UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

Fracionamento bioguiado para seleção de substâncias antioxidante, antimalárica e antibiótica potenciais nas espécies *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae) e *Brosimum glaziovii* (Moraceae)

Aline Coqueiro
Doutoranda

Vanderlan da Silva Bolzani
Orientadora

Araraquara-SP
2010

ALINE COQUEIRO

Fracionamento bioguiado para seleção de substâncias antioxidante, antimalárica e antibiótica potenciais nas espécies *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae) e *Brosimum glaziovii* (Moraceae)

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

Orientadora: Profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani

Araraquara
2010

SÚMULA CURRICULAR

ALINE COQUEIRO

Dados pessoais
Nome: Aline Coqueiro
Nascimento: 15/02/82
Naturalidade: Cianorte-PR
Nacionalidade: Brasileira
Estado civil: Solteira
Filiação: Ubaldo dos Santos Coqueiro
Maria Madalena Valderrama Coqueiro

Endereço Profissional

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Rua Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, Araraquara-SP, CEP 14800-900
Telefones: 16-33016600 (ramal 6793)

alinedqi@iq.unesp.br

 # Formação Acadêmica

(1) Graduação em Química
Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá-PR, Brasil
2000-2003

(2) Mestrado em Química
Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá-PR, Brasil
"Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da espécie vegetal *Mabea fistulífera* Mart. (Euphorbiaceae)
2004-2006

(3) Doutorado em Química
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Araraquara-SP, Brasil
"Fracionamento bioguiado para seleção de substâncias antioxidante, antimalárica e antibiótica potenciais nas espécies *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae) e *Brosimum glaziovii* (Moraceae)"

 # Estágios realizado durante o doutorado

(1) Estágio sanduíche no "Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy – The School of Pharmacy – University of London – London, UK" sob a supervisão do Prof. Dr. Simon Gibbons. 10/2009 – 01/2010

 # Artigos completos publicados em periódicos

(1) COQUEIRO, A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZOCOLLER, M. A.; VIDOTTI, G. J. . Flavanone glycosides from *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 717-719, 2007.

 # Últimos resumos publicados em Anais de Congressos relacionados ao projeto de Doutorado

(1) Potencial biológico de *Kielmeyera variabilis*.
XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology, 2008, São Paulo-SP.

(2) Xantonas de *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae): metabólitos especiais, antimaláricos potenciais.
32ª Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza-CE.

(3) Antiprotozoal Activity Against Trypanosoma cruzi by xanthones from *Kielmeyera variabilis*.
The 50th Anniversary Meeting of the ASP, 2009, Honolulu - Hawaii.

(4) Flavonóides e atividade antioxidante de *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae)
33ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, 2010.

(5) Anti-staphylococcal xanthones from *Kielmeyera variabilis*.
The 51st Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, St. Petersburg Beach, Florida, 2010, apresentação oral.

(6) Antimicrobial activity of *Kielmeyera variabilis*.
58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlim, - Alemanha, 2010, apresentação oral.

 # Participação em comissões

(1) VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP-2008. 2008.

(2) III Workshop do NuBBE-Conservação e Uso Sustentável da Diversidade de Plantas do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospecção de Bioprodutos. 2008.

ALINE COQUEIRO

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

Araraquara, 22 de outubro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Profª Drª Marcia Nasser Lopes
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre

Prof. Dr. Horácio Adolfo Heinzen González
Facultad de Química – UdelaR, Uruguai

Profª Drª Paulete Romoff
Faculdade de Ciências Biológicas, Exatas e Experimentais / Mackenzie / São Paulo

Tente Outra Vez

(Raul Seixas)

Veja!
Não diga que a canção
Está perdida
Tenha em fé em Deus
Tenha fé na vida
Tente outra vez!

Beba!
Pois a água viva
Ainda tá na fonte
(Tente outra vez!)
Você tem dois pés
Para cruzar a ponte
Nada acabou!

Tente!
Levante sua mão sedenta
E recomece a andar
Não pense
Que a cabeça agüenta
Se você parar
Não! Não! Não!

Há uma voz que canta
Uma voz que dança
Uma voz que gira
(Gira!)
Bailando no ar.

Queira! (Queira!)
Basta ser sincero
E desejar profundo
Você será capaz
De sacudir o mundo
Vai!
Tente outra vez!

Tente! (Tente!)
E não diga
Que a vitória está perdida
Se é de batalhas
Que se vive a vida
Tente outra vez!

***A*os meus pais Ubaldo e Maria e minha irmã Letícia por me incentivarem e apoiarem minhas decisões me dando sempre o amparo necessário para que eu pudesse ir além, sem vocês eu não teria chegado até aqui...**

***A*o meu avô Bidal e em especial à minha avó Aparecida Valderrama (*in memorian*) pelo exemplo de ser humano a ser seguido, com toda sua delicadeza, paciência, humildade e dedicação ao próximo e por mesmo ausente fisicamente estar sempre presente em minhas conquistas....**

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

✓À Deus pela oportunidade de crescimento e aprendizado constantes colocando em meu caminho oportunidades e pessoas que fazem toda difrença ao longo desta caminhada...

✓Aos meus pais Maria e Ubaldo e à minha irmã Letícia por me amarem incondicionalmente e por me ensinarem a dar valor a cada pequena conquista e sem os quais eu não conseguiria ter consquistado mais este sonho...

✓À minha orientadora e "mãe científica" Vanderlan por sempre me instigar a vencer novas batalhas, por me apoiar e pelo exemplo de pesquisadora e mulher que é tendo sempre uma visão ousada da ciência...

✓Aos Professores do departamento de química Orgânica Prof. Dr. Alberto Cavalheiro, Profa. Dra. Ângela R. Araújo, Profa. Dra. Dulce H. S. Silva, Profa. Dra. Márcia Nasser, Profa. Dra. Lúcia Xavier, Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, Profa. Dra. Lourdes Campaner e Prof. Dr. Wagner vilegas, pelos ensinamentos e pela convivência durante estes quatro anos...

✓Em especial ao Prof. Dr. Ian Castro Gamboa por toda ajuda e por se mostrar sempre pronto a exercer seu papel de mestre contagiando a todos com sua paixão pela ciência...

✓Ao Dr. Nivaldo Boralle (Nini) pela realização dos espectros de RMN e, além disso, por estar disposto a transmitir sempre seus conhecimentos de uma forma muito agradável, pela sua seriedade e prestatividade...

✓Ao Dr. Alberto C. Alécio, pela prestatividade e competência com que desenvolve seu trabalho ajudando a todos e resolvendo muitas vezes problemas que não são de sua obrigação, pelos ensinamentos durante estes quatro anos e pela pessoa humilde que é tornando assim o convívio sempre muito agradável...

✓À técnica Dra. Luciana Polese pela injeção das amostras nas análises de CG-DIC, por todos os esclarecimentos prestados e pela convivência durante estes anos...

✓Ao Prof. Dr. Norberto Peporini (USP – Ribeirão Preto) e ao especialista em espectrometria de massas Dr. José Carlos Tomaz, pela realização dos espectros de massas imprescindíveis para a elucidação estrutural das substâncias isoladas neste trabalho e também por estarem sempre dispostos a sanar minhas dúvidas...

✓Ao Gabriel, por aguentar meu humor muitas vezes oscilante e por acreditar e me fazer acreditar que tudo daria certo, me incentivando e apoiando minhas decisões, obrigada por ter feito parte desta etapa tão importante pra mim e por continuar fazendo parte da minha vida...

✓Aos amigos e aos colegas do NuBBE: Marília, Cristiano, Thaís, Wellington, Carol Rabal, Alessandra, Fernando (Aljazira), Fernando, Vanessa, Juliana, Luciene, Luiz Dutra (Berga), Luis Gustavo, Raquel, Vânia, Marcos Marçal, Miller, Mary Emily, Fausto, Alan, Sara, Fernando Passareli, Paulo, Rafael (Frera) Phanuel, Terezinha, Glenda, Ana Paula, Magela, Otávio, Fernando Cotinguiba, Alexander, Isabela, Andressa, João Marcos, Andreínha e aos que não estão mais no NuBBE mas fizeram parte dele e deixaram boas lembranças: Mike, Ana, Scheila, Carol, Fernanda Mattioli, Janaína, Fernanda Garcia, Douglas e Camila...

✓Aos demais amigos do departamento de Química Orgânica e do Instituto de Química...

✓Em especial aos amigos: Amanda, Ana Paula de Moura, Marcos Pivatto, Luis Octávio e Néia, pessoas especiais que entraram na minha vida por acaso, mas que não por acaso permancem nela. Obrigada pelas muitas conversas e por todo apoio...

✓Aos Professores integrantes do Projeto Temático Biota Bioprospecta-FAPESP e seus orientados pela realização de parte dos ensaios farmacológicos...

✓À Dra. Patrícia Pauletti pela ajuda no início do doutorado, sempre disposta a ajudar quando precisei...

✓À Dra. Maria Cláudia Marx Young pela coleta dos materiais botânicos...

✓À Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettli e a mestranda Isabela Oliveira de Freitas do Centro de Pesquisas Rene Rachou/CPqRR - Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz – Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil, pela realização dos ensaios antimaláricos com *Plasmodium falciparum*...

✓Ao Prof. Dr. Simon Gibbons por me disponibilizar seu laboratório para que eu pudesse desenvolver parte do presente trabalho e concretizar o sonho de realizar um estágio fora do país, por me ajudar sempre que precisei e por acreditar no meu trabalho. Sua capacidade intelectual, entusiasmo e paixão pelo seu trabalho, me contagiaram e tornaram o estágio fora do país e longe das pessoas amadas muito mais fácil.....

✓À Universidade de Londres – Escola de Farmácia, por permitir e disponibilizar suas instalações para que parte deste trabalho fosse desenvolvido em suas dependências...

✓Aos amigos do Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy: Mukleshur, Kadijo, Kamlesh, Isa e Jonathan, por toda paciência e por estarem sempre prontos a me auxiliar...

✓Às amigas da Av. Sorocaba, 60: Camila, Sayonara (Espeto), Mônica, Joyce (Fanta), Fabiana, Fernanda, Laninha (minha fiel escudeira) e ao agregado Maurício, obrigada pelos momentos de descontração, pelo apoio e pelas muitas conversas...

✓Às minhas queridas Professoras de inglês Mis. Dóris Barnis e Beth por toda paciência e por serem além de grandes professoras grandes amigas, sempre com uma palavra de conforto...

✓Ao meu Mestre e orientador do mestrado Prof. Dr. Gentil José Vidotti (*in memorian*), pessoa iluminada, humilde, sorridente e que despertou em mim a paixão pela química orgânica...
✓Aos funcionários do IQ, em especial às funcionárias da pós-graduação Sandra, Wennia, Patrícia e Célia...

✓ À Rose (*in memorian*) por estar sempre disposta a ajudar e resolver "pepinos" sempre que solicitada...

✓À Pós-Graduanda Gabriela Duó Passerini e a Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli pela realização dos testes tripanocida...

✓À Scheila Cristina Gutkoski Skrzek pela realização dos ensaios de sequestro de radicais livres...

✓À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini pela realização dos testes antifúngicos com patógenos humanos....

✓À técnica Cynthia Murakami do Instituto de Botânica pela realização dos testes com fungos fitopatógenos...

✓Aos Professores, membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito...

✓À todas as pessoas que não foram citadas mas que de maneira direta ou indireta contribuíram com a realização deste trabalho...

✓À FAPESP pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto...

“Quem passou pela vida em branca nuvem,
E em plácido repouso adormeceu;
Quem não sentiu o frio da desgraça,
Quem passou pela vida e não sofreu;
Foi espectro de homem, não foi homem,
Só passou pela vida, não viveu.”

Francisco Otaviano de Almeida Rosa

RESUMO

Os testes biológicos realizados por pesquisadores colaboradores do NuBBE para as espécies selecionadas para este estudo *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis* indicaram *K. variabilis* como uma importante fonte de metabólitos especiais bioativos. O fracionamento bioguiado da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* para isolamento de substâncias com potencial antimalárico foi realizado via teste químico com β-hematina e *in vitro* com *Plasmodium falciparum*, levando a identificação das xantonas oxigenadas 3,6-diidroxi-1,4,8-trimetoxixantona, 3,5-diidroxi-4-metoxixantona, 3,4-diidroxi-6,8-dimetoxixantona, 3,4-diidroxi-2-metoxixantona, 5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona, 2,3-dimetoxi-4-hidroxixantona, 3-hidroxi-2-metoxixantona e 2-hidroxi-1-metoxi-xantona e o xantonolignóide kielcorina. Dentre as substâncias isoladas, o xatonolignóide kielcorina foi considerado ativo quando comparado ao padrão cloroquina. A avaliação do potencial tripanocida também foi realizada para as xantonas isoladas e dentre estas, a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona foi a mais ativa, principalmente para a cepa resistente ao benzonidazol (cepa Bolívia). Na fração EHFB das folhas de *B. glaziovii* foi observado o potencial antichagásico desta espécie. Os resultados observados para os ensaios antioxidantes levaram ao isolamento dos flavonóides quercitrina, podocarpusflavona A e da mistura de quercetina-3-*O*-glicosídeo e quercetina-3-*O*-galactosídeo, evidenciando a importância dos grupos catecólicos na potencialização da ação antioxidante. O estudo bioguiado pela atividade antimicrobiana com seis cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina culminou no isolamento de um derivado prenilado do floroglucinol (HGK-1) o qual demonstrou ser responsável pela potente atividade demonstrada pela fração hexânica dos galhos de *K. variabilis*. As xantonas isoladas tiveram seu potencial antimicrobiano avaliado nas mesmas cepas, sendo que a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona é a única que possui um grupamento catecol e demonstrou maior potencial quando comparada às demais substâncias descritas. Por intermédio da técnica CG-DIC foram identificados 8 triterpenos e/ou esteróides, nas frações de baixa polaridade. Os resultados obtidos nos testes antifúngicos com fitopatógenos e patógenos humanos mais uma vez evidenciam o potencial farmacológico da espécie *K. variabilis*, assim como demonstram o potencial antimicótico dos galhos de *B. glaziovii*.

Palavras-chave: *Kielmeyera variabilis*, *Brosimum glaziovii*, atividades biológicas, xantonas, flavonóides, triterpenos, esteróides.

ABSTRACT

Several biological activities have been carried out by NuBBE's collaborators aiming the identification of active extracts from plant species, and *Brosimum glaziovii* and *Kielmeyera variables* showed to be important sources of bioactive secondary metabolites. Bio-guided fractionation of the EtOAc bioactive fraction of the branches of *K. variabilis* by using of the chemical test β-hematin, and *in vitro* by using of *Plasmodium falciparum*, led to the isolation and identification of oxygenated xanthones 3,6-dihydroxy-1,4,8-trimethoxyxanthone, 3,5-dihydroxy-4-methoxyxanthone, 3,4-dihydroxy-6,8-dimethoxyxanthone, 3,4-dihydroxy-2-methoxyxanthone, 1,3-dimethoxy-5-hydroxyxanthone, 2,3-dimethoxy-4-hydroxyxantona, 3-hydroxy-2-methoxyxanthone and 2-hydroxy-1-methoxyxanthone and xantonolignoid kielcorin. Among the compounds isolated, the xatonolignoid keilcorine indicated activity when compared to the standard chloroquine. The assessment of potential trypanocidal was also a part of this work and among the isolated xanthones, 3,4-dihydroxy-2-methoxyxanthone showed to be the most active, especially against the resistant strain to benzonidazole (Bolivia strain). In hexane fraction of leaves from *B. glaziovii* was noted antichagasic potencial for this specie. The antioxidant test used in this study led to the isolation of several flavonoids with antioxidant activity: quercitrin, podocarpusflavone A and the mixture of quercetin-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-galactoside, showing the importance of catechol group for the potentiating of antioxidant activity. The bio-guided antimicrobial activity using six strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resulted in the isolation of the prenylated phloroglucinol derivative (HGK-1), which proved to be responsible for the potent activity exhibited by the hexane extract of the branches of *K. variabilis*. The xanthones isolated were evaluated against antimicrobial activity in the same strains, and the 3,4-dihydroxy-2-methoxyxanthone was the only one that has a catechol, and presented the highest potential when compared to other substances described. Through GC-FID technique eight triterpenes and steroids were identified in the fractions of low polarity. The results obtained in tests against pathogens and human fungal pathogens once again highlighted the pharmacological potential of *K. variabilis* plant species, as well as demonstrate the antimycotic potential of the branches of *B. glaziovii*.

Keywords: *Kielmeyera variabilis*, *Brosimum glaziovii*, biological activities, xanthones, flavonoids, triterpenes, steroids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: À esquerda foto de um espécimen de *Brosimum glaziovii* do herbário do Instituto de Botânica, São Paulo-SP, Brasil. À direita foto de um espécimem de *B. glaziovii* publicada por SOUZA. 34
Figura 2: Foto de um espécimem de *Kielmeyera variabilis* (Fonte: http://timblindim.wordpress.com/arvores/pau-santo-1/). 36
Figura 3: Substâncias isoladas da espécie *Kielmeyera variabilis* Mart. em estudo anterior. 37
Figura 4: Núcleo xantônico básico numerado segundo a IUPAC. 38
Figura 5: Representantes para as diferentes classes de xantonas. 39
Figura 6: Incidência estimada de malária por 1000 habitantes em 2006. 41
Figura 7: Flavonóides e xantonas de origem natural com potencial antimalárico. 44
Figura 8: Foto ilustrativa da realização da medida da CIM. 61
Figura 9: Ilustração do teste para a obtenção da concentração mínima bactericida CMB 62
Figura 10: Porcentagem de inibição da complexação de β-hematina para os extratos etanólicos e frações de partição de *B. glaziovii* e *K.variabilis*, comparados ao controle positivo (cloroquina). 71
Figura 11: Cromatograma analítico da fração EAGK, via CLAE-UV-DAD no modo gradiente MeOH:H_2O, 5-100% MeOH em 50 min., solução 1 mg/mL, fluxo 1 mL/min, coluna Phenomenex C-18, 5µ, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, injeção de 20 µL. 72
Figura 12: Cromatograma isocrático de EAGK via CLAE-UV-DAD analítica [MeOH:H_2O (50:50) dopado com 0,1% HOAc, coluna Phenomenex C-18, 5µ, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, fluxo 1 mL/min. em 60 min.]. 73
Figura 13: Cromatograma isocrático de EAGK via CLAE preparativa [MeOH:H_2O (50:50) dopado com 0,1% HOAc, coluna Phenomenex C-18, 10 µm, 250 x 21,20 mm, λ = 254 nm, fluxo 1 mL/min em 80 min.]. 74
Figura 14: Cromatograma isocrático via CLAE preparativa, da subfração Fra 9 [(Coluna Phenomenex Fenil-hexil, 25,0 cm x 4,6; MeOH:H_2O (50:50) dopado com 0,1% HOAc; fluxo de 12 mL/min em 80 min.)]. 75

Figura 15: Xantonas isoladas da fração EAGK [3,6-diidroxi-1,4,8-trimetoxixantona (**1**), 3,5-diidroxi-4-metoxixantona (**2**), 3,4-diidroxi-6,8-dimetoxixantona (**3**), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (**4**), 5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona (**5**), 2,3-dimetoxi-4-hidroxixantona (**6**), kielcorina (**7**), 3-hidroxi-2-metoxixantona (**8**) e 2-hidroxi-1-metoxixantona (**9**)]. 77
Figura 16: Cromatograma preparativo da subfração EBFK-2 em CLAE-UV (**λ** = 254 nm) [Coluna C-18; MeOH:H_2O (48:52) dopada com 0,1% HOAc; 12 mL/min, em 30 min)]. 86
Figura 17: Flavonóides isolados de *K. variabilis* [(quercitrina (10), podocarpusflavona A (11), quercetina-3-*O*-glicosídeo (12) e quercetina-3-*O*-galactosídeo (13)]. 88
Figura 18: CCDA para a fração EHGK-1.8.1 em Hex/AcOEt 5%. 94
Figura 19: Avaliação da atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, para os extratos e frações de *B. glaziovii* e *K. variabilis*: 1 (EFB), 2 (EHFB), 3 (EAFB), 4 (EGB), 5 (EHGB), 6 (EAGB), 7 (EFK), 8 (EHFK), 9 (EAFK) e 10 (EGK), 11 (EHGK), 12 (EAGK), 13 (EBGK), 14 (EAqGK), 15 (nistatina-controle positivo). 101
Figura 20: Correlação C-H (-----) observada no mapa de contornos *g*HMBC utilizada na determinação da posição do hidrogênio H-8. 105
Figura 21: Espectro de massas de primeira ordem da substância 9, obtido em modo positivo (ESI). 105
Figura 22: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições dos hidrogênios H-1 e H-8 e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,76. 107
Figura 23: Espectro de massas de primeira ordem da substância 8, obtido em modo positivo (ESI). 107
Figura 24: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições dos hidrogênios H-1 e H-8 e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 7,13. 109
Figura 25: Espectros de massas de primeira ordem da substância 4, obtido em modo positivo (ESI). 109

Figura 26: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições H-1 e H-8 e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,89.110
Figura 27: Espectro de massas de primeira ordem da substância 6, obtido em modo positivo (ESI). 112
Figura 28: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação da posição do hidrogênio H-8 e correlações observadas no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,86 e 3,90..... 113
Figura 29: Espectro de massas de primeira ordem da substância 5 obtido em modo positivo (ESI). 114
Figura 30: Espectro de massas de primeira ordem da mistura contendo as substâncias 1, 2 e 3 obtido em modo positivo (ESI)..... 115
Figura 31: Correleção C-H (-----) observada no mapa de contornos *g*HMBC utilizada na determinação da posição do hidrogênio H-1 e correlações observadas no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 6,44 e 6,61..... 117
Figura 32: Espectro de massas de primeira ordem em alta resolução da substância 7, obtido em modo positivo (ESI). 120
Figura 33: Espectro de massas de primeira ordem em alta resolução para a substância 17 obtido no modo negativo (ESI). 123
Figura 34: Espectro de massas de primeira ordem da substância 10 obtido no modo negativo (ESI)..... 125
Figura 35: Principais correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC da substância 10..... 126
Figura 36: Espectro de massas de primeira ordem da substância 11 obtido no modo negativo (ESI)..... 128
Figura 37: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições H-3 e H-2' e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,74.129
Figura 38: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições da unidade glicosídica para a substância 12 e galactosídica para a substância 13. 132

Figura 39: Espectro de massas de primeira ordem da mistura contendo as substâncias 12 e 13 obtido no modo negativo (ESI). 133
Figura 40: Cromatograma da mistura HGK-2 contendo as substâncias **14** e **15**. 136
Figura 41: Espectro de massas do β-sitosterol obtido por CG-EM (IE, +70 eV). 136
Figura 42: Espectro de massas do estigmasterol obtido por CG-EM (IE, +70 eV)..... 136
Figura 43: Cromatograma da mistura HGK-3..... 137
Figura 44: Espectro de massas do ergost-5-en-3-ol obtido por CG-EM (IE, +70 eV)..... 138
Figura 45: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica das folhas de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 18,60 min); 18 = campesterol (TR = 20,95); 19 = α-amirina (TR = 24,32 min.) e 20 = acetato de β-amirina (TR = 27,53 min.)]. 139
Figura 46: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica das folhas de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 13,06); 18 = campesterol (TR = 16,19); 20 = acetato de β-amirina (TR = 25,22 min.) e 19 = *α*-amirina (TR = 26,22 min.)]. 140
Figura 47: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica dos galhos de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 18,53); 18 = campesterol (TR = 20,90 min.); 15 = estigmasterol (TR = 21,75 min.); 21 = α-amirinona (TR = 24,92 min.); 22 = lupenona (TR = 24,93 min.); 19 = α-amirina (TR = 25,56 min.); 20 = acetato de β-amirina (TR = 27,50 min.)]..... 140
Figura 48: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica dos galhos de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 13,05 min.); 18 = campesterol (TR = 16,15 min.); 15 = estigmasterol (TR = 17,13 min.); 20 = acetato de β-amirina (TR = 25,23 min.); 21 = α-amirinona (TR = 25,23 min.); 22 = lupenona (TR = 26,26 min.); 19 = α-amirina (TR = 26,26 min.)]..... 141
Figura 49: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica das folhas de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 18,60 min.); 14 = β-sitosterol (TR = 23,46 min.)]. 143

Figura 50: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica das folhas de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 13,10 min.); 14 = β-sitosterol (TR = 19,27 min.)]. 143
Figura 51: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 18,66 min.); 14 = β-sitosterol (TR = 23,48 min.); 23 = germanicona (TR = 23,48); 22 = lupenona (TR = 24,88 min.)]. 144
Figura 52: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 13,16 min.); 14 = β-sitosterol (TR = 19,30 min.); 23 = germanicona (TR = 21,70 min.) e 22 = lupenona (TR = 26,29 min.)]. 144
Figura 53: Estrutura dos esteróis β-sitosterol (14), estigmasterol (15) e campesterol (18) e dos triterpenos α-amirina (19), acetato de β-amirina (20), α-amirenona (21), lupenona (22) e germanicona (23) de *B. glaziovii* e *K. variabilis*. 146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimentos obtidos nos procedimentos de extração e partição líquido-líquido 68
Tabela 2: Frações obtidas na separação por CLAE preparativa da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK) 74
Tabela 3: Atividade antimalárica *in vitro* com *Plasmodium falciparum* para os extratos etanólicos das folhas e galhos de *B. glaziovii* e *K. variabilis* avaliada através dos métodos tradicional (microscopia) e de incorporação de hipoxantina tritiada 78
Tabela 4: Atividade antimalárica das frações de partição obtidas dos extratos etanólicos das folhas e galhos de *K. variabilis* com *Plasmodium falciparum*, valores de CI_{50}, utilizando o método de hipoxantina em experimentos distintos 78
Tabela 5: Atividade antimalárica com *Plasmodium falciparum*, média dos valores de CI_{50} e desvio padrão, das frações de partição das folhas e galhos de *K. variabilis*, pelo método de hipoxantina e citotoxicidade contra hepatócitos humanos HepG2 (valores de DL_{50}) e índice de seletividade (IS) 79
Tabela 6: Atividade antimalárica das xantonas obtidas da fração EAGK, no teste *in vitro* utilizando cepas de *Plasmodium falciparum*, pelo método de hipoxantina tritiada 80
Tabela 7: Atividade tripanocida dos extratos e frações de *K. variabilis* e *B. glaziovii* 81
Tabela 8: Atividade antichagásica das xantonas isoladas da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* em µg/mL 82
Tabela 9: Atividade antioxidante com os radicais livres DPPH e ABTS para os extratos etanólicos e frações de partição de *B. glaziovii* e *K. variabilis*..... 84
Tabela 10: Atividade antioxidante apresentada pelas substâncias isoladas das frações ativas de *K. variabilis* utilizando os radicais DPPH e ABTS; valores de CI_{50} expressos em µgmL..... 89
Tabela 11: Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos e frações de partição das folhas e galhos de *B.glaziovii* e *K.variabilis* 91

Tabela 12: Atividade antibacteriana das frações obtidas de EHGK para a cepa SA-1199B 92
Tabela 13: Subfrações obtidas da coluna em sílica gel de EHGK-1 93
Tabela 14: Frações obtidas do fracionamento de EHGK-1.8 por EFS 93
Tabela 15: CIMs da fração EHGK-1 e misturas purificadas desta fração HGK-1, HGK-2 e HGK-3 em µg/mL 96
Tabela 16: CIMs para as xantonas isoladas da fração EAGK CIM em µg/mL. 97
Tabela 17: Atividade antifúngica dos extratos e frações de partição de *B. glaziovii* e *K. variabilis* 100
Tabela 18: Fatores de retenção para as substâncias ativas no teste de atividade antifúngica utilizando *C. sphaerospermum* 102
Tabela 19: Fatores de retenção para as substâncias ativas no teste de atividade antifúngica utilizando *C. cladosporioides* 103
Tabela 20: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC das substâncias 8 e 9 (DMSO-*d*6) 106
Tabela 21: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC das substâncias 4 e 6 (DMSO-*d*6) 111
Tabela 22: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância 5 (DMSO-*d*6) 114
Tabela 23: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC das substâncias 2 e 3 (DMSO-*d*6) 118
Tabela 24: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância 7 (DMSO-*d*6) 121
Tabela 25: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância 17 (MeOD-*d*5) 123
Tabela 26: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância 10 (DMSO-*d*6) 126

Tabela 27: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância 11 (DMSO-*d*6) 130
Tabela 28: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da mistura contendo as substâncias 12 e 13 (DMSO-*d*6) 134
Tabela 29: Triterpenos e esteróis identificados nas frações hexânicas das folhas e galhos de *B. glaziovii* por análises de CG-DIC (Colunas SPB-5 e SPB-50) 142
Tabela 30: Triterpenos e esteróis identificados nas folhas e galhos de *K. variabilis* por análises de CG-DIC (Colunas SPB-5 e SPB-50) 145

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Preparo dos extratos e frações. 67
Fluxograma 2: Fluxograma do isolamento das substâncias da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK). 76
Fluxograma 3: Estudo químico da fração acetato de etila das folhas de *K. variabilis* (EAFK), isolamento das substâncias 10 e 11. 85
Fluxograma 4: Estudo químico da fração AcOEt das folhas de *K. variabilis* (EAFK), reisolamento da substância 10 e isolamento das substâncias 12 e 13. 87
Fluxograma 5: Estudo químico da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* (EHGK), isolamento de HGK-1, HGK-2, HGK-3 e HGK-4. 95

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da substância **9** 162
Anexo 2: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **9**..... 162
Anexo 3: Espectro de DEPT 135º da substância **9** 163
Anexo 4: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **9** 163
Anexo 5: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **9**164
Anexo 6: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **9**..... 164
Anexo 7: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **9**165
Anexo 8: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **9** 165
Anexo 9: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **9** 166
Anexo 10: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,81 da substância **9** 166
Anexo 11: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da sustância **8** 167
Anexo 12: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8**..... 167
Anexo 13: Espectro de DEPT 135º da substância **8** 168
Anexo 14: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **8** 168
Anexo 15: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **8** 169
Anexo 16: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **8**..... 169
Anexo 17: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **8** 170
Anexo 18: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **8** 170
Anexo 19: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **8**171
Anexo 20: Espectro de NOESY 1D (500 MHz – DMSO-d_6), ... 171
Anexo 21: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da substância **4** 172
Anexo 22: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4**..... 172
Anexo 23: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **4** 173
Anexo 24: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **4** 173
Anexo 25: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **4**..... 174
Anexo 26: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **4** 174
Anexo 27: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **4** 175

Anexo 28: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **4**175
Anexo 29: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 7,13 da substância **4** 176
Anexo 30: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da substância **6** 176
Anexo 31: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **6**..... 177
Anexo 32: Espectro de DEPT 135º da substância **6** 177
Anexo 33: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **6** 178
Anexo 34: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **6**..... 178
Anexo 35: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **6** 179
Anexo 36: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **6** 179
Anexo 37: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **6**180
Anexo 38: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em $\boldsymbol{\delta}_H$ 7,13 da substância **6** 180
Anexo 39: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **5** 181
Anexo 40: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **5**..... 181
Anexo 41: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **5**..... 182
Anexo 42: Espectro de DEPT 135º da substância **5** 182
Anexo 43: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **5** 183
Anexo 44: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **5** 183
Anexo 45: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **5**..... 184
Anexo 46: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **5** 184
Anexo 47: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **5** 185
Anexo 48: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **5**185
Anexo 49: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,86 da substância **5** 186
Anexo 50: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,90 da substância **5** 186
Anexo 51: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 187

Anexo 52: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 187
Anexo 53: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 188
Anexo 54: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 188
Anexo 55: Espectro de DEPT 135º da mistura contendo as substância **1**, **2** e **3** 189
Anexo 56: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 189
Anexo 57: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3**. 190
Anexo 58: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3**. 190
Anexo 59: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 191
Anexo 60: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3**. 191
Anexo 61: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 192
Anexo 62: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3**. 192
Anexo 63: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 6,61 da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3**. 193
Anexo 64: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 6,44 da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** 193
Anexo 65: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** 194
Anexo 66: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** 194
Anexo 67: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** 195
Anexo 68: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** 195
Anexo 69: Espectro de DEPT 135º da substância **7** 196
Anexo 70: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **7** 196
Anexo 71: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **7** 197

Anexo 72: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **7** 197
Anexo 73: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **7**..... 198
Anexo 74: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **7** 198
Anexo 75: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **7** 199
Anexo 76: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **7**199
Anexo 77: Espectro de NOESY 1D da substância **7**..... 200
Anexo 78: Espectro de NOESY 1D da substância **7**..... 200
Anexo 79: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **17** 201
Anexo 80: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **17**..... 201
Anexo 81: Mapa de contornos *g*HMQC da substância **17**..... 202
Anexo 82: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **17** 202
Anexo 83: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **17** 203
Anexo 84: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **10** 203
Anexo 85: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **10**..... 204
Anexo 86: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **10**..... 204
Anexo 87: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **10**..... 205
Anexo 88: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** 205
Anexo 89: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** 206
Anexo 90: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** 206
Anexo 91: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** 207
Anexo 92: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **10**..... 207
Anexo 93: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **10** 208
Anexo 94: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **10** 208
Anexo 95: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **11** 209
Anexo 96: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **11**..... 209

Anexo 97: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **11** 210
Anexo 98: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **11** 210
Anexo 99: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **11** 211
Anexo 100: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **11** 211
Anexo 101: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **11** 212
Anexo 102: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **11** 212
Anexo 103: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **11** 213
Anexo 104: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,74 da substância **11** 213
Anexo 105: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substância **12** e **13** 214
Anexo 106: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **12** e **13**. 214
Anexo 107: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **12** e **13**. 215
Anexo 108: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 215
Anexo 109: Espectro de DEPT 135º da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 216
Anexo 110: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 216
Anexo 111: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 217
Anexo 112: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 217
Anexo 113: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 218
Anexo 114: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 218
Anexo 115: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **12** e **13**. 219

Anexo 116: Espectro TOCSY 1D da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 219
Anexo 117: Espectro TOCSY 1D da mistura contendo as substâncias **12** e **13** 220
Anexo 118: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substância **14** e **15** 220
Anexo 119: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substância **14**, **15** e **16** 221

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ comprimento de onda

δ_H deslocamento químico de hidrogênio

δ_C deslocamento químico de carbono

Δtr variação do tempo de retenção entre dois picos em um cromatograma

ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)]

AcOEt acetato de etila

n-BuOH *n*-butanol

CC cromatografia em coluna

CCDA cromatografia em camada delgada analítica

CCDP cromatografia em camada delgada preparativa

$CDCl_3$ clorofórmio deuterado

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

CI_{50} concentração inibitória mímina para inibição de 50%

Cfu *colony-forming unit*

CG cromatografia gasosa

CGAR cromatografia gasosa de alta eficiência

CPG cromatografia de permeação em gel

COM contagem por minuto

CQ cloroquina

d dubleto

dd duplo dubleto

DAD detector com arranjo de diodos

DEPT *Distotionless Enhancement by Polarisation Transfer*

DIC detector de ionização em chama

DMSO-d_6 dimetilsulfóxido deuterado

DNA ácido desoxirribonucleico

DPPH radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

DNA ácido desoxiribonucléico

EFB extrato etanólico das folhas de *Brosimum glaziovii*

EHFB fração hexânica das folhas de *Brosimum glaziovii*

EAFB fração acetato de etila das folhas de *Brosimum glaziovii*

EBFB fração *n*-butanólica das folhas de *Brosimum glaziovii*

EAqFB fração aquosa das folhas de *Brosimum glaziovii*

EGB extrato etanólico dos galhos de *Brosimum glaziovii*

EHGB fração hexânica dos galhos de *Brosimum glaziovii*

EAGB fração acetato de etila dos galhos de *Brosimum glaziovii*

EBGB fração *n*-butanólica dos galhos de *Brosimum glaziovii*

EAqGB fração aquosa dos galhos de *Brosimum glaziovii*

EFK extrato etanólico das folhas de *Kielmeyera variabilis*

EHFK fração hexânica das folhas de *Kielmeyera variabilis*

EAFK fração acetato de etila das folhas de *Kielmeyera variabilis*

EBFK fração *n*-butanólica das folhas de *Kielmeyera variabilis*

EAqFK fração aquosa das folhas de *Kielmeyera variabilis*

EGK extrato etanólico dos galhos de *Kielmeyera variabilis*

EHGK fração hexânica dos galhos de *Kielmeyera variabilis*

EAGK fração acetato de etila dos galhos de *Kielmeyera variabilis*

EBGK fração *n*-butanólica dos galhos de *Kielmeyera variabilis*

EAqGK fração aquosa dos galhos de *Kielmeyera variabilis*

EM espectrometria de massas

EM2 espectrometria de massas de segunda ordem

ESI *eletrospray*

*g*COSY *gradient Correlated Spectroscopy*

*g*HMBC *gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

*g*HMQC *gradient Hetonuclear Multiple Quantum Coherence*

HCl ácido clorídrico

H_2O água

HOAc ácido acético

[^{3}H]-hipoxantina hipoxantina tritiada

J constante de acoplamento

k' fator de retenção

LIT *Liver Infusion Tryptose*

IE impacto eletrônico

m multipleto

m/z relação massa carga

MeOH metanol

MeOD metanol deuterado

MHB Mueller- Hinton broth

MRSA *Multidrug-resistant Staphylococcus aureus*

MTT 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio

n-BuOH *n*-butanol

NaCl cloreto de sódio

NaOH hidróxido de sódio

NOESY *Nuclear overhauser effect spectroscopy*

NuBBE Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

PMS phenazine methosulfate

RLO radicais livres de oxigênio

RMN de ^{1}H ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C ressonância magnética nuclear de carbono

s singleto

SDS dodecil sulfato de sódio

SPB-5 coluna capilar (5% fenil-metil-siloxano)

SPB-50 coluna capilar (50% fenil-metil-siloxano)

RMN de ^{1}H ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de ^{13}C ressonância magnética nuclear de carbono

RNA ácido ribonucléico

r.p.m rotações por minuto

RR retenção relativa

OMS organização mundial da saúde

tg tempo do gradiente

tm tempo morto

t_r tempo de retenção

TMS tetrametilsilano

UV ultravioleta

SUMÁRIO

1. Introdução 33
Considerações sobre os táxons estudados 33
A família Moraceae 33
O gênero *Brosimum* 33
A espécie *Brosimum glaziovii* 34
A família Clusiaceae 34
O gênero *Kielmeyera* 35
A espécie *Kielmeyera variabilis* Mart. 36
Xantonas 37
A importância farmacológica das xantonas 39
Atividade antimalárica 40
Atividade antioxidante 46
Atividade antimicrobiana 47
2. Objetivos 49
3. Materiais e métodos 50
3.1 Instrumentos e materiais utilizados 50
3.2 Métodos 52
3.2.1 Métodos utilizados na determinação da atividade antimalárica 52
3.2.1.1 Ensaio *in vitro* da polimerização de heme 52
3.2.1.2 Testes esquizonticidas *in vitro* com *Plasmodium falciparum* utilizando o método de incorporação de hipoxantina tritiada 53
3.2.1.3 Teste de citotoxicidade 54
3.2.1.4 Cálculo do índice de seletividade (IS) 55
3.2.2 Métodos utilizados na determinação da atividade tripanocida 55
3.2.2.1 Determinação da atividade tripanocida: Teste do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) 55
3.2.3 Métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante 57
3.2.3.1 Ensaio espectrofotométrico com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) 57
3.2.3.2 Ensaio com o radical ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] 58
3.2.4 Métodos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana ... 59
3.2.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana 59
3.2.4.2 Preparo do meio de cultura 59
3.2.4.3 Preparo do meio Mueller-Hinton broth 59
3.2.4.4 Cepas bacterianas 59
3.2.4.5 Preparo das subculturas bacterianas 60
3.2.4.6 Preparo das soluções contendo as cepas bacterianas 60
3.2.4.7 Preparo da solução estoque das amostras 60
3.2.4.8 Ensaio para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) ... 60
3.2.4.9 Ensaio para obtenção da concentração mínima bactericida (CMB) 61
3.2.5 Métodos utilizados na determinação da atividade antifúngica com patógenos humanos: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* 62
3.2.5.1 Microrganismos e condições de cultivo 62
3.2.5.2 Metodologia do teste antifúngico 63

3.2.6 Métodos utilizados na determinação da atividade antifúngica com fungos fitopatógenos 64
3.2.7 Métodos utilizados nos estudo de desreplicação 64
3.2.7.1 Preparo das amostras para análise em CG-DIC 64
3.2.7.2 Condições para cromatografia gasosa 65
3.2.7.3 Obtenção dos padrões de triterpenos e esteróis 65
3.2.8 Condições para cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas 65
3.2.9 Coleta e identificação do material botânico 66
4. Resultados e discussão 67
4.1 Extração e isolamento 67
4.1.1 Preparo dos extratos e frações 67
4.2 Isolamento dos metabólitos secundários 68
4.2.1 Triagem da atividade antimalárica 69
4.2.1.1 Estudo químico da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK) 71
4.2.1.2 Fracionamento de Fra 9 75
4.2.2 Avaliação da atividade tripanocida 80
4.2.3 Atividade antioxidante 82
4.2.3.1 Triagem antioxidante para os extratos etanólicos e frações de partição das espécies *B. glaziovii* e *K. variabilis* 82
4.2.3.2 Estudo químico da fração AcOEt das folhas de *K. variabilis* (EAFK) 84
4.2.3.3 Estudo químico da fração *n*-BuOH das folhas de *K. variabilis* (EBFK) 85
4.2.3.4 Avaliação antioxidante das substâncias isoladas das frações AcOEt (EAFK) e *n*-BuOH (EBFK) dos galhos de *K. variabilis* 87
4.2.4 Atividade antibacteriana 90
4.2.4.1 Triagem antibacteriana para os extratos etanólicos e frações de partição das espécies *B. glaziovii* e *K. variabilis* e isolamento bioguiado . 90
4.2.4.2 Estudo químico bioguiado da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* (EHGK) 91
4.2.4.3 Atividade antibacteriana das xantonas isoladas de *K. variabilis* ... 97
4.2.4.4 Avaliação da concentração mínima bactericida 98
4.2.5 Atividade antifúngica 98
4.2.5.1 Avaliação da atividade antifúngica (patógenos humanos): *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* 98
4.2.5.2 Avaliação da atividade com os fungos *Cladosporium cladosporioides e C. sphaerospermum* 100
4.3 Determinações estruturais 103
4.3.1 Xantonas 103
4.3.1.1 Identificação das substâncias 8 e 9 104
4.3.1.2 Identificação das substâncias 4 e 6 108
4.3.1.3 Identificação da substância 5 112
4.3.1.4 Identificação da mistura contendo as substâncias 1, 2 e 3 115
4.3.1.5 Identificação da substância 7 119
4.3.1.6 Identificação da substância 17 122
4.3.2 Flavonóides 124
4.3.2.1 Identificação da substância 10 124

4.3.2.2 Identificação da substância 11 127
4.3.2.3 Identificação da mistura contendo as substâncias 12 e 13 131
4.3.3 Esteróides 134
4.3.3.1 Identificação da mistura contendo as substâncias 14 e 15 135
4.3.3.2 Identificação da mistura contendo as substâncias 14, 15 e 16 ... 137
4.4 Estudo das frações apolares por cromatografia gasosa 138
4.4.1 Identificação dos triterpenos e esteróis das espécies *B. glaziovii* e *K. variabilis* utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-DIC) 138
5. Considerações finais 147

1. Introdução

Considerações sobre os táxons estudados

A família Moraceae

A família Moraceae compreende aproximadamente 75 gêneros e 1550 espécies de distribuição ampla nas regiões tropicais. No Brasil cerca de 30 gêneros e 340 espécies ocorrem em toda a costa Atlântica, representados por árvores, arbustos ou ervas geralmente lactescentes, monóicos ou dióicos. Ocorre um grande dimorfismo entre as folhas, distinguindo indivíduos jovens e adultos.[1]

O gênero *Brosimum*

O gênero *Brosimum* (Moraceae) compreende aproximadamente 13 espécies que ocorrem na América Tropical.[2] Dentre estas espécies apenas duas delas vem sendo mais estudadas do ponto de vista fitoquímico, sendo elas: *Brosimum gaudichaudii,*[3,4] e *B. acutifolium.*[2,5,6,7,8]

Revisão bibliográfica sobre o perfil químico das espécies de *Brosimum* revelou principalmente a ocorrência de flavonóides, lignanas, flavonolignanas, isoflavonas, cumarinas preniladas, furanocumarinas e chalconas.[3,4,7,8,9,10]

O gênero *Brosimum* é tradicionalmente empregado na fotoquimioterapia da psoríase, e algumas de suas espécies são utilizadas na medicina popular amazônica como anti-inflamatória e antirreumática.[11]

A espécie *Brosimum glaziovii*

A espécie *Brosimum glaziovii* (Figura 1) pertencente à família Moraceae é uma espécie endêmica do Brasil e uma revisão bibliográfica sobre registros fitoquímicos demonstrou a inexistência de estudos químicos sobre esta espécie.



Figura 1: À esquerda foto de um espécimen de *Brosimum glaziovii* do herbário do Instituto de Botânica, São Paulo-SP, Brasil. À direita foto de um espécimem de *B. glaziovii* publicada por SOUZA.[1]

A família Clusiaceae

A biodiversidade da flora brasileira vem despertando muito interesse devido ao grande número de táxons ainda pouco estudados sob os aspectos químicos e biológicos. Muitas destas famílias de plantas vêm sendo alvo de pesquisas científicas devido ao interesse farmacológico, visando à busca por novos constituintes protótipos de fármacos. Uma das famílias bastante estudadas na flora brasileira é a família Clusiaceae, com cerca de 50 gêneros e 1200 espécies de ocorrência exclusiva nas regiões tropicais. A maioria dos representantes desta família são árvores, arbustos ou ervas, sendo raramente epífitas.[12]

Alguns gêneros e espécies são endêmicos de certas áreas, como por exemplo, o gênero *Symphonia* L. e *Pentadesma sabine* os quais são encontrados unicamente na África.[13] No Brasil ocorrem 21 gêneros e 131 espécies distribuídos por todo território nacional, principalmente nas regiões Amazônica, Cerrado e Mata Atlântica.[14] Os gêneros pertencem a três subfamílias, tendo inúmeras aplicações na medicina popular, destaque para *Hypericum* e *Vismia* (Hypericoidae), *Clusia*, *Calophyllum* e *Garcinia* (Calophylloidae) e *Kielmeyera* (Bonnetioideae).[12]

Por intermédio de estudos anteriores observa-se que as xantonas são as substâncias mais comumente encontradas em plantas superiores pertencentes à família Clusiaceae, sendo que além das xantonas encontram-se também antraquinonas, flavonóides, benzofenonas e terpenos. Muitos destes metabólitos têm chamado a atenção por exibirem importantes atividades biológicas e químicas.[15]

As xantonas acumuladas neste grupo taxonômico podem ser mono-, di-, tri-, tetra- e pentaoxigenadas e, ainda, alquiladas, glicosiladas e xantolignóides. As xantonas naturais são de ocorrência restrita, sendo encontradas principalmente em três famílias de plantas - Clusiaceae, Gentianaceae e Hipericaceae.

As xantonas oxigenadas vêm merecendo atenção especial, por parte de pesquisadores de diversas áreas científicas, devido ao grande potencial biológico por elas apresentado.[16,17] Dentre os gêneros constituintes da família Clusiaceae três deles - *Haploclathra*, *Vismia* e *Kielmeyera* - merecem atenção como excelentes fontes de xantonas oxigenadas.

O gênero *Kielmeyera*

As plantas do gênero *Kielmeyera* são encontradas restritamente na América do Sul sendo que das 47 espécies de plantas conhecidas, 45 são nativas dos ecossistemas brasileiros. Estas se encontram localizadas principalmente no Cerrado brasileiro, mais especificamente na região Centro-Oeste onde as espécies do gênero *Kielmeyera* são mais frequentemente encontradas.[18]

Há vários registros destas espécies na literatura sobre seus usos na medicina popular. Os mais tradicionais estão relacionados ao tratamento de esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções bacterianas e fúngicas.[19]

Estudos fitoquímicos realizados com espécies do gênero indicam a presença de terpenóides e derivados bifenilícos,[20] cumarinas,[21] além de xantonas, que são os constituintes majoritários entre as plantas deste gênero.[22]

O perfil químico de algumas espécies do gênero *Kielmeyera* já estudadas, tais como, *K. coriaceae* Mart., *K. corymbosa* (Sp.) Mart., *K. excelsa* Camb., *K. ferruginosa*, *K. petiolaris* (Spr.) Mart., *K. speciosa* St. Hill, *K. rubriflora* Camb. e *K. variabilis* Mart. confirmam as xantonas como marcadores quimiotaxonômicos deste gênero.[23]

A espécie *Kielmeyera variabilis* Mart.

A espécie vegetal *Kielmeyera variabilis* Mart. (Figura 2), popularmente conhecida por malva-do-campo (sinonímia: pau-santo) encontra-se distribuída em território brasileiro nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás e Piauí.[24]



Figura 2: Foto de um espécimem de *Kielmeyera variabilis* (Fonte: http://timblindim.wordpress.com/arvores/pau-santo-1/).

Em estudo anterior foram isoladas dos galhos de *K. variabilis* Mart. três xantonas: assiguxantona-B, 1,3,5,6-tetra-hidroxi-2-prenilxantona e kielcorina além do ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (Figura 3).[25,26]

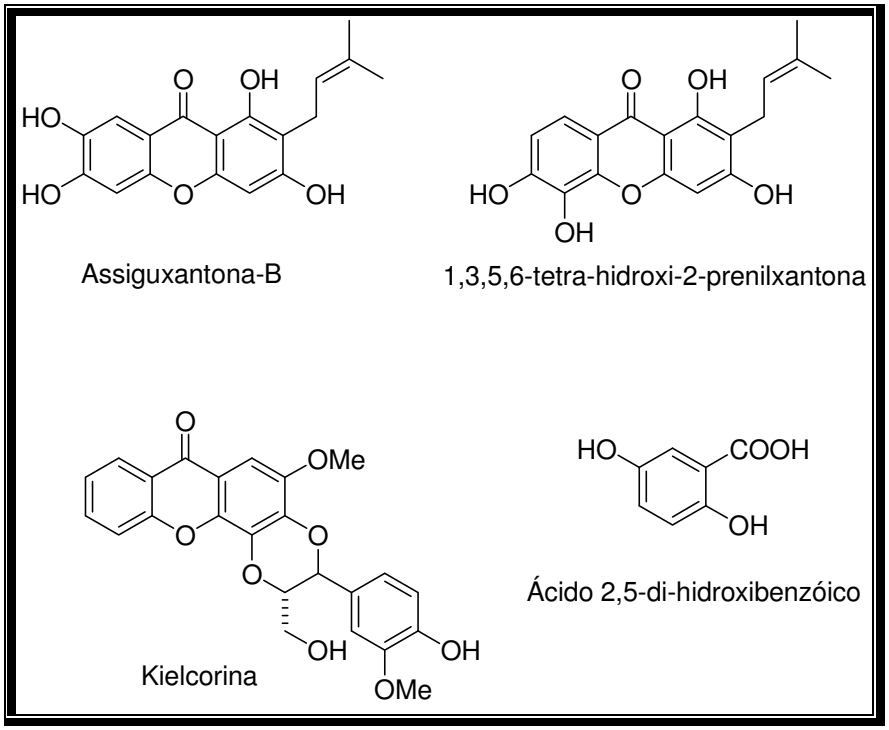


Figura 3: Substâncias isoladas da espécie *Kielmeyera variabilis* Mart. em estudo anterior.

Xantonas

Durante as últimas décadas um grande número de xantonas foi isolado de plantas superiores, bem como de fungos e líquens. Sua importância quimiotaxonômica em algumas famílias e suas propriedades farmacológicas têm despertado interesse de químicos, biólogos e farmacólogos.[27]

A palavra xantona é derivada do grego e significa amarelo, cor apresentada pela grande maioria destes constituintes químicos.[28] A xantona, também conhecida como 9H-xanten-9-ona, é estruturalmente formada por dois anéis benzênicos (A e B) e uma γ-pirona central (C), conferindo um arranjo simétrico a este tipo de composto (Figura 4).

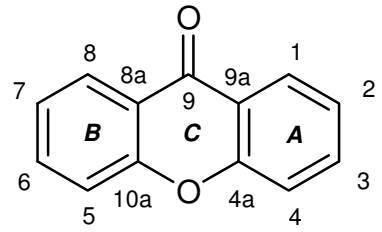


Figura 4: Núcleo xantônico básico numerado segundo a IUPAC.

Estas substâncias, de fórmula molecular $C_{13}H_8O_2$ possuem a mesma estrutura central com 6 átomos de carbonos conjugados com múltiplas ligações duplas, as quais as tornam mais estáveis. Devido ao fato da numeração do núcleo xantônico nem sempre ser tratada de maneira uniforme, a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) publicou uma recomendação, em 2004, para estabelecer uma numeração padrão (Figura 4), onde aos anéis benzênicos são atribuídas as denominações de A e B e para o anel γ-pirona a denominação C. Todas as posições de 1-4 e de 5-8 podem estar substituídas, resultando em uma variedade de derivados xantônicos que podem ser obtidos por meios naturais[28,29] ou por rotas sintéticas.[30]

Os compostos xantônicos de origem natural são classificados e subdivididos de acordo com a natureza de seus substituintes. Pela classificação as xantonas são divididas em seis grandes grupos: xantonas simples, xantonas glicosiladas, xantonas preniladas, xantonolignóides, bis-xantonas e xantonas miscelânias (Figura 5).[29]

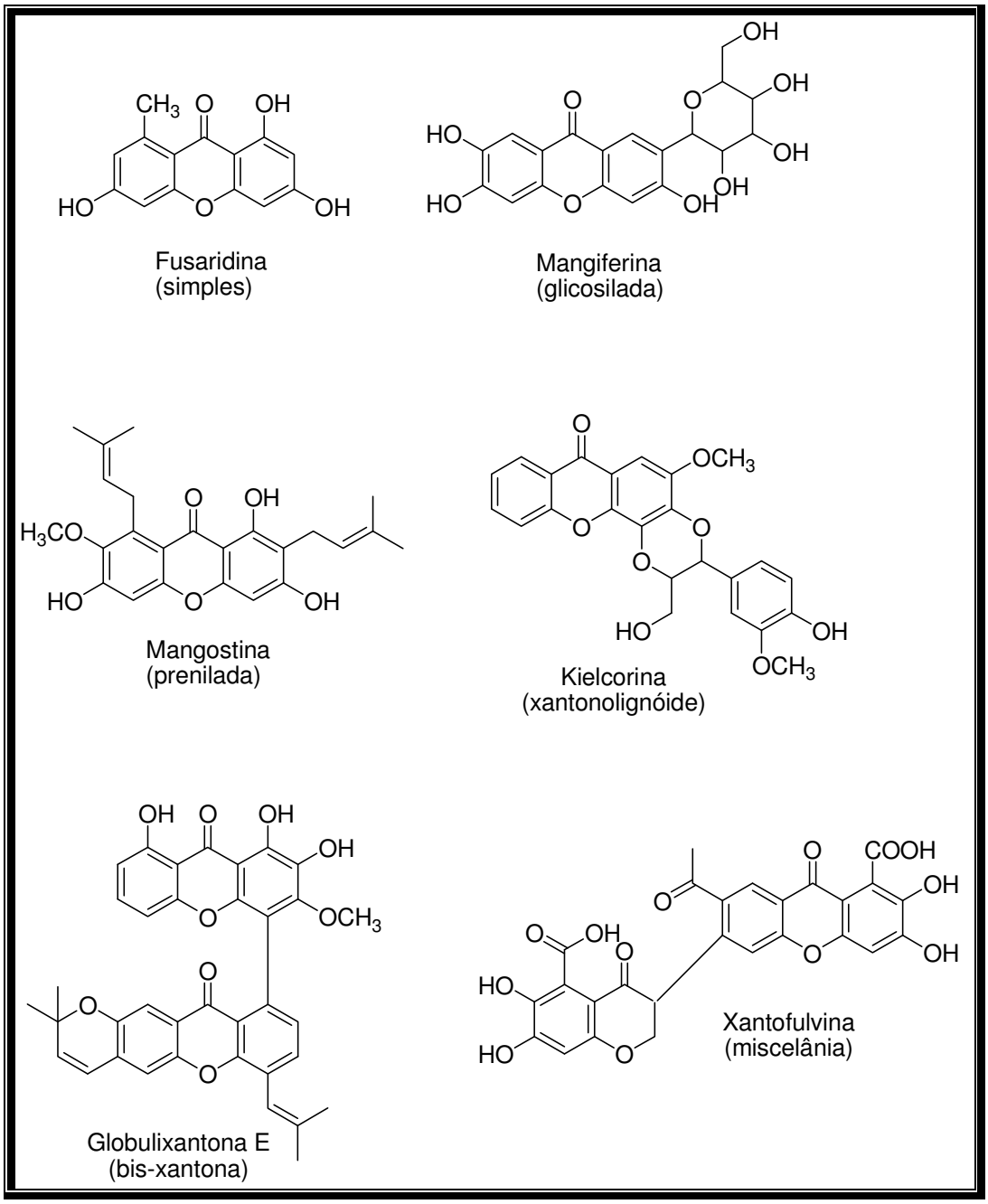


Figura 5: Representantes para as diferentes classes de xantonas.

A importância farmacológica das xantonas

As xantonas exibem propriedades farmacológicas muito bem documentadas, atribuídas principalmente a seus heterocíclos oxigenenados e à diversidade dos isósteros e grupos farmacofóricos que podem ser formados a partir de xantonas naturais.[31]

Para esta classe de metabólitos são atribuídas diversas propriedades farmacológicas, tais como: sequestradora de radicais livres; antibacteriana para cepas de bactérias multi-resistentes, como, por exemplo, atividade em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, demonstrada pelas xantonas tri-oxigenadas isoladas de *Garcinia nigrolineata* Planch. (Clusiaceae)[32,33] e pelas xantonas provenientes do extrato etanólico das raízes de *Hypericum sampsonii*. Já foram relatadas também atividade nas cepas de *Enterococci* resistentes à vancomicina,[34] *mycobacterium tuberculosis*[35] entre outras.

Esta classe apresenta também atividade citotóxica, como exemplo pode-se citar a atividade de α-mangostina isolada dos frutos de *Garcinia mangostana* [36] e antitumoral, tal como demonstrado pelas xantonas isoladas de *Garcinia fusca.*[37]

Existem ainda relatos de atividade anti-inflamatória,[38] hepatoprotetora como as xantonas de *Cudrania tricuspidata* (Moraceae),[39] protetora cardiovascular,[40] inibição seletiva da ciclooxigenase-2[41] como exemplo destaca-se as xantonas 2,6-diidroxi-1,7-dimetoxixantona e 3,4-diidroxixantona de *Calophyllum membranaceum* (Clusiaceae) além da atividade inibidora do fator de agregação plaquetária (PAF), representada pelas bis-xantonas de *Hypericum japonicum.* [42,43] Além destas atividades destaca-se também para a atividade antimalárica, um dos focos deste trabalho, demonstrada por representantes da classe das xantonas, como por exemplo, pelas xantonas covaxantona e mangostina isoladas das espécies *Calophyllum caledonicum* e *Garcinia mangostana* (Clusiaceae).[44]

Atividade antimalárica

A malária continua sendo um dos mais sérios problemas de saúde e a maior causa de mortalidade e morbidez nas regiões endêmicas. Existem aproximadamente 243 milhões de casos levando a aproximadamente 863.000 mortes, sendo que metade da população mundial esteve em risco de contaminação durante o ano de 2008. No momento 109 países e territórios apresentam casos da doença, dos quais 45 estão dentro da região Africana segundo dados da Organização de Mundial de Saúde.[45]

Embora a malária seja uma doença curável e que pode ser prevenida, ela aumentou nas décadas de 80 e 90 com o desenvolvimento da resistência do parasita ao fármaco mais frequentemente utilizado (cloroquina), assim como, pela resistência do vetor a inseticidas. Durante a década de 90 a doença re-emergiu em alguns países na Ásia Central, Leste Europeu e no sudeste da Ásia. A maioria dos casos registrados em 2006 ocorreu na África (86%), seguida pelo Sudeste da Ásia (9%) e Mediterrâneo Oriental (3%) (Figura 6).



Figura 6: Incidência estimada de malária por 1000 habitantes em 2006.[45]

O Brasil está entre os 30 países com maior incidência de malária, sendo o país que apresentou o maior número de casos (549.184 em 2007) nas Américas. Esta estimativa representa metade do número de casos da região das Américas pela OMS. Mais de 350.000 casos foram reportados no Brasil no período de 2001-2007 com um máximo de 603.532 ocorrendo em 2005. A transmissão ocorre principalmente na Região da Amazônia Legal, onde 10-15% da população vive numa área de alto risco. Em 2007, 19% destes casos foram causados por *Plasmodium falciparum*.[45]

O tratamento antimalárico é geralmente realizado por fármacos pertencentes à classe dos: aminoquinolinos (cloroquina, amodiaquina, primaquina), derivados de quimolinometanol (quinina, mefloquina, halofantrina), diaminopirimidinas (pirimetamina), sulfonamidas (sulfadoxina, sulfadiazina),

biguanidas (proguanil, clindamicina), sesquiterpenos (artemisinina, arteméter, arteéter, artesunato) e naftoquinonas (atavaquone).[46]

A descoberta de fármacos antimaláricos teve início com a quinina, isolada em 1820 pelos cientistas franceses Pelletier e Caventou das cascas da *Cinchona ssp.* (Rubiaceae), a qual era utilizada por índios Peruanos. A quinina foi o primeiro fármaco utilizado para o tratamento da malária. Só em 1944 sua síntese foi realizada por Woodward e Doering, entretanto esta era de alto custo e complexa. A quinina ainda hoje utilizada é extraída de *Cinchona spp.*, encontrada na América do sul e cultivada em Java.[47]

Em 1940 a quinina serviu como modelo para a síntese da cloroquina (CQ). Apesar do predomínio pelas cepas de *P. falciparum* resitentes à CQ, esta foi, até recentemente, o único fármaco viável para a quimioterapia da malária. Ao longo dos últimos 30 anos, a situação piorou, com o aumento das cepas de *P. falciparum* resistentes à CQ, sendo este o maior fator responsável pelo aumento da mortalidade ocorrida principalmente na África.[48]

Apesar dos esforços na obtenção de novos fármacos antimaláricos sintéticos, a contribuição mais efetiva recentemente, foi obtida pela pesquisa com plantas medicinais. Em 1972, a artemisinina foi isolada da espécie *Artemisia annua*, espécie utilizada durante milênios pela medicina chinesa. A artemisinina apresenta uma nova estrutura farmacofórica compreendendo uma lactona sesquiterpênica que possui uma ligação endoperóxido. Esta substância contribuiu para a obtenção de seus derivados semi-sintéticos arteéter, arteméter e artesunato de sódio, os quais estão sendo cada vez mais utilizados.[49] Apesar da eficácia destas substâncias contra *P. falciparum* resistentes à CQ, para se evitar os risco de reincidência e resistência, recomenda-se a utilização destas substâncias em combinação com um segundo fármaco antimalárico.[48]

Um dos antimaláricos utilizados é atavaquone (Malarone®), uma naftoquinona que apesar de sintética é um análogo de um produto natural, o lapachol, isolado de espécies de *Tabebuia* (Bignoniaceae). Atavaquone, quando em combinação com proguanil (Malarone®)[50] é eficiente no tratamento da malária, entretanto o alto custo deste fármaco opõe-se ao uso em grande escala em muitos países endêmicos.[51]

Os alcalóides são uma das mais importantes classes de produtos naturais fornecedoras de fármacos desde os tempos ancestrais, estes têm sido sucessivamente utilizados no tratamento de infecções parasitárias, um exemplo disto é a quinina. Porém com o desenvolvimento de resistência pelo parasita *Plasmodium falciparum* o fármaco cloroquina, assim como os novos com estruturas únicas e diferentes mecanismos de ação se fazem urgentemente necessários.[44] Com isto, o número de substâncias pertencentes a outras classes de metabólitos vêm sendo cada vez mais exploradas.

Recentemente três artigos de revisão focando a atividade antiplasmodial e antimalárica de substâncias naturais e extratos, foram publicados. No trabalho publicado por OLIVEIRA e col. em 2009 foi descrita a importância dos produtos naturais na descoberta de novos agente antimaláricos, destacando-se a atividade dos alcalóides,[52] sendo que como complemento deste trabalho, também em 2009 foi publicado por BATISTA e col. uma revisão destacando-se os novos agentes antimaláricos de origem não alcaloidal sendo estas substâncias pertencentes às classes dos terpenos, limonóides, flavonóides, cromonas, xantonas, antraquinonas e miscelâneas.[53]

O terceiro artigo de revisão publicado em 2009 por KAUR e col. foca a importância da descoberta de novas substâncias de origem natural, relatando as substâncias ativas pertencentes às diferentes classes de metabólitos secundários.[44] Estes três trabalhos demonstram como vêm crescendo os esforços na tentativa de se descobrir novas substâncias que possam vir a ser utilizadas como antimaláricos ou como modelos nesta descoberta.

Salienta-se para a atividade das substâncias da classe dos flavonóides e xantonas (Figura 7) as quais são o foco deste trabalho e que demonstram ser promissoras nas pesquisas em busca de novos modelos antimaláricos.

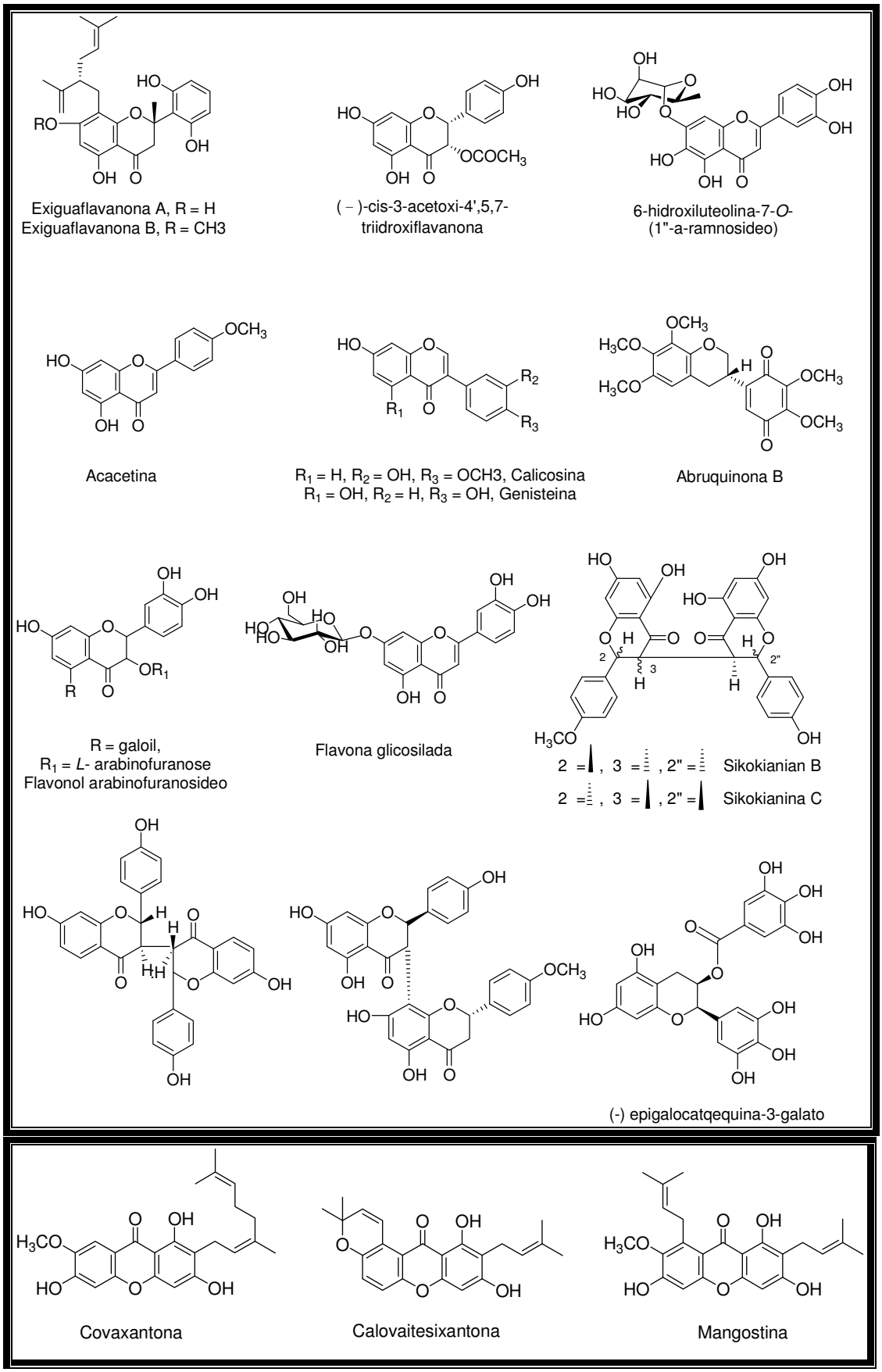


Figura 7: Flavonóides e xantonas de origem natural com potencial antimalárico.[44]

É consensual entre a comunidade científica que os produtos naturais tem um papel dominante na descoberta de novos fármacos empregados no tratamento de doenças humanas.[53] A maior parte dos agentes quimioterapêuticos antimaláricos são baseados em produtos naturais e este fato antecipa que novos líderes para o tratamento desta doença podem certamente emergir de plantas tropicais, sendo que a quimiodiversidade biológica continua sendo uma importante fonte de modelos moleculares na pesquisa com fármacos antimaláricos.[54,55,56]

Com base neste contexto, faz-se necessária a busca por novos agentes antimaláricos de fontes naturais. Muitas espécies são utilizadas na medicina tradicional nos países endêmicos, porém o número daquelas que já tiveram seu potencial antimalárico testado cientificamente é ainda muito pequeno, sendo menor ainda o número de espécies, das quais já foram isoladas substâncias ativas e que tiveram sua toxicidade determinada. Esta área de pesquisa é de suma importância e deve abranger ensaios *in vitro* e *in vivo*, bem como o isolamento biomonitorado de substâncias ativas. Os produtos finais destes estudos serão substâncias naturais antimaláricas, potenciais fármacos ou protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou extratos padronizados com atividade antimalárica, os quais são necessários para estudos pré-clínicos e clínicos, quando o objetivo é o desenvolvimento de fitoterápicos (fitomedicamentos) eficazes e seguros.[52]

Um novo antimalárico deve ser eficaz levando a morte das cepas resistentes de *P. falciparum*, dentro de um período curto de tratamento (3 dias ou menos) devido à toxicidade da maioria dos medicamentos até hoje disponíveis para o tratamento. Além disso, deve ser seguro, apropriado para uma formulação oral[49,51] e ter disponibilidade comercial a custo baixo, levando em consideração a pobreza que existe na maioria dos países das regiões endêmicas. Com base no tratamento realizado com CQ que custa menos que U$ 0,1 por tratamento, um novo fármaco competitivo economicamente deve ter um custo menor que um U$ 1 por tratamento e acima deste valor já pode ser restritivo. Em segundo lugar deve-se levar em consideração que devido ao mercado de antimaláricos estar concentrado principalmente em países pobres, as oportunidades deste mercado são limitadas e, portanto o investimento na descoberta e desenvolvimento de novos antimaláricos tem sido baixo e

altamente dependente do apoio de grandes companhias farmacêuticas. Esse apoio inclui as subvenções que são emitidas para a academia e grupos industriais para a investigação, além de novas parcerias público-privadas, no entanto o desequilíbrio entre estas parcerias ainda é muito grande.[57]

Atividade antioxidante

As atividades metabólicas normais do organismo humano produzem constantemente radicais livres. Estes são intermediários que possuem elétrons livres, ou não emparelhados em sua órbita externa. Os elétrons livres destes intermediários fazem com que os mesmos se tornem altamente reativos, atacando componentes celulares como DNA e RNA, membrana celular e outras substâncias oxidáveis, acelerando o envelhecimento e, podendo assim, contribuir para o processo de doenças degenerativas.[58]

A participação de radicais livres de oxigênio (RLO) nos processos patológicos, nas intoxicações e no envelhecimento, vem se tornando uma área de pesquisa de grande interesse. Esses RLO estão envolvidos com diversas patologias, tais como: câncer, doenças cardíacas, doenças inflamatórias, doenças degenerativas (Alzheimer, Parkinson, arteriosclerose, demência senil, etc) e em certas doenças sanguíneas.

Existem no nosso organismo enzimas e moléculas de baixo peso molecular que são denominadas genericamente de antioxidantes por inibirem a ação destes RLO. Um campo crescente de investigação tem sido a procura de antioxidantes de origem natural que possam ser utilizados como adjuvantes em muitas doenças. Esses constituintes são representados por flavonóides, triterpenóides, derivados fenólicos, peptídeos, etc.

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários, de acordo com seu tipo de ação e sintéticos ou naturais, de acordo com a origem. Agem em pequenas concentrações, quando comparados com o substrato oxidável, prevenindo significantemente, a oxidação do mesmo.[59]

O interesse por antioxidantes novos e seguros de fontes naturais vem aumentando, principalmente para prevenir a deterioração de alimentos e para minimizar o dano oxidativo às células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos

vem diminuindo devido a suspeita de atividade como promotores de carcinogênese, bem como devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos. O papel de antioxidantes dietários e seus benefícios para a saúde tem atraído grande atenção nos últimos anos, especialmente os extraídos de plantas.

Na década de 80 teve início o interesse pelos antioxidantes naturais, mais precisamente os de origem vegetal, devido aos estudos que comprovaram os efeitos tóxicos de doses elevadas de antioxidantes sintéticos (butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol e *t*-butilhidroquinona). Efeitos sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático foram observados.[58]

Várias substâncias de origem vegetal são apontadas como antioxidantes. Assim o uso terapêutico de antioxidantes requer que sejam determinados seus efeitos sobre diferentes moléculas biológicas, por isso, muito embora extratos de plantas tenham sido consagrados pelo uso, é necessário que trabalhos científicos analisem tais propriedades.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis pela maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas entre outros.

Atividade antimicrobiana

Os antibióticos foram considerados remédios milagrosos quando o primeiro deles se tornou viável há meio século, porém esta popularidade levou ao uso excessivo destes medicamentos. Ao longo das últimas décadas, é notável que os antibióticos estejam perdendo sua eficácia em cepas patógenas que vêm se tornando resistentes, tendo como agravante o fato de que novos fármacos estão chegando raramente ao mercado. Além disso, os microrganismos podem adquirir resistência aos fármacos por múltiplos caminhos, portanto contornar o problema de resistência não é uma questão trivial. Para abordar esta questão companhias farmacêuticas têm recentemente revivido esforços para o desenvolvimento de novos antibióticos[60] sendo este

um tema de urgência devido ao aparecimento de cepas resistentes, tais como, as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA).[61]

As infecções causadas por MRSA (multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*), principalmente àquelas resistentes à meticilina, são atualmente um grande problema de saúde pública em hospitais e comunidades em todo o mundo.[62]

O tratamento atual envolve antibacterianos altamente tóxicos como os glicopeptídeos vancomicina (Vancocin®) e teicoplanina (Targacid®), a oxazolidinona linezolida (Zyvox®) e a combinação de estreptograminas, quinupristina e dalfopristina (Synercid®). Apesar dos avanços no desenvolvimento de novos antibióticos, as infecções por MRSA continuam sendo uma preocupação considerável devido à resistência antecipada a estes fármacos. Em 2002, cepas de MRSA totalmente resistentes à vancomicina foram isoladas nos EUA. Também nos EUA foram relatados vários trabalhos sobre resistência a linezolida em pacientes submetidos a tratamentos prolongados.[63] Portanto, há uma necessidade urgente em se desenvolver antibióticos pertencentes à novas classes de metabólitos, e a natureza é um laboratório eficaz para identificação de substâncias, na tentativa de combater o problema de resistência aos fármacos disponíveis.

Os produtos naturais são uma fonte fundamental na pesquisa de novas diversidades químicas e um componente integral nas indústrias farmacêuticas atuais.

Alguns milhares de produtos naturais vêm sendo isolados, alguns com atividade antimicrobiana com grande potencial medicinal, ainda carecem de muita investigação farmacológica.[64]

Em trabalho publicado em 2010 por SALEEM e col. abrangendo as descobertas de antibióticos potenciais de origem natural nos anos de 2000 a 2008, mais de 300 metabólitos secundários foram relatados por possuírem atividade antimicrobiana que vai desde fraca até muito forte, porém menos da metade deste número demonstra um potencial antimicrobiano significante. Ano após ano as revisões da literatura demonstram que pouco trabalho foi realizado no intuito de desenvolvimento de antibióticos entre 2000 e 2004, e ainda que o número de estudos nesta área continue aumentando, ainda é insuficiente devido ao rápido aparecimento de cepas multirresistentes. No passado, muitos

antimicrobianos foram derivados de microrganismos, e é esperado que estes juntamente com as plantas, continuem sendo uma importante fonte de agentes antimicrobianos.[65]

A revisão feita por SALEEM e col. apresenta os compostos fenólicos como o maior grupo de substâncias antimicrobianas potenciais (47 substâncias, incluindo 7 flavonóides e 3 lignanas), sendo os próximos grupos os das quinonas (19), seguido pelos alcalóides (14).[61]

Em resumo estas informações enfatizam o potencial antimicrobiano dos produtos naturais e destaca a necessidade de se continuar a explorar estas fontes, nos valendo de técnicas de purificação dos metabólitos, caracterização e avaliação que estejam a nossa disposição.

2. Objetivos

✓Avaliação do potencial farmacológico das espécies *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis*, isolamento dos constituintes das matrizes ativas e avaliação farmacológica das substâncias isoladas;

✓Determinação estrutural das substâncias isoladas por técnicas espectroscópicas e espectrométricas usuais e estudo de desreplicação das matrizes de *B. glaziovii* e *K. variabilis*.

3. Materiais e métodos

3.1 Instrumentos e materiais utilizados

✓ As concentrações das soluções foram efetuadas em rota-evaporador Büchi-RE 121 sob pressão reduzida a 40ºC;

✓ Cromatógrafo líquido da marca Varian ProStar analítico, consistindo de uma bomba ternária mod. 240, um detector de arranjo de diodo mod. 330 e um injetor automático mod. 410, controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3;

✓ Cromatógrafo líquido da marca Varian ProStar analítico, consistindo de uma bomba ternária mod. 240, um detector ultravioleta, controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3;

✓ Cromatógrafo líquido da marca Varian ProStar preparativo, consistindo de duas bombas, um detector de ultravioleta, controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3;

✓ Todas as análises nos cromatógrafos líquidos foram feitas com λ = 254 nm, exceto no cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodo;

✓ As colunas utilizadas nas análises por CLAE foram: Phenomenex C-18 (5 µm, 250 x 4,6 mm para coluna analítica e 10 µm, 250 x 21,20 mm para coluna preparativa) e coluna Phenomenex Luna Fenil-hexil (5 µm, 250 x 4,6 mm, para coluna analítica) e coluna Phenomenex Fenil-hexil (10 µm, 250 x 21,20 mm para coluna preparativa);

✓ Espectrômetro de RMN Varian INOVA 500 (11,7 Tesla), operando em frequência de 500 MHz para os núcleos de hidrogênio e 125 MHz para o carbono;

✓ Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics utr$OTOF_Q$ com ionização por eletrospray. As amostras foram solubilizadas em MeOH e introduzidas utilizando seringa (100 µL), adaptada a uma bomba de infusão com fluxo 100 µL h^{-1}. O capilar foi aquecido a 150 ºC com fluxo de gás nebulizante de 4 L min^{-1} e 4 kV. Os dados foram adquiridos no modo positivo e negativo;

✓ As leituras no ultravioleta e visível foram realizadas em espectrofotômetro Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro e em leitor de microplaca Synergy HT – BioTeK;

✓ Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas da marca Shimadzu® modelo QP 5050A. Coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB-1MS (0,10 µm de espessura de filme);

✓ Cromatógrafo a gás Varian, modelo CP-3800 e detector de ionização em chama. As colunas utilizadas foram SPB-5 (5 % fenil-metil-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0, 25 µm) e SPB-50 (50 % fenil-metil-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0, 25 µm);

✓ Os solventes utilizados foram da Synth (P.A.), J. T. Backer (grau HPLC), solventes grau técnico, purificados em destilador semi-industrial com coluna de fracionamento (4 m de altura): hexano, acetato de etila, etanol e metanol, além dos solventes deuterados ($CDCl_3$, DMSO-d_6 e MeOD) produzidos por Merck, Aldrich ou Fluka e TMS (Aldrich) padrão interno;

✓ Para as separações cromatográficas em coluna aberta foram utilizadas as seguintes fases estacionárias:

- Sílica gel (SiO_2) para cromatografia flash (0,035 – 0,070 mm, diâmetro de poro ca 6 nm) ACROS Organics.
- Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich
- C-18 Sorbent Technologies

✓ Para cromatografia em camada delgada foram utilizadas as seguintes fases estacionárias:

- Placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV_{254}) 0,20 mm de espessura;
- Placas comerciais C-18;
- Placas de sílica gel 60 G, preparadas aplicando-se uma suspensão da fase em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre placas de vidro de 5, 10, e 20 x 20 cm, obtendo-se espessuras variadas do adsorvente (0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mm) através de espalhador Quickfitt. Depois de preparadas as placas foram secas a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 6 h e em seguida ativadas em estufa a 120 ºC, por 2 h. As revelações foram feitas

por: irradiação ultravioleta (UV 254 ou 366 nm) ou por nebulização de revelador;

✓ As revelações das placas cromatográficas foram realizadas utilizando-se o revelador universal:

- Anisaldeído/HOAc/MeOH/H_2SO_4 (1:20:170:10).

✓ No teste com hipoxantina tritiada a amostras foram aspiradas pelo coletor de células Harvester 96 Mach III (Tomtec), a medida da incorporação foi feita em MicroBeta 1450 (Wallac Trilux) e os cálculos de CI_{50} foram efetuados com auíxlio do programa Origin (versão 8.0).

