os sinais δ 3,84 (Ra-H2), 3,63 (Ra-H3), 3,41 (Ra-H4), 3,29 (Ra-H5) e 1,11 (Ra-H6) evidenciando o sistema de *spin* da raminose, para qual foi proposta a configuração α -L. O experimento gHMQC (**Tab. 2.5, 2.6**) forneceu as correlações dos hidrogênios anoméricos δ 5,34 (Ara-H1) e 5,54 (Ra-H1) com os carbonos em δ 101,2 (Ara-C1) e 98,4 (Ra-C1), respectivamente. Pelo experimento gHMBC através das correlações entre os sinais δ 133,8 (C3) e 5,34 (Ara-H1), δ 161,6 (C7) e δ 5,54 (Ra-H1) foi possível evidenciar a ligação da arabinose ao C3 e da raminose ao C7 do flavonóide. Este conjunto de dados permitiu identificar **It8** como sendo o **kaempferol 3-O- α -L-arabinopiranosil-7-O- α -L-raminopiranosídeo** (**Fig. 2.14**).

Identificação de It9: Comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios no espectro de RMN de ^1H (**Espectro 2.8, Tab. 2.5**) demonstrou que **It9** era um derivado do kaempferol 3,7-di-substituído. A principal diferença em relação aos demais flavonóides identificados em **It** foi a presença de 3 hidrogênios anoméricos: δ 5,54 (d, $J = 1,5$ Hz), 5,44 (d, $J = 4$ Hz) e 5,13 (d, $J = 2$ Hz). No espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 2.9, Tab. 2.6**) foram observados 15 sinais referentes ao kaempferol e 16 outros sinais referentes a 3 unidades

sacarídicas com carbonos anoméricos em δ 108,5, 99,1 e 98,4. O conjunto dos experimentos TOCSY-1D (**Espectro 2.10-2.13**) e gCOSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ (**Espectro 2.16**) indicaram que os açúcares eram raminose, arabinose e apiose. Com base nas constantes de acoplamento foi estabelecida a configuração α para as 3 pentoses. As correlações observadas no experimento gHMBC permitiram atribuir os hidrogênios e carbonos da substância (**Espectro 2.14**). A posição de cada uma das unidades sacarídicas no flavonóide foi determinada pelo experimento gHMBC (**Espectro 2.15**). Correlação entre o hidrogênio em δ 3,92 (Ara-H2) e o carbono em δ 108,5 (Api-C1) evidenciou a ligação 2 \rightarrow 1 entre arabinose e apiose. Comparação da parte sacarídica com dados da literatura (Agrawal, 1989) permitiu confirmar a presença da unidade Ara-(2 \rightarrow 1)-Api. Ainda no experimento gHMBC a correlação entre o hidrogênio em δ 5,54 (Ra-H1) e o carbono em 161,6 (C7) fixou a raminose na posição 7 do flavonóide. Embora não tenha sido possível observar a correlação do hidrogênio em δ 5,44 (Ara-H1) com o carbono em 133,8 (C3), o deslocamento químico de C2 (δ 155,8) demonstrou que a posição 3 do flavonóide estava substituída pela unidade Ara-(2 \rightarrow 1)-Api. O espectro de massas (modo negativo, **Espectro 2.17**) mostrou o íon m/z 695, correspondente à molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$. O fragmento de m/z 431 indicou a clivagem da unidade Arabinose(2 \rightarrow 1)Apiose $[\text{M} - 246 - \text{H}]^-$. Subseqüente perda de uma unidade de raminose levou ao íon de m/z 285, correspondente a aglicona $[\text{M} - 264 - 146 - \text{H}]^-$. Assim, **It9** foi identificado como sendo o novo **kaempferol 3-O-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-O- α -L-raminopiranosídeo (Fig. 2.14).**



R_1	R_2	Flavonóides
H	α -L-raminopiranosil	It5
α -L-raminopiranosil	H	It6
α -L-raminopiranosil	α -L-raminopiranosil	It7
α -L-raminopiranosil	α -L-arabinopiranosil	It8
α -L-raminopiranosil	α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil	It9

Figura 2.14. Estruturas dos derivados do kaempferol (**It5-It9**).

Tabela 2.5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 50 MHz) de **It5**, **It6**, **It7**, **It8** e **It9**.

^1H δ (ppm), J (Hz)					
Posição	It5	It6	It7	It8	It9
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
6	6,15 d (2,0)	6,42 d (2,0)	6,44 d (2,0)	6,43 d (2,5)	6,43 d (2,5)
7	-	-	-	-	-
8	6,34 d (2,0)	6,82 d (2,0)	6,77 d (2,0)	6,81 d (2,0)	6,81 d (2,0)
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	-
2'	7,74 d (9,0)	8,09 d (9,0)	7,78 d (8,5)	8,11 dd (9,0)	8,11 d (9,0)
3'	6,90 d (9,0)	6,94 d (9,0)	6,92 d (8,5)	6,88 d (9,0)	6,88 d (9,0)
4'	-	-	-	-	-
5'	6,90 d (9,0)	6,94 d (9,0)	6,92 d (8,5)	6,88 d (9,0)	6,88 d (9,0)
6'	7,74 d (9,0)	8,09 d (9,0)	7,78 d (8,5)	8,11 dd (9,0)	8,11 dd (9,0)
7-O-Ra					
1		5,54 d (1,5)	5,54 d (1,5)	5,54 d (1,5)	5,54 d (1,5)
2		3,85 dd (1,5; 3,0)	3,85 dd (1,5; 3,0)	3,84 dd (1,5; 3,0)	3,83 dd (1,5; 3,0)
3		3,65 dd (3,0; 9,0)	3,64 dd (3,0; 9,0)	3,63 dd (3,0; 9,0)	3,62 dd (3,0; 9,0)
4		3,46 dd (9,0; 9,0)	3,44 dd (9,0; 9,0)	3,41 dd (9,0; 9,0)	3,29 dd (9,0; 9,0)
5		3,32 dd (6,5; 9,0)	3,33 dd (6,0; 9,0)	3,29 dd (6,5; 9,0)	3,85 dd (6,0; 9,0)
6		1,12 d (6,5)	1,12 d (6,0)	1,11 d (6,5)	1,11 d (6,0)
3-O-Ra					
1	5,29 d (1,5)		5,29 d (1,5)		
2	3,97 dd (1,5; 3,0)		3,99 dd (1,5; 3,0)		
3	3,47 dd (3,0; 9,5)		3,49 dd (3,0; 9,0)		
4	3,13 dd (9,5; 9,5)		3,34 dd (9,0; 9,0)		
5	3,08 dd (6,0; 9,5)		3,13 dd (5,0; 9,0)		
6	0,79 d (6,0)		0,81 d (5,0)		
3-O-Ara					
1				5,34 d (5,0)	5,44 d (4,0)
2				3,75 m	3,92 m
3				3,52 m	3,85 m
4				3,65 m	3,62 m
5				3,20; 3,57 m	3,56 m
(2→1)Api					
1					5,13 d (2,0)
2					3,77 m
3					-
4					3,54 m
5					3,35 m

Tabela 2.6. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **It5**, **It6**, **It7**, **It8** e **It9**.

^{13}C δ (ppm)					
Posição	It5	It6	It7	It8	It9
2	156,8	147,9	157,8	156,7	155,8
3	134,1	136,0	134,5	133,8	133,8
4	177,4	177,1	177,9	177,7	177,6
5	161,2	160,9	160,9	160,9	160,8
6	99,1	98,6	99,5	99,4	99,3
7	ND	161,7	161,7	161,6	161,6
8	93,9	94,1	94,5	94,5	94,5
9	156,6	155,9	156,1	155,9	156,4
10	103,5	106,7	105,8	105,6	105,5
1'	120,5	120,4	120,4	120,4	120,4
2'	130,5	129,4	130,7	131,1	130,9
3'	115,3	115,2	115,4	115,3	115,3
4'	159,9	160,5	160,1	160,3	160,1
5'	115,3	115,2	115,4	115,3	115,3
6'	130,5	129,4	130,7	131,1	130,9
7-O-Ra					
1		98,4	98,5	98,4	98,4
2		69,5	69,8	69,8	70,0
3		70,0	70,3	70,2	70,2
4		69,3	71,1	70,0	71,6
5		71,2	70,1	71,5	69,9
6		17,7	17,5	17,8	19,0
3-O-Ra					
1	101,7		101,9		
2	70,3		70,3		
3	70,5		70,1		
4	71,1		71,6		
5	70,0		70,7		
6	17,4		17,9		
3-O-Ara					
1				101,2	99,1
2				70,7	75,1
3				71,6	69,8
4				65,9	65,5
5				64,2	62,9
(2→1)Api					
1					108,5
2					76,0
3					78,8
4					73,7
5					63,5

Fr. Inicial: It10

Identificação de It10: No espectro de RMN de ^1H (**Tab. 2.7**) foram observados sinais intensos na região entre δ 0,68 e 0,96 correspondentes a metilas e um singlete largo em δ 5,35 característico de hidrogênio de dupla ligação, além de um hidrogênio anomérico em δ 5,04 e demais hidrogênios referentes a uma unidade glicosídica. O espectro de RMN de ^{13}C (**Tab. 2.7**) apresentou 35 sinais com deslocamentos químicos idênticos aos descritos por Faizi *et al.* (2001) para o **sitosterol 3-O- β -glicopiranosídeo** (**Fig. 2.15**).

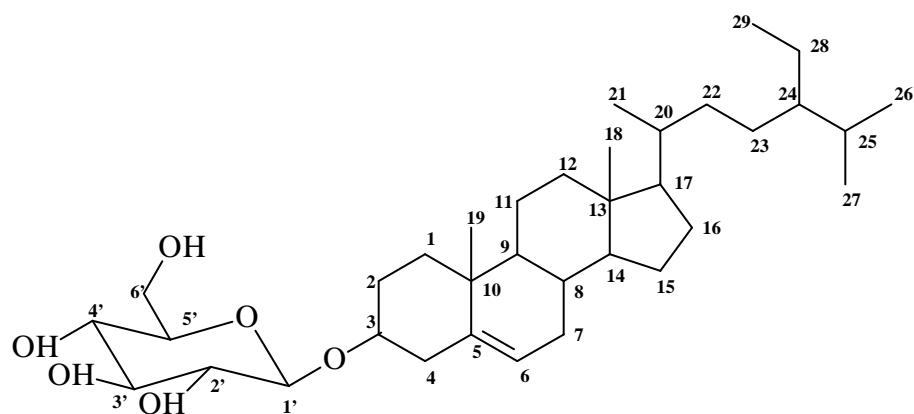


Figura 2.15. Estrutura do sitosterol 3-O-β-D-glicopiranosídeo (It10).

Tabela 2.7. Deslocamentos químicos de RMN de ¹H (D₂O, 500 MHz) e de ¹³C (D₂O, 125 MHz) de It10.

Posição	DEPT 135°	¹³ C δ (ppm)	¹ H δ (ppm)
1	CH ₂	36,9	ND
2	CH ₂	29,3	ND
3	CH	77,0	3,41
4	CH ₂	39,3	1,92
5	C	140,5	-
6	CH	121,2	5,31
7	CH ₂	31,4	ND
8	CH	31,5	ND
9	CH	49,7	2,54
10	C	37,2	-
11	CH ₂	21,8	ND
12	CH ₂	38,3	2,1
13	C	41,9	-
14	CH	56,2	3,5
15	CH ₂	23,9	ND
16	CH ₂	28,7	1,21
17	CH	55,5	ND
18	CH ₃	11,7	0,64
19	CH ₃	18,9	0,94
20	CH	35,5	ND
21	CH ₃	18,6	0,88
22	CH ₂	33,4	ND
23	CH ₂	25,5	ND
24	CH	45,2	ND
25	CH	28,8	ND
26	CH ₃	19,1	0,77
27	CH ₃	19,7	0,81
28	CH ₂	22,7	ND
29	CH ₃	11,8	0,79
	3-O-Gli		
1'	CH	100,8	4,21 d (8,0)
2'	CH	73,5	2,88 m
3'	CH	76,8	3,12 m
4'	CH	70,2	3,01 m
5'	CH	76,7	3,03 m
6'	CH ₂	62,5	2,71 m; 3,54 m

ND: não detectado.

2.4. Estudo fitoquímico de *Indigofera suffruticosa* (Is)

2.4.1. Extrato clorofórmico (ECHCl₃)

Uma alíquota (380 mg) do **ECHCl₃** de *I. suffruticosa* foi fracionando por CC (sílica gel; FM 1. hexano, 2. AcOEt). A fração hexânica foi analisada por GC-FID (coluna LM-5, 15 m x. 0,2 mm, 0,2 µm; detector: 280 °C; injetor: 280 °C; 45 °C por 2 min, 45 a 310 °C [8 °C / min], 310 °C por 5 min) e comparada com padrões de esteróides (sitosterol, estigmasterol, campesterol), triterpenos (amirina, lupeol, friedelan-3-ona, friedelan-3-ol) e hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa, existentes em nosso laboratório.

A análise do cromatograma evidenciou que o **ECHCl₃** de **Is** não continha compostos com mesmo tempo de retenção dos padrões injetados. Análise da fração AcOEt do **ECHCl₃** por CCDC (sílica gel, CHCl₃/Hex/MeOH [7:4:1, v/v]) apresentou somente 2 manchas, comparação dos t_R com alcalóides obtidos de *I. truxillensis*, indicou que se tratavam do **índigo (Is1)** e da **indirubina (Is2)**.

2.4.2. Extrato metanólico (EMeOH)

Similarmente ao procedimento executado para *I. truxillensis*, o **EMeOH** de *I. suffruticosa* foi fracionado por CPG. As frações obtidas foram analisadas por CCDC e reunidas em 3 grupos de “frações enriquecidas”: fr. inicial (45 %), fr. flavonóides (20 %) e fr. alcalóides (35 %). A purificação dessas frações possibilitou o isolamento e identificação de compostos nitrogenados (**Is1-Is6** e **Is8**), de um ciclitol (**Is7**), de flavonóis glicosilados derivados da quercetina (**Is9-13**), do ácido gálico (**Is14**) e de um esteróide glicosilado (**Is15**), conforme descrito a seguir (**Fig. 2.16**).

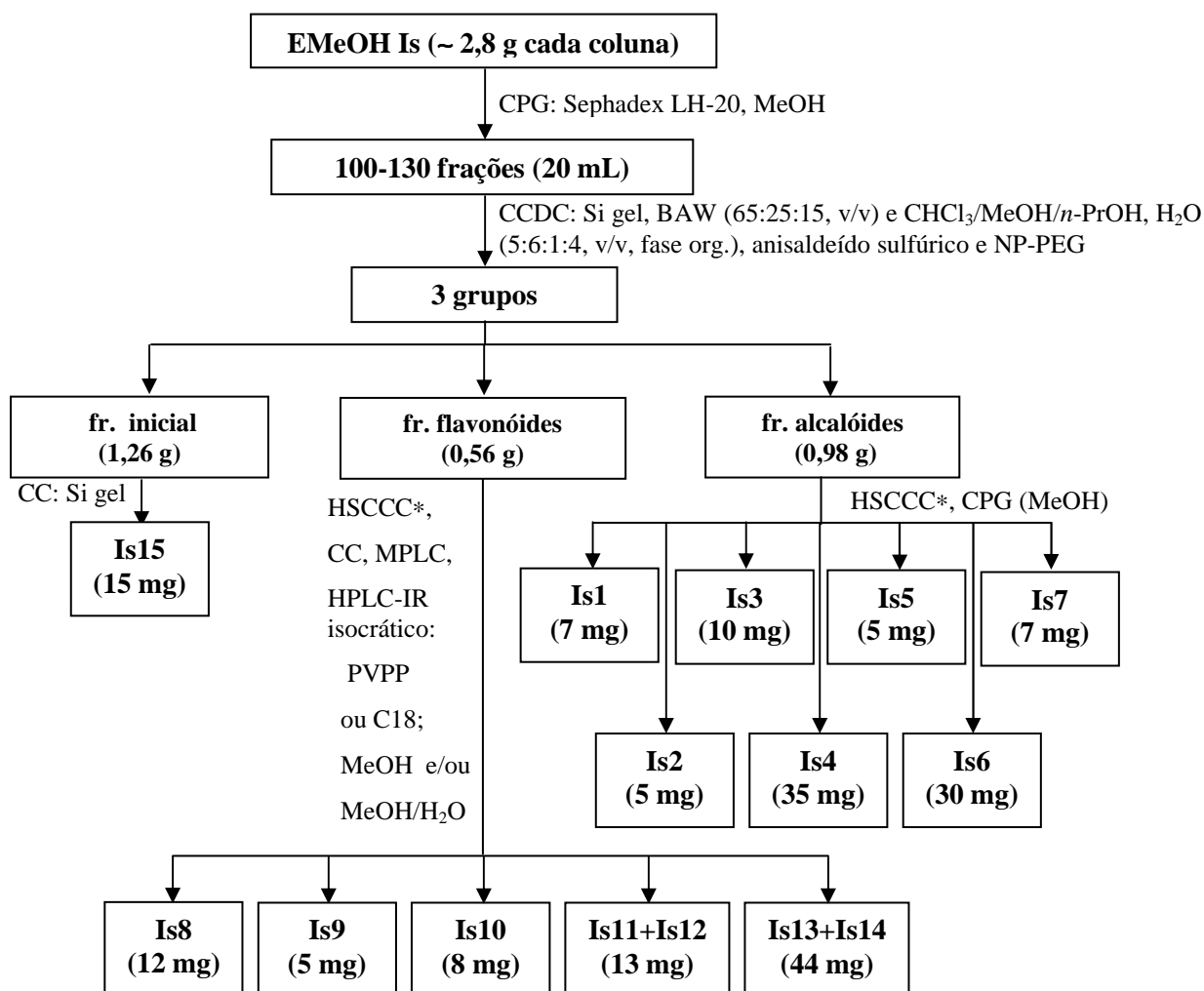


Figura 2.16. Análise fitoquímica do EMeOH de *I.suffruticosa*.

* gradiente de AcOEt/*n*-BuOH/H₂O 3,8:1,2:5,0 - 3,5:1,5:5,0 (v/v), FM: fase orgânica; 850 rpm; fluxo 1 mL/min.

Fr. Alcalóides: Is1-Is7

A Fig. 2.17 apresenta fotografias de uma coluna de sephadex do EMeOH, na qual é possível observar a eluição da fração flavonóides, seguida pela fração alcalóides [A]. Esta última fração é constituída por 4 faixas de substâncias/cores na coluna: azul (índigo, Is1), rosa (indirubina, Is2), marrom claro e marrom escuro (Is3) [B].

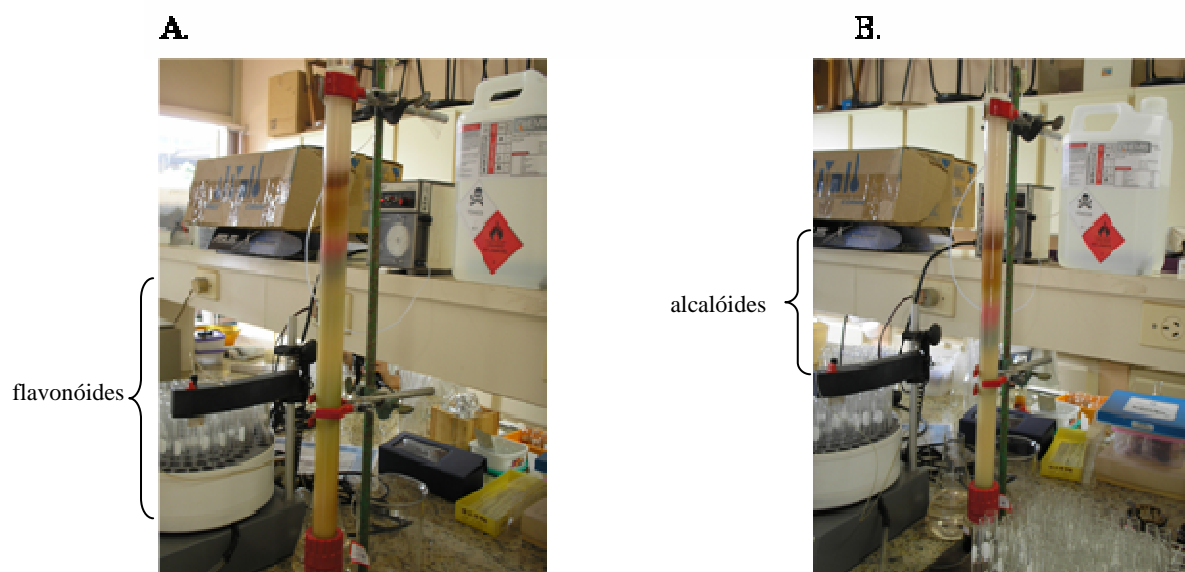


Figura 2.17. Fracionamento por CPG do EMeOH de *I. suffruticosa*.

Identificação de Is1: Comparações dos valores de fator de retenção (R_f) em placa cromatográfica e espectros no UV de **Is1** (mancha azul na coluna, **Fig. 2.17**) com o alcalóide **It1** (**Fig. 2.6-2.8**) demonstraram que se tratava do mesmo composto, o **índigo** (indigotina). O espectro de massas de **Is1** também foi idêntico ao obtido para o **índigo** (**It1**) (**Espectro 2.1**).

Identificação de Is2: A fração de coloração rosa apresentou $R_f = 0,52$, o mesmo da **indirubina It2** (**Fig. 2.10**). Para averiguação **Is2** foi também analisada por RMN, apresentando os seguintes sinais no espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6): δ 8,76 (H4', d, $J = 8,0$ Hz); δ 7,65 (H4, d, $J = 8,0$ Hz); δ 6,90 (H7', d, $J = 8,0$ Hz); δ 7,41 (H7, d, $J = 8,0$ Hz); δ 7,57 (H6, t, $J = 8,0$ Hz); δ 7,25 (H6', t, $J = 8,0$ Hz); δ 7,01 (H5 e H5', t, $J = 8,0$ Hz); δ 10,80 (H1', s, NH) e δ 11,00 (H1, s, NH). Os valores dos deslocamentos e acoplamentos químicos dos hidrogênios foram similares aos encontrados para **It2** (**Tab. 2.2**) e descritos na literatura para **indirubina** (Guengerich *et al.*, 2004).

Identificação de Is3: O espectro no UV-VIS (DMSO) mostrou bandas de absorção máxima em ($\log \epsilon$): 252 (1,34), 261 (1,43), 291 (1,70), 306 (1,27) e 552 (1,40) nm. A banda de absorção em 552 nm no espectro UV-VIS é característica de alcalóides derivados da indirubina e isoindigotina (**Fig. 2.18**). O espectro na região do IV (**Espectro 2.18**) forneceu as bandas de deformação axial de amina secundária e hidroxila sobrepostas em 3404 cm^{-1} e de carbonila conjugada em 1589 cm^{-1} . A coloração não definida, marrom-avermelhada, corroborou essa hipótese de um derivado da indirubina (vermelha) ou isoindigotina (marrom). O espectro de

massas (modo negativo) (**Espectro 2.19**) mostrou pico referente à molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 325, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{14}N_2O_5$. Um fragmento de m/z 295 $[M - 30]^-$ indicou a perda da unidade metoxila, enquanto o fragmento de m/z 251 $[M - 30 - 44]^-$ sugeriu a clivagem do NHCOH do núcleo indólico A. Espectros de RMN de 1H obtidos ao longo de 1 mês (**Espectros 2.20a,b,c**) mostraram que a substância **Is3** era bastante instável, dificultando sua identificação. O espectro de RMN de 1H obtido na mesma semana do isolamento de **Is3** (**Espectro 2.20a, Tab. 2.8**) apresentou evidências de um anel aromático trissubstituído, apresentando o sinal em δ 6,47 (H5', 1 H, dd, $J = 8,5; 2,0$ Hz) que acoplava em *orto* com o sinal em δ 7,61 (H4', 1 H, d, $J = 8,5$ Hz) e em *meta* com o sinal em δ 6,54 (H7', 1 H, d, $J = 2$ Hz) caracterizando o sistema denominado B. Também foram observados singletos (1 H cada) em δ 6,99, 7,05, 7,18 e 7,95. Na região de hidrogênios de sistemas alifáticos foi observado um sinal em δ 3,86 (3 H), referente a uma metoxila. Os experimentos TOCSY-1D (**Espectros 2.21-2.23**) confirmaram essas observações. O experimento NOESY-1D (**Espectro 2.24**) com irradiação no sinal em δ 6,54 determinou a posição da metoxila em C6'. O experimento gCOSY 1H - 1H (**Espectro 2.25**) confirmou a presença de um sistema 1,2,4,5-tetrasubstituído com os hidrogênios δ 7,61 e δ 6,47, denominado sistema A. O experimento gHMQC (**Espectros 2.26 e 2.27, Tab. 2.8**) forneceu as correlações diretas entre os hidrogênios e carbonos. O sinal em δ 7,95 não apresentou correlações nos experimentos de gHMQC e gHMBC, e provavelmente era referente à NH. Devido a pouca massa e dificuldade de solubilidade não foi possível a obtenção de espectro RMN de ^{13}C . O experimento gHMBC (**Espectro 2.28, Tab. 2.8**) forneceu os acoplamentos necessários para determinação dos seguintes carbonos quaternários: δ 7,61 (H4')/152,2 (C7'a); δ 3,86 (OCH₃)/157,2 (C6'); δ 7,18 (H2)/140,6 (C7a). Um dos principais acoplamentos observados foi entre δ 7,05 (H4) e os carbonos aromáticos em δ 121,9 (C3a) e 118,4 (C3). No anel aromático B, o H4' (δ 7,61) estava desprotegido em relação a H7' (δ 7,32), indicando que estaria mais próximo da carbonila, enquanto H7' estaria próximo do NH. De acordo com os dados de RMN foi possível propor as estruturas de 3 alcalóides bis-indólicos para **Is3**, os isômeros espaciais isoindirubina, isoindigo e indirubina (**Fig. 2.1**). Comparação com dados da literatura mostrou que **Is3** não era a indirubina (Guengerich *et al.*, 2004). Em qualquer uma das duas outras possibilidades, H7 (δ 6,99) e H4 (δ 7,05) seriam singletos, o que implicaria na existência de hidroxilas nas posições 5 e 6, sugerindo que **Is3** é uma molécula inédita. O singlete em δ 7,18 foi atribuído para H2, devido ao seu acoplamento com C2 no experimento de gHMQC e com C7a no experimento de gHMBC. Para tentar esclarecer se **Is5** era um derivado do isoindigo ou da isoindirubina foi realizado o experimento de NOESY-1D, no qual as

correlações envolvem interações entre hidrogênios que estão espacialmente próximos (distâncias menores que 4 Å) (Kaiser, 2000). Na hipótese de **Is3** ser um derivado do isoindigo, H2 deveria apresentar interação espacial com H4' do anel aromático, visto que a distância entre eles é de 2,17 Å (Programa ACDLabs, ChemSketch 4.0). No caso de um derivado da isoindirubina, H2 não teria hidrogênios próximos o suficiente para interação espacial. Nesse experimento, irradiação do sinal em δ 7,18 (H2) demonstrou ausência de efeito NOE, o que sugeriu que **Is3** seria um derivado da isoindirubina. Assim, foi proposto que **Is3** seria o **6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisoindirubina** (Tab. 2.8, Fig. 2.19). O experimento de rotação ótica também foi realizado: $[\alpha]_D^{25} -23.7$ (MeOH, *c* 3.7). Como não foram encontrados dados de **Is3** na literatura serão necessários outros experimentos para confirmação desta proposta estrutural.

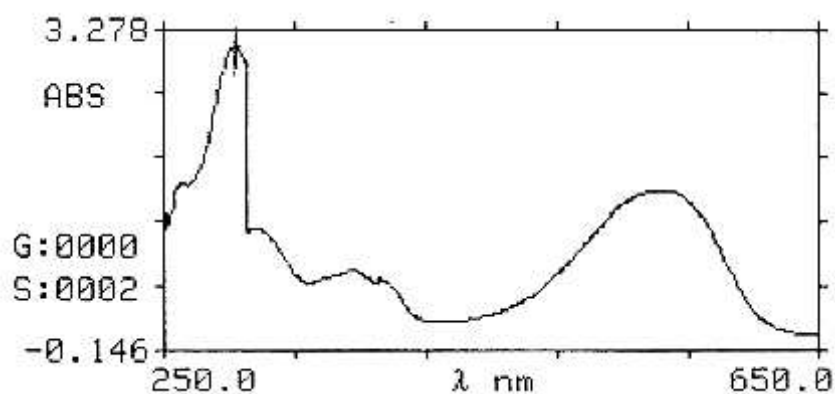


Figura 2.18. Espectro no UV do alcalóide 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisoindirubina (**Is3**).

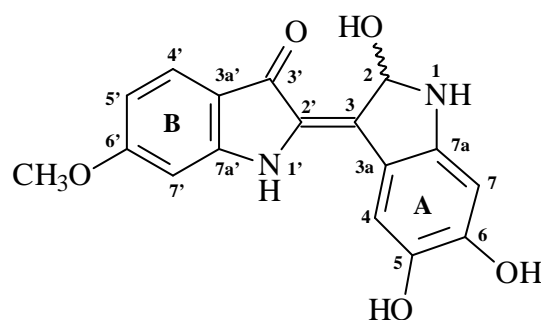


Figura 2.19. Estrutura da 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisoindirubina (**Is3**).

Tabela 2.8. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e correlações observadas no experimento gHMBC de **Is3**.

Posição		$^{13}\text{C}^* \delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	gHMBC (ppm)
1	NH	-	7,95 s	
2	CHOH	92,8	7,18 s	C7a
3	C	118,4	-	
3a	C	121,9	-	
4	CH	120,8	7,05 s	C3a; C3
5	C	ND	-	
6	C	ND	-	
7	CH	103,3	6,99 s	
7a	C	140,6	-	
1'	NH	-	7,95 s	
2'	C	ND	-	
3'	C=O	ND	-	
3a'	C	ND	-	
4'	CH	124,3	7,61 d (8,5)	C7a'
5'	CH	107,9	6,47 dd (2,0; 8,5)	
6'	C	157,2	-	
7'	CH	99,4	6,54 d (2,0)	
7a'	C	152,2	-	
OCH ₃	CH ₃	55,2	3,86 s	C6'

* sinais obtidos a partir dos experimentos gHMBC e gHMBC, ND: não detectado

Identificação de Is4: Análise do espectro de RMN de ^1H deste composto indicou que se tratava da **indicana**, um precursor dos alcalóides bis-indólicos, isolada também de *I. truxillensis* e descrita no item 2.3.2 (It3, Fig. 2.12, Tab. 2.3).

Identificação de Is5: O espectro no UV apresentou 3 bandas de absorção máxima 210, 254 e 295 nm. O espectro de RMN de ^1H (Espectro 2.29, Tab. 2.9) apresentou um singlete em δ 8,50 (H3), dupletos ($J = 8$ Hz) em δ 8,08 (H4) e δ 7,66 (H6) e um tripleto ($J = 8$ Hz) em δ 7,25 (H5) referentes a um núcleo indólico substituído, além de um duplete de hidrogênio anomérico em δ 5,60 (H1', $J = 8,5$ Hz) e sinais dos demais hidrogênios da unidade sacarídica. Experimento TOCSY-1D (Espectro 2.30) com irradiação seletiva sobre o sinal em δ 7,66 (H6), juntamente com experimentos gCOSY ^1H - ^1H (Tab. 2.9), auxiliaram na definição da constante de acoplamento dos sinais e atribuição dos hidrogênios. Irradiação do hidrogênio em δ 5,60, no experimento TOCSY-1D, permitiu a identificação da glicose. O experimento gHMBC (Espectro 2.31, Tab. 2.9) permitiu atribuir os carbonos aos seus respectivos hidrogênios. O experimento gHMBC (Espectro 2.32, Tab. 2.9) destacou as correlações à longa distância. O espectro de massas (modo negativo) mostrou o pico da molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 326, compatível com a fórmula $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_8$ e o pico base mostrando a clivagem de uma hexose $[\text{M} - 162]^-$ em m/z 164. O conjunto dos experimentos descritos acima sugeriu que **Is5** seria um derivado do dioxindol, outro precursor dos alcalóides bis-indólicos, mas neste caso, glicosilado, sendo denominado **dioxindol-3-O- β -D-glicopiranosídeo** (Fig. 2.1 e 2.20).

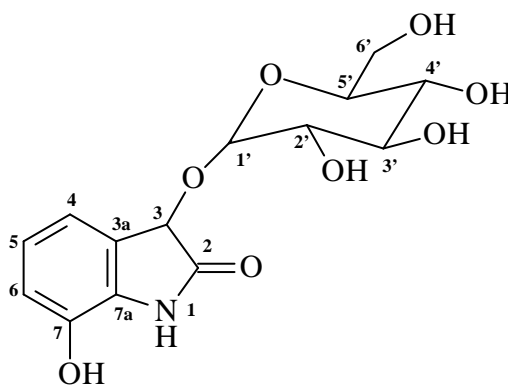


Figura 2.20. Estrutura do dioxindol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**Is5**).

Tabela 2.9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e correlações observadas nos experimentos gCOSY ^1H - ^1H e gHMBC de **Is5**.

Posição	$^{13}\text{C}^* \delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	gCOSY ^1H - ^1H	gHMBC
1	N-H	-	-	
2**	165,5 (C=O)	-	-	H4
3	121,0	8,50 s, 1 H	-	H5
3a	116,0	-	-	H5
4	131,2	8,08 d (8,0), 1 H	H5	H5, H6
5	123,2	7,25 t (8,0), 1 H	H4, H6	-
6	134,0	7,66 d (8,0), 1 H	H5	H4
7	ND	-	-	-
7a	139,5	-	-	H4, H6
3-O-Gli				
1'	95,2	5,60 d (8,5), 1 H	H2'	-
2'	72,4	3,34 m, 1H	-	H3', H4', H5'
3'	77,0	3,32 m, 1H	-	
4'	69,0	3,18 m, 1H	-	-
5'	76,2	3,22 m, 1H	-	H3'
6'	60,6	3,66 e 3,48 m, 2H	H4'	-

* sinais obtidos a partir dos experimentos gHMBC, ND: não detectado.

Identificação de Is6: O espectro de RMN de ^1H (**Tab. 2.10**) apresentou 2 dubletos (1H cada), com $J = 8,0$ Hz, em δ 6,86 (H6) e 5,23 (H5) e 2 singletos em δ 8,0 (1H) e 5,73 (2H), correspondentes a H3 e H8, respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (**Tab. 2.10**) revelou 3 sinais referentes a carbonos carbonílicos δ 173,5 (C4); 157,3 (C7); 156,7 (C2) e um sinal de carbono metínico em δ 62,4 (C5). O experimento gHMBC mostrou apenas a correlação entre δ 5,23 (H5) e 62,4 (C5), indicando que os demais carbonos observados no espectro de RMN de ^{13}C eram quaternários e que os outros sinais do espectro de RMN de ^1H eram provavelmente NH. O espectro de RMN de ^{15}N (**Tab. 2.10**) mostrou 3 sinais δ 103,0 (N3), 92,0 (N6) e 78,0 (N8) que, no experimento gHMBC (N-H), correlacionaram com os hidrogênios δ 8,00 (H3), 6,86 (H6) e 5,73 (H8), respectivamente. As correlações observadas no experimento gHMBC (C-H) e gHMBC (N-H), descritas na **Tab. 2.10** permitiram correlacionar os sinais a duas e três ligações de distância. O espectro gCOSY ^1H - ^1H apresentou correlações correspondentes aos

acoplamentos entre δ 5,23 (H5)/6,86 (NH6) e δ 5,23 (H-5)/8,00 (NH3). O conjunto desses dados permitiu deduzir que **Is5** se tratava da alantoína (**Fig. 2.21**) (Kalinowski & Berger & Braun, 1988).

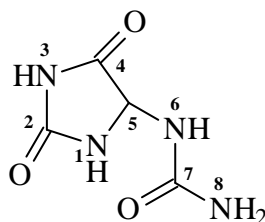


Figura 2.21. Estrutura da alantoína (**Is6**).

Tabela 2.10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz), de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e de ^{15}N (DMSO- d_6 , 125 MHz) e correlações observadas no experimento gHMBC de **Is6**.

Posição	$^{13}\text{C}^* \delta$ (ppm)	$^{15}\text{N}^* \delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	gHMBC (H-C, H-N)
1	-	ND**	10,50 s	-
2	156,7 (C=O)	-	-	H3
3	-	103,0 (NH)	8,00 s, 1H	-
4	173,5 (C=O)	-	-	H3, H5, H6
5	62,4 (CH)	-	5,23 d (8,0), 1 H	H3, H6, H8
6	-	92,0 (NH)	6,86 d (8,0), 1 H	-
7	157,3 (C=O)	-	-	H5, H6
8	-	78,0 (NH ₂)	5,73 s, 2H	-

* sinais obtidos a partir dos experimentos gHMQC (H-C e H-N), ** ND: não detectado.

Identificação de Is7: Os dados espectrais de **Is7** foram idênticos aos obtidos para **It4**, indicando se tratar da mesma substância, o ciclitol pinitol (**Fig. 2.13, Tab. 2.4**).

Fr. Flavonóides: Is8-Is14

Identificação de Is8: Esta substância é um alcalóide que eluiu juntamente com a fração flavonoídica do **EMeOH** de **Is** durante o fracionamento por CPG. A fração possuía aspecto viscoso, foi dissolvida em metanol e centrifugada formando um precipitado azul-escuro denominado **Is8**. O espectro no UV-VIS (DMSO) (**Fig. 2.22**) mostrou bandas de absorção máxima em ($\log \epsilon$): 252 (1,13), 257 (1,16), 290 (1,52), 620 (1,39) nm. A banda de absorção em 620 nm no espectro UV-VIS é característica de alcalóides derivados do índigo (azul). O espectro na região do IV (**Espectro 2.33**) forneceu as bandas de deformação axial de amina secundária e hidroxila sobrepostas em 3433 cm^{-1} e de carbonila conjugada em 1629 cm^{-1} . O espectro de massas (modo negativo) (**Espectro 2.34**) apresentou pico da molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 425,28 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$. O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 2.35, Tab. 2.11**) apresentou perfil de uma molécula aromática, apresentando hidrogênios com deslocamentos químicos (δ) semelhantes aos do índigo descrito por Guengerich

et al. (2004). Embora alguns sinais estejam sobrepostos no espectro de RMN de ^1H , experimentos TOCSY-1D (**Espectros 2.36-2.39**) permitiram estabelecer sistemas de *spins* bem definidos: δ 7,58 (d, $J = 8,0$ Hz), 6,93 (t, $J = 8,0$ Hz), 7,04 (t, $J = 8,0$ Hz) e 7,27 (d, $J = 8,0$ Hz) referentes ao sistema A; δ 7,50 (t, $J = 8,5$ Hz), 7,32 (d, $J = 8,5$ Hz), 7,60 (d, $J = 8,5$ Hz) e 6,94 (t, $J = 8,5$ Hz) pertencentes ao sistema B. Os experimentos NOESY-1D e gCOSY ^1H - ^1H corroboraram as atribuições dos hidrogênios dos sistemas A e B (**Espectros 2.41-2.42**). O experimento TOCSY-1D (**Espectro 2.40**), com irradiação sobre o sinal em δ 4,56 (d, $J = 7,0$ Hz), mostrou os sinais referentes ao sistema de *spin* da glicose. O experimento de rotação ótica também foi realizado $[\alpha]_{\text{D}}^{24} +31,8$ (MeOH, c 1.7). O conjunto dos espectros de RMN de ^{13}C (**Espectro 2.43, Tab. 2.11**) e gHMQC (**Espectros 2.44 e 2.45**) indicou a presença de 22 carbonos, 6 deles correspondentes à unidade de glicose. O experimento gHMBC (**Espectros 2.46 e 2.47, Tab. 2.11**) mostrou os acomplamentos entre $\text{C}7'/\text{H}6'$, $\text{C}5'/\text{H}7'$, $\text{C}4'/\text{H}6'$, $\text{C}6'/\text{H}4'$ (sistema A), $\text{C}4/\text{H}6$, $\text{C}6/\text{H}4$, $\text{C}5/\text{H}7$ (sistema B), $\text{C}4''/\text{H}6''$ e $\text{C}5''/\text{H}4''$ (açúcar). As correlações a longa distância também sugeriram as atribuições dos carbonos quaternários, através das correlações $\text{C}7'a/\text{H}4'$, $\text{C}7'a/\text{H}6'$, $\text{C}3a/\text{H}3$, $\text{C}7a/\text{H}3$, $\text{C}7a/\text{H}4$, $\text{C}2/\text{H}3$ e $\text{C}2/\text{H}1''$. Os sinais em δ 120,1 ($\text{C}3a$), 118,0 ($\text{C}3a'$), 133,2 ($\text{C}7a$) e 152,6 ($\text{C}7a'$) foram atribuídos aos carbonos de ligação entre os anéis de cada núcleo indólico, enquanto δ 120,7 ($\text{C}2'$) e 137,2 ($\text{C}2$) foram designados como sendo os carbonos sp^2 que unem as 2 unidades indólicas. Sinal pertencente a uma carbonila foi observado em δ 222,3 ($\text{C}3'$). Interação entre o δ 137,2 ($\text{C}2$) e o 4,56 (Gli-H1) comprovou a ligação da glicose ao C3 da substância. A partir destes dados foi proposto que **Is4** seria um derivado do alcalóide índigo (indigotina). O índigo quando não substituído é simétrico apresentando os mesmos deslocamentos químicos para ambos anéis indólicos (Guengerich *et al.*, 2004), este fato pode justificar a sobreposição dos sinais no espectro de RMN de ^1H (**Tab. 2.11**). Deste modo, para **Is8** foi proposta a estrutura **indigotina-3-O- β -D-glicopiranosídeo** (**Fig. 2.23**), a qual não foi encontrada descrita na literatura.

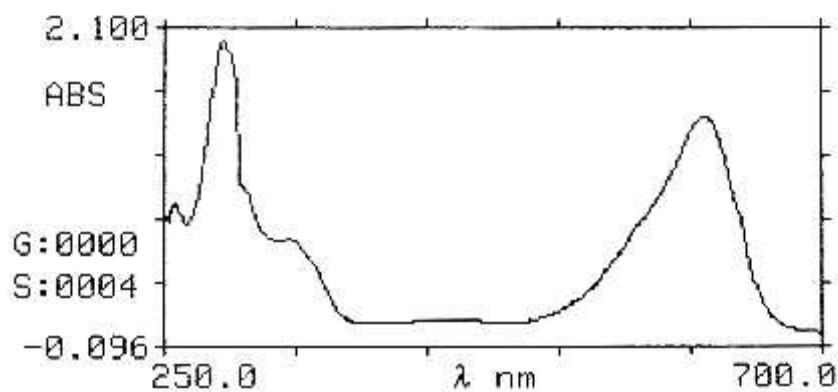


Figura 2.22. Espectro no UV do alcalóide indigotina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**Is8**).

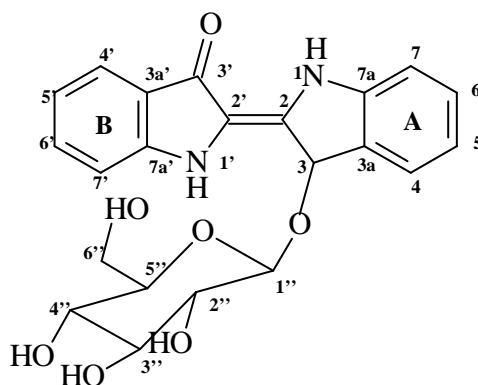

Figura 2.23. Estrutura da indigotina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (**Is8**).

Tabela 2.11. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) e correlações observadas no experimento gHMBC de **Is8**.

Posição		^{13}C δ (ppm)	^1H δ (ppm), J (Hz)	gHMBC (ppm)	^1H δ (ppm): indigotina Guengerich <i>et al.</i> , 2004
1	NH	-	10,40 s	-	10,49 s, 2H
2	C	137,2	-	-	-
3	CH	111,4	7,06 s	C3a, C7a, C2	-
3a	C	120,1	-	-	-
4	CH	117,5	7,58 d (8,0)	C6, C7a	7,60 d, 2H
5	CH	119,0	6,93 t (8,0)	-	6,94 t, 2H
6	CH	121,3	7,04 t (8,0)	C4, C5	7,50 t, 2H
7	CH	111,0	7,27 d (8,0)	-	7,32 d, 2H
7a	C	133,2	-	-	-
1'	NH	-	10,5 s	-	10,49 s, 2H
2'	C	120,7	-	-	-
3'	C=O	222,3	-	-	-
3a'	C	118,0	-	-	-
4'	CH	123,4	7,60 d (8,5)	C6', C7a'	7,60 d, 2H
5'	CH	119,6	6,94 t (8,5)	-	6,94 t, 2H
6'	CH	135,7	7,50 t (8,5)	C7', C4', C7a'	7,50 t, 2H
7'	CH	113,4	7,32 d (8,5)	C5'	7,32 d, 2H
7a'	C	152,6	-	-	-
3-O-Gli					
1''	CH	104,2	4,56 d (7,0)	C2	
2''	CH	73,4	3,30 m	-	
3''	CH	77,1	3,24 m	-	
4''	CH	70,0	3,22 m	C5''	
5''	CH	76,6	ND	-	
6''	CH ₂	60,99	3,72; 3,45 m	C4''	

Identificação de Is9: O espectro de RMN de ^1H (Tab. 2.12) mostrou sinais de uma unidade de quercetina monoglicosilada, com os dubletos ($J = 2,0$ Hz) em δ 6,11 (1 H), 6,33 (1 H) referentes aos H6 e H8 do anel A, respectivamente. Do anel B foi observado o sinal δ 7,54 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) pertencente ao H2' acoplado em *meta* com H6', o qual foi identificado pelo sinal em δ 7,55 (1H, dd, $J = 2,0$ e 9,0 Hz), indicativo de que também acoplava em *orto* com δ 6,81 referente ao H5' (1H, d, $J = 9,0$ Hz). O experimento TOCSY-1D com irradiação seletiva em δ 5,41 (d, $J = 7,5$ Hz) mostrou sinais referentes ao sistema de *spin* da glicose. O espectro de massas (modo negativo) apresentou o sinal da molécula desprotonada $[\text{M} - \text{H}]^-$ em m/z 463. Os

dados anteriores, juntamente com a análise dos experimentos bidimensionais $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$, $g\text{HMQC}$, $g\text{HMBC}$ (**Tab. 2.13**) e comparação com dados da literatura (Agrawal, 1989; Harborne, 1996) permitiram caracterizar **Is9** como sendo a **quercetina 7-O- β -D-glicopiranosídeo** (**Fig. 2.24**).

Identificação de Is10: O espectro de RMN de ^1H (**Tab. 2.12**) mostrou sinais de uma unidade de quercetina diglicosilada, com os dubletos ($J = 2,0$ Hz) em δ 6,17 (1 H) e 6,38 (1 H) atribuídos aos hidrogênios H6 e H8 do anel A, respectivamente. Os hidrogênios H2', H6' e H5' do anel aromático B foram observados em δ 7,55 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 7,65 (1H, dd, $J = 2,0$ e 8,5 Hz) e 6,84 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), respectivamente. Os dubletos dos hidrogênios anoméricos absorveram em δ 5,72 ($J = 7,5$ Hz) e 4,59 ($J = 7,0$ Hz). A seqüência dos deslocamentos químicos de cada unidade de açúcar foi obtida através de experimentos TOCSY-1D, irradiação seletiva em cada um dos hidrogênios anoméricos possibilitou individualizar os sistemas de *spins* de 2 unidades de glicose. O espectro de RMN de ^{13}C (**Tab. 2.13**) forneceu os sinais dos carbonos, os quais foram atribuídos aos hidrogênios por meio dos experimentos $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$. A correlação entre δ 4,59 (Gi-H1) e δ 82,6 (Gli-C2) demonstrou que uma unidade de glicose estava ligada à posição 2 da outra glicose, a qual estava conectada à posição 3 da quercetina como evidenciado pelo carbono C2 desprotegido (δ 156,5). Os dados da literatura (Harborne, 1986; Agrawal, 1989) corroboraram com a proposta estrutural da **quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosídeo** para **Is10** (**Fig. 2.24**).

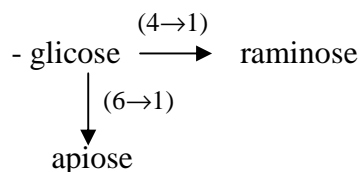
Identificação de Is11 e Is12: As informações cromatográficas juntamente com os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^1H permitiram detectar a presença de uma mistura de dois flavonóides, sendo denominados **Is11** o majoritário e **Is12** o minoritário.

Is11 foi caracterizado pelo conjunto de dados descritos a seguir: O espectro de RMN de ^1H (**Espectro 2.48, Tab. 2.12**) forneceu os dubletos ($J = 2$ Hz) em δ 6,16 (H6), 6,35 (H8), 7,51 (H2') e um dubleto ($J = 8,5$ Hz) em 6,83 (H5'), além de um duplo dubleto ($J = 8,5$ e 2,0 Hz) em 7,59 (H6'). Na região de hidrogênios anoméricos foram observados sinais intensos em δ 4,57 ($J = 7,5$ Hz) e 5,59 ($J = 7,0$ Hz) referentes às unidades sacarídicas deste flavonóide. O experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ (**Espectro 2.49**) mostrou as correlações entre os H1 (anoméricos) e os H2 das unidades de açúcar δ 4,57/3,12 e 5,59/3,47. O conjunto dos espectros de RMN de ^{13}C (**Espectro 2.50**) e $g\text{HMQC}$ (**Espectro 2.51**) evidenciou os sinais apresentados na **Tab. 2.13**. O experimento $g\text{HMQC}$ forneceu as interações diretas entre os carbonos e hidrogênios da molécula, sendo as interações dos anoméricos as seguintes: δ 4,57/104,3 e 5,59/98,6.

Experimentos TOCSY-1D permitiram identificar os sistemas de *spins* das unidades sacarídicas. Irradiação sobre o sinal em δ 5,59 (**Espectro 2.52**) mostrou 3 sinais do sistema de *spin* da galactose, um sinal maior em δ 3,47 e outros 2 sinais em δ 3,25 e 3,12. Irradiação sobre o sinal em δ 4,57 (**Espectro 2.53**) apresentou 5 sinais (δ 3,12; 3,04; 3,25; 3,67 e 3,00) correspondentes a uma unidade de xilose (Harborne, 1996; Grayer *et al.*, 2002). A partir dos valores de acoplamentos químicos (J) dos hidrogênios anoméricos foi estabelecida a configuração β para ambos açúcares. Pelo experimento gHMBC (**Espectro 2.58-2.60**) foi possível visualizar a correlação entre δ 4,57 (Xil-H1)/82,8 (Gal-C2), propondo a ligação Galactose-(2 \rightarrow 1)-Xilose. As atribuições feitas pelos experimentos de RMN são coerentes com a literatura, onde o C2 da galactose quando substituído apresenta sinal em δ 82,2, enquanto o C6 (δ 60,2) da galactose estaria livre (Agrawal, 1989). Os deslocamentos químicos (δ) da xilose nas posições C1 e C5 são característicos com sinais em δ 104,3 e 65,5, respectivamente (Agrawal, 1989; Grayer *et al.*, 2002).

Is12 foi caracterizado a partir dos dados espectrométricos abaixo: No espectro de RMN de ^1H (**Espectro 2.48, Tab. 2.12**) foram observados os dubletos ($J = 2$ Hz) em δ 6,16 (H6), 6,35 (H8) e 7,48 (H2'), um dubleto ($J = 8,5$ Hz) em δ 6,81 (H5') e um duplo dubleto ($J = 8,5$ e 2,0 Hz) em δ 7,57 (H6'). Além dos sinais δ 4,35 ($J = 1,0$ Hz), 5,32 ($J = 1,5$ Hz) e 5,46 ($J = 8,0$ Hz) de hidrogênios anoméricos. Uma unidade de raminose foi detectada pela presença de um dubleto em δ 0,95 ($J = 6,5$ Hz), referente à metila. No experimento gCOSY ^1H - ^1H (**Espectro 2.49**) foram observadas as correlações δ 5,46/3,45 e 4,35/3,34. Experimento TOCSY-1D com irradiação sobre o sinal em δ 5,46 (**Espectro 2.54**) mostrou o sistema de *spin* de uma unidade de glicose, com os sinais δ 3,45, 3,37, 3,21 e 3,04, os sinais dos H6 não foram observados devido à baixa intensidade. Ainda no experimento TOCSY-1D irradiação sobre o sinal em δ 5,32 (**Espectro 2.55**) mostrou somente um singlete em δ 3,77, característico de uma unidade de apiose. Os sinais em δ 4,35 e 0,95 (**Espectro 2.56 e 2.57**) ao serem irradiados separadamente apresentaram sinais de um mesmo sistema de *spin*, caracterizando uma unidade de raminose. As configurações dos açúcares foram atribuídas com sendo α para apiose e raminose e β para glicose. O conjunto dos espectros de RMN de ^{13}C (**Espectro 2.50**), gHMQC (**Espectro 2.51**) e gHMBC (**Espectros 2.58-2.60**) evidenciou os sinais apresentados na **Tab. 2.13**. Referente aos açúcares, as correlações importantes no experimento gHMQC (**Espectro 2.51**) foram δ 5,32/107,0 (Api-H1/C1) e 3,64/65,5 (Api-H5/C5) típicas da apiose (Grayer *et al.*, 2002), além de δ 4,35/100,5 (Ra-H1/C1) e 0,95/17,6 (Ra-H6/C6). No experimento gHMQC não foi observada correlação do sinal em δ 5,46 (Gli-H1). No entanto, o espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 2.50**,

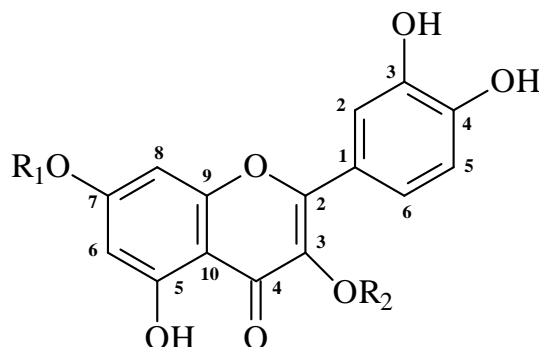
Tab. 2.13) apresentou um sinal em δ 103,8 (também sem correlação no experimento gHMQC), assim foi atribuído o conjunto δ 103,8/5,46 à Gli-H1/C1. Para os açúcares os acoplamentos mais significativos no experimento gHMBC (**Espectro 2.58-2.60**) foram δ 4,35 (Ra-H1)/68,2 (Gli-C4) e 5,32 (Api-H1)/73,7 (Gli-C5), caracterizando o sistema abaixo.



Apesar de ocorrerem em mistura e haver sobreposição de alguns sinais no espectro de RMN de ^1H , o conjunto dos experimentos mono e bidimensionais permitiu diferenciar cada um dos açúcares e determinar suas posições nas moléculas majoritária e minoritária e definindo-as como sendo **quercetina 3-O- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo (Is11)** e **quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (Is12)**, respectivamente (**Fig. 2.24**).

Identificação de Is13 e Is14: A partir dos dados espectroscópicos foi possível concluir que havia uma mistura de um flavonol diglicosilado (**Is13**) e um outro composto (**Is14**). O espectro de RMN de ^1H de **Is13+Is14** (**Tab. 2.12**) apresentou 6 sinais na região de absorção de hidrogênios de sistemas aromáticos: δ 6,18 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6,38 (1H, d, $J = 2$ Hz), 7,53 (1H, d, $J = 2$ Hz), 6,84 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), 7,55 (1H, dd, $J = 8,0$ e 2,0 Hz), evidenciando que se tratava de um derivado da quercetina, além do sinal δ 6,92 (2H, s). Os sinais δ 4,39 ($J = 1,0$ Hz), 5,34 ($J = 7,5$ Hz) e 1,00 ($J = 6,5$ Hz) indicaram a presença de 2 açúcares. Os experimentos gCOSY ^1H - ^1H e TOCSY-1D permitiram identificar as unidades sacarídicas. No experimento TOCSY, irradiação seletiva sobre os sinais em δ 5,34 e 4,39 mostrou os sinais dos sistemas de *spins* da glicose e raminose, respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (**Tab. 2.13**) apresentou sinais referentes à quercetina, às 2 unidades sacarídicas e a uma unidade de ácido gálico (Agrawal, 1989; Binutu & Cordel, 2000), os quais foram atribuídos aos respectivos hidrogênios a partir da análise das correlações do experimento gHMQC (**Tab. 2.13**). No experimento gHMBC as correlações mais importantes foram δ 3,70; 3,72 (Gli-H6a,b)/100,7 (Ra-C1) referente aos açúcares da quercetina e as do sistema aromático do ácido gálico: δ 6,92 (H2-H6) com δ 121,1 (C1), 145,4 (C3), 137,8 (C4), 144,8 (C5) e 167,7 (C6). Essas correlações indicaram que se tratava de uma mistura de **quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosídeo (rutina, Is13, Fig. 2.24)** e **ácido gálico (Is14)**. Análise por HPLC-UV-PAD (C18, H₂O [TFA 0,05 %] / ACN [TFA 0,05 %] 32-37 % em 20 min, 38-70 em 60 min e

70-100 % em 5 min; 1,0 mL/min; λ 210 nm) comprovou que o **ácido gálico (Is14)** ($t_R = 17$ min) não estava ligado a **rutina (Is9)** ($t_R = 32$ min). Posteriormente, a **rutina (Is13)** foi isolada pura.



R ₁	R ₂	Flavonóide
β-D-glicopiranosil	H	Is9
H	β-D-glicopiranosil-(2→1)-β-D-glicopiranosil	Is10
H	β-D-galactopiranosil-(2→1)-β-D-xilopiranosil	Is11
H	β-D-glicopiranosil-[(4→1)-α-L-raminopiranosil]-(6→1)-α-L-apiofuranosil	Is12
H	β-D-glicopiranosil-(6→1)-α-L-raminopiranosil	Is13

Figura 2.24. Estruturas dos derivados da quercetina (**Is9-Is13**).

Tabela 2.12. Deslocamentos químicos de RMN de ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) de **Is9, Is10, Is11, Is12 e Is13**.

Posição	¹ H δ (ppm) e J (Hz)				
	Is9	Is10	Is11	Is12	Is13
2					
3					
4					
5					
6	6,11 d (2,0)	6,17 d (2,0)	6,16 d (2,0)	6,16 d (2,0)	6,18 d (2,0)
7	-	-	-	-	-
8	6,33 d (2,0)	6,38 d (2,0)	6,35 d (2,0)	6,35 d (2,0)	6,38 d (2,0)
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
1'	-	-	-	-	-
2'	7,54 d (2,0)	7,55 d (2,0)	7,51 d (2,0)	7,48 d (2,0)	7,53 d (2,0)
3'	-	-	-	-	-
4'	-	-	-	-	-
5'	6,81 d (9,0)	6,84 d (8,5)	6,83 d (8,5)	6,81 d (8,5)	6,84 d (8,0)
6'	7,55 dd (2,0;9,0)	7,65 dd (2,0; 8,5)	7,59 dd (2,0; 8,5)	7,57 dd (2,0; 8,5)	7,55 dd (2,0; 8,0)
7-O-Gli					
1	5,41 d (7,5)				
2	3,22 m				
3	3,07 m				
4	3,07 m				
5	3,56 m				
6	3,32 m				
3-O-Gal					
1			5,59 d (7,0)		
2			3,47 m		
3			3,25 m		
4			3,12 m		
5			3,23 m		
6			3,48 m		

3-O-Gli					
1		5,72 d (7,5)		5,46 d (8,0)	5,34 d (7,5)
2		3,46 m		3,45 m	3,23 m
3		3,15 m		3,37 m	3,26 m
4		3,54 m		3,21 m	3,06 m
5		3,30 m		3,04 m	3,28 m
6		ND		3,48; 3,51 m	3,70; 3,72 m
(2→1)Xil					
1			4,57 d (7,5)		
2			3,12 m		
3			3,04 m		
4			3,25 m		
5			3,00; 3,67 m		
(4→1)Ra					
1				4,35 d (1,0)	
2				3,34 m	
3				3,33 m	
4				3,05 m	
5				3,24 m	
6				0,95 d (5,0)	
(6→1)Api					
1				5,32 d (1,5)	
2				3,77 m	
3				-	
4				ND	
5				3,64 m	
(6→1)Ra					
1					4,39 d (1,0)
2					3,42 m
3					3,28 m
4					3,08 m
5					3,30 m
6					1,00 d (6,5)
(2→1)Gli					
1		4,59 d (7,0)			
2		3,08 m			
3		3,05 m			
4		3,14 m			
5		3,26 m			
6		3,71 m			

Tabela 2.13. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de **Is9, Is10, Is11, Is12 e Is13.**

^{13}C δ (ppm)					
Posição	Is9	Is10	Is11	Is12	Is13
2	157,0	156,5	155,8	155,8	156,5
3	134,6	133,2	ND	ND	133,2
4	ND	177,7	ND	ND	177,3
5	162,3	161,2	161,6	161,6	161,2
6	99,0	98,5	98,6	98,6	98,7
7	163,8	164,5	164,1	164,1	164,5
8	94,2	93,5	93,5	93,5	93,6
9	157,2	156,4	156,6	156,6	156,4
10	104,5	103,7	104,0	104,0	103,7
1'	122,0	122,2	121,2	121,2	121,5
2'	116,8	115,8	116,0	116,0	116,2
3'	146,0	145,0	145,1	145,1	115,2
4'	149,4	148,5	148,8	148,8	148,5
5'	115,8	115,0	115,2	115,2	115,2
6'	122,5	121,0	121,7	121,7	121,0
7-O-Gli					
1	100,8				
2	74,8				
3	78,0				
4	70,0				
5	70,2				
6	61,5				
3-O-Gal					
1			98,6		
2			82,8		
3			75,8		
4			75,9		
5			75,4		
6			60,2		
3-O-Gli					
1		98,0		103,8	101,2
2		82,6		76,6	75,8
3		76,0		72,2	74,0
4		70,1		68,2	69,9
5		75,9		73,7	76,4
6		61,2		69,0	66,9
(2→1)Xil					
1			104,3		
2			75,9		
3			73,7		
4			66,4		
5			65,5		
(4→1)Ra					
1				100,5	
2				70,5	
3				70,3	
4				71,8	
5				69,4	
6				17,6	
(6→1)Api					
1				107,0	
2				75,9	
3				ND	
4				ND	
5				65,5	

(6→1)Ra					
1					100,7
2					70,5
3					70,3
4					71,8
5					68,2
6					17,6
(2→1)Gli					
1		104,5			
2		73,8			
3		77,2			
4		69,6			
5		75,9			
6		60,4			

Fr. Inicial: Is14

Identificação de Is14: O espectro de RMN de ^1H (Tab. 2.7) apresentou sinais com deslocamentos químicos idênticos aos descritos para **It10**, o **sitosterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo** (Fig. 2.15).

CAPÍTULO 3: Análises por FIA-ESI-IT-MS e HPLC-UV-ESI-IT-MS

3.1. Perfil cromatográfico do EMeOH de *Alchornea triplinervia* por FIA-ESI-IT-MS

A fim obter um perfil cromatográfico do EMeOH de *At* e tendo em vista a presença de taninos, moléculas complexas e de difícil isolamento e análise por HPLC, o extrato foi avaliado por FIA-ESI-IT-MS, ou seja, por injeção direta da amostra em espectromômetro de massas com interface electrospray e analisador de *ion-trap*. Uma alíquota (500 μ L) da amostra foi filtrada em membrana de PTFE com poro de 0,45 μ m, diluída para o volume final de 1 mL e a solução introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa infusora, com um sistema de bombeamento em fluxo de 5 μ L/min. Foi obtido espectro de massas em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas $[M - H]^-$. Fragmentação de segunda ordem (MS^2) para cada um desses íons levou à identificação de diversos metabólitos.

Esta análise permitiu postular a presença de 14 substâncias, incluindo flavonóides, proantocianidinas, derivados do ácido galoilquínico e galoilglicose. Dentre esses, 8 correspondentes a substâncias que anteriormente não haviam sido detectadas por meio dos estudos fitoquímicos (**Fig. 3.1**).

Os íons precursores de m/z 169 e 191 foram atribuídos às moléculas desprotonadas $[M - H]^-$ dos ácidos gálico e quínico, respectivamente, ambos comumente encontrados na forma polimerizada, isto é, como taninos (Salminen *et al.*, 1999).

O íon de m/z 633 $[M - H]^-$ quando refragmentado (MS^2) mostrou perdas de $[M - 170 - H]^-$ em m/z 463 e de $[M - 170 - 162 - H]^-$ em m/z 30, correspondentes à uma molécula de ácido gálico e uma unidade de glicose, respectivamente, caracterizando o elagitanino 1-*O*-galoil-3,6-hexaidroxidifenoil- α -L-glicopiranosose (**At16**) (**Fig. 3.2 e 3.5**), o que corroborou os resultados apresentados anteriormente. O íon de m/z 769 $[M - H]^-$ indicou a presença de outro tanino, a tetragaloilglicopiranosose (**Fig. 3.5**).

Fragmentação do íon de m/z 951 resultou no espectro de segunda ordem que mostrou os íons produtos de m/z 933 $[M - 18 - H]^-$ referente a perda de água e de m/z 907 $[M - 44 - H]^-$ correspondente a perda de um grupo carboxila, indicativo de que se tratava do ácido pentagaloil quínico (**Fig. 3.3 e 3.5**). O íon de m/z 965 indicou a presença do derivado do ácido pentagaloil quínico metilado (**Fig. 3.5**).

