

ROSILENE CRISTINA ROSSETTO BURGOS

Detecção *in silico*, isolamento e caracterização estrutural dos constituintes micromoleculares antimaláricos e antioxidantes em galhos e folhas de *Garcinia gardneriana* (Clusiaceae).

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

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

B957d Burgos, Rosilene Cristina Rossetto
Detecção in silico, isolamento e caracterização estrutural
dos constituintes micromoleculares antimaláricos e
antioxidantes em galhos e folhas de *Garcinia gardneriana*
(Clusiaceae) / Rosilene Cristina Rossetto Burgos. –
Araraquara : [s.n], 2010
149 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Ian Castro-Gamboa
Co-orientador: Márcia Nasser Lopes

1. Produtos naturais. 2. Estudo fitoquímico.
3. Biflavonóides. 4. Detecção in silico. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dedico este trabalho em especial à minha mãe Ana, minha irmã Regina que sempre estiveram ao meu lado em mais uma etapa da minha vida. Sem vocês do meu lado esse sonho não poderia tornar-se realidade. Essa vitória também é de vocês.
Amo vocês!

Agradecimentos

À Providência Divina.....

À toda a minha grande família por me fazer tão feliz e aprender a cada dia mais com vocês.....

Ao Marcelo, meu grande companheiro de mais uma jornada.

Ao meu orientador deste trabalho: Ian, pela confiança depositada, pela alegria e motivação contagiante em seus ensinamentos e pela amizade.

À Prof.^a Márcia Nasser pela coorientação, ajuda e amizade na ausência do professor Ian.

Aos professores do NuBBE: Prof.^a Dra. Dulce Helena Siqueira Silva e Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro pelas oportunidades de trabalho na Iniciação Científica.

Aos demais professores do Departamento de Química Orgânica: Dra. Vanderlan da Silva Bolzani, Dra. Lúcia Xavier, Dra. Maysa Furlan, Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, Dra. Lourdes C. dos Santos e Wagner Vilegas pela convivência e pelo aprendizado durante meus seis anos no laboratório.

Ao Professor Dr. Norberto Peporine Lopes (USP- Ribeirão Preto) pela ajuda imprescindível na interpretação dos espectros de massas.

Ao Professor Dr. Ernani Pinto do Laboratório de Análises Toxicológicas da FCF-USP-SP pela colaboração nos experimentos realizados no *ion-trap*.

Às minhas eternas amigas: Daniara e Patrícia em especial por dividir tantos aprendizados e ensinamentos durante a nossa estadia na república. Jamais esquecerei. Foram bons momentos.

Às minhas amigas orgânicas: Adriana, Marília, Alessandra pela grande amizade, momentos de estudo e de pipoca.

Aos meus amigos de graduação e pós graduação: Jorge, Sheila, Thayz e João que sempre estiveram presentes nesta etapa.

Aos amigos de grupo/laboratório/departamento: Andrea Nastri e João Marcos, Vânia, Luís Otávio, Marcos Marçal, Fausto, Alan, Vanessa, Fernando Passarelli, Carolina Rabal, Lisinéia, Aline, Gisele, Claudio Rodrigo, Silvia, Lidiane, Fernando, Viviane, Cristiano, Amanda, Marcos, Welington, Juliana Rodrigues e Juliana Severi, pela valiosíssima amizade.

À todos os amigos que passaram pelo NuBBE enquanto aqui estive.

Aos funcionários Albertinho e Nivaldo do IQ-UNESP e José Carlos Tomaz da FCF-USP-RP pela ajuda na realização de experimentos, interpretação dos espectros e pela amizade.

À todos os colaboradores que realizaram os ensaios de DPPH, inibição de β -hematina, inibidor da acetilcolinesterase, ensaios antifúngicos e tripanocida.

A todos os funcionários do IQ pelo atendimento, informação e ajuda durante todo o período que estive no IQ.

À todos os meus amigos de uma forma geral. Este caminho tornou-se mais agradável com a presença de vocês.

Aos pais do Marcelo: Maria e Itamar pelo imenso e acolhedor carinho aqui em Araraquara.

Aos cunhados Marina e Marcus pelo incentivo em realizar o mestrado.

À FAPESP e ao CNPq pela bolsa concedida.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Este trabalho teve como principais objetivos a detecção, isolamento e elucidação estrutural dos constituintes micromoleculares presentes em folhas e galhos de *Garcinia gardneriana*, uma espécie da família Clusiaceae com poucos relatos na literatura sobre a sua composição fitoquímica.

A detecção das moléculas foi realizada através de abordagens *in silico* com o estabelecimento de perfis cromatográficos e espectrométricos dos constituintes majoritários dos extratos brutos e frações. A comparação desses dados foi realizada através de dados existentes na literatura. A partir dessa metodologia foi possível detectar 11 triterpenos por GC-FID nos extratos e frações apolares: campesterol (1), estigmasterol (2), β -sitosterol (3), β -amirrenona (4), α -amirina (5), β -amirina (6), lupenona (7), lupeol (8), acetato de β -amirina (9), acetato de α -amirina (10), friedelina (11) e mais 9 biflavonóides nos extratos e frações mais polares: xantochimusídeo (12), GB2 (13), fukugisídeo (14), GB 1a glicosilado (15), GB2a (16), morelloflavona (17), volkensiflavona (18), amentoflavona (19), podocarpusflavona (20) e uma benzofenona: 7-epiclusianona (21) através da técnica HPLC-DAD-ESI-MS-HRMS.

Quanto aos bioensaios *in vitro* realizados (inibição da polimerização do heme, redução do radical DPPH (antioxidante), inibidor da enzima acetilcolinesterase, tripanocida, citotóxico, antifúngico contra fitopatógenos e patógenos humanos) em todos os extratos e frações preparados, alguns resultados merecem destaque tais como a redução do radical DPPH com IC₅₀ de 9,5, 7,4 e 7,5 μ g/mL respectivamente para o extrato etanólico dos galhos, a fração acetato de etila dos galhos e folhas, a inibição da polimerização do heme com valores de 95,7, 98,6 e 68,0 %, de inibição para o extrato etanólico das folhas, e frações acetato de etila das folhas e galhos respectivamente.

Palavras-chave: *Garcinia gardneriana*, detecção *in silico*, biflavonóides.

Abstract

This work had as main objective the detection, isolation and structural elucidation of the micromolecular constituents from leaves and twigs of *Garcinia gardneriana*, a Clusiaceae species with few literature reports regarding its phytochemical composition.

The detection of molecules was performed by *in silico* detection with the establishment of chromatographic and spectroscopic profiles of the major constituents present in the crude extracts and fractions as well as comparison of data from database and literature reports. Based on this methodology we were able to detect 11 triterpenes by GC-FID in the extracts and nonpolar fractions: campesterol (**1**), stigmasterol (**2**), β -sitosterol (**3**), β -amirenone (**4**), α -amyrin (**5**), β -amyrin (**6**), lupenone (**7**), lupeol (**8**), β -amyrin acetate (**9**), α -amyrin acetate (**10**), friedelin (**11**) and more 9 biflavonoids from extracts and fractions polar: xanthochymuside (**12**) and GB2 (**13**), fukugiside (**14**), GB1 glycosylated (**15**), GB2a (**16**), morelloflavone (**17**), volkensiflavone (**18**), amentoflavone (**19**), podocarpusflavone (**20**), 7-epiclusianone (**21**) by HPLC-DAD-ESI-MS-HRMS.

As for the performed *in vitro* bioassays (inhibition of heme polymerization, reduction of the DPPH radical (antioxidant), inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, trypanocidal, cytotoxic antifungal activity against plant pathogens and human pathogens) in all extracts and fractions prepared in this work, some results are worthy of mentioning such as the reduction of the DPPH radical with IC₅₀ values of 9.5, 7.4 and 7.5 μ g/mL respectively for the ethanol extract from twigs, the ethyl acetate fraction from the branches and leaves, as well as the inhibition of heme polymerization with values of 95.7, 98.6 and 68.0% from the ethanol extract from the leaves, and the ethyl acetate fractions leaves and branches.

Keywords: *Garcinia gardneriana*, *in silico* detection, biflavonoids.

Lista de Figuras

Figura 1: Fotos de diversas partes da espécie <i>Garcinia gardneriana</i>	24
Figura 2: Esqueleto fundamental dos flavonóides.....	26
Figura 3: Principais classes dos flavonóides: A: os flavonóides; B: os isoflavonóides e C: os neoflavonóides.	26
Figura 4: Atribuição das posições dos biflavonóides.....	28
Figura 5: Cromatogramas obtidos por GC-FID dos extratos hexânicos e das frações hexânicas de <i>G. gardneriana</i>	48
Figura 6: Compostos identificados nos extratos e frações de baixa polaridade.	51
Figura 7: Espectro de UV de algumas bandas cromatográficas majoritárias presentes no extrato etanólico das folhas de <i>G. gardneriana</i>	52
Figura 8: Perfil cromatográfico obtido em gradiente exploratório para o extrato etanólico (Ext. EtOH) e suas respectivas frações das folhas de <i>G. gardneriana</i> ..	53
Figura 9: Perfil cromatográfico obtido em gradiente exploratório para o extrato etanólico (Ext. EtOH) e suas respectivas frações dos galhos de <i>G. gardneriana</i> ..	53
Figura 10: Otimização cromatográfica obtida para o extrato etanólico e F. AcOEt das folhas.....	54
Figura 11: Otimização cromatográfica obtida para o extrato etanólico e F. AcOEt dos galhos.....	55

Figura 12: Otimização cromatográfica obtida para a fração hidroalcoólica (F. hidro) das folhas e galhos	55
Figura 13: Obtenção dos perfis HPLC/DAD/HRMS (TIC) para o extrato etanólico, frações AcOEt e hidroalcoólica das folhas no modo negativo.	57
Figura 14: Obtenção dos perfis HPLC/DAD/HRMS (TIC) para o extrato etanólico e frações AcOEt e hidroalcoólica dos galhos no modo negativo.	58
Figura 15: Perfis HPLC-DAD-HRMS (TIC) para as frações acetato de etila das folhas e dos galhos no modo negativo.	59
Figura 16: Espectro de massa obtido para o composto xantochimusídeo.	60
Figura 17: Espectro de massa de segunda ordem para o composto xantochimusídeo com 10 eV (a) e 20 eV (b) de energia de colisão aplicada...	61
Figura 18: Espectros de massa MS ² , MS ³ e MS ⁴ obtidos para o composto xantochimusídeo no íon trap.	62
Figura 19: Proposta de fragmentação para o xantochimusídeo.	63
Figura 20: Espectro de massa obtido para o composto GB2.	64
Figura 21: Espectro de massa de segunda ordem para o composto GB2 com 25 eV de energia de colisão aplicada.....	64
Figura 22: Proposta de fragmentação para o GB2.....	65
Figura 23: Espectro de massa obtido para o composto fukugisídeo.	66
Figura 24: Espectro de massa de segunda ordem para o composto fukugisídeo com 25 eV de energia de colisão aplicada.	66

Lista de Figuras

Figura 25: Espectros de massa MS ² , MS ³ e MS ⁴ obtidos para o composto fukugisídeo no íon trap.....	67
Figura 26: Proposta de fragmentação para o fukugisídeo.....	68
Figura 27: Espectro de massa obtido para o composto GB1a glicosilado.	69
Figura 28: Espectro de massa de segunda ordem para o composto GB1a glicosilado com 15 eV de energia de colisão aplicada.	69
Figura 29: Espectro de massa obtido para o composto GB2a.....	70
Figura 30: Espectro de massa de segunda ordem para o composto GB2a com 15 eV de energia de colisão aplicada.....	70
Figura 31: Espectro de massa obtido para o composto moreloflavona.....	71
Figura 32: Espectro de massa de segunda ordem para o composto moreloflavona com 25 eV de energia de colisão aplicada.....	71
Figura 33: Espectros de massa MS ² , MS ³ e MS ⁴ obtidos para o composto moreloflavona no íon trap.....	72
Figura 34: Espectro de massa obtido para o composto volkensiflavona.....	73
Figura 35: Espectro de massa de segunda ordem para o composto volkensiflavona com 15 eV de energia de colisão aplicada.	73
Figura 36: Espectro de massa obtido para o composto amentoflavona.....	74
Figura 37: Espectro de massa de segunda ordem para o composto amentoflavona com 15 eV de energia de colisão aplicada.	74
Figura 38: Espectro de massa obtido para o composto podocarpusflavona....	75

Lista de Figuras

Figura 39: Espectro de massa de segunda ordem para o composto podocarpusflavona com 15 eV de energia de colisão aplicada.....	75
Figura 40: Espectros de massa MS ² , MS ³ e MS ⁴ obtidos para o composto podocarpusflavona no íon trap.....	76
Figura 41: Proposta de fragmentação para a podocarpusflavona.....	77
Figura 42: Espectro de massa obtido para o composto 7-epiclusianona.	78
Figura 43: Cromatograma preparativo obtido da fração AcOEt.....	79
Figura 44: Simplificação do mecanismo da reação envolvido no ensaio com DPPH.	89
Figura 45: Gráficos obtidos para o ensaio de DPPH dos extratos e frações....	90
Figura 46: Dados obtidos para o ensaio de inibição da polimerização do heme.	92
Figura 47: Cromatoplasmas reveladas em: A – luz UV λ 254 nm; B – luz UV λ 366 e C – revelada com a solução da enzima acetilcolinesterase.	93
Figura 48: Cromatoplasmas reveladas em: A – luz UV λ 254 nm; B – luz UV λ 366 e C – revelada com a suspensão de esporos do fungo <i>C. cladosporioides</i> e/ou <i>C. sphaerospermum</i>	95

Lista de Tabelas

Tabela 1: Compostos já relatados para a espécie <i>Garcinia gardneriana</i>	25
Tabela 2: Quantidade de extratos obtidos por maceração com solvente.....	36
Tabela 3: Quantidade em massa das frações obtidas por extração líquido-líquido.....	37
Tabela 4: Padrões utilizados para a identificação com seu devido tempo de retenção relativo (TRR) ao colesterol.....	47
Tabela 5: Identificação dos compostos no extrato hexânico das folhas.....	49
Tabela 6: Identificação dos compostos na fração hexânica das folhas.....	49
Tabela 7: Identificação dos compostos no extrato hexânico dos galhos.....	50
Tabela 8: Identificação dos compostos na fração hexânica dos galhos.....	50
Tabela 9: Compostos detectados nas frações acetato de etila dos galhos e folhas de <i>G. gardneriana</i>	59
Tabela 10: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) para o xantochimusídeo (DMSO – d_6).....	81
Tabela 11: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) do fukugisídeo (DMSO – d_6).....	83
Tabela 12: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) da morelloflavona ou Fukugetin (DMSO – d_6).....	85
Tabela 13: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) da podocarpusflavona (DMSO – d_6).....	87

Lista de Tabelas

Tabela 14: Dados de IC ₅₀ frente ao ensaio de DPPH dos extratos e frações. .	90
Tabela 15: Valores de RF que apresentaram alguma indicação de inibição da reação enzimática.	94
Tabela 16: Valores de RF que apresentaram alguma indicação de atividade.	95
Tabela 17: Resultados obtidos para o ensaio tripanocida.	96
Tabela 18: Resultados obtidos para o ensaio citotóxico (% de inibição do crescimento celular) frente às linhagens de células tumorais HL-60 (leucemia promielocítica humana), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (sistema nervoso - humano).	97
Tabela 19: Resultados obtidos para o ensaio antifúngico (Concentração Inibitória Mínima - CIM) contra <i>Cryptococcus neoformans</i> e algumas espécies de <i>Candida</i>	99

Lista de Fluxogramas

Fluxograma 1: Método de obtenção dos extratos brutos para os galhos e também para as folhas de *G. gardneriana*. 35

Fluxograma 2: Método de extração líquido-líquido para os galhos e também para as folhas de *G. gardneriana*. 36

Abreviaturas e Símbolos

AcOEt – acetato de etila

DAD - detector de arranjo de diodos

DMSO - dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

EtOH – etanol

ESI – ionização por electrospray

GC – cromatografia gasosa

GC-MS – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

GC-FID – cromatografia gasosa com ionização de chama

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-DAD – cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

HPLC-DAD-ESI-HRMS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução com ionização electrospray

HPLC-DAD-ESI-MS - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas

HPLC-DAD-ESI-MS - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

HPLC-NMR - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear

HPLC-MS-NMR - cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas e à ressonância magnética nuclear.

MeOH – metanol

MS – espectrometria de massas

NA-TFA – Trifluoroacetato de sódio

NMR – ressonância magnética nuclear

ROS – espécies reativas de oxigênio

RNS – espécies reativas de nitrogênio

SPE – extração em fase sólida

TIC – corrente de íon total

UV-Vis – Ultravioleta visível

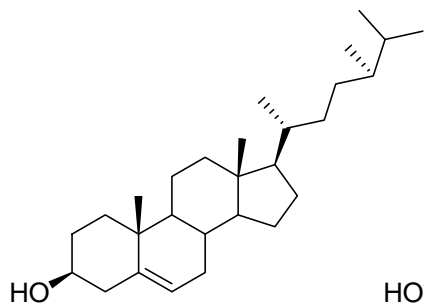
SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. IMPORTÂNCIA DOS PRODUTOS NATURAIS COMO PROTÓTIPOS A FÁRMACOS....	22
1.2. A FAMÍLIA CLUSIACEAE E O GÊNERO <i>GARCINIA</i>	23
1.3. A ESPÉCIE <i>GARCINIA GARDNERIANA</i>	24
1.4. OS FLAVONÓIDES E BIFLAVONÓIDES	26
1.5. O EMPREGO DAS TÉCNICAS ACOPLADAS NA QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS.	28
1.6. ABORDAGEM <i>IN SILICO</i> COMO UMA FERRAMENTA NA ANÁLISE DE MATRIZES COMPLEXAS.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	32
3.1. EQUIPAMENTOS CROMATOGRÁFICOS.....	32
3.1.1. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)</i>	32
3.1.2. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (HPLC-DAD preparativo)</i>	32
3.1.3. <i>Cromatografia gasosa por Ionização de Chama (GC-FID)</i>	33
3.1.4. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-DAD-ESI-HRMS)</i>	33
3.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM ANALISADOR <i>ION TRAP</i>	33
3.3. ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)	34
3.4. SOLVENTES	34
3.5. BALANÇAS	34
3.6. EVAPORADOR ROTATIVO	34
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	35
4.1. COLETA E CLASSIFICAÇÃO DO MATERIAL	35
4.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	35
4.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	37
4.3.1. <i>Cromatografia gasosa</i>	37

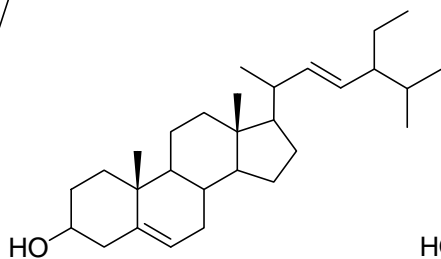
4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.....	37
4.4. CONSTRUÇÃO E OBTENÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS	38
4.4.1. Cromatografia gasosa.....	38
4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.....	38
4.5. Otimização dos perfis cromatográficos dos extratos e frações	38
4.6. OBTENÇÃO DOS PERFIS HPLC-DAD-ESI-HRMS.....	39
4.7. ENSAIOS PRELIMINARES	40
4.7.1. Atividade seqüestradora de radicais livres: DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidrazila)	40
4.7.2. Ensaio <i>in vitro</i> de inibição da polimerização da heme.....	40
4.7.3. Atividade acetilcolinesterásica	41
4.7.4. Atividade antifúngica	42
4.7.5. Atividade tripanocida.....	43
4.7.6. Atividade citotóxica.....	44
4.7.7. Ensaio antifúngico contra <i>Cryptococcus neoformans</i> e algumas espécies de <i>Candida</i>	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
5.1. ANÁLISE DO PERFIL GC-FID DOS EXTRATOS E FRAÇÕES HEXÂNICAS.	46
5.2. ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	51
5.3. ANÁLISE DO PERFIL HPLC-DAD-ESI-HRMS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	57
5.4. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> UTILIZANDO HPLC-DAD-HRMS	58
5.4.1. Análise do composto xantochimusídeo.....	60
5.4.2. Análise do composto GB2.....	64
5.4.3. Análise do composto fukugisídeo.....	66
5.4.4. Análise do composto GB1a glicosilado	69
5.4.5. Análise do composto GB2a.....	70
5.4.6. Análise do composto morelloflavona.....	71
5.4.7. Análise do composto volkensiflavona.....	73
5.4.8. Análise do composto amentoflavona.....	74
5.4.9. Análise do composto podocarpusflavona.....	75
5.4.10. Análise do composto 7-epiclusianona.....	78
5.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PREPARATIVA DA FRAÇÃO ACOET DAS FOLHAS.....	78

5.6. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS	79
5.6.1. <i>Caracterização estrutural da F. AcOEt 20 - (12) - (xantochimusídeo).</i>	80
5.6.2. <i>Caracterização estrutural da F. AcOEt 24 – (14) -(fukugisídeo).....</i>	82
5.6.3. <i>Caracterização estrutural da F. AcOEt 36 – (17) - (morelloflavona)</i>	84
5.6.4. <i>Caracterização estrutural da F. AcOEt 48 – (20) - (podocarpusflavona)</i>	86
5.7. ENSAIOS PRELIMINARES	88
5.7.1. <i>Ensaio antioxidante</i>	88
5.7.2 <i>Ensaio de inibição da polimerização da heme</i>	90
5.7.3. <i>Ensaio acetilcolinesterásico</i>	93
5.7.4. <i>Ensaio antifúngico</i>	94
5.7.5 <i>Ensaio tripanocida.....</i>	96
5.7.6. <i>Ensaio citotóxico</i>	97
5.7.7. <i>Ensaio antifúngico contra Cryptococcus neoformans e algumas espécies de Candida.....</i>	98
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
REFERÊNCIAS.....	102

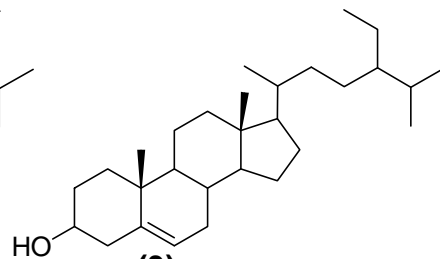
Terpenos



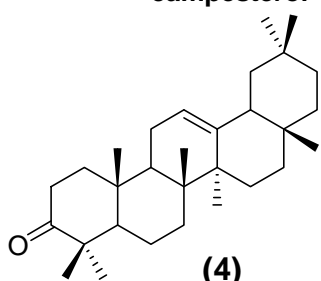
(1)
campesterol



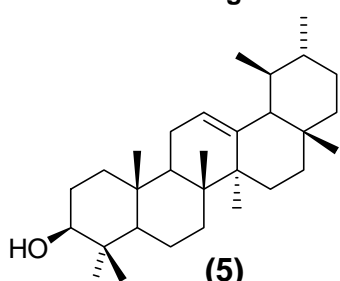
(2)
estigmasterol



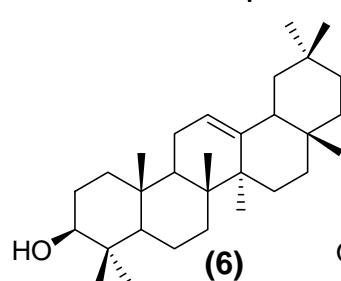
(3)
 β -sitosterol



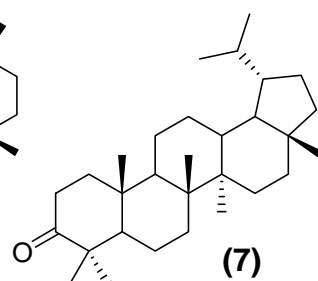
(4)
 β -amirenona



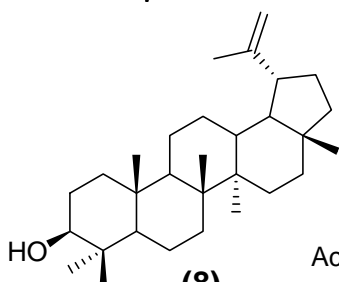
(5)
 α -amirina



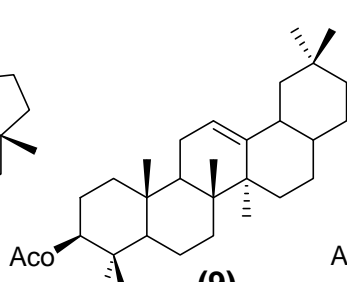
(6)
 β -amirina



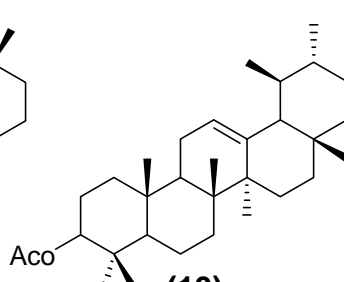
(7)
lupenona



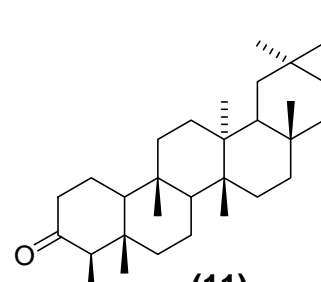
(8)
lupeol



(9)
acetato de β -amirina

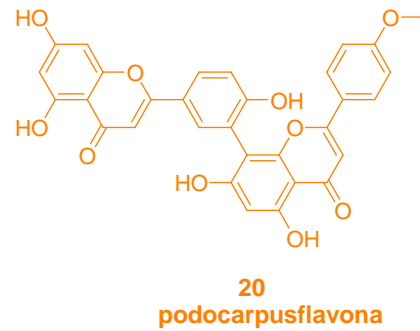
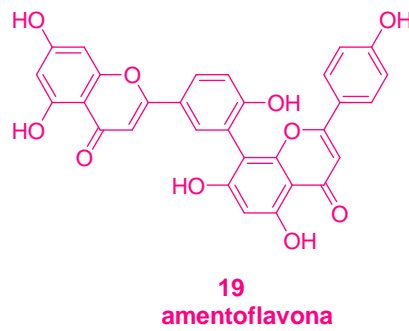
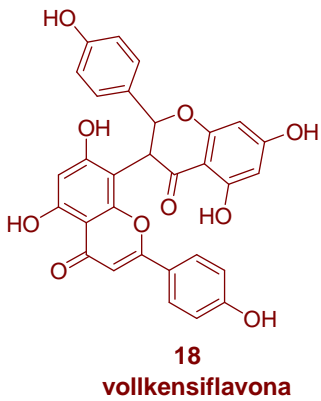
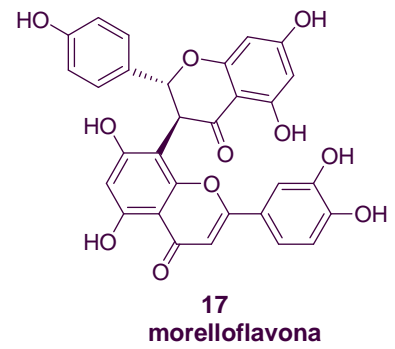
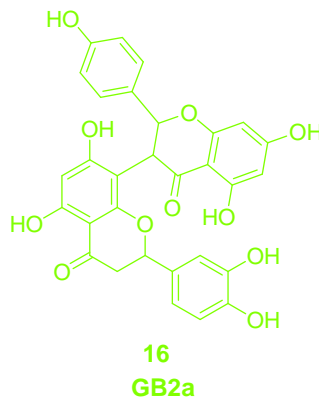
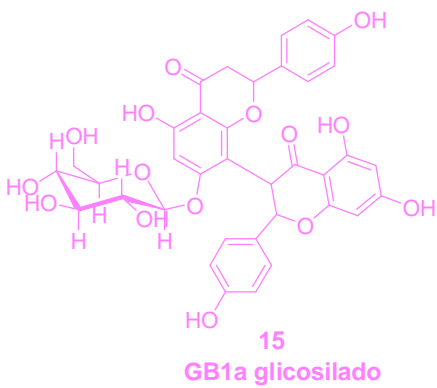
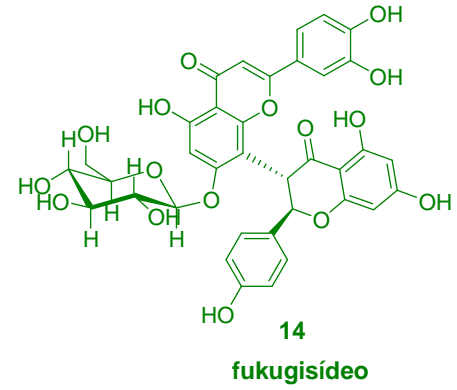
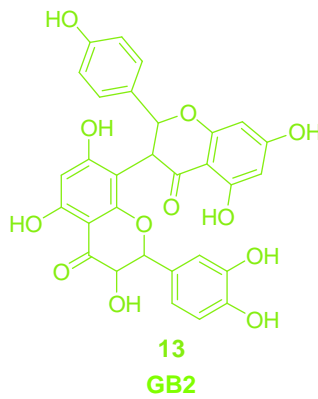
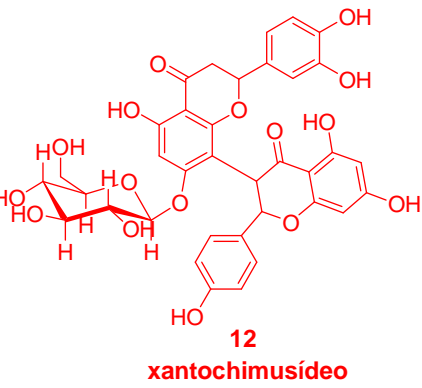


(10)
acetato de α -amirina

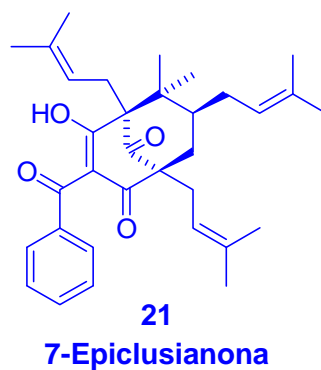


(11)
friedelina

Biflavonóides



Benzofenona



1. Introdução

1.1. Importância dos produtos naturais como protótipos a fármacos.

Segundo BARREIRO e BOLZANI, 2009, plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possam sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Muitos metabólitos secundários ou especiais se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos, comprovando que a química de produtos naturais é estratégica para a descoberta de fármacos inovadores.

BARREIRO e BOLZANI, 2009 descrevem também que a biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e que a preservação dessa biodiversidade é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O século XIX pode ser considerado marco na fitoquímica de plantas medicinais, pois durante esse período surgiram os primeiros estudos com base científica. A descoberta dos alcalóides morfina, cocaína e quinina, entre tantas outras substâncias isoladas de plantas e utilizadas como medicamentos até os dias atuais, não deixam dúvidas quanto a sua importância, principalmente, no uso tradicional (PINTO et al., 2002; KIRBY, 1996).

Com a descoberta dos antibióticos e anticolesterolêmicos a partir de microrganismos e, dos benefícios divulgados pela Organização Mundial de Saúde na década de 70 sobre a eficácia da medicina chinesa, começou uma corrida à procura de quimioterápicos eficazes (KIRBY, 1996).

Nestes últimos 10 anos, mudanças importantes vêm sendo observadas no rumo da pesquisa por novos fármacos devido aos avanços da biologia molecular, mapeamento genético, bioensaios automatizados e quimiogenômica. Esse novo cenário abriu perspectivas promissoras para parcerias e colaborações com universidades e institutos de pesquisas levando ao estabelecimento de programas de bioprospecção (seleção de substâncias bioativas de fontes naturais), cujo objetivo alvo visa a descoberta de substâncias naturais com estruturas novas e propriedades farmacológicas únicas, de biomas promissores, incorporando fases mais refinadas em pesquisa com fármacos, química medicinal e propostas de relações estrutura/atividade (NEWMAN et al., 2003; NEWMAN; CRAAG, 2007).

Aproximadamente 60% dos agentes antitumorais e antibióticos disponíveis no mercado ou em estágios de avaliação clínica são de origem natural (PINTO et al., 2002). Em 1999, metade dos 20 medicamentos mais vendidos eram produtos naturais com lucros de vendas em torno de 16,5 bilhões de dólares (GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002). De acordo com dados disponíveis na literatura, nos últimos 10 anos, cerca de 500 entidades químicas novas foram aprovadas pelas instituições reguladoras de todo o mundo, sendo quase 50% de origem natural (NEWMAN et al., 2003; NEWMAN; CRAAG, 2007). Diante desses dados, países como o Brasil, que detém grande parte da biodiversidade mundial, poderão usufruir deste patrimônio, se esforços forem dirigidos para a pesquisa colaborativa na descoberta por fármacos potenciais vindos da nossa biodiversidade (GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002).

1.2. A família Clusiaceae e o gênero *Garcinia*

Clusiaceae compreende, aproximadamente, 45 gêneros e 1370 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais (MABBERLEY, 1997). A maioria dos representantes desta família são árvores, arbustos ou ervas sendo raro o aparecimento de epífitas (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Alguns gêneros e espécies são endêmicos de certas áreas, por exemplo, o gênero *Symphonia L.* e *Pentadesma* são encontradas unicamente na África

(SULTANBAWA, 1980). No Brasil, há 21 gêneros e 183 espécies (CRUZ et al., 1998).

O gênero *Garcinia* revela como seus quimiomarcadores, a ocorrência de xantonas (PERES; NAGEM; OLIVEIRA, 2000; PERES; NAGEM; OLIVEIRA 1997; BENNETT e LEE, 1989; HAY et al., 2004), além de benzofenonas e biflavonoides (RAO et al., 1974; ITO et al., 2001).

1.3. A espécie *Garcinia gardneriana*

A espécie *Garcinia gardneriana* apresentada na **figura 1**, também conhecida como *Rheedia gardneriana* é nativa da Ásia, Austrália, zonas tropicais da África e Polinésia. É uma árvore de pequeno a médio porte podendo ser encontrada no Brasil da região Amazônica ao Rio Grande do Sul. Seu fruto é comumente conhecido como bacupari, bacopari-miúdo, mangostão-amarelo entre outros nomes. A madeira de dimensões relativamente pequenas é usada em construção civil, marcenaria e carpintaria. A casca, uma exsuda resina amarela serve para curtumes e tem aplicações medicinais (DOS SANTOS et al.,1999).



Figura 1: Fotos de diversas partes da espécie *Garcinia gardneriana*.

A revisão bibliográfica realizada em junho de 2009 sobre o estudo fitoquímico das folhas, cascas e polpa dos frutos, raiz e caules de *Garcinia gardneriana* revelou a presença, principalmente, de biflavonóides, xantonas, benzofenonas, terpenos os quais possuem atividade analgésica (LUZZI et al, 1997), antiinflamatória (CASTARDO et al, 2008) e anti-HIV (LIN YM. et al,1997). A **tabela 1** resume os principais constituintes relatados na espécie *Garcinia gardneriana*.

Tabela 1: Compostos já relatados para a espécie *Garcinia gardneriana*.

Classificação	Composto	Atividade	Parte da Planta	Referência	
Biflavonóide	Fukugetin	Antiinflamatória	Folhas e Raiz	CASTARDO et al,2008; LUZZI et al,1997	
	GB2a	Antiinflamatória	Folhas e Raiz	CASTARDO et al,2008; LUZZI et al,1997	
	Volkensiflavona	Analgésica	Folhas e Raiz	LUZZI et al,1997; BOTTA et al,1984	
	Fukugisídeo	Analgésica	Folhas	LUZZI et al, 1997	
	GB1a	Anti-HIV	Folhas e Raiz	BOTTA et al,1984; LIN et al,1997	
Xantona	13-naringenin-118-4'-OMe-	Analgésica	Folhas	CECHINEL FILHO et al, 2000	
	Buchanaxantona		Caule	BRAZ FILHO et al,1970	
	1,5-diidroxixantona		Caule	BRAZ FILHO et al,1970	
	Euxantona		Caule	BRAZ FILHO et al,1970	
	Rheediaxantona A		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1983	
	Rheediaxantona B		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1983	
	Rheediaxantona C		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1983	
	Macluraxantona		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1983	
	Isorheediaxantona B		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1983	
	8-deoxigartanin		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1984	
	Piranojacareubin		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1984	
	7-preniljacareubin		Raiz	DELLE MONACHE et al, 1984	
	9H-Xanten-9-ona			RICALDEZ et al, 2000	
	Benzofenona	7-epiclusianona	Tripanocida	Casca do Fruto	ALVES et al, 1999
		Sitosterol		Polpa do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999
Estigmasterol			Polpa do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999	
Lupeol			Casca	BRAZ FILHO et al,1970	
β-sitosterol			Caule	BRAZ FILHO et al,1970	
Betulin			Casca	BRAZ FILHO et al,1970	
α-copaeno			Casca do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999	
α-muuroleno			Casca do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999	
γ-cadineno			Casca do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999	
Cadineno			Casca do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999	
Ácido Oleanólico		Nematicida	Casca do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999 e 2007	
Terpeno		Friedelina			RICALDEZ et al, 2000
	Canofilol			RICALDEZ et al, 2000	
	Carboidratos	Glicose		Polpa do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999
		Galactose		Polpa do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999
		Frutose		Polpa do Fruto	DOS SANTOS et al, 1999
Éster Alifático			BRAZ FILHO et al,1970		

1.4. Os Flavonóides e Biflavonóides

Os flavonóides são pigmentos naturais presentes nos vegetais que protege o organismo dos danos produzidos pelos agentes oxidantes tais como os raios ultravioletas, a poluição ambiental entre outros. O organismo humano não pode produzir tais substâncias que então devem ser obtidas a partir da alimentação ou na forma de suplementos os quais estão amplamente distribuídos em plantas, frutas, verduras e em diversas bebidas (MARTINEZ-FLÓREZ et al., 2002).

Quimicamente, o termo "flavonóides" é usado para descrever uma ampla coleção de produtos naturais que incluem um sistema $C_6-C_3-C_6$ (**figura 2**), resultante de duas rotas biossintéticas distintas: a do ácido chiquímico e a do acetato.

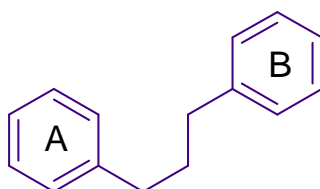


Figura 2: Esqueleto fundamental dos flavonóides.

Devido ao grande número de flavonóides existentes, estes são agrupados em três principais classes: os flavonóides propriamente ditos: 2-fenilbenzopiranos, os isoflavonóides: 3-fenilbenzopiranos e os neoflavonóides: 4-fenilbenzopiranos (**figura 3**).

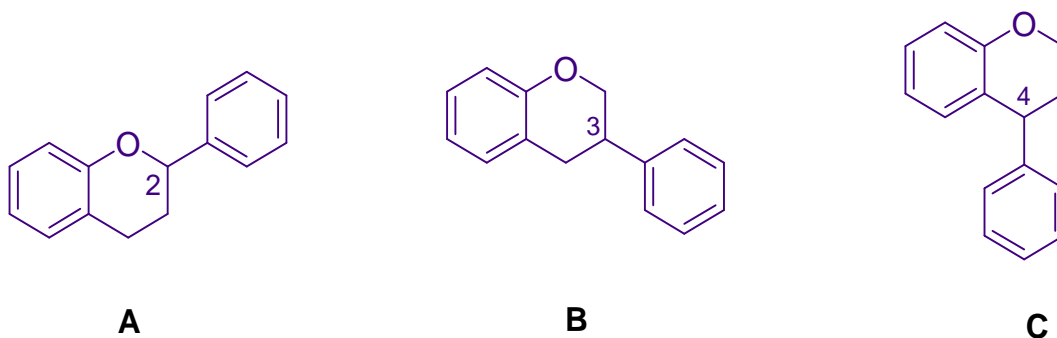


Figura 3: Principais classes dos flavonóides: A: os flavonóides; B: os isoflavonóides e C: os neoflavonóides.

Os flavonóides (2-fenilbenzopiranos) são subclassificados de acordo com o grau de oxidação e saturação presente no heterociclo, podendo apresentar-se como os seguintes grupos: flavanos, flavanonas, flavonas, flavonol, 2,3-dihidroflavonol, 3-hidroxi flavanos, 4-hidroxi flavanos, 3,4-hidroxi flavanos e antocianidinas. Os isoflavonóides são subdivididos em: isoflavanos, isoflavonas, isoflavanonas, isoflav-3-enos, 4-hidroxiisoflavanos, isoflavanol, rotenóides, cumestanos, 3-arilcumarinas, cumaronocromenos, cumaronocromonas e pterocarpanos. Os neoflavonóides constituem as 4-arilcumarinas, 3,4-dihidro-4-arilcumarinas e neoflavenos. Estes por sua vez podem apresentar-se como monômeros, dímeros ou oligômeros. Os oligômeros (polímeros) mais importantes constituem o grupo dos taninos condensados (MARAIS *et al.*, 2006).

Os biflavonóides se apresentam de forma natural como duas unidades de flavonóides que podem unir-se por ligações covalentes do tipo C-C ou C-O-C. As unidades de flavonóides ligadas podem ser iguais ou de diferentes subclassificações, como por exemplo, uma flavona e uma flavanona.

Utiliza-se a numeração dos biflavonóides atribuindo números ordinários para os anéis A e C e primados (') para o anel B de um dos monômeros. Para a segunda unidade, empregam-se números ordinários duplamente primados (") para os núcleos A e C e números ordinários triplamente primados (''') para o núcleo B (**figura 4**). Raramente ocorre alteração no padrão de oxigenação dos precursores, sendo garantida a oxigenação em 5, 7 e 4' e raramente uma oxidação adicional em 3'. Podem ocorrer oxidações nas posições 6, 8 ou 3' e quando isso acontece é, certamente, proveniente da outra unidade ligada nessa posição via C-O-C.

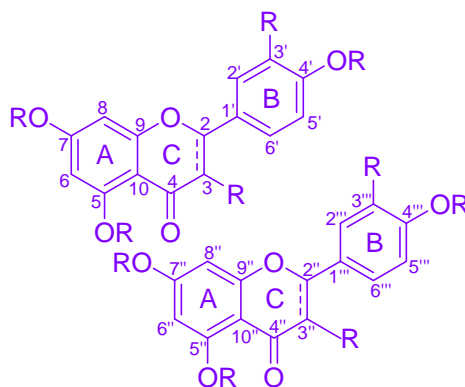


Figura 4: Atribuição das posições dos biflavonóides

A primeira biflavona foi isolada em 1929, e é conhecida como gíngentina. Desde então, mais de mil biflavonóides foram isolados de plantas e muitas atividades biológicas têm sido relacionadas a essa classe de substâncias (SUZART et al, 2007).

1.5. O emprego das técnicas acopladas na química de produtos naturais.

Segundo RODRIGUES et al, 2006, para o estudo de novas moléculas bioativas de origem natural, o extrato vegetal deve ser submetido, concomitantemente, a uma triagem química e biológica. O perfil metabólico de extratos brutos não é uma tarefa fácil de ser realizada em razão da diversidade de estruturas químicas presentes na planta (RODRIGUES et al 2006).

Com o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hífenadas, proporcionou um papel importante na análise e elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis, até poucos anos atrás. Isso possibilitou o estudo de extratos brutos, ou de alta complexidade, sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos. Sendo assim, estratégias de triagem química têm sido desenvolvidas através do uso dessas técnicas (RODRIGUES et al 2006).

O termo técnicas hífenadas refere-se ao acoplamento entre duas ou mais técnicas analíticas com o objetivo de obter uma ferramenta mais

eficiente e rápida comparada com as técnicas convencionais. As técnicas analíticas químicas mais empregadas na análise de produtos oriundos de plantas medicinais são a cromatografia e a espectroscopia. As técnicas a serem acopladas devem gerar informações diversas, e de caráter ortogonal. Um exemplo típico é o acoplamento de métodos de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia gasosa (GC), com técnicas espectrométricas como espectrofotômetro de UV-Vis (DAD), espectrômetro de massas (MS e MS/MS) e ressonância magnética nuclear (NMR), que fornecem informações complementares sobre a estrutura química dos componentes da amostra. A escolha do detector torna-se fundamental quando o analito se encontra em nível de traços, necessitando-se baixos limites de detecção (RODRIGUES et al 2006).

O número de informações obtidas, através dessas técnicas, é muito grande, tornando-se necessária a utilização de processadores para a obtenção e tratamento dos dados visando a sua interpretação.

Uma das vantagens das técnicas acopladas na química de produtos naturais moderna, em comparação com as técnicas espectroscópicas sem hifenação, é a baixa quantidade de analito inicial que pode ser da ordem de miligramas ou microgramas (RODRIGUES et al 2006).

1.6. Abordagem *in silico* como uma ferramenta na análise de matrizes complexas.

Em geral, extratos brutos de plantas contém uma mistura complexa com dezenas ou centenas de metabólitos (MAURI e PIETTA, 2000) e (WOLFENDER et al., 2003) o que faz necessária uma detecção eficiente e caracterização rápida de produtos naturais. Neste contexto o desenvolvimento de metodologias rápidas de detecção e identificação da matriz bruta se faz necessária, dispensando o exaustivo trabalho de isolamento que muitas vezes leva a compostos já conhecidos.

Novas metodologias de análise surgiram as quais se referem à detecção de compostos por meio de comparações com bases de dados internas e/ou comerciais que contém informações relacionadas à estrutura, propriedades espectroscópicas e físicas dos metabólitos denominadas

comumente como análise e/ou detecção *in silico* e desreplicação. Essa metodologia permite a identificação de compostos conhecidos ou direciona o estudo à apenas compostos de interesse, proporcionando desse modo a racionalização quanto ao procedimento de isolamento dos metabólitos encontrados na matriz bruta.

A técnica mais associada a esta ferramenta usualmente consiste de um sistema HPLC-MS ou HPLC-DAD-MS, apesar de muitos estudos já utilizarem HPLC-NMR e, até mesmo HPLC-MS-NMR (CROTTI et al., 2006). Na detecção *in silico* de produtos naturais por HPLC-DAD-MS, os espectros de UV e dados de MS, como massas moleculares (acuradas no caso de analisadores que permitam alta resolução) e espectros de íons produto (no caso dos espectrômetros que permitam a fragmentação em célula de colisão e a realização de MS/MS) são usualmente utilizados em conjunto com informações quimiosistemáticas da espécie analisada e banco de dados de produtos naturais como Dictionary of Natural Products (DNP) (CORDELL; SHIN, 1999; CROTTI et al., 2006; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003). Atualmente inúmeras bases de banco de dados relacionados às propriedades espectroscópicas e dados físicos de produtos naturais são criadas para acelerar este trabalho.

2. Objetivos

- Aplicar novas estratégias cromatográficas, de seleção e triagem de novos produtos, a partir de técnicas acopladas de HPLC-DAD-ESI-HRMS, de GC-FID e de desreplicação.
- Obter o perfil cromatográfico e de bioatividade de *G. gardneriana* para gerar uma abordagem racional do planejamento experimental, seleção, purificação e elucidação estrutural de micromoléculas com potencial antioxidante, antimalárico, acetilcolinesterásica, tripanocida, antifúngica e citotóxica.
- Usar a abordagem *in silico* em extratos brutos de *G. gardneriana* visando à detecção das moléculas majoritárias bioativas.

3. Materiais e Equipamentos

3.1. Equipamentos cromatográficos

Para a caracterização do perfil químico dos extratos, frações e substâncias isoladas descritas neste trabalho, foram utilizadas as seguintes técnicas cromatográficas: cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) analítico e preparativo, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-HRMS), cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e espectrometria de massas com analisador *ion-trap*.

3.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)

Para a obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos, frações e sub-frações empregou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu, bombas modelo LC-20AT, detector de arranjo de diodos UV-DAD modelo SPD-M20-A, injetor automático modelo SIL-20A, comunicador modelo CBM 20A, coluna analítica C18 Synergi, 4 μ Hydro RP80A (250 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA), uma pré-coluna: C18 Synergi, (5 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA e aquisição de dados utilizando software LC Solution versão 1.23 – SP1.

3.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (HPLC-DAD preparativo)

Utilizou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu, bombas modelo LC-6AD, detector de arranjo de diodos UV-DAD modelo SPD-M20-A, injetor manual, comunicador modelo CBM 20A, coletor de frações modelo FRC-10A, coluna preparativa C18 Synergi, 4 μ Hydro RP80A (250 X 21,20 mm, Phenomenex, Torrance, CA) e aquisição de dados utilizando software LC Solution versão 1.23 – SP1.

3.1.3. Cromatografia gasosa por Ionização de Chama (GC-FID)

As análises em GC-FID foram realizadas usando um equipamento de GC Varian, modelo CP3800 equipado com detector de ionização de chama (FID), coluna SPB5 marca Supelco (30 m X 0,25 mm e filme de 0,25 µm de espessura), empregando Hélio como gás de arraste e como gases do detector: nitrogênio, hidrogênio e ar sintético.

3.1.4. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HPLC-DAD-ESI-HRMS)

Para a obtenção dos perfis HPLC-DAD-ESI-HRMS dos extratos e frações empregou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20A, coluna analítica C18 Synergi, 4µ Hydro RP80A (250 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA) e uma pré-coluna: C18 Synergi, (5 X 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, detector de arranjo de diodos UV-DAD modelo CBM20A, injetor manual, utilizando software LC Solution, espectrômetro de massas de alta resolução ultrOToF (Bruker Daltonics), com ionização por electrospray (ESI), analisador do tipo QqToF (analisadores tipo quadrupolo, tempo de vôo em sequência), End Plate: 4000 Volts, capilar: 4500 Volts, saída do capilar: 300 Volts, skimmer 1: 55 Volts, skimmer 2 : 25 Volts, tempo de transferência: 90µs, porta de saída de colisão: 80µs, no modo de ionização negativo e como calibração interna uma solução de NA-TFA a 10 mg/mL.

3.2. Espectrometria de Massas com analisador *Ion Trap*

Para o estudo das fragmentações dos padrões de biflavonóides, foi utilizado um espectrômetro de massas tipo *ion-trap*, modelo Esquire HCT, marca Bruker Daltonics com fonte de ionização electrospray no modo negativo, situado no laboratório de análises toxicológicas do Prof. Dr. Ernani Pinto da FCF-USP-SP.

3.3. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

Para a identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foram empregadas técnicas de NMR mono e bidimensionais. Os espectros foram obtidos num espectrômetro Varian Inova® 500, operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio e em 125 MHz na frequência do carbono (11,7 T).

3.4. Solventes

Todos os solventes empregados na extração e isolamento dos constituintes químicos são da marca JT Baker®.

Para as amostras analisadas por NMR de ^{13}C e NMR de ^1H e experimentos bidimensionais foram utilizados os seguintes solventes: DMSO- d_6 , e CD_3OD . Como referência interna foi utilizado o tetrametil silano (TMS).

3.5. Balanças

Foi utilizada uma balança analítica Mettler Toledo - AG245 com capacidade para 210 g e precisão de 0,01 mg para pesagem das frações e balança Marconi BG2000 com capacidade para 2,020 g e precisão de 0,01 g para pesagem dos extratos.

3.6. Evaporador rotativo

Os extratos e frações preparados foram concentrados em evaporador rotatório da Büchi (rotavapor R-114 e waterbath B-480).

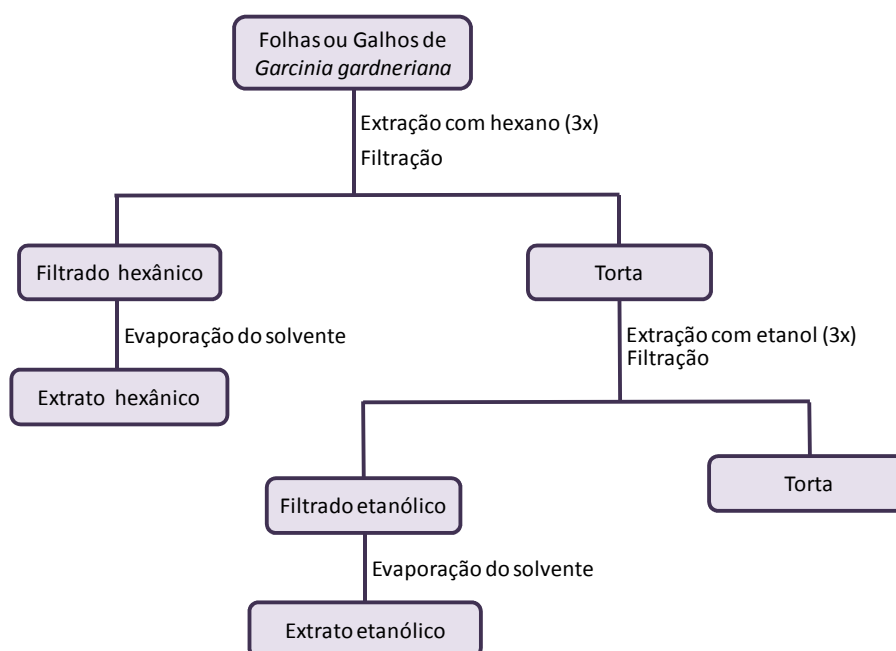
4. Procedimento Experimental

4.1. Coleta e classificação do material

As folhas e galhos da espécie *Garcinia gardneriana* utilizadas para o objeto de estudo químico e biológico foram coletados em um plantio de restauração de mata ciliar em 16/04/2008 na Fazenda Cananéia localizada no município de Cândido Mota estado de São Paulo, coordenadas: 22°47'23,9"S/50°28'4,1"W. A classificação do material botânico foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Giselda Durigan e o número da exsicata sendo o FEA 3546.

4.2. Preparação dos extratos

O material coletado foi seco e pulverizado em moinho de facas. Os galhos e folhas já pulverizados separadamente (as folhas pesando 1060 g e os galhos 1200 g) foram submetidos ao processo de extração por maceração em hexano (3x), com posterior remaceração em etanol (3x), fornecendo as soluções hexânica e etanólica. A torta foi desprezada. Essas soluções foram evaporadas a pressão reduzida e forneceram os extratos hexânicos (HEX) e etanólico (EtOH), para os galhos e folhas separadamente (**fluxograma 1 e tabela 2**).



Fluxograma 1: Método de obtenção dos extratos brutos para os galhos e também para as folhas de *G. gardneriana*.

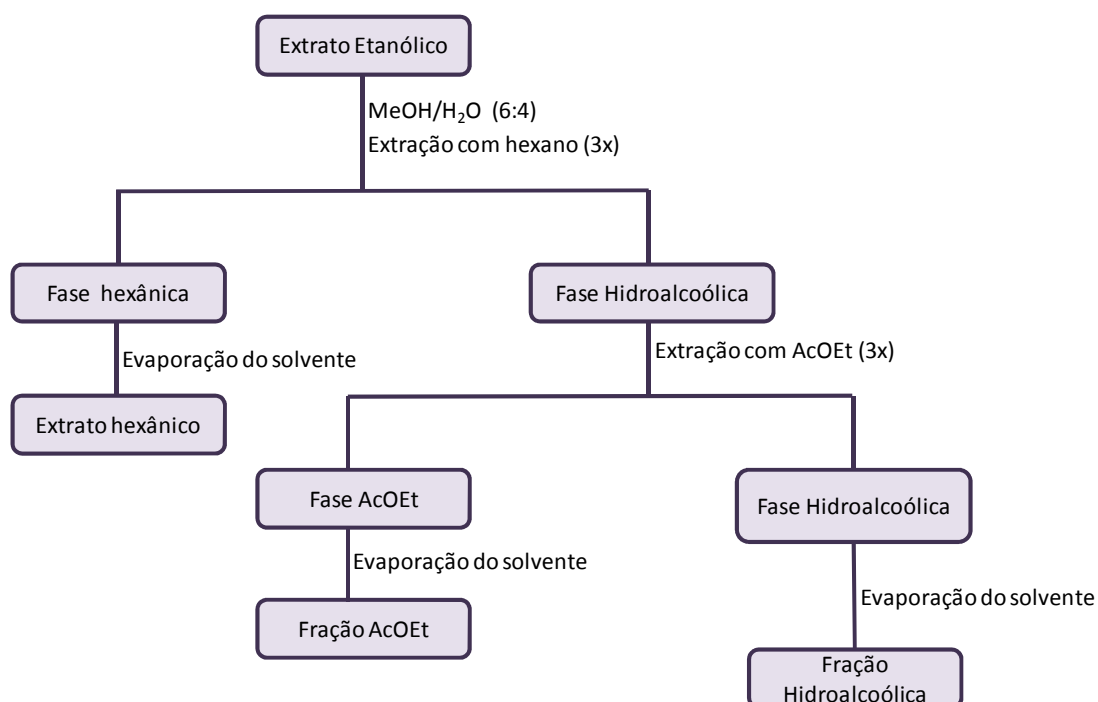
Procedimento Experimental

Tabela 2: Quantidade de extratos obtidos por maceração com solvente.

Material Vegetal	Extrato hexânico	Extrato etanólico
Folhas de <i>Garcinia gardneriana</i>	19,90 g	65,42 g
Galhos de <i>Garcinia gardneriana</i>	19,46 g	74,80 g

Uma alíquota de 15 g de cada extrato etanólico foi solubilizada em uma solução de metanol: água (6:4) e então submetido à extração líquido-líquido (ELL), empregando hexano e AcOEt como contra-fase (**fluxograma 2** e **tabela 3**). As extrações líquido-líquido foram realizadas em um funil de separação de 2000 mL e para cada solvente utilizado foram realizadas três extrações consecutivas com o volume de 400 mL de solvente a cada extração.

As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida fornecendo as frações hexânica, AcOEt e hidroalcoólica.



Fluxograma 2: Método de extração líquido-líquido para os galhos e também para as folhas de *G. gardneriana*.

Tabela 3: Quantidade em massa das frações obtidas por extração líquido-líquido.

Material Vegetal	Galhos	Folhas
Fração hexano	0,300 g	0,800 g
Fração AcOEt	9,13 g	6,0 g
Fração hidroalcoólica	3,20 g	5,7 g

4.3. Preparação das amostras para análise

4.3.1. Cromatografia gasosa

Os extratos hexânicos e frações hexânicas foram pesados (15 mg de cada amostra) e solubilizadas em 1 mL de clorofórmio. Uma coluna de vidro (20 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro) foi empacotada com 500 mg de sílica gel. Acima da sílica adicionou-se uma mistura de 50 mg de celite e 50 mg de carvão ativo. A amostra foi eluída com 10 mL de clorofórmio. Posteriormente a amostra foi re-suspendida em hexano/acetato de etila grau HPLC na concentração de 5 mg/mL.

4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

Os extratos e frações antes de serem analisadas em HPLC-DAD e HPLC-HRMS foram submetidos à extração em fase sólida (SPE) de fase reversa. A SPE de fase reversa foi utilizada por ser a técnica que elimina grande parte dos pigmentos e constituintes de baixíssima polaridade. Dessa maneira, seguiu-se o seguinte procedimento:

- Condicionamento do cartucho (C18) com 3,0 mL do eluente MeOH:H₂O (95:05).
- Solubilização do extrato ou fração (15 mg) em 1,0 mL do eluente.
- Aplicação do extrato na coluna e eluição da amostra com 5,0 mL de MeOH:H₂O (95:05).
- Filtração da amostra em membrana Millipore® (0,2 µm) e acondicionamento em frascos para injeção em HPLC.