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos utilizados na determinação da atividade antimalárica

3.2.1.1 Ensaio *in vitro* da polimerização de heme

O ensaio foi baseado na metodologia de Baelmans e colaboradores,[66] com algumas modificações. Este teste consistiu na incubação em microtubos (eppendorfs) de 1,5 mL por 24 horas a 37 ºC das seguintes soluções: 50 µL de extratos dissolvidos em DMSO (à concentração final de 2,5 mg/mL), com 100 µL de heme [14,6 mg de heme diluídos em 3,5 mL de NaOH (0,2 N) para o preparo de solução de 6,4 mM], que foi preparada 60 minutos antes da execução do ensaio, incubada a 37 ºC e protegida da luz, 200 µL de tampão acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2.3H_2O$) 0,5 M e 50 µL de ácido acético glacial (17,4 M) totalizando 400 µL por eppendorf. Para o controle foi feita a mesma solução acima, utilizando-se no lugar de 50 µL de extrato 50 µL de solvente (DMSO). Como controle positivo utilizou-se a cloroquina (3,87 mg de cloroquina dissolvida em 250 µL de DMSO). A mesma solução supracitada foi feita utilizando 50 µL da solução de cloroquina no lugar dos 50 µL de extrato.

As soluções acima foram todas preparadas em triplicata. Elas foram agitadas para homogeneização e deixadas em estufa a 37 ºC por 24 horas. O pH das soluções foi igual a 3,8.

Após a incubação, os eppendorfs foram centrifugados por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 400 µL de DMSO e deixado em centrífuga por seis minutos, em seguida foi lavado novamente com 400 µL de MeOH e centrifugado por mais seis minutos. Posteriormente foi dissolvido em 1000 µL de NaOH 0,1 M. Alíquotas de 20 µL de β-hematina solubilizadas foram transferidas para uma placa de 96 poços com 180 µL de NaOH 0,1 M, e lidas a 405 nm no leitor de microplacas.

As análises foram feitas sempre em triplicata para o cálculo do desvio padrão e os dados foram expressos como porcentagem de inibição da polimerização do heme e foram calculados pelo programa KC4 pelo emprego da fórmula a seguir.

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

3.2.1.2 Testes esquizonticidas *in vitro* com *Plasmodium falciparum* utilizando o método de incorporação de hipoxantina tritiada

Os testes *in vitro* com *Plasmodium falciparum*, de citotoxicidade bem como o cálculo do índice de seletividade foram realizados pela Mestranda Isabela Oliveira de Freitas sob a supervisão da Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettli do Centro de Pesquisas Rene Rachou/CPqRR - Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz – Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil.

Para o teste esquizonticida, culturas sincronizadas com 1% de parasitemia no estágio de anel e 1% de hematócritos foram distribuídas em microplacas de 96 poços colocando-se 180 µL por poço. Os compostos testados foram adicionados em diferentes concentrações na placa contendo os parasitos. Os poços controles (sem a adição do fármaco) continham hemácias normais não infectadas (controle negativo) e hemácias infectadas (controle positivo). Ainda em cada experimento foram utilizados antimaláricos padrões, como a cloroquina, artesunato ou mefloquina, testados em paralelo nas placas. Cada composto ou fármaco foi testado em triplicata. Após 24 horas de incubação foram adicionados 20 µl da solução de [^{3}H]-hipoxantina (1Ci/mMol)

retornando por mais 18 horas de incubação.[67] Após este segundo período de incubação, as microplacas foram congeladas a -70 ^{o}C de 6 a 10 horas para promover a lise das hemácias. As amostras foram aspiradas pelo coletor de células Harvester 96 Mach III (Tomtec), os filtros secos em microondas (3 minutos, potência média) e acondicionados em embalagem plástica apropriada e adicionados 4 mL do líquido de cintilação. Os filtros foram lidos em MicroBeta 1450 (Wallac Trilux) para a medida de incorporação da [^{3}H]-hipoxantina em contagem por minuto (CPM). A viabilidade de *P. falciparum* na presença dos compostos foi demonstrada em curvas de inibição do crescimento do parasito em função da concentração dos fármacos com auxílio do programa Origin (versão 8.0) no qual foi possível determinar a dose inibitória do crescimento de 50% dos parasitos (CI_{50}).

3.2.1.3 Teste de citotoxicidade

O sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) foi dissolvido em solução tampão fosfato (PBS) a 5 mg/mL. Após 72 h, 10 µL de solução de MTT foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas a 37 ºC por 4 h. Após centrifugação a 1400 r.p.m o meio foi manualmente removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em 150 µL de DMSO. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida utilizando-se um espectrofotômetro de varredura com comprimento de onda teste de 450 nm e comprimento de onda de referência de 690 nm após 30 s de agitação. Os cálculos para obtenção das porcentagens de toxicidade foram realizados utilizando-se a seguinte fórmula.

$$\% \text{ de toxicidade} = 1 - \frac{(\text{DO amostra} - \text{DO meio de controle})}{(\text{DO controle de células} - \text{DO meio de controle})}$$

A concentração de amostra requerida para inibir 50% do crescimento das células em comparação com as células controle (CI_{50}), foi determinada a partir de curvas dose-resposta.[68]

3.2.1.4 Cálculo do índice de seletividade (IS)

O índice de seletividade foi obtido dividindo-se o valor correspondente ao CI_{50} determinado para a atividade dos extratos e frações de *K. variabilis* pelo valor de CI_{50} determinado para as células cancerosas. O índice de seletividade foi considerado interessante para valores maiores que 3.[68]

3.2.2 Métodos utilizados na determinação da atividade tripanocida

O teste colorimétrico utilizando MTT para determinação da atividade tripanocida foi realizado no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular de Parasitos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara - SP, pela pós-graduanda Gabriela Duó Passerini sob a supervisão da Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli.

3.2.2.1 Determinação da atividade tripanocida: Teste do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT)

O teste colorimétrico utilizando MTT[69] foi realizado utilizando formas epimastigotas de *Trypanossoma cruzi* (cepa Y). A forma epimastigota de *T. cruzi* foi escolhida por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura.

Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa, em câmara de fluxo laminar.

Após diluição em DMSO, 3 µL de cada substância testada nas concentrações desejadas (concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL), não ultrapassando o limite de 3% de DMSO, uma vez que porcentagens superiores conferem toxicidade ao parasita, foram adicionados a 97 µL de meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo 1,0 x 10^7 parasitos/mL na forma epimastigosta de *T. cruzi* (fase log). Foram realizados dois controles, um na ausência do parasita para cada poço teste, mas na presença da amostra e outro na ausência desta, mas contendo parasitas.

Para os extratos e frações, as concentrações das substâncias foram extrapoladas até valores de 200, 300 e 500 µg/mL.

A placa foi incubada em câmara úmida a 28 °C (BOD) por 72 horas. A seguir adicionou-se 10 µL de solução MTT/PMS (2,5 mg/mL de MTT e 0,22 mg/mL de PMS) em todos os poços e a placa foi incubada ao abrigo da luz por 75 minutos a 28 °C. Neste momento ocorre a redução do sal tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium] em um produto colorido, formazan, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias. Foram adicionados 100 µL da solução 10% SDS - 0,01 N HCl, incubando a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Após solubilização dos cristais de formazan e incubação a temperatura ambiente, foi feita a leitura.

A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de Elisa – BioRad) a 595 nm e os resultados obtidos em absorbância. A porcentagem de parasitas mortos – % C (citotoxicidade) – foi calculada segundo a equação abaixo.[69]

$$\% C = [(G_c - G_p)/G_c] \times 100$$

$$G_c = A_c - A_m$$

$$G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo que, G_c representa o número de parasitas/mL nos poços controle e G_p representa o número de parasitas/mL detectados em diferentes concentrações da substância. A_c corresponde ao valor da absorbância nos poços controle (na ausência de amostra) com parasitas; A_m corresponde ao valor da absorbância nos poços controle (na ausência de amostra) sem parasita; A_p representa o valor da absorbância nos testes e A_{pm} representa o valor da absorbância das diferentes concentrações de substância na ausência do parasita.

3.2.3 Métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante

Os testes utilizando os radicais livres DPPH e ABTS foram realizados no NuBBE – Instituto de Química – Araraquara – SP, pela bolsista de treinamento técnico/FAPESP, Scheila Cristina Gutkoski Skrzek sob a supervisão da Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira Silva.

3.2.3.1 Ensaio espectrofotométrico com DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O radical DPPH apresenta absorção máxima em 517 nm. Neste comprimento de onda avalia-se a absorção na ausência e na presença das amostras-teste, sendo que na presença de agentes antioxidantes ocorre aumento da transmitância.

A solução de DPPH (200 μM), assim como as soluções das amostras foram preparadas em MeOH. Para os extratos e frações as amostras foram testadas nas concentrações de 66,7; 33,3; 10,0; 6,67; 3,33; 2,67 e 1,67 μg/mL e as substâncias puras foram ensaiadas nas concentrações de 33,3; 26,7; 20,0; 13,3; 6,7 e 1,7 μg/mL, bem como o padrão utilizado. Cada concentração foi testada em triplicata.

Às placas de 96 poços foram adicionados: 200 μL da solução de DPPH previamente preparada e 100 μL das soluções das amostras em diferentes concentrações. O controle positivo foi realizado com 200 μL de DPPH e 100 μL de antioxidante padrão. Para o controle negativo adicionou-se 200 μL de DPPH e 100 μL de solvente.

As placas foram mantidas por 30 minutos ao abrigo da luz e a avaliação da forma reduzida de DPPH gerado, foi determinada através da diminuição da absorbância a 517 nm, em leitor de microplacas SYNERGY-HTS.[70,71]

Processamento dos dados:

Fórmula: % de sequestro do radical livre DPPH

$$\% = \frac{(\text{absorbância do CONTROLE DPPH} - \text{absorbância da AMOSTRA ou PADRÃO}) * 100}{\text{Absorbância do CONTROLE DPPH}}$$

3.2.3.2 Ensaio com o radical ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)]

O ensaio de sequestro do radical catiônico ABTS foi conduzido de modo a produzi-lo *in situ*. Para isso, inicialmente realizou-se a reação entre uma solução aquosa na concentração de 7 mM do ácido sulfônico ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)] e uma solução aquosa de persulfato de potássio (2,45 mM), produzindo uma solução-estoque de $ABTS^{\bullet+}$.

Esta mistura permaneceu ao abrigo da luz e em temperatura ambiente de 12 a 16 horas. A solução foi diluída em metanol até uma absorbância de 0,70 (± 0,02) a 734 nm e equilibrada a 30 ^{o}C.

Na placa de 96 poços, foram adicionados para as amostras: 300 µL de ABTS e 10 µL de amostra em diversas concentrações. Controle positivo: 300 µL de ABTS e 10 µL de antioxidante conhecido. Controle negativo: 300 µL de ABTS e 10 µL de solvente.

As medidas foram efetuadas a 30 ^{o}C e a absorbância monitorada no primeiro e no sexto minuto a 734 nm.

3.2.4 Métodos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana

3.2.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios antibacterianos foram realizados no "Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy – School of Pharmacy – University of London", Londres – Inglaterra, durante o estágio "sanduíche" sob a supervisão do Prof. Dr. Simon Gibbons.

3.2.4.2 Preparo do meio de cultura

Utilizou-se 31,4 g de ISO-SENSITEST AGAR (Oxoid) para cada litro de água deionizada, purificada por um sistema Milli-Q. A mistura foi auto-clavada e então foram transferidos 10 mL para cada tudo de centrífuga de 50 mL.

3.2.4.3 Preparo do meio Mueller-Hinton broth

A solução de Mueller-Hinton broth (MHB; Oxoid) foi preparada para conter 20 e 10 mg/L de Ca^{2+} e Mg^{2+}, respectivamente em água deionizada, purificada por um sistema Milli-Q.

3.2.4.4 Cepas bacterianas

Foram utilizadas as seguintes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes aos principais antibióticos no mercado: SA-1199B, XU212, ATCC 25943, RN4220, EMRSA15 e EMRSA16.

A cepa padrão ATCC 25943 e a cepa resistente à tetraciclina XU212 foram fornecidas por Gibbons e Udo (2000)[72] A cepa SA-1199B foi fornecida por Kaatz e col. (1993)[73] e a cepa RN4220 foi fornecida por Ross e col. (1989).[74]

3.2.4.5 Preparo das subculturas bacterianas

As cepas bacterianas foram adicionadas aos tubos contendo o meio de cultura (AGAR) e encubadas por 24h a 37 ºC.

3.2.4.6 Preparo das soluções contendo as cepas bacterianas

Um inóculo com densidade de $5x10^5$ cfu de cada cepa foi preparado em solução salina normal (9 g de NaCl por litro de água) por comparação com um padrão de turbidez 0,5 MacFarland.

3.2.4.7 Preparo da solução estoque das amostras

Para cada amostra uma solução estoque foi preparada nas concentrações iniciais de 512 µg/mL para extratos e frações e 128 µg/mL para substâncias puras, utilizando-se DMSO como solvente.

3.2.4.8 Ensaio para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM)

Uma nova solução de amostra foi preparada utilizando-se 100 µL da solução universal das amostras previamente preparada juntamente com 1,5 mL da solução de BROTH. Em cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 100 µL da solução de BROTH e a estes foram adicionados em duplicata 100 µL da solução contendo as amostras a serem testadas. Foi realizada uma diluição seriada partindo-se da concentração de 512 µg/mL até 1 µg/mL para extratos e frações e 128 µg/mL até 0,25 µg/mL para substâncias puras. Sendo os poços 11 e 12 utilizados como padrões. O poço 11 foi utilizado como padrão de crescimento das cepas sem adição de amostra e o poço 12 utilizado como padrão da solução de MTT sem adição das cepas bacterianas. Após adição das cepas, as placas foram incubadas por 18 h a 37 ºC. Para determinação da concentração inibitória mínima 20 µL de uma solução metanólica de 5 mg/mL

de MTT (MTT; Sigma) foi adicionado a cada poço e incubado por 20 min. O crescimento bacteriano foi indicado pela mudança de coloração de amarelo para azul escuro. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi registrada para a menor concentração na qual o crescimento bacteriano não foi observado[72] (Figura 8).

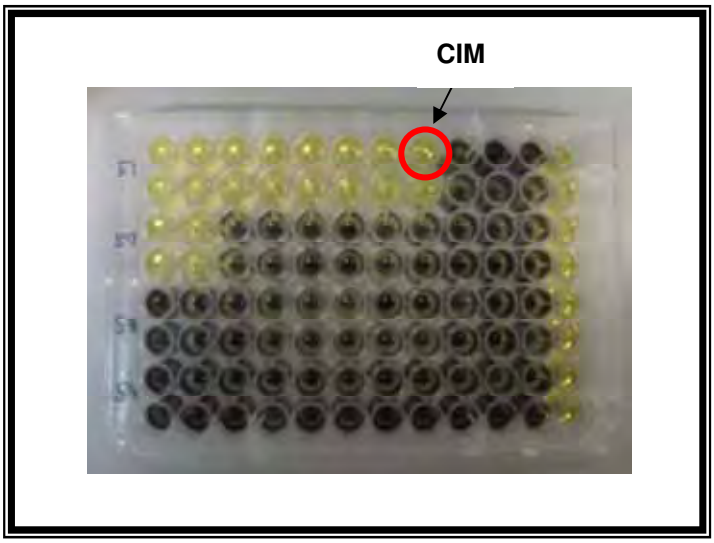


Figura 8: Foto ilustrativa da realização da medida da CIM.

3.2.4.9 Ensaio para obtenção da concentração mínima bactericida (CMB)

As soluções foram preparadas seguindo o mesmo protocolo de preparo das amostras descrito anteriormente para a obtenção da CIM e a estas foram adicionadas as mesmas quantidades de microrganismos, testando-se apenas a cepa SA-1199B. Após a adição dos microrganismos as placas de 96 poços foram incubadas por 24 h a 37 ºC. Após as 24 h de incubação e sem adição de MTT, 25 µL de cada solução nas diferentes concentrações de amostra foram transferidos paras as placas de Petri correspondentes contendo meio de cultura (AGAR). As Placas de Petri foram então incubadas por mais 24 h (Figura 9).



Figura 9: Ilustração do teste para a obtenção da concentração mínima bactericida CMB.

A CMB foi obtida pela observação do crescimento das colônias nas Placas de Petri após as 24 h de incubação. O crescimento de novas colônias até três diluições acima do valor já obtido para CMI sugere que a substância testada tem caráter bactericida, porém o crescimento em concentração maior que três vezes o CIM sugere que se trata de uma substância com capacidade bacteriostática.

3.2.5 Métodos utilizados na determinação da atividade antifúngica com patógenos humanos: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*

Os ensaios antifúngicos para os extratos e frações de *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis* foram desenvolvidos no Laboratório de Micologia Clínica, Departamento de Análise Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sob a supervisão da Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini.

3.2.5.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os fungos testados neste trabalho incluem *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e

Cryptococcus neoformans ATCC 90012. As cepas são originárias do laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, sendo cultivadas em Agar Sabourand-dextrose a temperatura ambiente.[75]

3.2.5.2 Metodologia do teste antifúngico

Os ensaios antifúngicos foram realizados pelo método de microdiluição em caldo e verificação de turbidez em leitor de microplacas conforme descrito no documento M27-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com algumas modificações. As análises foram feitas em triplicata e o meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 com L-glutamina, ácido morfolinopropanosulfônico (MPOs) 0,165 M (pH 7,0), suplementado com 2% de glicose.

Os extratos e frações foram dissolvidos em DMSO e logo adicionados no meio de cultura RPMI, alcançando uma concentração inicial de 250 µg/mL. A suspensão de células fúngicas foi preparada em solução salina 0,85% com densidade óptica de 0,5 (McFarland) e então diluída na razão de 1:100 em RPMI tendo uma densidade fúngica equivalente a 1×10^5 unidades formadoras de colônia/mL. Esta suspensão foi inoculada sobre as microplacas com as amostras diluídas numa concentração entre 250 µg/mL até a concentração de 0,48 µg/mL. As microplacas foram incubadas sob agitação constante a uma temperatura de 37 $^{\circ}$C, durante 24 horas para *Candida albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* e 48 horas para *Cryptococcus neoformans*. O controle positivo empregado nos ensaios de fungitoxicidade foi o fluconazol dissolvido em DMSO. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração capaz de inibir em 100 % o crescimento fúngico, sendo este analisado por espectrofotometria. Considerou-se que os extratos e frações que apresentaram uma CMI menor que 75 µg/mL, demonstraram uma potente atividade antimicrobiana; de 75 – 150 µg/mL, moderada atividade antimicrobiana e de 150 – 250, fraca atividade antimicrobiana.[75]

3.2.6 Métodos utilizados na determinação da atividade antifúngica com fungos fitopatógenos

O teste foi realizado pelo laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica pela técnica responsável Cynthia Murakami, sob a orientação da Dra. Maria Cláudia Marx Young.

Os extratos (400 µg/10µL), frações (200 µg/10µL) e o padrão positivo a nistatina (1 µg/10µL) foram aplicados em cromatoplacas de sílica-gel. Os extratos e as frações de partição hexânica e acetato de etila foram eluídas em $CHCl_3$:MeOH (97:3) enquanto as frações de partição *n*-butanólica e aquosa foram eluídas em $CHCl_3$:MeOH (70:30) e em seguida nebulizadas com a suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* e em seguida incubadas em câmara úmida a 25 °C, no escuro, por 48 horas.[76]

3.2.7 Métodos utilizados nos estudo de desreplicação

As injeções foram realizadas pela técnica, Luciana Polese, do departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP.

3.2.7.1 Preparo das amostras para análise em CG-DIC

As frações hexânicas dos galhos e folhas de *B. glaziovii* e *K. variabilis* (50 mg) foram dissolvidas em clorofórmio (3,0 mL) e percoladas em coluna cromatográfica contendo uma mistura de celite:carvão ativo (1:1, 100 mg) + sílica gel (200 mg) e eluídas com clorofórmio (10 mL). Após evaporação em temperatura ambiente os eluatos foram dissolvidos em hexano:AcOEt (7:3) e analisados por CG-DIC em triplicata.

3.2.7.2 Condições para cromatografia gasosa

Todas as frações hexânicas foram analisadas por CG-DIC em cromatógrafo a gás marca Varian modelo CP-3800 equipado com injetor split [splitless inicial; 0,75 min (1:50); 2,00 min (1,20)] a 260 ºC, e detector de ionização em chama a 310 ºC para coluna SPB-5 e 290 ºC para coluna SPB-50. O volume injetado foi de 20 µL. Foram empregadas colunas capilares SPB-50 (50 % fenil-metil-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0, 25 µm) e SPB-5 (5 % fenil-metil-silicone, 30 m x 0,25 mm x 0, 25 µm). Para SPB-50 a temperatura da coluna utilizada foi de 280 ºC (condição isotérmica), entretanto para coluna SPB-5 foi empregada uma temperatura inicial de 250 ºC mantida por 12 min., seguido por um aumento na temperatura de 6 ºC/min até 280 ºC e então mantida por mais 30 min. Foi utilizado nitrogênio como gás carreador com fluxo de 1 mL/min. Os triterpenos e esteróis foram identificados por comparação da retenção relativa (RR) das amostras com as RR dos padrões de triterpenos e esteróis. Como padrão interno utilizou-se o colesterol. O detector utilizado foi o de ionização em chama (DIC).

3.2.7.3 Obtenção dos padrões de triterpenos e esteróis

Os triterpenos e esteróis utilizados como padrões foram previamente isolados de espécies das famílias Lauraceae e Rubiaceae, incluindo *Alibertia macrophylla*, *A. sessilis*, *Licaria rodriguesii*, *L. subbulata* e *Aniba parviflora*. As estruturas moleculares destes compostos foram identificadas com base nas técnicas de RMN de ^{1}H, RMN de ^{13}C e EM.[77,78,79]

3.2.8 Condições para cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas

As injeções foram realizadas pelo técnico do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP, Araraquara – SP, Dr. Alberto

Camilo Alécio, em equipamento cedido pelo Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira - Coordenador do Cempeqc (IQ – UNESP).

As condições do equipamento utilizadas nos experimentos foram as seguintes: temperatura do injetor de 280 ºC; temperatura da interface de 300 ºC; programação da coluna com temperatura inicial de 50 ºC permanecendo por 3 min, sendo acrescidos 2 ºC/min até atingir 295 ºC, permanecendo por 20 min, perfazendo um tempo total de análise de 145,50 min; gás carreador hélio (1 mL min^{-1}); pressão inicial na coluna: 56,0 kPa; taxa de split 1:20 e volume injetado de 1 µL.

Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: ionização por impacto eletrônico, modo positivo, com energia de impacto: 70 eV; velocidade de aquisição dos dados foi de 769 u.m.a./s; e fragmentos de *m/z* 40 a 500 Da em full scan, medidos a intervalos de 0,5 s.

3.2.9 Coleta e identificação do material botânico

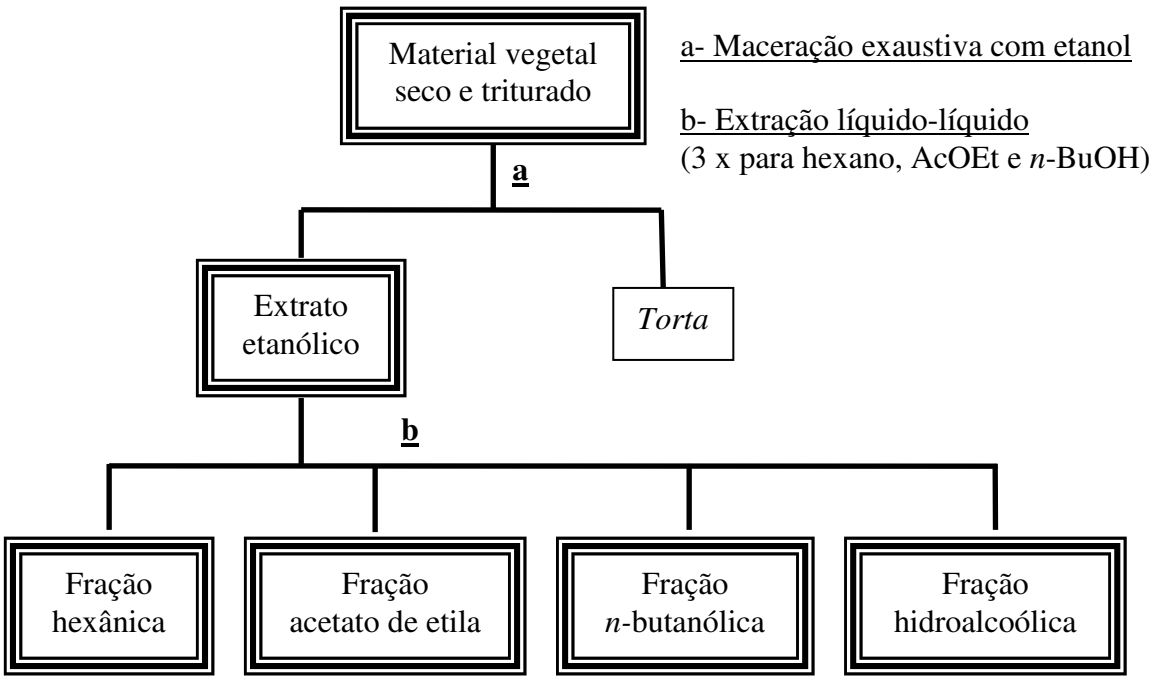
As folhas e galhos de *Brosimum glaziovii* foram coletados na mata do Instituto de Botânica, São Paulo-SP, Brasil, em 20/10/2006. As folhas e galhos da espécie *Kielmeyera variabilis* foram coletados na Fazenda Campininha em Mogi-Guaçu em 19/01/2007. Ambos foram coletados pela Dra. Maria Cláudia Marx Young. As exsicatas de *B. glaziovii* (col. S. Romaniuc Neto 1298) e de *K. variabilis* (SP 346310), encontram-se depositadas no herbário “Maria Eneida P. Kaufman” do Instituto de Botânica, São Paulo-SP, Brasil.

4. Resultados e discussão

4.1 Extração e isolamento

4.1.1 Preparo dos extratos e frações

O material botânico foi seco a temperatura ambiente e triturado em moinho de facas. O pó obtido foi submetido à maceração exaustiva com etanol. A concentração do solvente foi realizada sob pressão reduzida em rotaevaporador, obtendo-se os extratos das folhas e galhos de *B. glaziovii* e *K. variabilis*. Os extratos etanólicos foram dissolvidos em mistura metanol:água (7:3) e submetidos à extração líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades: hexano, acetato de etila e posteriormente *n*-butanol, resultando em quatro frações (Fluxograma 1).



Fluxograma 1: Preparo dos extratos e frações.

Tabela 1: Rendimentos obtidos nos procedimentos de extração e partição líquido-líquido

Espécie	Partes do vegetal	Massa do material seco (kg)	Tipo de extração ou fração	Códigos	Massa dos extratos ou frações obtidos (g) (rendimento,%)[a,b]
K. variabilis	folhas	1,5			
			etanólica	EFK	94,0 (6,27)
			hexânica	EHFK	1,6 (7,9)
			acetato de etila	EAFK	6,0 (29,8)
			n-butanólica	EBFK	6,4 (31,8)
			hidroalcoólica	EAqFK	1,9 (9,5)
K. variabilis	galhos	2,5			
			etanólica	EGK	87,3 (3,50)
			hexânica	EHGK	3,7 (18,5)
			acetato de etila	EAGK	6,4 (32)
			n-butanólica	EBGK	5,3 (26,5)
			hidroalcoólica	EAqGK	1,7 (8,5)
B. glaziovii	folhas	0,85			
			etanólica	EFB	35,2 (4,1)
			hexânica	EHFB	1,5 (14,5)
			acetato de etila	EAFB	1,23 (12,3)
			n-butanólica	EBFB	0,5 (5,0)
			hidroalcoólica	EAqFB	0,7 (5,3)
B. glaziovii	galhos	2,5			
			etanólica	EGB	57,3 (2,30)
			hexânica	EHGB	2,5 (15,1)
			acetato de etila	EAGB	6,1 (35,9)
			n-butanólica	EBGB	2,1 (12,2)
			hidroalcoólica	EAqGB	2,2 (12,9)

[a] Os extratos etanólicos tiveram seu rendimento calculado a partir do material botânico seco e moído;
[b] As frações hexânica, acetato de etila, *n*-butanólica e hidroalcoólica tiveram seus rendimentos calculados a partir da massa do extrato etanólico utilizada na partição.

4.2 Isolamento dos metabólitos secundários

Durante os últimos anos o NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), laboratório no qual o presente estudo foi desenvolvido, além do estudo químico voltado para o isolamento e determinação estrutural de micromoléculas, vem investindo esforços em técnicas de separação e identificação (HPLC/MS; HPLC/RMN) para obtenção do perfil metabólico, sem o prévio isolamento de substâncias, muitas vezes conhecidas, aplicando métodos para identificar os possíveis constituintes bioativos na matriz complexa, antes de proceder ao isolamento (desreplicação)

e amplia suas pesquisas para outros organismos como marinhos e microrganismos, além do investimento em biossíntese e ecofisiologia de substâncias e espécies de interesse farmacológico e cosmético. Assim, os últimos esforços vêm sendo dirigidos para a pesquisa colaborativa, visando à conservação e uso sustentável da biodiversidade do Estado de São Paulo, realizando estudos visando o conhecimento da diversidade química e a busca por substâncias com potencial farmacológico. O presente trabalho tem um forte componente colaborativo, tendo em conta a riqueza de substâncias presentes nas espécies estudadas e as atividades detectadas para as classes isoladas.

4.2.1 Triagem da atividade antimalárica

Uma das mais importantes estratégias na busca de novos fármacos é a identificação de novos alvos e a subsequente descoberta de substâncias que sejam capazes de agir nestes alvos, sendo que um destes alvos na busca por substâncias antimalárica potenciais é a polimerização de heme.[80]

Com base nestes fundamentos o teste de inibição da complexação de β-hematina foi a metodologia escolhida para um "screening" preliminar, por se tratar de um teste químico que pode ser realizado no próprio laboratório de fitoquímica e foi implementado no nosso laboratório de pesquisa quando o presente estudo teve início. Esta foi a metodologia preliminar empregada pela Pós-doutoranda Patrícia Mendonça Pauletti (Processo FAPESP nº 150774/2004-4) com o objetivo de identificar espécies vegetais e substâncias com potencial antimalárico e dessa forma contribuir com o projeto Temático "Conservation and sustainable use of the plant diversity from Cerrado and Atlantic forest: chemical diversity and prospection for potential drugs, Phase II" (Processo nº 03/02176-7, Programa Biota-FAPESP), cujo objetivo principal consistiu na bioprospecção de plantas da flora Paulista. Durante o trabalho desenvolvido pela Pós-doutoranda foram selecionadas para estudo 8 famílias e 26 espécies, num total de 49 extratos, dentre as espécies depositadas em nossa extratoteca: Asteraceae (*Baccharis dracunculifolia*, *Bidens segetum*, *Calea pinnatifida*, *Mikania sp.*, *Vernonia discolor* e *Viguiera arenaria*);

Clusiaceae (*Callycophyllum brasiliensis*, *Garcinia gardineriana* e *Kielmeyera variabilis*); Gersneriaceae (*Nemathanthus fritschii* e *Sinnigia schiffneri*); Loganiaceae (*Strichnos sp* e *S. pseudoquina*); Lytraceae (*Diplusodum virgatus*); Meliaceae (*Cabralea canjerana*, *Guarea macrophylla* e *Trichilia lepidota*); Moraceae (*Brosimum glaziovii*, *B. guianense*, *Ficus insípida*, *F. pulchella* e *Sorocea bonplandii*) e Rutaceae (*Conchocarpus fontanesianus*, *Metrodorea nigra* e *Zanthoxyllum rhoifolium*) apresentaram substâncias reativas ao teste de β-hematina, indicativo de atividade para posterior ensaios *in vitro*.

Estas famílias e gêneros foram escolhidos por apresentarem atividade antimalárica relatada na literatura ou por possuírem quimiomarcadores capazes de interagir com o heme, entre eles xantonas, alcalóides e acridonas.

A partir dos dados preliminares obtidos as espécies *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis,* as quais dentre outras espécies demonstraram potencial antimalárico, foram selecionadas para dar continuidade aos estudos na busca por metabólitos com esta atividade.

No mecanismo do teste de inibição da complexação de β-hematina assume-se que para a obtenção dos aminoácidos essenciais, o parasita digere a hemoglobina dentro do seu vacúolo digestivo e isso resulta na liberação de grande quantidade de grupamentos heme que formam um produto chamado hematina, o qual apresenta um íon ferro oxidado (Fe^{3+}). A hematina é altamente reativa e, por isso, dentro do parasita ela é altamente tóxica podendo levar o parasita a morte. No entanto, dentro do parasita normalmente ocorre a agregação da hematina formando a hemozoína, que é um agregado cristalino insolúvel e extremamente estável, nesta forma este não é tóxico para o parasita.[81,82] Com isto a idéia principal é impedir que ocorra a formação de hemozoína dentro do vacúolo digestivo do parasita, deste modo proporcionando um acúmulo de hematina e consequentemente a morte do parasita. Uma das maneiras de impedir a agregação da hematina é a formação de complexos solúveis, nos quais o Fe^{3+} seria quelado.

Inicialmente foram testados os extratos etanólicos e frações de partição das duas espécies em estudo *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis* (Figura 10). A metodologia empregada no teste encontra-se descrita no item 3.2.1.1 dos materiais e métodos.

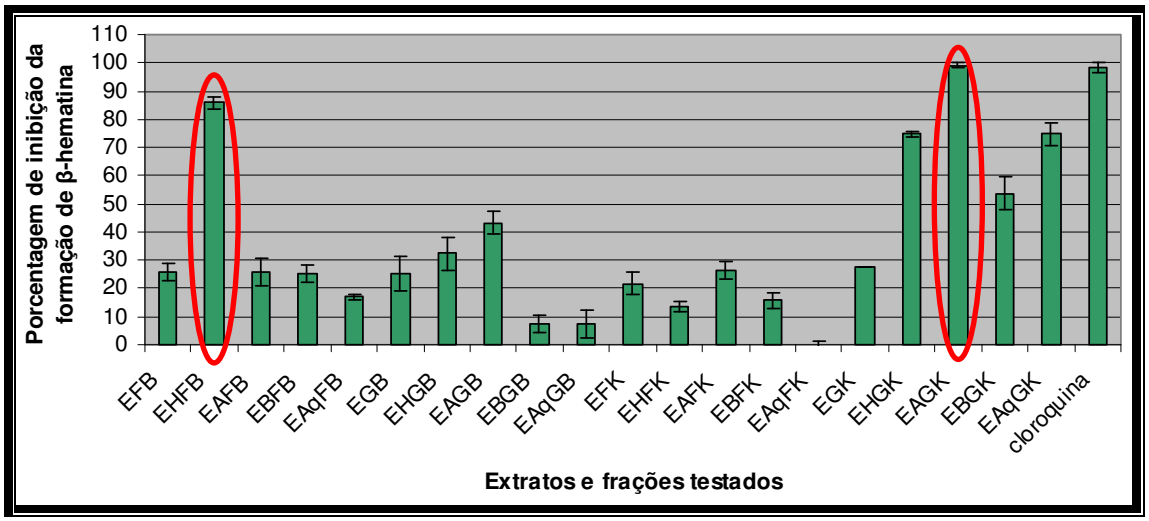


Figura 10: Porcentagem de inibição da complexação de β-hematina para os extratos etanólicos e frações de partição de *B. glaziovii* e *K.variabilis*, comparados ao controle positivo (cloroquina).

A partir dos resultados obtidos pode-se dizer que as frações hexânica das folhas de *B. glaziovii* (EHFB) e AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK) foram as mais promissoras no teste de complexação com β-hematina, quando comparadas ao padrão cloroquina (98,2 %), demonstrando porcentagens de inibição de complexação de 85,8 e 99,2 %, respectivamente.

4.2.1.1 Estudo químico da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK)

No teste químico de inibição da complexação de β-hematina, realizado para os extratos e frações de *K. variabilis* e *B. glaziovii*, a fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK) foi a mais promissora, esta fração foi então selecionada para dar início ao estudo químico na busca por substâncias potencialmente ativas.

Primeiramente uma análise exploratória com detector de arranjo de diodos para esta fração foi realizada (Figura 11).

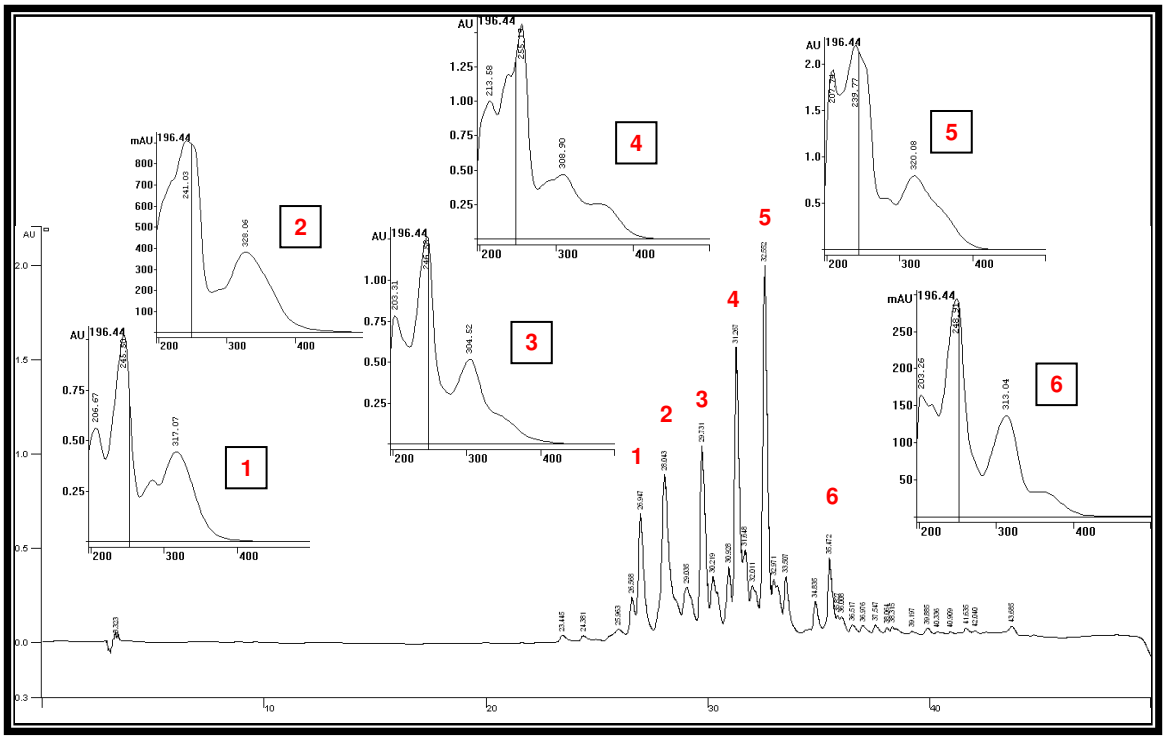


Figura 11: Cromatograma analítico da fração EAGK, via CLAE-UV-DAD no modo gradiente MeOH:H_2O, 5-100% MeOH em 50 min., solução 1 mg/mL, fluxo 1 mL/min, coluna Phenomenex C-18, 5µ, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, injeção de 20 µL.

Ao se analisar o perfil obtido por CLAE DAD observa-se 6 picos de maior intensidade. Os espectros de absorção referentes a estes picos apresentam bandas de absorção no UV características para xantonas.[20]

Para saber se a transposição do modo gradiente de eluição para o isocrático em CLAE era possível, dividiu-se a variação do tempo de retenção entre o primeiro pico e o último pico (Δtr) pelo tempo do gradiente (tg). Para que a transposição seja possível o valor encontrado deve ser menor que 0,25 para uma amostra que contenha fator de retenção (k') entre 1 e 10 e menor que 0,40 para uma amostra que contenha fator de retenção (k') entre 0,5 e 20, sendo o fator de retenção calculado para cada pico. Fazendo os cálculos para o cromatograma de EAGK obteve-se:

$$\Delta tr/\ tg = (35,47 - 26,59)/50 = 0,18$$

$$k' = (tr-tm)/tm \qquad \text{(eq. 1)}$$

tr: tempo de retenção do pico

tm: tempo morto

k' pico1 = (26,58 – 3,32)/3,32 = 7,00

k' pico2 = (35,47 – 3,32)/3,32 = 9,68

Após a verificação de que seria possível a separação em modo isocrático, a melhor condição de separação foi obtida utilizando-se MeOH:H_2O dopado com 0,1 % HOAc (50:50) como eluente (Figura 12).

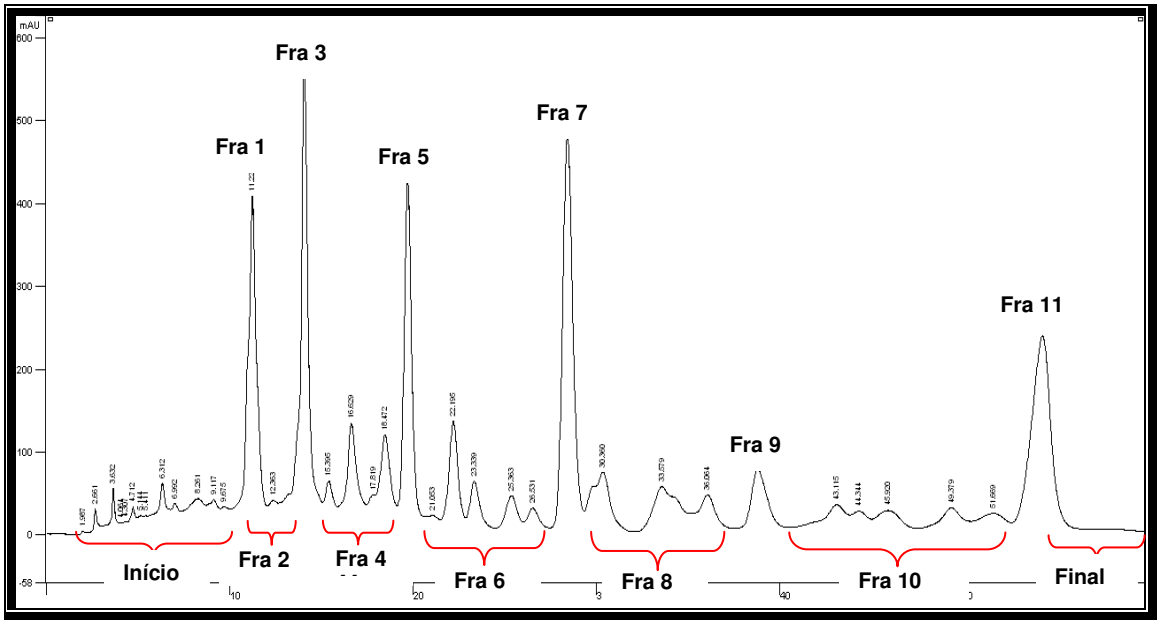


Figura 12: Cromatograma isocrático de EAGK via CLAE-UV-DAD analítica [MeOH:H_2O (50:50) dopado com 0,1% HOAc, coluna Phenomenex C-18, 5µ, 250 x 4,6 mm, λ = 254 nm, fluxo 1 mL/min. em 60 min.].

Na transposição de CLAE analítica para a preparativa teve-se um aumento no tempo de análise de 60 para 80 minutos (Figura 13). As frações coletadas manualmente e separadas por picos. As frações coletadas e as estimativa dos tempos de retenção observados para cada uma delas encontram-se descritos na Tabela 2. Foram realizadas várias injeções, num total de 450,0 mg de amostra.

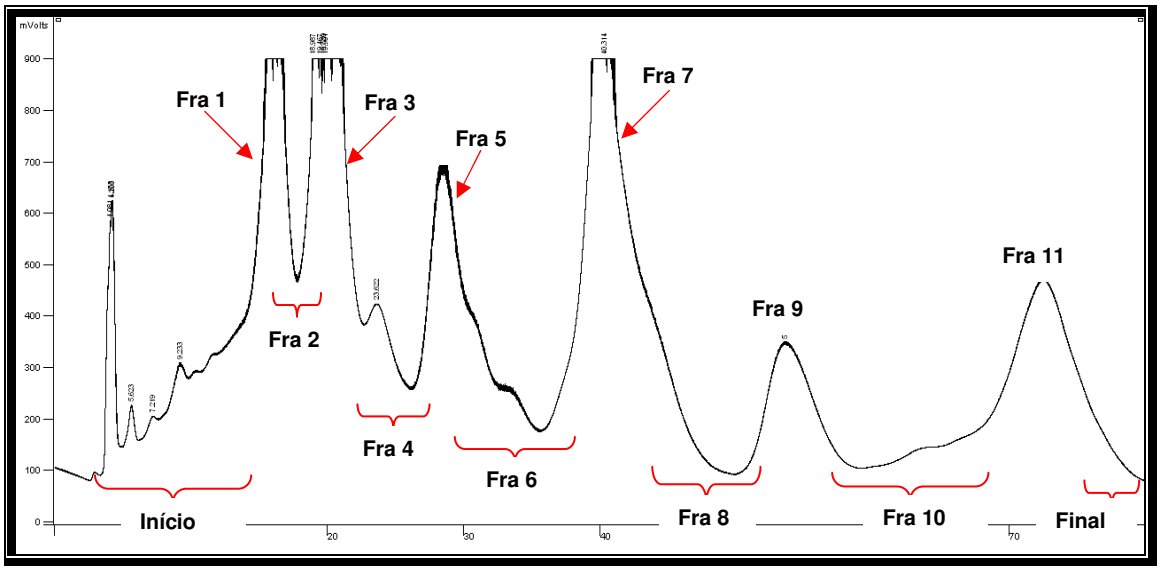


Figura 13: Cromatograma isocrático de EAGK via CLAE preparativa [MeOH:H_2O (50:50) dopado com 0,1% HOAc, coluna Phenomenex C-18, 10 µm, 250 x 21,20 mm, λ = 254 nm, fluxo 1 mL/min em 80 min.].

Tabela 2: Frações obtidas na separação por CLAE preparativa da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK)

Fração	Estimativa dos tempos de retenção (min)	Massa fração (mg)
Início	0 – 15,0	12,9
Fra 1	15,0 - 17,0	23,7
Fra 2	17,0 – 18,4	13,8
Fra 3	18,4 – 21,6	25,6
Fra 4	21,6 – 27,0	20,2
Fra 5	27,0 – 29,6	50,1
Fra 6	29,6 – 38,3	53,7
Fra 7	38,3 – 42,4	30,2
Fra 8	42,4 – 51,5	47,2
Fra 9	51,4 – 57,0	26,7
Fra 10	57,0 – 69,2	35,7
Fra 11	69,2 – 77,1	30,4
Final	77,1 – 80,0	15,7
Limpeza		45,4

As frações Fra 1, Fra 3, Fra 5, Fra 7, Fra 9 e Fra 11 foram analisadas por RMN de ^1H, onde constatou-se que a fração Fra 1 era constituída por uma

mistura de três substâncias (**1**, **2** e **3**) as quais foram identificadas em mistura e que as frações Fra 3, Fra 5, Fra 7 e Fra 11 eram compostas pelas substâncias **4**, **5**, **6** e **7**, respectivamente (Fluxograma 2), ainda pela análise de RMN de ^{1}H observou-se que a subfração Fra 9 apresentava três substâncias, esta foi então submetida a uma nova separação por CLAE preparativa, porém agora utilizando-se novas condições cromatográficas.

4.2.1.2 Fracionamento de Fra 9

A subfração Fra 9 (26,7 mg) foi submetida a novo fracionamento por CLAE preparativa utilizando-se as seguintes condições: coluna Phenomenex Fenil-hexil, 25,0 cm x 4,6; MeOH:H_2O (50:50) dopada com 0,1% HOAc; fluxo de 12 mL/min, em 60 min (Figura 14).

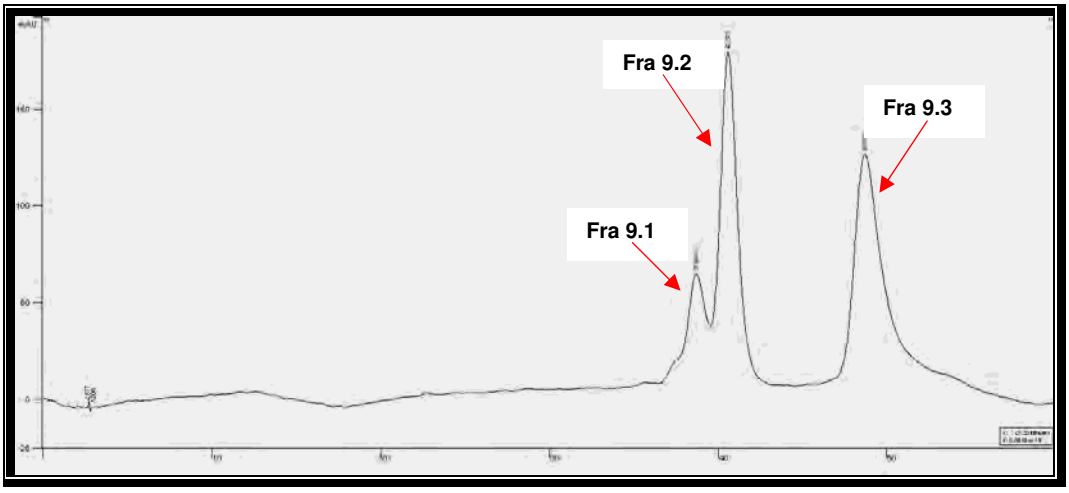
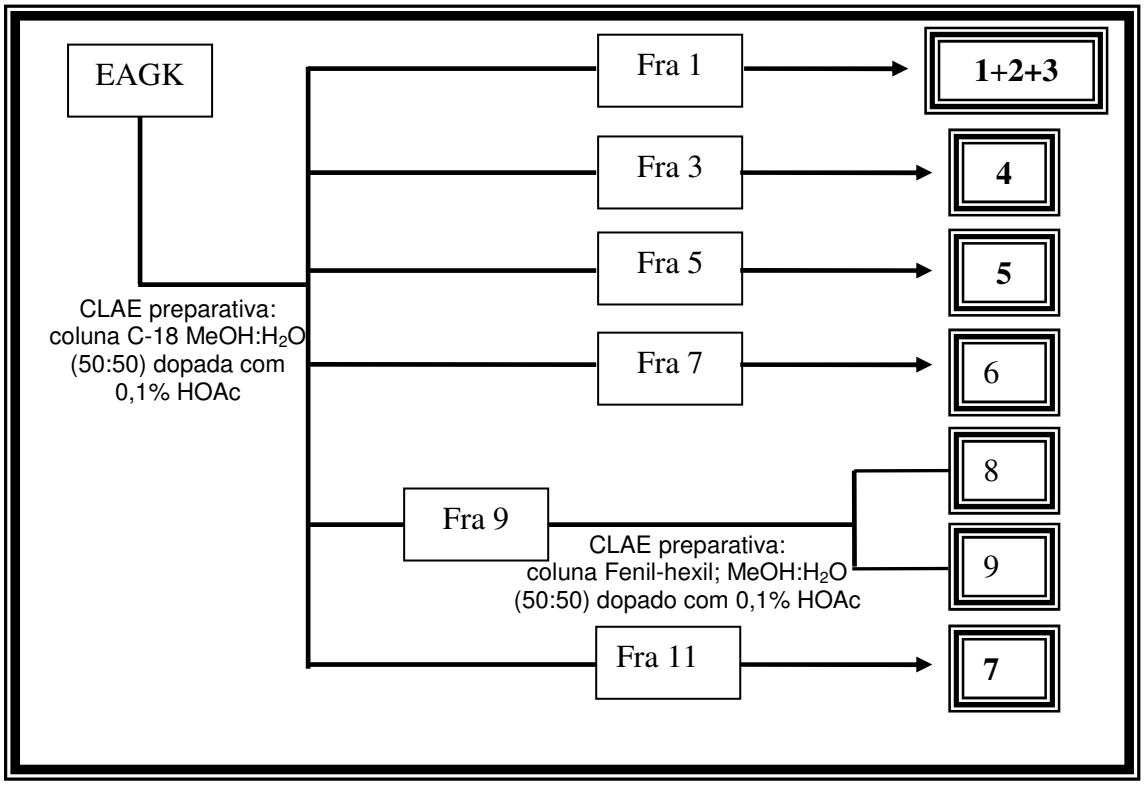


Figura 14: Cromatograma isocrático via CLAE preparativa, da subfração **Fra 9** [(Coluna Phenomenex Fenil-hexil, 25,0 cm x 4,6; MeOH:H_2O (50:50) dopado com 0,1% HOAc; fluxo de 12 mL/min em 80 min.)].

Do fracionamento de Fra 9 foram obtidas três subfrações demoninadas por Fra 9.1 (5,3 mg), Fra 9.2 (10,7 mg) e Fra 9.3 (7,9 mg). Após análise de RMN de ^{1}H constatou-se o isolamento das substâncias **8** (Fra 9.1) e **9** (Fra 9.2). O pico observado no cromatograma correspondente à fração Fra 9.3 não pode ser identificado devido à qualidade dos espectros de RMN obtidos.

O isolamento das substâncias da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* estão descritos no Fluxograma 2.



Fluxograma 2: Fluxograma do isolamento das substâncias da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK).

Após análise detalhada dos dados espectroscópicos obtidos para as substâncias isoladas conforme descrito no item 4.3.1, estas foram identificadas como pertencentes à classe das xantonas (Figura 15), sendo elas: 3,6-diidroxi-1,4,8-trimetoxixantona (**1**), 3,5-diidroxi-4-metoxixantona (**2**), 3,4-diidroxi-6,8-dimetoxixantona (**3**) 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (**4**), 5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona (**5**), 2,3-dimetoxi-4-hidroxixantona (**6**), kielcorina (**7**), 3-hidroxi-2-metoxixantona (**8**) e 2-hidroxi-1-metoxixantona (**9**).

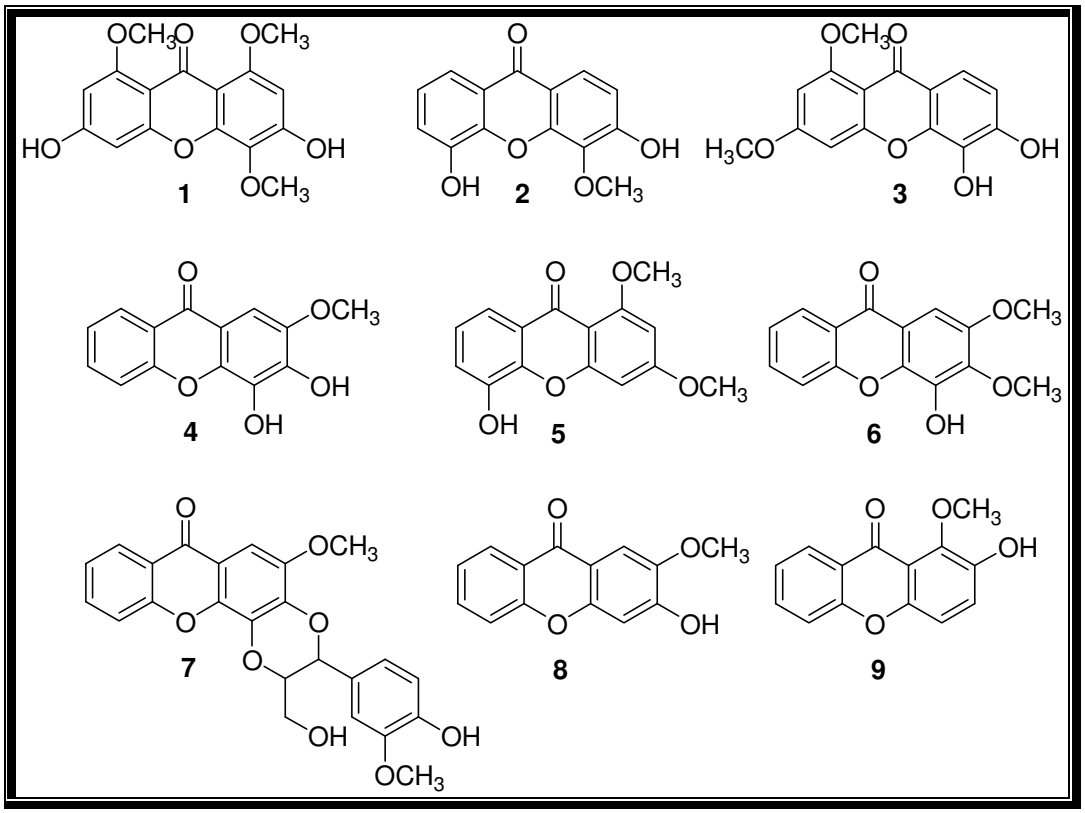


Figura 15: Xantonas isoladas da fração EAGK [3,6-diidroxi-1,4,8-trimetoxixantona (**1**), 3,5-diidroxi-4-metoxixantona (**2**), 3,4-diidroxi-6,8-dimetoxixantona (**3**), 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (**4**), 5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona (**5**), 2,3-dimetoxi-4-hidroxixantona (**6**), kielcorina (**7**), 3-hidroxi-2-metoxixantona (**8**) e 2-hidroxi-1-metoxixantona (**9**)].

A partir da colaboração estabelecida com a Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettli do Centro de Pesquisas Rene Rachou/CPqRR - Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz – Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil, ambas as espécies foram testadas *in vitro* em *Plasmodium falciparum* no intuito de validar a metodologia de screening inicial de inibição da complexação de β-hematina e continuar a avaliação antimalárica agora por teste biológico. A atividade antimalárica *in vitro* com *Plasmodium falciparum* foi avaliada pela Mestranda Isabela Oliveira de Freitas.

Inicialmente testaram-se apenas os extratos etanólicos antes de se prosseguir com os testes para as frações de partição obtidas destes extratos (Tabela 3). A metodologia empregada nos testes encontra-se descrita no item 3.2.1.2.

Tabela 3: Atividade antimalárica *in vitro* com *Plasmodium falciparum* para os extratos etanólicos das folhas e galhos de *B. glaziovii* e *K. variabilis* avaliada através dos métodos tradicional (microscopia) e de incorporação de hipoxantina tritiada

Extratos	CI_{50} *P. falciparum* (µg/mL)		Conclusão
	tradicional	hipoxantina	
B. glaziovii (EFB)	> 50	> 50	Inativa
B. glaziovii (EGB)	>25	< 25	Inativa
K. variabilis (EFK)	~6,25	< 25	Parcialmente ativa
K. variabilis (EGK)	< 25	<25	Parcialmente ativa
cloroquina (controle)	< 0,062	0,081	Ativa

Pela triagem inicial pode-se constatar que apenas a espécie *K. variabilis* demonstrou potencial antimalárico, sendo consideradas ativas apenas as amostras com CI_{50} < 25 µg/mL. Com base nestes resultados prosseguiu-se com os testes para as frações de partição obtidas dos extratos etanólicos das folhas e galhos desta espécie (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade antimalárica das frações de partição obtidas dos extratos etanólicos das folhas e galhos de *K. variabilis* com *Plasmodium falciparum*, valores de CI_{50}, utilizando o método de hipoxantina em experimentos distintos

Frações	CI_{50} *P. falciparum* (µg/mL)		Conclusão
	Experimento 1*	Experimento 2*	
EHFK	25	29,4	PA
EAFK	1,8	4,9	Ativo
EBFK	23,6	46,3	PA
EAqFK	>50	>50	Inativo
EHGK	4,6	12	Ativo
EAGK	5,8	8,8	Ativo
EBGK	>50	>50	Inativo
EAqGK	>50	>50	Inativo
cloroquina (controle)	0,088	0,070	Ativo

*experimentos realizados em diferentes datas; *PA = parcialmente ativo.

Pelo método de hipoxantina tritiada pode-se observar que as frações hexânica e *n*-BuOH das folhas (EHFK e EBFK) foram parcialmente ativas e que a fração AcOEt das folhas (EAFK) e as frações hexânica e AcOEt dos galhos (EHGK e EAGK) foram consideradas ativas, quando comparadas ao padrão cloroquina. Para estas frações foram realizados experimentos para a

determinação da citotoxicidade com hepatócitos humanos HepG2, seguindo a metodologia descrita no item 3.2.1.3 (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade antimalárica com *Plasmodium falciparum*, média dos valores de CI_{50} e desvio padrão, das frações de partição das folhas e galhos de *K. variabilis*, pelo método de hipoxantina e citotoxicidade contra hepatócitos humanos HepG2 (valores de DL_{50}) e índice de seletividade (IS)

Frações	**CI_{50} (µg/mL)*** $\overline{X}$ **± S.D.**	**DL_{50} (µg/mL)** $\overline{X}$ **± S.D.**	**IS**	**Conclusão**
EAFK	3,4±2,2	48±37	14	Ativo/não tóxico
EAGK	7±2	73±17	10	Ativo/não tóxico
EBFK	35±16	284±154	8	PA**/não tóxico
EHFK	27±3	191±250	7	PA**/não tóxico
EHGK	8±5	14,7±8	1,8	**Ativo/tóxico**
cloroquina	0,039±0,043	317±95	8128	Ativo/não toxico

**Valores referentes à média e desvio padrão de dois experimentos independentes; PA = parcialmente ativo.

O índice de seletividade para a fração EHGK (IS = 1,8) demonstrou que esta apesar de possuir potencial antimalárico com CI_{50} de 8±5 µg/mL apresentou alta toxicidade com relação às demais frações testadas. Segundo a literatura, amostras com índice se seletividade abaixo de 3 são consideradas tóxicas.[68]

Estudos publicados por Bastos e col. têm adotado como critério para atividade antiplasmodial *in vitro*, que amostras com uma CI_{50} < 10 µg/mL apresentam uma boa atividade; CI_{50} de 10 – 50 µg/mL são consideradas moderadamente ativas; CI_{50} de 50 – 100 µg/mL apresentam baixa atividade e CI_{50} > 100 µg/mL são consideradas inativas.[83,84]

De todas as frações testadas destaca-se a atividade de EAFK (CI_{50} de 3,4±2,2 µg/mL) e EAGK (CI_{50} de 7±2 µg/mL), as quais demonstraram além de uma boa atividade quando comparadas ao padrão utilizado cloroquina (CI_{50} = 0,039±0,043 µg/mL), um bom índice de seletividade, com IS de 14 e 10, respectivamente.

Os resultados obtidos no teste *in vitro* utilizando cepas de *Plasmodium falciparum* para as frações obtidas do extrato que demonstrou maior potencial antimalárico (EGK) corroboraram os resultados obtidos no "screening" realizado pelo teste de inibição da complexação de β-hematina, reafirmando o potencial antimalárico da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK),

sendo assim as xantonas isoladas desta fração (Figura 15), foram ensaiadas nas mesmas cepas de *Plasmodium falciparum* (Tabela 6).

Tabela 6: Atividade antimalárica das xantonas obtidas da fração EAGK, no teste *in vitro* utilizando cepas de *Plasmodium falciparum*, pelo método de hipoxantina tritiada

Xantonas de EAGK	CI_{50} (µg/mL) $\overline{X}$ ± S.D	Conclusão
1+2+3	50>IC_{50}>25	IN
4	26,30	IN
5	IND	IND
6	19,34	PA
7	6,8±0,3	AT
8	22,74	IN
9	50>IC_{50}>25	IN
cloroquina	0,039±0,043	AT

IN = inativo; AT = ativo; PA = parcialmente ativo; IND = indeterminado.

Pela avaliação dos testes realizados *in vitro* pode-se observar que apenas a xantona **7** (kielcorina), pertencente à subclasse dos xantonolignóides foi considerada ativa com CI_{50} de 6,8 µg/mL, sendo que dentre as xantonas isoladas da fração EAGK esta é a mais apolar delas, podendo seu maior potencial quando comprada as demais xantonas isoladas (oxigenadas) estar relacionado a maior lipofilia desta substância, porém só se pode confirmar seu mecanismo de ação através de estudos mais aprofundados de relação estrutura atividade (REA).

As frações ativas e que demonstraram baixa toxicidade (EHFK, EAFK, EBFK e EAGK) estão em fase de avaliação *in vivo* utilizando ratos infectados por *Plasmodium berghei*. Esta atividade está sendo realizada sob a supervisão da Profa. Dra. Antoniana Ursine Krettli do Centro de Pesquisas Rene Rachou/CPqRR - Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz – Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil.

4.2.2 Avaliação da atividade tripanocida

Os extratos e frações de *K. variabilis* e *B. glaziovii* tiveram seu potencial tripanocida avaliados na forma epimastigota de *Tripanosoma cruzi*.

Dentre os extratos e frações obtidos dos galhos e folhas de *B. glaziovii* testados, observou-se que as folhas demonstraram melhor potencial principalmente a fração hexânica (EHFB) com CI_{50} de 58,42 µg/mL.

Os extratos e frações de *K. variabilis* apresentaram melhores resultados de CI_{50} quando comparados aos da espécie *B. glaziovii*. Conforme demonstrado na Tabela 7, o extrato e frações dos galhos de *K. variabilis* mostraram-se mais ativos que os das folhas, sendo que dentre as amostras testadas para os galhos destaca-se o potencial tripanocida do extrato EtOH (EGK), assim como suas frações de partição hexânica (EHGK) e AcOEt (EAGK) com valores de CI_{50} de 9,46, 6,98 e 30,33 µg/mL. Este resultado quando comparado com o fármaco atualmente usado contra a Doença de Chagas, o bezonidazol (CI_{50} de 11,11 µg/mL), incentiva o estudo na busca de metabólitos secundários nestas matrizes, que tenham ação atiprotozoária, para servirem de modelos no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da Doença de Chagas.

Tabela 7: Atividade tripanocida dos extratos e frações de *K. variabilis* e *B. glaziovii*

Extratos e frações	**CI_{50} (µg/mL)**	**Extratos e frações**	**CI_{50} (µg/mL)**
EFK	111,46	EFB	212,93
EHFK	15,74	EHFB	58,42
EAFK	104,90	EAFB	97,96
EBFK	306,48	EBFB	539,49
EAqFK	718,20	EAqFB	519,22
EGK	9,46	EGB	469,05
EHGK	6,98	EHGB	107,63
EAGK	30,33	EAGB	105,13
EBGK	489,52	EBGB	286,55
EAqGK	537,59	EAqGB	508,27
benzonidazol[+]	11,11	benzonidazol[+]	11,11

[+] controle positivo.

Baseado nos resultados promissores obtidos para os extratos e frações de *K. variabilis*, decidiu-se testar as xantonas isoladas da fração EAGK (CI_{50} de 30,33 µg/mL). Estas substâncias foram testadas nas cepas Y e Bolívia de *T. cruzi* (Tabela 8).

Tabela 8: Atividade antichagásica das xantonas isoladas da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* em µg/mL

Substâncias	CI_{50} (Cepa Y)	CI_{50} (Cepa Bolívia)
1 + 2 + 3	ND	89,1
4	87,0	36,1
5	ND	70,5
6	ND	68,6
7	ND	ND
8	110,6	125,0
9	124,1	130,2
benzonidazol[+]	9,0	25,6

[+] controle positivo; ND = não determinado.

Para as xantonas testadas pode-se observar que a com estrutura pertencente à subclasse dos xantonolignóides, a kielcorina (**7**) mostrou-se inativa nas cepas testadas. Todas as demais xantonas apresentaram atividade fraca quando comparadas à atividade da fração de onde foram isoladas. A substância com maior potencial foi a xantona **4** (3,4-diidroxi-2-metoxixantona) com CI_{50} de 87,0 e 36,1 µg/mL para as cepas Y e Bolívia, destacando-se para a atividade para a cepa Bolívia, mais resistente ao padrão, o benzonidazol. Estruturalmente a xantona mais ativa difere das demais identificadas por apresentar um grupamento catecólico, o qual pode estar relacionado à maior atividade desta substância.

4.2.3 Atividade antioxidante

4.2.3.1 Triagem antioxidante para os extratos etanólicos e frações de partição das espécies *B. glaziovii* e *K. variabilis*

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos e suas respectivas frações de partição das folhas e galhos de *B. glaziovii* e *K. variabilis* foi avaliada por métodos espectrofotométricos utilizando-se os radicais livres DPPH e ABTS, conforme procedimento descrito no item 3.2.3.

Observando-se os valores de CI_{50} (concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos radicais livres) demonstrado pela espécie *B. gaziovii* pode-se constatar que para as folhas apenas a fração *n*-BuOH (EBFB) apresentou

moderada atividade sequestradora de radicais livres com CI_{50} de 35,5 e 24,3 µg/mL para os radicais DPPH e ABTS, respectivamente, quando comparada ao controle positivo utilizado, a rutina com CI_{50} de 6,2 e 7,4 µg/mL.

O extrato etanólico dos galhos de *B. glaziovii* (EGB) demonstrou potencial antioxidante com CI_{50} de 11,6 e 17,2 µg/mL para os radicais DPPH e ABTS. Analisando-se as frações de partição para este extrato pode-se inferir que apesar das frações AcOEt (EAGB) e *n*-BuOH (EBGB) apresentarem atividade sequestradora de radicais livres, esta atividade foi inferior à atividade obtida para o extrato de partida, concluindo-se que a partição do extrato ativo levou a uma perda de atividade, sugerindo que a maior atividade para o extrato total dos galhos pode estar ligada algum sinergismo entre as moléculas constituintes deste extrato (Tabela 9). No entanto o estudo feito é preliminar para inferir que houve perda de atividade por sinergismo.

Para a espécie *K. variabilis* observa-se que com exceção das frações hexânica e hidroalcoólica tanto os extratos etanólicos quanto as frações de partição AcOEt e *n*-BuOH dos galhos e folhas demonstraram ser eficientes no sequestro de radicais livres quando comparadas ao controle positivo rutina. A comparação dos valores de CI_{50} apresentados para as frações ativas dos galhos e folhas demonstra que as frações AcOEt (EAFK) e *n*-BuOH (EBFK) das folhas possuem maior potencial antioxidante com CI_{50} de 3,5 e 4,4 µg/mL para o radical DPPH e CI_{50} de 6,6 e 3,1 µg/mL para o radical ABTS, respectivamente. Ainda por comparação dos valores de CI_{50} destas frações com o respectivo extrato etanólico de origem (EFK), o qual apresentou CI_{50} de 7,5 e 7,0 µg/mL para os radicais DPPH e ABTS, respectivamente observa-se que houve um pequeno aumento na atividade sequestradora de radicais quando o mesmo foi particionado isto pode estar relacionado à concentração das moléculas ativas após um fracionamento (Tabela 9).

Tabela 9: Atividade antioxidante com os radicais livres DPPH e ABTS para os extratos etanólicos e frações de partição de *B. glaziovii* e *K. variabilis*

Extratos e frações *B. glaziovii*	CI_{50} (µg/mL) DPPH	CI_{50} (µg/mL) ABTS	Extratos e frações *K. variabilis*	CI_{50} (µg/mL) DPPH	CI_{50} (µg/mL) ABTS
EFB	ND	ND	EFK	7,5	7,0
EHFB	ND	ND	EHFB	>66,6	ND
EAFB	ND	35,9	EAFK	3,5	6,6
EBFB	35,5	24,3	EBFK	4,4	3,1
EAqFB	ND	ND	EAqFK	27,4	27,5
EGB	11,6	17,2	EGK	13,9	2,8
EHGB	ND	ND	EHGK	65,9	47,2
EAGB	16,9	11,8	EAGK	13,4	13,5
EBGB	22,9	23,3	EBGK	4,9	3,2
EAqGB	ND	ND	EAqGK	46,6	46,6
rutina^{+}	6,2	7,4	rutina^{+}	6,2	7,4

$^{+}$rutina: controle positivo; ND = não determinado.

As frações mais ativas AcOEt e *n*-BuOH das folhas de *K. variabilis* foram submetidas a estudo químico.

4.2.3.2 Estudo químico da fração AcOEt das folhas de *K. variabilis* (EAFK)

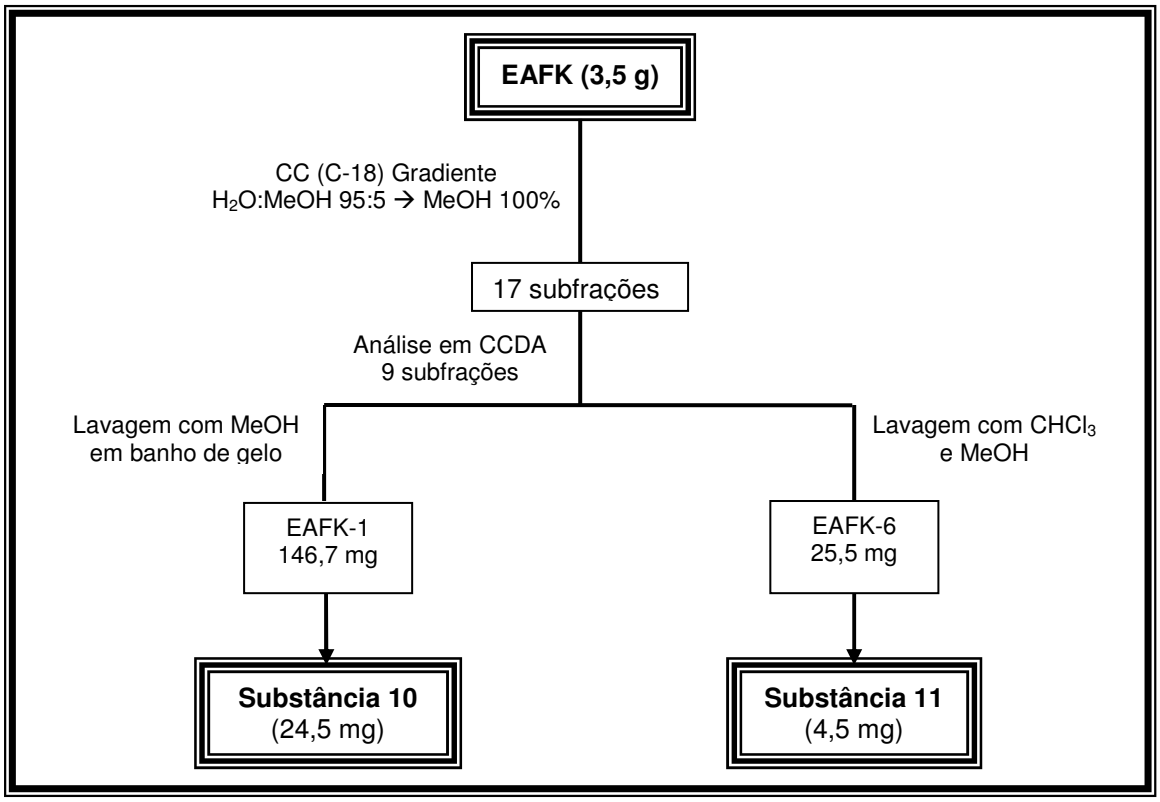
Inicialmente a fração EAFK (3,5 g) foi submetida à CC (ϕ = 4,5 cm; 120 g de fase estacionária) de fase reversa C-18 sob pressão reduzida com gradiente de eluição H_2O/MeOH 95:5 → 0:100, fornecendo 17 subfrações. A reunião das subfrações através da análise dos seus perfis cromatográficos por CCDA culminou em 9 subfrações.

Na subfração EAFK-1 houve a formação de um preciptado amarelo claro, este foi separado do sobrenadante e lavado com MeOH em banho de gelo. O precipitado denominado por FK-1 foi submetido à CCDA que indicou a pureza da substância, esta foi submetida às análises espectroscópicas de RMN para determinação estrutural. Após as análises espectroscópicas e espectrométricas pode-se determinar a substância FK-1 como sendo a substância pertencente à classe dos flavonóides, a quercitrina (**10**).

A subfração EAFK-6 apresentou a formação de um precipitado amarelo claro que foi separado e lavado com diferentes solventes ($CHCl_3$ e MEOH) e posteriormente submetido à CCDA, o que indicou a pureza desta substância. Esta foi denominada por FK-2 e então submetida às análises espectroscópicas

e espectrométricas, por intermédio das quais foi determinada como sendo o biflavonóide, podocarpusflavona A (**11**).

Os procedimentos empregados no isolamento das substâncias **10** e **11** estão descritos no Fluxograma 3.



Fluxograma 3: Estudo químico da fração acetato de etila das folhas de *K. variabilis* (EAFK), isolamento das substâncias **10** e **11**.

4.2.3.3 Estudo químico da fração *n*-BuOH das folhas de *K. variabilis* (EBFK)

A fração *n*-butanólica das folhas de *K. variabilis* (EBFK - 3,5 g) foi submetida à cromatografia de permeação em gel (Sephadex®, LH-20) em modo isocrático utilizando MeOH como eluente resultando em 35 subfrações, as quais foram avaliadas e reunidas de acordo com seu perfil em CCDA num total de 7 subfrações.

As subfrações foram analisadas em CLAE-DAD [Coluna C-18; MeOH:H_2O (5 à 100% MeOH); 230 < λ < 400 nm; 1 mL/min). Os espectros de

absorção na região do ultravioleta das substâncias presentes nestas subfrações exibiram absorções típicas de flavonóides.[85]

As análises por CLAE-DAD demonstraram que a subfração EBFK-2, aparentemente apresentou uma menor quantidade de substâncias. Diante destas informações optou-se por fracioná-la em CLAE-UV utilizando-se coluna C-18 em sistema isocrático: MeOH:H_2O (48:52) dopada com 0,1% HOAc e fluxo de12 mL/min, em 30 min, previamente otimizado.

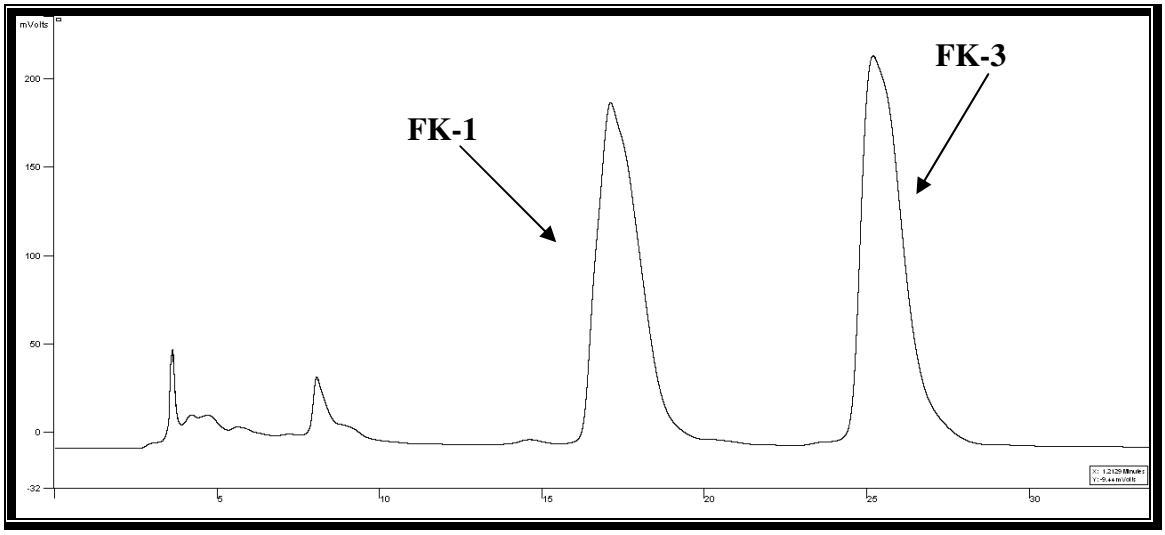
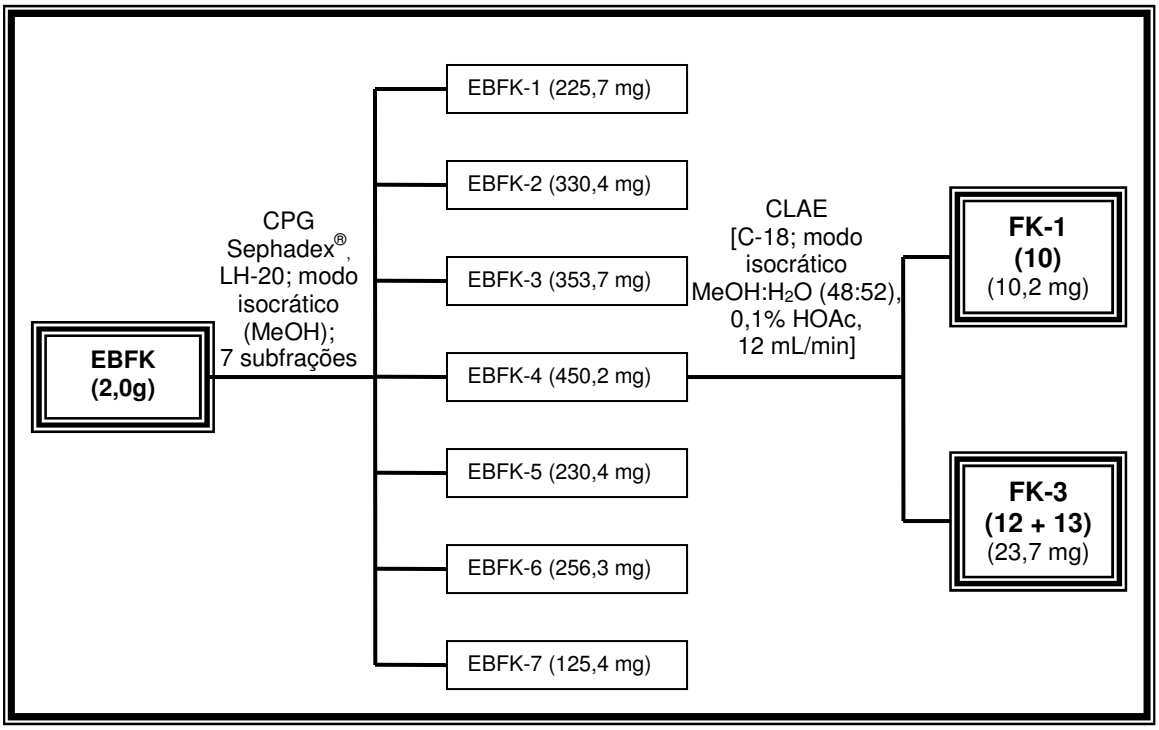


Figura 16: Cromatograma preparativo da subfração EBFK-2 em CLAE-UV (λ = 254 nm) [Coluna C-18; MeOH:H_2O (48:52) dopada com 0,1% HOAc; 12 mL/min, em 30 min)].

O fracionamento de EBFK-2 (Figura 16) resultou no reisolamento da substância **10** (quercitrina) anteriormente isolada da fração EAGK e no isolamento de FK-3 (Fluxograma 4). Após análises espectroscópicas e espectrométricas de FK-3 constatou-se que se tratava de uma mistura de dois flavonóis, os quais foram identificados como sendo quercetina-3-*O*-glicosídeo (**12**) e quercetina-3-*O*-galactosídeo (**13**).