Também foram detectados polímeros de catequina, os quais são denominados proantocianidinas, com picos dos íons precursores de m/z 577 e 863, correspondentes aos dímero e trímero de proantodicianidina, respectivamente (Rodriguez, 2007) (**Fig. 3.5**).

Com relação aos flavonóides, além dos derivados da quercetina (**At10-14**), foi detectado o íon precursor de m/z 615, correspondente à molécula desprotonada $[M - H]^-$ de um derivado acilado com grupo galoil (quercetina-galoilexose) (**Fig. 3.5**). Fragmentação de segunda ordem deste íon levou ao íon produto de m/z 463 referente à perda de uma unidade galoíla $[M - 152 - H]^-$ (**Fig. 3.4**).

O ácido carboxílico da brevifolina (**At9**) foi identificado pelo íon m/z 291 da molécula desprotonada $[M - H]^-$, enquanto que a presença de seu derivado metilado pode ser postulada pela observação do íon precursor $[M - H]^-$ de m/z 305 (**Fig. 3.5**).

Na **Tabela 3.1** estão, resumidamente, os resultados obtidos após estas análises. O espectro de massas apresentou outros picos não identificados de compostos de elevado peso molecular, possivelmente taninos.

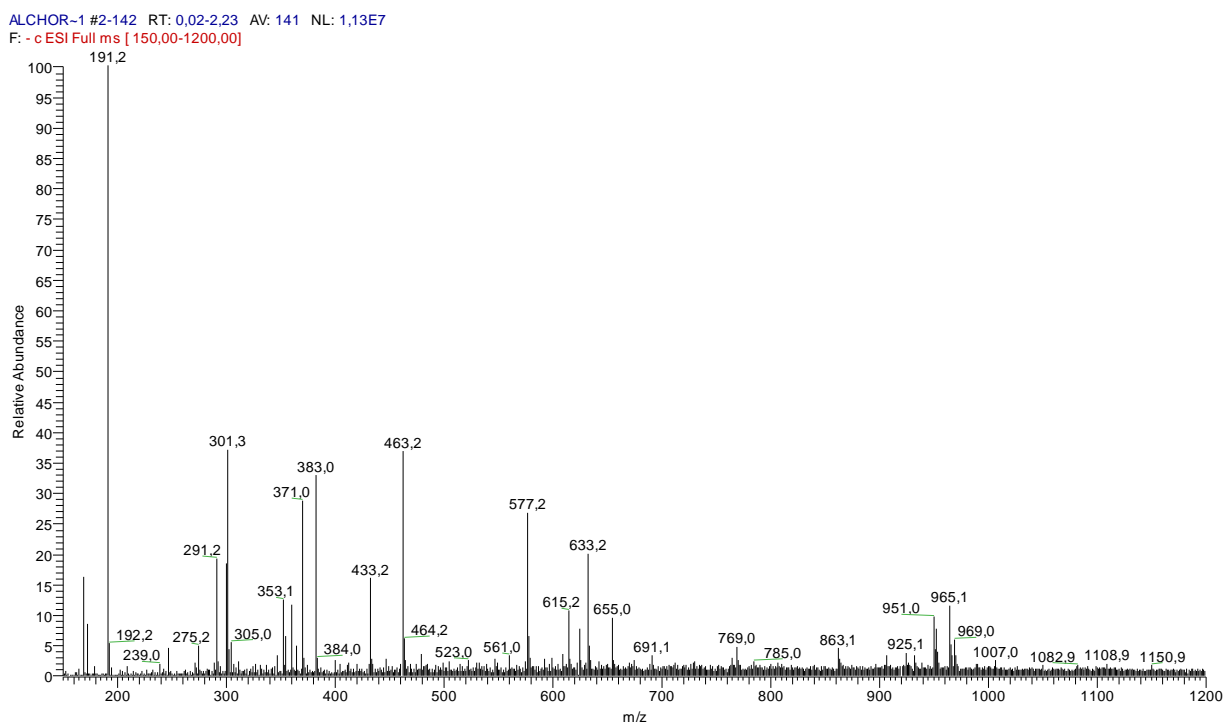


Figura 3.1. Espectro de massas de primeira ordem (*full scan*), em modo negativo, do EMeOH de At.

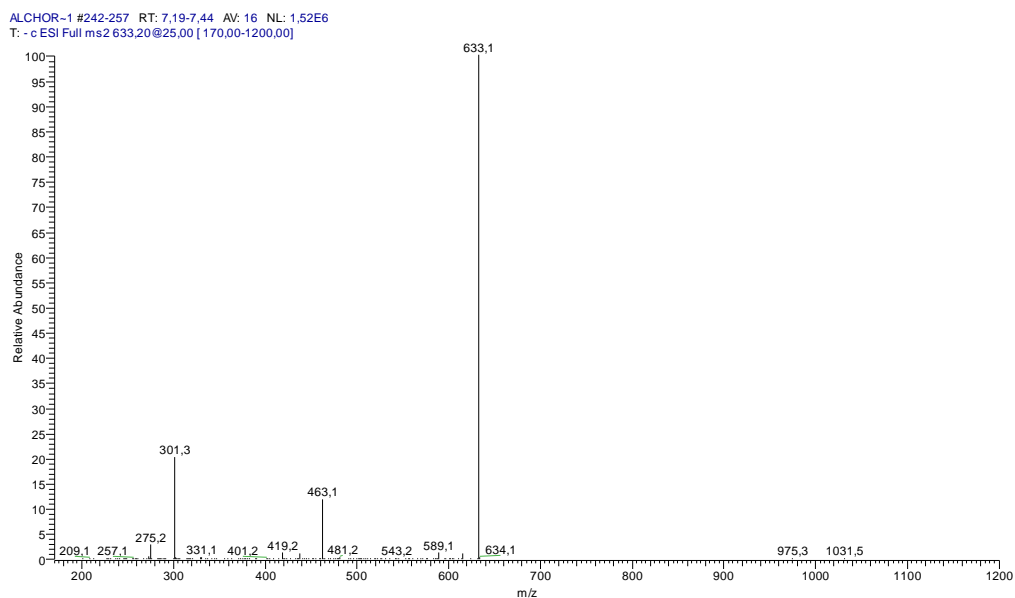


Figura 3.2. Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 633, obtido em modo negativo.

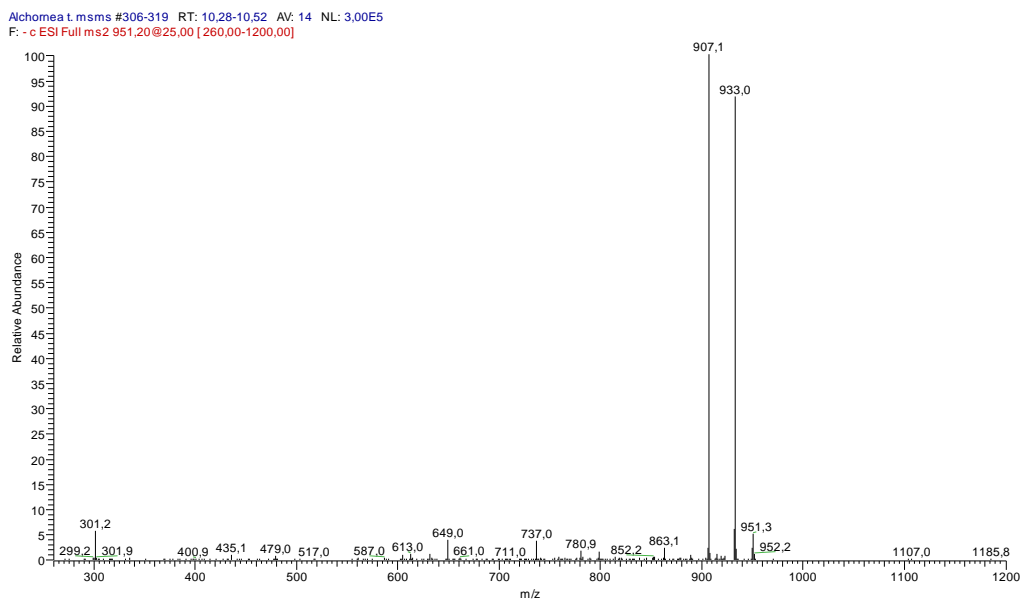


Figura 3.3. Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 951, obtido em modo negativo.

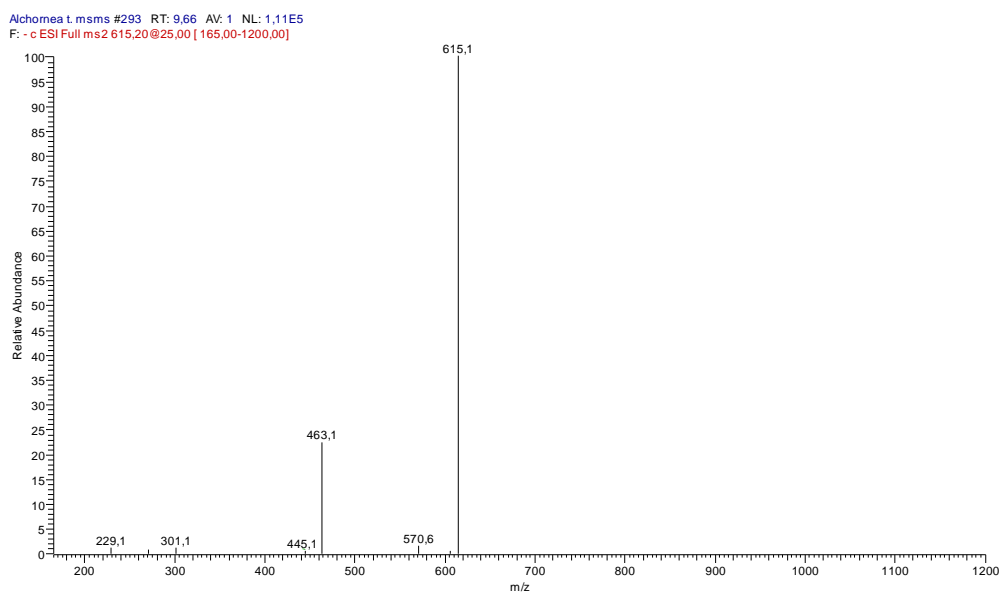


Figura 3.4. Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 615, obtido em modo negativo.

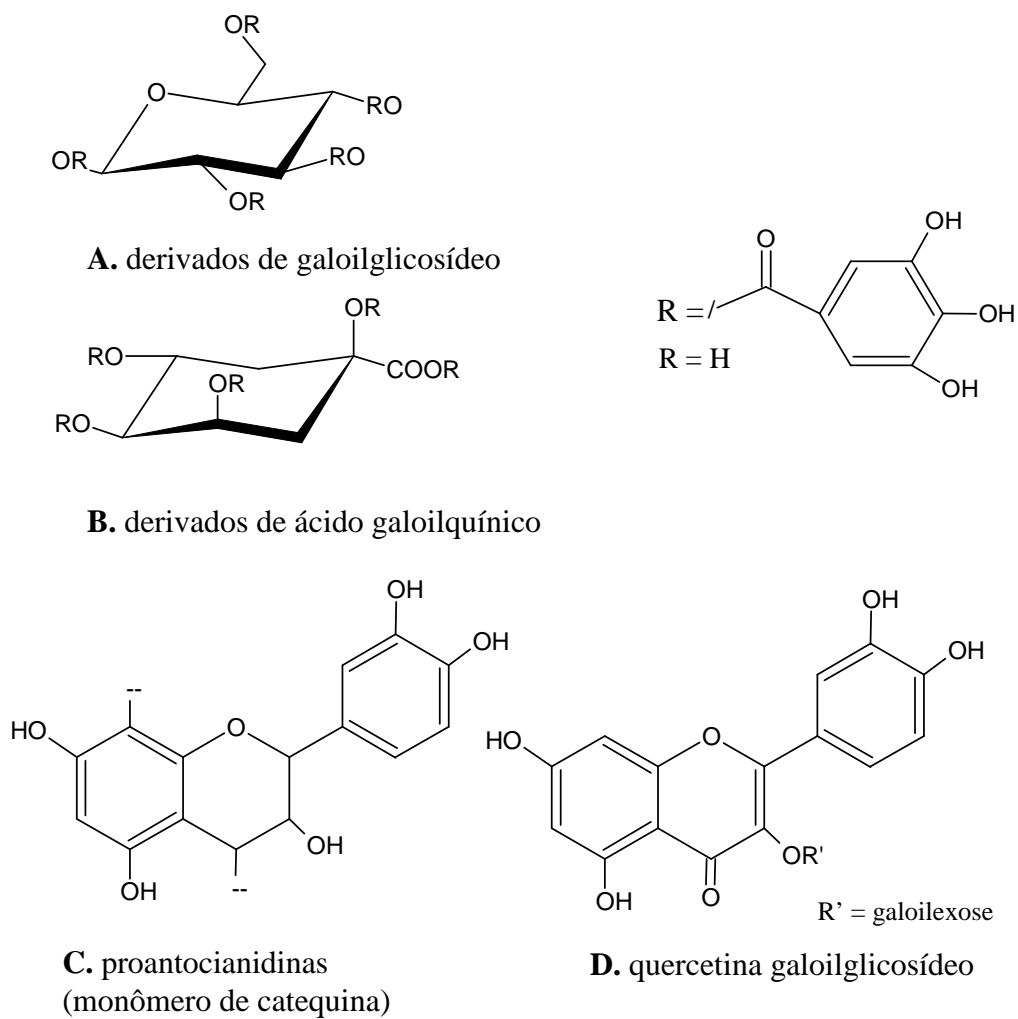


Figura 3.5. Classes de metabólitos identificadas no **EMeOH** de **At** por FIA-ESI-IT-MS.

Tabela 3.1. Substâncias detectadas por FIA-ESI-IT-MS no **EMeOH** de *At*.

[M-H] ⁻	Substâncias
169	Ácido gálico (At7)
191	Ácido quínico
291	Ácido carboxílico da brevifolina (At9)
301	Quercetina (At14)
305	Ácido carboxílico da brevifolina metilado ou metoxilado
433	Quercetina-arabinosídeo (At13)
463	Quercetina-galactosídeo; Quercetina-glicosídeo (At10-12)
577	Dímero de proantodicianidina
615	Quercetina- galoilgalactose ou Quercetina- galoilglicose
633	Hexaidroxidifenoilgaloilglicose (At16)
769	Tetragaloilglicose
863	Trímero de proantodicianidina
951	Ácido pentagaloilquínico
965	Ácido metilpentagaloilquínico

3.2. Perfil cromatográfico da fração inicial dos *EMeOH* de *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* por FIA-ESI-IT-MS

A **fração inicial** obtida a partir do **EMeOH** de *I. suffruticosa* (*Is*) foi analisada por FIA-ESI-IT-MS, visto que não foi estudada quimicamente. O espectro de massas desta fração indicou sinais de maior intensidade na região de m/z 669 a 815 (**Fig. 3.6**), os quais foram refragmentados (MS^2).

De maneira geral, os componentes presentes na **fração inicial** de *Is* parecem ser **glicerolipídeos**, ou seja, derivados do glicerol esterificados por 1-3 unidades de ácidos graxos modificados. Tendo em vista que essa classe de substâncias é muito complexa, pois os ácidos graxos podem estar ligados de diferentes maneiras à molécula de glicerol, apresentamos a seguir algumas propostas que justificam a presença dessa classe de substâncias. As análises não foram conclusivas, mas permitiram postular a presença de uma classe de metabólitos ainda pouco explorada no âmbito da Química de Produtos Naturais.

O íon precursor de m/z 721 $[M - H]^-$ quando refragmentado (MS^2) mostrou perdas consecutivas de $[M - 256 - H]^-$ em m/z 465 e de $[M - 238 - 92 - H]^-$ em m/z 483 e 391 (**Fig. 3.7**). Estes dados sugeriram que a molécula era composta por uma unidade de glicerol esterificada por unidades lipídicas $C_{14}H_{24}O_4$ e $C_{16}H_{30}O$ (**Fig. 3.8**). No entanto, não foi possível elaborar uma

proposta completa para a molécula, pois para isso seriam necessários outros experimentos de massas variando as condições de análise para obtenção de mais fragmentos. Sugerimos a presença de alguns substituintes, entretanto, suas posições na unidade de glicerol não foram determinadas, bem como a posição das ligações duplas, hidroxilas e carbonilas nas cadeias laterais. Claramente, há possibilidade de mais de uma proposta estrutural. Fragmentações de segunda ordem de vários íons detectados foram sumarizadas na **Tabela 3.2**.

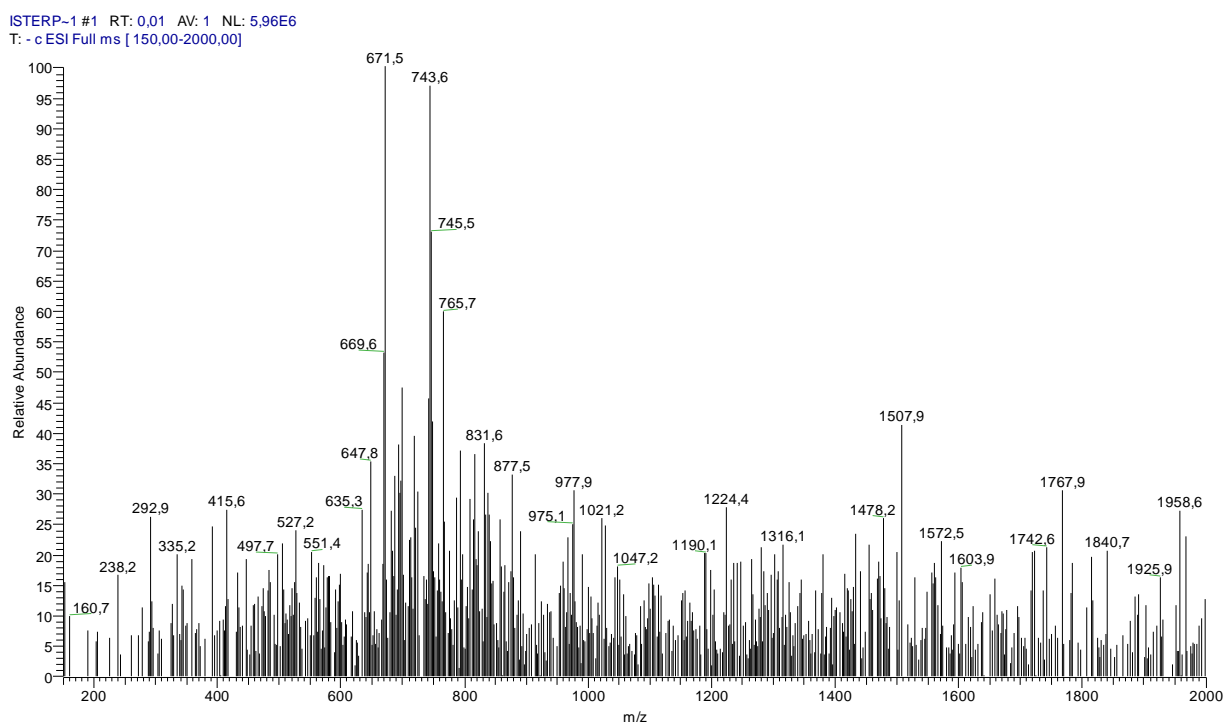


Figura 3.6. Espectro de massas de primeira ordem (*full scan*), em modo negativo, da fração inicial do **EMeOH** de **Is**.

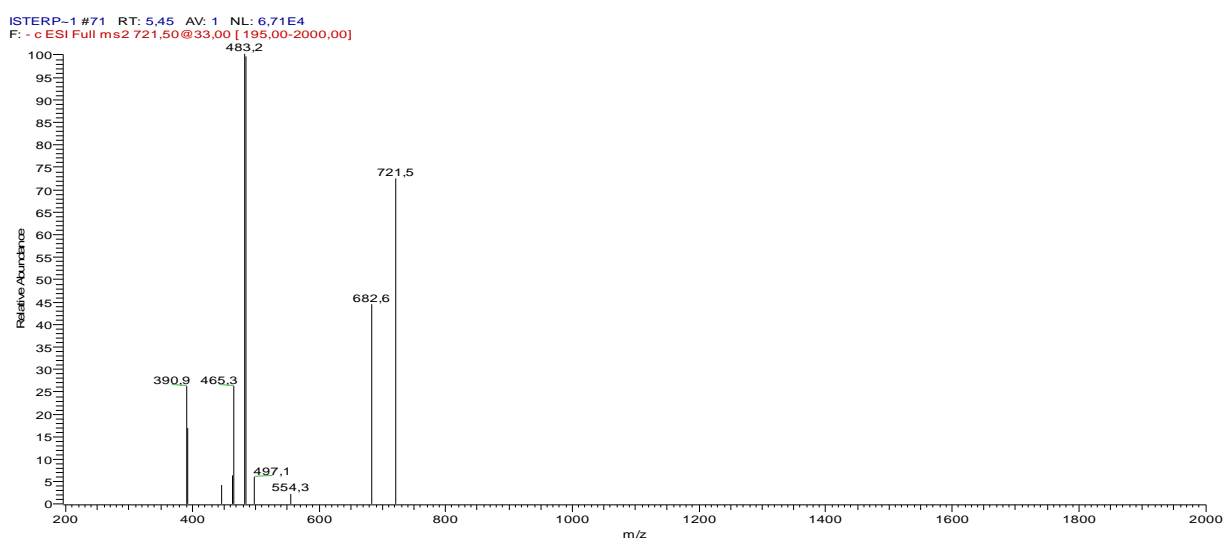


Figura 3.7. Espectro de massas de segunda ordem do íon precursor de m/z 721, obtido em modo negativo.

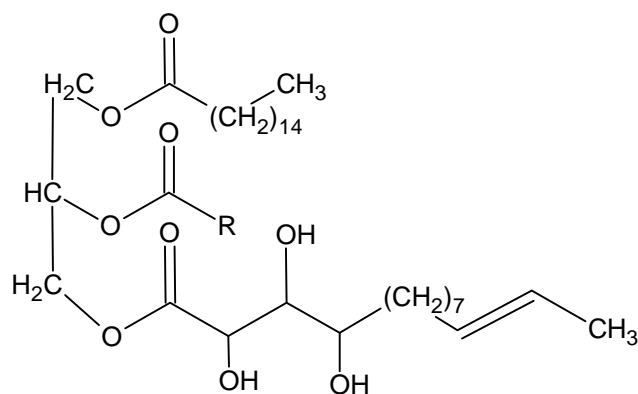


Figura 3.8. Proposta estrutural exemplificando um glicerolípido de m/z 721 presente em *Is*.

Tabela 3.2. Propostas estruturais para alguns fragmentos de glicerolípido de *I. sufruticosa* determinados por FIA-ESI-IT-MS contendo o número de grupos funcionais detectados em cada fragmento perdido.

m/z		fragmento perdido (m/z)	Número de grupos funcionais do fragmento		
[M - H] ⁻	MS ²		n° C=O	n° OH	n° C=C
669	413	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ (256)	1	3	1
	391	C ₁₈ H ₃₀ O ₂ (278)	2	-	1
671	409	C ₁₈ H ₃₀ O (262)	1	-	2
	391	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (280)	1	1	1
695	433	C ₁₈ H ₃₀ O (262)	1	-	2
	415	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (280)	1	1	1
697	417	C ₁₈ H ₃₂ O ₂ (280)	1	1	1
	415	C ₁₈ H ₃₄ O ₂ (282)	1	1	-
719	483	C ₁₆ H ₂₈ O (236)	1	-	1
	463	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ (256)	1	3	1
743	505 e 413	C ₁₆ H ₃₀ O (238) e C ₃ H ₈ O ₃ (92, glicerol)	1	-	-
	487	C ₁₄ H ₂₄ O ₄ (256)	1	3	1
745	509 e 417	C ₁₆ H ₂₈ O (236) e C ₃ H ₈ O ₃ (92, glicerol)	1	-	1
765	NF	527	1	-	-
		505	1	-	3
793	NF	537	1	3	1
		515	2	-	1
815	NF	537	1	3	1
		515	2	-	1

NF: não sofre fragmentação nas condições de Ms² empregadas.

A fração inicial obtida a partir do EMeOH de *I. truxillensis* (It) foi analisada por FIA-ESI-IT-MS do mesmo modo realizado para Is, tendo também apresentado fragmentos que justificaram propor glicerolipídeos como constituintes dessa matriz. No entanto, os espectros de massas de It apresentaram menos fragmentos que Is e com íons de m/z maiores (1028 a 1062) (Fig. 3.9). Além disso, os espectros de segunda ordem dos íons desta região apresentaram poucos fragmentos, na maioria dos casos foram observadas perdas consecutivas de água. Os íons de m/z 1062, 1048 e 1020 apresentaram fragmentos (MS^2) que permitiram propor a presença de alguns ácido graxos modificados (Tab. 3.3).

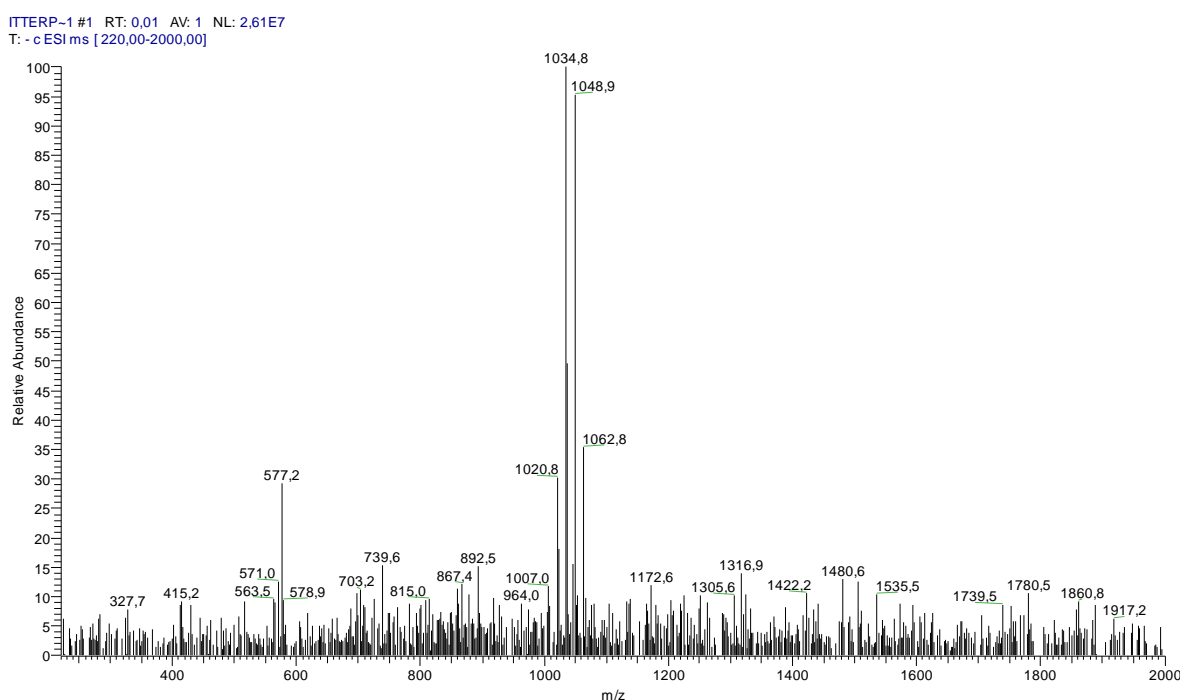


Figura 3.9. Espectro de massas de primeira ordem (*full scan*), modo negativo, da fração inicial do EMeOH de It.

Tabela 3.3. Propostas estruturais para alguns fragmentos de glicerolipídeos de *I. truxillensis* determinados por FIA-ESI-IT-MS contendo o número de grupos funcionais detectados em cada fragmento perdido.

m/z			fragmento perdido (m/z)	Número de grupos funcionais do fragmento			
$[M - H]^-$	MS^2	MS^3		n° C=O	n° OH	n° C=C	n° CH ₃
1062	818	-	C ₁₇ H ₂₄ O (244)	1	-	4	1
	720	-	C ₂₀ H ₃₈ O ₄ (342)	1	3	-	3
1048	818	-	C ₁₆ H ₂₂ O (230)	1	-	4	1
	720	-	C ₁₉ H ₃₆ O ₄ (328)	1	3	1	3
1020	1002	692	C ₁₉ H ₃₆ O ₄ (328)	1	3	1	3
		678	C ₂₀ H ₃₈ O ₄ (342)	1	3	-	3

A literatura relata a identificação de glicoglicerolípídeos e derivados contendo fósforo e enxofre em plantas (**Fig. 3.10**). No entanto, nas espécies de *Indigofera* não foram detectados fragmentos que caracterizassem a presença de açúcares, fósforo ou enxofre.

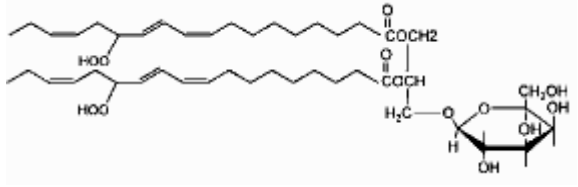
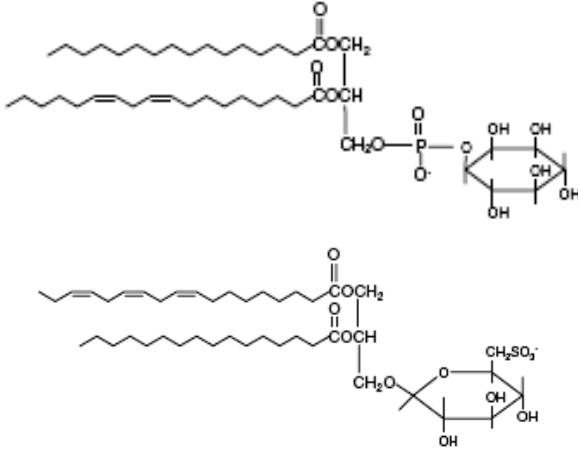
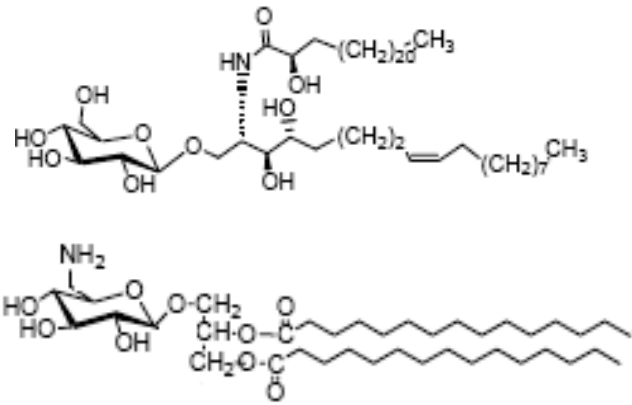
Alguns ésteres lipídicos do glicerol	Classe da substância
	galactoglicerolípídeos (Buseman <i>et al.</i> , 2006)
	glicofosfoglicerolípídeos e glicoglicerolípídeos contendo enxofre (Devaiah <i>et al.</i> , 2006)
	glicosfingolípídeos e aminoglicoglicerolípídeos (atividades antileishmanial e imunomodulatória) (Mishra <i>et al.</i> , 2005)

Figura 3.10. Glicerolípídeos isolados de plantas.

3.3. Perfil cromatográfico do EMeOH e frações flavonóides/alcalóides de *I. truxillensis* utilizando HPLC-UV-ESI-IT-MS

Técnicas hifenadas como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (HPLC-MS) são extremamente úteis principalmente no caso de matrizes complexas, pois fornecem seletividade e sensibilidade para obter informações de substâncias que co-eluem ou são minoritárias, como é o caso dos extratos/frações de *Indigofera*, nos quais alguns picos não são bem definidos e/ou são pequenos dificultando a obtenção dos espectros no UV. Desse modo, as análises utilizando ambos detectores UV e MS possibilitaram identificação rápida e inequívoca dos picos referentes às substâncias isoladas de *Indigofera*.

Flavonóides são analisados por HPLC utilizando rotineiramente detector de UV, pois apresentam absorções máximas características: banda I (330-370 nm) e banda II (240-280 nm), variando os valores de acordo com a classe de flavonóides e substituintes (Mabry & Markham & Thomas, 1970). Os indigóides (alcalóides bis-indólicos) possuem um máximo de absorção característica entre 550-650 nm (visível), sendo comumente analisados também por EM (Gillam *et al.*, 2000).

Para as análises por HPLC-UV-ESI-IT-MS uma alíquota (100 μ L) de cada amostra (EMeOH de *I. truxillensis* e frações enriquecidas) foi dissolvida no menor volume possível da fase móvel com ácido acético 2,5 % e filtrada em Millex (45 μ m). As substâncias puras foram dissolvidas na fase móvel com gotas de DMSO.

A análise por HPLC-UV-ESI-IT-MS do EMeOH (**Fig. 3.11**), a 350 nm, indicou a presença de 8 picos majoritários, sendo que todos apresentaram espectro no UV similares [λ_{\max} 260, 301 (ombro) e 350 nm], característicos de derivados do kaempferol. Os cromatogramas extraídos dos íons analisados foram apresentados na **Fig. 3.12**.

O espectro de massas representativo dos picos **1** e **2** (**Fig 3.13**) mostrou a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 725, bem como de seu respectivo aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 839. Fragmentação de segunda ordem (MS^2) a partir da molécula desprotonada mostrou fragmento de m/z 579 $[M - 146 - H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de deoxiexose. O espectro de terceira ordem do íon precursor de m/z 579 produziu os íons de m/z 447 e de m/z 285, referentes à perda de uma pentose $[M - 146 - 132 - H]^-$ e de uma hexose $[M - 146 - 132 - 162 - H]^-$, respectivamente. O conjunto desses dados sugeriu a presença de derivados triglicosilados do kaempferol nos picos **1** e **2**.

O espectro de massas do pico **3** (**Fig. 3.14**) mostrou a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 593, do aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 707, bem como de seu respectivo

dímero desprotonado $[2M - H]^-$ em m/z 1187. Fragmentação MS^2 da molécula desprotonada mostrou a perda de uma unidade de deoxiexose em m/z 447 $[M - 146 - H]^-$. Fragmentação de terceira ordem a partir do íon precursor de m/z 447 produziu o íon de m/z 285, referente à perda de uma hexose $[M - 146 - 162 - H]^-$. Esses dados sugeriram a presença de um derivado diglicosilado do kaempferol.

O espectro de massas do pico **4** (**Fig. 3.14**) exibiu a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 695, bem como seu aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 809. Fragmentação de segunda ordem do íon de m/z 695 levou à perda de uma deoxiexose, produzindo o íon de m/z 549 $[M - 146 - H]^-$, enquanto a fragmentação de terceira ordem apresentou os íons de m/z 417 e de m/z 285, referentes à perda de duas pentoses $[M - 146 - 132 - H]^-$ e $[M - 146 - 132 - 132 - H]^-$, respectivamente. Análise de **It9**, nas mesmas condições do **EMeOH**, demonstrou que o pico **4** era correspondente ao kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo.

O espectro de massas do pico **5** (**Fig. 3.16**) mostrou a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 563, o aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 677 e o dímero da molécula desprotonada $[2M - H]^-$ em m/z 1127. Fragmentação do íon precursor de m/z 563 apresentou o espectro de segunda ordem com um íon de m/z 417 referente à perda de uma unidade de deoxiexose $[M - 146 - H]^-$. Fragmentação de terceira ordem a partir do íon de m/z 417 indicou o íon de m/z 285, referente à perda de uma pentose $[M - 146 - 132 - H]^-$. Injeção do composto **It8** revelou que o pico **5** continha o kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo.

O espectro de massas do pico **6** (**Fig. 3.17**) mostrou a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 577, os adutos com ácido acético $[M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 637 e com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 691, bem como o dímero da molécula desprotonada $[2M - H]^-$ em m/z 1155. Perda de uma deoxiexose a partir da molécula desprotonada levou ao íon $[M - 146 - H]^-$ de m/z 431. Quando analisado por HPLC, **It7** apresentou mesmo tempo de retenção e espectro de massas que o pico **6**, identificado como sendo o kaempferol 3-*O*- α -L-raminopiranosil-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo.

Os espectros de massas dos picos **7** e **8** (**Fig. 3.18**) mostraram a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 431, os adutos com ácido acético $[M + CH_3COOH - H]^-$ em m/z 491 e com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 545, bem como o dímero da molécula desprotonada $[2M - H]^-$ em m/z 863. Análise por HPLC dos compostos **It5** e **It6**, nas mesmas condições do **EMeOH**, demonstrou que os picos **7** e **8** correspondiam aos kaempferol 3-*O*- α -L-raminopiranosídeo e kaempferol 7-*O*- α -L-raminopiranosídeo, respectivamente.

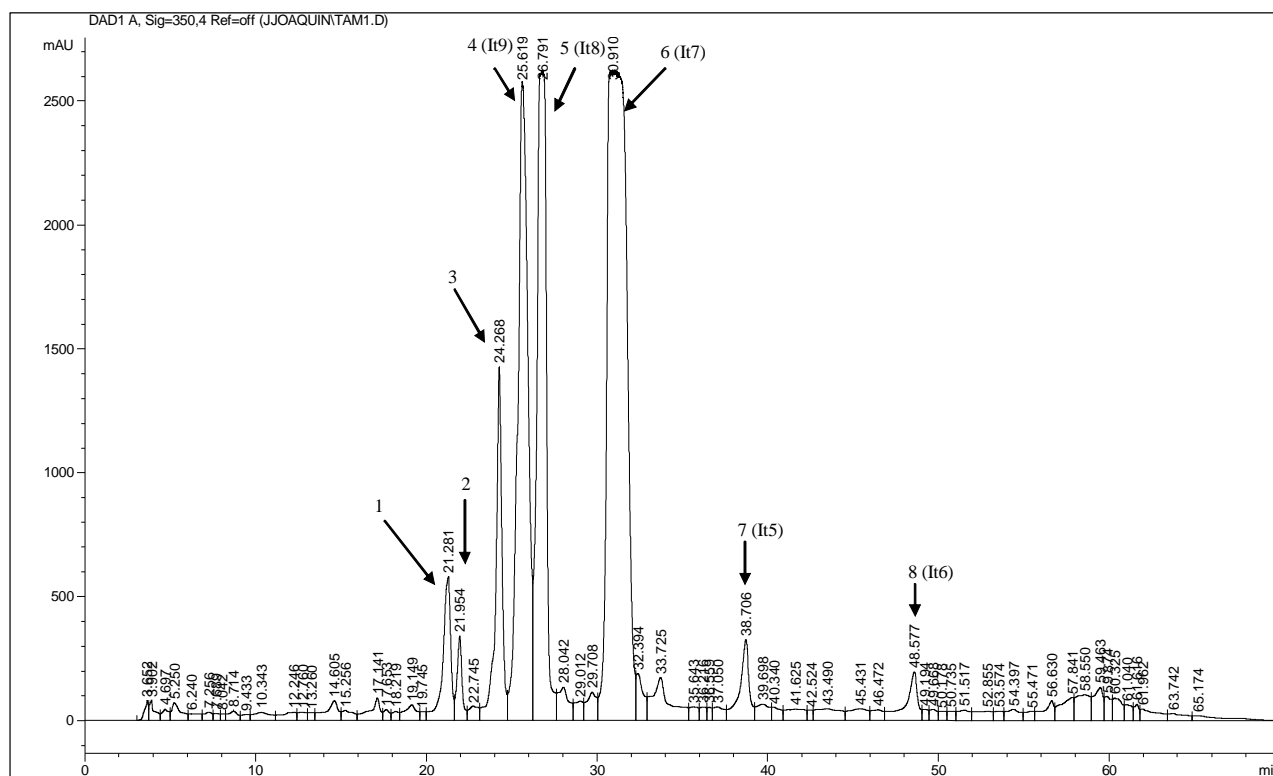


Figura 3.11. Cromatograma do EMeOH de It obtido por HPLC-UV-ESI-IT-MS, observado a 350 nm.

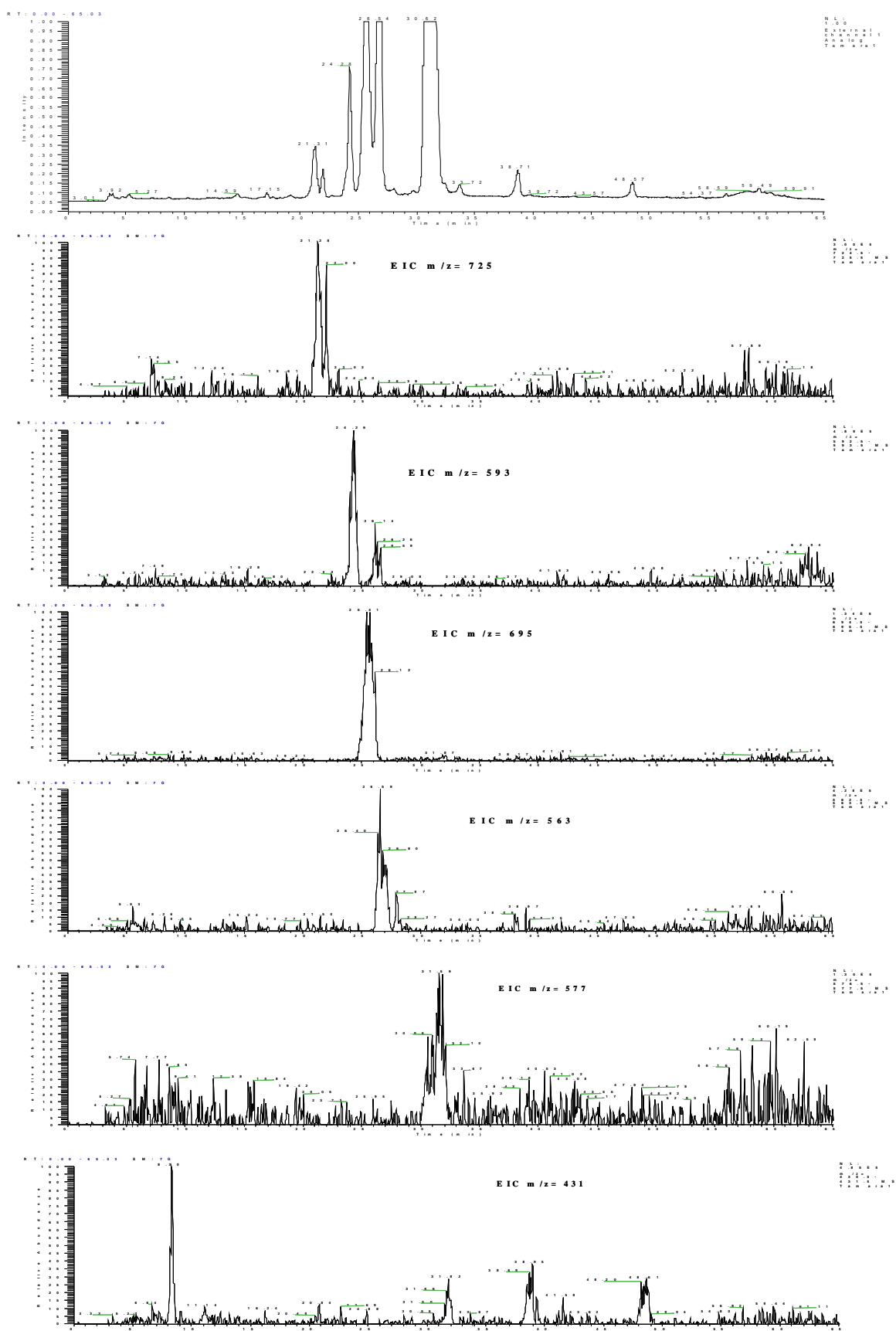
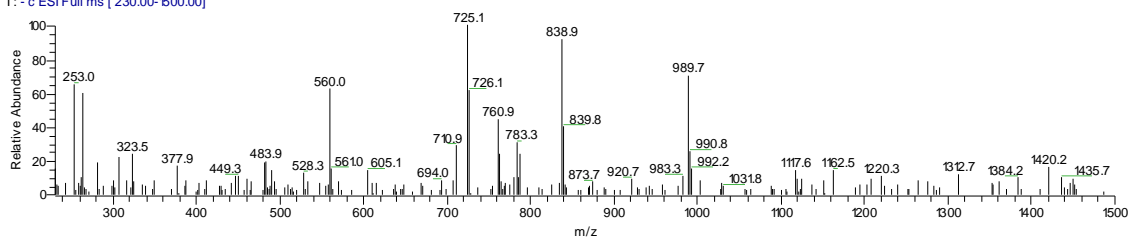


Figura 3.12. Análise do EMeOH de **It** por HPLC-UV-ESI-IT-MS (modo negativo). Cromatogramas extraídos dos íons de m/z 725 (picos **1** e **2**), 593 (pico **3**), 695 (pico **4**, **It9**), 563 (pico **5**, **It8**), 577 (pico **6**, **It7**) e 431 (pico **7**, **It5** e pico **8**, **It6**), respectivamente.

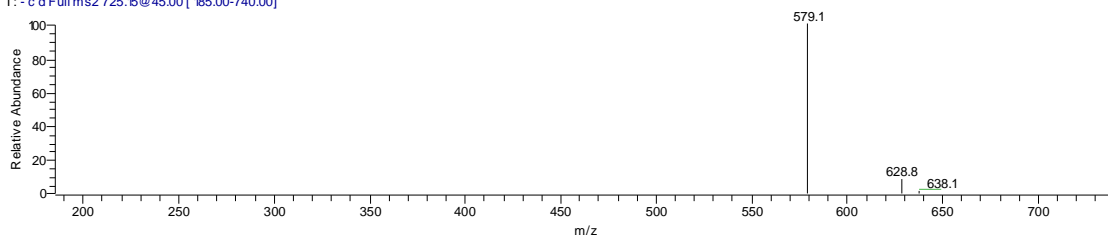
D:\Masas\JJoquin\Tamara\Tamara1

06/11/07 01:12:17 PM

Tamara1#911 RT: 2121 AV: 1 NL: 7.92E5
T: - c ESI Full ms [230.00-1500.00]



Tamara1#912 RT: 2123 AV: 1 NL: 7.8E4
T: - c d Full ms2 725.1@45.00 [185.00-740.00]



Tamara1#913 RT: 2126 AV: 1 NL: 2.38E4
T: - c d Full ms3 725.1@45.00 579.1@45.00 [145.00-585.00]

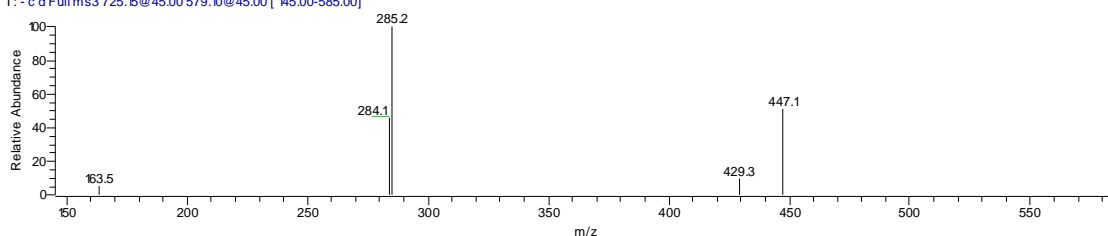
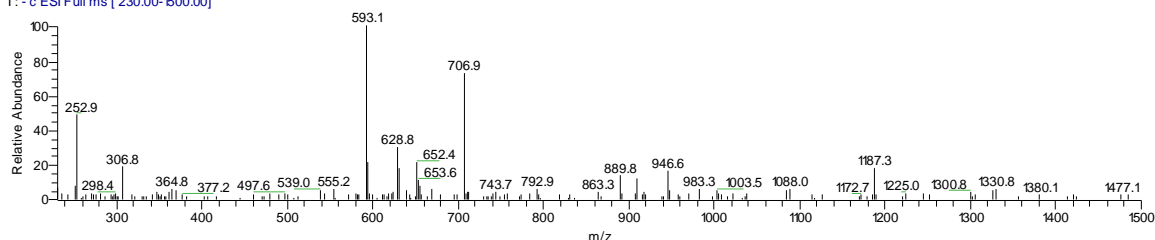


Figura 3.13. Espectros de massas (MS, MS² e MS³) do pico 1 (m/z 725) do EMeOH de It.

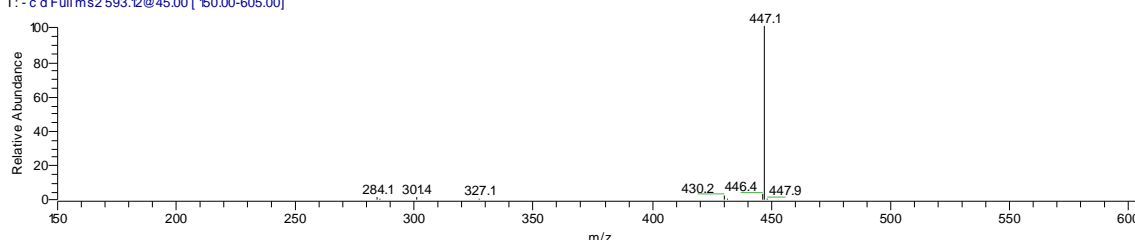
D:\Masas\JJoquin\Tamara\Tamara1

06/11/07 01:12:17 PM

Tamara1# 1043 RT: 24.33 AV: 1 NL: 102E6
T: - c ESI Full ms [230.00-1500.00]



Tamara1# 1044 RT: 24.38 AV: 1 NL: 197E5
T: - c d Full ms2 593.1@45.00 [150.00-605.00]



Tamara1# 1045 RT: 24.38 AV: 1 NL: 6.44E4
T: - c d Full ms3 593.1@45.00 447.1@45.00 [110.00-455.00]

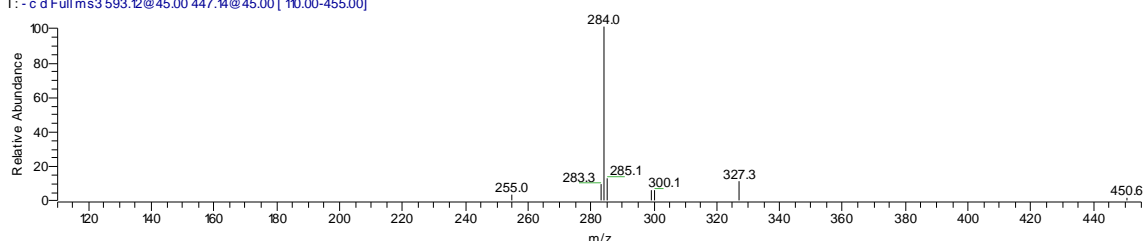
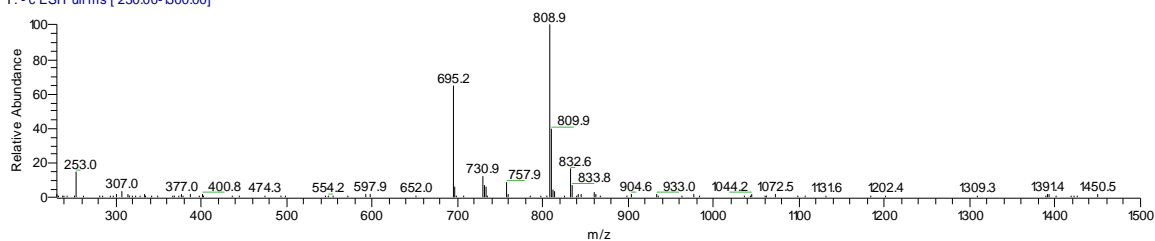


Figura 3.14. Espectros de massas (MS, MS² e MS³) do pico 3 (m/z 593) do EMeOH de It.

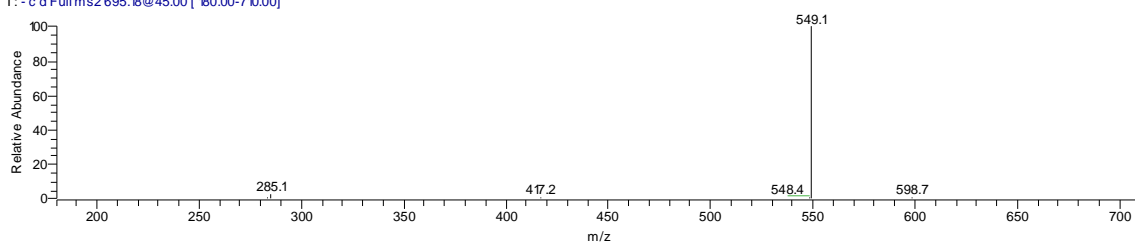
D:\Masas\Joaquin\Tamara\Tamara1

06/11/07 01:12:17 PM

Tamara1# 1095 RT: 25.58 AV: 1 NL: 5.41E6
T: - c ESI Full ms [230.00-1500.00]



Tamara1# 1096 RT: 25.60 AV: 1 NL: 4.18E5
T: - c d Full ms2 695.18@45.00 [180.00-710.00]



Tamara1# 1097 RT: 25.63 AV: 1 NL: 9.38E4
T: - c d Full ms3 695.18@45.00 549.07@45.00 [140.00-555.00]

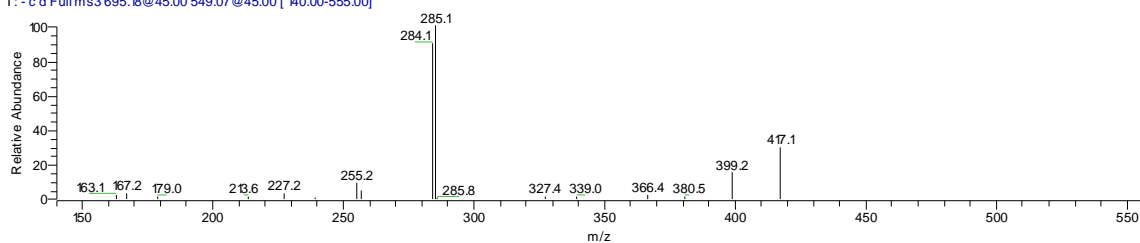
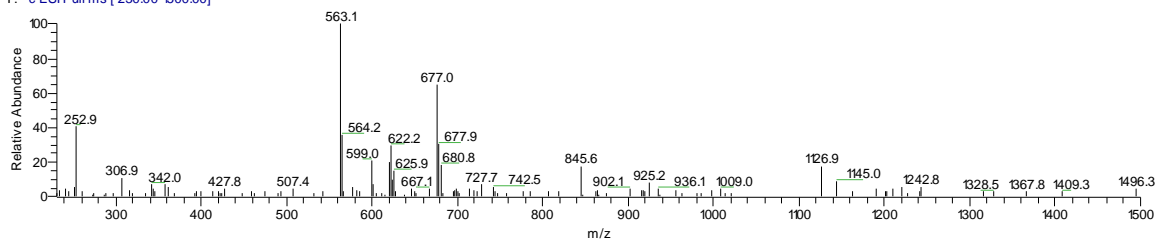


Figura 3.15. Espectros de massas (MS, MS² e MS³) do pico 4, It9 (m/z 695) do EMeOH de It.

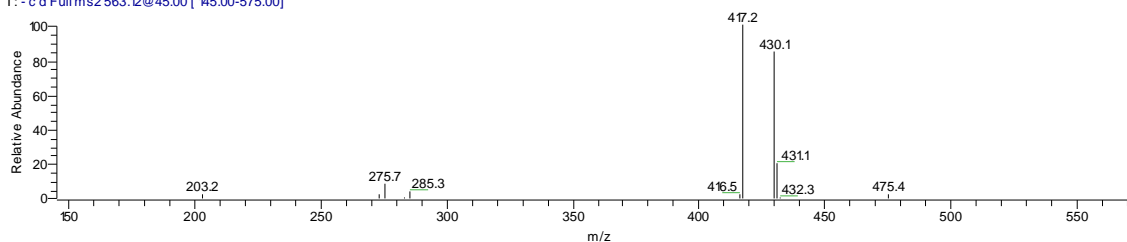
D:\Masas\Joaquin\Tamara\Tamara1

06/11/07 01:12:17 PM

Tamara1# 1150 RT: 26.89 AV: 1 NL: 4.82E5
T: - c ESI Full ms [230.00-1500.00]



Tamara1# 1151 RT: 26.92 AV: 1 NL: 9.24E4
T: - c d Full ms2 563.12@45.00 [145.00-575.00]



Tamara1# 1152 RT: 26.94 AV: 1 NL: 3.60E4
T: - c d Full ms3 563.12@45.00 417.16@45.00 [100.00-425.00]

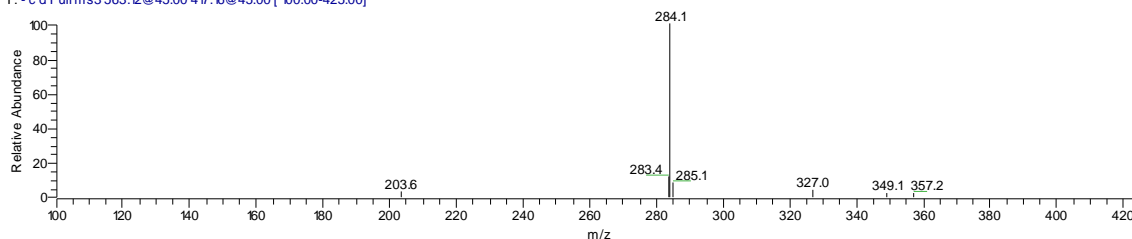


Figura 3.16. Espectros de massas (MS, MS² e MS³) do pico 5, It8 (m/z 563) do EMeOH de It.

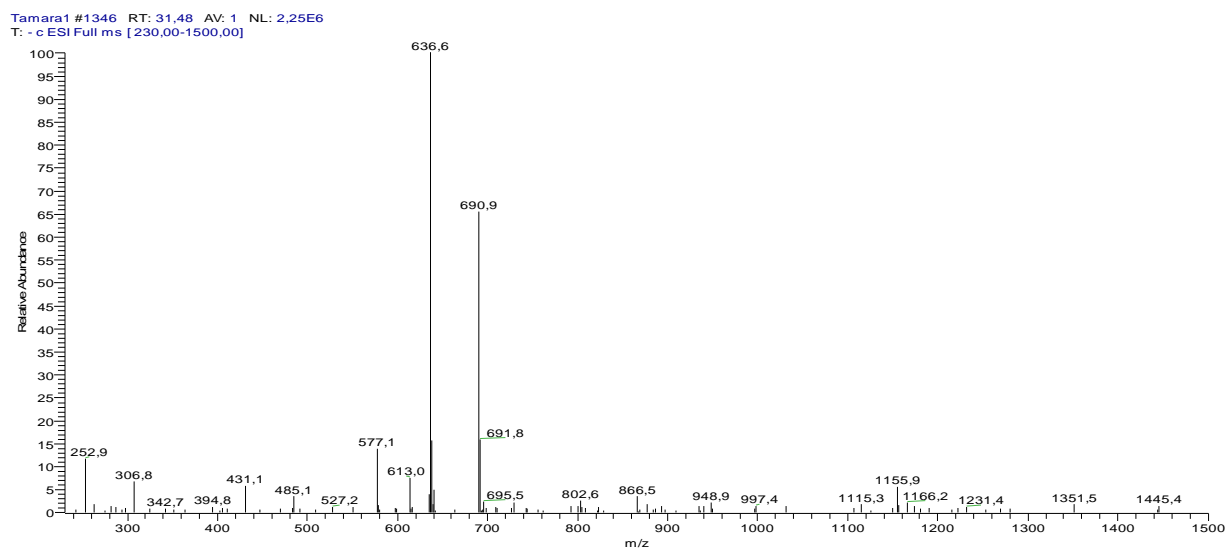


Figura 3.17. Espectro de massas do pico 6, It7 (m/z 577) do EMeOH de It.

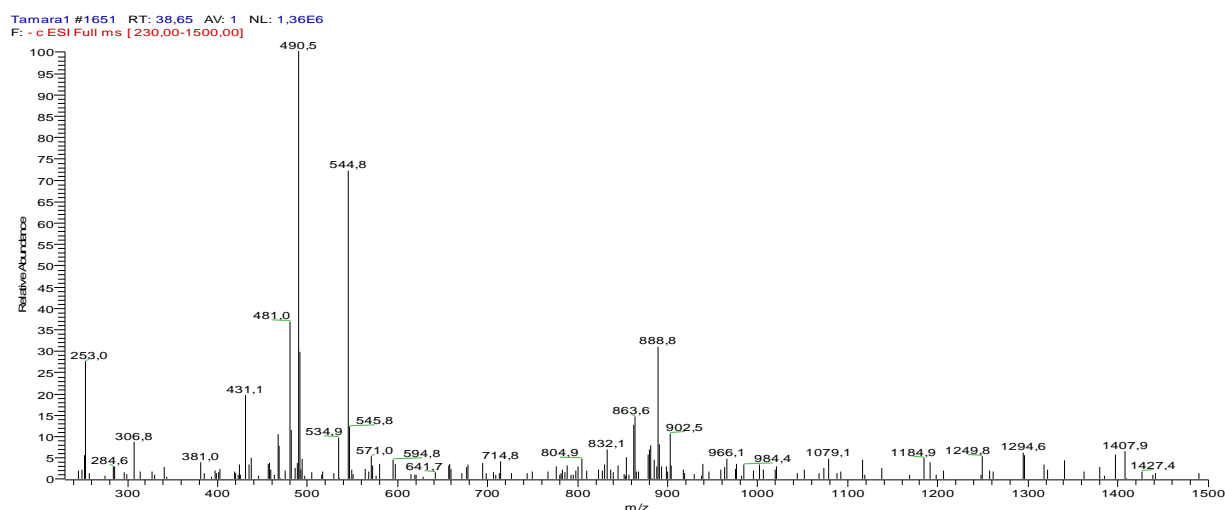


Figura 3.18. Espectro de massas do pico 7, It5 e do pico 8, It6 (m/z 431) do EMeOH de It.

No cromatograma obtido por HPLC-UV-ESI-IT-MS da fração alcaloidal (**Fig. 3.19B**), a 350 nm, foi possível identificar os picos correspondentes aos alcalóides isolados de *I. truxillensis*, índigo (**It1**) e indirubina (**It2**). Ambos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e análise dos espectros no UV e massas. O espectro no UV do pico 1 (33,55 min) apresentou banda de λ_{\max} em 603 nm correspondente ao índigo (**It1**), enquanto pico 2 (34,66 min) apresentou banda de λ_{\max} em 552 nm, indicativo da indirubina (**It2**). Ambos picos apresentaram íon em m/z 261 $[M-H]^-$ no espectro de massas.

Na análise da fração flavonoídica por HPLC-UVESI-IT-MS (**Fig. 3.19C**) o pico 1 (21,10 min), não observado no EMeOH, apresentou íon de m/z 563 referente à molécula desprotonada $[M - H]^-$ e seu aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 677. Fragmentação de segunda

ordem a partir da molécula desprotonada do pico **1** mostrou as perdas de uma unidade de deoxiexose e uma unidade de pentose, levando aos íons de m/z 417 $[M - 146 - H]^-$ e m/z 285 $[M - 146 - 132 - H]^-$, respectivamente, indicando que se tratava de outro derivado diglicosilado do kaempferol. Os demais picos observados na fração flavonoídica corresponderam às moléculas desprotonadas $[M - H]^-$ de m/z 593 (pico **2**), 695 (pico **3**), 563 (pico **4**), 577 (pico **5**), 431 (pico **6**), 431 (pico **7**) descritas na análise do cromatograma do **EMeOH**, sendo identificadas como um diglicosídeo de kaempferol e os flavonóis isolados **It9** (kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo), **It8** (kaempferol 3-*O*- α -L-arabinopiranosil-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo) e **It7** (kaempferol 3-*O*- α -L-raminopiranosil-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo), **It6** (kaempferol 7-*O*- α -L-raminopiranosídeo) e **It5** (kaempferol 3-*O*- α -L-raminopiranosídeo), respectivamente.