4.4. Construção e obtenção dos perfis cromatográficos

4.4.1. Cromatografia gasosa

Os extratos hexânicos e as frações hexânicas que foram submetidos ao GC-FID, utilizou-se a coluna descrita no **item 3.1.3** e no método de análise as seguintes temperaturas: temperatura do injetor: 260 °C; temperatura do detector: 310 °C e temperatura da coluna: 250 °C (durante 12 minutos); aquecimento de 250 °C até 280 °C (6 °C/minuto); 280 °C (durante 30 minutos) obtendo-se o cromatograma do GC para cada amostra.

Para a identificação dos compostos foram utilizados padrões disponíveis no laboratório submetido às mesmas condições de análise dos extratos brutos e frações de baixa polaridade. Foi utilizado como padrão interno para todas as amostras o colesterol, e o tempo de retenção calculado para cada composto identificado foi calculado com relação ao padrão interno.

4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa

Foram obtidos os perfis cromatográficos dos extratos e frações fazendo uso de um gradiente exploratório linear (5 % de B a 100 % de B em 40 minutos seguida de mais 10 minutos com 100 % de B) utilizando como fase móvel: A (sendo 0,1 % de ácido acético, em H₂O) e B (100 % metanol), uma vazão de 1,00 mL/min., volume de injeção de 20 µL (para o modo analítico) e detecção a λ 254 nm e λ 280 nm.

4.5. Otimização dos perfis cromatográficos dos extratos e frações

A partir dos perfis cromatográficos obtidos foi realizada uma otimização das condições de separação das amostras, alterando apenas a variação da porcentagem de metanol com relação ao tempo do gradiente na fase móvel. Essa otimização teve como principal objetivo a melhor separação dos constituintes das matrizes para a posterior utilização da técnica hifenada HPLC-DAD-ESI-HRMS.

Foi aplicada as seguintes condições para as otimizações dos extratos etanólicos e frações acetato de etila (galhos e folhas): eluição no modo gradiente: 30 % a 45 % de B em 5 minutos, 45 % a 60 % de B em 25 minutos, 60 % a 100 % de B em 20 minutos, seguida de mais 10 minutos com 100 % de B e detecção a λ 254 nm. Para as frações hidroalcoólicas (galhos e folhas): também foi utilizado eluição no modo gradiente de 10 % de B a 40 % de B em 15 minutos, 40 % a 80 % de B em 25 minutos, 80 % a 100 % de B em 20 minutos, seguida de mais 10 minutos com 100 % de B e detecção a λ 254 nm.

4.6. Obtenção dos perfis HPLC-DAD-ESI-HRMS

Foram obtidos os perfis HPLC-DAD-ESI-HRMS para os extratos etanólicos e para as frações acetato de etila e fração hidroalcoólica das folhas e galhos de *G. gardneriana*.

As condições da análise por cromatografia líquida de alta eficiência, foram semelhantes às otimizadas anteriormente para cada amostra. O modo negativo foi selecionado para a detecção dos íons no espectrômetro de massas. Os dados de massa de alta resolução dos íons majoritários foram comparados aos relatados no dicionário de produtos naturais da Chapman & Hall (<http://dnp.chemnetbase.com>) e principalmente com dados obtidos na literatura visando à detecção *in silico* dos metabólitos.

4.7. Ensaio Preliminares

4.7.1. Atividade seqüestradora de radicais livres: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

Os extratos e frações (1 mg de cada amostra) foram solubilizados em 1 mL de MeOH e diluídos nas seguintes concentrações: 66,7; 33,3; 10,0; 6,67; 3,33; 2,67; 1,67 µg/mL.

Como controle positivo utilizou-se a rutina nas mesmas concentrações e como controle negativo a solução de DPPH e metanol. A solução de DPPH (200 µM) foi preparada em CH₃OH.

Numa placa de 96 poços, foram adicionados em triplicata: Amostras: 200 µL de DPPH e 100 µL de amostra em diversas diluições. Controle positivo: 200 µL de DPPH e 100 µL de antioxidante padrão. Controle negativo: 200 µL de DPPH e 100 µL de solvente. A placa foi mantida por 30 minutos no escuro. A avaliação da forma reduzida do DPPH gerado foi determinada através da diminuição da absorbância a 517 nm. (SON E LEWIS, 2002, PAULETTI et al. 2003).

Este ensaio foi realizado pela bolsista Scheila C.G. Skrzek, no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE.

4.7.2. Ensaio *in vitro* de inibição da polimerização da heme

O ensaio foi baseado no artigo de BAELMANS et al 2000, com algumas modificações. Este teste consistiu na incubação em recipientes eppendorf de 1,5 mL por 24 horas a 37 °C das seguintes soluções: 50 µL de extratos e frações dissolvidos em DMSO (a concentração final de 2,5 mg/mL), DMSO (50 µL) para os controles, com 100 µL de heme (6,4 mM de heme dissolvida em 0,2 N NaOH, 4,16 mg em 1000 µL, preparada 60 minutos antes da execução do ensaio, incubada a 37 °C e protegida da luz), 200 µL de acetato de sódio 0,5 M e 50 µL de ácido acético. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 min e, o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado duas vezes, com 400 µL de DMSO e 400 µL de metanol, e dissolvido em 1000 µL de NaOH 0,1 M. Alíquotas de 20 µL da β-hematina foram transferidas para uma placa de 96 poços junto com 180 µL de NaOH 0,1 M, e,

posteriormente lidas a 405 nm no leitor de microplacas. Quinina e cloroquina foram utilizados como controle positivo. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição da polimerização do heme e calculados pelo programa KC4 versão 3.4 fazendo uso da fórmula a seguir.

$$\% \text{ inibição da formação de } \beta\text{-hematina} = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) * 100 /$$

Este ensaio foi realizado pela bolsista Scheila C.G. Skrzek, no Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais - NuBBE.

4.7.3. Atividade acetilcolinesterásica

Os extratos e frações foram dissolvidos em metanol (20 mg/mL). Uma amostra de 200 µg (10 µL) de cada amostra de extrato ou fração foi analisada em CCD de sílica gel 60 F254 (0,2 mm, MERCK). Como controle positivo foi utilizado fisostigmina (1 µg) dissolvida em metanol. As placas cromatográficas foram eluídas com a fase móvel hexano/AcOEt (1:1) para as frações hexânicas e hexano/AcOEt/MeOH (40:48:12) para os extratos EtOH e demais frações (AcOEt e hidroalcoólica) das folhas e galhos de *G. gardneriana*.

Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%) e o solvente evaporado novamente. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com uma mistura das soluções: etanólica de 1-naftil acetato (5 mL; 0,25 %) e aquosa do sal Fast Blue B (20 mL; 0,25%). Os resultados obtidos onde houve inibição da enzima acetilcolinesterase foram observados e fotografados a λ 254 nm e 366 nm em câmera fotográfica Epson e os valores de Rf calculados onde houve inibição da reação. Este ensaio foi realizado pela técnica Maura Casari, responsável por este ensaio no Instituto de Botânica da USP - SP.

4.7.4. Atividade antifúngica

O fungo filamentoso e sapróbio *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, SPC¹ - 1485² e o fungo filamentoso *C. cladosporioides* (Fresen) de Vries SPC - 140³ foram utilizados como fungos reveladores nos bioensaios de detecção de substâncias fungitóxicas deste projeto.

Para a obtenção das cepas, os fungos foram semeados com a ajuda de uma alça de platina na superfície do meio de cultura BDA, incubadas a 22 °C, no escuro, por 14 dias.

Para a obtenção de esporos, preparou-se uma solução de sais minerais e glicose na proporção de 6:1 com a qual se fez a extração dos esporos do fungo, com o auxílio de um pincel. A suspensão é filtrada em um funil contendo gaze, e estocada à temperatura de 18 °C para posterior nebulização nas cromatografias em camada delgada.

Amostras dos extratos brutos e suas frações foram submetidas a cromatografia em camada delgada com sistemas de solventes: hexano/AcOEt (1:1) para as frações hexânicas e hexano/AcOEt/MeOH (40:48:12) para os extratos EtOH e demais frações (AcOEt e hidroalcoólica) das folhas e galhos de *G. gardneriana*. Após desenvolvimento da cromatografia e completa evaporação do solvente, as cromatoplasmas foram nebulizadas com a suspensão de esporos do fungo *C. cladosporioides* e/ou *C. sphaerospermum* e incubadas em câmara úmida a 25 °C, no escuro, por 48 horas, segundo método de HOMANS & FUCHS (1970). O ensaio foi realizado pela técnica Vanessa Fuentes, responsável por este ensaio no Instituto de Botânica da USP.

¹ SPC - Micoteca do Instituto de Botânica de São Paulo.

² 1485 - número de identificação *C. sphaerospermum* na Micoteca.

³ 140 - número de identificação *C. cladosporioides* na Micoteca.

4.7.5. Atividade tripanocida

Os testes para determinação da atividade tripanocida foram realizados pela pós doutoranda Daniela Ambrósio sob a supervisão da Prof^a Dr^a Regina Maria Barreto Cicarelli na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Campus de Araraquara.

O teste colorimétrico MTT foi descrito por MUELAS-SERRANO; NOGAL-RUIZ; GOMEZ-BARRIO, 2000 utilizando formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y). Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, na câmara de fluxo laminar. Para o teste são colocados 3 µL da substância em cada concentração desejada (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL, respectivamente), não ultrapassando o limite de 3 % de DMSO, uma vez que porcentagens superiores mostram-se tóxicas para o parasita. A seguir, são adicionados 97 µL de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* na concentração desejada nos poços para teste e 97 µL de meio LIT nos poços controles. São realizados 2 controles, um na ausência do parasita para cada poço teste, mas na presença da substância e outro na ausência dessa, mas contendo parasitas.

A placa foi incubada em câmara úmida a 28 °C (BOD) por 72 horas. A seguir, adiciona-se 10 µL de solução MTT/PMS (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS) em todos os poços, ao abrigo da luz por 75 minutos a 28 °C. Coloca-se então 100 µL da solução 10 % SDS-0,01N HCl, incubando à temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. A leitura da densidade óptica (DO) é realizada em espectrofotômetro (Leitor de ELISA - BioRad) a 595 nm e os resultados são obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitas mortos, C % (citotoxicidade) - é calculada segundo a equação abaixo: (MUELAS-SERRANO; NOGAL-RUIZ; GOMEZ-BARRIO, 2000).

$$\%C = [(Gc \times Gp)/Gc] \times 100$$

$$Gc = Ac - Am$$

$$Gp = Ap - Apm$$

Sendo que, **Gc** representa o número de parasitas/mL nos poços

controles e **Gp** representa o número de parasitas/mL detectados em diferentes concentrações da substância. **Ac** corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de substância) com parasitas; **Am** corresponde ao valor da absorbância nos poços controle (na ausência de substância) sem parasita; **Ap** representa o valor da absorbância nos testes e **Apm** representa o valor da absorbância das diferentes concentrações de substância na ausência do parasita.

4.7.6. Atividade citotóxica

As linhagens de células tumorais utilizadas, HL-60 (Leucemia promielocítica humana), HCT-8 (carcinoma de cólon humano) e SF-295 (Glioblastoma humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5 % de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril, sendo testadas em concentração única de 25 mg/mL para extrato e as frações foram testadas na concentração de 12,5 mg/mL e adicionadas em placa de 96 poços (100 µL/poço) usando sistema automatizado de plaqueamento (High Throughput Screening). A doxorubicina (Dox) foi usada como controle positivo na concentração de 0,3 mg/mL, pois já é um quimioterápico de eficácia comprovada. O controle negativo foi tratado apenas com o veículo de diluição da substância em estudo (DMSO 1%).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ cel/mL para a linhagem HL-60, $0,1 \times 10^6$ para a linhagem SF-295 e $0,7 \times 10^5$ para a linhagem HCT-8, após 24 horas foram adicionadas as amostras. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5 % de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e os sobrenadantes, removidos. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução de MTT 10% (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Este ensaio foi realizado no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, sob responsabilidade da Prof^a Dra Cláudia do Ó Pessoa.

4.7.7. Ensaio antifúngico contra *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de *Candida*.

Para esse ensaio foram utilizados os microrganismos *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90012. Os microrganismos foram obtidos a partir do laboratório de micologia do departamento de análises clínicas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Araraquara (SP), Brasil. As leveduras foram cultivadas e mantidas em ágar sabouraudextrose por 24 horas para as espécies de *Candida* e 48 horas para *Cryptococcus neoformans*, em temperatura ambiente.

Os extratos foram preparados em DMSO e colocados em microplacas contendo meio RPMI 1640 com L-glutamina em pH 7,0 e 0,165 mol.L⁻¹ ácido morfolinpropanosulfônico (MOPS) suplementado com 2 % de glicose, até a concentração dos extratos de 250 µg/mL. A suspensão de células foi preparada em solução salina 0,85 % com densidade ótica 0,5 padrão McFarland e diluídas 1:100 em RPMI até concentração final de 1x10⁴ a 5x10⁴ unidades formadoras de colônias por mL (CFU mL⁻¹). Esta solução foi inoculada nas microplacas contendo os extratos em concentrações de 250 µg/mL a 0,4 µg/mL. As placas foram incubadas com agitação a 37 °C por 24 horas para espécies de *Candida* e 48 horas para *Cryptococcus neoformans*. O controle utilizado foi anfotericina B diluída em DMSO, no intervalo de concentração de 0,03 a 16 µg/mL. A CIM (concentração inibitória mínima), para o controle foi à concentração mais baixa que inibiu completamente o crescimento dos fungos. A CIM foi definida como a concentração mínima capaz de inibir qualquer crescimento fungíco visível. Extratos exibindo um MIC menor que 75,0 µg/mL consideram-se com atividade antimicrobiana forte, de 75,0 para 150,0 µg/mL, a atividade antimicrobiana foi considerada como moderada, de 150,0-250,0 µg/mL fraca, e mais de 250,0 µg/mL, o extrato foi considerado inativo. Os resultados foram analisados em espectrofotômetro (SCORZONI *et al*, 2007).

5. Resultados e Discussões

5.1. Análise do perfil GC-FID dos extratos e frações hexânicas.

De acordo com a metodologia empregada, foi calculado o tempo de retenção relativo (T.R.R) com aquele apresentado pelo padrão colesterol. A operação foi realizada para cada tempo de retenção encontrado nos extratos e frações analisados sendo possível identificar um total de 10 compostos. A **tabela 4** apresenta os padrões utilizados para a comparação do tempo de retenção relativo (T.R.R.) ao colesterol, as **tabelas 5, 6, 7 e 8** apresentam os resultados obtidos para cada amostra analisada e a **figura 5** os cromatogramas obtidos.

Todos os compostos identificados (**figura 6**) pertencem à classe dos terpenos. Eles caracterizam-se como um grupo de constituintes com esqueleto carbônico múltiplos de unidades C_5 e podem ser classificados de acordo com o número de carbonos em monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesteteterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Os triterpenos podem possuir esqueletos carbônicos acíclicos mono-, di-, tri-, tetra ou pentacíclicos, sendo que os últimos representam a classe dominante e mais amplamente investigada (MAHATO; KUNDU, 1996).

Devido à mistura de alta complexidade dos compostos nos extratos e frações de baixa polaridade, a cromatografia gasosa tem sido considerada uma poderosa técnica analítica para a identificação dessa classe de compostos devido à rápida identificação, confiabilidade dos resultados e pequenas quantidades de amostra utilizada quando comparada às técnicas de separação e isolamento (fitoquímica clássica) na química de produtos naturais. (REGASINI et al., 2009).

Tabela 4: Padrões utilizados para a identificação com seu devido tempo de retenção relativo (TRR) ao colesterol.

Padrão	Tempo de Retenção Relativo ao Colesterol (padrão) - TRR
Esqualeno	-
α -amirina	1,38
β -amirina	1,32
Lupeol	1,39
Taraxerol	1,29
Acetato de α -amirina	1,57
Acetato de β -amirina	1,49
Acetato de lupeol	1,58
Acetato de taraxerol	1,46
Acetato de friedelanol	1,82
Friedelina	1,58
Lupenona	1,34
α -amirenona	1,34
β -amirenona	1,28
Germaniconona	1,26
Campesterol	1,13
Estigmasterol	1,18
β -sitosterol	1,26

É possível observar nos cromatogramas obtidos (**figura 5**), que o perfil dos extratos e frações de baixa polaridade da espécie em estudo apresenta uma semelhança em seus perfis químicos. Os compostos tais como: lupeol, acetato de β -amirina, friedelina, estigmasterol, β -sitosterol foram identificados em todos os extratos e frações de baixa polaridade justificando ainda mais a necessidade da identificação através de dados contidos em banco de dados, evitando o reisolamento de compostos já conhecidos.

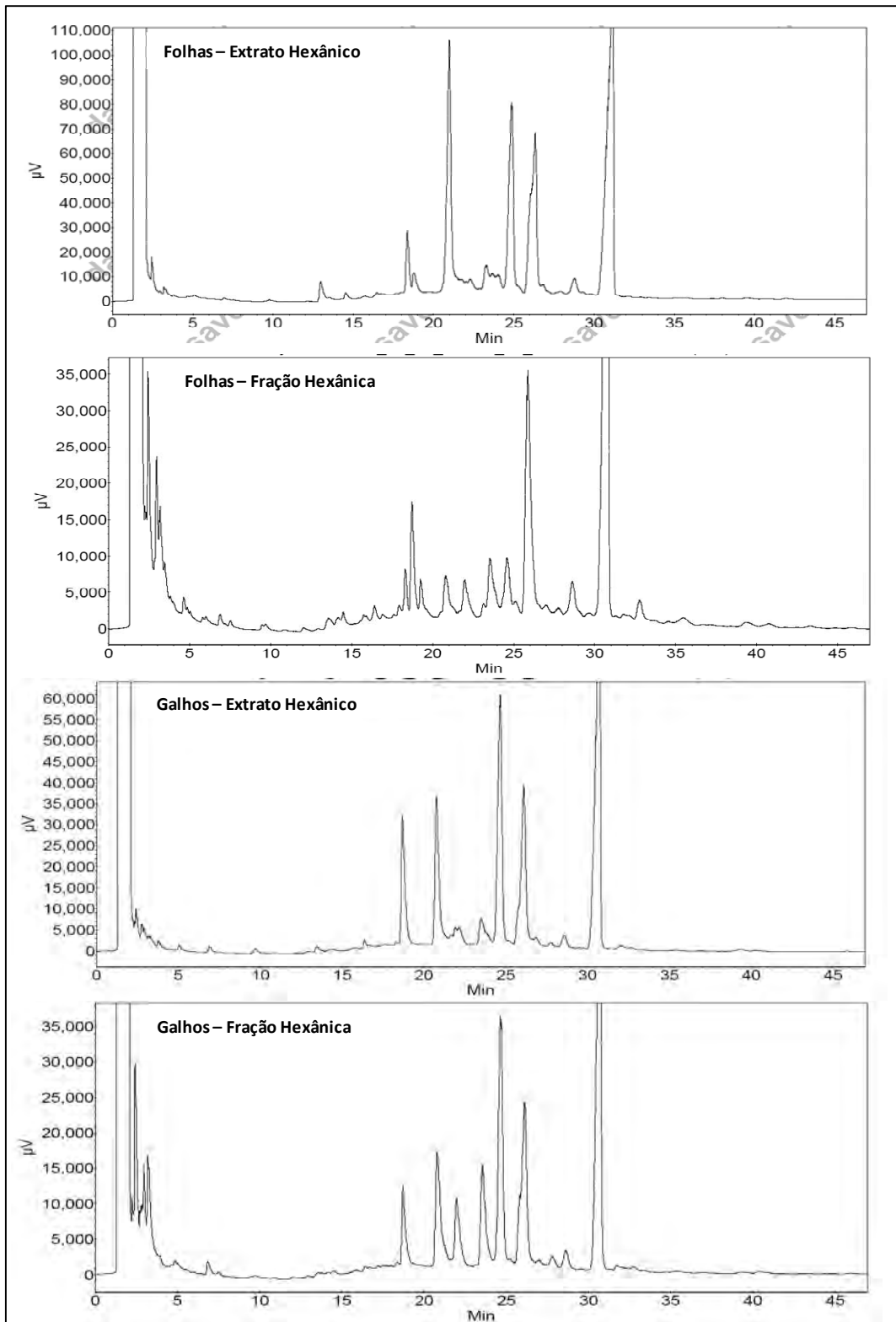


Figura 5: Cromatogramas obtidos por GC-FID dos extratos hexânicos e das frações hexânicas de *G. gardneriana*.

Resultados e Discussões

Tabela 5: Identificação dos compostos no extrato hexânico das folhas.

Composto	Tempo de Retenção (T.R)	T. Retenção Relativo Obtido (T.R.R)	Composto Identificado, TRR
Padrão Interno	18,80	1,00	Colesterol - 1,00
TR1	21,00	1,12	Campesterol - 1,13
TR2	21,80	1,16	N.I
TR3	22,01	1,17	Estigmasterol - 1,18
TR4	22,33	1,19	N.I
TR5	23,26	1,24	N.I
TR6	23,67	1,26	β -Sitosterol - 1,26
TR7	24,06	1,28	β -Amirina - 1,28
TR8	24,89	1,32	β -Amirina - 1,32
TR9	26,35	1,40	Lupeol - 1,39
TR10	26,87	1,43	N.I
TR11	27,91	1,48	Acetato de β -Amirina - 1,49
TR12	28,79	1,53	N.I
TR13	29,37	1,56	Acetato de α -Amirina - 1,57
TR14	29,84	1,59	Friedelina - 1,58
TR15	31,18	1,66	N.I
TR16	32,21	1,71	N.I
TR17	32,87	1,75	N.I
TR18	33,47	1,78	N.I
TR19	35,10	1,87	N.I
TR20	35,70	1,90	N.I
TR21	38,01	2,02	N.I
TR22	39,52	2,10	N.I

Tabela 6: Identificação dos compostos na fração hexânica das folhas.

Composto	Tempo de Retenção (T.R)	T. Retenção Relativo Obtido (T.R.R)	Composto Identificado
Padrão Interno	18,72	1,00	Colesterol - 1,00
TR1	19,25	1,03	N.I
TR2	20,79	1,11	N.I
TR3	21,97	1,17	Estigmasterol - 1,18
TR4	23,09	1,23	N.I
TR5	23,54	1,26	β -Sitosterol - 1,26
TR6	24,60	1,31	β -Amirina - 1,32
TR7	25,18	1,35	Lupenona - 1,34
TR8	25,87	1,38	α -Amirina - 1,38
TR9	26,99	1,44	N.I
TR10	27,76	1,48	Acetato de β -Amirina - 1,49
TR11	28,61	1,53	N.I
TR12	29,61	1,58	Friedelina - 1,58
TR13	30,81	1,65	N.I
TR14	31,26	1,67	N.I
TR15	31,74	1,70	N.I
TR16	32,75	1,75	N.I
TR17	35,46	1,89	N.I
TR18	39,34	2,10	N.I

Resultados e Discussões

Tabela 7: Identificação dos compostos no extrato hexânico dos galhos.

Composto	Tempo de Retenção (T.R)	T. Retenção Relativo Obtido (T.R.R)	Composto Identificado – T.R.R (obtido)
Padrão Interno	18,70	1,00	Colesterol – 1,00
TR1	19,95	1,07	N.I
TR2	20,77	1,11	N.I
TR3	21,64	1,16	N.I
TR4	21,89	1,17	Estigmasterol - 1,18
TR5	22,18	1,19	N.I
TR6	23,48	1,26	β -Sitosterol - 1,26
TR7	24,65	1,32	β -Amirina - 1,32
TR8	25,21	1,35	Lupenona - 1,34
TR9	26,11	1,40	Lupeol - 1,39
TR10	26,84	1,44	N.I
TR11	27,75	1,48	Acetato de β -Amirina - 1,49
TR12	28,58	1,53	N.I
TR13	29,52	1,58	Friedelina - 1,58
TR14	30,74	1,64	N.I
TR15	32,03	1,71	N.I
TR16	32,69	1,75	N.I
TR17	34,59	1,85	N.I
TR18	35,40	1,89	N.I
TR19	36,89	1,97	N.I
TR20	39,37	2,11	N.I
TR21	40,29	2,15	N.I
TR22	42,88	2,29	N.I

Tabela 8: Identificação dos compostos na fração hexânica dos galhos.

Composto	Tempo de Retenção (T.R)	T. Retenção Relativo Obtido (T.R.R)	Composto Identificado
Padrão Interno	18,71	1,00	Colesterol – 1,00
TR1	20,79	1,11	N.I
TR2	21,97	1,17	Estigmasterol - 1,18
TR3	23,54	1,26	β -Sitosterol - 1,26
TR4	24,62	1,32	β -Amirina - 1,32
TR5	25,22	1,35	Lupenona - 1,34
TR6	26,11	1,40	Lupeol - 1,39
TR7	26,96	1,44	N.I
TR8	27,77	1,48	Acetato de β -Amirina - 1,49
TR9	28,63	1,53	N.I
TR10	29,58	1,58	Friedelina - 1,58
TR11	30,70	1,64	N.I
TR12	31,74	1,70	N.I
TR13	32,77	1,75	N.I
TR14	33,36	1,78	N.I
TR15	34,60	1,85	N.I
TR16	35,48	1,90	N.I
TR17	36,93	1,97	N.I
TR18	39,31	2,10	N.I

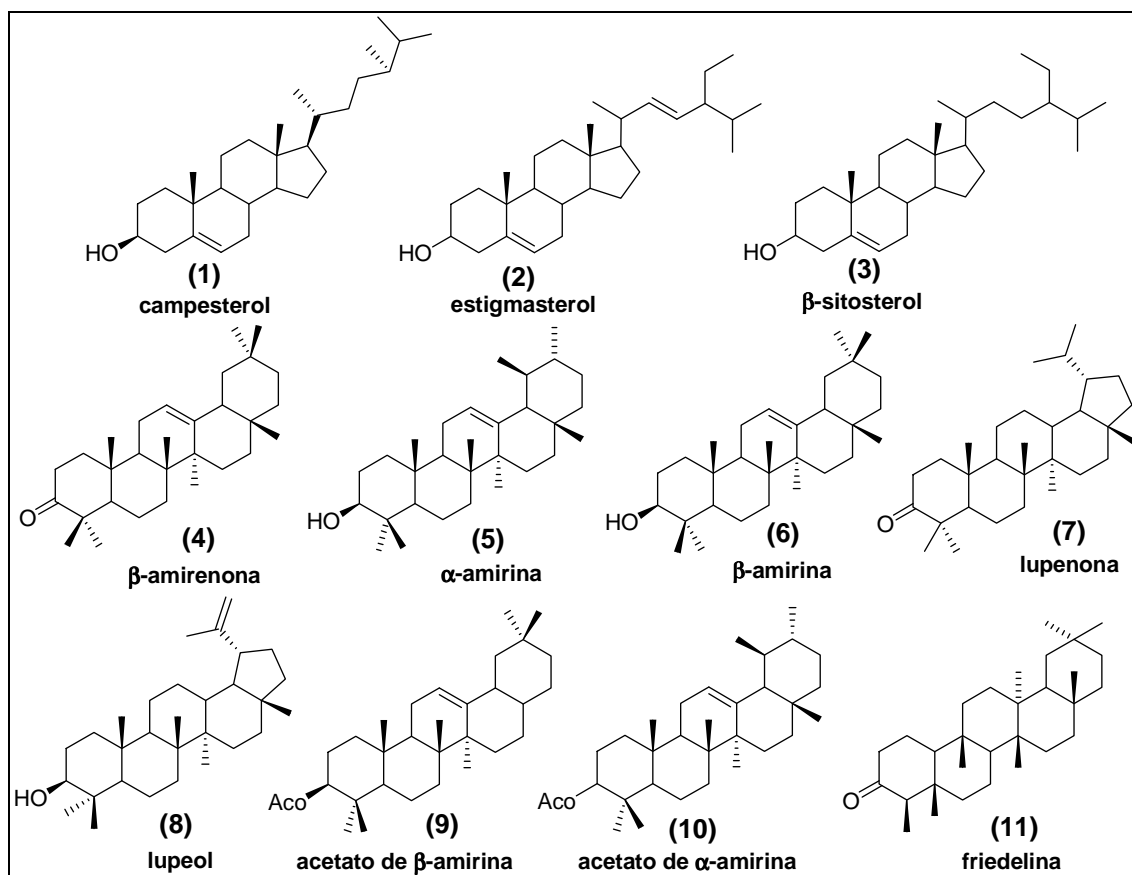


Figura 6: Compostos identificados nos extratos e frações de baixa polaridade.

5.2. Análise do perfil cromatográfico dos extratos e frações

Através do perfil cromatográfico obtido para cada extrato e fração de ambas as partes (galhos e folhas) apresentadas nas **figuras 8 e 9** observam-se semelhanças entre os extratos etanólicos e frações, os quais revelam a presença de compostos de média polaridade.

As frações hexânicas e hidroalcoólica das folhas e galhos confirmam a eficiência da extração líquido-líquido, sendo que na fração hexano dos galhos quantidades remanescentes de compostos de média polaridade também foram extraídas.

Uma análise preliminar com os dados do UV indica que a maioria das bandas cromatográficas existentes nos extratos etanólicos e fração AcOEt dos galhos e das folhas apresentam o mesmo perfil de bandas característico de

Resultados e Discussões

flavonóides com dois intervalos de máxima absorção entre 230-295 nm referente à banda II e 300-550 nm referente à banda I. A posição precisa e as intensidades relativas desses máximos fornecem informações da natureza do flavonóide e de seu padrão de oxigenação. Desse modo, diferentes substituições no anel A normalmente são evidenciadas por alteração na posição e/ou intensidade na banda II, enquanto que alterações nos anéis B e C resultam em alterações na banda I (**figura 7**) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Nos constituintes majoritários descritos neste trabalho, observam-se perfis semelhantes nos dados do ultravioleta em λ 254 nm, sendo que as pequenas diferenças nos valores e em suas intensidades deve-se às pequenas alterações nas substituições dos anéis A, B e C das duas unidades flavonoídicas.

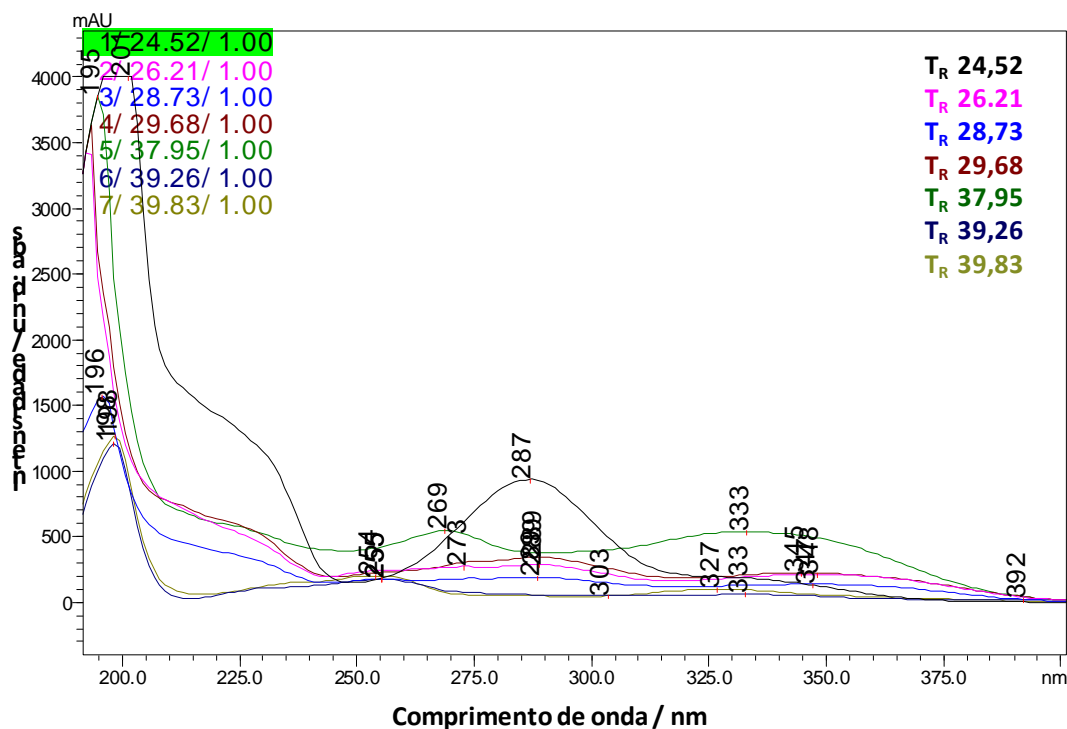


Figura 7: Espectro de UV de algumas bandas cromatográficas majoritárias presentes no extrato etanólico das folhas de *G. gardneriana*.

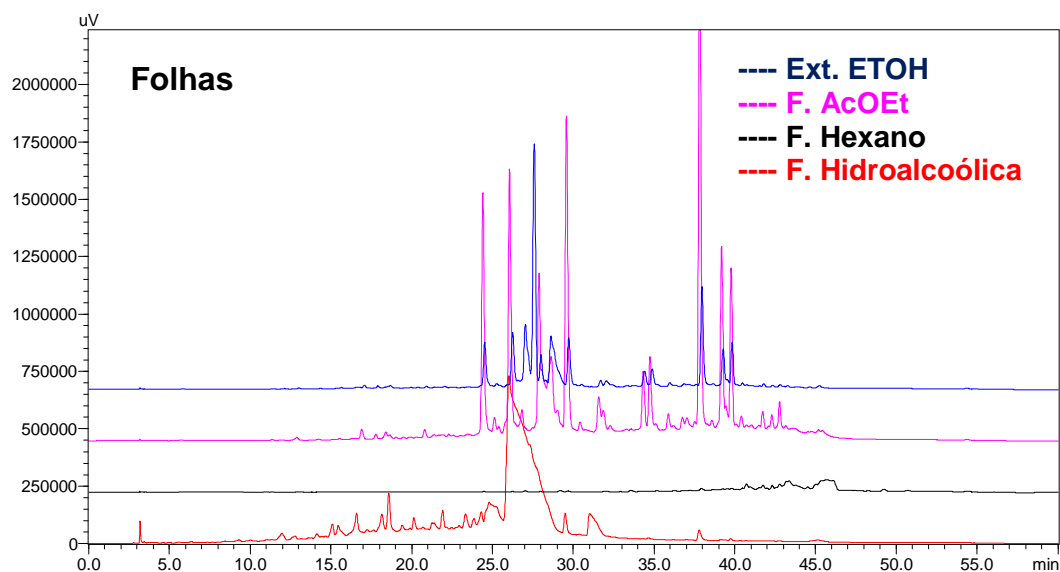


Figura 8: Perfil cromatográfico obtido em gradiente exploratório para o extrato etanólico (Ext. EtOH) e suas respectivas frações das folhas de *G. gardneriana*. Condições de eluição: 5 % de B a 100 % de B em 40 minutos seguida de mais 10 minutos com 100 % de B e detecção a λ 254 nm.

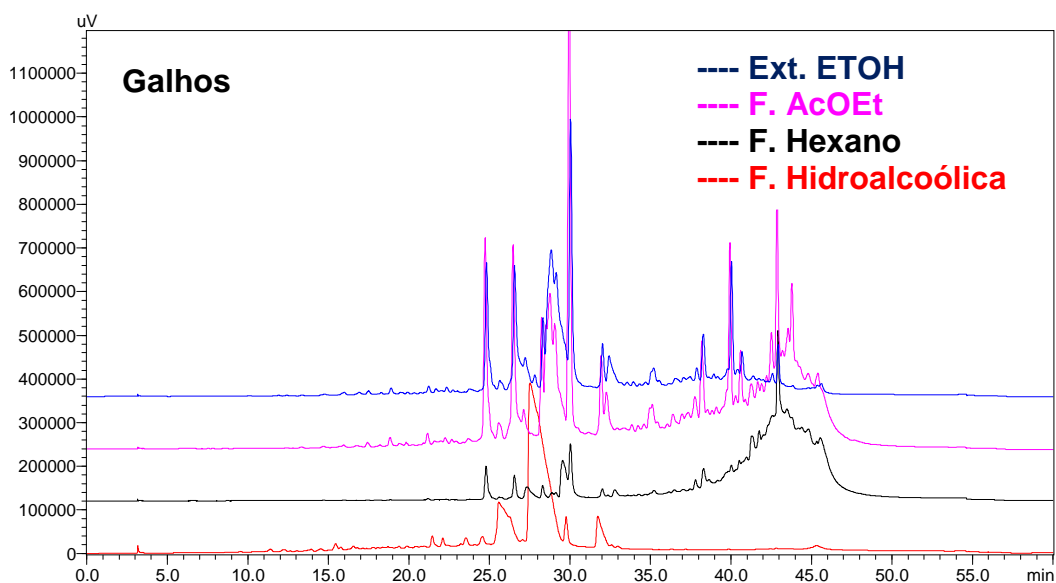


Figura 9: Perfil cromatográfico obtido em gradiente exploratório para o extrato etanólico (Ext. EtOH) e suas respectivas frações dos galhos de *G. gardneriana*. Condições de eluição: 5 % de B a 100 % de B em 40 minutos seguida de mais 10 minutos com 100 % de B e detecção a λ 254 nm.

Diante da grande quantidade de bandas cromatográficas entre os 20 e 40 min. apresentadas nos cromatogramas, foi necessário o desenvolvimento de uma otimização dos perfis cromatográficos visando uma melhor separação dos compostos para a posterior análise em HPLC-DAD-ESI-HRMS.

Observa-se uma similaridade do perfil cromatográfico do extrato etanólico (ext. EtOH) e sua fração acetato de etila (F. AcOEt) tanto para as folhas bem como para os galhos. A partir dessa observação aplicou-se a mesma condição de otimização para essas amostras como mostra os cromatogramas (**figuras 10 e 11**). As frações hidroalcoólica (galhos e folhas) que constituem as substâncias mais polares, foram otimizadas de maneira independente (**figura 12**).

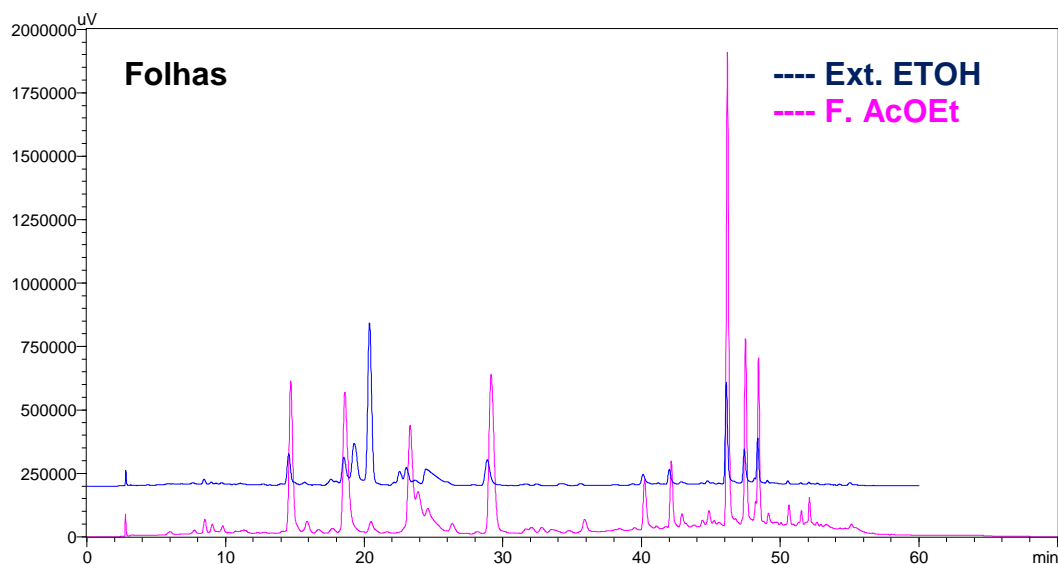


Figura 10: Otimização cromatográfica obtida para o extrato etanólico e F. AcOEt das folhas. Eluição no modo gradiente: 30 % a 45 % de B em 5 minutos, 45 % a 60 % de B em 25 minutos, 60 % a 100 % de B em 20 minutos, seguida de mais 10 minutos com 100 % de B e detecção a λ 254nm.

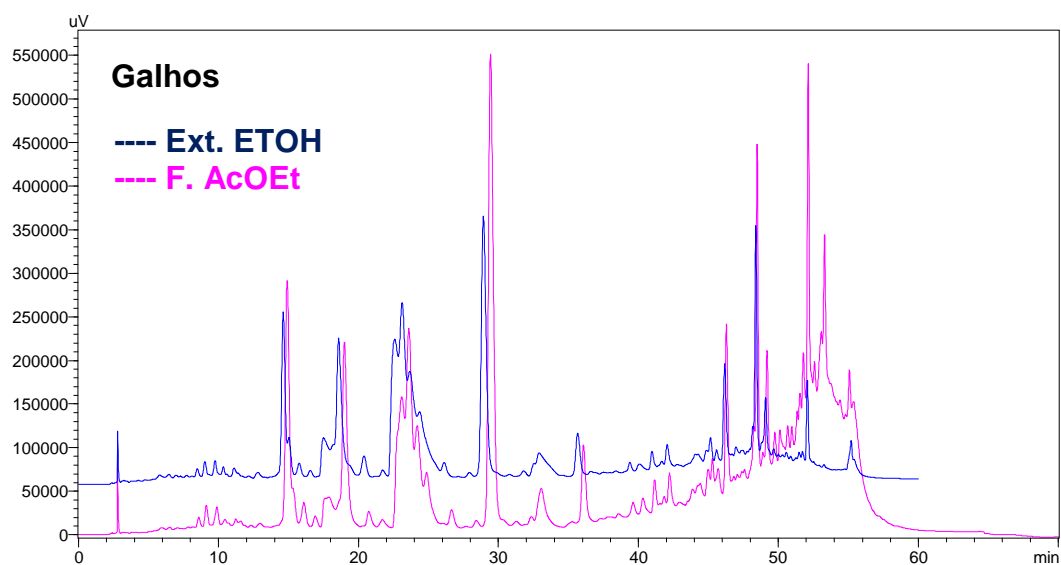


Figura 11: Otimização cromatográfica obtida para o extrato etanólico e F. AcOEt dos galhos. Eluição no modo gradiente: 30 % a 45 % de B em 5 minutos, 45 % a 60 % de B em 25 minutos, 60 % a 100 % de B em 20 minutos, seguida de mais 10 minutos com 100 % de B e detecção a λ 254 nm.

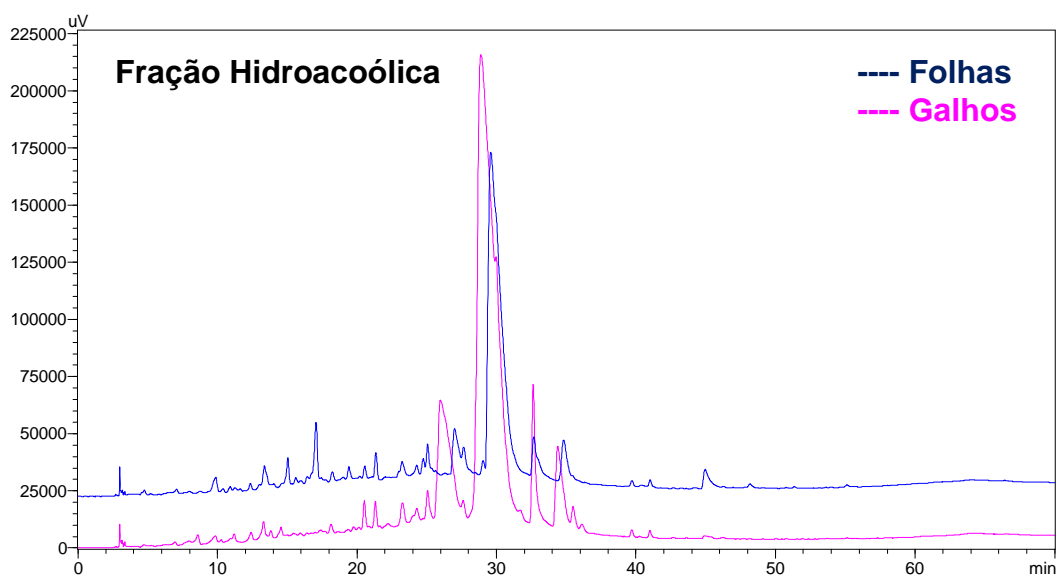


Figura 12: Otimização cromatográfica obtida para a fração hidroalcoólica (F. hidro) das folhas e galhos. Eluição no modo gradiente: 10 % de B a 40 % de B em 15 minutos, 40 % a 80 % de B em 25 minutos, 80 % a 100 % de B em 20 minutos, seguida de mais 10 minutos com 100 % de B e detecção a λ 254nm.

A fração AcOEt das folhas e a fração AcOEt dos galhos foram as frações que despertaram maior interesse por serem as mais ricas em bandas cromatográficas e, portanto representativas dos extratos etanólicos brutos se comparado com os perfis cromatográficos iniciais e, por apresentar, diversos resultados positivos frente a alguns ensaios biológicos preliminares descritos no **item 5.7**.

Diante dessas observações, iniciou-se o estudo e a detecção *in silico* com as frações acetato de etila das folhas e galhos.

5.3. Análise do perfil HPLC-DAD-ESI-HRMS dos extratos e frações

Os cromatogramas de íon totais (TIC), apresentado nas **figuras 13 e 14**, obtidos pelo acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas de alta resolução fazendo uso de modo de ionização por electrospray no modo negativo. Neste modo observa-se uma boa ionização das moléculas devido, provavelmente, à presença de grande quantidade de substâncias fenólicas presentes nos extratos e frações.

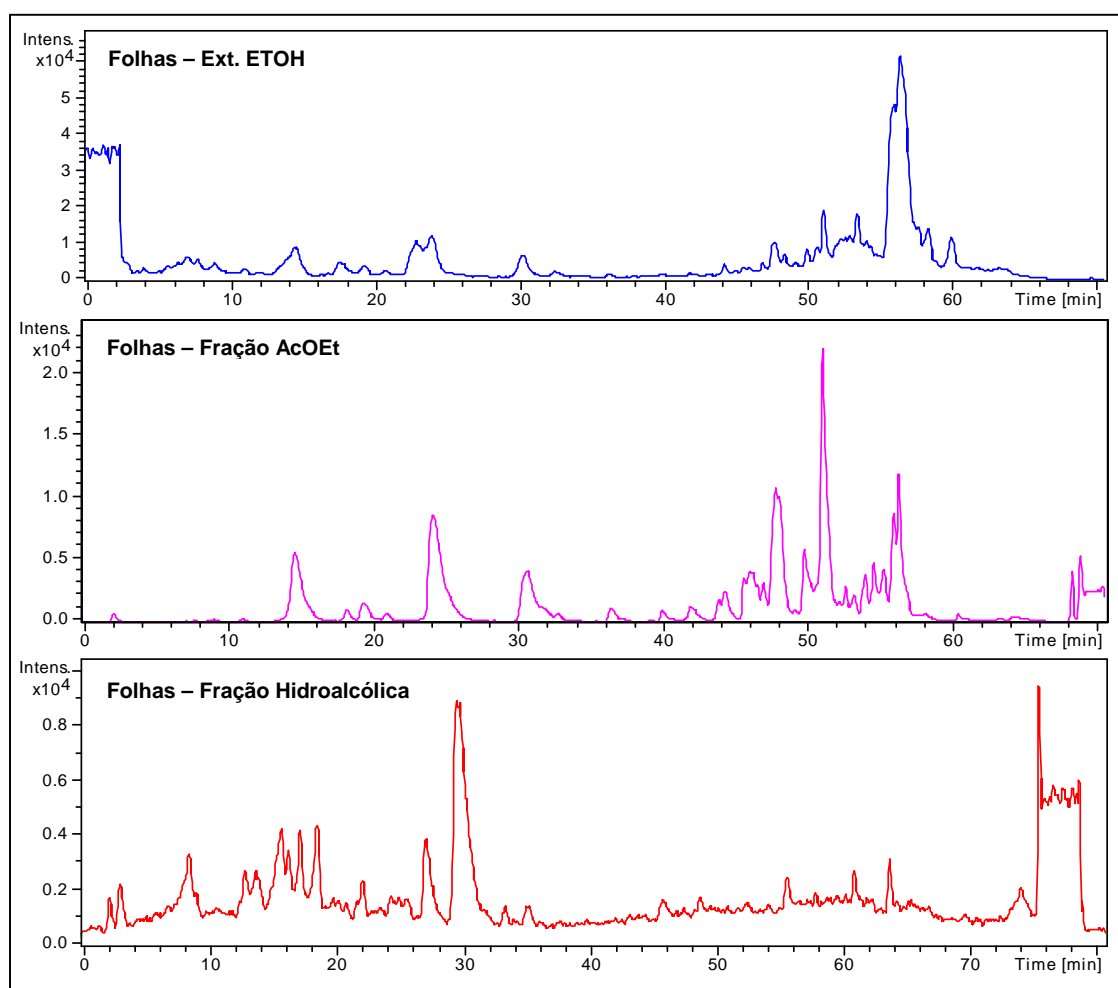


Figura 13: Obtenção dos perfis HPLC/DAD/HRMS (TIC) para o extrato etanólico, frações AcOEt e hidroalcoólica das folhas no modo negativo.

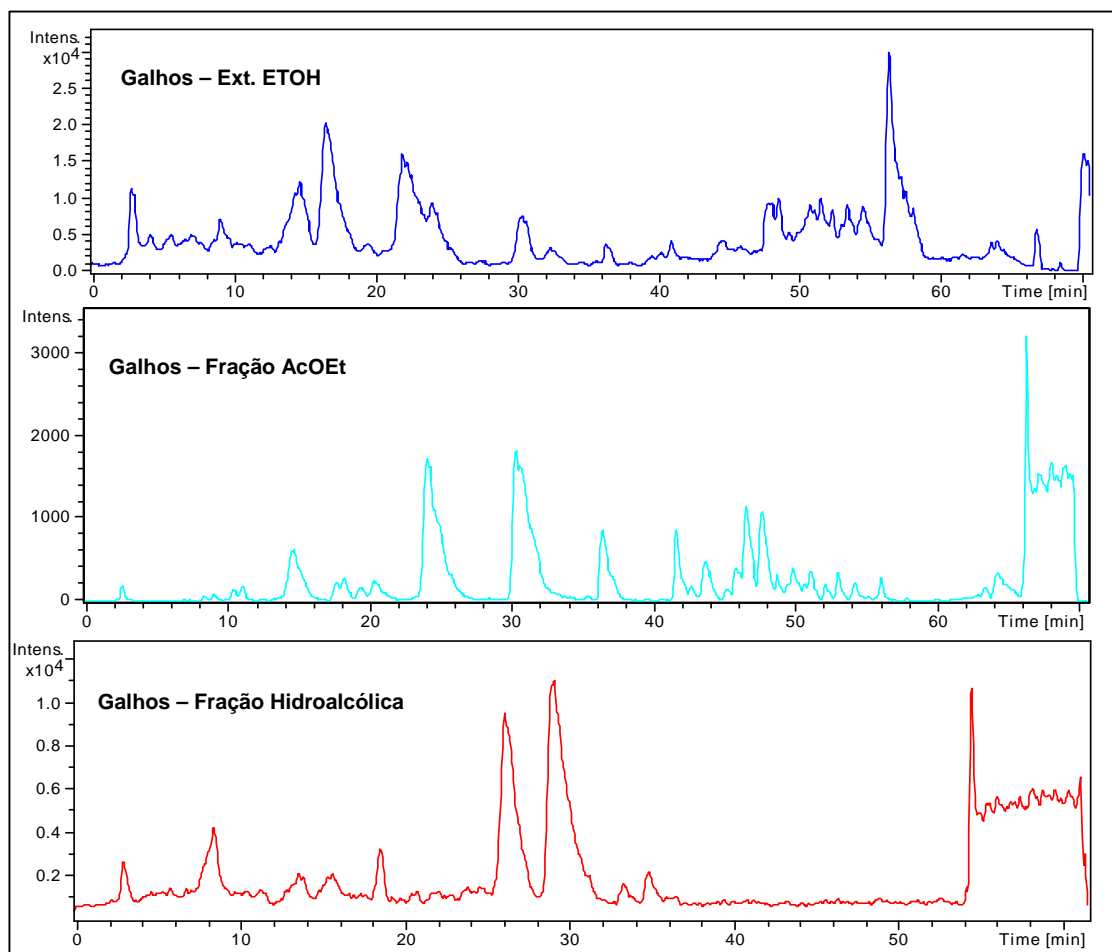


Figura 14: Obtenção dos perfis HPLC/DAD/HRMS (TIC) para o extrato etanólico e frações AcOEt e hidroalcolica dos galhos no modo negativo.

5.4. Análise *in silico* utilizando HPLC-DAD-HRMS

A análise dos íons detectados foi realizada através da comparação dos dados de massa de alta resolução obtidos principalmente da revisão bibliográfica e também da base de dados do dicionário de produtos naturais (DNP) com os íons evidenciados experimentalmente. O erro considerado para efetuar a comparação, foi menor que 50 ppm, com relação à massa experimental observada. Os espectros de massas foram selecionados tomando-se como referência os t_r das substâncias.

Foram detectados em ambas as frações (fração AcOEt das folhas e fração AcOEt dos galhos) nos TICs (**tabela 9** e **figura 15**) 10 compostos (sendo 9 compostos pertencentes à classe dos biflavonóides e 1 composto pertencente à classe das benzofenonas): xantochimusídeo (**12**), GB2 (**13**),

Resultados e Discussões

fukugisídeo ou morelloflavona 7''-O-glicosídeo (**14**), GB1a glicosilado (**15**), GB2a (**16**), morelloflavona ou fukugetin (**17**), volkensiflavona (**18**), amentoflavona (**19**), podocarpusflavona (**20**) e 7-epiclusianona (**21**).

O uso da análise MS-ESI-MS², na maioria dos compostos detectados também foi essencial para a discussão, justificação e confirmação dos fragmentos produtos, através de propostas racionais de fragmentação.

Tabela 9: Compostos detectados nas frações acetato de etila dos galhos e folhas de *G. gardneriana*.

Identificação	Composto	Identificação	Tempo de Retenção (T.R)
12	xantochimúsídeo	Folhas/Galhos	15,5 min
13	GB2	Folhas/Galhos	18,1 min
14	fukugisídeo	Folhas/Galhos	19,7 min
15	GB1a glicosilado	Folhas/Galhos	21,2 min
16	GB2a	Folhas/Galhos	24,1 min
17	morelloflavona	Folhas/Galhos	31,1 min
18	volkensiflavona	Folhas/Galhos	36,4 min
19	amentoflavona	Folhas/Galhos	42,0 min
20	podocarpusflavona	Folhas/Galhos	45,8 min
21	7-epiclusianona	Folhas/Galhos	56,0 min

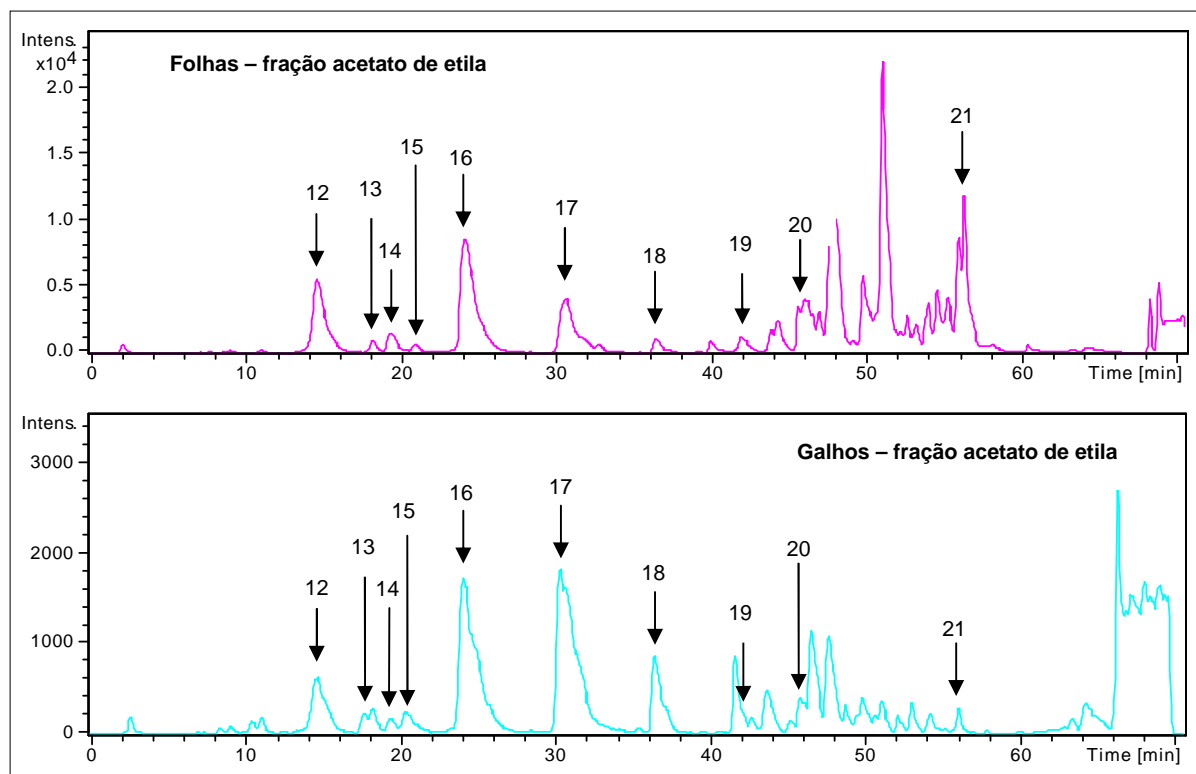


Figura 15: Perfis HPLC-DAD-HRMS (TIC) para as frações acetato de etila das folhas e dos galhos no modo negativo.

5.4.1. Análise do composto xantochimusídeo

O composto de fórmula molecular $C_{36}H_{32}O_{16}$ e com massa molecular 720,1690, detectado como xantochimusídeo no t_r 15,5 min. do TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas), apresentou como íon molecular de alta resolução m/z 719,1543 $[M - H]^-$ apresentando um erro experimental de 21 ppm como mostra a **figura 16**.

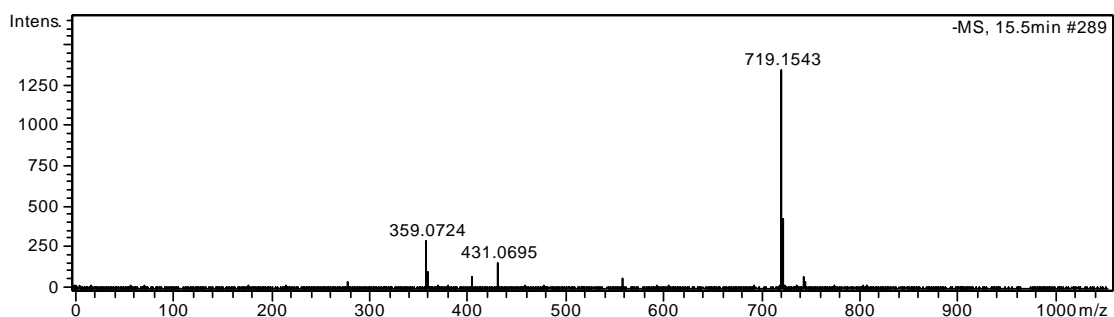


Figura 16: Espectro de massa obtido para o composto xantochimusídeo.