Fluxograma 4: Estudo químico da fração AcOEt das folhas de *K. variabilis* (EAFK), reisolamento da substância **10** e isolamento das substâncias **12** e **13**.

4.2.3.4 Avaliação antioxidante das substâncias isoladas das frações AcOEt (EAFK) e *n*-BuOH (EBFK) dos galhos de *K. variabilis*

O estudo químico das frações (EAFK e EBFK) as quais demonstraram maior potencial para sequestrar radicais livres no teste com DPPH e ABTS resultou no isolamento do flavonol (**10**), da biflavona (**11**) e da mistura de dois flavonóis (**12** + **13**), os quais foram identificados como sendo quercitrina (**10**), isolada de ambas as frações, podocarpusflavona A (**11**) isolada de EAFK e da mistura de quercetina-3-*O*-glicosídeo (**12**) e quercetina-3-*O*-galactosídeo (**13**) isolado de EBFK (Figura 17).

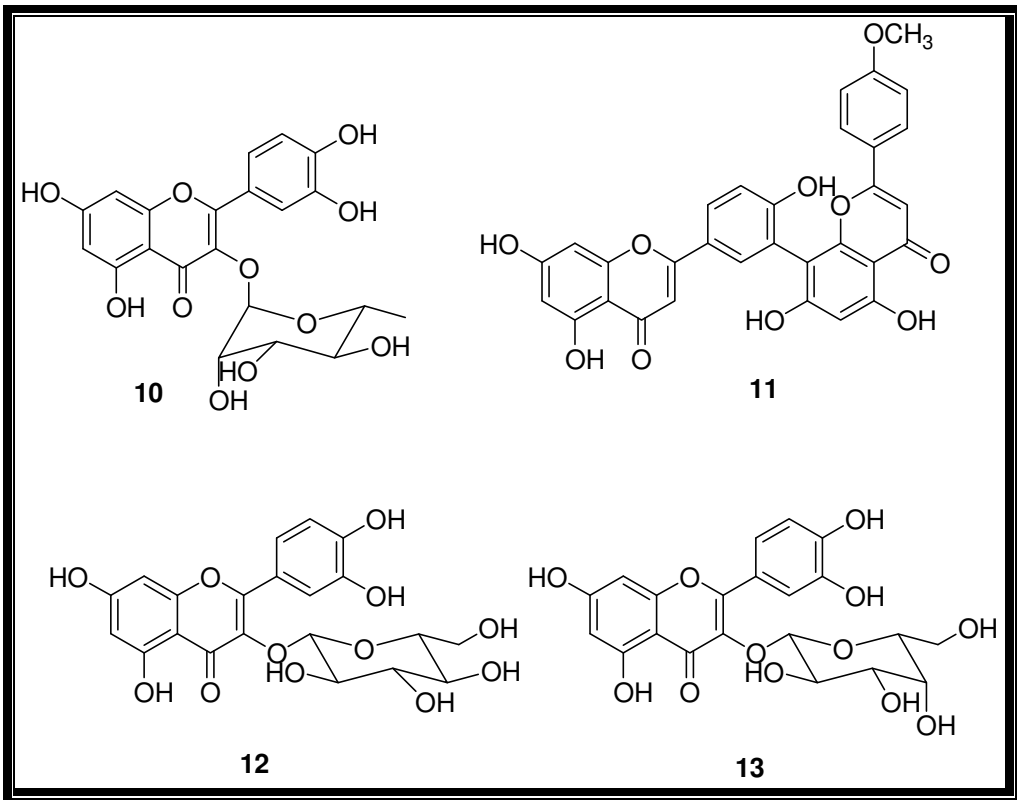


Figura 17: Flavonóides isolados de *K. variabilis* [(quercitrina (**10**), podocarpusflavona A (**11**), quercetina-3-*O*-glicosídeo (**12**) e quercetina-3-*O*-galactosídeo (**13**)].

Os flavonóides isolados de *Kielmeyera variabilis* tiveram seu potencial antioxidante avaliado nos testes químicos com DPPH e ABTS e comparados à rutina (controle positivo).

Os ensaios com os radicais DPPH e ABTS demonstraram que a mistura contendo quercetina-3-*O*-glicosídeo **(12)** e quercetina-3-*O*-galactosídeo (**13**) exibiu potente ação sequestradora de radicais livres, com CI_{50} = 4,1 e 5,0 µg/mL para DPPH e ABTS, respectivamente, quando comparada ao controle positivo, a rutina com CI_{50} de 6,2 e 7,4 µg/mL (Tabela 10).

Tabela 10: Atividade antioxidante apresentada pelas substâncias isoladas das frações ativas de *K. variabilis* utilizando os radicais DPPH e ABTS; valores de CI_{50} expressos em µgmL

Frações e substâncias puras	CI_{50} (µg/mL) DPPH	CI_{50} (µg/mL) ABTS
EAFK	3,5	6,6
EBFK	4,4	3,1
10	9,1	12,2
11	ND	ND
12 + **13**	4,1	5,0
rutina[+]	6,2	7,4

[+]rutina: controle positivo; ND = não determinado.

Ao se comparar as substâcias isoladas com suas respectivas frações de origem pode-se observar que a substância **10** (quercitrina) demostrou um potencial sequestrador de radicais livres inferior ao da fração EAFK de onde esta foi isolada, sugerindo que esta fração possue outras substâncias potencialmente sequestradoras de radicais livres que não foram isoladas. Pelos resultados obtidos para as substâncias isoladas da fração EBFK observpu-se que a mistura contendo as substâncias quercetina-3-*O*-glicosídeo **(12)** e quercetina-3-*O*-galactosídeo (**13**) demostrou um potencial sequestrador de radicais livres comparável à fração de onde foram obtidas.

Pelos resultados obtidos concluiu-se que os flavonóides que possuem grupamento catecólico no anel B (**10**, **12** e **13**) apresentaram CI_{50} (concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais livres) superiores àquela mostrada pelo flavonóide que apresenta um anel B monoidroxilado (**11**), reafirmando a importância do número de hidroxilas fenólicas para a ação sequestradora de radicais livres. A literatura descreve que substâncias catecólicas são excelentes sequestradoras de radicais livres.[86] Os flavonóides testados que apresentaram capacidade sequestradora de radicais livres (**10**, **12** e **13**) possuem a mesma aglicona diferindo apenas na unidade de açúcar, porém a mistura de **12** e **13** foi mais ativa que a substância **10**. A substância **11** não demonstrou significante atividade sequestradora de radicais livres.

4.2.4 Atividade antibacteriana

O isolamento bioguiado pela atividade antibacteriana nas cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* foi realizado no "Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy – School of Pharmacy – University of London", Londres – Inglaterra, sob a supervisão do Prof. Dr. Simon Gibbons.

Esta parte do trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana das espécies *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis* em seis diferentes cepas de MRSA assim como o isolamento bioguiado dos compostos responsáveis por tal atividade.

4.2.4.1 Triagem antibacteriana para os extratos etanólicos e frações de partição das espécies *B. glaziovii* e *K. variabilis* e isolamento bioguiado

Dando início aos estudos de avaliação do potencial antimicrobiano, os extratos etanólicos e suas respectivas frações de partição das folhas e galhos de *B. glaziovii* e *K. variabilis* foram testados na cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* (SA-1199B).

O teste para os extratos e frações foi realizado na concentração inicial de 512 µg/mL conforme descrito no procedimento experimental item 3.2.4.

Os dados de CIM revelaram uma ação antibacteriana superior para a espécie *K. variabilis* quando comparada à espécie *B. glaziovii*, a qual demonstrou ser inativa nas concentrações testadas, sendo que apenas as frações EHFB e EAGB (CIM de 512 e 256 µg/mL) demonstraram uma fraca atividade.

A comparação dos valores de CIM entre os extratos etanólicos dos galhos e folhas de *K. variabilis* demonstrou que os galhos possuem um maior potencial antibacteriano com CIM de 32 µg/mL e que dentre suas frações de partição a fração mais promissora foi a fração hexânica (EHGK) com CIM de 16 µg/mL atividade esta superior à atividade do controle utilizado, a norfloxacina (Tabela 11).

Tabela 11: Atividade antibacteriana dos extratos etanólicos e frações de partição das folhas e galhos de *B.glaziovii* e *K.variabilis*

B. glaziovii	**CIM (µg/mL)**	***K. variabilis***	**CIM (µg/mL)**
EFB	>512	EFK	128
EHFB	512	EHFK	64
EAFB	>512	EAFK	128
EBFB	>512	EBFK	256
EAqFB	512	EAqFK	>512
EGB	>512	EGK	32
EHGB	>512	EHGK	16
EAGB	256	EAGK	64
EBGB	>512	EBGK	256
EAqGB	>512	EAqGK	>512
norfloxacina[+]	32	norfloxacina*	32

[+] Norfloxacina: controle positivo.

Salienta-se para a potencialização da atividade após o fracionamento do extrato etanólico sugerindo que a substância responsável pela atividade ou o conjunto de substâncias ativas devem estar concentrados na fração EHGK demonstrando CIM de 16 µg/mL. Devido a estes fatores a fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* (EHGK) foi selecionada para dar continuidade ao estudo de atividade antibacteriana prosseguindo-se para o isolamento bioguiado.

4.2.4.2 Estudo químico bioguiado da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* (EHGK)

O estudo químico da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* objetivou o isolamento dos constituintes responsáveis pela atividade antibateriana. Com esta finalidade, o fracionamento cromatográfico foi guiado por teste de susceptibilidade antibacteriana utilizando a cepa de *S. aureus* (SA-1199B). As frações obtidas que apresentaram maior potencial antibacteriano foram prioritariamente selecionadas para dar continuidade ao estudo fitoquímico.

Dando início ao fracionamento da fração hexânica dos galhos (EHGK) 1,0 g desta foi submetido à CPG (Sephadex®, LH-20) utilizando-se como gradiente de eluição as fases móveis Hex/$CHCl_3$ (90:10 → 0:100) e $CHCl_3$/MeOH (1:1). As frações obtidas foram reunidas com base nos seus comportamentos em CCDA culminando em seis subfrações.

Todas as frações obtidas do fracionamento de EHGK tiveram seus potenciais antibacterianos avaliados utilizando-se a cepa SA-1199B (Tabela 12).

Tabela 12: Atividade antibacteriana das frações obtidas de EHGK para a cepa SA-1199B

Frações	Massa (mg)	CIM (µg/mL) SA-1199B
EHGK-1	756,5	2
EHGK-2	70,4	8
EHGK-3	42,1	8
EHGK-4	33,9	256
EHGK-5	22,3	512
EHGK-6	35,0	128
norfloxacina[+]		32

[+] norfloxacina: controle positivo.

A purificação da fração hexânica dos galhos (EHGK) por CPG levou à potencialização da atividade, o que pode ser constatado pelos valores de CIM para as frações EHGK-1, EHGK-2 e EHGK-3 com CIM de 2,8 e 8 µg/mL.

A fração mais ativa (EHGK-1) também apresentou maior quantidade de massa e com base nestes resultados deu-se continuidade ao estudo fitoquímico biomonitorado da fração EHGK-1. É importante ressaltar mais uma vez que o fracionamento de EHGK (CIM de 16 µg/mL) levou a potencialização da atividade observada em EHGK-1 (CIM de 2 µg/mL), indicando que o procedimento experimental bioguiado foi eficiente.

Parte da fração EHGK-1 (740,0 mg) foi submetida à coluna de sílica gel utilizando-se gradiente de eluição Hex/AcOEt (100:0 → 0:100) e AcOEt/MeOH (100:0 → 0:100). As frações coletadas foram submetidas à CCDA e reunidas em 17 subfrações de acordo com as características observadas (Tabela 13).

Tabela 13: Subfrações obtidas da coluna em sílica gel de EHGK-1

Código da fração	Massa (mg)	Código da fração	Massa (mg)
EHGK-1.1	2,6	EHGK-1.10	48,3
EHGK-1.2	0,5	EHGK-1.11	17,9
EHGK-1.3	47,1	EHGK-1.12	4,5
EHGK-1.4	3,1	EHGK-1.13	6,2
EHGK-1.5	7,8	EHGK-1.14	7,3
EHGK-1.6	6,4	EHGK-1.15	171,3
EHGK-1.7	9,2	EHGK-1.16	113,5
EHGK-1.8	222,7	EHGK-1.17	4,0
EHGK-1.9	39,0		

A seguir, após avaliação do perfil cromatográfico a fração EHGK-1.8 (222,7 mg) foi submetida a novo fracionamento utilizando-se extração em fase sólida (EFS) em cartucho de sílica gel e gradiente de eluição Hex/AcOEt (0:100 → 100:0). Após análise em CCDA foram obtidas 4 subfrações (Tabela 14).

Tabela 14: Frações obtidas do fracionamento de EHGK-1.8 por EFS

Código da fração	Massa (mg)	Código da fração	Massa (mg)
EHGK-1.8.1	55,9	EHGK-1.8.3	21,3
EHGK-1.8.2	92,7	EHGK-1.8.4	10,2

A purificação de EHGK-1.8.1 (55,9 mg) (Figura 18) empregando CCDP em fase normal e gradiente de eluição Hex/AcOEt 5%, culminou no isolamento da subfração denominada por HGK-1 (23,5 mg). Esta foi isolada como um óleo amarelo e após as análises espectroscópicas de RMN pode-se constatar que era composta por duas substâncias, sendo estas, dois derivados prenilados do floroglucinol, porém a completa identificação dos constituintes desta mistura ainda não foi concluída.

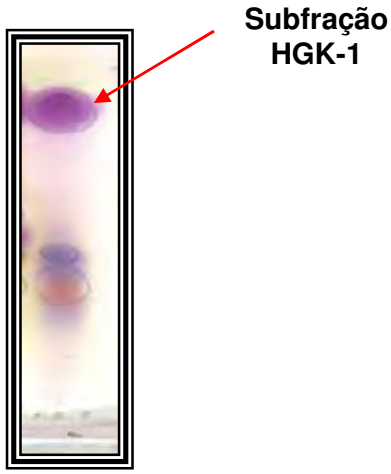


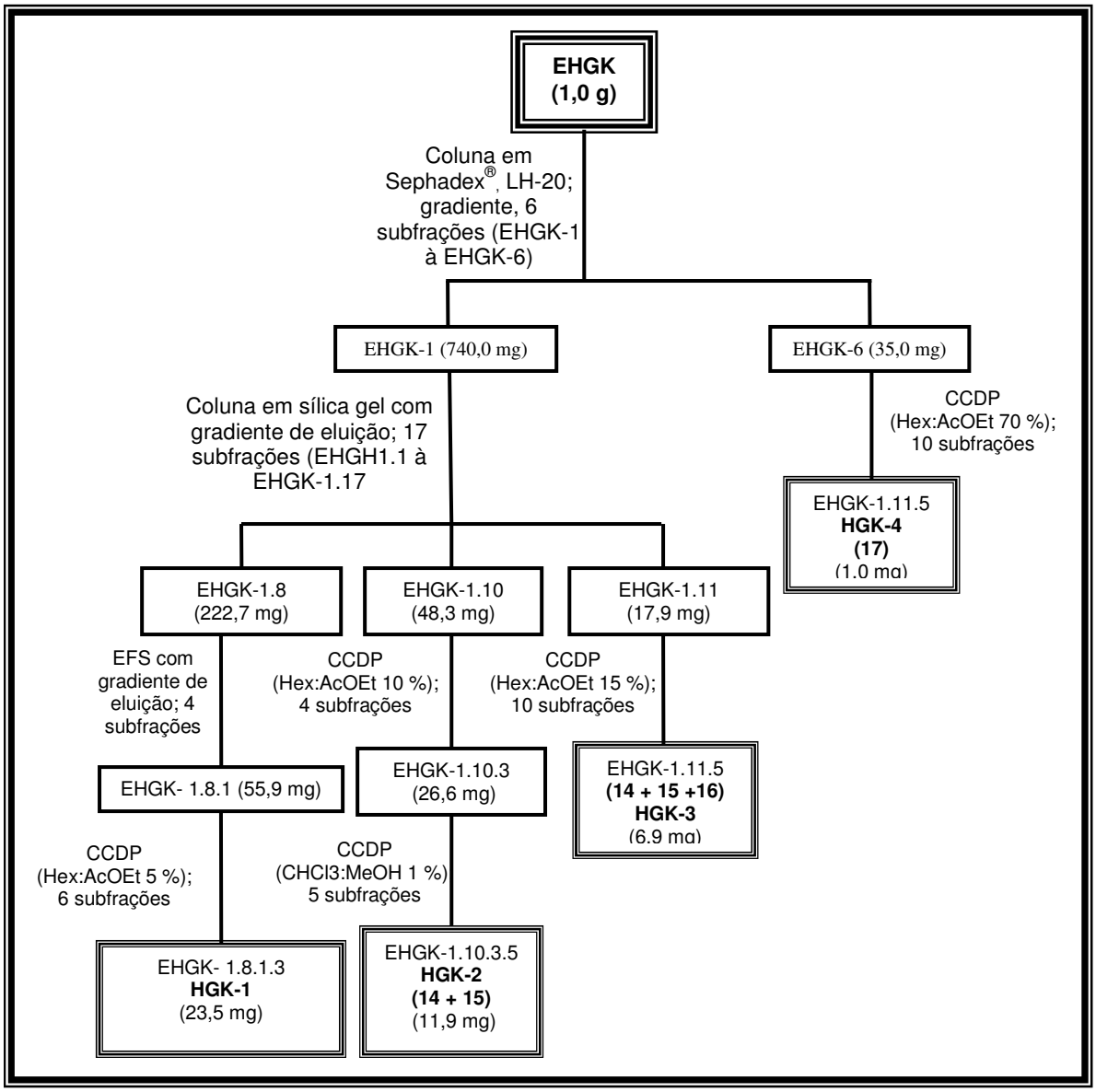
Figura 18: CCDA para a fração EHGK-1.8.1 em Hex/AcOEt 5%.

Por CCDP, utilizando como eluente Hex/AcOEt 10%, foram obtidas 4 subfrações de EHGK-1.10. Destas a subfração EHGK-1.10.3 (26,6 mg) devido a seu perfil cromatográfico e maior quantidade de massa foi selecionada para dar prosseguimento à purificação. EHGK-1.10.3 foi submetida à nova CCDP em $CHCl_3$/MeOH 1% de onde foram obtidas 6 subfrações, resultando no isolamento de HGK-2 (11,9 mg). Esta após as análises espectroscópicas e espectrométricas foi determinada como sendo a mistura conhecida dos esteróides β-sitosterol (**14**) e estigmasterol (**15**).

Também pela técnica de CCDP em Hex/AcOEt 15% foi obtida a subfração denominada por HGK-3 (6,9 mg) a partir da subfração EHGK-1.11 (17,9 mg). Esta foi caracterizada também como uma mistura dos esteróides β-sitosterol (**14**) e estigmasterol (**15**) e além destes também se pode determinar nesta mistura a substância ergost-5-en-3-ol (**16**).

O estudo químico da subfração inativa EHGK-6 (35 mg) por CCDP em Hex/AcOEt 70% resultou em 10 subfrações e na purificação da substância denominada por HGK-4 (1,0 mg). Esta foi identificada por meio da análise de seus dados espectroscópicos e espectrométricos como a xantona conhecida por osajaxantona (**17**).

Todos os procedimentos que resultaram na identificação de substâncias da fração EHGK estão descritos no Fluxograma 5.



Fluxograma 5: Estudo químico da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* (EHGK), isolamento de HGK-1, HGK-2, HGK-3 e HGK-4.

As misturas de esteróides (HGK-2 e HGK-3) e a mistura de derivados do floroglucinol (HGK-1) isoladas da fração ativa (EHGK-1) foram testadas nas cepas de bactérias multirresistentes: SA-1199B, Xu212, ATCC 25943, RN4220, EMRSA15 e EMRSA16. A fração ativa EHGK-1 também teve seu potencial reavaliado para a cepa SA-1199B e avaliado nas demais cepas bacterianas multiresistentes citadas (Tabela 15).

Tabela 15: CIMs da fração EHGK-1 e misturas purificadas desta fração HGK-1, HGK-2 e HGK-3 em µg/mL

Código	SA-1199B	Xu212	ATCC 25943	RN4220	EMRSA 15	EMRSA 16
EHGK-1	2	0,5	1	0,5	1	0,5
HGK-1	2	0,25	2	0,25	1	0,5
HGK-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HGK-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
norfloxacina*	32	8	0,5	0,5	0,5	128

[+] norfloxacina: controle positivo; ND = não determinado.

Pode-se observar que a mistura denominada por HGK-1 demonstrou uma notável atividade nas cepas de *S. aureus* multirresistentes testadas, com valores de CIM entre 0,25 e 2 µg/mL, sendo esta uma potente atividade quando comparada ao controle positivo (norfloxacina). Destaca-se sua atividade nas cepas SA-1199B (susceptível a vários antibacterianos) e EMRSA16 (um isolado clínico resistente à meticilina) para as quais o controle positivo norfloxacina apresentou CIM de 32 e 128 µg/mL, enquanto HGK-1 apresentou CIM de 2 e 0,5 µg/mL, respectivamente. Para a cepa Xu212 (TetK, as quais são resistentes a eritromicina e tetraciclina) a mistura HGK-1 demonstrou um valor de CIM de 0,25 µg/mL enquanto o controle positivo apresentou CIM de 8 µg/mL. Para a cepa resistente a macrolídeos RN4220, HGK-1 apresentou CIM de 0,25 µg/mL superior ao controle positivo. Para as cepas ATCC 25943 (susceptível a vários antibacterianos) e EMRSA15, HGK-1 (CIM de 2 e 1 µg/mL, respectivamente) apesar de ativo não superou a atividade apresentada pelo controle positivo (CIM de 0,5 µg/mL) para ambas as cepas de microrganismos.

As misturas conhecidas testadas HGK-2 e HGK-3 foram inativas nas cepas de *S. aureus* multirresistentes testadas.

Com base nestes resultados pode-se inferir que a mistura **HGK-1** é provavelmente a responsável pela atividade observada para a fração EHGK.

A substância HGK-4 (osajaxantona) que foi isolada de uma fração não ativa não foi testada devido à baixa quantidade de massa obtida.

4.2.4.3 Atividade antibacteriana das xantonas isoladas de *K. variabilis*

Avaliações biológicas de substâncias das classes das xantonas revelam que estes compostos normalmente apresentam menores efeitos colaterais e baixa tendência a induzir resistência a patógenos quando comparadas a antibióticos convencionais e substâncias antibacterianas sintéticas, xantonas naturais são conhecidas por suas potentes propriedades inibitórias a MRSA.[73]

Devido às indicações da literatura de que xantonas são substâncias com potencial antibacteriano e ao fato da fração AcOEt dos galhos (EAGK), com CIM de 64 µg/mL, ter sido a segunda fração mais ativa dos galhos de *K. variabilis* e desta terem sido isoladas substâncias pertencentes à classe das xantonas estas foram submetidas a avaliação antimicrobiana, utilizando-se as mesmas cepas de microrganismos (MRSA) testadas anteriormente (Tabela 16).

Tabela 16: CIMs para as xantonas isoladas da fração EAGK CIM em µg/mL

Código	SA-1199B	Xu212	ATCC 25943	RN4220	EMRSA 15	EMRSA 16
1 + 2 +3	64	64	128	64	128	32
4	32	32-16	64	32	64	16
5	128-64	ND	128	ND	ND	64
6	128-64	128	128	ND	ND	64
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	64	64	64	64	64	32
9	64	128	64	64	64	32
norfloxacina[+]	32	8	0,5	0,5	0,5	128

[+] norfloxacina: controle positivo; ND = não determinado.

A avaliação do potencial antimicrobiano das xantonas isoladas de EAGK demonstrou que estas possuem uma atividade que vai de moderada a fraca estando entre 16-128 µg/mL, para as diferentes cepas bacterianas. A xantona com maior potencial foi a xantona **4** (3,4-diidroxi-2-metoxixantona), a qual demonstrou uma CIM de 16 µg/mL para a cepa EMRSA16, quando comparada ao controle positivo norfloxacina (CIM de 128 µg/mL).

A xantona **4** difere das demais por ser a única a possuir um grupamento catecólico em sua estrutura. A xantona **7** (kielcorina), ativa em *Plasmodium falsiparum*, foi considerada inativa para as cepas de microrganismos testadas.

4.2.4.4 Avaliação da concentração mínima bactericida

De todas as misturas purificadas e substâncias isoladas que tiveram sua CMI determinada, apenas **HGK-1** demonstrou ser potencialmente antibacteriana, com base nestes resultados esta foi selecionada para estudo de CMB (concentração mínima bactericida), para se determinar se esta substância tem potencial bactericida ou bacteriostático.

Após 24 h de incubação das Placas de Petri contendo as soluções da amostra em diferentes concentrações de microrganismos, as placas foram observadas a olho nu para verificação de reaparecimento de colônias bacterianas.

Apenas a cepa SA-1199B foi testada e pode-se observar que ouve crescimento bacteriano nas seguintes concentrações 1, 2, 4, 8, 16 e 32 µg/mL. Levando-se a conclusão de que **HGK-1** possui um potencial bacteriostático, pois depois de colocadas novamente em meio de cultura nas placas de Petri as colônias voltaram a ser formadas.

4.2.5 Atividade antifúngica

4.2.5.1 Avaliação da atividade antifúngica (patógenos humanos): *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*

Dando início aos estudos antifúngicos das espécies *B. glaziovii* e *K. variabilis* os extratos e frações de partição destas espécies foram testados em quatro fungos oportunistas: *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*.

Para a espécie *B. glaziovii* os melhores resultados foram obtidos para os galhos sendo que a fração AcOEt (EAGB) demonstrou melhor atividade com CIM de 62,5 µg/mL para as cepas *Candida kusei* e *C. neoformans,* sendo esta atividade considerada moderada. Ainda para os galhos foi observada uma

atividade também moderada para *C. Krusei* de 62,5 µg/mL para a fração *n*-butanólica (EBGB).

Os dados de CIM (concentração inibitória mínima capaz de inibir 100 % o crescimento fúngico) revelaram uma ação antifúngica superior para os extratos e frações de *K. variabilis* quando comparada à espécie *B. glaziovii* (Tabela 17).

As atividades mais relevantes foram conseguidas com o fungo *Candida krusei*, onde o extrato e as frações das folhas de *K. variabilis* demonstram forte atividade, destacando-se para o extrato etanólico das folhas desta espécie (EFK; CIM de 7,81 µg/mL), também observado para suas frações de partição hexânica (EHFK; CIM = 31,25 µg/mL), AcOEt (EAFK; CIM de 15,6 µg/mL) e *n*-BuOH (EBFK; CIM de 31,25 µg/mL). Dentre as frações de partição das folhas de *K. variabilis* destaca-se para a fração de onde foram isoladas substâncias da classe dos flavonóides EAFK, a qual apresentou a melhor atividade, quando comparada aos padrões utilizados anfotericina B (CIM de 2,0 µg/mL), sendo superior ao segundo padrão de referência fluconazol (CIM de 64,0 µg/mL).

Forte atividade também foi notada com o mesmo fungo para os extratos dos galhos de *K. variabilis*, sendo as atividades mais pronunciadas observadas para o fungo *Candida krusei* pelo extrato bruto (EGK; CIM de 31,25 µg/mL) e pela fração de partição AcOEt (EAGK; CIM de 15,6 µg/mL), superiores à atividade do padrão fluconazol (CIM de 64,0 µg/mL). Da fração mais ativa obtida dos galhos de *K. variabilis* foram isoladas xantonas oxigenadas e um xantolignóide, podento estas substâncias estarem relacionadas a capacidade antifúngica desta fração.

Estes resultados quando comparados com a droga de referência o fluconazol, para o fungo *C. krusei* resistente a este fármaco, incentiva o estudo na busca de micromoléculas antifúngicas nestas matrizes para servirem como protótipos de novas substâncias com potencial terapêutico no tratamento de infecções fúngicas.

Tabela 17: Atividade antifúngica dos extratos e frações de partição de *B. glaziovii* e *K. variabilis*

Extratos e frações	*C. albicans* CIM (µg/mL)	*C. krusei* CIM (µg/mL)	*C. parapsilosis* CIM (µg/mL)	*C. neoformans* CIM (µg/mL)
EFB	> 250	**250**	> 250	**125**
EHFB	> 250	> 250	> 250	> 250
EAFB	> 250	**125**	> 250	**125**
EBFB	> 250	**125**	> 250	> 250
EAqFB	> 250	> 250	> 250	> 250
EGB	> 250	**125**	> 250	**125**
EHGB	> 250	> 250	> 250	> 250
EAGB	**250**	**62,5**	**125**	**62,5**
EBGB	**250**	**62,5**	**250**	**250**
EAqGB	> 250	> 250	> 250	> 250
EFK	**250**	**7,81**	**250**	**62,5**
EHFK	> 250	**31,25**	**250**	**250**
EAFK	**62,5**	**15,6**	**250**	**250**
EBFK	**250**	**31,25**	**250**	**62,5**
EAqFK	> 250	**250**	> 250	**250**
EGK	> 250	**31,25**	**125**	**250**
EHGK	> 250	> 250	> 250	> 250
EAGK	**250**	**15,6**	> 250	**62,5**
EBGK	> 250	**125**	> 250	**250**
EAqGK	**250**	> 250	> 250	> 250
anfotericina B[+]	2,00	2,00	2,00	1,00
fluconazol[+]	2,00	64,0	8,00	4,00

* CIM menor que 50 µg/mL, atividade potente; CIM entre 50 e 150 µg/mL, atividade moderada; CIM entre 150 e 250 µg/mL, atividade fraca; CIM acima de 250, inativo.

4.2.5.2 Avaliação da atividade com os fungos *Cladosporium cladosporioides e C. sphaerospermum*

Dos extratos totais e frações de partição testados nos fungos *Cladosporium cladosporioides e C. sphaerospermum*, pode-se observar (Figura 19) que apenas *K. variabilis* demonstrou potencial antifúngico.

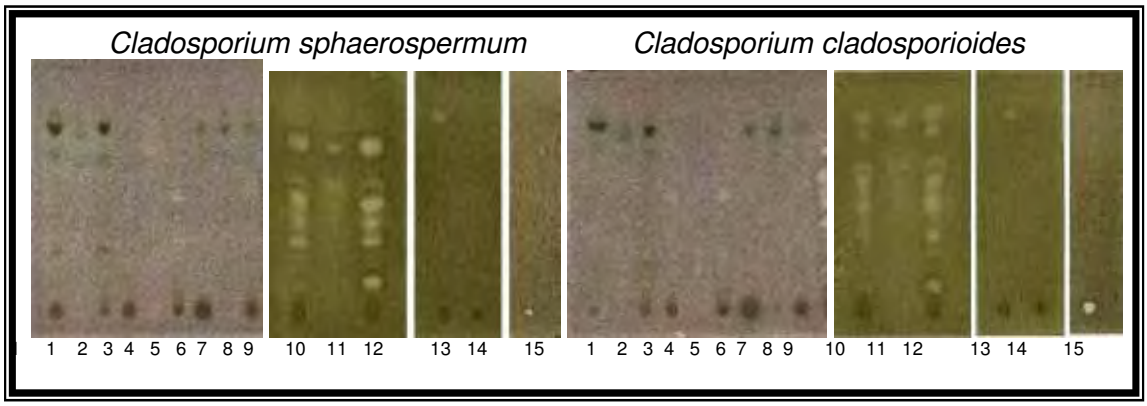


Figura 19: Avaliação da atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, para os extratos e frações de *B. glaziovii* e *K. variabilis*: 1 (EFB), 2 (EHFB), 3 (EAFB), 4 (EGB), 5 (EHGB), 6 (EAGB), 7 (EFK), 8 (EHFK), 9 (EAFK) e 10 (EGK), 11 (EHGK), 12 (EAGK), 13 (EBGK), 14 (EAqGK), 15 (nistatina-controle positivo).

Pela análise do teste qualitativo de bioautografia com o fungo *C. sphaerospermum* pode-se observar que a fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK) foi a mais ativa (Tabela 18), apresentando substâncias com atividade moderada.

Tabela 18. Fatores de retenção para as substâncias ativas no teste de atividade antifúngica utilizando *C. sphaerospermum*

código	amostra	Quantidade (µg)	eluente	*C. sphaerospermum*	
				Rf	Potencial
1	EFB	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
2	EHFB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
3	EAFB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
4	EBFB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
5	EAqFB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
6	EGB	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
7	EHGB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
8	EAGB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
9	EBGB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
10	EAqGB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
11	EFK	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
12	EHFK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
13	EAFK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
14	EBFK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
15	EAqFK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
16	EGK	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	0,37/0,44/0,50/0,56/0,68	**/**/**/**/*
17	EHGK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	0,85...	*
18	EAGK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	0,90/0,81/0,59/0,48/0,34/0,12.	*/*/**/**/*/*
19	EBGK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	0,88...	*
20	EAqGK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i

* = atividade fraca; ** = atividade média; *** = atividade forte; i = inativo.

Pode-se observar que para as amostras testadas com *C. cladosporioides* novamente apenas EAGK demonstrou inibição dos fungos fitopatógenos, apresentando substâncias com atividade moderada (Tabela 19). Desta fração foram isoladas xantonas oxigenadas e um xantonolignóide que podem estar relacionados a estas atividades, porém estas substâncias ainda precisam ter seu potencial antimicótico avaliado.

Tabela 19. Fatores de retenção para as substâncias ativas no teste de atividade antifúngica utilizando *C. cladosporioides*

código	amostra	quantidade (µg)	eluente	*C. cladosporioides*	
				Rf	Potencial
1	EFB	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
2	EHFB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
3	EAFB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
4	EBFB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
5	EAqFB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
6	EGB	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
7	EHGB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
8	EAGB	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
9	EBGB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
10	EAqGB	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
11	EFK	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
12	EHFK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
13	EAFK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
14	EBFK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
15	EAqFK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i
16	EGK	400	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	0,38/0,48/0,58/0,69	**/**/**/*
17	EHGK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	--	i
18	EAGK	200	$CHCl_3$:MeOH (97:3)	0,73/0,51/0,48/0,40/0,32/0,14	**/*/**/**/**/**
19	EBGK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	0,87..... *	
20	EAqGK	200	$CHCl_3$:MeOH (70:30)	--	i

* = atividade fraca; ** = atividade média; *** = atividade forte; i = inativo.

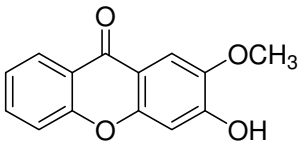
4.3 Determinações estruturais

Para facilitar a discussão sobre a determinação estrutural das substâncias, estas foram agrupadas por classes de metabólitos secundários. As substâncias foram identificadas utilizando-se as análises de RMN uni e bi dimensionais, espectrometria de massas de alta e baixa resolução, assim como comparação com dados da literatura.

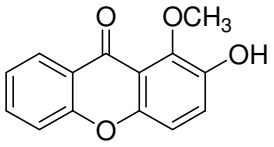
4.3.1 Xantonas

Pela análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos das substâncias isoladas da fração acetato de etila dos galhos de *K. variabilis* (EAGK) pode-se afirmar que todas as substâncias isoladas e identificadas desta fração pertencem à classe das xantonas.

4.3.1.1 Identificação das substâncias 8 e 9



3-hidroxi-2-metoxixantona
(8)



2-hidroxi-1-metoxixantona
(9)

As substâncias **8** e **9** foram isoladas como pós amorfos de coloração amarela.

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 2) da substância **9** apresentou 12 sinais absorvendo na região de carbonos aromáticos, onde 6 destes carbonos encontram-se ligados a hidrogênios o que pode ser observado no espectro de DEPT 135º (Anexo 3). Destaca-se para a presença no espectro de RMN de ^{13}C do sinal em δ_C 175,3 característico de carbonilas de cetonas conjugadas, corroborando a caracterização do esqueleto xantônico básico. O sinal em δ_C 61,0 característico de carbono metoxílico correlacionando pelo espectro de *g*HMQC com o hidrogênio em δ_H 3,81 (3H, *s*) indicou a substituição de uma das posições da xantona por uma metoxila (Anexos 4 e 5).

O espectro de RMN de ^{1}H (Anexo 1) apresentou sinais referentes a hidrogênios aromáticos em δ_H 8,13 (*ddd*, *J* = 8,0; 1,0 e 0,5 Hz) e em δ_H 7,54 (*ddd*, *J* = 8,0, 1,0 e 0,5 Hz) característicos de hidrogênios com acoplamento *orto*, *meta* e *para,* respectivamente e os sinais em δ_H 7,41 (*ddd*, *J* = 8,0; 8,0 e 1,0 Hz) e δ_H 7,79 (*ddd*, *J* = 8,0; 8,0 e 1,0 Hz) característico para hidrogênios acoplando com outros dois hidrogênios em *orto* e com um hidrogênio em *meta*. Estes sinais indicaram a presença de um anel aromático dissubstituído, sendo atribuídos ao anel B da xantona. A posição destes hidrogênios foi determinada pela análise dos dados observados no mapa de contornos *g*HMBC (Anexos 6 e 7) pela correlação do carbono carbonílico com o hidrogêncio em δ_H 8,13 sendo este atribuído ao hidrogênio H-8 (Figura 20). Ainda pelo espectro de RMN de ^{1}H notou-se a presença de um anel A tetrassubstituído, pelos sinais em δ_H 7,38 (*d*, *J* = 9,0 Hz) e 7,27 (*d*, *J* = 9,0 Hz) acoplando entre si com constante de acoplamento *orto*.

A posição da metoxila foi determinada pela irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,81 no experimento de NOESY 1D (Anexo 10). Com a irradiação destes hidrogênios pode-se observar que não houve correlação dos hidrogênios metoxílicos com os hidrogênios aromáticos. Com base nestas informações e nos deslocamentos de carbonos encontrados, a posição da metoxila foi determinada como ligada ao carbono C-1 do anel A da xantona.

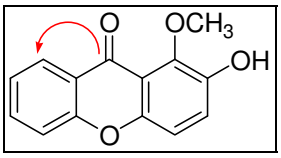


Figura 20: Correlação C-H (**-----**) observada no mapa de contornos *g*HMBC utilizada na determinação da posição do hidrogênio H-8.

O espectro de massas no modo positivo (ESI) em alta resolução para a substância **9** apresentou íon *quasi-molecular* m/z 243,0651 $[M+H]^+$ (Figura 21), possibilitando atribuir a esta substância a fórmula molecular $C_{14}H_{10}O_4$.

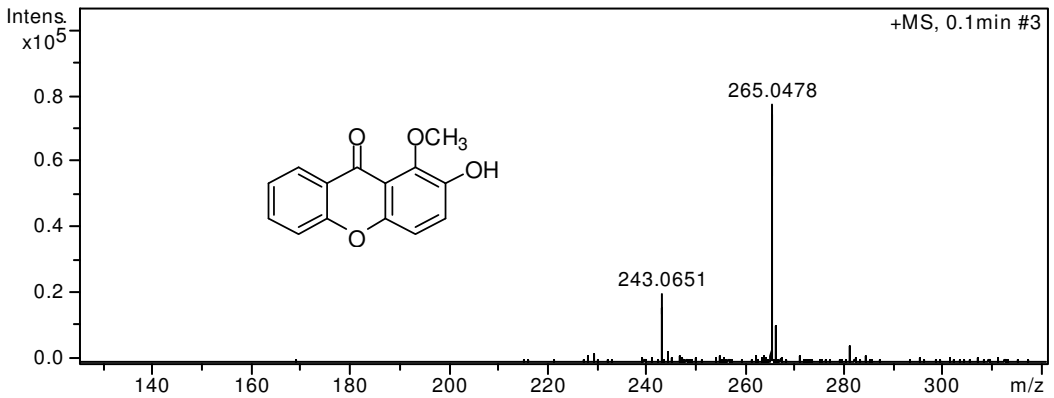


Figura 21: Espectro de massas de primeira ordem da substância **9**, obtido em modo positivo (ESI).

A partir dos resultados espectroscópicos e espectrométricos obtidos (Tabela 20), a substância **9** foi identificada como sendo a 2-hidroxi-1-metoxixantona, cujos dados espectroscópicos estão de acordo com a literatura.[87] O isolamento desta substância já havia sido relatado para outras espécies do gênero *Kielmeyera*, sendo estas *K. cuspidata* Saddi,[87] *K. coriaceae,*[20] *K. rupestris*[88] e *K. speciosa.*[89], porém é a primeira vez que esta é relata na espécie *K. variabilis*.

Tabela 20: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC das substâncias **8** e **9** (DMSO-*d*6)

Posição	Subst. 9			Subst. 8		
	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-1	145,3		H-3 e 1-OMe	103,3	7,21; *s*	
C-2	146,8		H-4	150,0		H-1 e 2-OMe
C-3	124,1	7,38; *d*; 9,0		166,2		H-1
C-4	113,5	7,27; *d*; 9,0		101,7	6,31; *s*	
C-4a	149,6		H-3 e H-4	154,8		H-1
C-10a	154,8		H-5, H-6 e H-8	155,1		H-6 e H-8
C-5	117,6	7,54; *ddd*; 8,0; 1,0 e 0,5	H-7	117,2	7,44; *d*; 8,0	H-7
C-6	134,9	7,79; *ddd*; 8,0; 8,0 e 1,0	H-8	132,7	7,64; *ddd*; 8,0; 8,0 e 1,5	H-8
C-7	123,8	7,41; *ddd*; 8,0; 8,0 e 1,0	H-5	122,9	7,31; *ddd*; 8,0; 8,0 e 1,5	H-5
C-8	126,0	8,13; *ddd*; 8,0; 1,0 e 0,5	H-6	125,3	8,07; *dd*; (8,0 e 1,5)	H-6
C-8a	121,5		H-7 e H-5	121,6		H-7
C-9a	116,2		H-4	112,3		
C-9	175,3		H-8	172,6		H-1 e H-8
1-OMe	61,0	3,81; *s*				
2-OMe				55,2	3,76; *s*	

Por intermédio dos resultados obtidos nas análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C, bem como dos dados observados nos mapas de contornos heteronucleares *g*HMQC e *g*HMBC e homonuclear *g*COSY pode-se constatar que a substância **8** é um isômero posicional da substância **9**.

Pelo padrão de acoplamento observado entre os hidrogênios no espectro de RMN de ^{1}H e *g*COSY (Anexo 11, 18 e 19) em δ_H 8,07 (*dd*; *J* = 8,0 e 1,5 Hz), 7,31 (*ddd*; *J* = 8,0, 8,0 e 1,5 Hz), 7,64 (*ddd*; *J* = 8,0; 8,0 e 1,5 Hz) e 7,44 (*d*; *J* = 8,0 Hz) o anel B foi determinado como dissubstituído, pela correlação observada entre o carbono carbonílico e o hidrogênio em δ_H 8,07 (Figura 22) observado pelo mapa de contornos *g*HMBC, foi atribuída para este hidrogênio a posição H-8 (Anexos 16 e 17).

A posição do hidrogênio H-1 foi determinada pela correlação observada entre o carbono carbonílico em δ_C 175,0 com o hidrogênio em δ_H 7,21 (s) (Figura 22) observada pelo mapa de contornos *g*HMBC.

Para a determinação dos substituintes, os hidrogênios da metoxila em δ_H 3,76 (*s*) foram irradiados no experimento de NOESY 1D (Anexo 20) demonstrando um ganho no sinal em δ_H 7,21 (H-1), concluindo-se que a metoxila encontra-se ligada ao carbono C-2. Como ao irradiar os hidrogênios metoxílicos não se observou ganho no sinal em δ_H 6,31 (s), para este hidrogênio foi atribuída a posição H-4, estando a hidroxila ligada ao carbono C-3 (Figura 22).

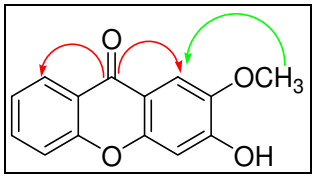


Figura 22: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições dos hidrogênios H-1 e H-8 e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,76.

O espectro de massas no modo positivo (ESI) em alta resolução para a substância **8** apresentou íon *quasi-molecular* m/z 243,0646 $[M-H]^+$ (Figura 23) permitindo atribuir a fórmula molecular $C_{14}H_{10}O_4$.

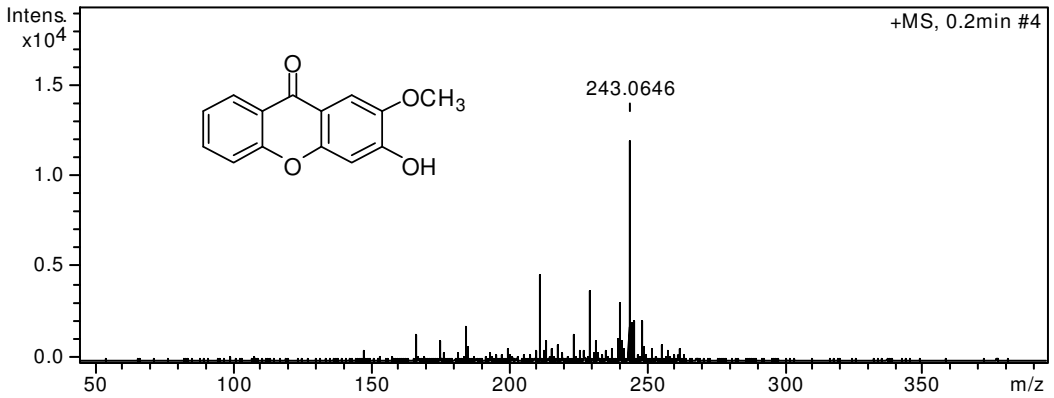
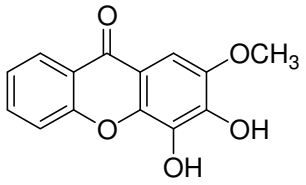


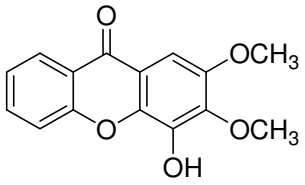
Figura 23: Espectro de massas de primeira ordem da substância **8**, obtido em modo positivo (ESI).

Pela análise dos dados espectroscópicos (Tabela 20) e espectrométricos (Figura 23) a substância **8** foi identificada como a 3-hidroxi-2-metoxixantona.[90]

4.3.1.2 Identificação das substâncias 4 e 6



3,4-diidroxi-2-metoxixantona
(4)



4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona
(6)

As substâncias **4** e **6** foram isoladas como pós amorfos de coloração amarela.

O espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 22) para a substância **4** apresentou 10 sinais na região de carbonos aromáticos, estando cinco destes carbonos ligados a hidrogênios, observados pelo mapa de contornos *g*HMQC (Anexos 23 e 24). Pode-se ainda observar a presença dos sinais dos carbonos quaternários com absorção em δ_C 146,3 e 142,2 atribuídos às posições C-2 e C-3, respectivamente. O sinal em δ_C 174,7 foi atribuído ao carbono carbonílico C-9. Além dos sinais referentes aos carbonos aromáticos pode-se observar o sinal de carbono em δ_C 55,8 sugerindo que a substância **4** apresentava uma metoxila como substituinte.

No espectro de RMN de ^{1}H e *g*COSY (Anexos 21, 27 e 28) foram observados quatro sinais de hidrogênios aromáticos acoplando entre si. Um dubleto em δ_H 8,16 (J = 7,5 Hz) atribuído ao hidrogênio H-8 pela correlação observada no mapa de contornos *g*HMBC com a carbonila (δ_C 174,7) (Figura 24); dois duplos dubletos em δ_H 7,42 (J = 7,5 e 7,5 Hz) e 7,79 (J = 7,5 e 7,5 Hz) e o dubleto em 7,61 (J = 7,5 Hz), correspondentes aos hidrogênios H-7, H-6 e H-5, respectivamente (Anexos 25 e 26).

Por intermédio da correlação observada no mapa de contornos *g*HMBC do singleto em δ_H 7,13 com o carbono carbonílico da xantona em δ_c 174,7 este foi determinado como o hidrogênio H-1 do anel A da xantona (Figura 24). A presença do um singleto em δ_H 7,13 sugereriu que o anel A da xantona estava

penta-substituído, sendo um dos substituintes uma metoxila caracterizada pelo sinal de hidrogênio em δ_H 3,88 e do carbono absorvendo em δ_c 55,80.

O experimento de NOESY 1D realizado com irradiação dos hidrogênios com absorção em δ_H 7,13 (Figura 24) promoveu um ganho de intensidade no singleto em δ_H 3,88 (hidrogênios metílicos de um grupo metoxila), sugerindo que a metoxila encontra-se ligada ao carbono C-2 (Anexo 29).

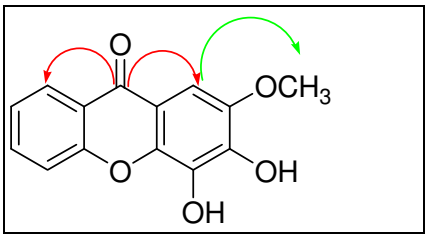


Figura 24: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições dos hidrogênios H-1 e H-8 e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 7,13.

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo para a substância **4** apresentou o íon *quasi*-molecular *m/z* 259,0624 $[M+H]^+$ (Figura 25), confirmando a fórmula molecular $C_{14}H_{10}O_5$.

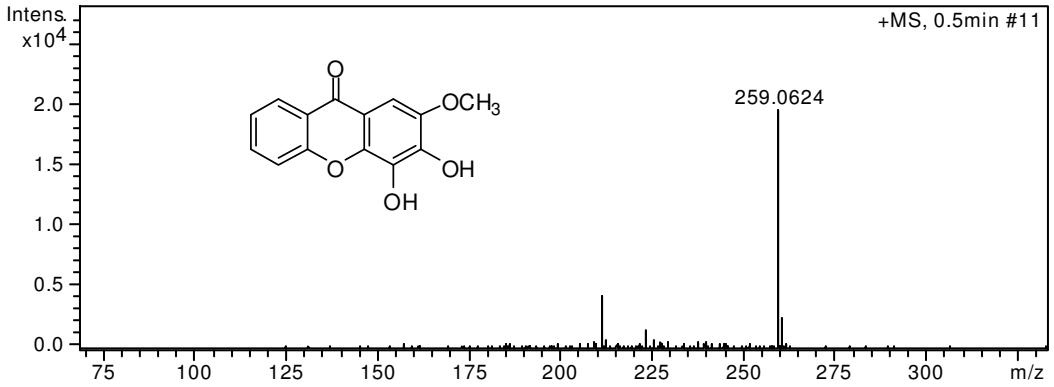


Figura 25: Espectros de massas de primeira ordem da substância **4**, obtido em modo positivo (ESI).

Os dados obtidos para a substância **4** (Tabela 21) são compatíveis com a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona já descrita previamente na literatura.[91] Esta substância havia sido relatada em duas outras espécies do gênero *Kielmeyera* sendo elas *K. coriaceae* e *K. corimbosa*.[92]

Os espectros de RMN de ^{1}H (Anexo 30), ^{13}C (Anexo 31) e DEPT (Anexo 32) , assim como os mapas de contornos *g*HMQC (Anexo 33) e *g*HMBC (Anexo 34 e 35) e o espectro de *g*COSY (Anexos 36 e 37) para a substância **6**, apresentaram-se muito similares àqueles observados para a xantona **4**, diferindo apenas pela presença do carbono em δ_c 60,6 correlacionado pelo mapa de contornos *g*HMQC com o hidrogênio em δ_H 3,85 sugerindo a presença de mais um grupo metoxílico na molécula. A posição deste grupo pode ser atribuída pelas correlações observadas no mapa de contornos *g*HMBC entre o carbono C-3 em δ_c 142,2 tanto com os hidrogênios metoxílicos em δ_H 3,85 quanto com o singleto referente ao hidrogênio H-1 em δ_H 7,15. Na xantona **4** descrita anteriormete a posição C-3 era substituída por uma hidroxila. Ainda pelo mapa de contornos *g*HMBC pode-se deteriminar a posição dos hidrogênios H-1 (δ_H 7,15) e H-8 (δ_H 8,18) pela correlação observada com o carbono carbonílico em δ_c 175,4 (Figura 26).

O experimento de NOESY 1D permitiu determinar a posição da metoxila em δ_H 3,89 como ligada ao carbono C-2 (Figura 26) pela irradiação dos hidrogêncios em δ_H 7,15 observando um ganho no sinal da metoxila em δ_H 3,89 (Anexo 38).

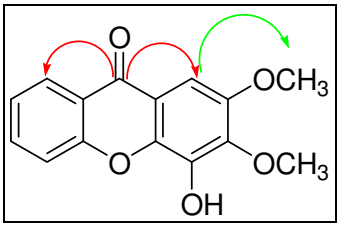


Figura 26: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições H-1 e H-8 e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,89.

Tabela 21: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC das substâncias **4** e **6** (DMSO-*d*6)

Posição	Subst. 4			Subst. 6		
	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-1	96,0	7,13; *s*		95,4	7,15; *s*	
C-2	146,3		H-1 e 2-OMe	150,2		H-1 e 2-OCH3
C-3	142,2		H-1	142,2		H-1 e 3-OCH3
C-4	*			*		
C-4a	*			*		
C-10a	155,3		H-5, H-6 e H-8	155,5		H-5, H-6 e H-8
C-5	117,9	7,61; *d*; 7,5	H-7	118,2	7,66; *d*; 8,0	H-7 e H-6
C-6	134,2	7,79; *dd*; 7,5 e 7,5	H-8	134,9	7,84; *ddd*; 8,0, 8,0 e 2,0	H-8
C-7	123,6	7,42; *dd*; 7,5 e 7,5	H-5	124,1	7,46; *dd*; 8,0 e 8,0	H-5
C-8	125,7	8,16; *d*; 7,5	H-6	125,9	8,18; *dd*; 8,0 e 2,0	H-6
C-8a	120,7		H-5 e H-7	120,5		H-5 e H-8
C-9a	112,0			116,8		
C-9	174,7		H-1 e H-8	175,4		H-8
2-OMe	55,8	3,88; *s*		55,9	3,89; *s*	
3-OMe				60,6	3,85; *s*	

*valores não observados.

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI) para a substância **6** apresentou o íon *quasi*-molecular *m/z* 273,0699 $[M+H]^+$(Figura 27) correspondendo à fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$.

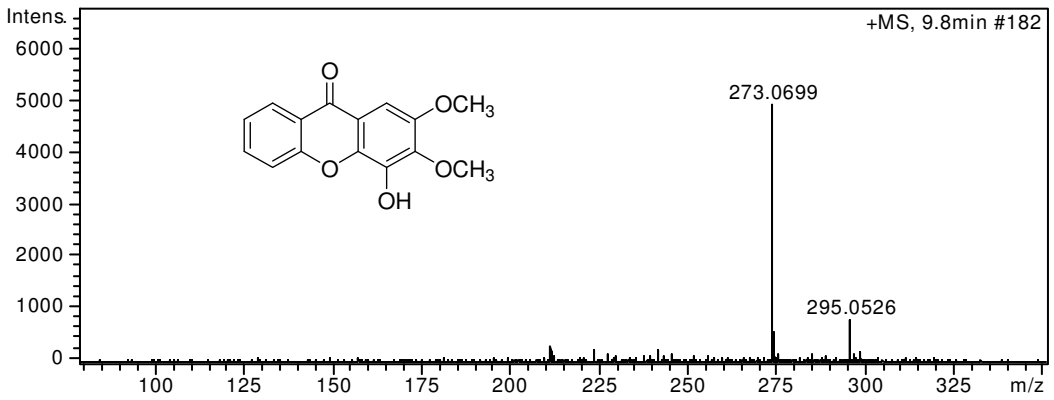
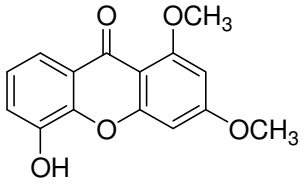


Figura 27: Espectro de massas de primeira ordem da substância **6**, obtido em modo positivo (ESI).

A substância **6** foi identificada como sendo a 4-hidrox-2,3-dimetoxixantona (Tabela 21), já isolada de outras espécies de *Kielmeyera.* Até o momento esta xantona já foi isolada das espécies *K. ferruginosa,*[93] *K. coriaceae,*[20] *K. rupestris,*[88] *K. speciosa,*[89] e *K. rubriflora*[94], sendo agora também isolada de *K. variabilis* no presente estudo.

4.3.1.3 Identificação da substância 5



5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona
(5)

A substância **5** foi isolada como um pó amorfo de coloração amarela.

Por intermédio dos padrões de acoplamento dos hidrogênios aromáticos observados para a substância **5** pode-se inferir que esta possui um padrão de substituição diferente das xantonas descritas anteriormente.

As análises de RMN de ^{1}H (Anexos 39 e 40) indicaram que a substância **5** possui uma substituição no anel B, que pode ser observada pelos sinais de três hidrogênios aromáticos que acoplam entre si em δ_H 7,35 (*dd*; *J* = 8,0 e 1,5 Hz), 7,10 (*dd*; *J* = 8,0 e 8,0 Hz) e 7,21 (*dd*; *J* = 8,0 e 1,5 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-8, H-7 e H-6, respectivamente. O hidrogênios em δ_H 7,35 foi

atribuído à posição H-8 (Figura 28) com base na correlação com o carbono carbonílico C-9, observada no mapa de contornos *g*HMBC (Anexos 45 e 46).

A posição dos hidrogênios do anel A da xantona foi determinada pelo padrão de acoplamento observado no espectro de RMN de ^{1}H e pelas correlações no espectro de *g*COSY (Anexos 47 e 48). Foram observados dois hidrogênios aromáticos em δ_H 6,47 (1H; *d*; *J* = 2,5 Hz) e 6,67 (1H; *d*; *J* = 2,5 Hz) acoplando entre si com padrão *meta*. Não foi observada a correlação entre estes dois hidrogênios e o carbono carbonílico sugerindo que estes hidrogênios não ocupavam a posição H-1.

Os espectros de ^{13}C (Anexo 41) e DEPT 135º (Anexo 42) demostram além dos 12 sinais referentes aos carbonos aromáticos da xantona e do sinal de carbono carbonílico em δ_C 174,2, dois sinais de carbonos metoxílicos em δ_C 56,1 e 55,9, correlacionados respectivamente aos hidrogênios em δ_H 3,86 e 3,90.

A posição das metoxilas foi determinada pelo experimento de NOESY 1D (Anexos 49 e 50) por meio da irradiação dos hidrogênios da metoxila em δ_H 3,90 foi observado um aumento na intensidade dos sinais em δ_H 6,67 e 6,47, sendo esta metoxila atribuída como substituindo no carbono C-3. Ao irradiar os hidrogênios da metoxila em δ_H 3,86 foi observado o aumento na intensidade do sinal em δ_H 6,47, concluindo que esta metoxila ocupava a posição C-1(Figura 28).

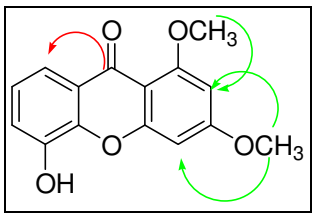


Figura 28: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação da posição do hidrogênio H-8 e correlações observadas no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,86 e 3,90.

Tabela 22: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância **5** (DMSO-*d*6)

Posição	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-1	161,4		1-OMe e H-2
C-2	95,1	6,47; *d*; 2,5	H-4
C-3	164,5		3-OMe; H-2 e H-4
C-4	93,1	6,67; *d*; 2,5	H-2
C-4a	159,0		H-4
C-10a	144,5		H-6; H-7 e H-8
C-5	148,0		H-7
C-6	119,5	7,21; *dd*; 8,0 e 1,5	H-8
C-7	123,6	7,10; *dd*; 8,0 e 8,0	
C-8	112,9	7,35; *dd*; 8,0 e 1,5	H-6
C-8a	123,5		H-7
C-9a	106,2		H-2 e H-4
C-9	174,2		H-8
1-OMe	56,1	3,86	
3-OMe	55,9	3,90	

O espectro de massas de alta resolução no modo positivo (ESI) para a substância **5** apresentou o íon *quasi*-molecular *m/z* 273,0758 $[M+H]^+$(Figura 29) confirmando a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$.

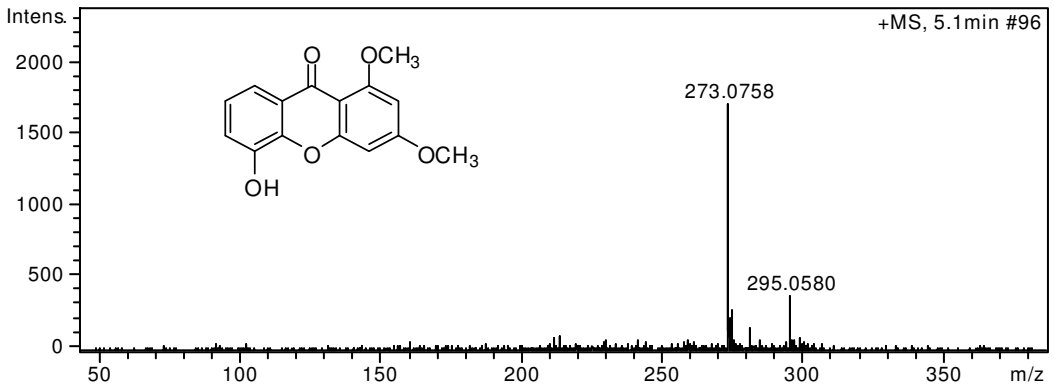


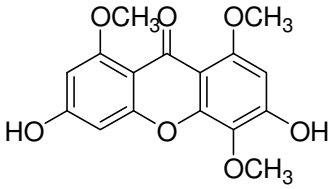
Figura 29: Espectro de massas de primeira ordem da substância **5** obtido em modo positivo (ESI).

Com base nos dados espectroscópicos (Tabela 22) e espectrométricos (Figura 29) descritos anteriomente a substância **5** foi identificada como sendo a

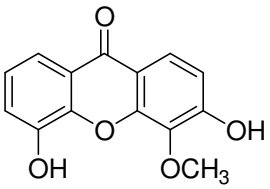
5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona. A xantona **5** já havia sido relatada para as espécies *K. speciosa,*[89] *K. rupestris,*[88] *K. ferruginosa*[93] e *K.* coriaceae.[95]

4.3.1.4 Identificação da mistura contendo as substâncias 1, 2 e 3

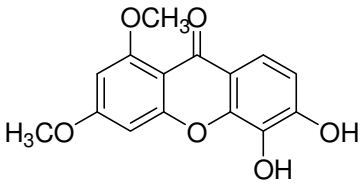
...



3,6-diidroxi-1,4,8-trimetoxixantona
(1)



3,5-diidroxi-4-metoxixantona
(2)



3,4-diidroxi-6,8-dimetoxixantona
(3)

As substâncias **1**, **2** e **3** foram isoladas como um pó amorfo de coloração amarela e foram identificadas em mistura por intermédio da análise dos espectros de RMN de ^{1}H, ^{13}C, *g*COSY, NOESY 1D e dos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC.

No espectro de massas em modo positivo (ESI) (Figura 30) foram observados sinais de três íons *quasi-molecular* em *m/z* 259, 289 e 319 $[M+H]^+$ correspondentes às fórmulas moleculares $C_{14}H_{10}O_5$, $C_{15}H_{12}O_6$ e $C_{16}H_{14}O_7$.

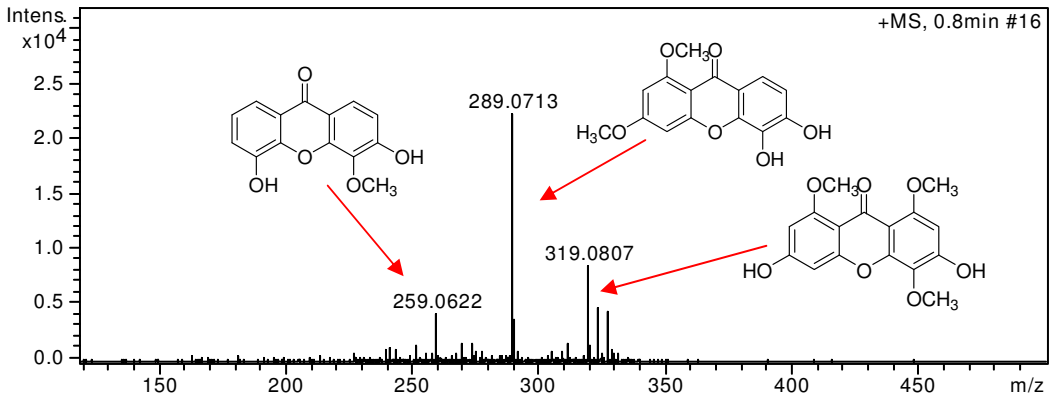


Figura 30: Espectro de massas de primeira ordem da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** obtido em modo positivo (ESI).

No espectro de RMN de ^{1}H (Anexos 51-53) foram observados dois dubletos em δ_H 7,61 (*d*; *J* = 8,8 Hz) e 6,84 (*d*; *J* = 8,8 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-1 e H-2 do anel A tetrassubstituído corespondente à xantona **2**. Além destes foram observados três duplos dubletos em δ_H 7,45 (*dd*; 7,7 e 1,7 Hz), 7,12 (*dd*; 7,7 e 7,7 Hz) e 7,16 (*dd*; 7,7 e 1,7 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-8, H-7 e H-6, respectivamente, correspondentes ao anel B da substância **2**. Os hidrogênios das substâncias **1**, **2** e **3** puderam ser diferenciados principalmente devido a estas substâncias não estarem em proporções iguais na mistura e a partir desta informação foram atribuídos os carbonos pertencente a cada substância, também pela intensidade dos sinais apresentados e pelas correlações observados nos mapas de contonos *g*HMQC (Anexos 56-58) e *g*HMBC (Anexos 59 e 60).

A posição da metoxila foi determinada pela interação observada entre o carbono em δ_C 134,0 (C-4) e o hidrogênio em δ_H 6,84 atribuído à substância **2** e também com o sinal dos hidrogênios metoxílicos em δ_H 3,86.

A partir dos dados espectroscópicos (Tabela 23) e espectrométricos (Figura 30) pode-se identificar a substância **2** como a xantona trioxigenada 3,5-diidroxi-4-metoxixantona.[96]

Pela análise do espectro de RMN de ^{1}H (Anexos 51-53), foram atribuídos à substância **3** ($C_{15}H_{12}O_6$), substância esta majoritária na mistura, dois dubletos com acoplamento *orto* em δ_H 7,37 (*d*; *J* = 8,6 Hz) e 6,78 (*d*; *J* = 8,6 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-1 e H-2, respectivamente. A posição do hidrogênio H-1 foi confirmada pela correlação observada entre o carbono carbonílico em δ_c 173,4 e o hidrogêncio em δ_H 7,37 (Figura 31) pelo mapa de contornos *g*HMBC (Anexo 60). Foram também observados dois dubletos com constantes de acoplamento *meta* em δ_H 6,61 (*d*; *J* = 2,1 Hz) e 6,44 (*d*; *J* = 2,1 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-7, respectivamente sugerindo um anel B tetrassubstituído para a substância **3**.

Para esta substância foram atribuídas duas metoxilas em δ_H 3,88 e 3,84. A posição das metoxilas foi determinada pelo experimento de NOESY 1D. Ao irradiar o sinal com deslocamento em δ_H 6,44 foi possível observar um ganho na intensidade do sinal de ambas as metoxilas em δ_H 3,88 e 3,84 e ao irradiar o sinal em δ_H 6,61 observou-se um ganho apenas nos sinal da metoxila em δ_H 3,88 (Anexos 63 e 64). A partir destes dados foram determinadas as posições

das metoxilas, estando a metoxila em δ_H 3,88 ligada ao carbono C-5 e a metoxila em δ_H 3,84 ligada ao carbono C-8 (Figura 31).

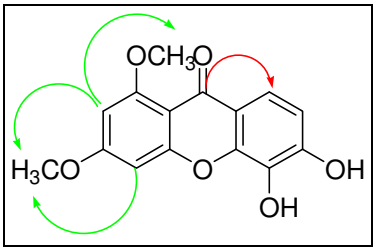


Figura 31: Correleção C-H (-----) observada no mapa de contornos *g*HMBC utilizada na determinação da posição do hidrogênio H-1 e correlações observadas no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 6,44 e 6,61.

A partir dos resultados obtidos nas análises espectroscópicas (Tabela 23), e espectrométricas (Figura 30) concluiu-se que a substância **3** é uma xantona tetraoxigenada relatada apenas em estudo com a espécie *Musua ferrea* (Clusiaciae),[97] porém sendo o primeiro relato de isolamento para o gênero *Kielmeyera*.

A substância **1**, por ser a substância minoritária na mistura não pode ter todos os dados de carbono atribuídos. O pico do íon *quasi-molecular* atribuído para a substância **1** em *m/z* 319 $[M+H]^+$ corresponde à fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_7$ sugerindo uma xantona pentaoxigenada.

Pelo espectro de RMN de ^1H pode-se atribuir à substância **1** o hidrogênio em δ_H 6,32 (*sl*) correlacionando com o carbono em δ_C 95,7 (C-2) de um anel A pentassubstituído e os hidrogênios em δ_H 6,39 (*d*; 1,9 Hz) e 6,41 (*d*; 1,9 Hz) correlacionando pelo espectro de *g*HMQC com os carbonos em δ_C 95,2 e 95,1 (C-5/C-7), respectivamente, atribuídos ao anel B da xantona.

Pelo espectro de RMN de ^{13}C foi ainda observado o sinal em δ_C 172,9 (C-9) o qual pelo mapa de contornos *g*HMBC não demonstrou correlação com nenhum dos hidrogênios referentes a esta molécula, sugerindo que os carbonos C-1 e C-8 estão substituídos por metoxilas, uma vez que também não foi observado no espectro de RMN de ^1H sinal referente a hidrogênio de hidroxila quelatada com a carbonila em aproximandamente 12 ppm.

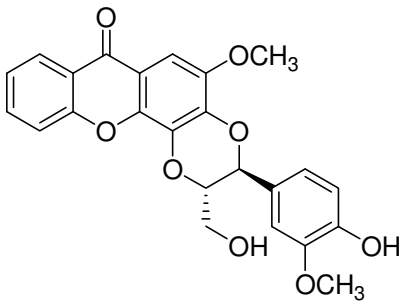
A substância **1** foi identificada como a 3,6-diidorxi-1,4,8-trimetoxixantona, porém para confirmação da posição dos substituintes esta teria que ser purificada.

Tabela 23: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC das substâncias **2** e **3** (DMSO-*d*6)

	Subst. 2			**Subst. 3**		
Posição	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-1	121,5	7,61; *d*; 8,8		116,1	7,37; *d*; 8,6	H-2
C-2	113,2	6,84; *d*; 8,8		112,5	6,78; *d*; 8,6	
C-3	154,9		H-1	145,1		H-1
C-4	134,0		H-2 e 4-OMe			H-2
C-4a	149,1		H-1	132,1		H-1
C-10a	143,8		H-8 e H-6	159,1		H-5
C-5	145,8		H-7	93,1	6,61; *d*; 2,1	H-7
C-6	119,0	7,16; *dd*; 7,7 e 1,7	H-8	164,2		H-5, H-7 e 6-OMe
C-7	123,4	7,12; *dd*; 7,7 e 7,7		95,1	6,44; *d*; 2,1	H-5
C-8	115,2	7,45; *dd*; 7,7 e 1,7	H-6	161,4		H-7 e 8-OMe
C-8a	123,6		H-7	105,9		H-5 e H-7
C-9a	104,8			*		
C-9	173,6			173,4		H-1
4-OMe	60,76	3,86; *s*				
6-OMe				55,9	3,88; *s*	
8-OMe				56,1	3,84; *s*	

*valores não observados.

4.3.1.5 Identificação da substância 7



Kielcorina
(7)

A substância **7** foi isolada da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* como um pó amorfo de coloração amarelo claro.

No espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 68) foram obervados 24 sinais, destacando-se para o sinal em δ_C 174,7 atribuído ao carbono carbonílico C-9 e para os sinais em δ_C 77,8 (CH) e 76,4 (CH), os quais foram atribuídos aos carbonos C-2" e C-1", respectivamente de um anel 1,4 dioxano. Além destes foi observado o sinal em δ_C 59,8 referente a um carbono metilênico comprovado pelo espectro de DEPT 135º (Anexo 69). Estes sinais não foram observados para as demais xantonas isoladas, demonstando que esta possui um substituinte diferente das demais. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou ainda a presença de duas metoxilas pelos sinais em δ_C 55,8 e 55,7.

No espectro de RMN de ^{1}H (Anexos 65-67) foram observados três duplos dubletos e um dubleto em δ_H 8,22 (*dd*; *J* = 7,5 e 1,5 Hz), 7,49 (*dd*; *J* = 7,5 e 7,5 Hz), 7,86 (*dd*; *J* = 7,5 e 7,5 Hz) e 7,70 (*d*; *J* = 7,5 Hz) acoplando entre si (Anexos 75 e 76) sugerindo um anel dissubstituído, sendo este atribuído ao anel B de uma xantona. Pelas correlações observadas no mapa de contornos *g*HMBC (Anexos 73 e 74) pode-se atribuir ao hidrogênio em δ_H 8,22 a posição H-8. Foi observada ainda a correlação no mapa de contornos *g*HMBC do singleto em δ_H 7,23 com o carbono carbonílico (C-9), sendo este atribuído ao hidrogênio H-1 do anel A pentassubstituído da xantona. Por meio do experimento de NOESY 1D (Anexos 78) a posição da metoxila em δ_H 3,88 foi atribuída ao carbono C-2, pela correlação observada com o hidrogênio aromático em δ_H 7,23.

Ainda pelo espectro de RMN de ^{1}H foram observados sinais de hidrogênios aromáticos referentes a um anel aromático adicional aos do esqueleto xantônico básico. Pelo acoplamento entre os hidrogênios pertencentes a este anel inferiu-se que se tratava de um anel trisubstituído, apresentando os sinais em δ_H 6,92 (*dd*; *J* = 8,0 e 1,5 Hz) e em δ_H 6,85 (*d*; *J* = 8,0 Hz) e 7,08 (*d*; *J* = 1,5).

Pelo experimento de NOESY 1D (Anexo 77) a posição da metoxila em δ_H 3,80 foi atribuída ao carbono C-3' pela correlação observada entre os hidrogênios metoxílicos e o hidrogênio em δ_H 7,08 (H-2').

A posição do anel aromático ligado ao anel 1,4-dioxano foi realizada pela observação das correlações por *g*HMBC entre o carbono em δ_C 76,4 (C-1") e os hidrogênios em δ_H 6,92 (H-6') e 7,08 (H-2').

A constante de acoplamento entre os hidrogênios em δ_H 5,10 (*d*; *J* = 8,0 Hz, H-1") e o hidrogênio em δ_H 4,43-4,40 (*m*, H-2") sugere uma relação *trans* entre estes dois hidrogênios (Tabela 24).

No espectro de massas em alta resolução no modo positivo (ESI) para a substância **7** (Figura 32) foi observado o íon *quasi-molecular m/z* 437,1231 $[M+H]^+$ que confirma a estrutura proposta.

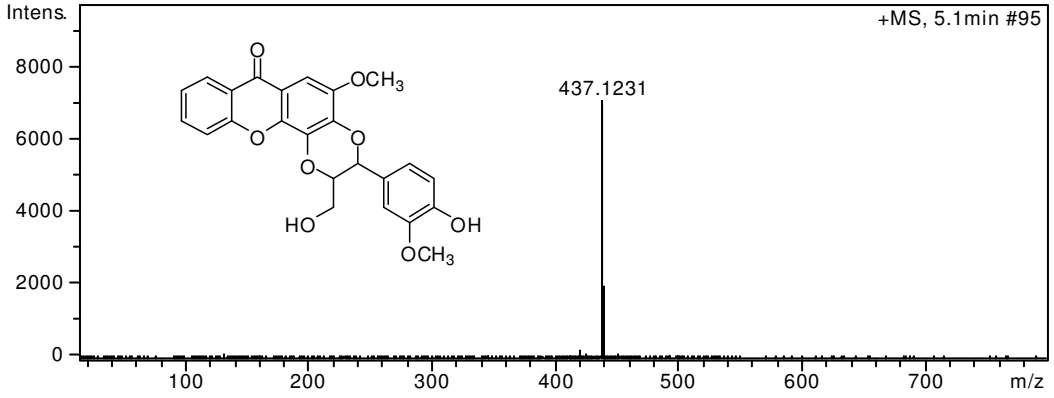


Figura 32: Espectro de massas de primeira ordem em alta resolução da substância **7**, obtido em modo positivo (ESI).

Tabela 24: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância **7** (DMSO-*d*6)

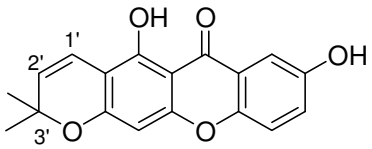
Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-1	96,5	7,23; *s*	
C-2	145,8		H-1 e 2-OCH_3
C-3	139,6		H-1
C-4	132,5		
C-4a	141,2		H-1
C-10a	155,3		H-5, H-6 e H-8
C-5	118,0	7,70; *d;* 7,5	H-5
C-6	134,8	7,86; *dd*; 7,5 e 7,5	H-8
C-7	124,2	7,49; *dd*; 7,5 e 7,5	H-5
C-8	125,8	8,22; *dd*; 7,5 e 1,5	H-6
C-8a	120,7		H-5 e H-7
C-9a	113,9		
C-9	174,7		H-1 e H-8
C-1'	126,6		H-1" e H-5'
C-2'	112,1	7,08; *d*; 1,5	H-1" e H-6'
C-3'	147,6		H-2', H-5', 4'-OH e 3'-OCH3
C-4'	147,3		H-6"
C-5'	115,4	6,85; *d*; 8,0	
C-6'	120,8	6,92; *dd*; 8,0 e 1,5	H-1" e H-2'
C-1"	76,4	5,10; *d*; 8,0	H-2' e H-6'
C-2"	77,8	4,43 – 4,40; *m*	H-1"
C-3"	59,8	3,47 e 3,75 *d*; 12,0	
2-OMe	55,7	3,88; *s*	
3-OMe	55,8	3,80; *s*	
4-OH		9,22; *s*	

A partir dos dados espectroscópicos e espectrométricos, bem como por comparação com os dados da literatra[91] a substância **7** foi identificada como sendo o xantonolignóide kielcorina, já isolado da espécie *K. variabilis* em estudo anterior.[25,26] Esta substância já havia sido relatada para a espécie *K. coriaceae.*[20]

Os xantonolignóides são uma classe de compostos tendo um grupo fenilpropano ligado a uma *orto*-diidroxixantona por um anel 1,4-dioxano, os quais são considerados muito promissores por demonstrarem uma ampla variedade de atividades biológicas.[98] O primeiro derivado natural deste grupo

de compostos foi descrito em 1969 por Gottlieb e col.,[93] sendo esta a substância kielcorina. Gottlieb e col. afirmaram a configuração *trans* dos prótons do anel 1,4-dioxano do xantolignóide natural kielcorina pela observação da constante de acoplamento axial-axial entre os hidrogênios H-1" e H-2" (J ≈ 8 Hz).[94]

4.3.1.6 Identificação da substância 17



Osajaxantona
(17)

A substância **17** foi isolada da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* como uma pó amarelo claro. A baixa quantidade de massa obtida dificultou a realização de todas as análises espectroscópicas.

No espectro de RMN de ^{1}H (Anexo 79) pode-se observar a presença dos sinais de hidrogênios aromáticos em δ_H 7,53 (*d*, *J* = 3,0 Hz), δ_H 7,30 (*dd*, *J* = 9,0 e 3,0 Hz) e δ_H 7,42 (*d*, *J* = 9,0 Hz) acoplando entre si em anel aromático trissubstituído. Pode-se observar ainda a presença do singleto em δ_H 6,38 atribuído a um anel aromático pentasubstituído. Ainda pela análise dos dados de RMN de ^{1}H foram observados sinais de dois dubletos característicos para hidrogênios em dupla ligação em δ_H 5,73 e 6,74 acoplando entre si com constante *J* = 10,1 Hz. Observa-se também a presença do singleto em δ_H 1,51 com integração para seis hidrogênios referente a duas metilas (Tabela 25).

Por intermédio dos dados de ^{13}C (Anexo 80) e *g*HMQC (Anexos 81 e 82) os carbonos ligados a estes hidrogênios puderam ser atribuídos. As posições dos hidrogênios na molécula foram determinadas baseando-se nas interações observadas no espectro de *g*HMBC (Anexo 83) bem como por comparação com os dados relatados na literatura.[99]

Tabela 25: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância **17** (MeOD-*d*5)

Posição	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-1	109,49	7,53; *d*; 3,0	
C-2	156,0		H-4
C-3	125,7	7,30; *dd*; 9,0 e 3,0	H-2' e H-1'
C-4	120,0	7,42; *d*; 9,0	
C-4a	*		
C-10a	*		
C-5	95,8	6,38; *s*	
C-6	162,2		
C-7	105,5		H-2'
C-8	*		
C-8a	104,4		
C-9a	122,4		
C-9	*		
C-1'	116,2	6,74; *d*; 10,1	
C-2'	129,0	5,73; *d*; 10,1	
C-3'	79,5		
3'-Me	28,7	1,51; *s*	

*valores não observados.

O íon *quasi-molecular* em *m/z* 309,0805 $[M-H]^-$, verificado no espectro de massas obtido no modo negativo (ESI) da substância **17** permitiu atribuir a esta a fórmula molecular $C_{18}H_{14}O_5$ (Figura 33).

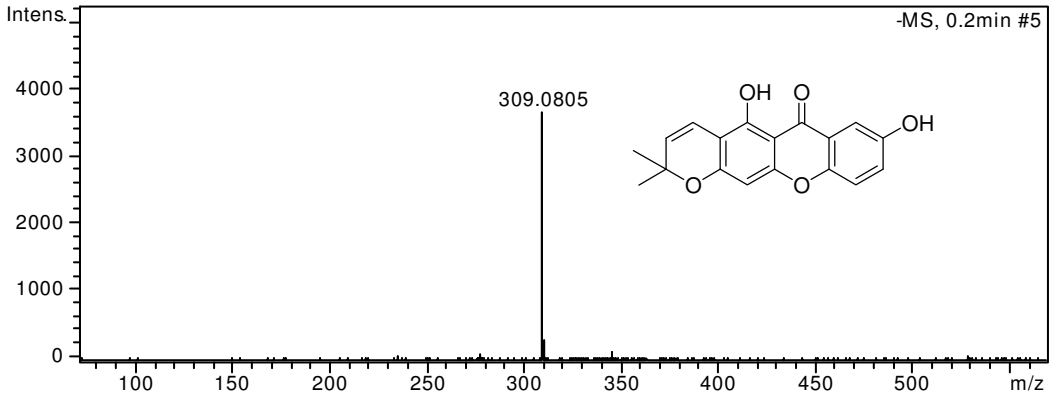


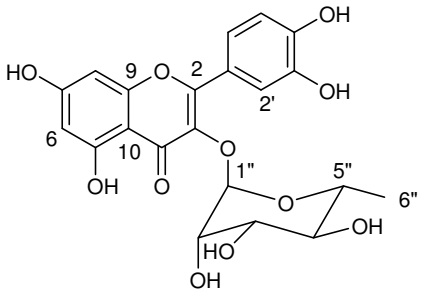
Figura 33: Espectro de massas de primeira ordem em alta resolução para a substância **17** obtido no modo negativo (ESI).