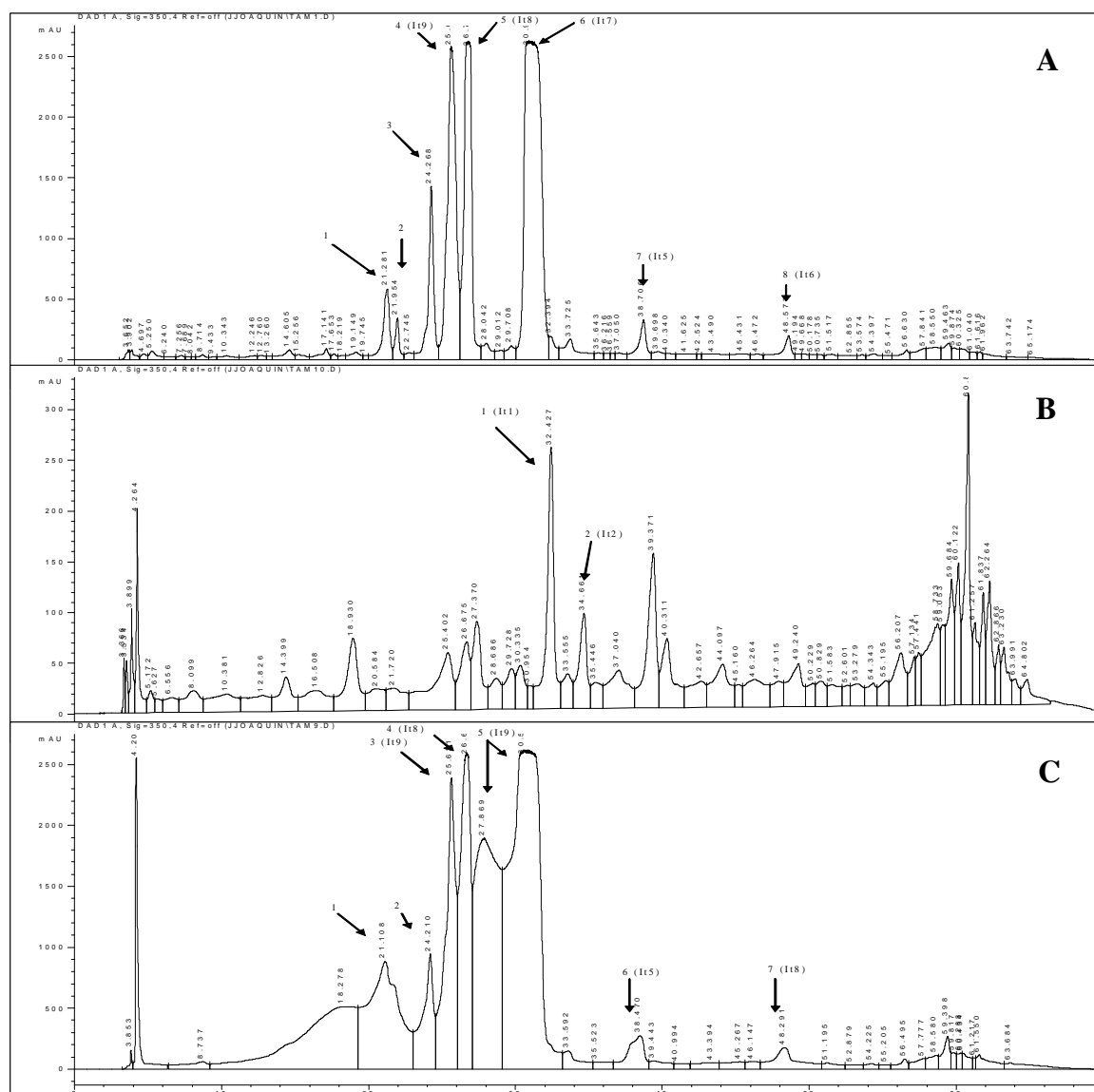


Figura 3.19. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV-ESI-IT-MS do **EMeOH** (A), fração alcalóides (B) e fração flavonoídes (C) de **It**, a 350 nm.

3.4. Perfil cromatográfico do EMeOH e e frações flavonóides/alcalóides de *I. suffruticosa* utilizando HPLC-UV-ESI-IT-MS

O EMeOH de *I. suffruticosa* e as frações enriquecidas foram analisadas por HPLC-UV-ESI-IT-MS nas mesmas condições utilizadas nas análises do EMeOH de *I. truxillensis*. O espectro do EMeOH (Fig. 3.20) indicou a presença de picos intensos entre 20-30 min de análise. Os picos 1 e 7 apresentaram espectro no UV correspondentes a alcalóides bis-indólicos. Os picos 2-6 apresentaram espectro no UV com bandas típicas dos derivados da quercetina [λ_{\max} 255, 265, 300 (ombro) e 365 nm)]. Os cromatogramas extraídos dos íons analisados foram apresentados na Fig. 3.21.

O pico 1 (11,00 min) apresentou banda no UV com λ_{\max} 552 nm. O espectro de massas mostrou a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 325 e do dímero desprotonado $[2M - H]^-$ em m/z 649 (Fig 3.22). A substância Is3, quando analisada nas mesmas condições apresentou tempo de retenção (t_R) idêntico ao do pico 1, indicando que se tratava de 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisoindirubina.

O pico 7 (28,60 min), com banda de λ_{\max} 603 nm no espectro UV, apresentou no espectro de massas o fragmento da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 261, indicando que se tratava do índigo (Is1) (Fig. 3.23).

Os picos 2 (21,15 min), 3 (21,99 min), 5 (26,58 min) e 6 (26,91 min) apresentaram espectros de massas com fragmentações referentes aos compostos isolados Is12, Is11, Is13 e Is9, respectivamente. Estes foram analisados separadamente no HPLC nas mesmas condições, apresentando tempos de retenção e espectros de massas semelhantes aos dos picos 2, 3, 5 e 6.

O pico 2 mostrou a presença da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 741, o aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 855, bem como o dímero da molécula desprotonada $[2M - H]^-$ em m/z 1483. Fragmentação de segunda ordem a partir da molécula desprotonada mostrou a perda de uma unidade de pentose em m/z 609 $[M - 132 - H]^-$ e a perda de hexose + deoxiexose em m/z 301 $[M - 162 - 146 - H]^-$, o que sugeriu a presença de um derivado triiglicosilado da quercetina. A mistura Is11 + Is12 foi analisada nas mesmas condições, e o sinal correspondente ao triglicosídeo Is12 (quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo) apresentou mesmo tempo de retenção e espectro de massas do pico 2 (Fig. 3.24).

O espectro de massas do pico 3 mostrou a presença da molécula desprotonada $[M - H]^-$, do seu aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ e do seu dímero desprotonado $[2M - H]^-$ em m/z 595, 709 e 1191, respectivamente. Fragmentação de segunda ordem a partir do íon precursor de

m/z 595 indicou a perda de uma pentose em m/z 463 $[M - 132 - H]^-$, enquanto o íon em m/z 301 $[M - 162 - 132 - H]^-$ evidenciou a perda de uma hexose, coerente com a massa molecular do diglicosídeo **Is11** (quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo) isolado de Is (**Fig. 3.25**).

O espectro de massas do pico **4** mostrou a molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 741, bem como seu respectivo aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 855 e seu dímero desprotonado em $[2M - H]^-$ em m/z 1483. Fragmentação de segunda ordem a partir da molécula desprotonada mostrou a perda de uma unidade de pentose em m/z 609 $[M - 132 - H]^-$ e a perda de hexose + deoxiexose $[M - 132 - 162 - 146 - H]^-$, respectivamente. O conjunto desses dados sugeriu a presença de derivados triglicosilados da quercetina não isolados.

O espectro de massas do pico **5** apresentou a molécula desprotonada em m/z 609 $[M - H]^-$ e o aduto com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ em m/z 723, enquanto o dímero da molécula desprotonada $[2M - H]^-$ foi observado em m/z 1219. Os íons de m/z 463 e 301, obtidos da fragmentação de segunda ordem a partir do íon precursor de m/z 609, indicaram a perda subsequente de unidades de deoxiexose e hexose $[M - 146 - H]^-$ e $[M - 162 - H]^-$, coerente com a massa molecular de **Is13** (quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosídeo), isolado anteriormente (**Fig. 3.26**).

O espectro de massas do pico **6** exibiu íon de m/z 463, referente à molécula desprotonada $[M - H]^-$ e os íons de m/z 577 e 927, atribuídos aos adutos com TFA $[M + CF_3COOH - H]^-$ e ao dímero da molécula desprotonada. A clivagem de uma unidade de hexose foi observada em m/z 301 $[M - 162 - H]^-$ a partir da fragmentação de segunda ordem da molécula desprotonada, coerente com a massa molecular da substância **Is9** (quercetina 7-*O*- β -D-glicopiranosídeo), isolada anteriormente (**Fig. 3.27**).

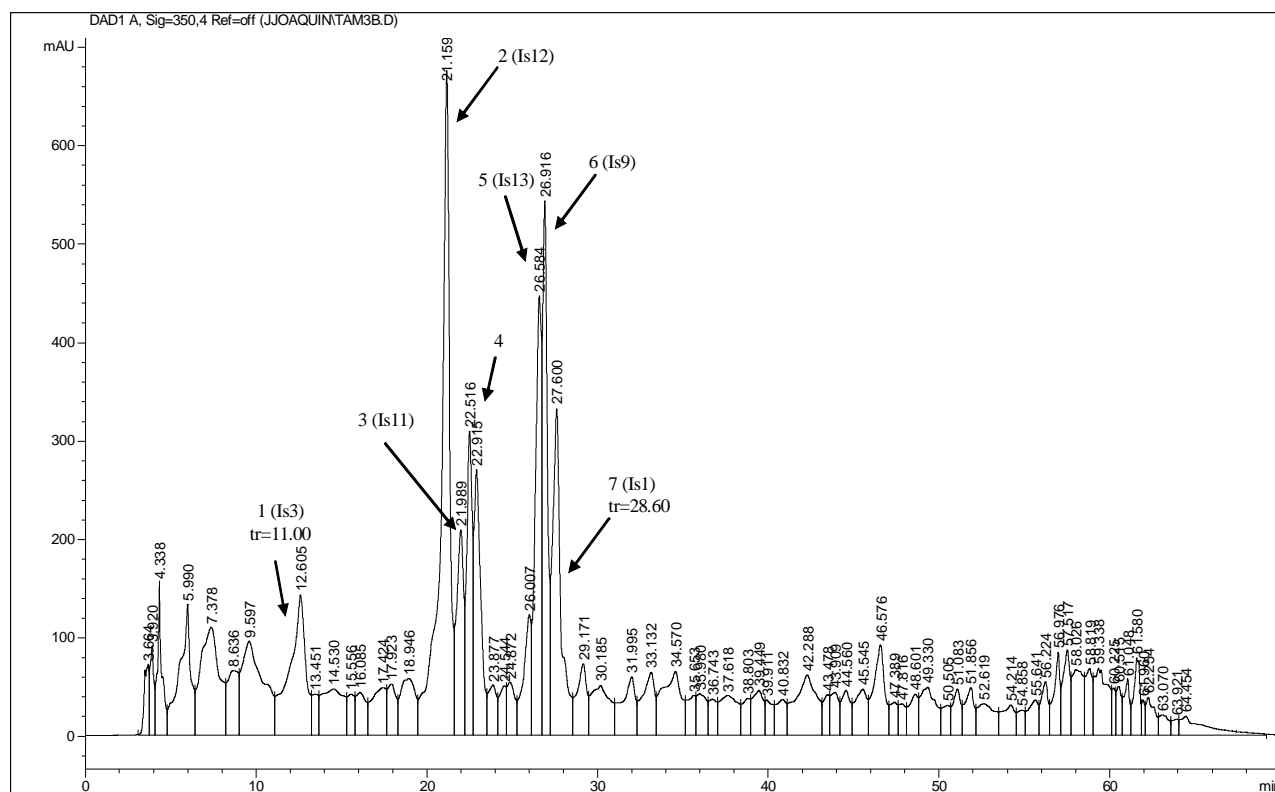


Figura 3.20. Cromatograma obtido por HPLC-UV-ESI-IT-MS do EMeOH de Is, observado a λ 350 nm.

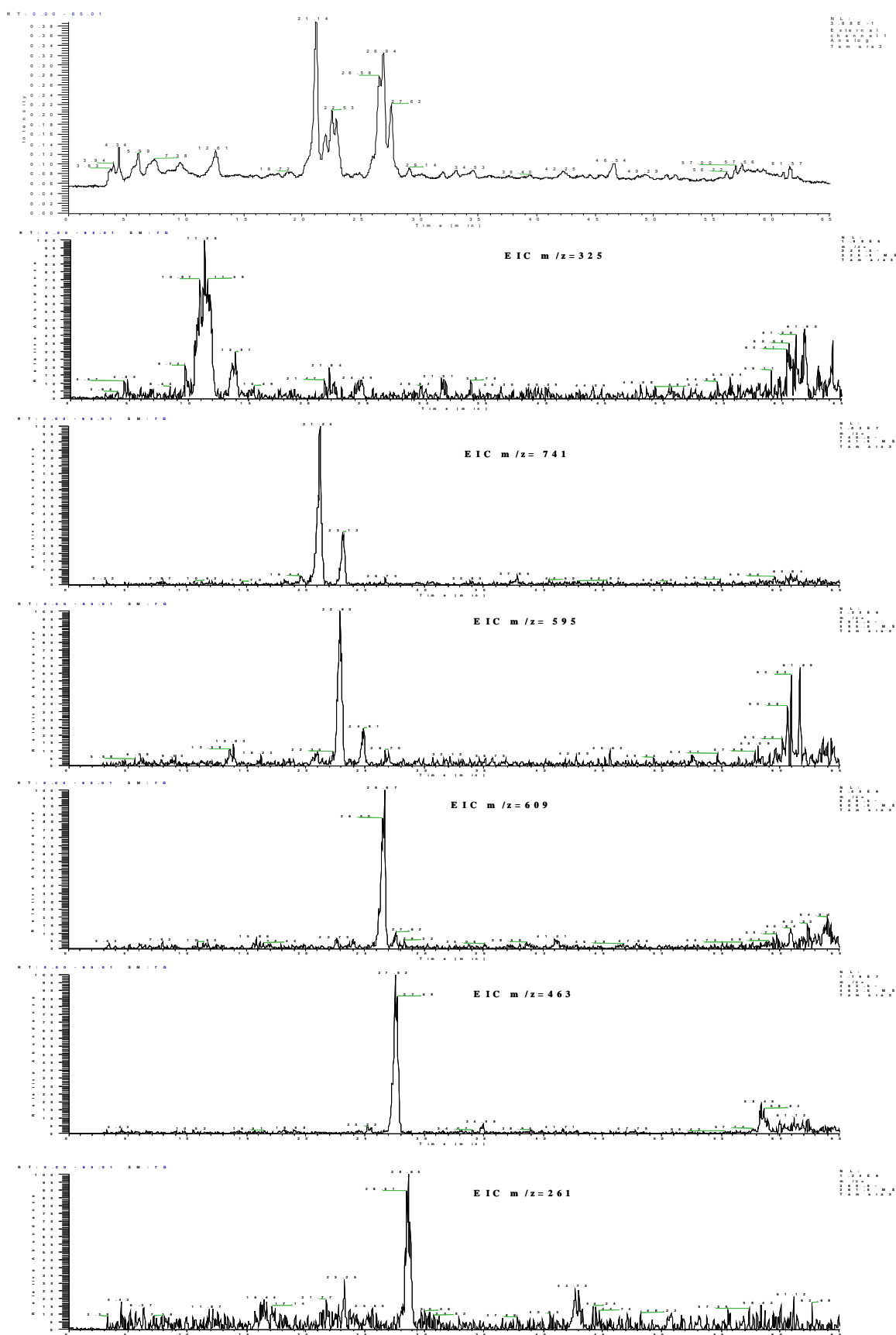


Figura 3.21. Análise por HPLC-UV-ESI-IT-MS (modo negativo) do EMeOH de **It**. Cromatogramas extraídos dos íons de m/z 325 (picos **1**, **Is3**), 741 (pico **2**, **Is12** e pico **4**), 595 (pico **3**, **Is11**), 609 (pico **5**, **Is13**), 463 (pico **6**, **Is9**) e 261 (pico **7**, **Is1**), respectivamente.

D:\Masas\JJoquin\Tamara\Tamara3

06/18/07 11:23:12 AM

Tamara3 #479 RT: 111 AV: 1 NL: 2.86E6
T: - c ESI Full ms [230.00-1500.00]

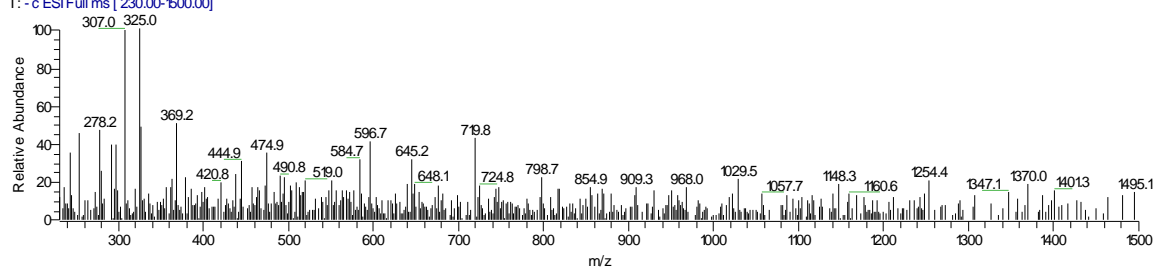


Figura 3.22. Espectro de massas (MS) do pico 1, Is3 (m/z 325) do EMeOH de Is.

D:\Masas\JJoquin\Tamara\Tamara3

06/18/07 11:23:12 AM

Tamara3 #1200 RT: 28.51 AV: 1 NL: 3.20E6
T: - c ESI Full ms [230.00-1500.00]

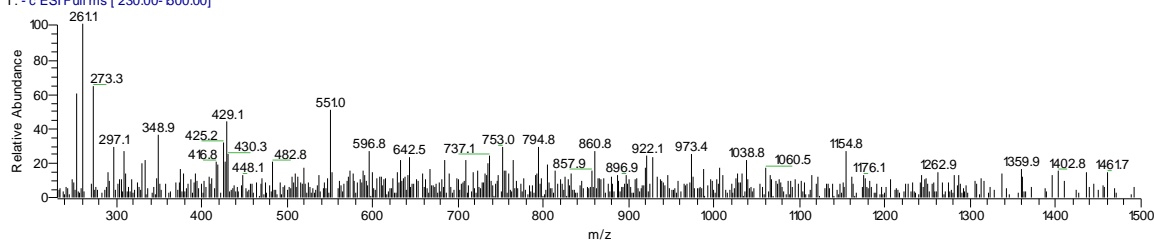
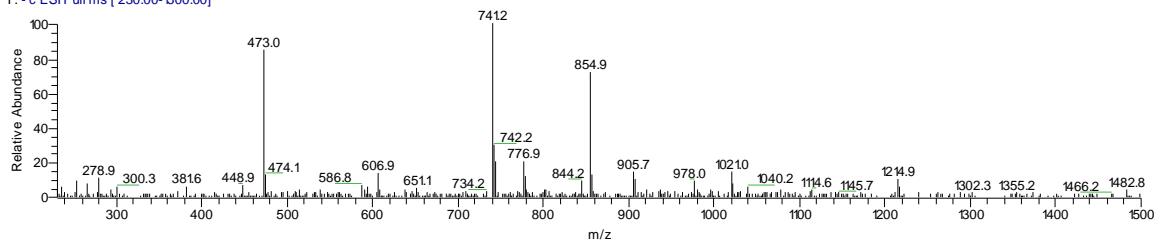


Figura 3.23. Espectro de massas (MS) do pico 7, Is1 (m/z 261) do EMeOH de Is.

D:\Masas\JJoquin\Tamara\Tamara3

06/18/07 11:23:12 AM

Tamara3 #890 RT: 2102 AV: 1 NL: 1.57E7
T: - c ESI Full ms [230.00-1500.00]



Tamara3 #891 RT: 2105 AV: 1 NL: 1.91E5
T: - c d Full ms2 741.25@45.00 [190.00-755.00]

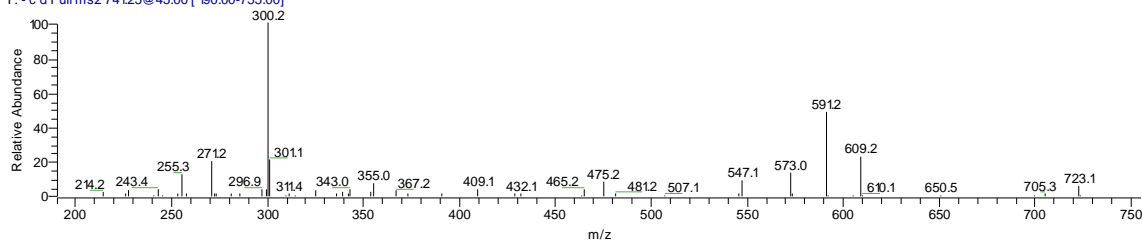
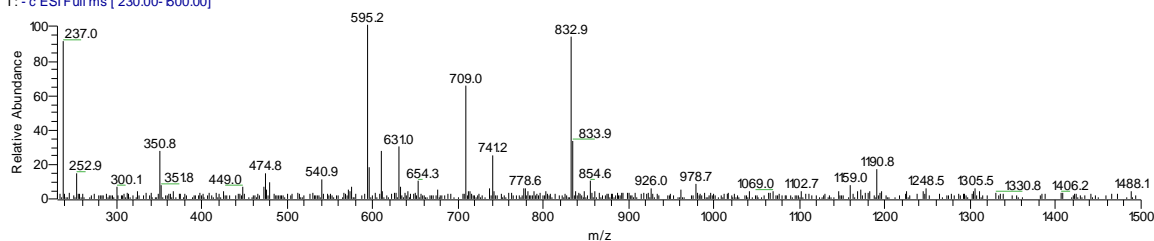


Figura 3.24. Espectros de massas (MS e MS²) do pico 2, Is12 (m/z 741) do EMeOH de Is.

D:\Masas\J.Joaquin\Tamara\Tamara3

06/18/07 11:23:12 AM

Tamara3 #968 RT: 22.90 AV: 1 NL: 123E7
T: - c ESI Full ms [230.00-500.00]



Tamara3 #969 RT: 22.92 AV: 1 NL: 2.89E5
T: - c d Full ms2 595.23@45.00 [150.00-610.00]

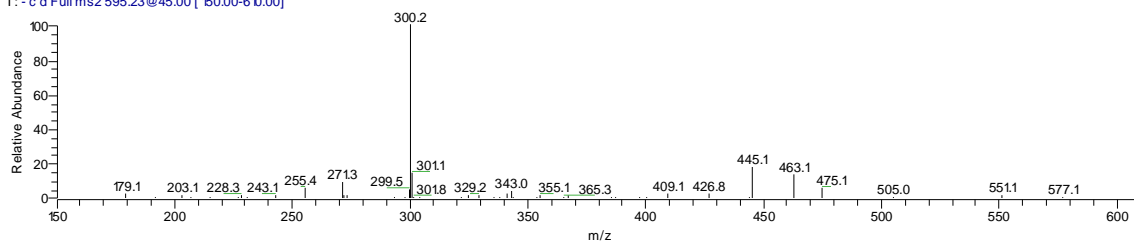
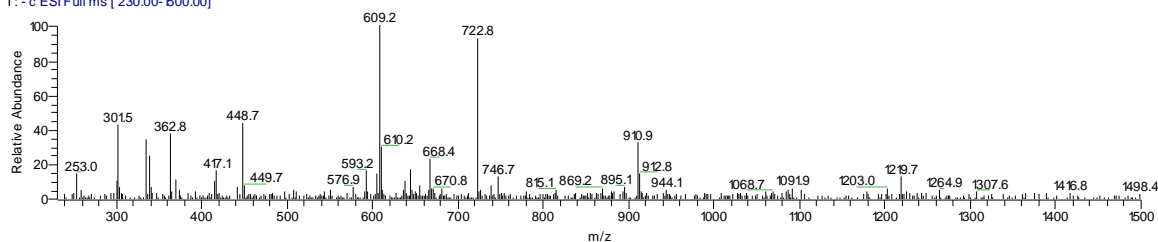


Figura 3.25. Espectros de massas (MS e MS²) do pico 3, Is11 (m/z 595) do EMeOH de Is.

D:\Masas\J.Joaquin\Tamara\Tamara3

06/18/07 11:23:12 AM

Tamara3 #117 RT: 26.50 AV: 1 NL: 149E7
T: - c ESI Full ms [230.00-500.00]



Tamara3 #118 RT: 26.53 AV: 1 NL: 184E5
T: - c d Full ms2 609.21@45.00 [155.00-620.00]

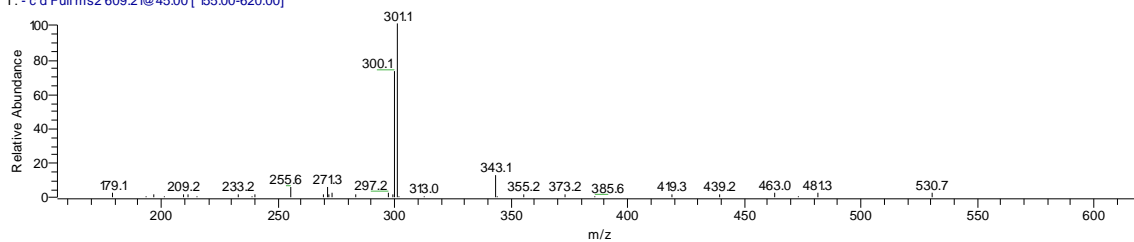


Figura 3.26. Espectros de massas (MS e MS²) do pico 5, Is13 (m/z 609) do EMeOH de Is.

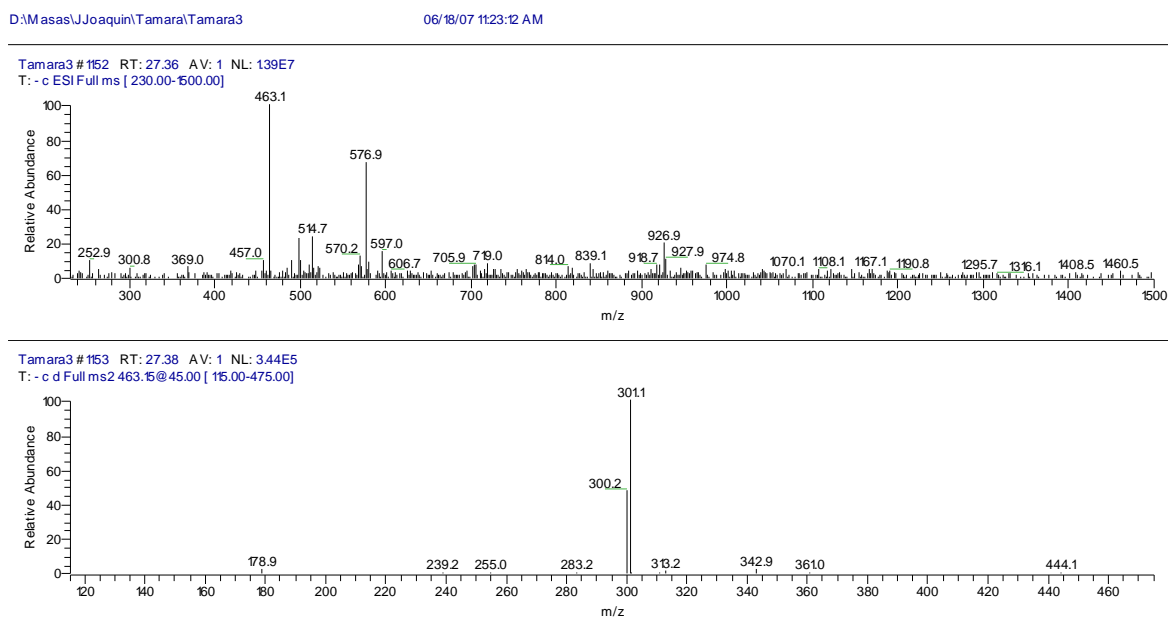


Figura 3.27. Espectros de massas (MS e MS²) do pico **6, Is9** (m/z 463) do **EMeOH** de **Is**.

No cromatograma obtido por HPLC-UV-ESI-IT-MS da fração alcaloidal foi possível identificar traços dos picos correspondentes aos alcalóides isolados de *I. suffruticosa* **Is3** e **Is8** (**Fig. 3.28B**). O espectro de massas do pico **1** (11,43 min) no modo negativo apresentou m/z 325 [M - H]⁻, enquanto que no modo positivo foi observado o íon m/z 327 [M + H]⁺, indicando que se tratava do alcalóide **Is3** (6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisindirubina), discutido na análise do **EMeOH**. O pico **2** (43,13 min) apresentou o íon m/z 425, no modo negativo, referente ao alcalóide derivado do índigo **Is8** (indigotina-3-*O*-β-D-glicopiranosídeo) (**Fig. 3.29**). Contudo, não foi possível obter fragmentações, pois o sinal era muito baixo. Foi observado que a fração alcaloidal de *I. suffruticosa*, obtida a partir do **EMeOH**, não era estável. Pode ser, em parte, devido à presença do alcalóide **Is3**, o qual degrada rapidamente ao ser isolado. Como essas análises foram realizadas na Espanha meses após obtenção dessa fração no Brasil, é possível que tenha havido degradação dos alcalóides originais.

Na análise por HPLC-UV-ESI-IT-MS da fração flavonoídica (**Fig. 3.28C**) foram observados 6 picos relevantes, com espectros no UV e de massas e derivados da quercetina. O pico **1** (19,31 min) apresentou íon em m/z 625 correspondente à molécula desprotonada [M - H]⁻ de **Is10** (quercetina 3-*O*-β-D-glicopiranosil-(2→1)-β-D-glicopiranosídeo), também foram observados o aduto com TFA [M + CF₃COOH - H]⁻ em m/z 739 e o dímero da molécula desprotonada [2M - H]⁻ em m/z 1251. **Is10** não foi detectado no **EMeOH**, provavelmente devido à sua baixa concentração.

Os picos **2** (20,51 min), **3** (21,86), **5** (25,62 min) e **6** (26,82 min) da fração flavonoídica corresponderam às moléculas desprotonadas $[M - H]^-$ de m/z 741 (**Is12**, quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo), 595 (**Is11**, quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo), 609 (**Is13**, quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(6 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosídeo) e 463 (**Is9**, quercetina 7-*O*- β -D-glicopiranosídeo) descritas na análise do cromatograma do **EMeOH**. O pico **4** (22,43 min) apresentou m/z 741 referente à molécula desprotonada de outro triglicósido, fragmentação de segunda ordem deste íon mostrou a perda de uma pentose $[M - 132 - H]^-$ em m/z 609 e de uma deoxiexose + hexose $[M - 146 - 162 - H]^-$ em m/z 301, respectivamente.

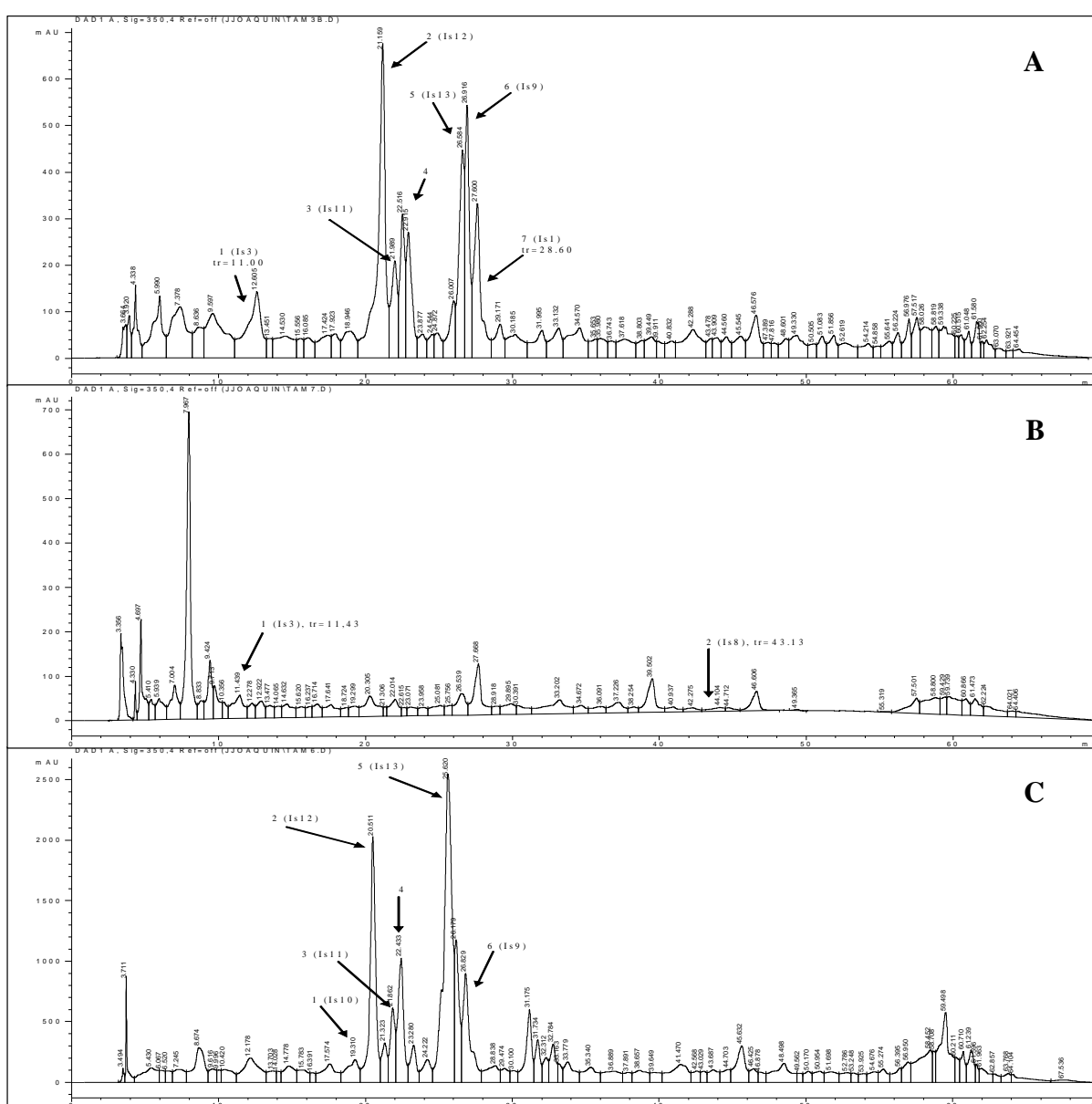


Figura 3.28. Cromatogramas obtidos por HPLC-UV-ESI-IT-MS do **EMeOH** (A) e fração alcalóides (B) e fração flavonoídica (C) de **Is**, a 350 nm.

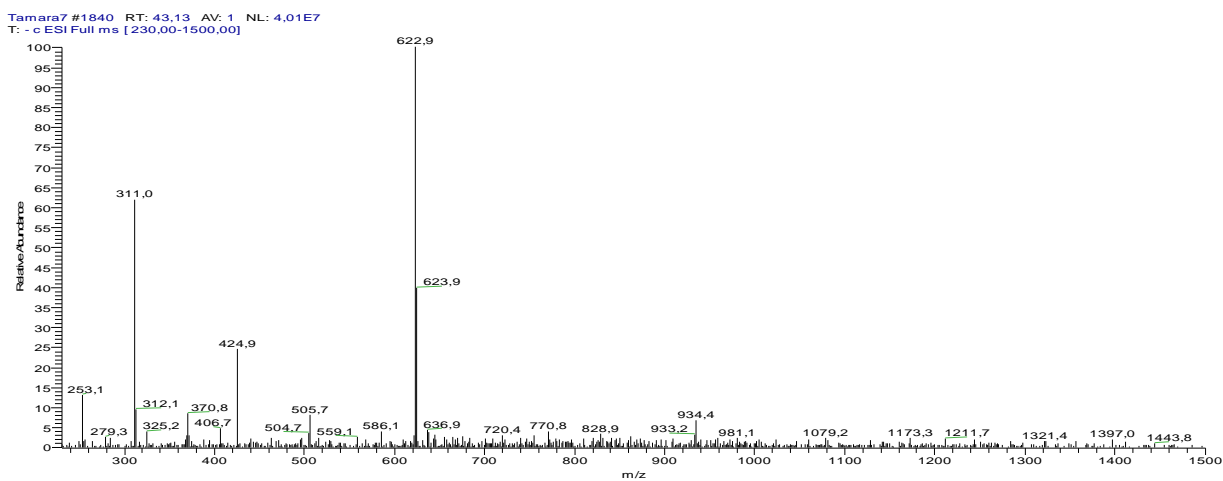


Figura 3.29 Espectro de massas do pico 2, Is8 (m/z 425) da fração alcaloidal de Is.

Em resumo, as análises por FIA-ESI-IT-MS E HPLC-UV-ESI-IT-MS permitiram obter um panorama geral da composição química das duas espécies de *Indigofera*.

CAPÍTULO 4: Síntese

Desde a antiguidade compostos nitrogenados são conhecidos devido ao seu potencial farmacológico, sendo que algumas substâncias se consagraram como princípios ativos eficazes como a morfina (sedativo) e a quinina (antimalárico). Atualmente, fármacos potentes utilizados no tratamento de enfermidades graves como o câncer e o mal de Alzheimer contêm átomos de nitrogênio, como taxol e galantamina, respectivamente.

Compostos contendo núcleo indólico são descritos na literatura por apresentarem a capacidade de inibir/modular enzimas específicas (proteínas quinases), as quais são reguladoras de processos celulares em tecidos e são associadas com ampla variedade de doenças (Islam *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 1999). Hidrazonas contendo núcleo indólico apresentaram atividade antiinflamatória e analgésica (Sondhi & Dinodia & Kumar, 2006).

O composto sintético *o*-nitrofenilhidrazona de isatina apresentou atividade antineoplásica contra carcinosarcoma de Walker 256. Análogos deste composto contendo grupamento alquila e halogênios foram sintetizados e não apresentaram atividade antitumoral significativa. Também foram preparados compostos a partir da condensação da isatina com aminas, hidrazidas e algumas hidrazinas. Todos os derivados se mostraram inativos contras as linhagens tumaróis de carcinosarcoma de Walker 256 e leucemia linfóide L1210 (Popp, 1969).

Isatina é um dos precursores dos alcalóides bis-indólicos encontrados nas espécies de *Indigofera*. Este composto e seus derivados poderiam ser responsáveis por algumas das atividades farmacológicas apresentadas pelos extratos destas plantas (Capítulo 5). Ademais, não foram encontrados outros trabalhos químico-farmacológicos desta classe de substâncias na literatura. Deste modo, foram sintetizados hidrazonas de isatina, uma azina e uma semicarbazona, além de indirubina e acetato de indirubina. Essas substâncias foram preparadas no Departamento de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca-Espanha.

Também há grande interessante na realização de ensaios de atividade em cultivos de células neoplásicas e determinação da citotoxicidade destes compostos. Os ensaios antitumorais estão sendo realizados pela empresa PharmaMar (Madrid) em parceria com a Universidade de Salamanca.

EXPERIMENTAL / RESULTADOS / DISCUSSÕES

4.1. Hidrazonas de isatina e outros derivados

A metodologia utilizada para preparação da **metilidrazona de isatina (T1)** foi a seguinte (Vázquez, 1996): a 100 mg de isatina (0,68 mmol) dissolvida em 3 mL de ácido acético glacial foram adicionados 55 μ L de metilidrazina (1,02 mmol). A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente com agitação magnética e acompanhada por CCDC. Após 15 h foi observado que toda isatina havia reagido. A solução foi neutralizada com solução de Na_2CO_3 e NaCl , em seguida, extraída com AcOEt . Foi adicionado Na_2SO_4 à fase orgânica, que foi filtrada e evaporada, sendo obtidos 115 mg de produto (rend. 96%), o qual foi analisado por RMN.

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) de **T1** mostrou 4 sinais referentes à hidrogênios de um sistema aromático: δ 7,50 (H4, d, $J = 9,5$ Hz), δ 7,15 (H6, ddd, $J = 9,5, 9,5, 1,5$ Hz), δ 7,04 (H5, ddd, $J = 9,5, 9,5, 1,5$ Hz) e δ 6,90 (H7, d, $J = 9,5$ Hz) (**Espectro 4.1**). A atribuição dos hidrogênios foi realizada com base nas correlações observadas no experimento $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$. O espectro de RMN de ^1H apresentou ainda um sinal em δ 3,42 (H10, d, $J = 5,5$ Hz) referente ao grupamento metílico, e dois sinais de NH em δ 8,95 (H1) e 10,90 (H9). No espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 4.2**) foram detectados 9 sinais, com auxílio dos experimentos DEPT, $g\text{HMBC}$ e $g\text{HMBC}$ foi possível atribuir todos os carbonos da estrutura, conforme indicado na **Tab. 4.1**. O espectro de massas (modo positivo) apresentou picos de m/z 176 e 198, referentes à molécula protonada $[\text{M} + \text{H}]^+$ e seu aduto com sódio $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (**Espectro 4.3**). O espectro no UV mostrou bandas em 206, 271 e 321 nm.

Tabela 4.1. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e de ^{13}C (CDCl_3 , 50,3 MHz) e correlações observadas nos experimentos $g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$ e $g\text{HMBC}$ de **T1**.

Posição	$^{13}\text{C}^* \delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	$g\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$	$g\text{HMBC}$
1	NH	8,95 s, 1H	-	-
2	163,9	-	-	-
3	137,1	-	-	H4
3a	122,5	-	-	H1, H5, H7
4	117,8	7,50 d (9,5), 1 H	H5	H6
5	122,1	7,04 ddd (9,5, 9,5, 1,5), 1 H	H4	-
6	126,6	7,15 t (9,5, 9,5, 1,5), 1 H	H7	H4
7	110,0	6,90 d (9,5), 1 H	H6	H5
7a	124,5	-	-	H4, H1
8	N	-	-	-
9	NH	10,90 s, 1H	-	-
10	38,8	3,42 d (5,5)	-	-

O procedimento geral utilizado para a preparação dos demais derivados de isatina (**T2-9**) foi o mesmo apresentado para metilidrazona (**T1**), utilizando sempre a proporção 1:1,5 de isatina/hidrazina ou semicarbazida. As reações ocorreram entre 15-24h. Algumas reações, como *p*-nitrofenilidrazona, *p*-metoxifenilidrazona, fenilidrazona e azina de isatina apresentaram mais de um produto, nestes casos os produtos de interesse foram recristalizados.

Foram sintetizados 7 hidrazonas, uma azina e uma semicarbazona de isatina (**Fig. 4.1**), as quais foram caracterizadas por experimentos uni e bidimensionais de RMN, MS e UV, conforme descrito a seguir.

***p*-Metoxifenilidrazona de isatina (T2, DMSO-*d*₆):** rend. 65%; RMN ¹H δ 12,70 (NH9, s), 10,90 (NH1, s), 7,50 (H4, d, *J* = 7,5 Hz), 7,36 (H11 e H15, dd, *J* = 7,5, 2,0 Hz), 7,20 (H6, ddd, *J* = 7,5, 7,5, 2,0 Hz), 7,02 (H5, ddd, *J* = 7,5, 7,5, 2,0 Hz), 6,95 (H12 e H14, dd, *J* = 7,5, 2,0 Hz), 6,90 (H7, d, *J* = 7,5 Hz) e 3,76 (H16, s) (**Espectro 4.4**); RMN ¹³C δ 163,8 (C2), 156,3 (C13), 137,8 (C7a), 136,4 (C10), 127,6 (C3), 125,8 (C6), 122,5 (C3a), 122,3 (C5), 118,8 (C4), 115,8 (C11 e C15), 114,8 (C12 e C14), 110,3 (C7) e 55,7 (C16); MS (modo positivo, *m/z*) 268 [M + H]⁺; UV (λ_{max}, nm) 209, 212, 234, 246, 265, 423.

***p*-Nitrofenilidrazona de isatina (T3, DMSO-*d*₆):** rend. 48%; RMN ¹H δ 12,80 (NH1, s), 11,10 (NH9, s), 8,20 (H12 e H14, dd, *J* = 7,5, 2,0 Hz), 7,58 (H11 e H15, dd, *J* = 7,5, 2,0 Hz), 7,56 (H4, d, *J* = 8,0 Hz), 7,28 (H6, ddd, *J* = 8,0, 8,0, 1,5 Hz), 7,05 (H5, ddd, *J* = 8,0, 8,0, 1,5 Hz) e 6,90 (H7, d, *J* = 8,0 Hz) (**Espectro 4.5**); RMN ¹³C δ 162,8 (C2), 148,2 (C10), 141,5 (C13), 141,1 (C7a), 131,7 (C3), 130,0 (C6), 126,7 (C12 e C14), 122,1 (C5), 120,5 (C3a), 119,61 (C4), 113,9 (C11 e C15), 110,8 (C7); MS (modo positivo, *m/z*) 305 [M + Na]⁺; UV (λ_{max}, nm) 192, 205, 236, 250, 410.

Fenilidrazona de isatina (T4, DMSO-*d*₆): rend. 54%; RMN ¹H δ 12,70 (NH9, s), 10,90 (NH1, s), 7,53 (H4, d, *J* = 8,0 Hz), 7,41 (H11 e H15, dd, *J* = 7,5, 1,0 Hz), 7,35 (H6, ddd, *J* = 8,0, 8,0, 1 Hz), 7,23 (H13, dd, *J* = 7,5, 1,0 Hz), 7,05 (H5, m), 7,02 (H12 e H14, m) e 6,91 (H7, d, *J* = 8,0 Hz) (**Espectro 4.6**); RMN ¹³C δ 163,2 (C2), 142,5 (C10), 139,8 (C7a), 128,7 (C6), 128,5 (C13), 127,7 (C3), 122,9 (C5), 121,9 (C12 e C14), 121,2 (C3a), 118,6 (C4), 114,1 (C11 e C15), 110,5 (C7); MS (modo positivo, *m/z*) 260 [M + Na]⁺; UV (λ_{max}, nm) 210, 258, 383, 390, 400, 405.

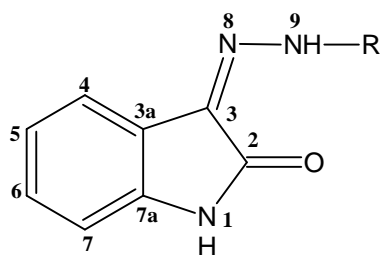
2-Hidroxietilidrazona de isatina (T5, DMSO- d_6): rend. 57%; RMN ^1H δ 11,10 (NH9, s), 10,70 (NH1, s), 7,33 (H4, d, $J = 7,5$ Hz), 7,11 (H6, ddd, $J = 7,5, 7,5, 1,5$ Hz), 6,94 (H5, ddd, $J = 7,5, 7,5, 1,5$ Hz), 6,85 (H7, d, $J = 7,5$ Hz), 3,60 (H10 e H11, s) (**Espectro 4.7**); RMN ^{13}C δ 162,9 (C2), 138,2 (C7a), 126,6 (C6), 124,4 (C3), 122 (C3a), 121,3 (C5), 117,2 (C4), 109,9 (C7), 60,1 (C11) e 53,9 (C10); MS (modo positivo, m/z) 228 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; UV (λ_{max} , nm) 192, 208, 238, 276, 345, 381.

2,2,2-Trifluoretilidrazona de isatina (T6, DMSO- d_6): rend. 90%; RMN ^1H δ 10,90 (NH9, s), 10,80 (NH1, s), 7,36 (H4, d, $J = 7,5$ Hz), 7,18 (H6, ddd, $J = 7,5, 7,5, 1,2$ Hz), 6,99 (H5, ddd, $J = 7,5, 7,5, 1,2$ Hz), 6,88 (H7, d, $J = 7,5$ Hz), 4,32 (H10a,b, m) (**Espectro 4.8**); RMN ^{13}C δ 162,8 (C2), 139,5 (C7a), 128,3 (C3), 128,1 (C6), 121,7 (C5), 121,1 (C3a), 118,2 (C4), 110,4 (C7), 51,7 e 51,1 (C10a,b), C11 ND; MS (modo positivo, m/z) 266 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, UV (λ_{max} , nm) 209, 255, 268.

Hidrazona de isatina (T7, DMSO- d_6): rend. 67%, RMN ^1H δ 10,93 (NH1, s), 8,72 (NH9, s), 7,34 (H4, d, $J = 7,5$ Hz), 7,13 (H6, ddd, $J = 7,5, 7,5, 2,0$ Hz), 6,95 (H5, ddd, $J = 7,5, 7,5, 2,0$ Hz) e 6,84 (H7, d, $J = 7,5$ Hz) (**Espectro 4.9**); RMN ^{13}C δ 162,8 (C2), 138,6 (C7a), 127,1 (C6), 126,7 (C3), 122,5 (C3a), 121,4 (C5), 117,4 (C4) e 109,9 (C7); MS (modo positivo, m/z) 162 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 184 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; UV (λ_{max} , nm) 206, 271, 321.

Azina de isatina (T8, DMSO- d_6): rend. 70%; RMN ^1H δ 11,20 (NH1 e NH1', s), 7,49 (H4 e H4', d, $J = 8,0$ Hz), 7,40 (H6 e H6', ddd, $J = 8,0, 8,0, 1,5$ Hz), 6,99 (H5 e H5', ddd, $J = 8,0, 8,0, 1,5$ Hz) e 6,92 (H7 e H7', d, $J = 8,0$ Hz) (**Espectro 4.10**); RMN ^{13}C δ 167,5 (C2 e C2'), 145,2 (C7a e C7a'), 134,4 (C3 e C3'), 127,8 (C4 e C4'), 134,0 (C6 e C6'), 122,0 (C5 e C5'), 115,8 (C3a e C3a'), 110,9 (C7 e C7'); MS (modo positivo, m/z) 313 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; UV (λ_{max} , nm) 201, 245, 315.

Semicarbazona de isatina (T9, DMSO- d_6): rend. 90%; RMN ^1H δ 11,80 (NH1, s), 7,58 (H4, d, $J = 8,0$ Hz), 7,30 (H6, ddd, $J = 8,0, 8,0, 1,0$ Hz), 7,05 (H5, ddd, $J = 8,0, 8,0, 1,0$ Hz) e 6,90 (H7, d, $J = 8,0$ Hz) (**Espectro 4.11**); RMN ^{13}C δ 162,7 (C10), 155,0 (C2), 141,5 (C7a), 131,0 (C3), 130,4 (C6), 122,2 (C5), 120,4 (C4), 120,2 (C3a) e 110,8 (C7); MS (modo positivo, m/z) 205 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e 227 $[\text{M} + \text{Na}]^+$; UV (λ_{max} , nm) 191, 206, 253, 267, 299, 331.



Reagente	R	Produto
metilidrazina	-CH ₃	hidrazona (T1)
<i>p</i> -metoxifenilidrazina		hidrazona (T2)
<i>p</i> -nitrofenilidrazina		hidrazona (T3)
fenilidrazina		hidrazona (T4)
2-hidroxietilidrazina	-CH ₂ CH ₂ OH	hidrazona (T5)
2,2,2-trifluoretilidrazina	-CH ₂ CF ₃	hidrazona (T6)
hidrazina monoidrato	H	hidrazona (T7)
hidrazina monocloreto		azina (T8)
semicarbazida		semicarbazona (T9)

Figura 4.1. Estruturas dos derivados da isatina (T1-T9).

4.2. Síntese e acetilação da indirubina

A indirubina foi isolada de ambas espécies de *Indigofera*, no entanto, em pouca quantidade. Pelo fato de ser um alcalóide com forte atividade anticancerígena, foi sintetizado para realização de outros bioensaios.

A indirubina foi preparada segundo modificações da metodologia descrita por Ferandin *et al.* (2006). A 150 mg de isatina (0,91 mmol) dissolvidos em 20 mL de metanol foram adicionados 106 mg de 3-acetoxindol (0,61 mmol), a mistura foi mantida sob agitação em atmosfera inerte (N₂). Em seguida, 155 mg de Na₂CO₃ foram adicionados e a reação foi mantida sob agitação e atmosfera inerte por 4 horas. O precipitado escuro formado foi filtrado e lavado

com 20 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v). A reação rendeu 126 mg de um sólido vermelho (80 %), que quando analisado por RMN de ¹H, MS, IV e UV foi identificado como sendo a indirubina (**Fig. It2-Is2**, capítulo 2).

Acetilação da indirubina

A indirubina (50 mg, 0,19 mmol) dissolvido em 1 mL de piridina foi adicionado 1 mL de anidrido acético. A mistura foi mantida em repouso no escuro por 72 h. A placa cromatográfica do produto reacional (CCDC) apresentou 2 manchas, uma delas referente a indirubina. O produto foi neutralizado com HCl, seguido de soluções saturadas de NaHCO₃ e NaCl. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e concentrada. A purificação foi realizada por CC em sílica gel, eluição com DCM rendeu 10 mg de acetato de indirubina (**T10**, 18%), eluição posterior com AcOEt recuperou a indirubina não acetilada.

O espectro de massas (modo positivo) (**Espectro 4.12**) apresentou o íon [M + Na]⁺ em *m/z* 327, compatível com a fórmula molecular C₁₈H₁₂N₂O₃. O espectro no UV apresentou banda característica com absorção máxima em 546 nm. O espectro de RMN de ¹H (**Espectro 4.13**, **Tab. 4.2**) mostrou um sinal em δ 11,30 (NH1, s), além dos sinais pertencentes aos hidrogênios dos sistemas aromáticos da indirubina em δ 8,97 (H4', d, *J* = 8,0 Hz), 7,26 (H5', t, *J* = 8,0 Hz), 7,37 (H6', t, *J* = 8,0 Hz), 8,21 (H7', d, *J* = 8,0 Hz) e δ 7,67 (H4, d, *J* = 8,0 Hz), 7,06 (H5, t, *J* = 8,0 Hz), 7,60 (H6, t, *J* = 8,0 Hz), 7,44 (H7, d, *J* = 8,0 Hz). O sinal atribuída ao grupamento metil foi observado em δ 2,64 (H9', s, 3H). Os experimentos HOMODEC (**Espectro 4.14**) e gCOSY ¹H-¹H auxiliaram na atribuição dos hidrogênios dos sistemas aromáticos. Os experimentos gHMQC (**Espectro 4.15**) e gHMBC (**Espectros 4.16 e 4.17**) indicaram as correlações diretas e a longa distância de carbonos e hidrogênios, permitindo atribuição inclusive dos carbonos quaternários conforme indicado na **Tab. 4.2**. O experimento NOESY-1D (**Espectro 4.18**), com irradiação do singlete em δ 11,32 (NH1), mostrou NOE com o dubleto em δ 7,44 (CH7), confirmando que a acetilação ocorreu no nitrogênio da amina (N1'), estabelecendo a estrutura do **acetato de indirubina (Fig. 4.2)**.

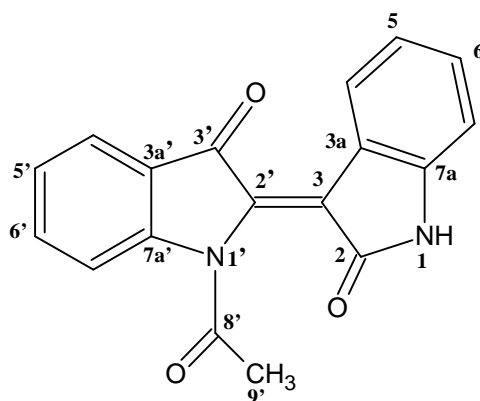


Figura 4.2. Estrutura do acetato de indirubina (T10).

Tabela 4.2. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e de ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) de T10.

Posição		$^{13}\text{C}^* \delta$ (ppm)	$^1\text{H} \delta$ (ppm), J (Hz)	gHMBC
1	NH	-	11,32 s	-
2	C=O	189,0	-	H1
3	C	119,0	-	H1; H5, H7
3a	C	130,2	-	H4
4	CH	124,8	7,67 d (8,0)	H6
5	CH	122,3	7,06 t (8,0)	H7
6	CH	137,5	7,60 t (8,0)	H4
7	CH	113,9	7,44 d (8,0)	H5
7a	C	140,0	-	H1
1'	N	-	-	-
2'	C	152,0	-	H1; H4
3'	C=O	ND	-	-
3a'	C	122,5	-	H5'; H7'
4'	CH	123,9	8,97 d (8,0)	H6'
5'	CH	124,4	7,26 t (8,0)	H7'
6'	CH	129,0	7,37 t (8,0)	H4'
7'	CH	115,2	8,21 d (8,0)	H5'
7a'	C	137,9	-	H4'; H6'
8'	C	172,0	-	H9'
9'	CH ₃	26,5	2,70 s	-

*sinais obtidos pelos experimentos gHMQC/gHMBC, ND: não detectado.

CAPÍTULO 5: Estudo Farmacológico

Um dos objetivos do nosso grupo de pesquisa é a realização de ensaios para algumas atividades biológicas, sendo iniciada uma triagem com testes mais simples e, de acordo com os resultados obtidos, é dada continuidade aos estudos.

Na avaliação das atividades biológicas são investigados os possíveis efeitos tóxicos das espécies. Paralelamente, são testadas as atividades moduladora do sistema imunológico e antimicrobiana dos extratos e de princípios ativos purificados, bem como desenvolvidos modelos clássicos de indução de úlcera, analgesia e inflamação em animais de laboratório, os quais mimetizam estas injúrias no homem. Através desses modelos é possível verificar rapidamente a ausência ou presença das atividades-alvo.

Inicialmente são avaliadas as atividades citotóxica *in vitro*, *in vivo* e genotóxica (Brito, 1994; Mosmann, 1983). Além da avaliação dos efeitos mutagênicos dos extratos, frações e substâncias puras realizados segundo o teste de Ames, utilizando linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA102, com e sem metabolização, utilizando metodologia de pré-incubação (Maron & Ames, 1983).

Para a avaliação das atividades antimicrobiana os extratos são testados frente a modelos de bactérias *Gram*-negativas e *Gram*-positivas e também sobre o gênero *Mycobacterium*, com ênfase no agente etiológico da tuberculose, o *M. tuberculosis* (Palomino *et al.*, 2002).

Para a avaliação das atividades antiinflamatória e analgésica são usados os modelos de edema de pata, teste de contorções abdominais e teste da placa quente (Henriques *et al.*, 1987; Koster & Anderson & Beer, 1959; Eddy & Leimbach, 1953). A determinação da atividade antiulcerogênica é investigada através dos efeitos das substâncias isoladas ou presentes em frações enriquecidas sobre receptores, enzimas e substâncias produzidas em resposta a agressões da mucosa (Mizui & Doteuchi, 1983; Morimoto *et al.*, 1991; Puscas *et al.*, 1997; Arrieta *et al.*, 2003). Paralelamente, ensaios de atividade antioxidante (aquela intrinsecamente ligada a alguns mecanismos de atividade antiúlcera), além dos ensaios clássicos de detecção de muco, prostaglandina, somatostatina, gastrina e de antagonismo aos receptores envolvidos com a secreção ácida gástrica, também são realizados (Worthington & Rosemeyer, 1974; Robert *et al.*, 1979; Garg & Cho & Ogle, 1991; López *et al.*, 1996).

São realizados também ensaios contra *Helicobacter pylori*, o mais importante patógeno bacteriano em humanos envolvido nos processos de úlceras pépticas (Ellof, 1998). A avaliação da motilidade intestinal dos extratos foi realizada segundo metodologia descrita por Wong & Way (1981).

As ações das plantas no sistema imunológico murino são estudadas principalmente através da pesquisa do H₂O₂, NO e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) para avaliar as atividades imunomodulatória dos extratos e/ou substâncias isoladas (Mosmann, 1983; Kovalovsky *et al.*, 2000).

Os ensaios farmacológicos com as espécies de *Alchornea* e *Indigofera* foram realizados/coordenados por alunos e professores participantes do nosso Projeto Biota-Fapesp, alguns resultando em dissertações e teses:

Atividades citotóxica *in vivo*, analgésica e antiulcerogênica

Alchornea: Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima e os mestrados Zeila Pinheiro Lima e Roney Rick de Carvalho (Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp).

Indigofera: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito e os doutorandos Maira Cola-Miranda e Victor Barbastefano (Instituto de Biologia, Depto. de Fisiologia e Biofísica, Unicamp).

Citotoxicidade *in vitro* e atividade antioxidante de *Alchornea*: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp).

Atividade antioxidante de *Indigofera*: Profa. Dra. Alba Regina Monteiro Souza Brito e a pós-doutoranda Elisangela Farias-Silva (Instituto de Biologia, Depto. de Fisiologia e Biofísica, Unicamp).

Atividade mutagênica

Alchornea: Profa. Dra. Eliana A. Varanda e o doutorando Fábio Vieira dos Santos (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp).

***Indigofera* e compostos sintéticos**: Profa. Dra. Eliana A. Varanda e a doutoranda Cássia Regina Primila Cardoso (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp).

Genotoxicidade de *Alchornea* e *Indigofera*: Profa. Dra. Ilce Mara de Silos Collus e a aluna Juliana Mara Serpeloni (Universidade Estadual de Londrina).

Atividades imunomodulatória e antiinflamatória de *Alchornea*, *Indigofera* e compostos sintéticos: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos e a mestranda Flavia Cristine Mascia Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp).

Atividade antimicobacteriana (*M. tuberculosis*) de *Alchornea* e *Indigofera*: Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite e o mestrando Fernando Rogério Pavan (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp).

Atividade antimicrobiana (*H. pylori*, *Aeromonas*, *Yersinia* e *E. coli*) de *Alchornea* e *Indigofera*: Profa. Dra. Tais Maria Bauab e a mestranda Helen Pimenta de Moraes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp).

Motilidade intestinal

***Alchornea*:** Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima e a mestranda Zeila Pinheiro Lima (Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp).

***Indigofera*:** Profa. Dra. Herida R. N. Salgado e os doutorandos Juliana A. Severi e Marcelo A. da Silva (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp).

Neste trabalho, para avaliação das atividades analgésica, antiúlcero-gênica e imunomodulatória foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas (25-35 g) e ratos *Wistar* machos (180-250 g) provenientes dos Biotérios da UNICAMP e UNESP-Botucatu. Os animais foram aclimatados às condições locais dos biotérios por cerca de 15 dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura de $(23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ e ciclos claro-escuro controlados de 12 h. Os animais foram alimentados com ração Nuvital (Nuvilab) água *ad libitum* à vontade e distribuídos, ao acaso, nos diferentes grupos experimentais. Os períodos de jejum a que foram submetidos os animais estão de acordo com o preconizado para cada uma das metodologias empregadas. Os protocolos experimentais dos testes utilizados nesse trabalho foram aprovados pelos Comitês de Ética em Experimentação Animal das instituições envolvidas.

EXPERIMENTAL / RESULTADOS / DISCUSSÕES

A escolha das plantas selecionadas para este estudo foi baseada em informações etnofarmacológicas. Nas introduções dos Capítulos **1** e **2** foram descritas as indicações de uso tradicional para estas plantas medicinais, bem como algumas atividades farmacológicas comprovadas descritas anteriormente na literatura. Neste contexto, apresentamos aqui os resultados mais relevantes referentes aos ensaios farmacológicos realizados com as espécies de *Alchornea glandulosa*, *A. triplinervia*, *Indigofera truxillensis* e *I. suffruticosa* (**Tab. 5.1** e **5.2**).

5.1. *Alchornea*

Resumo dos Resultados Promissores de *Alchornea glandulosa* (Ag) e *Alchornea triplinervia* (At)

Resultados preliminares demonstraram baixa toxicidade aguda dos **EMeOH** e **ECHCl₃** de **Ag** e de **At** (**Tab. 5.1**). No entanto, todos os extratos (**EMeOH** e **ECHCl₃**) de ambas espécies de *Alchornea* apresentaram indícios de mutagenicidade nos ensaios preliminares (Santos, 2006). Deve ser considerado que muitos medicamentos disponíveis no mercado são mutagênicos como, por exemplo, os antineoplásicos ficando na dependência da relação benefício/prejuízo.

Em relação aos experimentos farmacológicos do **EMeOH** de **Ag** foi dado ênfase à avaliação da atividade antiulcerogênica, que revelou eficácia em promover a inibição da úlcera gástrica induzida por diferentes agentes (etanol absoluto, HCl/etanol, AINE-piroxicam e estresse) (Lima, 2006). No modelo de HCl/etanol mostrou inibição de 64% e 46% nas doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg, respectivamente. Esses resultados não foram tão relevantes quanto àqueles observados, por exemplo, com a administração do **ECHCl₃** de **Ag**. Este, na dose de 500 mg/kg, foi duas vezes mais ativo com percentual de inibição de 93 %. É interessante observar que nos modelos de HCl/etanol e AINE, o aumento da dose do **EMeOH** de **Ag** levou a uma diminuição do efeito antiúlcera. Isso provavelmente se deve ao fato de que compostos presentes no extrato polar (o biflavonóide amentoflavona e o alcalóide pteroginidina) também possuam efeito antiinflamatório e que, em maior concentração, tenham intensificado a ação antiinflamatória e reduzido a ação antiulcerogênica (Calvo *et al.*, 2007).

Confirmando o efeito antiinflamatório, o **EMeOH** de **Ag** causou inibição de 70,5 % da produção de H₂O₂, 38,7 % de NO e 15,1 % de TNF- α , sendo que nas determinações de NO e TNF- α a percentagem de inibição aumentou conforme a utilização de concentrações mais elevadas, enquanto que na determinação de H₂O₂ esse fato não foi observado (Lopes, 2004). Esses resultados, ainda que parciais, são de considerável importância uma vez que agentes inibidores da produção destes mediadores são potencialmente benéficos no tratamento de diversas condições associadas à superprodução desse mediador, como nas doenças inflamatórias (Lopes *et al.*, 2005).

No caso de *A. triplinervia*, o **EMeOH** apresentou atividade antiúlcera gástricas nos modelos experimentais *in vivo*. Os mecanismos de ação antiulcerogênica foram extensivamente estudados e envolvem a ativação de fatores de proliferação celular, expressão de COX-2, redução de liberação de gastrina e aumento da liberação de somatostatina. Simultaneamente, o

mesmo extrato apresentou atividade antiinflamatória *in vivo*. Esse resultado foi o mesmo obtido para a avaliação *in vitro*, que apontou que o **EMeOH** de **At** não estimulou a liberação significativamente de H₂O₂, NO e TNF- α , sugerindo uma potencial atividade antiinflamatória que foi comprovada por estudos complementares, os quais evidenciaram a inibição da liberação das espécies reativas intermediárias de oxigênio e nitrogênio e do TNF- α . Esse resultado é interessante, uma vez que substâncias antiinflamatórias contribuem à contenção de úlceras gástricas (Lima, 2006).

O **EmeOH** de **Ag** (250 mg/Kg) e a **fração AcOEt** de **At** (100 mg/Kg) foram ainda avaliados quanto ao seu efeito cicatrizante das úlceras induzidas por ácido acético, sendo também realizadas análises histológicas e imunoistoquímicas da área de lesão. Os tratamentos não mostraram diferenças significativas nas áreas de cicatrização em uma análise macroscópica. Porém, um exame histológico apontou um aumento nas áreas de regeneração da mucosa gástrica dos animais tratados com ambos (**EMeOH** de **Ag** e **fração AcOEt** de **At**). Na análise imunoistoquímica de **At** foram observados aumentos de células positivas marcadas para a enzima COX-2, aumento de células produtoras de somatostatina e diminuição de células produtoras de gastrina. Os resultados obtidos demonstram que o principal mecanismo de ação da **fração AcOEt** de **At** está na modulação de PG endógenas.