O íon molecular m/z 719,1543 $[M - H]^-$ foi submetido ao experimento MS/MS. Ao aplicar uma energia de colisão de 10 eV (**figura 17**) são observados como principais íons produtos os íons: m/z 593, m/z 557, m/z 431. Quando 20 eV de energia de colisão é aplicada, no experimento tandem, observa-se somente o íon m/z 431 como íon produto majoritário e o íon m/z 295 em pequena abundância.

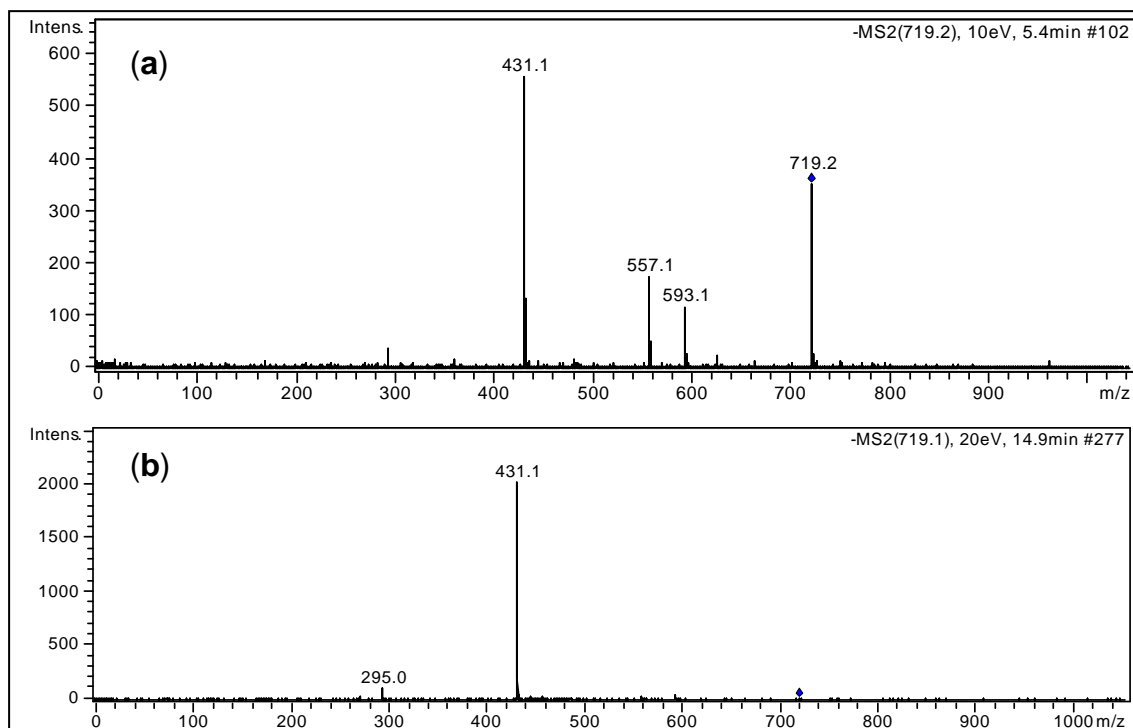


Figura 17: Espectro de massa de segunda ordem para o composto xantochimusídeo com 10 eV (a) e 20 eV (b) de energia de colisão aplicada.

Paralelamente à detecção *in silico* este composto detectado foi isolado e purificado por HPLC preparativo como descrito no **item 5.5**. Depois de purificado este composto foi submetido à espectrometria de massas com analisador *ion-trap* para o estudo dos íons produtos, visando ao entendimento das fragmentações recém propostas.

Observa-se, a partir dos espectros de massas obtidos de segunda, terceira e quarta ordem neste experimento (**figura 18**), que os fragmentos produtos obtidos foram condizentes com os fragmentos observados por HRMS.

A partir de todos esses dados obtidos, pode-se propor que o íon m/z 593 pode ser justificado pela perda de 126 unidades de massa referente à perda de floroglucinol. A perda deste íon reportado por JACKSON; LOCKSLEY; SCHEINMANN, 1967; JACKSON; LOCKSLEY; SCHEINMANN, 1970 justifica seu mecanismo indeterminado por decomposição térmica na ionização por impacto eletrônico. Na ionização por electrospray muitos processos podem ocorrer tais como dissociação do íon molecular na fonte de ionização, reações ácido-base e até mesmo reações de óxido-redução (CROTTI et al, 2006; VESSECCHI et al, 2007), o que pode gerar muita complexidade no mecanismo

envolvido. Portanto até o presente esse mecanismo da perda de floroglucinol pelo modo de ionização por electrospray encontra-se indefinido.

O íon m/z 557 pode ser justificado pela perda da unidade de açúcar. Por outra via de fragmentação o íon m/z 431 pode ser justificado pela perda da unidade de açúcar com conseqüente perda de uma unidade de floroglucinol. O íon m/z 295 pode ser justificado pela perda referente à 136 unidades de massa por um mecanismo via Retro-Diels-Alder (RDA) (**figura 19**).

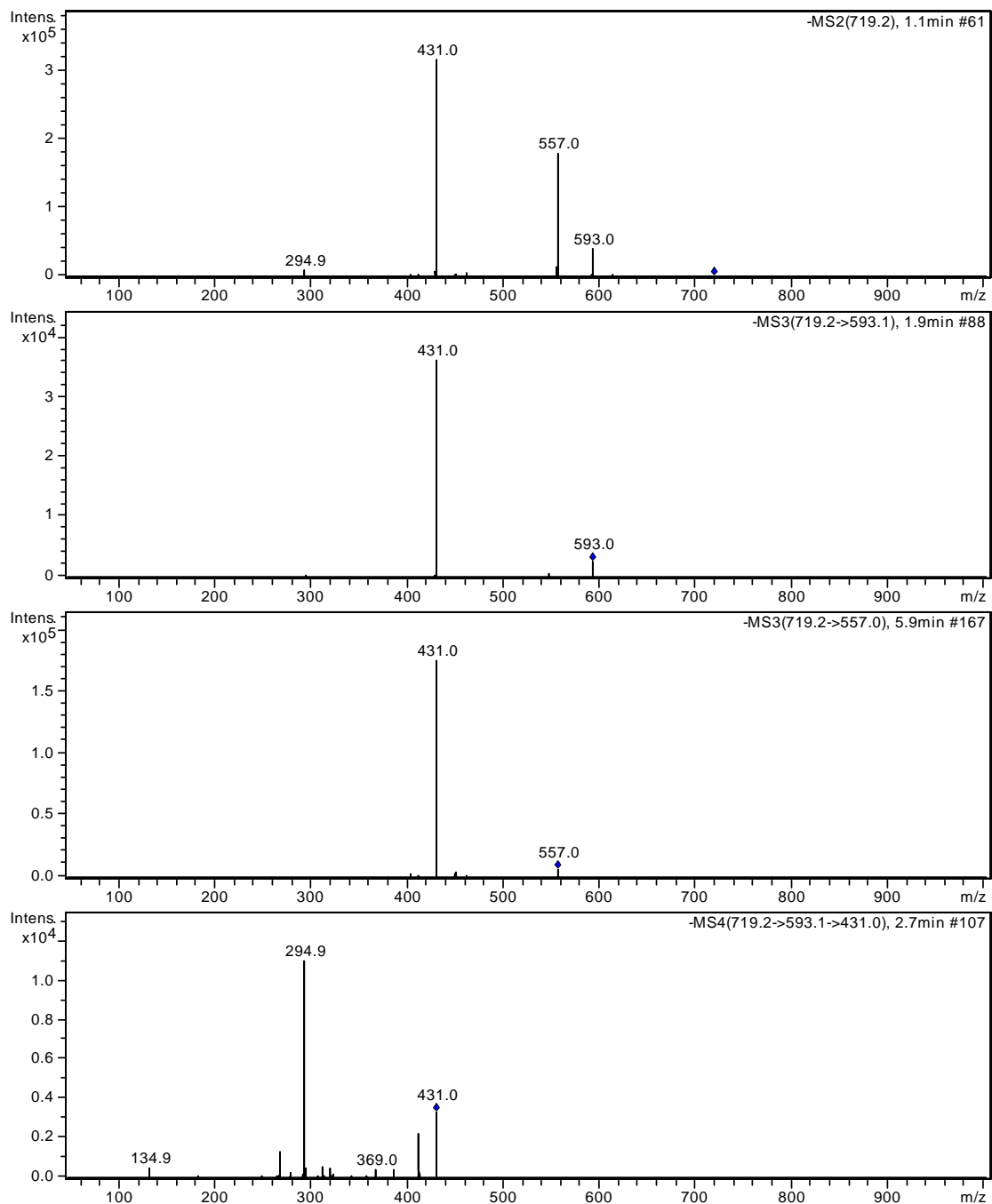


Figura 18: Espectros de massa MS², MS³ e MS⁴ obtidos para o composto xantochimusídeo no *ion-trap*.

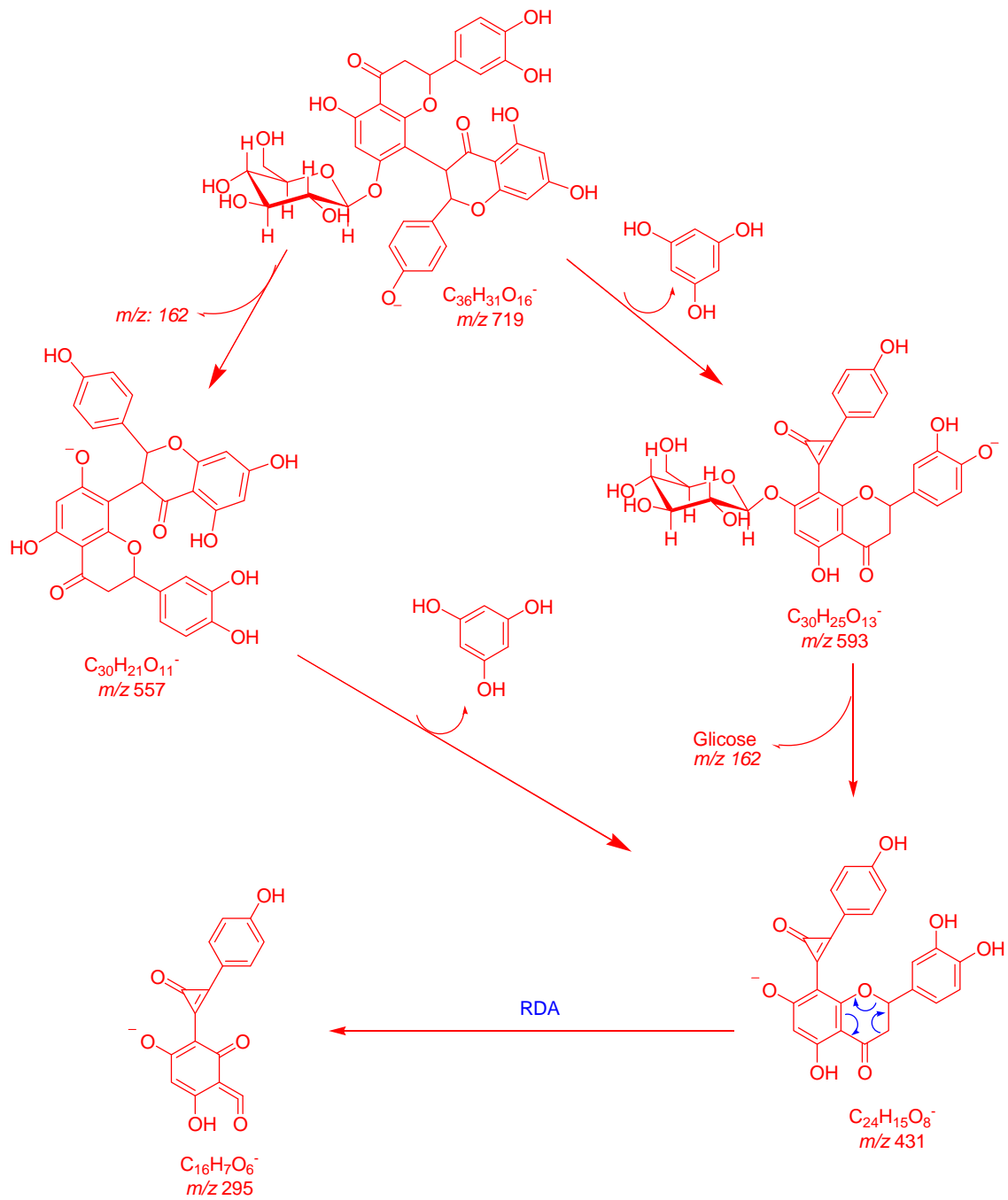


Figura 19: Proposta de fragmentação para o xantochimusídeo.

5.4.2. Análise do composto GB2

O composto de fórmula molecular $C_{30}H_{22}O_{12}$ e com massa molecular 574,1111 detectado como GB2 no T.R 18,1 min. do TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas), apresentou como íon molecular de alta resolução m/z 573,1012 $[M - H]^-$ apresentando um erro experimental de 4,5 ppm como mostra a **figura 20**.

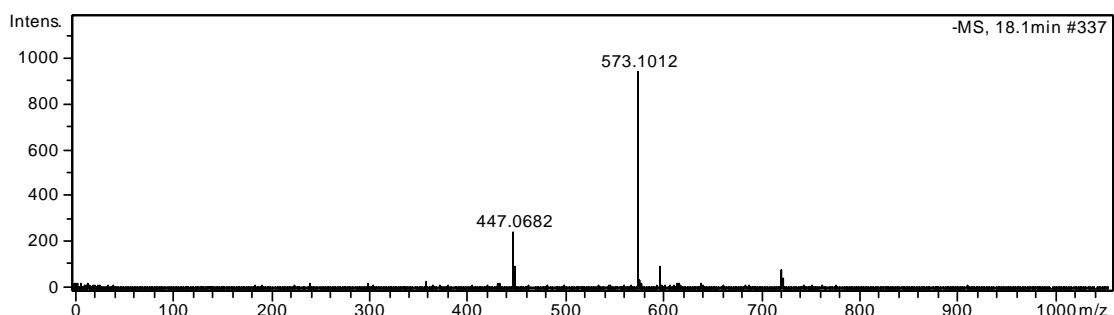


Figura 20: Espectro de massa obtido para o composto GB2.

O íon molecular m/z 573,1012 $[M - H]^-$ foi submetido ao experimento MS/MS. Ao aplicar uma energia de colisão de 25 eV (**figura 21**) é observado como principal íon produto o íon m/z 419 e o íon produto m/z 269 em menor abundância justificados por sucessivos rearranjos via Retro-Diels-Alder (**figura 22**).

O íon m/z 447 visualizado no espectro de massas de primeira ordem (**figura 20**) provavelmente se deve à perda de floroglucinol observado em todos os biflavonóides que possuem pelo menos uma unidade de flavanona.

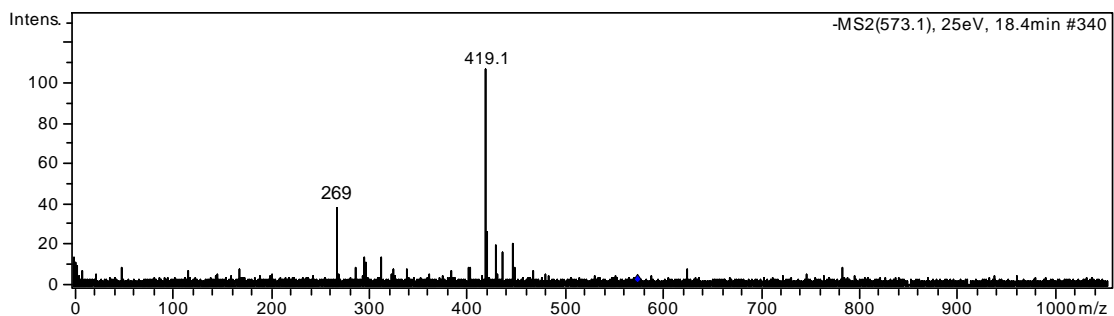


Figura 21: Espectro de massa de segunda ordem para o composto GB2 com 25 eV de energia de colisão aplicada.

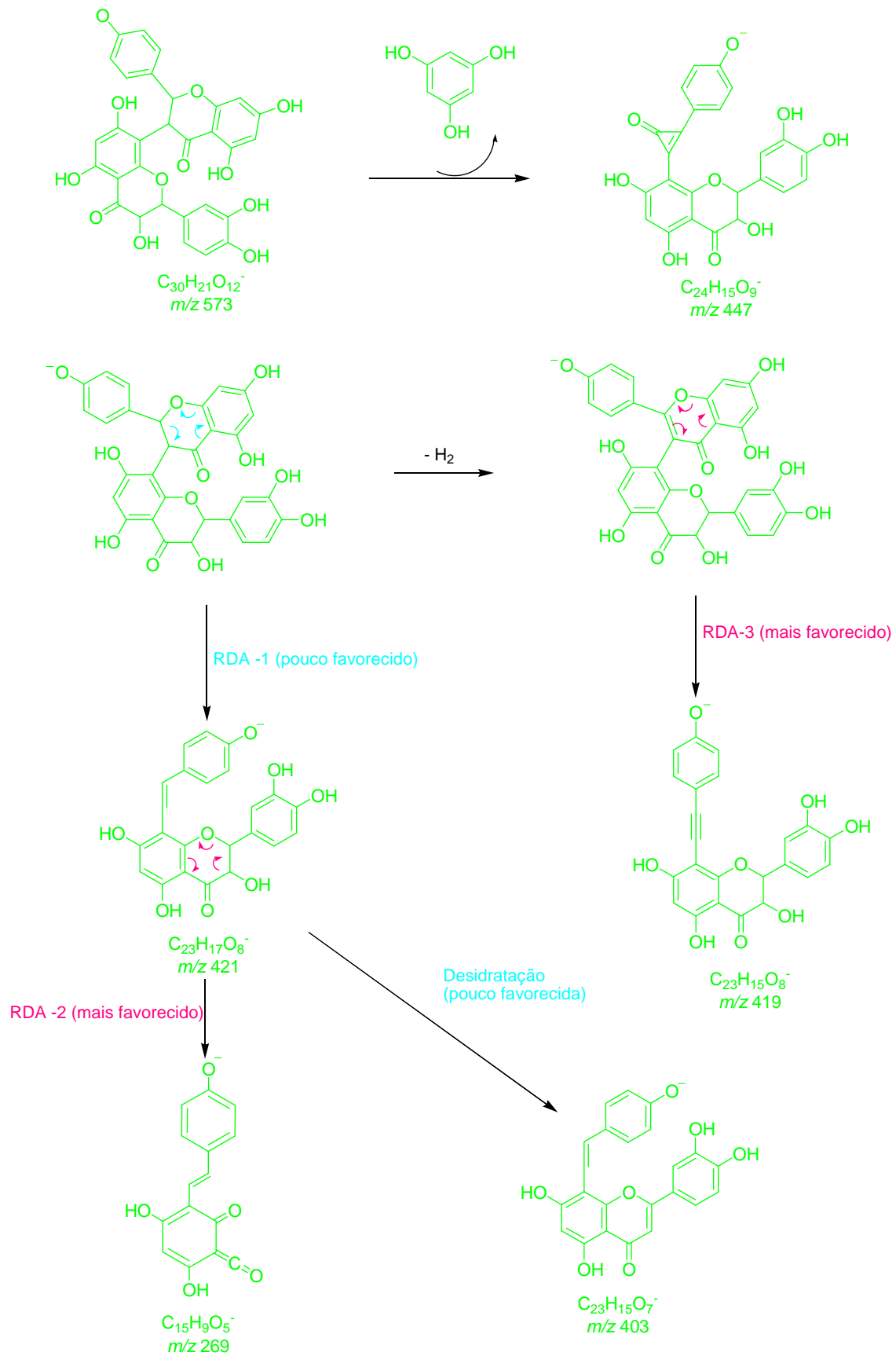


Figura 22: Proposta de fragmentação para o GB2.

5.4.3. Análise do composto fukugisídeo

O composto de fórmula molecular $C_{36}H_{30}O_{16}$ e com massa molecular 718,1533 detectado como fukugisídeo no t_r 19,7 min. do TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas), apresentou como íon molecular de alta resolução m/z 717,1347 $[M - H]^-$ apresentando um erro experimental de 24,9 ppm como mostra a **figura 23**.

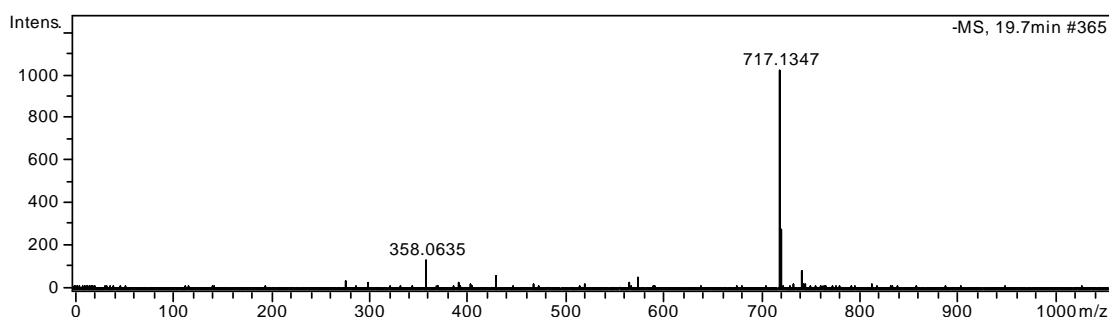


Figura 23: Espectro de massa obtido para o composto fukugisídeo.

São observados como principais íons produtos para o fukugisídeo, o íon m/z 565 referente a um rearranjo via Retro-Diels-Alder, o íon m/z 591 que representa a perda de floroglucinol e os íons m/z 429 e m/z 403 sendo a perda da unidade de açúcar em duas vias distintas (**figura 26**).

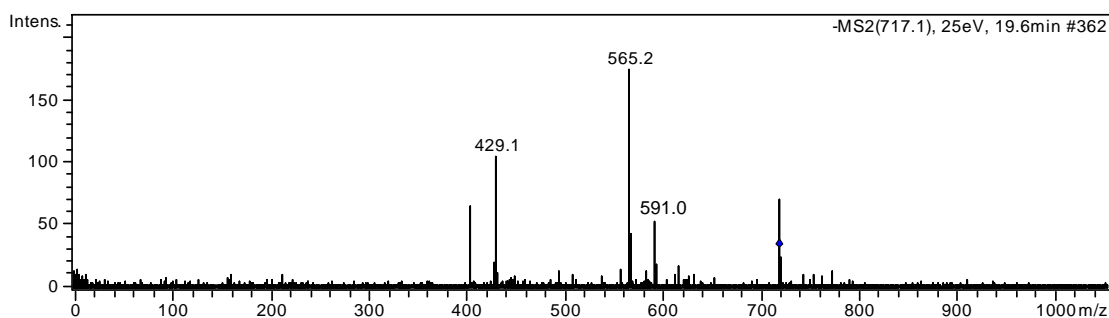


Figura 24: Espectro de massa de segunda ordem para o composto fukugisídeo com 25 eV de energia de colisão aplicada.

Paralelamente à detecção *in silico* este composto detectado foi isolado e purificado por HPLC preparativo como descrito no **item 5.5**. Depois de purificado este composto foi submetido à espectrometria de massas com analisador *ion-trap* para uma melhor compreensão da formação dos íons

Resultados e Discussões

produtos (**figura 25**), os quais foram coerentes com os dados encontrados na técnica anteriormente utilizada.

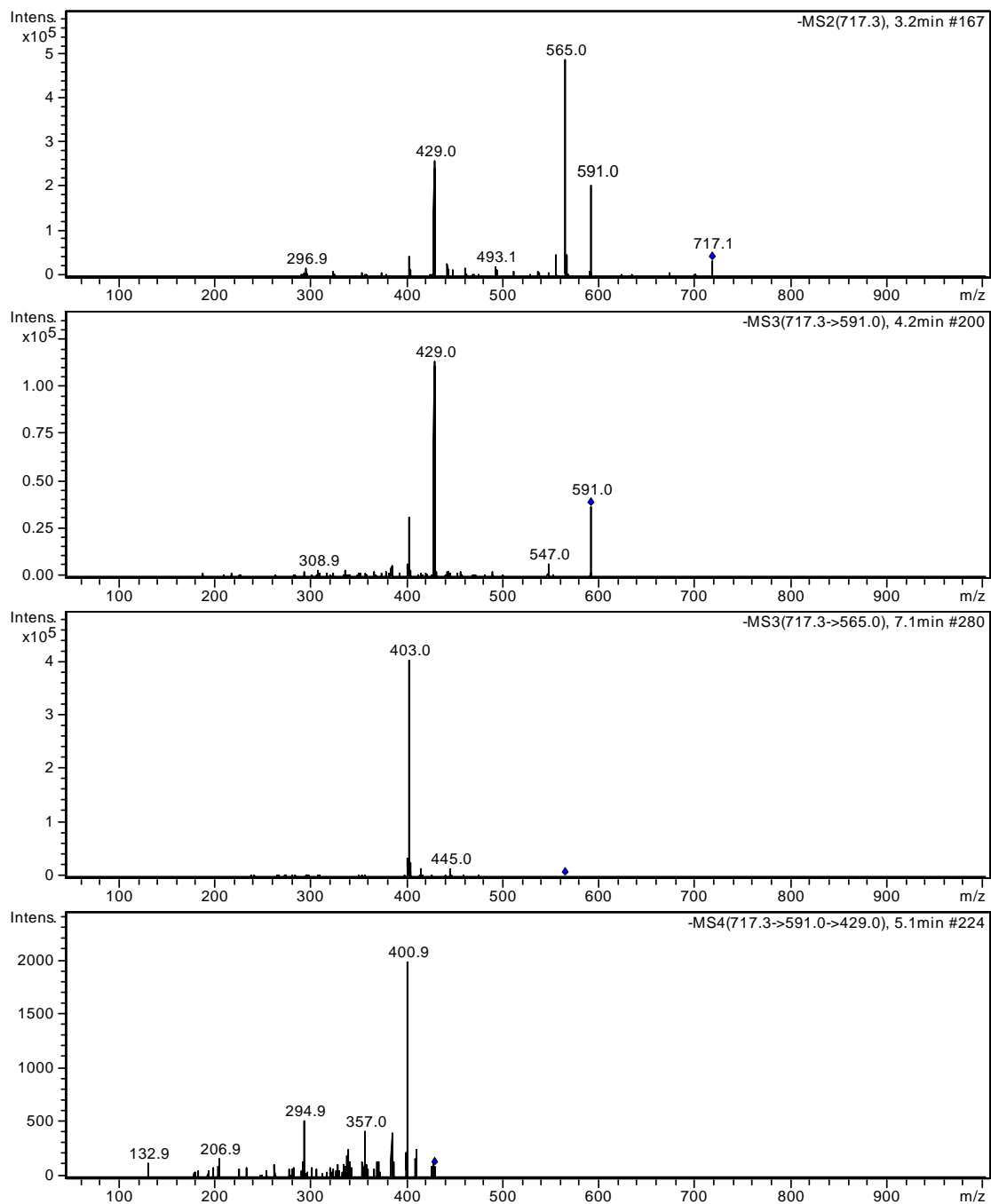


Figura 25: Espectros de massa MS^2 , MS^3 e MS^4 obtidos para o composto fukugisídeo no *ion-trap*.

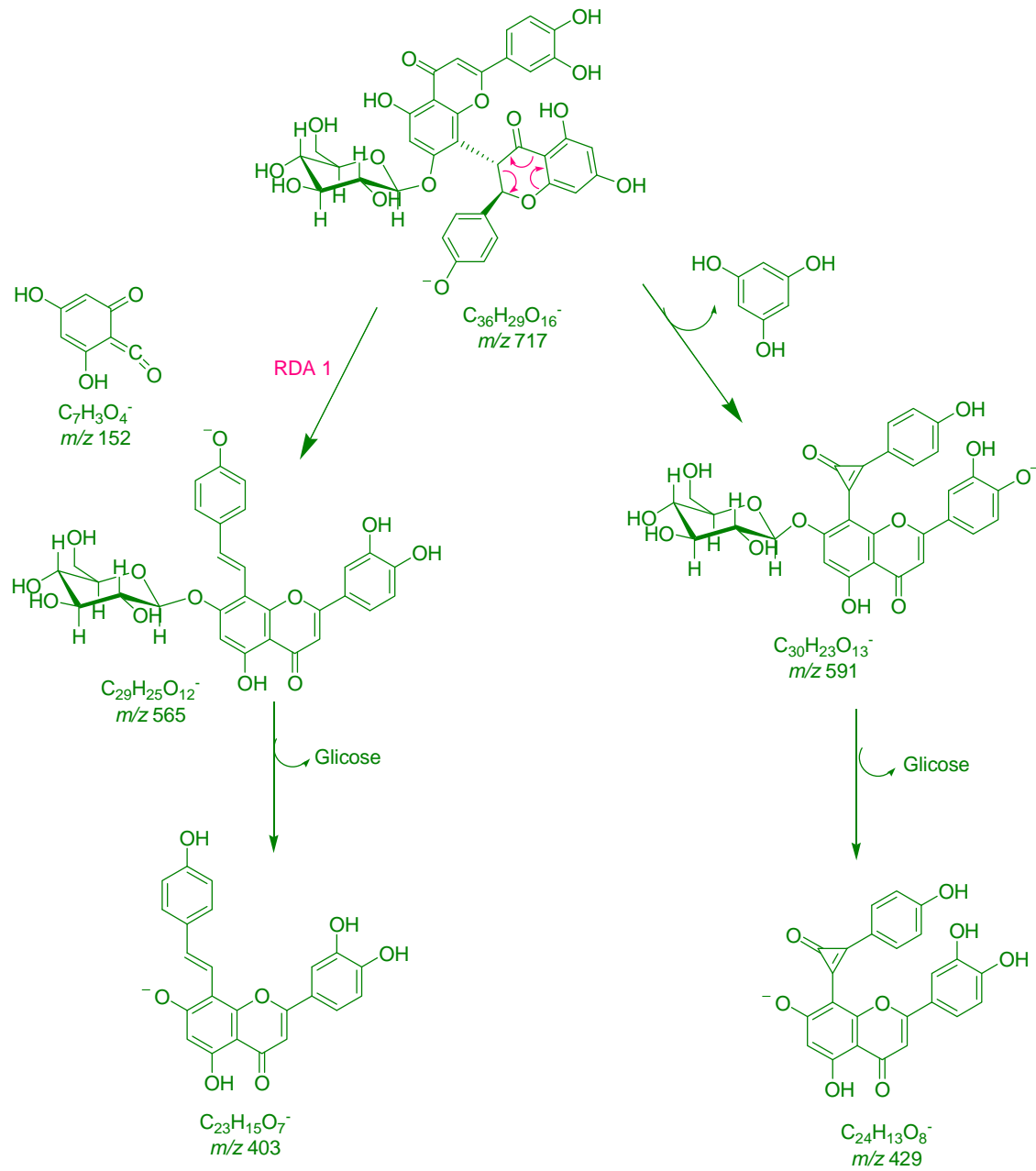


Figura 26: Proposta de fragmentação para o fukugisídeo.

5.4.4. Análise do composto GB1a glicosilado

Foi detectado no T.R 21,2 min. no TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas) como sendo o composto GB1a glicosilado de fórmula molecular $C_{36}H_{32}O_{15}$ e com massa molecular 704,1741 apresentando como íon molecular de alta resolução m/z 703,1571 $[M - H]^-$ e um erro experimental de 13,8 ppm como mostra a **figura 27**.

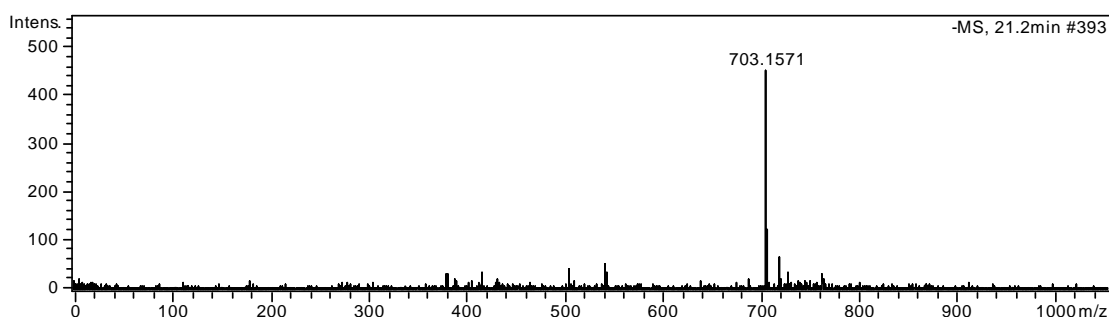


Figura 27: Espectro de massa obtido para o composto GB1a glicosilado.

Ao incidir uma energia de colisão de 15 eV no íon molecular m/z 703,1571 (**figura 28**) observa-se como íons produtos os íons m/z 541 referente à perda de uma unidade de açúcar e o íon m/z 415 referente à perda de 126 unidades de massa evidenciando a perda de floroglucinol.

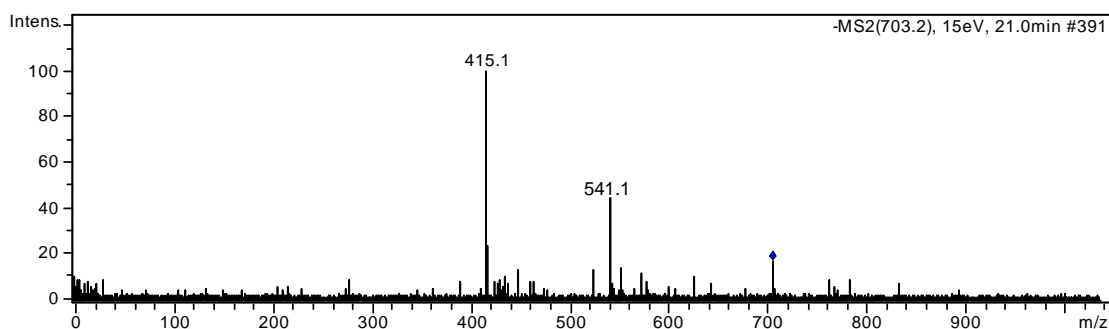


Figura 28: Espectro de massa de segunda ordem para o composto GB1a glicosilado com 15 eV de energia de colisão aplicada.

5.4.5. Análise do composto GB2a

Foi detectado no T.R 24,1 min. no TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas) o composto GB2 de fórmula molecular $C_{30}H_{22}O_{11}$ e com massa molecular 558,1162 apresentando como íon molecular de alta resolução m/z 557,1128 $[M - H]^-$ e um erro experimental de 7,0 ppm como mostra a **figura 29**.

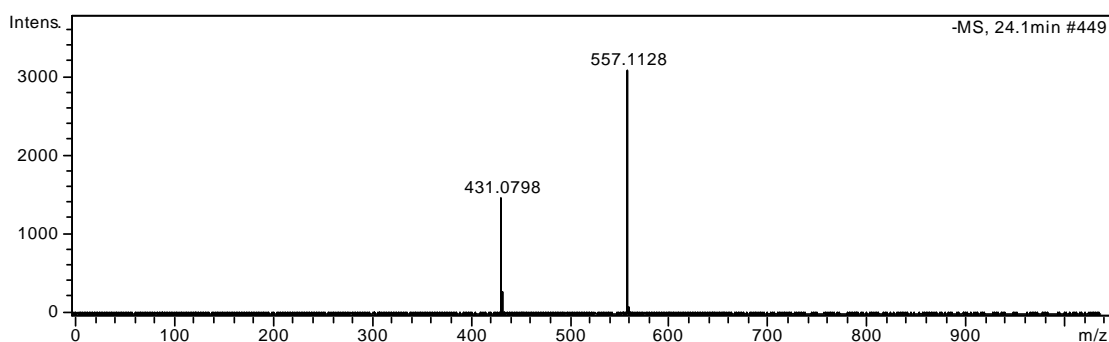


Figura 29: Espectro de massa obtido para o composto GB2a.

Para este composto detectado observa-se o mesmo padrão de fragmentação dos demais biflavonóides detectados, sendo o íon m/z 431 referente à perda neutra de floroglucinol e o íon m/z 295 sendo um sucessivo rearranjo via Retro-Diels-Alder apresentados no espectro de massa de segunda ordem.

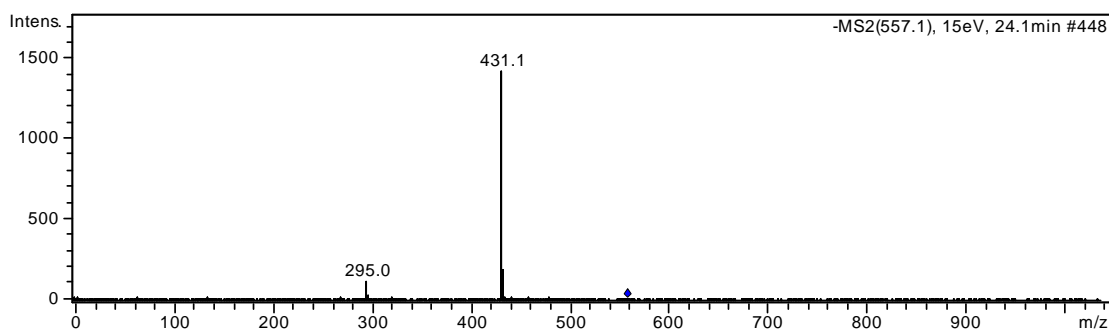


Figura 30: Espectro de massa de segunda ordem para o composto GB2a com 15 eV de energia de colisão aplicada.

5.4.6. Análise do composto morelloflavona

No TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas) foi detectado no T.R 24,1 min. o composto morelloflavona de fórmula molecular $C_{30}H_{20}O_{11}$ e com massa molecular 556,1005 apresentando como íon molecular de alta resolução m/z 555,0873 $[M - H]^-$ e um erro experimental de 10,8 ppm como mostra a **figura 31**.

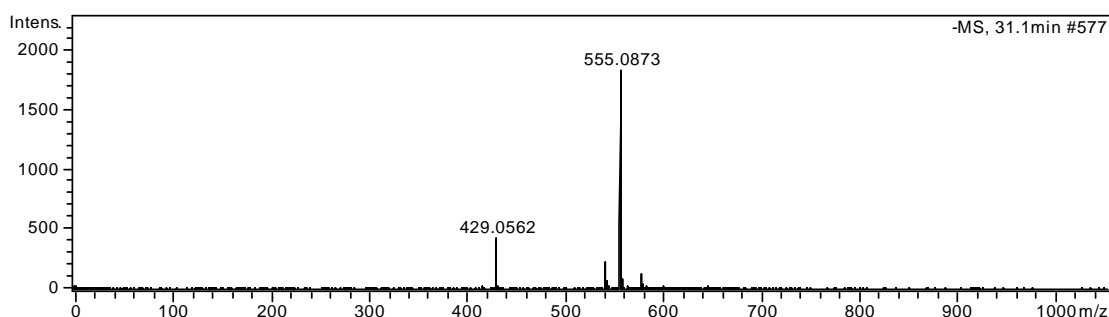


Figura 31: Espectro de massa obtido para o composto morelloflavona.

No experimento MS/MS (**figura 32**) é possível observar apenas a perda de floroglucinol quando uma energia de 25 eV é aplicada como mostra o espectro de massas MS^2 .

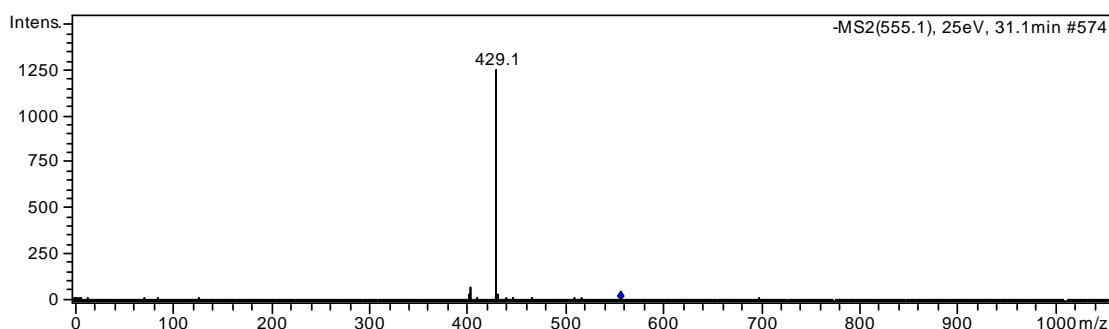


Figura 32: Espectro de massa de segunda ordem para o composto morelloflavona com 25 eV de energia de colisão aplicada.

Este composto detectado também foi isolado paralelamente à detecção *in silico* e purificado por HPLC preparativo como descrito no **item 5.5**. Depois de purificado este composto foi submetido à espectrometria de massas com analisador *ion-trap* para uma melhor compreensão na formação dos íons produtos (**figura 33**).

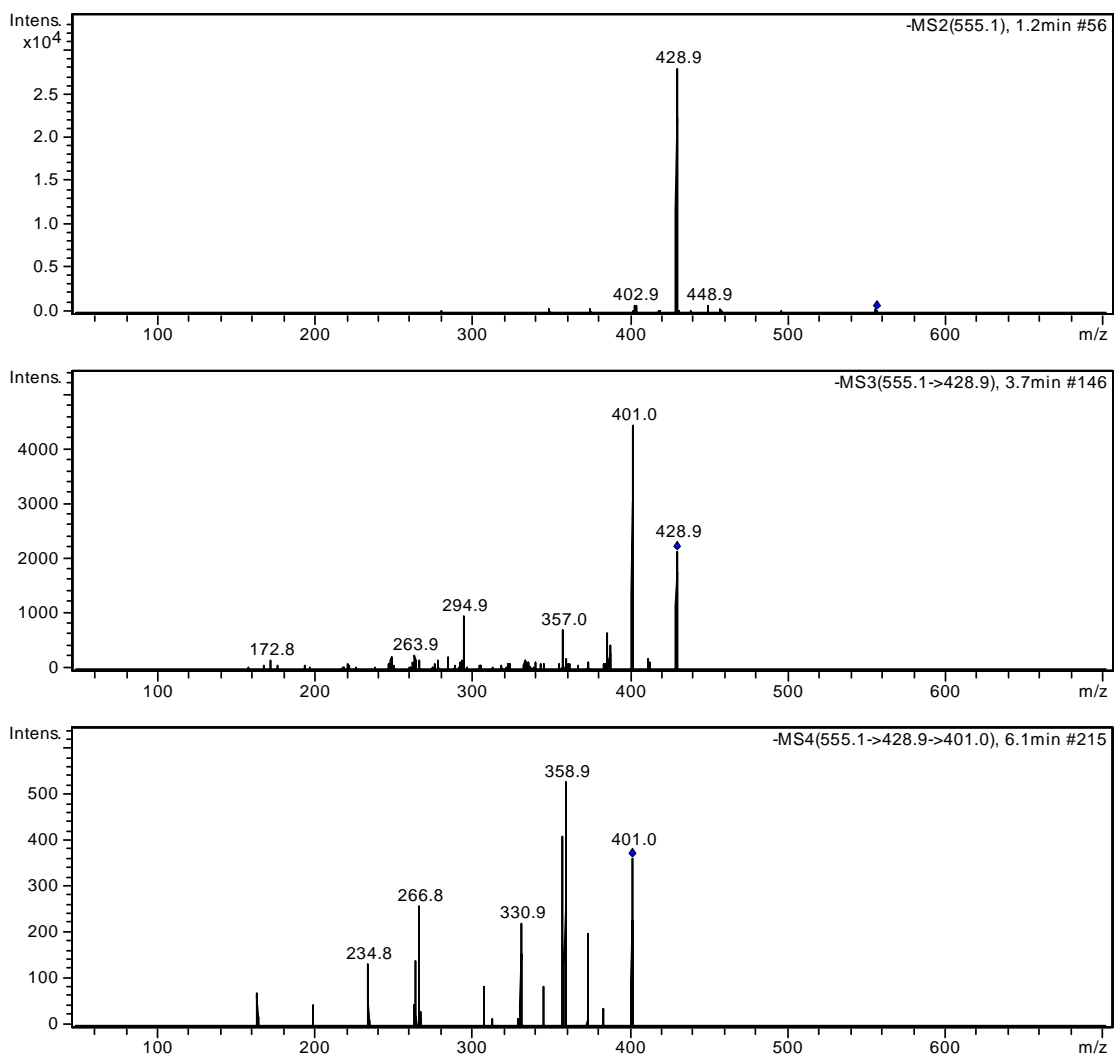


Figura 33: Espectros de massa MS², MS³ e MS⁴ obtidos para o composto morelloflavona no *íon-trap*.

Mesmo após a análise dos espectros de segunda, terceira e quarta ordem, observa-se que o padrão de fragmentação da maioria dos biflavonóides detectados apresenta a perda neutra de floroglucinol em maior abundância, certamente por ser a fragmentação mais favorável para esta classe de compostos. Nos espectros de MS³ e MS⁴ é possível observar somente a quebra da aglicona e a perda de uma molécula de CO.

5.4.7. Análise do composto volkensiflavona

No TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas) foi detectado no T.R 36,4 min. como sendo o composto volkensiflavona de fórmula molecular $C_{30}H_{20}O_{10}$ e com massa molecular 540,1056 apresentando como íon molecular de alta resolução m/z 539,0918 $[M - H]^-$ e um erro experimental de 12,2 ppm como mostra a **figura 34**.

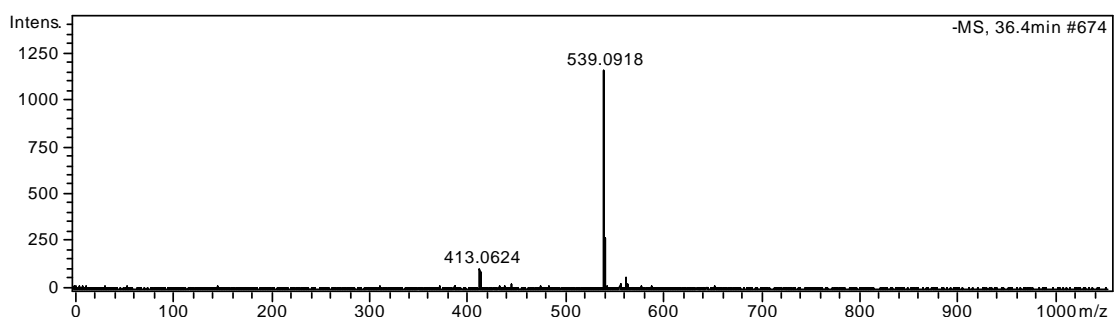


Figura 34: Espectro de massa obtido para o composto volkensiflavona.

Para o experimento tandem (**figura 35**) é observado como principal íon produto o íon m/z 413 referente à perda neutra da molécula floroglucinol já discutido nos itens anteriores.

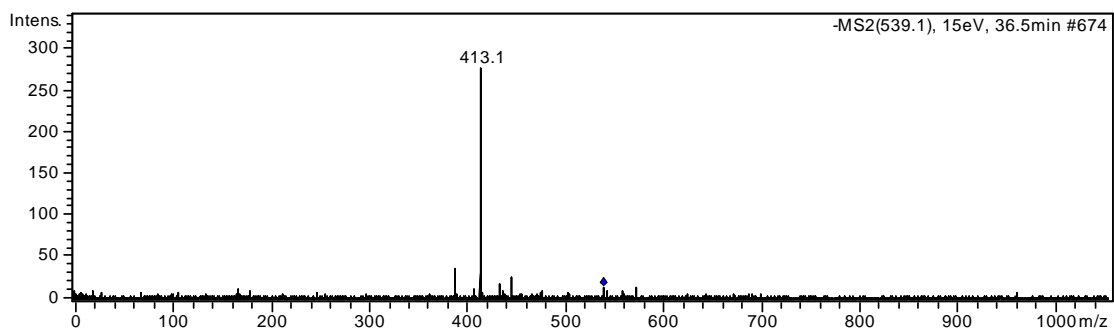


Figura 35: Espectro de massa de segunda ordem para o composto volkensiflavona com 15 eV de energia de colisão aplicada.

5.4.8. Análise do composto amentoflavona

Foi detectado no T.R 42,0 min. do TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas) como sendo a amentoflavona de fórmula molecular $C_{30}H_{18}O_{10}$ e com massa molecular 538,4579 e apresentando como íon molecular de alta resolução m/z 537, 0814 $[M - H]^-$ e um erro experimental de 2,4 ppm. A **figura 36** apresenta o espectro de massas obtido para a amentoflavona.

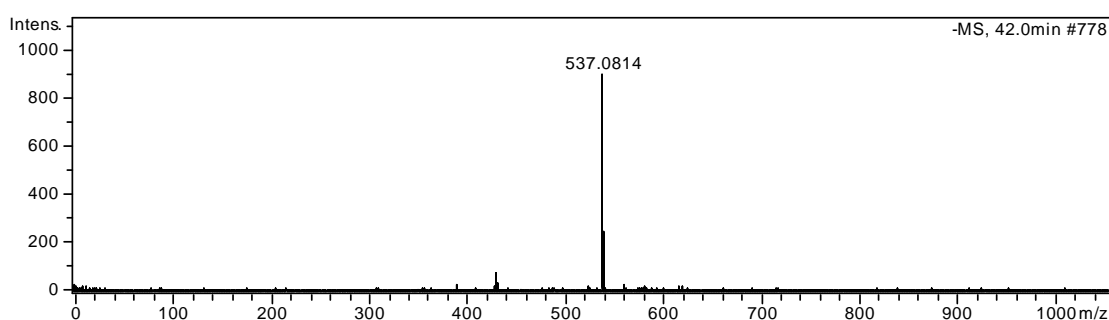


Figura 36: Espectro de massa obtido para o composto amentoflavona.

O espectro de massa de segunda ordem (MS^2) (**figura 37**) apresenta como íon produto majoritário o íon m/z 375 que foi proposto com sendo a mesma rota de fragmentação descrita para o composto podocarpusflavona no **item 5.4.9**.

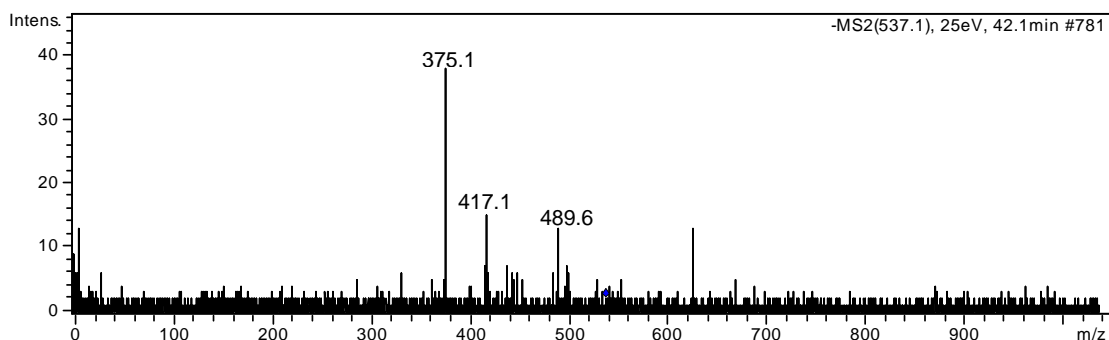


Figura 37: Espectro de massa de segunda ordem para o composto amentoflavona com 15 eV de energia de colisão aplicada.

5.4.9. Análise do composto podocarpusflavona

Foi detectado no T.R 45,8 min. do TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas) como sendo a podocarpusflavona de fórmula molecular $C_{31}H_{20}O_{10}$ e com massa molecular 718,1533, apresentando como íon molecular de alta resolução m/z 552,1056 e um erro experimental de 4,9 ppm. A **figura 38** apresenta o espectro de massas obtido para a podocarpusflavona.

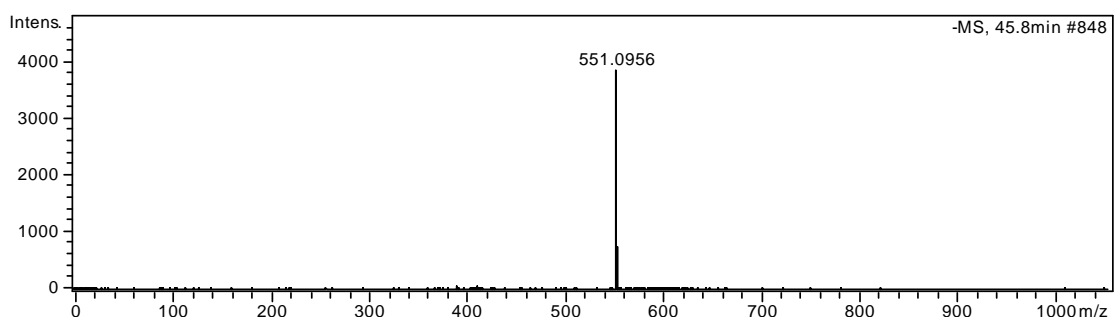


Figura 38: Espectro de massa obtido para o composto podocarpusflavona.

O íon em maior abundância observado no experimento MS/MS (**figura 39**) e no *íon-trap* (**figura 40**) com m/z 375 foi proposto por um rearranjo via Retro-Diels-Alder seguido da perda de CO_2 ocorrendo uma retro-ciclicização para a lactona (FABRE, N. et al, 2001; McNAB, H. et al, 2009). Na seqüência é proposto uma contração de anel por perda de CO e perda de H_2O .

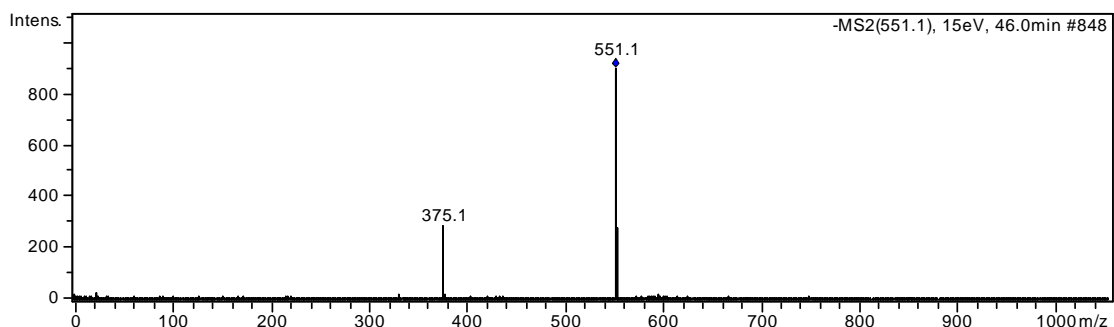


Figura 39: Espectro de massa de segunda ordem para o composto podocarpusflavona com 15 eV de energia de colisão aplicada.

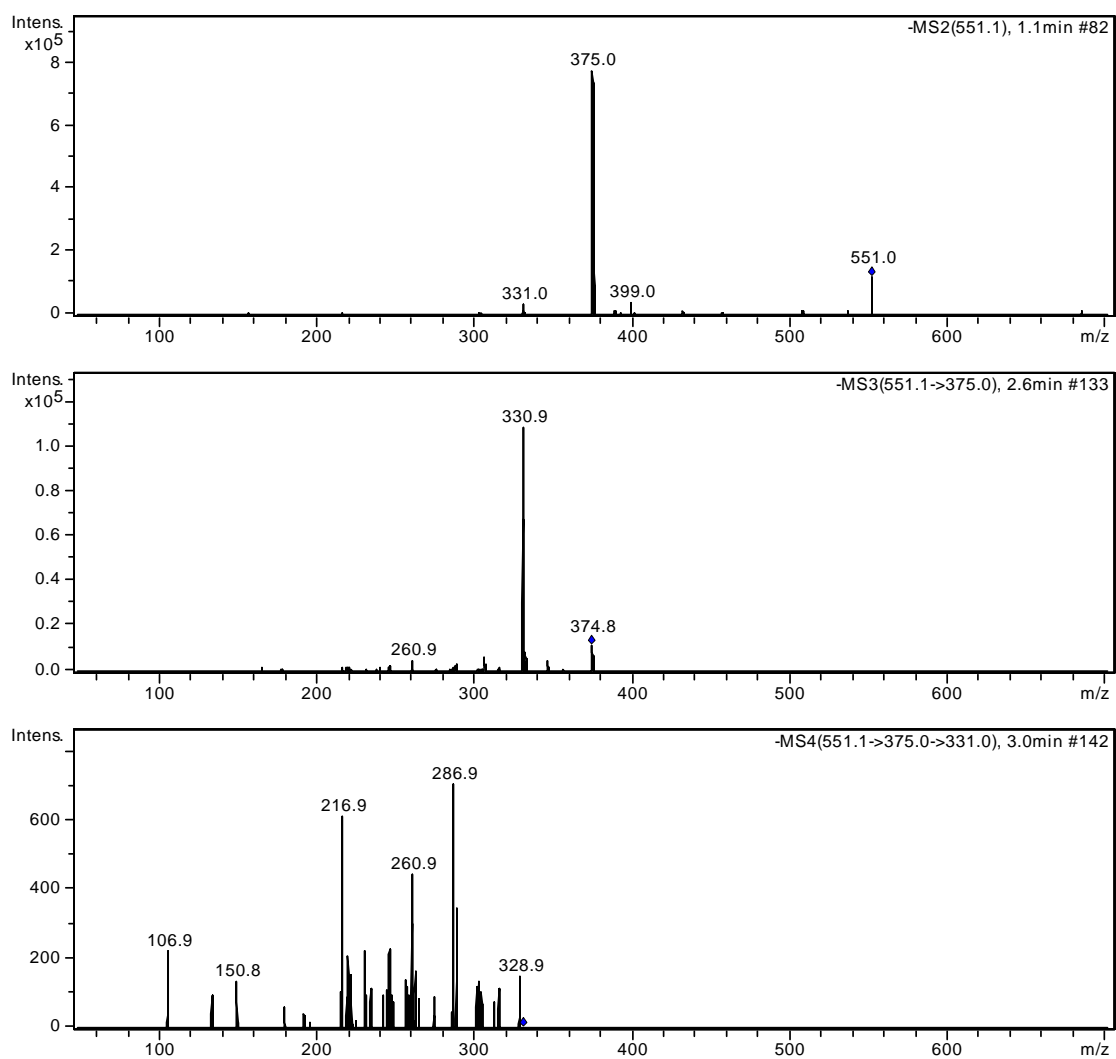


Figura 40: Espectros de massa MS², MS³ e MS⁴ obtidos para o composto podocarpusflavona no *ion-trap*.