Pelas análises dos dados espctroscópicos e espectrométricos, associados aos dados da literatura a substância **17** foi identificada como a xantona osajaxantona,[99] sendo esta substância já isolada de outras espécies do gênero *Kielmeyera*, tais como *K. corymbosa,* [100] *K. ferruginosa*[93] e *K. coriaceae.*'[101]

4.3.2 Flavonóides

Pela análise dos dados espectroscópicos e espectrométricos das substâncias isoladas da fração AcOEt e *n*-BuOH das folhas de *K. variabilis* (EAFK e EBFK) pode-se afirmar que todas as substâncias isoladas e identificadas destas frações pertencem a classe dos flavonóides.

4.3.2.1 Identificação da substância 10



quercitrina
(10)

A substância **10** foi isolada da fração AcOEt das folhas de *K. variabilis* na forma de um preciptado amarelo claro.

O íon molecular observado no espectro de massas (Figura 34) em *m/z* 447 $[M-H]^-$ apresentado pela substância **10** sugere a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$.

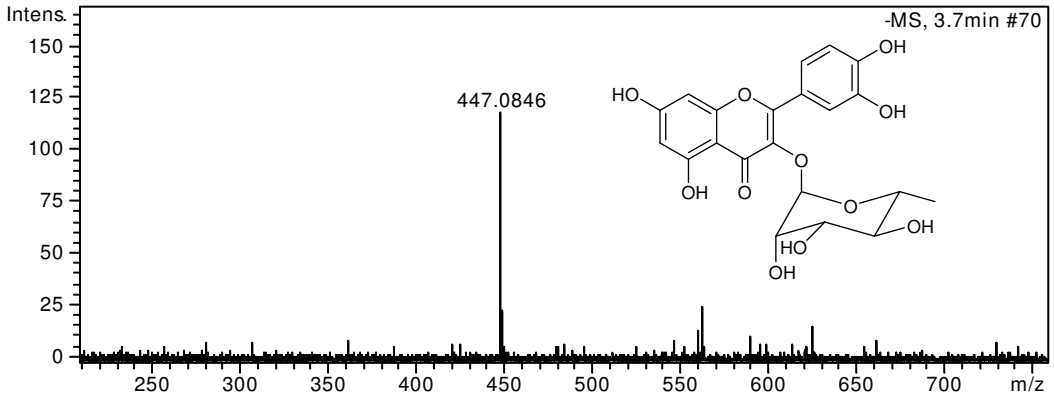


Figura 34: Espectro de massas de primeira ordem da substância **10** obtido no modo negativo (ESI).

O espectro de RMN de ^{13}C da substância **10** apresentou 21 sinais de carbonos, destacando-se para os sinais em δ_C 157,2, 134,6 e 177,7 atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-4, respectivamente. Estes três sinais evidenciam o anel C de um flavonol (Anexo 87).

O espectro de RMN de ^{1}H (Anexos 84-86) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos de um flavonol cujos anéis A e B apresentam-se tetra e trissubstituídos, respectivamente. Esta observação foi deduzida pela presença de quatro dubletos e um duplo dubleto em δ_H 6,19 (*d*; *J* = 2,0 Hz), 6,38 (*d*; *J* = 2,0 Hz), 7,29 (*d*; *J* = 2,0 Hz), 6,86 (*d*; *J* = 8,5 Hz) e 7,25 (*dd*; *J* = 8,5 e 2,0 Hz) relacionados aos hidrogênios H-6, H-8, H-2', H-5' e H-6', respectivamente (Tabela 26).

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou ainda sinais para uma unidade de açúcar, constatada pelo dubleto em δ_H 5,25, atribuído ao hidrogênio anomérico H-1". O valor da constante de acoplamento *J* = 1,5 Hz, calculada para este sinal, indica um acoplamento do tipo equatorial-equatorial com o hidrogênio H-2" em δ_H 3,97 (*dd*; *J* = 3,5 e 1,5 Hz) sugerindo uma configuração α, para a unidade ramnose.

Pela correlação observada no mapa de contornos *g*HMBC (Anexo 94) entre o carbono C-3 e o hidrogênio anomérico em δ_H 5,25 foi possível estabelecer a posição da ramnose. A posição do anel B foi confirmada pelas correlações observadas entre o carbono C-2 e os hidrogênios em δ_H 7,29 e 7,25 atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6', respectivamente (Figura 35).

Os mapas de contornos *g*HMQC e *g*HMBC corroboraram a atribuição correta das posições dos hidrogênios e carbonos da subunidade ramnose do flavonol **10** (Anexos 88-94).

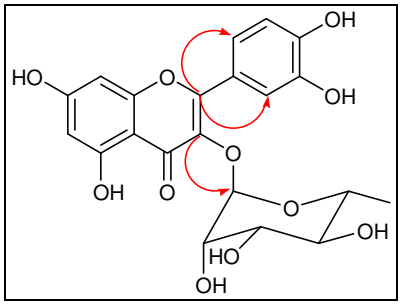


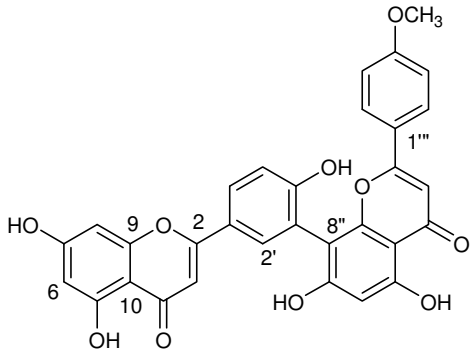
Figura 35: Principais correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC da substância **10**.

Tabela 26: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância **10** (DMSO-*d*6)

Posição	δ_C	δ_H; mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-2	157,2		H-2' e H-6'
C-3	134,2		H-1"
C-4	177,7		
C-5	161,3		H-6
C-6	98,7	6,19; *d*; 2,0	H-8
C-7	164,2		H-8
C-8	93,6	6,38; *d*; 2,0	H-6
C-9	156,2		H-8
C-10	104,0		H-6 e H-8
C-1'	120,7		H-5'
C-2'	115,6	7,29; *d*; 2,0	H-6'
C-3'	145,2		H-2' e H-5'
C-4'	148,4		H-2', H-5' e H-6'
C-5'	115,4	6,86; *d*; 8,5	
C-6'	121,1	7,25; *dd*; 8,5 e 2,0	H-2'
C-1"	101,8	5,25; *d*; 1,5	
C-2"	70,0	3,97; *dd*; 3,5 e 1,5	
C-3"	70,5	3,50; *dd*; 9,3 e 3,5	H-1"
C-4"	71,2	3,16; *t*; 9,3	H-6"
C-5"	70,3	3,20-3,23; *m*	H-4"
C-6"	17,4	0,81; *d*; 6,5	H-4"
5-OH		12,6, *s*	

Pelas análises espectroscópicas e espectrométricas, bem como pela comparação com os dados da literatura[102] foi possível identificar a substância **10** como sendo a quercitrina. Este é o primeiro relato desta substância para o gênero *Kielmeyera*.

4.3.2.2 Identificação da substância 11



podocarpusflavona A
(11)

A substância **11** foi isolada da fração AcOEt da folhas de *K. variabilis* como um preciptado amarelo claro.

Os resultados observados nos espectros de RMN de ^{1}H (Anexos 95 e 96) e ^{13}C (Anexo 97), assim como nos mapas de contorno *g*HMQC (Anexo 98 e 99) e *g*HMBC (Anexos 100 e 101) permitiram caracterizar a substância **11** como pertencente à classe dos biflavonóides do tipo flavona-flavona.

No modo de ionização negativa (ESI), o espectro de massas exibiu um pico referente ao íon *quase-molecular* em *m/z* 551 $[M-H]^-$ correspondendo à fórmula molecular $C_{31}H_{20}O_{10}$ (Figura 36).

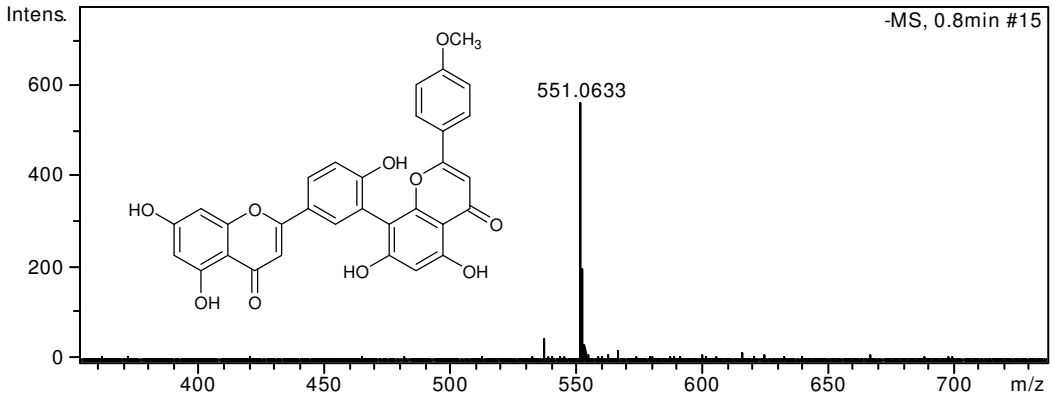


Figura 36: Espectro de massas de primeira ordem da substância **11** obtido no modo negativo (ESI).

No espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 97) destacam-se os sinais em δ_C 163,8 e 103,0 atribuídos aos carbonos C-2 e C-3 de uma unidade flavona e os sinais de carbonos em δ_C 163,2 e 103,2 atribuídos aos carbonos C-2" e C-3" da outra unidade flavona, além destes destacaram-se os sinais em δ_C 181,7 e 182,1 correspondentes aos carbonos carbonílicos C-4 e C-4" das unidades I e II (Tabela 27).

O espectro de RMN de ^{1}H (Anexos 95 e 96) mostrou a presença de dois singletos em δ_H 12,95 (Unidade I) e 13,05 (Unidade II), correspondentes a hidroxilas quelatadas com ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio carbonílico situado em C-4 e C-4". Sinais de um anel aromático trissubstituído contendo um carbono carbinólico foram observados em δ_H 7,97 (*d*; *J* = 2,5 Hz), δ_H 7,14 (*d*; *J* = 8,5 Hz) e δ_H 8,0 (*dd*; *J* = 8,5 e 2,5 Hz) atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente, juntamente com os dubletos de um anel aromático tetrassubstituído em δ_H 6,43 (*d*; *J* = 2,0 Hz) e em δ_H 6,17 (*d*; *J* = 2,0 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-6. Destaca-se ainda a presença de dois dubletos em δ_H 7,66 (*d*; *J* = 9,0 Hz), referentes aos hidrogênios H-2"' e H-6"' e em δ_H 6,91 (*d*; *J* = 9,0 Hz), atribuídos à H-3"' e H-5"'.

As correlações a longa distância (Anexo 101) foram úteis para determinar as posições dos substituintes e para designar a união interflavonoídica, tipo 3'→8", por intermédio da correlação do sinal de hidrogênio em δ_H 7,97 (H-2') com o carbono absorvendo em δ_C 104,1 (C-8") (Figura 37).

O experimento de NOESY 1D (Anexo 104) com irradiação nos hidrogênios atribuídos à metoxila absorvendo em δ_H 3,74 demonstrou um ganho na intensidade do sinal em δ_H 6,91 (H-3''' e H-5'''), concluindo portanto que a metoxila encontra-se ligada ao carbono C-4''' (Figura 37).

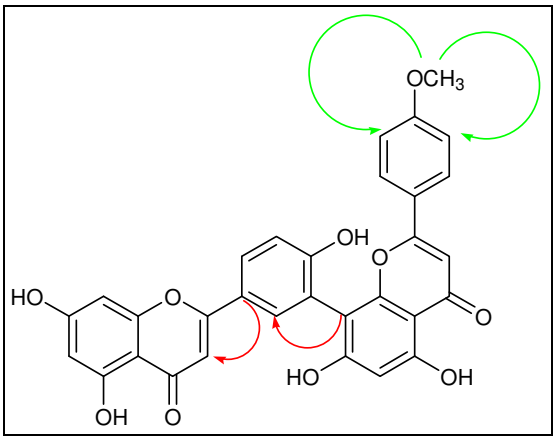


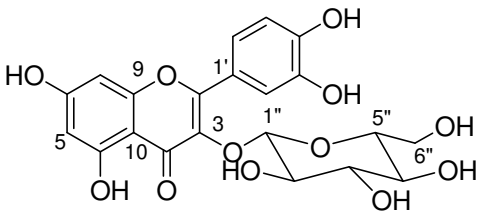
Figura 37: Correleções C-H (-----) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições H-3 e H-2' e correlação observada no experimento de NOESY 1D (-----) na irradiação dos hidrogênios em δ_H 3,74.

A análise destas informações em conjunto com os dados da literatura,[103] permitiu identificar a substância **11** como a podocarpusflavona A, ainda não relatada para o gênero *Kielmeyera*.

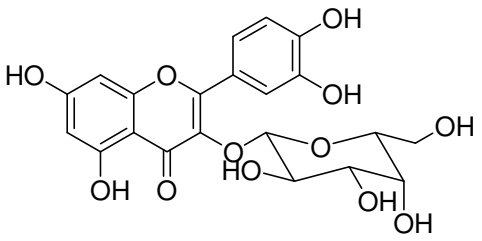
Tabela 27: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da substância **11** (DMSO-*d*6)

Posição	δ_C	$\delta_{H;}$ mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-2	163,8		H-3 e H-2'
C-3	103,0	6,80; *s*	
C-4	181,7		H-3
C-5	161,4		5-OH
C-6	98,8	6,17; *d*; 2,0	5-OH
C-7	164,1		H-8
C-8	94,0	6,43; *d*; 2,0	H-6
C-9	157,3		H-8
C-10	103,7		5-OH, H-3 e H-8
C-1'	121,0		H-3' e H-5'
C-2'	131,3	7,97; *d*; 2,5	H-6'
C-3'	120,0		H-5'
C-4'	159,6		H-2' e H-6'
C-5'	116,2	7,14; *d*; 8,5	
C-6'	127,8	8,0; *dd*; 8,5 e 2,5	H-2'
C-2"	163,2		H-3"
C-3"	103,2	6,86; *s*	
C-4"	182,1		H-3"
C-5"	160,5		5"-OH
C-6"	98,7	6,40; *s*	5"-OH
C-7"	161,0		H-6"
C-8"	104,1		H-2'
C-9"	154,5		
C-10"	103,6		5"-OH, H-3" e H-6"
C-1'"	123,0		H-3", H-3'", H-5'" e H-6'"
C-2'"	128,0	7,66; *d*; 9,0	H-6'"
C-3'"	114,5	6,91; *d*; 9,0	H-5'"
C-4'"	162,2		H-2'", H-3'", H-5'" e H-6'"
C-5'"	114,5	6,91; *d*; 9,0	H-3"
C-6'"	128,0	7,66; *d*; 9,0	H-2'"
4'"-OMe	55,5	3,74; *s*	
5-OH		12,95, *s*	
5"-OH		13,05, *s*	

4.3.2.3 Identificação da mistura contendo as substâncias 12 e 13



quercetina-3-*O*-β-glicosídeo
(12)



quercetina-3-*O*-β-galactosídeo
(13)

Pela análise dos espectros de RMN de ^{1}H (Anexos 105-107) e ^{13}C (Anexo 108) das substâncias **12** e **13** pode-se concluir que estas pertencem à classe dos flavonóides. Os sinais observados em δ_C 156,36/156,38, 133,37/133,53 e 177,50/177,46 foram correlacionados aos carbonos C-2, C-3 e C-4, das substâncias **12** e **13**, respectivamente, sugerindo a presença do anel C típico de um flavonol.

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou o mesmo deslocamento para os hidrogênios H-6 e H-8 de ambas as substâncias em δ_H 6,21 e 6,41, respectivamente. Aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' da substância **12** foram atribuídos os sinais em δ_H 7,55 (*d; J* = 1,5 Hz), 6,85 (*d*; *J* = 8,5 Hz) e 7,66 (*dd*; *J* = 8,5 e 1,5 Hz), respectivamente. Para a substância **13** foi atribuído o conjunto de sinais em δ_H 7,59 (*m*), 6,85 (*d*; *J* = 8,5 Hz) e 7,57 (*m*), correspondentes aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6', respectivamente. Esse conjunto de informações sugerem que os flavonóis **12** e **13** possuem a mesma aglicona apresentando um anel A 5,7,9,10 tetrassubstituído e um anel B 1',3',4'-trissubstituído, sendo esta a quercetina.[104]

O espectro de RMN de ^{1}H apresentou dois sinais característicos de hidrogênios anoméricos, o dubleto em δ_H 5,46 com constante de acoplamento de 7,5 Hz e o dubleto em δ_H 5,37 com constante de 8,0 Hz, sugerindo a presença de duas unidades de β-hexoses, sendo estes sinais atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1" das substâncias **12** e **13**, respectivamente.

O espectro de ^{13}C revelou dois conjuntos de seis sinais em δ_C 61,02 (C-6"), 77,54 (C-5"), 69,98 (C-4"), 76,55 (C-3"), 74,14 (C-2") e 100, 98 (C-1") os quais foram atribuídos à unidade glicosídica da substância **12** e o conjunto de sinais em δ_C 60,18 (C-6"), 75,86 (C-5"), 67,97 (C-4"), 73,25 (C-3"), 71,26 (C-2")

e 101,93 (C-1”) atribuídos à unidade galactosídica da substância **13** (Tabela 28).

O esperimento de TOCSY 1D (Anexos 116 e 117) bem como os dados observados nos mapas de contornos *g*HMQC e *g*HMBC e comparação com os dados da literatura[104] permitiram a atribuição dos hidrogênios das unidades glicosídica e galactosídica.

A posição da unidade glicosídica da substância **12** foi determinada pela correlação observada no mapa de contornos *g*HMBC (Anexo 113) do carbono em δ_C 133,37 (C-3) com o hidrogênio anomérico em δ_H 5,46 (H-1”), o mesmo foi observado para a substância **13** para a qual foi verificada a correlação entre o carbono em δ_C 133,53 (C-3) com o hidrogênio anomérico em δ_H 5,37 (H-1”) (Figura 38).

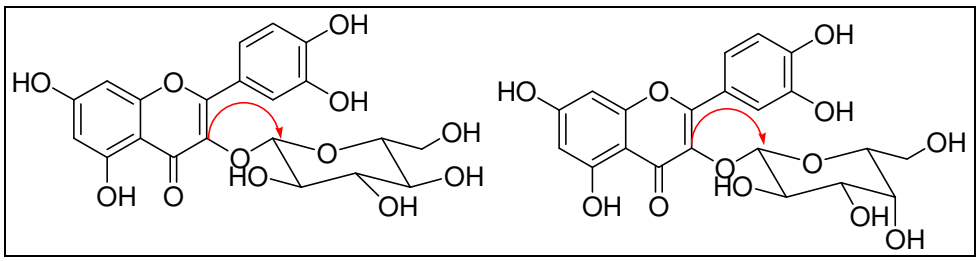


Figura 38: Correleções C-H (**-----**) observadas no mapa de contornos *g*HMBC utilizadas na determinação das posições da unidade glicosídica para a substância **12** e galactosídica para a substância **13**.

No espectro de massas em modo negativo de ionização (ESI) foi observado o pico de íon *quasi-molecular* em *m/z* 463 $[M-H]^-$ correspondendo a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{12}$ (Figura 39), confirmando as estruturas propostas e que ambas possuem a mesma fórmula molecular.

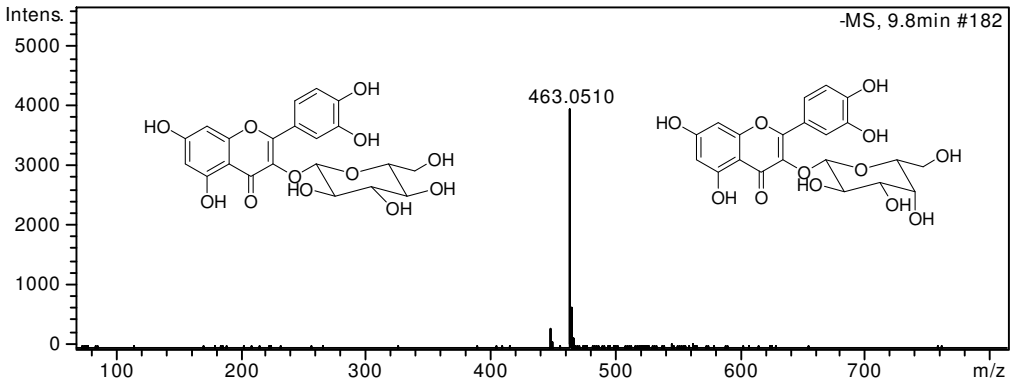


Figura 39: Espectro de massas de primeira ordem da mistura contendo as substâncias **12** e **13** obtido no modo negativo (ESI).

Tabela 28: Dados de RMN de ^{1}H (500 MHz), RMN de ^{13}C (125 MHz) e correlações observadas nos mapas de contorno *g*HMQC e *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (DMSO-*d*6)

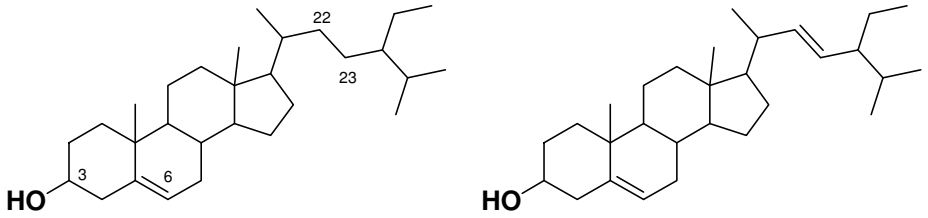
Posição	Subst. 12			Subst. 13		
	δ_C	δ_H; mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC	δ_C	δ_H; mult.; *J*(Hz)	*g*HMBC
C-2	156,36		H-2' e H-6'	156,38		
C-3	133,37		H-1"	133,53		H-1"
C-4	177,50			177,46		
C-5	161,24			161,24		
C-6	98,76	6,21; *sl*	H-8	98,76	6,21; *sl*	H-8
C-7	164,42			164,42		
C-8	93,58	6,41; *sl*	H-6	93,58	6,41; *sl*	H-6
C-9	156,27			156,22		
C-10	103,94		H-6	103,88		H-8
C-1'	121,96		H-2'	121,62		H-2'
C-2'	116,04	7,55; *d*; 1,5	H-6'	116,25	7,59; m	H-6'
C-3'	144,88		H-2' e H-5'	144,87		H-6'
C-4'	148,53		H-2' e H-6'	148,55		H-2'
C-5'	115,25	6,85; *d*; 8,5		115,25	6,85; *d*; 8,5	
C-6'	121,96	7,66; *dd*; 8,5 e 1,5	H-5'	121,62	7,57; *m*	
C-1"	100,98	5,46; *d*; 7,5	H-2" e H-3"	101,93	5,37; *d*; 8,0	H-2" e H-3"
C-2"	74,14	3,24; *m*		71,27	3,58; *dd*; 8,0 e 8,0	
C-3"	76,55	3,25; *m*	H-2"	73,25	3,39; *dd*; 8,0 e 3,0	H-2"
C-4"	69,98	3,11; *m*	H-2"	67,97	3,67; *sl*	H-5" e H-6"
C-5"	77,54	3,10; *m*		75,86	3,33; *m*	
C-6"	61,02	3,57;*m* 3,60; *m*		60,18	3,34; *m* 3,35; *m*	H-5"

4.3.3 Esteróides

Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e

C-14. Originados das frações lipídicas de vegetais e animais, o sitosterol e o estigmasterol são os esteróides mais frequentemente encontrados no reino vegetal.[105] Quase sempre estes esteróides encontram-se em mistura devido as suas semelhanças, então, na maioria das vezes, suas identificações são realizadas em mistura através de CG-EM.

4.3.3.1 Identificação da mistura contendo as substâncias 14 e 15



..... **..β-sitosterol (14)** **estigmasterol (15)**

A mistura denominada por HGK-2, foi isolada da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* como cristais transparentes em formato de agulhas.

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H e CG-EM, permitiu caracterizar HGK-2 como sendo uma mistura de dois esteróides **14** e **15**.

O espectro de RMN de ^{1}H (Anexo 118) apresentou sinais característicos de hidrogênios olefínicos *trans* em δ_H 5,16 (*d*; *J* = 8,6 e 15,2 Hz) atribuído ao hidrogênio H-22 e δ_H 5,02 (*d*; *J* = 8,6 e 15,2 Hz) atribuído ao hidrogênio H-23 do estigmasterol.

A presença do multipleto em δ_H 3,56-3,48 atribuído ao hidrogênio H-3 e do dubleto em δ_H 5,35 atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 (*J* = 5,2 Hz) e o acúmulo de sinais na região em δ_H 0,6-2,4 atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos são sinais característicos dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol.

O cromatograma obtido por cromatografia gasosa apresentou dois sinais com os tempos de retenção de 103,840 e 105,706 minutos (Figura 40). O espectro de massas obtido por CG-EM (IE, +70 eV) para a substância com T_R = 103,840 min. apresentou o íon molecular em *m/z* 414 (Figura 41)

confirmando a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ referente ao esteróide β-sistosterol (**14**).

A substância com T_R = 105,706 apresentou o íon molecular *m/z* 412 (Figura 42) obtido por CG-EM (IE, +70 eV) referente à fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ confirmando a presença do esteróide estigmasterol (**15**).

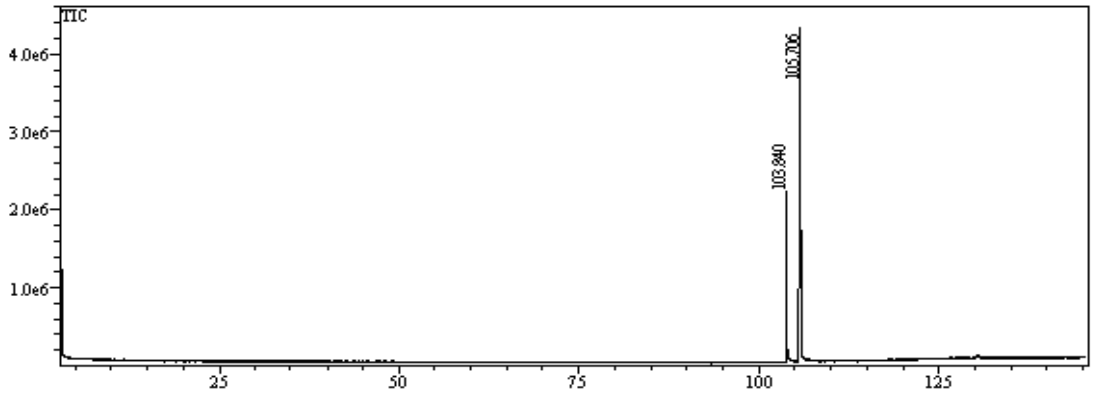


Figura 40: Cromatograma da mistura HGK-2 contendo as substâncias **14** e **15**.

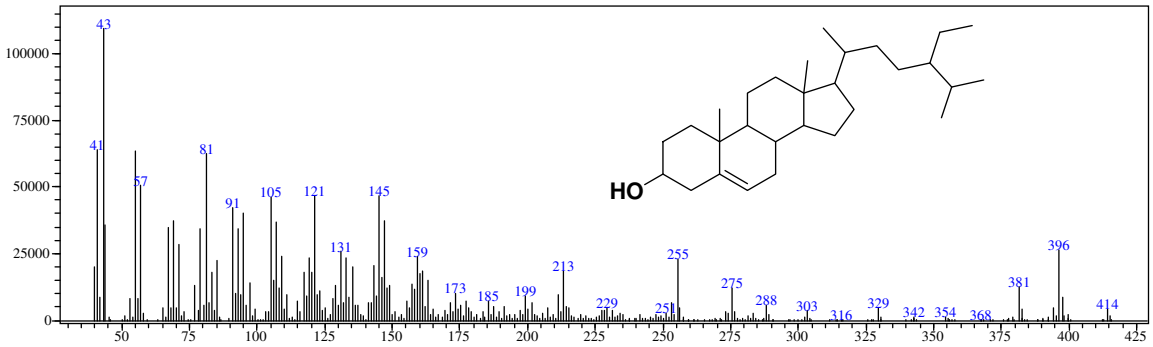


Figura 41: Espectro de massas do β-sitosterol obtido por CG-EM (IE, +70 eV).

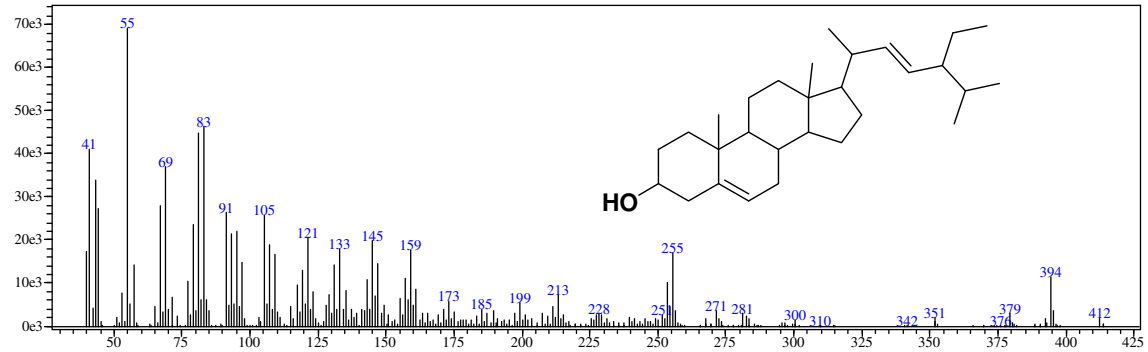
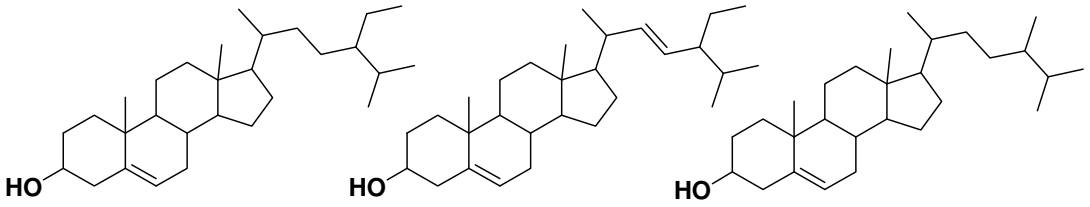


Figura 42: Espectro de massas do estigmasterol obtido por CG-EM (IE, +70 eV).

Baseado nos dados espectrofotométricos de RMN de ^1H e EM e comparação com os dados de fragmentação das bibliotecas virtuais NIST 21 e 107 e WILEY MS BASE, bem como com os dados encontrados na literatura[106]

HGK-2 foi identificada como a mistura dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol.

4.3.3.2 Identificação da mistura contendo as substâncias 14, 15 e 16



β-sitosterol **estigmasterol.....** **ergost-5-en-3-ol**

(14) **(15)** **(16)**

A mistura denominada por **HGK-3** foi isolada da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* como cristais transparentes em formato de agulhas.

A análise dos espectros de RMN de ^{1}H e CG-EM, permitiu caracterizar **HGK-3** como sendo uma mistura de substâncias pertencentes à classe dos esteróides.

O cromatograma obtido por cromatografia gasosa apresentou três sinais com os tempos de retenção de 102,723, 103,994 e 106,040 minutos (Figura 43).

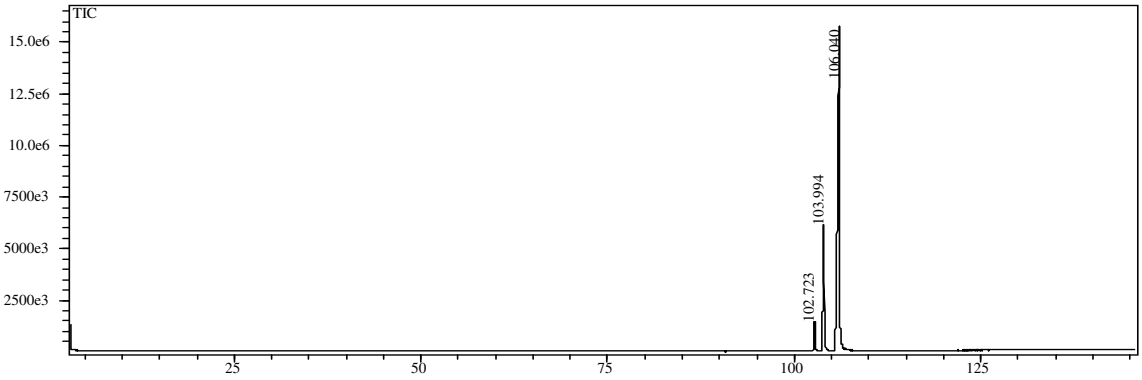


Figura 43: Cromatograma da mistura **HGK-3**.

Os espectros de massas obtidos por CG-EM (IE, +70 eV) para a substâncias com T_R = 103,994 e 106,040 min. apresentaram os íons moleculares *m/z* 414 e 412 confirmando a presença dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol. O espectro de massas para a substância com T_R = 102,723 (

Figura 44) apresentou o íon molecular *m/z* 400 referente à fórmula molecular $C_{28}H_{48}O$. Através do banco de dado das bibliotecas virtuais NIST 21 e 107 e WILEY MS BASE foi possível identificar esta substância como sendo o ergost-5-en-3-ol.

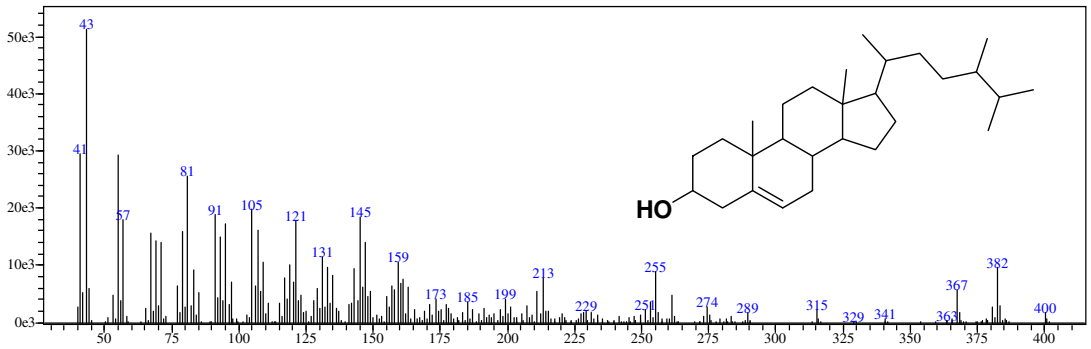


Figura 44: Espectro de massas do ergost-5-en-3-ol obtido por CG-EM (IE, +70 eV).

4.4 Estudo das frações apolares por cromatografia gasosa

A bioatividade de extratos de baixa polaridade tem sido frequentemente associada a misturas complexas de triterpenos e/ou esteróides sem, no entanto, uma análise mais detalhada de identificação dos componentes da mistura. Isso acontece, em primeiro lugar, porque os procedimentos de fitoquímica tradicionais, que incluem isolamento dos constituintes das misturas, podem ser trabalhosos e relativamente caros. Em segundo lugar, devido à complexidade estrutural, a análise de triterpenos e esteróides por técnicas espectroscópicas, tem se mostrado difícil em muitos casos. A cromatografia gasosa (CG) surgiu como uma das melhores técnicas analíticas para caracterização rápida, simples e relativamente barata de compostos apolares de extratos de plantas.[107]

4.4.1 Identificação dos triterpenos e esteróis das espécies *B. glaziovii* e *K. variabilis* utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-DIC)

As frações hexânicas das folhas e galhos de *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis* foram analisadas por CG-DIC utilizando métodos que não

requereram pré-derivatizações. O método CG-DIC utilizado neste estudo empregou duas diferentes colunas: SPB-5 e SPB-50, as quais foram utilizadas devido a sua menor polaridade, inércia frente a compostos orgânicos e resistência a alto limite de temperatura. Tais aspectos as tornam ideais para analises de extratos e frações semi-voláteis de plantas não derivatizados. Os procedimentos de preparo das amostras, as condições cromatográficas e a obtenção dos padrões se encontram descritos detalhadamente no item 3.2.7.

Os cromatogramas obtidos em coluna SPB-5 e SPB-50 para as frações hexânicas de *B. glaziovii* (Figuras 45 a 48) permitiram a identificação de componentes da mistura por comparação dos valores de retenção relativa (RR) das substâncias com os valores de RR dos padrões autênticos. A presença de cada triterpeno ou esterol foi adicionalmente confirmado pela co-injeção de padrões autênticos em ambas as colunas para evitar erros de identificação devido à sobreposição das zonas de retenção.

Os resultados indicam que o esterol campesterol (**18**) e os triterpenos α-amirina (**19**) e acetato de β-amirina (**20**) estão presentes nas folhas e galhos de *B. glaziovii.* Para os galhos foram identificados ainda os triterpenos lupenona (**22**) e α-amirinona **(21)** e o esterol estigmasterol (**15**).

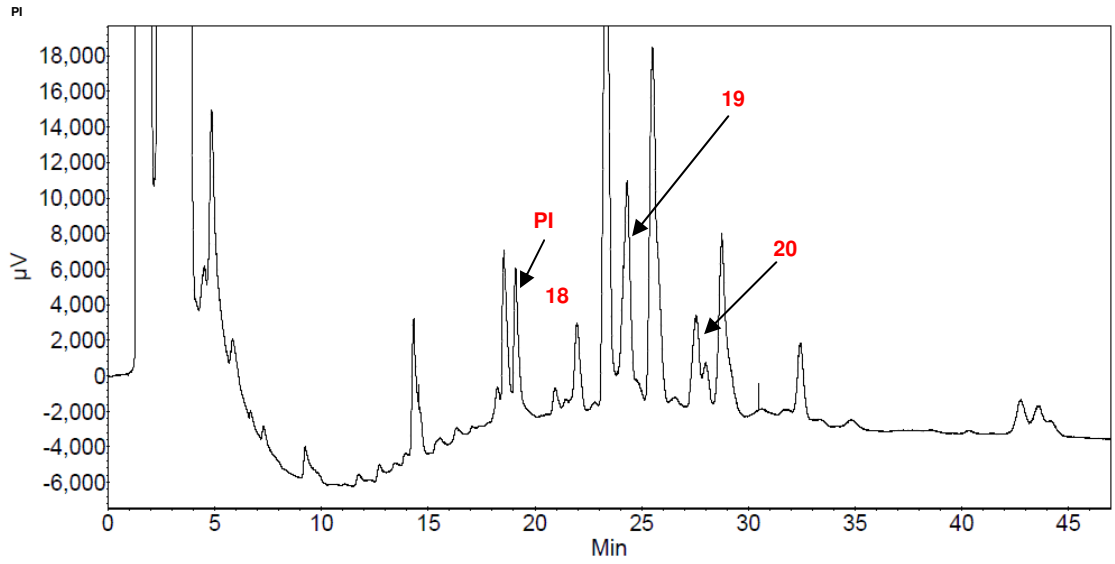


Figura 45: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica das folhas de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 18,60 min); **18** = campesterol (TR = 20,95); **19** = α-amirina (TR = 24,32 min.) e **20** = acetato de β-amirina (TR = 27,53 min.)].

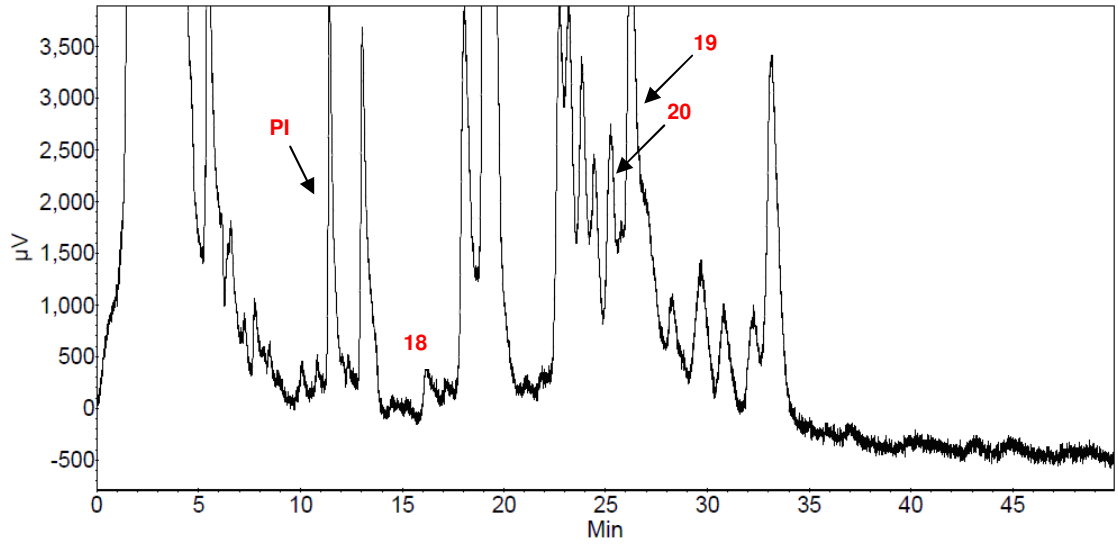


Figura 46: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica das folhas de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 13,06); **18** = campesterol (TR = 16,19); **20** = acetato de β-amirina (TR = 25,22 min.) e **19** = *α*-amirina (TR = 26,22 min.)].

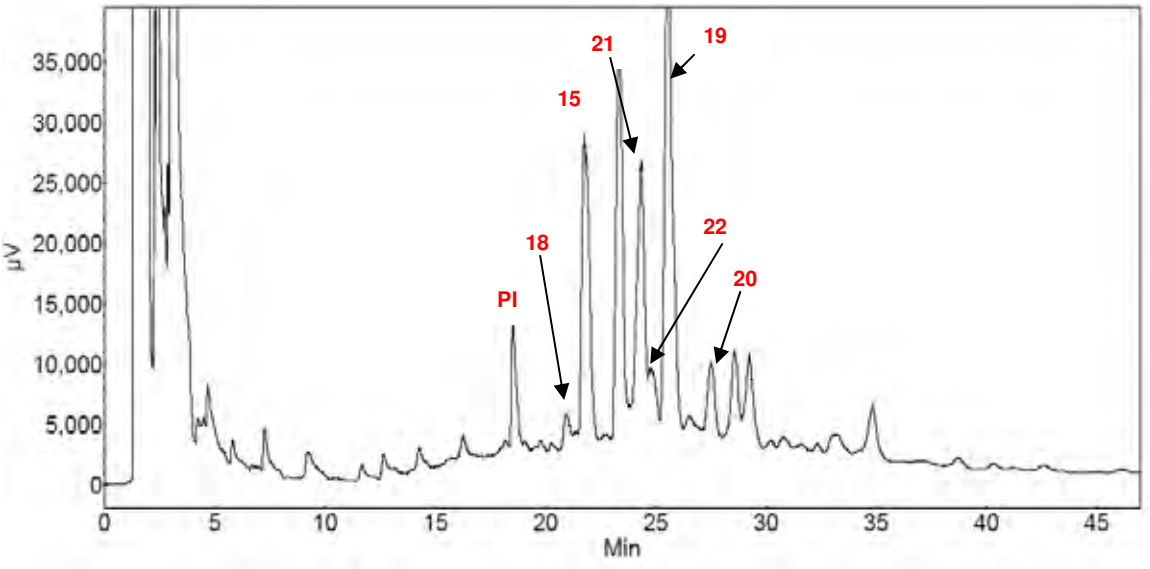


Figura 47: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica dos galhos de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 18,53); **18** = campesterol (TR = 20,90 min.); **15** = estigmasterol (TR = 21,75 min.); **21** = α-amirinona (TR = 24,92 min.); **22** = lupenona (TR = 24,93 min.); **19** = α-amirina (TR = 25,56 min.); **20** = acetato de β-amirina (TR = 27,50 min.)].

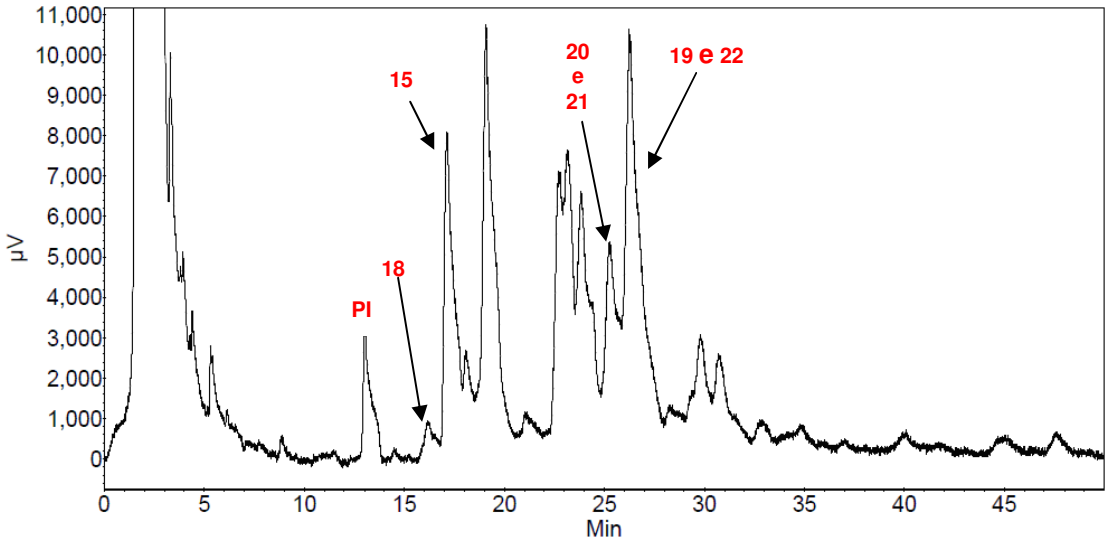


Figura 48: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica dos galhos de *Brosimum glaziovii* [PI = colesterol (TR = 13,05 min.); **18** = campesterol (TR = 16,15 min.); **15** = estigmasterol (TR = 17,13 min.); **20** = acetato de β-amirina (TR = 25,23 min.); **21** = α-amirinona (TR = 25,23 min.); **22** = lupenona (TR = 26,26 min.); **19** = α-amirina (TR = 26,26 min.)].

A Tabela 29 sumariza os resultados das análises de CG-DIC, indicando parte da composição química das frações hexânicas das folhas e galhos de *B. glaziovii*.

Tabela 29: Triterpenos e esteróis identificados nas frações hexânicas das folhas e galhos de *B. glaziovii* por análises de CG-DIC (Colunas SPB-5 e SPB-50)

Substâncias	Folhas	Galhos	RR[a]	RR[b]
α-amirina	+	+	1,381	2,015
β-amirina	-	-	1,318	1,799
lupeol	-	-	1,389	1,859
taraxerol	-	-	1,285	1,750
acetato de α-amirina	-	-	1,572	2,246
acetato de β-amirina	+	+	1,486	1,927
acetato de lupeol	-	-	1,582	2,265
acetato de baurenila	-	-	---	2,536
acetato de taraxerol	-	-	1,464	1,928
acetato de friedelanol	-	-	1,823	2,949
friedelina	-	-	1,580	2,776
lupenona	-	+	1,341	2,011
α-amirinona	-	+	1,341	1,940
β-amirinona	-	-	1,279	1,727
germanicona	-	-	1,264	1,658
campesterol	+	+	1,131	1,231
estigmasterol	-	+	1,175	1,302
β-sitosterol	-	-	1,263	1,482

RR = Retenção relativa ao padrão interno (Colesterol): [a] Coluna SPB-5; [b] Coluna SPB-50. (+) presença da substância; (-) ausência da substância.

O mesmo procedimento foi empregado na identificação dos triterpenos e esteróis presentes nas folhas e galhos de *K. variabilis*. A partir da comparação com as RR dos padrões autênticos identificou-se a presença do esterol β-sitosterol (**14**) tanto nas folhas quanto nos galhos e dos triterpenos lupenona (**22**) e germanicona (**23**) presente apenas nos galhos (Figuras 49 a 52).

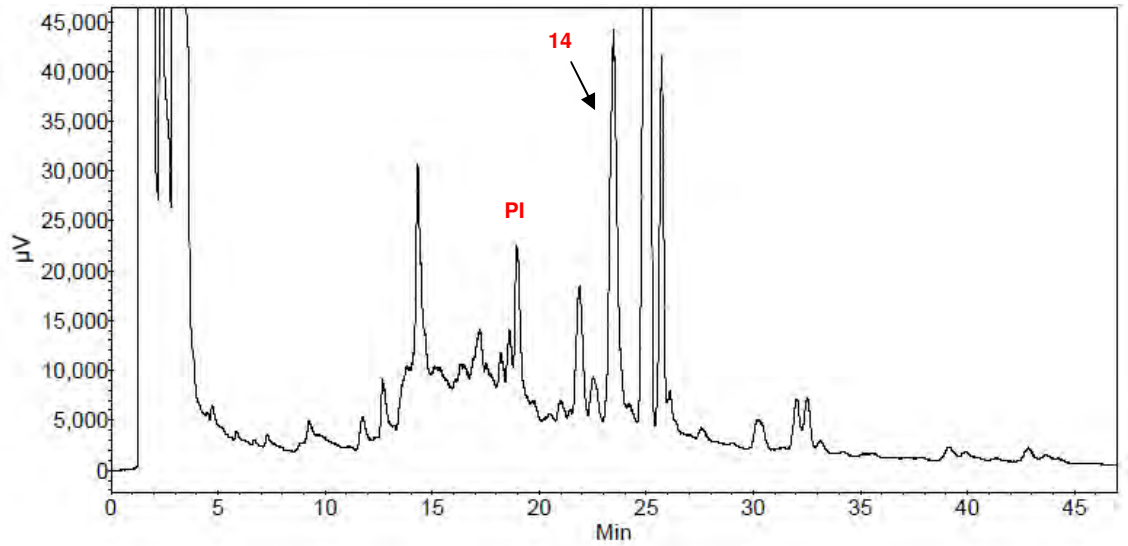


Figura 49: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica das folhas de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 18,60 min.); **14** = β-sitosterol (TR = 23,46 min.)].

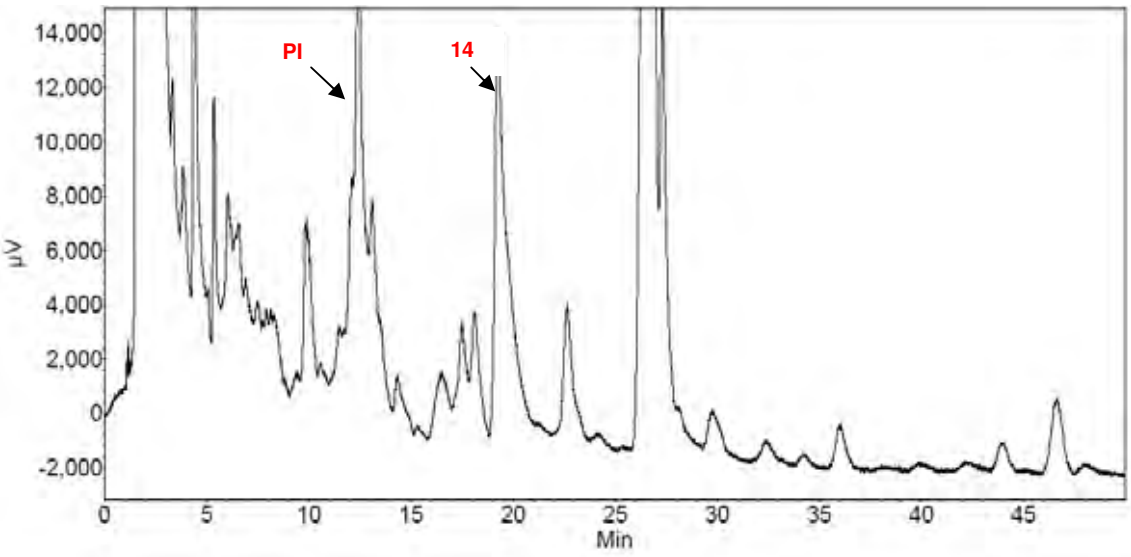


Figura 50: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica das folhas de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 13,10 min.); **14** = β-sitosterol (TR = 19,27 min.)].

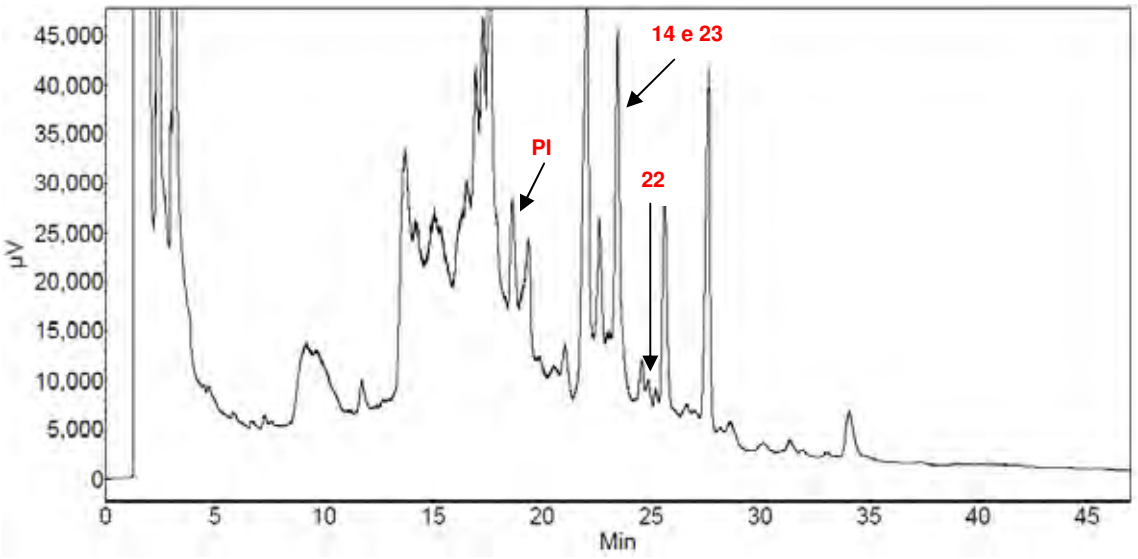


Figura 51: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-5 para a fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 18,66 min.); **14** = β-sitosterol (TR = 23,48 min.); **23** = germanicona (TR = 23,48); **22** = lupenona (TR = 24,88 min.)].

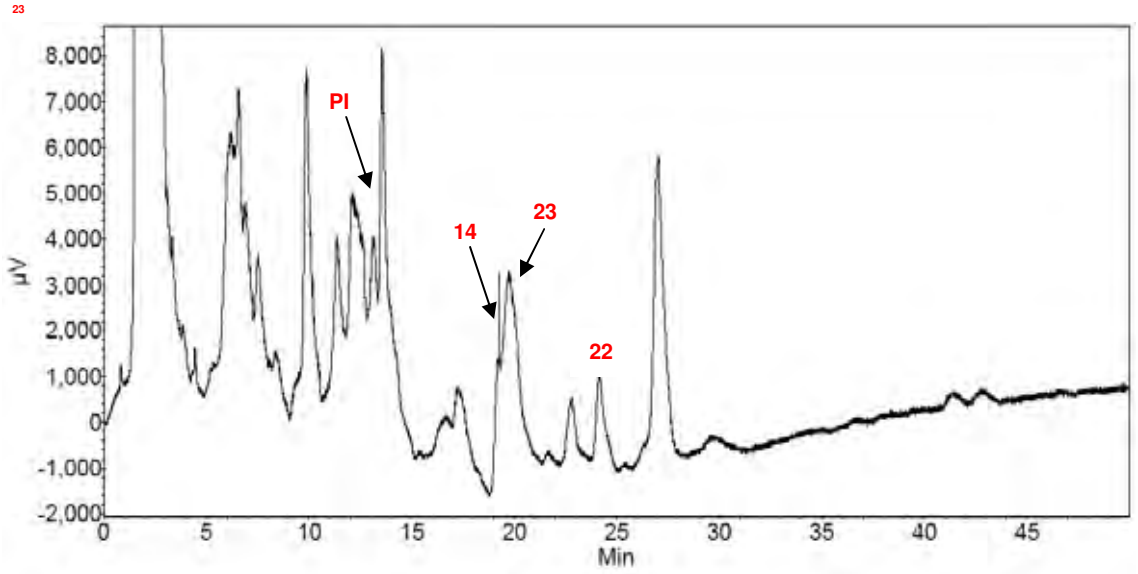


Figura 52: Cromatograma (CG-DIC) em coluna SPB-50 para a fração hexânica dos galhos de *K. variabilis* [PI = colesterol (TR = 13,16 min.); **14** = β-sitosterol (TR = 19,30 min.); **23** = germanicona (TR = 21,70 min.) e **22** = lupenona (TR = 26,29 min.)].

A Tabela 30 sumariza os resultados das análises de CG-DIC, indicando parte da composição química das frações hexânicas das folhas e galhos de *K. variabilis*. A presença de tais substâncias apolares foi evidenciada por comparação com os valores de retenção relativa dos autênticos padrões, obtidos por colunas SPB-5 e SPB-50.

Tabela 30: Triterpenos e esteróis identificados nas folhas e galhos de *K. variabilis* por análises de CG-DIC (Colunas SPB-5 e SPB-50)

Substâncias	Folhas	Galhos	RR[a]	RR[b]
α-amirina	-	-	1,381	2,015
β-amirina	-	-	1,318	1,799
lupeol	-	-	1,389	1,859
taraxerol	-	-	1,285	1,750
acetato de α-amirina	-	-	1,572	2,246
acetato de β-amirina	-	-	1,486	1,927
acetato de lupeol	-	-	1,582	2,265
acetato de baurenila	-	-	---	2,536
acetato de taraxerol	-	-	1,464	1,928
acetato de friedelanol	-	-	1,823	2,949
friedelina	-	-	1,580	2,776
lupenona	-	+	1,341	2,011
α-amirinona	-	-	1,341	1,940
β-amirinona	-	-	1,279	1,727
germanicona	-	+	1,264	1,658
campesterol	-	-	1,131	1,231
estigmasterol	-	-	1,175	1,302
β-sitosterol	+	+	1,263	1,482

RR = Retenção relativa ao padrão interno (Colesterol): [a] Coluna SPB-5; [b] Coluna SPB-50. (+) presença da substância; (-) ausência da substância.

A Figura 53 apresenta as estruturas dos triterpenos e esteróis identificados nas folhas e galhos de *B. glaziovii* e *K. variabilis*, utilizando cromatografia gasosa (CG-DIC).

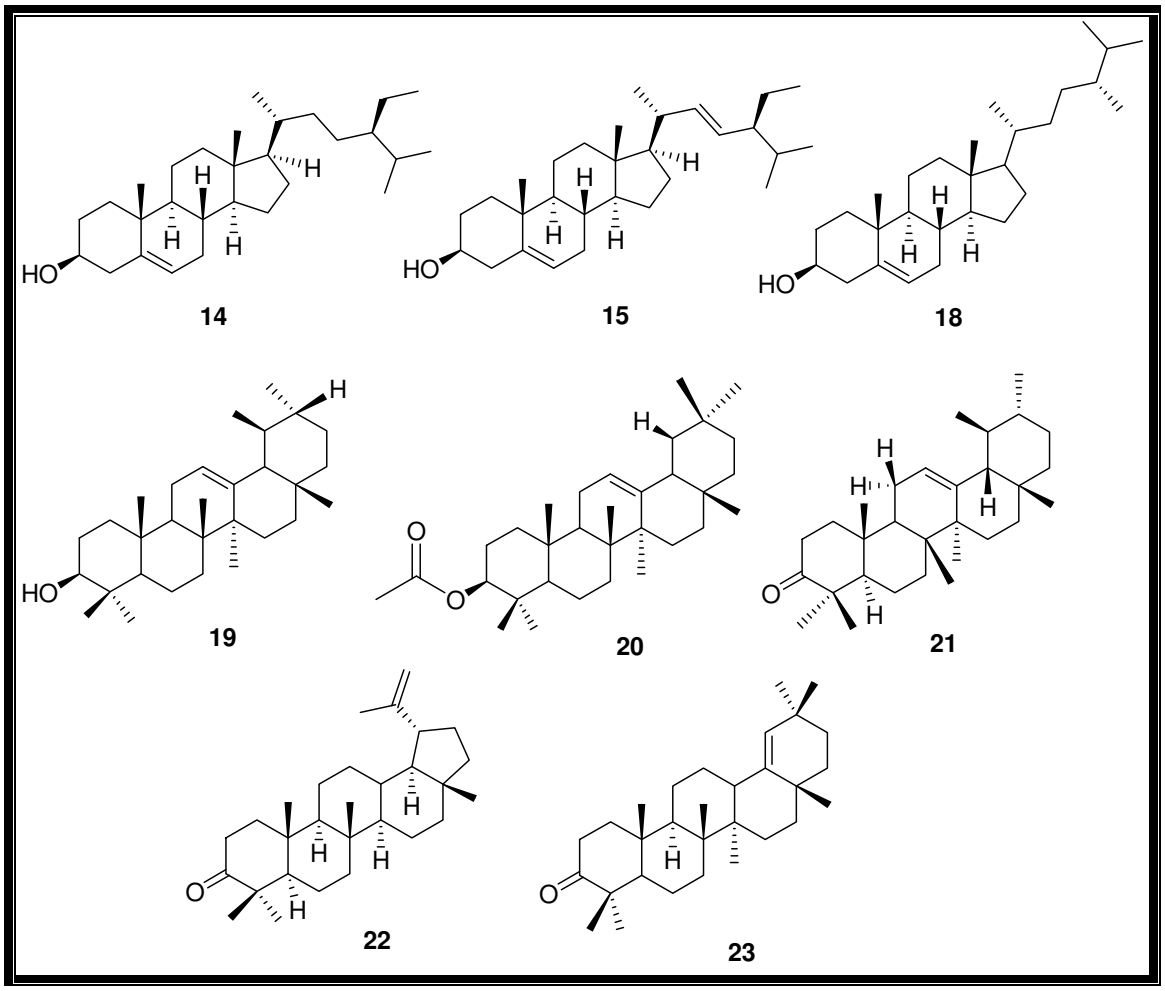


Figura 53: Estrutura dos esteróis β-sitosterol (**14**), estigmasterol (**15**) e campesterol (**18**) e dos triterpenos α-amirina (**19**), acetato de β-amirina (**20**), α-amirenona (**21**), lupenona (**22**) e germanicona (**23**) de *B. glaziovii* e *K. variabilis*.

5. Considerações finais

A avaliação do potencial antimalárico das espécies *Brosimum glaziovii* e *Kielmeyera variabilis* pelo teste químico de inibição de complexação de β-hematina e biológico utilizando *Plasmodium falciparum* indicou a espécie *K. variabilis* como uma importante fonte de antimaláricos potenciais. Da fração ativa (acetato de etila dos galhos de *K. variabilis*) foram isoladas e identificadas por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, xantonas oxigenadas e um xantonolignóide, sendo estas uma mistura contendo a 3,6-diidroxi-1,4,8-trimetoxixantona (**1**), 3,5-diidroxi-4-metoxixantona (**2**) e 3,4-diidroxi-6,8-dimetoxixantona (**3**) e as xantonas 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (**4**), 5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona (**5**), 2,3-dimetoxi-4-hidroxixantona (**6**), kielcorina (**7**), 3-hidroxi-2-metoxixantona (**8**) e 2-hidroxi-1-metoxixantona (**9**). As xantonas isoladas tiveram seu potencial antimalárico avaliado nas cepas de *Plasmodium falciparum* evidenciando a atividade da xantona pertencente à subclasse dos xantonolignóides **7** (kielcorina), a atividade apresentada pela kielcorina reafirma os dados da literatura que relatam o potencial biológico para esta subclasse de substâncias. Os extratos e frações que demonstram maior atividade estão sendo testados *in vivo* utilizando ratos infectados por *Plasmodium berghei*. Esta etapa do trabalho contribuiu para a identificação dos constituintes majoritários da fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* e ainda para a obtenção de valiosos dados sobre o potencial antimalárico desta espécie.

Os extratos e frações de partição de ambas as espécies, assim como as xantonas isoladas de *K. variabilis* foram avaliados em cepas de *Trypanosoma cruzi*, evidenciando a espécie *K. variabilis* como uma fonte de metabólitos bioativos e demonstrando que das xantonas testadas a que demonstrou maior potencial foi a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (**4**) destacando-se para a atividade demonstrada por esta na cepa Bolívia resitente à droga de referência, o benzonidazol. Estruturalmente a xantona com maior potencial tripanocida difere das demais identificadas por apresentar um grupamento catecólico, o qual pode estar relacionado à maior atividade desta substância. Para a espécie *B. glaziovii* a fração mais ativa foi a fração hexânica das folhas (EHFB) a qual

demonstrou CI_{50} de 58,42 µg/mL, este dado sugere o potencial tripanocida das folhas de *B. glaziovii* podendo vir a ser uma fonte de estudo futuros.

A avaliação do potencial de sequestro de radicais livres utilizando os radicais DPPH e ABTS, indicou as frações AcOEt e *n*-BuOH das folhas de *K. variabilis* como as mais pormissoras para este estudo, de onde foram isolados os flavonóides: quercitrina (**10**), podocarpusflavona A (**11**) e a mistura contendo quercetina-3-*O*-glicosídeo (**12**) e quercetina-3-*O*-galactosídeo (**13**). Os ensaios de sequestro de radicais livres para as substâncias isoladas evidenciaram a importância dos grupos catecólicos como potencializadores da atividade antioxidante.

Durante o estudo bioguiado pela atividade antimicrobiana com seis cepas distintas de bactérias resistentes à meticilina (MRSA), realizado no "Centre for Pharmacognosy and Phyttherapy-University of London- School of Pharmacy-London, UK", durante estágio "sanduíche" foi constatada a atividade da fração hexânica dos galhos de *K. variabilis*, atividade esta que guiou o estudo para esta fração. Desta fração foi isolada a substância ativa com atividade similar ou superior a atividade demonstrada pelo padrão norfloxacina. Sabe-se que se trata de uma mistura contendo dois derivados prenilados do floroglucinol, porém esta está em fase de elucidação estrutural. A avaliação do potencial antimicrobiano das xantonas isoladas de EAGK demonstrou que estas possuem uma atividade que vai de moderada a fraca para as diferentes cepas bacterianas. A xantona com maior potencial foi a 3,4-diidroxi-2-metoxixantona (**4**) a qual demonstrou ser mais ativa para a cepa bacteriana EMRSA16, quando comparada ao controle positivo norfloxacina.

A técnica CG-DIC mostrou-se eficiente e rápida na identificação de esteróides e triterpenos em misturas complexas. Neste estudo foram identificados das frações apolares de ambas as espécies 8 compostos lipofílicos sem a necessidade de etapas demoradas e caras de purificação, sendo estes, cinco triterpenos α-amirina (**19**), acetato de β-amirina (**20**), α-amirenona (**21**), lupenona (**22**) e germanicona (**23**) e de três esteróis campesterol (**18**), estigmasterol (**15**) e β-sitosterol (**14**) das frações hexânicas de *B. glaziovii* e *K. variabilis.*

Os extratos e frações das espécies selecionas para este estudo tiveram ainda seu potencial antifúngico em cepas fitopatógenas e em patógenos

humanos avaliados concluindo-se que a fração AcOEt dos galhos de *K. variabilis* (EAGK) foi a mais ativa quando testada nos fungos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Para os extratos e frações testados em quatro fungos oportunistas: *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* os dados de CIM revelaram uma ação antifúngica superior para os extratos e frações de *K. variabilis* quando comparada à espécie *B. glaziovii*. As atividades mais relevantes foram conseguidas com o fungo *Candida krusei*, onde o extrato e as frações das folhas de *K. variabilis* demonstram forte atividade. Forte atividade também foi notada com o mesmo fungo para os galhos de *K. variabilis*, sendo as atividades mais pronunciadas observadas para o extrato bruto (EGK) e pela fração de partição AcOEt (EAGK); superiores à atividade do padrão fluconazol.

Concluindo, mesmo que alguns ensaios aqui apresentados para detecção de atividade sejam preliminares, o potencial biológico apresentado pelas espécies estudadas são muito animadores e geraram dados importantes sobre o potencial biológico/farmacológico demonstrado neste estudo, principalmente com a espécie *K. variabilis*. Os dados obtidos serão essenciais para dirigir estudos químicos e farmacológicos adicionais com as substâncias bioativas objetivando identificar possíveis protótipos dentre as classes de metatabólitos secundários isolados. As informações contidas neste trabalho demonstram a importância dos estudos multidisciplinares na busca por entidades farmacológicas úteis, bem como a grande importância da biodiversidade brasileira.

Referências

1 SOUZA, P. P. **Moraceae Gaudich. de Viçosa, Minas Gerais, Brasil**: florística e anatomia foliar de*Ficus mexiae* Standl. 2009. 157 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009. f. 1.

2 TORRES, S. L. et al. Two flavans from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 347-349, 1996.

3 MONTEIRO, V. de F. F. et al. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 281-287, 2002.

4 VILEGAS, W.; POZETTI, G. L.; VILEGAS, J. H. Y. Coumarins from *Brosimum gaudichaudii*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 3, p. 416-417, 1993.

5 TORRES, S. L. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 10-47-1050, 2000.

6 TAKASHIMA, J. et al. Brosimacutins J-M, four new flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their cytotoxic activity. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 654-658, 2005.

7 TAKASHIMA, J.; OHSAKI, A. Brosimacutins A-I, nine new flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 12, p. 1843-1847, 2002.

8 TAKASHIMA, J.; ASANO, S.; OHSAKI, A. Mururins A-C, three new lignoids from *Brosimum acutifolium* and their protein kinase inhibitory activity. **Planta Medica**, v. 68, n.7, p. 621-625, 2002.

9 FERRARI, F. et al. New cytotoxic isoflavone from the root bark of *Brosimum utile*. **Natural Product Research**, v. 19, n. 4, p. 331-335, 2005.

10 TAKASHIMA, J. et al. Brosimacutins J-M, four new flavonoids from *Brosimum acutifolium* and their cytotoxic activity. **Planta Medica**, v. 71, n.7, p. 654-658, 2005.

11 TORRES, S. L. et al. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 1047-1050, 2000.

12 DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002. Cap. 14, p. 259-261.

13 SULTABAWA, M. U. S. et al. Xanthonoids of tropical plants. **Tetrahedron**, v. 36, n. 11, p. 1465-1506, 1980.

14 CRUZ, F. G. et al. Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1363-1366, 1998.

15 PERES, V.; NAGEM, T. J. Trioxigenated naturally occurring xanthones. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 191-214, 1997.

16 PINTO, M. M. M. Xanthone (dibenzo-gamma-pyrone): an interesting framework in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 2411-2411, 2005.

17 PINTO, M. M. M. et al. Xanthones derivatives: new insights in biological activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 2517-2538, 2005.

18 BARROS, M. A. G. Floração sincrônica e sistemas reprodutivos em quatro espécies de *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). **Acta Botanica Brasilica**, v.16, n.1, p.113-122, 2002.

19 ALVES, T. M. D. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 376-373, 2000.

20 CORTEZ, D. A. G. et al. Xanthones, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriaceae*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1367-1374 1998.

21 CRUZ, F. G. et al. Xanthones and coumarins from *Kielmeyera lathrophyton*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n.1, p. 117-122, 2001.

22 GOTTLIEB, O. R. et al. Chemistry of Brazilian Guttiferae. 27. Xanthones from *Kielmeyera rubriflora*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2253-2255, 1971.

23 BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthones from Guttiferae. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 967-998, 1989.

24 CORREA, M. P. **Dicionário das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 5, p. 50.

25 PINHEIRO, L. et al. Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Kielmeyera variabilis* Mart (CLUSIACEAE). **Quimica Nova**, v. 26, n. 2, p. 157-160, 2003.

26 PINHEIRO, L. et al. Antibacterial xanthones from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p.549-552, 2003.

27 EL-SEEDI, H. R. et al. Naturally occurring xanthones; latest investigations: isolation, structure elucidation and chemosystematic significance. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 20, p. 2581-2626, 2009.

28 ROBERTS, J. C. Naturally occurring xanthones. **Chemical Reviews**, v. 61, n. 6, p. 591-605, 1961.

29 VIEIRA, L. M. M.; KIJJOA, A. Naturally-occurring xanthones: recent developments. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 2413-2446, 2005.

30 SOUSA, M. E.; PINTO, M. M. M. Synthesis of xanthones: an overview. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 2447-2479, 2005.

31 FRANKLIN, G. et al. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 60-68, 2009.

32 RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Antibacterial xanthones from the leaves of *Garcinia nigrolineata*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 12, p. 1531-1535, 2003.

33 RUKACHAISIRIKU, V. et al. Benzopyran, biphenyl, and tetraoxygenated xanthone derivatives from the twigs of *Garcinia nigrolineata*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 8, p. 1218-1221, 2005.

34 SAKAGAMI, Y. et al. Antibacterial activity of α-mangostin against vancomycin resistant Enterococci (VRE) and synergism with antibiotics. **Phytomedicine**, v. 12, n, 3, p. 203-208, 2005.

35 SUKSAMRARN, S. et al. Antimycobacterial activity of prenylated xanthones from the fruits of *Garcinia mangostana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 7, p. 857-859, 2003.

36 SUKSAMRAR, S. et al. Cytotoxic prenylated xanthones from the young fruit of *Garcinia mangostana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 3, p. 301-305, 2006.

37 ITO, C. et al. Chemical constituents of *Garcinia fusca*: structure elucidation of eight new xanthone and their cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 200-205, 2003.

38 BANERJEE, S. et al. Assessment of the antiinfammatory effects of *Swertia chirata* in acute and chronic experimental models in male albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 21-24, 2000.

39 TIAN, Y. H. et al. Hepatoprotective constituents of *Cudrania tricuspidata*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 1, p. 44-48, 2005.

40 JIANG, D-J.; DAI, Z.; LI, Y-J. Pharmacological effects of xanthones as cardiovascular protective agents. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22, n. 2, p. 91-102, 2004.

41 ZOU, J. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors from *Calophyllum membranaceum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 10, p. 1514-1518, 2005.

42 ISHIGURO, K. et al. Bisxanthones from *Hypericum japonicum*: inhibitors of PAF-induced hypotension. **Planta Medica**, v. 68, n. 3, p. 258-261, 2002.

43 OKU, H. et al. Inhibitory effects of xanthones from Guttiferae plants on PAF-induced hypotension in mice. **Planta Medica**, v. 71, n. 1, p. 90-92, 2005.

44 KAUR, K. et al. Antimalarials from nature. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 3229-3256, 2009.

45 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2009**. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html>. Acesso em: 29 set. 2010.

46 GUÉRIN, P. J. et al. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 564-573, 2002.

47 BOULOS, M, et al. The clinical evaluation of quinine for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 211-213, 1997.

48 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2005**: Brazil country profile. Overview of malaria control activities and programme progress. 2005. Disponível em: <http://www.rollbackmalaria.org/wmr2005/profiles/brazil.pdf>. Acesso em: 29 set. 2010.

49 WRIGHT, C. W. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 67-71, 2005.

50 LOOAREESUWAN, S. et. al. Malarone (atavaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 533-541, 1999.

51 FIDOCK, D. A. et al. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 509-520, 2004.

52 OLIVEIRA, A. B. et al. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 81, n. 4, p. 715-740, 2009.

53 BATISTA, R.; SILVA JUNIOR, A. J.; BRAGA, O. A. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. **Molecules**, v. 14, n. 8, p. 3037-3072, 2009.

54 ZIEGLER, H. L. et al. *In vitro Plasmodium falciparum* drug sensitivity assay: inhibition of parasite growth by incorporation of stomacytogenic amphiphiles into the erythrocyte membrane. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1441-1446, 2002.

55 KALAUNI, S. K. et al. Antimalarial activity of cassane-and norcassane-type diterpenes from Caesalpinia crista and their structure-activity relationship. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 5, p. 1050-1052, 2006.

56 PORTET, B. et al. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 9, p. 1312-1320, 2007.

57 ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 21, p. 3735-3744, 2003.

58 ZOCOLER, A. M. D. **Avaliação da qualidade fitoquímica e da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminoae)**. 2005. 235 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005. f. 41.

59 HALLIEL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

60 AMABILE-CUEVAS, C. F. Gathering of resistence genes in Gram negative bacteria: an overview. **Multiple Drug Resistant Bacteria**, p. 9-31, 2003.

61 SALEEM, M. et al. Antimicrobial natural products: an update antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 2, p. 238-254, 2010.

62 WHITE, C. MRSA infections rose by 5% between 2003 and 2004. **British Medicinal Journal**, v. 329, n. 7458, p. 131-146, 2004.

63 SHIU, W. K. P.; GIBBONS, S. Anti-staphylococcal acylphlroglucinols from *Hypericum beanie*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 23, p. 2568-2572, 2006.

64 BEHAL, V. Nontraditional microbial bioactive metabolites. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 5, p. 363-370, 2001.

65 CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

66 BAELMANS, R. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 271-275, 2000.

67 DESJARDINS, R. et al. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 710-718, 1979.

68 BEZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v.10, n. 6-7, p.499-503, 2003.

69 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.

70 SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468-472, 2002.

71 PAULETTI, P. M. et al. New antioxidant C-glucosylxanthones from the stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384-1387, 2003.

72 GIBBONS, S.; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the *in vitro* activity of tetracycline against clinical isolates of methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 2, 139-140, 2000.

73 TOWNSEND, N. E. et al. The international spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Hospital Infection**, v. 9, n. 1, p. 60-71, 1987.

74 ROSS, J. I. et al. Characterization and molecular cloning of the novel macrolide streptogramin B resistence determinant from *Staphylococcus epiderrmidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, n. 6, p. 851-862, 1989.

75 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.

76 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.

77 SILVA, V. C. et al. A new ent-kaurane diterpene from steams of *Alibertia macrophilla* K. Schum. (Rubiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, n. 9, p. 1781, 2007.

78 LUCA, A. N. **Estudo fitoquímico de espécies de Lauraceae**. 2006. 281 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006. f. 84-85.

79 SILVA, V. C. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae**. 2007. 330 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007. f. 75-134.

80 ROSENTHAL, P. J. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 21, p. 3735-3744, 2003.

81 PAGOLA, S. et al. The structure of malaria pigment β-haematin. **Nature**, v. 404, n. 6775, p. 307-310, 2000.

82 PORTELA, C. et al. Computational studies of new potential antimalarial compounds – stereoelectronic complementarity with the receptor. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 17, n. 9, p. 583-595, 2003.

83 BASCO, L. K. et al. *In vitro* activities of furoquinoline and acridone alkaloids against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 5, p. 1169-1171, 1994.

84 DOLABELA, M. F. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of extract and constituints from *Esenbeckia febrifuga*, a plant traditionally used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 367-372, 2008.

85 REUTER, G. Biochemistry and physiology of galegine in *Galega officinallis*. III. Arginine as precursor of galegine in *G. officinalis*. **Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft**, v. 296, n. 8, p. 516-522, 1963.

86 CAI, Y-Z. et al. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 25, p. 2872-2888, 2006.

87 SOBRAL, I. S. et al. Xanthones, triterpenes and antibacterial activity of the dichloromethane extract of *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 686-689, 2009.

88 CORREA, D. B. et al. Chemistry of Brazilian Guttiferae. XVIII. Quinone and xanthone constituents of *Kielmeyera rupestris*. **Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 447-451, 1970.

89 GOTTLIEB, O. R. et al. Chemistry of the Brazilian guttiferae. XXVI. Xanthones from *Kielmeyera speciosa*. **Phytochemistry**, v. 9, n. 12, p. 2537-2544, 1970.

90 HABIB, A. M. et al. New xanthones from *Psorospermum febrifugum*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 2, p. 141-145, 1987.

91 PINTO, M. M. M.; MESQUITA, A. A. L.; GOTTLIEB, O. R. The chemistry of Brazilian Guttiferae. Part 4. Xanthonolignoids from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2945-2048, 1987.

92 GOTTLIEB, O. R. et al. The chemistry of Brazilian Guttiferae. V. 2,3,4- and 1,3,5-trioxygenated xanthones from *Kielmeyera species*. **Tetrahedron**, v. 22, n. 6, p. 1777-1784, 1966.

93 GOTTLIEB, O. R. et al. Chemistry of Brazilian Guttiferae. XVII. Xanthones of *Kielmeyera ferruginea*. **Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 665-666, 1969.

94 GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L.; NAGEM, T. J. Chemistry of Brazilian Guttiferae. XXVII. Guttiferae. Xanthones from *Kielmeyera rubriflora*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 9, p. 2253-2255, 1971.

95 PIMENTA, A.et al. Chemistry of Brazilian Gutiferae. II. Biphenyl content of *Kielmeyera coriacea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 36, n. 3, p. 283-286, 1964.

96 ZHANG, Z. et al. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from Tovomita krukovii. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 49-54, 2002.

97 WALIA, S.; MUKERJEE, S. K. Ferrxanthone, a 1,3,5,6-tetraoxygenated xanthone from Mesua ferrea. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1816-1817, 1984.

98 PINTO, M. M. M.; SOUSA, E. P. Natural and synthetic xanthonolignoids: chemistry and biological activities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2003.

99 MONDAL, M.; PURANIC, V. G.; ARGADE, N. P. Facile synthesis of 1,3,7-trihydroxyxanthone and its regiosolective coupling reactions with prenal: simple and efficient access to osajaxanthone and nigrolineaxanthone F. **Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 13 , p. 4992-4995, 2006.

100 CORREA, D. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Chemistry of Brazil Guttiferae. VII. Constituents of *Kielmeyera corymbosa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, n. 2, p. 269-271, 1966.