No ensaio de motilidade intestinal dos **EMeOH** de **Ag** e **At** foi observado comportamento antagônico, sendo que **EMeOH** de **Ag** aumentou a motilidade intestinal dos camundongos, enquanto o **EMeOH** de **At** diminuiu. A diminuição da motilidade pode levar a uma alteração na farmacocinética de medicamentos no organismo, além de causar retardamento no esvaziamento gastrintestinal, o que pode estar relacionado à proteção antiulcerogênica (Lima, 2006).

Tabela 5.1. Resultados dos ensaios farmacológicos realizados com extratos **EMeOH** e **ECHCl₃** das espécies de *Alchornea*.

Ensaio Farmacológicos	Controles		<i>A. glandulosa</i> (Ag)		<i>A. triplinervia</i> (At)	
	C-	C+	EMeOH	ECHCl ₃	EMeOH	ECHCl ₃
Toxicidade Aguda	Salina (10 mL/Kg)	-	Ausente (5 g/Kg)	Ausente (5 g/Kg)	Ausente (5 g/Kg)	Ausente (5 g/Kg)
Mutagenicidade (-) S9, (+) S9	DMSO	4-NFD (5,0 µg/placa)	IM > 2 (7,5 µg/placa)	IM > 2 (7,5 µg/placa)	IM > 2 (7,5 µg/placa)	IM > 2 (7,5 µg/placa)
Antiúlcera HCl/EtOH	Salina (10 mL/Kg)	Lanzoprazol (30 mg/Kg)	64,0 % (250 mg/Kg)	93,0 % (500 mg/Kg)	89,0 % (1000 mg/Kg)	87,0 % (1000 mg/Kg)
AINE	Salina (10 mL/Kg)	Cimetidina (100 mg/Kg)	78,0 % (250 mg/kg)	57,0 % (1000 mg/Kg)	76,0 % (1000 mg/Kg)	NA
Motilidade Intestinal	Salina (10 mg/Kg)	Atropina (5 mg/Kg)	(+) 5,8 % (1000 mg/Kg)	NA	(-) 2,3 % (1000 mg/Kg)	NA
Imunomodulatória						
H₂O₂	6,4 nmols/well	125,5 (PMA 2 µM)	(-) 70,5 % (15,6 µg/mL)	NA	(-) 69,6 % (62,5 µg/mL)	NA
NO	2,4 µmols/well	130,8 (LPS 1µg/mL)	(-) 38,7 % (62,5 µg/mL)	NA	(-) 76,7 % (62,5 µg/mL)	NA
TNF-α	17,3 unid./mL	254,5 (LPS 10 µg/mL)	(-) 15,1 % (62,5 µg/mL)	NA	(-) 21,0 % (62,5 µg/mL)	NA

C-: controle negativo; C+: controle positivo; (-) S9: sem ativação metabólica; (+) S9: com ativação metabólica; DMSO: dimetilsulfóxido; NFD: nitrofenilenodiamina; IM: índice mutagênico (revertentes); PMA: forbol miristato/acetato; LPS: lipopolissacarídeo; NO: óxido nítrico; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; unid.: unidades.

5.2. *Indigofera*

Resumo dos resultados promissores de *Indigofera truxillensis* (It) e *Indigofera suffruticosa* (Is)

Administração dos extratos (**EMeOH** e **ECHCl₃**) de ambas espécies de *Indigofera* não produziu sinal de toxicidade aguda, razão pela qual foi iniciada a avaliação das atividades farmacológicas (**Tab. 5.2**).

Na avaliação da mutagenicidade dos extratos (**EMeOH** e **ECHCl₃**) das espécies de *Indigofera* foi verificado que somente os **EMeOH** apresentaram atividade significativa. Essa atividade foi detectada unicamente na linhagem TA98 e sem ativação metabólica, indicando que

os compostos presentes nestes extratos são capazes de causar mutações pelo deslocamento do quadro de leitura do DNA. As frações enriquecidas do **EMeOH** de **It** foram avaliadas. A fração contendo glicerolípídeos não apresentou mutagenicidade, enquanto a fração flavonóides mostrou sinais de atividade mutagênica para linhagem TA98, com e sem ativação metabólica (IM 1,1-1,9), com significativo efeito dose-dependente ($p \leq 0,01$). A fração alcalóides apresentou indícios de mutagenicidade somente em altas concentrações (IM 1,7 e $p \leq 0,05$). Os alcalóides (**It1-It2**) e os flavonóides (**It5-It9**) obtidos de *I. truxillensis* quando testados (linhagem TA98) não apresentaram efeitos mutagênicos sugerindo que a mutagenicidade observada no **EMeOH** de **It** poderia ser resultante da interação entre os flavonóides e os alcalóides.

Ambas espécies de *Indigofera* (**It** e **Is**) apresentaram resultados semelhantes quando avaliadas com relação à liberação dos mediadores H_2O_2 , NO e TNF- α , com elevados valores para os dois últimos fatores e baixa liberação do primeiro, tanto nos **ECHCl₃** quanto nos **EMeOH**.

Os **EMeOH** de **It** e de **Is** apresentaram CIM promissoras no teste de atividade contra *Mycobacterium*. Posteriormente foram testadas as frações enriquecidas do **EMeOH** de **Is**, sendo averiguado que o potencial anti-*M. tuberculosis* poderia ser devido a fração flavonoídica (CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$), enquanto a fração alcaloidal apresentou um CIM igual a do **EMeOH** de **Is**. Por outro lado, a melhor atividade foi observada para o **EMeOH** de **It**, sendo constatado que as substâncias ativas estavam na fração alcalóides (CIM 31,25 $\mu\text{g/mL}$), enquanto a fração flavonoídica apresentou CIM igual ao do **EMeOH** de **It**. Os bons resultados com a fração alcalóides de **It** levaram também a análise de suas substâncias puras (índigo, isatina e indirubina), porém os resultados de CIM foram maiores de 150 $\mu\text{g/mL}$. Baseado nestes resultados foi possível sugerir que a atividade encontrada na fração alcalóides de **It** seja consequência de um sinergismo das substâncias que a compõem ou de uma possível substância ainda não isolada.

A atividade antiulcerogênica foi detectada para os **EMeOH** de **It** e de **Is**, com avaliação posterior dos mecanismos de ação envolvidos através de modelos experimentais *in vivo* de indução de úlcera por: 1) úlcera induzida por etanol; 2) avaliação da atividade antissecretora pelo modelo de ligadura do piloro; 3) investigação dos fatores protetores da mucosa gástrica como envolvimento com óxido nítrico (NO), grupamentos sulfidríla, produção de muco gástrico aderido e produção de prostaglandina; 4) avaliação do processo de cicatrização com o modelo de úlcera induzida por ácido acético e fatores relacionados com essa cicatrização como a expressão de Heat Shock Protein 70 (HSP70), uma proteína celular citoprotetora e proliferação celular (Cola Miranda, 2006).

Os resultados mostraram que o **EMeOH** de **It** inibiu significativamente a formação de lesões gástricas em todos os modelos gerais e mecanismos acima citados, com ausência de toxicidade aguda *in vivo*, mas mutagenidade *in vitro*. Foi verificado também que o extrato é capaz de modular a atividade antioxidante, o que pode estar ligado ao efeito gastroprotetor detectado (Cola Miranda *et al.*, 2006).

A atividade antiulcerogênica também foi detectada para o **EMeOH** de **Is**. Os experimentos demonstraram que ocorre aumento de muco, envolvimento de compostos sulfidríla e mecanismos antioxidantes. A atividade antiulcerogênica não envolve efeitos antissecretórios, considerando que não houve alteração do pH. Paralelamente, foi ensaiada a atividade antioxidante do **EMeOH** de **Is**, que também apresentou atividade sequestradora de radicais livres, uma vez que o pré-tratamento com este extrato preveniu contra a depleção de compostos sulfidríla na mucosa de ratos submetidos à indução de úlcera por etanol absoluto (Cola Miranda, 2006).

Foi realizada análise dos potenciais antioxidantes do índigo, alcalóide isolado de ambas espécies de *Indigofera*, que apresentou propriedade antiulcerogênica dependente de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, tais como, aumento de glutatona redutase e manutenção dos estoques de grupamento sulfidríla. Foi verificado que ocorreu prevenção da fragmentação do DNA induzida pelo etanol absoluto em animais tratados com índigo. Além disso, observações macroscópicas indicaram que o pré-tratamento com o índigo formava uma camada viscosa mais espessa na parede estomacal dos animais, mesmo quando submetidos ao tratamento com etanol absoluto, o que corroborou a atividade antiulcerogênica previamente detectada (Farias Silva *et al.*, 2007).

Os resultados também indicaram que, apesar do aumento de muco, a síntese de PGE₂ não foi modificada pelo índigo. No entanto, resultados obtidos empregando a técnica de Western blotting mostraram que o pré-tratamento com índigo aumentou a expressão de COX-1 e diminuiu a de COX-2 na mucosa de ratos submetidos à úlcera induzida por etanol, mostrando sua importante seletividade (Farias Silva *et al.*, 2007).

Mesmo em concentrações basais de PGE₂, ocorreu aumento de muco na mucosa gástrica de ratos pré-tratados com índigo, indicando que havia outro mecanismo além da síntese de PGE₂ determinando este efeito protetor. Assim, também foi investigado a expressão da NOS total na mucosa gástrica de ratos submetidos ao pré-tratamento com índigo. Novamente, empregando a técnica de Western blotting, foi observado aumento na expressão desta enzima, essencial para a geração de NO e, conseqüentemente, aumento de muco. Assim, a modulação compensatória e/ou seletiva na expressão das COX, o aumento de muco via NO e a manutenção da concentração

basal de PGE₂ indicaram que o índigo apresenta, além do efeito antiúlcera, potencial efeito antiinflamatório sem comprometimento da mucosa gástrica (Farias Silva *et al.*, 2007).

Tabela 5.2. Resultados dos ensaios farmacológicos realizados com extratos **EMeOH** e **ECHCl₃** das espécies de *Indigofera*.

Ensaio Farmacológicos	Controles		<i>I. truxillensis</i> (It)		<i>I. suffruticosa</i> (Is)	
	C-	C+	EMeOH	ECHCl ₃	EMeOH	ECHCl ₃
Toxicidade Aguda	Salina (10 mL/Kg)	-	Ausente (5 g/Kg)	Ausente (5 g/Kg)	Ausente (5 g/Kg)	Ausente (5 g/Kg)
Mutagenicidade (-) S9	DMSO	NFD (5 µg/placa)	IM > 2 (7,5 µg/placa)	IM < 2 (7,5 µg/placa)	IM < 2 (7,5 µg/placa)	IM < 2 (7,5 µg/placa)
Mutagenicidade (+) S9	DMSO	NFD (5 µg/placa)	IM < 2 (7,5 µg/placa)	NA	NA	NA
Antiúlcera HCl/EtOH	Salina (10 mL/Kg)	Lanzoprazol (30 mg/Kg)	96,0 % (500 mg/Kg)	NA	71,0 % (100 mg/Kg)	NA
AINE	Salina (10 mL/Kg)	Cimetidina (100 mg/Kg)	69,0 % (500 mg/kg)	NA	NA	NA
Estresse	Salina (10 mL/Kg)	Cimetidina (100 mg/Kg)	89,0 % (1000 mg/Kg)	NA	NA	NA
Motilidade Intestinal	Salina (10 mg/Kg)	Atropina (5 mg/Kg)	Ausente	Ausente	(-) 4,7 (1000 mg/Kg)	(-) 25,5 % (1000 mg/Kg)
Antimicrobiano (CIM)		Isoniazida (5 µg/mL)	62,5 µg/mL	1000,0 µg/mL	125,0 µg/mL	1000,0 µg/mL
Imunomodulatória						
H₂O₂	6,4 nmols/ well	125,5 (PMA 2 µM)	(-) 0,5 nmols/ well	(-) 3,5 nmols/well	(-) 0,6 nmols/ well	(-) 3,3 nmols/well
NO	2,4 µmols/well	130,8 (LPS 1 µg/mL)	(+) 110,0 µmols/well	(+) 58,0 µmols/well	(+) 106,0 µmols/well	(+) 60,0 µmols/well
TNF-α	17,3 unid./mL	254,5 (LPS 10 µg/mL)	(+) 250,0 unid./mL	(+) 231,4 unid./mL	(+) 252,7 unid./mL	(+) 234,6 unid./mL

C-: controle negativo; C+: controle positivo; (-) S9: sem ativação metabólica; (+) S9: com ativação metabólica; DMSO: dimetilsulfóxido; NFD: nitrofenilenodiamina; IM: índice mutagênico (revertentes); PMA: forbol miristato/acetato; LPS: lipopolissacarídeo; NO: óxido nítrico; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; unid.: unidades.

5.3. Isatina e seus derivados sintéticos

Isatina comercial e seus derivados sintéticos hidrazonas (**T1-T7**), azina (**T8**) e semicarbazona de isatina (**T9**), juntamente com indirubina e acetato de indirubina foram avaliados quanto às atividades imunológica e mutagênica.

Para a avaliação da atividade mutagênica *in vitro* dos compostos sintéticos, utilizando o teste de Ames, foi utilizada apenas a linhagem TA98, uma vez que foram obtidos resultados significativos nos **EMeOH** das espécies de *Indigofera*. O ensaio, igualmente, foi desenvolvido com e sem ativação metabólica.

Os ensaios sem metabolização detectaram a atividade mutagênica da isatina e seus derivados *p*-metoxifenilidrazona (**T2**), *p*-nitrofenilidrazona (**T3**) e 2,2,2-trifluoretilidrazona (**T6**). Os demais derivados (**T1**, **T4**, **T7**, **T8** e **T9**) apresentaram indícios de mutagenicidade. O índigo, indirubina e acetato de indirubina (**T10**) também apresentaram indícios de mutagenicidade. Após a metabolização, foi detectada mutagenicidade do índigo, e a isatina perdeu o potencial mutagênico. Os derivados *p*-metoxifenilidrazona (**T2**) e 2-hidroxietilidrazona (**T5**) apresentaram mutagenicidade, enquanto as demais substâncias testadas apresentaram resultados negativos.

Os compostos sintéticos também foram testados quanto à sua citotoxicidade em macrófagos murinos. Indirubina sintética, acetato de indirubina (**T10**), *p*-nitrofenilidrazona (**T3**) e 2-hidroxietilidrazona (**T5**) mostraram maior citotoxicidade em relação às outras substâncias testadas. Foi realizado também o teste de detecção de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos murinos, sendo que nenhuma dos compostos testados apresentou estimulação. A ausência de um mediador pode ser por dois motivos: não induz ou pode estar sendo inibida essa produção. Para confirmar essa questão foi determinada a inibição de NO em presença de LPS, e todos compostos apresentaram de moderada à alta inibição, dentre os quais a azina (**T8**) (100 %) foi a mais ativa inibidora e o menos inibitório foi a *p*-nitrofenilidrazona (30,43 %). Desse modo, a azina poderia ser considerada um promissor antiinflamatório.

Estão sendo realizados também ensaios de atividade em cultivos de células neoplásicas, paralelamente a determinação da citotoxicidade destes compostos (Empresa PharmaMar - Madrid). Normalmente são utilizados sistemas neoplásicos A-549 e HT-29 de carcinomas humanos de pulmão e cólon, respectivamente, onde se pretende inibir diretamente *in vitro* um cultivo das células tumorais de lento desenvolvimento, em fase de crescimento, mediante a exposição continuada dessas células aos compostos a serem ensaiados. Outro ensaio envolve o sistema MEL-28 (melanoma maligno), interessante por ser uma neoplasia bastante resistente e de difícil tratamento, além de apresentar grande tendência a produzir metástases extensas. O último

ensaio envolve o sistema neoplásico P-338 (leucemia de camundongos), utilizado para detectar a possível inibição das sínteses de DNA, RNA e proteínas, já que são processos chave no controle de tumores, visto que determinam a velocidade de proliferação celular. Ensaios com bactérias *Gram* negativas, *Gram* positivas e sobre o gênero *Mycobacterium tuberculosis* também estão em andamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo químico das folhas de *Alchornea glandulosa* (**Ag**) e *A. triplinervia* (**At**) e das partes aéreas de *Indigofera truxillensis* (**It**) e *I. suffruticosa* (**Is**), contribuindo com extratos, frações e substâncias puras destas plantas para ensaios farmacológicos.

Os resultados obtidos do estudo cromatográfico das espécies de *Alchornea* são compatíveis com os relatados na literatura. Derivados do ácido gálico haviam sido previamente isolados de *A. glandulosa* e *A. triplinervia* (Braca *et al.*, 2002 e Urrea-Bulla *et al.*, 2004). Esteróides, alcalóides guanidínicos, elagitaninos e os flavonóis foram descritos anteriormente para *A. glandulosa* (Urrea-Bulla *et al.*, 2004; Conegero *et al.*, 2003; Higa, 2001). Amentoflavona foi purificada de *A. triplinervia* (Braca *et al.*, 2002), a literatura relata atividade antioxidante e antiulcerogênciã deste biflavonóide (Goel & Gambhir & Dasgupta, 1988). Segundo a literatura, o alcalóide guanidínico pteroginidina apresenta atividade antitumoral (Bolzani & Gunatilaka & Kingston, 1995). Taninos são conhecidos por possuírem atividade antisséptica e por agir no sistema digestivo, sendo utilizados no tratamento de diarréias, desordens estomacais e inflamações (Haslam, 1996).

O estudo químico de **It** e **Is** também corroborou os dados da literatura para espécies de *Indigofera*, sendo isolados de ambas espécies alcalóides bis-indólicos (indigóides), que podem ser considerados como marcadores taxonômicos deste gênero. Em **It** foram encontradas quantidades significativas de derivados do kaempferol, outra classe de compostos amplamente encontrada neste gênero, enquanto de **Is** foram isolados pequenas quantidade de derivados da quercetina. Desse modo foi possível concluir que **Is** apresentou maior variedade de flavonóides e alcalóides, mas em concentrações inferiores àquelas encontradas em **It**.

Os metabólitos isolados e/ou identificados nas espécies de *Alchornea* e *Indigofera* foram sumarizados no final destas considerações.

Alguns exemplos dos principais compostos químicos com atividade antiulcerogênica encontrados em muitas espécies de plantas são os flavonóides quercetina e kaempferol (Guaraldo & Sertiè & Bacchi, 2001). Estudos com flavonóides glicosilados, como a rutina, que possuem sistema catecólico no anel B exibiram também elevadas atividades antioxidante e antiulcerogênica (La Casa Garcia *et al.*, 2000).

A literatura relata inúmeros estudos farmacológicos envolvendo alcalóides bis-indólicos, principalmente derivados da indirubina, a qual isolamos de *Indigofera*, tais como atividade anti-proliferativa e estudos genéticos (Adachi *et al.*, 2004), atividade anti-cancerígena (Nam *et al.*,

2005), no tratamento da doença de Alzheimer (Polychronopoulos *et al.*, 2004), como antioxidante (Beutner *et al.*, 2001), atividade antimicrobiana (MacNeil *et al.*, 2001), atividade antiinflamatória (Iwaki & Kurimoto, 2002), atividade antimetabólica (Damiens *et al.*, 2001), atividade fungicida (Marero *et al.*, 1997) e atividade leishmanicida (Grant *et al.*, 2004), entre outras.

Em relação aos alcalóides isolados de *Indigofera* é interessante ressaltar que drogas contendo o grupo indólico como estrutura básica, ou como grupo ligado, gera propriedades específicas. O grupo indólico tem algumas similaridades com os núcleos de purina. Assim, essas substâncias podem se assemelhar a nucleosídeos e nucleotídeos, com o potencial de ligar e inibir muitas enzimas que usam trifostato de adenosina (ATP) ou trifosfato de guanosina. Drogas baseadas em grupos indólicos também interagem com proteínas, incluindo receptores esteroidais (Guengerich *et al.*, 2004).

A produção anual de índigo sintético é calculada em 22.000 toneladas de material para tintura. Por causa da importância do índigo natural considerável esforço tem sido realizado para substituir a obtenção do índigo sintético por métodos biotecnológicos, especialmente nas indústrias cosméticas e têxteis onde há um grande apelo para o desenvolvimento e comercialização de compostos naturais. Plantas contêm além de trans-índigo e trans-indirubina, impurezas como cis-índigo, cis-indirubina, isoíndigo e flavonóides que acrescentam ao índigo natural uma cor mais intensa que a do índigo sintético. Por esta razão, há grande interesse no estudo de precursores da biossíntese de indigóides, como a indicana e o novo dioxindol-*O*-glucosídeo (Kokubun & Edmonds & John, 1998). Além da importância desta classe de compostos na busca de novos agentes antitumorais (Nan *et al.*, 2005).

Outros metabólitos isolados das espécies de *Indigofera* com interessantes efeitos terapêuticos foram um *chiro*-inositol, o pinitol, e o ureídeo alantoína, que apresentam ação antiipoglicemiante (Bates & Jones & Baylei, 2000) e propriedade cicatrizante (Lorenzi & Matos, 2002), respectivamente.

A análise utilizando FIA-ESI-IT-MS forneceu o perfil químico do **EMeOH** de **At**, apresentando picos das moléculas desprotonadas referentes aos compostos isolados, além da identificação de compostos fenólicos de elevada massa molecular (elagitaninos e proantocianidinas). Esse experimento ressaltou a eficiência e rapidez da técnica de espectrometria de massas para o estudo de plantas, sem a necessidade do isolamento de metabólitos previamente caracterizados e de difícil obtenção.

O emprego da técnica FIA-ESI-IT-MS também permitiu a identificação de uma classe de compostos no **EMeOH** das espécies de *Indigofera*, a análise da fração inicial deste extrato (obtida por CPG) indicou a existência de grande quantidade de derivados de glicerolipídeos.

O emprego de HPLC-ESI-IT-MS possibilitou a identificação simultânea dos flavonóides e alcalóides, anteriormente isolados, nos **EMeOH** e frações flavonóides e alcalóides das espécies de *Indigofera* (**Is** e **It**).

A partir da isatina, um precursor dos alcalóides bis-indólicos, foram preparados indirubina, acetato de indirubina (**T10**), sete hidrazonas (**T1-T7**), uma azina (**T8**) e uma semicarbazona (**T9**).

Quanto aos resultados farmacológicos, os extratos polares e apolares de ambas espécies de *Alchornea* inibiram a formação de úlceras gástricas e reduziram a severidade das lesões gástricas frente a diversos modelos experimentais, apontando para um potente efeito gastroprotetor e cicatrizante destas espécies. Este fato confirmou a atividade antiulcerogênica atribuída a este gênero de plantas na medicina popular. Entretanto, apesar dos resultados preliminares terem demonstrado baixa toxicidade dos extratos, foram observados indícios de mutagenicidade das espécies de *Alchornea*. Sendo necessário aprofundar os estudos para assegurar o emprego seguro destas plantas no tratamento de enfermidades gástricas pela população e identificar os compostos responsáveis por essa atividade, além disso, os **ECHCl₃** apresentaram efeito mais potente que os **EMeOH** e essas plantas são utilizadas corriqueiramente na forma de infusões.

Os **EMeOH** das espécies de *Alchornea* e as frações **AcOEt** de **Ag** e de **At** demonstraram possuir uma forte capacidade inibitória de NO, que está relacionado com atividade antiinflamatória. Este resultado é instigante, visto que ao realizar a partição AcOEt/água os taninos permanecem na fração aquosa, não sendo portanto os responsáveis pela atividade observada, sendo a fração **AcOEt** constituída basicamente por derivados quercetínicos.

Tendo em vista o vasto espectro de atividades biológicas dos derivados quercetínicos, a presença desses metabólitos secundários nas espécies de *Alchornea* e também em *I. suffruticosa* poderá fornecer subsídios importantes para a correta interpretação dos resultados biológicos. Como exemplo, eles representam um grupo de substâncias que exibem propriedades antioxidante e habilidade para modular várias enzimas ou receptores celulares. Alguns flavonóides apresentam atividades antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, analgésica, efeitos antialérgico, hepatoprotetor, citostático, e também sobre a apoptose celular (Hodek & Trefil & Stiborová, 2002).

Os extratos polares e apolares das espécies de *Indigofera* não apresentaram toxicidade aguda, entretanto, foram observados efeitos mutagênicos em uma das linhagens avaliadas. Das

frações enriquecidas obtidas a partir dos **EMeOH**, a fração flavonóides foi a que apresentou sinais significativos de mutagenicidade. Para a espécie **It** foram avaliados também os alcalóides e flavonóides isolados, os quais não foram mutagênicos, sugerindo que a mutagenicidade observada nos **EMeOH** seja resultante de um sinergismo entre essas classes de metabólitos ou devido a outros compostos não avaliados.

Os resultados dos ensaios com micobactérias foram bastante interessantes, pois foi averiguado que para o **EMeOH** de **Is** o potencial anti-*M. tuberculosis* pode ser devido a fração flavonóides. Por outro lado, no caso do **EMeOH** de **It** que apresentou uma atividade superior ao **EMeOH** de **Is** ficou constatado que o potencial anti-*M. tuberculosis* se deve à fração alcalóides. Análise dos metabólitos puros índigo e indirubina mostraram que não foram eles os responsáveis pelo efeito observado. Assim, há necessidade de ensaiar as demais substâncias puras pertencentes a estas frações para esclarecimento dos resultados.

Com relação à atividade antiulcerogênica o **EMeOH** de **It** e suas frações **AcOEt** e **aquosa** inibiram significativamente a formação de lesões gástricas. Foi verificado também que ambas as frações são capazes de modular a atividade antioxidante, mas com magnitudes diferentes, provavelmente devido à composição química quali e quantitativa de cada uma delas. A atividade antiulcerogênica envolvendo, entre outros, mecanismos antioxidantes também foi detectada para o **EMeOH** e a **fr. AcOEt** de **Is**.

Foram realizadas diversas análises dos potenciais antioxidantes do índigo, substância isolada de ambas espécies de *Indigofera*, que apresentou propriedade antiulcerogênica dependente de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, podendo ser um dos responsáveis pela atividade detectada nos **EMeOH**. Assim, a modulação compensatória e/ou seletiva na expressão das COXs, o aumento de muco via NO e a manutenção da concentração basal de PGE2 indicaram que o índigo apresentou potencial antiinflamatório, sem comprometimento da mucosa gástrica. Resultado importante, visto que o uso contínuo de muitos antiinflamatórios disponíveis atualmente lesa o sistema digestivo.

Conforme descrito no **Cap. 1 (Tab. 1.1)** a espécie **Is** é utilizada em diversos países da América Latina, África e Ásia para o tratamento de diferentes afecções (febrífuga, purgante, anti-espasmódica, sedativa, diurética, antiúlceras, antitérmica, hepatite, inseticida e antiofídica). Alguns estudos comprovaram importantes efeitos atribuídos a esta planta, como atividade antiinflamatória, antimicrobiana e antitumoral. Nossos trabalhos complementaram esses resultados, pois demonstraram pronunciados efeitos principalmente no sistema imunológico, além de atividade antiulcerogênica, antioxidante e antimicobacteriana.

A partir da isatina, um precursor dos alcalóides bis-indólicos, foram preparados indirubina, acetato de indirubina, sete hidrazonas, uma azina e uma semicarbazona. Os resultados preliminares demonstraram atividade mutagênica (sem metabolização) dos compostos isatina, *p*-metoxifenilidrazona, *p*-nitrofenilidrazona e 2,2,2-trifluoretilidrazona, no entanto, após metabolização foi detectada mutagenicidade para a indigotina, *p*-metoxifenilidrazona e 2-hidroxiethylidrazona. Os compostos indirubina, acetato de indirubina, *p*-nitrofenilidrazona e 2-hidroxiethylidrazona mostraram maior citotoxicidade em relação às outras substâncias testadas. Na avaliação inicial sob o sistema imunológico foi determinada a inibição de NO em presença de LPS, a azina apresentou potente efeito antiinflamatório, com 100 % de inibição. Todos os demais compostos sintéticos apresentaram inibição considerável.

As espécies de *Alchornea* e *Indigofera* e os compostos sintéticos apresentaram resultados promissores frente a vários ensaios farmacológicos realizados, conforme discutido no Capítulo 5. No entanto, há necessidade da continuidade dos estudos químico-farmacológicos visando à identificação dos compostos responsáveis por essas atividades ou, em alguns casos, averiguando a possibilidade de ocorrência de sinergismo. Visto que as diferentes classes de compostos isolados apresentam, segundo a literatura, as mesmas atividades farmacológicas como descrito acima.

Metabólitos secundários isolados e/ou identificados nas espécies de *Alchornea*.

Metabólito secundário	ECHCl ₃ Ag	ECHCl ₃ At	EMeOH Ag	EMeOH At
estigmasterol (esteróide)	X	X		
campesterol (esteróide)	X	X		
sitosterol (esteróide)	X	X		
lupeol (terpeno)		X		
friedelan-3-ol (terpeno)		X		
friedelan-3-ona (terpeno)		X		
pteroginidina (alcalóide)	X			
Amentoflavona (biflavonóide)			X	X
Quercetina (flavonol)			X	X
quercetina 3- <i>O</i> - α -L-arabinopiranosídeo			X	X
quercetina 3- <i>O</i> - β -D-galactopiranosídeo			X	X
quercetina 3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo				X
quercetina 7- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo				X
miricetina 3- <i>O</i> - α -L-raminopiranosídeo			X	
deriv. brevifolina (isocumarina)			X	X
ácido gálico			X	X
galato de metila			X	X
isocorilagina (elagitanino)				X
ácido quínico			NA	X*
ácido pentagalolquínico			NA	X*
ac. metilpentagalol quínico			NA	X*
tetragaloliglicopiranosose (elagitanino)			NA	X*
dímero proantodicianidina			NA	X*
trímero proantodicianidina			NA	X*
quercetina-galoilexose			NA	X*

* identificados somente por Espectrometria de massas. NA: não analisado.

Metabólitos secundários isolados e/ou identificados nas espécies de *Indigofera*.

Metabólito secundário	ECHCl₃ It	ECHCl₃ Is	EMeOH It	EMeOH Is
Isoprenóides	X	X		
indigotina (alcalóide)	X	X	X	X
indirubina (alcalóide)	X	X	X	X
6' metoxi 2, 5, 6 triidroxisoindirubina (alcalóide)				X
indigotina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (alcalóide)				X
dioxindol-3-O-β-D-glicopiranosídeo (precursor dos alcalóides)				X
indicana (precursor dos alcalóides)			X	X
alantoína (ureídeo)				X
glicerolípídeos			X	X
pinitol (ciclitol)			X	X
sitosterol 3-O-β-D-glicopiranosídeo (esteróide)			X	X
ácido gálico				X
kaempferol 3-O-α-L-raminopiranosídeo (flavonol)			X	
kaempferol 7-O-α-L-raminopiranosídeo			X	
kaempferol 3-O-α-L-raminopiranosil-7-O-α-L-raminopiranosídeo			X	
kaempferol 3-O-α-L-arabinopiranosil-7-O-α-L-raminopiranosídeo			X	
kaempferol 3-O-[α-L-arabinopiranosil-(2→1)-α-L-apiofuranosil]-7-O-α-L-raminopiranosídeo			X	
quercetina 7-O-β-D-glicopiranosídeo				X
quercetina 3-O-β-D-glicopiranosil-(2→1)-O-β-D-glicopiranosídeo				X
quercetina 3-O-β-D-galactopiranosil-(2→1)-β-D-xilopiranosídeo				X
quercetina 3-O-β-D-glicopiranosil-[(4→1)-α-L-raminopiranosil]-(6→1)-α-L-apiofuranosídeo				X
quercetina 3-O-β-D-glicopiranosil-(6→1)-α-L-raminopiranosídeo				X

CONCLUSÕES

- Os constituintes majoritários encontrados nas espécies de *Alchornea* foram compostos fenólicos, principalmente flavonóides monoglicosilados derivados da quercetina. Esses metabólitos, segundo a literatura, apresentam atividades relacionadas à gastroproteção e a propriedade antiinflamatória, dando suporte às informações etnomedicinais e corroborando os resultados dos ensaios farmacológicos apresentados nesta tese.

- As espécies de *Indigofera* apresentaram maior ocorrência de glicerolipídeos, alcalóides bis-indólicos e flavonóis mono, di e triglicosilados derivados da quercetina em **Is** e do kaempferol em **It**, respectivamente. Sendo isolados cinco substâncias inéditas: kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo, 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisindirubina, indigotina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, dioxindol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo. *I. suffruticosa* e *I. truxillensis* apresentaram, entre outras, propriedades antiinflamatória, antiulcerogênica, antioxidante e anti *M. tuberculosis*. Alcalóides bis-indólicos e flavonóis glicosilados podem ser os responsáveis por essas atividades, segundo nossos resultados preliminares e dados da literatura.

- O uso da técnica FIA-ESI-IT-MS possibilitou detectar a presença de derivados do ácido galoilquínico, elagitaninos e proantodicianidinas em *A. triplinervia* e de glicerolipídeos nas espécies de *Indigofera*, enquanto o emprego de HPLC-ESI-IT-MS permitiu estabelecer o perfil químico dos extratos metanólicos e frações das espécies de *Indigofera*.

- Foram preparados, a partir da isatina, os alcalóides indirubina e acetato de indirubina, juntamente com sete hidrazonas, uma azina e uma semicarbazona. Os compostos isatina, *p*-metoxifenilidrazona, *p*-nitrofenilidrazona, 2,2,2-trifluoretilidrazona e 2-hidroxiethylidrazina demonstraram atividade mutagênica. Indirubina, acetato de indirubina, *p*-nitrofenilidrazona e 2-hidroxiethylidrazona apresentaram maior citotoxicidade em relação aos demais compostos. Além disso, ensaio preliminar para inibição de NO determinou promissor efeito antiinflamatório da azina.

- Este estudo envolveu diferentes enfoques: apresentou uma abordagem interdisciplinar possibilitando visualizar as potencialidades das plantas medicinais; mostrou resultados relevantes na valorização da cultura popular; contribui para o aumento do conhecimento sobre a composição química e atividade farmacológica, avaliando a biodiversidade das plantas dos gêneros *Alchornea* e *Indigofera*, pertencentes ao bioma Cerrado.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE FITOTERÁPICOS. **Fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.abifito.com.br>>. Acesso em: 10 set. 2006.
- ABO, K. A.; ASHIDI, J. S. Antimicrobial screening of *Bridelia*, *Micrantha*, *Alchornea cordifolia* and *Boerhavia diffusa*. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 28, n. 3/4, p. 167-169, 1999.
- ABUBAKAR, M. S.; BALOGUN, E.; ABDURAHMAN, E. M.; NOK, A. J.; SHOK, M.; MOHAMMED, A.; GARBA, M. Ethnomedical treatment of poisonous snakebites: plant extract neutralized *Naja nigricollis* venom. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n. 5, p. 343-348, 2006.
- ADACHI, J.; MORI, Y.; MATSUI, S.; MATSUDA, T. Comparison of Gene Expression Patterns between 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and a Natural Arylhydrocarbon Receptor Ligand, Indirubin. **Toxicological Sciences**, v. 80, p.161-169, 2004.
- ADEWUNMI, C. O.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEBAJO, A. C.; ALADESANMI, A. J.; MURPHY, N.; WANDO, J. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 19-24, 2001.
- ADINARAYANA, D.; SARADA, M. Phytochemical study of *Indigofera mysorensis* Rottl. (N.O.Leguminosae) leaves. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 64, n. 10, p. 648-649, 1987.
- AGBOR, G. L. A.; TALLA, L.; NGOGANG, J. Y. The anti-diarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 11, p. 873-876, 2004.
- AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
- AJALI, U. Antibacterial activity of *Alchornea cordifolia* stem bark. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 436-438, 2000.
- AL MESHAL, I. A.; MOSSA, J. S.; AL YAYA, M. A.; KHATIBI, A.; HAMMOUDA, Y. Phytochemical and biological screening of Saudi medicinal plants (part I). **Fitoterapia**, v. 53, n. 3, p. 79-84, 1982.
- ALSTON, T. A.; MELA, L.; BRIGHT, H. J. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 9, p. 3767-3771, 1977.
- AMALA-BHASKAR, E.; GANGA, N.; ARIVUDAINAMBI, R.; SANTHANAM, G. Anti-inflammatory activity of *Indigofera aspalathoides* Vahl. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 76, p. 115-118, 1982.
- AMOS, S.; BINDA, L.; KUNLE, O. F.; OKAFOR, I.; EMEJE, M.; AKAH, P. A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Smooth muscle contraction induced by *Indigofera dendroides* leaf extracts may involve calcium mobilization via potential sensitive channels. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 792-796, 2003.
- ANAND, K. K.; CHAND, D.; GHATAK, B. J. Protective effect of alcoholic extract of *Indigofera tinctoria* Linn. in experimental liver injury. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 17, n. 7, p. 685-687, 1979.
- ANAND, K. K.; CHAND, D.; GHATAK, B. J. R.; ARYA, R. K. Histological evidence of protection by *Indigofera tinctoria* Linn. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity - an experimental study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 19, n. 3, p. 298-300, 1981.
- ANDRADE, F. D. P. **Estudo químico de chás brasileiros**. 2002. 110 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução-RDC nº. 48**, de 16 de março de 2004. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 01 nov. 2007.
- ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILHO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*: role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, p. 905-909, 2003.

AWADH ALI, N. A.; JÜLICH, W. D.; KUSNICK, C.; LINDEQUIST, U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 173-179, 2001.

AYISI, N. K.; NYADEDZOR, C. Comparative *in vitro* effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia*, and *Elaeophorbia drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. **Antiviral Research**, v. 58, p. 25-33, 2003.

AZIZ-UR-REHMAN; MALIK, A.; RIAZ, N.; AHMAD, H.; NAWAZ, S. A.; CHOUDHARY, M. I. Lipoxigenase inhibiting flavonoids from *Indigofera hetrantha*. **Heterocycles**, v. 63, n. 2, p. 359-366, 2004.

AZIZ-UR-REHMAN; MALIK, A.; MEHMOOD, S.; JAHAN, E.; AHMAD, H. Phytochemical studies on *Indigofera hetrantha*. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 27, n. 4, p. 440-442, 2005a.

AZIZ-UR-REHMAN; MALIK, A.; RIAZ, N.; AHMAD, H.; NAWAZ, S. A.; CHOUDHARY, M. I. Lipoxigenase inhibiting constituents from *Indigofera hetrantha*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 263-266, 2005b.

BALASUBRAMANIAN, R.; NARAYANAN, M.; DECHEN, C.; DHANAPAL, S. Chemoprevention of N-nitrosodiethylamine induced phenobarbital promoted liver tumors in rat by extract of *Indigofera aspalathoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 364-366, 2005.

BALASUBRAMANIAN, R.; NARAYANAN, M.; KEDALGOVINDARAM, L.; RAMA, K. D. Cytotoxic activity of flavone glycoside from the stem of *Indigofera aspalathoides* Vahl. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 1, p. 80-83, 2007.

BANZOUZI, J. T.; PRADO, R.; MENAN, H.; VALENTIN, A.; ROUMESTAN, C.; MALLIE, M.; PELISSIER, Y.; BLACHE, Y. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 399-401, 2002.

BARBASTEFANO, V.; FARIAS SILVA, E.; COLA MIRANDA, M.; CALVO, T.; LUIZ FERREIRA, A.; PIMENTEL, F. O.; MICHELATTO, D. D.; HIRUMA LIMA, C. A.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antioxidant activity of an aqueous fraction obtained from *Indigofera truxillensis* against ischemia-reperfusion-induced gastric lesions. **Planta Medica**, v. 72, n. 11, p. 1038-1038, 2006.

BARBO, F. E.; MEDA, C. I.; CLAUDIA, M.; YOUNG, M.; CORDEIRO, I.; BLATT, C. T. T. Pentatronol from *Alchornea sidifolia* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 605-607, 2002.

BARBOSA NETO, J. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; PEIXOTO, P. V.; BARBOSA, I. B. P.; AVILA, S. C.; TOKARNIA, C. H. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 18-22, 2001.

BATES, S.; JONES, R.; BAYLEI, C. Insulin-like effect of pinitol. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 1944-1948, 2000.

BEUTNER, S.; BLOEDORN, B.; FRIXEL, S.; BLANCO, I. H.; HOFFMANN, T.; MARTIN, H. D.; MAYER, B.; NOACK, P.; RUCK, C.; SCHMIDT, M.; SCHULKE, I.; SELL, S.; ERNST, H.; HAREMZA, S.; SEYBOLD, G.; SIES, H.; STAHL, W.; WALSH, R. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 6, p. 559-568, 2001.

BINUTU, O. A.; CORDELL, G. A. Gallic acid derivatives from *Mezoneuron benthamianum* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 284-286, 2000.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, L. A. A.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 11, p. 1683-1688, 1995.

BRACA, A.; MENDEZ, J.; MENICHINI, F.; MORELLI, I. Constituents of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 30, p. 1111-1119, 2002.

BRANDON, K.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; SILVA, J. M. C. Brazilian conservation: challenges and opportunities. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 595-600, 2005.

BRASIL. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/far/media/Decreto%205813.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2007.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Ed. Unicamp, 1994. 122 p.

BUSEMAN, C. M.; TAMURA, P.; SPARKS, A. A.; BAUGHMAN, E. J.; MAATTA, S.; ZHAO, J.; ROTH, M. R.; ESCH, S. W.; SHAH, J.; WILLIAMS, T. D.; WELTI, R. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. **Plant Physiology**, v. 142, p. 28-39, 2006.

CALVO, T. R.; LIMA, Z. P.; SILVA, J. S.; BALLESTEROS, K. V. R.; PELLIZZON, C. H.; HIRUMA LIMA, C. A.; TAMASHIRO, J.; SOUZA BRITO, A. R. M.; TAKAHIRA, R. K.; VILEGAS, W. Constituents and antiulcer effect of *Alchornea glandulosa*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 451-459, 2007.

CERRADO brasileiro. Cerrado. Portal Brasil (Biblioteca Virtual). Disponível em: <<http://www.portalbrasil.eti.br/cerrado.htm>>. Acesso em: 01 nov. 2007.

CHAKRABARTI, R.; DAMARLA, R. K. B.; MULLANGI, R.; SHARMA, V. M.; VIKRAMADITHYAN, R. K.; RAJAGOPALAN, R. Insulin sensitizing property of *Indigofera mysorensis* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p.102-106, 2006.

CHANAYATH, N.; LHIOCHAIPHANT, S.; PHUTRAKUL, S. Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and chemical structure analysis of their major components. **Chiang Mai University Journal**, v. 1, n. 2, p. 149-160, 2002.

CHRISTINA, A. J. M.; JOSE, M. A.; ROBERT, S. J. H.; KOTHAI, R.; CHIDAMBARANATHAM, N.; MUTHUMANI, P. Effect of *Indigofera aspalathoides* against Dalton's ascitic lymphoma. **Fitoterapia**, v. 74, p. 280-283, 2003.

COLA MIRANDA, M. **Atividade antiulcerogênica de plantas nativas do cerrado do Estado de São Paulo: pertencentes ao gênero *Indigofera***. 2006. 161f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

COLA MIRANDA, M., BARBASTEFANO, V., HIRUMA LIMA, C. A., CALVO, T. R., VILEGAS, W., SOUZA BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2006.

COLEMAN, R. G.; WINDRUM, G. M.; HUTTON, E. M. The toxicity of *Indigofera endecaphylla*. III. Separation of toxic fractions from seed and herbage. **Journal of Nutrition**, v. 70, p. 267-271, 1960.

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

CUI, G. Y.; TAN, R. X. Lignans and tannins from *Alchornea davidii* (Euphorbiaceae) and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 1, p. 99-102, 2004.

DAMIENS, E.; BARATTE, B.; MARIE, D.; EISENBRAND, G.; MEIJER, L. Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. **Oncogene**, v. 20, n. 29, p. 3786-3797, 2001.

DE SMET, P. A. G. M. Some ethnopharmacological notes on African hallucinogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 141-146, 1996.

DEVAIAH, S. P.; ROTH, M. R.; BAUGHMAN, E.; LI, M.; TAMURA, P.; JEANNOTTE, R.; WELTI, R.; WANG, X. Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a phospholipase D α 1 knockout mutant. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1907-1924, 2006.

DI STASI, L. C.; HIRUMA LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. 604 p.

DOMINGUEZ, X. A.; MARTINEZ, C.; CALERO, A.; DOMINGUEZ JUNIOR, X. A.; HINOJOSA, M.; SAMUDIO, A.; WATSON, W. H.; ZABEL, U. Mexican Medicinal Plants XXXI: chemical components from “Jiquelite”, *Indigofera suffruticosa* Mill. **Planta Medica**, v. 34, n. 2, p. 172-175, 1978a.

DOMINGUEZ, X. A.; MARTINEZ, C.; CALERO, A.; DOMINGUEZ JUNIOR, X. A.; HINOJOSA, M.; ZAMUDIO, A.; ZABEL, U.; SMITH, W. B.; WATSON, W. H. Louisfieserone, an unusual flavone derivative from *Indigofera suffruticosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 5, p. 429-432, 1978b.

EBI, G. C. Antimicrobial activities of *Alchornea cordifolia*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 69-72, 2001.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics II: dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, n. 4, p. 385-393, 1953.

EKE, I. N.; OGUNDAINI, A. O.; OGUNGBAMILA, F. O.; LAMIKANRA, A. Antimicrobial spectrum of *Alchornea cordifolia* leaf extract. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 1, p. 67-69, 1999.

ELLOF, J. N. A. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ENSLEY, B. D.; RATZKIN, B. J.; OSSLUND, T. D.; SIMON, M. J.; WACKETT, L. P.; GIBSON, D. T. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. **Science**, v. 222, p. 167-169, 1983.

FAIZI, S.; ALI, M.; SALEEM, R.; BIBI, I.; BIBI, S. Spectral assignments and reference data. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 39, p. 399-405, 2001.

FARIAS SILVA, E., COLA, M., CALVO, T. R., BARBASTEFANO, V.; FERREIRA, A. L., MICHELATTO, D. P., DE ALMEIDA, A. C. A., HIRUMA LIMA, C. A., VILEGAS, W., SOUZA BRITO, A. R. M. Antioxidant activity of Indigo and its preventive effect against ethanol-induced DNA damage in rat gastric mucosa. **Planta Medica**, v. 73, p. 1241-1246, 2007.

FAROMBI, E. O.; OGUNDIPE, O. O.; UHUNWANGHO, E. S.; ADEYANJU, M. A., MOODY, J. O. Antioxidant properties of extracts from *Alchornea laxiflora* (Benth) Pax and Hoffman. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 7, p. 713-716, 2003.

FERANDIN, Y.; BETTAYEB, K.; KRITSANIDA, M.; LOZACH, O.; POLYCHRONOPOULOS, P.; MAGIATIS, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; MEIJER, L. 3'-Substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 15, p. 4638-4649, 2006.

FINNEGAN, R. A.; MUELLER, W. H. Chemical examination of a toxic extract of *Indigofera endecaphylla*: the endecaphyllins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, n. 8, p. 1136-1144, 1965.

FORD, C. W. Galactomannan from the seed of *Indigofera spicata*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 2005-2009, 1969.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; HONDA, N. K.; DA SILVA, A. J. R. A nitropropanoyl glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1251, 1989.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; BARISON, A. Additional 3-nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera suffruticosa* (Leguminosae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 207-209, 2003.

GARCIA-MACIAS, P.; JOHN, P. Formation of natural indigo derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7891-7896, 2004.

GARG, C. P.; CHO, C. H.; OGLE, C. W. The role of gastric mucosal sulfhydryl in the ulcer-protecting effects of sulphasalazine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, p. 733-734, 1991.

GILLAM, E. M. J.; NOTLEY, L. M.; CAI, H.; DE VOSS, J. J.; GUENGERICH, F. P. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. **Biochemistry**, v. 39, p. 13817-13824, 2000.

- GOEL, R. K.; GAMBHIR, S. S.; DASGUPTA, G. Mechanism of anti-ulcerogenic effect of amentoflavone. **Indian Journal of Medical Research**, v. 88, p. 192-196, 1988.
- GRANT, K. M.; DUNION, M. H.; YARDLEY, V.; SKALTSOUNIS, A-L.; MARKO, D.; EISENBRAND, G.; CROFT, S. L.; MEIJER, L.; MOTTRAM, J. C. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 cyclin-dependent kinase: chemical library screen and antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3033-3042, 2004.
- GRAYER, R. J.; KITE, G. C.; VEITCH, N. C.; ECKERT, M. R.; MARIN, P. D.; SENANAYAKE, P.; PATON, A. P. Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 327-342, 2002.
- GUARALDO, L.; SERTIÈ, J. A. A., BACCHI, E. M. Antiulcer action of the hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 2, p. 191-195, 2001.
- GUENGERICH, F. P.; SORRELLS, J. L.; SCHMITT, S.; KRAUSER, J. A.; ARYAL, P.; MEIJER, L. Generation of new protein kinase inhibitors utilizing cytochrome P450 mutant enzymes for indigoid synthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 3236-3241, 2004.
- HARBONE, J. B.; BOULTER, D.; TURNER, B. L. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. London: Academic Press, 1971.
- HARBORNE, J. B. **The Flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1996. 676 p.
- HART, N. K.; JOHNS, S. R.; LAMBERTOS, J. A. Hexahydroimidazo-pyrimidines, a new class of alkaloids from *Alchornea javanensis*. **Journal of Chemical Communications**, v. 24, p. 1484-1485, 1969.
- HART, N. K.; JOHNS, S. R.; LAMBERTOS, J. A.; WILLING, R. I. Alkaloids of *Alchornea javanensis* (Euphorbiaceae): the isolation of hexahydroimidazo[1,2- \square]pyrimidines and guanidines. **Australian Journal of Chemistry**, v. 23, p. 1679-1693, 1970.
- HASAN, A.; WATERMAN, P.; IFTIKHAR, N. The use of new chromatographic techniques for the isolation and purification of phenolic acids from *Indigofera heterantha*. **Journal of Chromatography**, v. 66, p. 399-402, 1989.
- HASAN, A.; FARMAN, M. Constituents of *Indigofera hebeptala* leaves. **Fitoterapia**, v. 64, n. 5, p. 479, 1993.
- HASAN, A.; FARMAN, M.; AHMED, I. Flavonoid glycosides from *Indigofera hebeptala*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 1, p. 275-276, 1994.
- HASAN, A.; AHMED, I.; KHAN, M. A.; CHUDHARY, M. I. Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1115-1118, 1996.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n.2, p. 205-215, 1996.
- HASTINGS, R. B. Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilionoideae, part one. **Economic Botany**, v. 44, n.3, p. 336-348, 1990.
- HEGARTY, M. P.; POUND, A. W. Indospicine, a new hepatotoxic amino-acid from *Indigofera spicata*. **Nature**, v. 217, n. 126, p. 354-355, 1968.
- HEGARTY, M. P.; POUND, A. W. Indospicine, a hepatotoxic amino acid from *Indigofera spicata*: isolation, structure, and biological studies. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 831-842, 1970.
- HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. Mouse paw edema: a new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.
- HIGA, R. **Busca de substâncias bioativas em *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae)**. 2001. 60f. Monografia (Bacharelado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

HIRUMA LIMA, C. A.; CALVO, T. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 215-224, 2006.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids: potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biological Interactions**, v. 139, p. 1-21, 2002.

HOESSEL, R.; LECLERC, S.; ENDICOTT, J. A.; NOBEL, M. E. M.; LAWRIE, A.; TUNNAH, P.; LEOST, M.; DAMIENS, E.; MARIE, D.; MARKO, D.; NIEDERBERGER, E.; TANG, W.; EISENBRAND, G.; MEIJER, L. Indirubin, the active constituent of a chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. **Nature Cell Biology**, v. 1, p.60-67, 1999.

HOSOE, T.; NOZAWA, K.; KAWAHARA, N.; FUKUSIMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; KAWAI, K. Isolation of a new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the pathogenic basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*. **Mycopathologia**, v. 146, p. 9-12, 1999.

HUTTON, E. M.; WINDRUM, G. M.; KRATZING, C. C. Toxicity of *Indigofera endecaphylla*. I: toxicity for rabbits. **Journal of Nutrition**, v. 64, p. 321-337, 1958a.

HUTTON, E. M.; WINDRUM, G. M.; KRATZING, C. C. Studies on the toxicity of *Indigofera endecaphylla*. II: toxicity for mice. **Journal of Nutrition**, v. 65, p. 429-440, 1958b.

IGBENEGHU, O. A.; IWALEWA, E. O.; LAMIKANRA, A. A study of the *in vivo* activity of the leaf extract of *Alchornea cordifolia* against multiply antibiotic resistant *S. aureus* isolate in mice. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 67-71, 2007.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Nomenclature of cyclitols**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/cyclitol/>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

ISLAM, I.; BROWN, G.; BRYANT, J.; HRVATIN, P.; KOCHANNY, M. J.; PHILIPS, G. B.; YUAN, S.; ADLER, M.; WHITLOW, M.; LENTZ, D.; POLOKOFF, M. A.; WU, J.; SHEN, J.; WALTERS, J.; HO, E.; SUBRAMANIAM, B.; ZHU, D.; FELDMAN, R. I.; ARNAIZ, D. O. Indolinone based phosphoinositide-dependent kinase-1 (PK1) inhibitors. Part 2: optimization of BX-517. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 3819-3825, 2007.

IWAKI, K.; KURIMOTO, M. Cancer preventive effects of the indigo plant, *Polygonum tinctorium*. **Recent Research Developments in Cancer**, v. 4, p. 429-437, 2002.

KALINOWSKI, H. O.; BERGER, S.; BRAUN, S. **Carbon-13 NMR Spectroscopy**. Chichester: John Wiley & Sons, 1988. 776 p.

KAMAL, R.; MANGLA, M. Rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against cyclops, the carrier of dracunculiasis. **Pharmazie**, v. 42, n. 5, p. 356, 1987.

KAMAL, R.; MANGLA, M. Flavonoids from *Indigofera tinctoria* L. *in vivo* and *in vitro*. **Herba Polonica**, v. 36, n. 1/2, p. 3-7, 1990.

KAMAL, R.; MANGLA, M. *In vivo* and *in vitro* production of histamine from *Indigofera tinctoria*. **Indian Drugs**, v. 29, n. 4, p. 179-181, 1992.

KAMAL, R.; MANGLA, M. *In vivo* and *in vitro* investigations on rotenoids from *Indigofera tinctoria* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Biosciences**, v. 18, n. 1, p. 93-101, 1993.

KHUONG HUU, F.; LE FORESTIER, J. P.; GOUTAREL, R. Alchornéine, isoalchornéine et alchornéinone, produits isolés de *L'Alchornea floribunda* Muell. Arg. **Tetrahedron**, v. 28, p. 5207-5220, 1972.

KOKUBUN, T.; EDMONDS, J.; JOHN, P. Indoxyl derivatives in woad in relation to Medieval indigo production. **Phytochemistry**, v. 49, p. 79-87, 1998.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.

KOVALOVSKY, D.; REFOJO, D.; HOLSBOER, F.; ARZT, E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. **Journal of Neuroimmunology**, v. 109, p. 23-29, 2000.

LA CASA GARCIA, M. C.; LAMA, M. I. V.; ROMERO, C. A. L.; SÁNCHEZ, V. M.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1/2, p. 45-53, 2000.

LATTÉ, K. P.; KOŁODZIEJ, H. Pelargonins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 701-708, 2000.

LEITE, S. P.; SILVA, L. L. S.; CATANHO, M. T. J. A.; LIMA, E. O.; LIMA, V. L. M. Antiinflammatory activity of *Indigofera suffruticosa* extract. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 7, p. 47-52, 2003.

LEITE, S. P.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, E. C.; MAIA, M. B. S.; LIMA, V. L. M.; SAUL, D. E. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v. 18, p. 701-705, 2004.

LEITE, S. P.; VIERIA, J. R. C.; MEDEIROS, P. L.; LEITE, R. M. P.; LIMA, V. L. M.; XAVIER H. S.; LIMA, E. O. Antimicrobial Activity of *Indigofera suffruticosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 261-265, 2006.

LIMA, A. K.; CAVALCANTI DE AMORIM, E. L.; MENDONÇA DE AQUINO, T.; LIMA, C. S. A.; MAGALHAES DE MENDONÇA, R.; HIGINO, J. S.; ALBUQUERQUE, U. P. Pharmacognostic study of *Indigofera microcarpa* Desv. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 373-379, 2003.

LIMA, Z. P. **Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações de *Alchornea triplinervia* e *Alchornea glandulosa***. 2006. 200f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

LOPES, F. C. M. **Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea* ssp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral-alfa por macrófagos murinos**. 2004. 151f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

LOPES, F. C. M.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W. ; CARLOS, I. Z. Inhibition of hydrogen peroxide, nitric oxide and TNF-alpha production in peritoneal macrophages by ethyl acetate fraction from *Alchornea glandulosa*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 9, p. 1726-1730, 2005.

LÓPEZ, A.; MOTILVA, V.; ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; MARTÍN, M. J.; LA CASA, C. The role of gastric mucosal sulfhydryls in the ulcer-protecting effects of cisapride. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 37-40, 1996.

LORENZI, H. Euphorbiaceae. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Plantarum, 1998. p. 97-98.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.A. **Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p. 103-104.

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

MAJAK, W.; BENN, M.; MCEWAN, D.; PASS, M. A. Three nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera linnaei*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2393-2395, 1992.

MANGA, H. M.; BRKIC, D.; MARIE, D. E. P.; QUETIN-LECLERC, Q. J. *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 2/3, p. 209-214, 2004.

MARERO, L. M.; JIN, J. H.; SHIN, J. H.; LEE, H. J.; CHUNG, I. S.; LEE, H. J. Effect of fungal elicitation on indirubin production from a suspension culture of *Polygonum tinctorium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 97-101, 1997.

- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3/4, p. 173-215, 1983.
- MATHABE, M. C.; NIKOLOVA, R. V.; LALL, N.; NYAZEMA, N. Z. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 286-293, 2006.
- MAUGARD, T.; ENAUD, E.; CHOISY, P.; LEGOY, M. D. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). **Phytochemistry**, v. 58, p. 897-904, 2001.
- MAVAR-MANGA, H.; CHAPON, D.; HOET, S.; BLOCK, S.; PAUW GILLET, M. C.; QUETIN LECLERCQ, J. N1,N2,N3-trisisopentenyl guanidine and N1,N2-diisopentenyl guanidine, two cytotoxic alkaloids from *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) root barks. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 12, p. 1097-1100, 2006.
- MACNEIL, I. A.; TIONG, C. L.; MINOR, C.; AUGUST, P. R.; GROSSMAN, T. H.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; PHILLIPS, T.; NARULA, S.; SUNDARAMOORTHY, R.; TYLER, A.; ALDREDGE, T.; LONG, H.; GILMAN, M.; HOLT, D.; OSBURNE, M. S. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 301-308, 2001.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, J. E.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active-plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.
- MILES, D. H.; HANKINSON, B. L.; RANDLE, S. A. Insect antifeedants from the Peruvian plant *Alchornea triplinervia*. **ACS Symposium Series**, v. 276, p. 469-476, 1985.
- MISHRA, P. K.; SINGH, N.; AHMAD, G.; DUBE, A.; MAURYA, R. Glycolipids and other constituents from *Desmodium gangeticum* with antileishmanial and immunomodulatory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 4543-4546, 2005.
- MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 934-945, 1983.
- MORAES E SOUZA, M. A.; BIEBER, L. W.; CHIAPPETA, A. A.; MACIEL, G. M.; MELLO, J. F.; MONACHE, F. D.; MESSANA, I. Arylbenzofurans from *Indigofera microcarpa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1817-1819, 1988.
- MORAES E SOUZA, M. A.; BIEBER, L. W.; MELLO, J. F.; CAVALCANTI, M. S. B.; SILVA FILHO, A. A.; NASCIMENTO, S. C. Antimicrobial activity of *Indigofera microcarpa* benzofurans. **Fitoterapia**, v. 62, n. 6, p. 514-516, 1991.
- MOREIRA, J. L. A.; AZEVEDO TOZZI, A. M. G. *Indigofera* L. (Leguminosae, Papilionoideae) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, n.1, p. 97-117, 1997.
- MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terpenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.
- MORRIS, J. B.; WALKER, J. T. Non-traditional legumes as potential soil amendments for nematode control. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 358-361, 2002.
- MORRIS, M. P.; PAGAN, C.; WARMKE, H. E. Hiptagenic acid, a toxic component of *Indigofera endecaphylla*. **Science**, v. 119, p. 322-323, 1954.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1/2, p. 55-63, 1983.
- MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M.; BUITRAGO, D. C.; NINO, J. Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 631-634, 2007.

- MUSTOFA, V. A.; BENOIT-VICAL, F.; PELISSIER, Y.; KONE-BAMBA, D.; MALLIE, M. Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 145-151, 2000.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- NAM, S.; BUETTNER, R.; TURKSON, J.; KIM, D.; CHENG, J. Q.; MUEHLBEYER, S.; HIPPE, F.; VATTER, S.; MERZ, K-H.; EISENBRAND, G.; JOVE, R. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. **Biochemistry**, v. 102, n. 17, p. 5998-6003, 2005.
- NARENDER, T.; KHALIQ, T.; PURI, A.; CHANDER, R. Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 13, p. 3411-3414, 2006.
- NAWWAR, M. A. M.; HUSSEIN, S. A. M.; MERFORT, I. NMR spectral analysis of polyphenols from *Punica granatum*. **Phytochemistry**, v. 36, n.3, p. 793-798, 1994.
- NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.
- NONAKA, G. I.; SAKAI, R.; NISHIOKA, I. Hydrolysable tannins and proanthocyanidins from green tea. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1753-1755, 1984.
- OGUNDIPE, O. O.; MOODY, J. O.; HOUGHTON, P. J. Occurrence of flavonol sulphates in *Alchornea laxiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 6, p. 421-423, 2001.
- OGUNDIPE, O. O.; MOODY, J. O.; HOUGHTON, P. J.; ODELOLA, H. A. Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (benth) pax and hoffman. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 275-280, 2001.
- OGUNGBAMILA, F. O.; SAMUELSSON, G. Smooth muscle relaxing flavonoids from *Alchornea cordifolia*. **Acta Pharmaceutica Nordica** v. 2, n. 6, p. 421-422, 1990.
- OKEKE, I. N.; OGUNDAINI, A. O.; OGUNGBAMILA, F. O.; LAMIKANRA, A. Antimicrobial spectrum of *Alchornea cordifolia* leaf extract. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 1, p. 67-69, 1993.
- OLALEYE, M. T.; ADEGBOYE, O. O.; AKINDAHUNSI, A. A. *Alchornea cordifolia* extract protects Wistar albino rats against acetaminophen-induced liver damage. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 24, p. 2439-2445, 2006.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Informativo das perspectivas do meio ambiente mundial da ONU: GEO4-ONU**, de 25 de outubro de 2007. Disponível em: <www.unep.org/geo/geo4/>. Acesso em: 01 nov. 2007.
- ORTIZ DE MONTELLANO, B. R.; BROWNER, C. H. Chemical bases for medicinal plant use in Oaxaca, Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 1, p. 57-88, 1985.
- OSADEBE, P. O.; OKOYE, F. B. C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 19-24, 2003.
- PALOMINO, J. C.; MARTIN, M.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.
- PANIZZI, A. R. Performance of *Piezodorus guildinii* on four species of *Indigofera* legumes. **Entomologia-Experimentalis-et-Applicata**, v. 63, n. 3, p. 221-228, 1992.
- PEARN, J. H.; HEGARTY, M. P. Indospicine: the teratogenic factor from *Indigofera spicata* extract causing cleft palate. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 51, n. 1, p. 34-36, 1970.
- POLYCHRONOPOULOS, P.; MAGIATIS, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; MYRIANTHOPOULOS, V.; MIKROS, E.; TARRICONE, A.; MUSACCHIO, A.; ROE, S. M.; PEARL, L.; LEOST, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 935-946, 2004.

POPP, F. D. Synthesis of potential antineoplastic agents: compounds related to the 3-*O*-nitrophenylhydrazone of isatin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 182-184, 1969.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n.6, 2007.

PUSCAS, I.; PUSCAS, C.; COLTAU, M.; PASCA, R.; TORRES, J.; MÁRQUEZ, M.; HERRERO, E.; FILLAT, O.; ORTIZ, J. A. Comparative study of the safety and efficacy of ebrotidine versus ranitidine and placebo in the prevention of piroxicam-induced gastroduodenal lesions. **Arzneimittelforschung**, v. 47, p. 568-572, 1997.

RAJKAPOOR, B.; JAYAKAR, B.; KAVIMANI, S.; MURUGESH, N. Protective effect of *Indigofera aspalathoides* against CCl₄-induced hepatic damage in rats. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2006.

RAO, J. U. M.; HANUMIAH, T.; RAO, B. K.; RAO, K. V. J. A new flavonol glycoside from the leaves of *Indigofera hirsuta* Linn. **Indian Journal of Chemistry, Section B**, v. 23, n. 1, p. 91, 1984.

RIBEIRO, L. R.; BAUTISTA, A. R.; SILVA, A. R.; SALES, L. A.; SALVADORI, D. M., MAIA, P. C. Toxicological and toxicogenetic effects of plants used in popular medicine and in cattle food. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 89-91, 1991.

RIBEIRO, J. E. L. S. **Flora da reserva Ducke**: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID, 1999. 816 p.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. Cytoprotection by prostaglandins in rats: prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 71, p. 433-443, 1979.

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 197 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SALMINEM, J. P.; OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Characterization of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 864, p. 283-291, 1999.