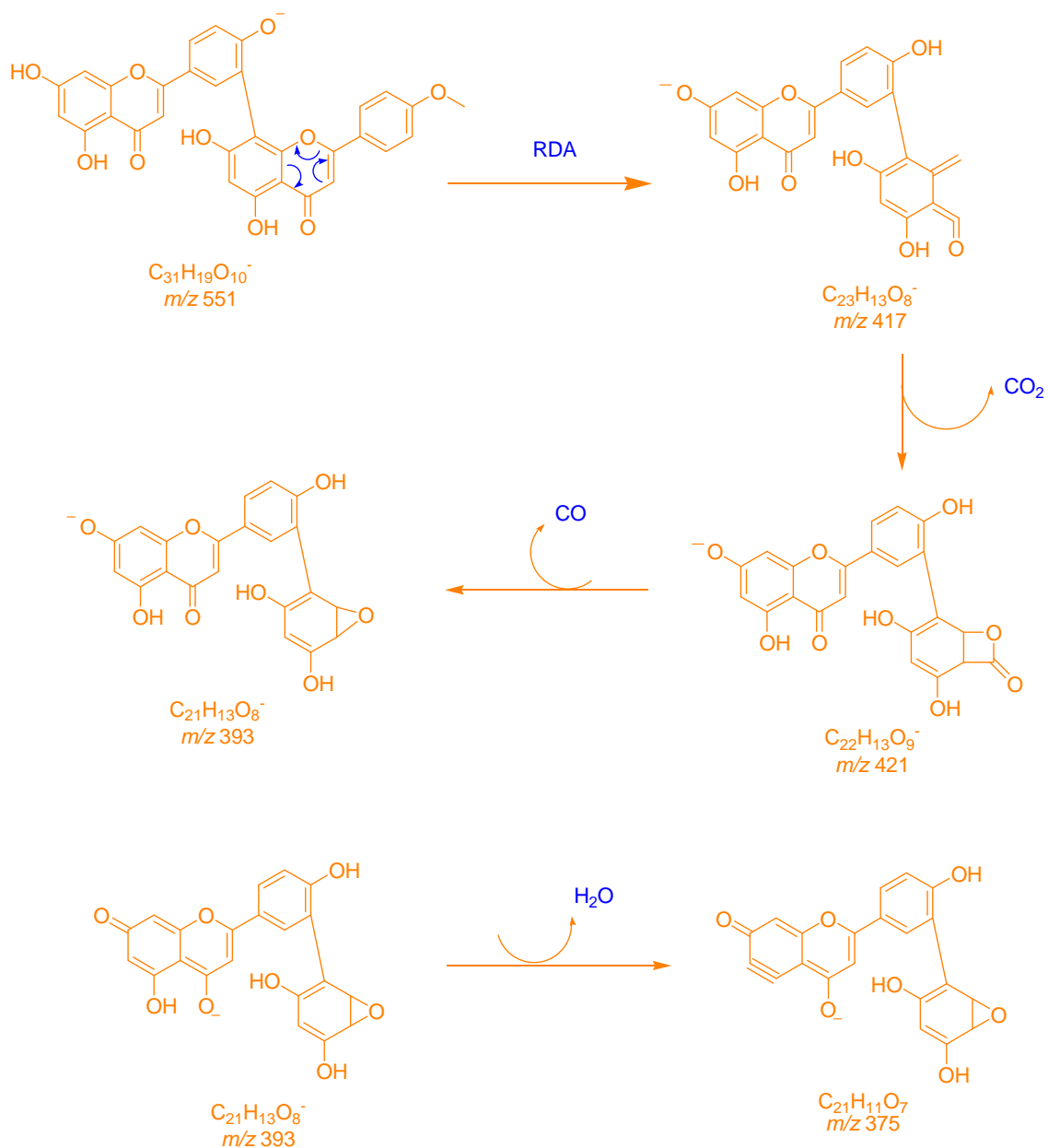


Figura 41: Proposta de fragmentação para a podocarpusflavona.

Analisando os dados da análise *in silico*, principalmente os dados de espectrometria de massas, é possível concluir que os biflavonóides detectados possuem um padrão de fragmentação característico com suas propriedades estruturais. Para os biflavonóides do tipo C-3→C-8” com pelo menos uma unidade de flavanona observa-se a perda neutra de 126 unidades de massa

referente à molécula de floroglucinol. Biflavonóides do tipo C3'→C-8'' do tipo das amentoflavonas caracterizam-se pelo íon produto m/z 375.

5.4.10. Análise do composto 7-epiclusianona.

O composto de fórmula molecular $C_{33}H_{42}O_4$ e com massa molecular 502,3083 detectado como 7-epiclusianona no t_r 56,1 min. do TIC de ambas as frações acetato de etila (galhos e folhas), apresentou como íon molecular de alta resolução m/z 501,3016 $[M - H]^-$ com um erro experimental de 1,2 ppm como mostra a **figura 42**. Tal composto já foi relatado para extratos dos frutos da espécie em estudo (DOS SANTOS et al, 1999), sendo este o primeiro relato para as folhas e galhos.

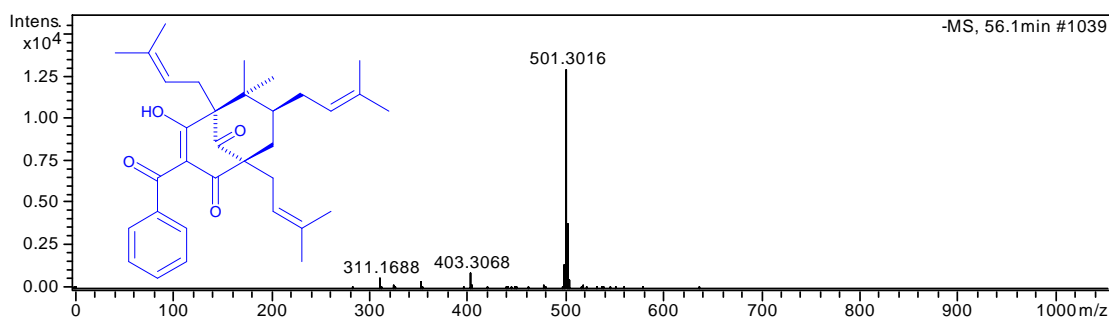


Figura 42: Espectro de massa obtido para o composto 7-epiclusianona.

Para este composto não foi possível observar o experimento MS^2 , devido às suas baixas concentrações na matriz analisada, fato este, que reforça a eficiência da técnica utilizada.

5.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa da fração AcOEt das folhas.

Paralelamente à análise *in silico* das frações acetato de etila das folhas e dos galhos resultarem na detecção de vários compostos, esta fração foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) preparativa (**figura 43**) para a confirmação estrutural de algumas moléculas detectadas.

As condições de eluição em modo gradiente da fase móvel foram às mesmas já otimizadas para a fração AcOEt no modo analítico e foi utilizado uma coluna preparativa conforme já descrita no **item 3.1.2**.

Foram realizadas aproximadamente 10 injeções (30 mg cada injeção), utilizando o coletor automático de frações, em tubos de ensaio uma fração a cada minuto (10 mL/minuto) somando 58 frações no total, e posteriormente algumas frações reunidas (Frações reunidas: Fr 0 à Fr 19; Fr 21, 22 e 23; Fr 26, 27, 28 e 29; Fr 32, 33, 34 e 35; Fr 37 à 47; Fr 52 à 58).

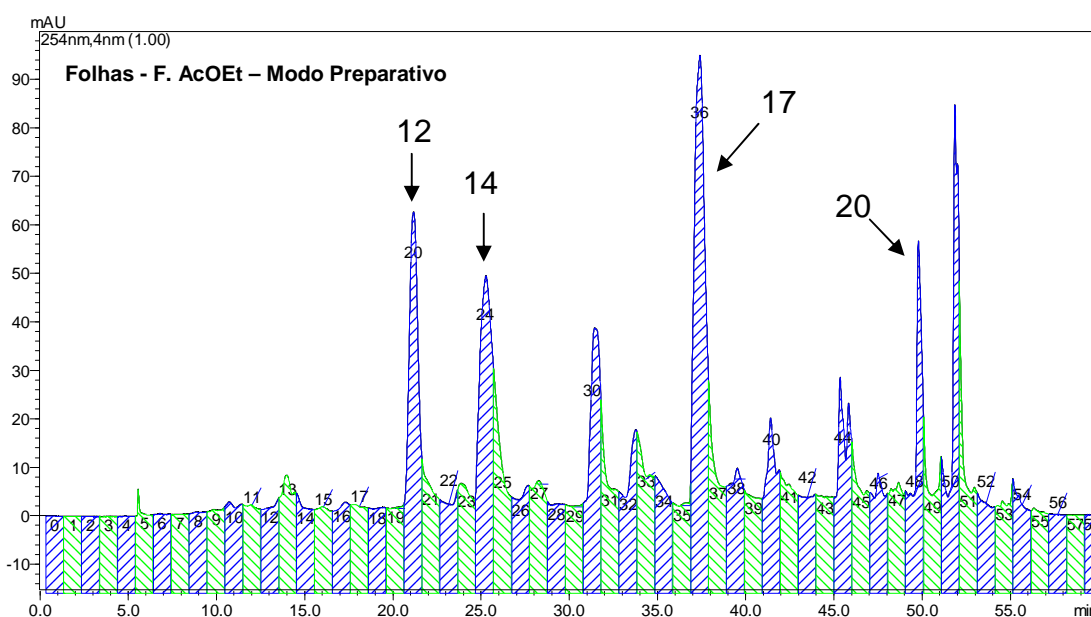
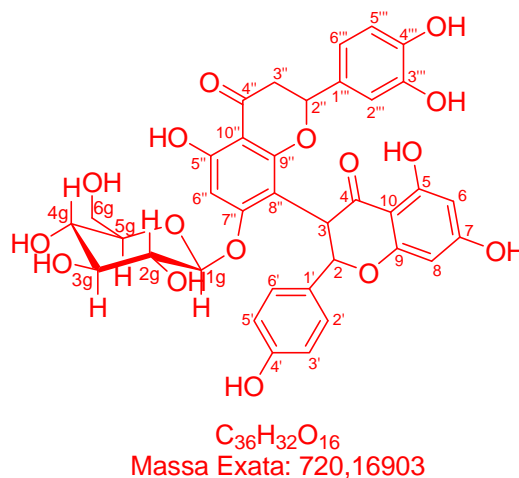


Figura 43: Cromatograma preparativo obtido da fração AcOEt. Eluição no modo gradiente: 30 % a 45 % de B em 5 minutos, 45 % a 60 % de B em 25 minutos, 60 % a 100 % de B em 20 minutos, seguida de mais 10 minutos com 100 % de B. vazão: 10 mL/min e detecção a λ 254 nm.

5.6. Elucidação estrutural dos compostos isolados

As substâncias foram elucidadas utilizando técnicas espectroscópicas (principalmente técnicas de Ressonância Magnética Nuclear como: ^1H e ^{13}C , DEPT, gCOSY, gHMQC, gHMBC e NOE) e comparação dos dados experimentais com aqueles encontrados na literatura.

5.6.1. Caracterização estrutural da F. AcOEt 20 - (12) - (xantochimusídeo).



A análise dos espectros de NMR de 1H e ^{13}C permitiu identificar a fração AcOEt 20 como pertencente à classe das biflavanonas. O espectro de NMR ^{13}C apresentou sinais de carbonos carbonílicos em δ 196,7 e δ 196,9 ppm e dois sinais no NMR de 1H em δ 11,98 (s) e δ 12,07 (s) ppm desprotegido pelo efeito anisotrópico da carbonila (hidrogênios quelados), evidenciando duas unidades flavonoídicas (espectros em anexos).

Os sinais no espectro de 1H em δ 5,60 *d* (12 Hz), δ 5,11 *d* (12 Hz) e δ 5,34 *dd* (12,5 e 3 Hz), δ 3,02 e 2,69 e no espectro de ^{13}C em δ 82,0, δ 46,6, δ 78,7 e δ 43,1 evidenciam a existência de duas unidades flavonoídicas comumente conhecidas como flavanonas.

No experimento *g*COSY, o qual indica os núcleos de hidrogênios que se correlacionam, observamos as seguintes correlações: δ 5,80 *d* (2,5 Hz) com δ 5,90 *d* (2,5 Hz) referente aos H-6 e H-8 (anel A da unidade I); δ 7,26 *d* (8,5 Hz) com δ 6,61 *d* (8,5 Hz) referente aos H-2'/H-6' com H-3'/H-5' sugerindo apenas uma substituição em H-4'. No mapa de contorno do *g*HMBC é observada como principal correlação para a determinação estrutural: H-3 (δ 5,11 *d* (12 Hz)) e o C-7'' (δ 162,7) evidenciando a ligação entre as duas unidades flavonoídicas do tipo C-3→C-8''. A correlação entre C-7'' (δ 162,7) e H-1 da unidade de açúcar (glicose) (4,73 *d* 7 Hz) evidencia uma unidade de glicose ligada na posição C-7'' da biflavanona identificada. A **tabela 10** abaixo mostra as demais

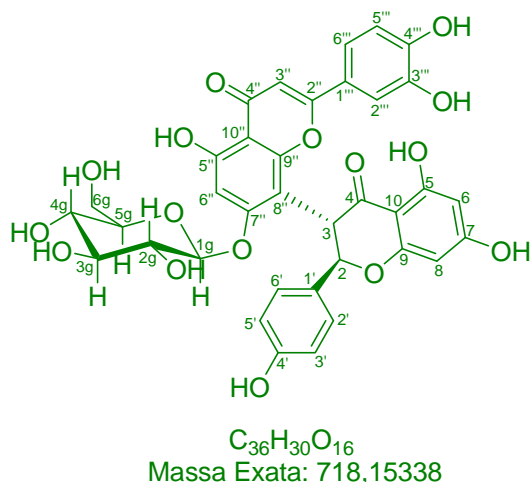
Resultados e Discussões

correlações observadas com seus respectivos deslocamentos químicos de NMR ^1H e de ^{13}C (CHEN, FA-CHING et al, 1975; DUDDECK; SNATZKE; YEMUL et al, 1978).

Tabela 10: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) para o xantochimusídeo (DMSO – d_6).

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	gHMBC	gCOSY
2	5,60 <i>d</i> (12 Hz)	82,0	H-3; H-2'	
3	5,11 <i>d</i> (12 Hz)	46,6		
4	-	196,7	H-2; H-3	
5	-	163,5		
5' - OH	12,07 <i>s</i>	-		
6	5,80 <i>d</i> (2,5 Hz)	94,7	H-8	H-8
7	-	163,1		
8	5,90 <i>d</i> (2,5 Hz)	95,9	H-6	H-6
9	-	166,2	H-8	
10	-	101,0	H-6; H-8; 12,0 <i>s</i>	
1'	-	127,0	H-3; H-3'; H-5'	
2'	7,26 <i>d</i> (8,5 Hz)	129,8	H-2; H-6'	H-3'
3'	6,61 <i>d</i> (8,5 Hz)	114,9	H-5'	H-2'
4'	-	157,6	H-2'; H-6'	
5'	6,61 <i>d</i> (8,5 Hz)	114,7	H-3'	H-6'
6'	7,26 <i>d</i> (8,5 Hz)	129,5	H-2	H-5'
2''	5,34 <i>dd</i> (12,5 e 3 Hz)	78,7	H-3''; H-2'''; H-6'''	H-3''
3''	3,02 e 2,69	43,1		H-2''
4''	-	196,9	H-3''	
5''	-	162,0	H-6''; 11,9 <i>s</i>	
5'' - OH	11,98 <i>s</i>	-		
6''	6,19 <i>s</i>	95,6	11,9 <i>s</i>	
7''	-	162,7	H-3; H-1g	
8''	-	102,5	H-3; H-6''	
9''	-	159,1	H-3	
10''	-	102,8	H-6''; 11,9 <i>s</i>	
1'''	-			
2'''	6,66 <i>d</i> (1,5 Hz)	116,7		
3'''	-	145,4	H-5'''	
4'''	-	145,1	H-2'''	
5'''	6,67 <i>d</i> (8,5 Hz)	115,4		H-6'''
6'''	6,78 <i>d</i> (8,5 Hz)	113,6	H-2'''	H-5'''
1g	4,73 <i>d</i> (7,0 Hz)	100,0		H-2g
2g	3,34	77,1		H-1g
3g	3,31	76,1		
4g	3,31	72,9		
5g	3,17	69,5		
6g	3,67 e 3,45	60,5		

5.6.2. Caracterização estrutural da F. AcOEt 24 – (14) - (fukugisídeo)



A análise dos espectros de NMR de 1H e ^{13}C permitiu identificar a F. AcOEt 24 como pertencente à classe dos biflavonoides. A comparação dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos com valores registrados na literatura do espectro de NMR ^{13}C apresentou sinais de carbono carbonílico em δ 196,6 e δ 181,9 ppm e dois sinais no NMR de 1H em δ 12,2 (s) e δ 13,2 (s) ppm desprotegido pelo efeito do átomo de oxigênio da carbonila (hidrogênios quelados), evidenciando duas unidades flavonoídicas (espectros em anexos).

Os sinais no espectro de 1H em δ 5,78 *d* (12 Hz), δ 4,90 *d* (12 Hz) e δ 6,61 *s* e no espectro de ^{13}C em δ 80,2, 48,6, 163,7 e 102,4 evidenciam a existência de duas unidades flavonoídicas: uma flavanona e a outra unidade sendo uma flavona.

As principais correlações em *g*COSY observadas são: δ 6,90 *d* (8 Hz) com δ 7,41 *dd* (8 Hz e 2,5 Hz) referente ao anel B da unidade flavona e δ 6,32 *d* (9 Hz) com δ 7,15 *d* (9 Hz) referente aos H-2/H-6 correlacionando com H-3/H-5 do anel B da unidade flavanona.

Novamente é observada no mapa de contorno do *g*HMBC a principal correlação entre H-3 da flavanona com C-7'' e C-9'' da unidade flavona que confirma a ligação entre as duas unidades do tipo C-3→C-8''. A correlação entre H-1 do açúcar glicose e o C-7'' da unidade II permite identificar este biflavonóide como fukugisídeo ou moreloflavona 7'-O – glicosídeo (MARTINEZ;

Resultados e Discussões

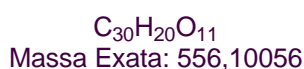
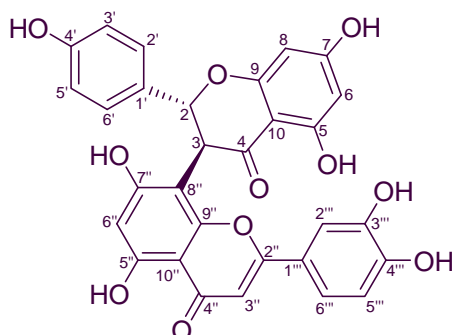
MORENO-MURILLO; DELLE MONACHE *et al*, 1996.).

Todos os dados de NMR de ^1H , ^{13}C , $g\text{HMQC}$ e $g\text{HMBC}$ observados encontram-se na **tabela 11**.

Tabela 11: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) do fukugisídeo (DMSO – d_6).

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	$g\text{HMBC}$	$g\text{COSY}$
2	5,78 <i>d</i> (12 Hz)	80,2	H-3; H-2'; H-6';	H-3
3	4,90 <i>d</i> (12 Hz)	48,6		H-2
4	-	195,6	H-3	
5	-	160,9		
5' - OH	12,21 <i>s</i>	-		
6	5,91 <i>d</i> (2 Hz)	95,4		
7	-	163,3		
8	5,93 <i>d</i> (2 Hz)	96,0		
9	-	166,6	H-8	
10	-	101,4	H-6	
1'	-	128,4	H-2'; H-3'	
2'	7,15 <i>d</i> (9 Hz)	128,5	H-4'; H-6'	H-3'
3'	6,32 <i>d</i> (9 Hz)	114,3	H-5'	H-2'
4'	-	157,2	H-2'	
5'	6,32 <i>d</i> (9 Hz)	114,3	H-3'	H-6'
6'	7,15 <i>d</i> (9 Hz)	128,5	H-2'	H-5'
2''	-	163,7	H-3''	
3''	6,61 <i>s</i>	102,4		
4''	-	181,9	H-3''	
5''	-	160,8	H-6''	
5'' - OH	13,2 <i>s</i>	-		
6''	6,50 <i>s</i>	98,1		
7''	-	160,9	H-3; H-1g	
8''	-	100,0	H-2	
9''	-	154,4	H-3	
10''	-	104,5	H-3''; H-6''	
1'''	-	120,9	H-3''; H-5'''	
2'''	7,41 <i>d</i> (2,5 Hz)	113,3	H-4''; H-6'''	
3'''	-	145,8	H-5'''	
4'''	-	150,1	H-6'''	
5'''	6,90 <i>d</i> (8 Hz)	116,2		H-6'''
6'''	7,43 <i>dd</i> (8 e 2,5 Hz)	119,5		H-5'''
1g	4,95 <i>d</i> (7,5 Hz)	100,1		
2g	3,0	73,4		
3g	3,2	76,9		
4g	3,1	69,7		
5g	3,4	77,3		
6g	3,4 e 3,7	60,7		

5.6.3. Caracterização estrutural da F. AcOEt 36 – (17) - (morelloflavona)



A análise dos espectros de NMR de 1H e ^{13}C permitiu identificar essa fração como pertencente à classe dos biflavonóides. A comparação dos valores de deslocamentos químicos dos carbonos com valores registrados na literatura para a (+)-morelloflavona (Fukugetin) permitiu identificar este biflavonóide como morelloflavona ou fukugetin. (LI *et al*, 2002).

O espectro de NMR ^{13}C apresentou sinais de carbono carbonílico em δ 196,2 e δ 181,5 ppm e dois sinais no NMR de 1H em δ 12,25 (s) e δ 13,0 (s) ppm desprotegido pelo efeito do oxigênio da carbonila (hidrogênios quelados), evidenciando duas unidades flavonoídicas (espectros em anexos).

Os sinais em δ 5,7 *d* (12 Hz), δ 4,9 *d* (12 Hz) e δ 6,5 s e no espectro de 1H e os sinais em δ 80,2, 48,6, 163,7 e 102,4 no espectro de ^{13}C evidenciam a existência de duas unidades flavonoídicas distintas: uma flavanona e a outra unidade sendo uma flavona.

São observados no *g*COSY as correlações em δ 6,4 *d* (8,5 Hz) com δ 7,1 *d* (8,5 Hz) referente aos H-2/H-6 correlacionando com H-3/H-5 do anel B da unidade I e a correlação em δ 4,9 *d* (12 Hz) com δ 5,7 *d* (12 Hz) referente aos hidrogênios H-2 e H-3 da flavanona (unidade I).

No mapa de contorno do *g*HMBC algumas das correlações observadas são: os sinais do espectro de NMR 1H em δ 7,1 *d* (8,5 Hz) referente ao H-2/H-6 e δ 4,9 *d* (12 Hz) referente ao H-3 correlacionando com o sinal no espectro de RMN ^{13}C em δ 80,9; o H-3 correlacionando com o carbono carbonílico C-4 na

Resultados e Discussões

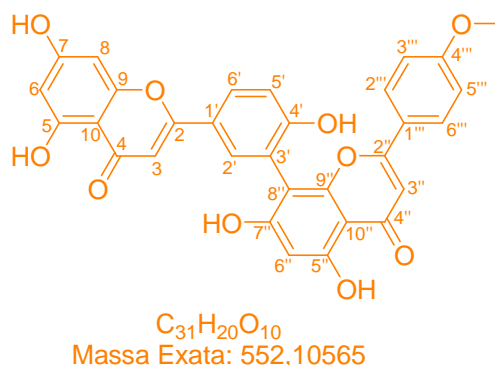
unidade I e na unidade II (flavona) os singletos do H-3'' e H-6'' correlacionando com o C-10''. É observada também no gHMBC a correlação entre H-3 da flavanona com C-7'' e C-9'' da unidade flavona confirmando a ligação entre as duas unidades do tipo C-3→C-8''.

Todos os dados de ^1H , ^{13}C , gHMQC e gHMBC observados para a morelloflavona encontram-se na **tabela 12**.

Tabela 12: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) da morelloflavona ou Fukugetin (DMSO – d_6).

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	gHMBC	gCOSY
2	5,74 <i>d</i> (12 Hz)	80,9	H3 ; H2'	H3
3	4,86 <i>d</i> (12 Hz)	48,3		H-2
4	-	196,2	H-3	
5	-	N.O		
5 - OH	12,25 <i>s</i>	-		
6	5,97 <i>d</i> (1,5 Hz)	95,3		
7	-	163,8		
8	5,99 <i>d</i> (1,5 Hz)	96,2		
9	-	166,6	H-8	
10	-	101,5	H-6	
1'	-	128,2	H-2'; H-3'	
2'	7,15 <i>d</i> (8,5 Hz)	128,4	H-2	H-3'
3'	6,39 <i>d</i> (8,5 Hz)	114,4		H-2'
4'	-	157,3	H-2'	
5'	6,39 <i>d</i> (8,5 Hz)	114,4		H-6'
6'	7,15 <i>d</i> (8,5 Hz)	128,4		H-5'
2''	-	163,1	H-3''	
3''	6,55 <i>s</i>	102,1		
4''	-	181,5	H-3''	
5''	-	160,4		
5'' - OH	13,01 <i>s</i>	-		
6''	6,20 <i>s</i>	98,7		
7''	-	162,8		
8''	-	100,6	H-3; H-6''	
9''	-	155,3		
10''	-	102,8	H-3''; H-6''	
1'''	-	121,1	H-5'''	
2'''	7,43 <i>sl</i>	113,2		
3'''	-	145,6	H-5'''	
4'''	-	149,6		
5'''	6,91 <i>d</i> (9,0 Hz)	116,1		H-6'''
6'''	7,41 <i>d</i> (9,0 Hz)	119,2		H-5'''

5.6.4. Caracterização estrutural da F. AcOEt 48 – (20) - (podocarpusflavona)



A análise dos espectros de NMR de 1H e ^{13}C permitiu identificar a molécula F. AcOEt 48 como pertencente à classe das biflavonas. Os dados do espectro de NMR ^{13}C foram comparados com valores já reportados na literatura (MARKHAM; SHEPPARD; GEIGER, et al, 1987) apresentando dois sinais de carbonos carbonílicos em 181,6 e 181,8 ppm e dois sinais no NMR de 1H em 12,97 (s) e 13,07 (s) ppm desprotegido pelo efeito do átomo de oxigênio da carbonila (hidrogênios quelados), evidenciando duas unidades flavonoídicas (espectros em anexos).

Os sinais no espectro de 1H em δ 6,77 s, δ 6,82 s e no espectro de ^{13}C em δ 164,0, 162,8, 102,6 e 103,1 evidenciam a existência de duas unidades flavonoídicas comumente conhecidas como flavonas.

A posição da metoxila foi determinada pelo experimento NOESY 1D. Quando o sinal em δ 3,69 no espectro de NMR de 1H referente à metoxila foi irradiado, o sinal em δ 6,84 d (9 Hz) no espectro de NMR de 1H interagiu com a metoxila, evidenciando a sua posição em 4'''.

No mapa de contorno do gHMBC é observado como principal correlação o H-2' da unidade I com o C-8'' da unidade II sugerindo a ligação entre as duas unidades do tipo das amentoflavonas (C-3'→C-8''). As demais correlações observadas no gHMBC e gHMQC estão listadas na **tabela 13** abaixo.

Tabela 13: Dados de NMR de ^1H (500 MHz) e NMR de ^{13}C (125 MHz) da podocarpusflavona (DMSO – d_6).

Posição	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)	gHMBC	gCOSY
2	-	164,0	H-1'; H-3'	
3	6,77 s	102,7	-	
4	-	181,6	H-3	
5	-	161,4	12,97 s	
5 - OH	12,97 s	-	-	
6	6,16 d (2 Hz)	98,7	H-8	
7	-	163,9	H-6; H-8	
8	6,35 d (2 Hz)	93,9	H-6	
9	-	157,3	H-8	
10	-	103,6	H-3; H-6; H-8; 12,97 s	
1'	-	120,0*	H-3	
2'	8,07 d (2 Hz)	131,3	H-6'	H-6'
3'	-	120,2*	H-5'	
4'	-	N.O*		
5'	7,06 d (8 Hz)	117,2*		H-6'
6'	7,95 dd (8 e 2 Hz)	127,3	H-2'	H-5'
2''	-	162,8	H-3''	
3''	6,83 s	103,1		
4''	-	181,9	H-3''	
5''	-	160,5	H-6''; 13,07 s	
5'' - OH	13,07 s	-		
6''	6,27 s	99,7*	13,07 s	
7''	-	164,0		
8''	-	105,3	H-6''; H-2'	
9''	-	154,6		
10''	-	103,0*	H-3''; 13,0 s	
1'''	-	123,1	H-3'''	
2'''	7,70 d (9 Hz)	127,9	H-6'''	H-3'''
3'''	6,84 d (9 Hz)	114,3	H-5'''	H-2'''
4'''	-	162,0	3,69 s; H-6'''	
5'''	6,84 d (9 Hz)	114,3	H-3'''	H-6'''
6'''	7,70 d (9 Hz)	127,9	H-2'''	H-5'''
OCH ₃	3,69 s	55,3		

* - Os valores de NMR de ^{13}C foram atribuídos através das interações observadas nos experimentos gHMQC e gHMBC.

N.O* - Valores não observados no experimento de NMR ^{13}C .

5.7. Ensaio Preliminares

5.7.1. Ensaio antioxidante

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se localizado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ROS (espécies reativas de oxigênio) ou RNS (espécies reativas de nitrogênio). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS; DAVID; DAVID et al, 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças através do restabelecimento do equilíbrio pró/antioxidante de sistemas biológicos.

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura, que absorve a 516 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (figura 14), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH• consumida pelo antioxidante) ou seqüestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional. O ensaio utilizando o radical

estável DPPH• consiste em um método fácil e rápido para avaliar a atividade antiradicalar de diversos antioxidantes (PAULETTI et al, 2003).

O mecanismo de reação é baseado em transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio (DE OLIVEIRA et al, 2009).

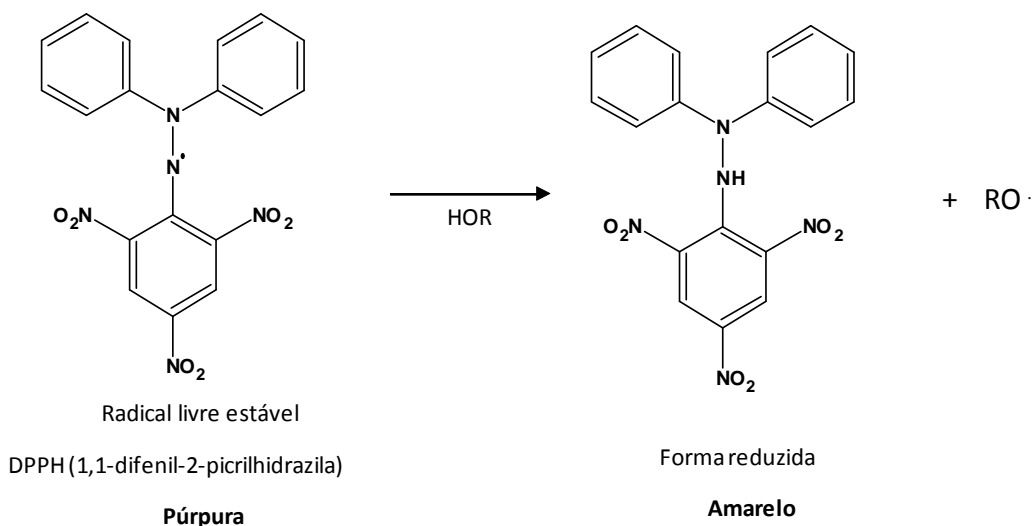


Figura 44: Simplificação do mecanismo da reação envolvido no ensaio com DPPH.

Segundo a tabela de resultados (**tabela 14**), observa-se uma maior ação antioxidante frente ao DPPH no extrato etanólico dos galhos e folhas, assim como nas frações AcOEt dos galhos e folhas. Os resultados observados no gráfico (**figura 48**) e na **tabela 14** corroboram a importância da presença de unidades fenólicas e/ou núcleos catecólicos em antioxidantes em potencial, evidenciadas na análise *in silico*. Os extratos e frações (EtOH, AcOEt) que contém substâncias com tais características estruturais mostraram os melhores resultados, com IC₅₀ comparáveis aos apresentados pelos padrões utilizados.

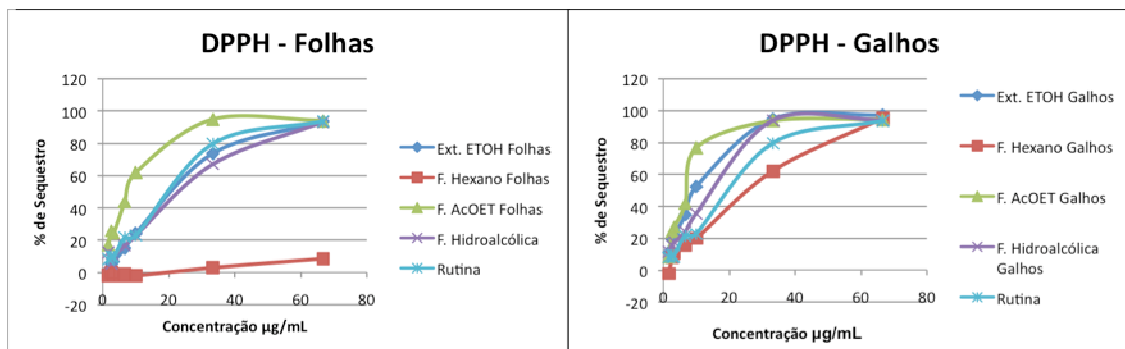


Figura 45: Gráficos obtidos para o ensaio de DPPH dos extratos e frações.

Tabela 14: Dados de IC₅₀ frente ao ensaio de DPPH dos extratos e frações.

Extratos e Frações das folhas e galhos de <i>G. gardneriana</i>	DPPH. IC ₅₀ (µg/mL)
Folhas Ext. EtOH	21,9
Folhas F. hexano	N.A*
Folhas F. AcOEt	7,5
Folhas F. hidroalcoólica	24,1
Galhos Ext. EtOH	9,5
Galhos F. hexano	26,9
Galhos F. AcOEt	7,4
Galhos F. hidroalcoólica	15,8
Rutina	21,0

* Não apresentou atividade significativa

5.7.2 Ensaio de inibição da polimerização da heme

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a malária é a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo superada apenas, em número de mortes, pela AIDS. A malária ainda é uma das doenças que mais crescem no mundo. O *Plasmodium falciparum*, responsável pela malária mais grave, afeta severamente a população mundial, causando de 1-1,5 milhões de mortes a cada ano, sendo a maioria crianças de até 5 anos de idade. A malária ocorre principalmente nos países da África, Ásia e América Latina, devido às inadequadas estruturas na área da saúde e baixas condições socioeconômicas.

Na década de 40, ocorriam cerca de 6 milhões de casos de malária ao ano no Brasil, número que foi reduzido a 52 mil casos em 1970, graças a campanhas federais e estaduais de combate à doença. Os dados da Fundação

Nacional de Saúde (Funasa) do ano de 2002, até abril, indicam que o número de casos de malária caiu 14 % em relação ao mesmo período de 2001.

Existem quatro membros do gênero *Plasmodium*, que afetam os seres humanos. A malária é transmitida através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* infectado. Após a infecção do indivíduo pela picada do mosquito, os parasitas *Plasmodium* primeiramente se acumulam nos hepatócitos (células do fígado) na forma de esporozoítos, onde se desenvolvem e tornam-se merozoítos. Em seguida, os merozoítos invadem os eritrócitos para o próximo estágio de sua maturação. Neste estágio os merozoítos desenvolvem-se, tornando-se trofozoítos maduros (forma anelar) e, em seguida, tornam-se esquizontes. Após alguns dias, as células vermelhas infectadas arrebentam e os merozoítos são liberados, causando as febres periódicas da malária. Cada esquizonte libera de 8-24 merozoítos e estes infectam novos eritrócitos, dando seqüência a um ciclo. Dentro dos eritrócitos o parasita degrada grande parte da hemoglobina, liberando uma porção protéica (globina) e o heme (complexo ferro-porfirina). Em humanos, os parasitas da malária digerem mais de 70 % da hemoglobina dentro das células vermelhas infectadas do sangue. Cerca de 30 % ou mais desta metabloporfirina é digerida pelo parasita e usada como fonte de aminoácidos para a síntese de suas próprias proteínas. O heme proveniente da hemoglobina é tóxico para o parasita, que, através de uma polimerase, o converte no pigmento malarial chamado de hemozoína e, desta forma, ele se protege. (COSTA; KIRALJ; FERREIRA et al, 2007).

O planejamento racional de novos medicamentos antimaláricos requer o conhecimento preciso do mecanismo de ação destes fármacos. Existem algumas evidências que a interação entre os antimaláricos esquizonticidas sangüíneos com o grupo heme [ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX)] está envolvida na toxicidade destes fármacos ao parasita intraeritrocítico. Vários experimentos *in vitro* estabeleceram que fármacos antimaláricos quinolínicos atuam por interferência na cristalização da hemozoína. É consenso que estes fármacos inibem a formação da hemozoína. Persiste, entretanto, uma divergência sobre como isso ocorre (DA SILVA et al, 2005).

Foi demonstrado química, espectroscópica e cristalograficamente que o pigmento malárico hemozoína é idêntico à β -hematina sintética, cuja estrutura foi determinada usando técnicas de “simulated annealing” para analisar dados de difração, obtidos por radiação síncroton. No cristal de β -hematina, as moléculas de Fe(III)PPIX estão ligadas, formando dímeros, por meio de ligações recíprocas ferro-carboxilato de uma das cadeias laterais propiônicas. Estes dímeros formam cadeias mantidas por ligações de hidrogênio.

Os ensaios realizados com o extrato etanólico das folhas de *G. gardneriana* evidenciaram uma forte interação com o grupo heme, em valores de inibição de 95,7 % a 2,5 mg/mL. Após a extração líquido-líquido, a fração AcOEt mostrou a maior atividade com inibição de 98,6 % a 2,5 mg/mL, sugerindo a presença de substâncias com potencial atividade de inibição de polimerização do heme nesta fração (**figura 19**).

Para o extrato etanólico e a fração AcOEt dos galhos também foram observadas interações com o grupo heme, mas com valores inferiores ao obtido para as folhas.

Sendo assim o extrato etanólico das folhas e sua fração AcoEt são as frações mais promissoras à identificação de substâncias em potencial da inibição da β -hematina e conseqüentemente da polimerização do heme.

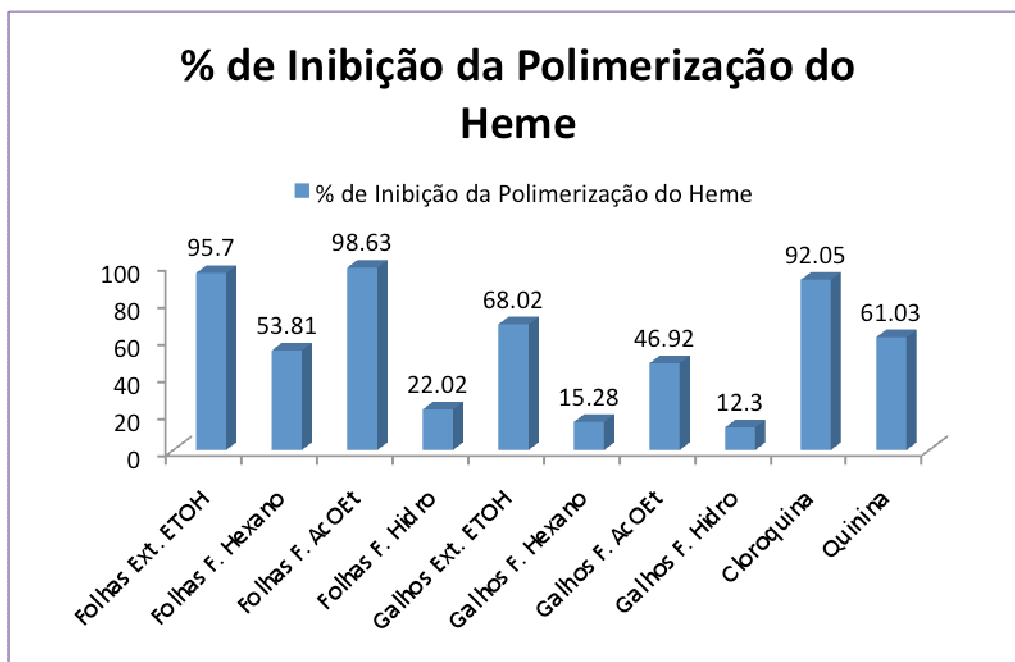


Figura 46: Dados obtidos para o ensaio de inibição da polimerização do heme.

5.7.3. Ensaio acetilcolinesterásico

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto sócio-econômico, responsável por ca. 50-60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima dos 65 anos. Esta patologia afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo. Cientistas estimam que cerca de 4 milhões de pessoas possuem esta doença e que sua incidência duplica a cada 5 anos, após os 65 anos de idade.

Em nível celular, a DA está associada à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão. Os fármacos inibidores de acetilcolinesterase vêm sendo, atualmente, a alternativa terapêutica mais comumente empregada por apresentarem melhores resultados no controle da doença sem, entretanto, serem capazes de impedir sua progressão em nenhum de seus níveis (VIEGAS JR. et al, 2004).

Os extratos e frações submetidos ao ensaio acetilcolinesterásico não foram tão ativas quando comparadas ao padrão (o padrão aparece como um halo de coloração totalmente branca), mas alguns constituintes que estão parcialmente descorados ao fundo de coloração roxa da placa cromatográfica (**figura 47**) com os devidos RF listados abaixo (**tabela 15**), apresentaram alguma indicação de inibição da reação enzimática.

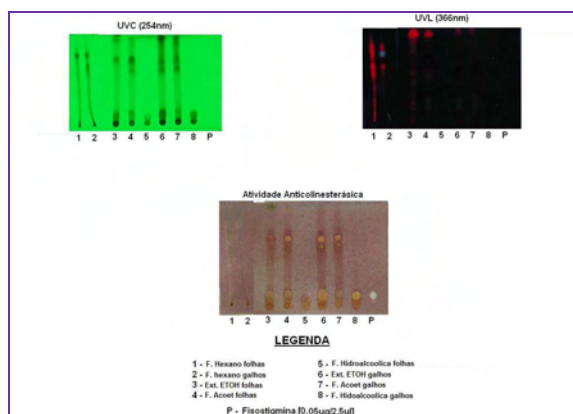


Figura 47: Cromatoplasmas reveladas em: A – luz UV λ 254 nm; B – luz UV λ 366 e C – revelada com a solução da enzima acetilcolinesterase.

Tabela 15: Valores de RF que apresentaram alguma indicação de inibição da reação enzimática.

Amostras	RF
Folhas Ext. EtOH	0,1
Folhas F. hexano	-
Folhas F. AcOEt	0,65 / 0,12
Folhas F. hidroalcoólica	0,06
Galhos Ext. EtOH	0,64 / 0,56 / 0,11
Galhos F. hexano	-
Galhos F. AcOEt	0,65
Galhos F. hidroalcoólica	0,08
Fisostigmina	0,08

5.7.4. Ensaio antifúngico

Agentes fungitóxicos provenientes de plantas superiores são utilizados tanto na clínica humana quanto na veterinária, e para avaliação das atividades, realiza-se um ensaio para a detecção do efeito inibitório das substâncias sobre o crescimento de fungos (HOOG & GUARRO, 1995).

Os fungos são responsáveis por várias doenças de difícil tratamento, como por exemplo a alergia causada pelo *Trichophyton nentagrophytes* (“pé-de-atleta”), e estão associados a doenças imunodeficientes, tal como a AIDS (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991 e HOOG & GUARRO, 1995).

O fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, é uma espécie fitopatogênica em *Anacardium occidentale* ocorrendo nos Estados da Bahia, Ceará, Piauí e Rondônia (HOOG & GUARRO, 1995).

O fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, é uma espécie comum e cosmopolita, ocorrendo como invasor secundário em diversas partes de plantas, como rizosfera do feijão, e sementes de arroz e milho. É encontrado em ambientes como ar, solo, comidas e tinturas (HOOG & GARRO, 1995). Várias técnicas são descritas para análise de atividade fungitóxica, mas de acordo com BETINA (1973), bioautografia é o mais importante método de detecção para novos compostos antimicrobianos.

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos para este ensaio evidenciam que alguns constituintes das folhas (F. AcOEt) possuem atividade antifúngica fraca e média (**tabela 16**). Alguns constituintes dos galhos (Ext. EtOH e F. AcOEt) também possuem atividade fraca frente ao fungo *Cladosporium cladosporioides*. Quanto à outra linhagem de fungo testada (*C. sphaerospermum*), nenhum dos constituintes dos extratos e frações de *G. gardneriana* apresentaram atividade significativa (**Figura 48**).

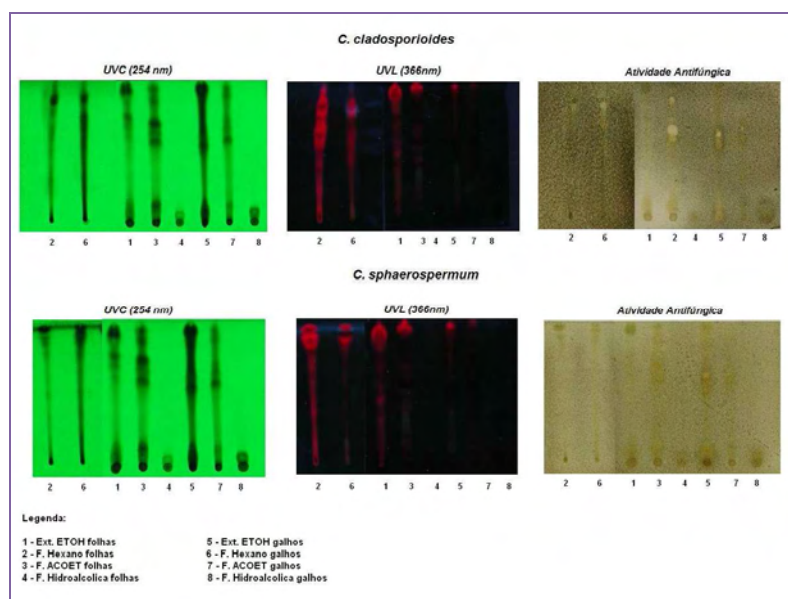


Figura 48: Cromatoplaças reveladas em: A – luz UV λ 254 nm; B – luz UV λ 366 e C – revelada com a suspensão de esporos do fungo *C. cladosporioides* e/ou *C. sphaerospermum*.

Tabela 16: Valores de RF que apresentaram alguma indicação de atividade.

Amostras	Atividade			RF		
Folhas Ext. EtOH	-	-	-	-	-	-
Folhas F. hexano	-	-	-	-	-	-
Folhas F. AcOEt	1) *	2) **	3) *	1) 0,86	2) 0,64	3) 0,57
Folhas F. hidroalcoólica	-	-	-	-	-	-
Galhos Ext. EtOH	1) *	-	-	1) 0,62	-	-
Galhos F. hexano	-	-	-	-	-	-
Galhos F. AcOEt	1) *	-	-	1) 0,65	-	-
Galhos F. hidroalcoólica	-	-	-	-	-	-

* Atividade fraca **Atividade média ***Atividade Forte

5.7.5 Ensaio tripanocida

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* e afeta um número estimado de 16 a 18 milhões de pessoas. Cerca de 30 a 40% dos pacientes infectados desenvolvem a cardiomiopatia chagásica crônica, que representa um importante problema de saúde pública na América Latina (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002). A quimioterapia atual para esta doença envolve duas drogas, nitrofuranos (Nifurtimox) ou nitroimidazóis (benzonidazol), que são eficientes apenas durante a fase crônica aguda e de curta duração (COTINGUIBA et al, 2009). Infelizmente, a utilidade destas drogas é limitada pela sua estreita janela terapêutica, forte efeitos colaterais, e suscetibilidade variável entre as cepas de *T. cruzi*, resultando em baixa eficácia clínica. Os esforços são, portanto, urgente da necessidade de identificar, projetar e desenvolver novos medicamentos candidatos anti-chagásico (CASTRO et al., 2006).

Os extratos e frações de *G. gardneriana* submetidas a este ensaio não apresentaram atividade significativa, conforme mostrado na **tabela 17**.

Tabela 17: Resultados obtidos para o ensaio tripanocida.

Concentração das Amostras (µg/mL)	% de parasitas mortos							
	Folhas Ext. EtOH	Folhas F. Hexano	Folhas F. AcOEt	Folhas F. Hidro	Galhos Ext. EtOH	Galhos F. Hexano	Galhos F. AcOEt	Galhos F. Hidro
500	30	80	100	29	100	100	100	100
400	26	77	100	27	100	100	100	99
300	25	59	100	25	79	100	100	92
200	19,5	35	86	22	39	100	99	69
100	9,5	21,5	40	5	20	84	76	26
50	2	13	17	5	10	25,5	22	12
25	0	4	8	0	4	7	6	7
IC ₅₀ (µg/mL)	>500	272	121	>500	217	69,8	74,7	154

IC₅₀ do Benzonidazol: 9,7 µg/mL

5.7.6. Ensaio citotóxico

O teste é uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

De acordo com a **tabela 18**, de todos os extratos e frações de *Garcinia gardneriana* submetidas a este ensaio, apenas as frações hexânicas dos galhos e folhas apresentaram-se promissores.

Tabela 18: Resultados obtidos para o ensaio citotóxico (% de inibição do crescimento celular) frente às linhagens de células tumorais HL-60 (leucemia promielocítica humana), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (sistema nervoso - humano).

Amostras	HL-60	GI%	SF 295	GI%	HCT 8	GI%
	GI% Média	SD	GI% Média	SD	GI% Média	SD
Folhas Ext. EtOH	33,02	1,70	30,57	1,05	15,30	4,29
Folhas F. hexano	100,9	0,93	78,72	0,35	88,25	1,80
Folhas F. AcOEt	54,53	15,40	60,11	9,42	84,87	5,22
Folhas F. hidroalcoólica	16,97	3,95	31,02	0,60	11,68	1,88
Galhos Ext. EtOH	-9,68	4,26	14,7	1,6	1,37	1,65
Galhos F. hexano	102,0	2,17	87,63	0,25	98,19	0,15
Galhos F. AcOEt	49,6	6,93	13,90	3,00	46,32	0,67
Galhos F. hidroalcoólica	19,26	0,19	29,87	3,25	8,60	3,61

5.7.7. Ensaio antifúngico contra *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de *Candida*.

Segundo SCORZONI et al, 2007, as infecções humanas por fungos têm aumentado em uma alarmante taxa nos últimos 20 anos, principalmente entre indivíduos imunocomprometidos. Novos dados indicam que a proporção de organismos causando infecções da corrente sanguínea nosocomial mudaram na última década, com espécies de *Candida* agora firmemente estabelecido como um dos agentes mais freqüentes. Candidemia não é só associado a uma mortalidade elevada, mas também se estende à duração da estadia no hospital e aumenta os custos de cuidados médicos. Entre trato gastrointestinal humano isolados 50-70% do total em leveduras isolados foram identificados como *Candida albicans*. Mais freqüentes são isolados de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, enquanto *C. kefyr* e *C. guilliermondii* são encontradas ocasionalmente (BARBERINO et al., 2006; COLOMBO et al., 2006).

Cryptococcus neoformans, levedura encapsulada, é a segunda causa mais comum de infecção fúngica oportunista em pacientes com AIDS, mas também podem causar doença em indivíduos normais hosts. De fato, as manifestações desta infecção pode variar de um colonização assintomática do trato respiratório de ampla divulgação, em função imune do hospedeiro a resposta. Quando a divulgação ocorre, o sistema nervoso central sistema é comumente envolvido. Os fatores de risco incluem: avançada HIV palco, uso de corticosteróides, linfomas, de órgãos sólidos.

Drogas rotineiras antifúngicas estão essencialmente limitadas aos polienos anfotericina B, e seus diversos complexos de novos lipídios, os compostos azólicos, como fluconazol e itraconazol, e flucitosina (5-fluorocitosina). Estes agentes sofrem uma série de limitações que podem levar a complicações, por exemplo, dose-limitante, nefrotoxicidade associada anfotericina B, o rápido desenvolvimento de resistência à flucitosina e resistência aos azólicos. Assim, há uma necessidade urgente de novos antifúngicos com um amplo espectro de ação fungicida e com menos dose-limitante dos efeitos colaterais.

Resultados e Discussões

De acordo com os resultados (**tabela 19**) apresentados para este ensaio, podemos dizer que apenas o extrato etanólico dos galhos e sua fração AcOEt apresentaram atividade forte frente à *Candida krusei*.

A fração AcOEt das folhas apresentou atividade moderada frente à *C. krusei*, assim como a fração hidroalcoólica das folhas e a fração hexânica dos galhos.

O extrato etanólico, a fração hexânica e a fração AcOEt dos galhos apresentaram atividade moderada frente à *C. albicans*. Apenas a fração AcOEt dos galhos apresentou atividade moderada frente à *C. parapsilosis* e a fração hexânica e a fração hidroalcoólica dos galhos apresentaram atividade moderada frente à *Cryptococcus neoformans*.

Tabela 19: Resultados obtidos para o ensaio antifúngico (Concentração Inibitória Mínima - CIM) contra *Cryptococcus neoformans* e algumas espécies de *Candida*.

Amostras	<i>Candida albicans</i> CIM*	<i>Candida krusei</i> CIM*	<i>Candida parapsilosis</i> CIM*	<i>Cryptococcus neoformans</i> CIM*
Ext EtOH folhas	250	250	> 250	250
F. hexano folhas	> 250	250	> 250	> 250
F. AcoEt folhas	250	125	250	250
F. hidroalcoólica folhas	> 250	125	> 250	250
Ext EtOH galhos	125	31,25	250	250
F. hexano galhos	125	125	250	125
F. AcoEt galhos	125	31,25	125	250
F. hidroalcoólica galhos	250	250	> 250	125

*CIM – Concentração Inibitória Mínima.

6. Considerações Finais

A detecção *in silico* por técnicas acopladas possibilitou o estudo fitoquímico dos extratos e frações de *Garcinia gardneriana* descritos neste trabalho.

Foram detectados *in silico* por GC-FID nos extratos de baixa polaridade 11 triterpenos: campesterol (1), estigmasterol (2), β -sitosterol (3), β -amirenona (4), α -amirina (5), β -amirina (6), lupenona (7), lupeol (8), acetato de β -amirina (9), acetato de α -amirina (10), friedelina (11).

Na fração AcOEt das folhas foram detectados, *in silico* através da técnica HPLC-MS-HRMS 9 biflavonóides: xantochimusídeo (12), GB2 (13), fukugisídeo (14), GB 1a glicosilado (15), GB2a (16), moreloflavona (17), volkensiflavona (18), amentoflavona (19), podocarpusflavona (20) e uma benzofenona: 7-Epiclusianona (21).

Os compostos (2), (3), (8), (11), (14), (16), (17), (18) e (21) já haviam sido reportados para a espécie e os demais compostos não possuem relatos na literatura para a espécie *G. gardneriana*.

No que diz respeito às técnicas hifenadas e à metodologia de análise *in silico*, tais demonstraram-se eficientes na identificação dos constituintes de *G. gardneriana* diretamente na matriz bruta, excluindo a necessidade de isolamento destes compostos e fornecendo a rápida detecção de constituintes em pequenas quantidades da matriz.

Quanto aos bioensaios *in vitro*, foi avaliado o potencial antioxidante, inibidor de β -hematina, antifúngico contra fitopatógenos e antifúngico contra patógenos humanos, tripanocida e citotóxico. Os resultados observados para o ensaio de sequestro de radicais livres utilizando o radical DPPH (IC₅₀ de 9,5, 7,4 e 7,5 μ g/mL para o extrato etanólico dos galhos, a fração acetato de etila dos galhos e folhas respectivamente) evidenciaram à alta concentração de grupos fenólicos presentes nos biflavonóides detectados, essenciais para uma ação antioxidante potencializada.

O extrato etanólico das folhas e as frações acetato de etila das folhas e galhos mostraram-se com uma boa interação com o heme, com inibição de 95,7, 98,6 e 68,0 % respectivamente.

Com relação à atividade antifúngica contra fitopatógenos o resultados obtidos para este ensaio evidenciam que alguns constituintes das folhas (F. AcOEt) possuem atividade antifúngica fraca e média; alguns constituintes dos galhos (Ext. EtOH e F. AcOEt) também possuem atividade fraca frente ao fungo *Cladosporium cladosporioides*. Quanto à outra linhagem de fungo testada (*C. sphaerospermum*), nenhum dos constituintes dos extratos e frações de *G. gardneriana* apresentou atividade relevante.

Para o ensaio antifúngico contra alguns patógenos humanos os resultados que merecem maior interesse foram contra a linhagem *Candida krusei* para o extrato etanólico dos galhos e sua fração acetato de etila (CIM: 31,5).

A avaliação preliminar do potencial para a inibição da enzima acetilcolinesterase apresentou como melhores resultados as frações acetato de etila das folhas e galhos.

O ensaio tripanocida não apresentou nenhuma atividade significativa para os extratos e frações avaliados.

Apenas as frações hexânicas dos galhos e folhas apresentaram-se promissoras à avaliação do ensaio preliminar de citotoxicidade.

De uma forma geral os resultados coletados neste trabalho podem direcionar o estudo na detecção de novos compostos ainda desconhecidos para a espécie *G. gardneriana* e que possam vir a serem responsáveis pelos vários resultados positivos no estudo de bioatividade e conseqüentemente, novos candidatos à fármacos.

Referências

- ALVES, T. M. A. et al. Biological Activities of 7-Epiclusianone. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 369-371, 1991.
- BAELMANS, R. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? **Journal Ethnopharmacol**, v. 73, p. 271-275, 2000.
- BARBERINO, M. G. et al. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, p. 36-40, 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthenes from guttiferæ. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 967-998, 1989.
- BERRIDGE, M. V. et al. Biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.
- BETINA, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in antibiotic field. **Journal of Chromatography**, v. 78, n. 1, p. 41-51, 1973.
- BOTTA, B. et al. Chemical investigation of the genus *Rheedia*, V. biflavonoids and xanthochymol. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1053, 1984.
- BRAZ FILHO, R.; CAVALCANTE DE MAGALHÃES, G.; GOTTLIEB, O. R. Chemistry of Brazilian guttiferæ. XX. Xanthenes of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 9, p. 673, 1970.
- CASTARDO, J. C. et al. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 405-411, 2008.
- CASTRO, J. A. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American Trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.

- CECHINEL FILHO, V. et al. I3-naringenin-II8-4'-OMe-eriodictyol - a new potential analgesic agent isolated from *Rheedia gardneriana* leaves. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 55, n. 9/10, p. 820-823, 2000.
- CHEN, F. C.; LIN, Y. M.; HUNG, J. C. New biflavone glucoside from *Garcinia multiflora*. New biflavone glucoside from *Garcinia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 818-820, 1975.
- COLOMBO, A. L. et al. Brazilian network candidemia study. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.
- CORDELL, G. A.; SHIN, Y. G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural products extracts. **Pure Applied Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 1089-1094, 1999.
- COSTA, M. S.; KIRALJ, R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo teórico da interação existente entre a artemisinina e o heme. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 25-31, 2007.
- COTINGUIBA, F. et al. Piperamides and their derivatives as potential anti trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703-711, 2009.
- CROTTI, A. E. M. et al. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular height compounds. In: TAFT, C. A. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Kerala: Reserch Signpost, 2006a. p. 99-141.
- CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006b.
- CRUZ, F. G. et al. Coumarins from *Kielmeyera reticulate*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1363-1366, 1998.
- DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 655-659, 1983.
- DELLE MONACHE, G. et al. Minor xanthenes from *rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1757-1759, 1984.
- DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.