101 LOPES, J. L. C. et al. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 7, p. 1101, 1977.

102 CERUKS, M. et al. Polar phenolic constituents from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 597-599, 2007.

103 CARBONEZI, C. A. et al. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 319-324, 2007.

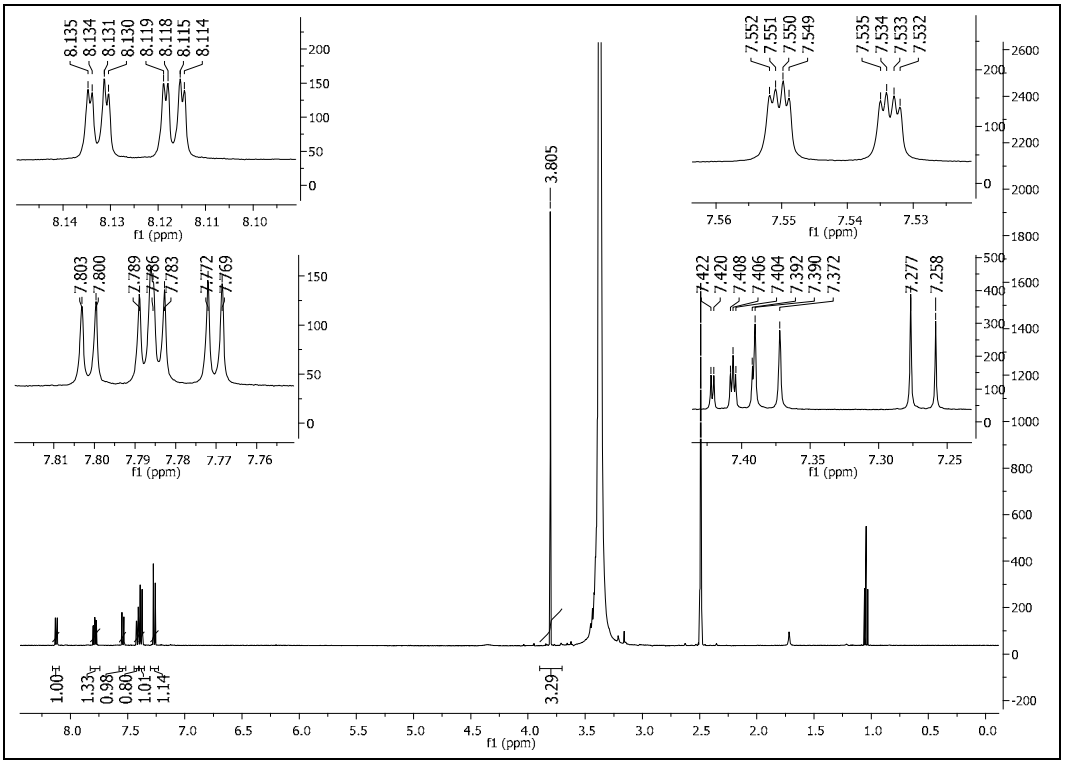
104 AGRAWAL, P. K. **Carbon-13C NMR of flavonoids**. New York: Elsevier, 1989. p. 304-337.

105 DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 2 nd ed. New York: John Wiley and Sons, 2001. p. 507.

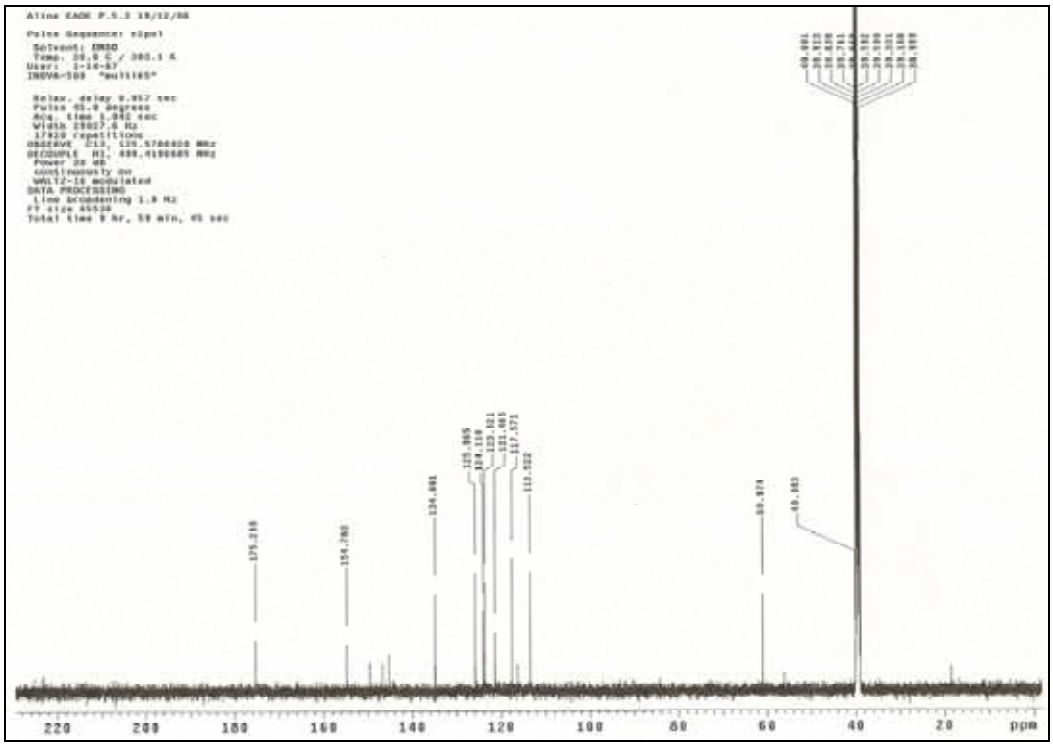
106 MATIDA, A. K. et al. 3-β-O-β-D-glucopyranosylsitosterol in species of Labiatae, Verbenaceae and Apocynaceae. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 45, n. 3, p. 147-151, 1996.

107 REGASINI, L. O. et al. Identification of triterpenes and sterols from Pterogyne nitens (Fabaceae-caesalpinioideae) using hight-resolution gas chromatography. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 3, p. 218-221, 2009.

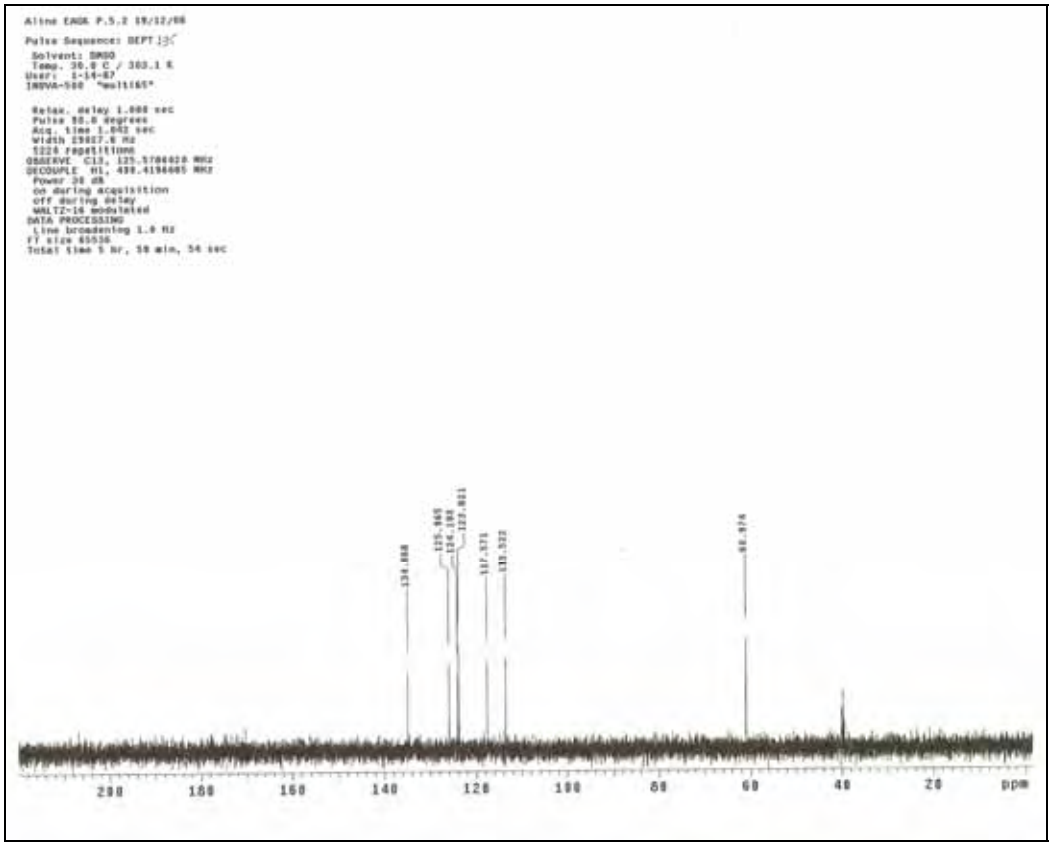
Anexos



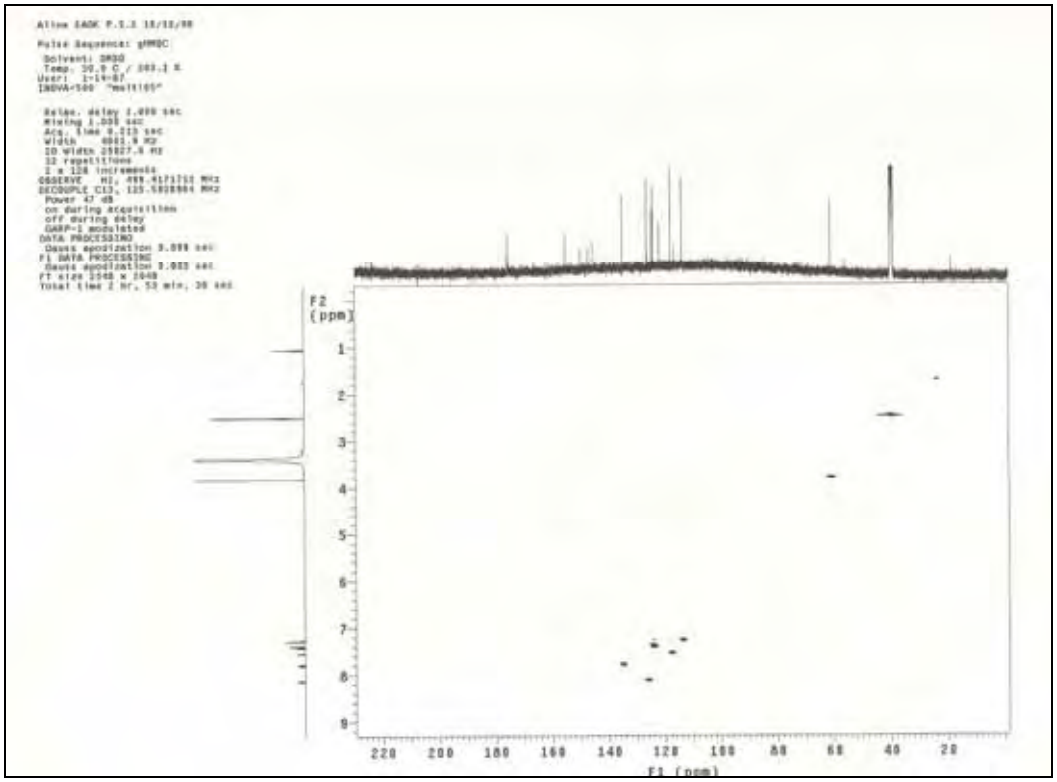
Anexo 1: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da substância **9** (500 MHz – DMSO-d_6).



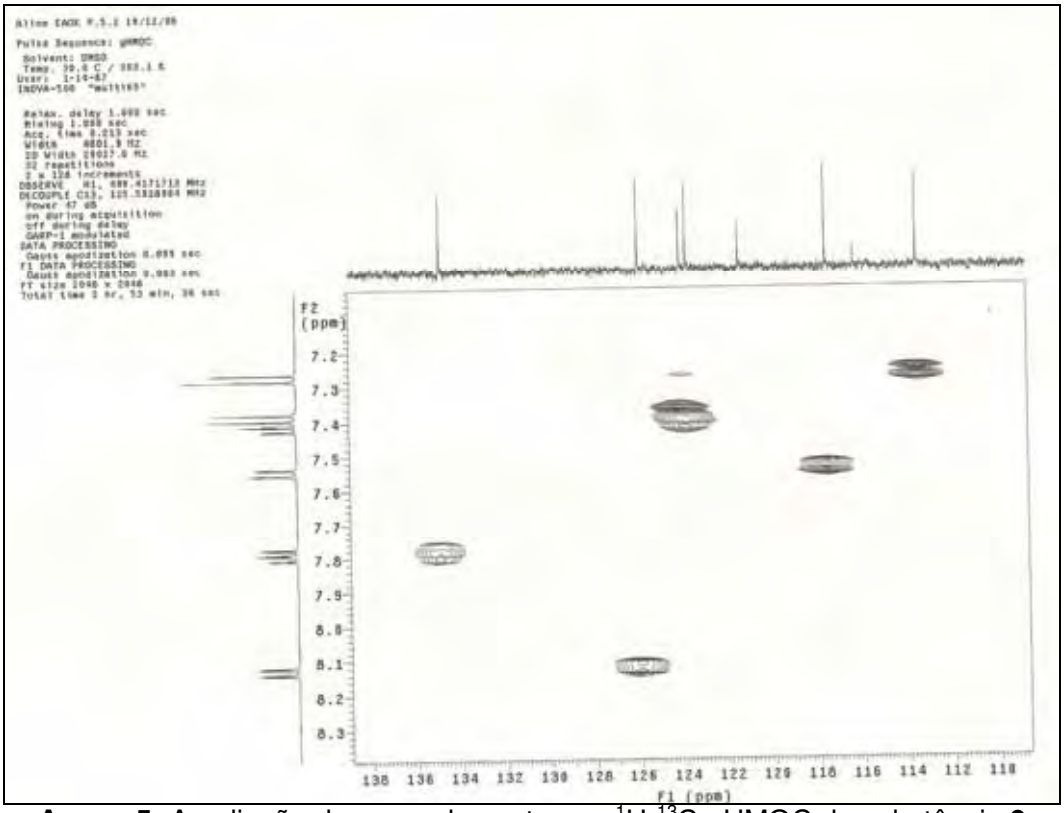
Anexo 2: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **9** (125 MHz – DMSO-d_6).



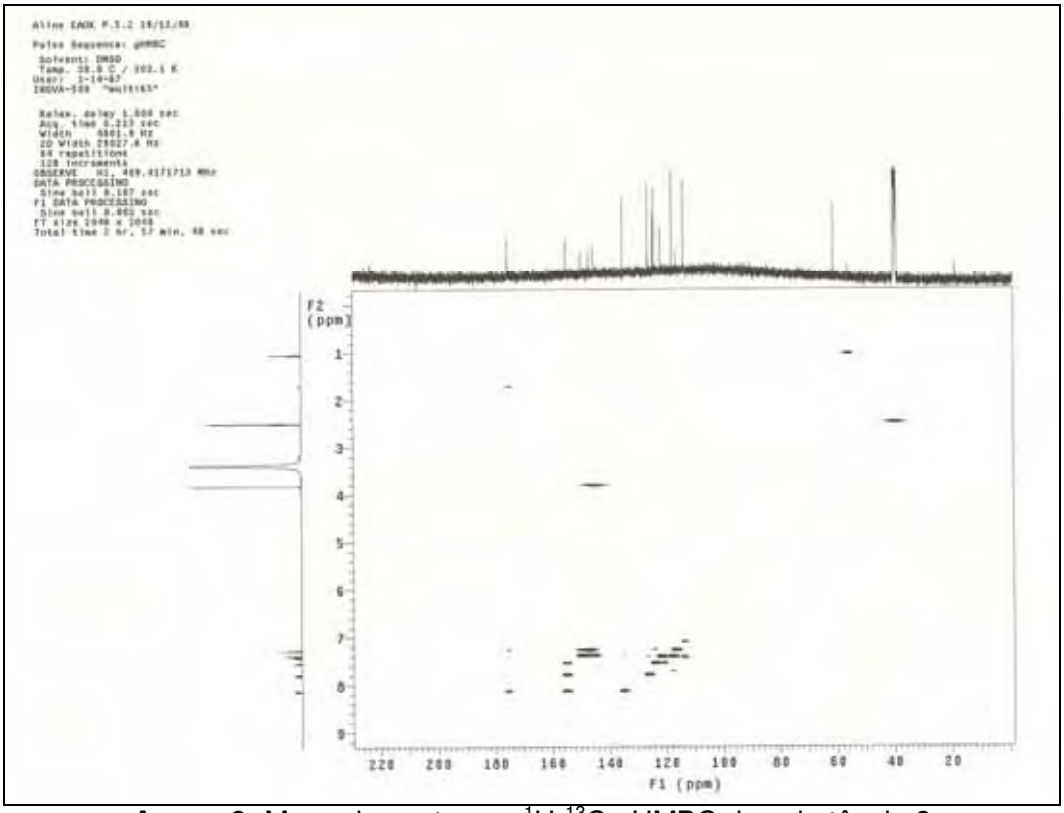
Anexo 3: Espectro de DEPT 135º da substância **9**
(125 MHz – DMSO-d_6).



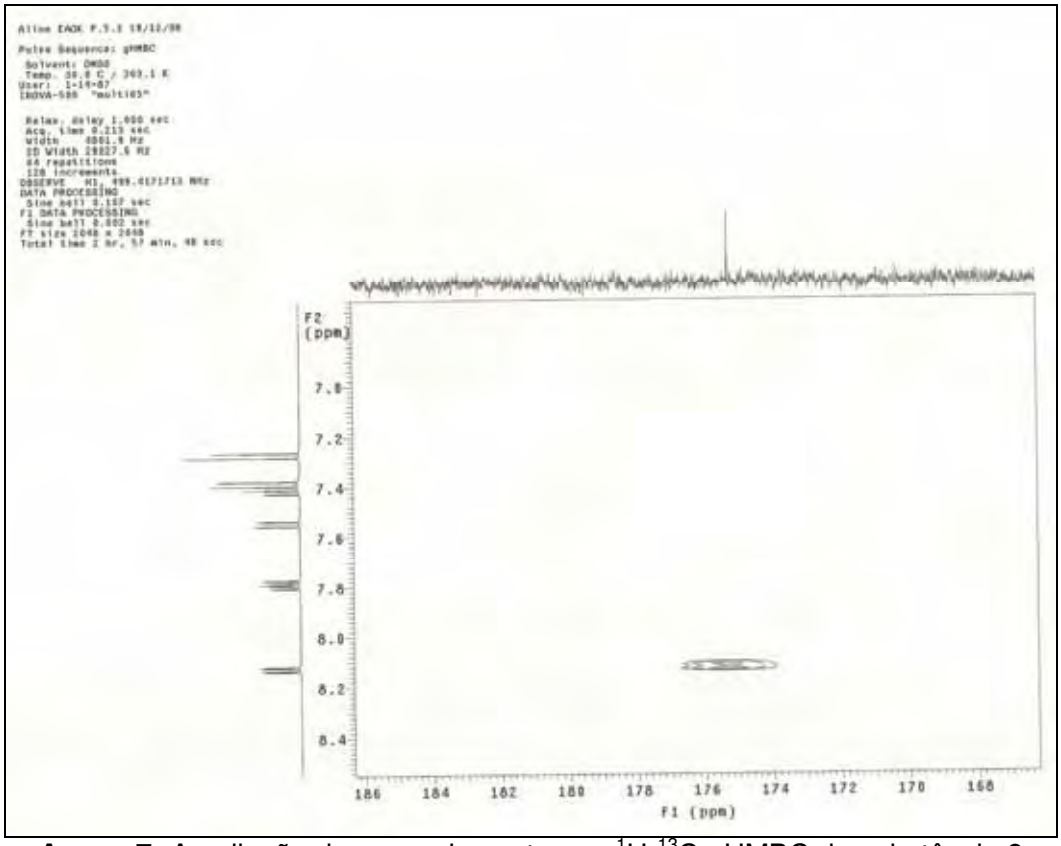
Anexo 4: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **9**
(500 MHz – DMSO-d_6).



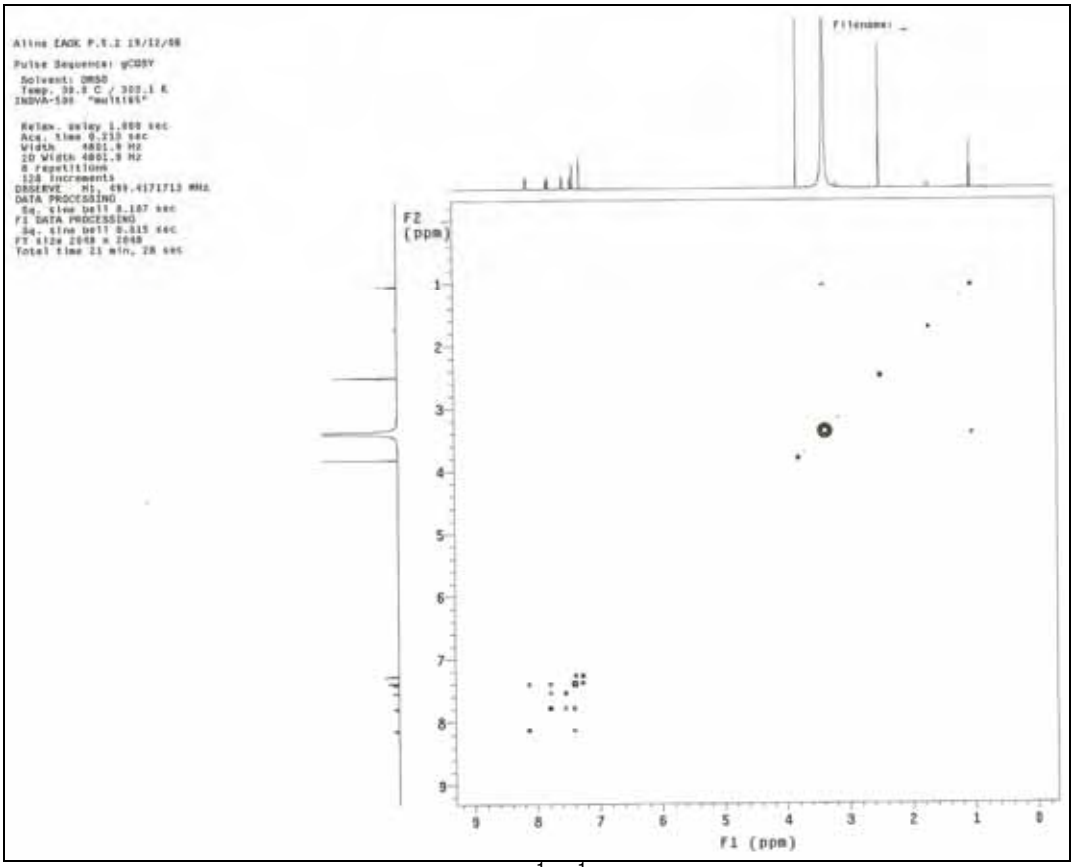
Anexo 5: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **9** (500 MHz – DMSO-d_6).



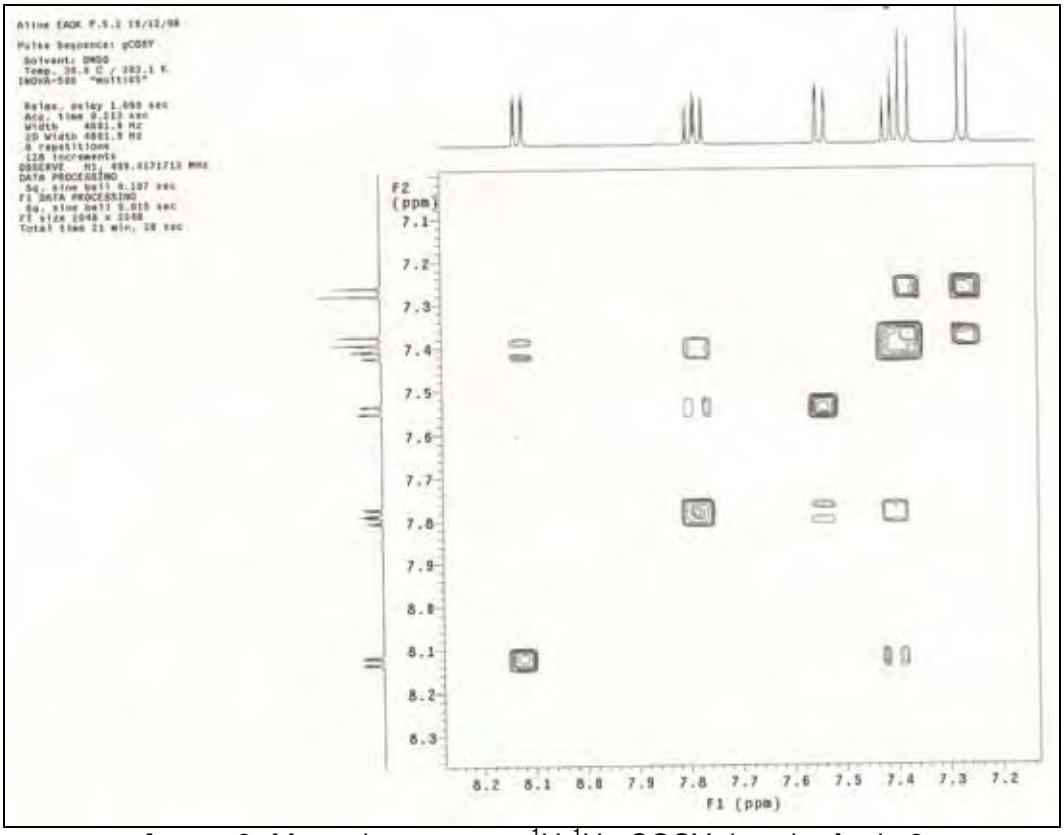
Anexo 6: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **9** (500 MHz – DMSO-d_6).



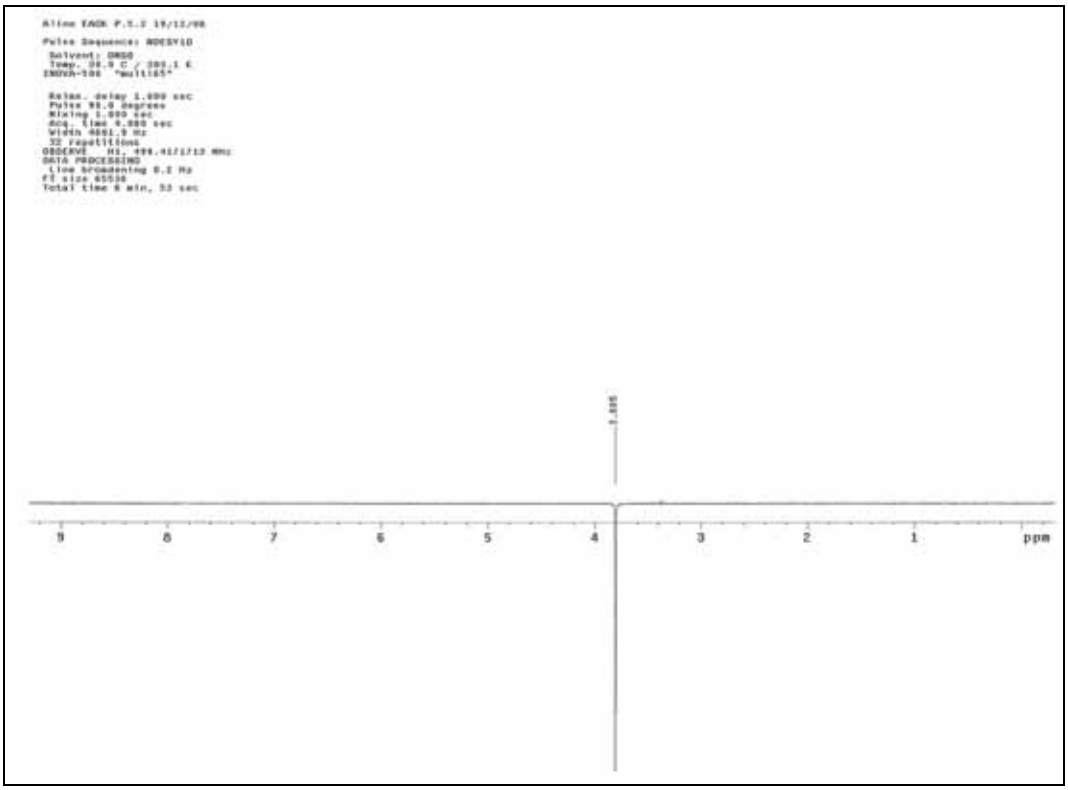
Anexo 7: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **9** (500 MHz – DMSO-d_6).



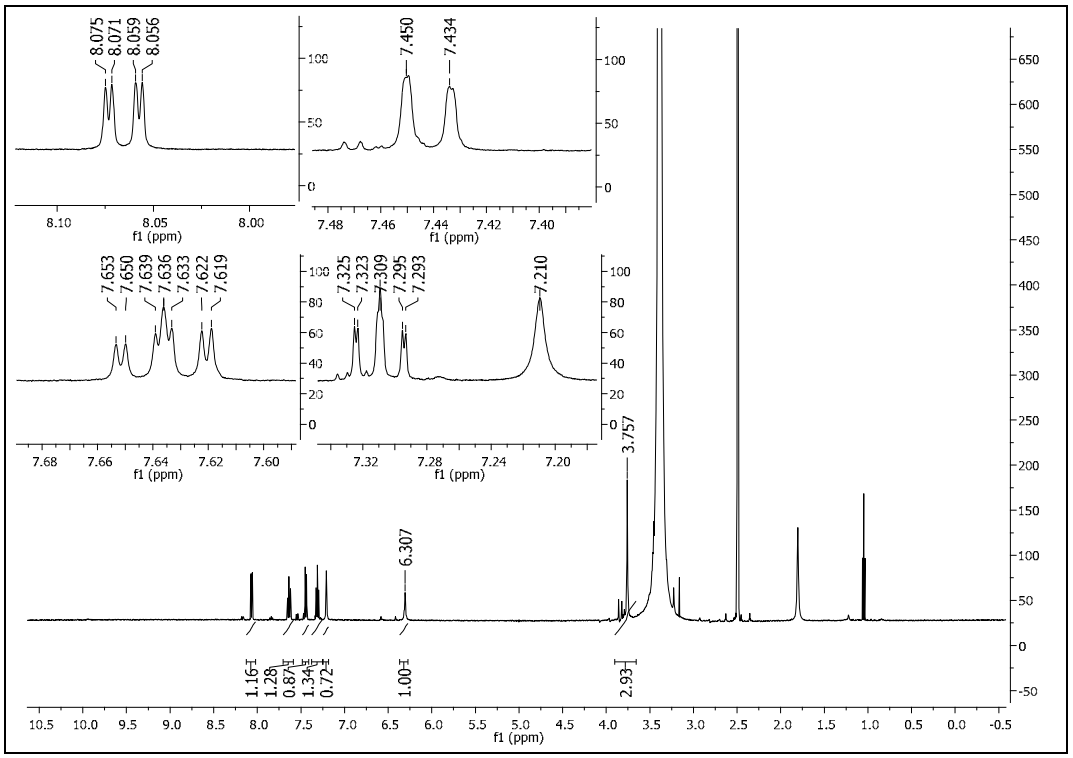
Anexo 8: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **9** (500 MHz – DMSO-d_6).



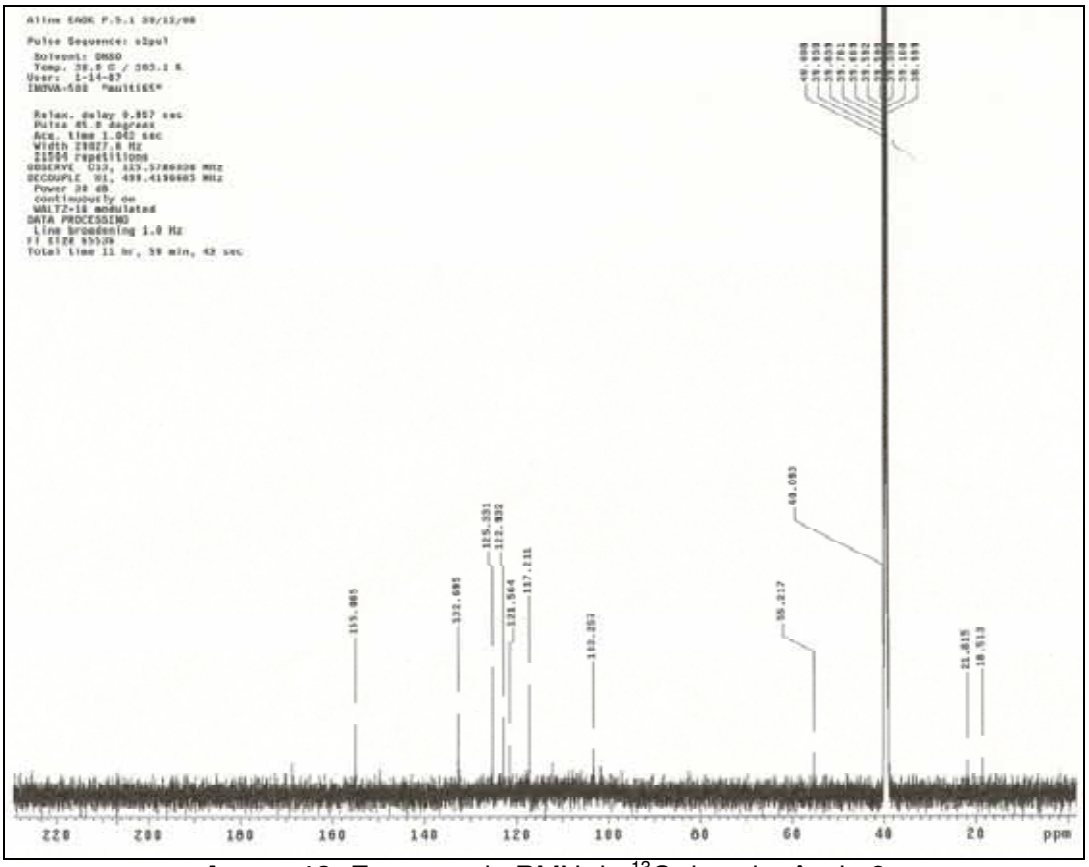
Anexo 9: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **9** (500 MHz – DMSO-d_6).



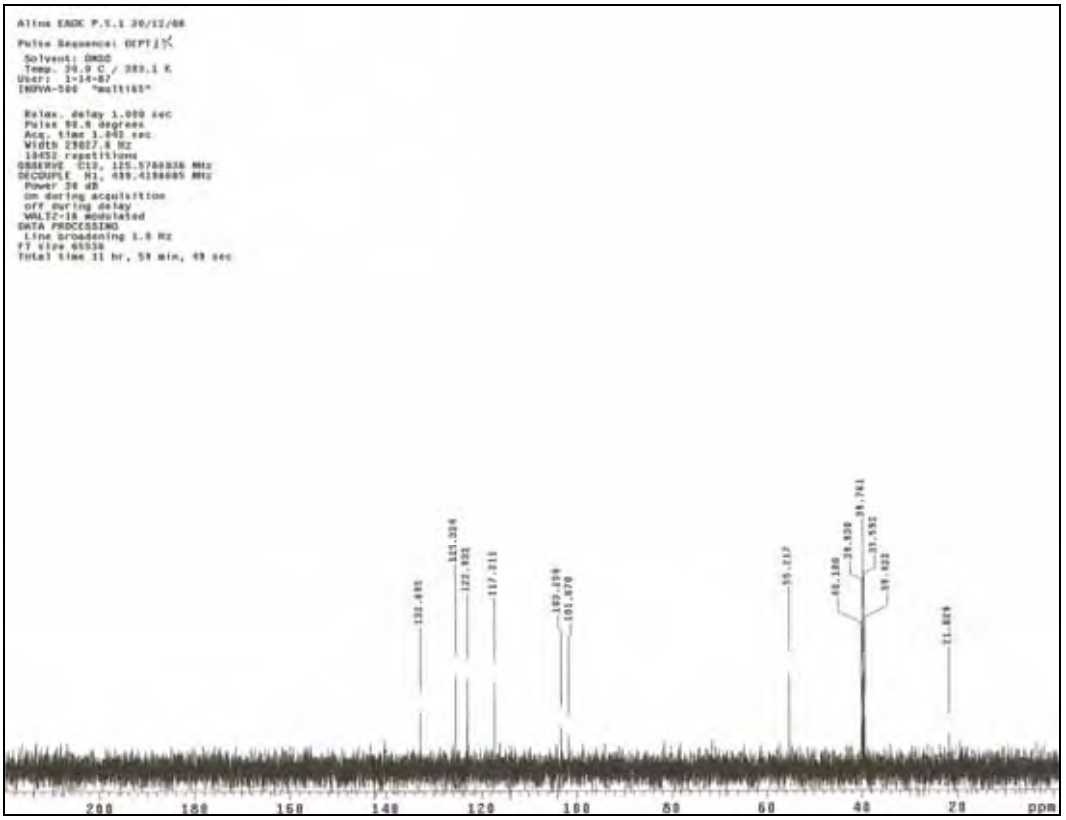
Anexo 10: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,81 da substância **9** (500 MHz – DMSO-d_6).



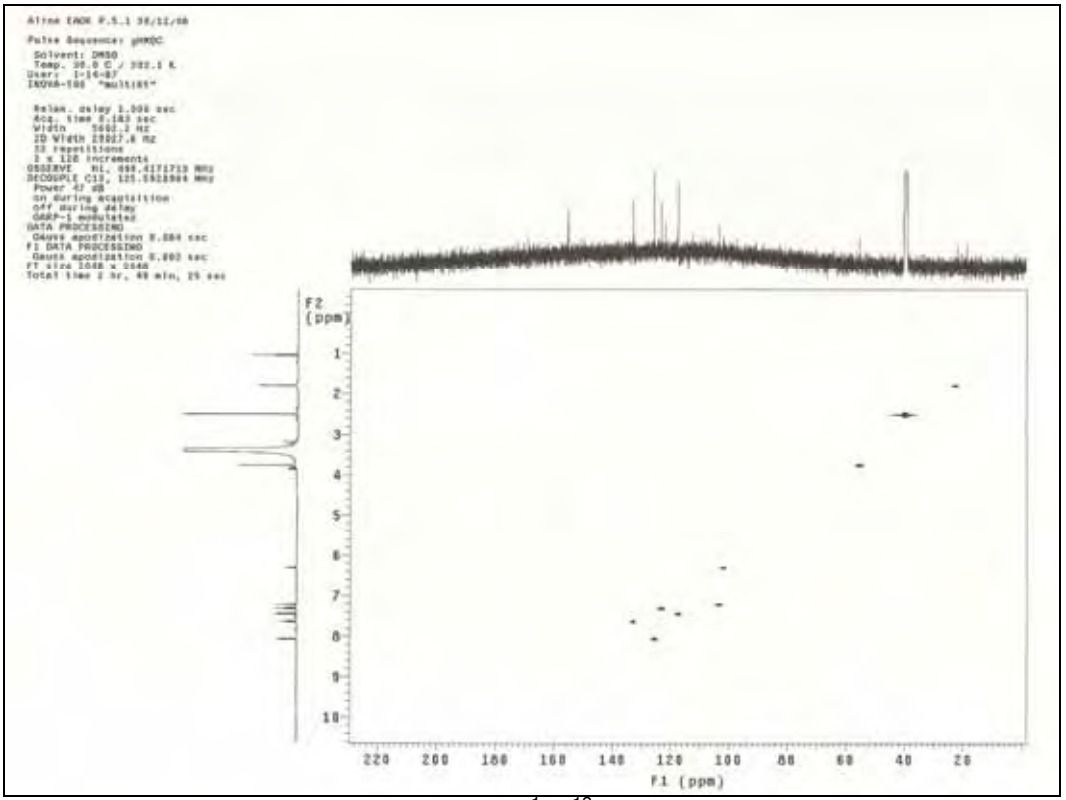
Anexo 11: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da sustância **8** (500 MHz – DMSO-d_6).



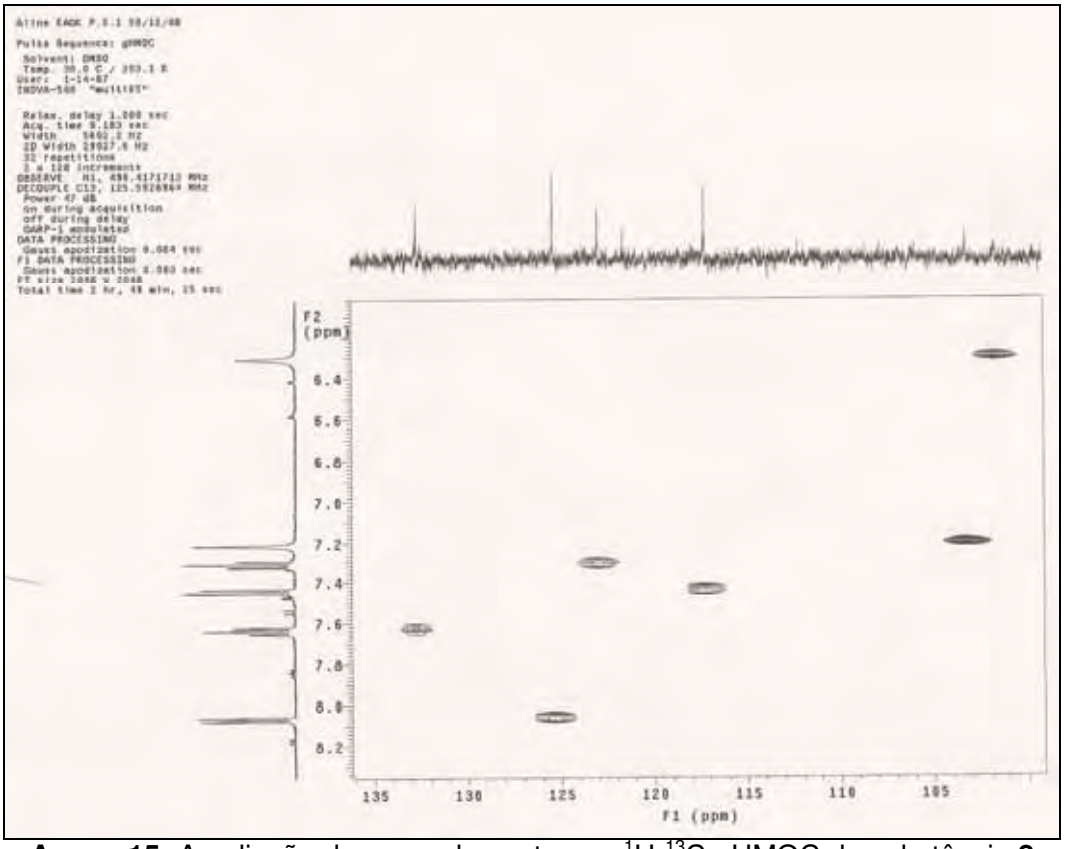
Anexo 12: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **8** (125 MHz – DMSO-d_6).



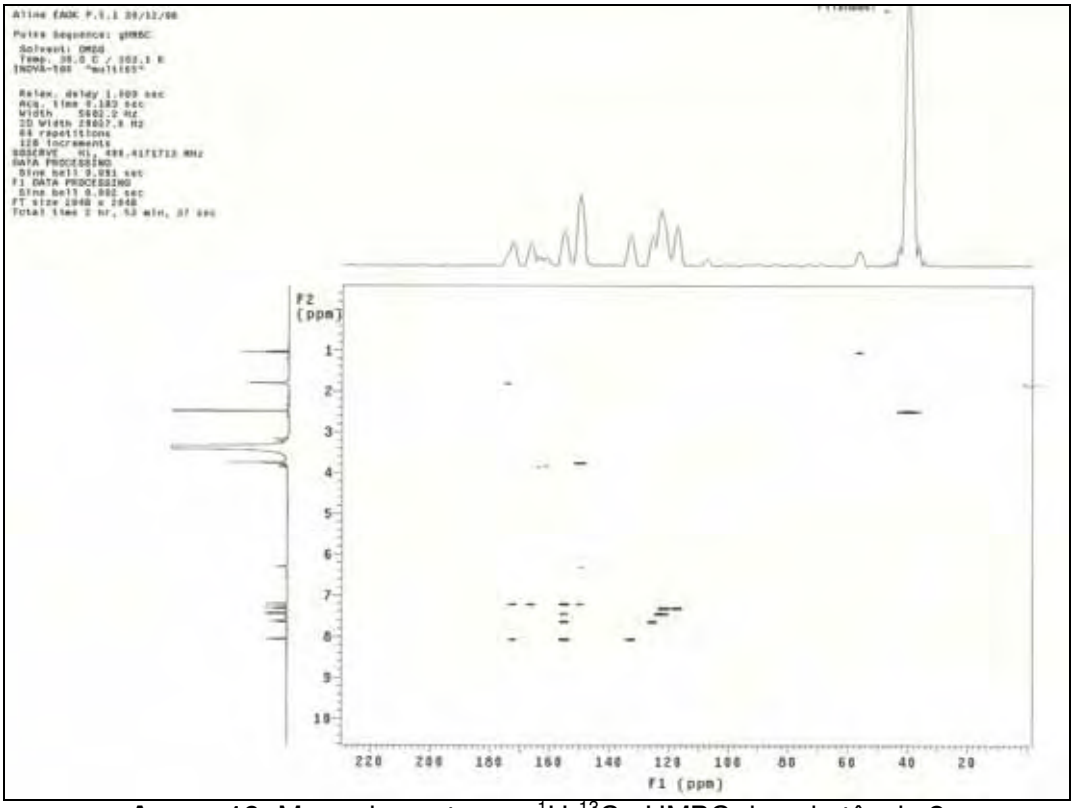
Anexo 13: Espectro de DEPT 135º da substância **8**
(125 MHz – DMSO-d_6).



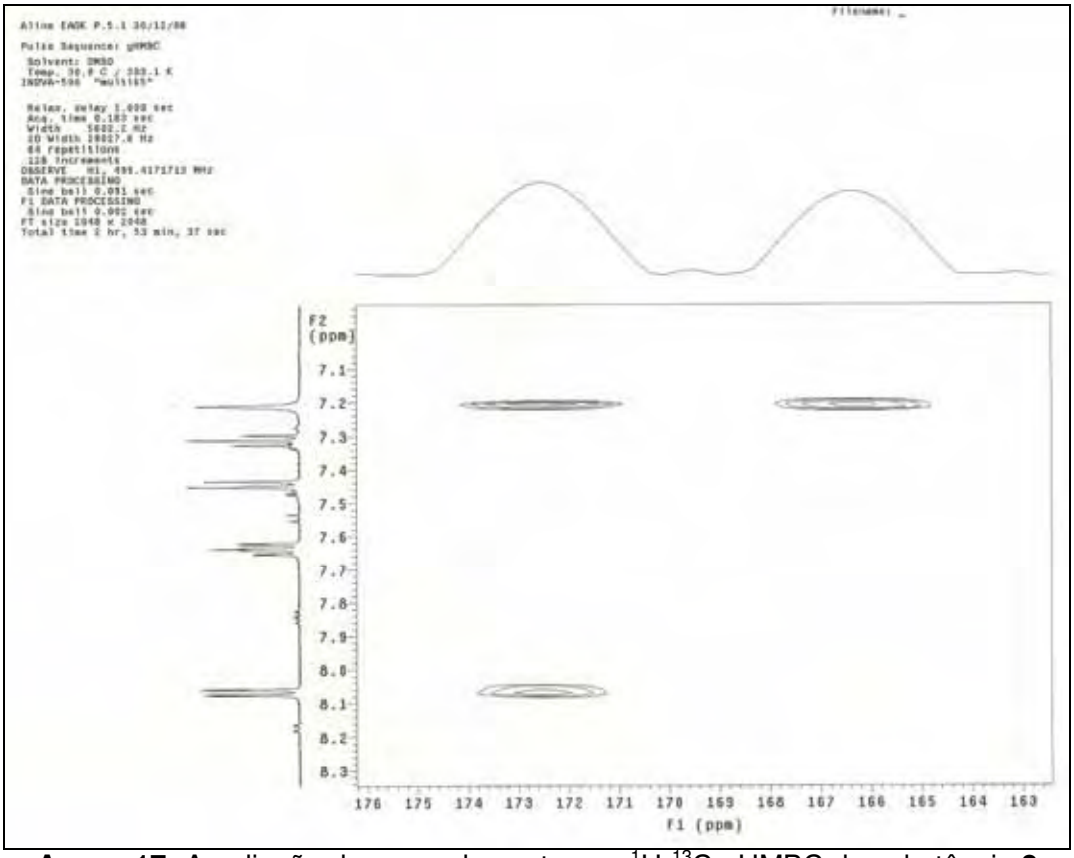
Anexo 14: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **8**
(500 MHz – DMSO-d_6).



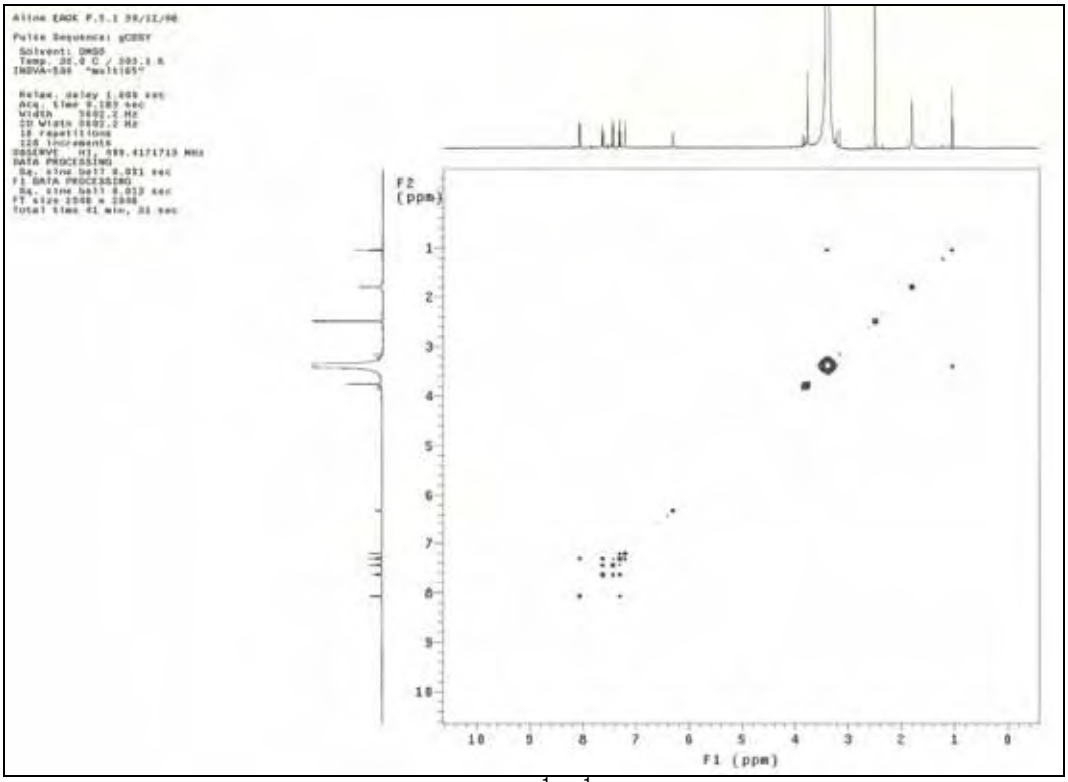
Anexo 15: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **8** (500 MHz – DMSO-d_6).



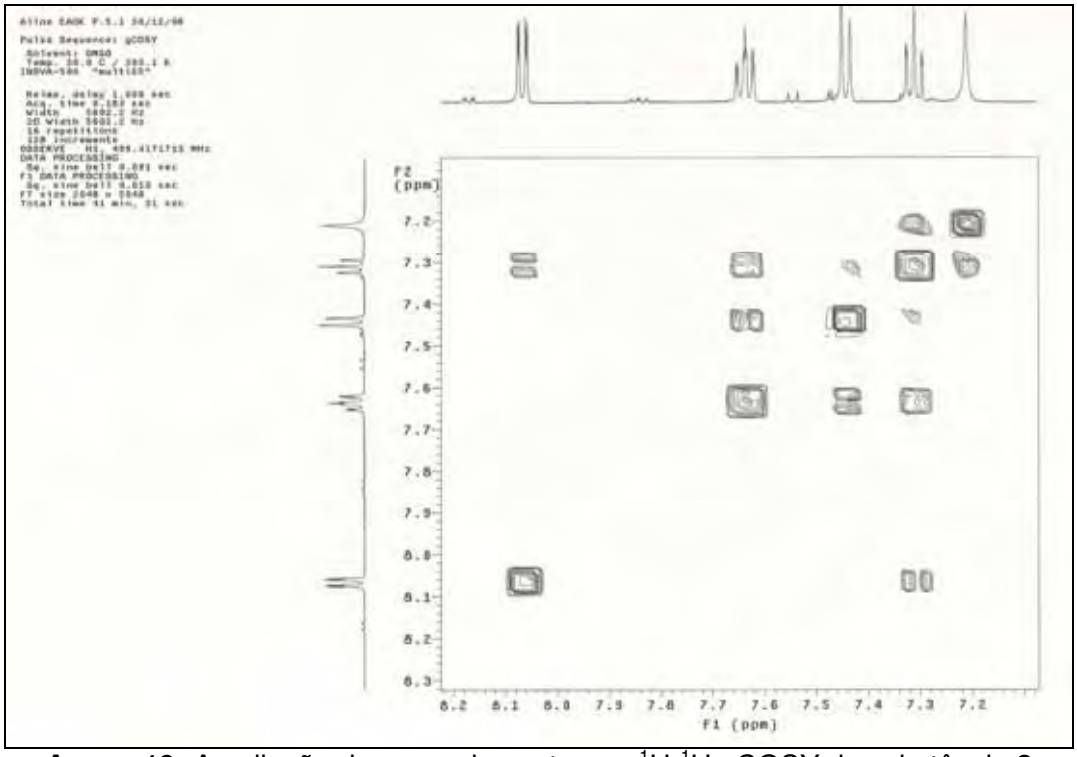
Anexo 16: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **8** (500 MHz – DMSO-d_6).



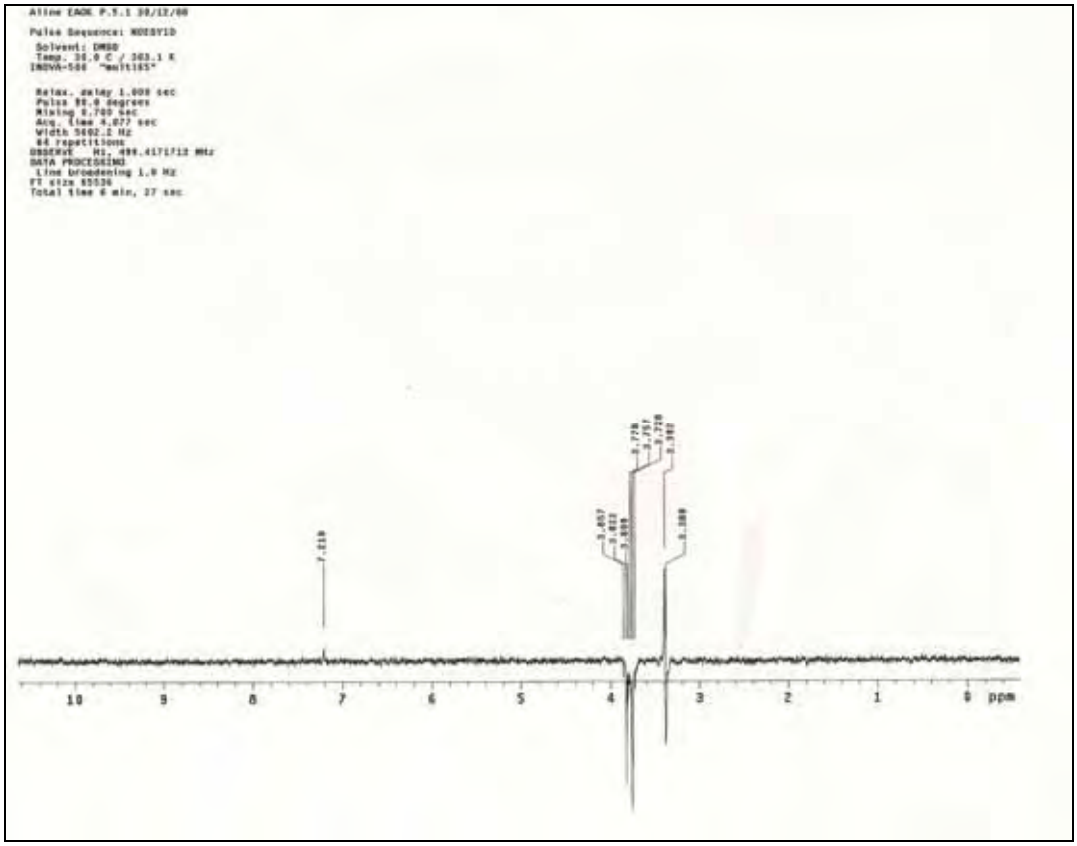
Anexo 17: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **8** (500 MHz – DMSO-d_6).



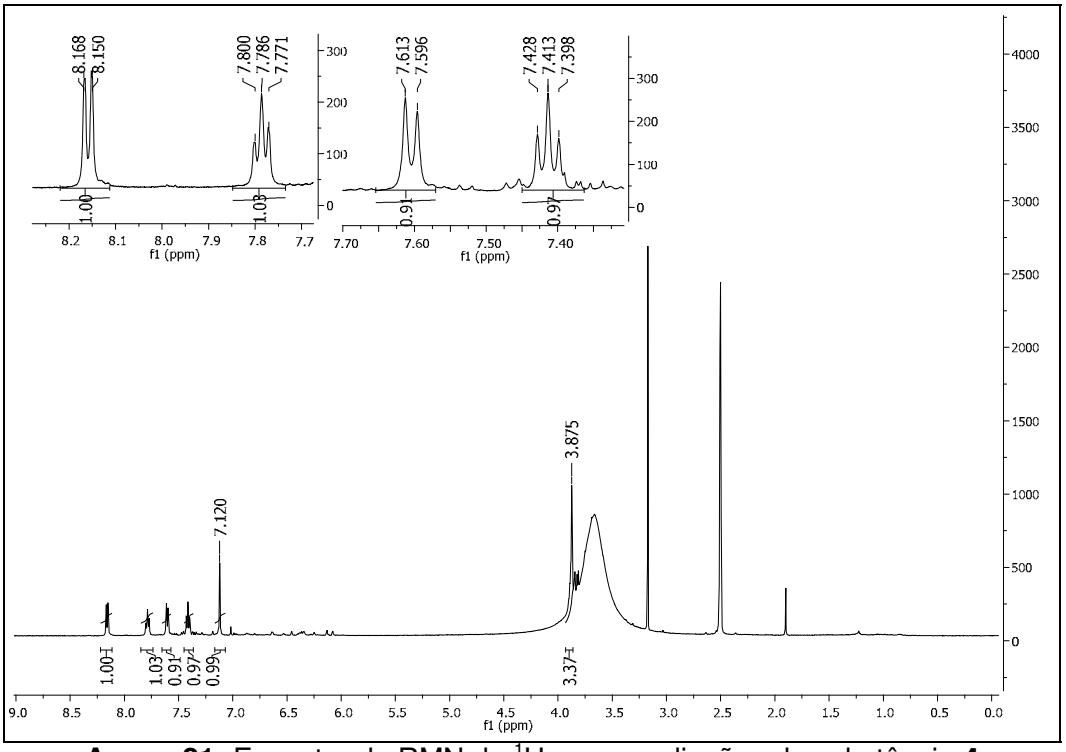
Anexo 18: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **8** (500 MHz – DMSO-d_6).



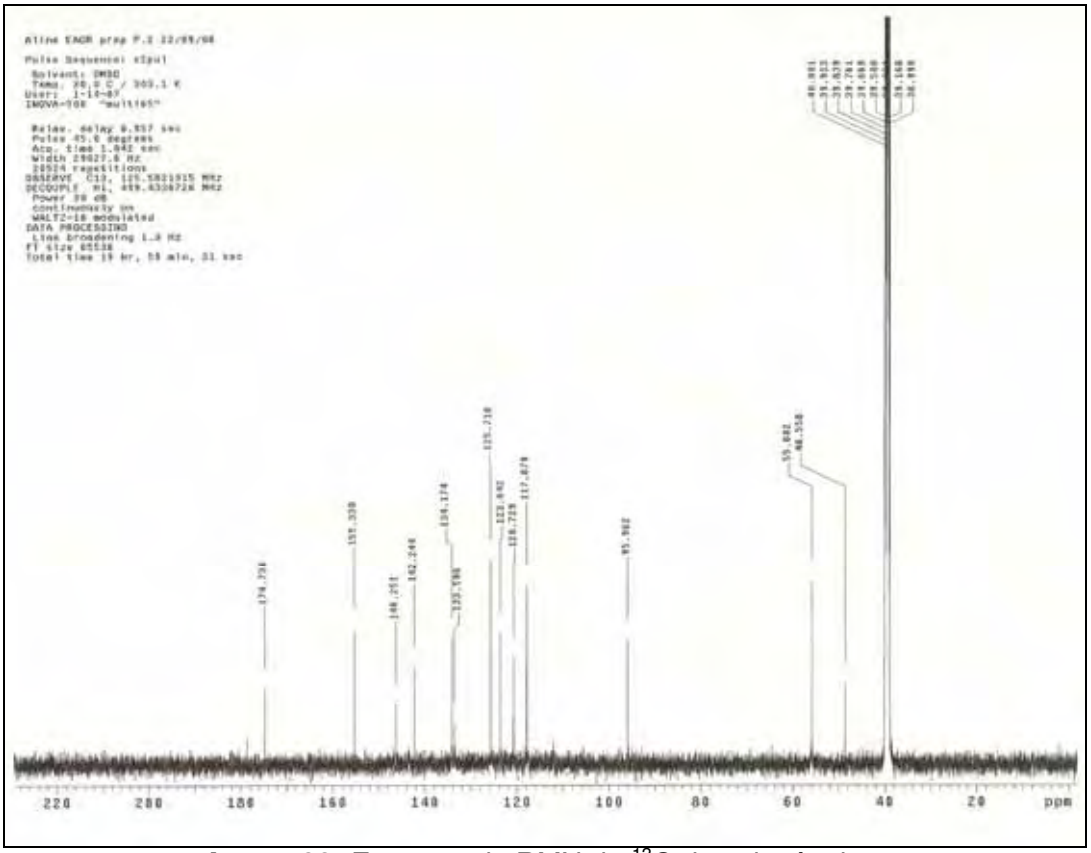
Anexo 19: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **8** (500 MHz – DMSO-d_6).



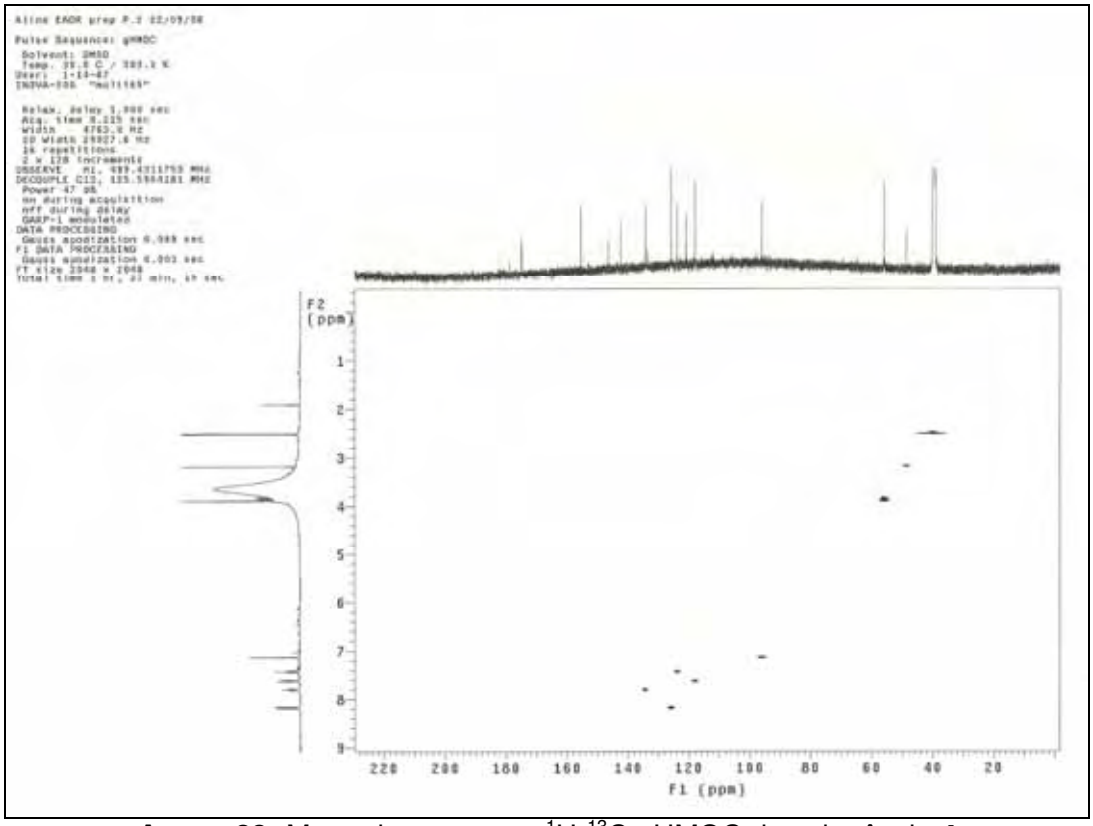
Anexo 20: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,76 da substância **8** (500 MHz – DMSO-d_6).



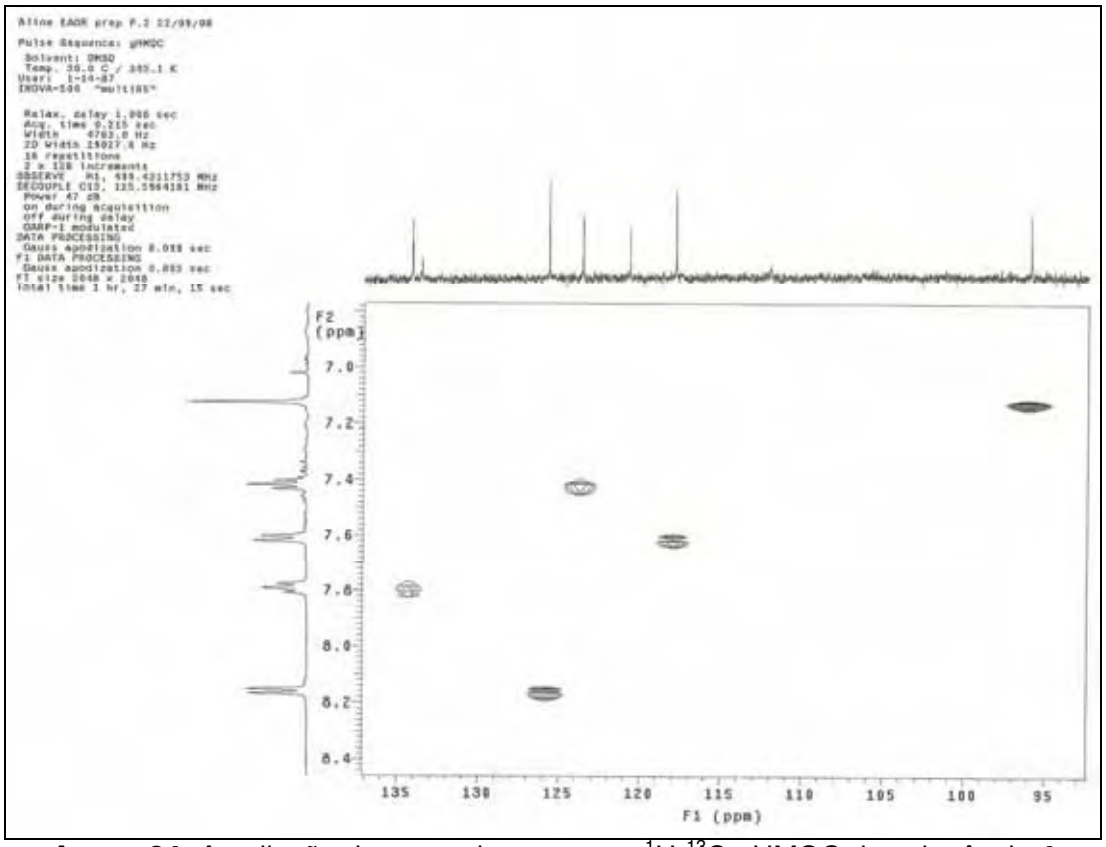
Anexo 21: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).



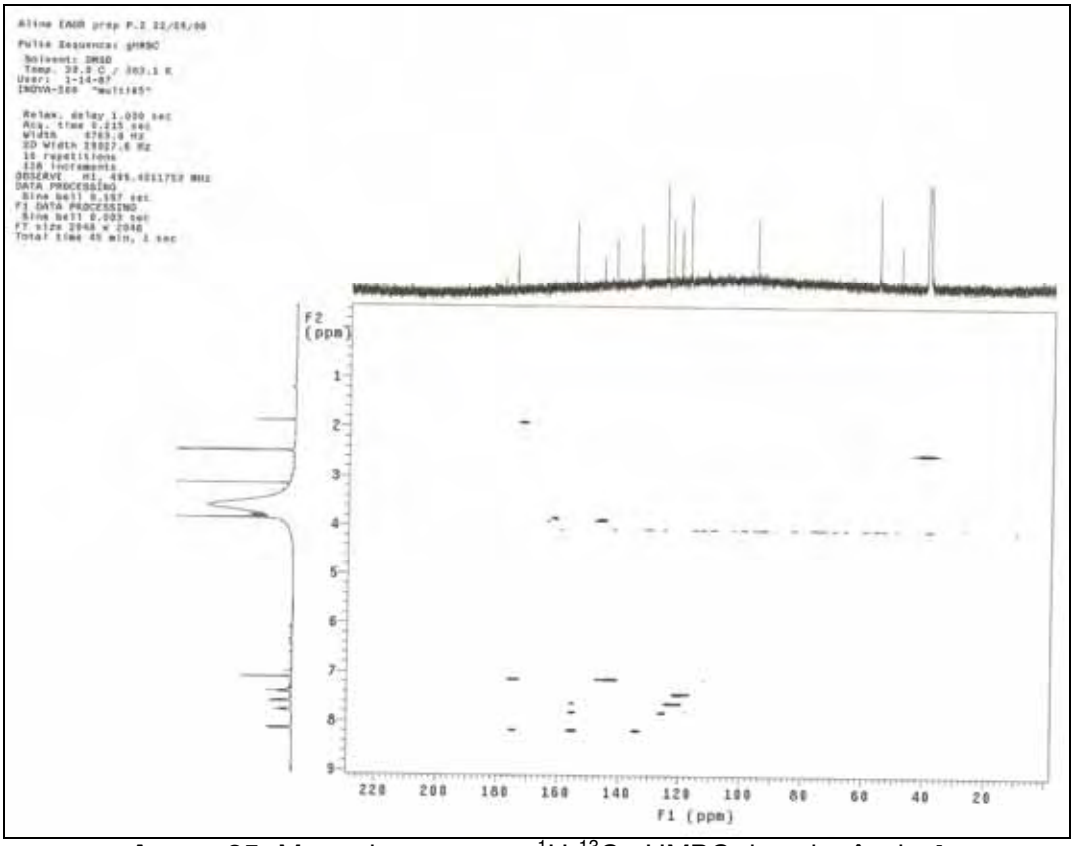
Anexo 22: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4** (125 MHz – DMSO-d_6).



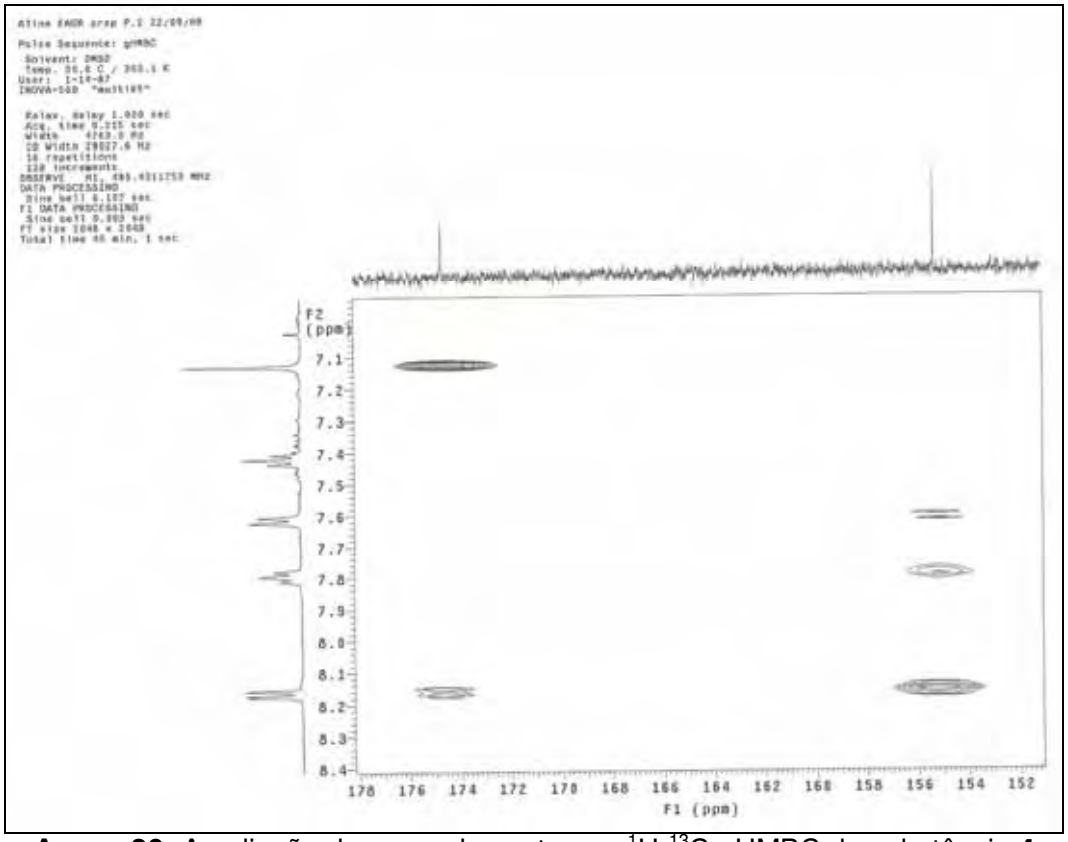
Anexo 23: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).



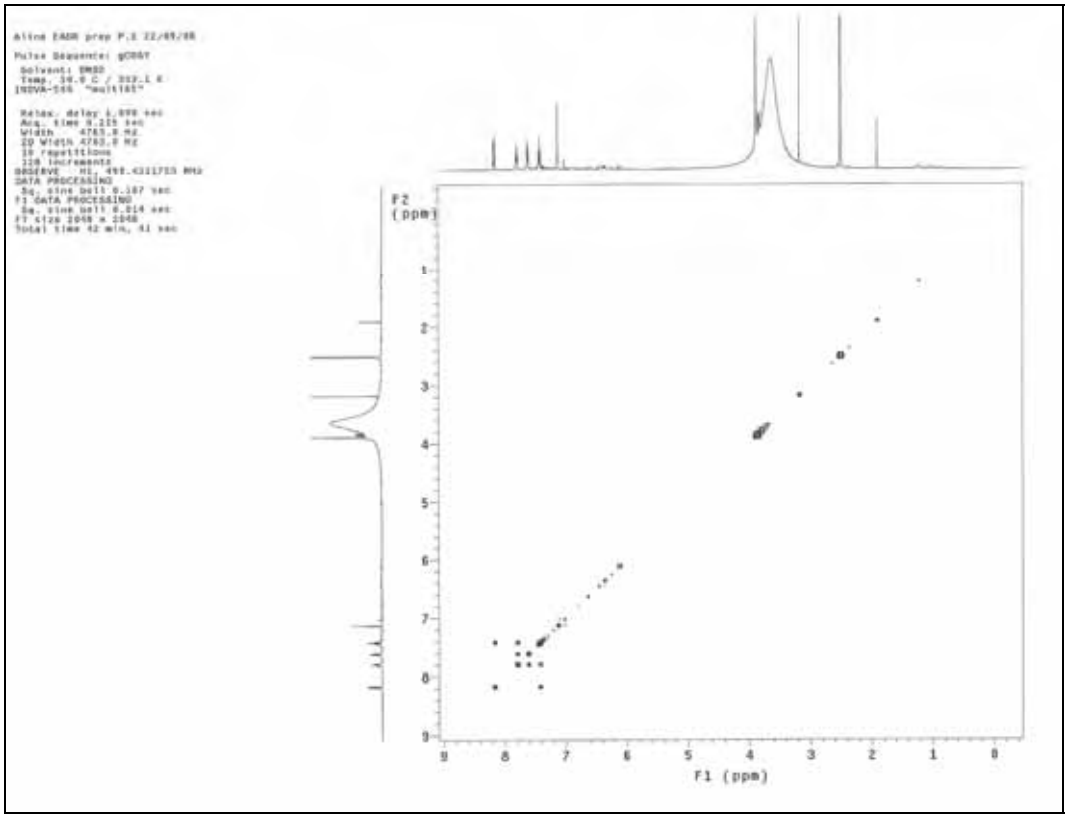
Anexo 24: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).



Anexo 25: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).



Anexo 26: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).



Anexo 27: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).