SANTOS, F. V. **Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado (espécies de *Alchornea*)**. 2006. 152f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SANTOS, C. H.; PANIZZI, A. R. Nymphal and adult performance of *Neomegalotomus parvus* (Hemiptera: Alydidae) on wild and cultivated legumes. **Annals Entomological Society of America**, v. 91, n. 4, p. 445- 451, 1998.

SELVAM, C.; JACHAK, S. M.; OLI, R. G.; THILAGAVATHI, R.; CHAKRABORTI, A. K.; BHUTANI, K. K. A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from *Indigofera aspalathoides*: structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 22, p. 4311-4314, 2004.

SETZER, W. N.; SHEN, X.; BATES, R. B.; BURNS, J. R.; MCCLURE, K. J.; ZHANG, P.; MORIARITY, D. M.; LAWTON, R. O. A phytochemical investigation of *Alchornea latifolia*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 195-198, 2000.

SHARIF, A.; MALIK, A.; RIAZ, N.; AHMED, E.; YAWER, M. A.; AFZA, N. Phytochemical investigations on *Indigofera oblongifolia*. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 28, n. 1, p. 101-104, 2006.

SINGH, B.; SAXENA, A. K.; CHANDAN, B. K.; BHARDWAJ, V.; GUPTA, V. N.; SURI, O. P.; HANDA, S. S. Hepatoprotective activity of indigotone: a bioactive fraction from *Indigofera tinctoria* Linn. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 4, p. 294-297, 2001.

SINGH, B.; CHANDAN, B. K.; SHARMA, N.; BHARDWAJ, V.; SATTI, N. K.; GUPTA, V. N.; GUPTA, B. D.; SURI, K. A.; SURI, O. P. Isolation, structure elucidation and *in vivo* hepatoprotective potential of *trans*-tetracos-15-enoic acid from *Indigofera tinctoria* Linn. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 831-839, 2006.

SONDHI, S. M.; DINODIA, M.; KUMAR, A. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 4657-4663, 2006.

SOUZA BRITO, A. R. M.; SOUZA BRITO, A. A. Medicinal plant research in Brazil: data from regional and national meetings. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S. A. **Medicinal resources of the tropical forest**. New York: Columbia University Press, 1996. cap. 28, p. 387-401.

SUN, L.; TRAN, N.; LIANG, C.; TANG, F.; RICE, A.; SCHRECK, R.; WALTZ, K.; SHAWWER, L. K., MCMAHON, G.; TANG, C. Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethyl)pyrrol-2-yl)methylidene]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptors tyrosine kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 5120-5130, 1999.

THANGADURAI, D.; VISWANATHAN, M. B.; RAMESH, N. Characterization of a new decahydropyridoquinoline from *Indigofera longiracemosa* Boiv. ex Baill. (Fabaceae). **Natural Product Letters**, v. 15, n. 4, p. 287-290, 2001.

THANGADURAI, D.; VISWANATHAN, M. B.; RAMESH, N. Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longiracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity. **Pharmazie**, v. 57, n. 10, p. 714-715, 2002.

TONA, L.; KAMBU, K.; MESIA, K.; CIMANGA, K.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A. J. Biological screening of traditional preparations from some medicinal plants used as antidiarrhoeal in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v.6, n. 1, p. 59-66, 1999.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N.; MESIA, K.; PENGE, O.; LUSAKIBANZA, M.; CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Antiamoebic and spasmolytic activities of extracts from some antidiarrhoeal traditional preparations used in Kinshasa, Congo. **Phytomedicine**, v.7, n. 1, p. 31-38, 2000.

THUSOO, A.; RAINA, N.; AHMED, S. R. Flavonoids and other constituents of *Indigofera hetrantha*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 59, n. 8, p. 1007-1008, 1982.

UMAR-DAHOT, M. Antibacterial and antifungal activity of small protein of *Indigofera oblongifolia* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 277-282, 1999.

URREA-BULLA, A.; SUÁREZ, M; MORENO MURILLO, M. B. Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**. v.75, p.392-394, 2004.

VAN ELISWIJK, D. A.; IRTH, H. Analytical tools for the detection and characterization of biologically active compounds from natura. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 427-439, 2003.

VÀZQUEZ, M. L. L. **Ciclolignanos citotóxicos derivados de podofilotoxina: nuevos análogos nitrogenados**. 1996. 212f. Tese (Doutorado em Química Farmacêutica) - Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, 1996.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, J. R. C.; SOUZA, I. A.; NASCIMENTO, S. C.; LEITE, S. P. *Indigofera suffruticosa*: An alternative anticancer therapy. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, v. 12, p. 1-6, 2006.

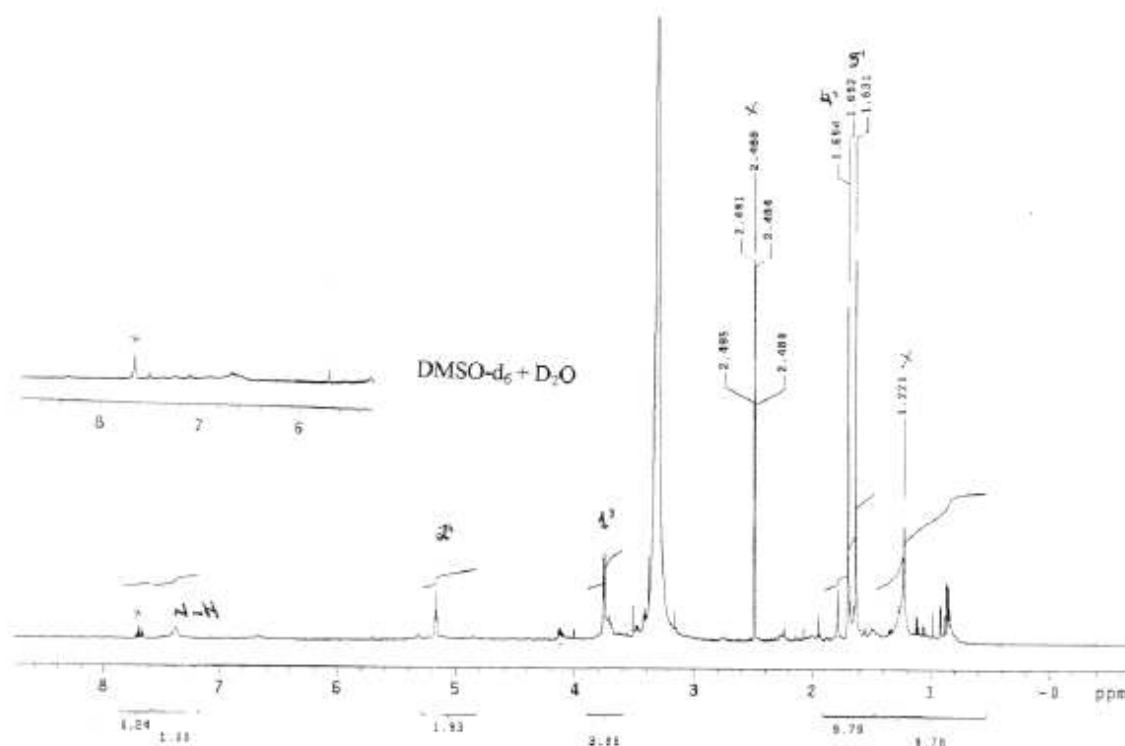
WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Planta drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.

WONG, C. L.; WAY, M. K. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal of morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 73, p. 11-19, 1981.

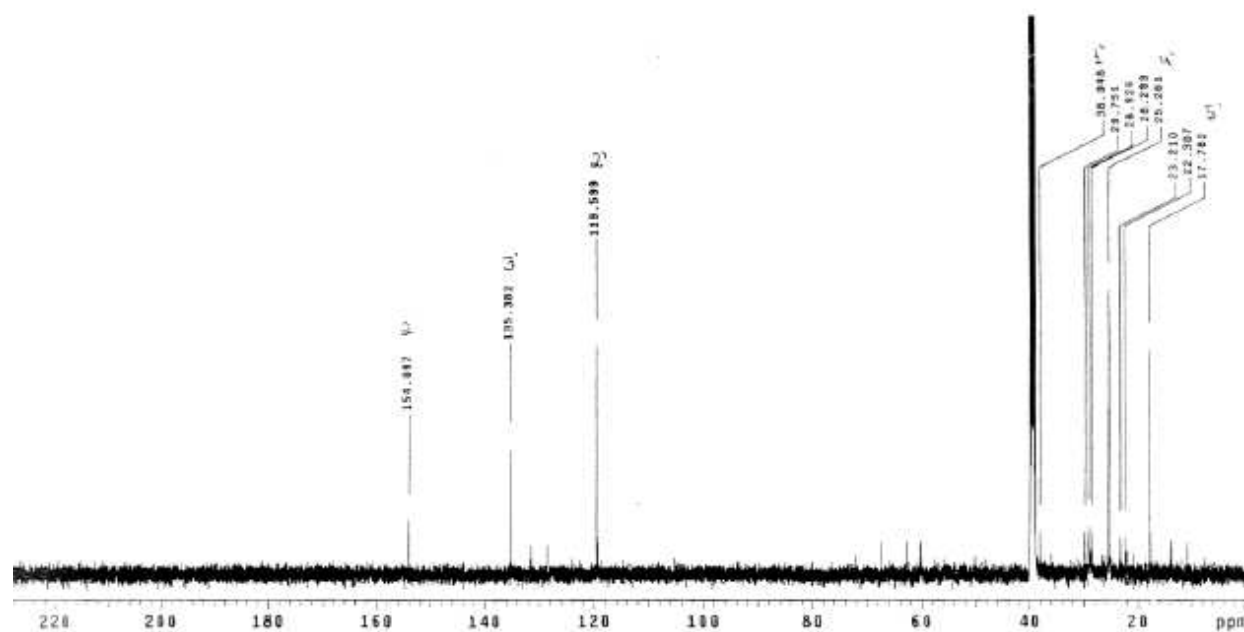
WORTHINGTON, D. J.; ROSEMEYER, M. A. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. **European Journal of Biochemistry**, v. 48, p. 167-77, 1974.

ZHANG, X. X.; ZHANG, Z. X.; CHEN, L.; SU, Y. F. New aliphatic nitro-compounds from *Indigofera carlesii*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 15-18, 2006.

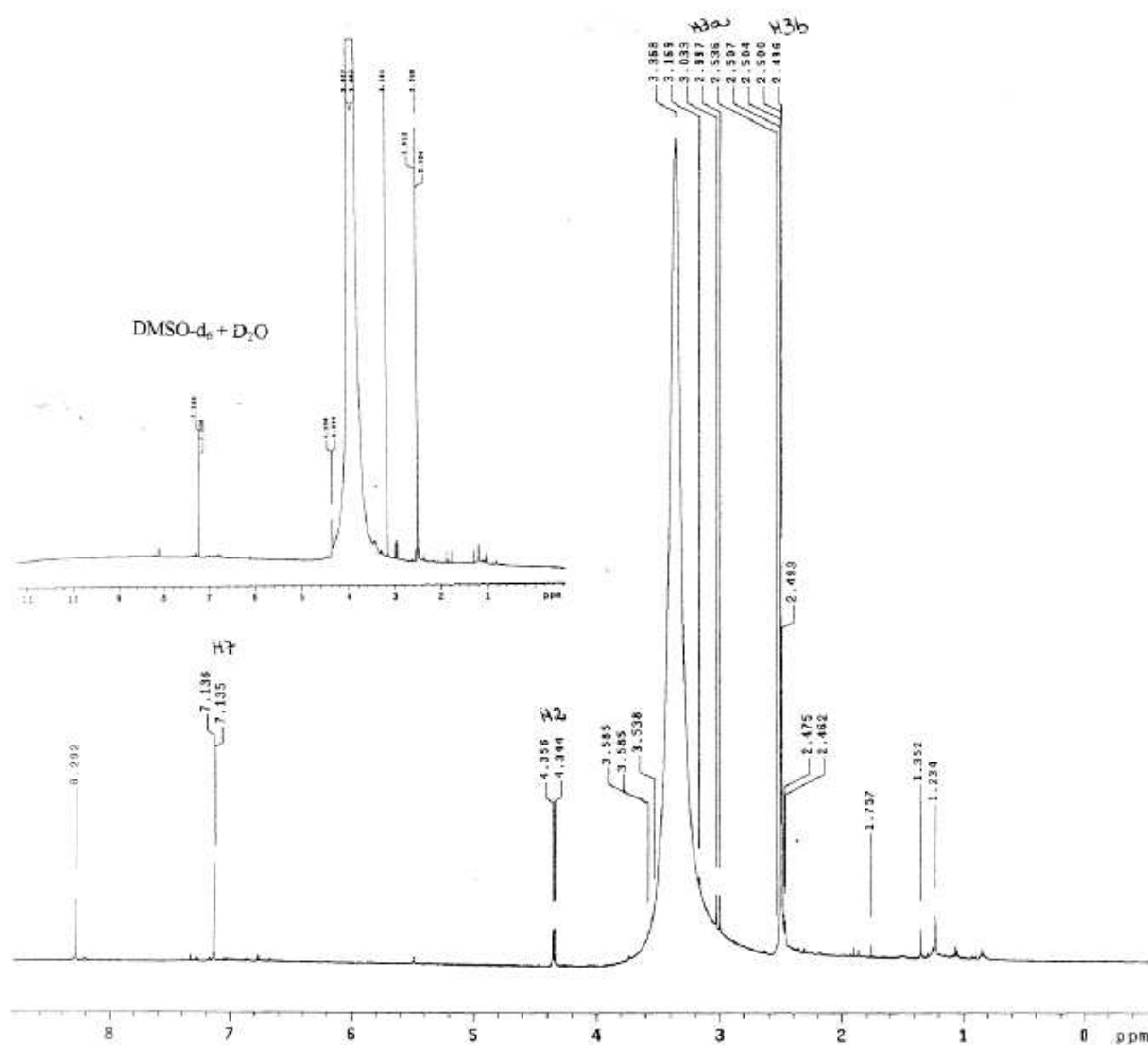
Espectros



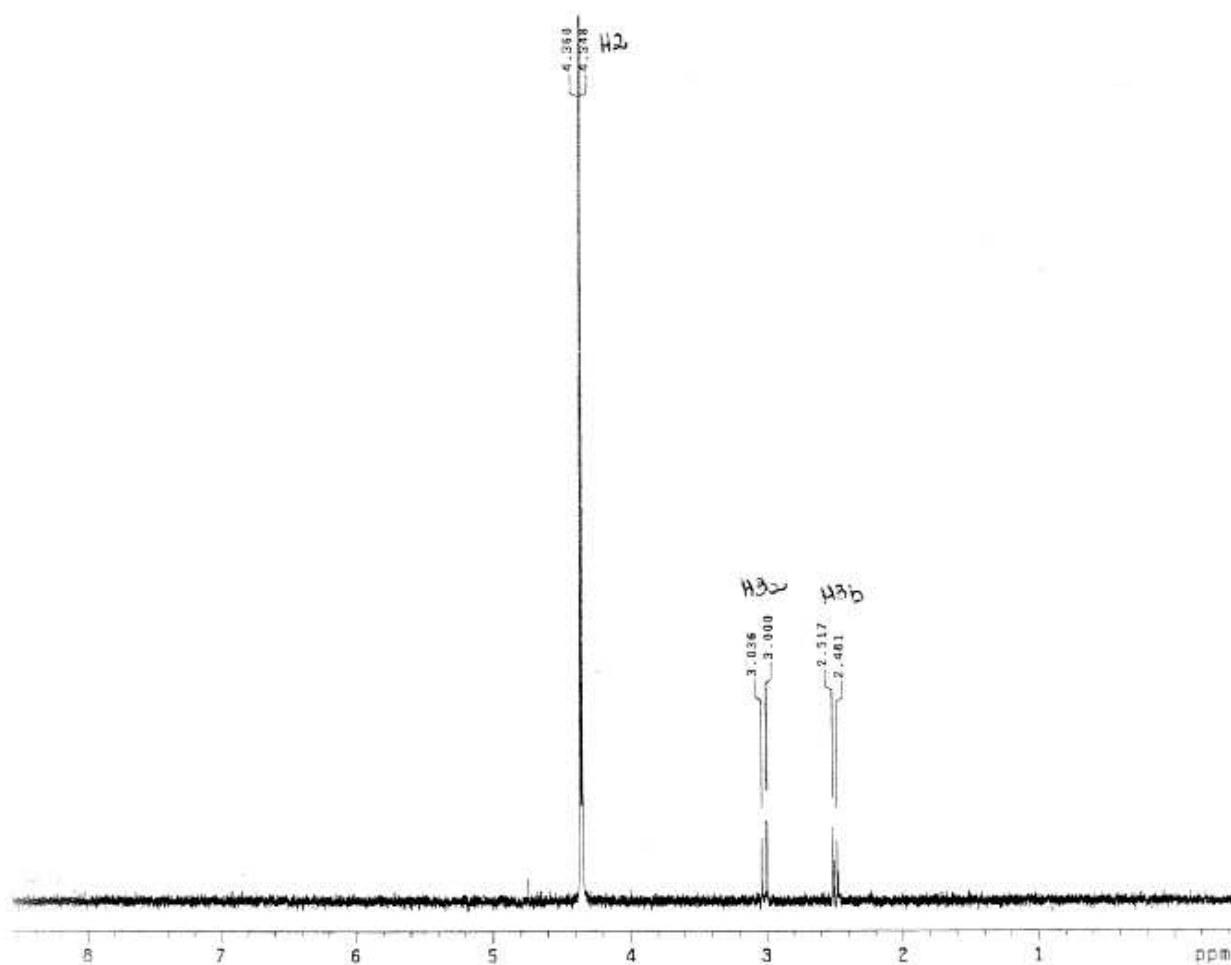
Espectro 1.1 Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da pteroginidina (Ag4).



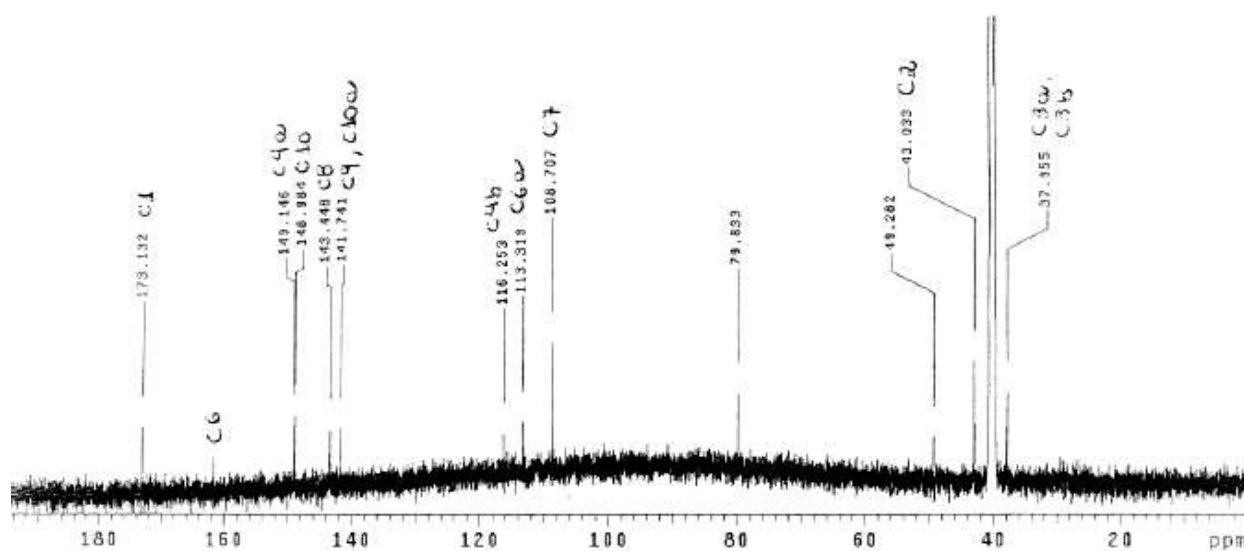
Espectro 1.2. Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) da pteroginidina (Ag4).



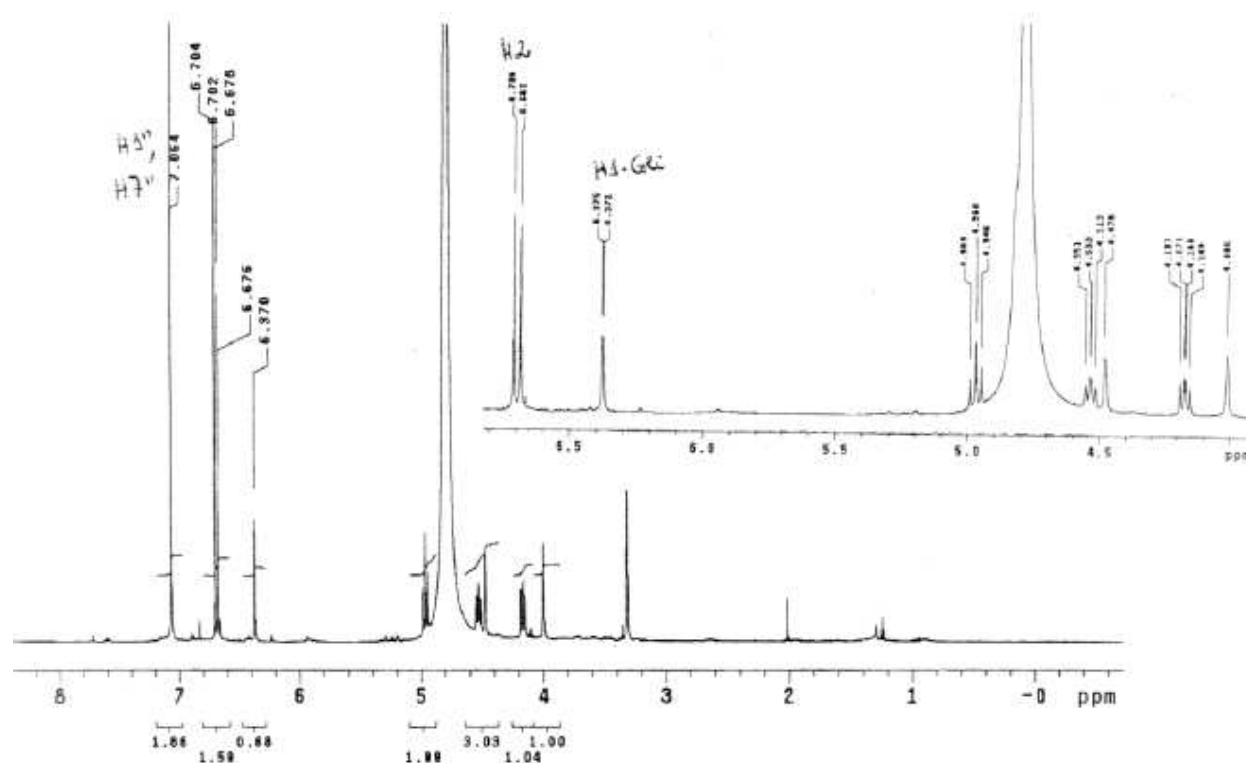
Espectro 1.3 Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) do ácido carboxílico da brevifolina (Ag7).



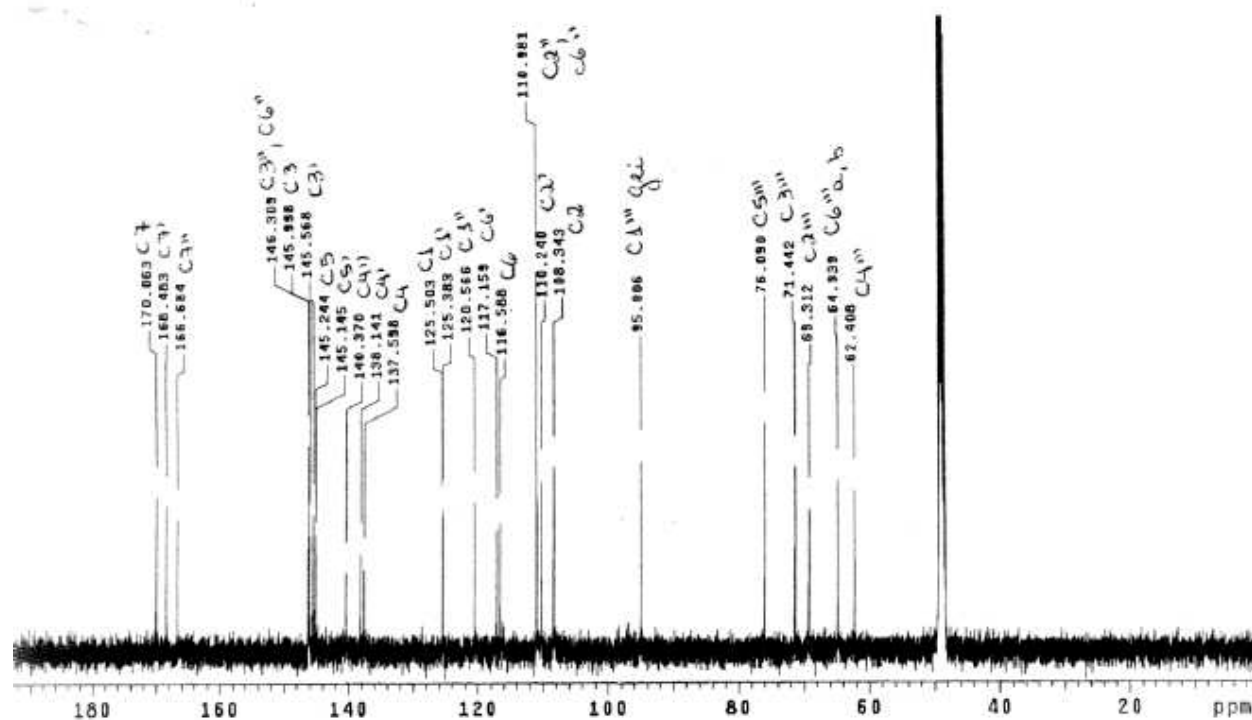
Espectro 1.4 Experimento monodimensional TOCSY (DMSO-d₆, 500MHz) do ácido carboxílico da brevifolina (Ag7).



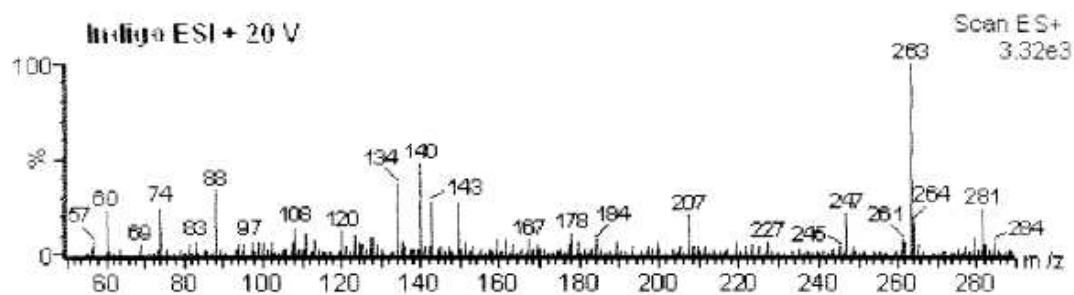
Espectro 1.5. Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) do ácido carboxílico da brevifolina (Ag7).



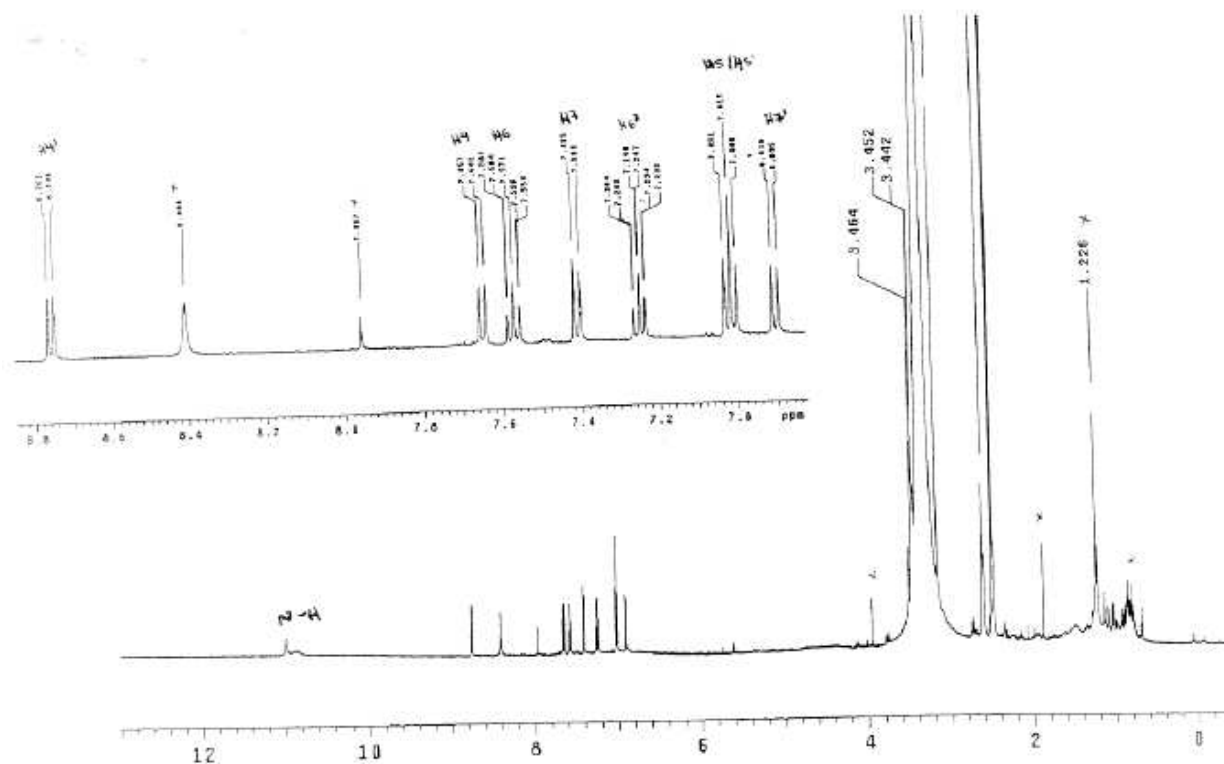
Espectro 1.6 Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da isocorilagina (At16).



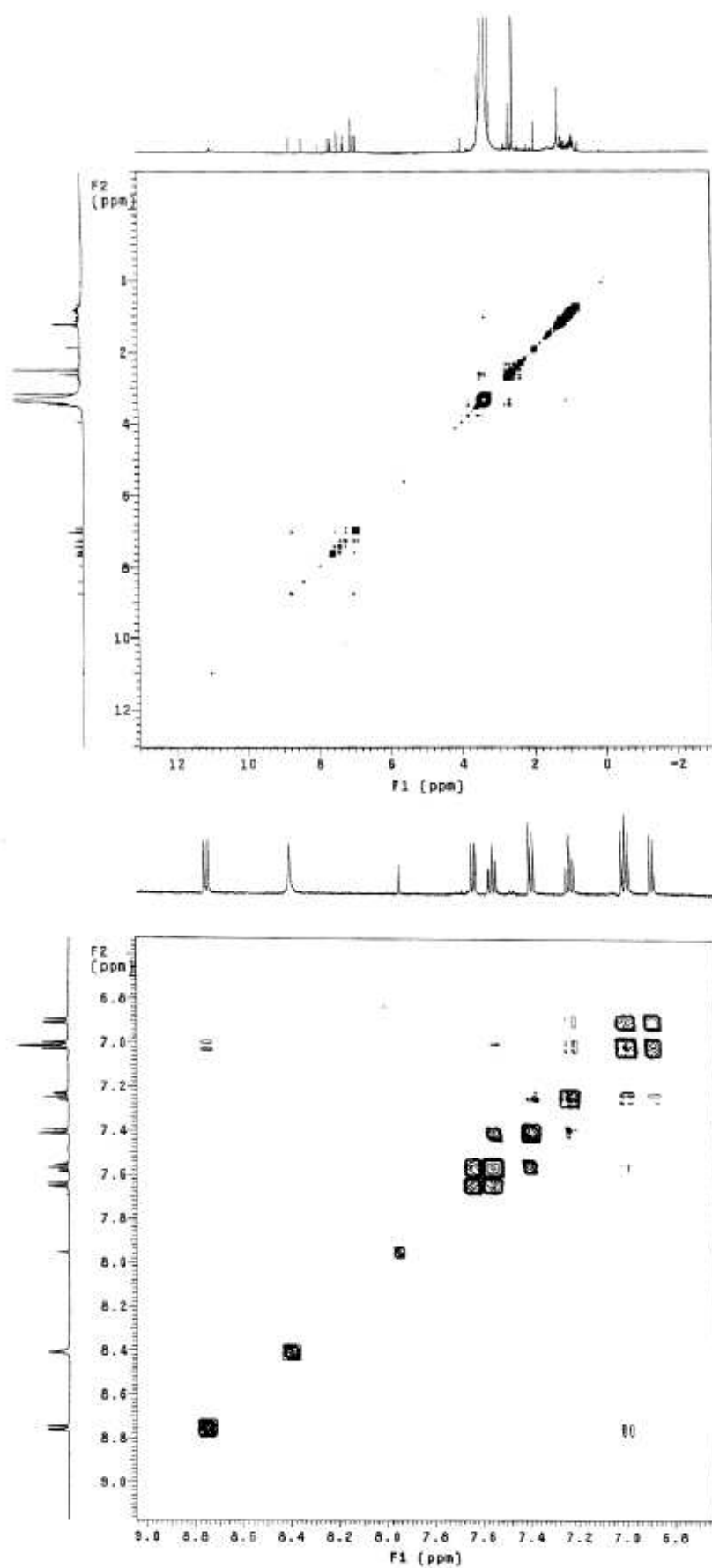
Espectro 1.7. Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) da isocorilagina (At16).



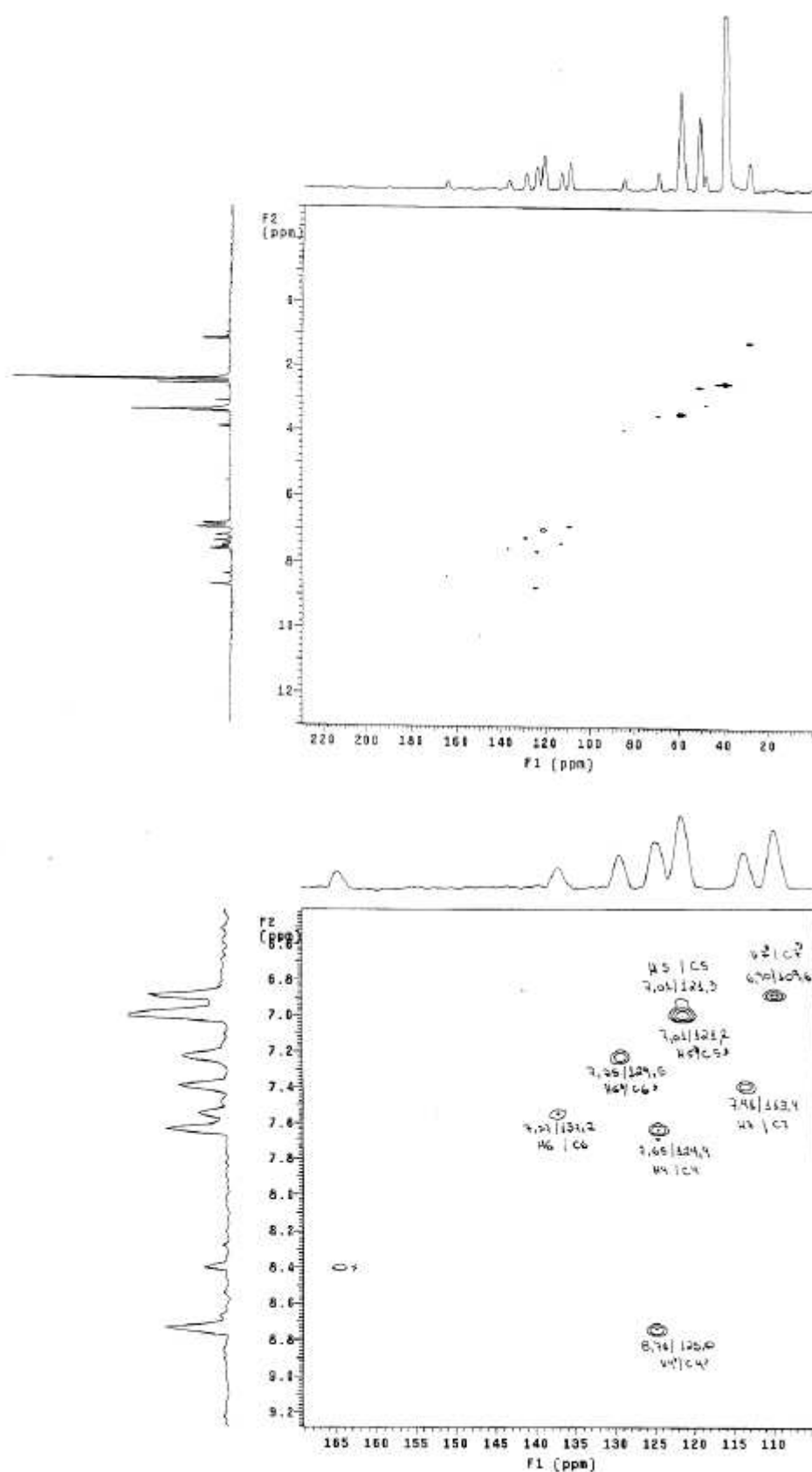
Espectro 2.1. Espectro de massas EM-ES (modo positivo) da indigotina (It1).



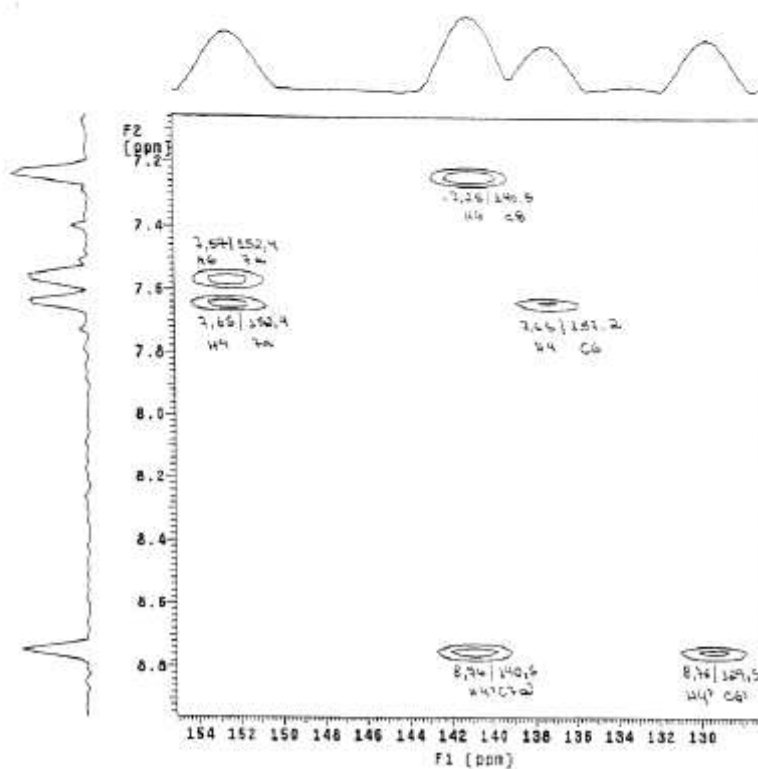
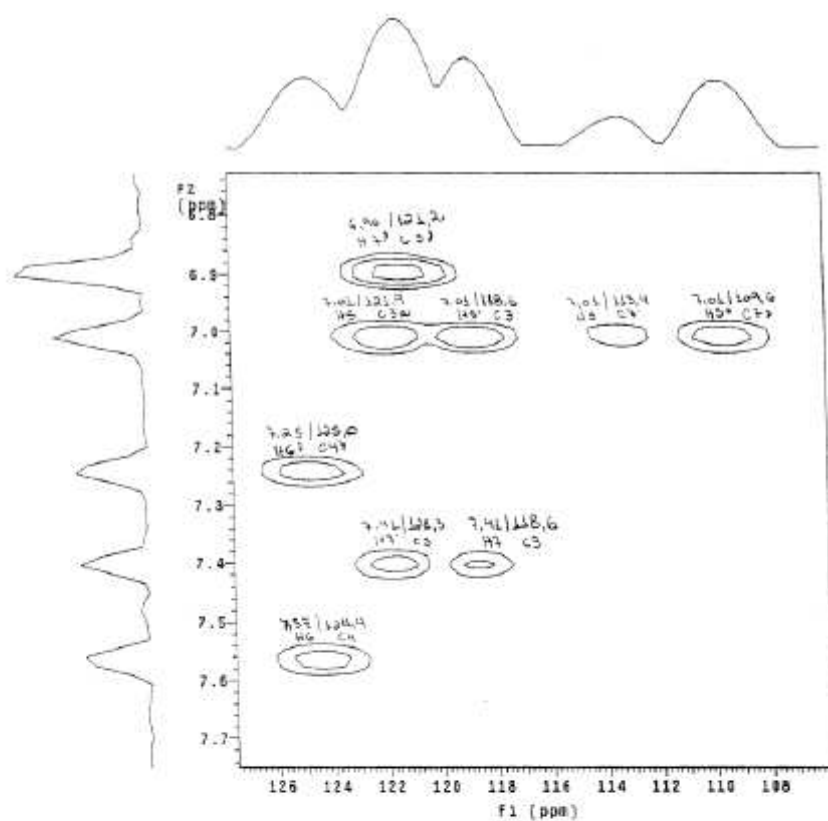
Espectro 2.2. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da indirubina (It2).



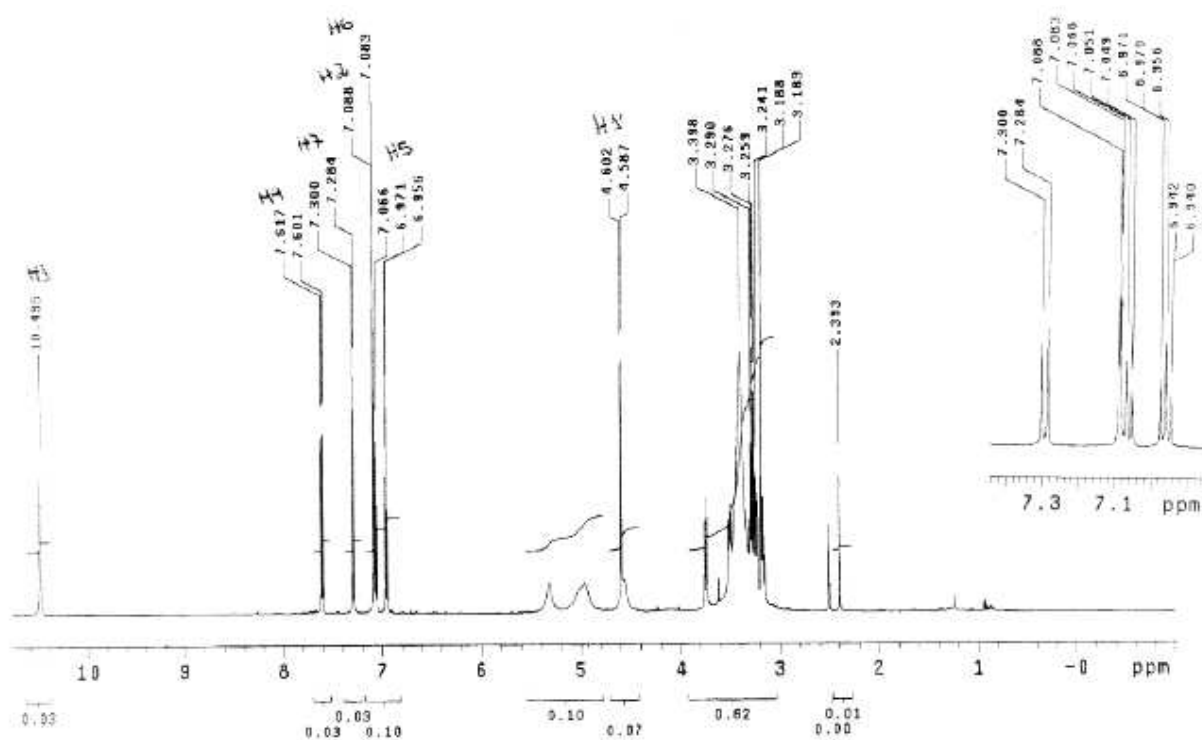
Espectro 2.3. Experimento bidimensional COSY ^1H - ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da indirubina (**It2**).



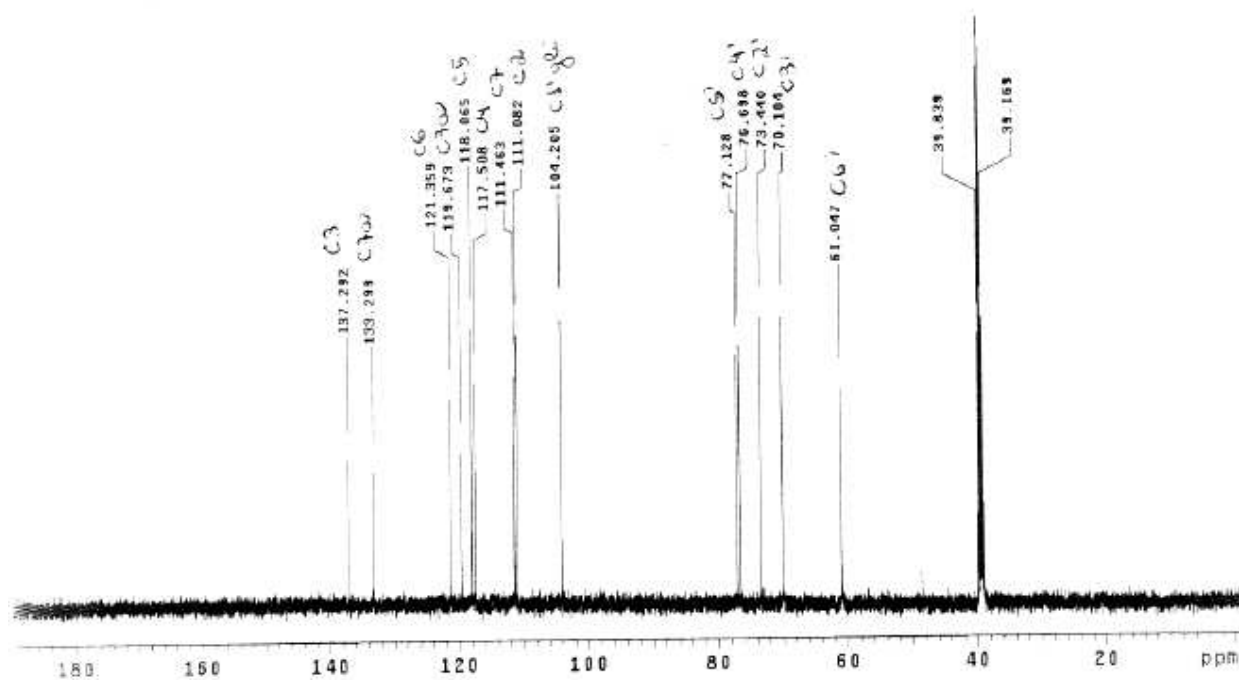
Espectro 2.4. Experimento bidimensional gHMQC (DMSO-d₆, 125 MHz) da indirubina (It2).



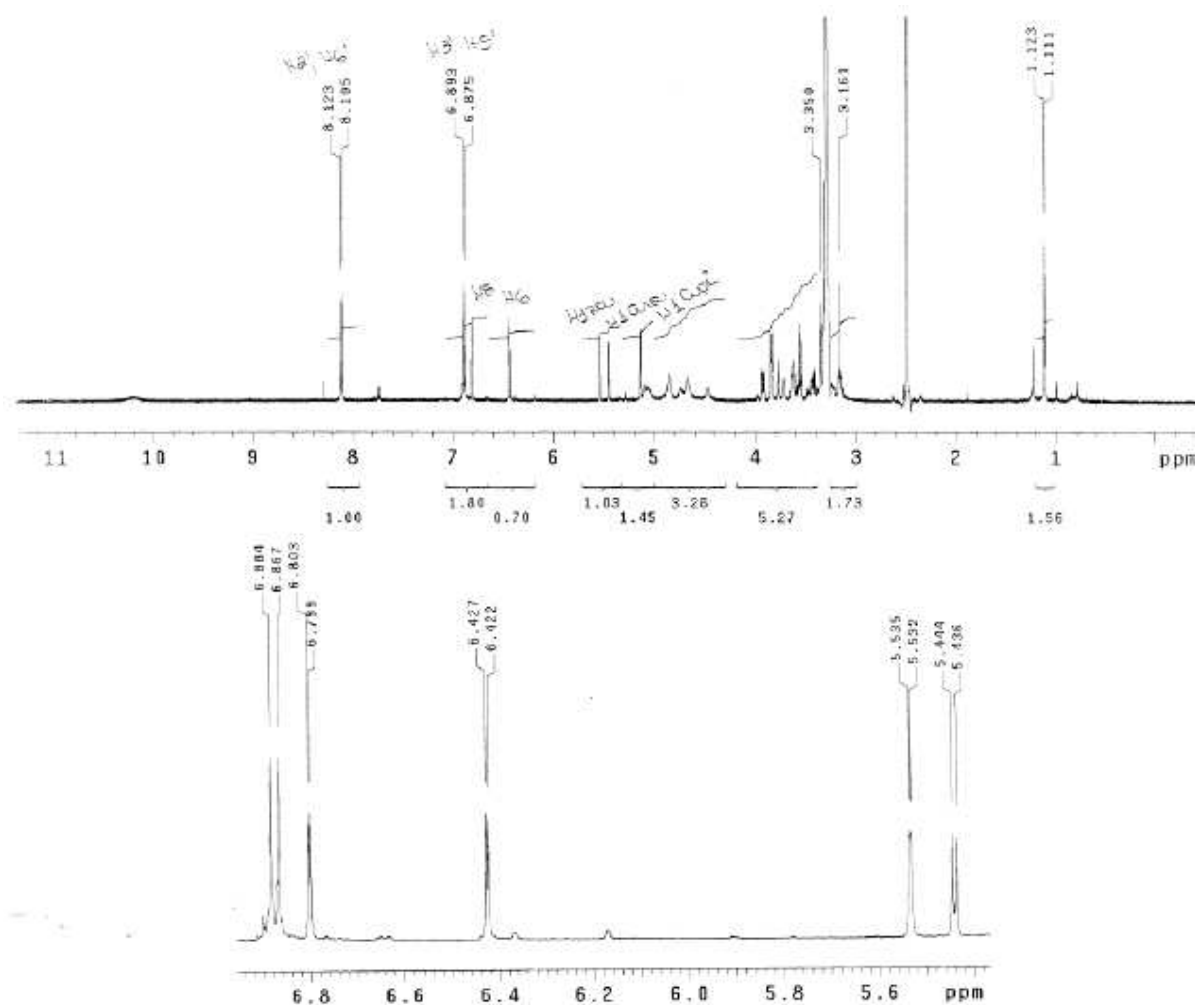
Espectros 2.5. Ampliações do experimento bidimensional gHMBC (DMSO-d₆, 125 Hz) da indirubina (It2).



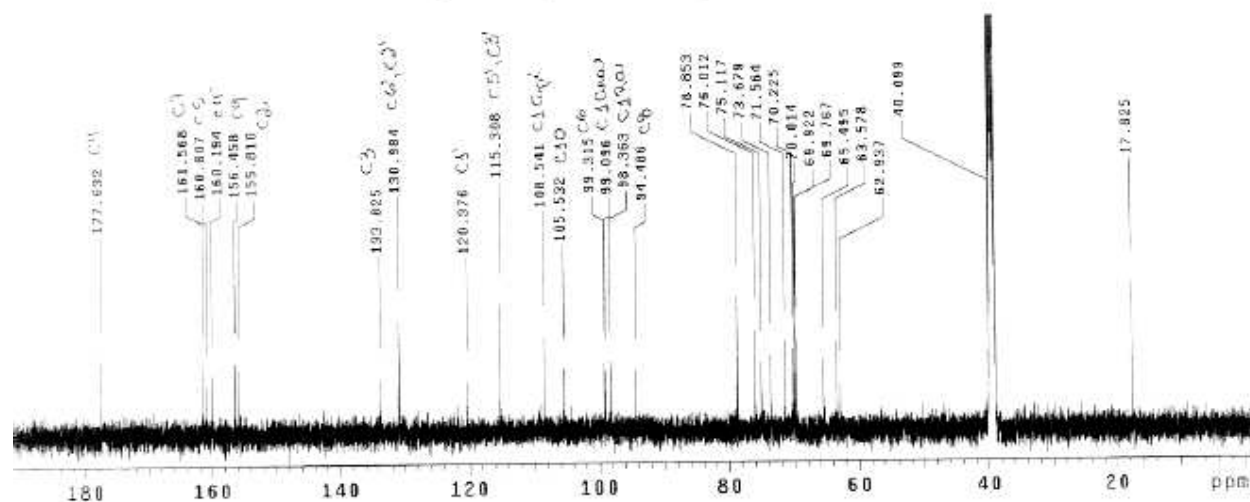
Espectro 2.6. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da indicana (1t3).



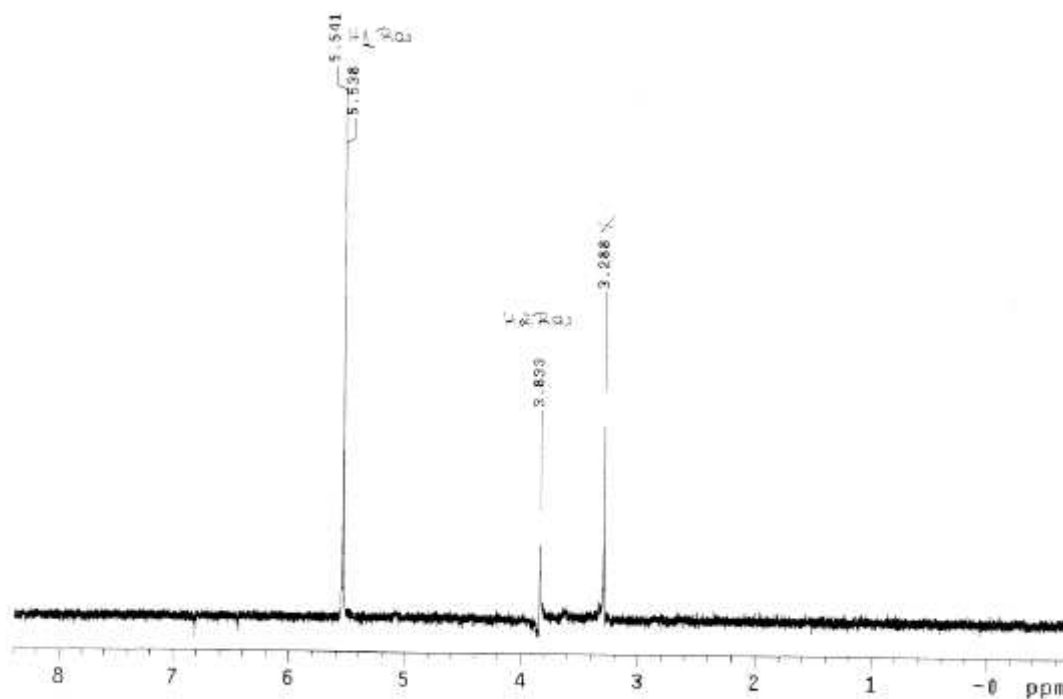
Espectro 2.7. Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) da indicana (1t3).



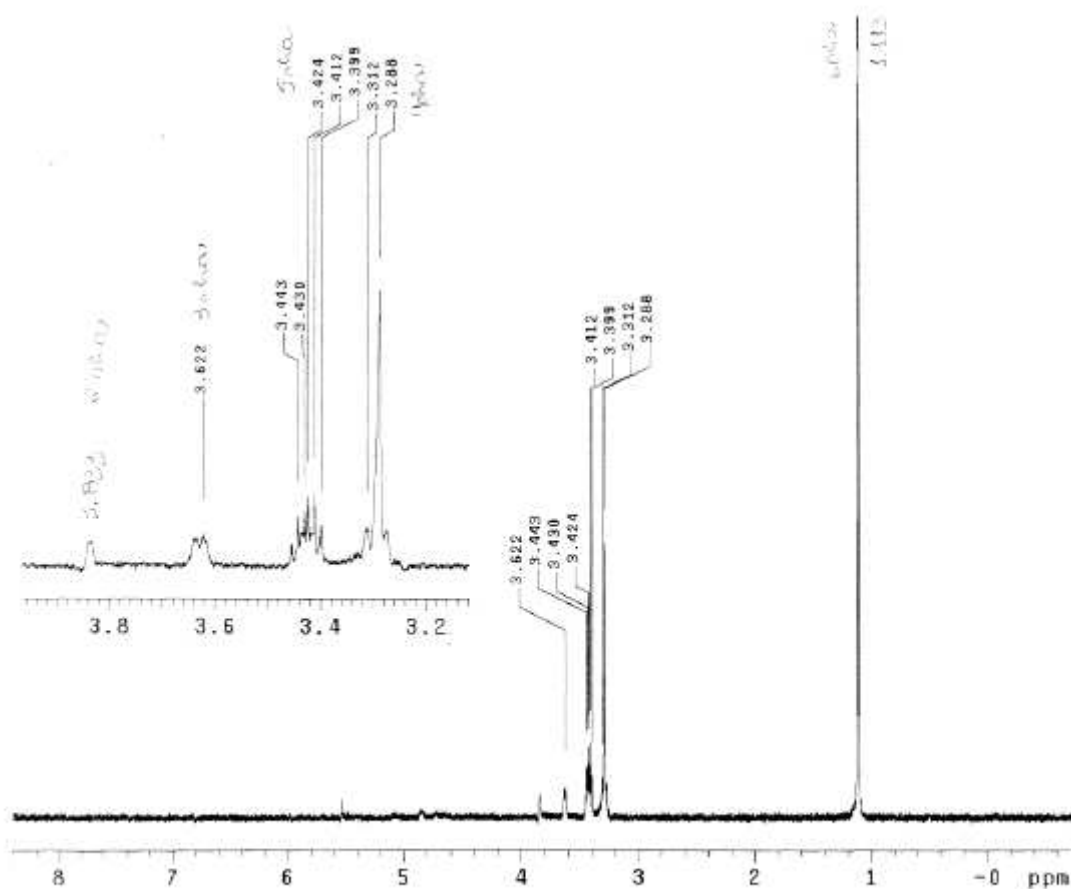
Espectro 2.8. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) do kaempferol 3-O-[α-L-arabinopiranosil-(2→1)-α-L-apiofuranosil]-7-O-α-L-raminopiranosídeo (**It9**).



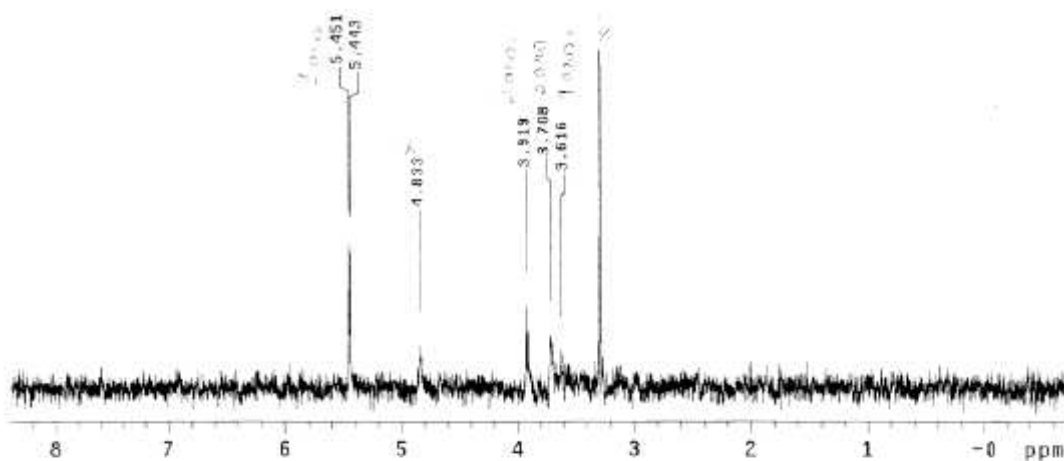
Espectro 2.9. Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) do kaempferol 3-O-[α-L-arabinopiranosil-(2→1)-α-L-apiofuranosil]-7-O-α-L-raminopiranosídeo (**It9**).



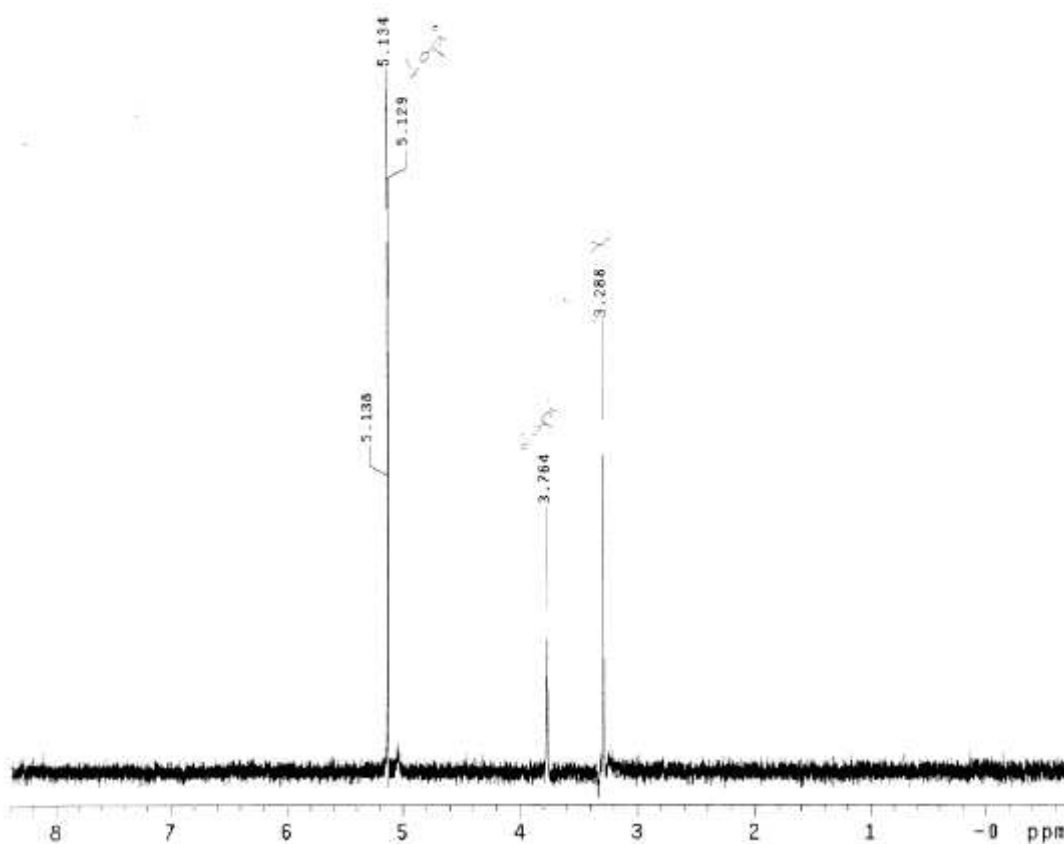
Espectro 2.10. Experimento TOCSY-1D (DMSO-d₆, 500 MHz), irradiação em δ 5,54, do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosideo (**It9**).



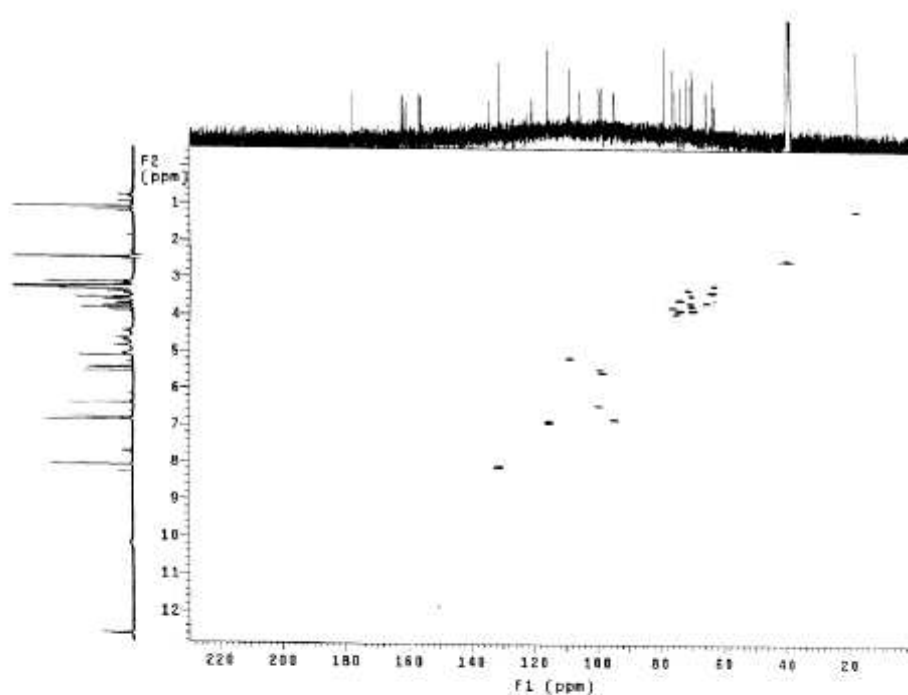
Espectro 2.11. Experimento TOCSY-1D (DMSO-d₆, 500 MHz), irradiação em δ 1,11, do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosideo (**It9**).