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

FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal American Society for Mass Spectrometry**, v.12, p. 707-715, 2001.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 670-672, 2002.

HAY, A. E. et al. Antioxidant xanthenes from *Garcinia vieillardii*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 707-709, 2004.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, n. 2, p. 327-329, 1970.

HOOG, G.; GARRO, J. (Ed.). **Atlas of clinical fungi**. Utrecht: Central Bureau voor Schimmelcultures Boarn and Deft, 1995.

ITO, C. et al. Cancer chemopreventive agents. New depsidones from *Garcinia* plants. **Journal Natural Products**, v. 64, n. 2, p. 147-150, 2001.

JACKSON, B.; LOCKSLEY, H. D.; SCHEINMANN, F. Thermal and mass spectral fragmentation of flavanones and biflavanones. **Tetrahedron Letters**, v. 32, p. 3049-3055, 1967.

JACKSON, B.; LOCKSLEY, H. D.; SCHEINMANN, F. Extractives from Guttiferae. XV. Biflavonoids of *Garcinia volkensii*. **Phytochemistry**, v. 9, p. 221-226, 1970.

KIRBY, G. C. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 605-609, 1996.

LI, X. C. et al. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3→8'')-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. **Tetrahedron**, v. 58, n. 43, p. 8709-8717, 2002.

LIN, Y. M. et al. *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 9, p. 884-888, 1997.

LUZZI, R. et al. Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v. 4, n. 2, p. 141-144, 1997.

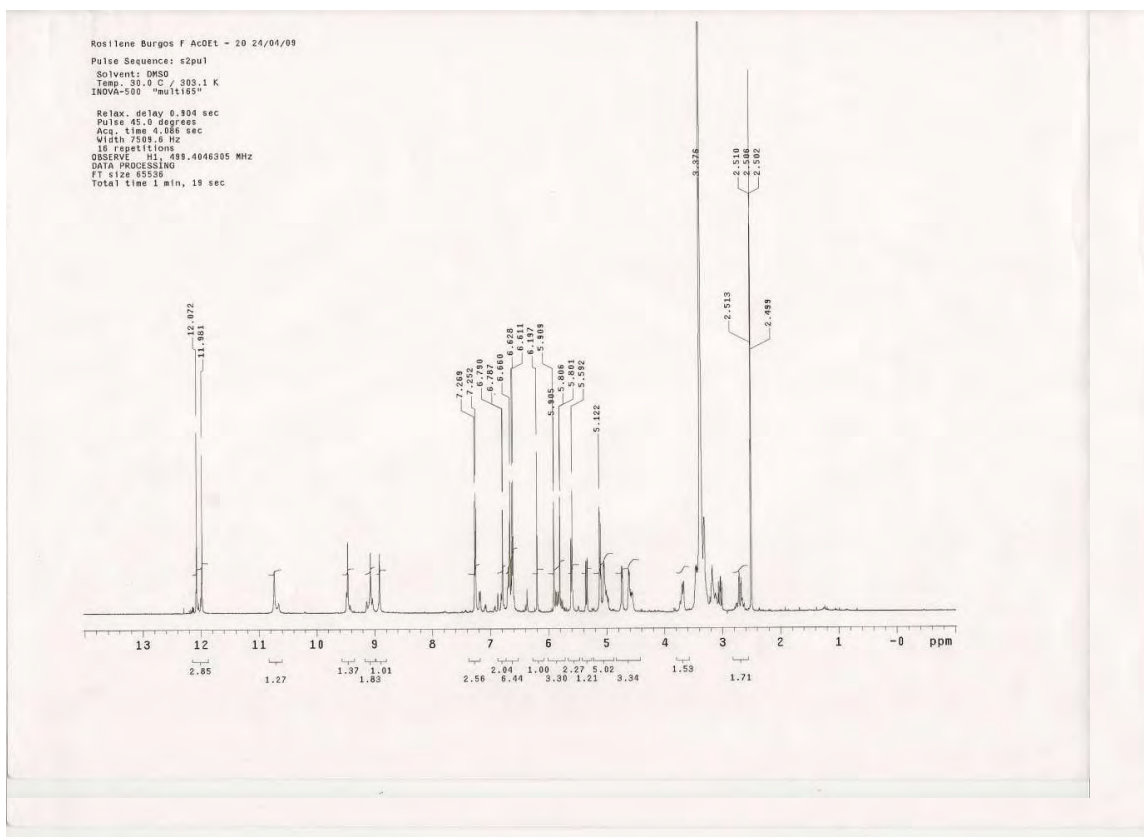
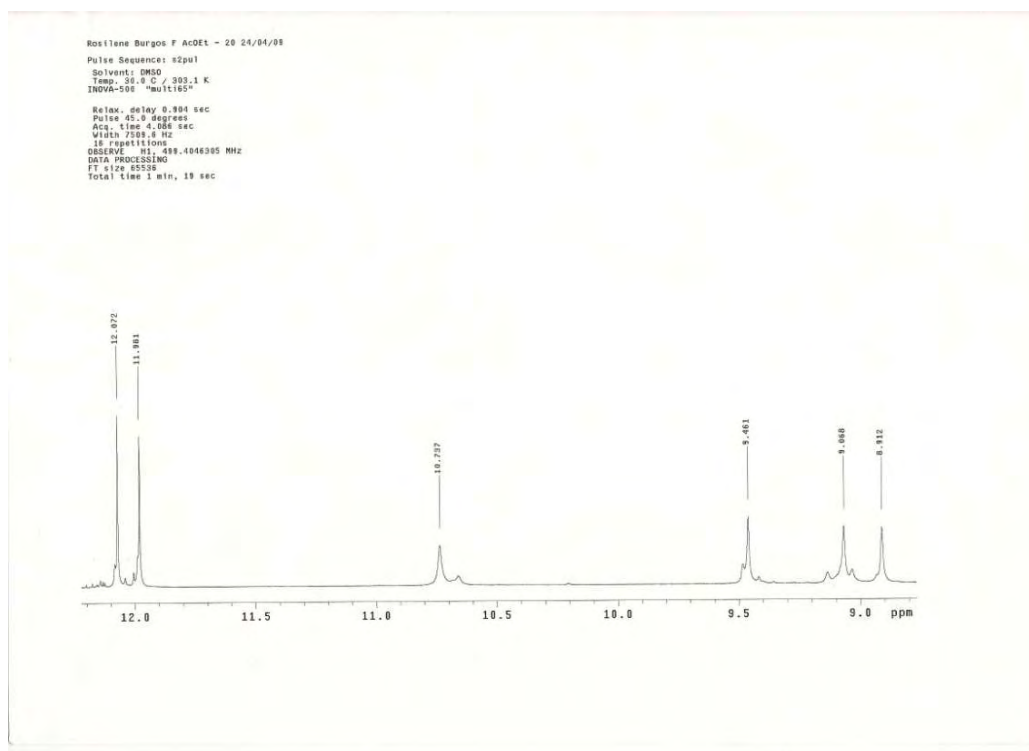
MABBERLEY, D. J. **The plant-book**. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.

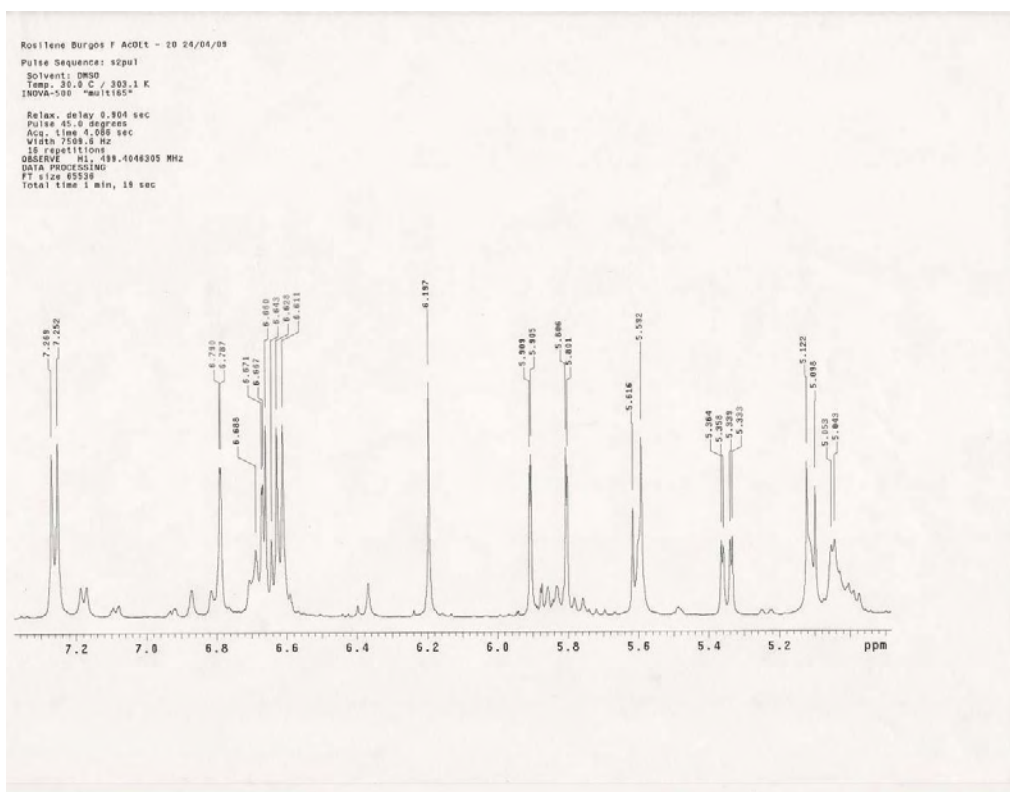
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The ultraviolet spectra of flavones and flavonols. In:_____. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer Verlag, 1970. p. 41-57.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1996.
- MARAIS, J. P. J. et al. **The science of flavonoids**: the stereochemistry of flavonoids. New York: Springer, 2006. p. 1-46.
- MARKHAM, K. R.; SHEPPARD, C.; GEIGER, H. ^{13}C NMR studies of some naturally occurring amentoflavona and hinokiflavone biflavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p. 3335-3337, 1987.
- MARTINEZ, O. E.; MORENO-MURILLO, B.; DELLE MONACHE, F. Fukugetina y fukogisida, biflavonoides de *clusia guaviarensis cuatr.* (Clusiaceae). **Revista Colombiana de Química**, v. 25, n. 1-2, p. 15-21, 1996.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v.17, p. 271-278, 2002.
- MAURI, P.; PIETTA, P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 1, p. 61-68, 2000.
- McNAB, H. et al. Negative ion ESI–MS analysis of natural yellow dye flavonoids - An isotopic labelling study. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 284, p. 57-65, 2009.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GOMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999-1002, 2000.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1-2, p. 111-136, 2003.
- OLIVEIRA, A. C. de. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

- PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthenes from the stems of *Arrabidaea samydoidea*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.
- PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal resistance in pathogenic fungi. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 1073-80, 2002.
- PERES, V.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Trioxxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 191-214, 1997.
- PERES, V.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Tetraoxxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 683-710, 2000.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- RAHALISON, L. et al. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 5, p. 199-203, 1991.
- RAO, A. V. R. et al. Benzophenone and xanthone with unusual hydroxylation patterns from heartwood of *garcinia-pedunculata*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 7, p. 1241-1244, 1974.
- REGASINI, L. O. et al. Identification of triterpenes and sterols from *Pterogyne nitens* (Fabaceae-caesalpinioideae) using high-resolution gas chromatography. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 3, p. 218-221, 2009.
- RICALDEZ, F. T.; VEGA, G. R. A. Phytochemical study of *rheedia gardneriana*. **Revista Boliviana de Química**, v. 17, n. 1, p. 9-14, 2000.
- RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista Multiciência**, v. 7, p. 7-14, 2006.
- SANTOS, M. H. dos. et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *rheedia gardneriana*. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 654-660, 1999.
- SANTOS, M. H. dos. et al. Efeito de constituintes químicos isolados da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a eclosão de juvenis de meloidogyne incógnita raça 3. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 711-714, 2007.
- SCORZONI, L. et al. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candida spp* and *Cryptococcus sp*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 25-34, 2007.

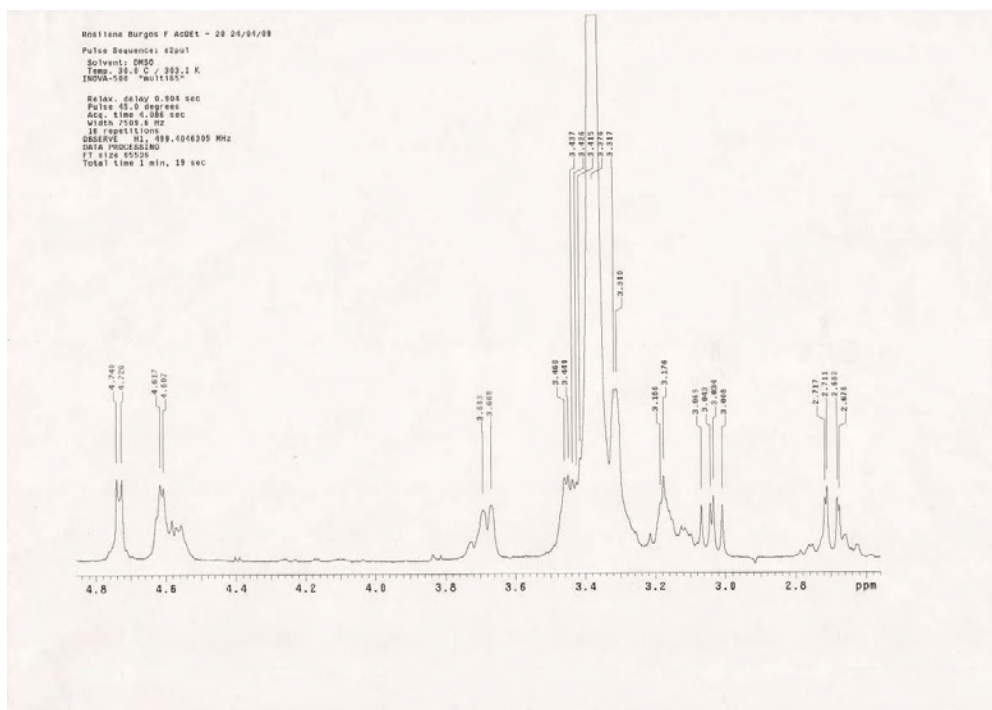
- SILVA, T. H. A. da. et al. Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-ix e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: proposta de um farmacóforo. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 244-249, 2005.
- SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structureactivity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468-472, 2002.
- SULTANBAWA, M. U. S. Xanthonoids of tropical plants. **Tetrahedron**, v. 36, n. 11, p. 1465-1506, 1980.
- SUZART, L. R. et al. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *ouratea* e *luxemburgia* (ochraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984-987, 2007.
- VESSECCHI, R. et al. Radical ion generation processes of organic compounds in electrospray ionization mass spectrometry. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 75-84, 2007.
- VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 2, n. 4, p. 655-660, 2004.
- WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural identification of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 437-455, 2003.

Anexos

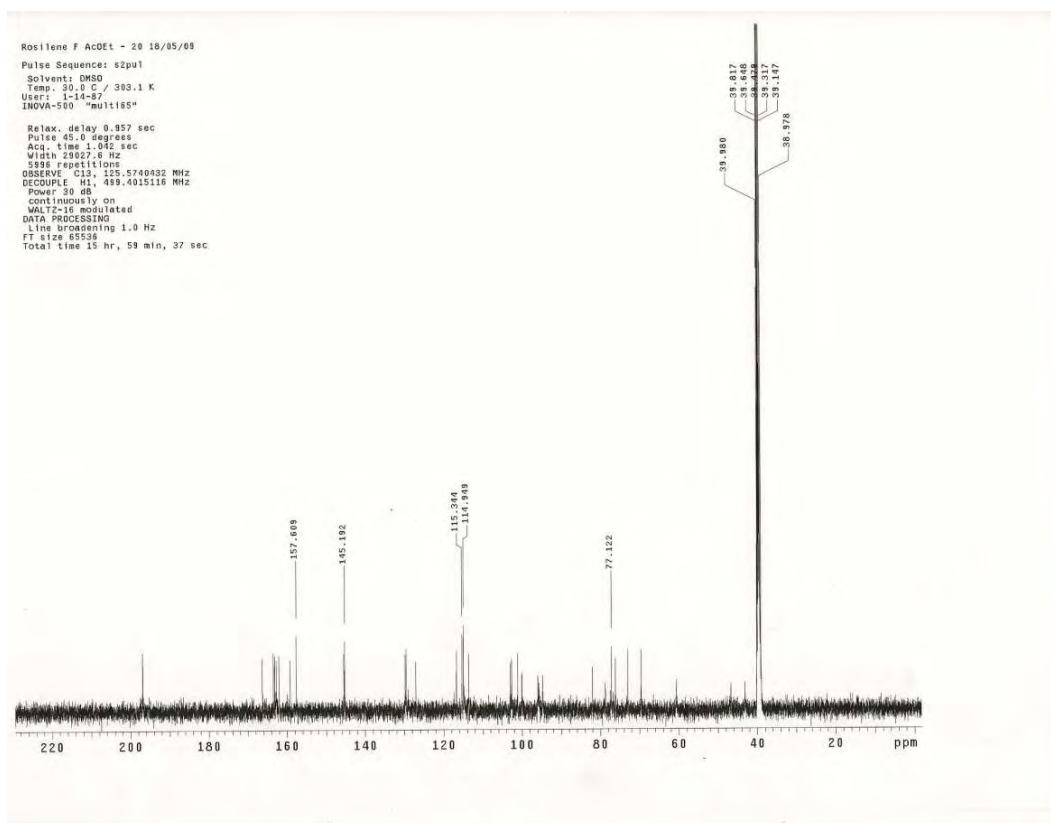
Anexo 1 – Espectro de RMN de ^1H da substância 12 - (500 MHz – DMSO- d_6)Anexo 2 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 12 (500 MHz – DMSO- d_6)



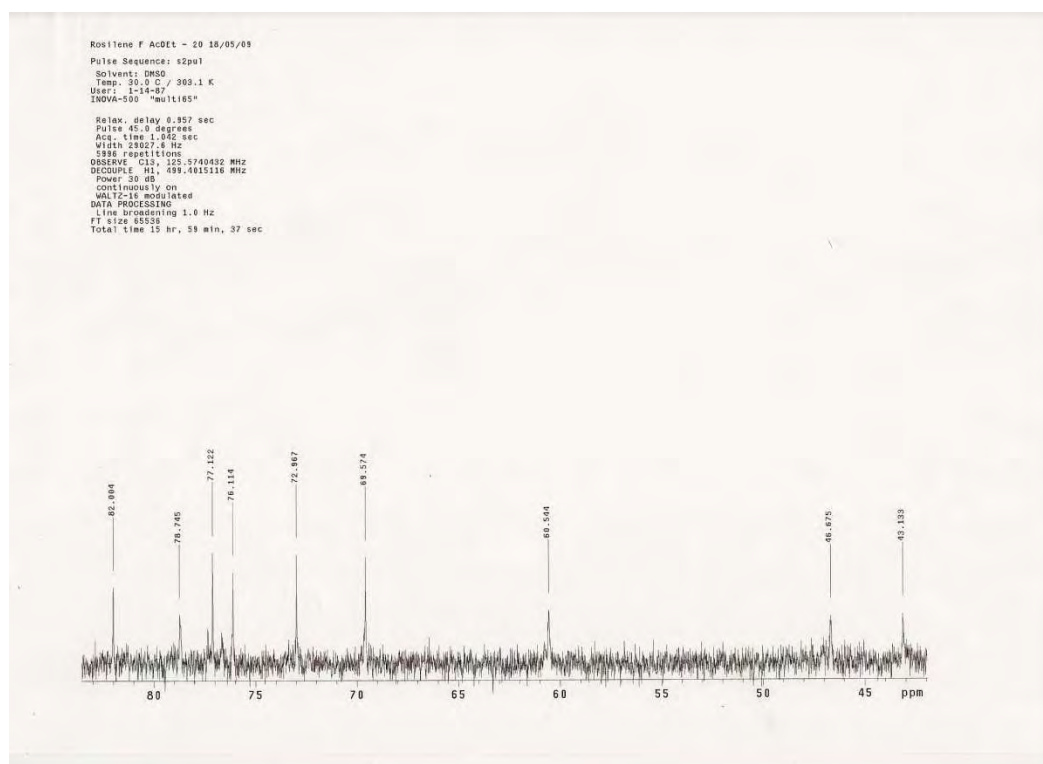
Anexo 3 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 12 (500 MHz – DMSO- d_6)



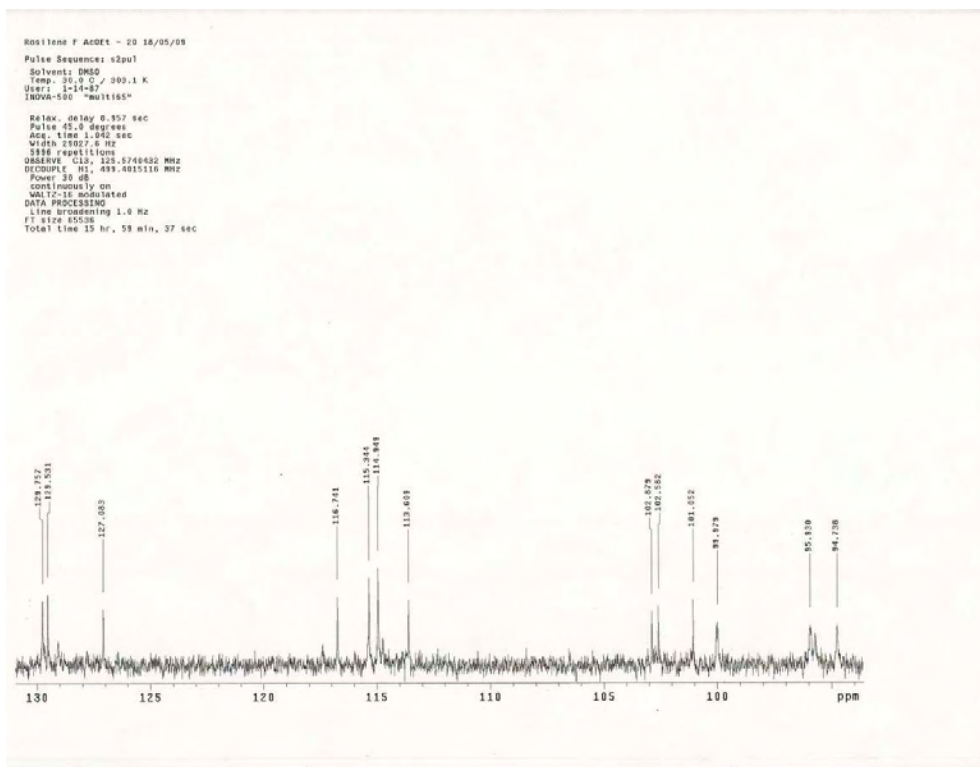
Anexo 4 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 12 (500 MHz – DMSO- d_6)



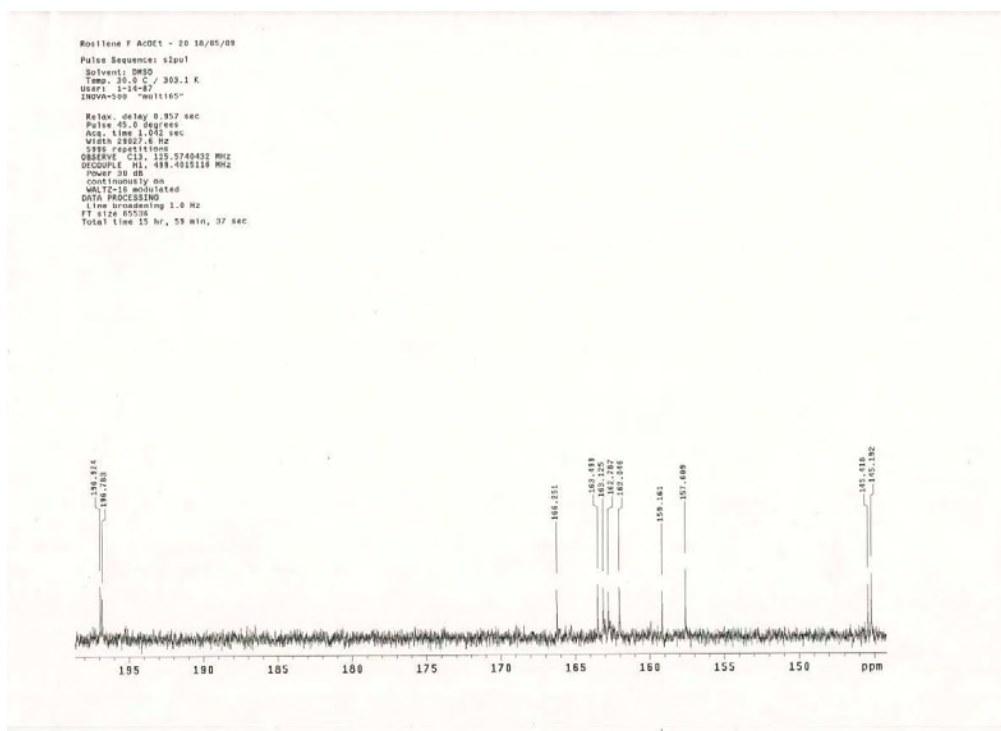
Anexo 5 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 12 (DMSO- d_6)



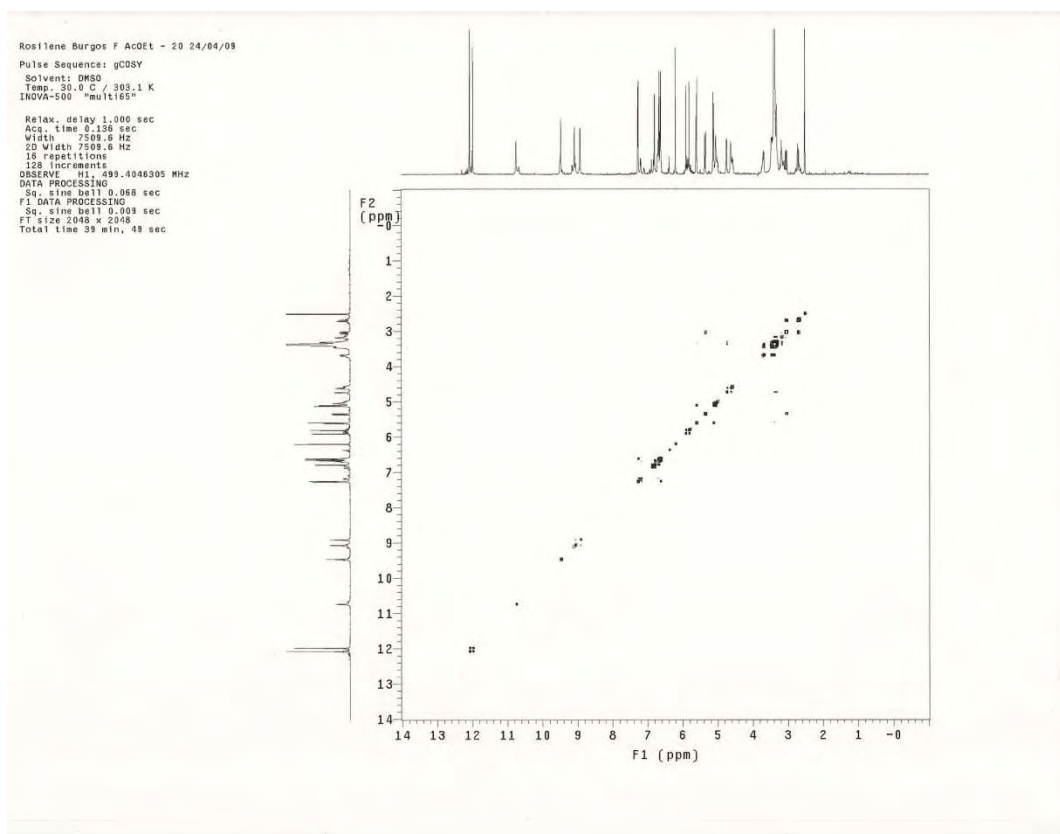
Anexo 6 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 12 (DMSO- d_6)



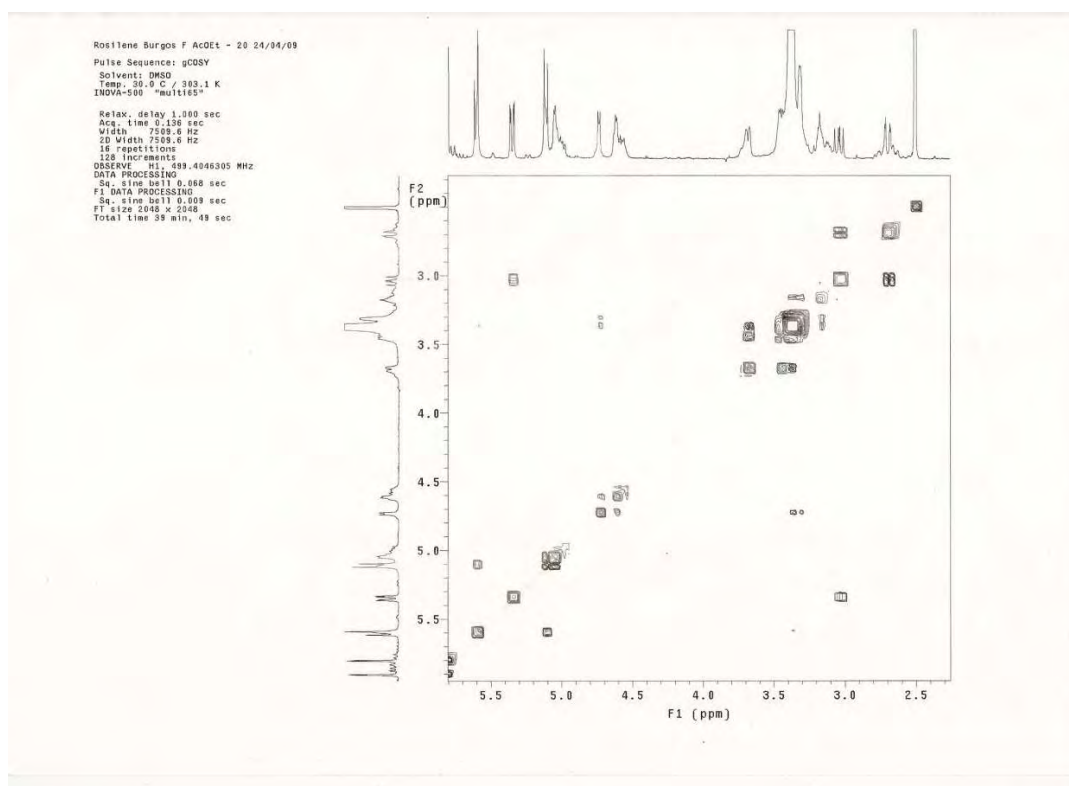
Anexo 7 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 12 (DMSO- d_6)



Anexo 8 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 12 (DMSO- d_6)

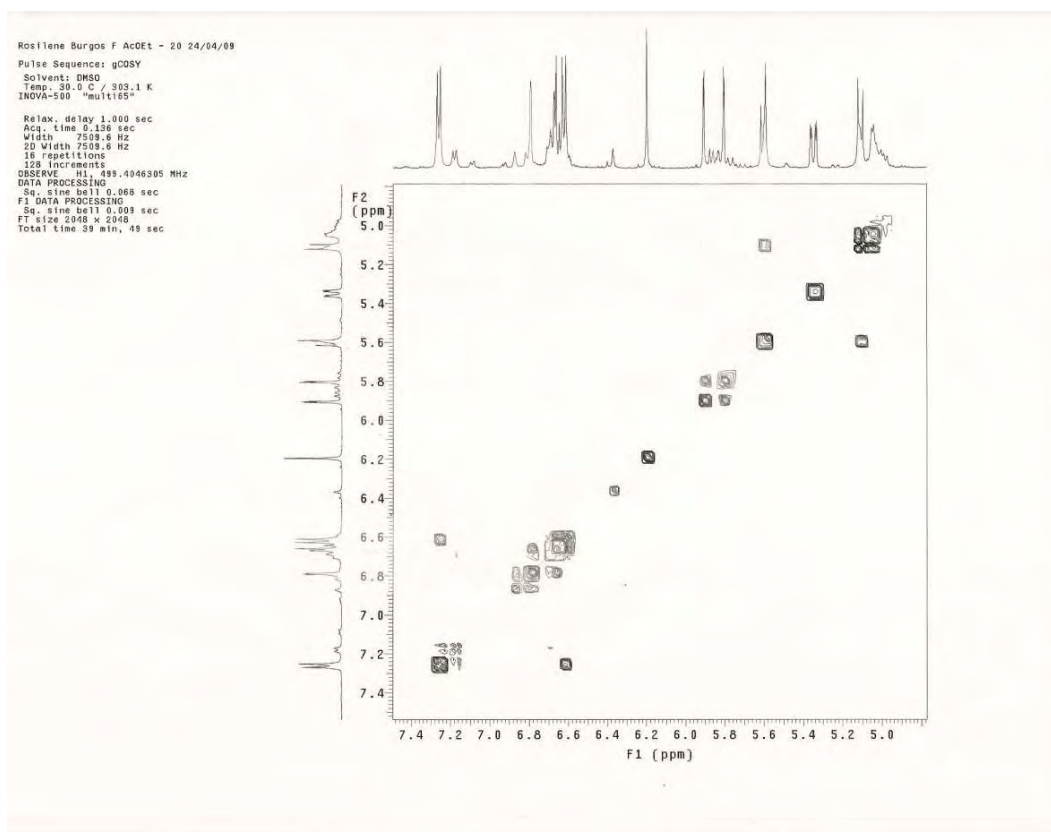


Anexo 9 – Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 12

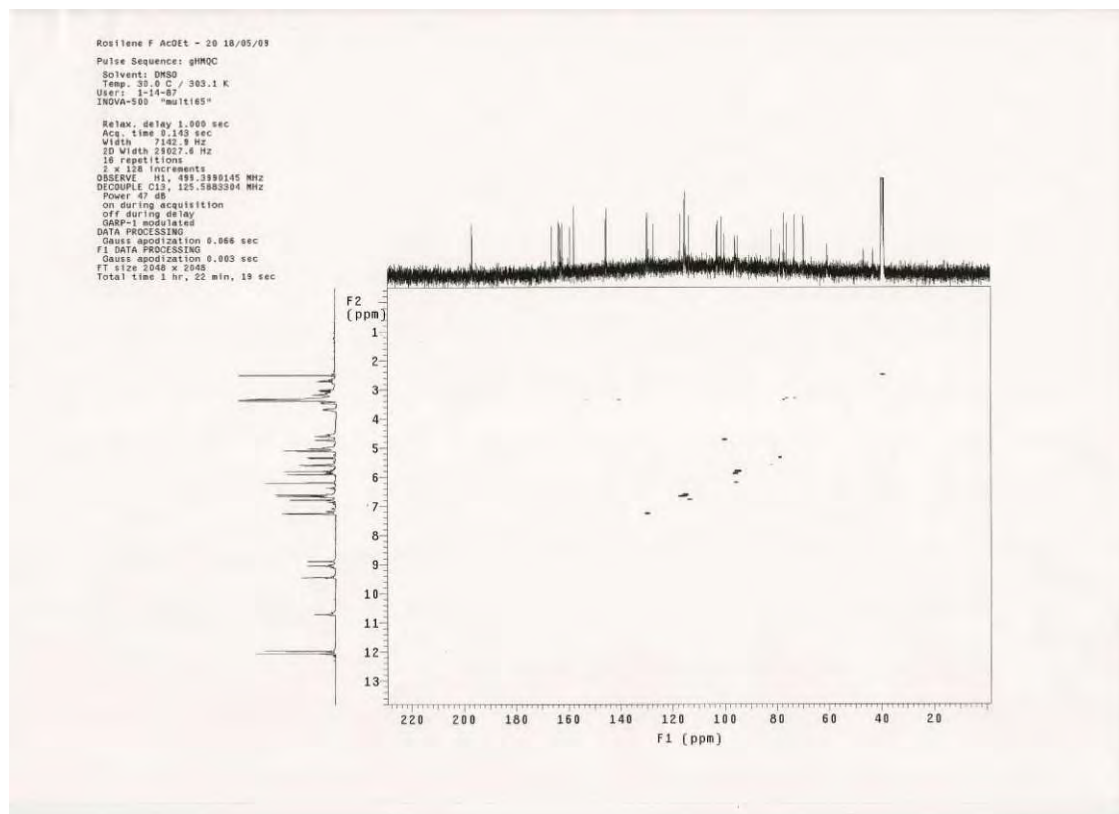


Anexo 10 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância

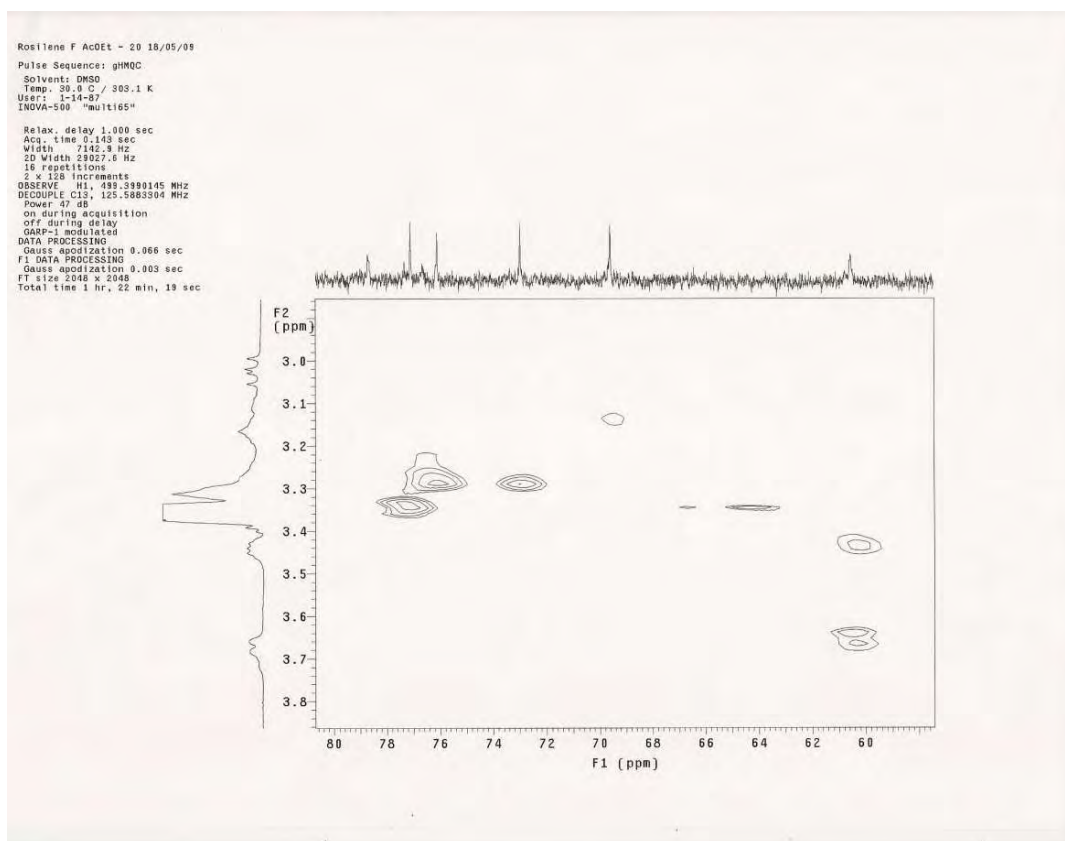
12



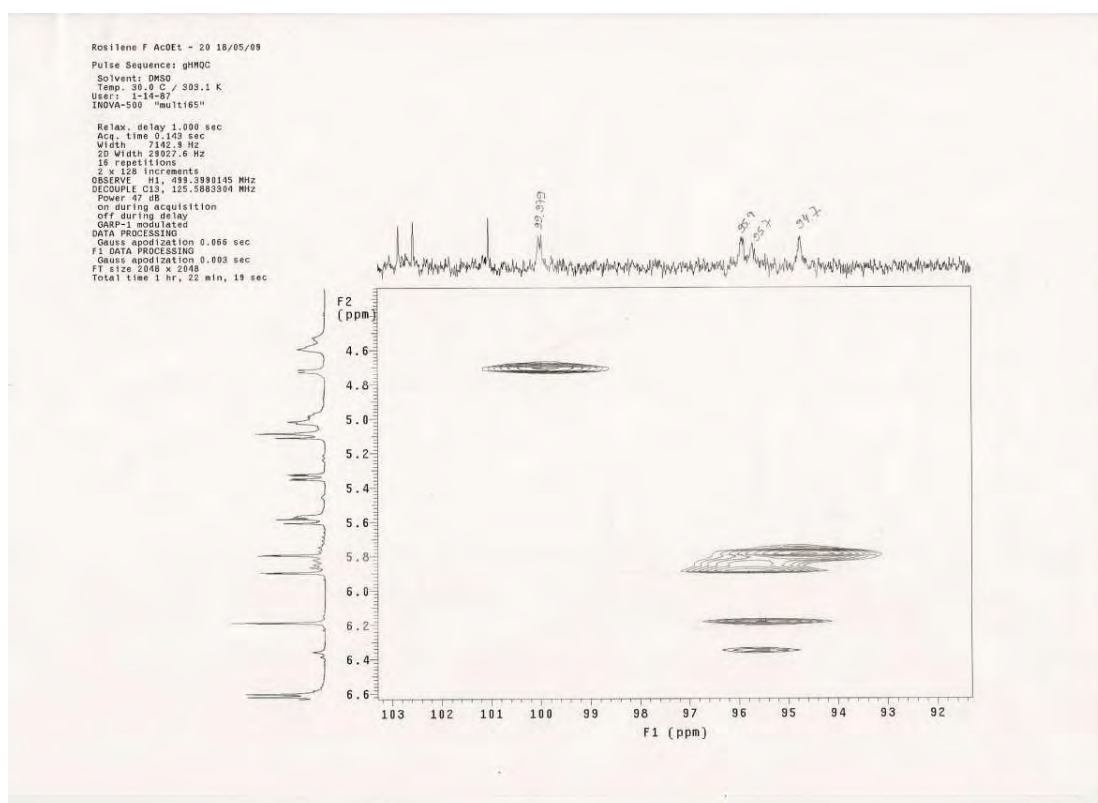
Anexo 11 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 12



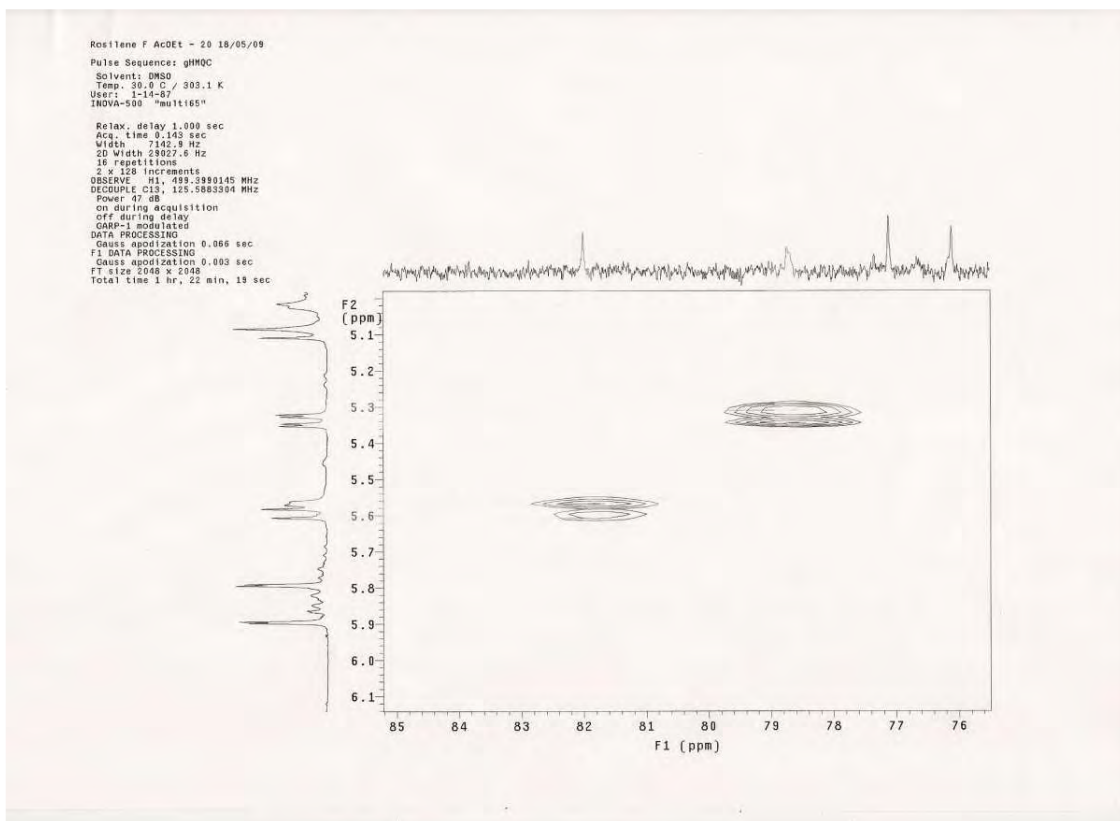
Anexo 12 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMOC da substância 12



Anexo 13 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12

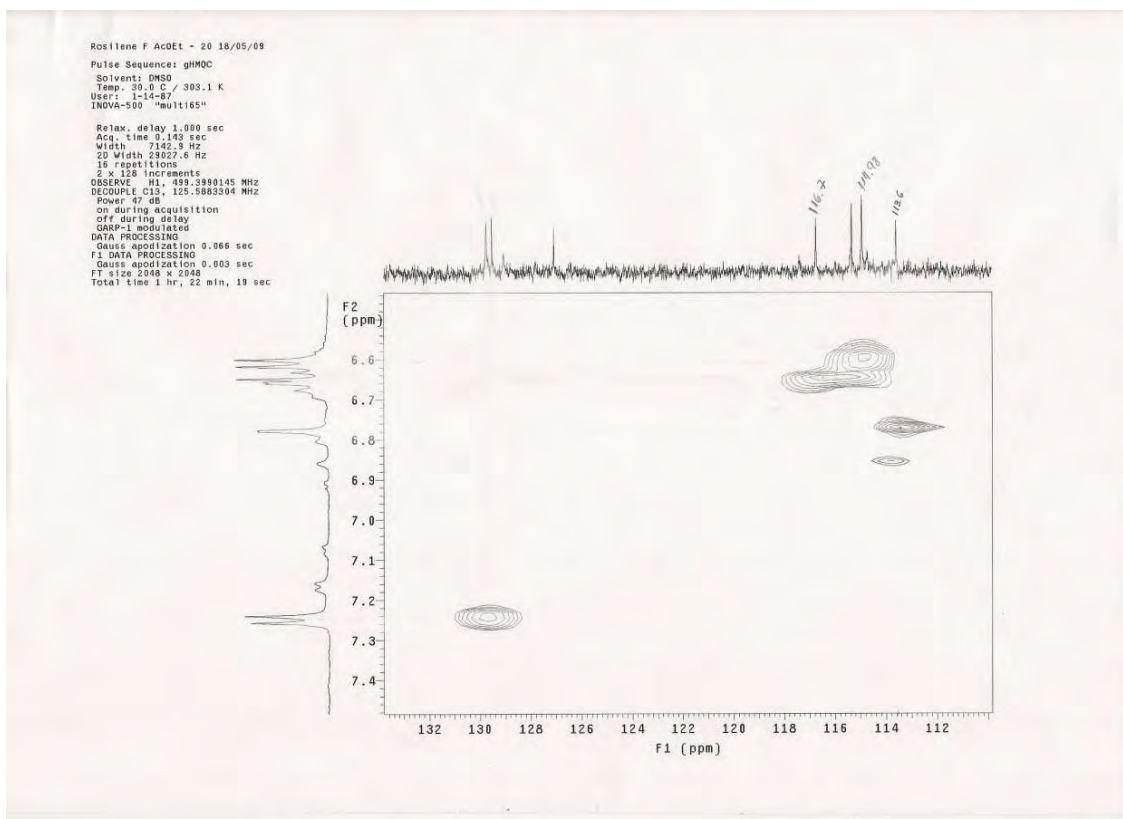


Anexo 14– Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 12



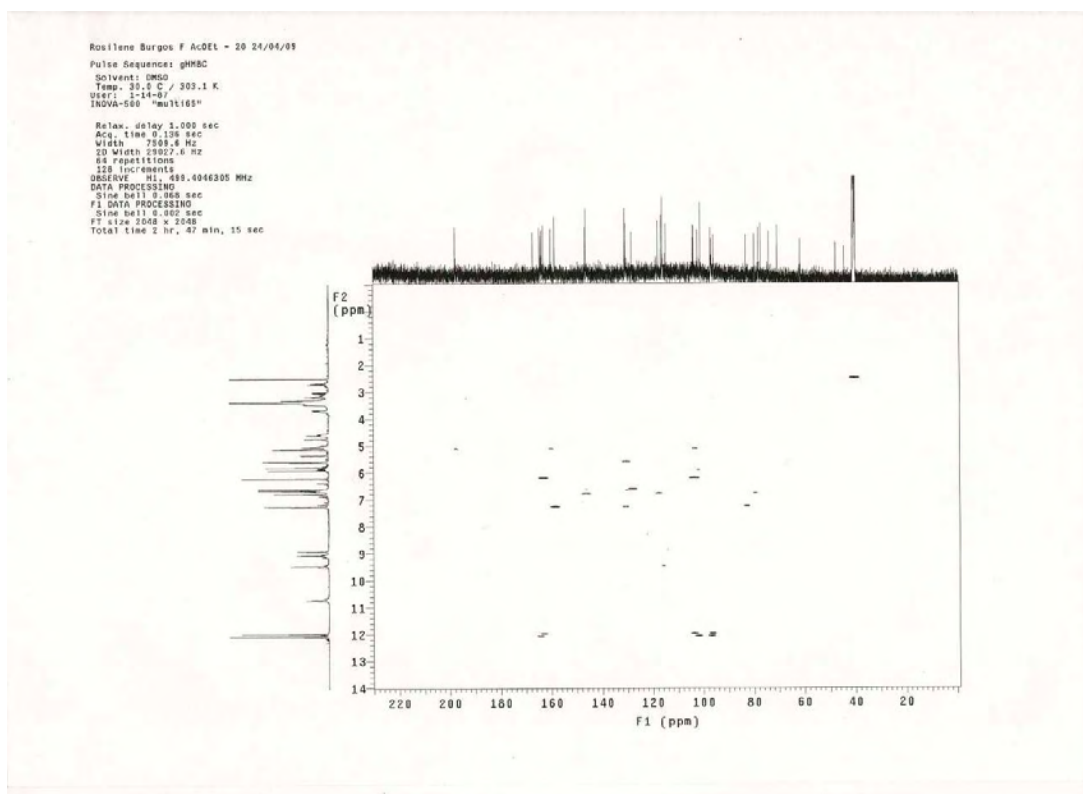
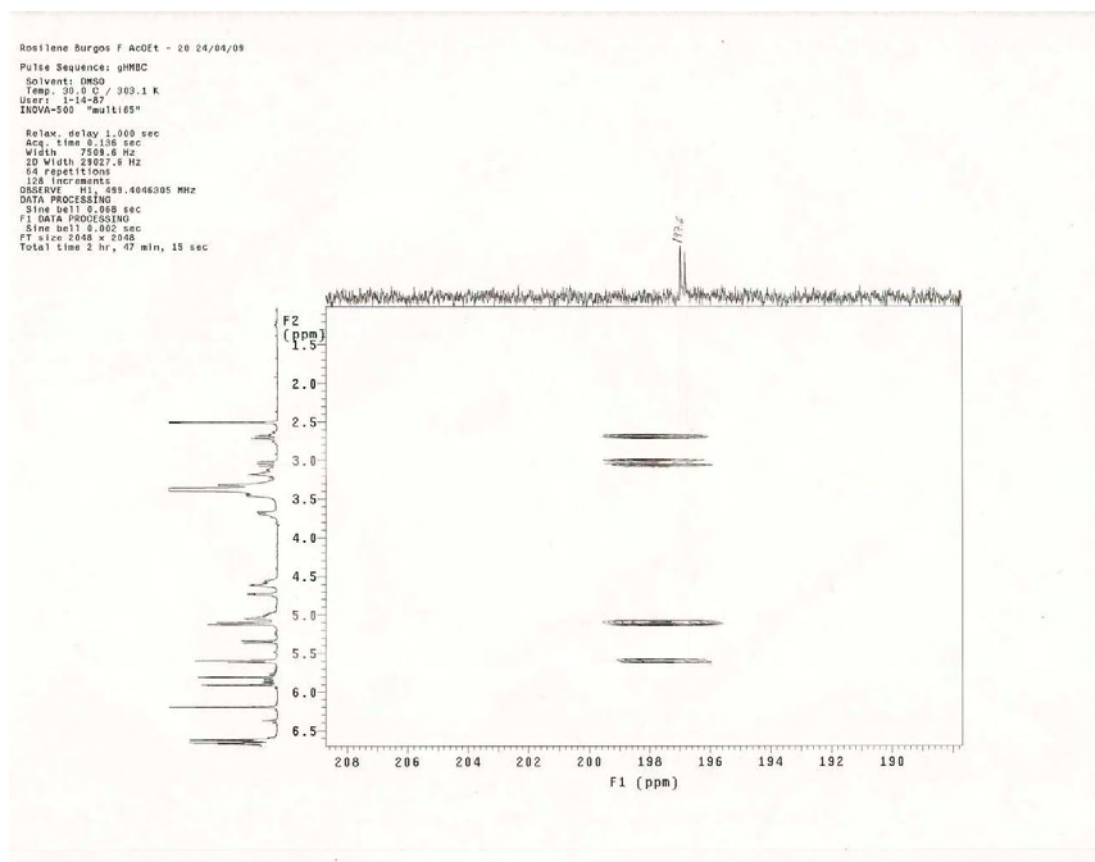
Anexo 15– Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância

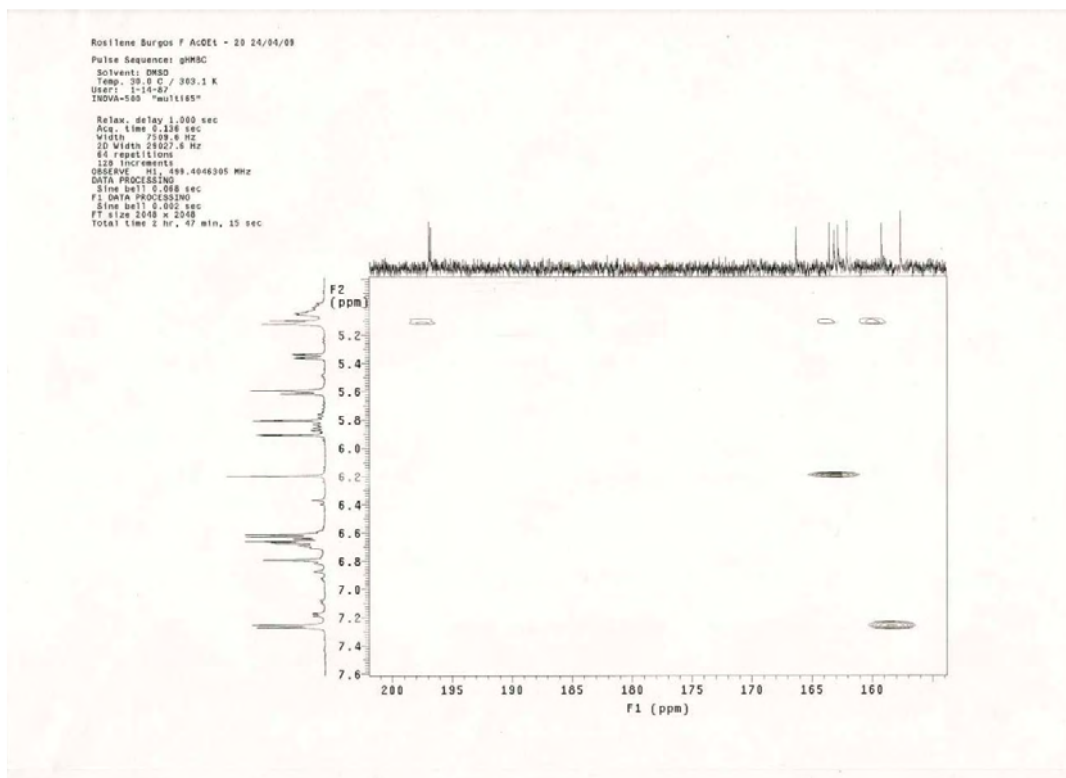
12



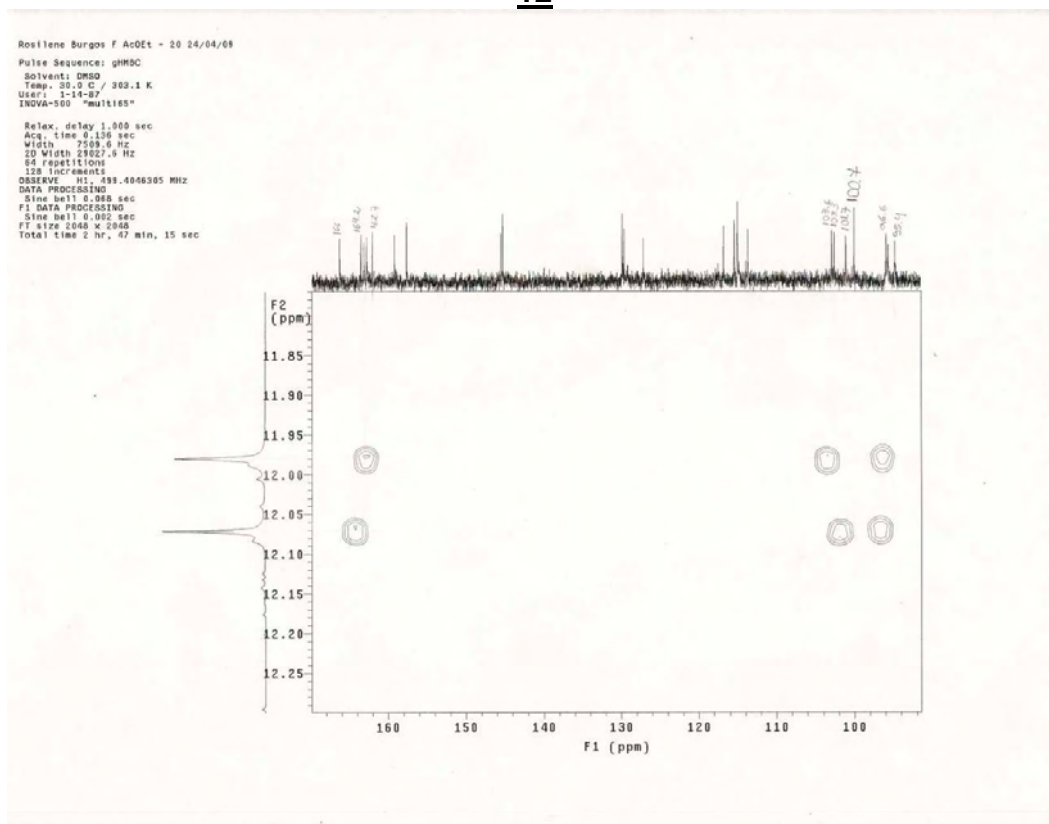
Anexo 16– Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância