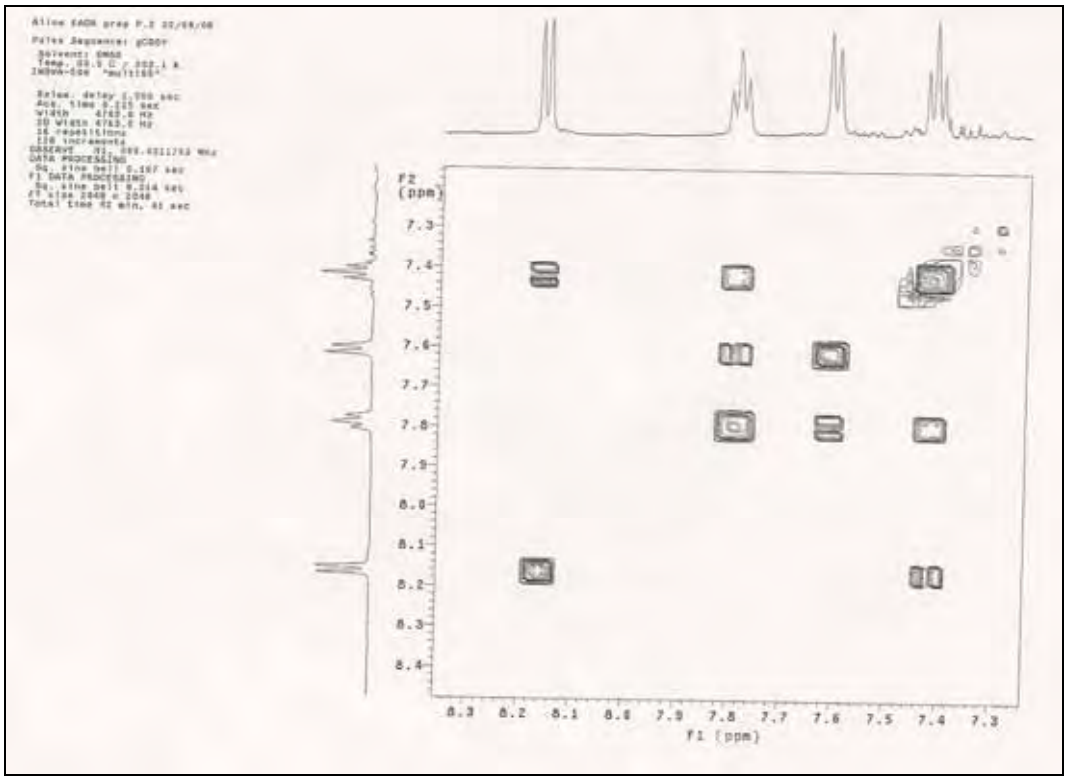
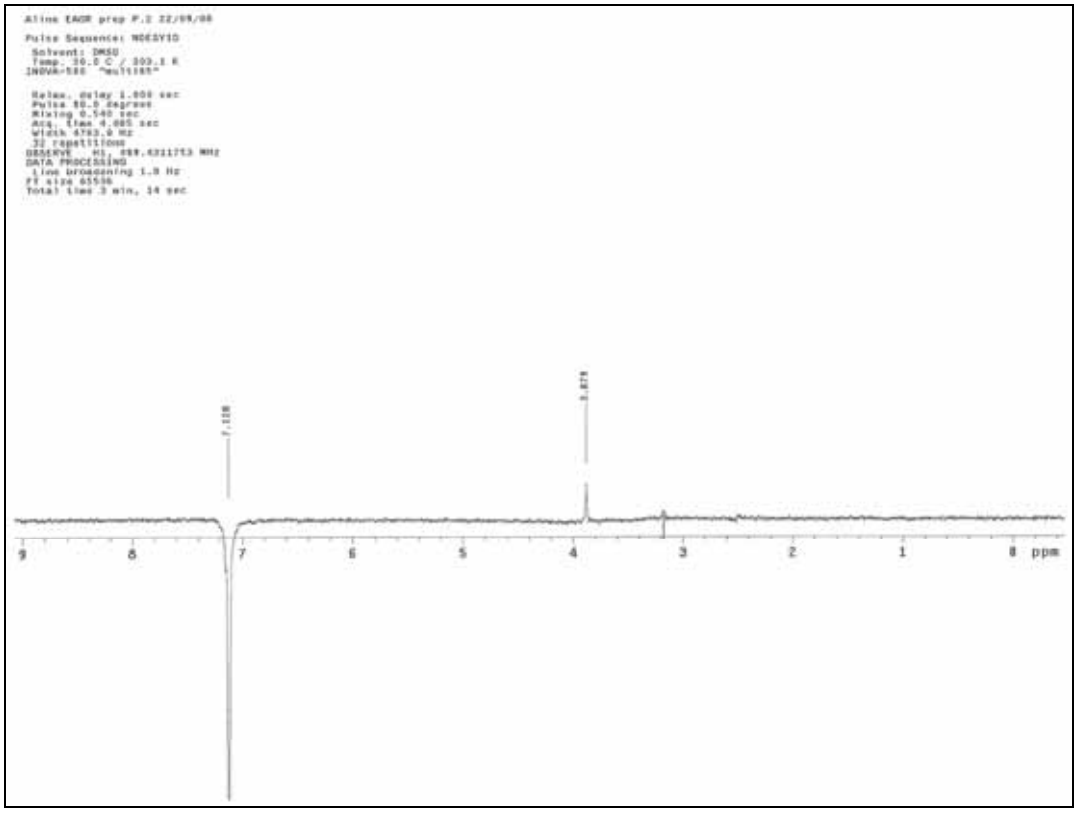
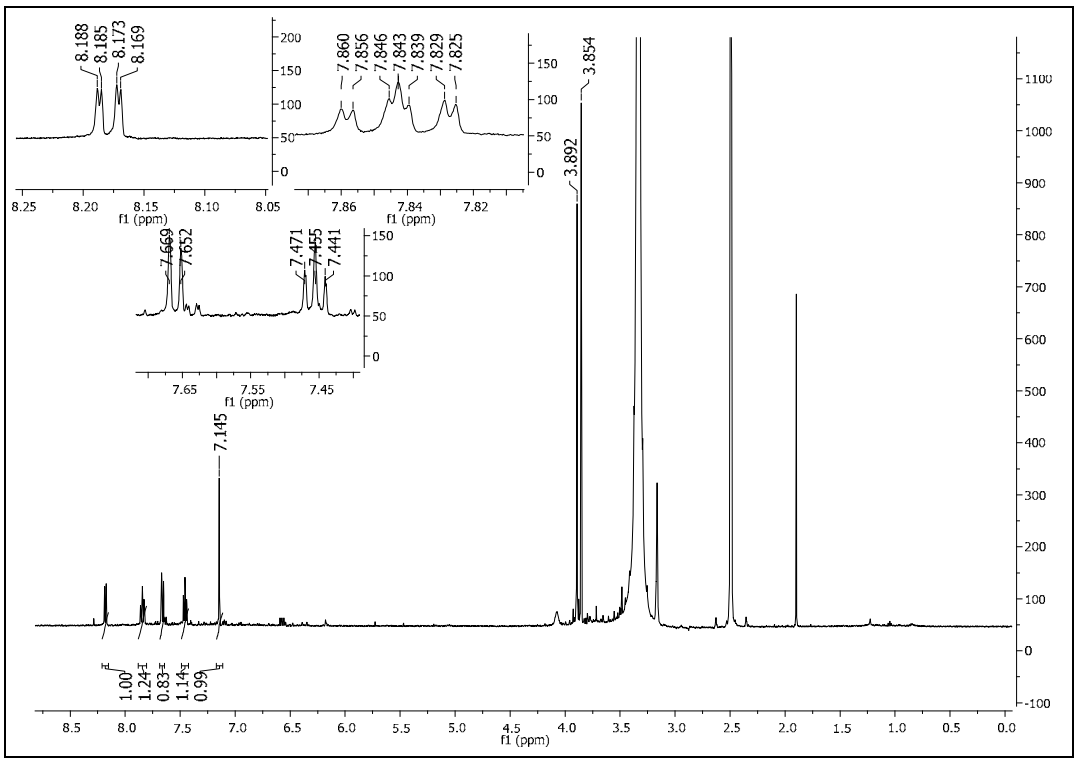


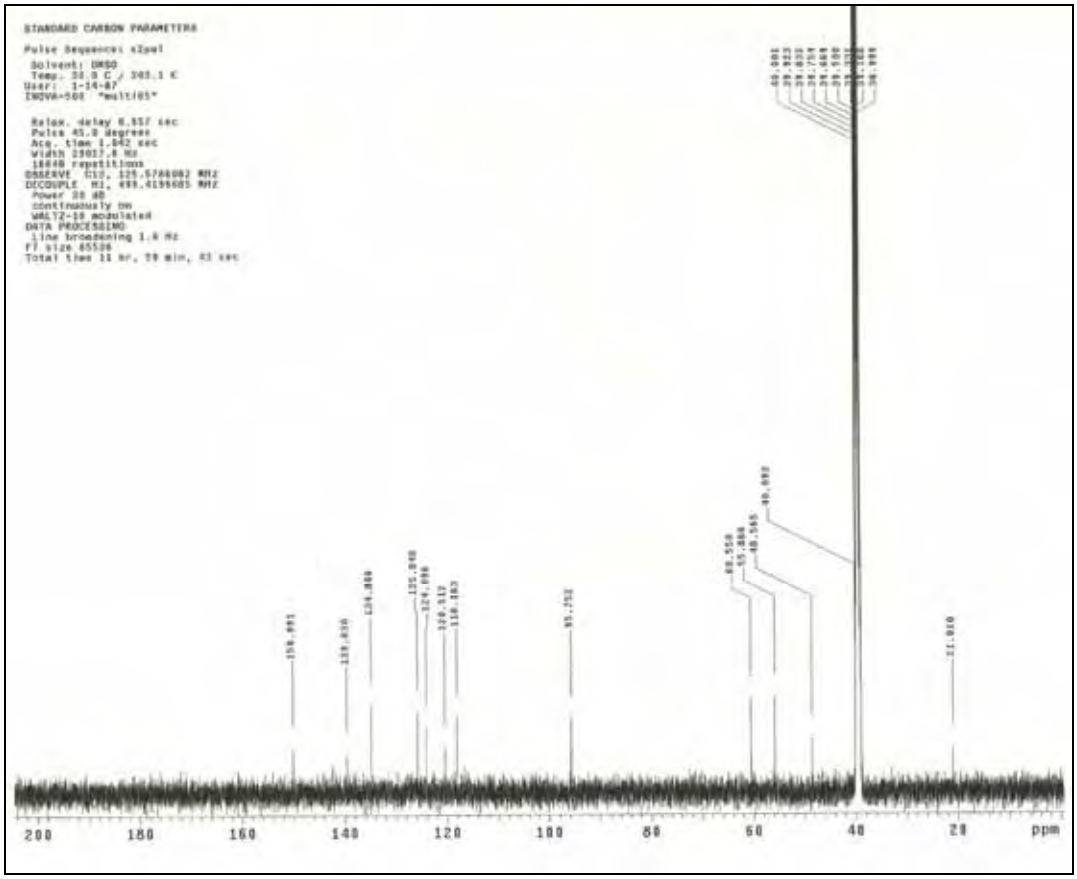
Figura 28: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).



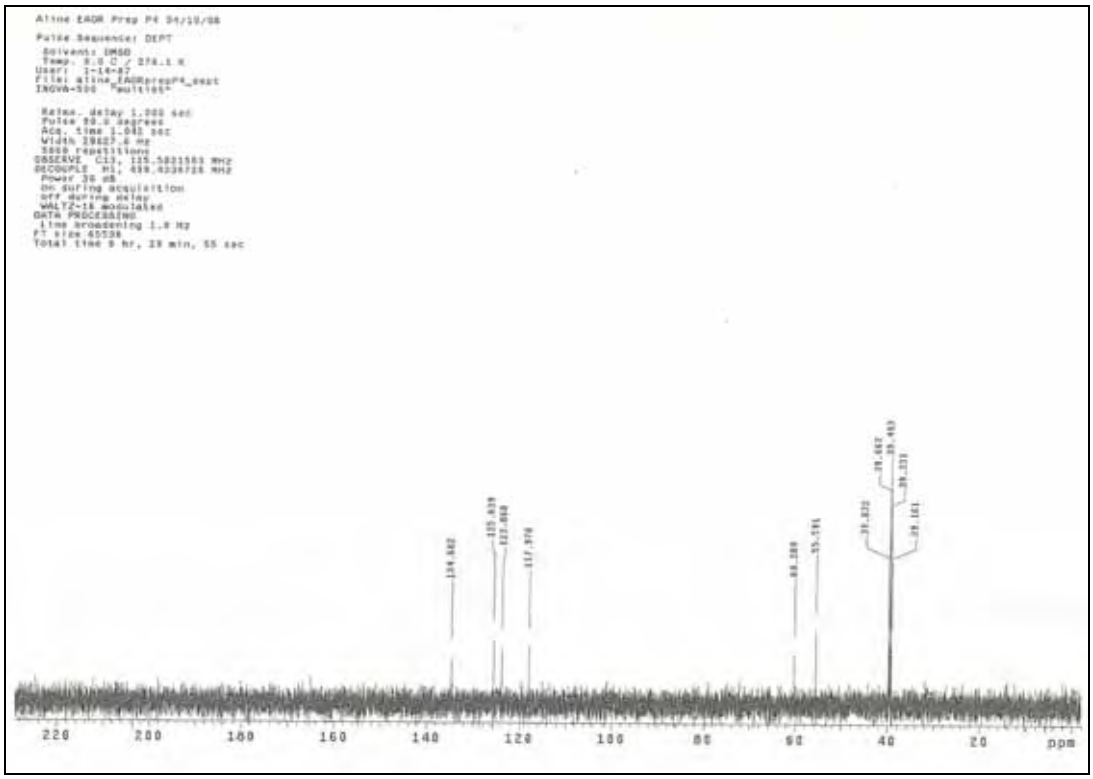
Anexo 29: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 7,13 da substância **4** (500 MHz – DMSO-d_6).



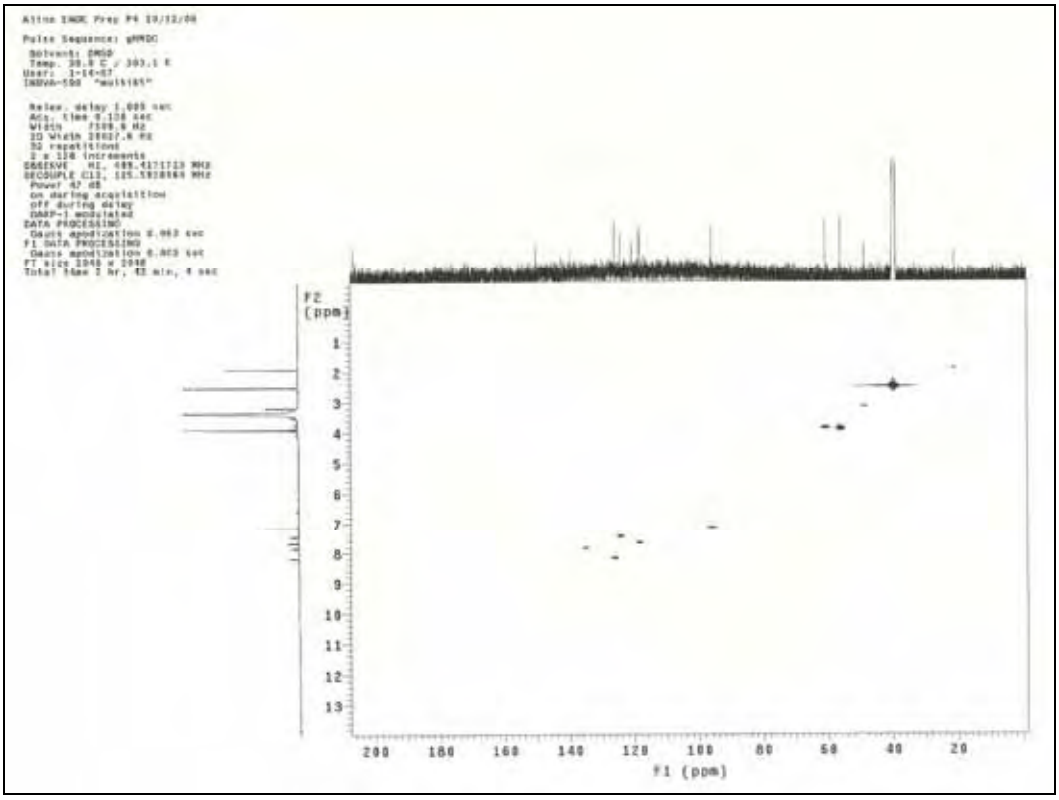
Anexo 30: Espectro de RMN de ^{1}H com ampliações da substância **6** (500 MHz – DMSO-d_6).



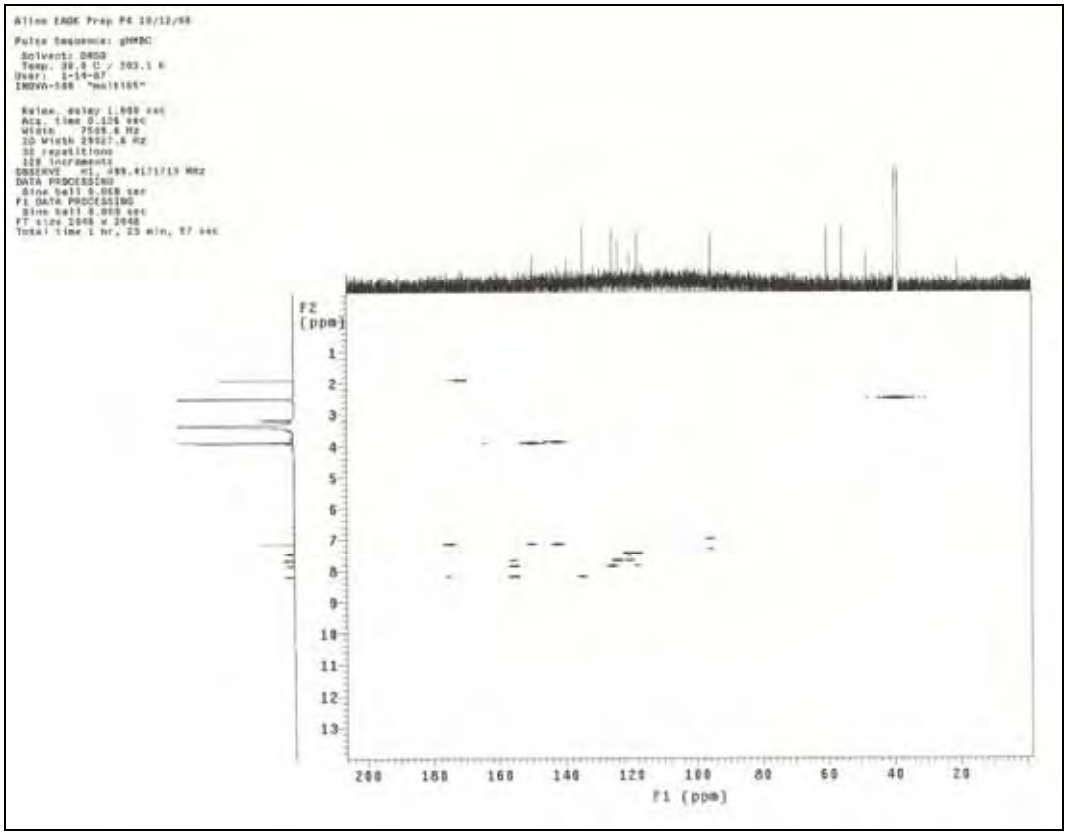
Anexo 31: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **6** (125 MHz – DMSO-d_6).



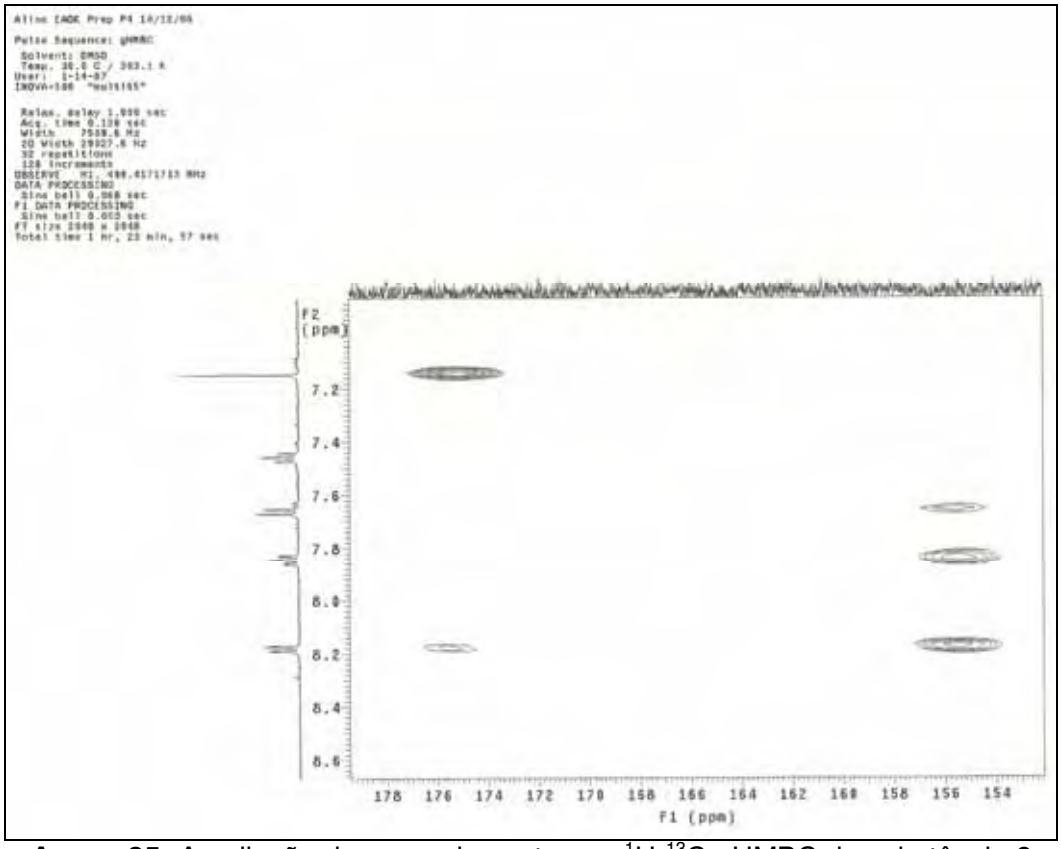
Anexo 32: Espectro de DEPT 135º da substância **6** (125 MHz – DMSO-d_6).



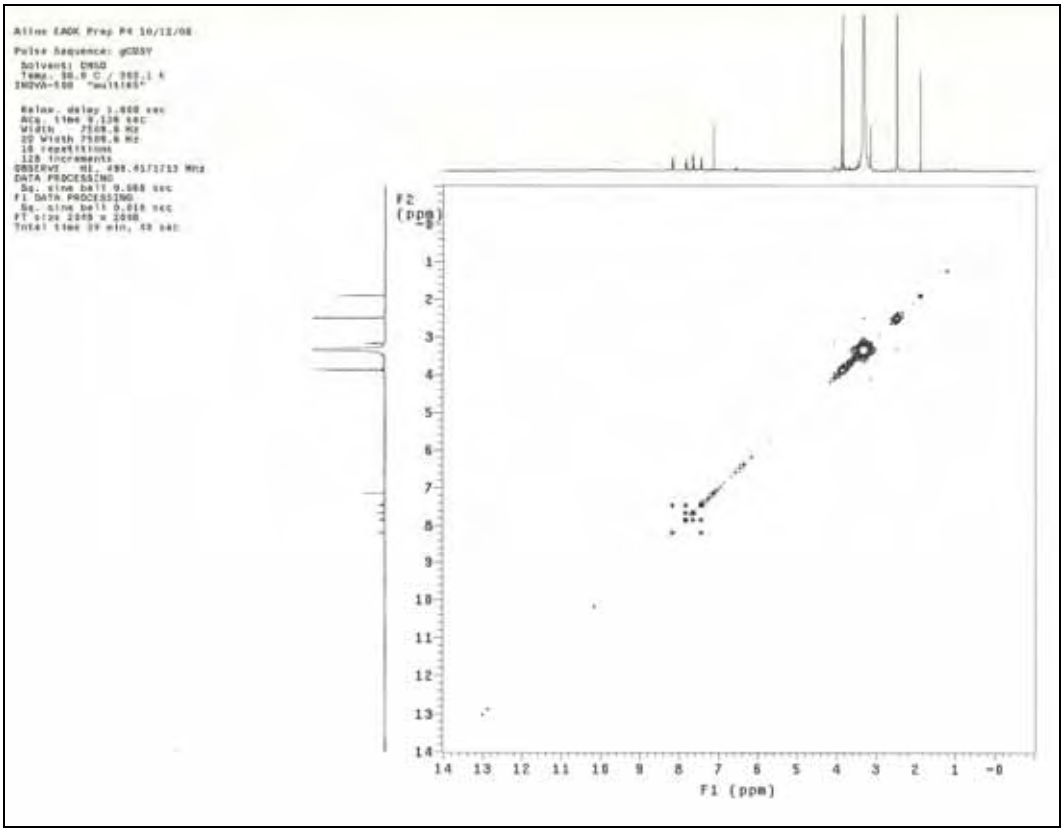
Anexo 33: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **6** (500 MHz – DMSO-d_6).



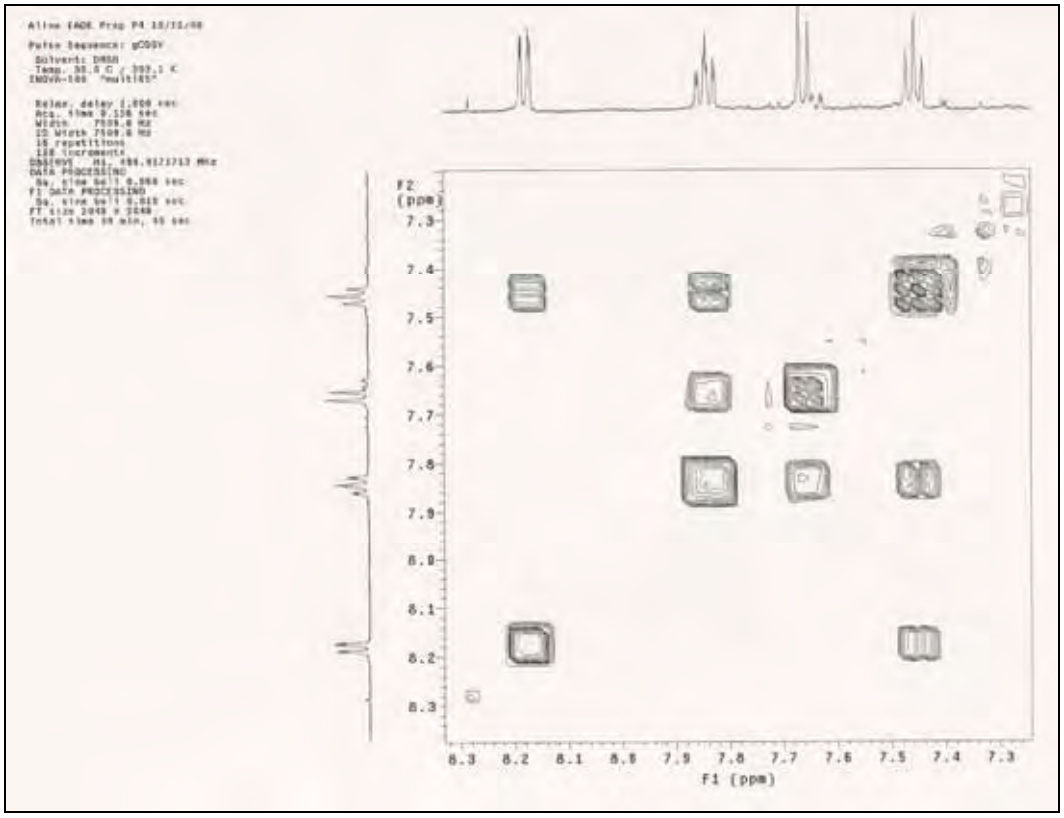
Anexo 34: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **6** (500 MHz – DMSO-d_6).



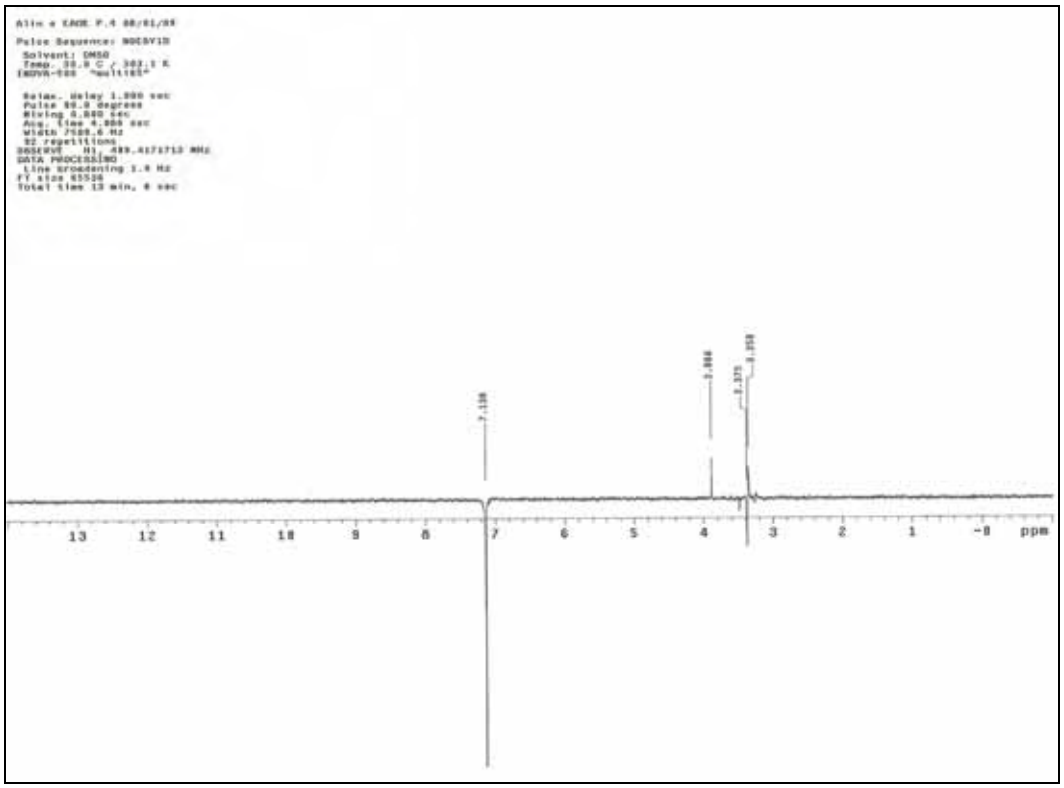
Anexo 35: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **6** (500 MHz – DMSO-d_6).



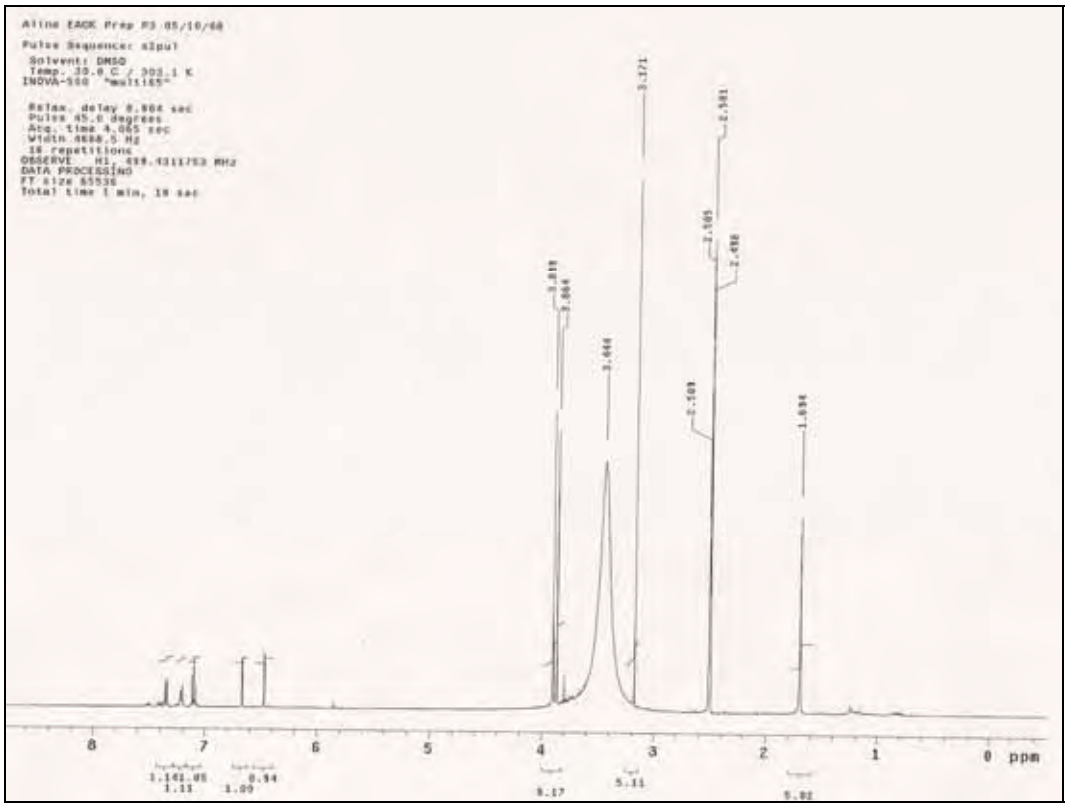
Anexo 36: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **6** (500 MHz – DMSO-d_6).



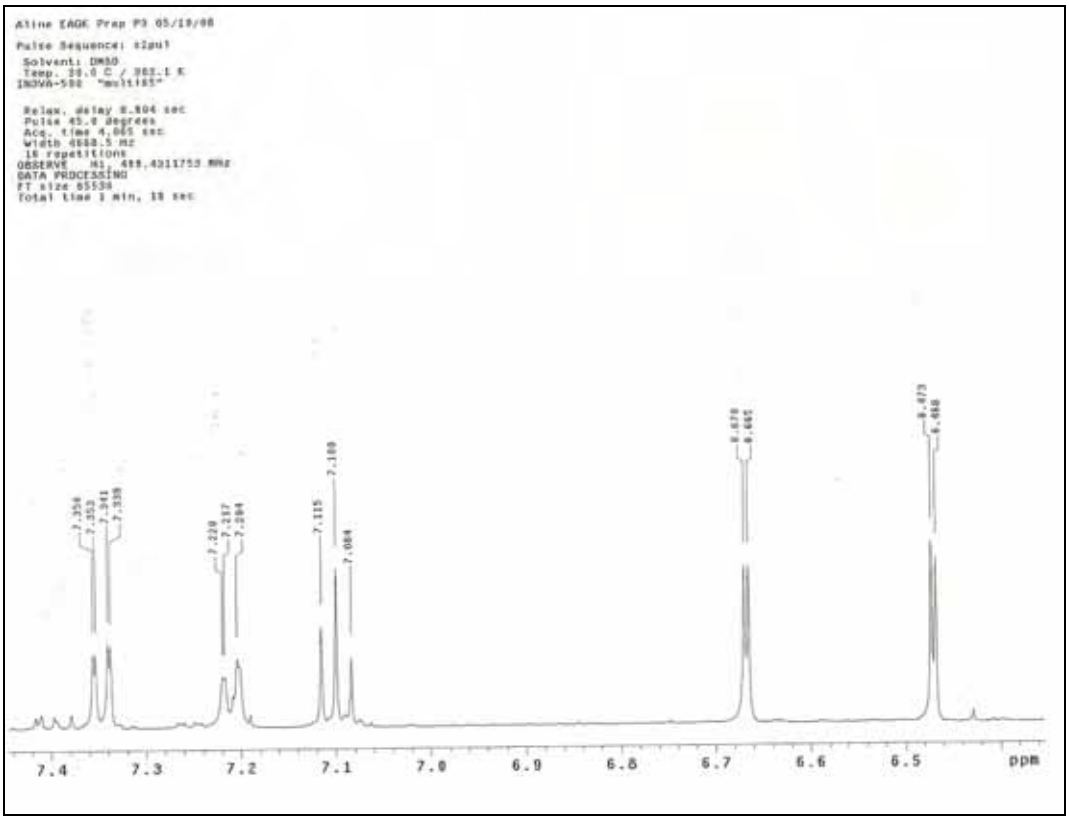
Anexo 37: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **6** (500 MHz – DMSO-d_6).



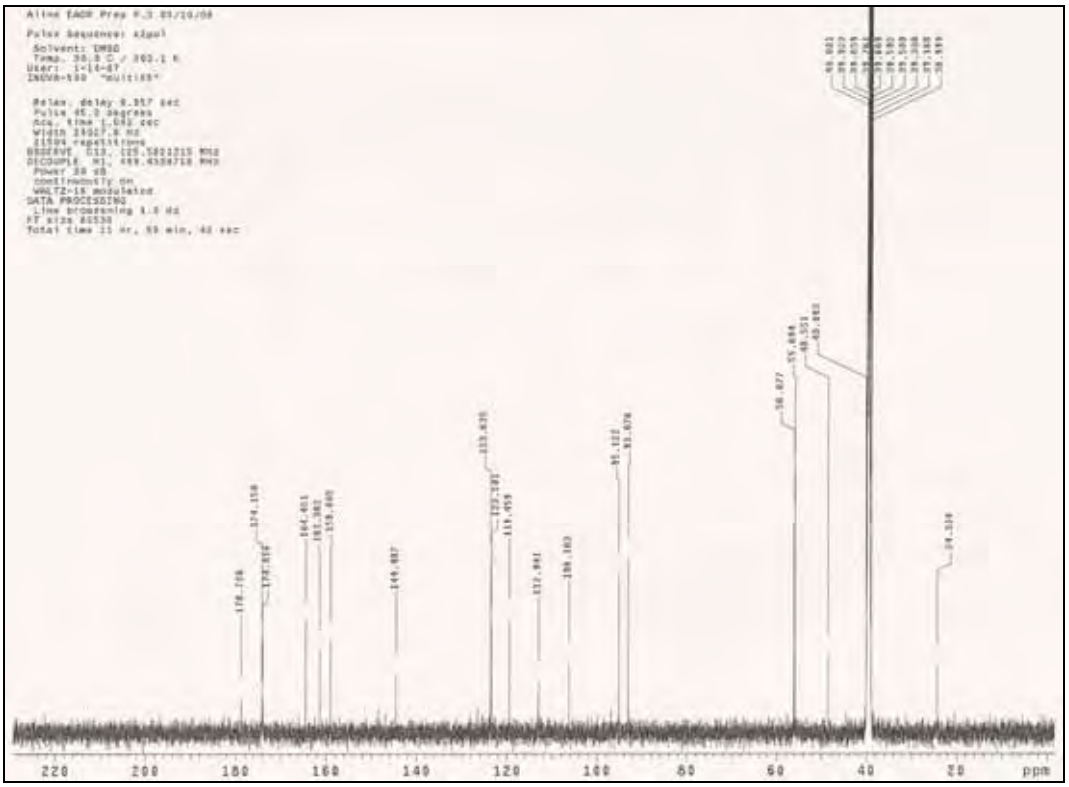
Anexo 38: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 7,13 da substância **6** (500 MHz – DMSO-d_6).



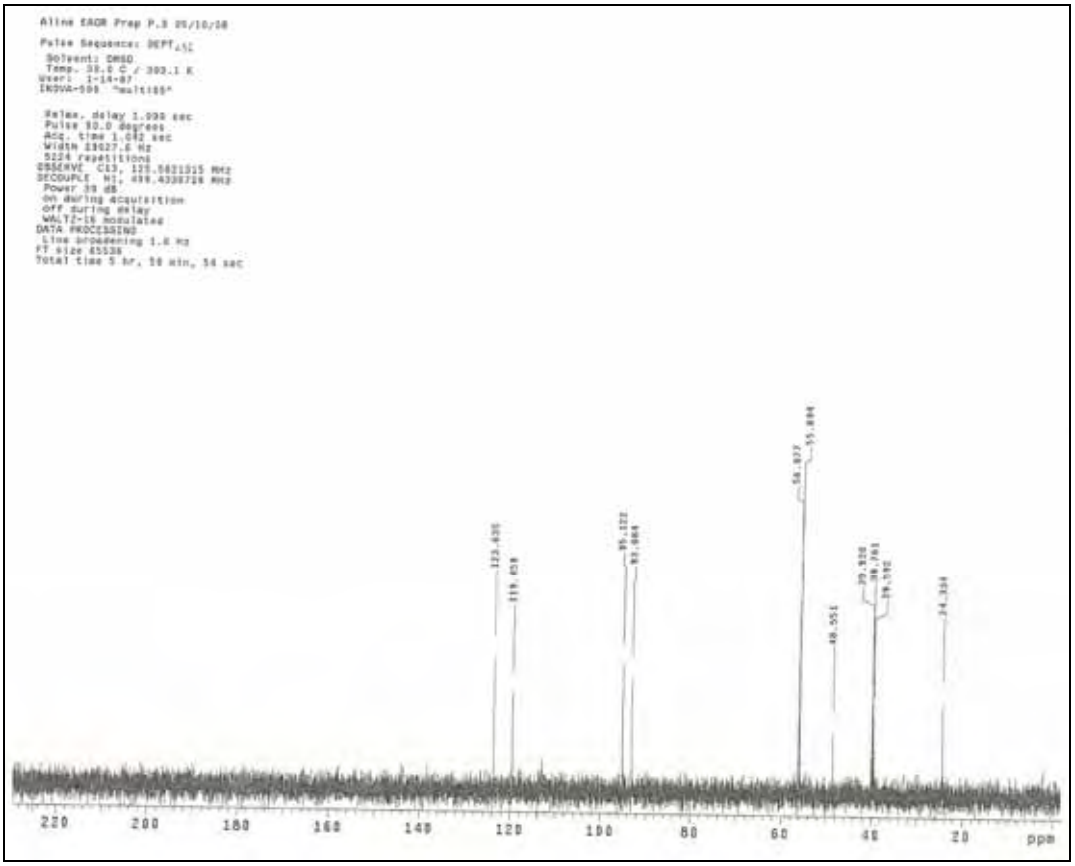
Anexo 39: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



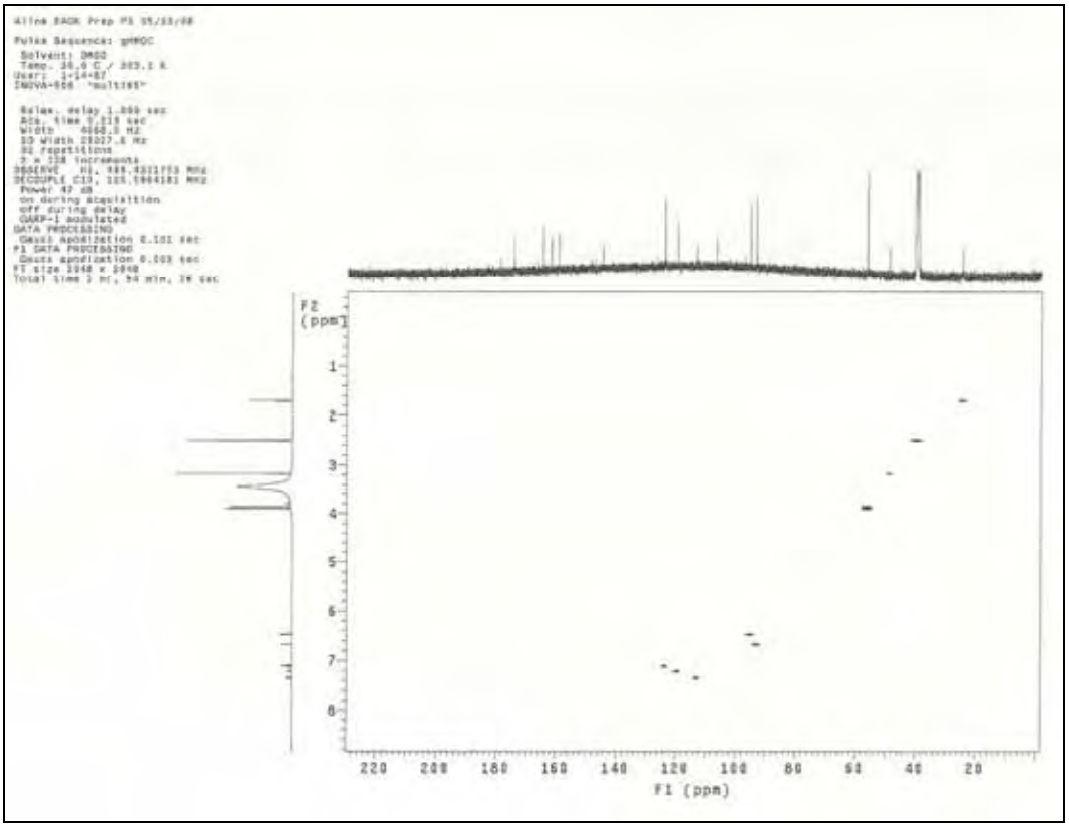
Anexo 40: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



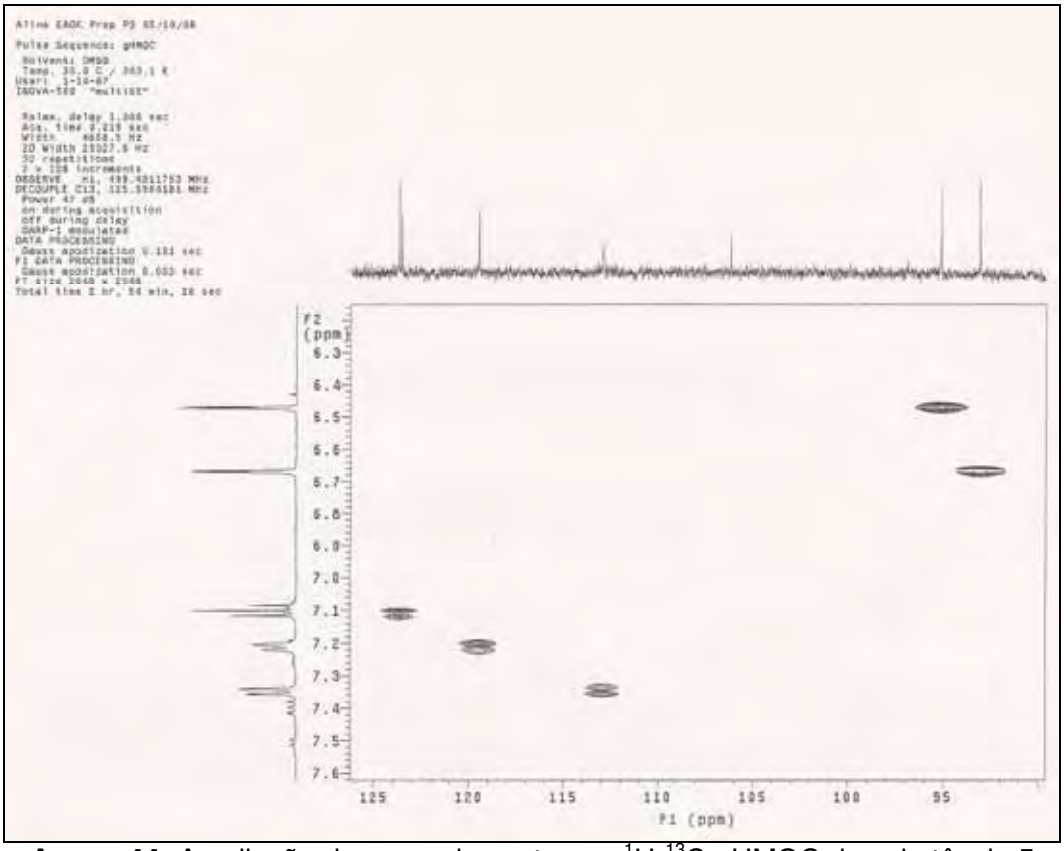
Anexo 41: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **5** (125 MHz – DMSO-d_6).



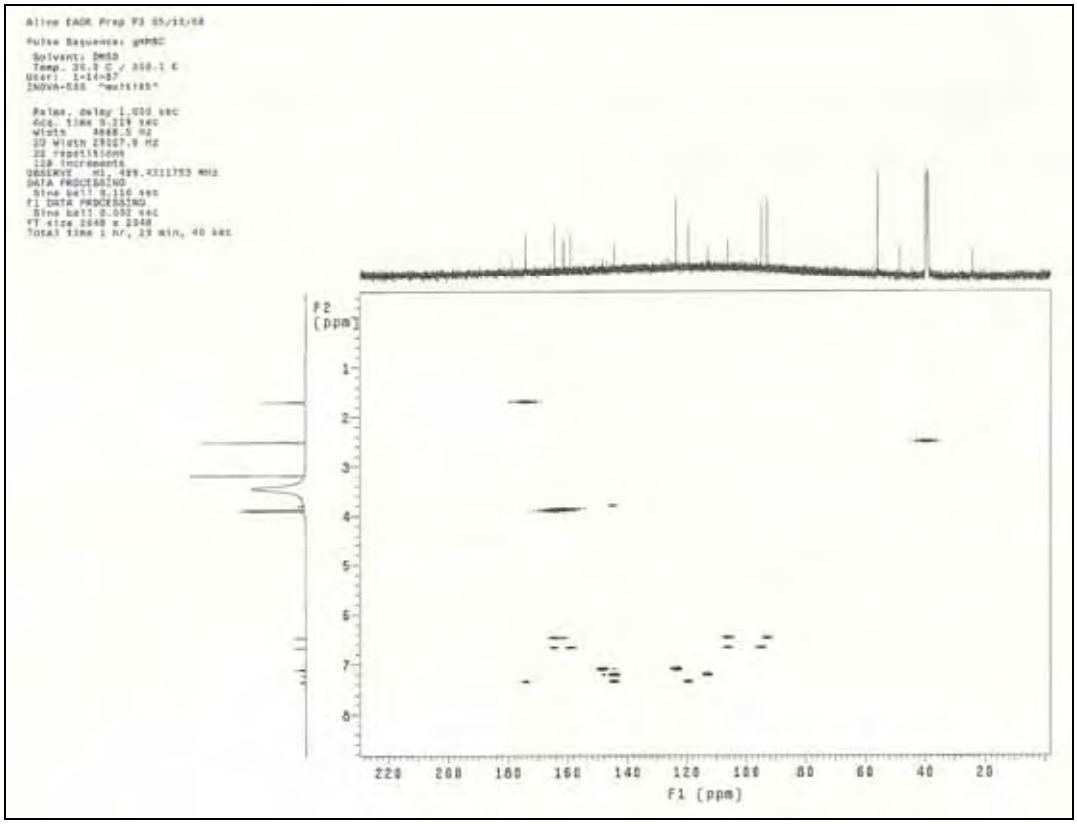
Anexo 42: Espectro de DEPT 135º da substância **5** (125 MHz – DMSO-d_6).



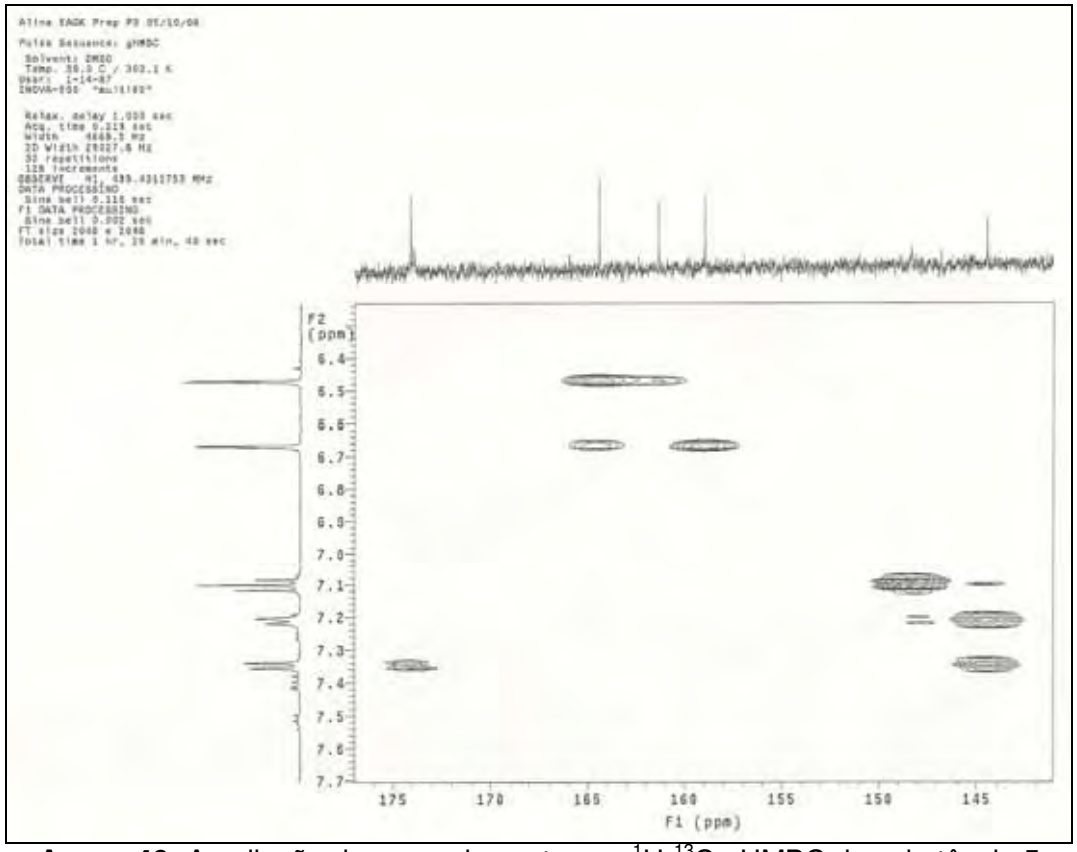
Anexo 43: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância 5 (500 MHz – DMSO-d_6).



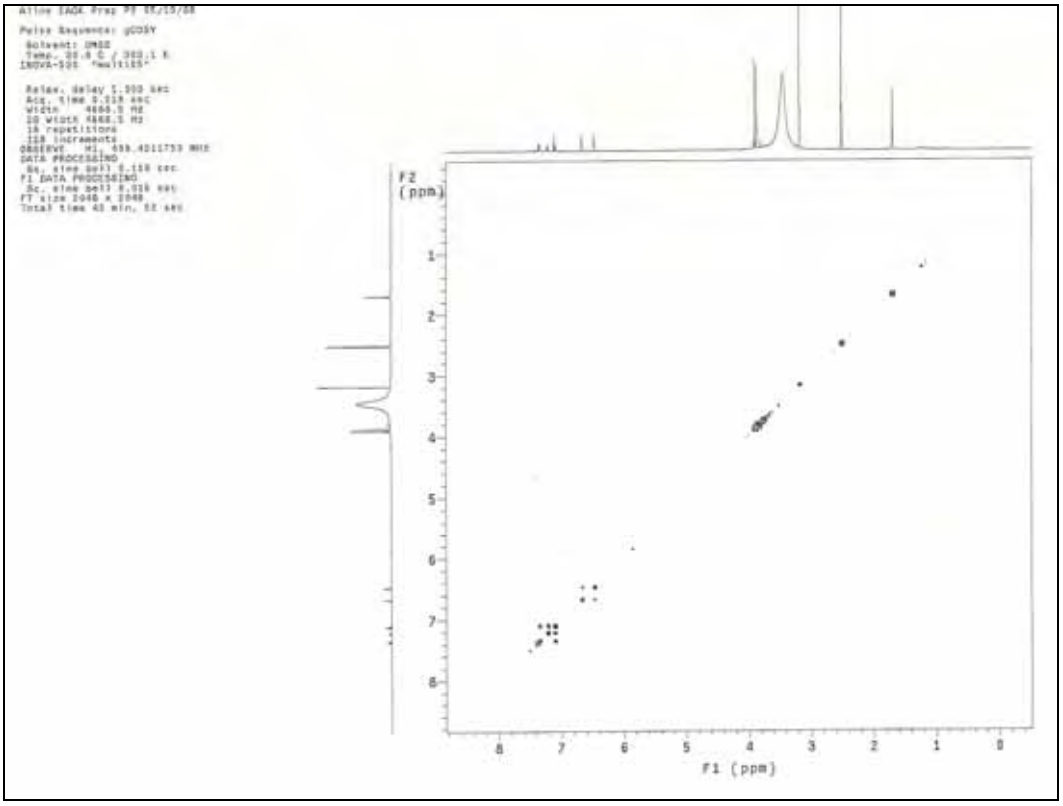
Anexo 44: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



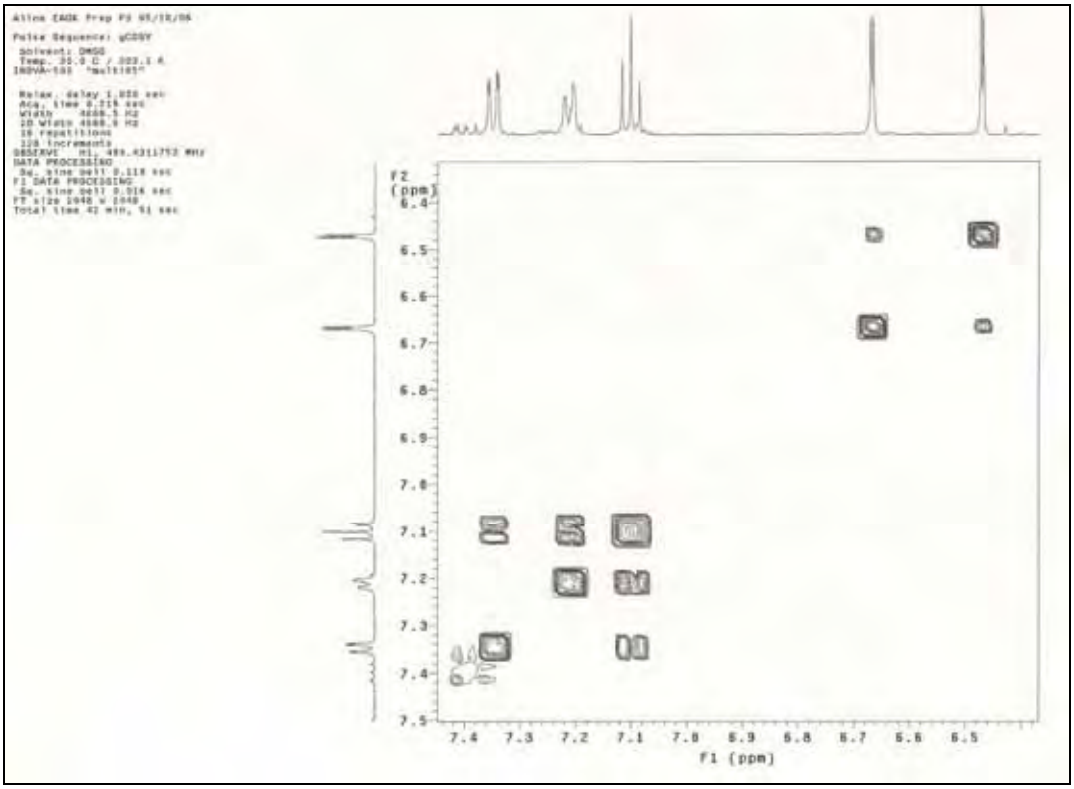
Anexo 45: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



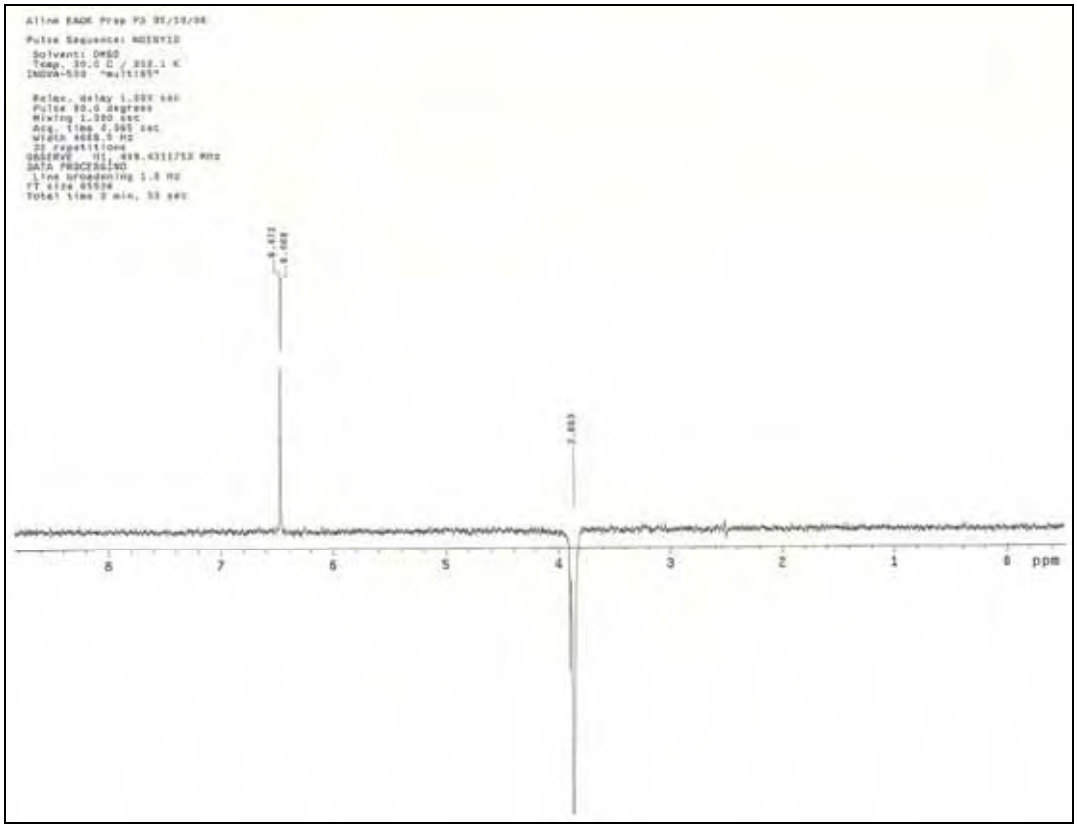
Anexo 46: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



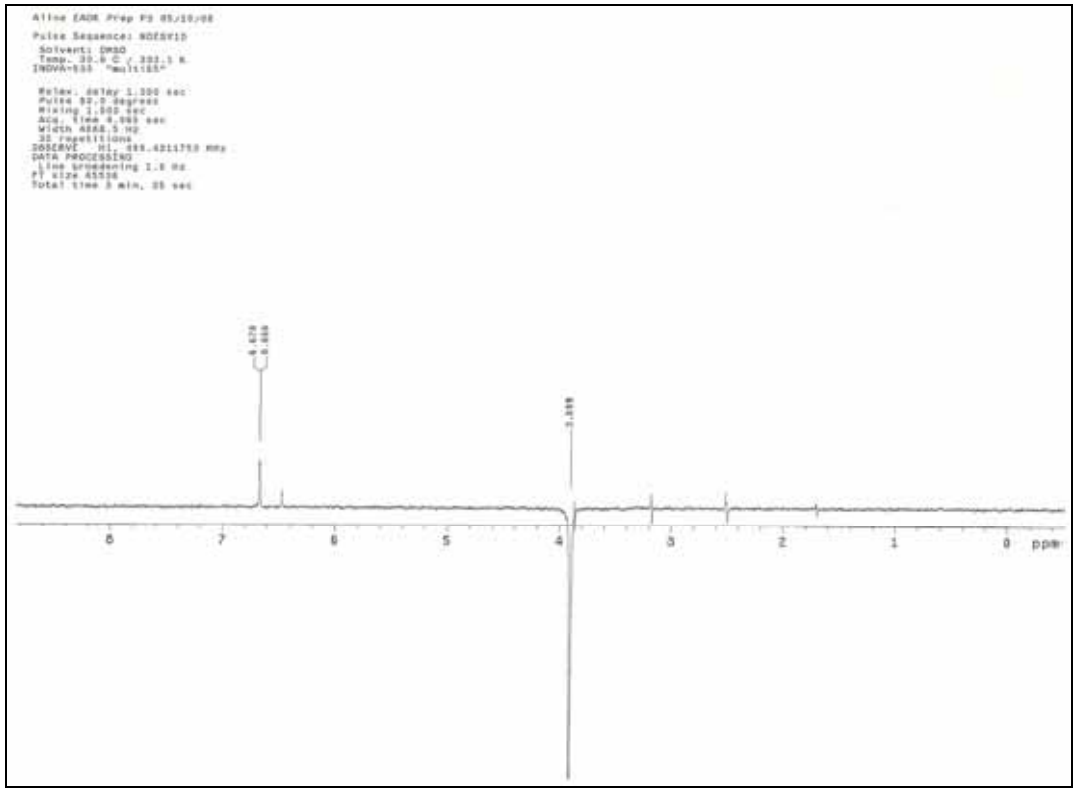
Anexo 47: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



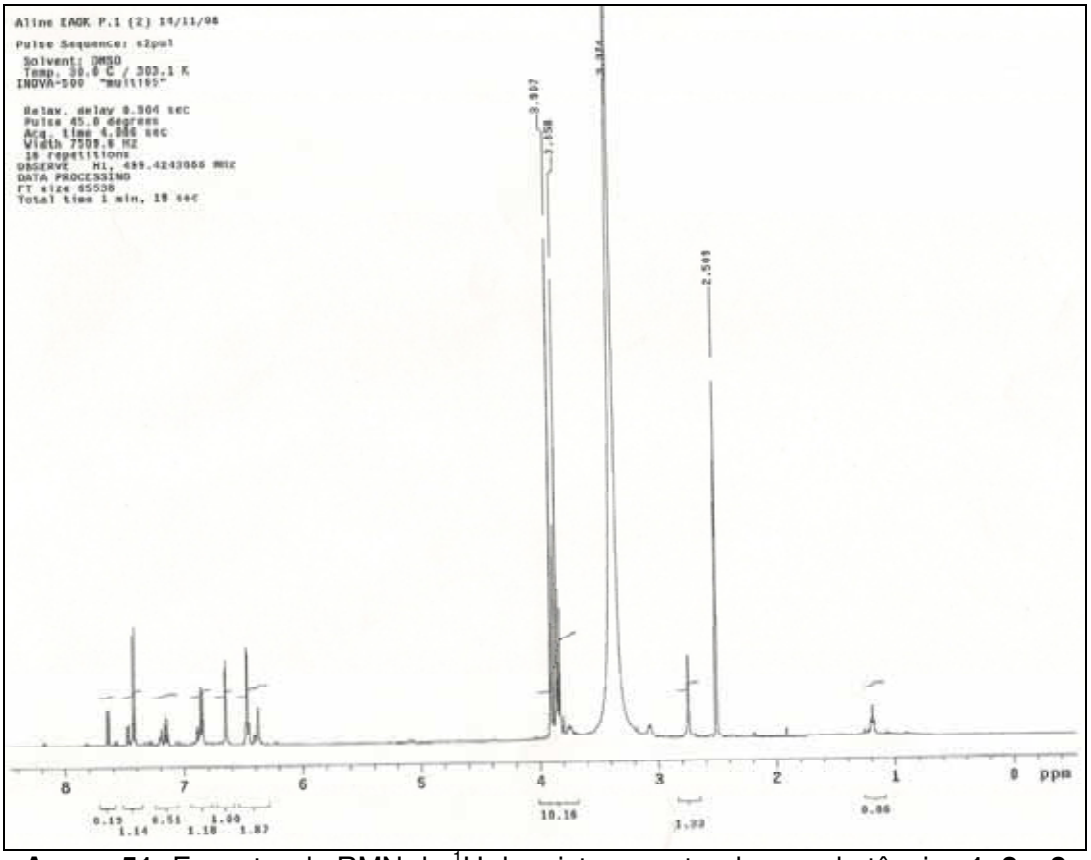
Anexo 48: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



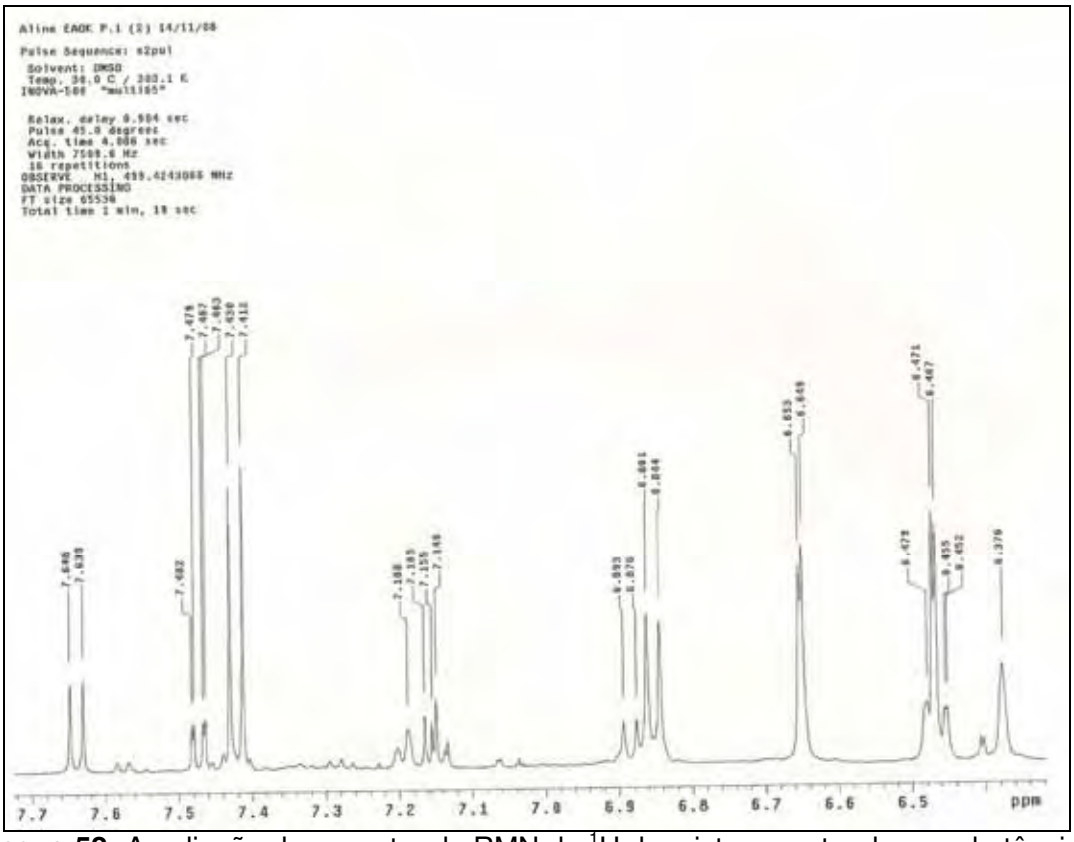
Anexo 49: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,86 da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



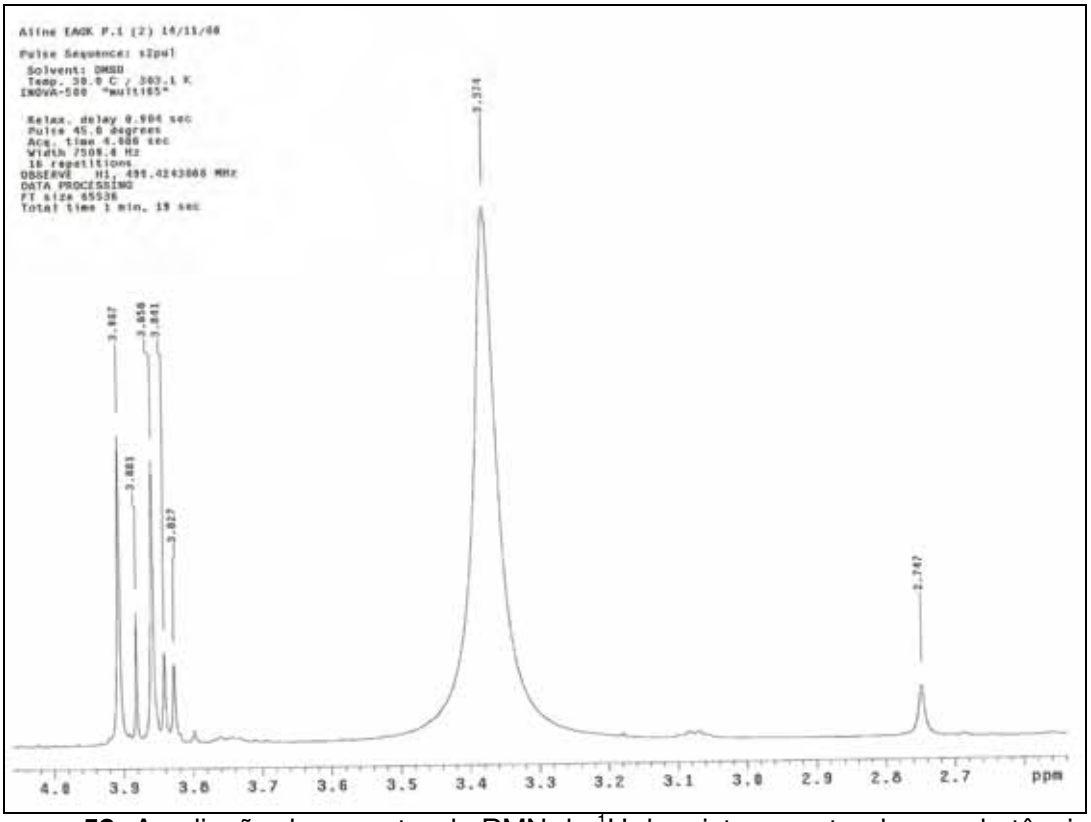
Anexo 50: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,90 da substância **5** (500 MHz – DMSO-d_6).



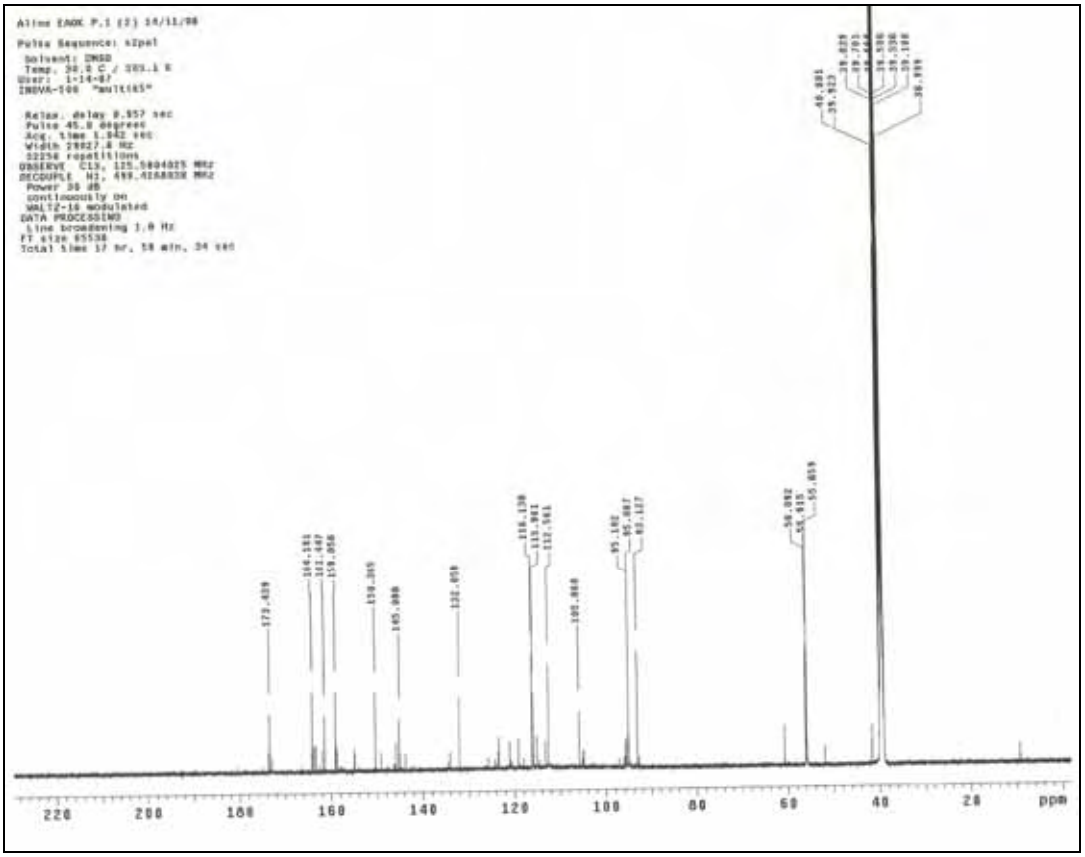
Anexo 51: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



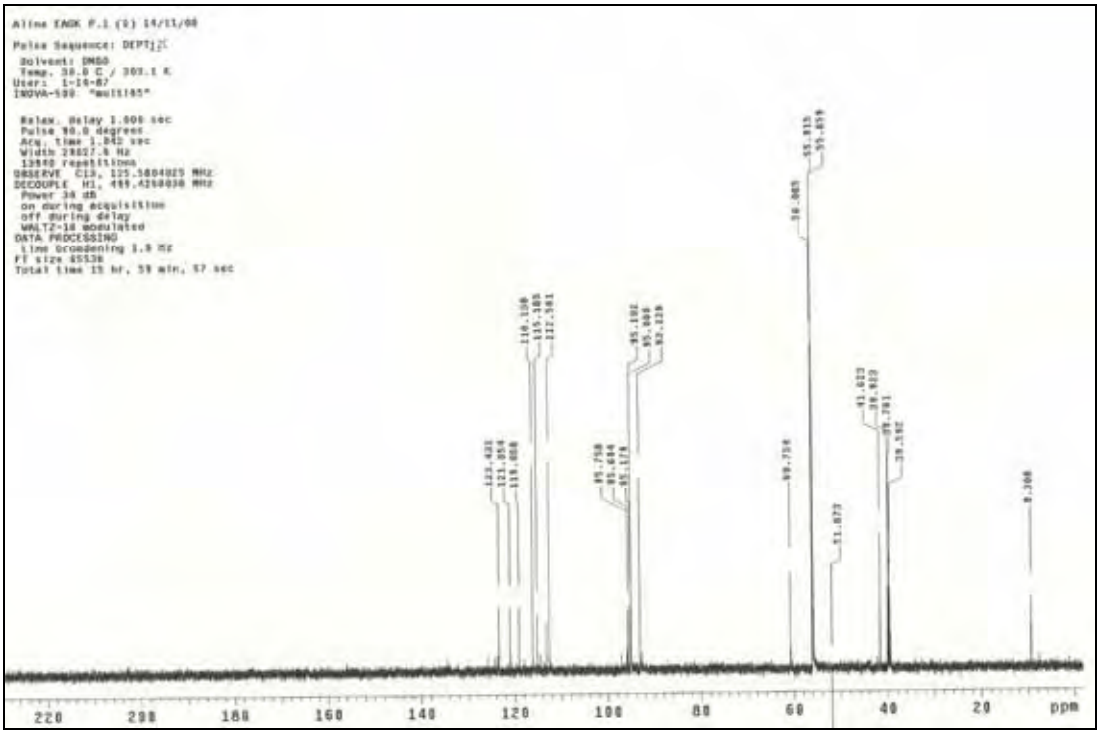
Anexo 52: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



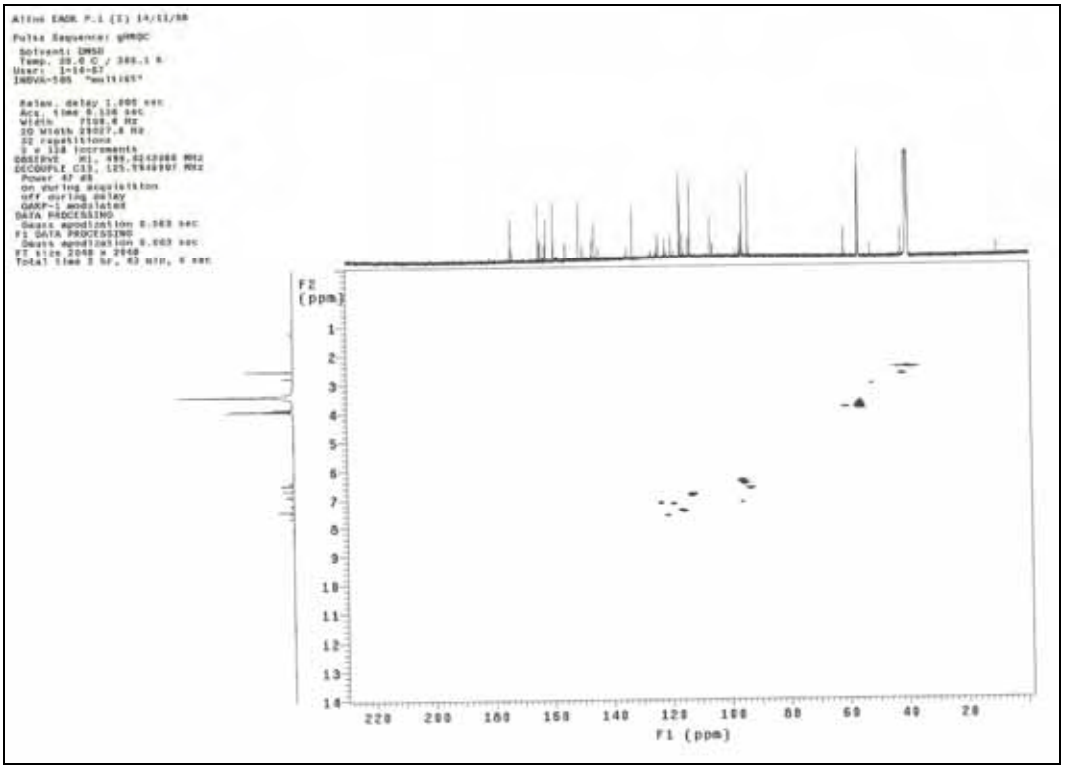
Anexo 53: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



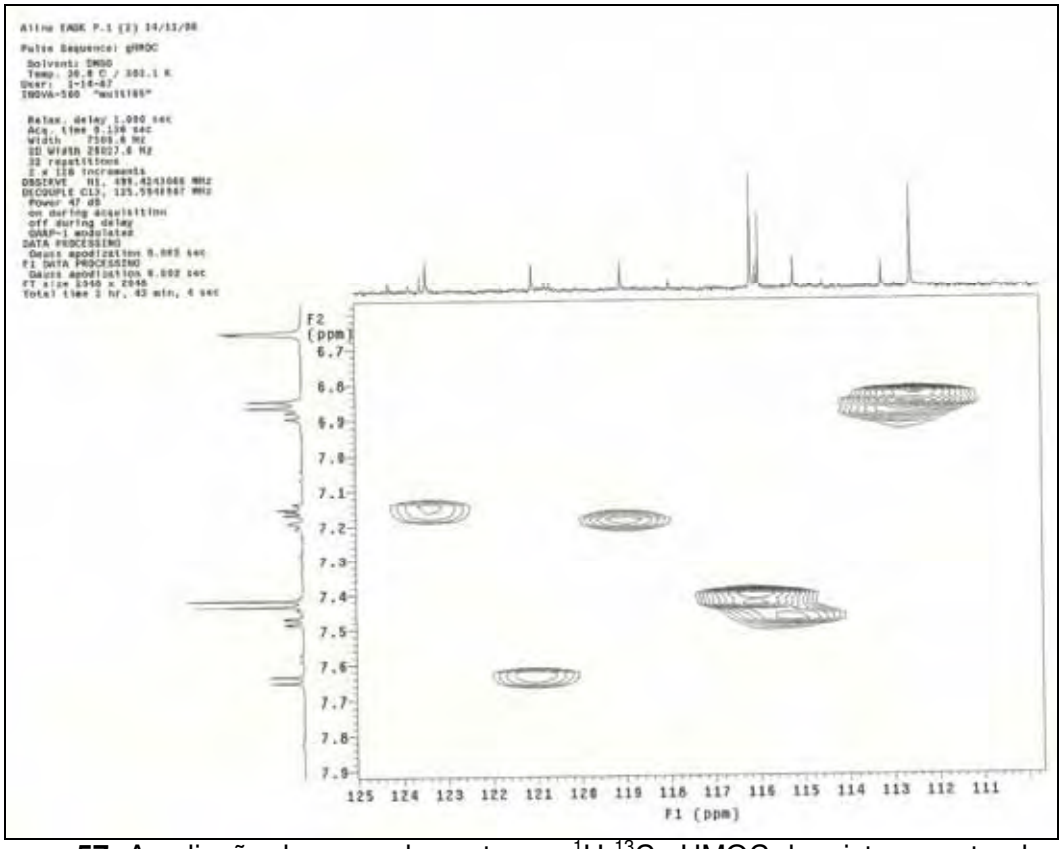
Anexo 54: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (125 MHz – DMSO-d_6).



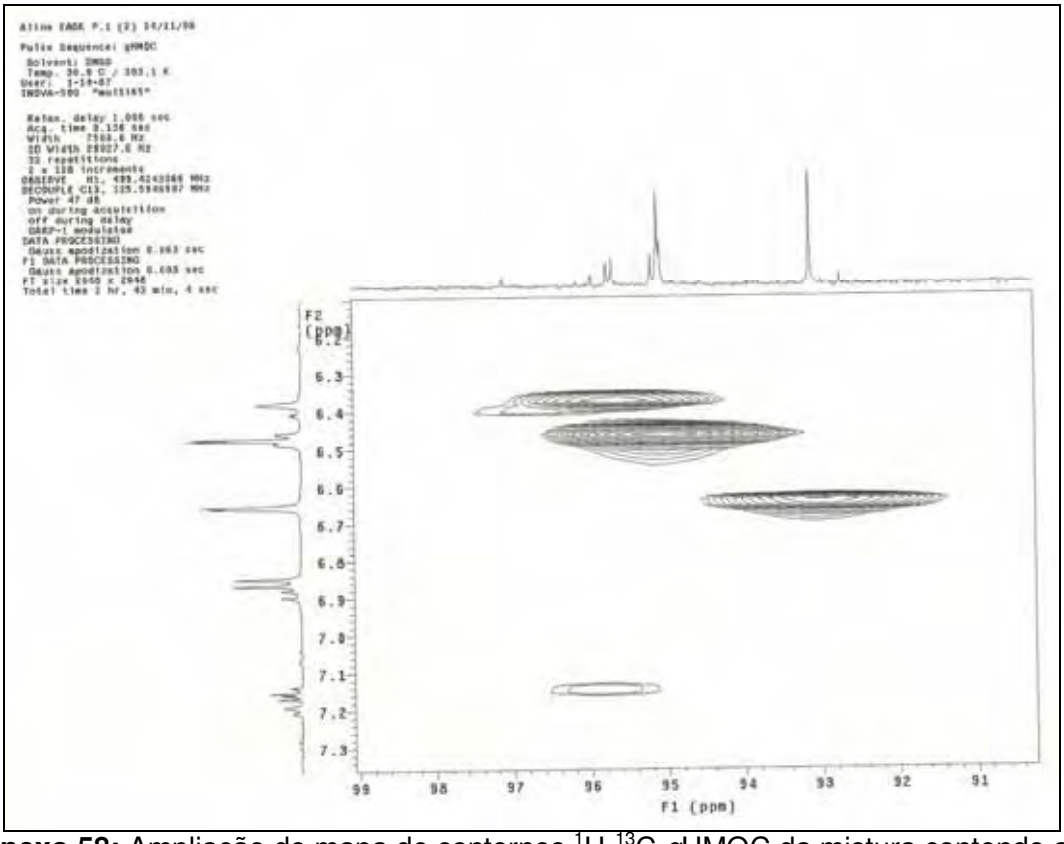
Anexo 55: Espectro de DEPT 135º da mistura contendo as substância **1**, **2** e **3** (125 MHz – DMSO-d_6).