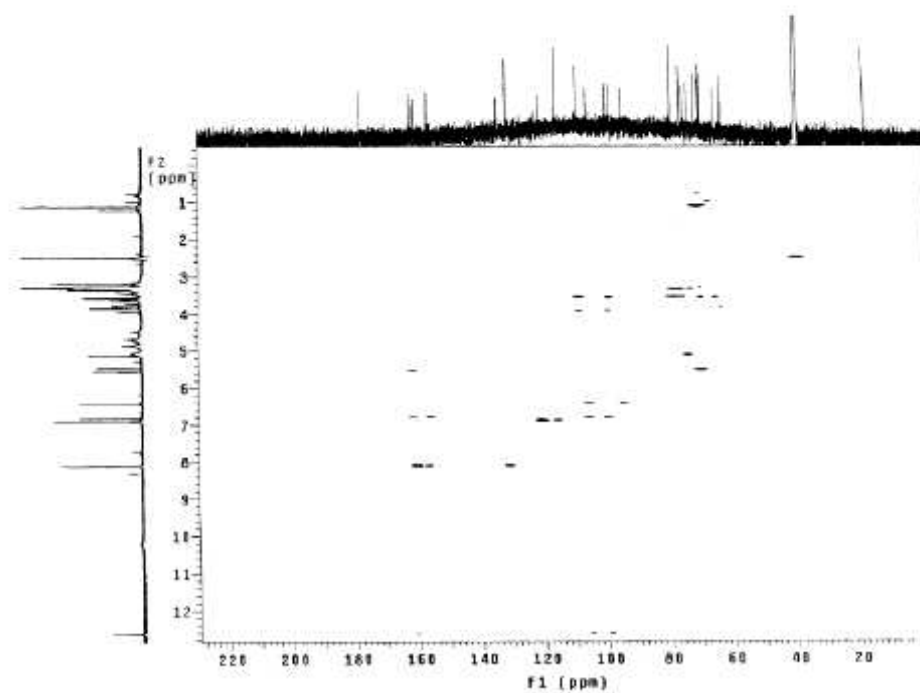
Espectro 2.12. Experimento TOCSY-1D (DMSO- d_6 , 500 MHz), irradiação em δ 5,44, do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo (**1t9**).



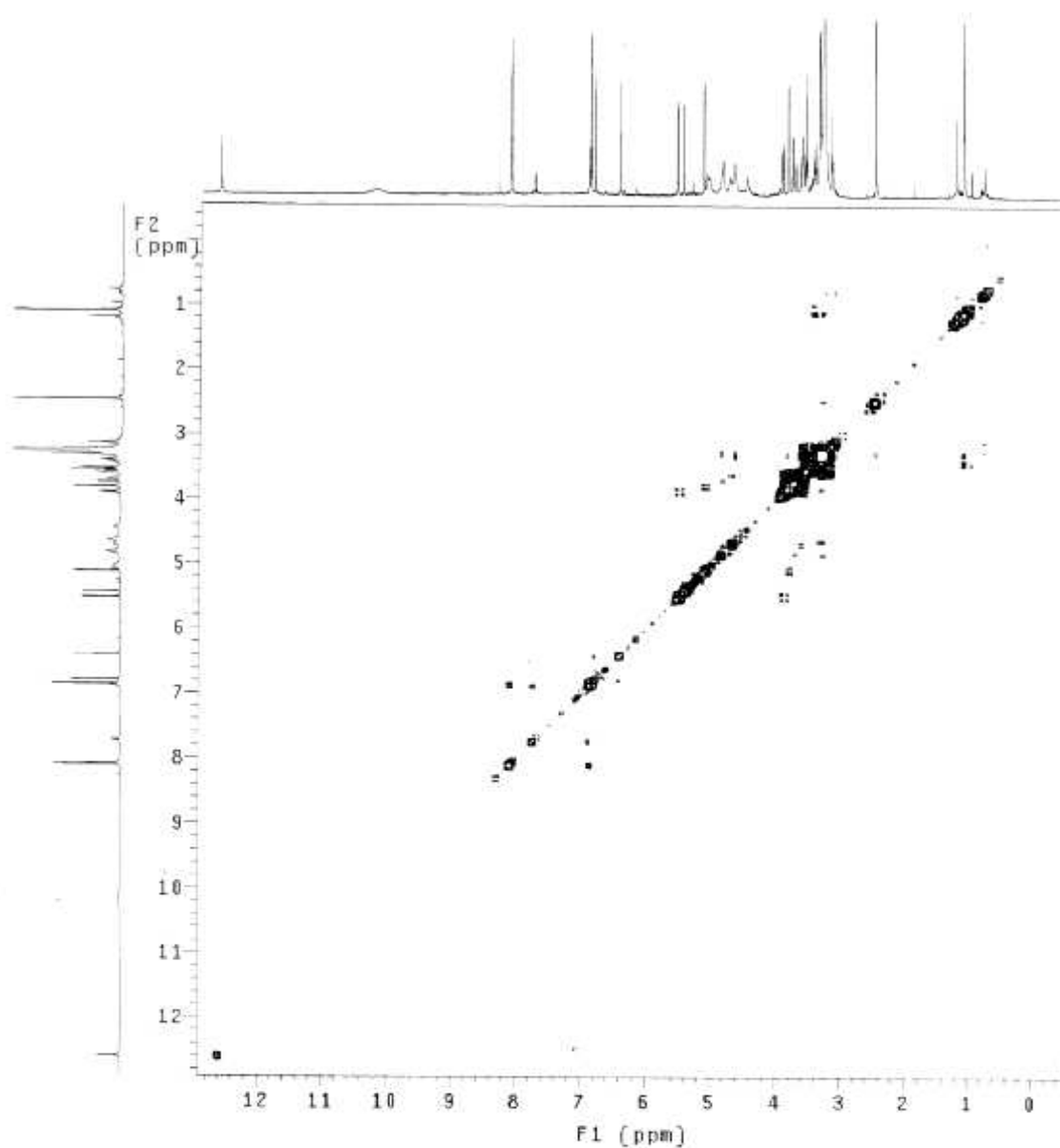
Espectro 2.13. Experimento TOCSY-1D (DMSO- d_6 , 500 MHz), irradiação em δ 5,13, do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo (**1t9**).



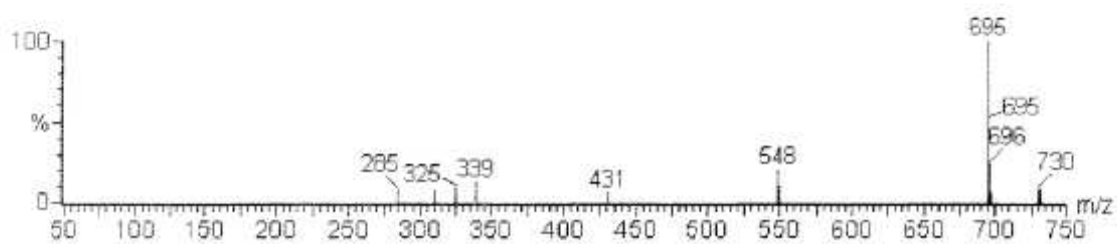
Espectro 2.14. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 125 Hz) do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo (**1t9**).



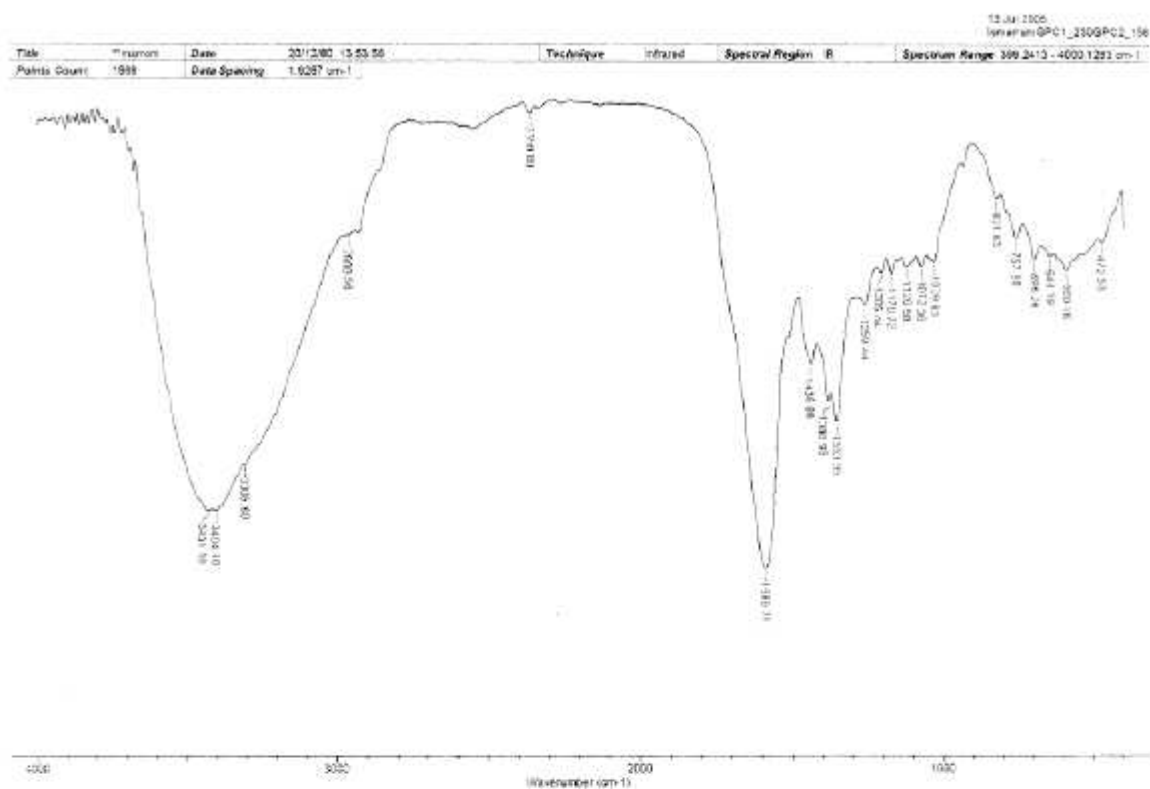
Espectro 2.15. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 125 Hz) do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo (**1t9**).



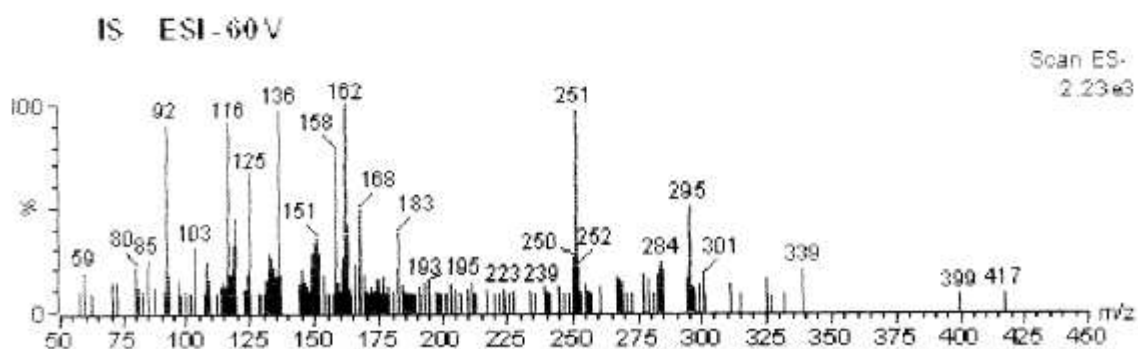
Espectro 2.16. Experimento bidimensional COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo (**1t9**).



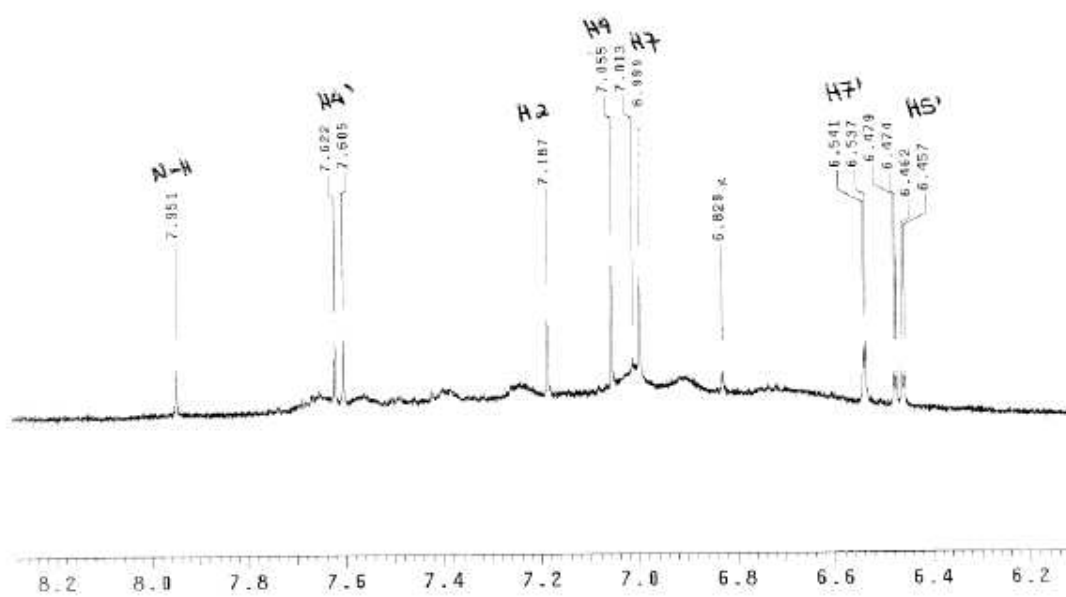
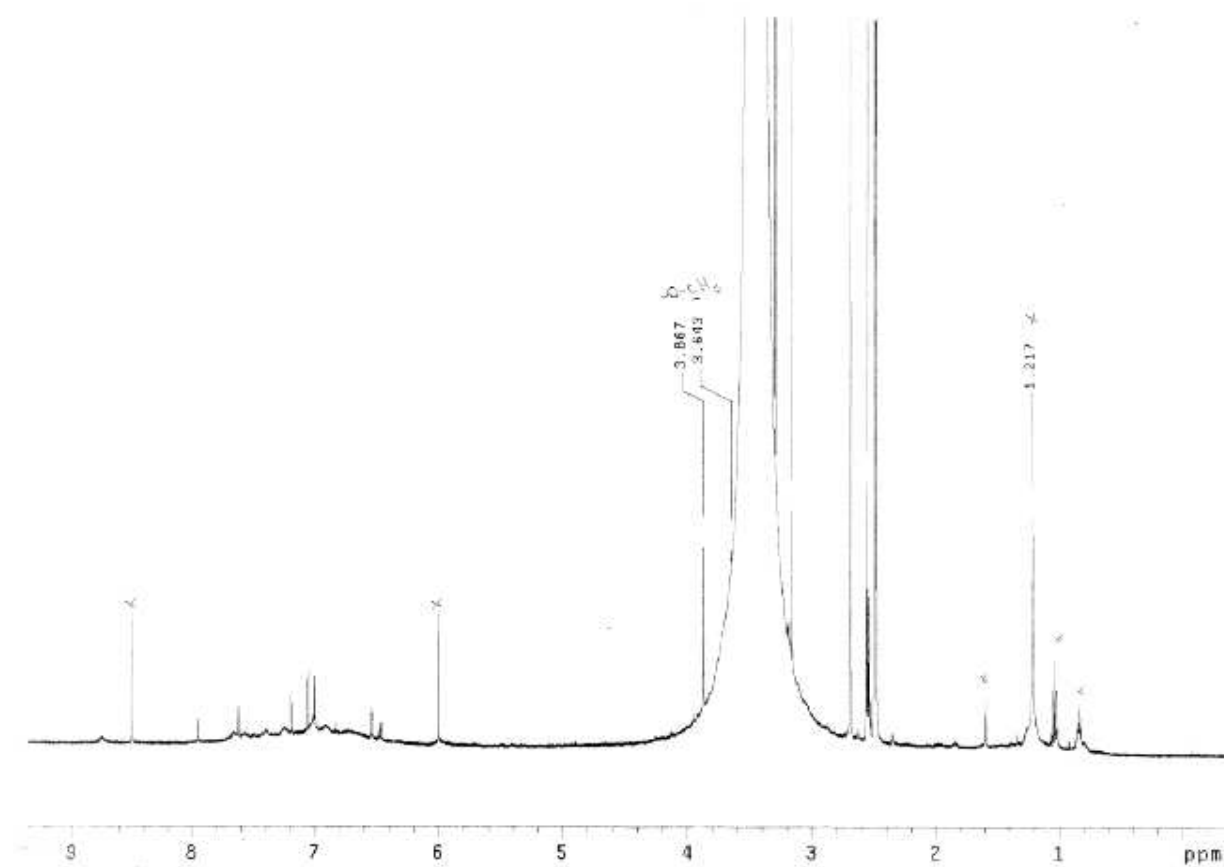
Espectro 2.17. Espectro de massas EM-ES (modo negativo) do kaempferol 3-*O*-[α -L-arabinopiranosil-(2 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosil]-7-*O*- α -L-raminopiranosídeo (**1t9**).



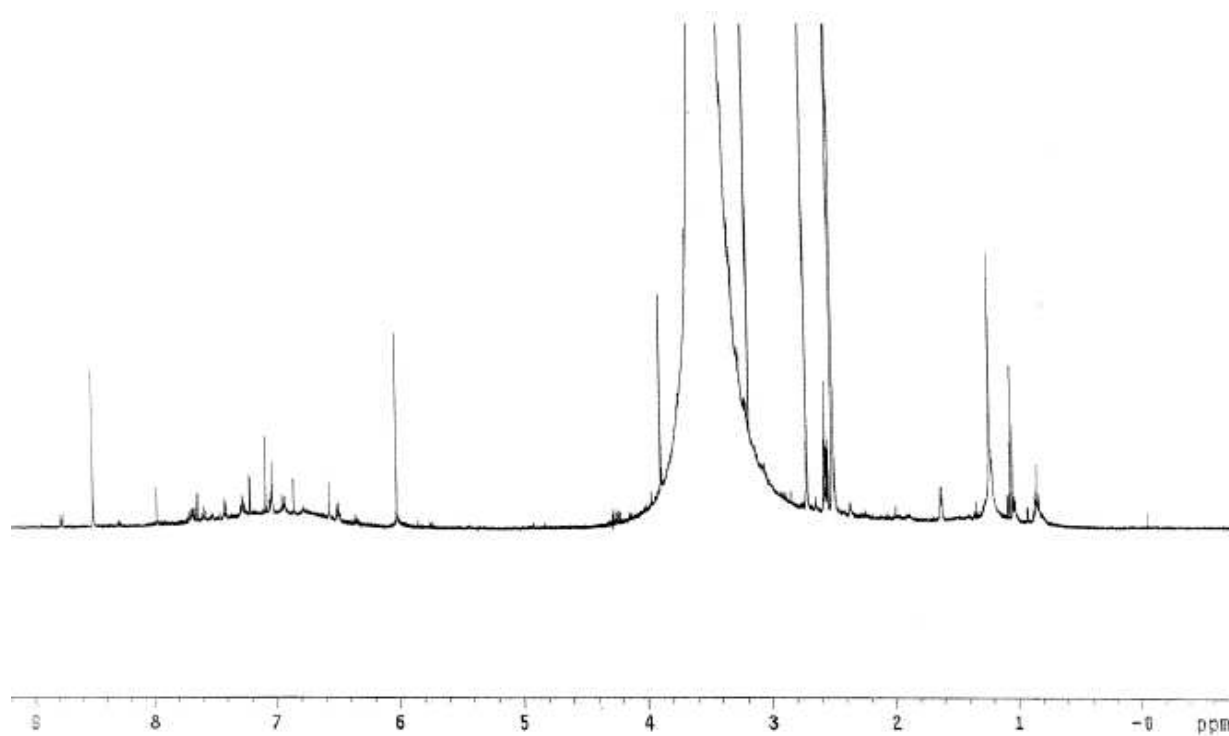
Espectro 2.18. Espectro no IV da 6'-metoxi 2, 5, 6-trihidroxiisourubina (Is3).



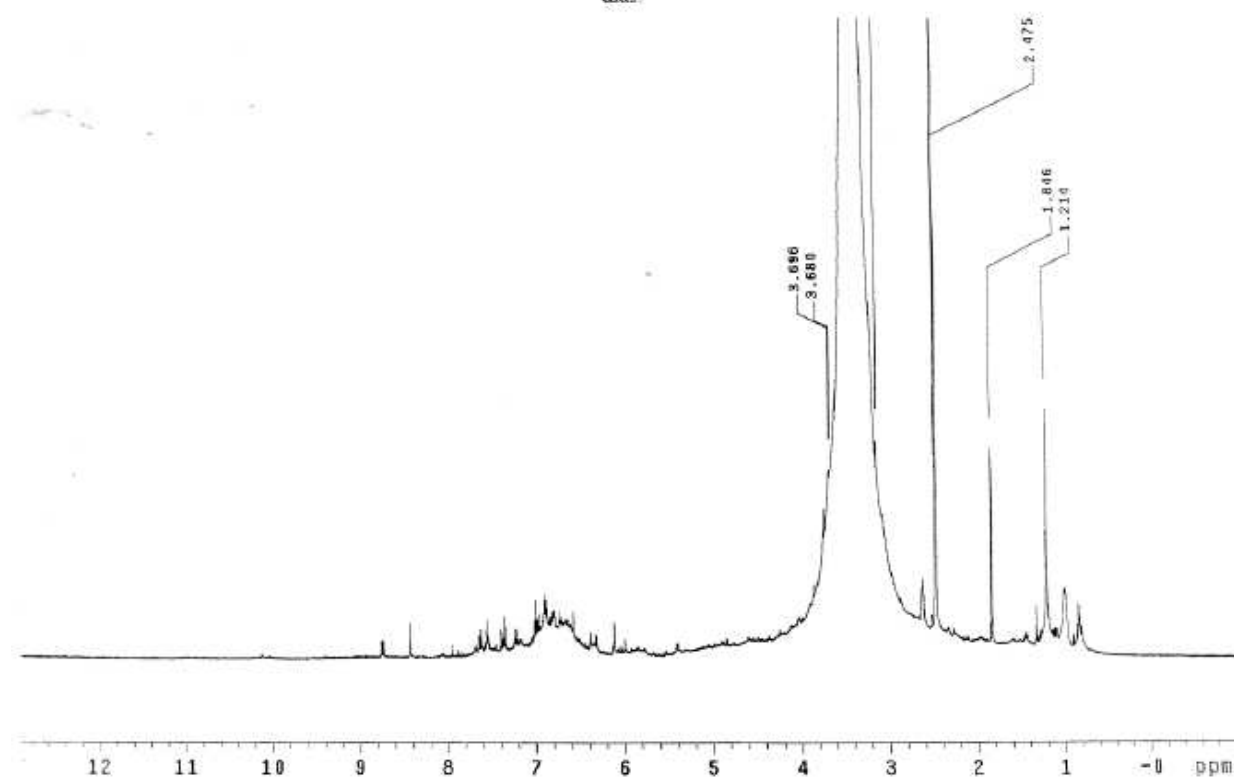
Espectro 2.19. Espectro de massas EM-ES (modo negativo) da 6'-metoxi 2, 5, 6-trihidroxiisourubina (Is3).



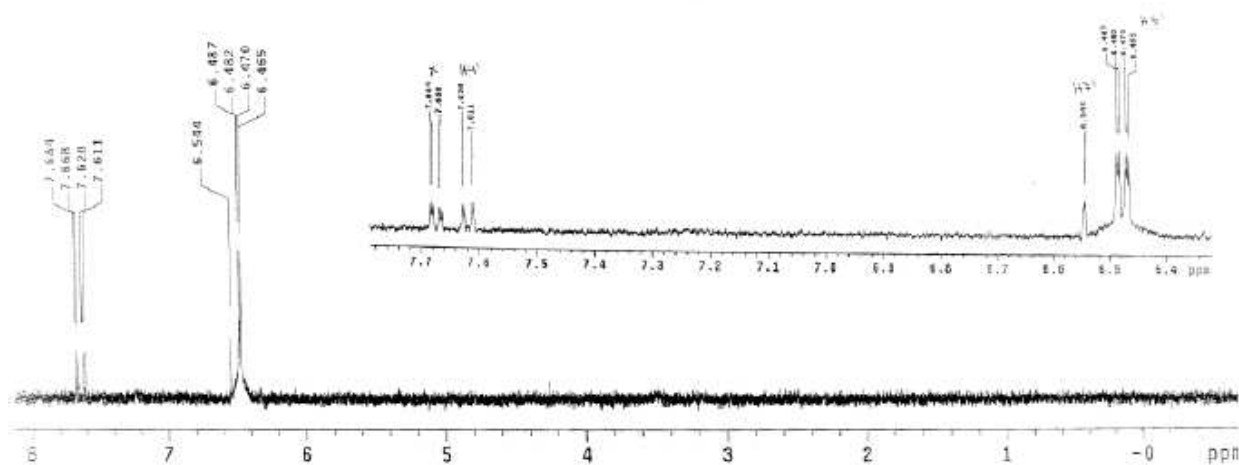
Espectro 2.20a. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da 6'-metoxi 2, 5, 6-tridroxisouindirubina (Is3).



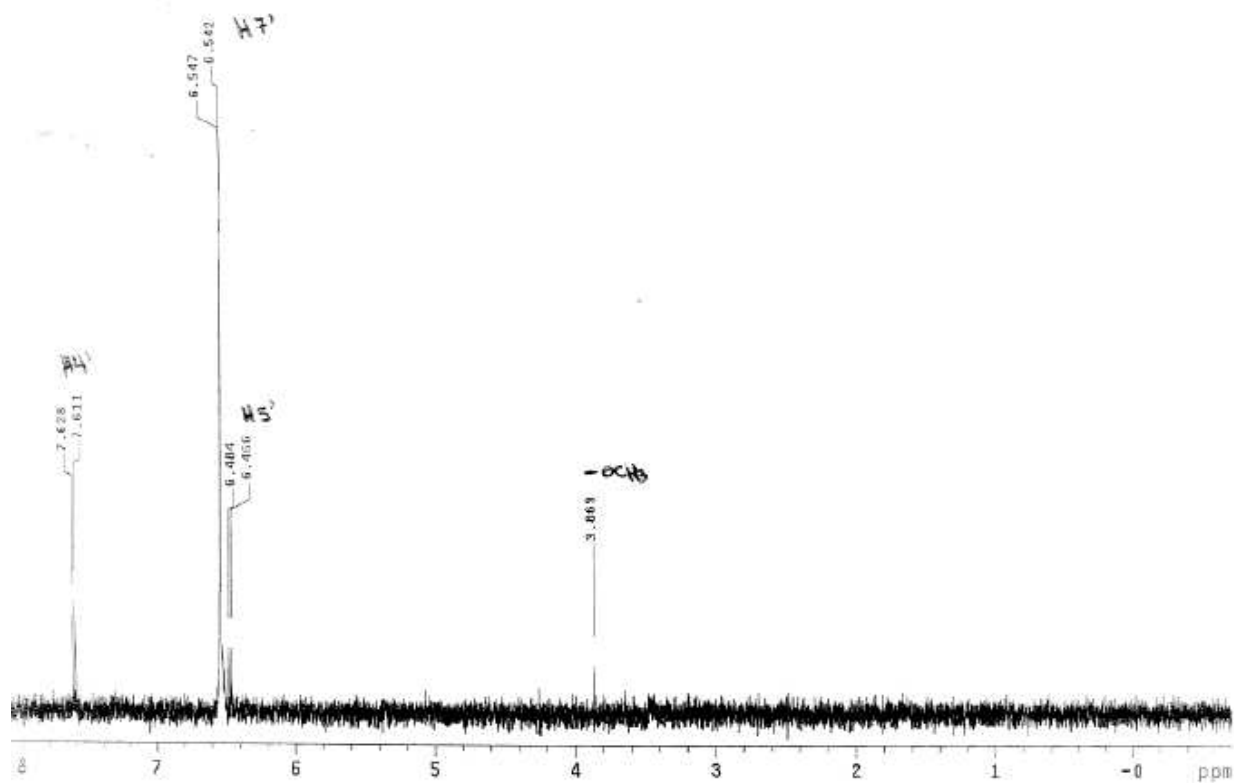
Espectro 2.20b. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisindirubina (**Is3**), após 15 dias.



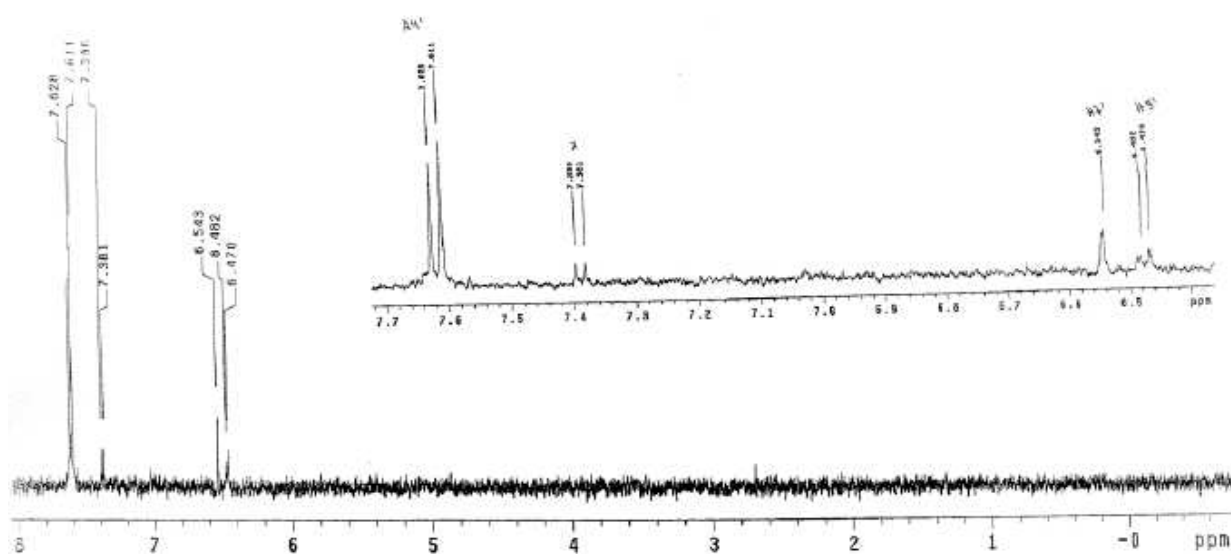
Espectro 2.20c. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisindirubina (**Is3**), após 30 dias.



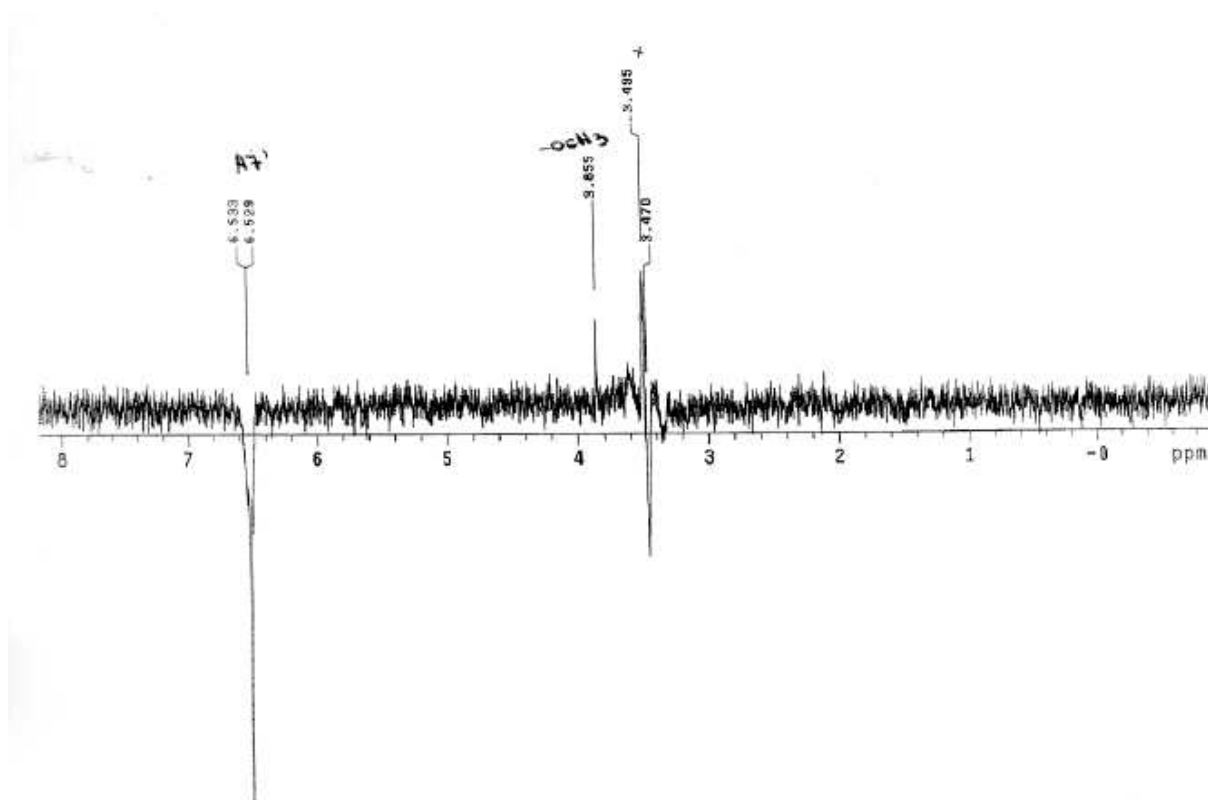
Espectro 2.21. Experimento TOCSY-1D (DMSO- d_6 , 500 MHz), com irradiação em δ 6,48, da 6'-metoxi 2, 5, 6-trihidroxiisouridina (**1s3**).



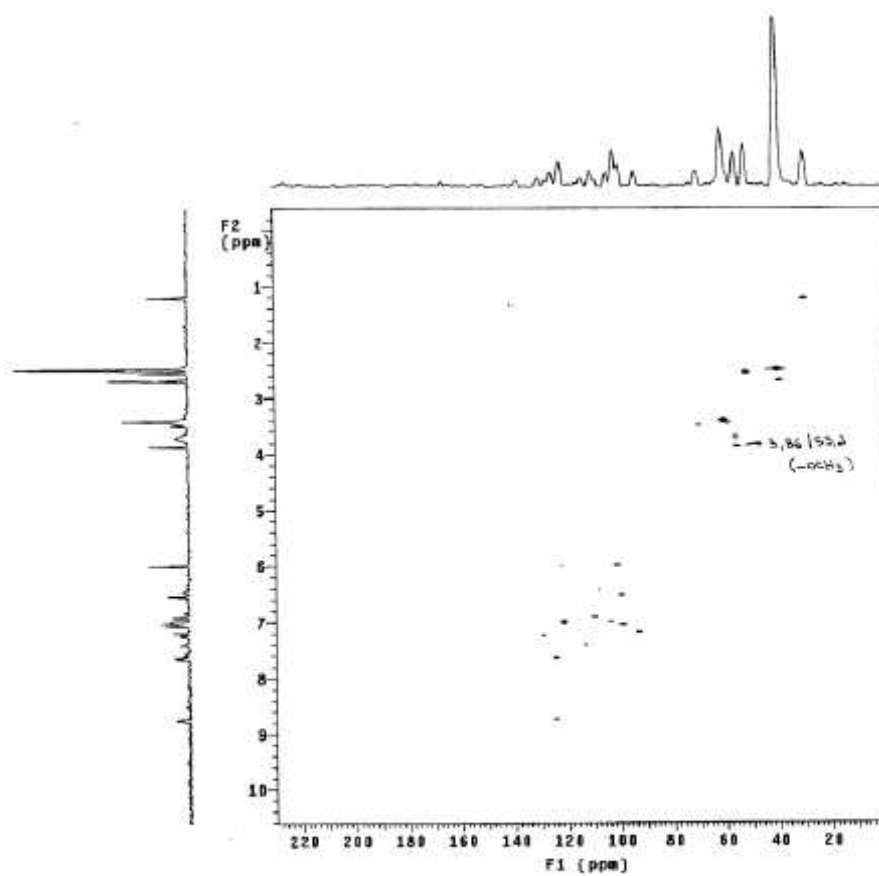
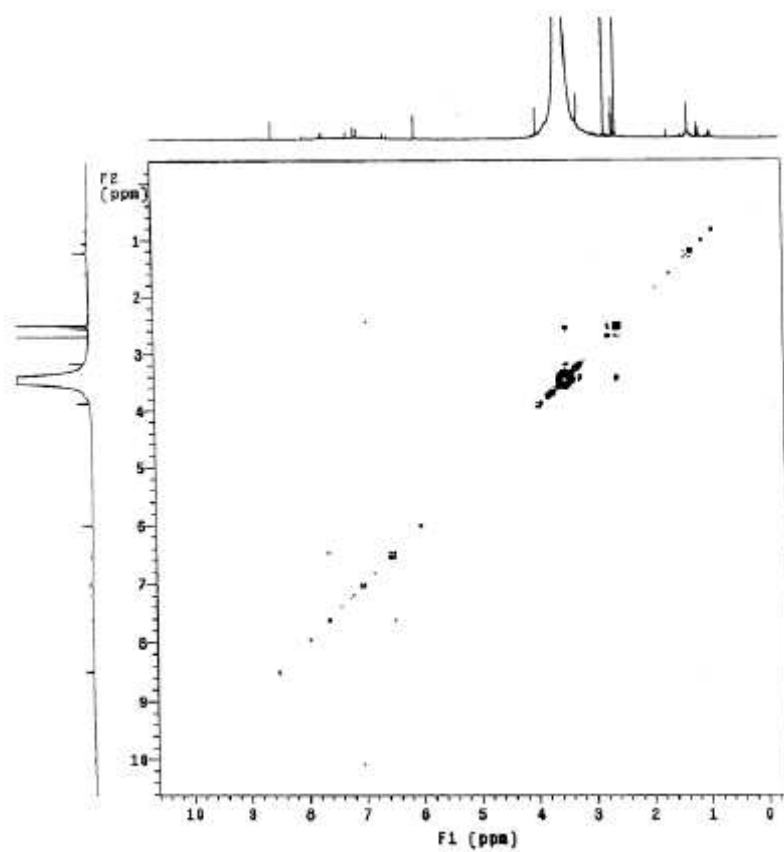
Espectro 2.22. Experimento TOCSY-1D (DMSO- d_6 , 500 MHz), com irradiação em δ 6,54, da 6'-metoxi 2, 5, 6-trihidroxiisouridina (**1s3**).



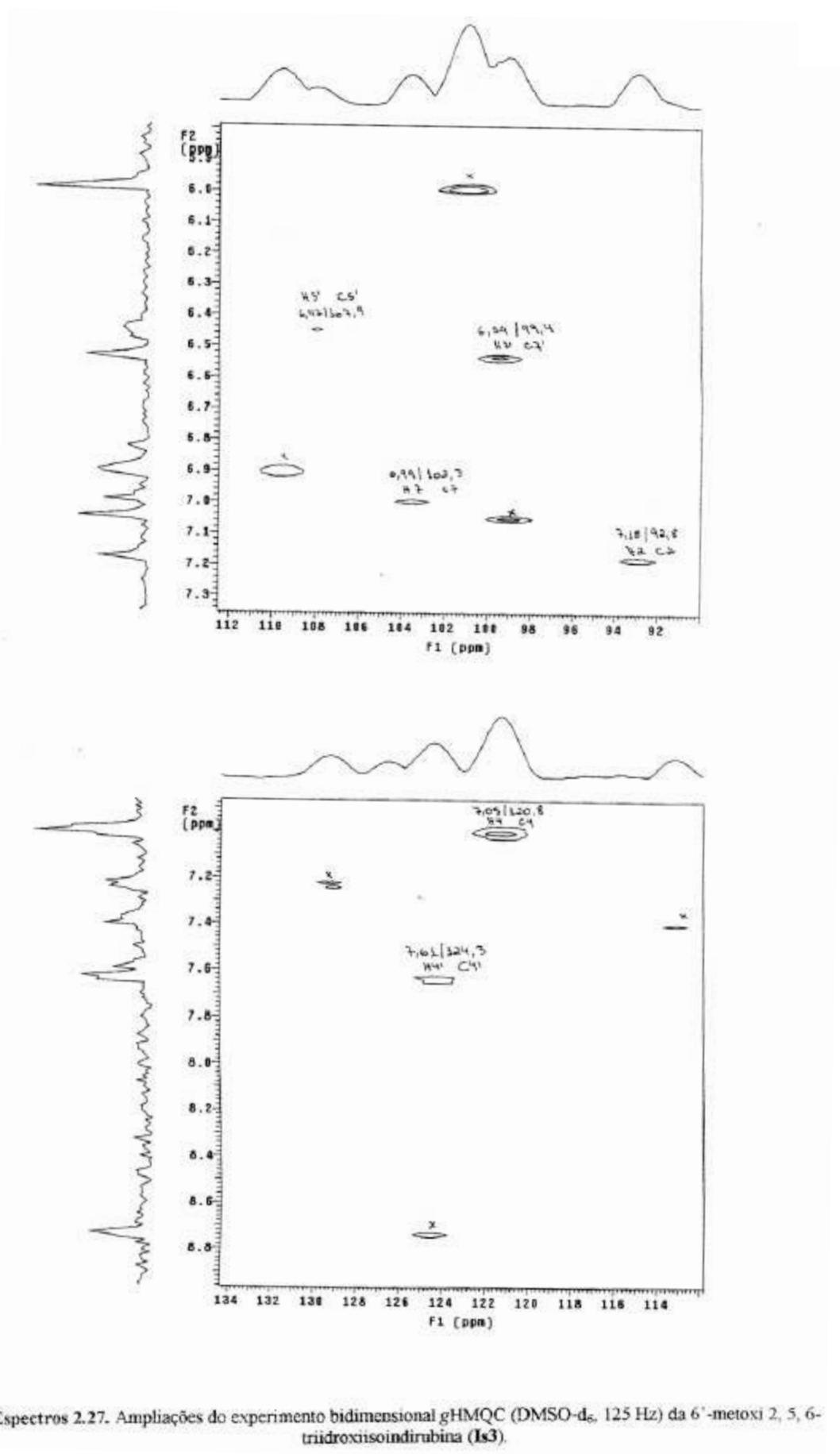
Espectro 2.23. Experimento TOCSY-1D (DMSO- d_6 , 500 MHz), com irradiação em δ 7,61, da 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisindirubina (**1s3**).



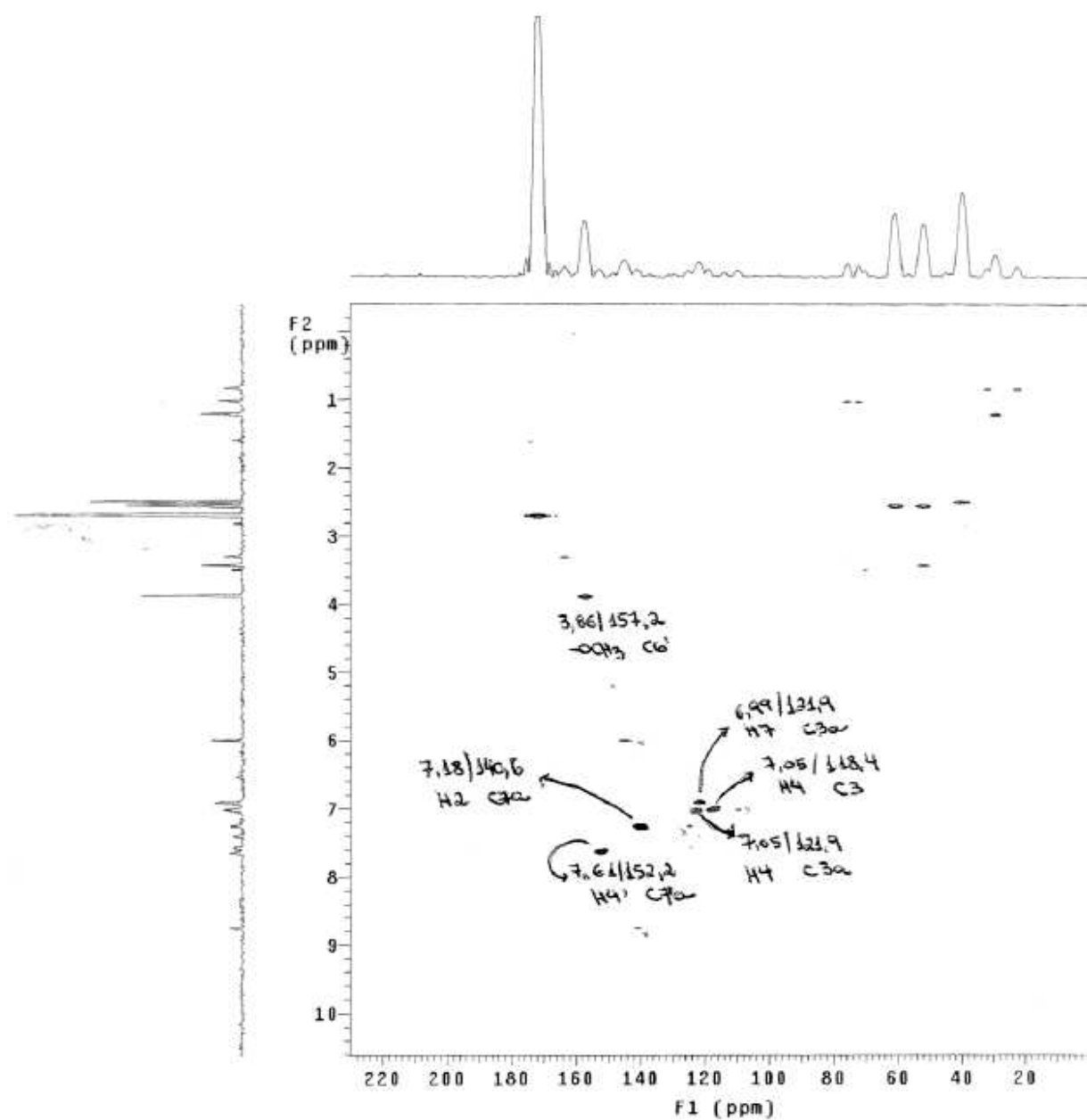
Espectro 2.24. Experimento NOESY-1D (DMSO- d_6 , 500 MHz), com irradiação em δ 6,54, da 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisindirubina (**1s3**).



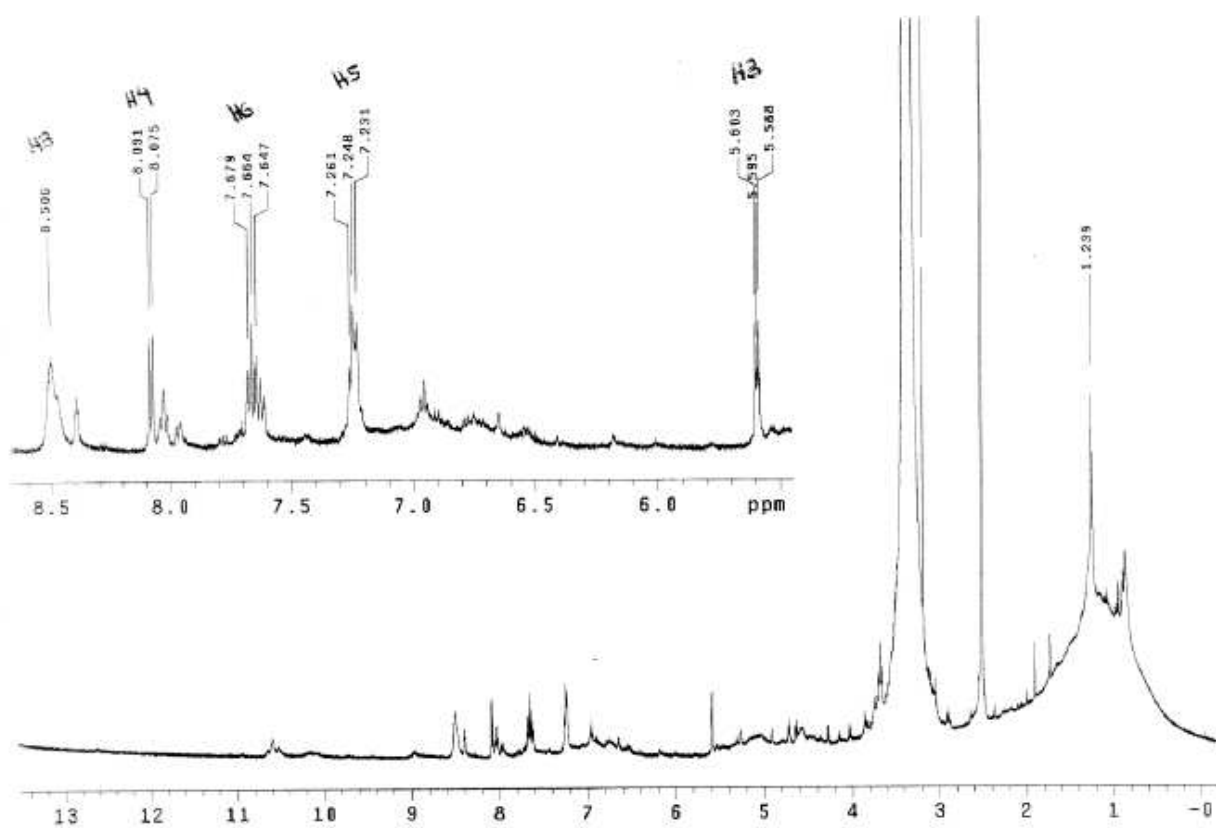
Espectros 2.25. e 2.26. Experimentos bidimensionais COSY ^1H - ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) e gHMQC (DMSO- d_6 , 125 MHz) da 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisoirubina (1s3)



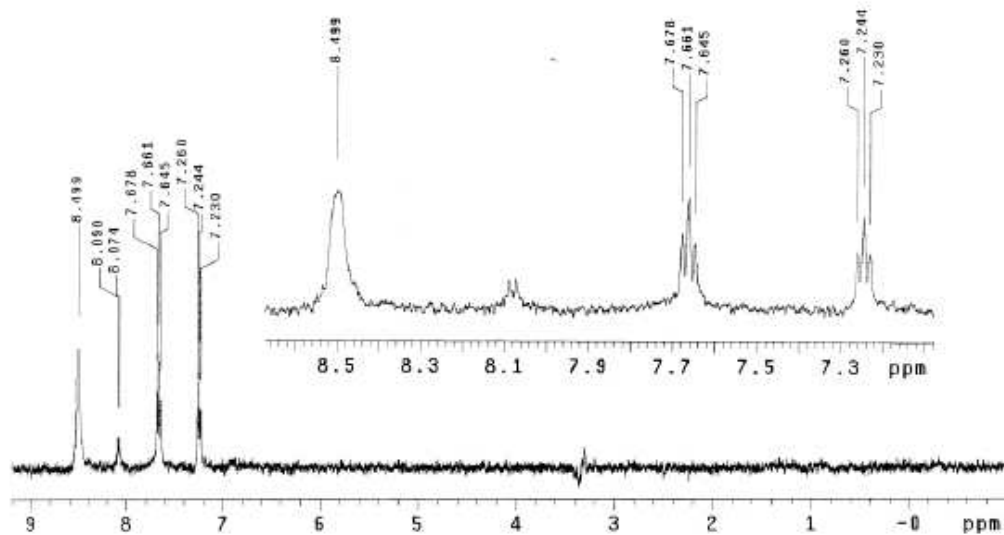
Espectros 2.27. Ampliações do experimento bidimensional gHMBC (DMSO-d₆, 125 Hz) da 6'-metoxi 2, 5, 6-trihidroxiisondirubina (**1s3**).



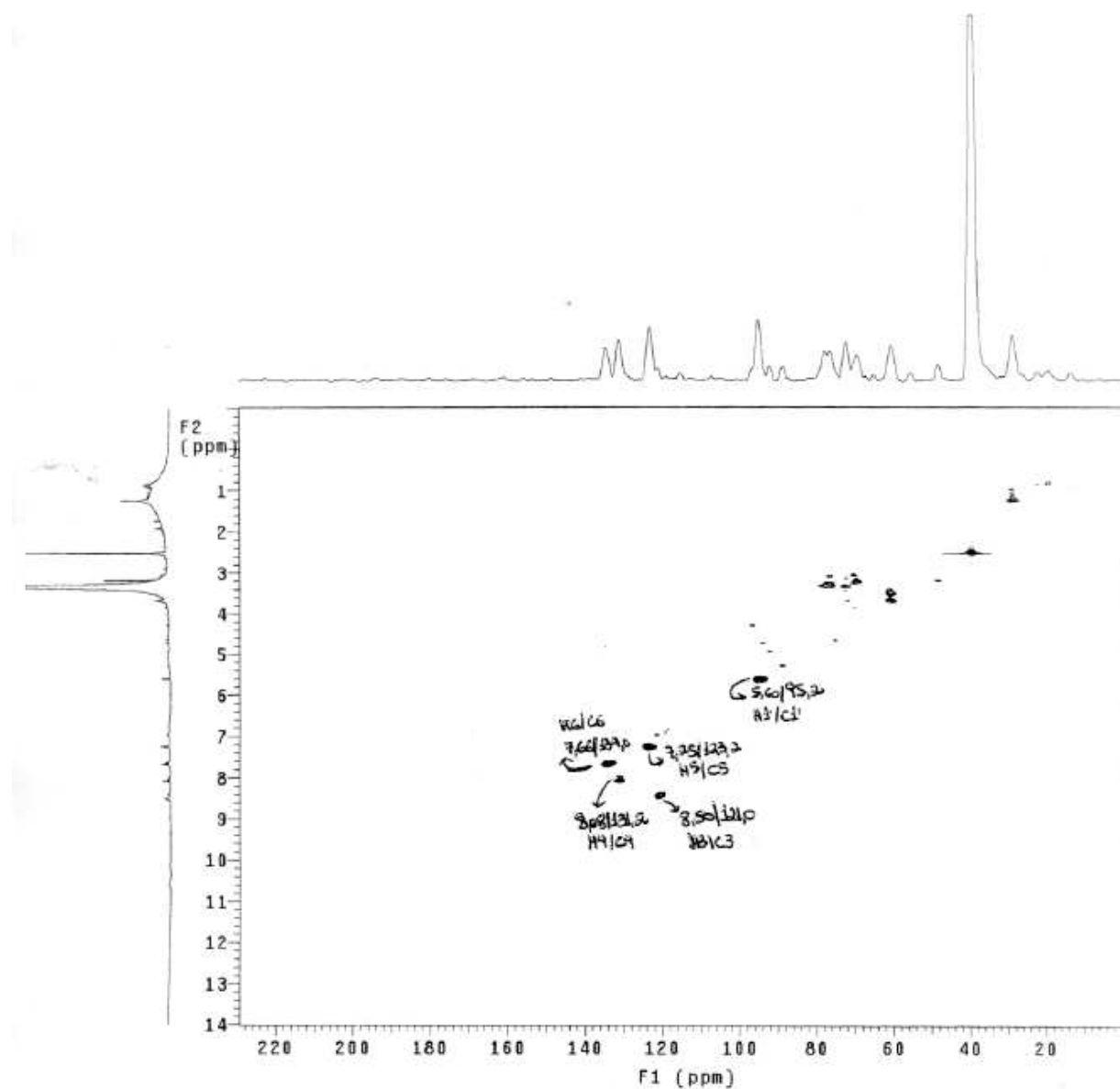
Espectros 2.28. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO-d₆, 125 Hz) da 6'-metoxi 2, 5, 6-triidroxiisourubina (**Is3**).



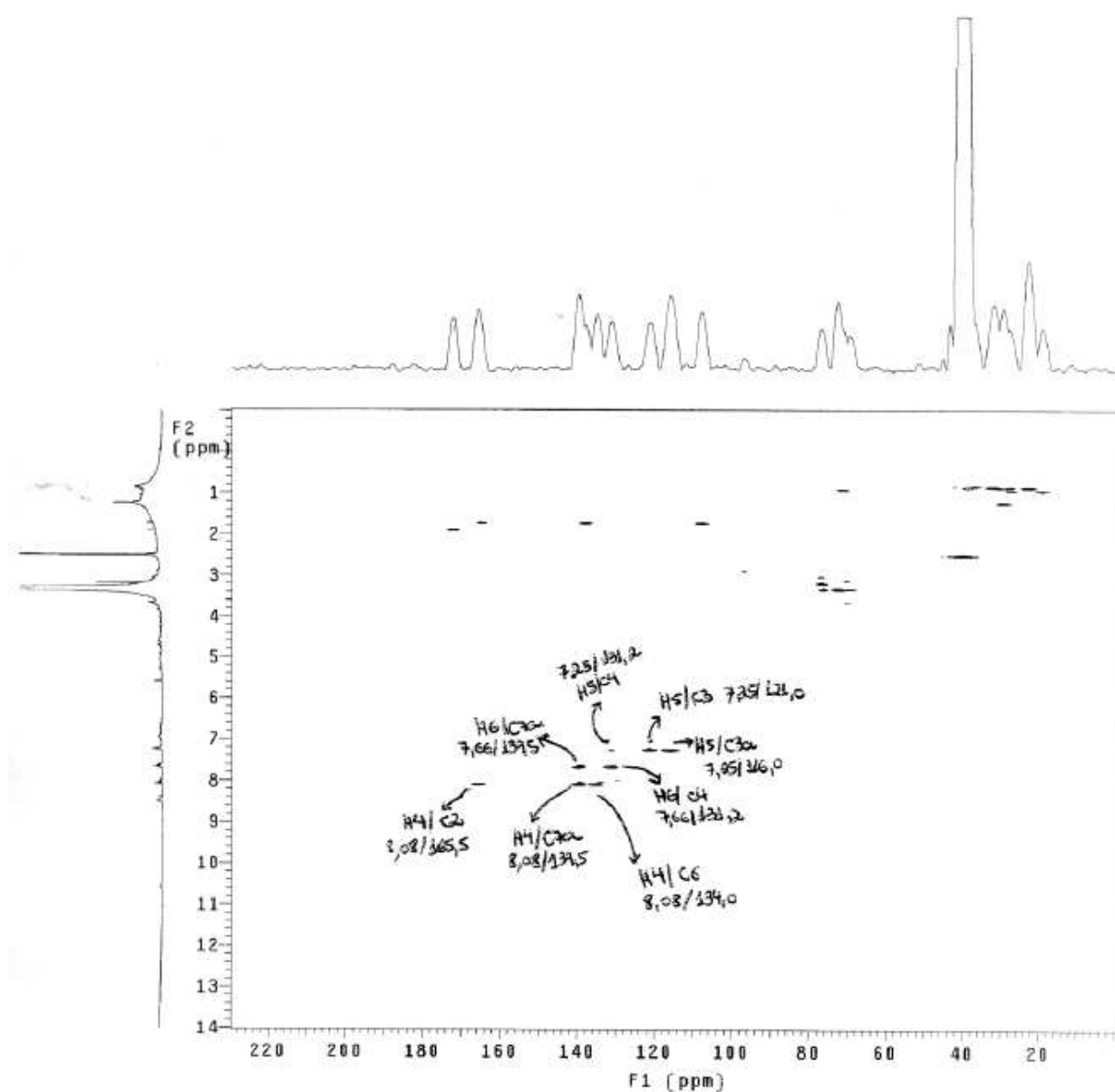
Espectro 2.29. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) do dioxindol-3-O-β-D-glicopiranosídeo (1s5).



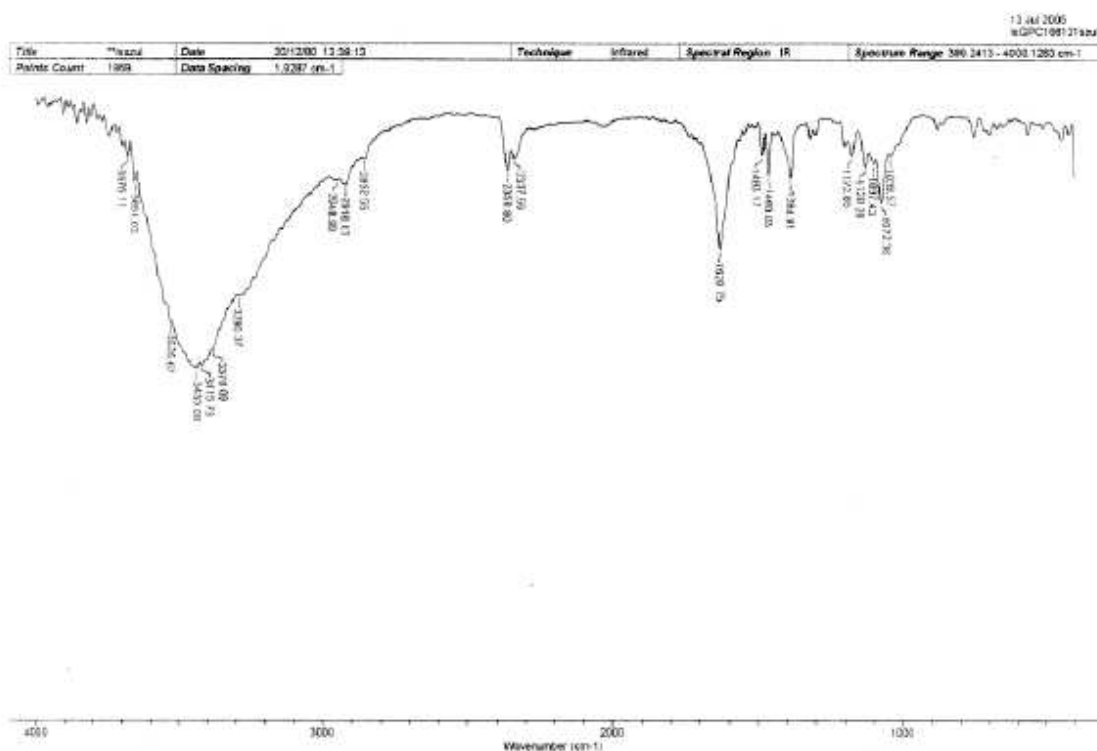
Espectro 2.30. Experimento TOCSY-1D (DMSO-d₆, 500 MHz), com irradiação em δ 7,66, do dioxindol-3-O-β-D-glicopiranosídeo (1s5).



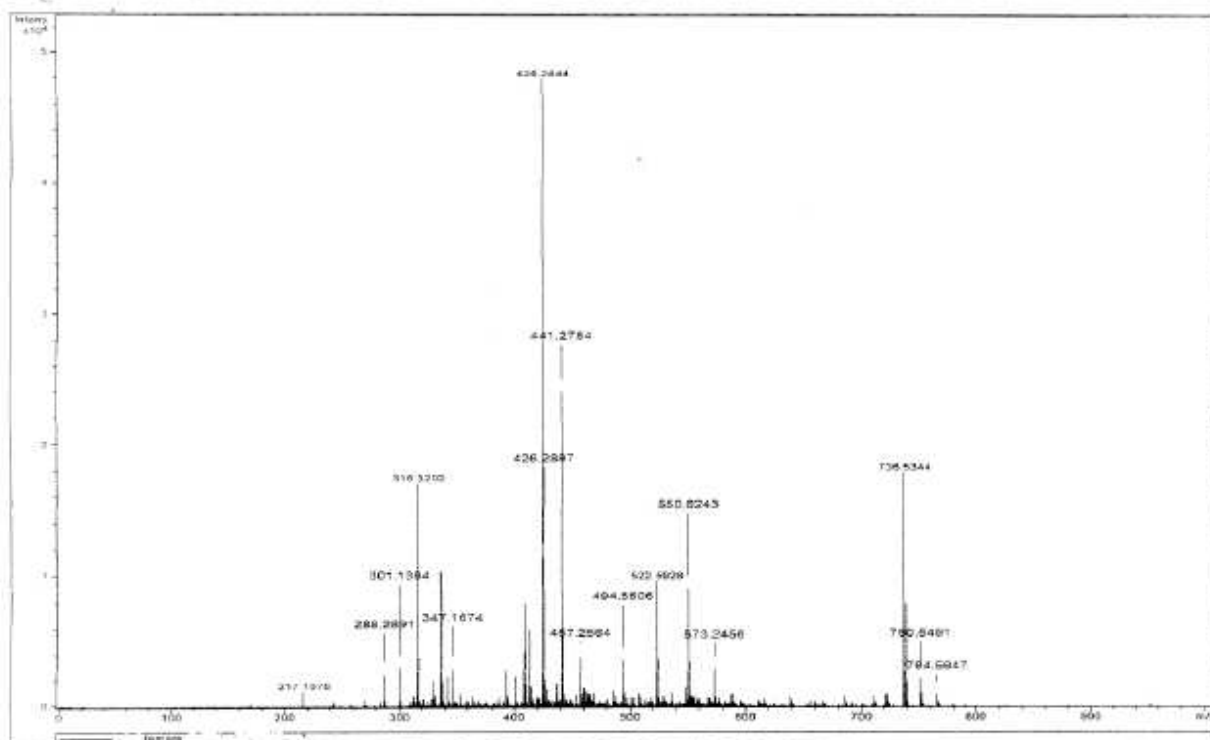
Espectros 2.31. Experimento bidimensional gHMQC (DMSO-d₆, 125 Hz) do dioxindol-3-O-β-D-glicopiranosideo (Is5).