12

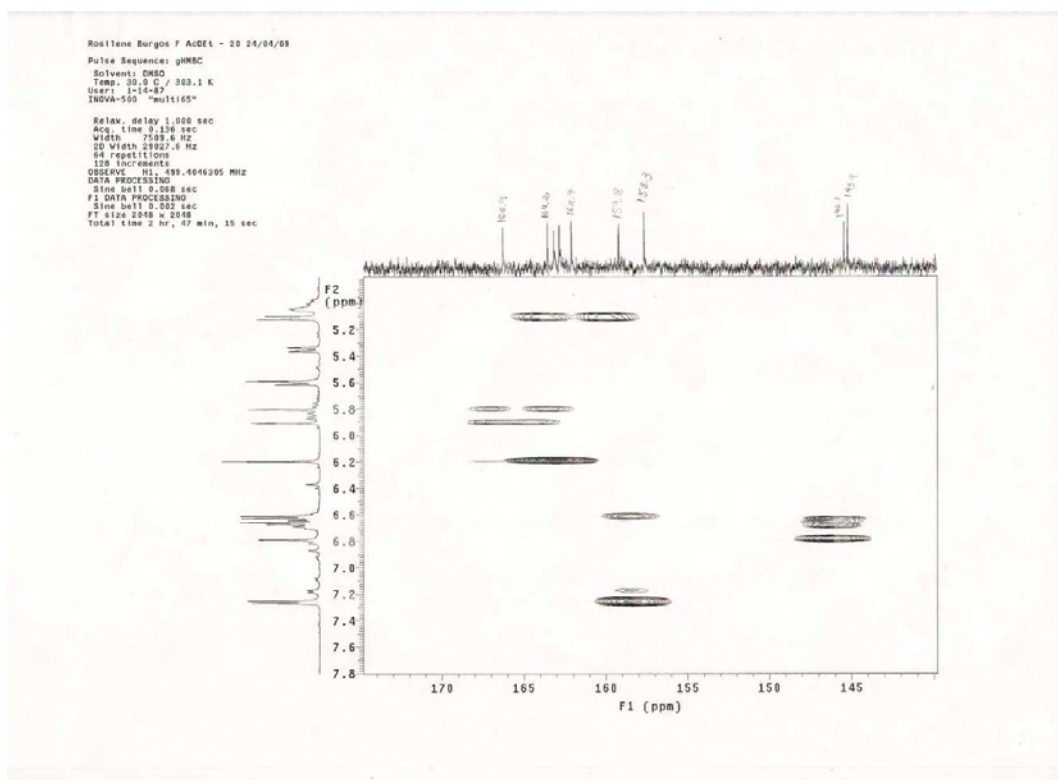
Anexo 17 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12Anexo 18 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância



Anexo 19 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12

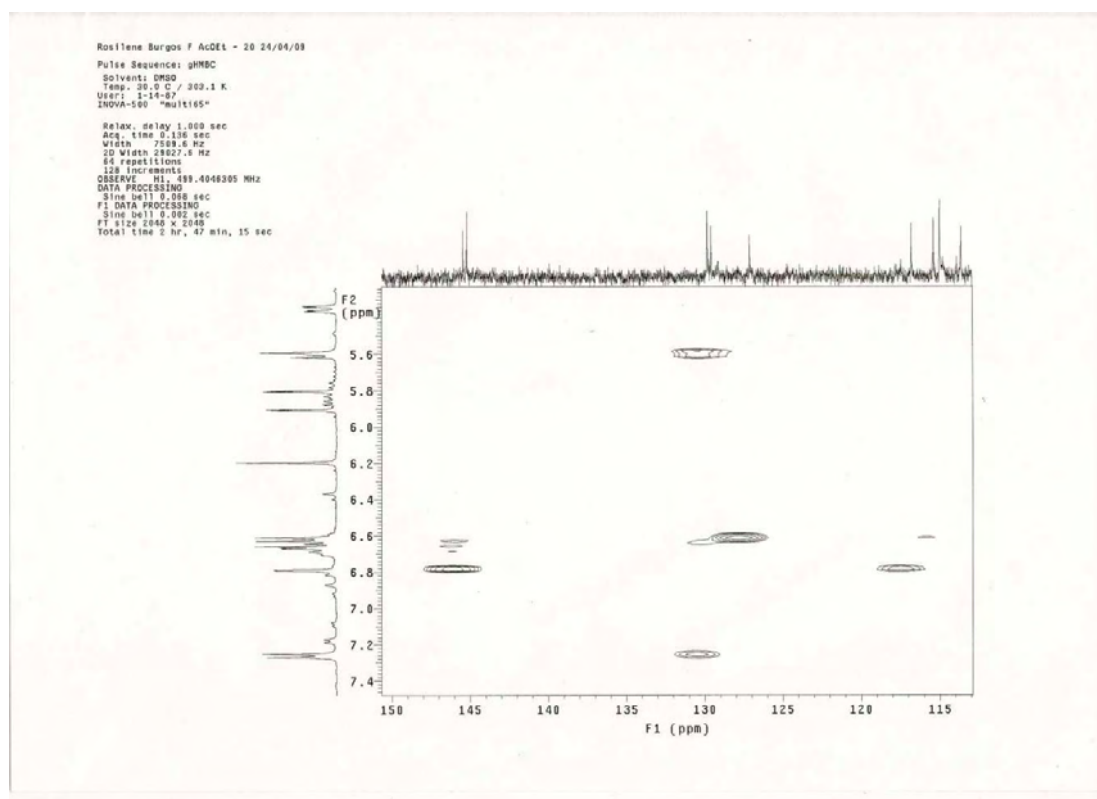


Anexo 20 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 12



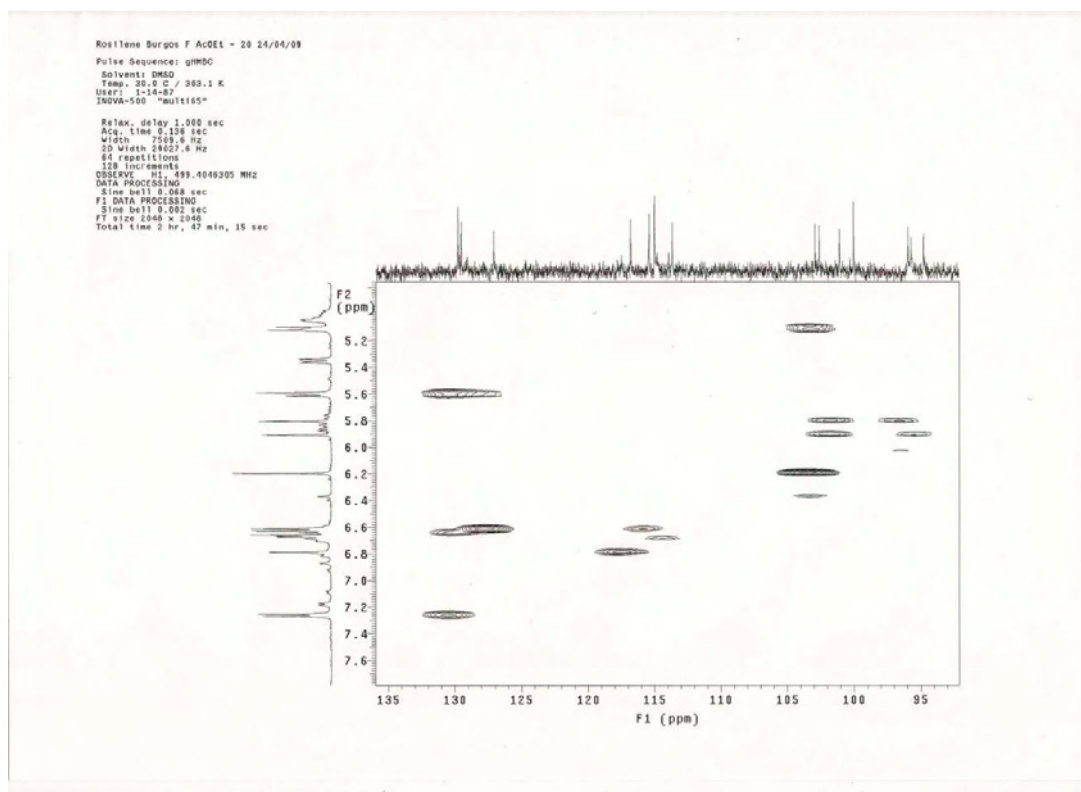
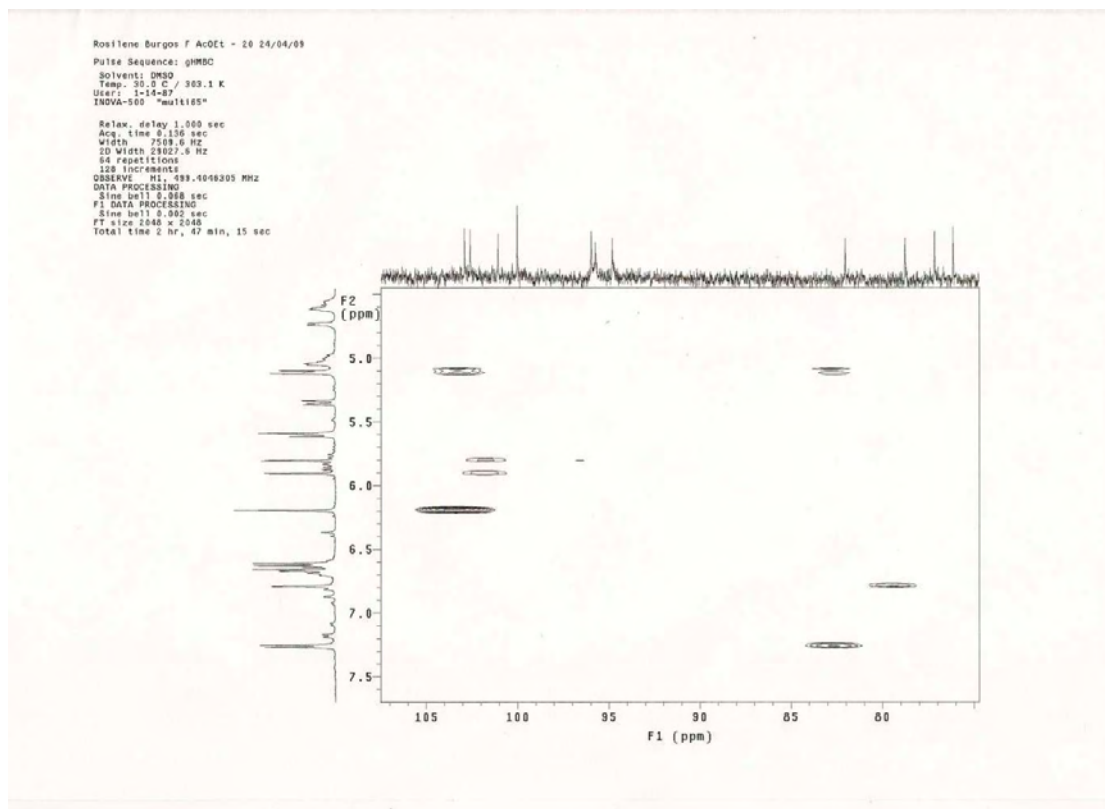
Anexo 21 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

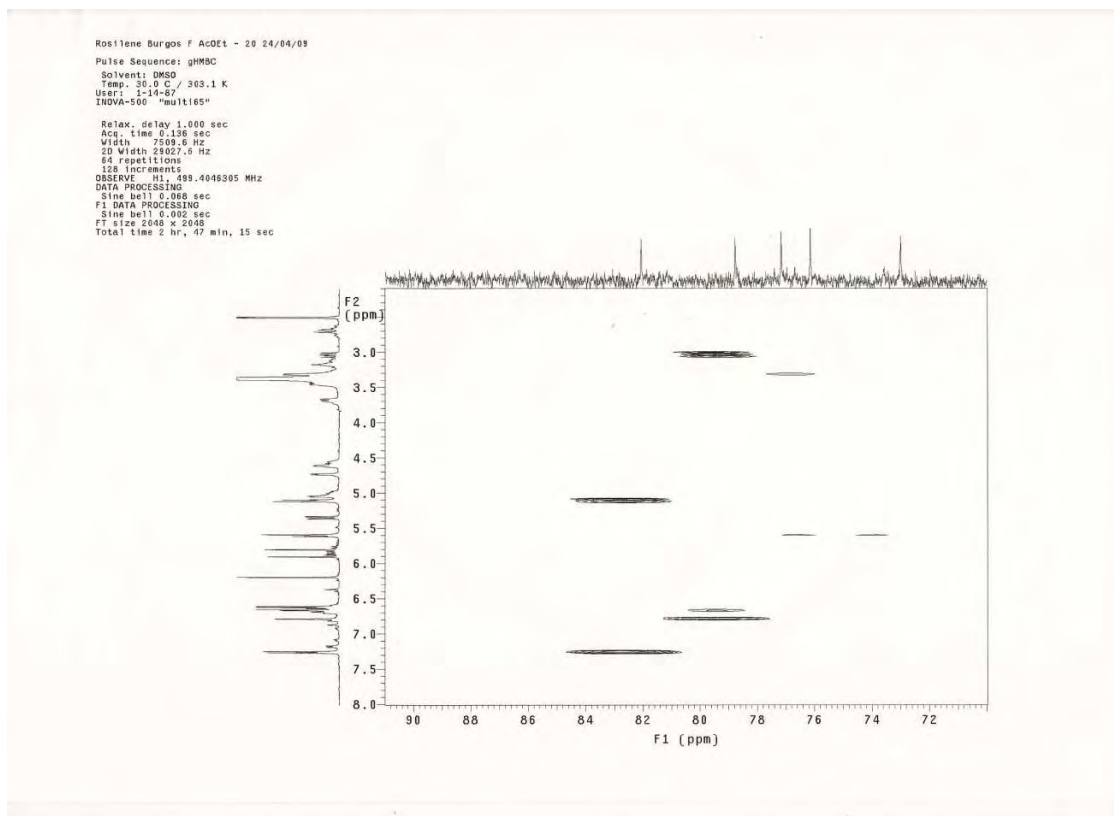
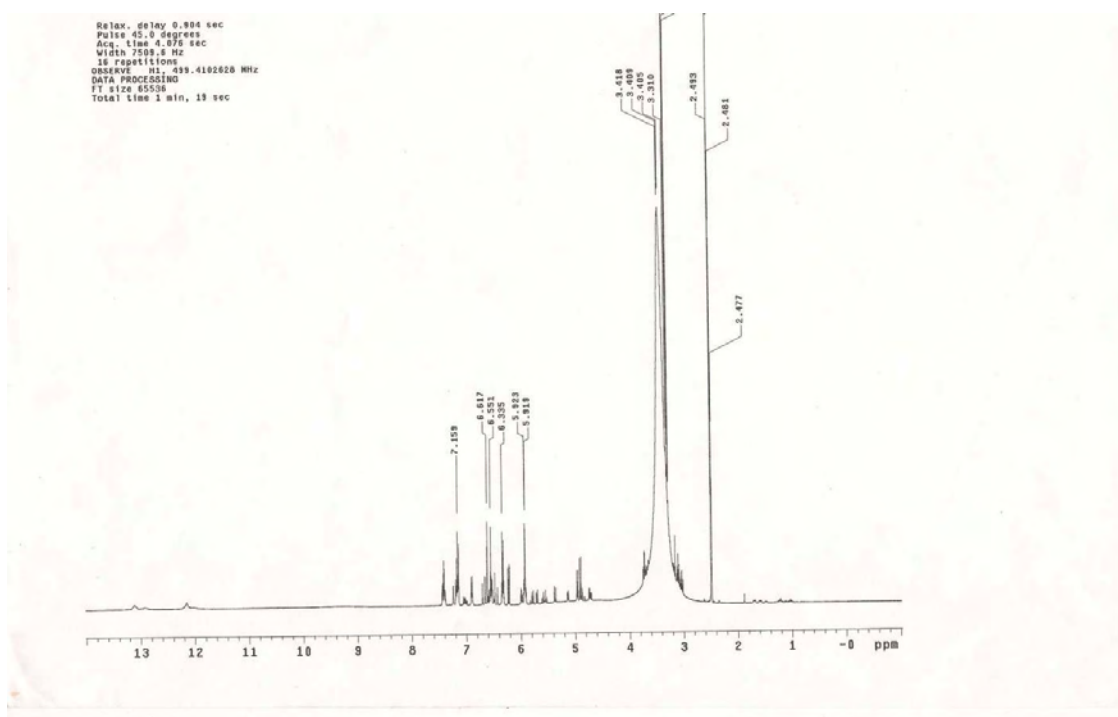
12

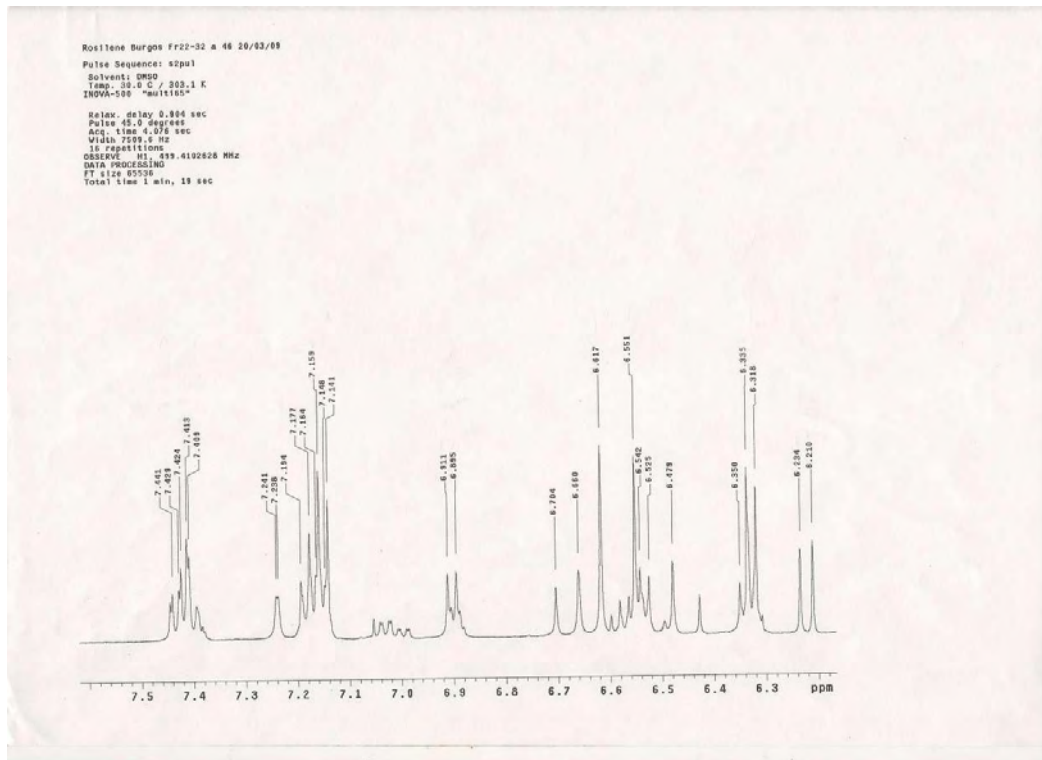


Anexo 22 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

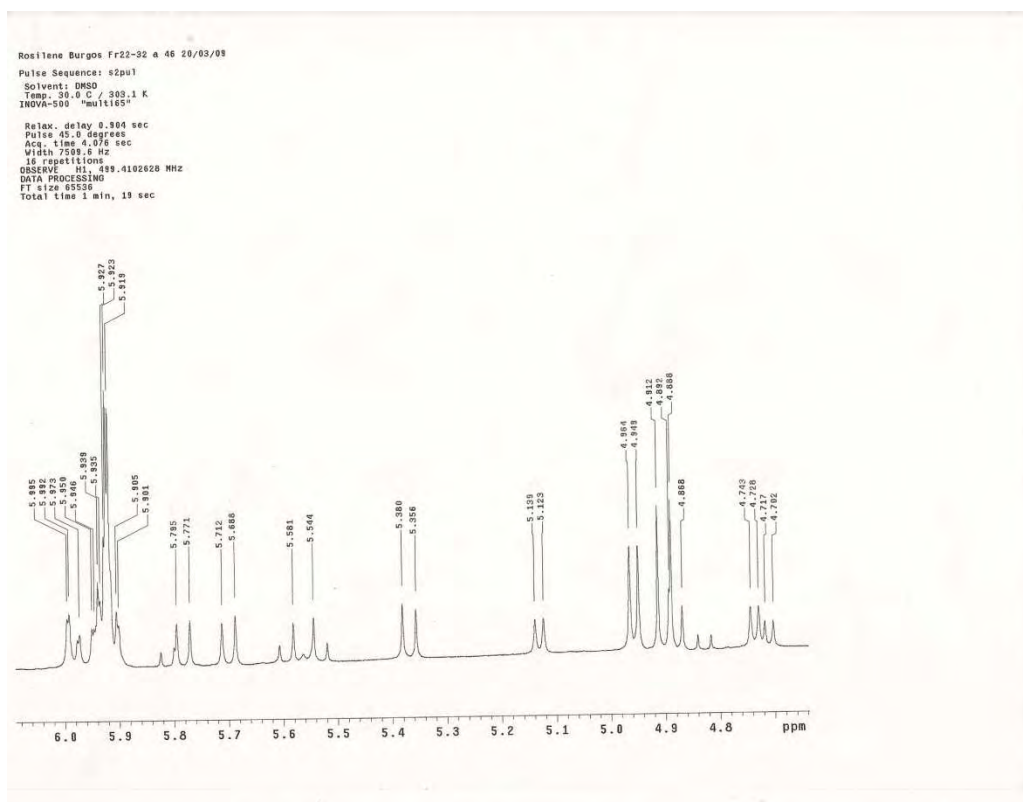
12

Anexo 23 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância12Anexo 24 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância12

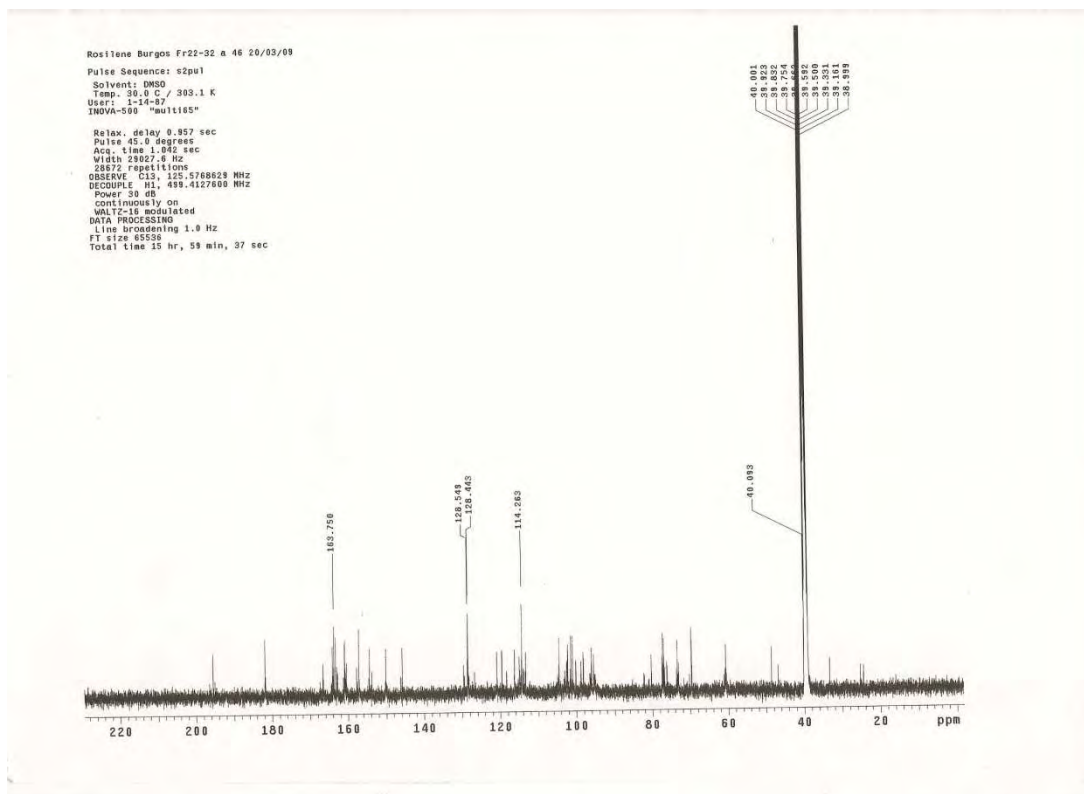
Anexo 25 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância12Anexo 26 – Espectro de RMN de ^1H da substância 14
(500 MHz – DMSO- d_6)



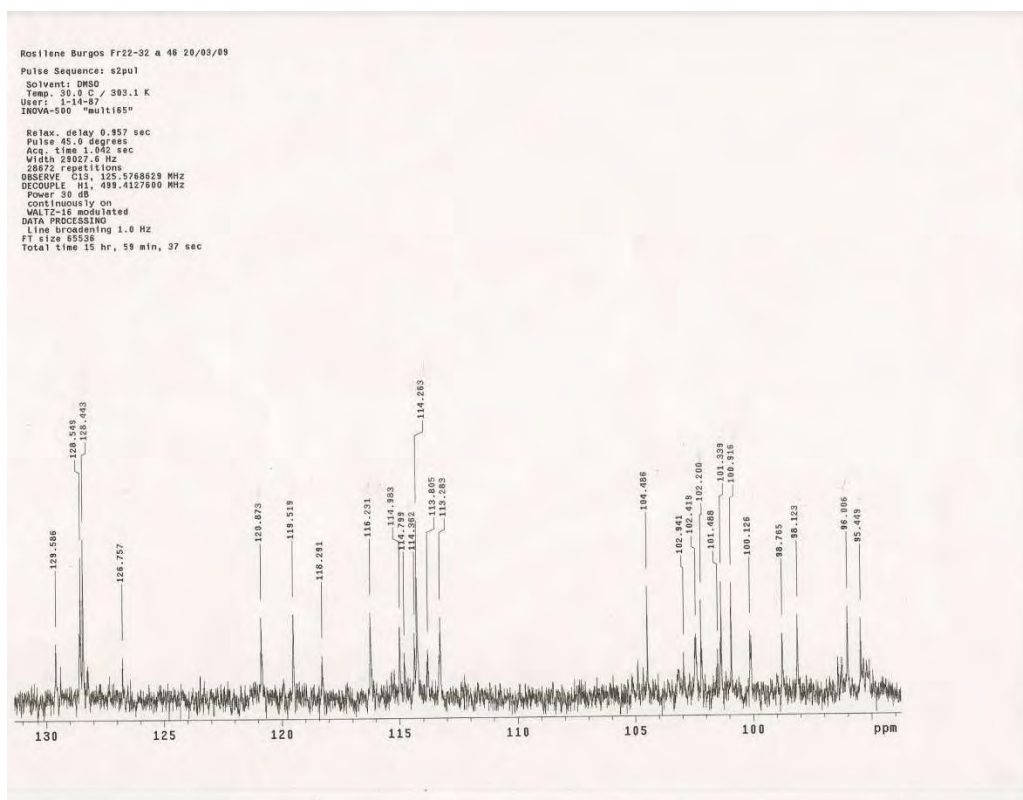
**Anexo 27 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 14
 (500 MHz – DMSO- d_6)**



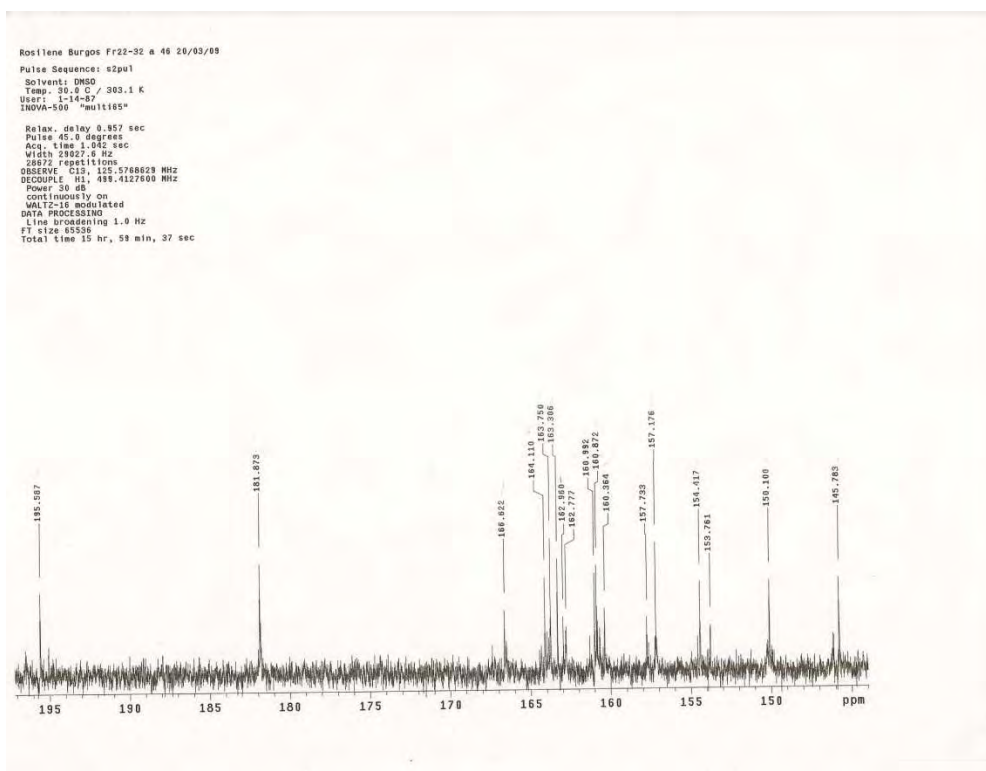
**Anexo 28 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 14
 (500 MHz – DMSO- d_6)**



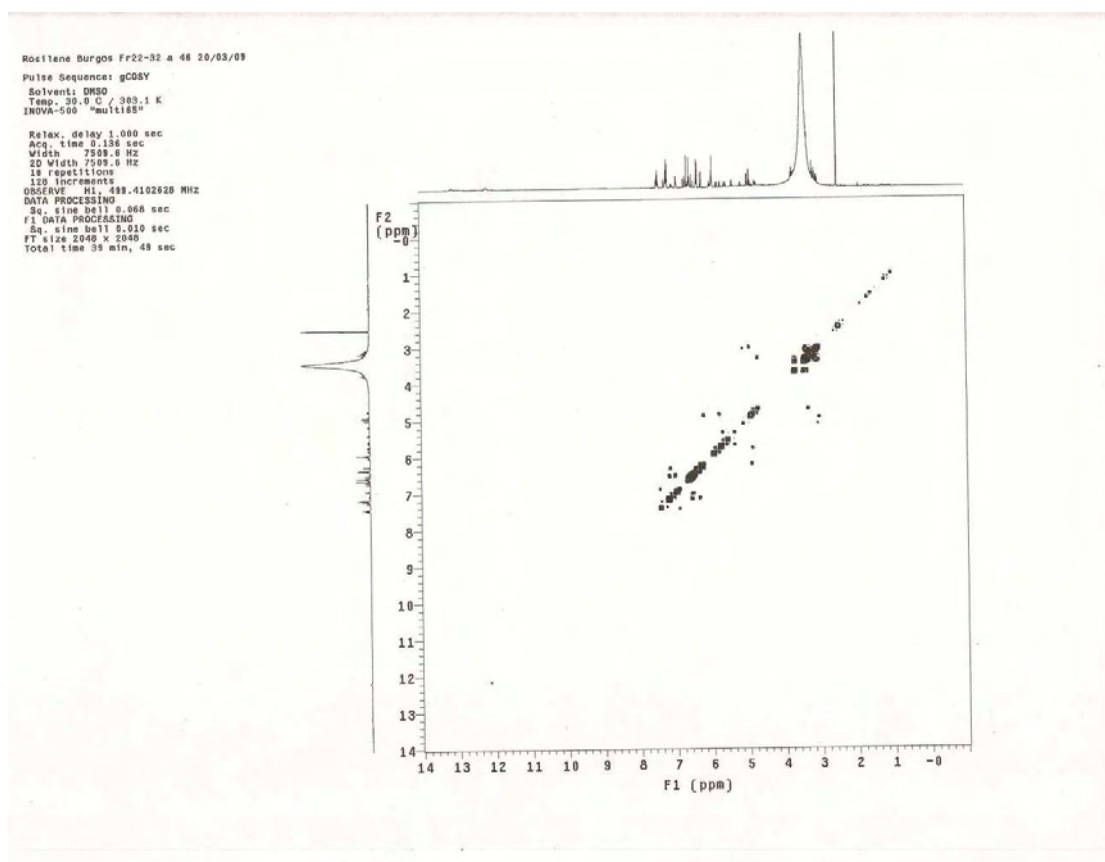
Anexo 29 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 - (DMSO- d_6)



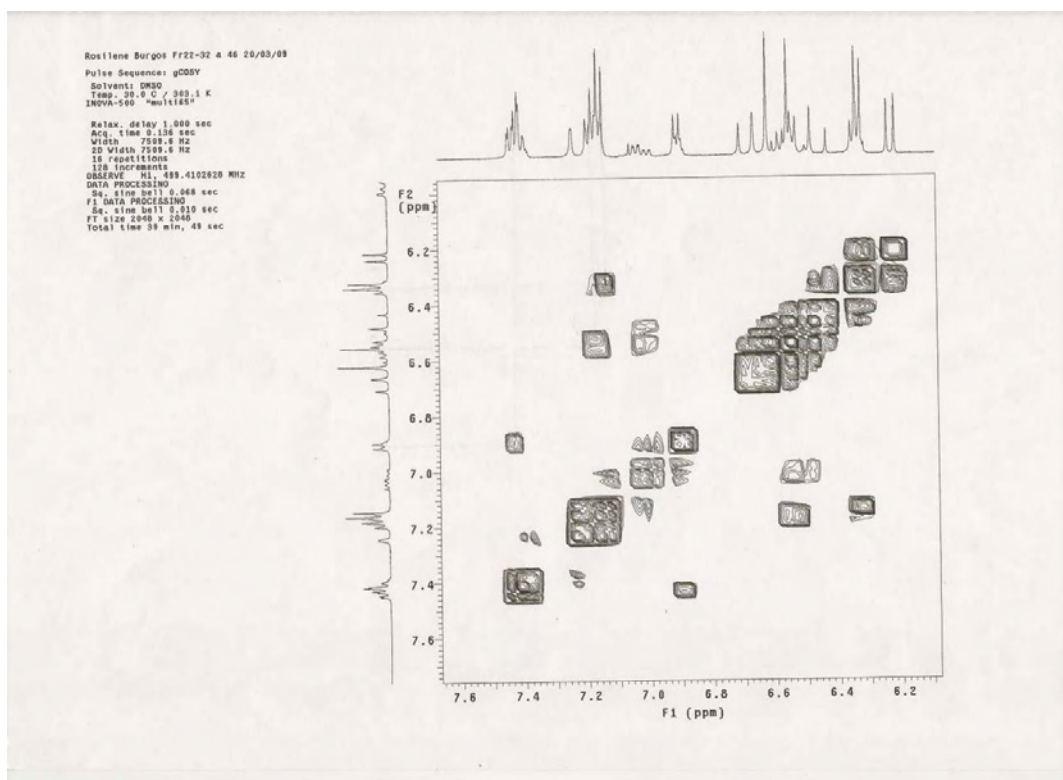
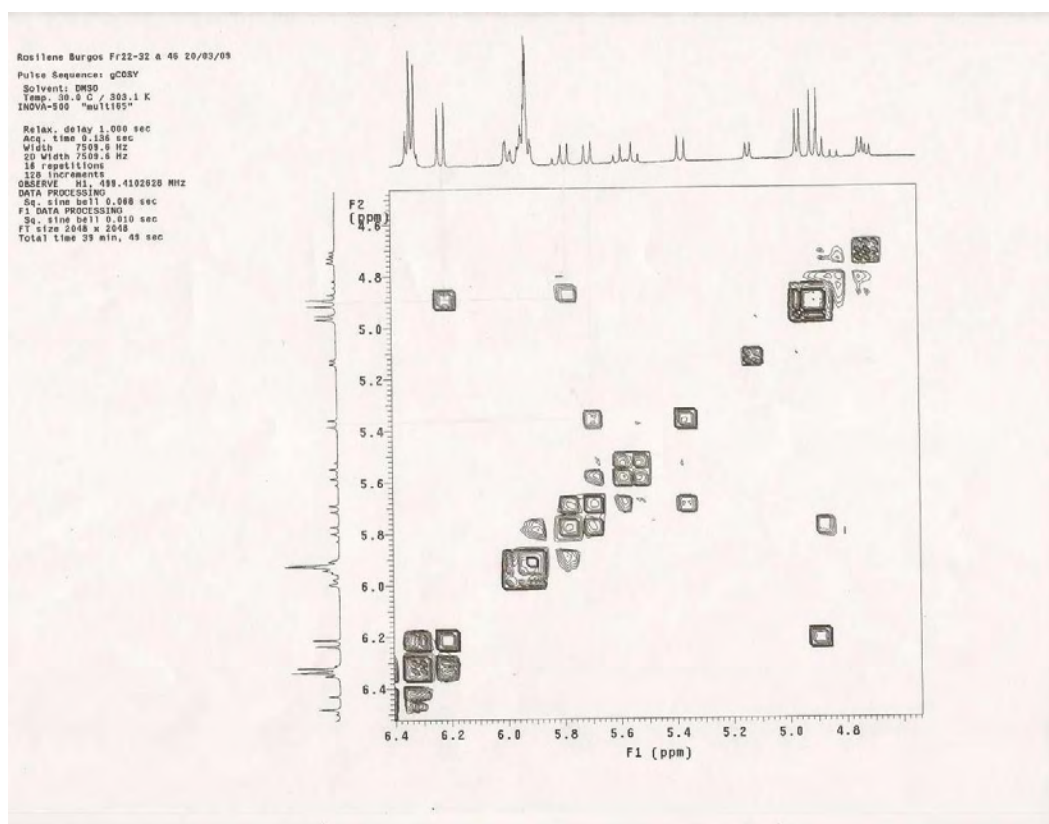
Anexo 30 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 (DMSO- d_6)

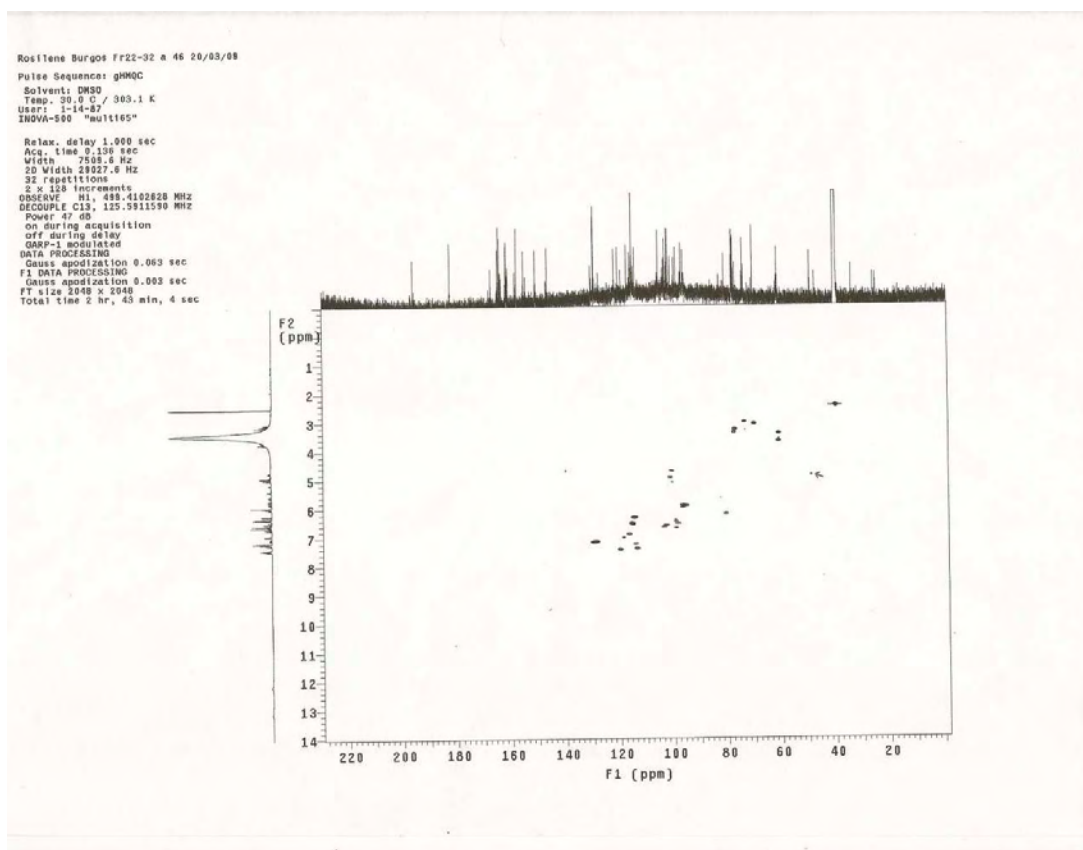


Anexo 31 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 14 (DMSO- d_6)

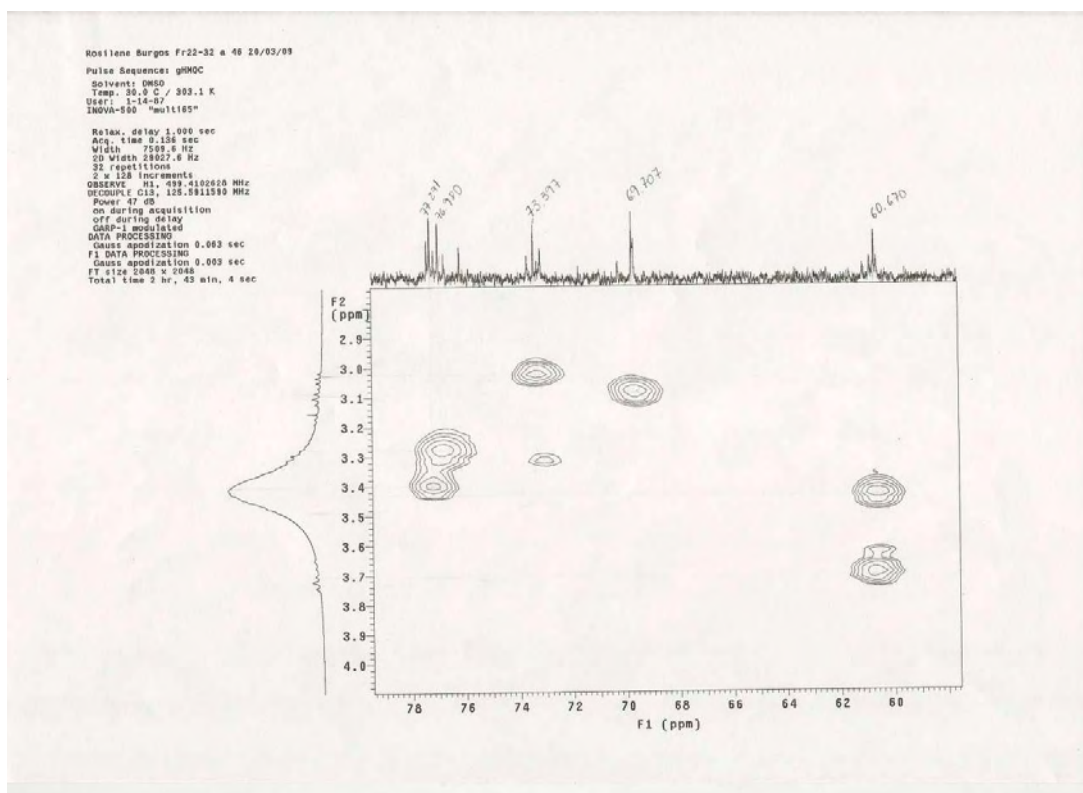


Anexo 32 – Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 14

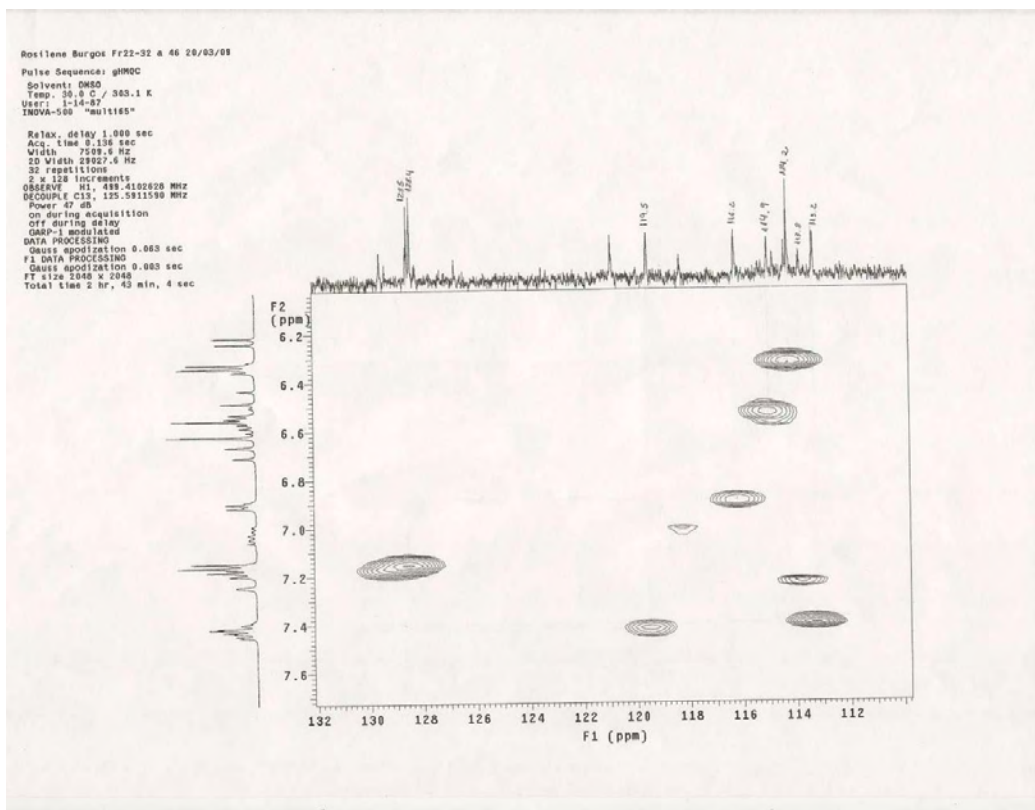
Anexo 33 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância14Anexo 34 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância14



Anexo 35 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 14

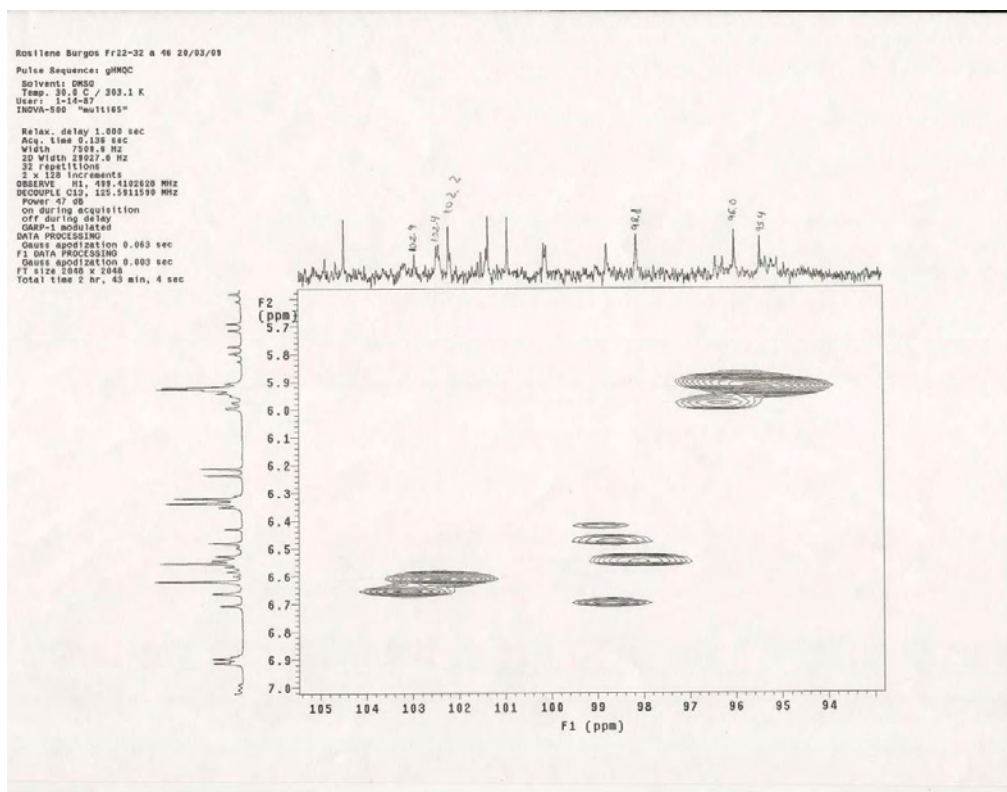


Anexo 36 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 14



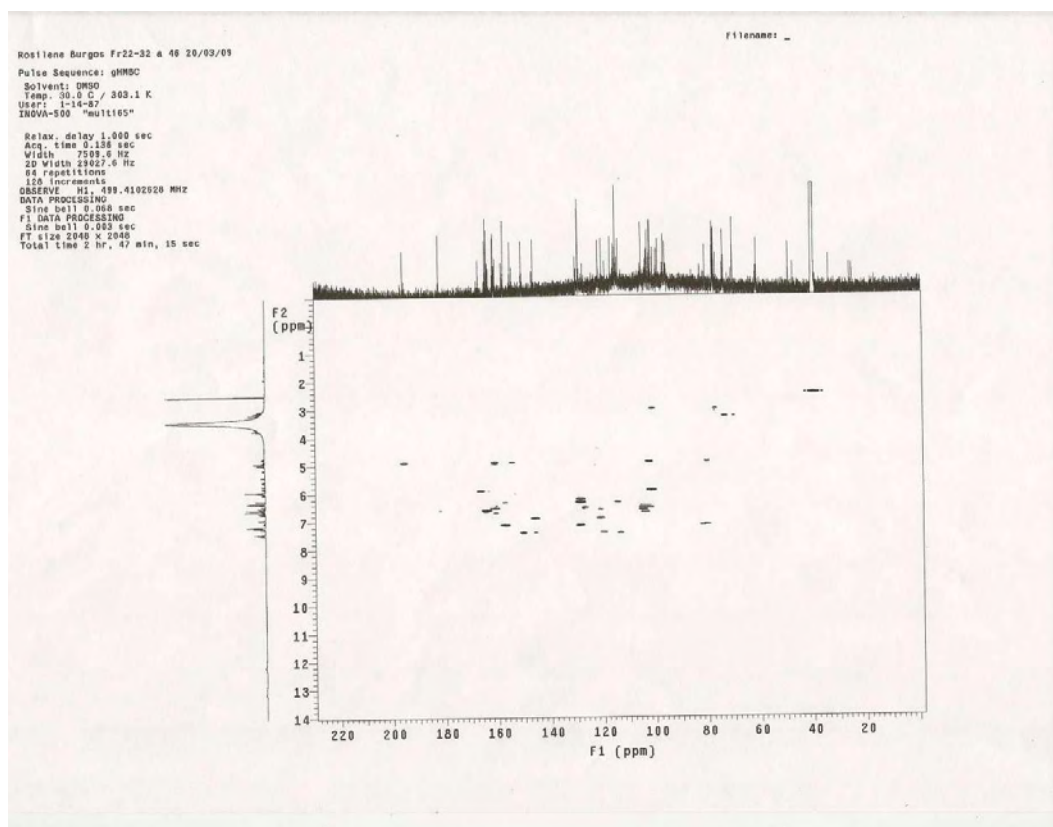
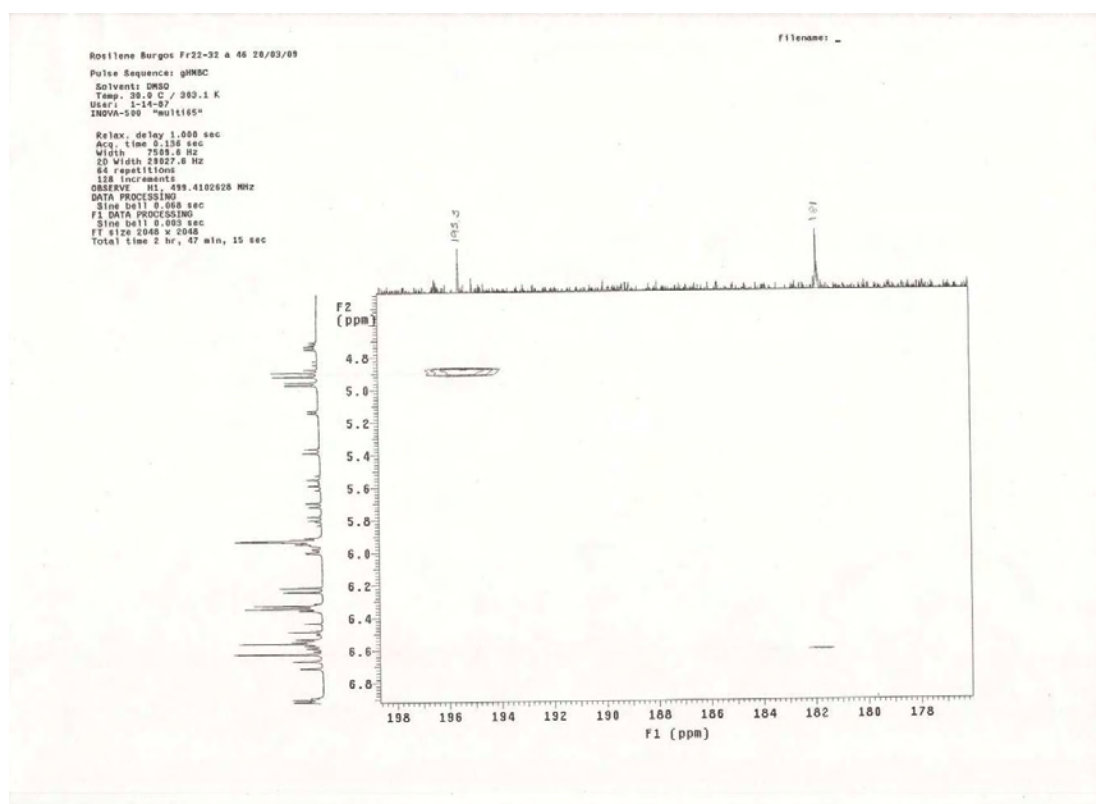
Anexo 37 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância

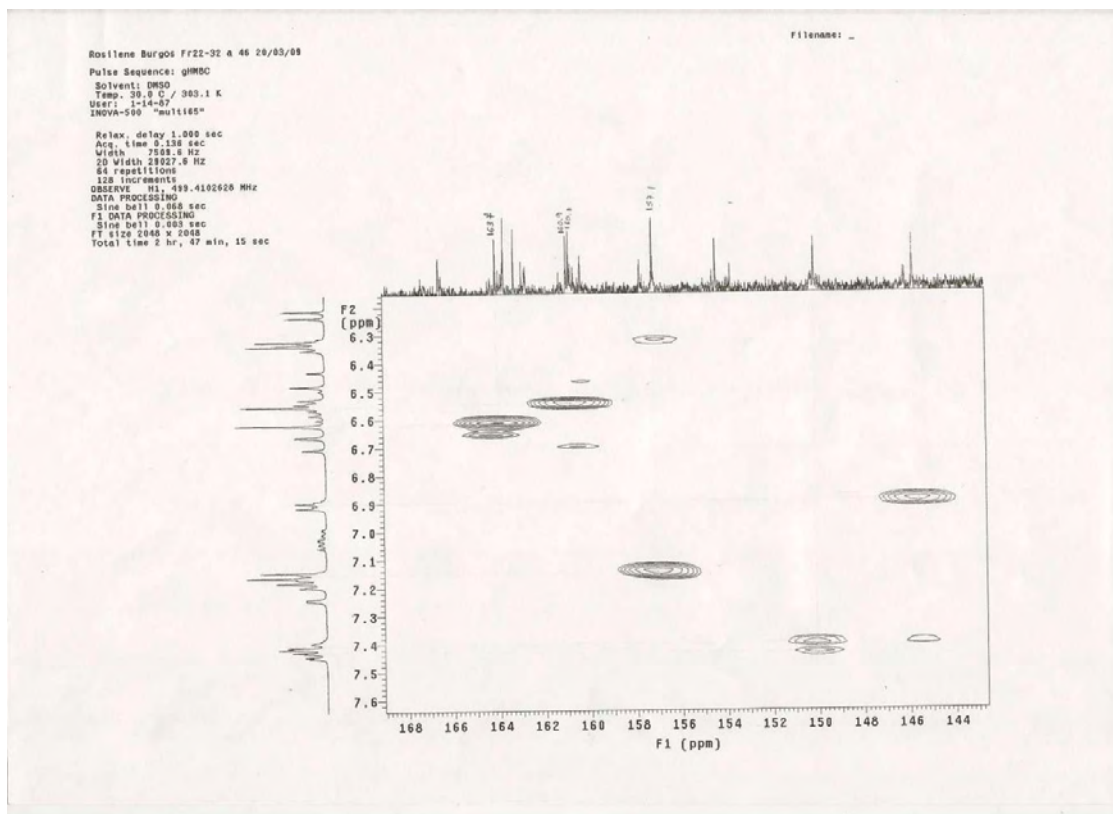
14



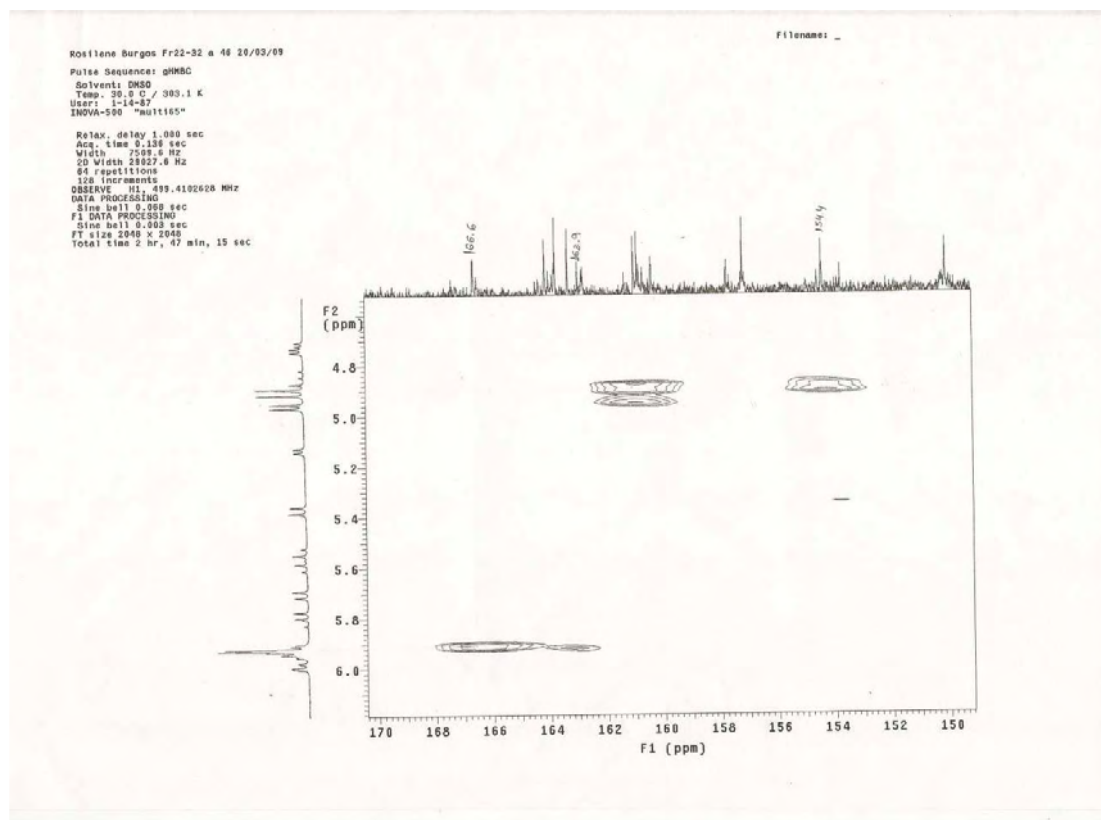
Anexo 38 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância