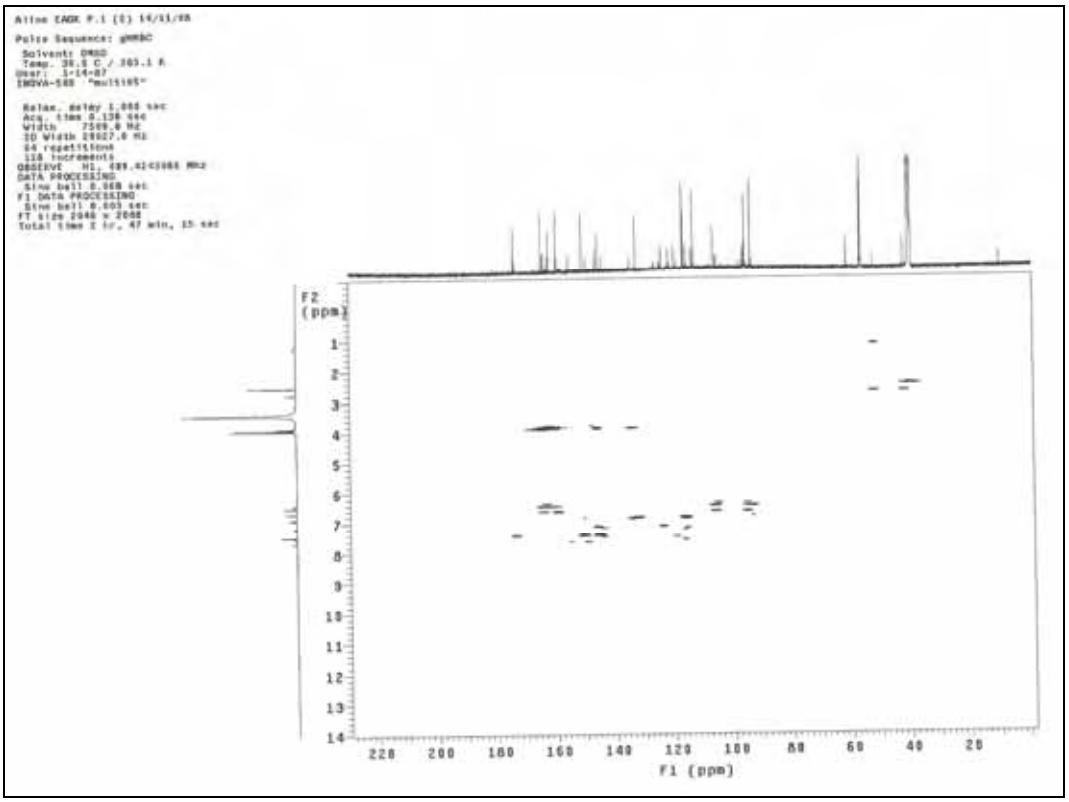
Anexo 56: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



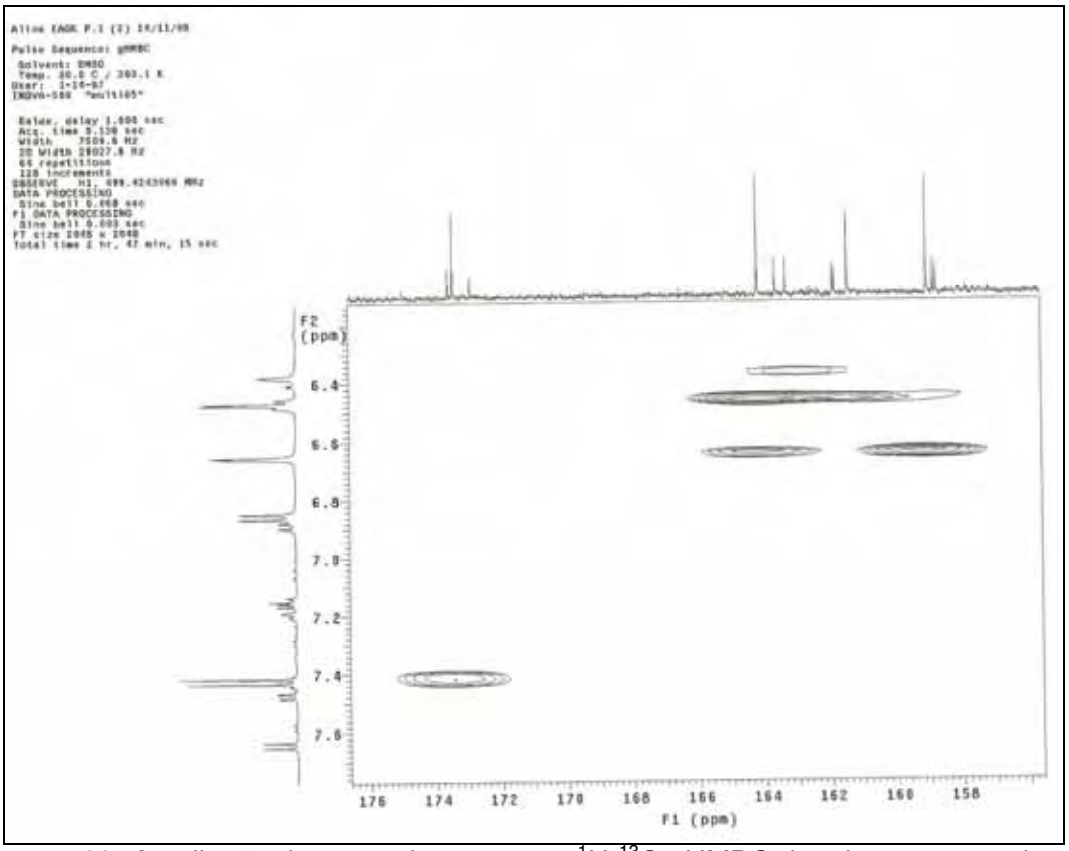
Anexo 57: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



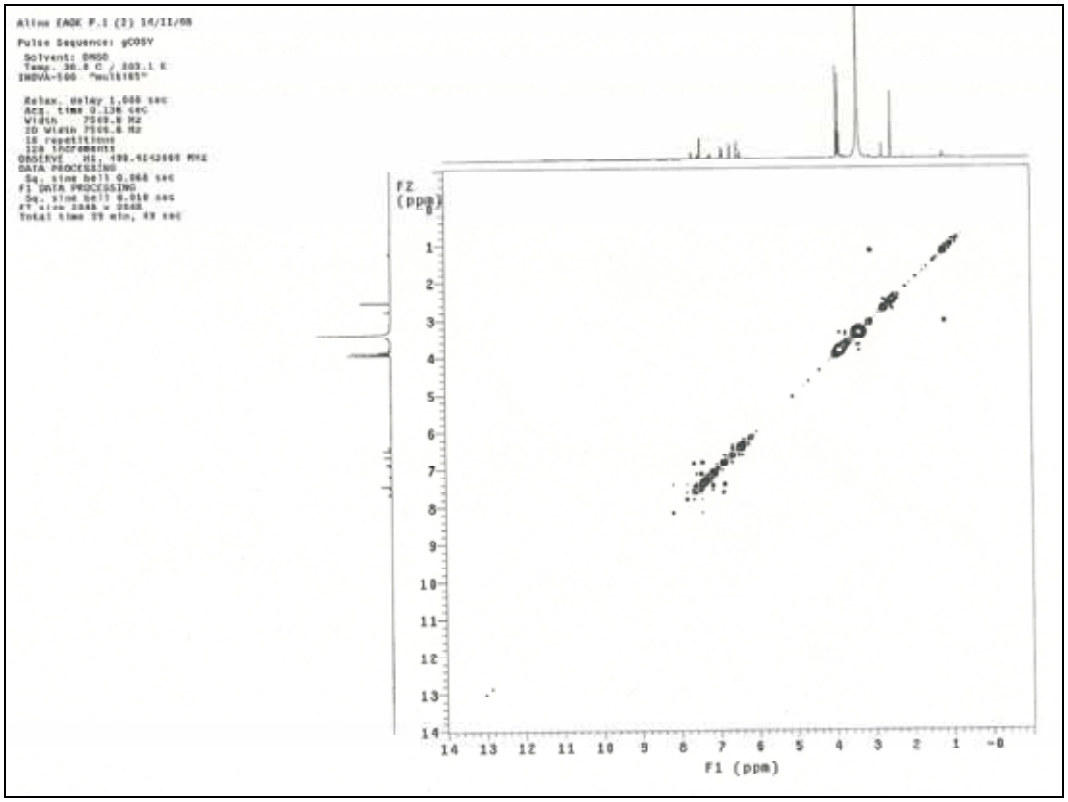
Anexo 58: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



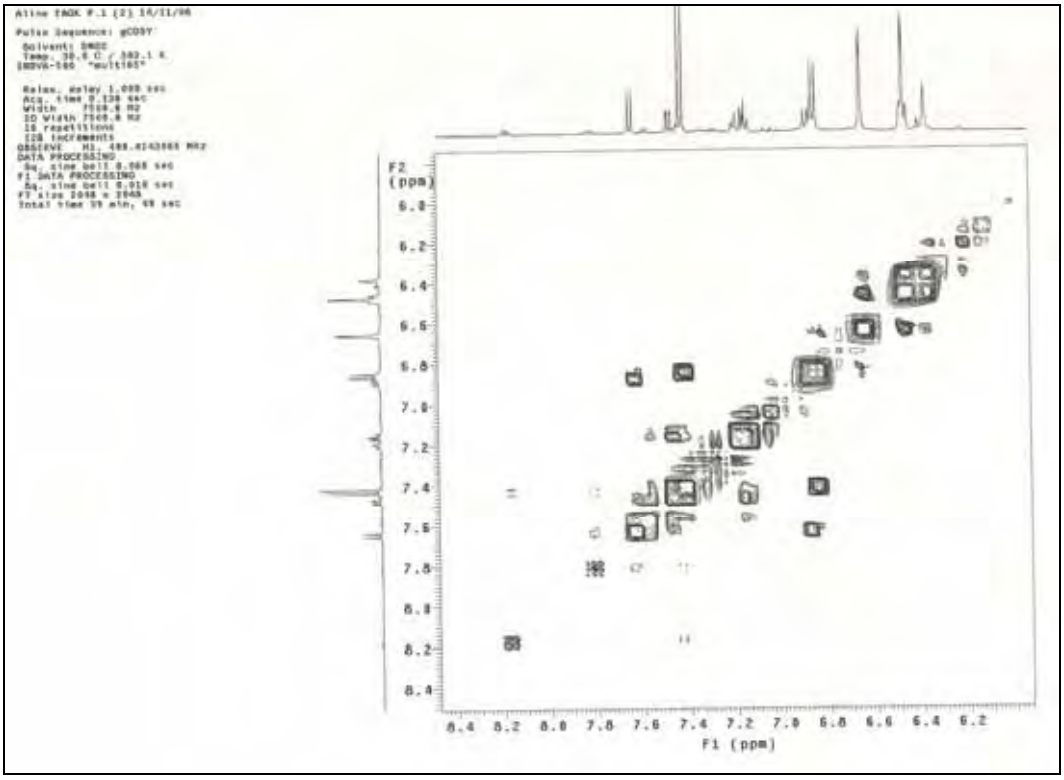
Anexo 59: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



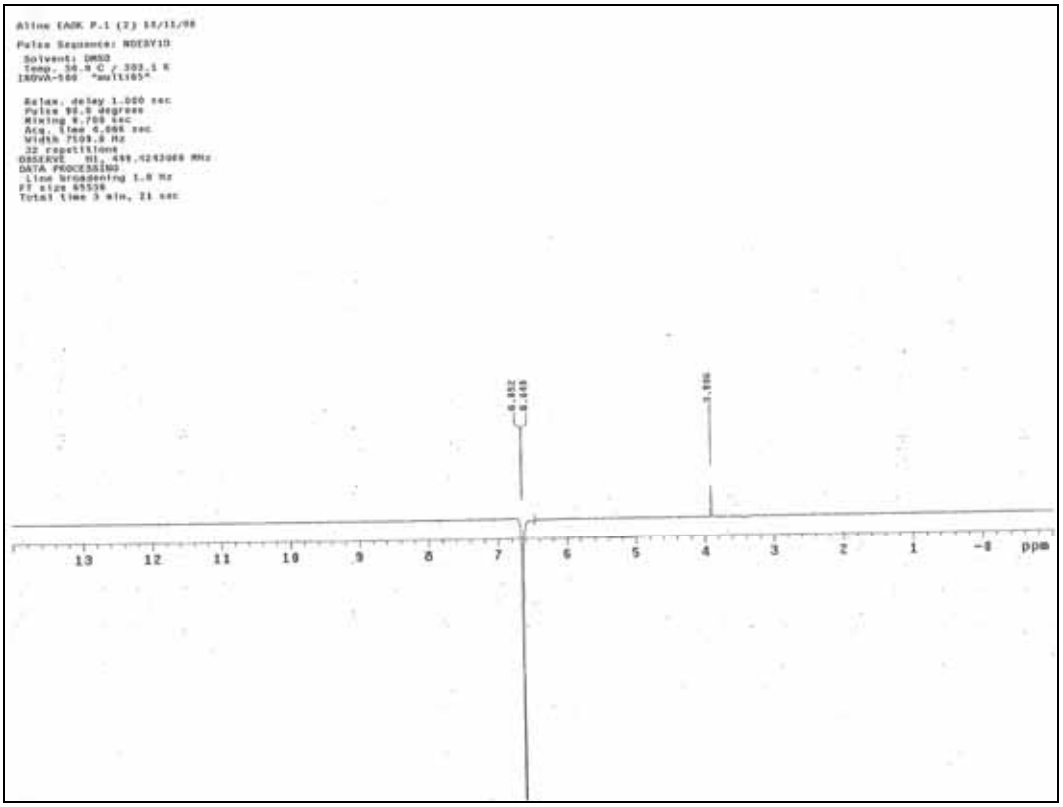
Anexo 60: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



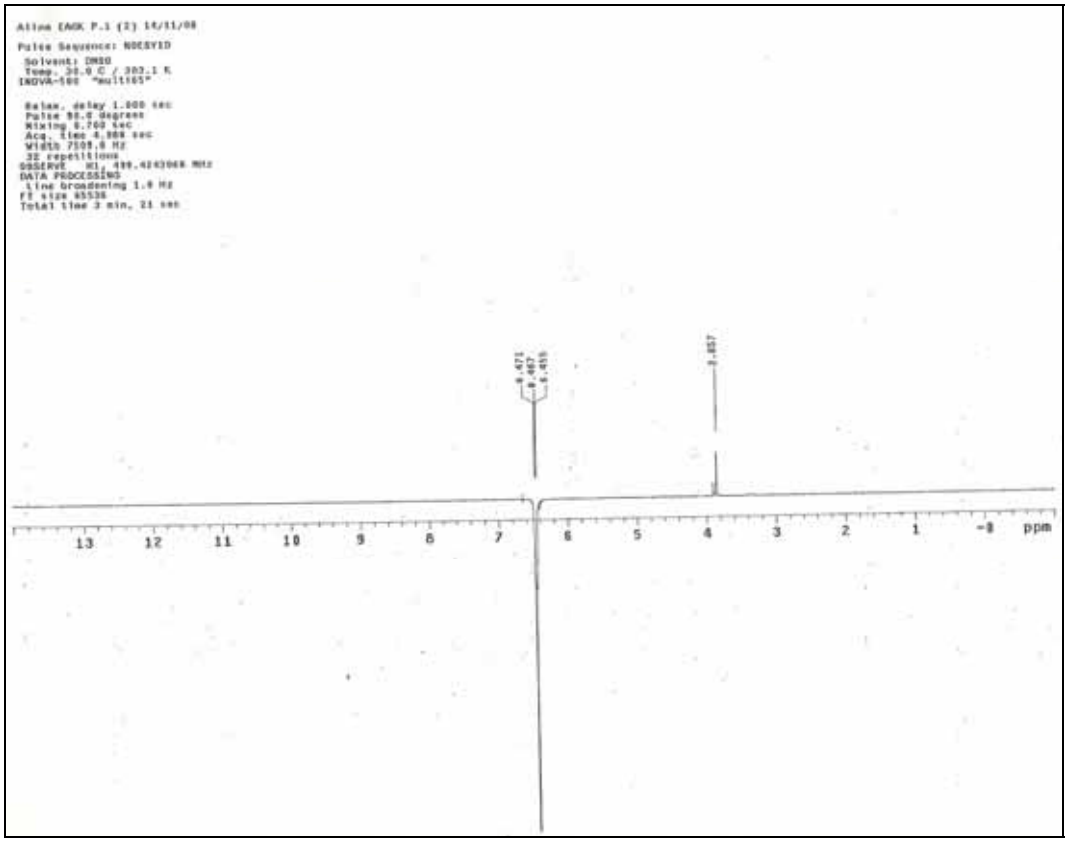
Anexo 61: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



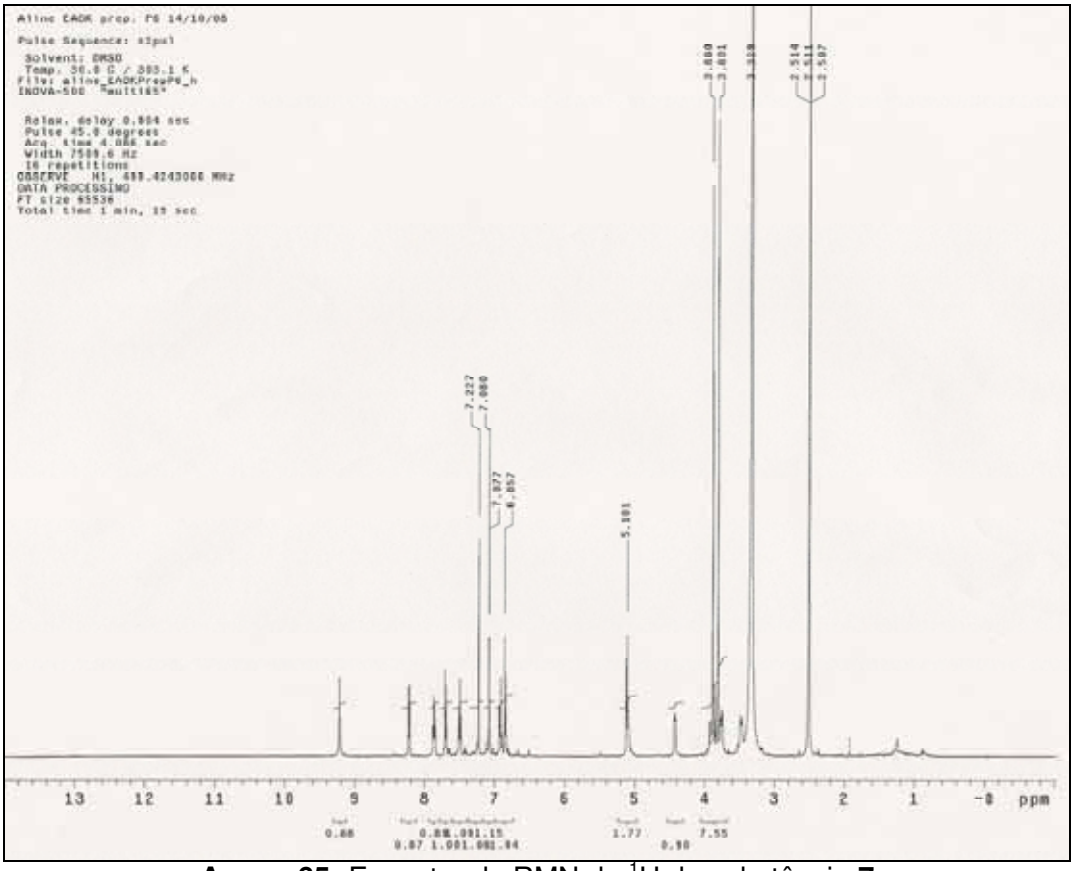
Anexo 62: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



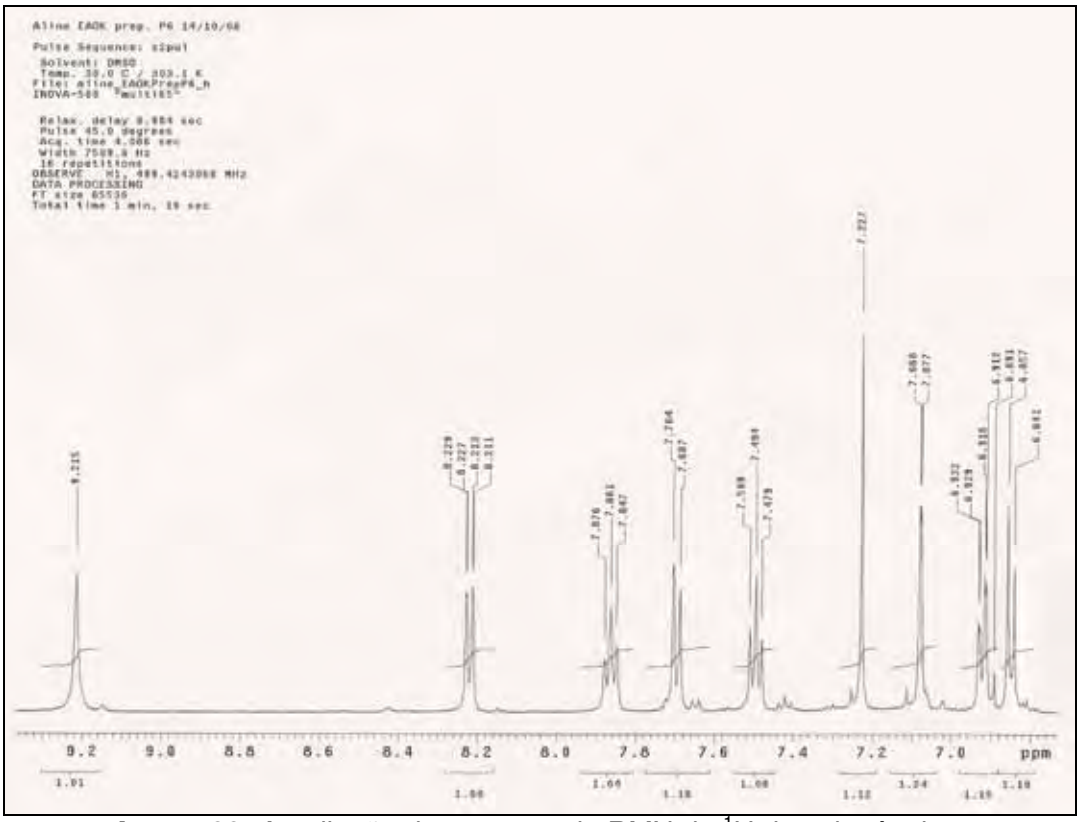
Anexo 63: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 6,61 da mistura contendo as substâncias **1, 2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



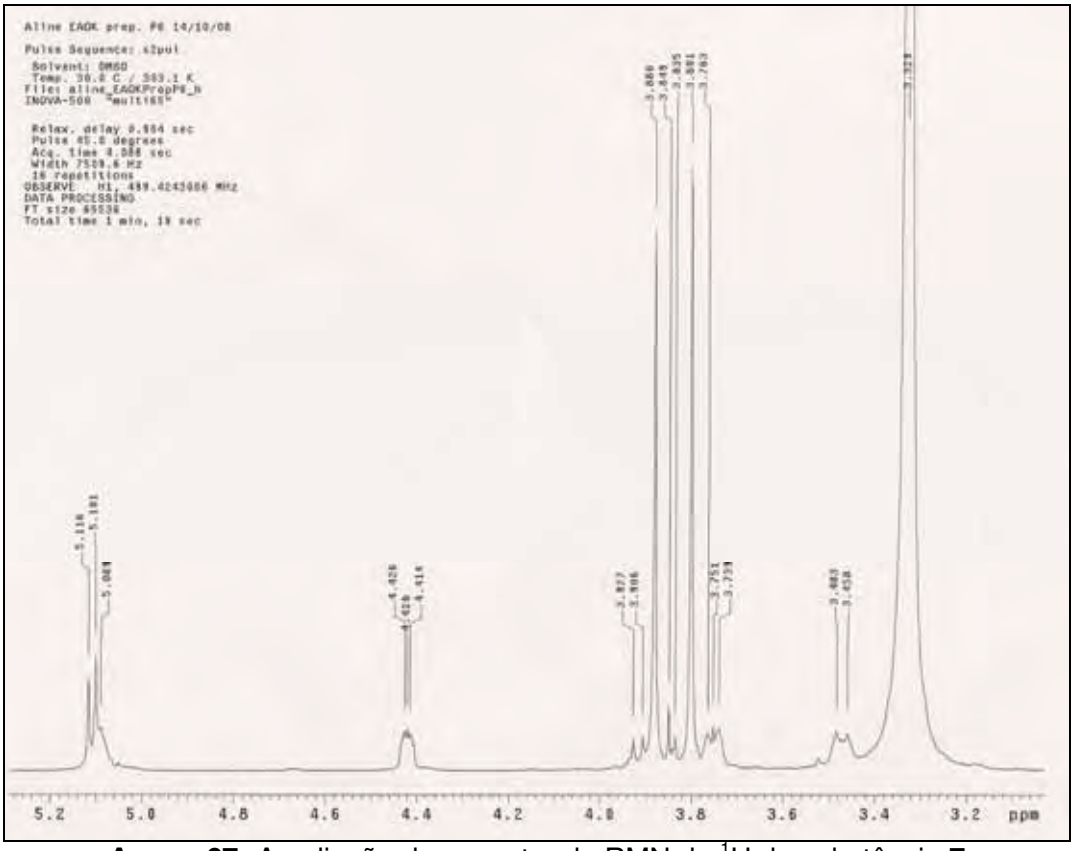
Anexo 64: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 6,44 da mistura contendo as substâncias **1**, **2** e **3** (500 MHz – DMSO-d_6).



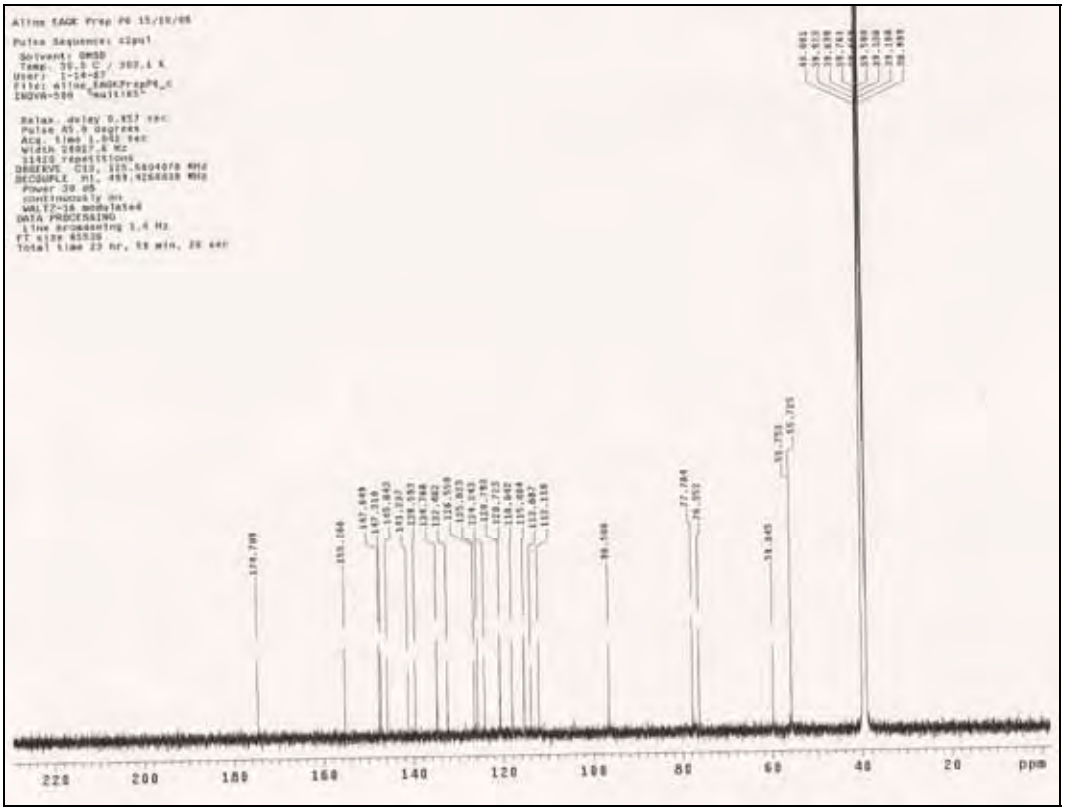
Anexo 65: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



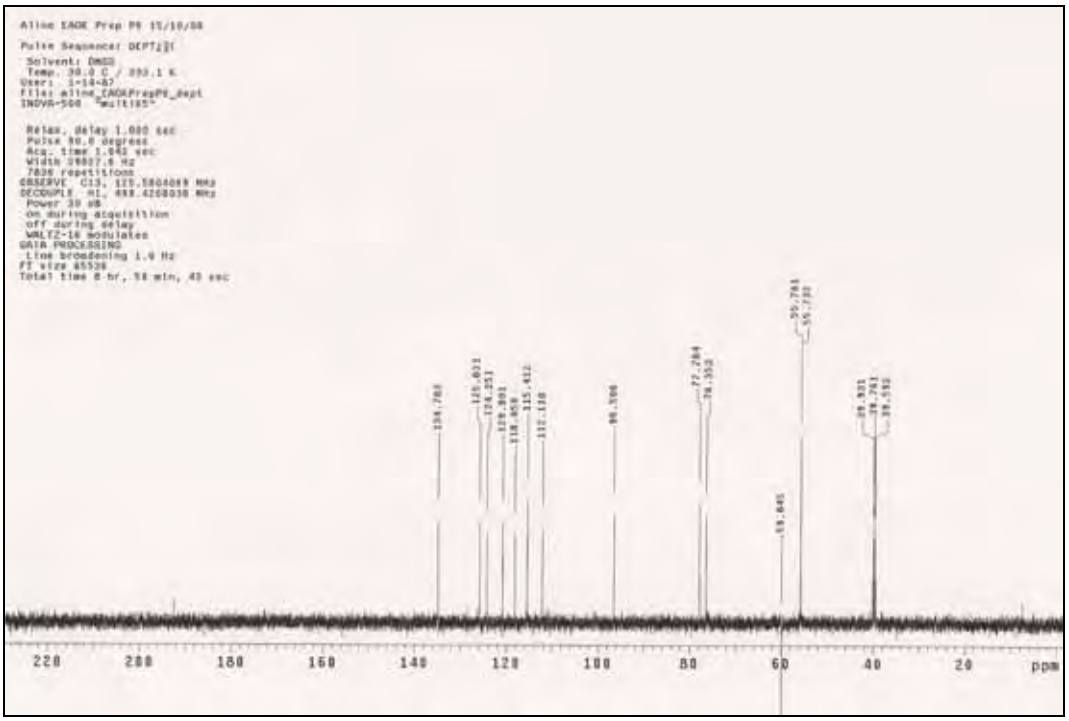
Anexo 66: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



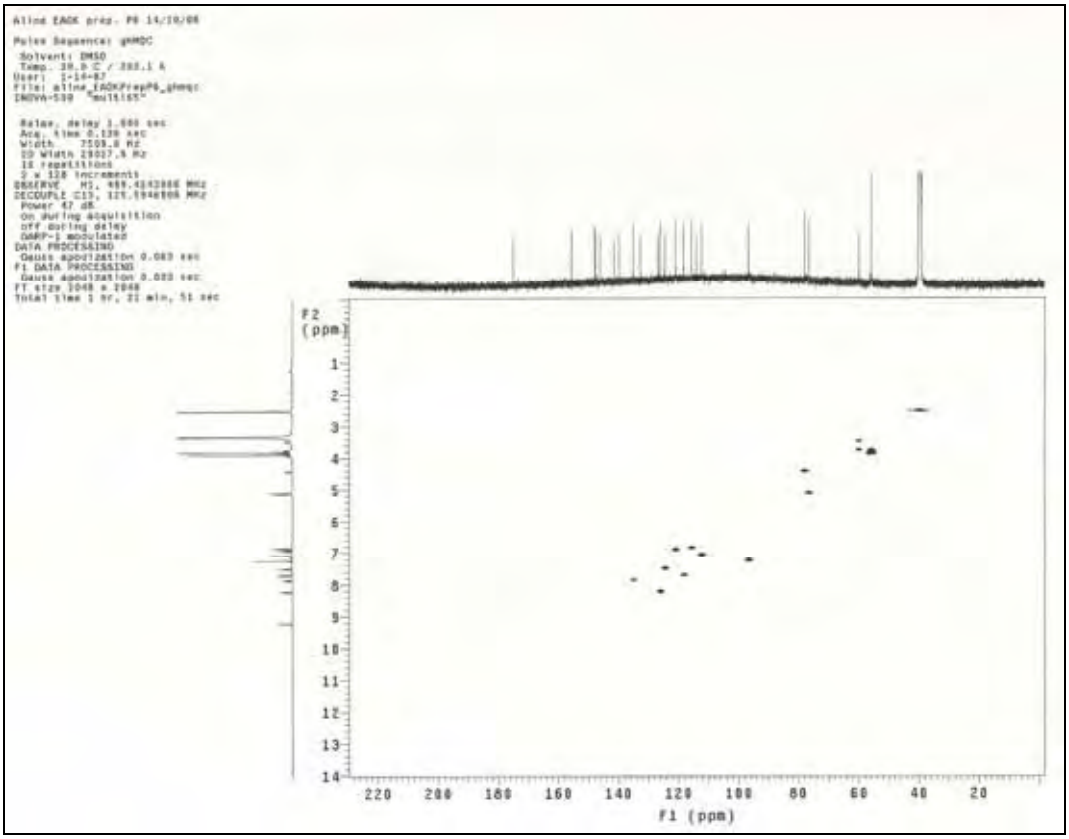
Anexo 67: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



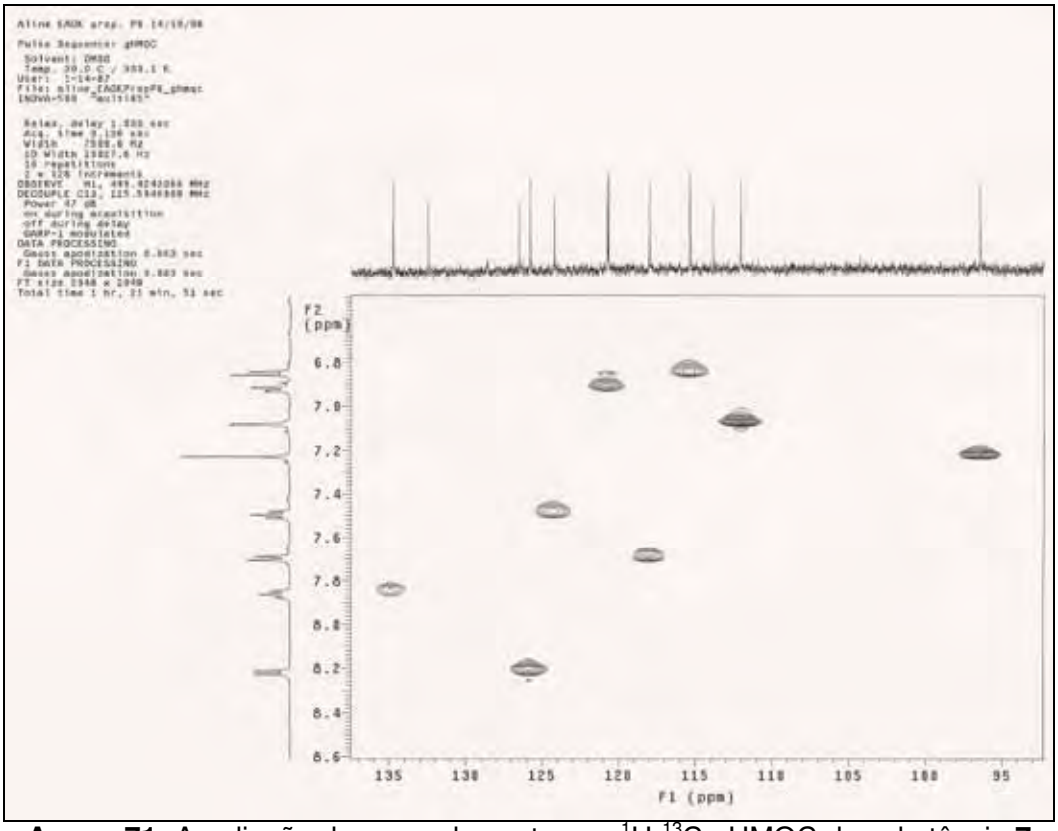
Anexo 68: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **7** (125 MHz – DMSO-d_6).



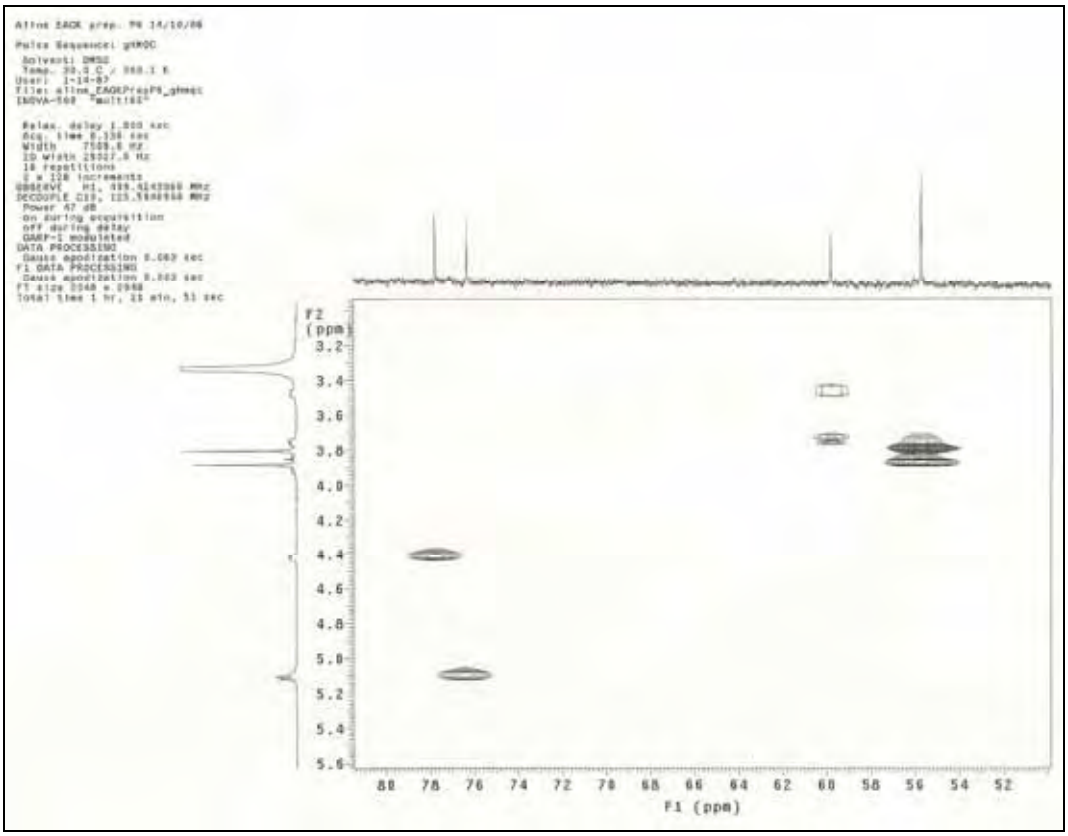
Anexo 69: Espectro de DEPT 135º da substância **7**
(125 MHz – DMSO-d_6).



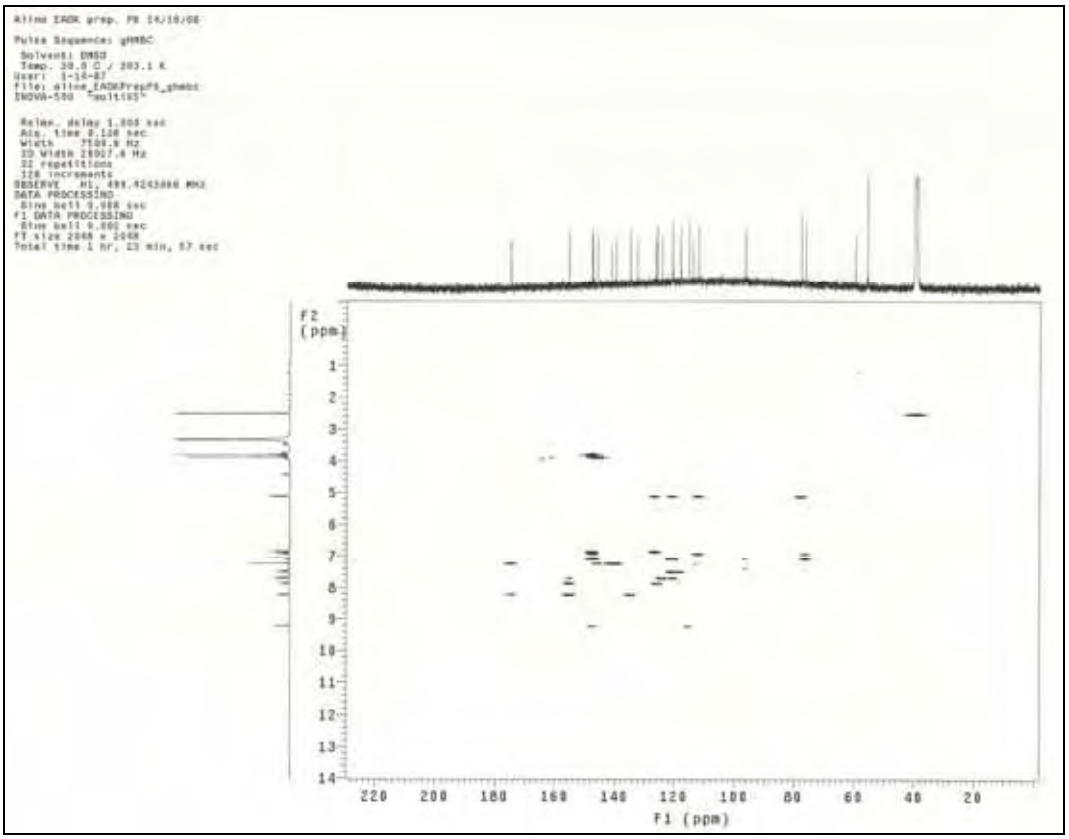
Anexo 70: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **7**
(500 MHz – DMSO-d_6).



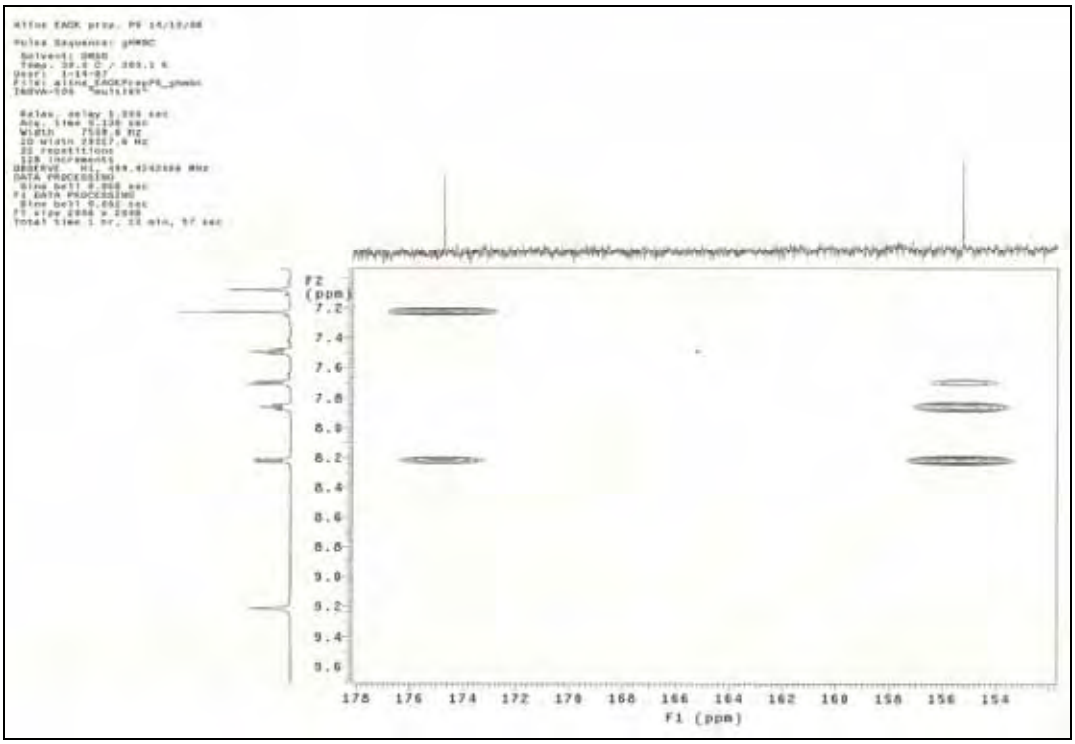
Anexo 71: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



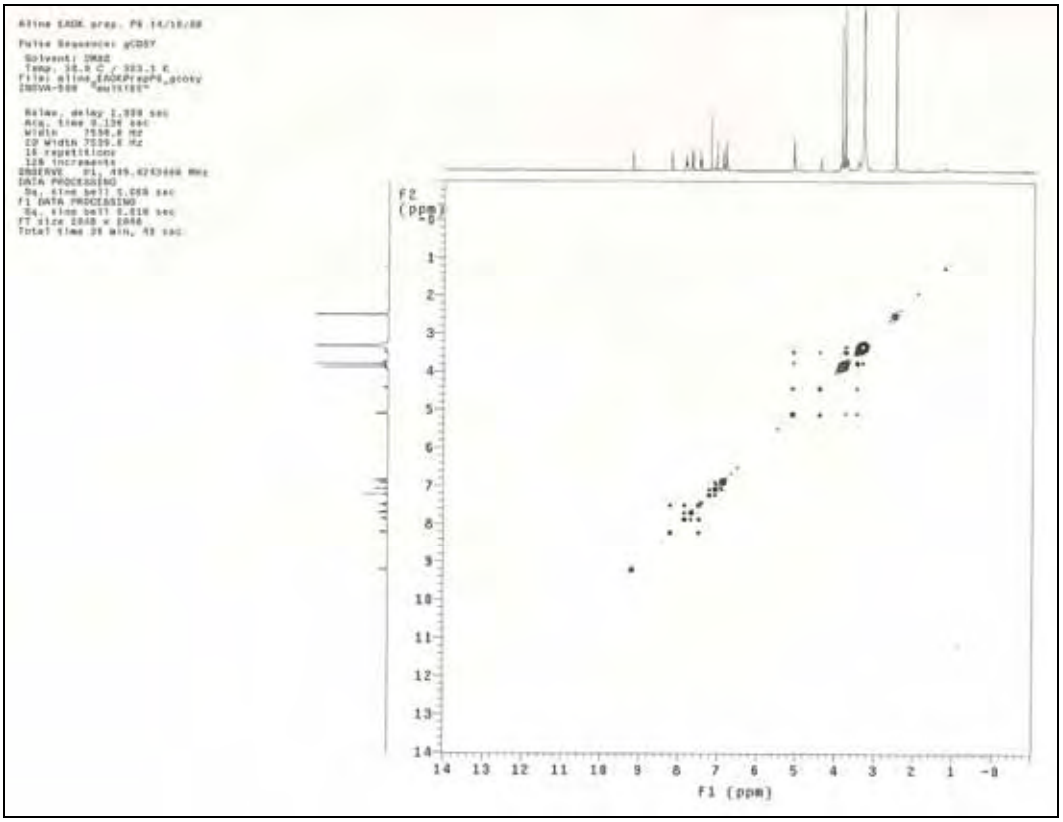
Anexo 72: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



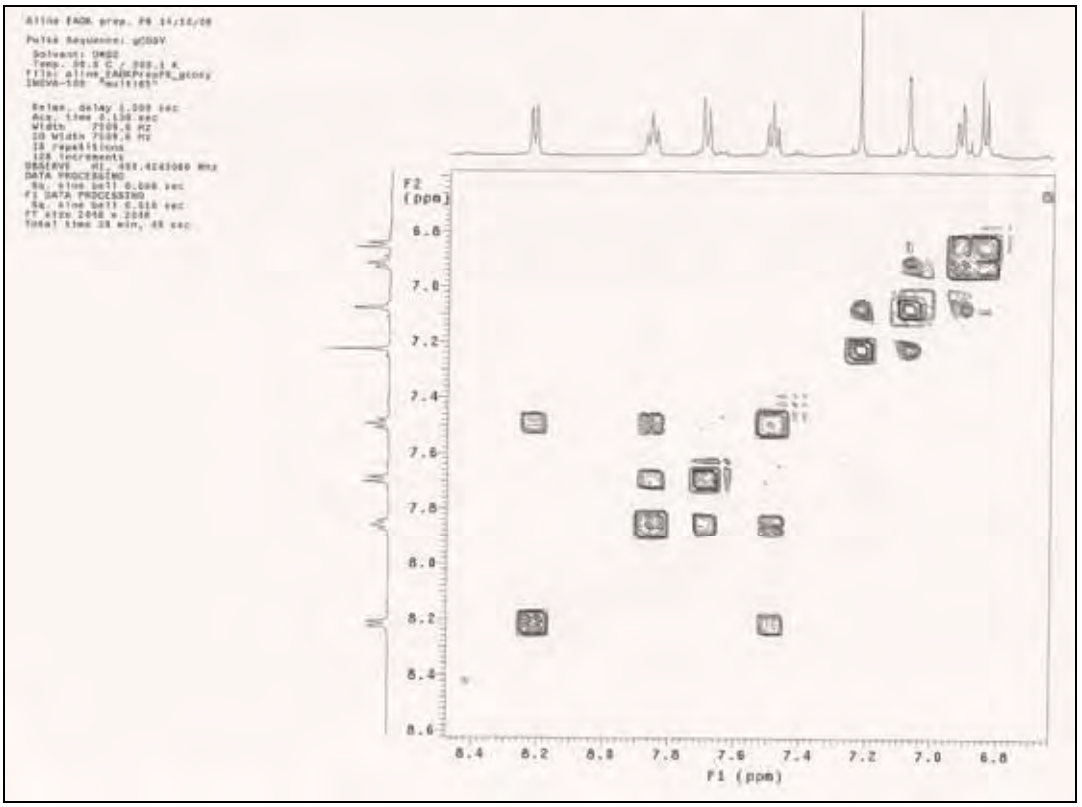
Anexo 73: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



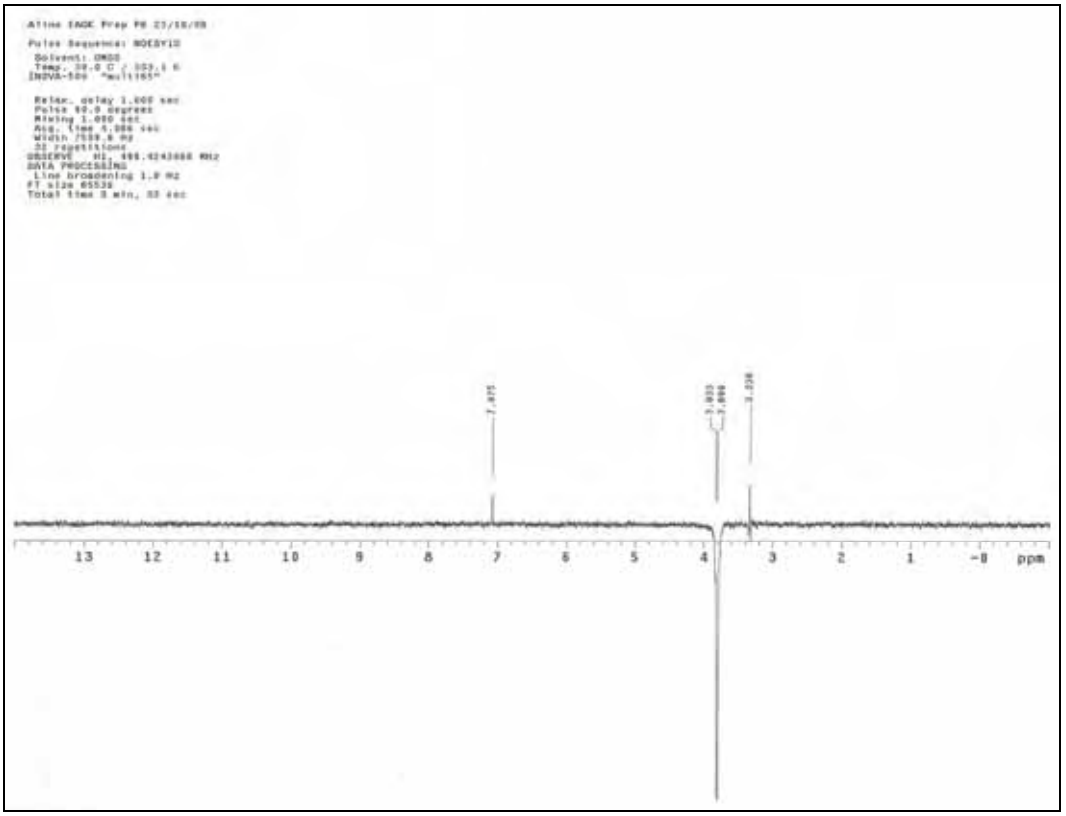
Anexo 74: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



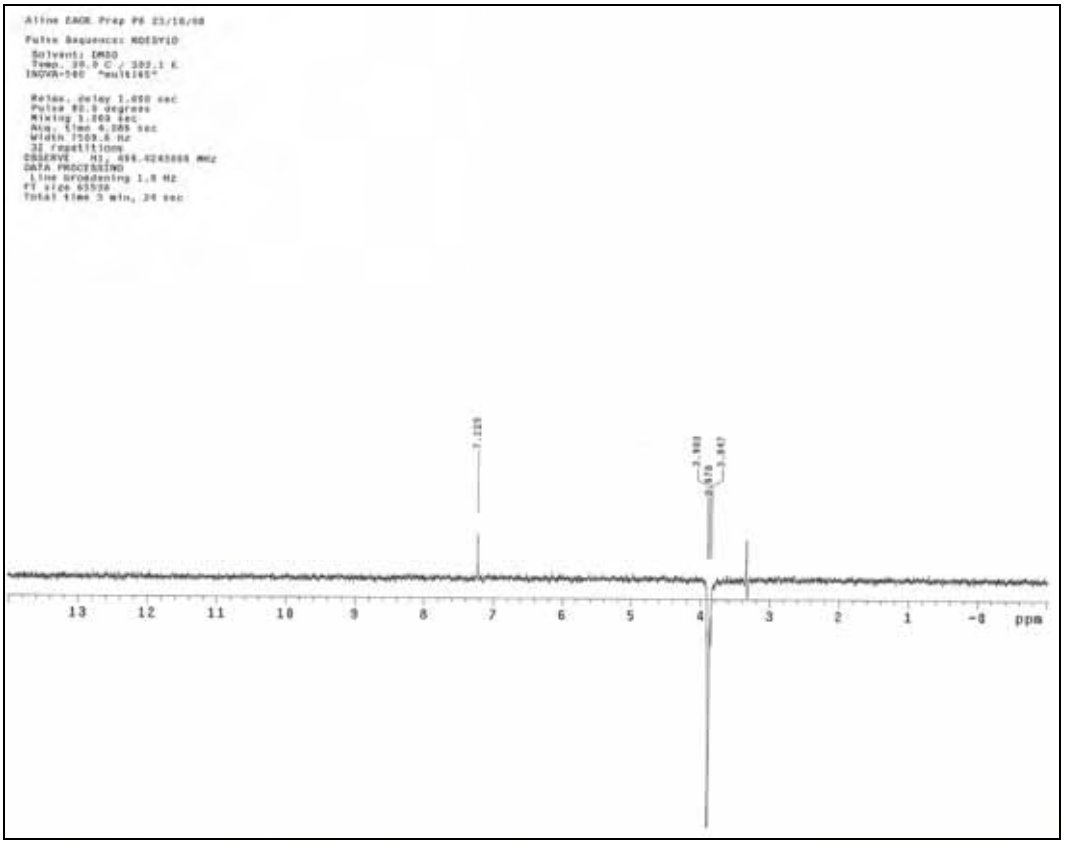
Anexo 75: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



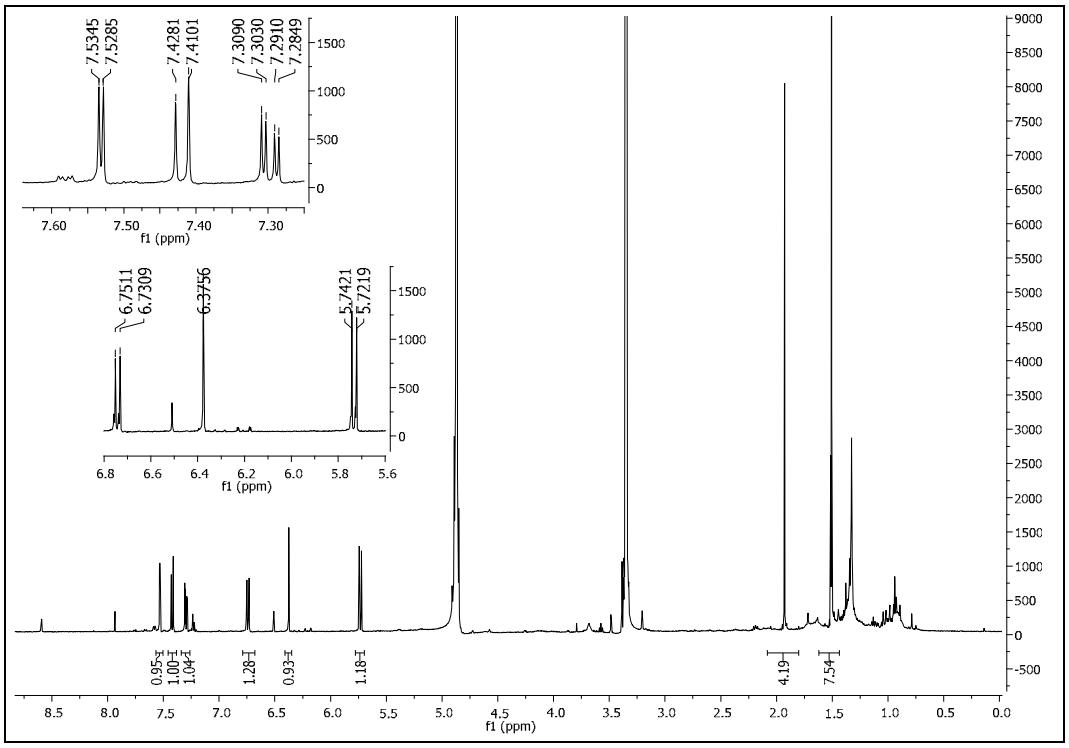
Anexo 76: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



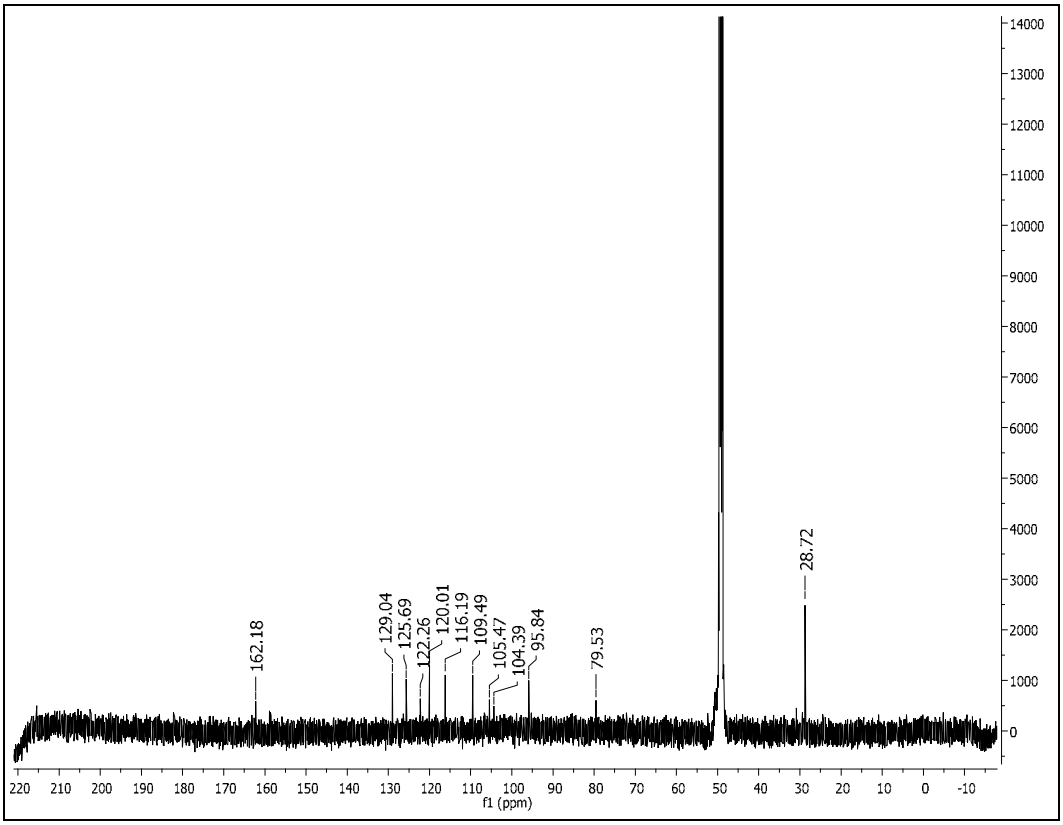
Anexo 77: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,80 da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



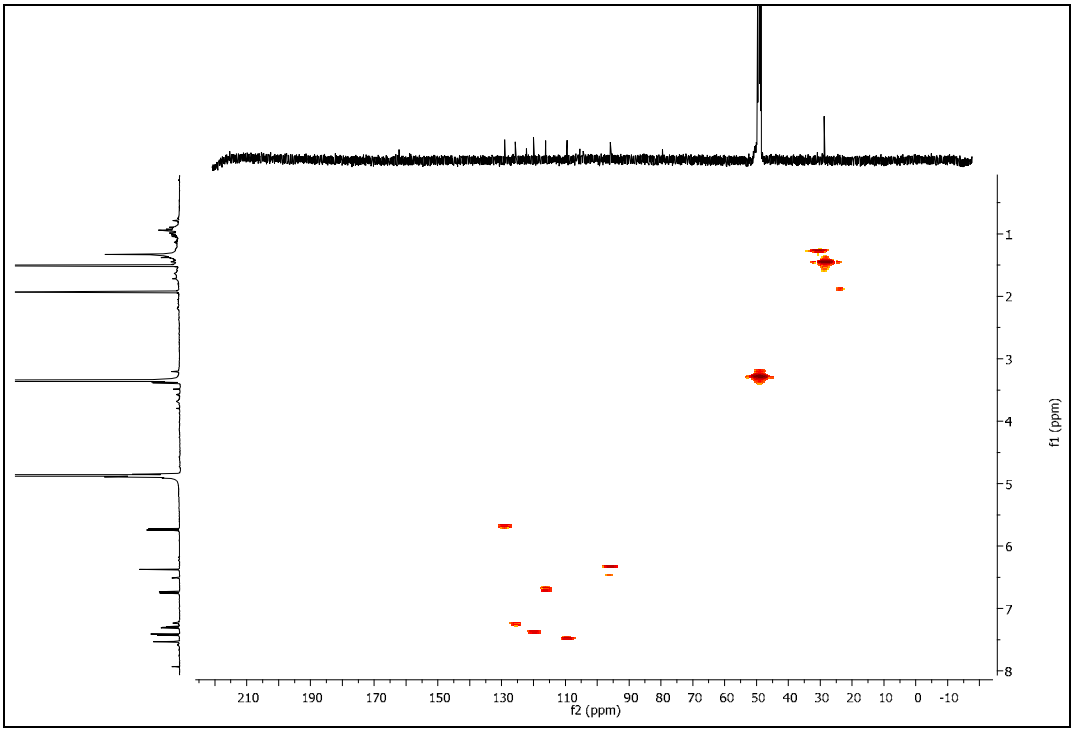
Anexo 78: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,88 da substância **7** (500 MHz – DMSO-d_6).



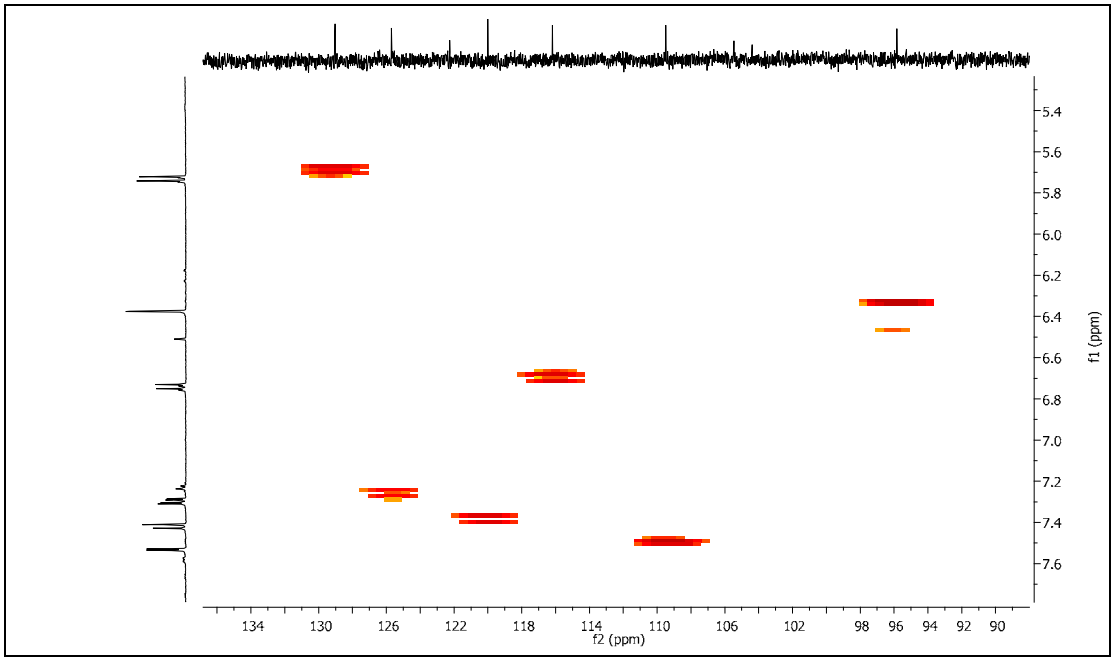
Anexo 79: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **17** (500 MHz – MeOD-d_4).



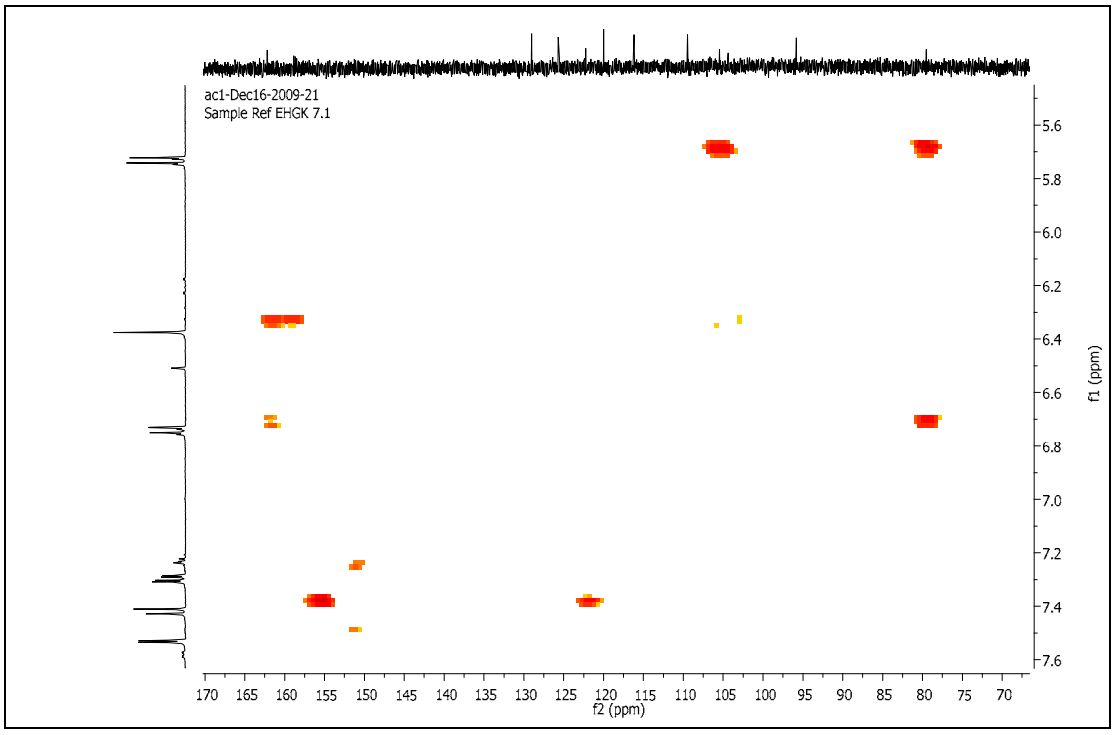
Anexo 80: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **17** (125 MHz – MeOD-d_4).



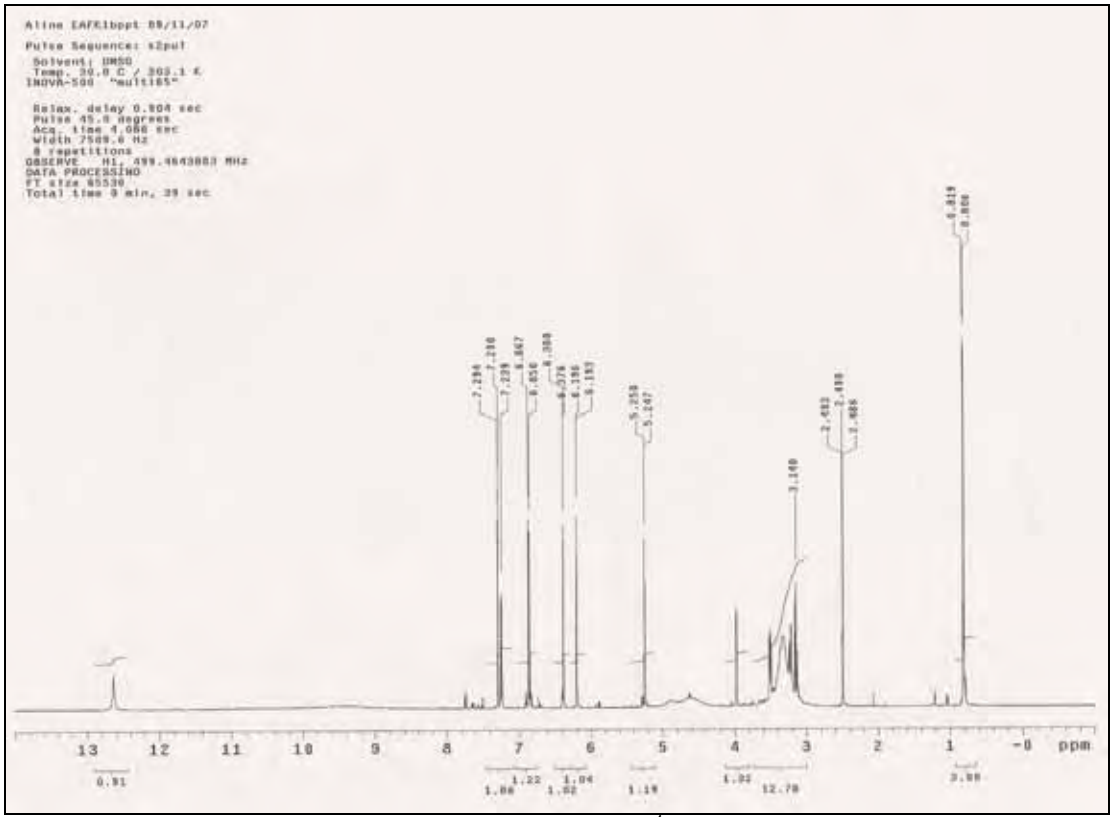
Anexo 81: Mapa de contornos *g*HMQC da substância **17** (500 MHz – MeOD-d_4).



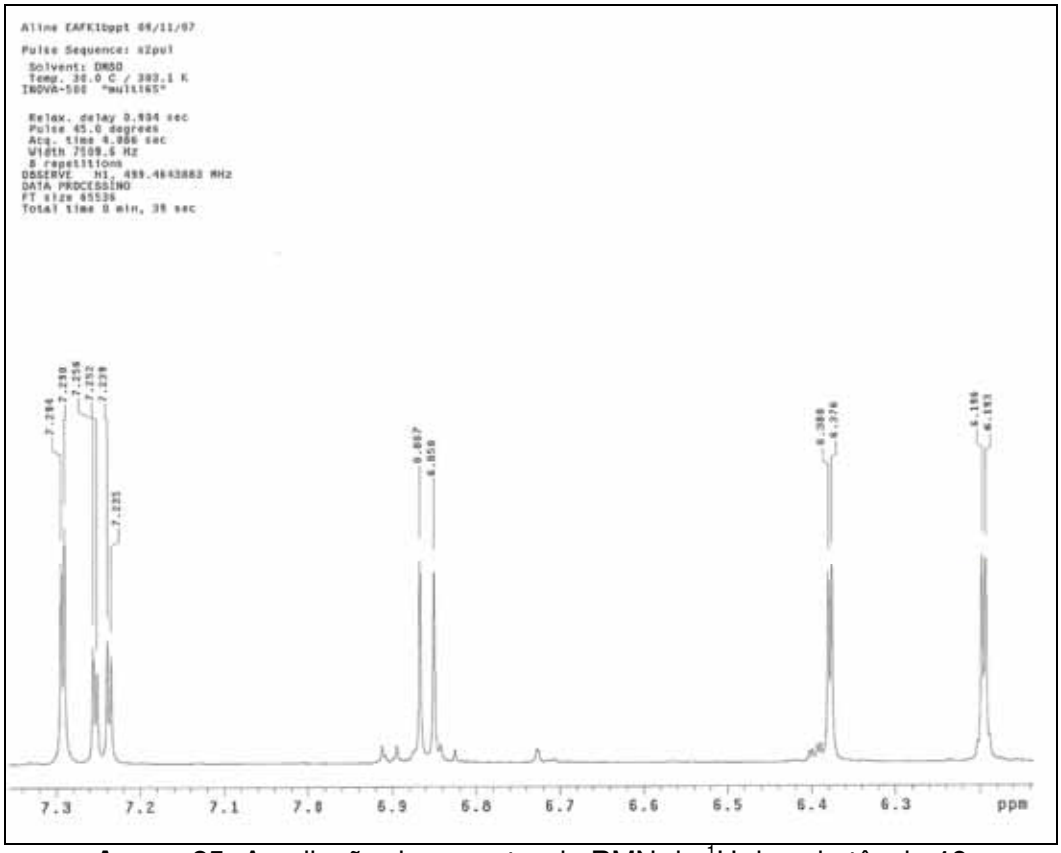
Anexo 82: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **17** (500 MHz – MeOD-d_4).



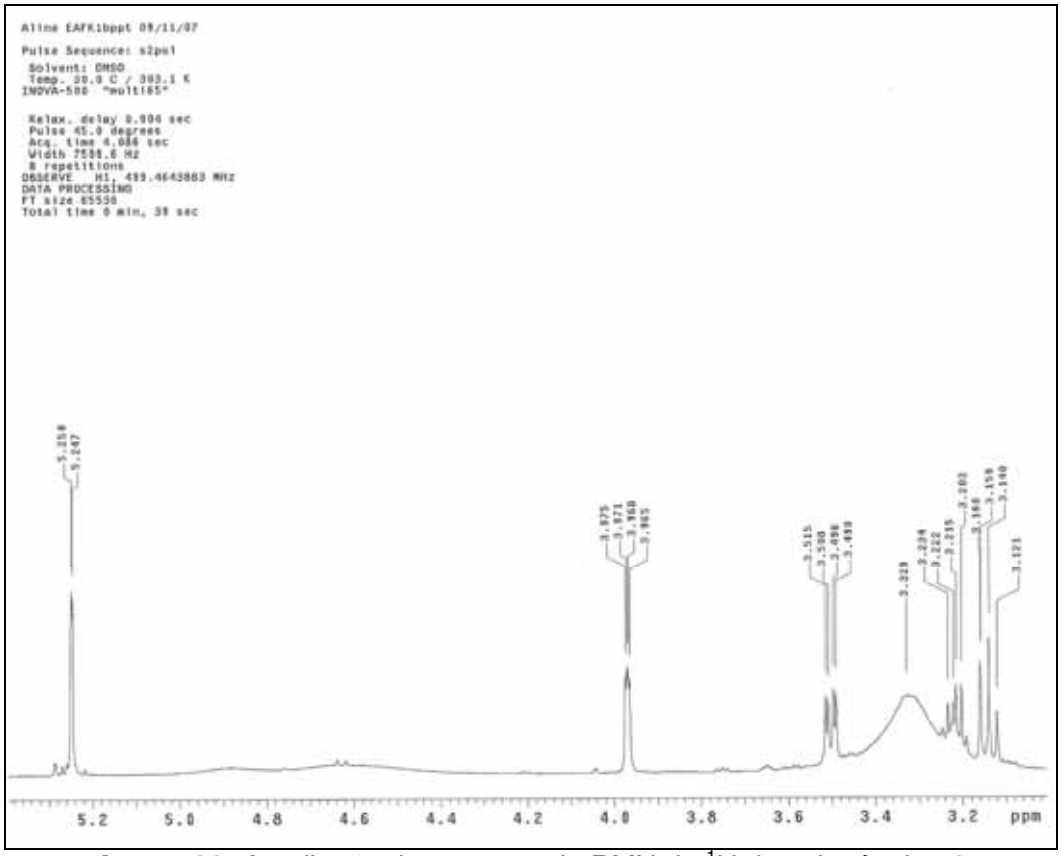
Anexo 83: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **17** (500 MHz – MeOD-d_4).