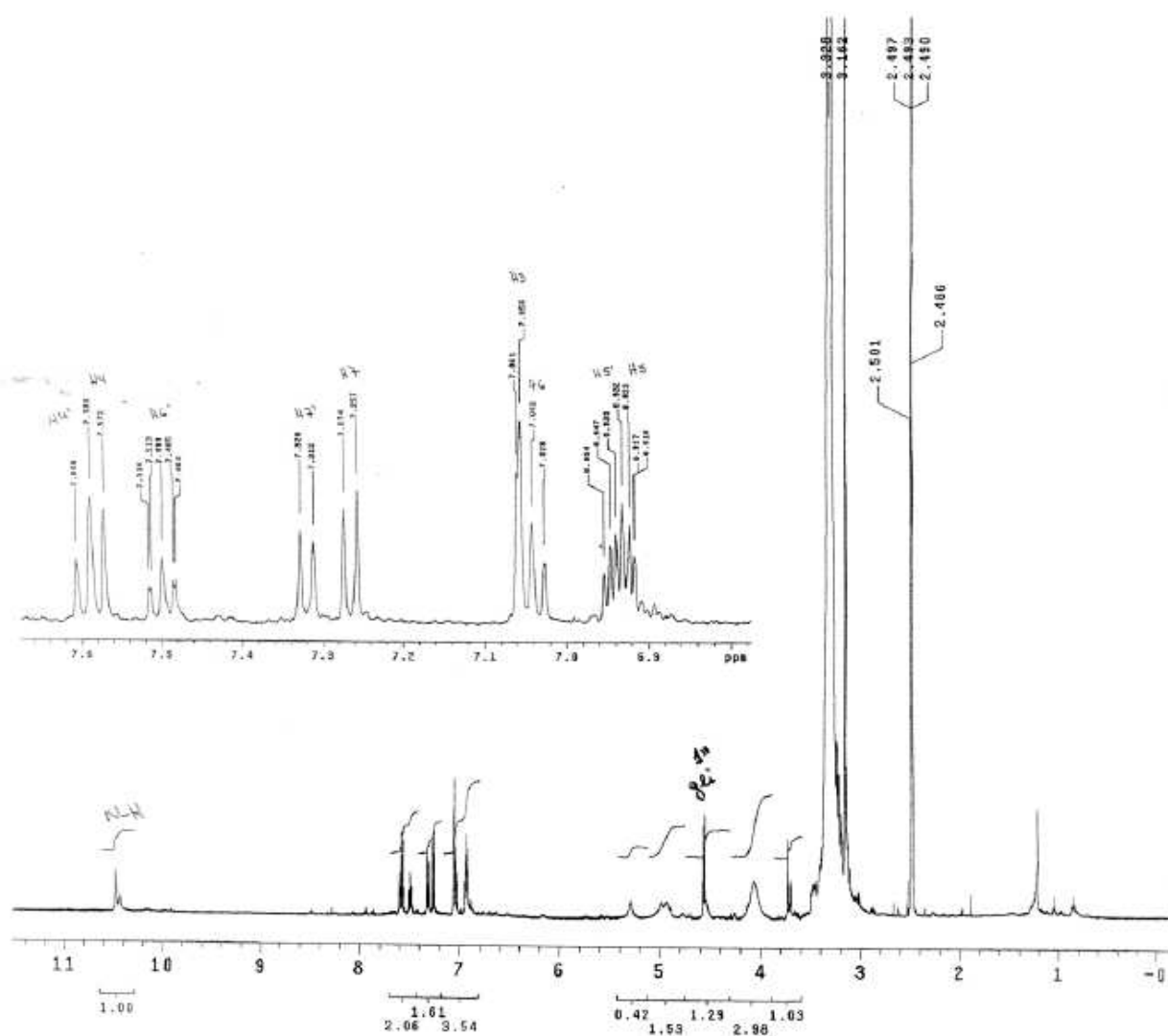
Espectros 2.32. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO-*d*₆, 125 Hz) do dioxindol-3-*O*-β-D-glicopiranosideo (Is5).



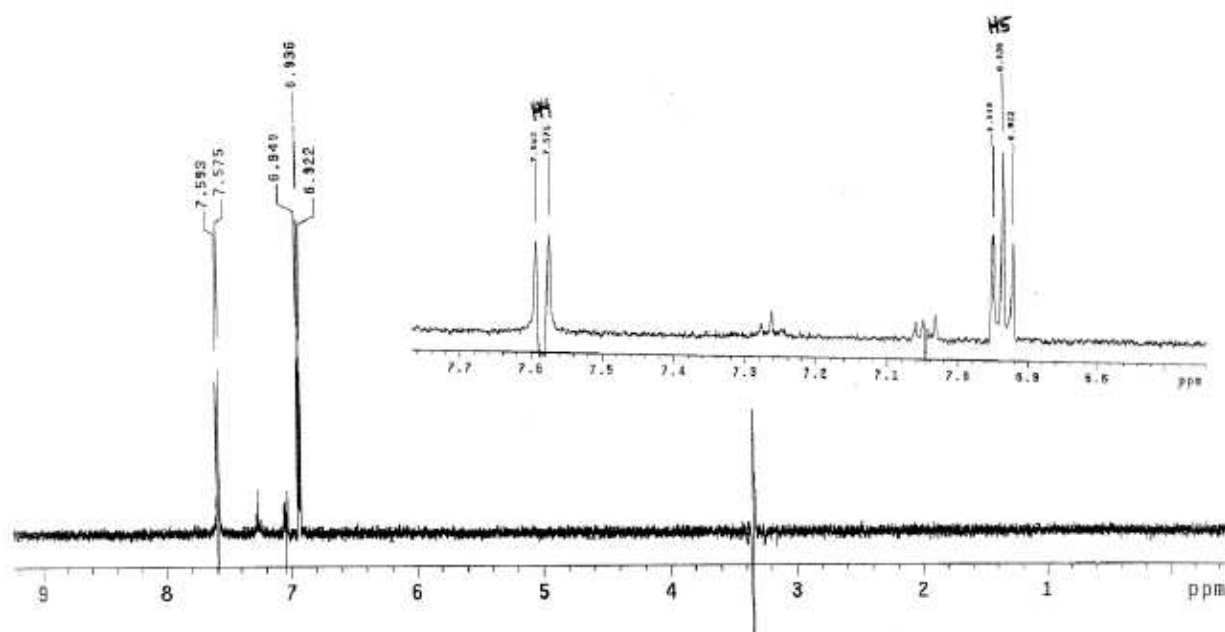
Espectro 2.33. Espectro no IV da indigotina-3-O-β-D-glicopiranosideo (Is8).



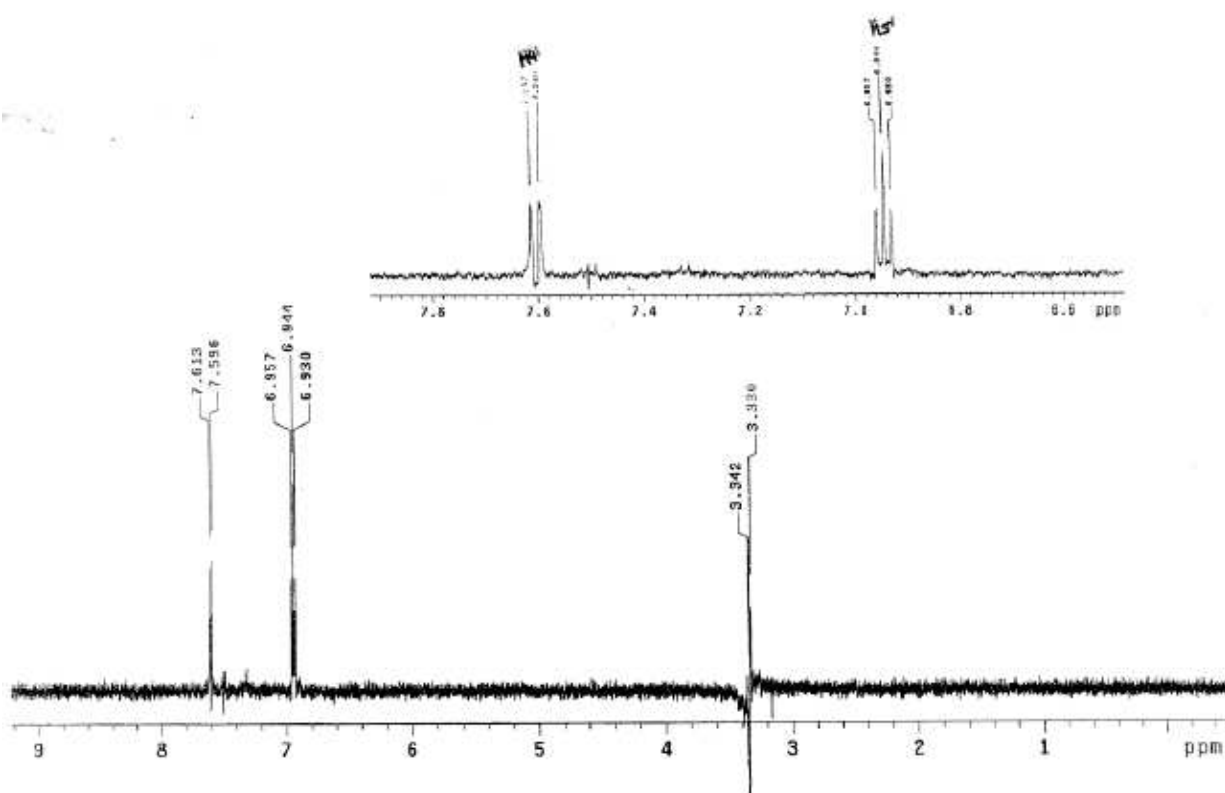
Espectro 2.34. Espectro de massas EM-ES (modo negativo) da indigotina-3-O-β-D-glicopiranosideo (Is8).



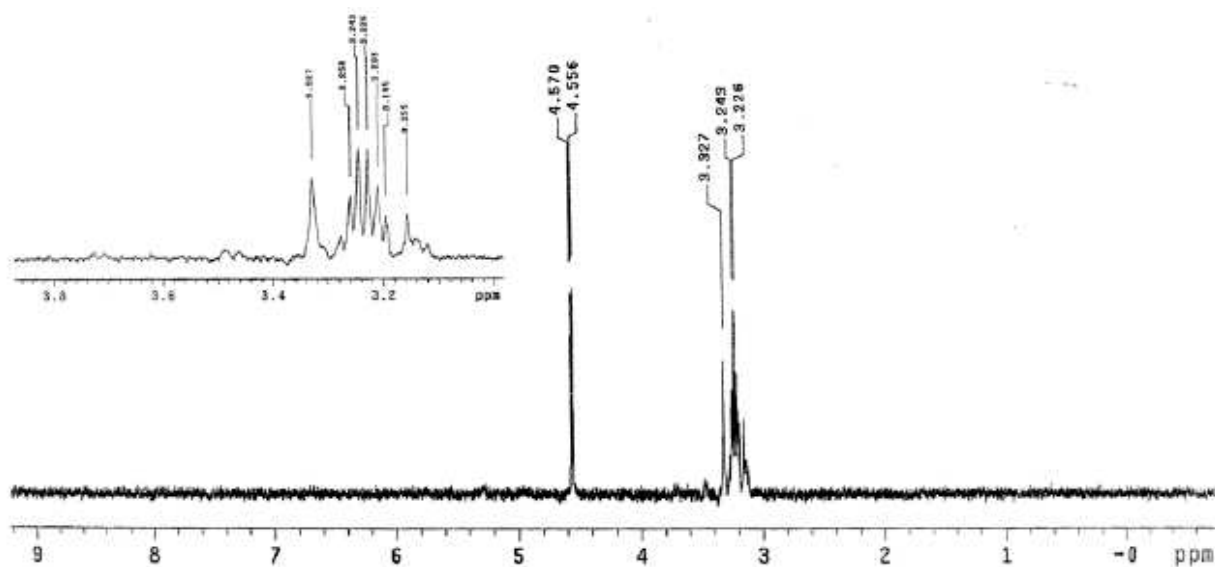
Spectro 2.35. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da indigotina-3-O-β-D-glicopiranosideo (1s8).



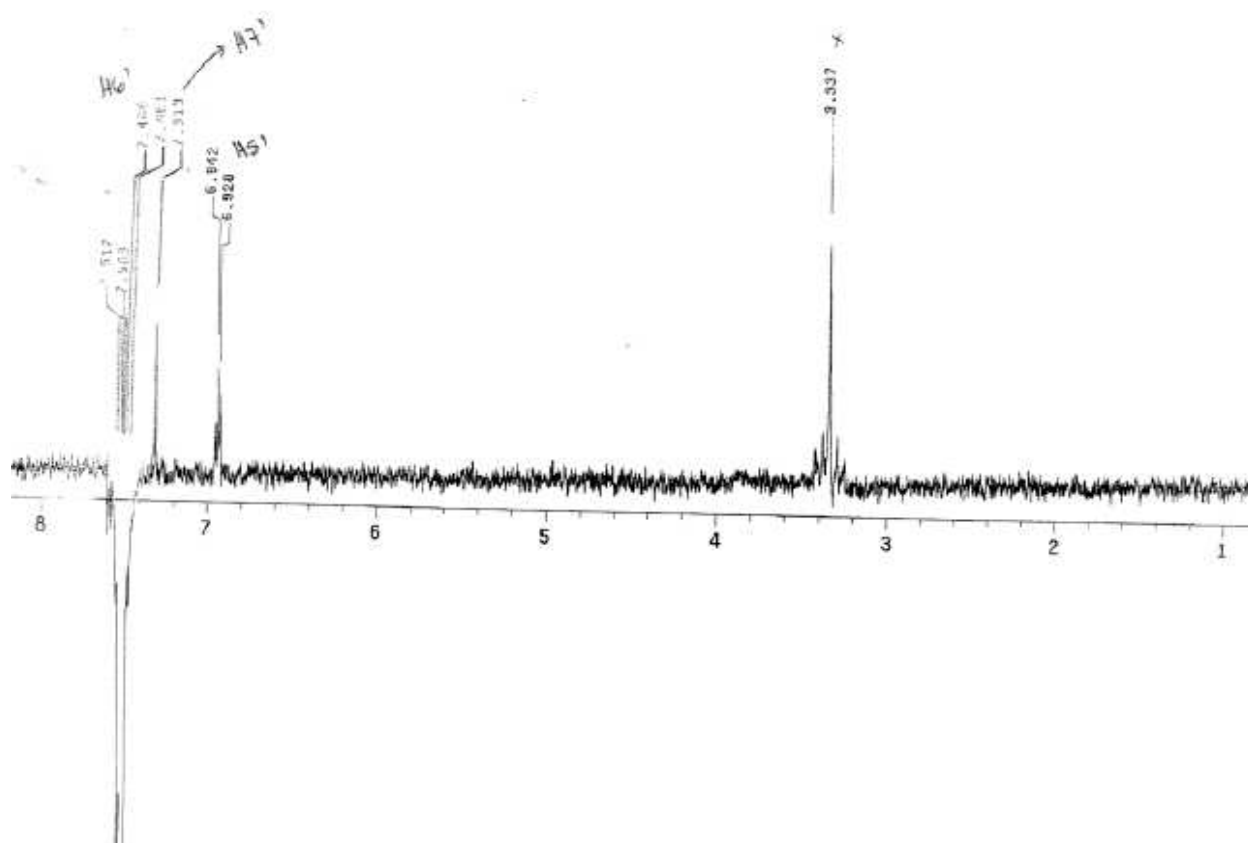
Espectro 2.36. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 6,93, (DMSO- d_6 , 500 MHz) da indigotina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**1s8**).



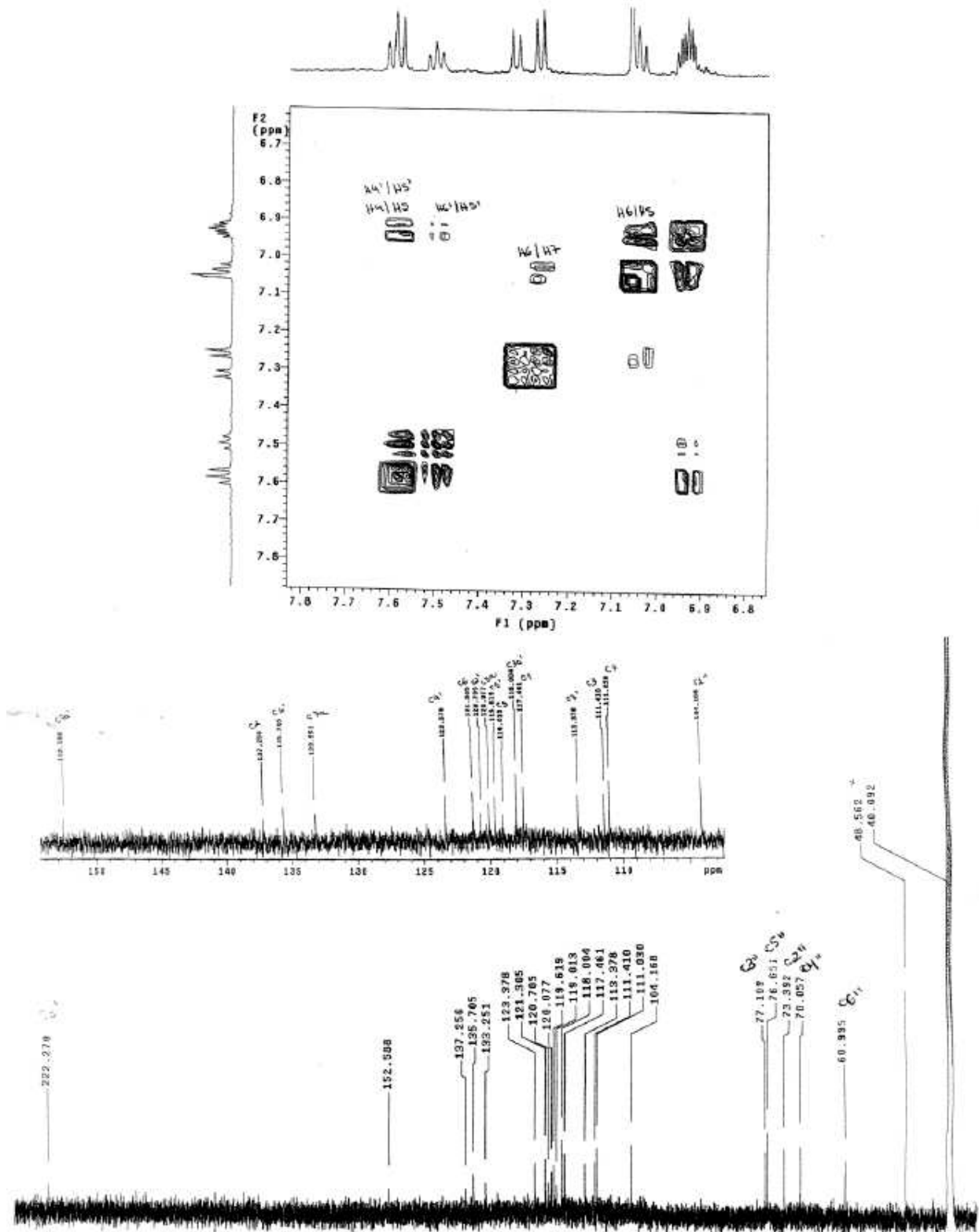
Espectro 2.37. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 6,94, (DMSO- d_6 , 500 MHz) da indigotina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**1s8**).



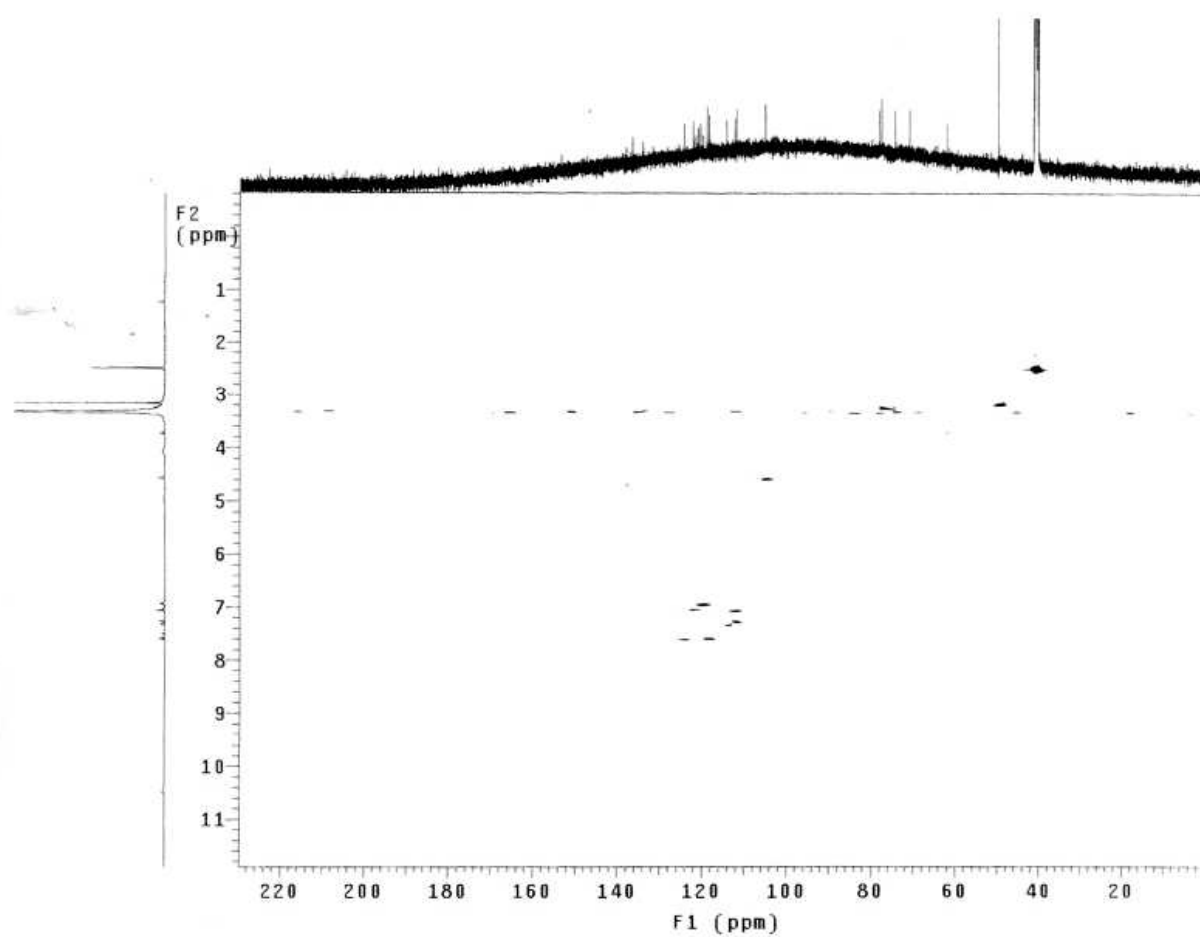
Espectro 2.40. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 4,56, (DMSO- d_6 , 500 MHz) da indigotina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**Is8**).



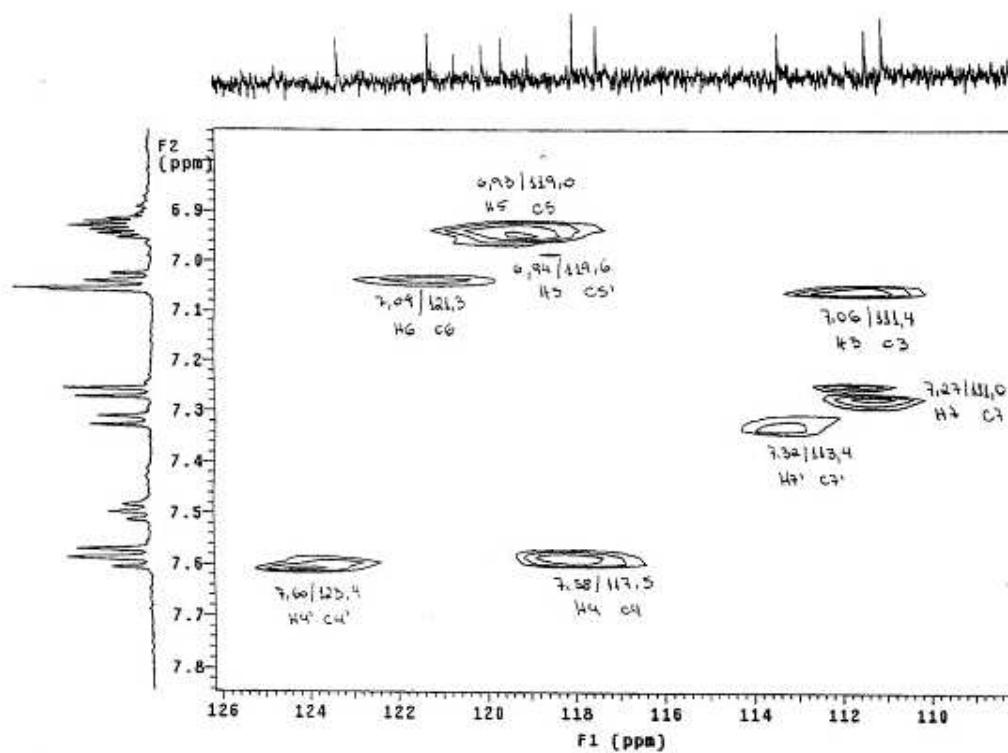
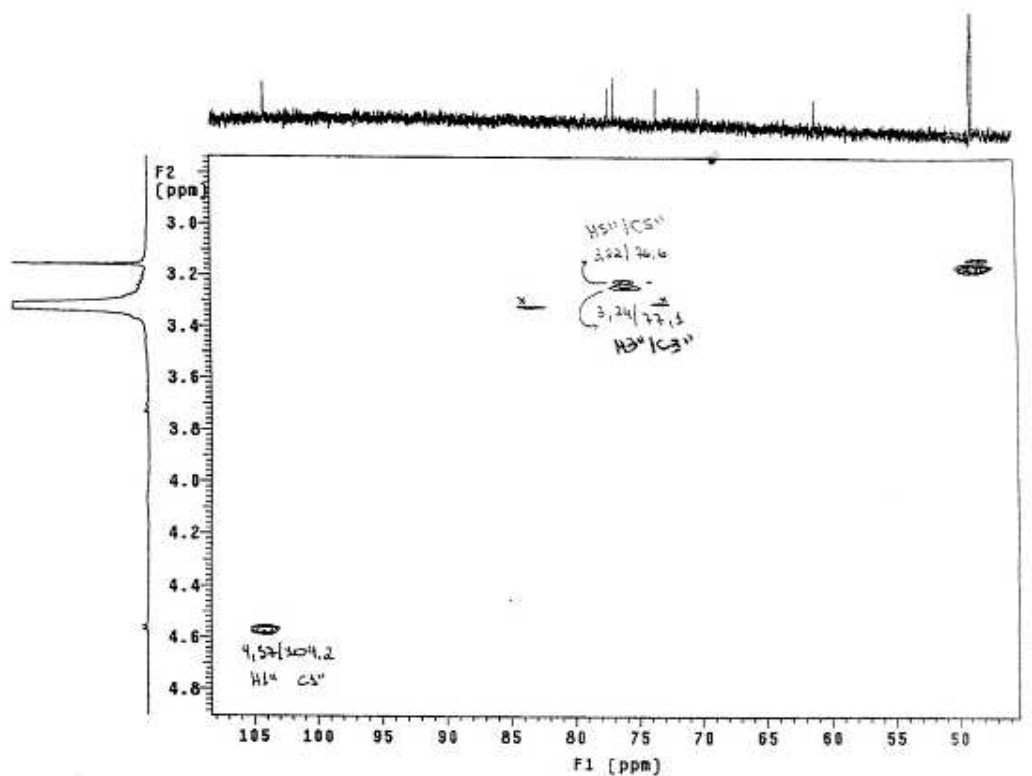
Espectro 2.41. Experimento NOESY-1D, irradiação em δ 7,50, (DMSO- d_6 , 500 MHz) da indigotina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**Is8**).



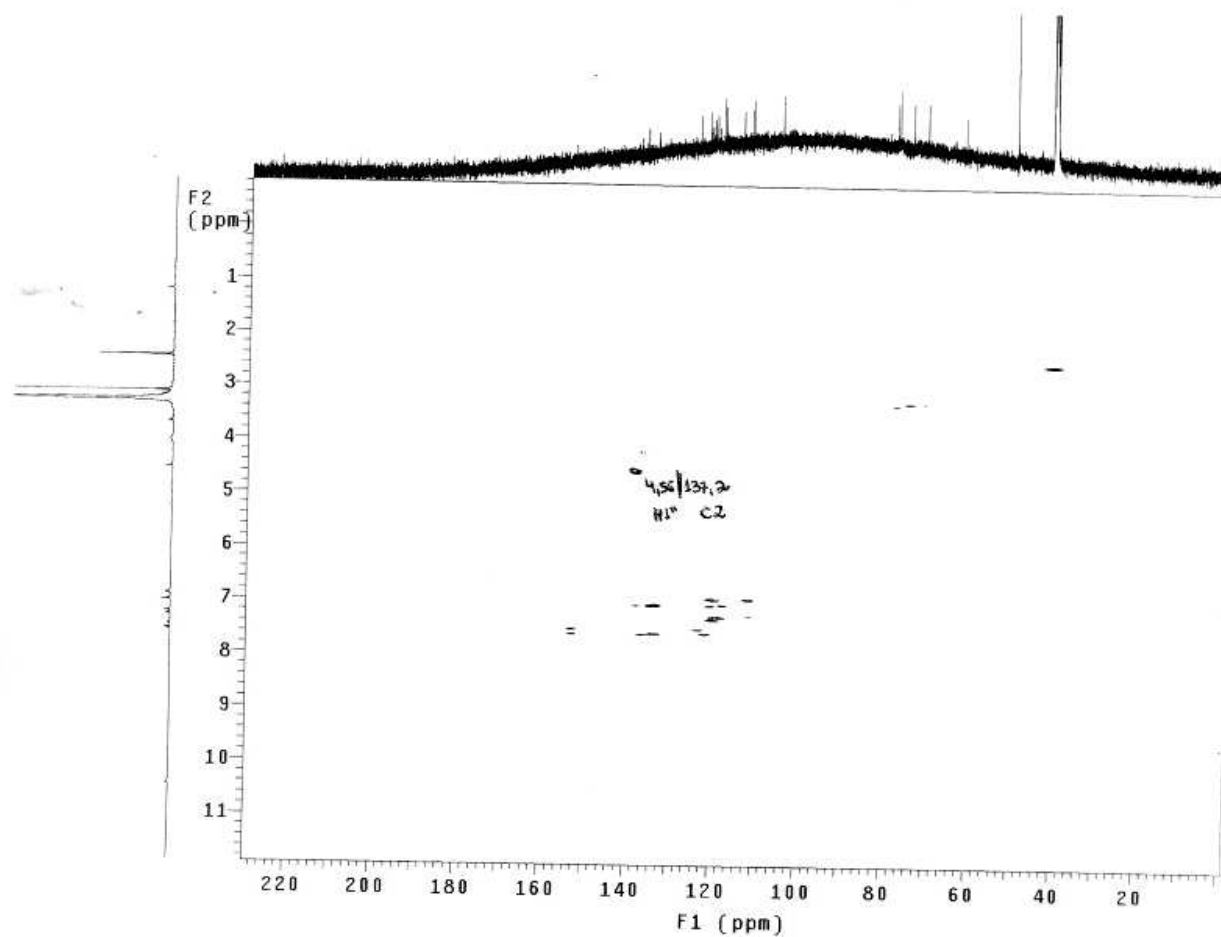
Espectros 2.42 e 2.43. Experimento bidimensional COSY ¹H-¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) e espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆, 125 MHz) da indigotina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (I8).



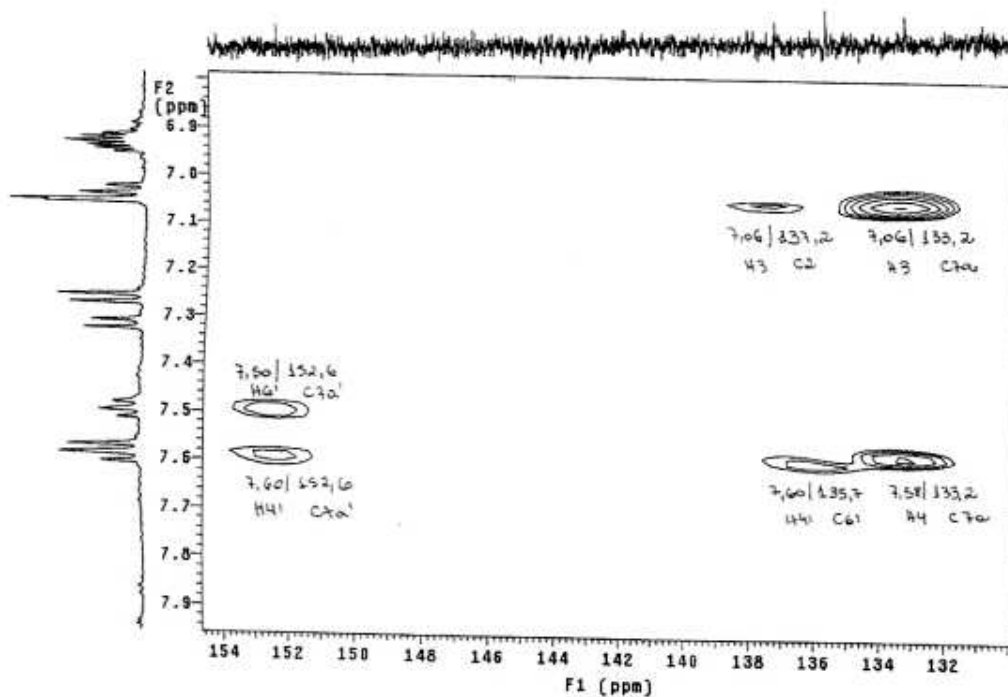
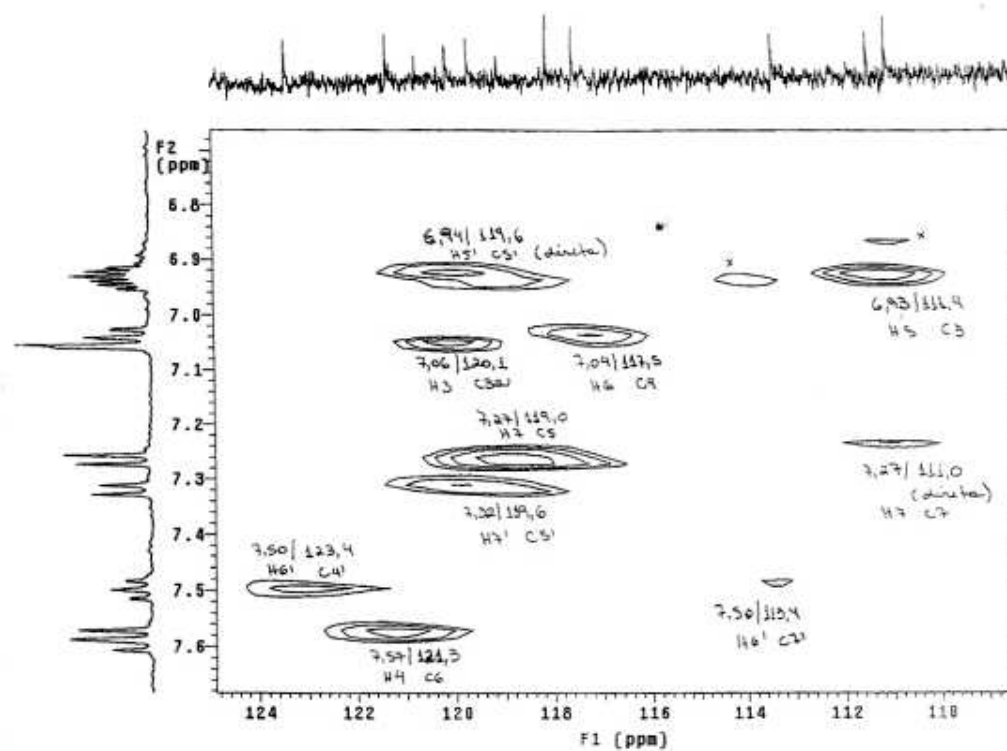
Espectro 2.44. Experimento bidimensional gHMQC (DMSO- d_6 , 125 MHz) da indigotina-3- O - β -D-glicopiranosídeo (Is8).



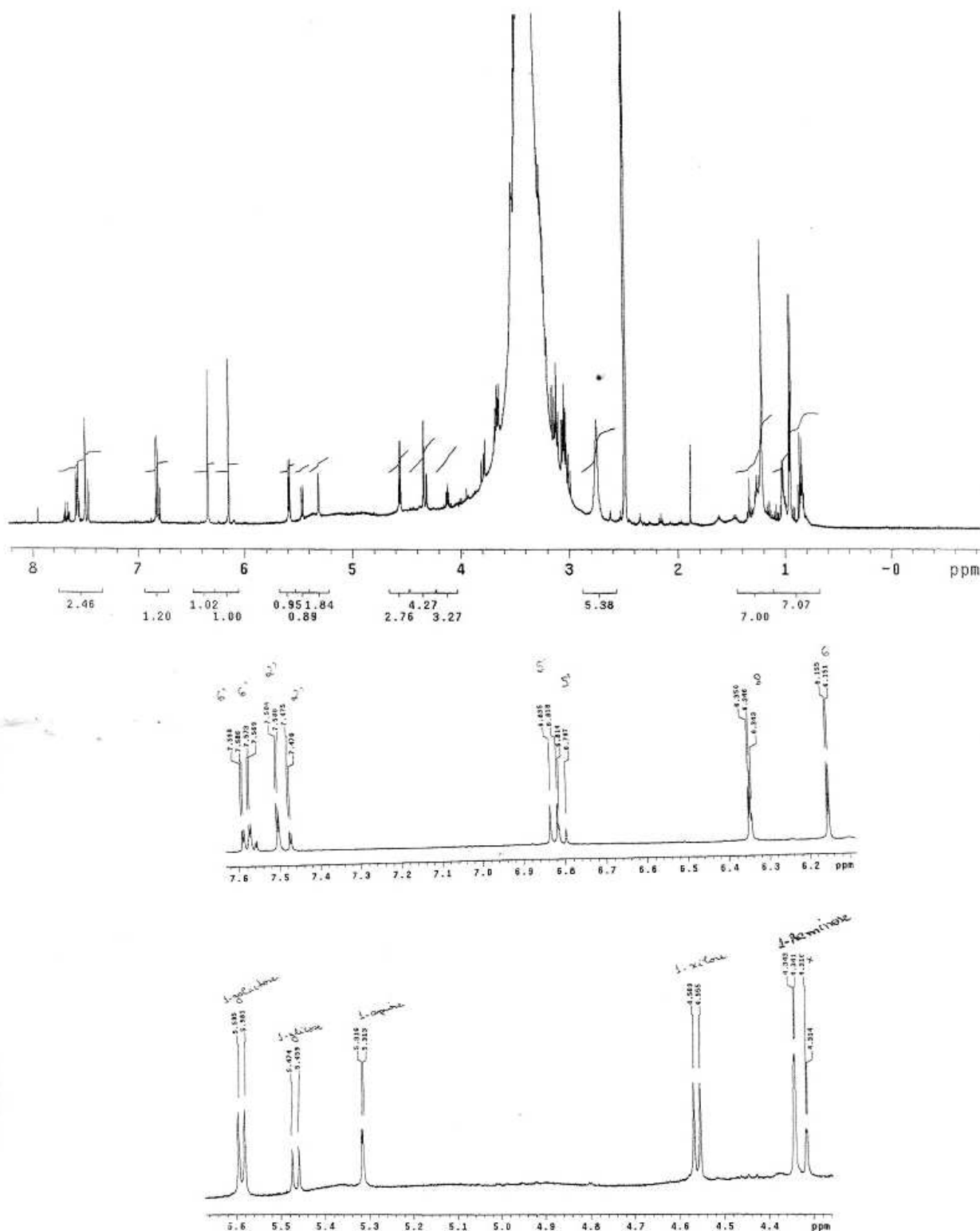
Espectro 2.45. Ampliações do experimento bidimensional gHMQC (DMSO- d_6 , 125 MHz) da indigotina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (Is8).



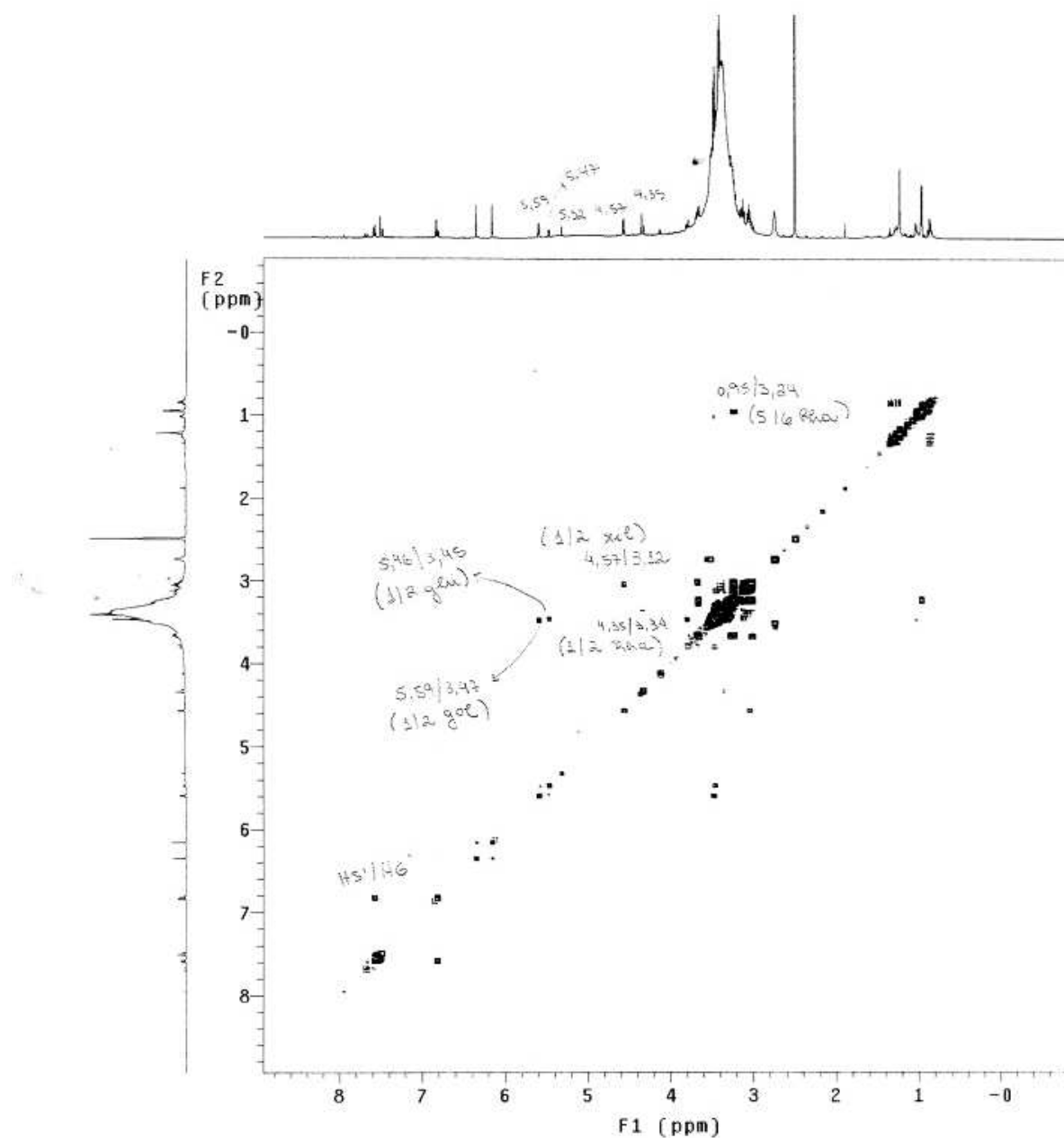
Espectro 2.46. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 125 MHz) da indigotina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (1s8).



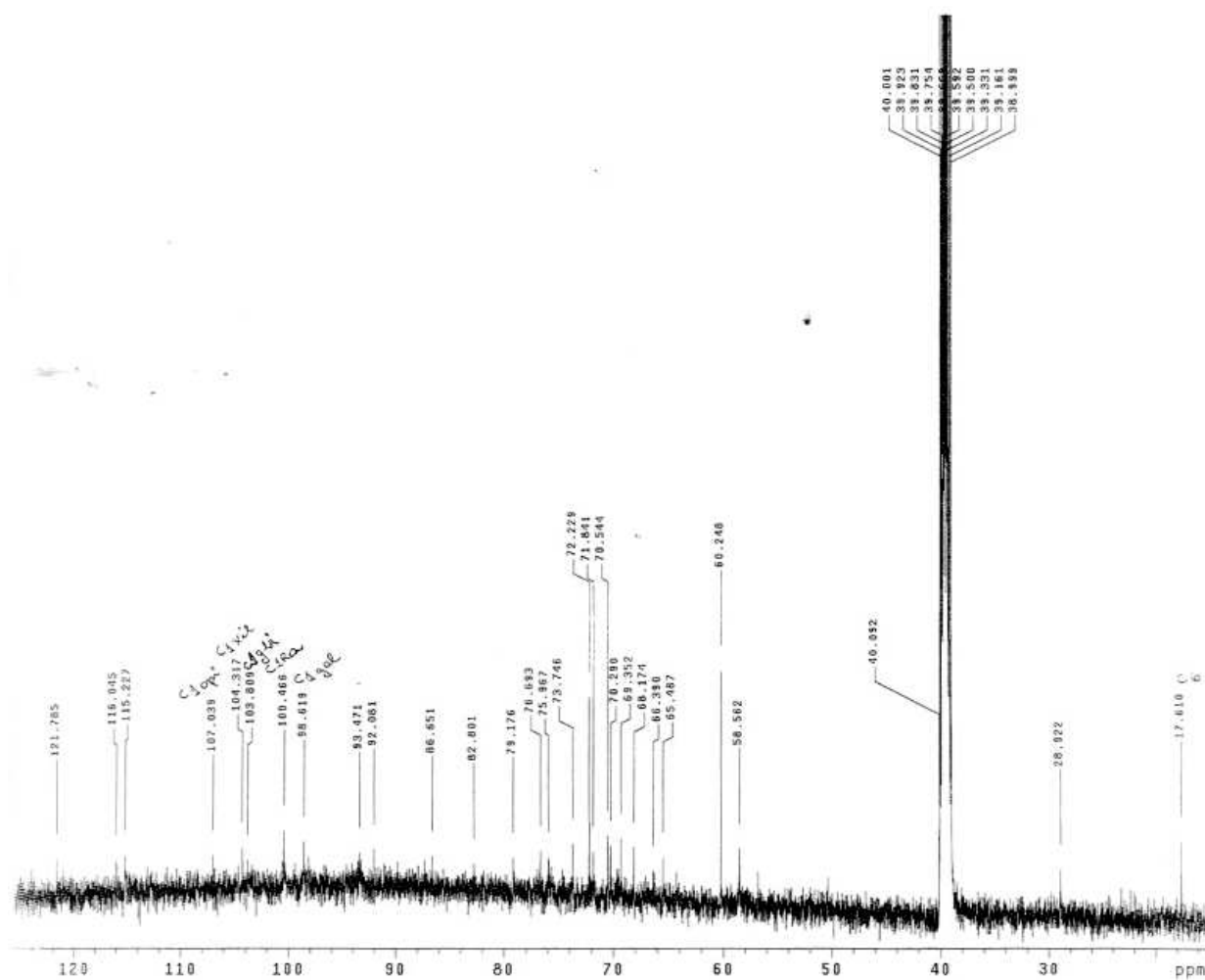
Espectro 2.47. Ampliações do experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 125 MHz) da indigotina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (**1s8**).



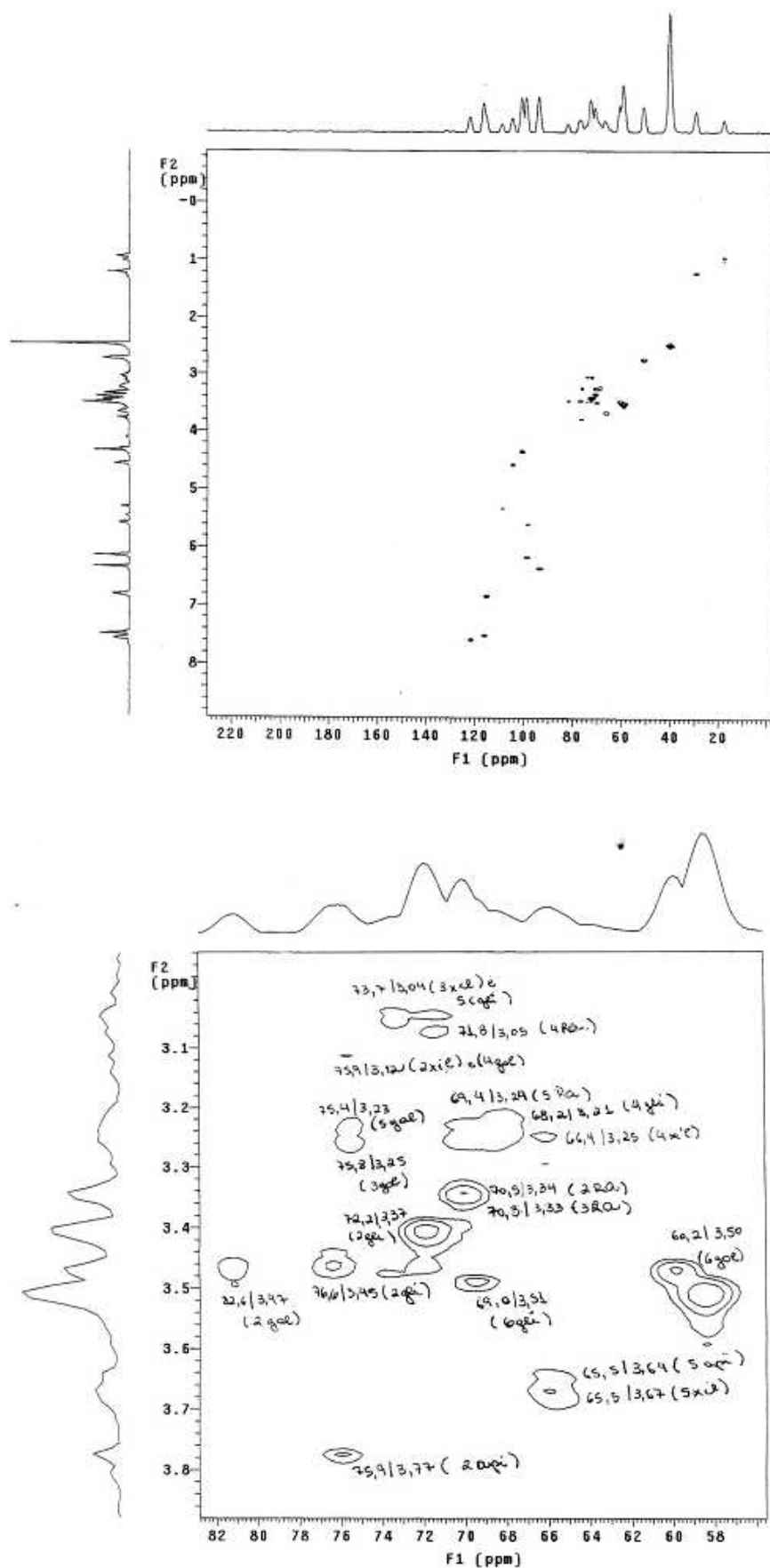
Espectro 2.48. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da quercetina 3-O-β-D-galactopiranosil-(2→1)-β-D-xilopiranosídeo (**Is11**) e da quercetina 3-O-β-D-glicopiranosil-[(4→1)-α-L-raminopiranosil]-(6→1)-α-L-apiofuranosídeo (**Is12**).



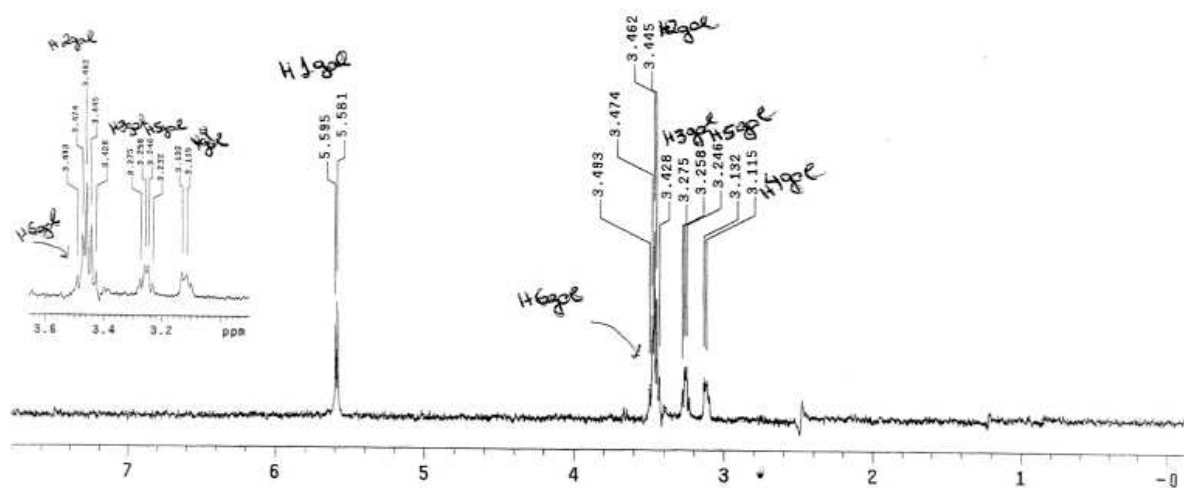
Espectros 2.49. Experimento bidimensional COSY ^1H - ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo (**Is11**) e da quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (**Is12**).



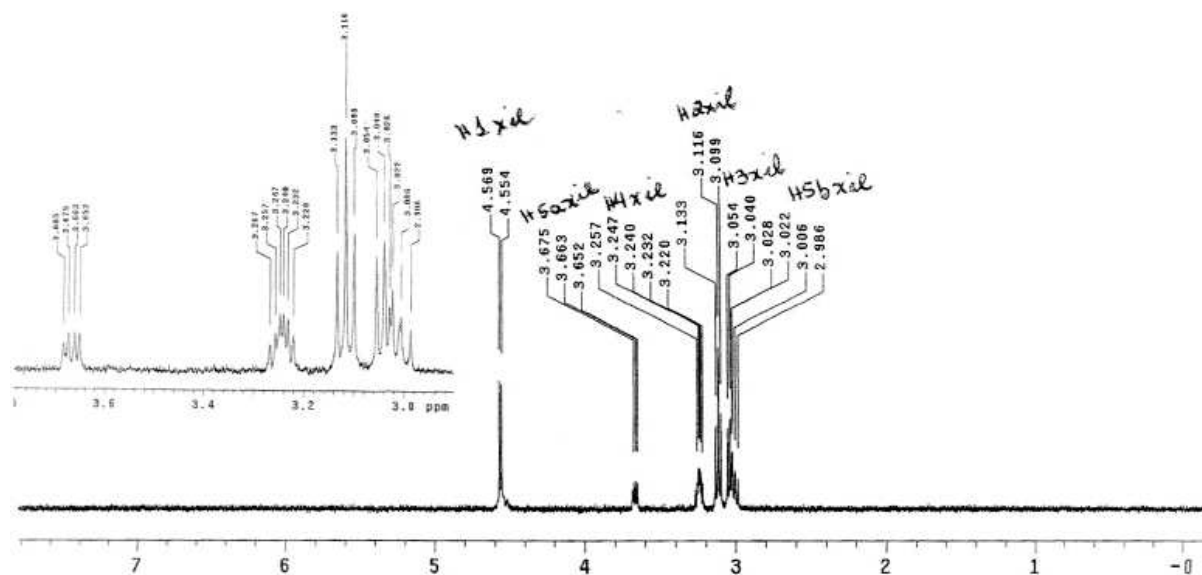
Espectro 2.50. Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) da quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo (**Is11**) e da quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (**Is12**).



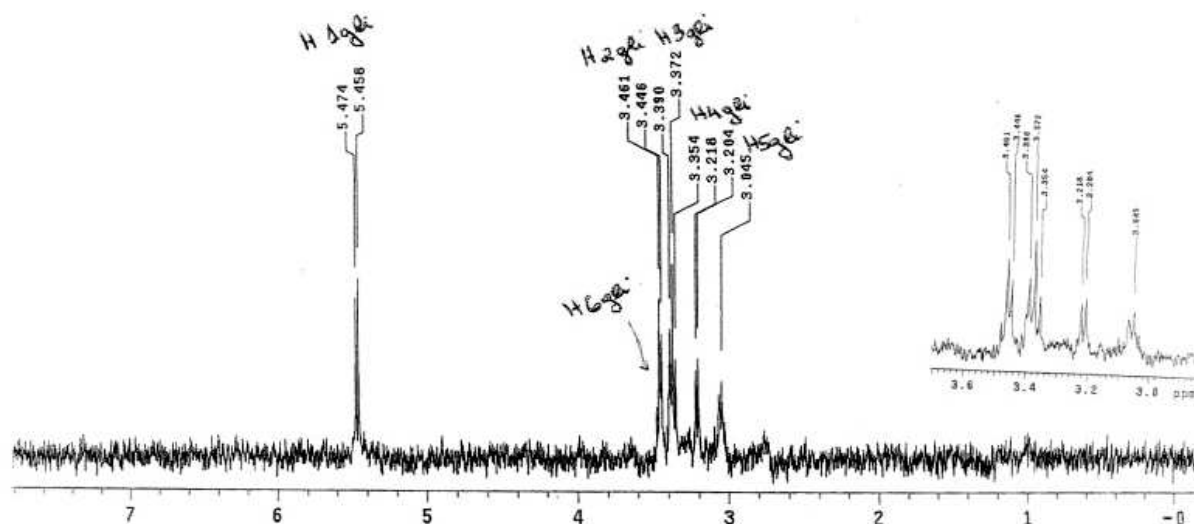
Espectro 2.51. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 125 MHz) da quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo (Is11) e da quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (Is12).



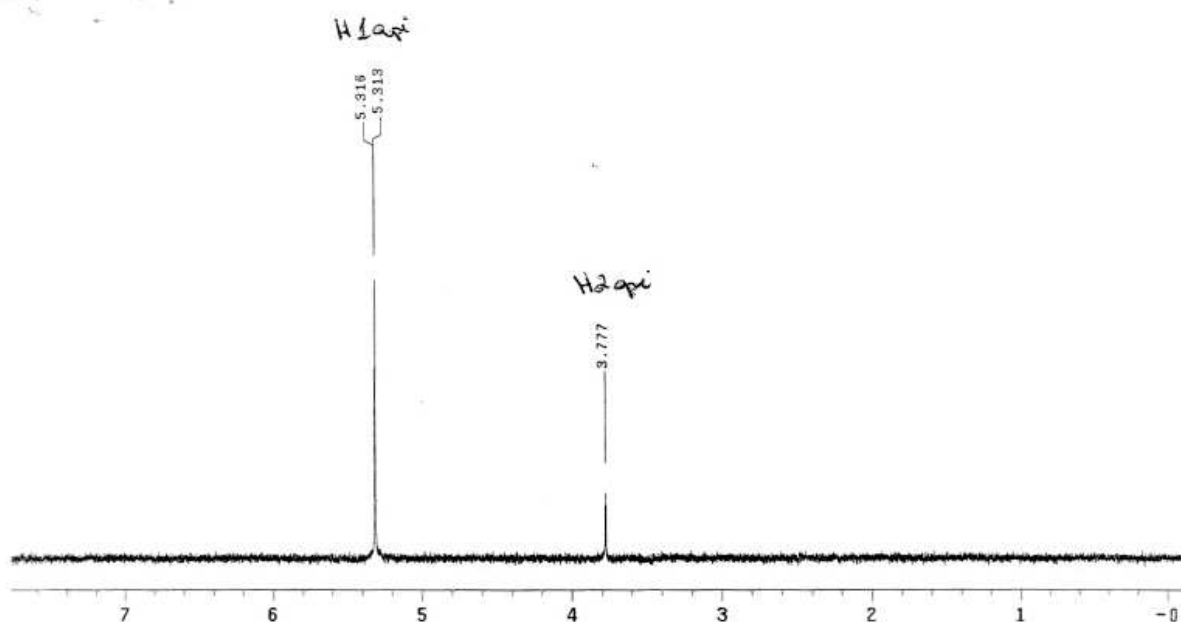
Espectro 2.52. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,59 (DMSO- d_6 , 500 MHz) da quercetina 3-O- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo (Is11)



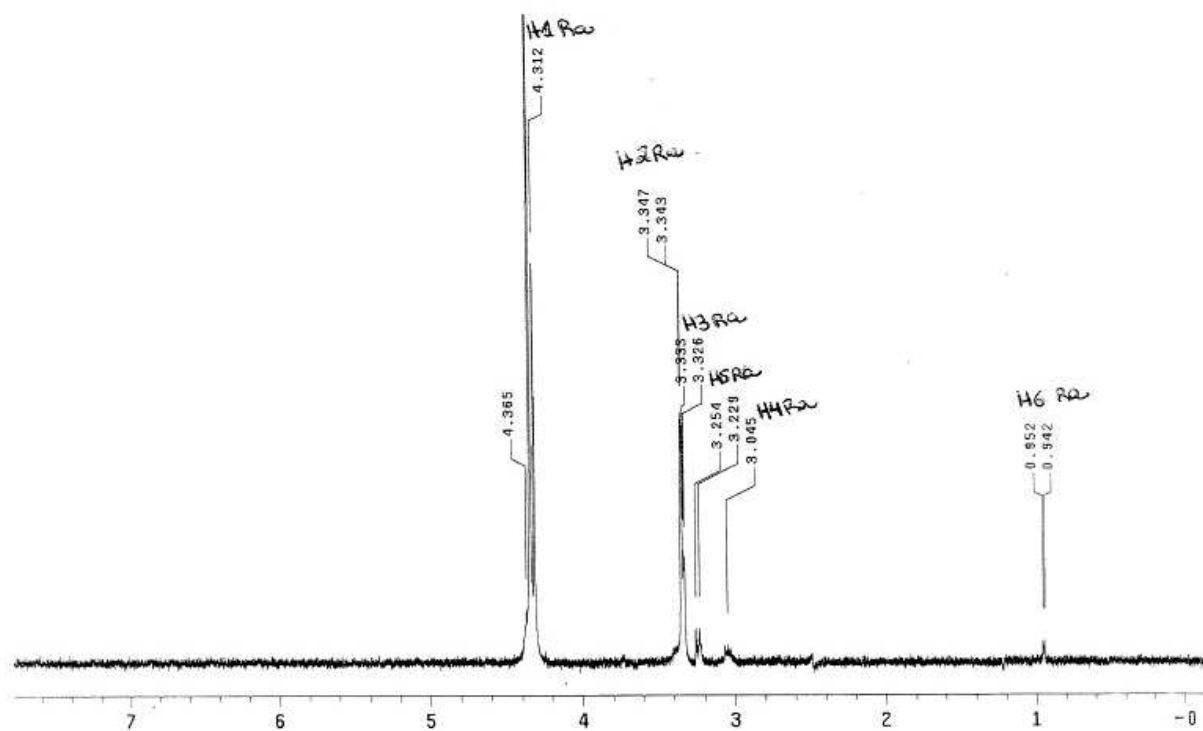
Espectro 2.53. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 4,57 (DMSO- d_6 , 500 MHz) da quercetina 3-O- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo (Is11)



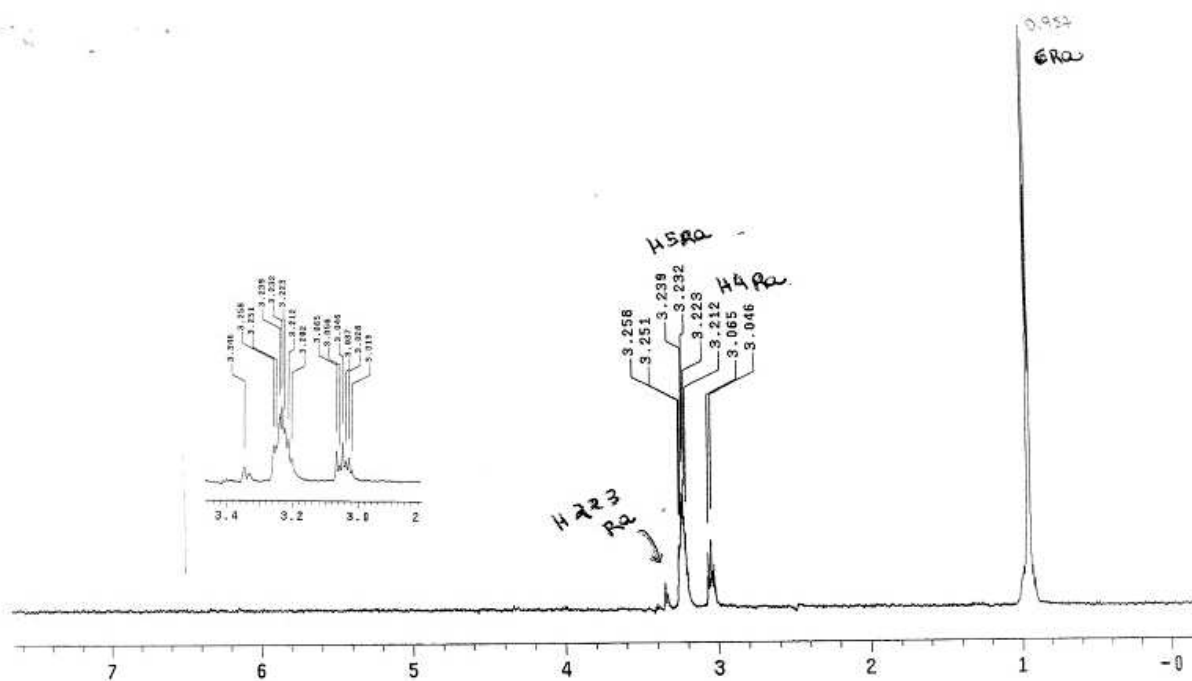
Espectro 2.54. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,46 (DMSO- d_6 , 500 MHz) da quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (**1s12**).