14

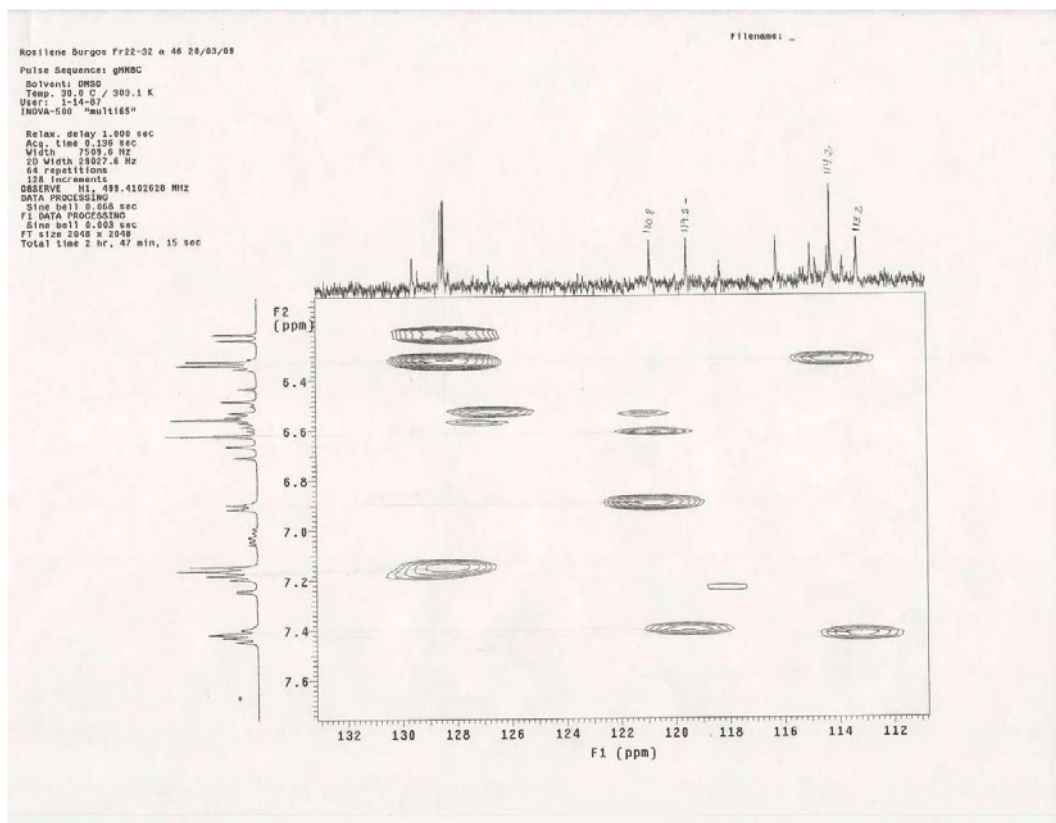
Anexo 39 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14Anexo 40 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância



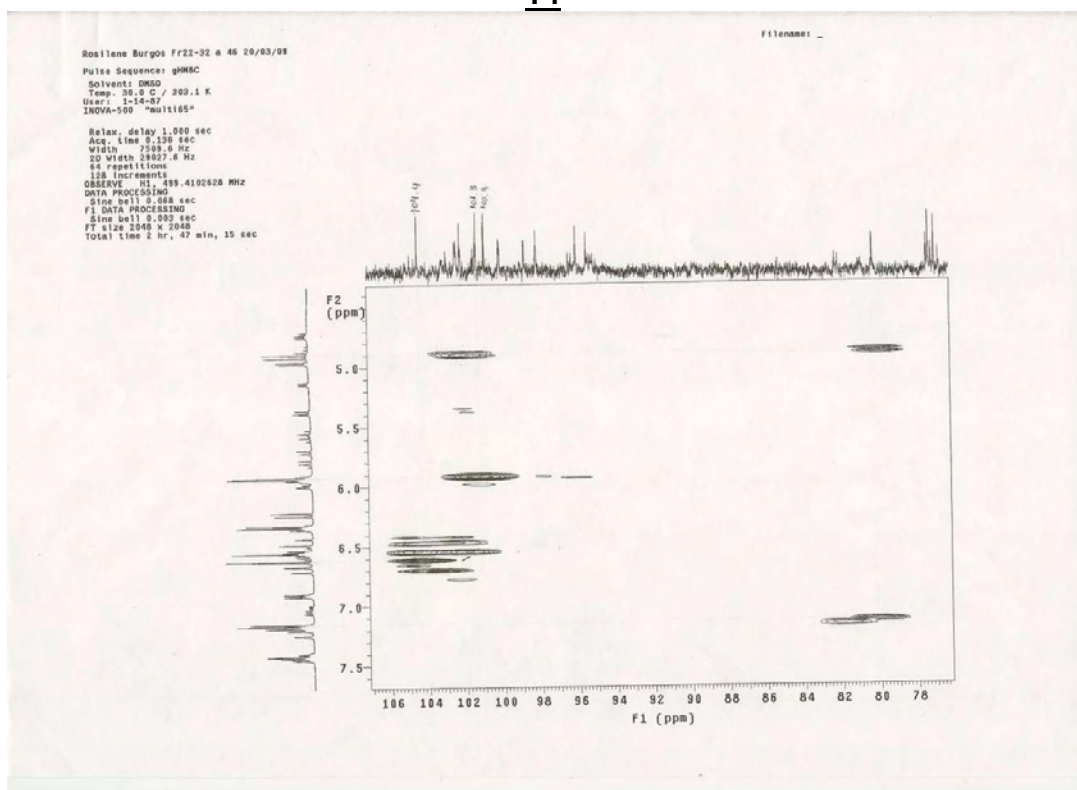
Anexo 41 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14



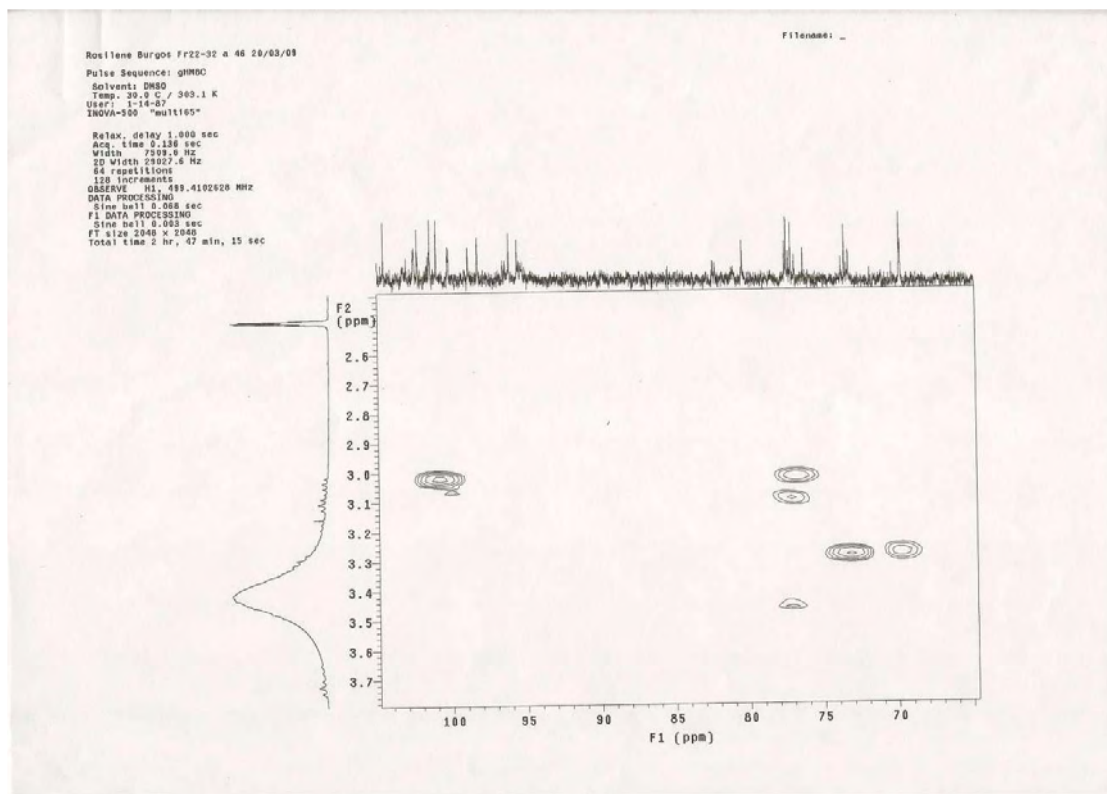
Anexo 42 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14



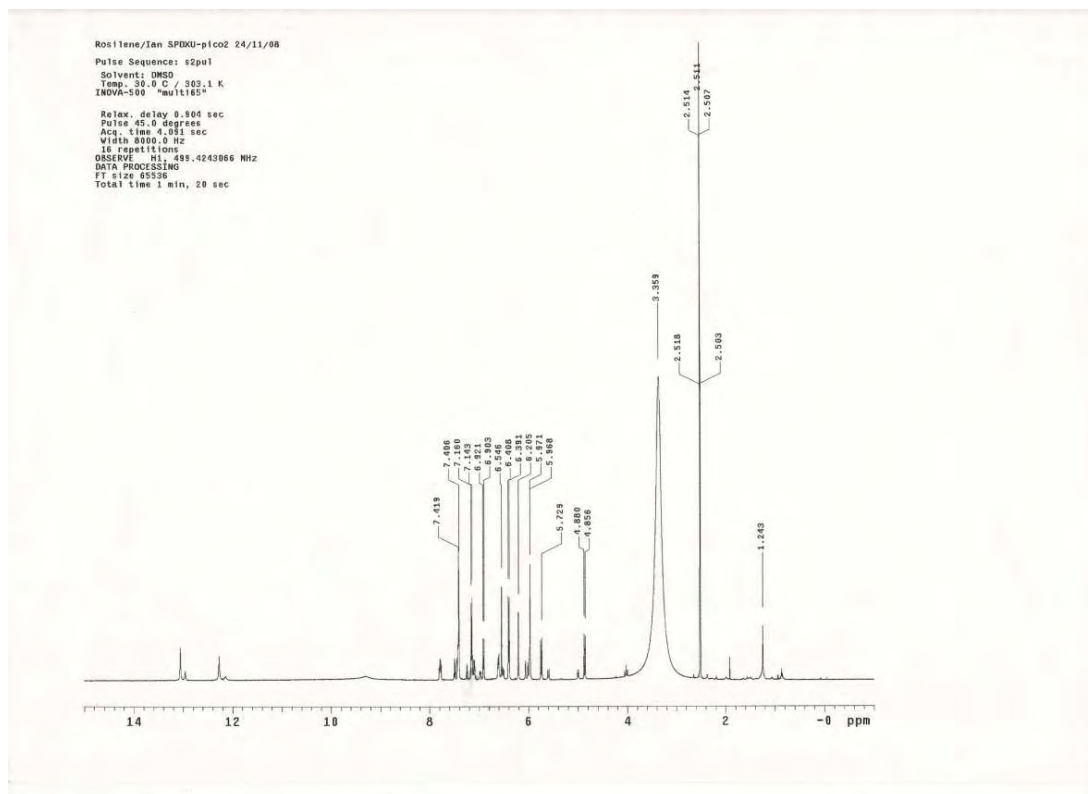
Anexo 43 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14



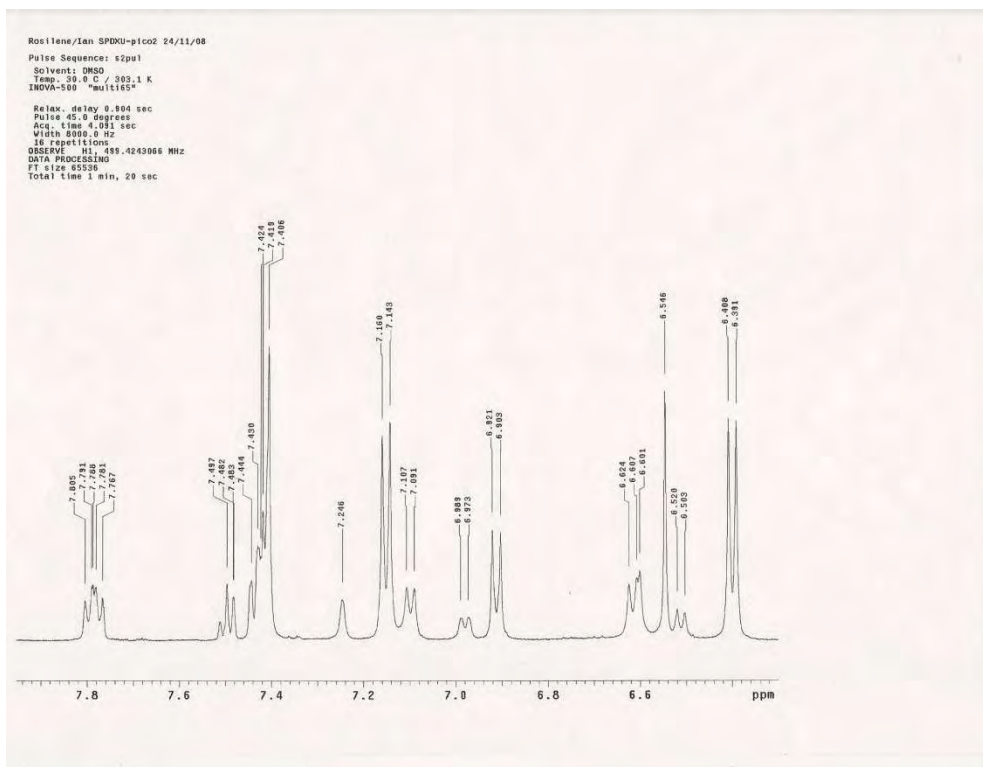
Anexo 44 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14



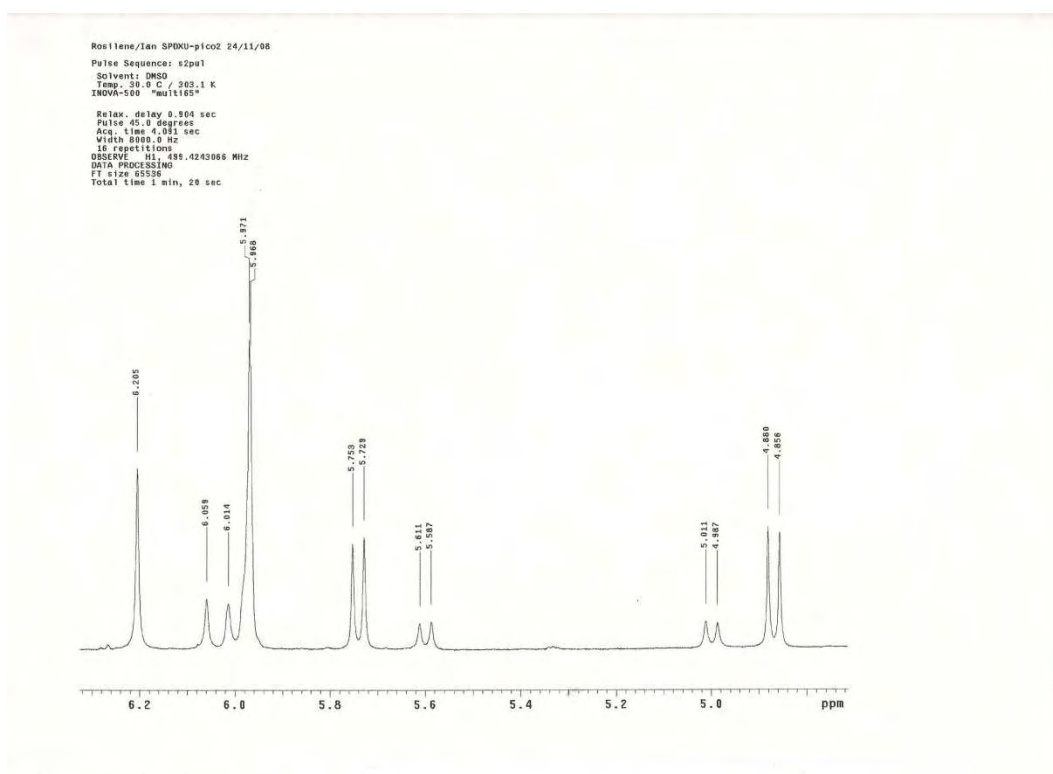
Anexo 45 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 14



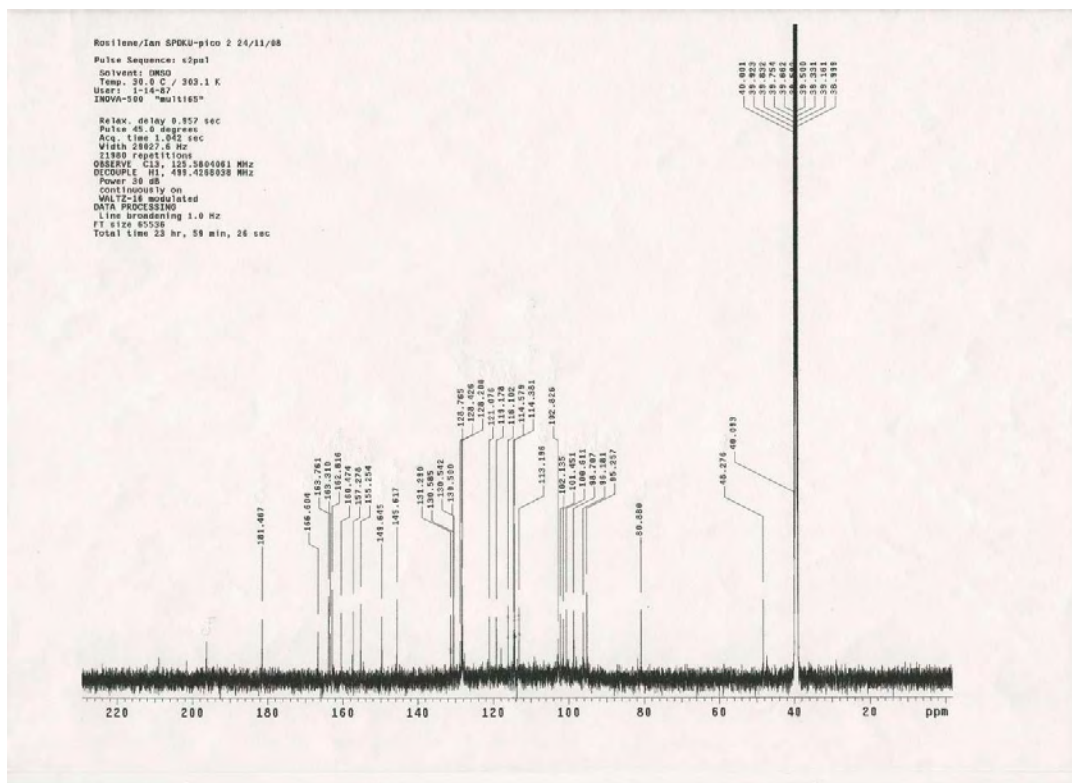
Anexo 46 – Espectro de RMN de ^1H da substância 17
 (500 MHz – DMSO- d_6)



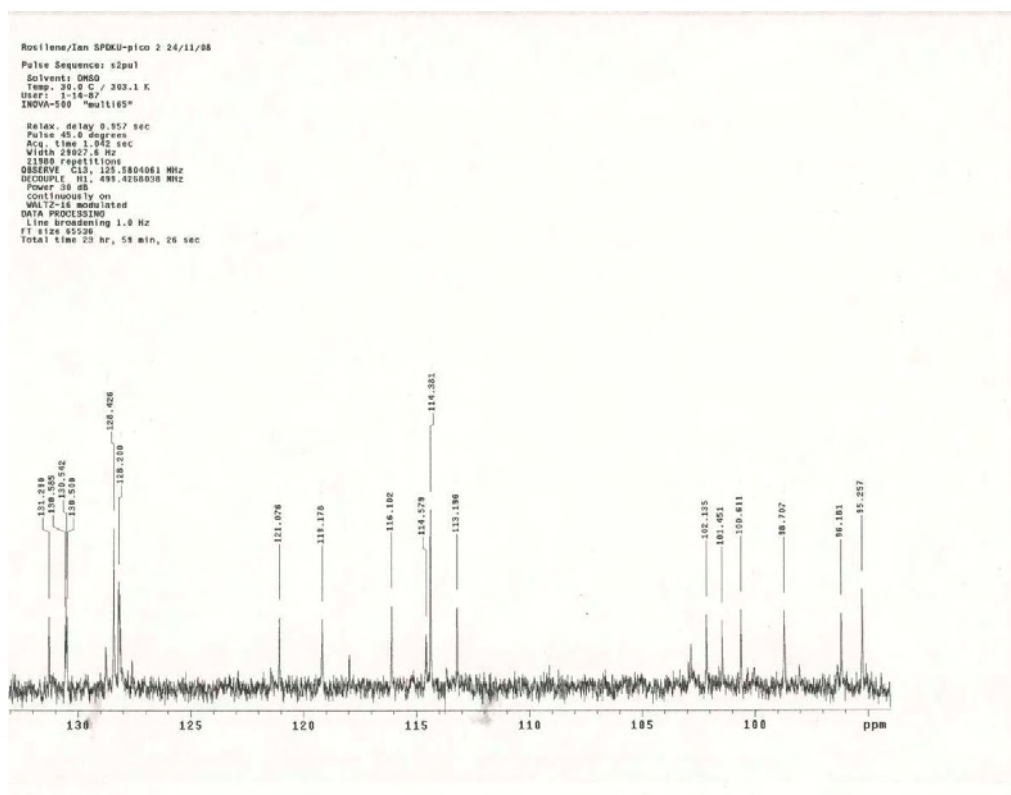
Anexo 47 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 17 (500 MHz – DMSO- d_6)



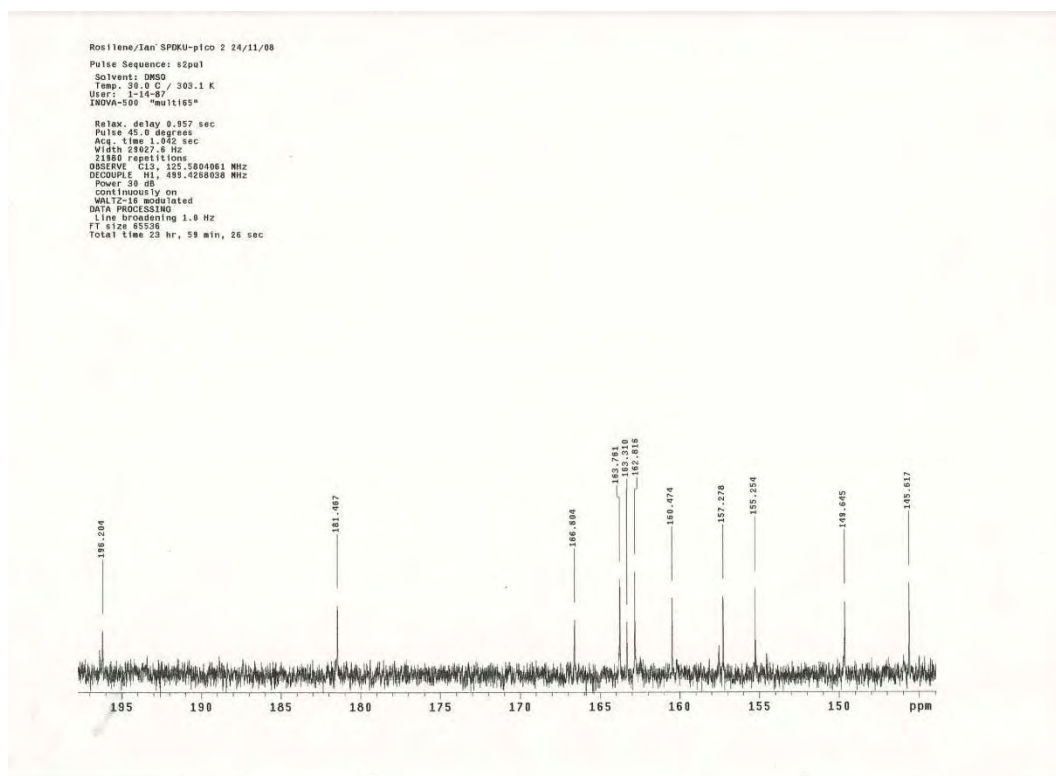
Anexo 48 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 17 (500 MHz – DMSO- d_6)



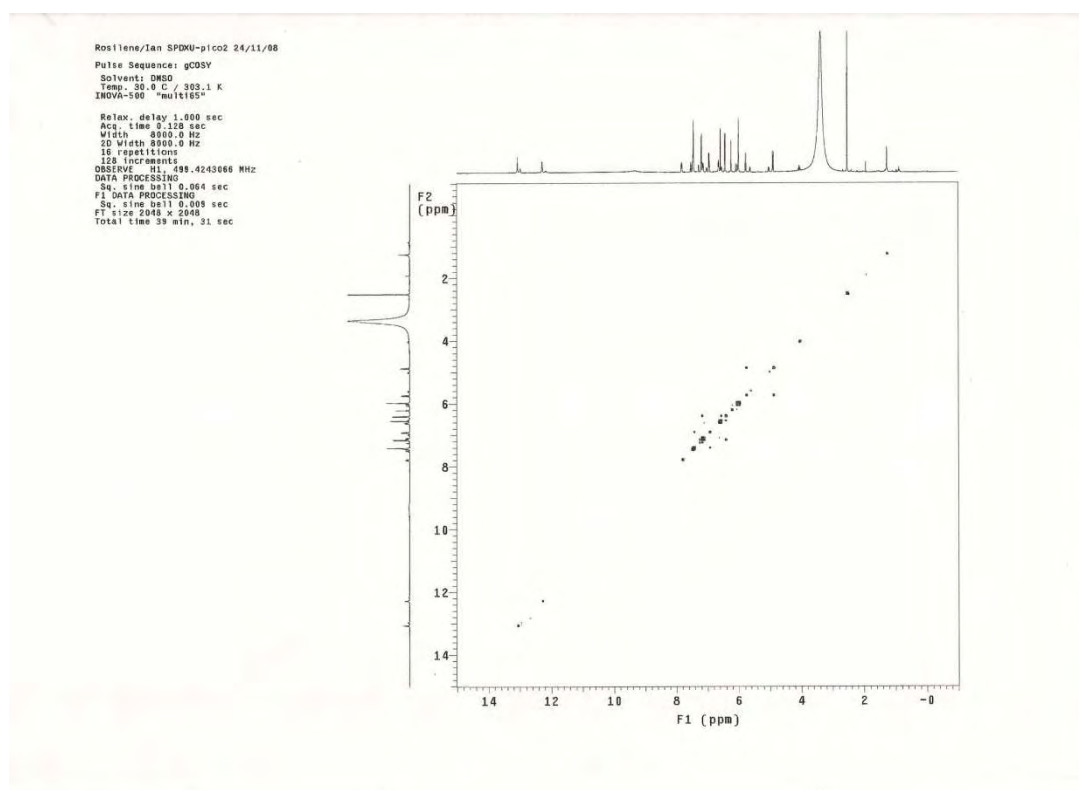
Anexo 49 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 17
(DMSO- d_6)



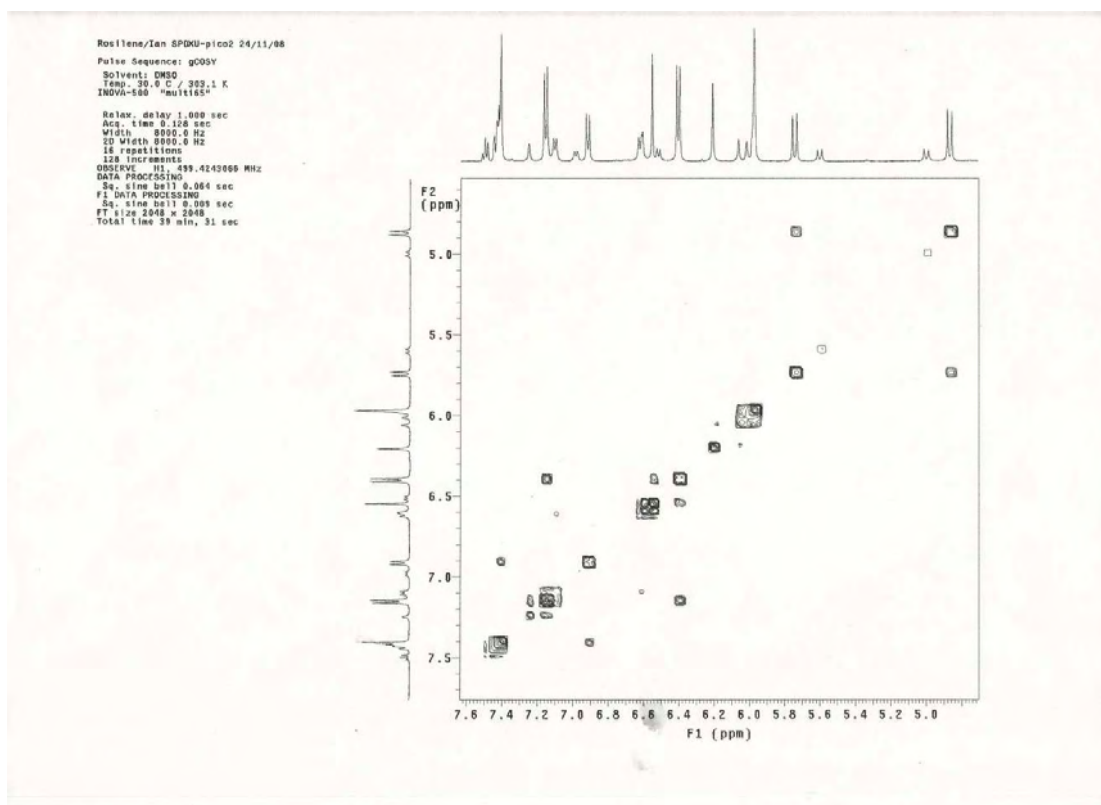
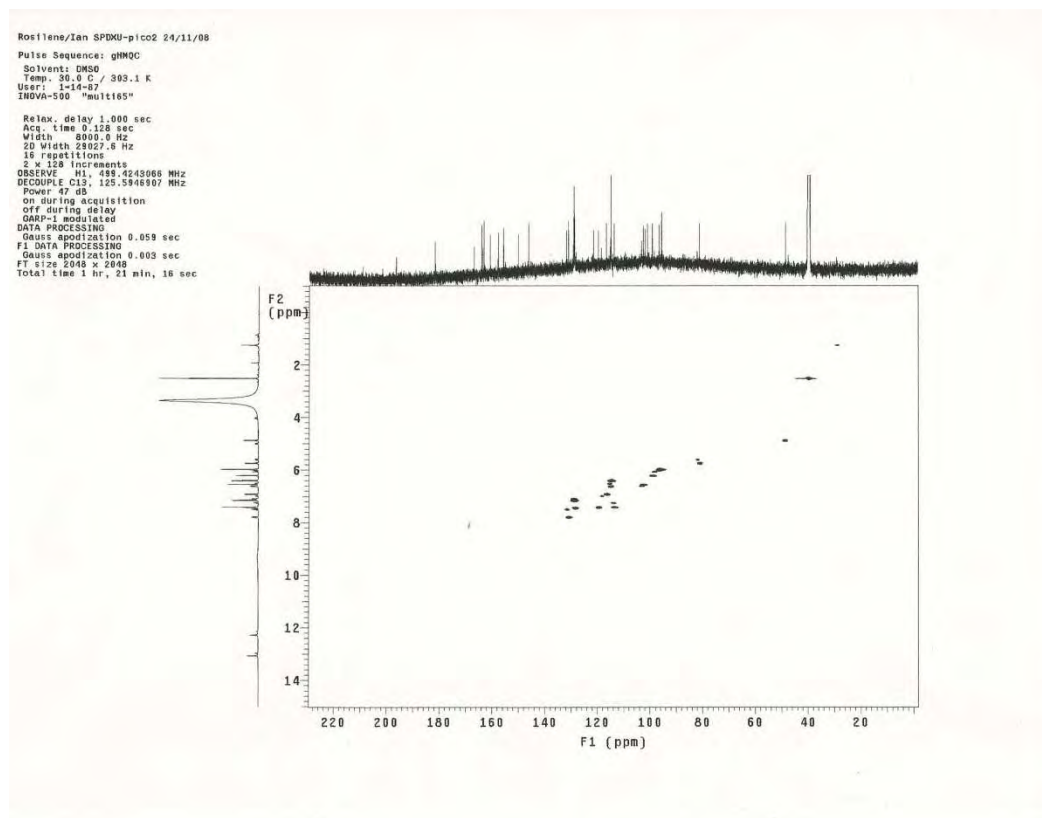
Anexo 50 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 17
(DMSO- d_6)

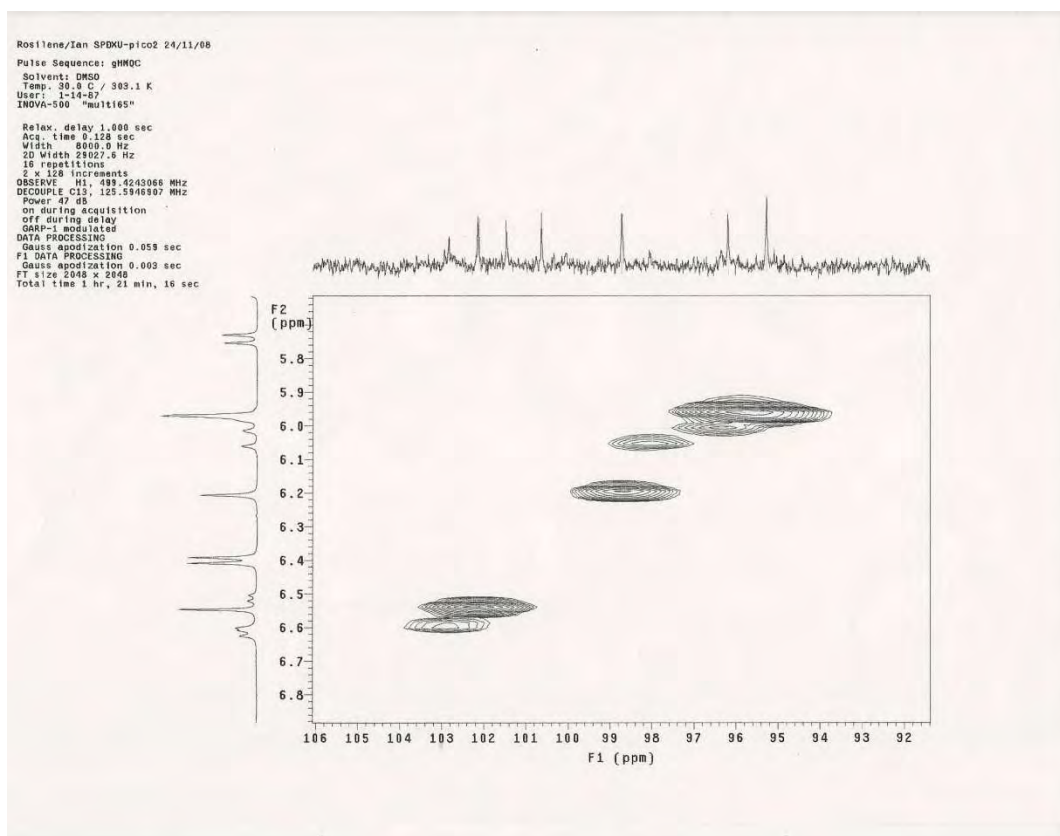
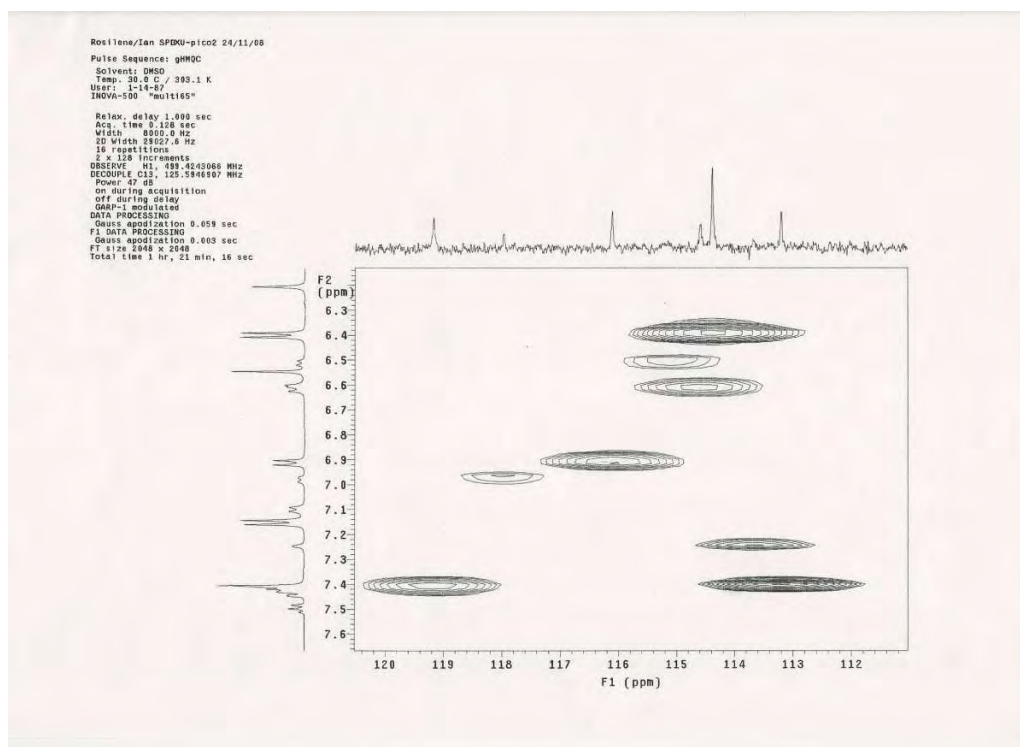


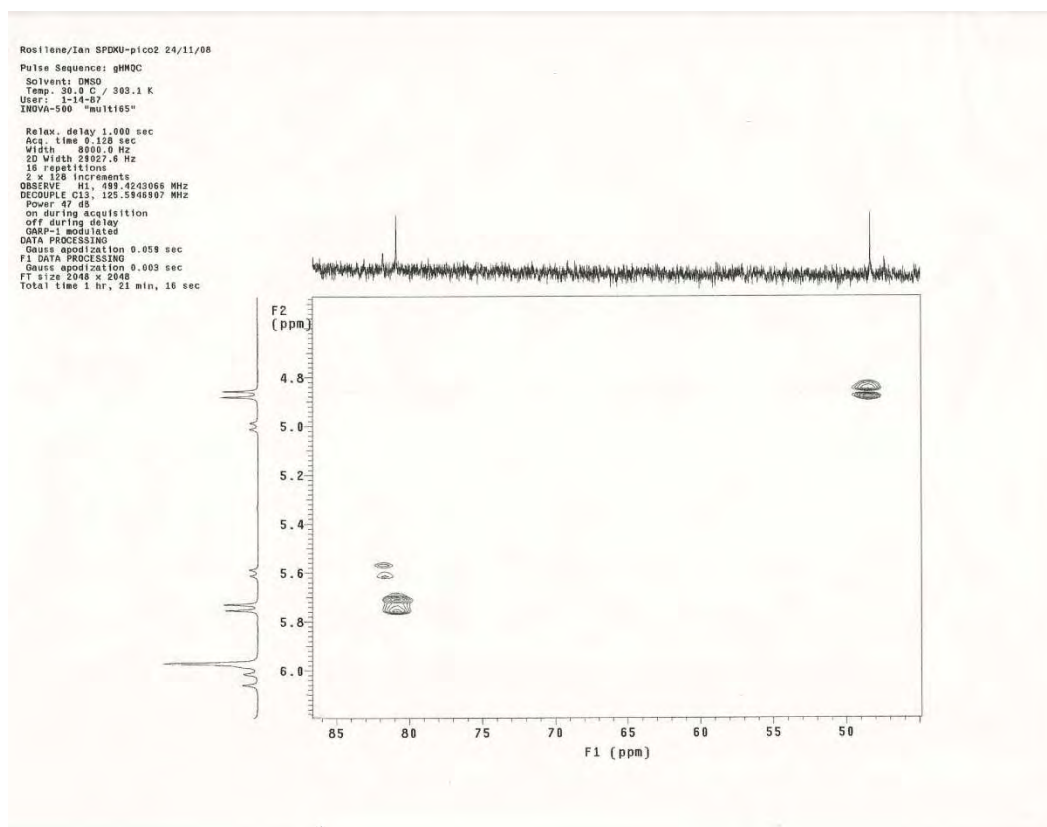
Anexo 51 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 17
(DMSO- d_6)



Anexo 52 – Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 17

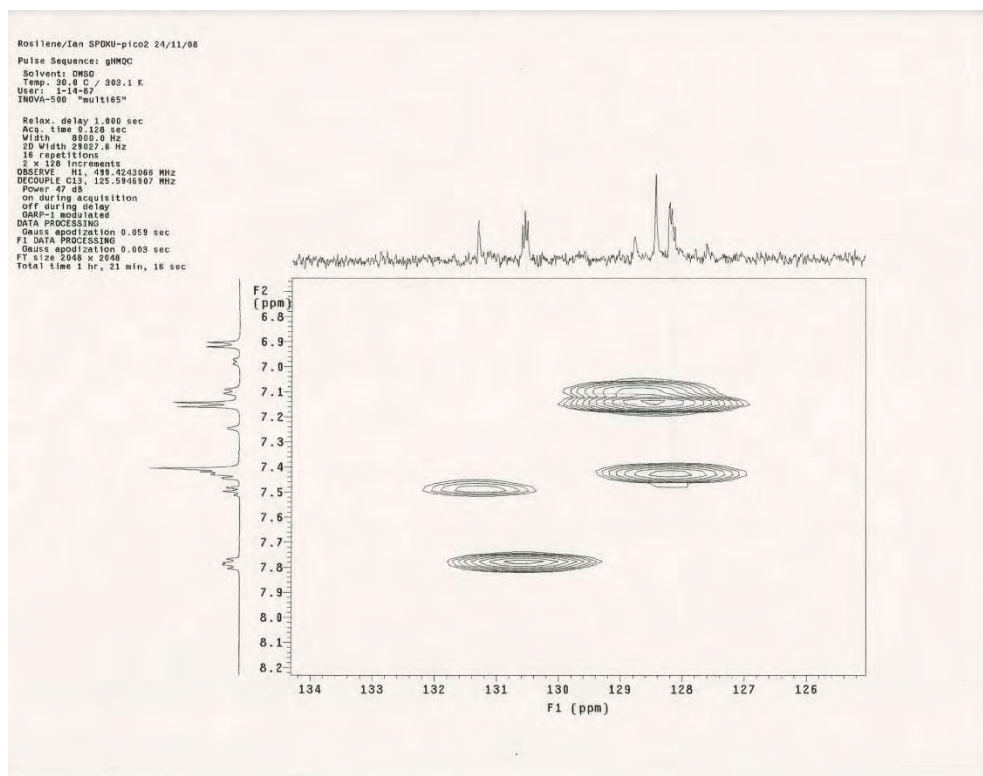
Anexo 53 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância17Anexo 54 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMOC da substância

Anexo 55– Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância17Anexo 56– Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância17



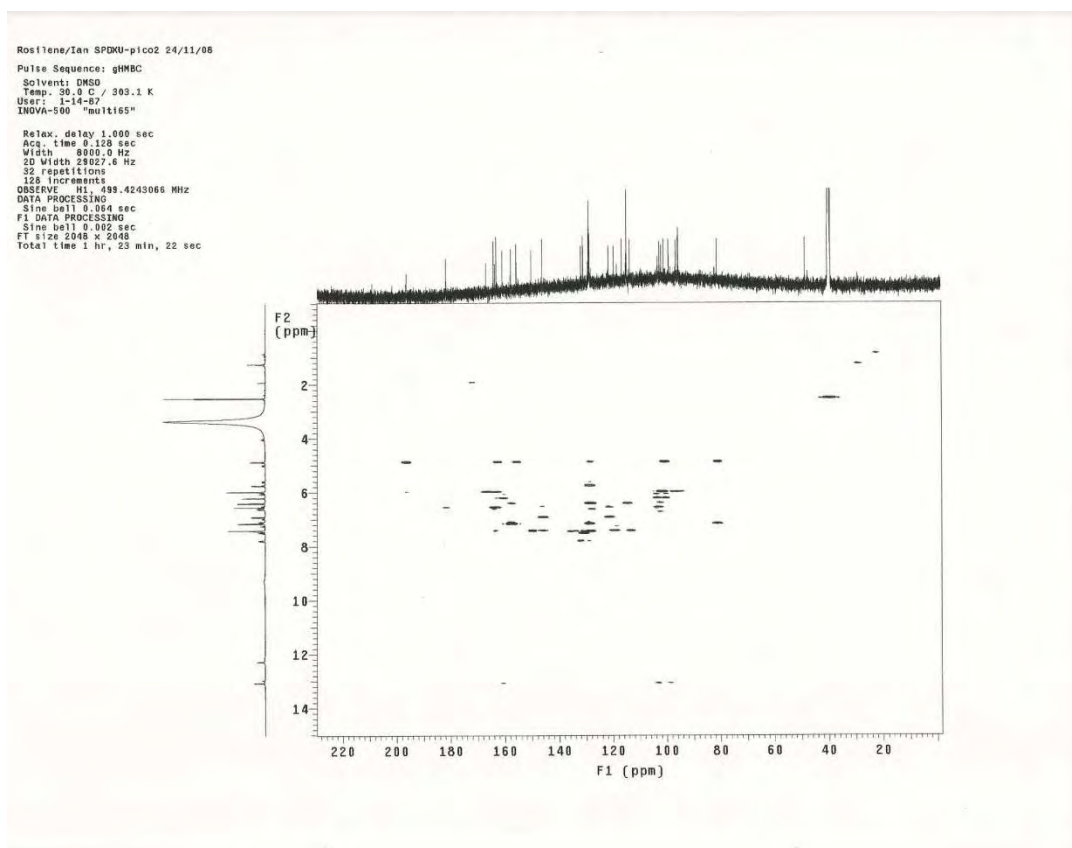
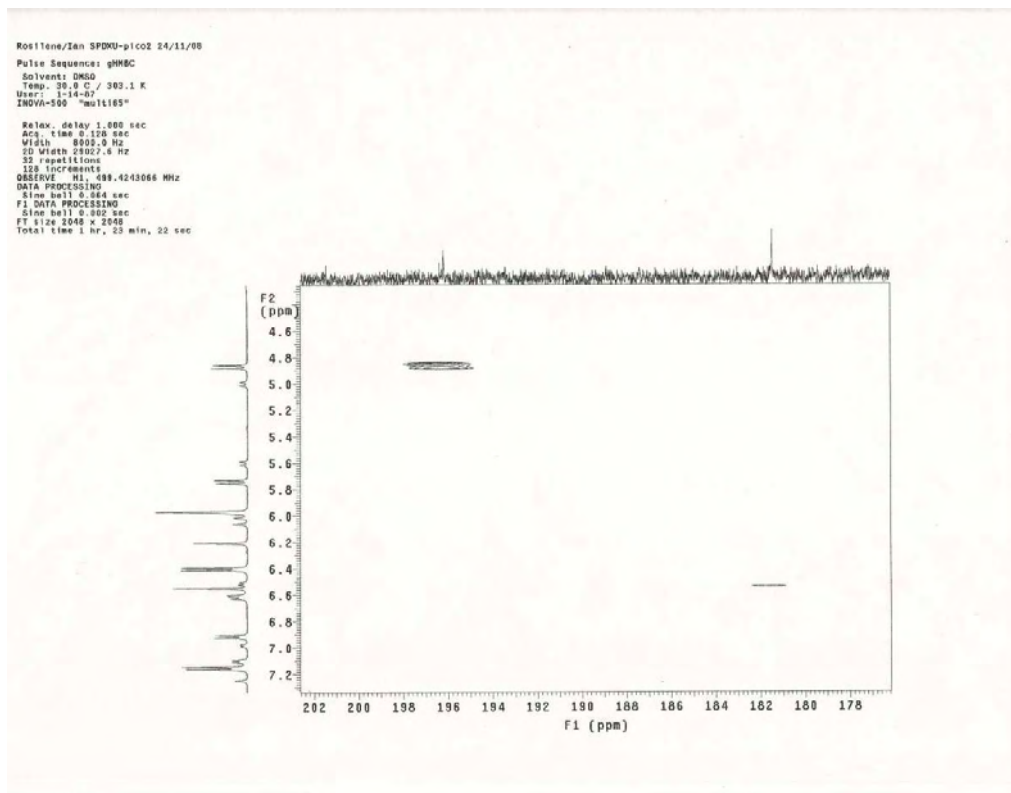
Anexo 57– Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância

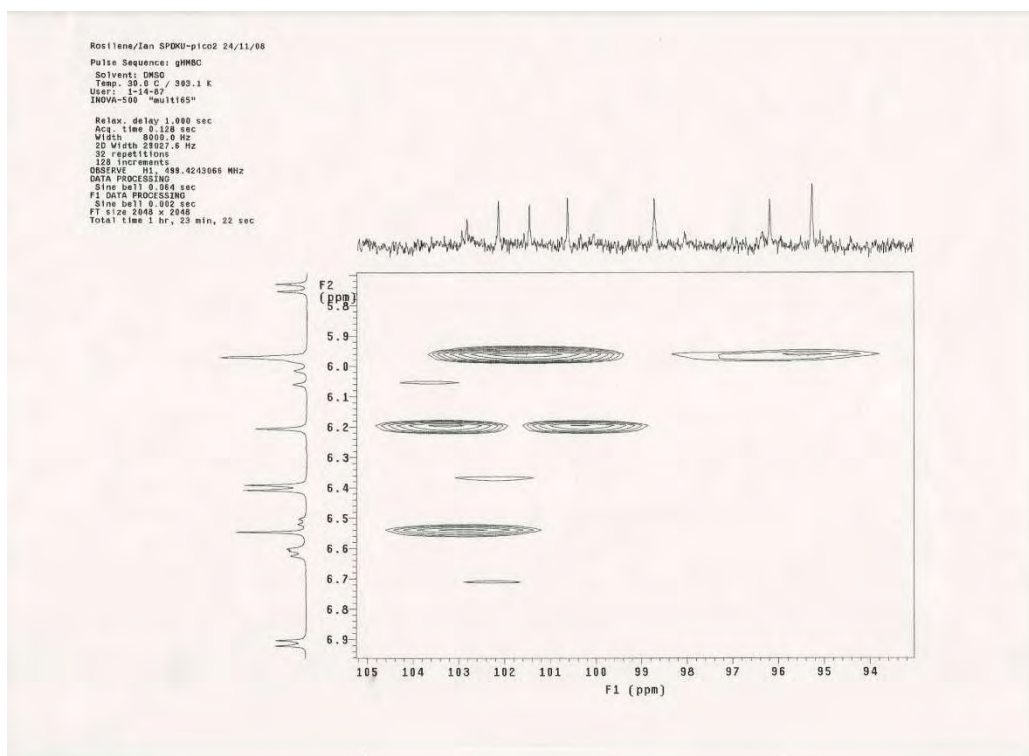
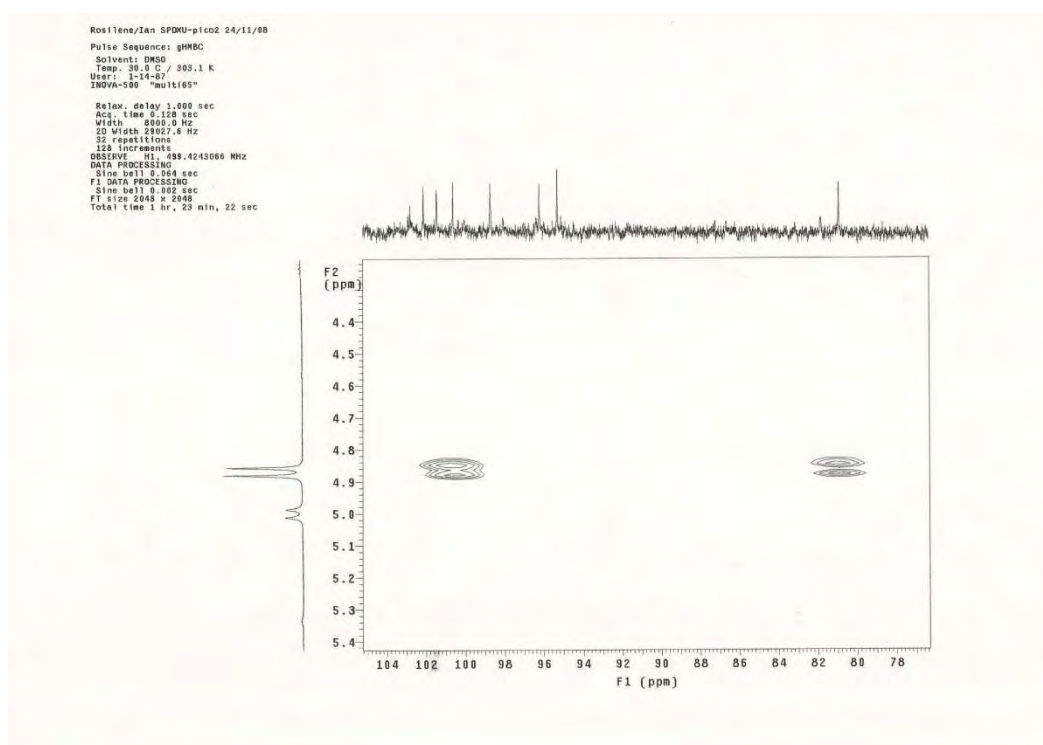
17

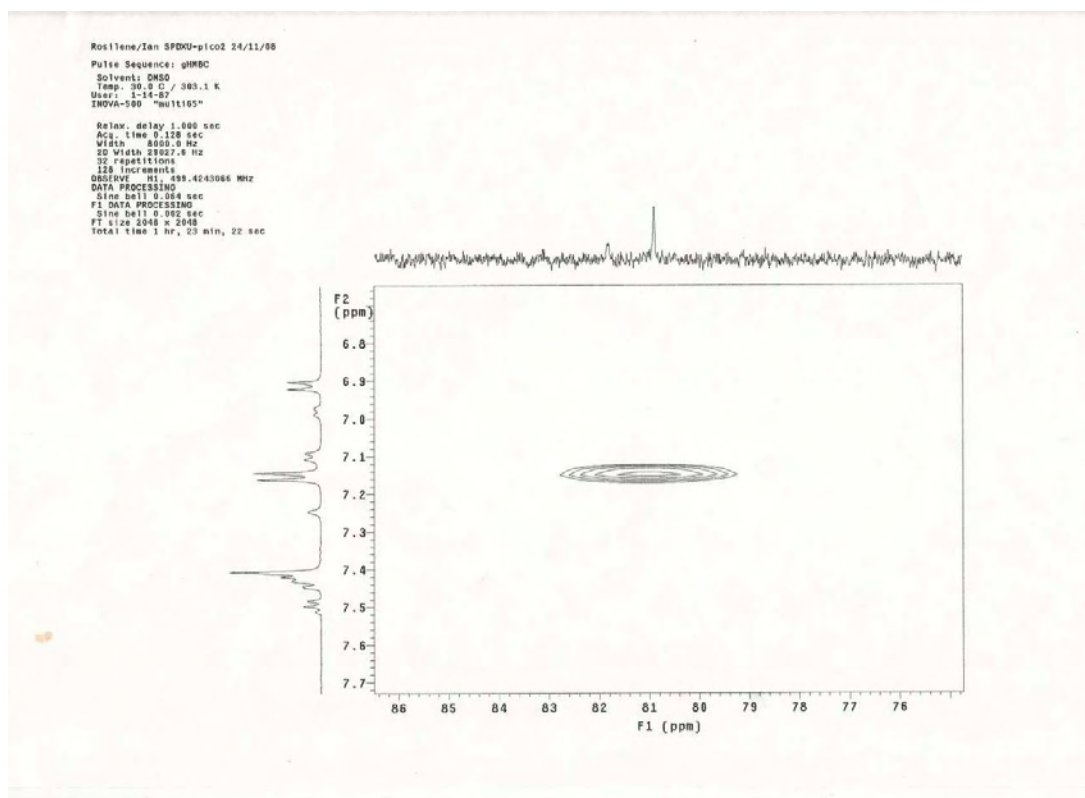
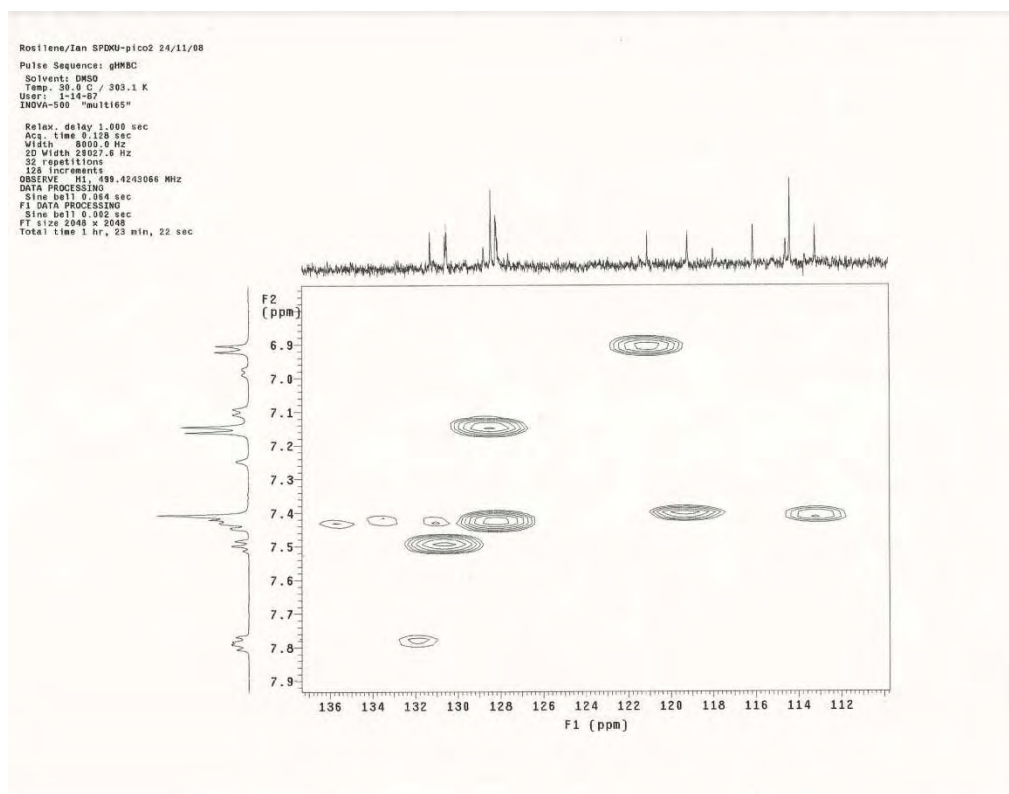