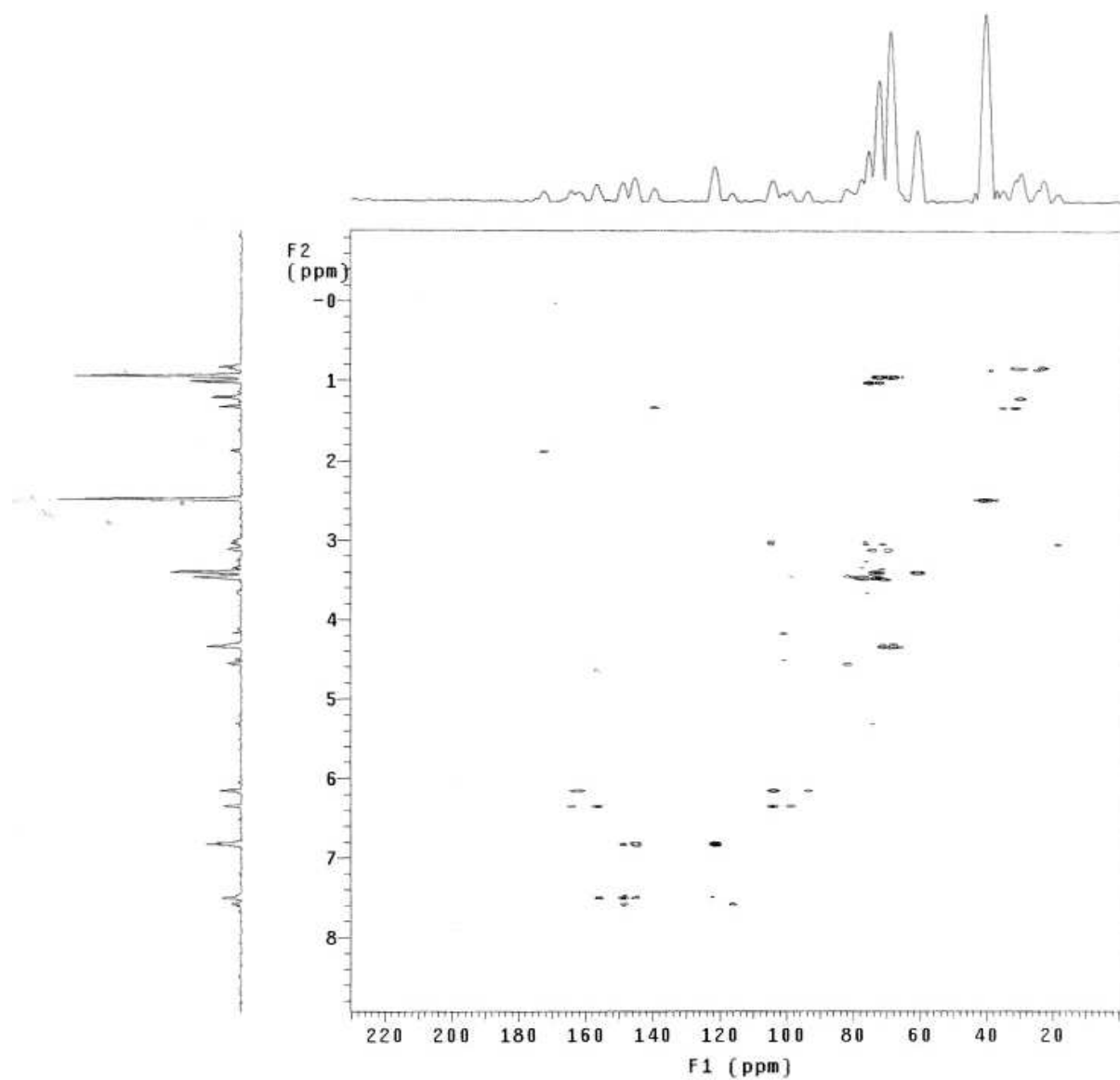
Espectro 2.55. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 5,32 (DMSO- d_6 , 500 MHz) da quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (**1s12**).



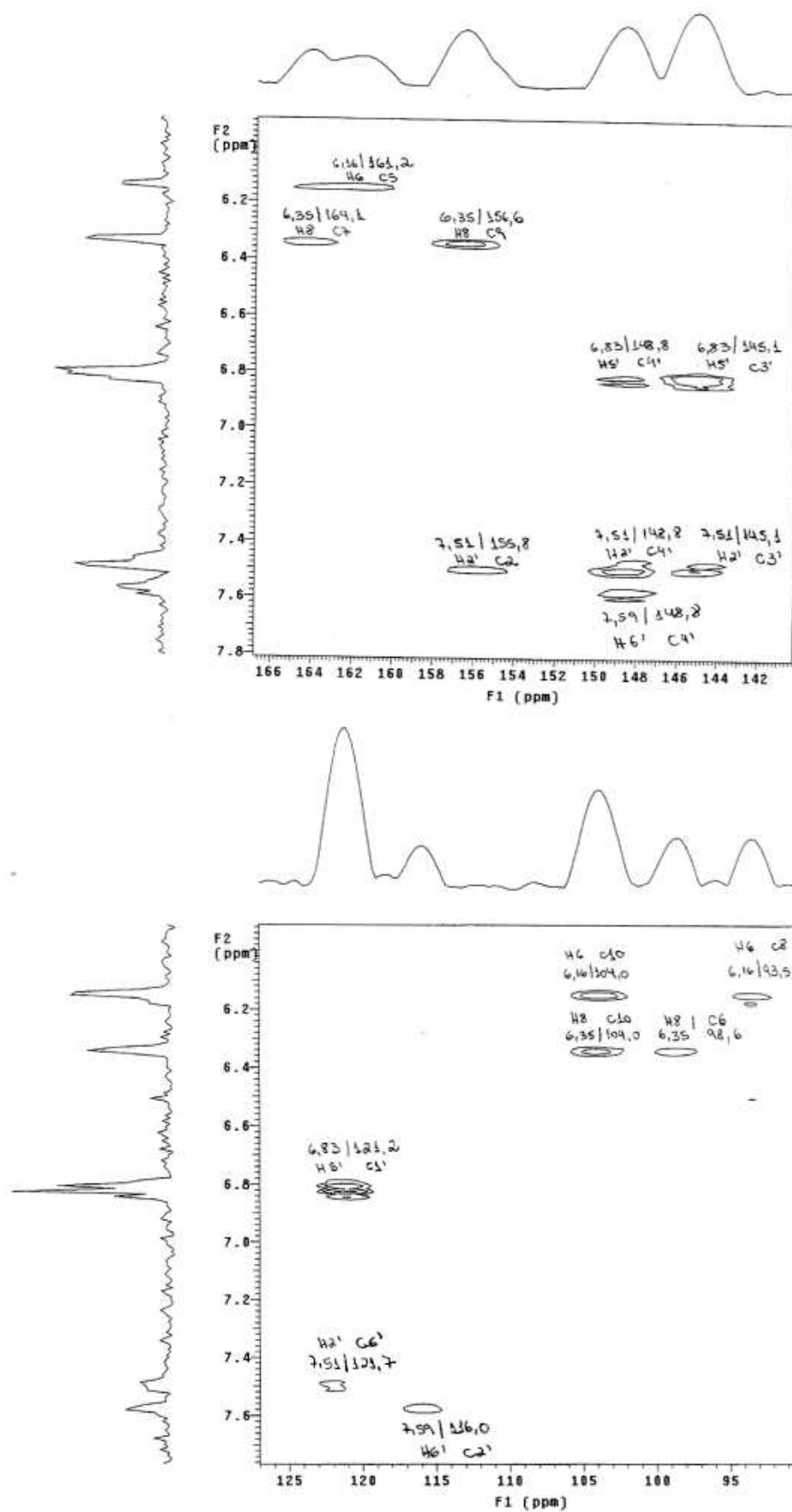
Espectro 2.56. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 4,35 (DMSO- d_6 , 500 MHz) da quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (Is12).



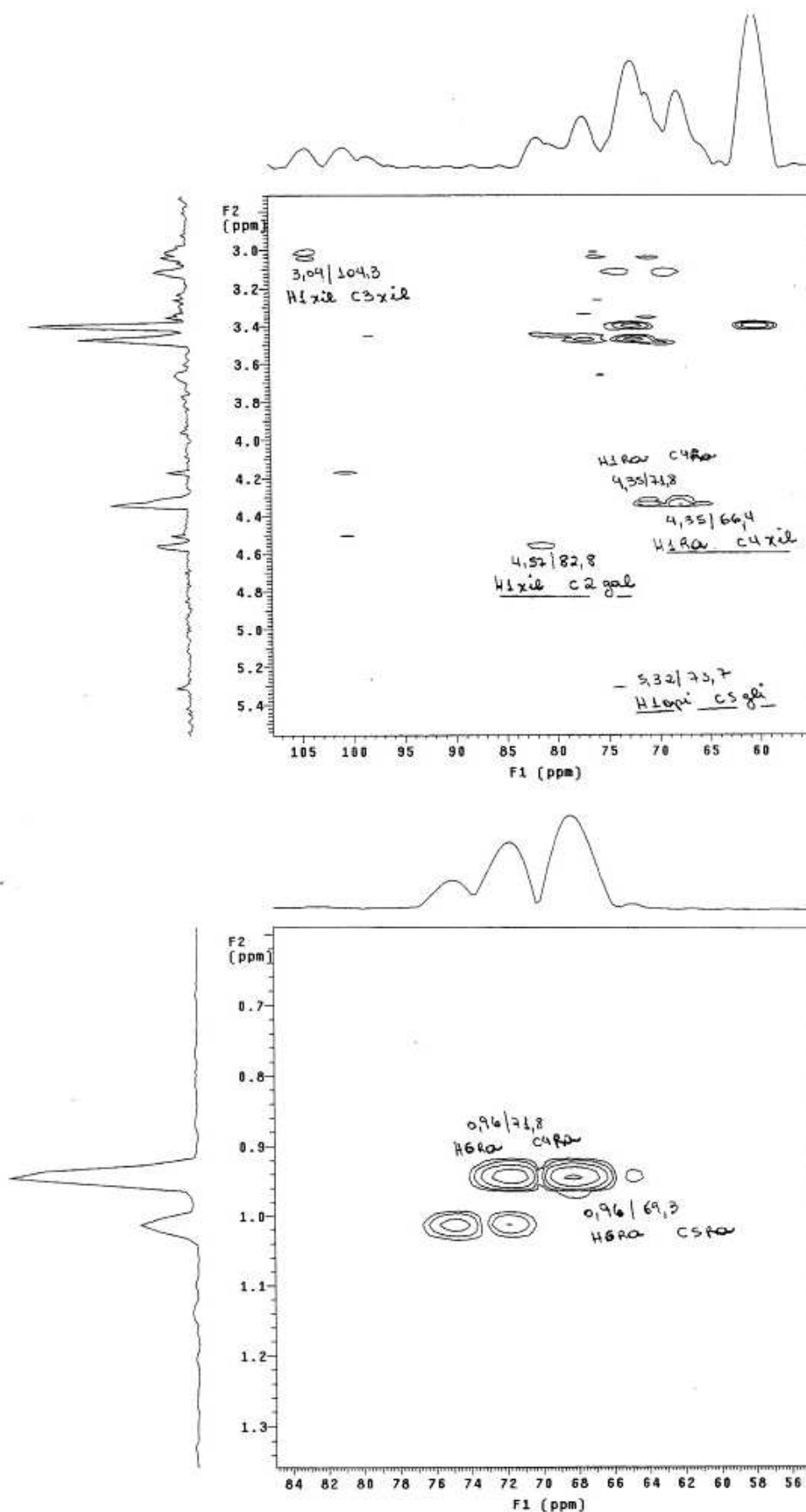
Espectro 2.57. Experimento TOCSY-1D, irradiação em δ 0,95 (DMSO- d_6 , 500 MHz) da quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (Is12).



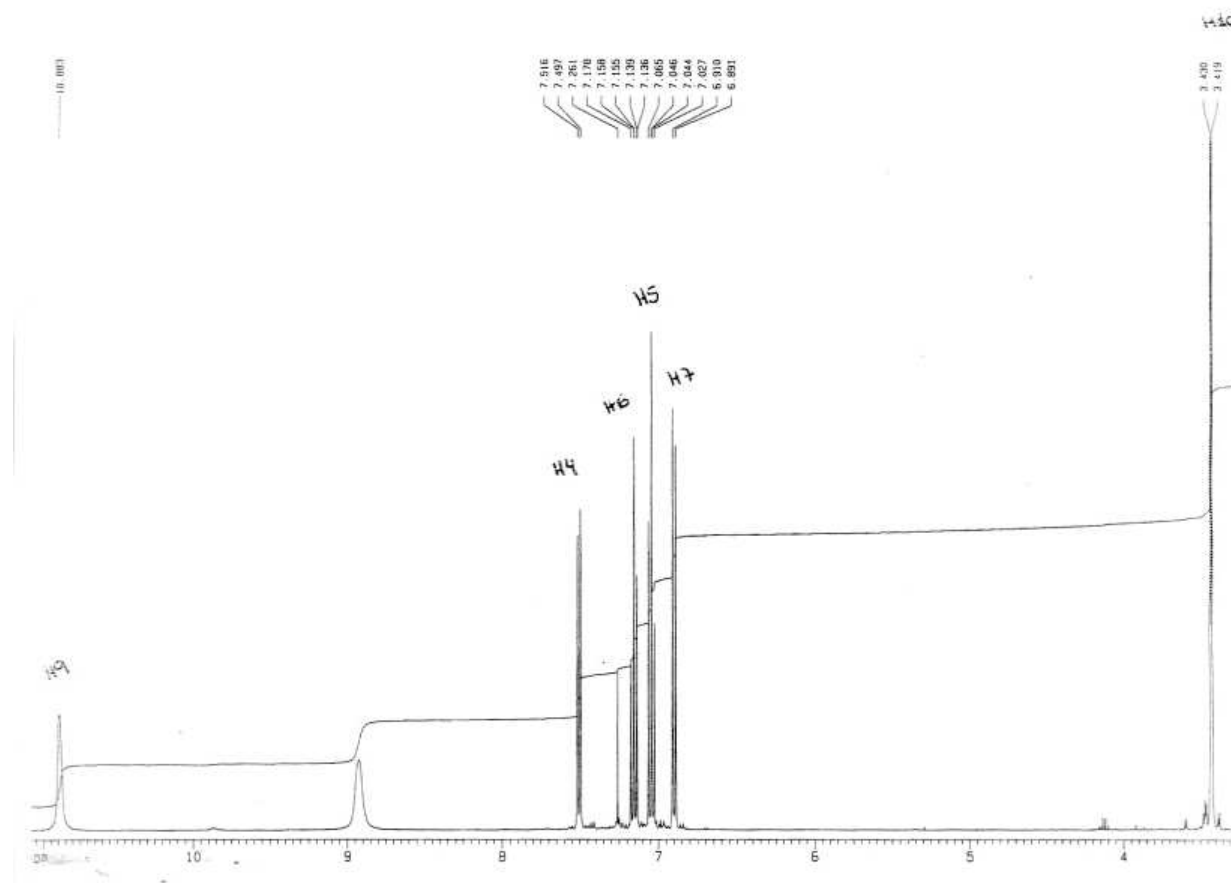
Espectros 2.58. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO-d₆, 125 MHz) da quercetina 3-*O*-β-D-galactopiranosil-(2→1)-β-D-xilopiranosídeo (**Is11**) e da quercetina 3-*O*-β-D-glicopiranosil-[(4→1)-α-L-raminopiranosil]-(6→1)-α-L-apiofuranosídeo (**Is12**).



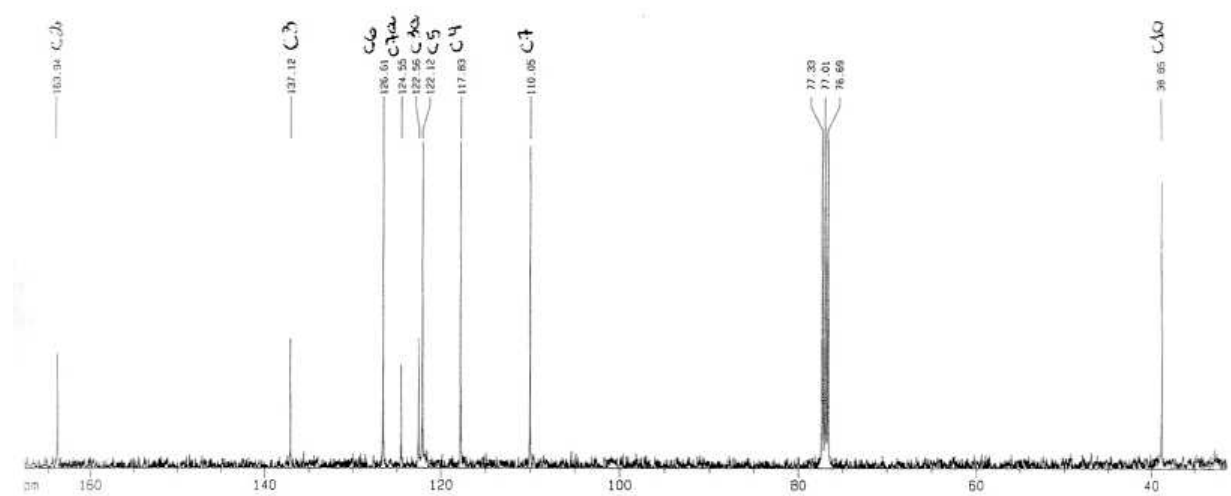
Espectros 2.59. Ampliações do experimento bidimensional gHMBC (DMSO-d₆, 125 MHz) da quercetina 3-O-β-D-galactopiranosil-(2→1)-β-D-xilopiranosídeo (**11**) e da quercetina 3-O-β-D-glicopiranosil-[(4→1)-α-L-raminopiranosil]-(6→1)-α-L-apiofuranosídeo (**12**).



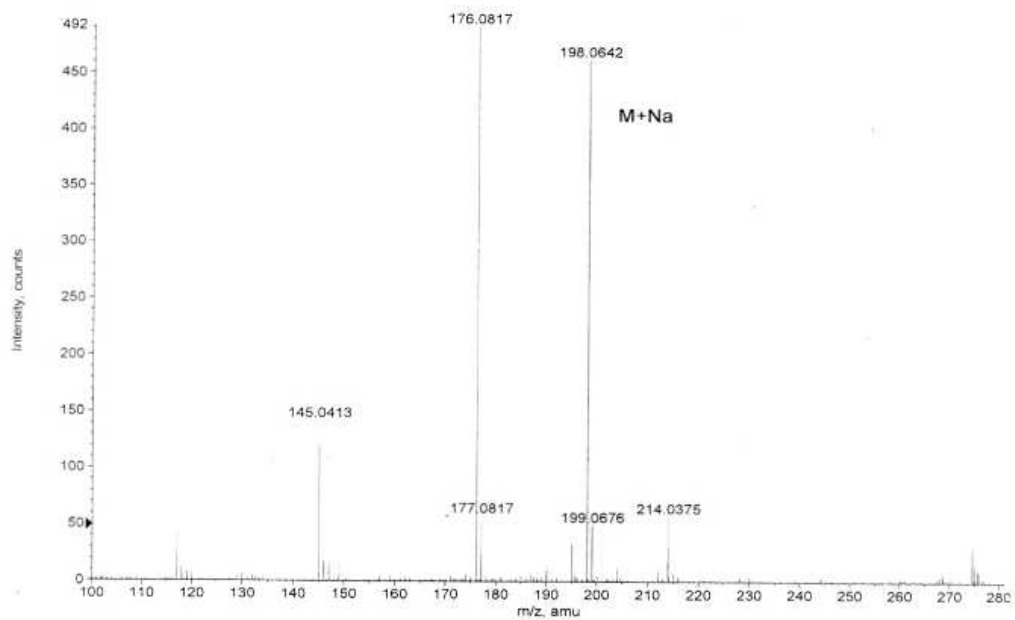
Espectros 2.60. Ampliações do experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 125 MHz) da quercetina 3-*O*- β -D-galactopiranosil-(2 \rightarrow 1)- β -D-xilopiranosídeo (**Is11**) e da quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4 \rightarrow 1)- α -L-raminopiranosil]-(6 \rightarrow 1)- α -L-apiofuranosídeo (**Is12**).



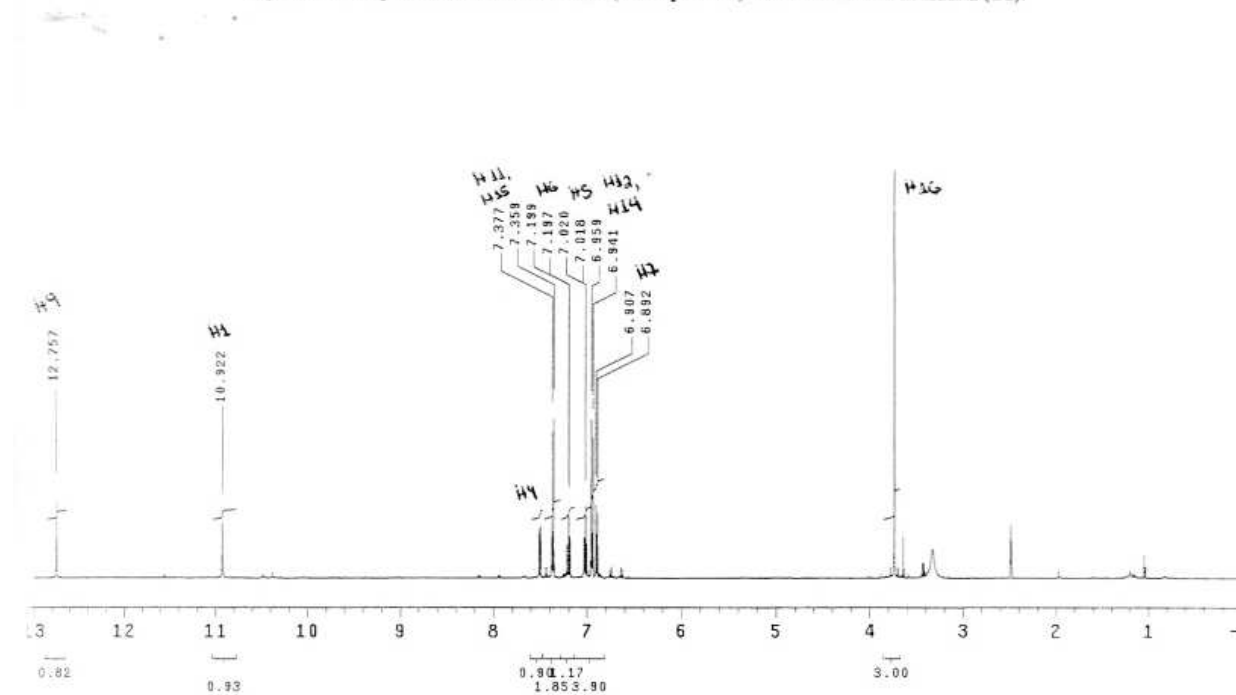
Espectro 4.1. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da metilidrazona de isatina (T1).



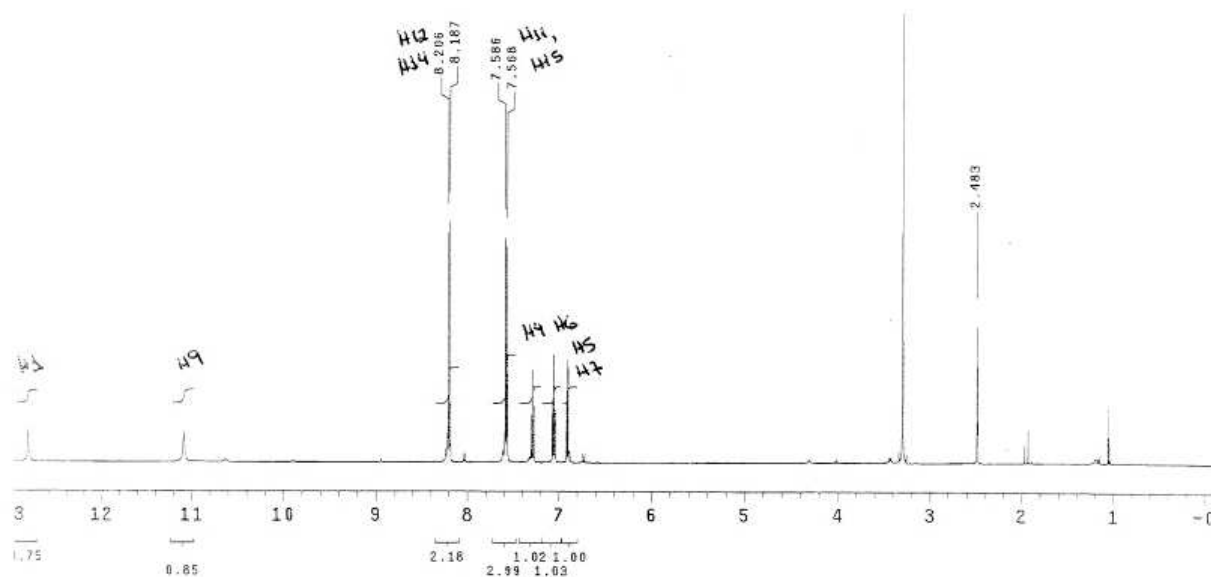
Espectro 4.2. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) da metilidrazona de isatina (T1).



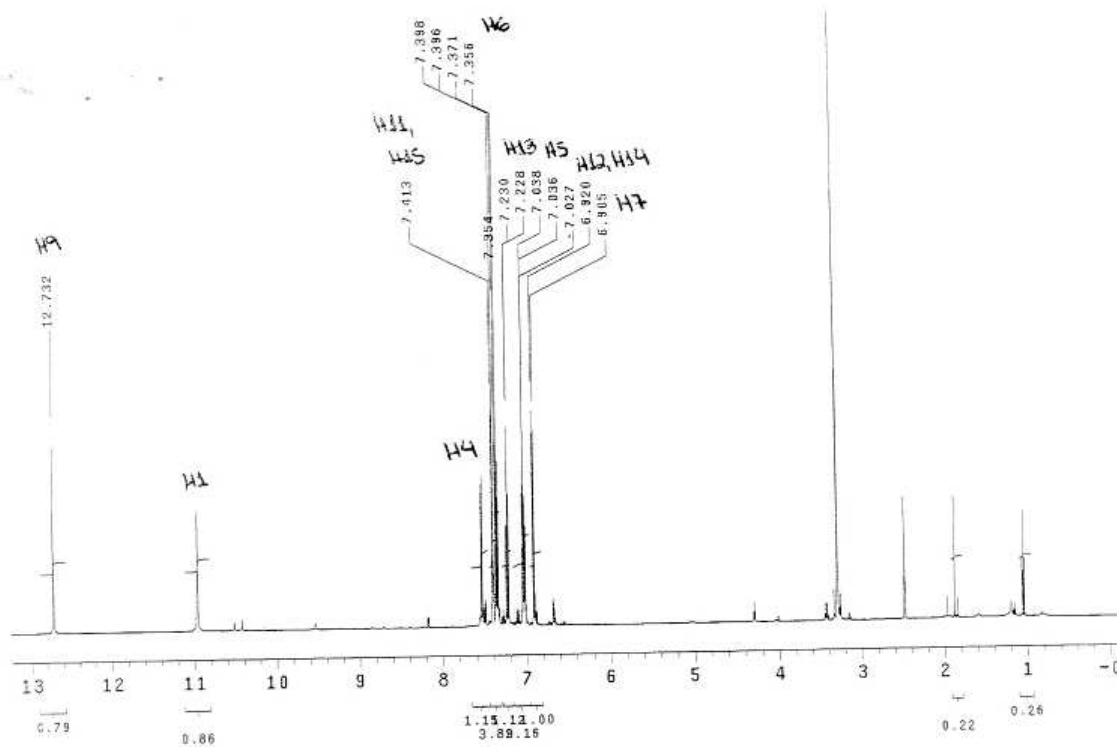
Espectro 4.3 Espectro de massas TOF-MS (modo positivo) da metilidrazona de isatina (T1).



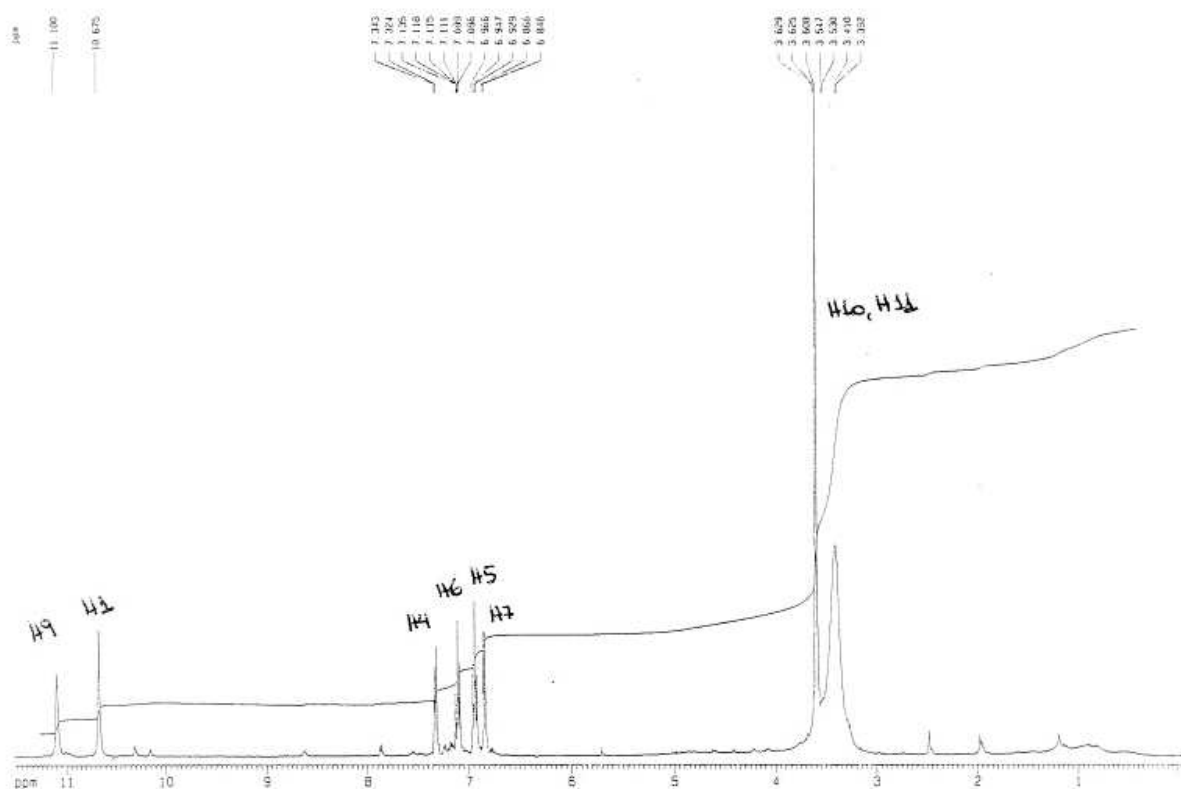
Espectro 4.4. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da p-metoxifenilidrazona de isatina (T2).



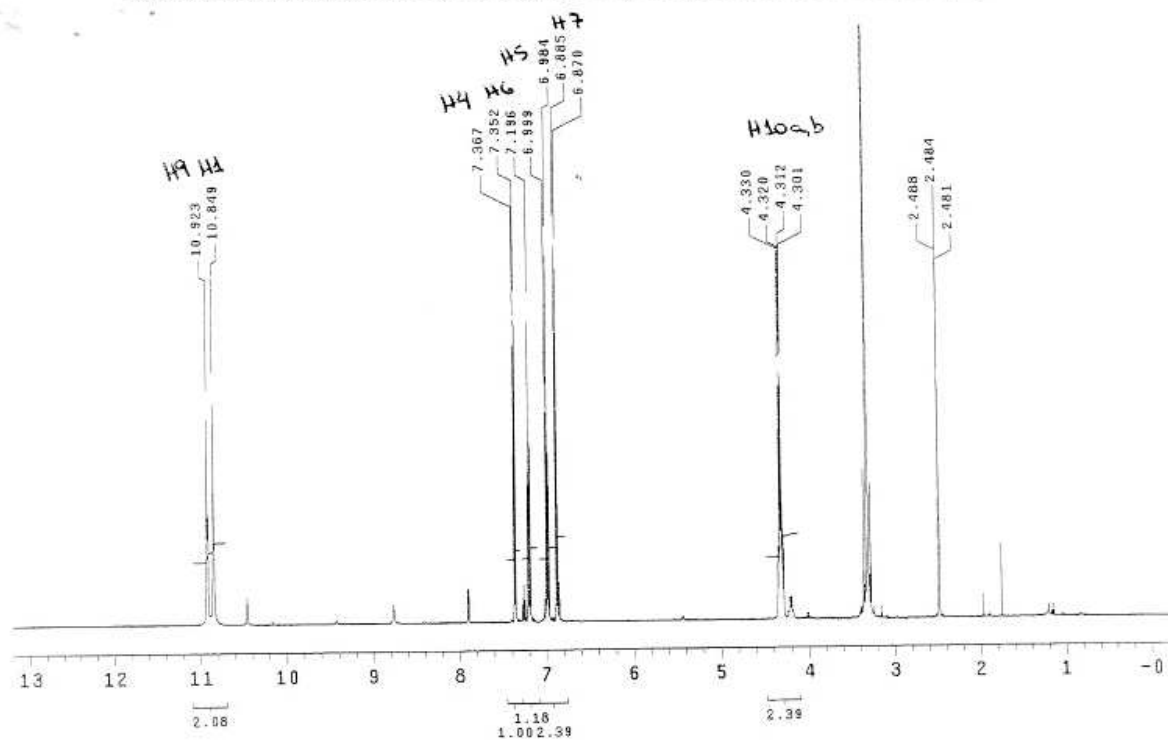
Espectro 4.5. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da *p*-nitrofenilidrazona de isatina (T3).



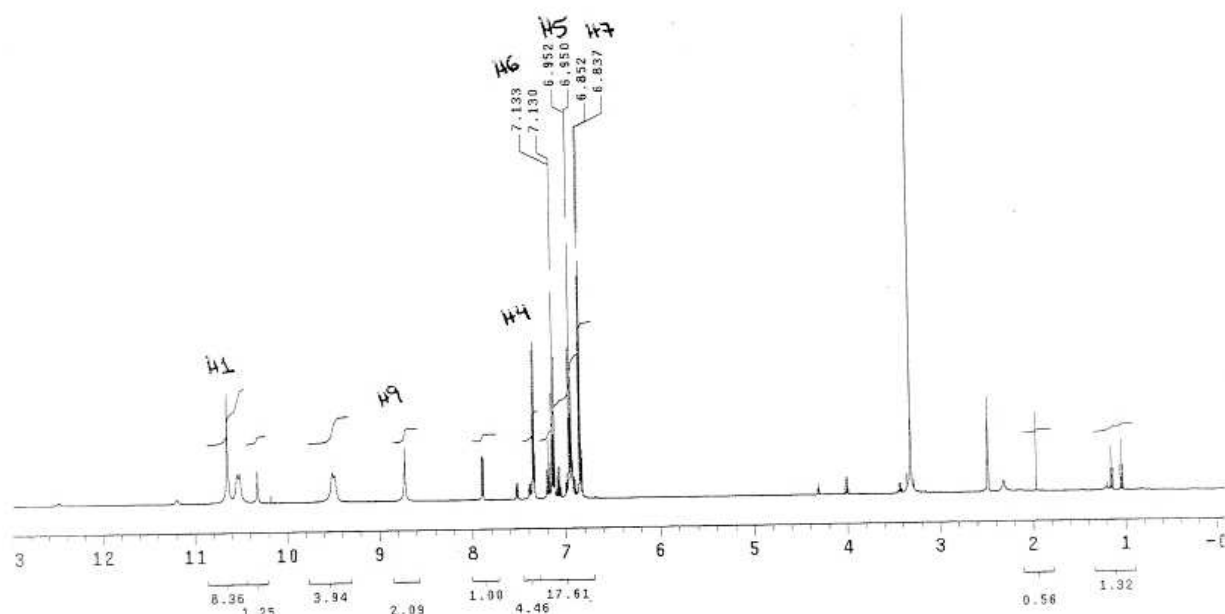
Espectro 4.6. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) da fenilidrazona de isatina (T4).



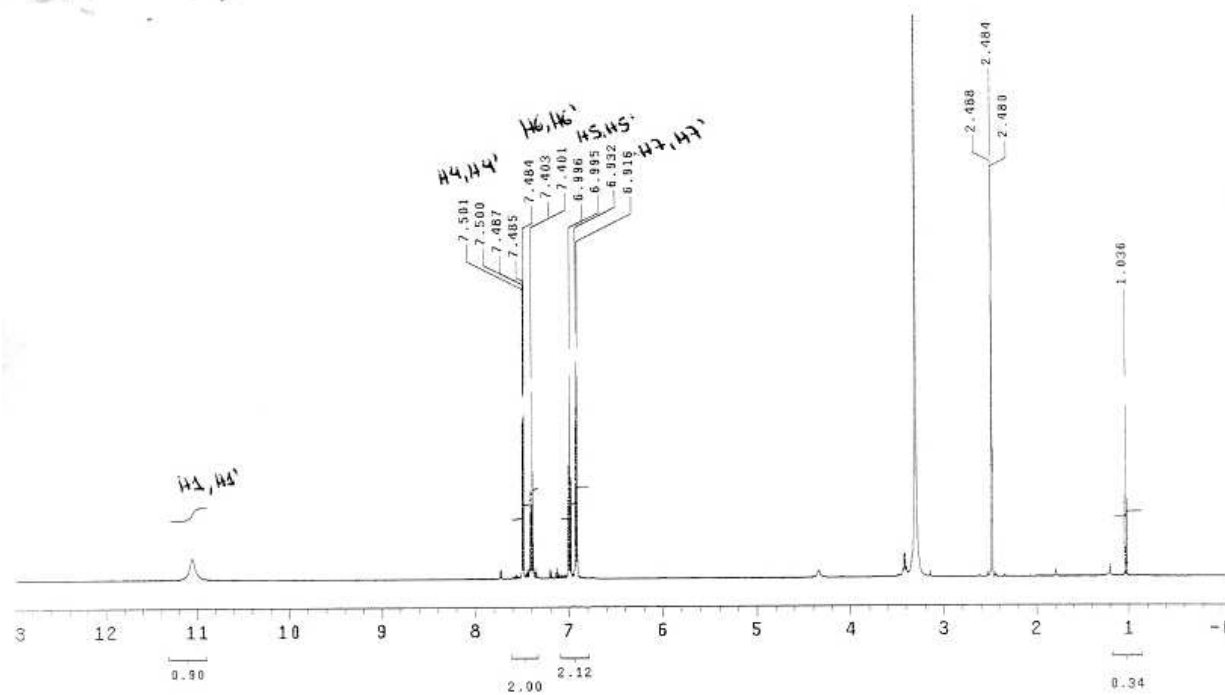
Espectro 4.7. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) da 2-hidroxiethylidrazona de isatina (T5).



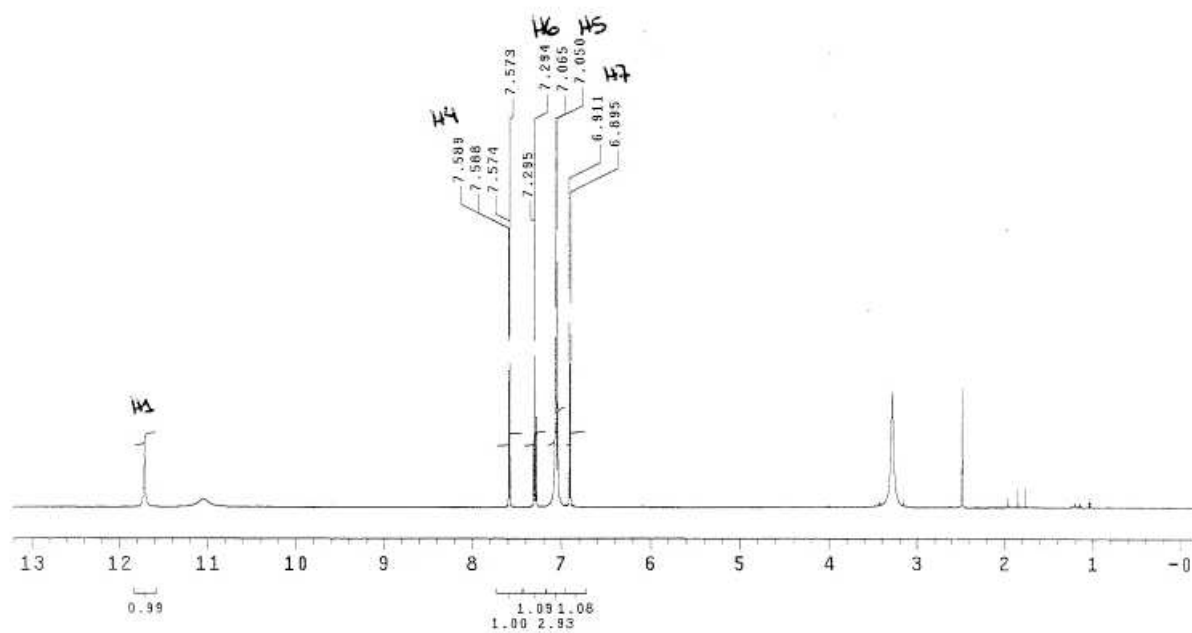
Espectro 4.8. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da 2,2,2-trifluoretilidrazona de isatina (T6).



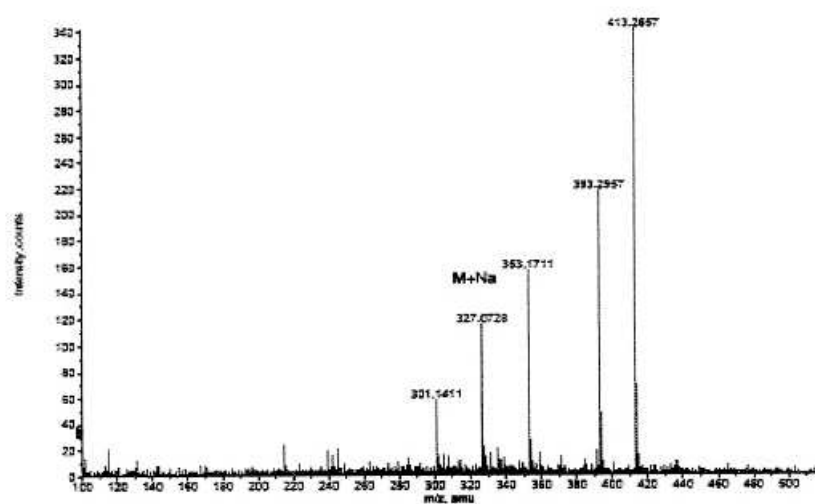
Espectro 4.9. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da hidrazona de isatina (T7).



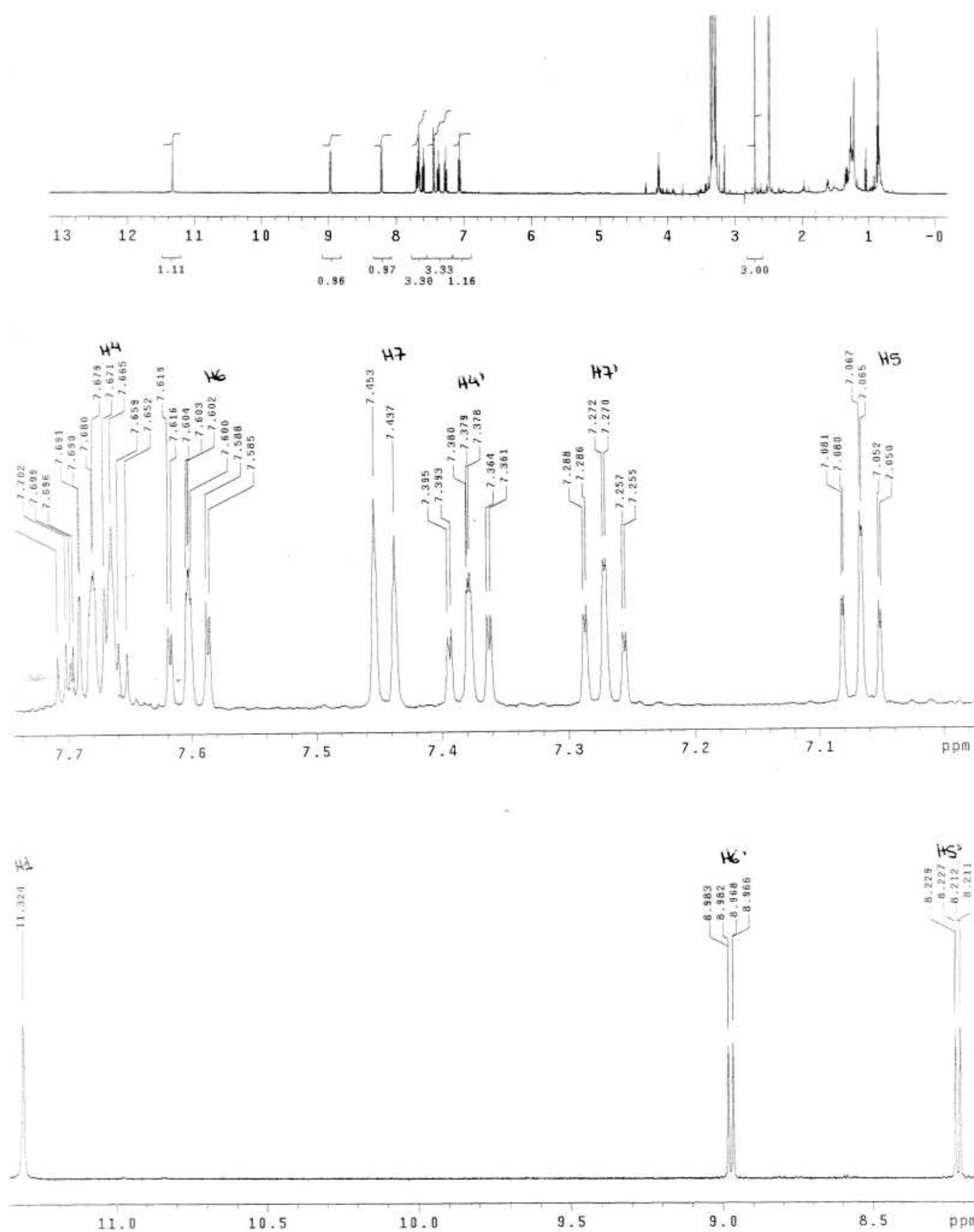
Espectro 4.10. Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) da azina de isatina (T8).



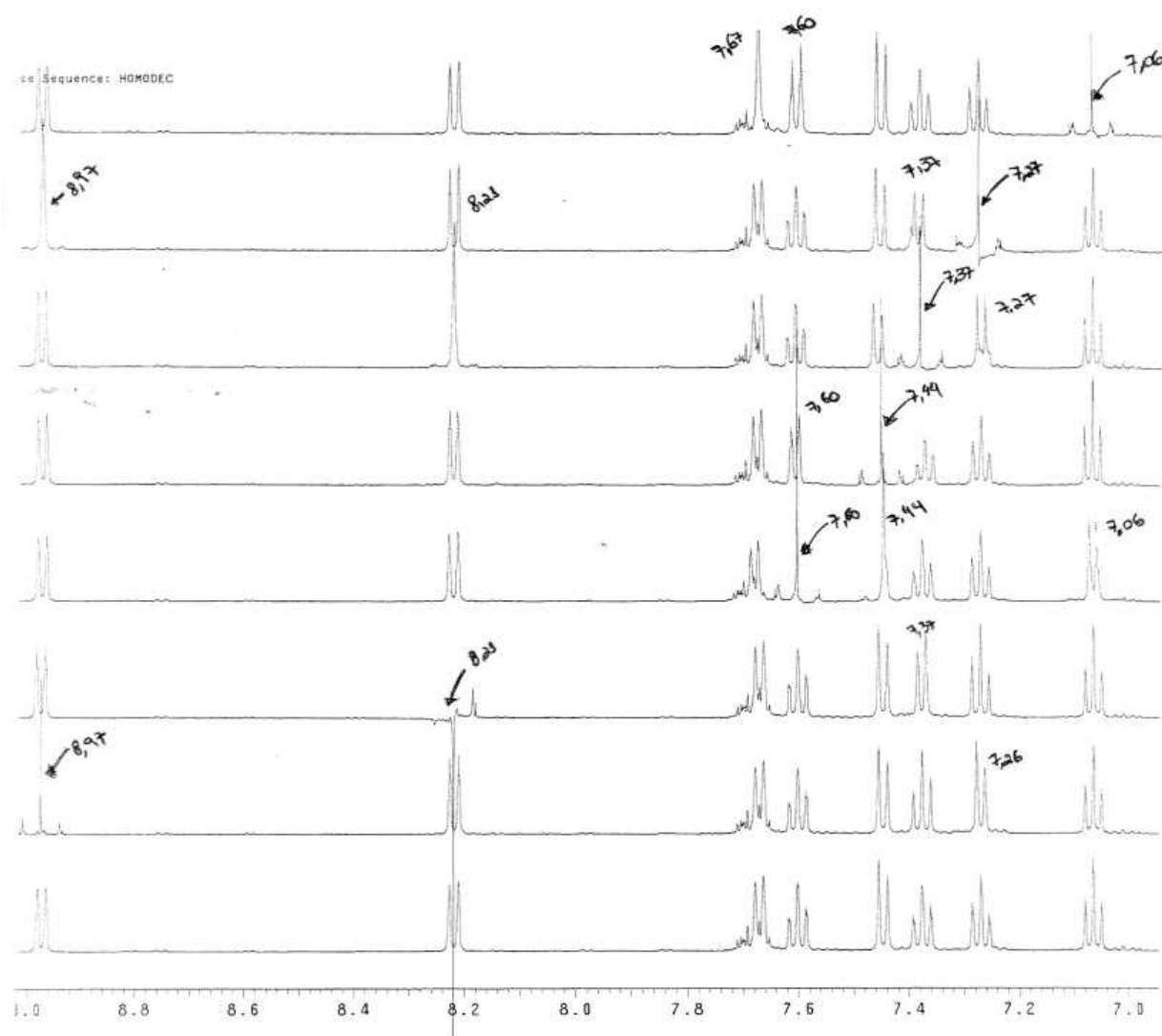
Espectro 4.11. Espectro de RMN ^1H (DMSO-d_6 , 500 MHz) da semicarbazona de isatina (T9).



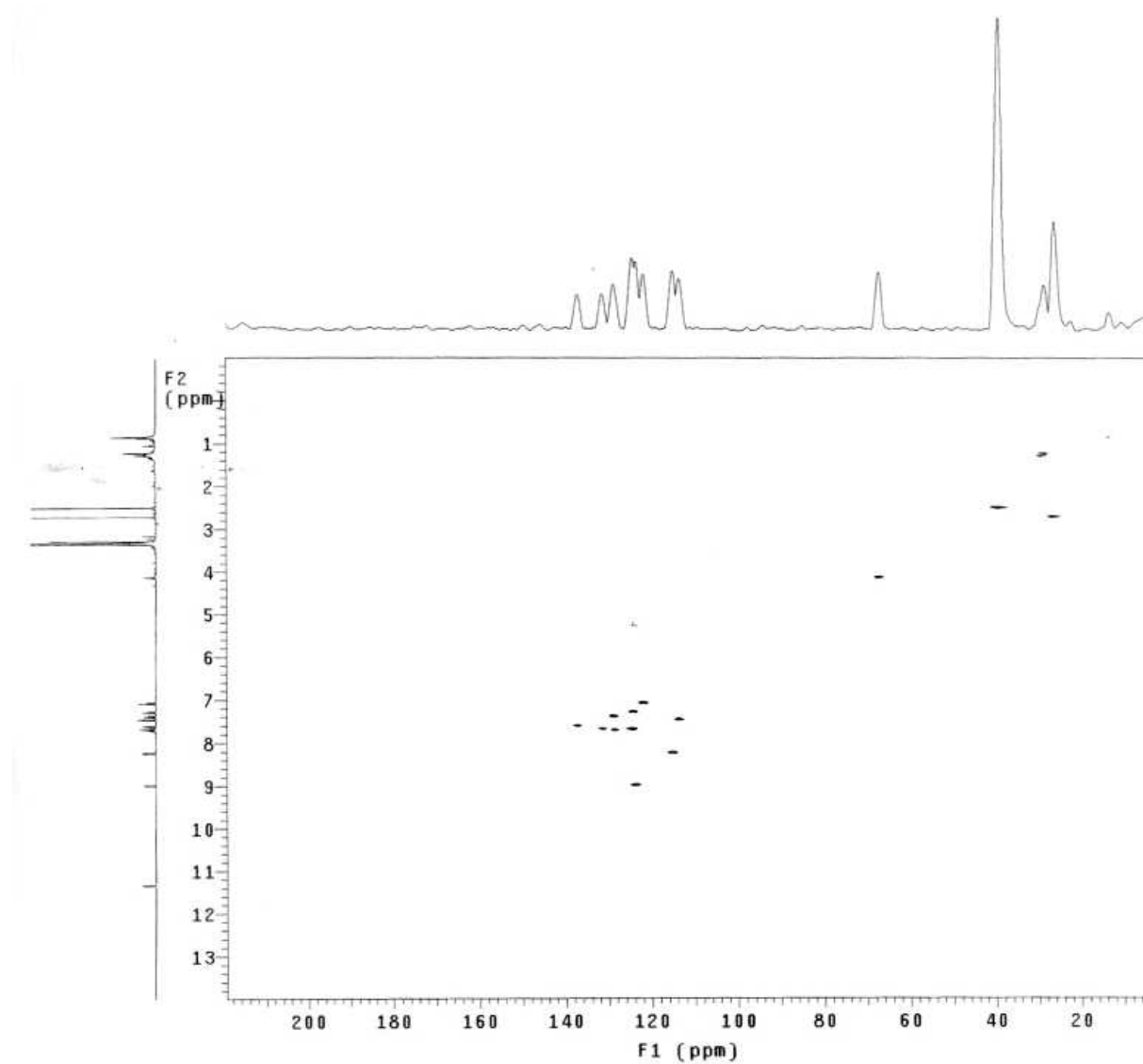
Espectro 4.12 Espectro de massas TOF-MS (modo positivo) do acetato de indirubina (T10).



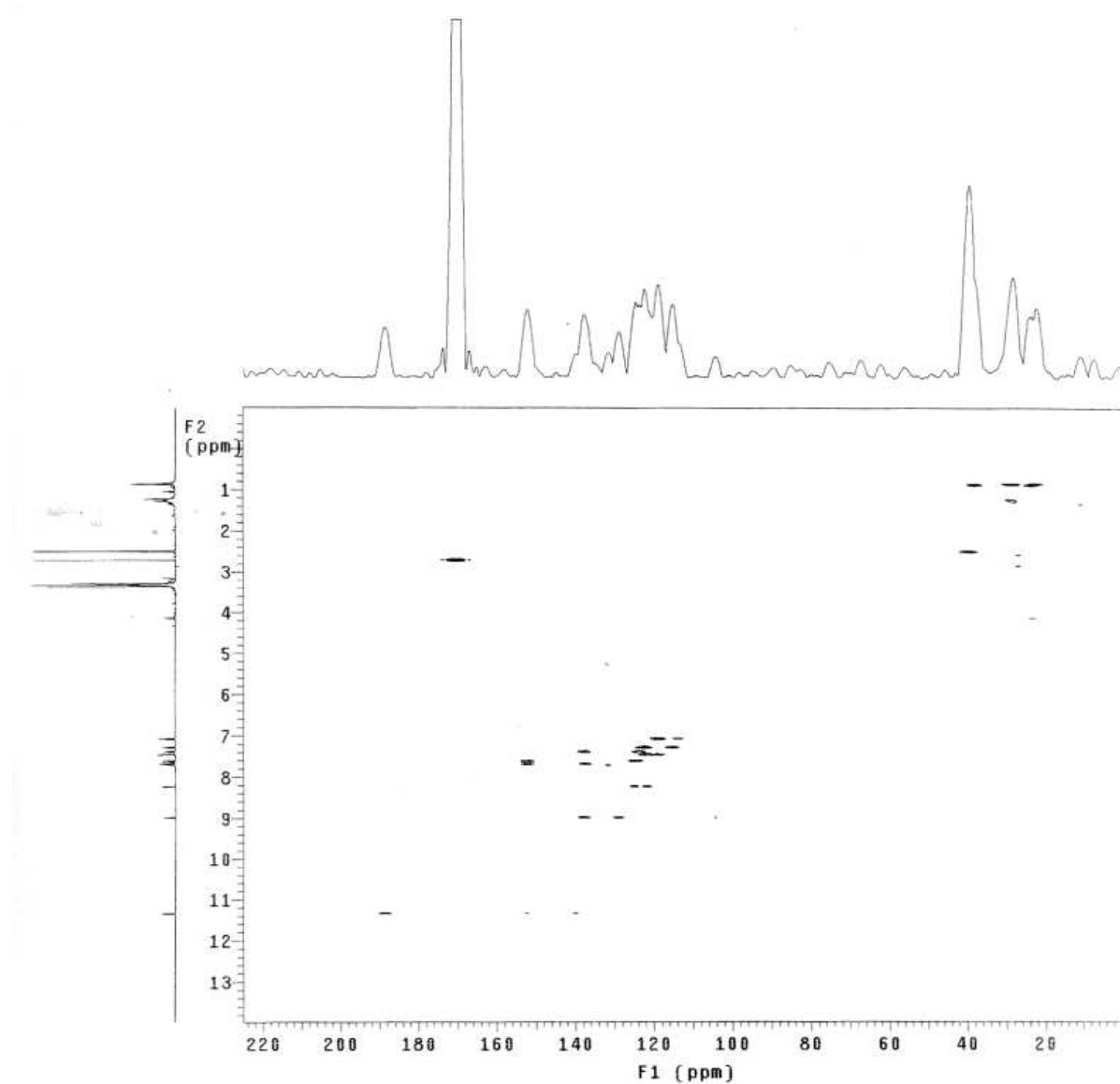
Espectro 4.13. Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆, 500 MHz) do acetato de indirubina (T10).



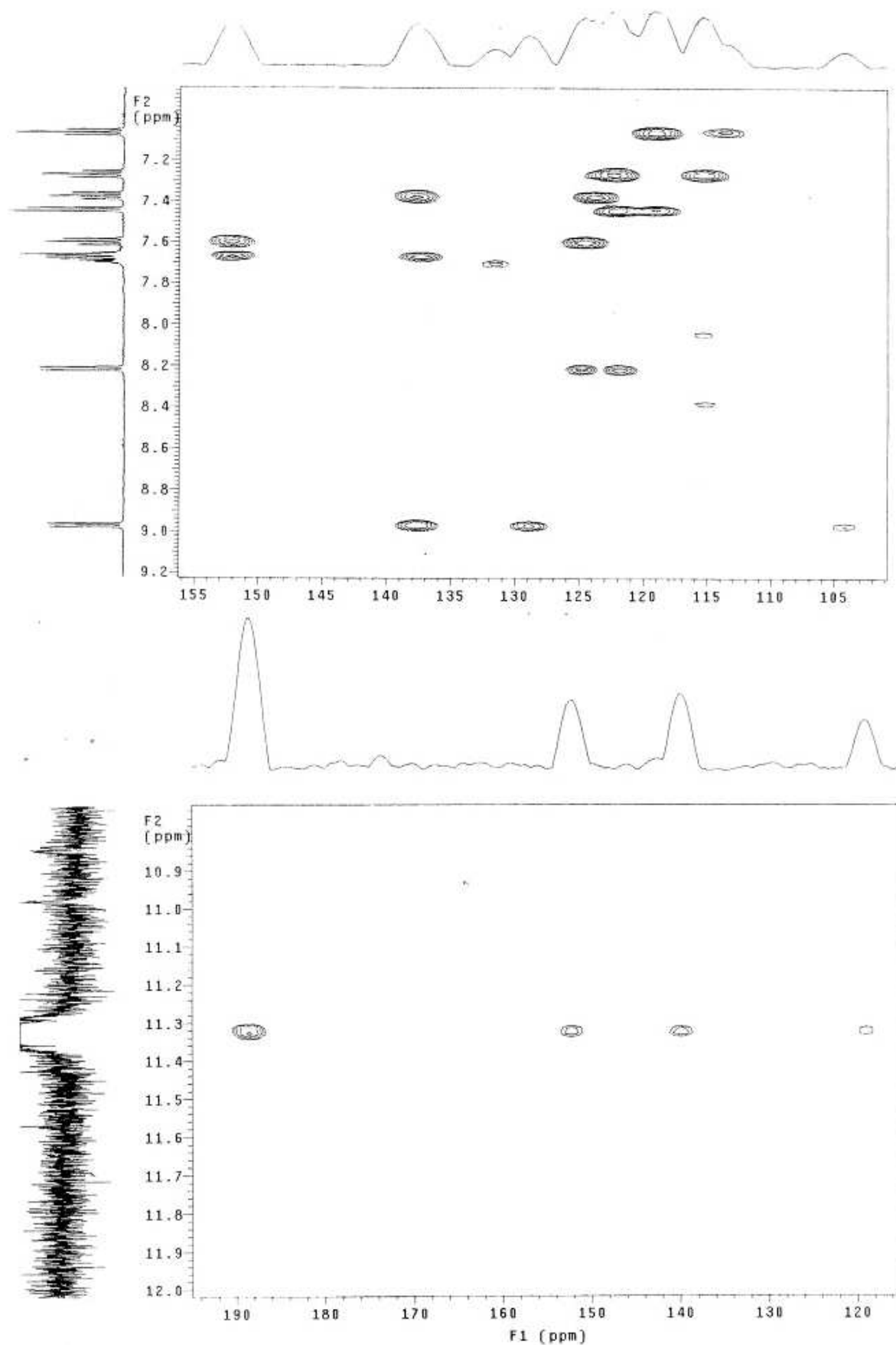
Espectro 4.14. Experimentos HOMODEC (DMSO-d₆, 500 MHz) do acetato de indirubina (T10).



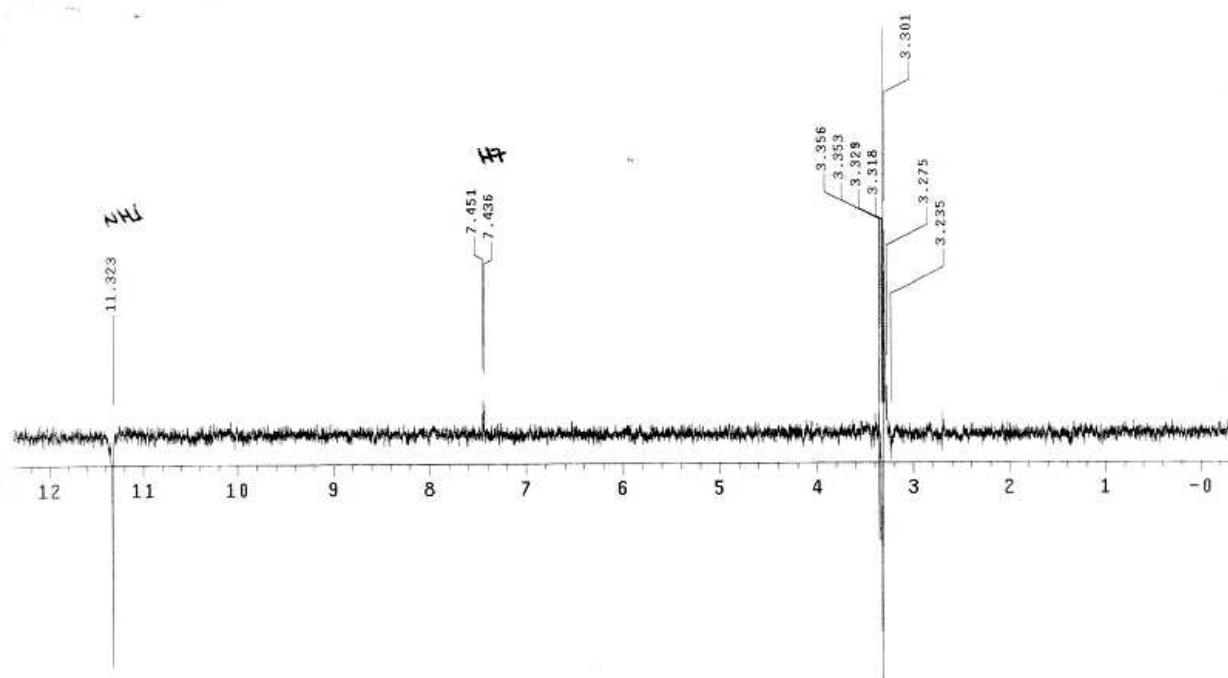
Espectro 4.15. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO- d_6 , 125 MHz) do acetato de indirubina (T10).



Espectro 4.16. Experimento bidimensional gHMBC (DMSO-d₆, 125 MHz) do acetato de indirubina (T10).



Espectro 4.17. Ampliações do experimento bidimensional gHMBC (DMSO-d₆, 125 MHz) do acetato de indirubina (T10).



Espectro 4.18. Experimento NOESY-1D, irradiação em δ 11,32, (DMSO- d_6 , 500 MHz) do acetato de indirubina (T10).