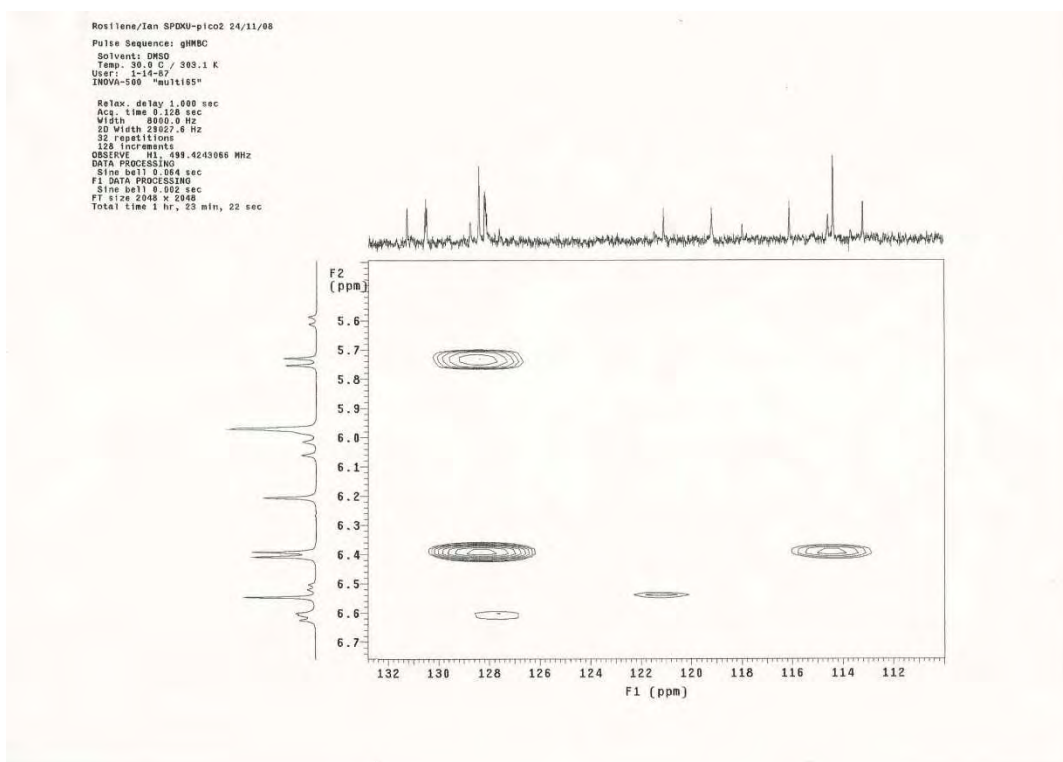
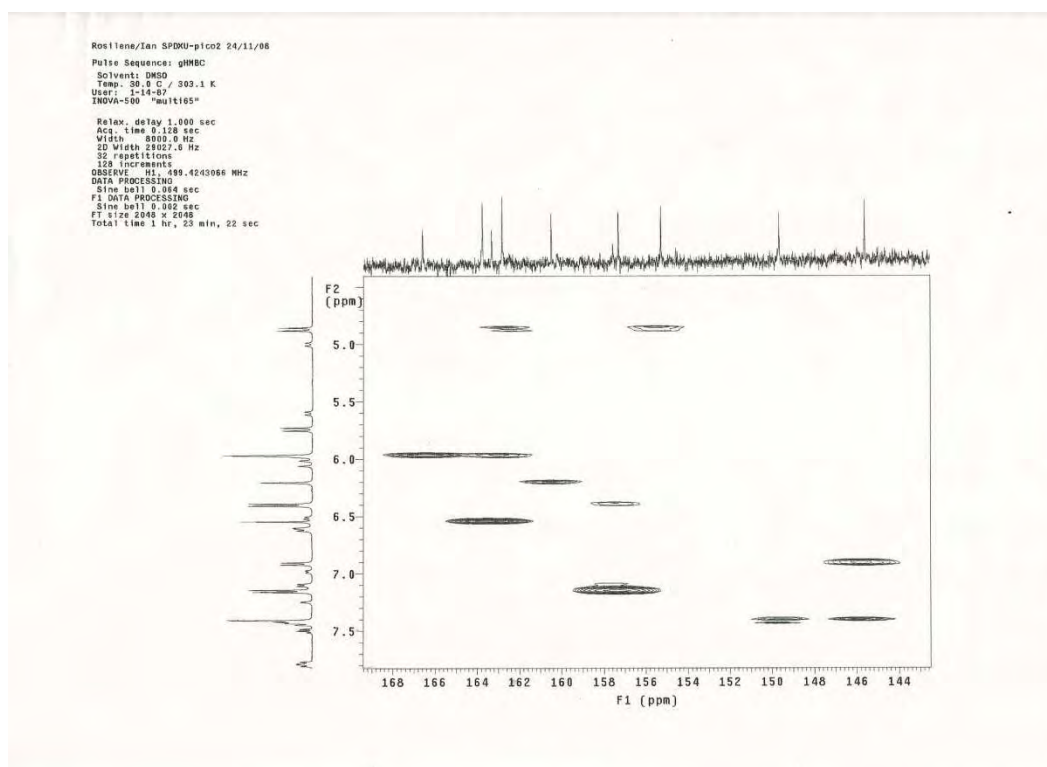
Anexo 58– Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância

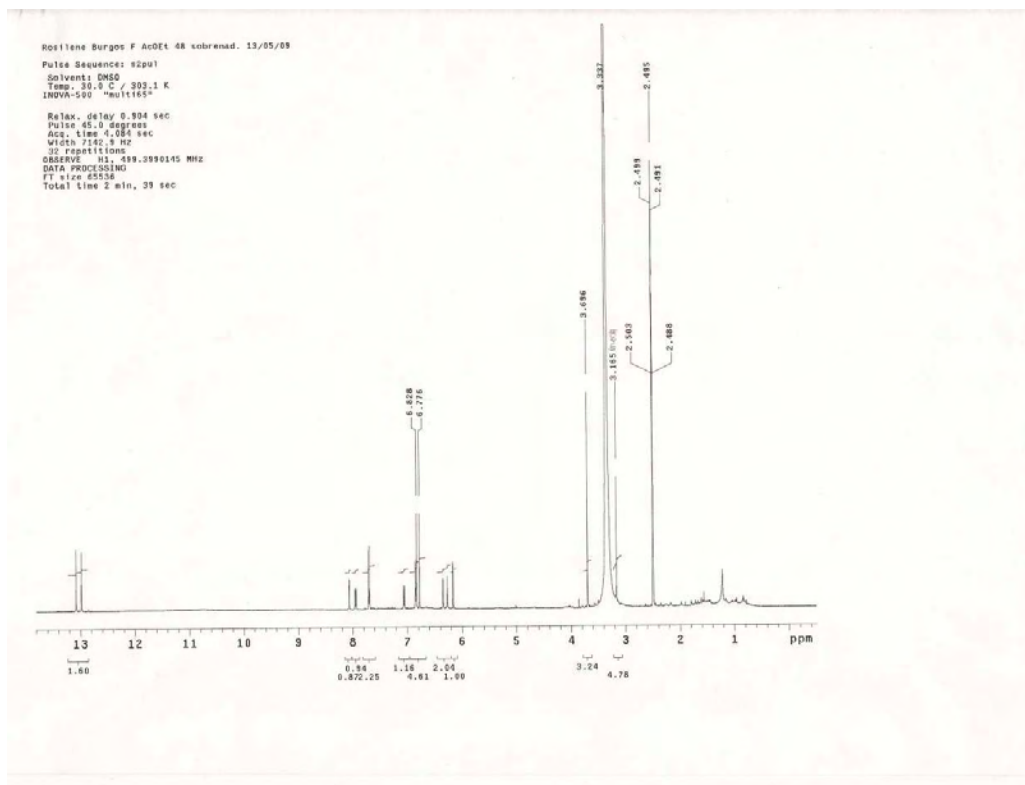
17

Anexo 59 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 17Anexo 60 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

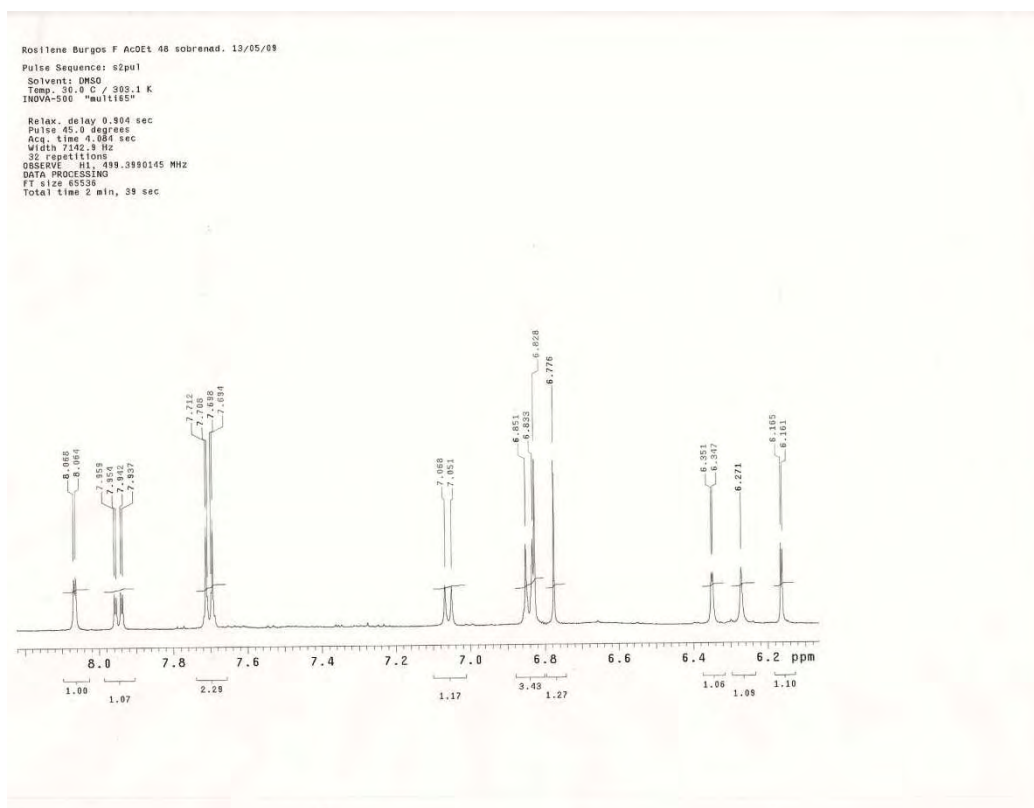
Anexo 61 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância17Anexo 62 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância17

Anexo 63 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância17Anexo 64 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância17

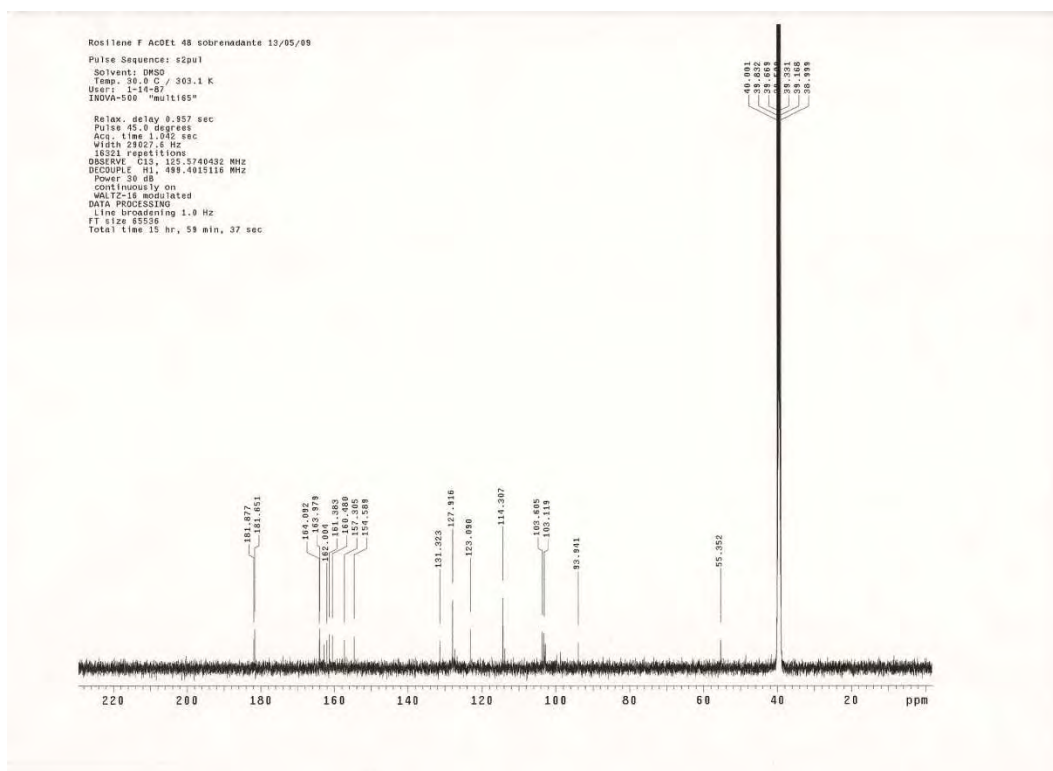
Anexo 65 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância17Anexo 66 – Ampliação do mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância17



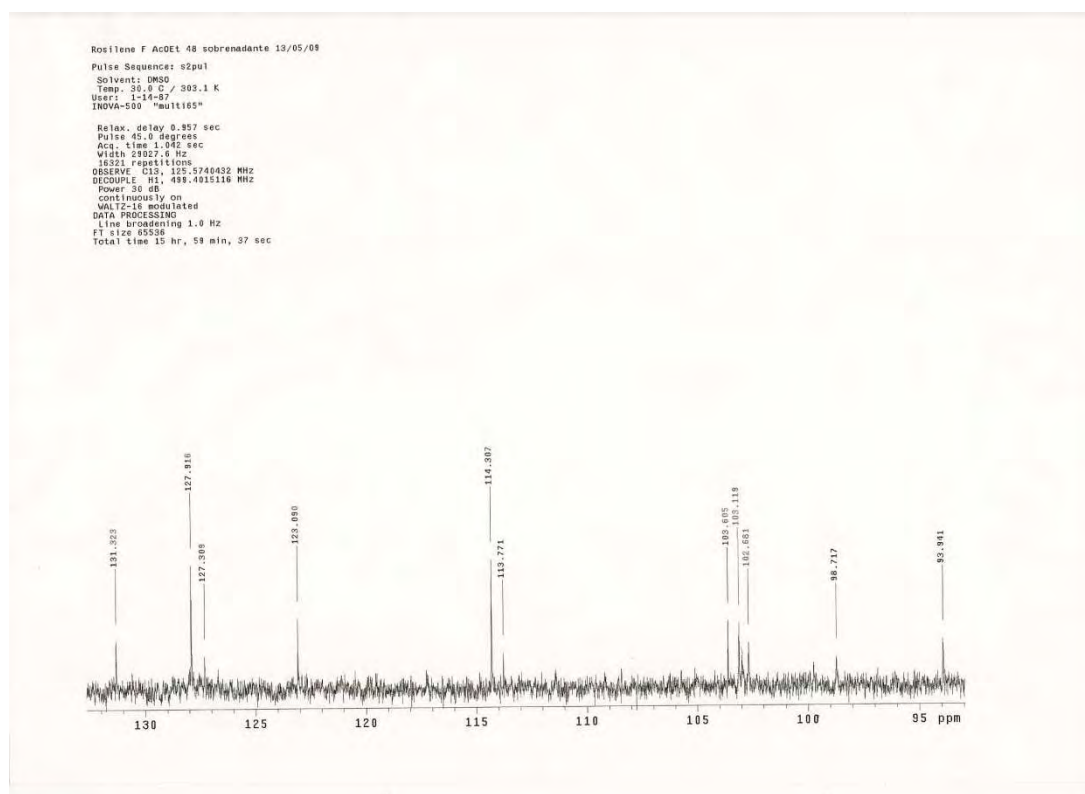
**Anexo 67 – Espectro de RMN de ^1H da substância 20
(500 MHz – DMSO- d_6)**



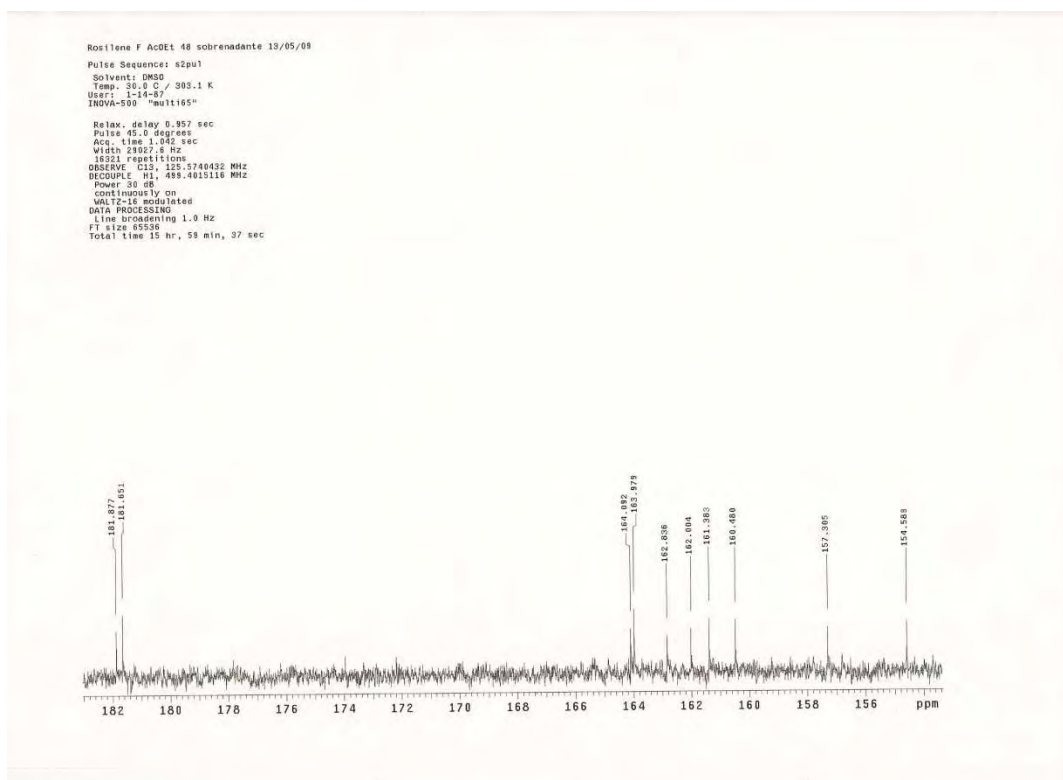
**Anexo 68 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H da substância 20
(500 MHz – DMSO- d_6)**



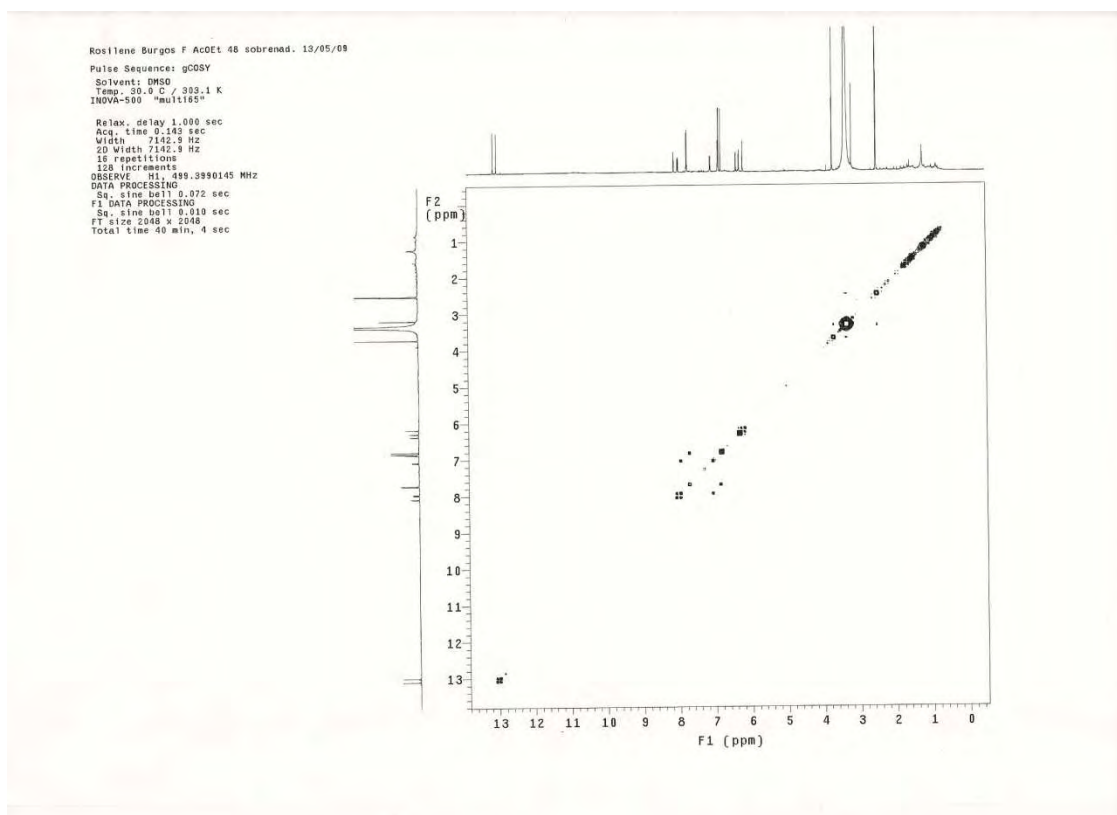
Anexo 69 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 20 - (DMSO- d_6)



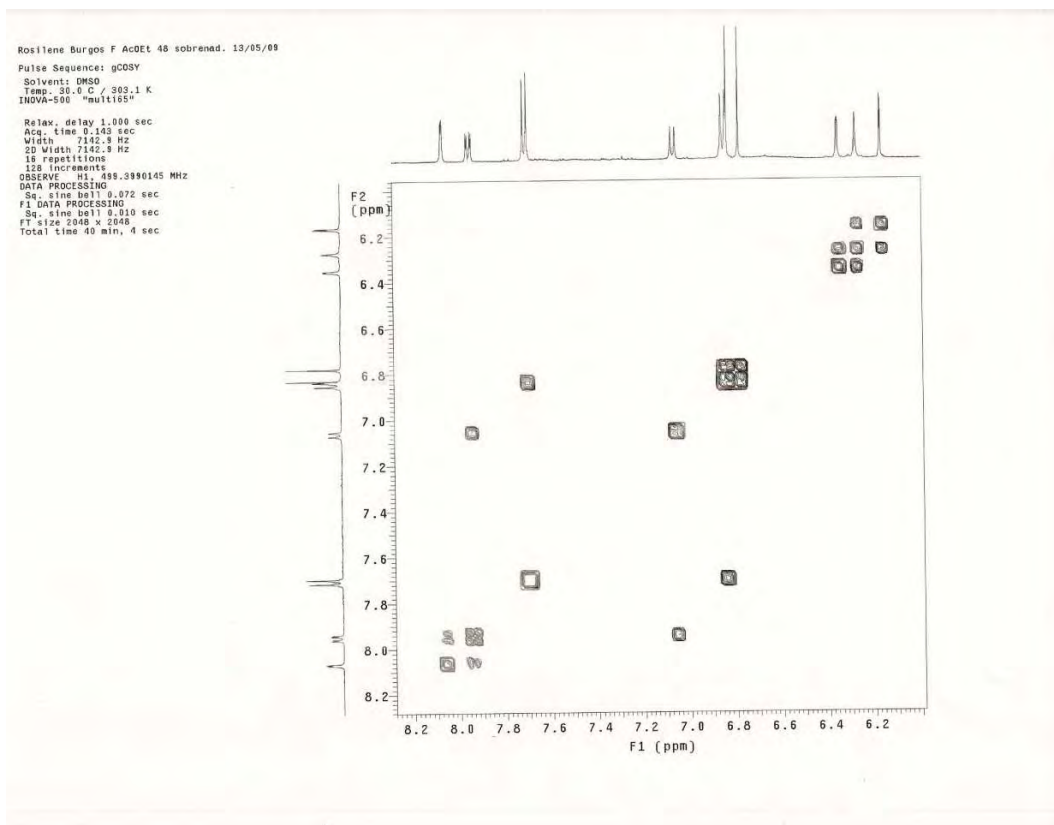
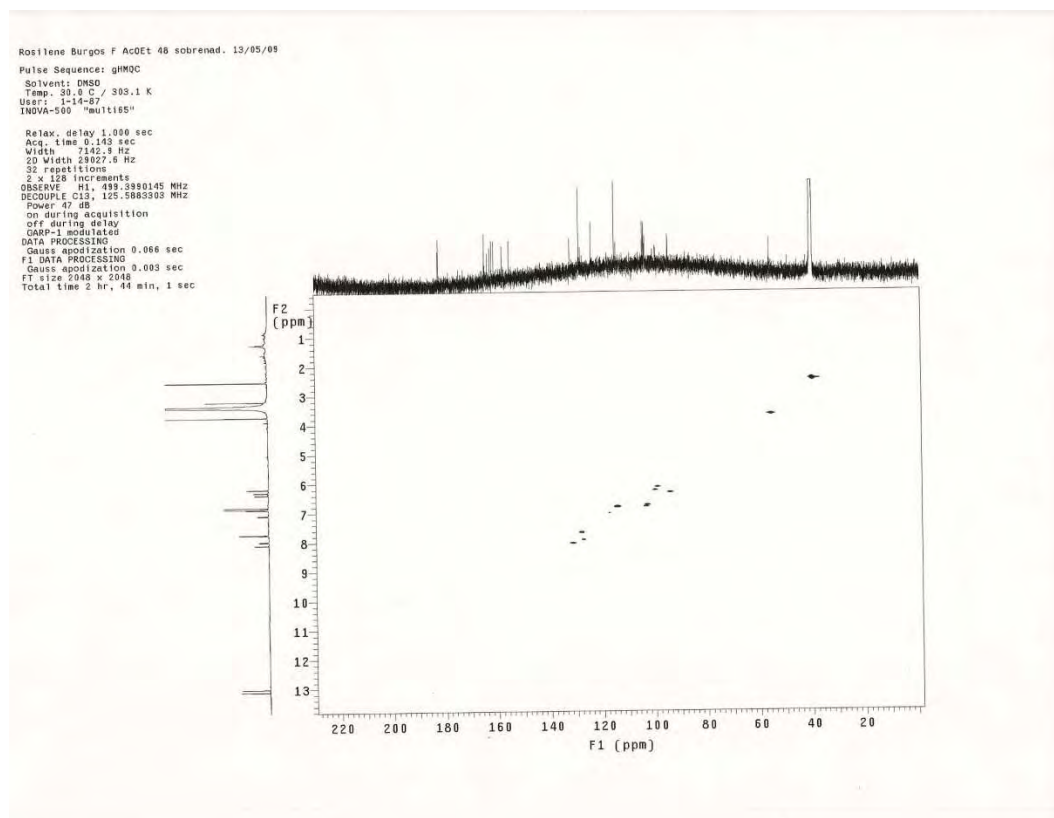
Anexo 70 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 20
 (DMSO- d_6)

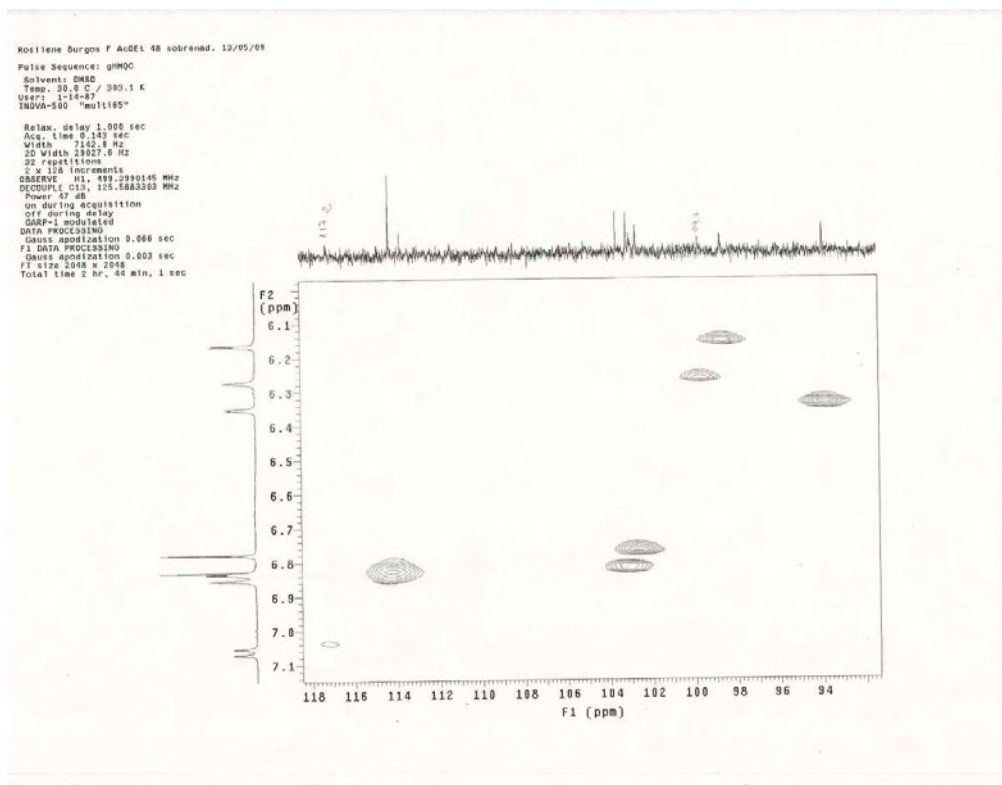


Anexo 71 – Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C da substância 20
(DMSO- d_6)

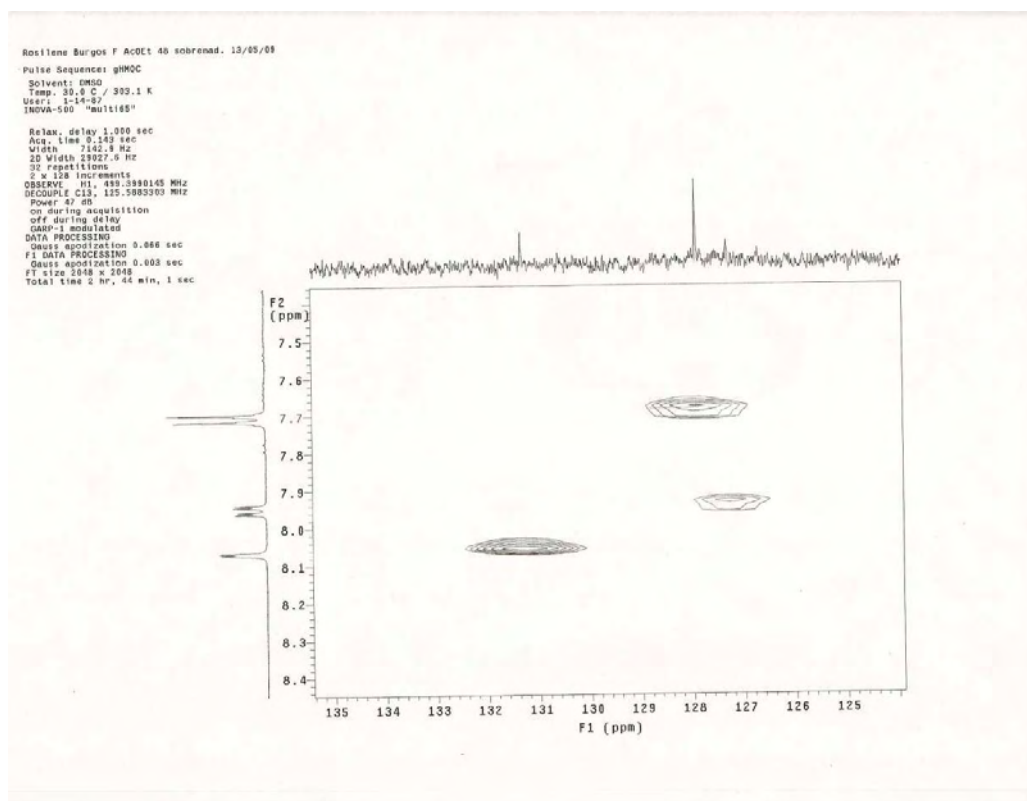


Anexo 72 – Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância 20

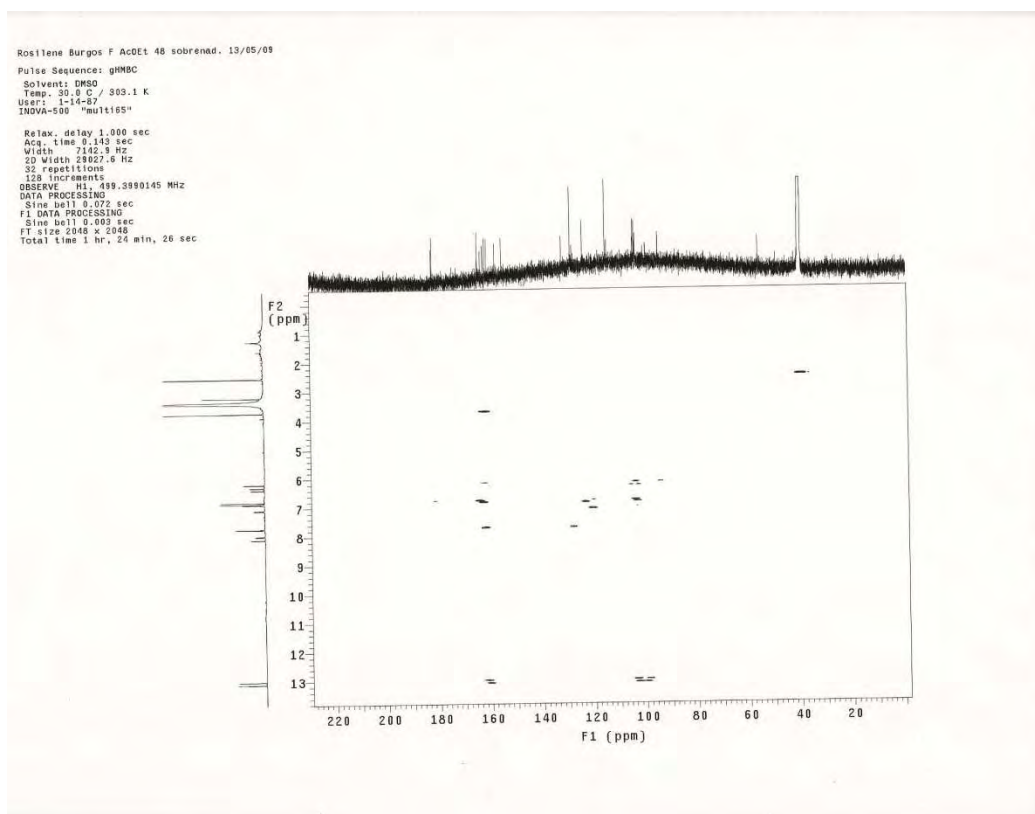
Anexo 73 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^1H gCOSY da substância20Anexo 74 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMQC da substância 20



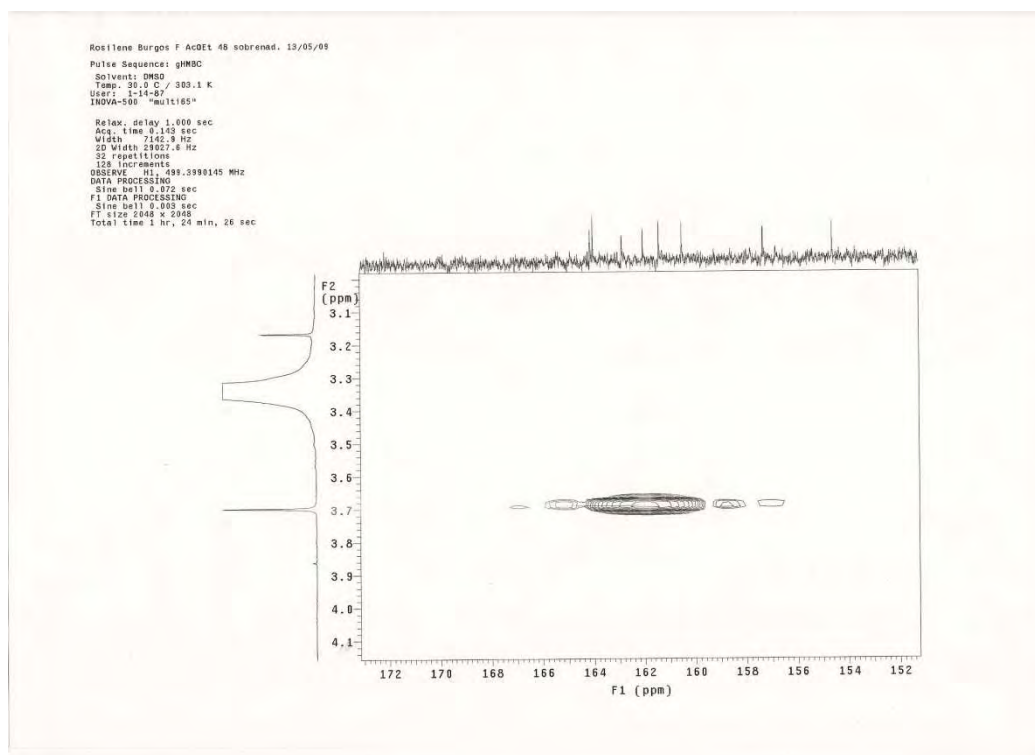
Anexo 75 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMOC da substância
20



Anexo 76 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMOC da substância
20

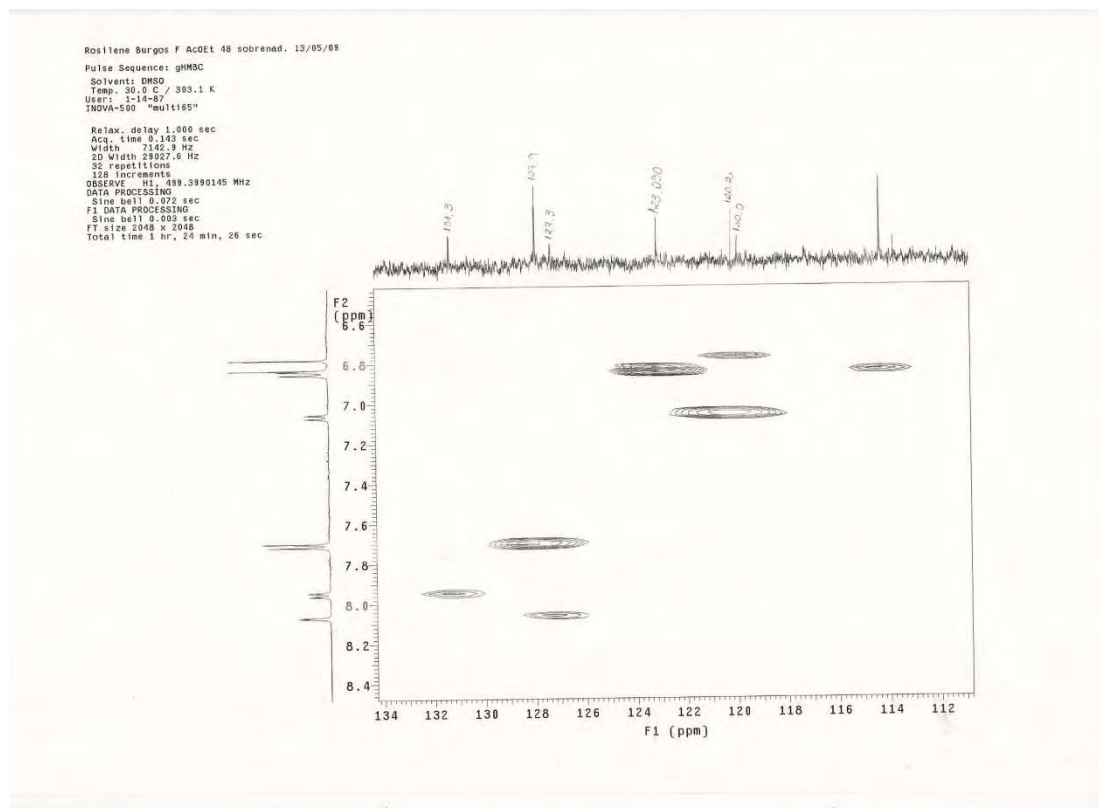


Anexo 77 – Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância 20



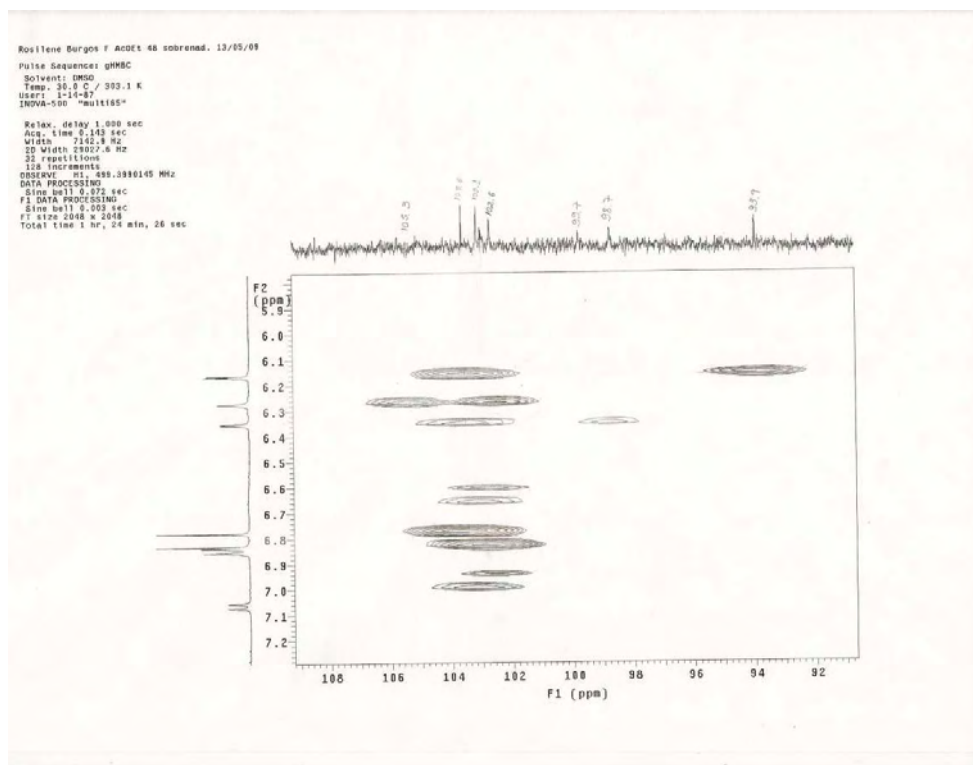
Anexo 78 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

20



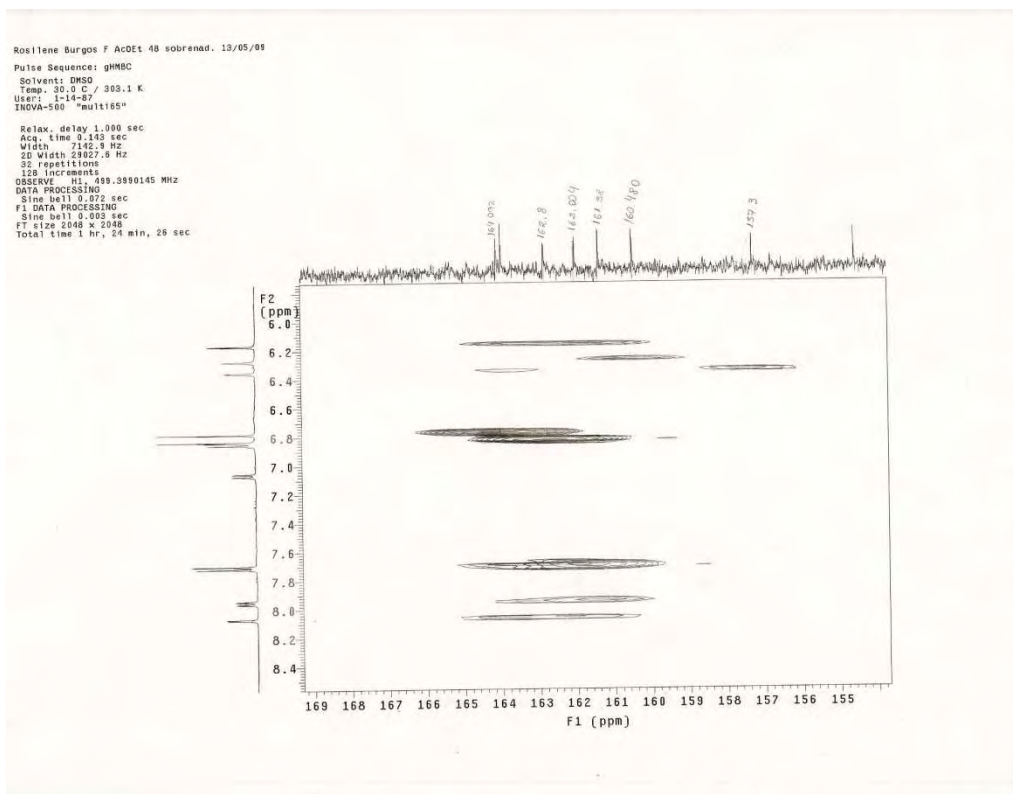
Anexo 79 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

20



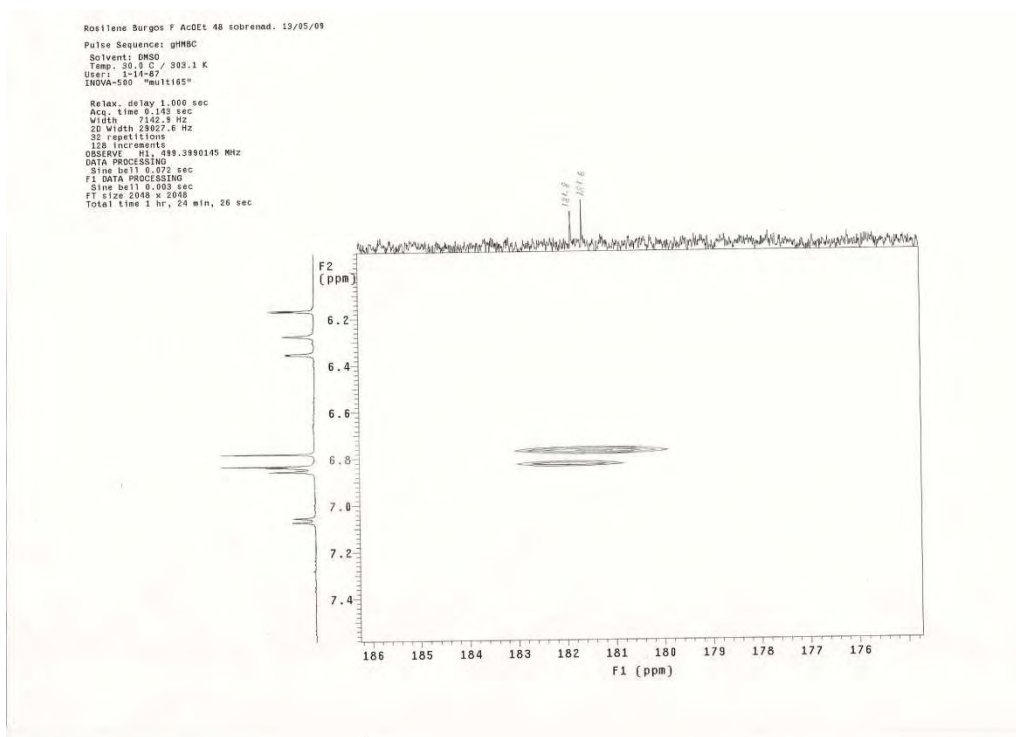
Anexo 80 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

20



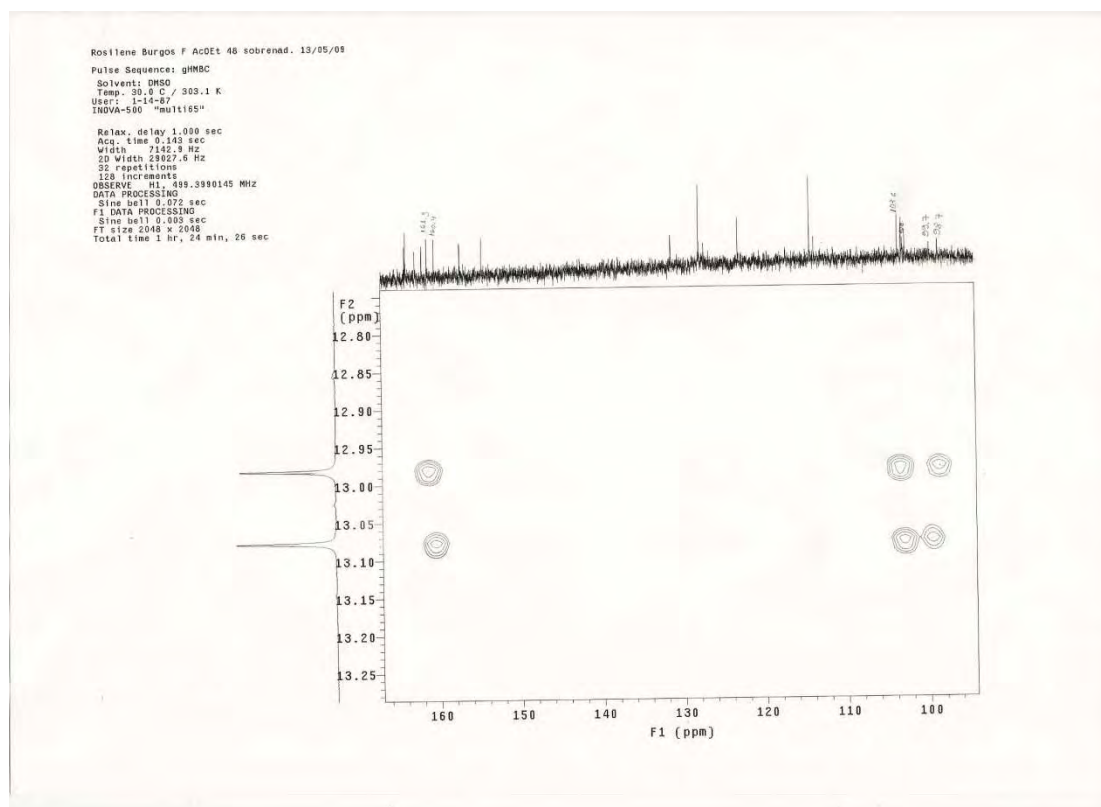
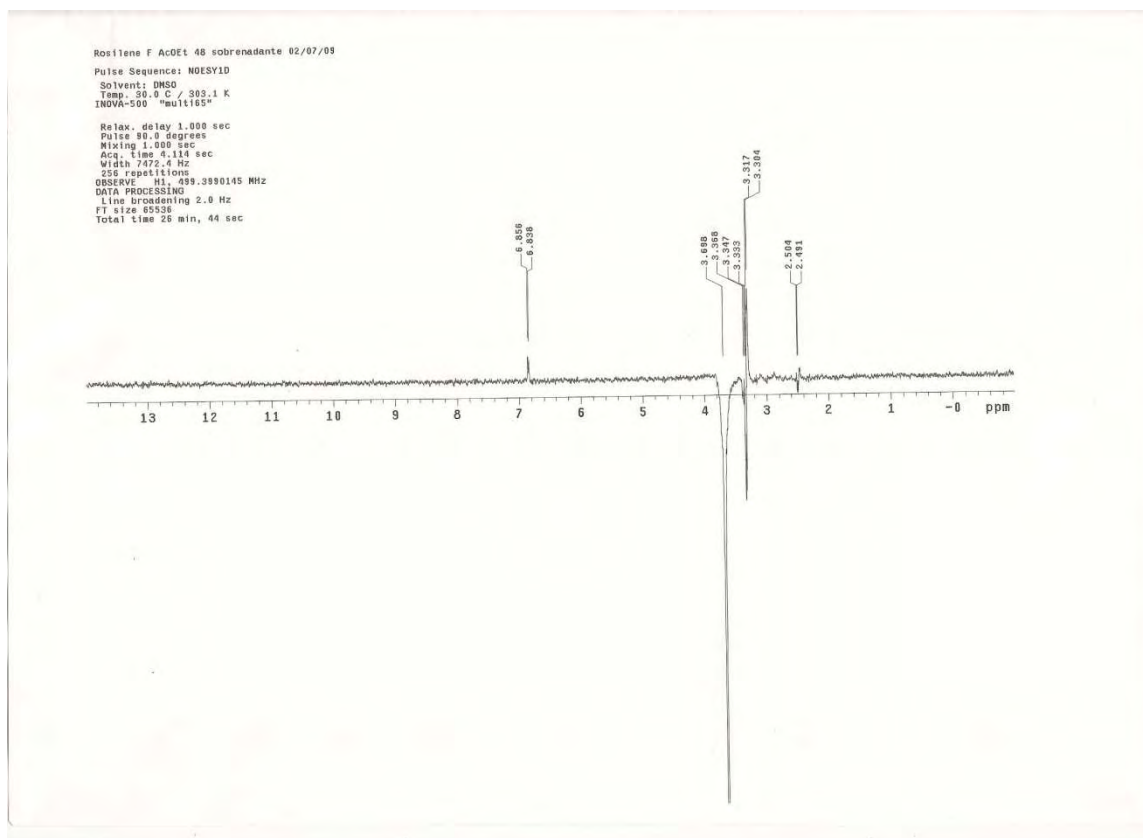
Anexo 81 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

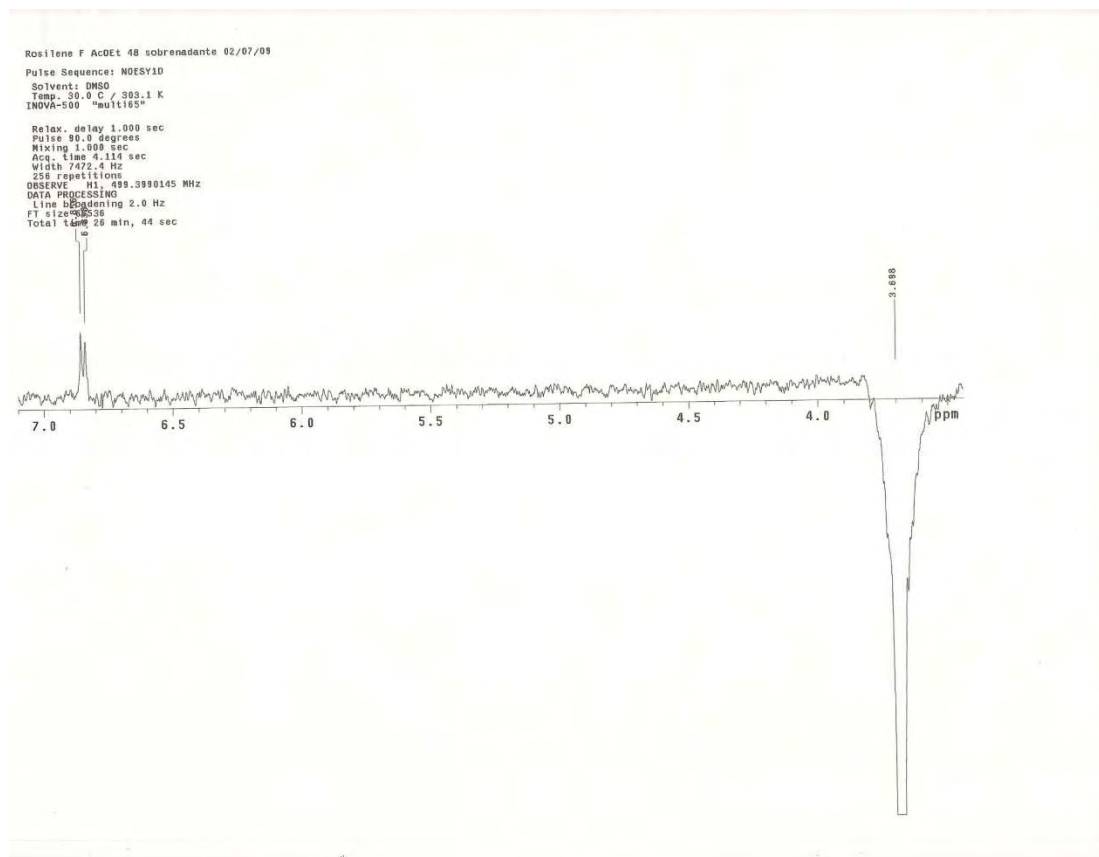
20



Anexo 82 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância

20

Anexo 83 – Ampliação do Mapa de contorno ^1H - ^{13}C gHMBC da substância20Anexo 84 – Espectro de NOESY 1D da substância 20



Anexo 85 – Ampliação do Espectro de NOESY 1D da substância 20