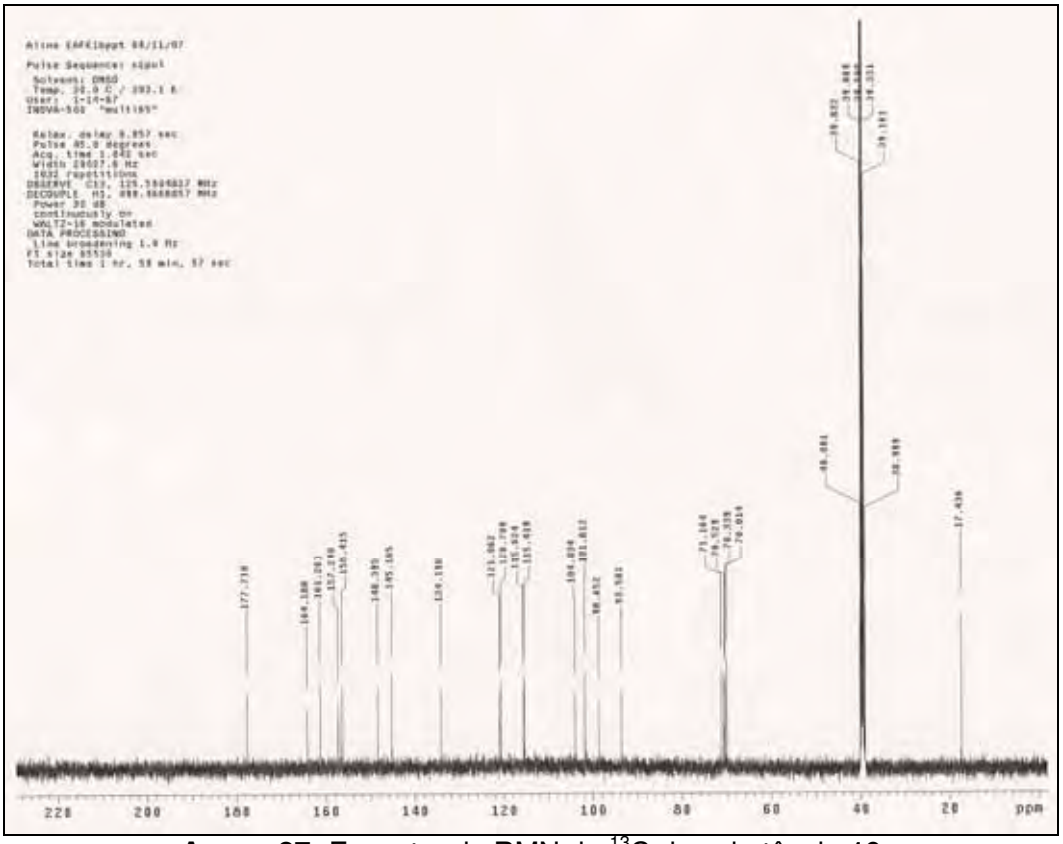
Anexo 84: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



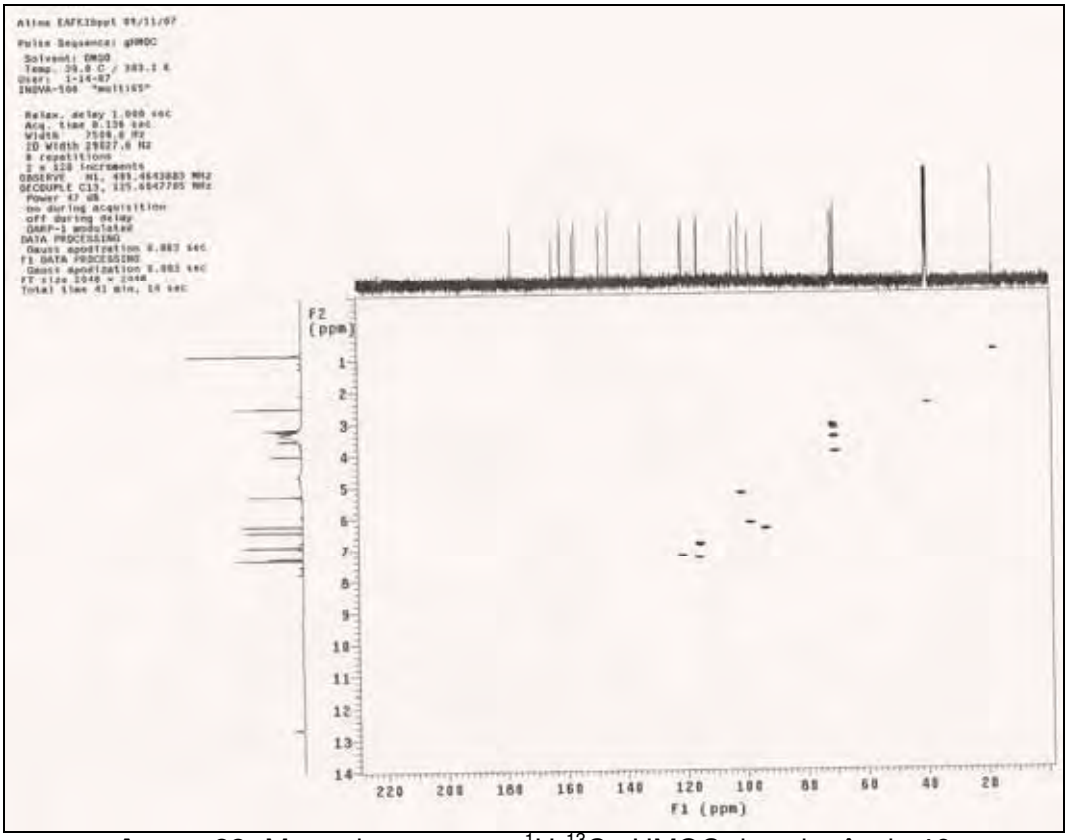
Anexo 85: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



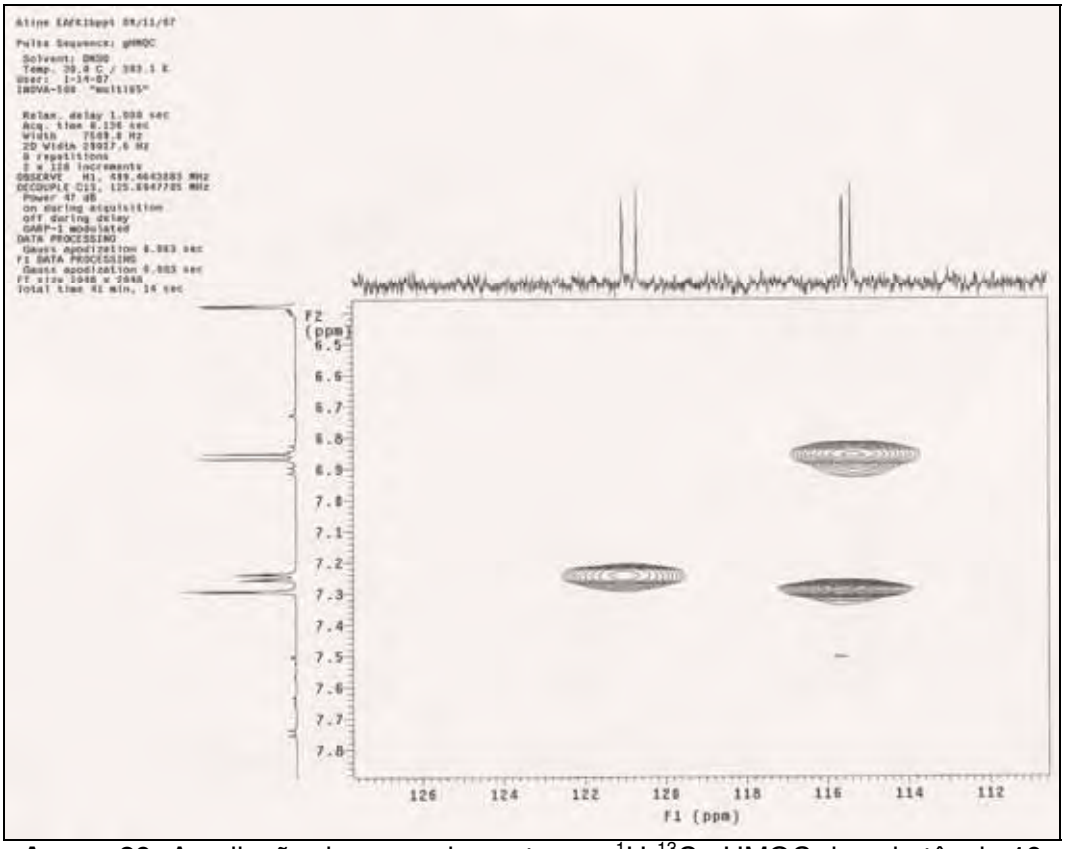
Anexo 86: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



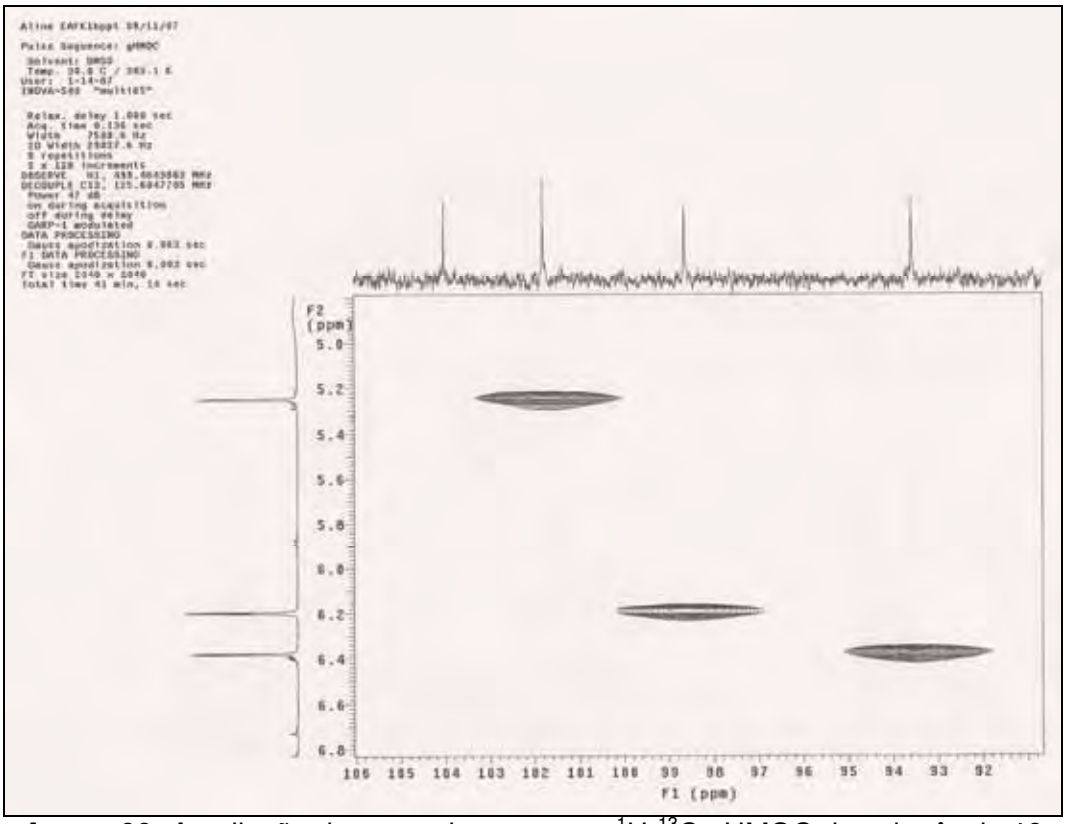
Anexo 87: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **10** (125 MHz – DMSO-d_6).



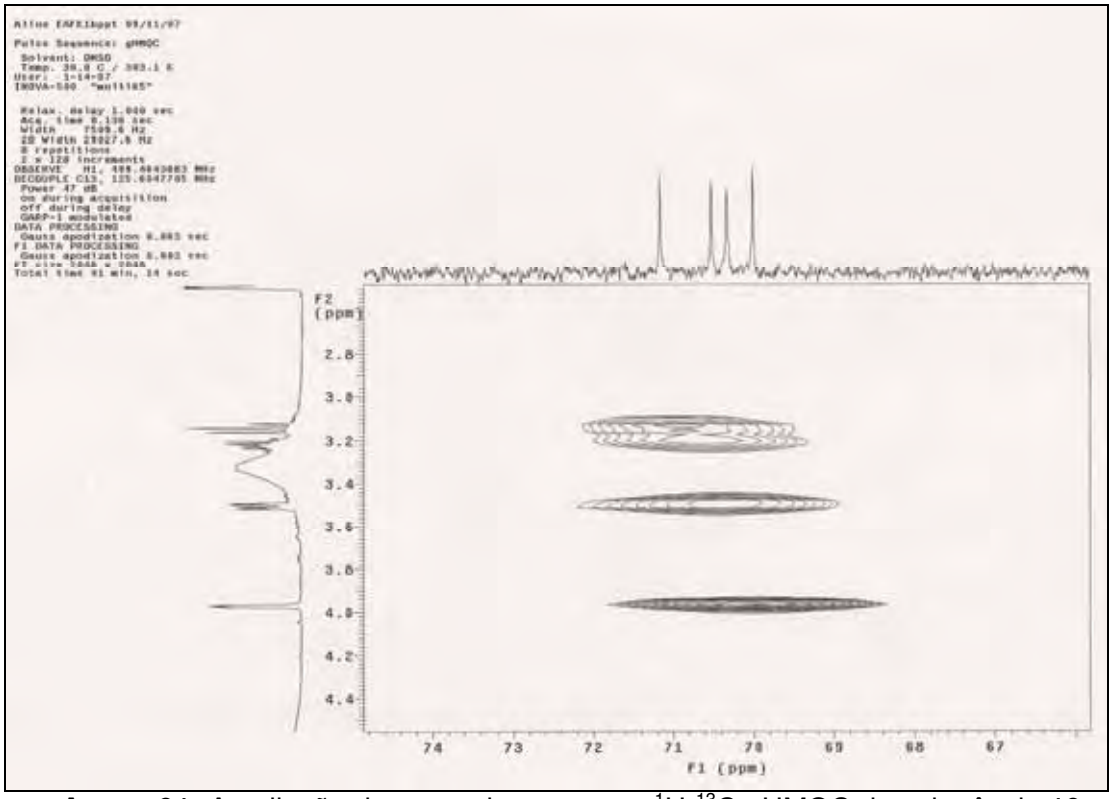
Anexo 88: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



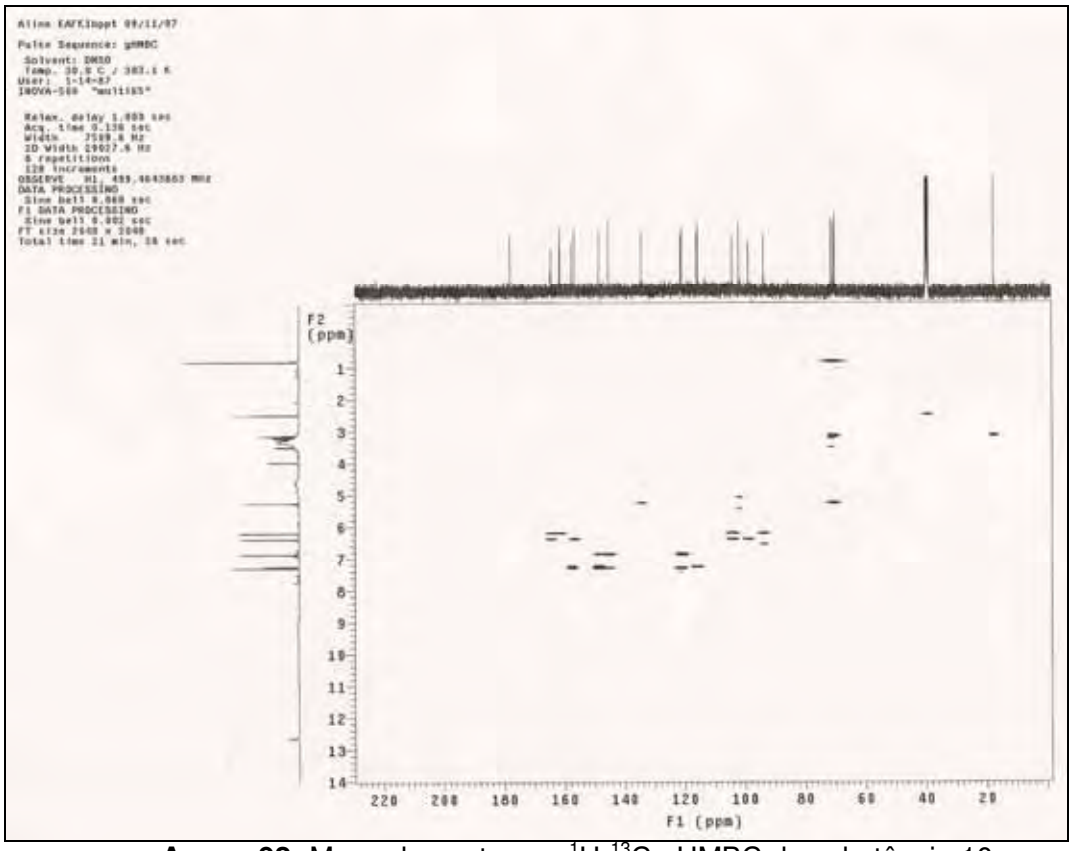
Anexo 89: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



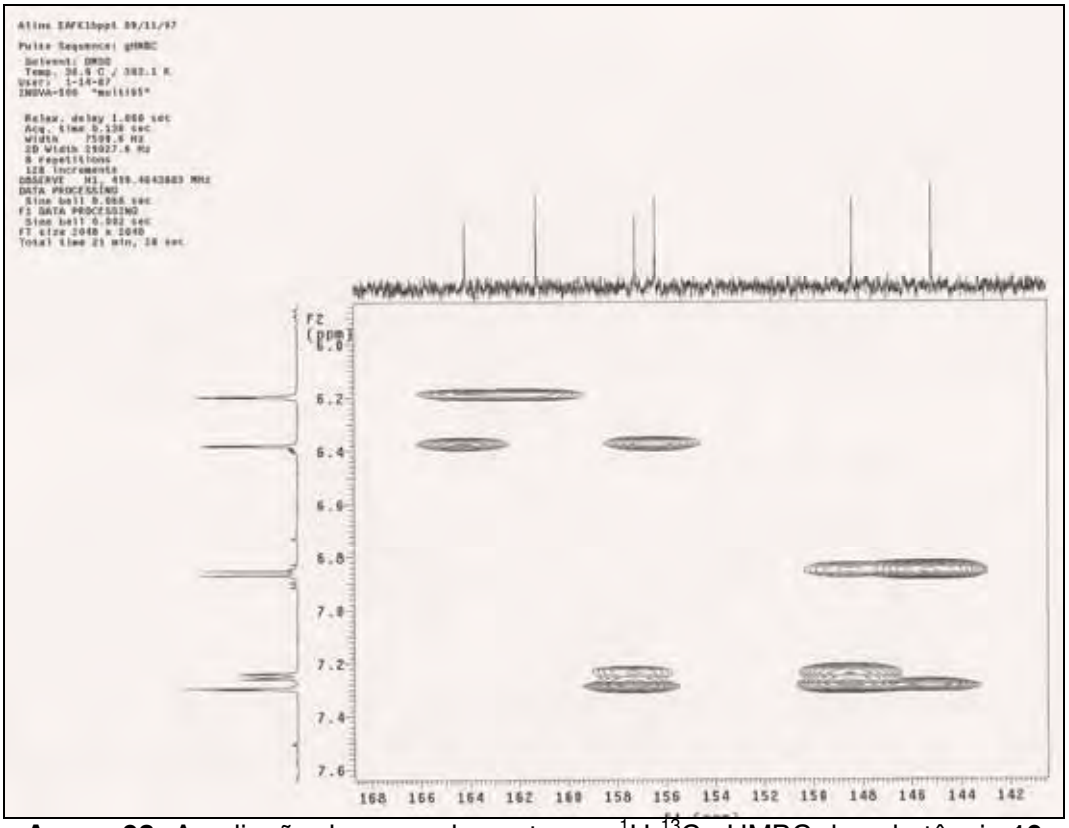
Anexo 90: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



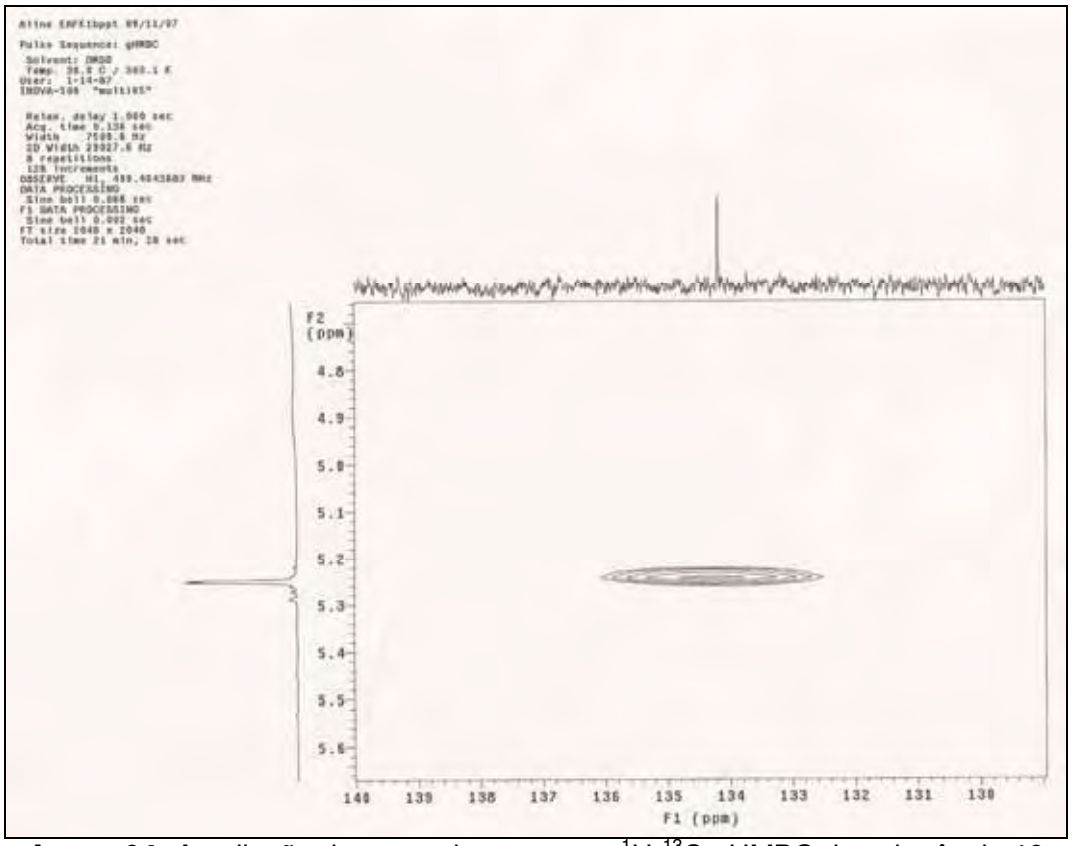
Anexo 91: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



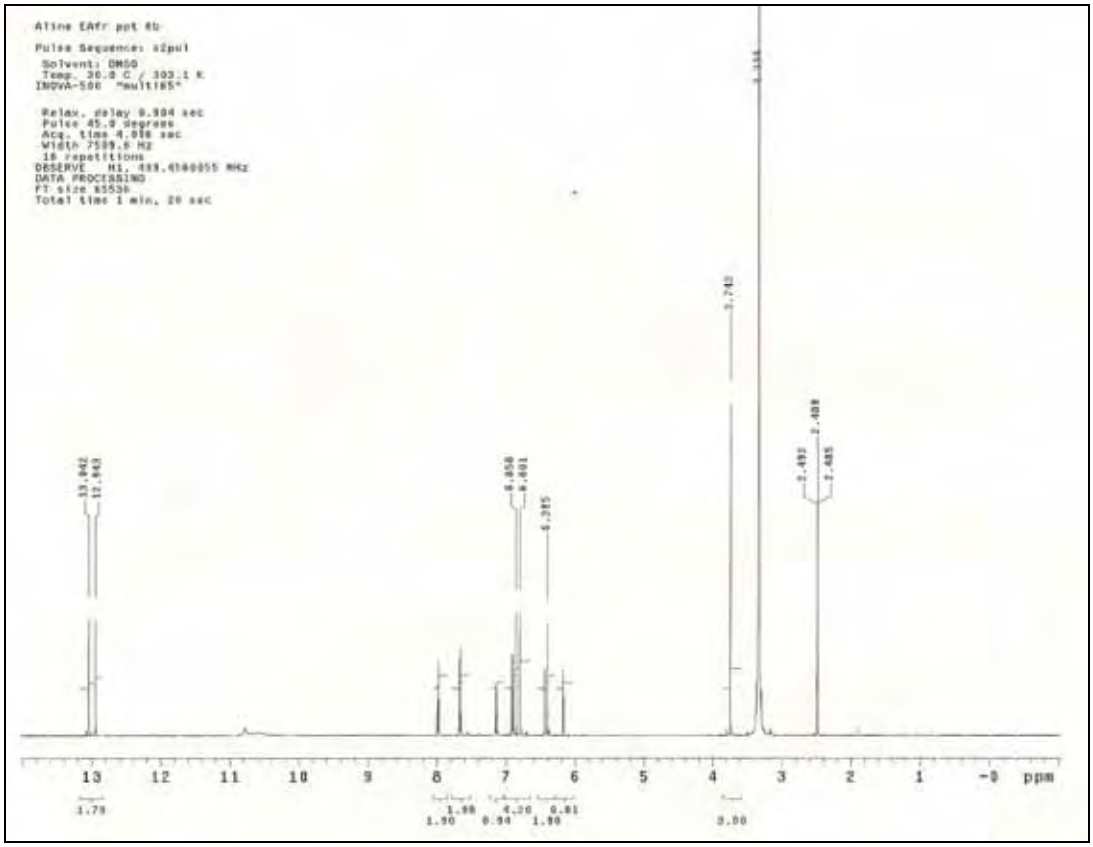
Anexo 92: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância 10 (500 MHz – DMSO-d_6).



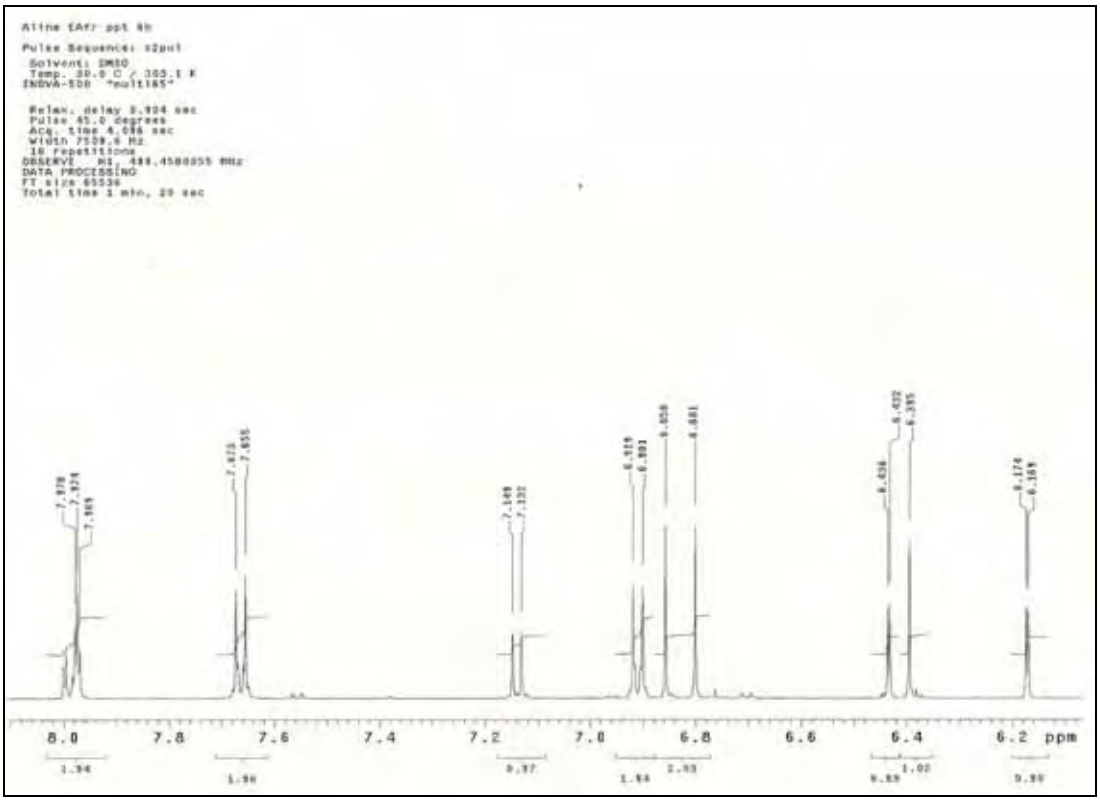
Anexo 93: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



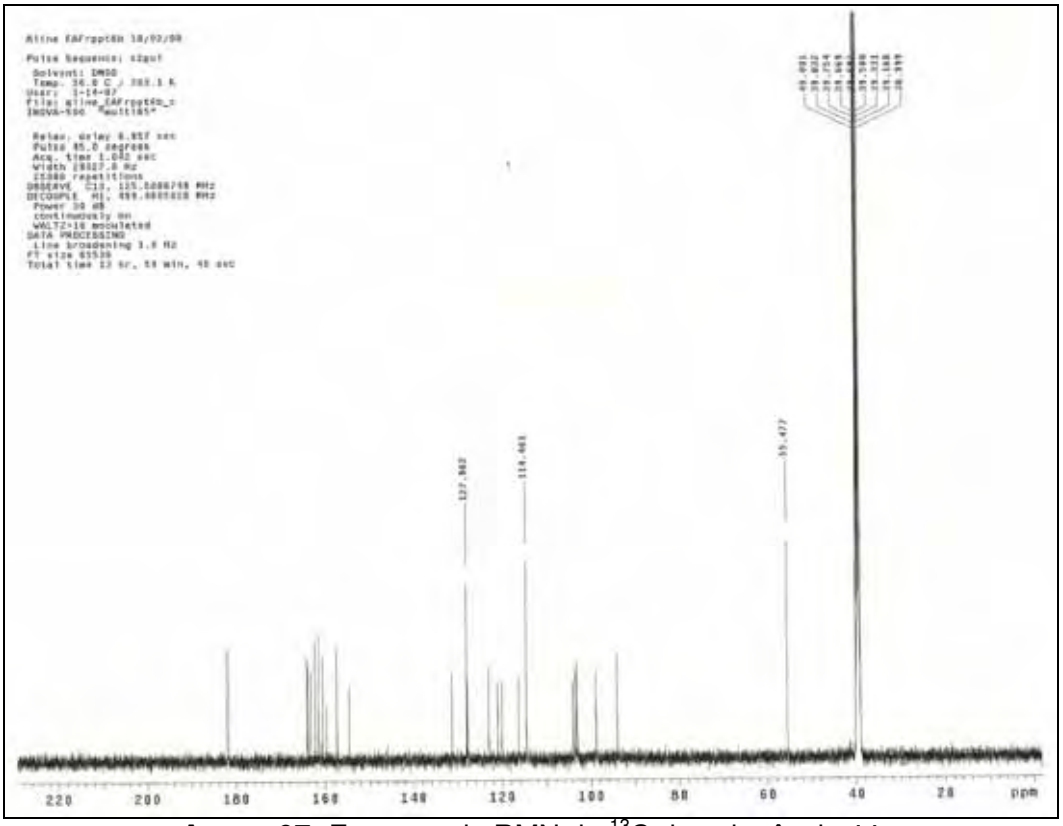
Anexo 94: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **10** (500 MHz – DMSO-d_6).



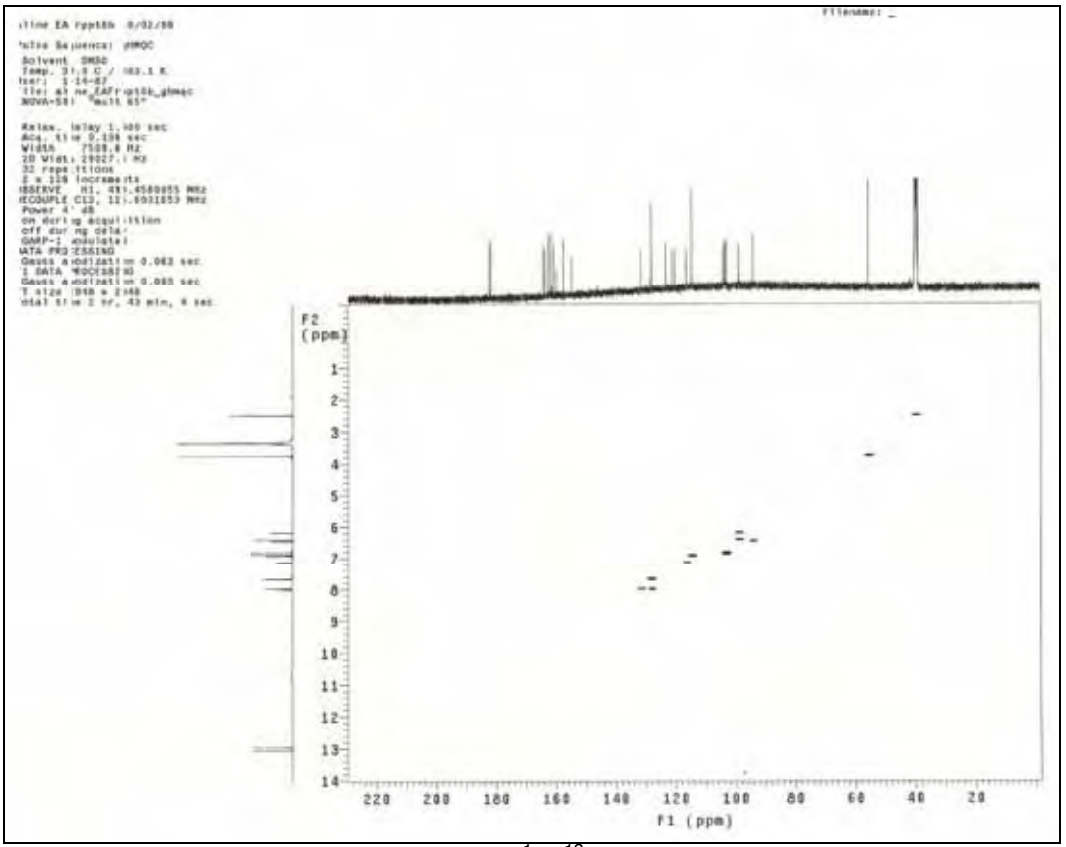
Anexo 95: Espectro de RMN de ^{1}H da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



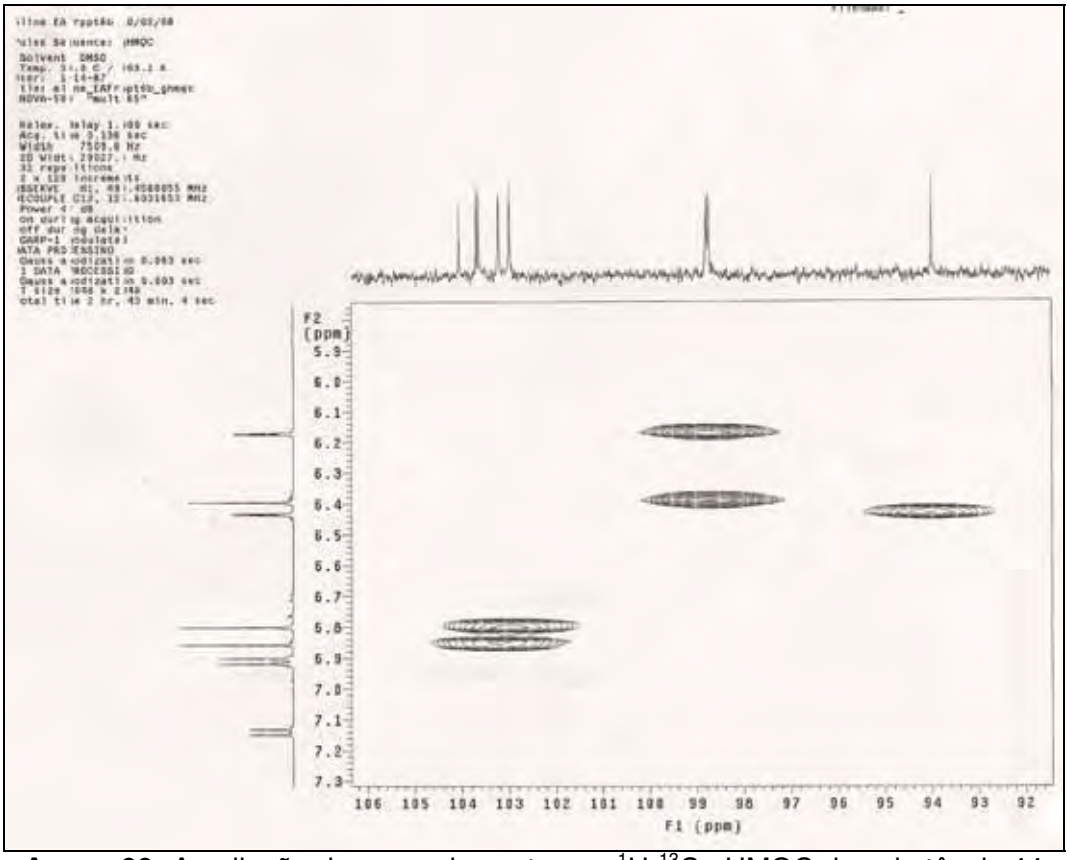
Anexo 96: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



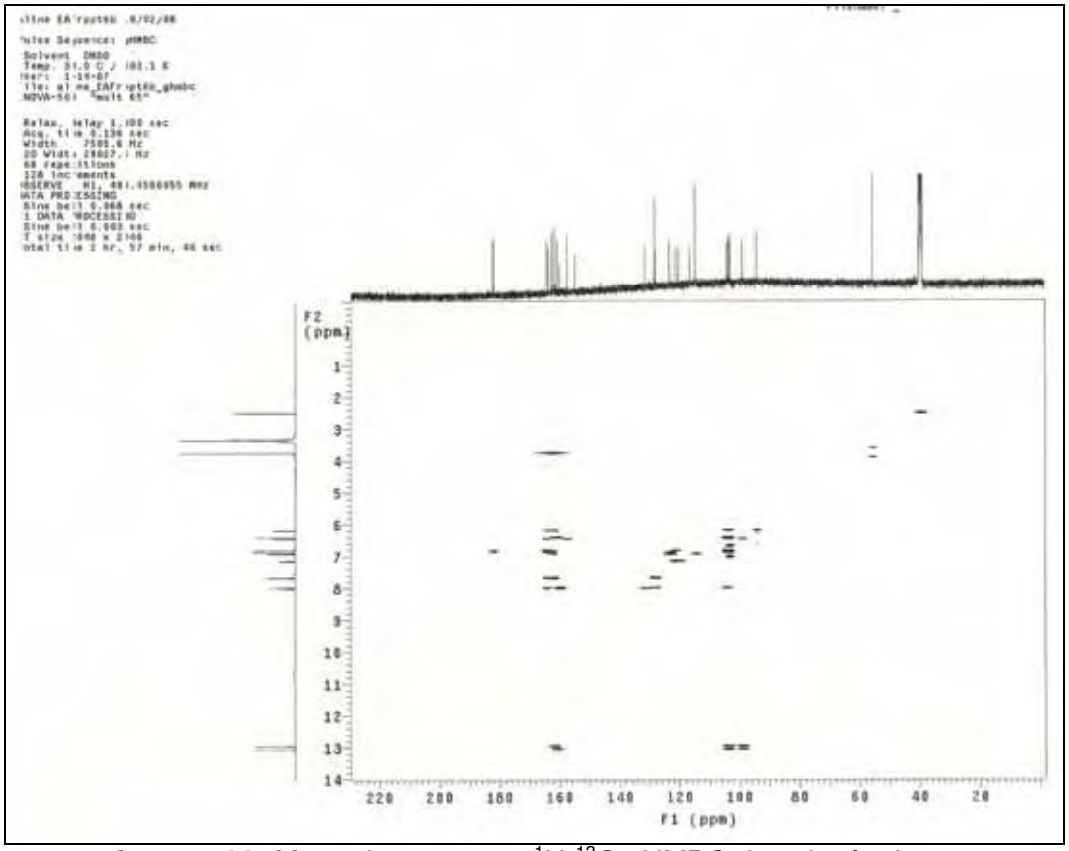
Anexo 97: Espectro de RMN de ^{13}C da substância **11** (125 MHz – DMSO-d_6).



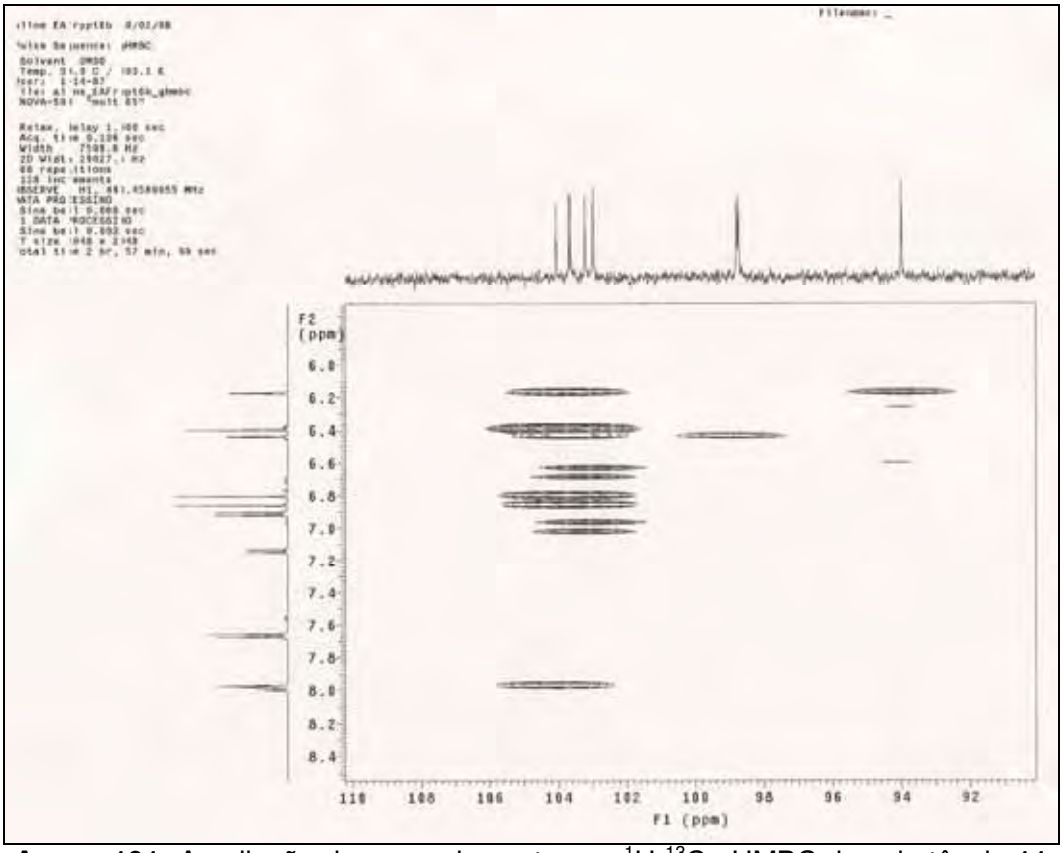
Anexo 98: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



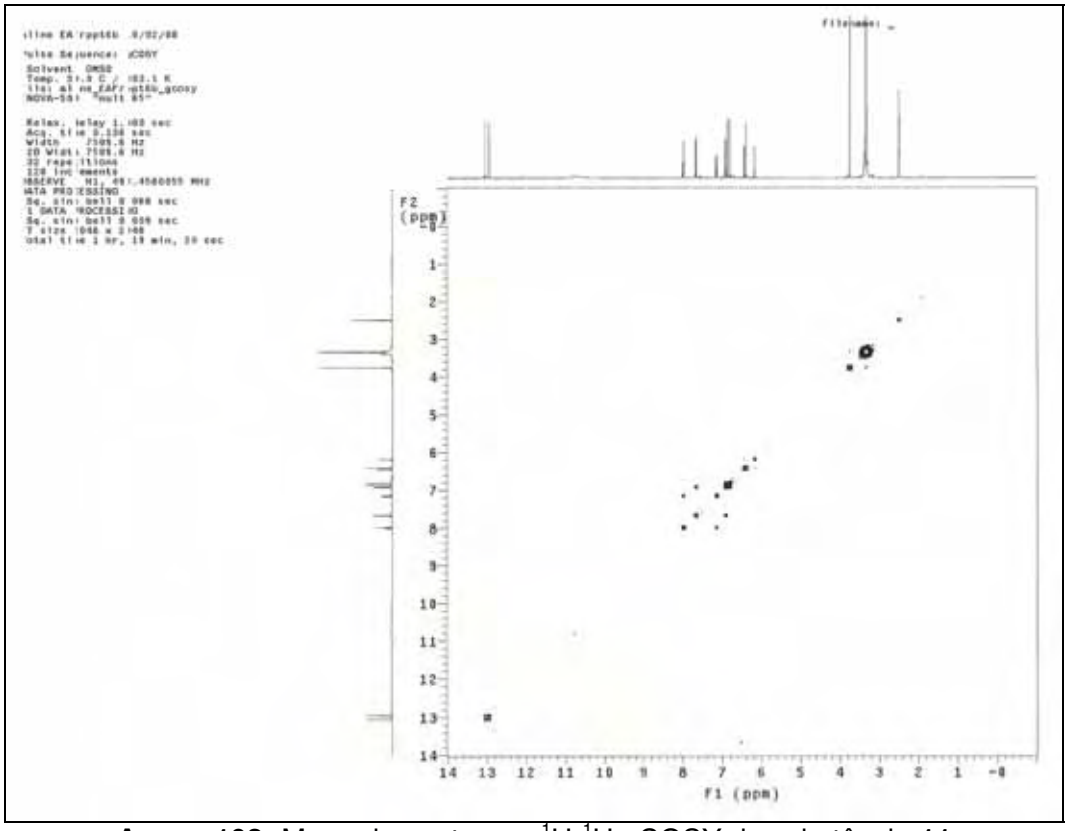
Anexo 99: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



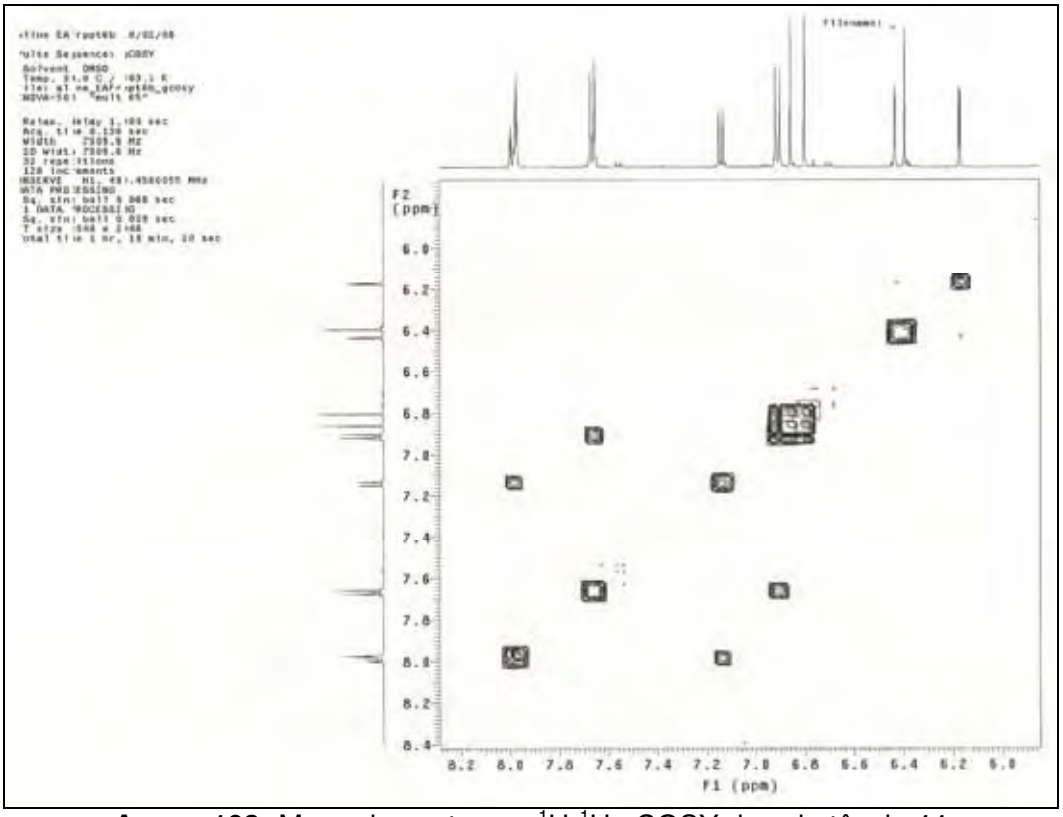
Anexo 100: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



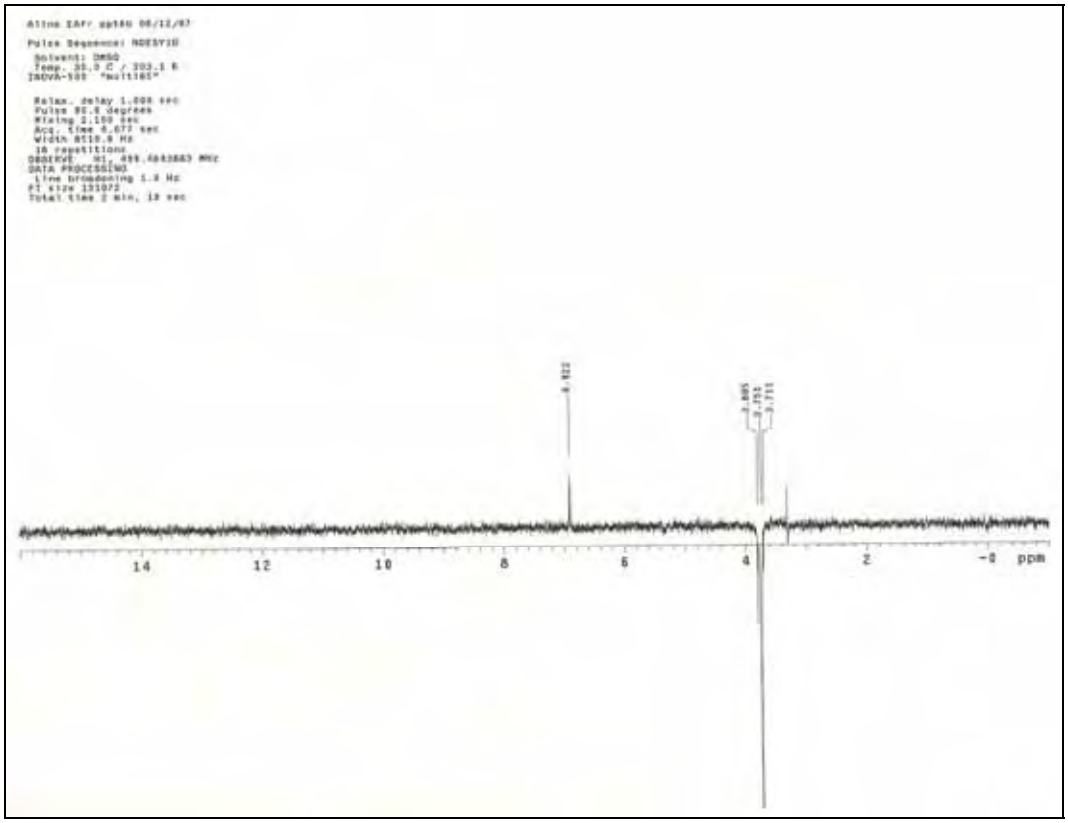
Anexo 101: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



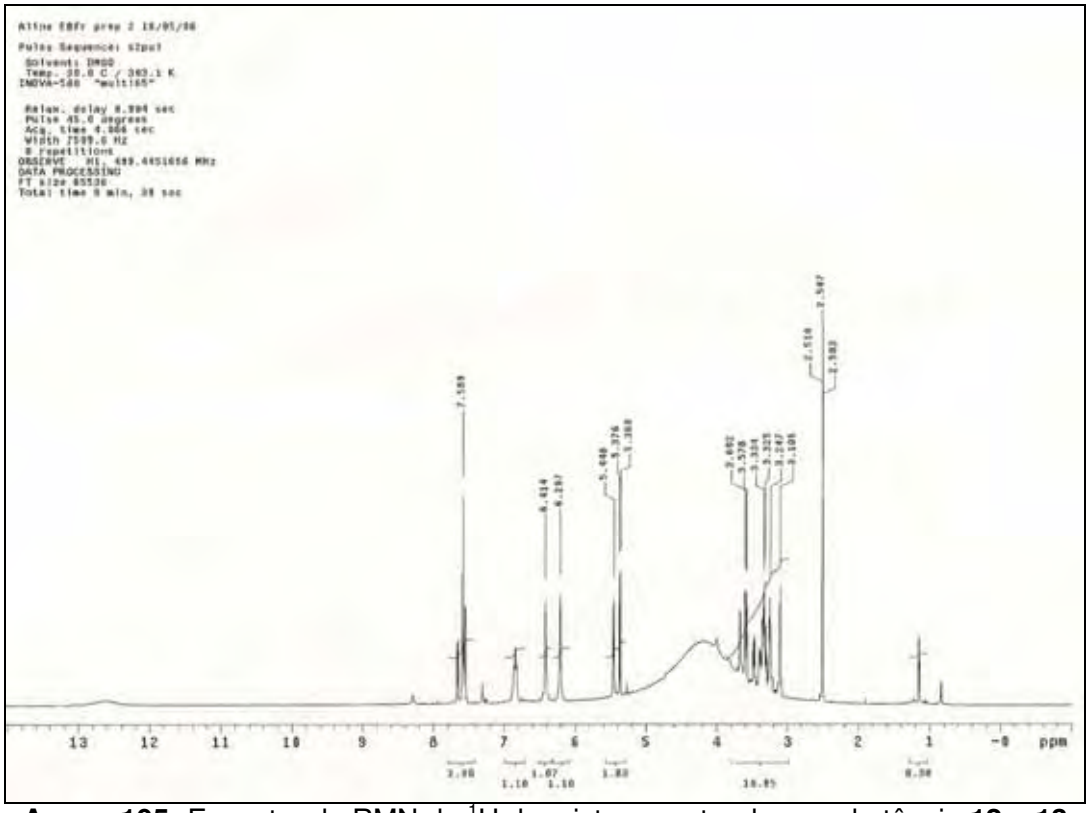
Anexo 102: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



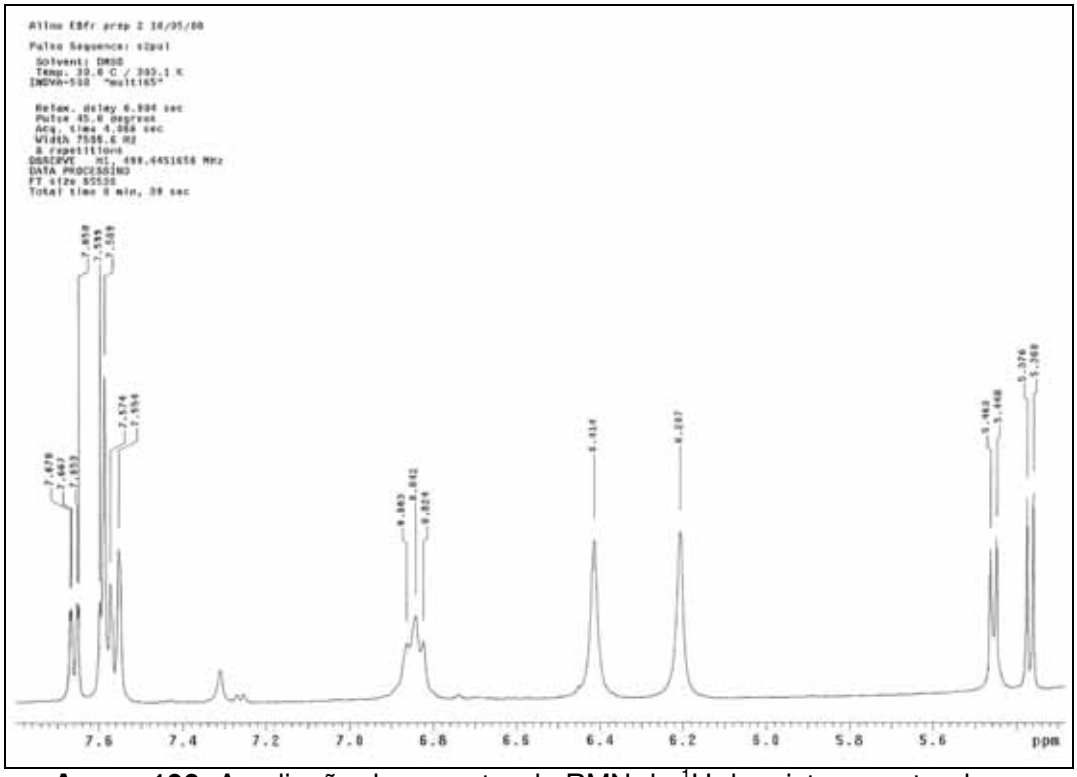
Anexo 103: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



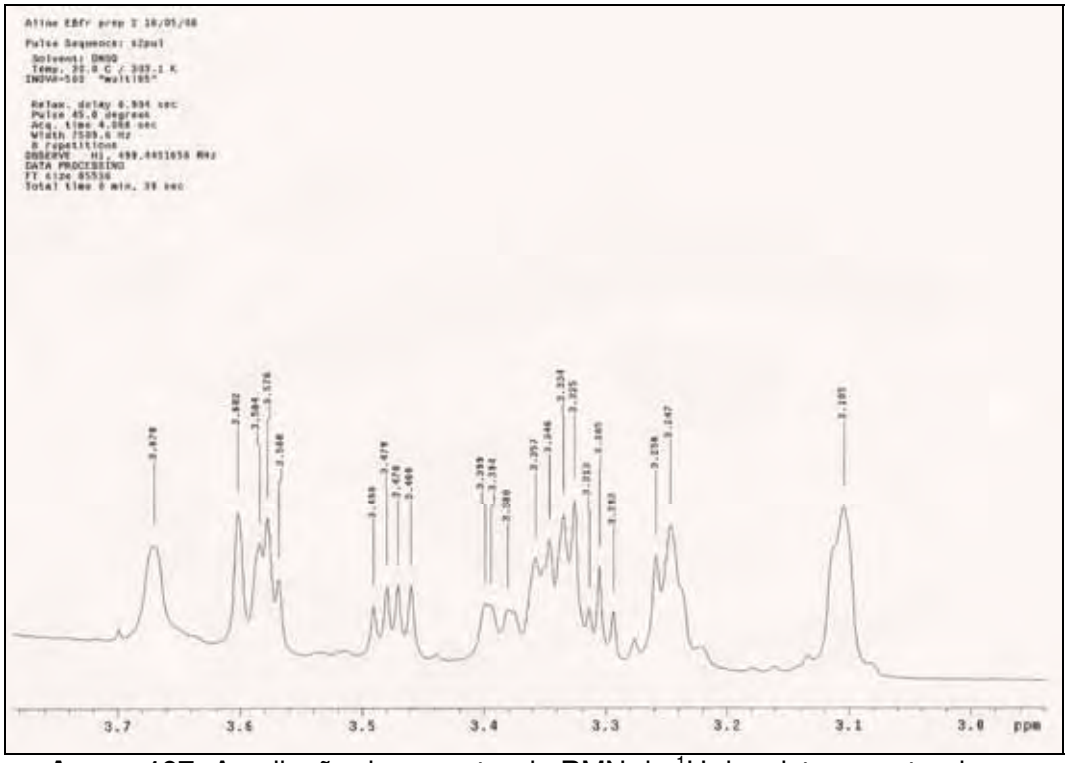
Anexo 104: Espectro de NOESY 1D, irradiando o sinal em δ_H 3,74 da substância **11** (500 MHz – DMSO-d_6).



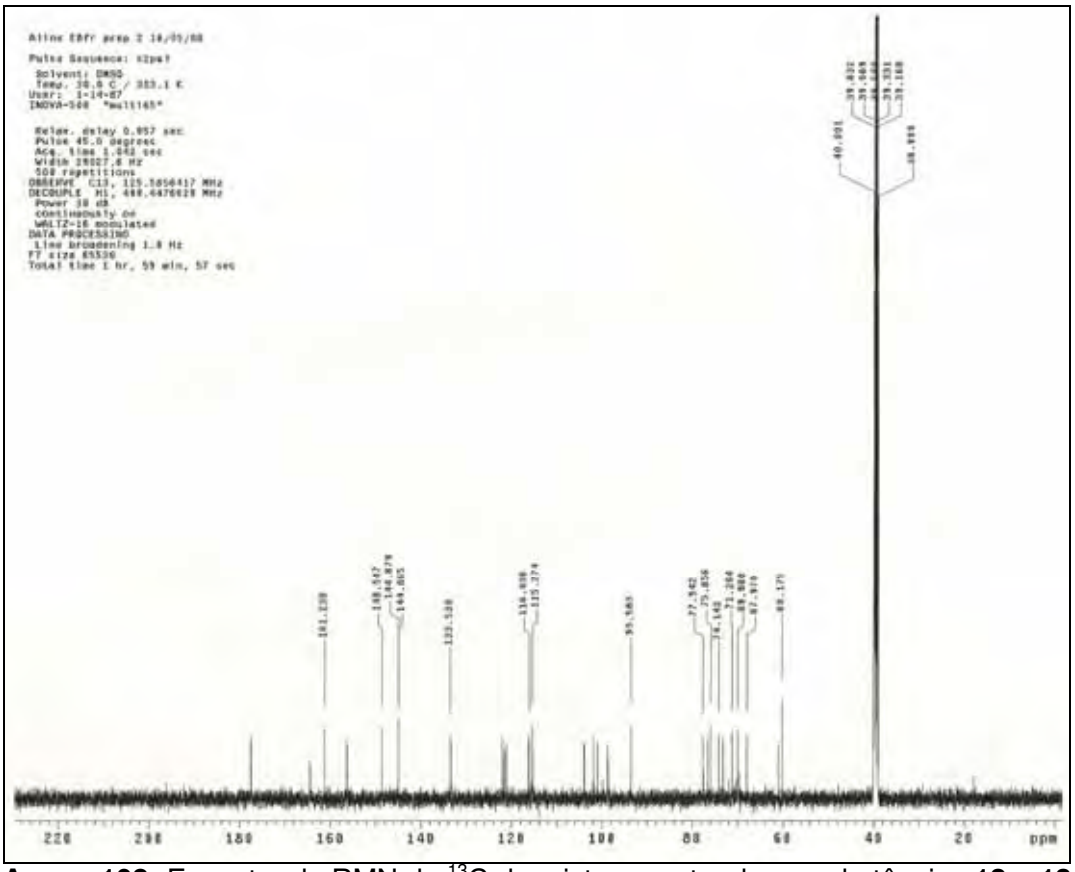
Anexo 105: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substância **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



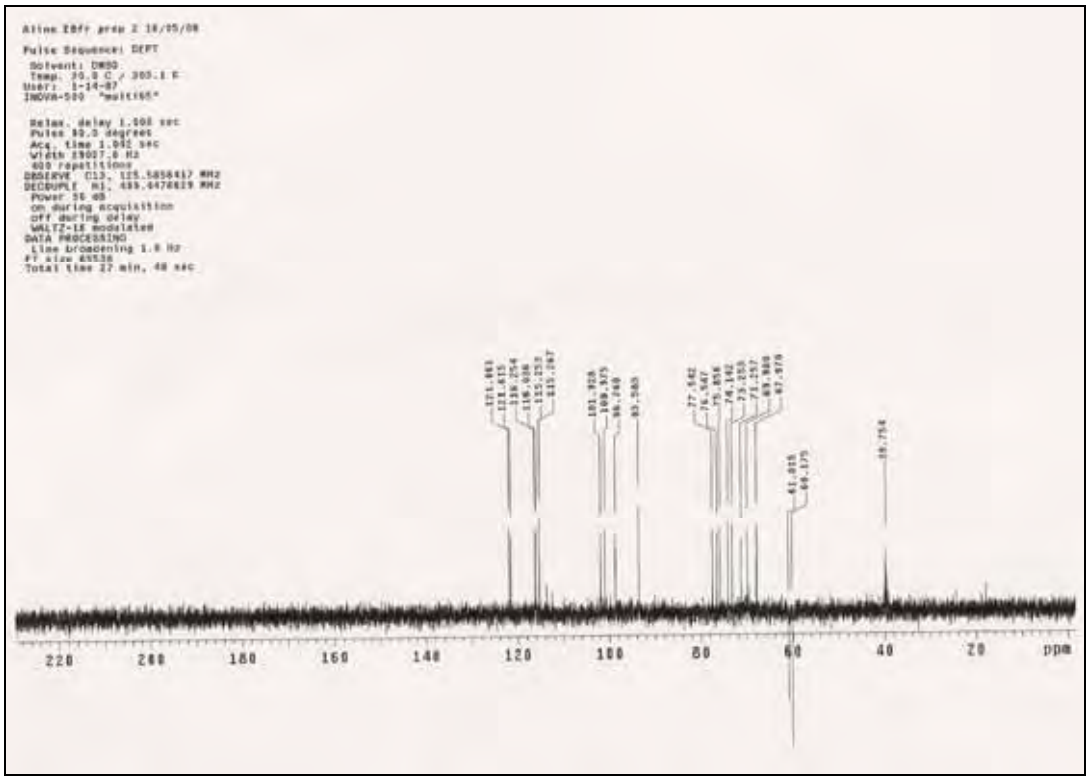
Anexo 106: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



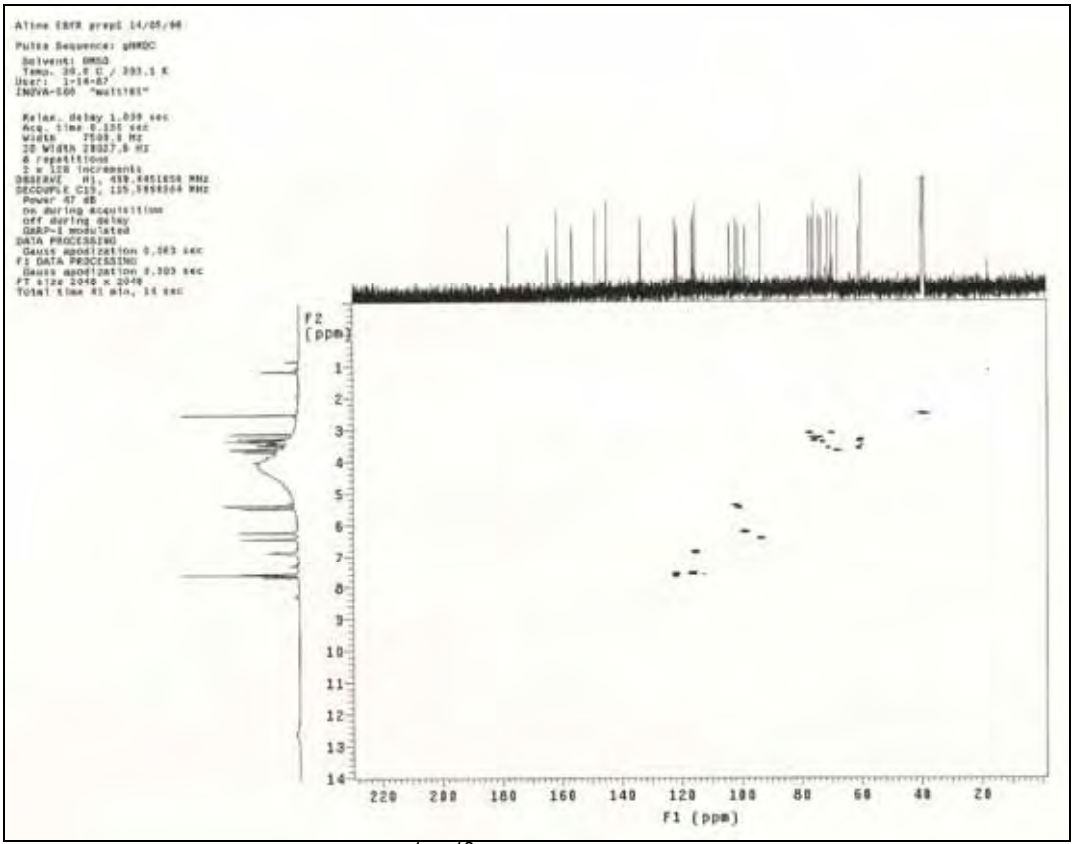
Anexo 107: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



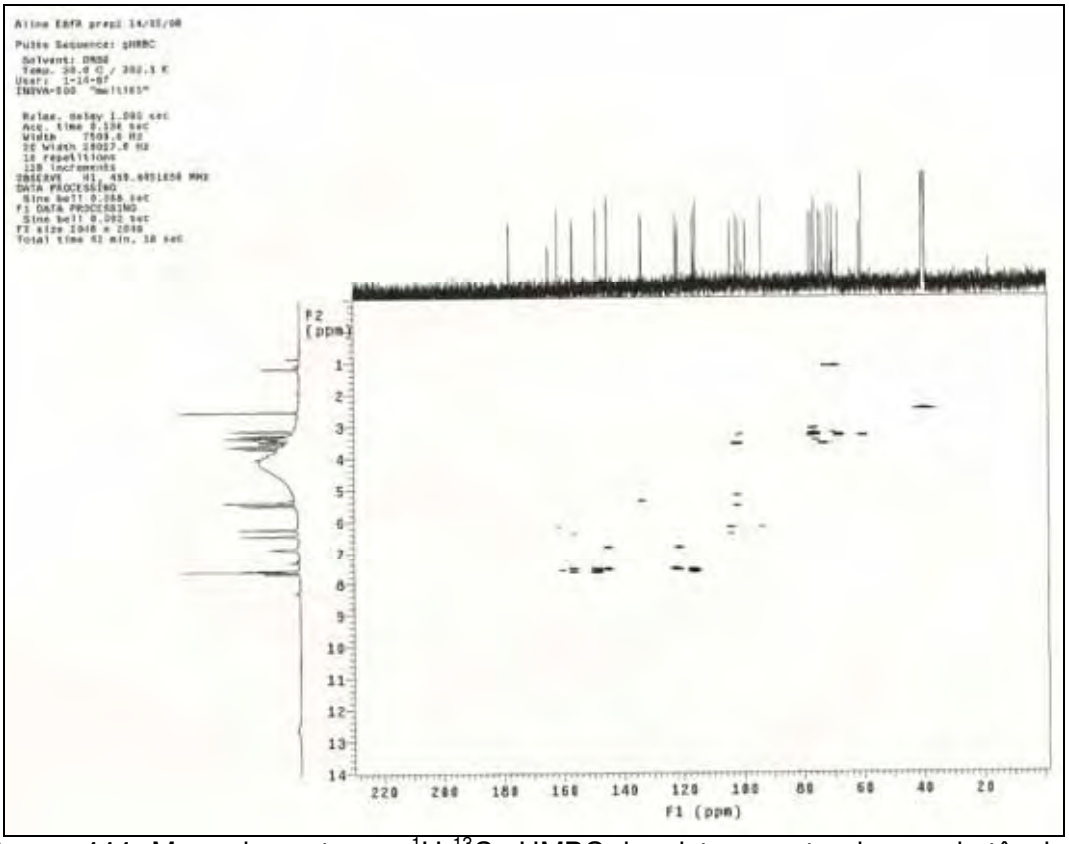
Anexo 108: Espectro de RMN de ^{13}C da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (125 MHz – DMSO-d_6).



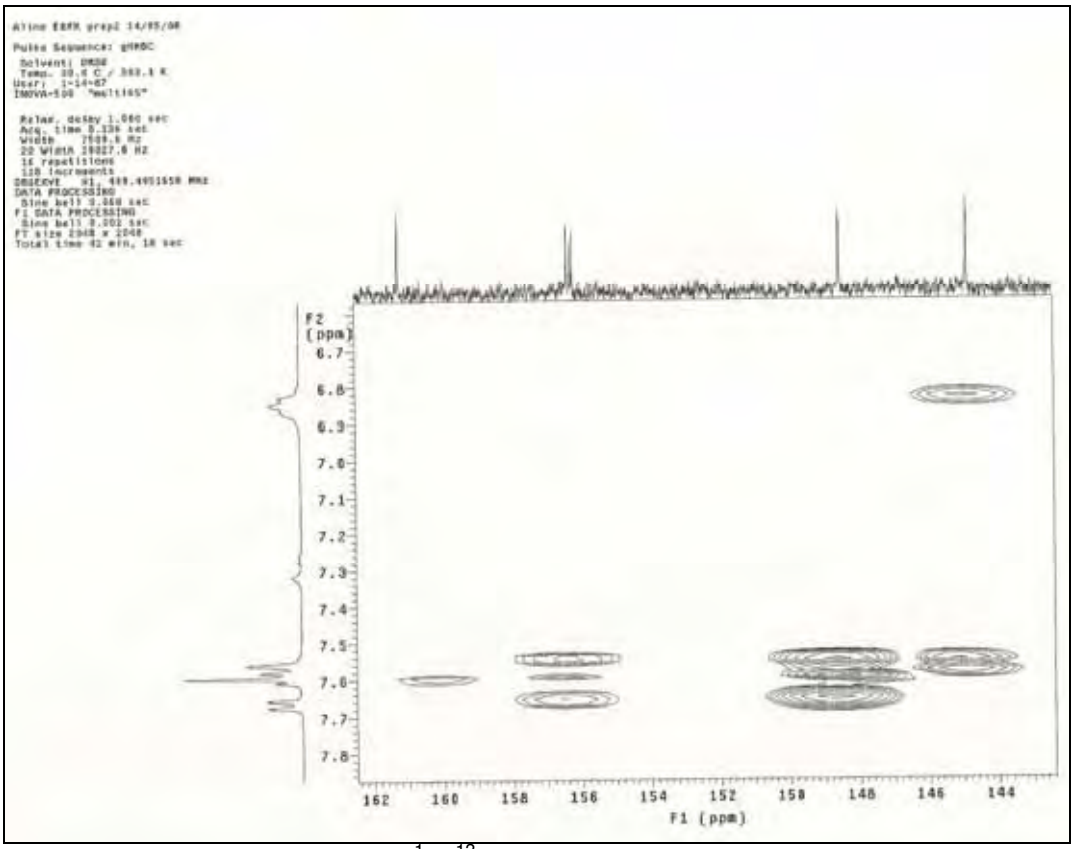
Anexo 109: Espectro de DEPT 135º da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (125 MHz – DMSO-d_6).



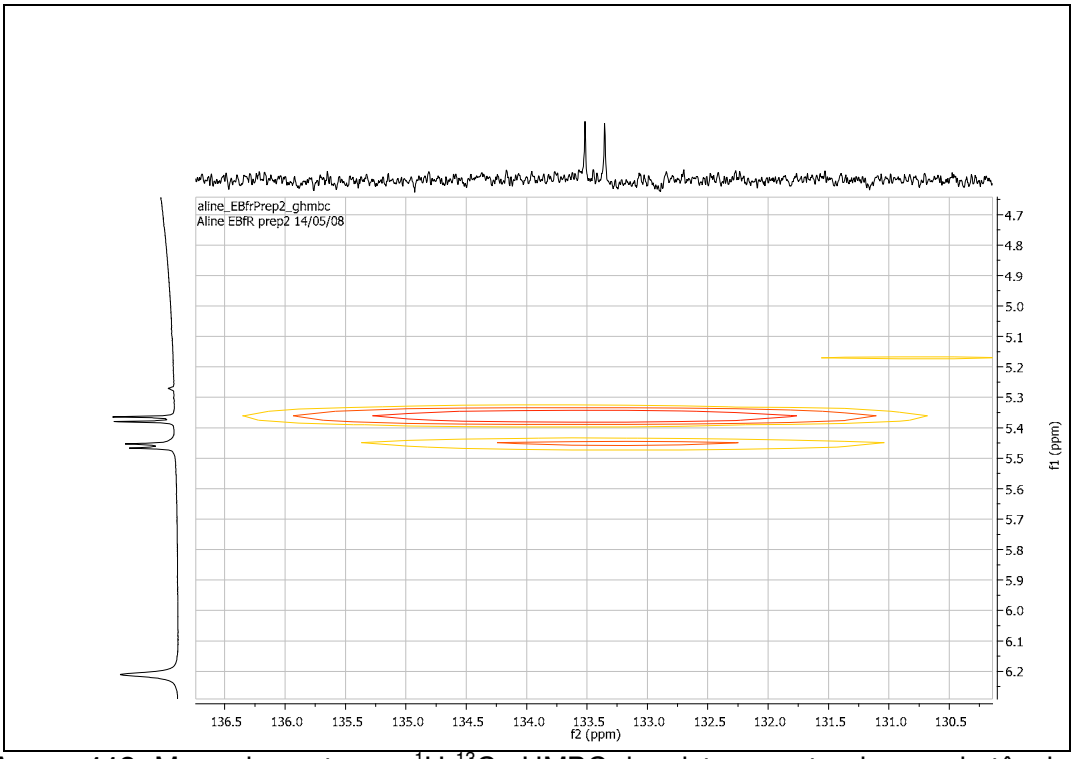
Anexo 110: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMQC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



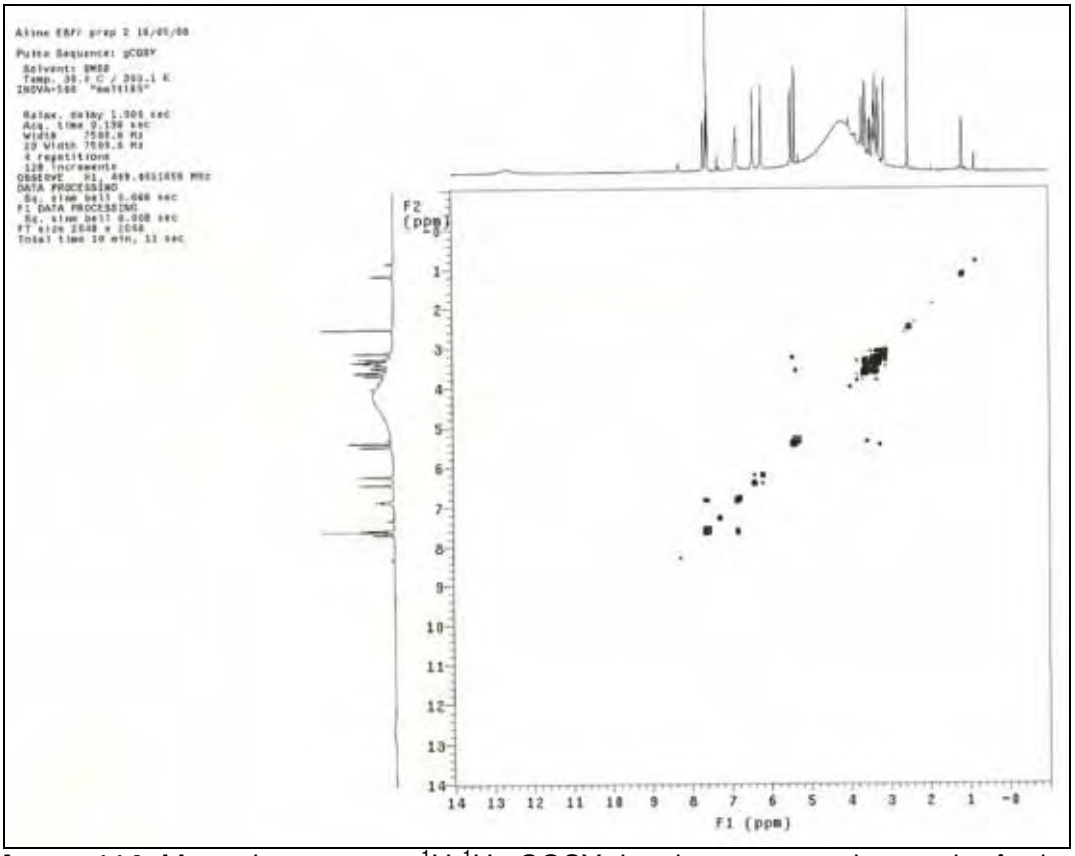
Anexo 111: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



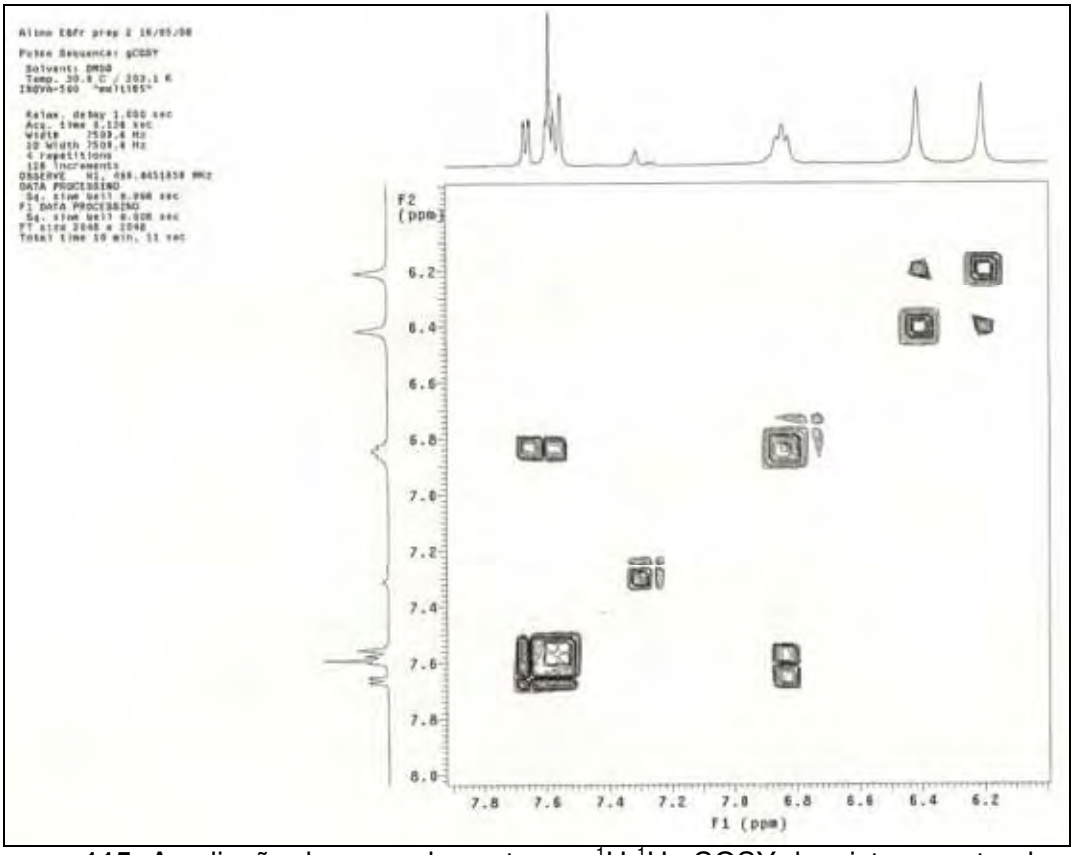
Anexo 112: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



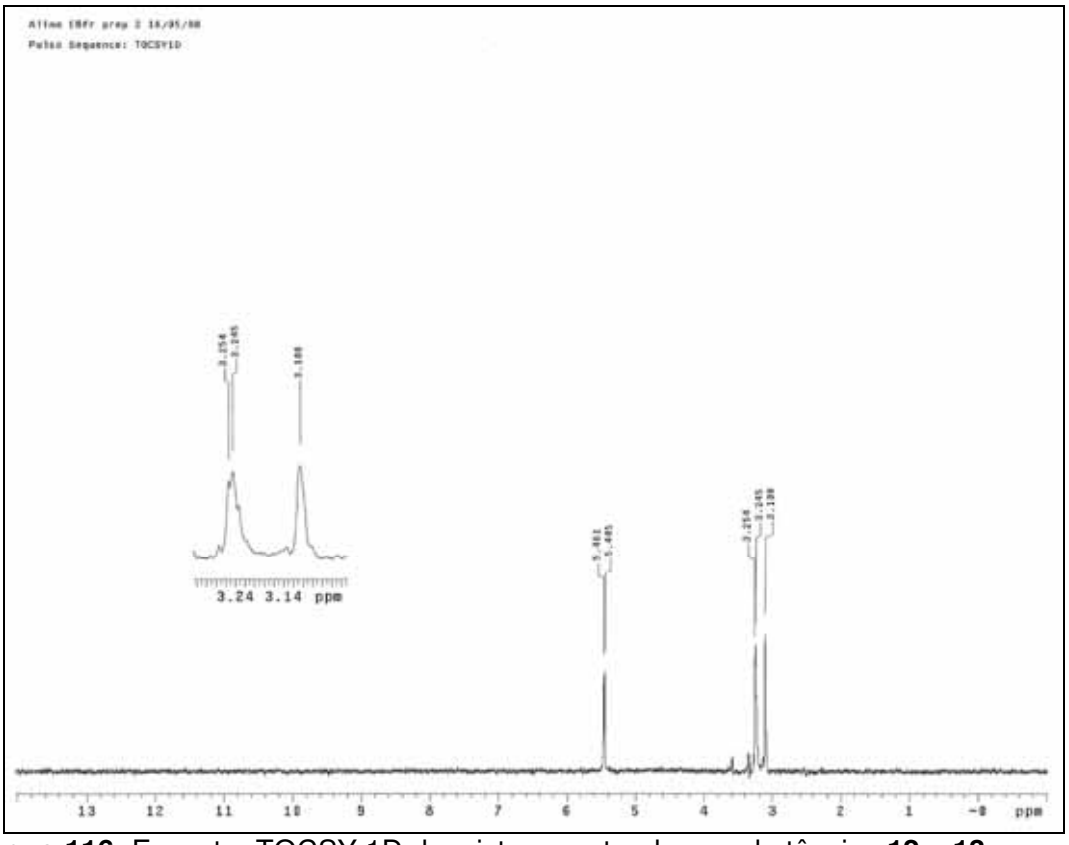
Anexo 113: Mapa de contornos ^{1}H-^{13}C *g*HMBC da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



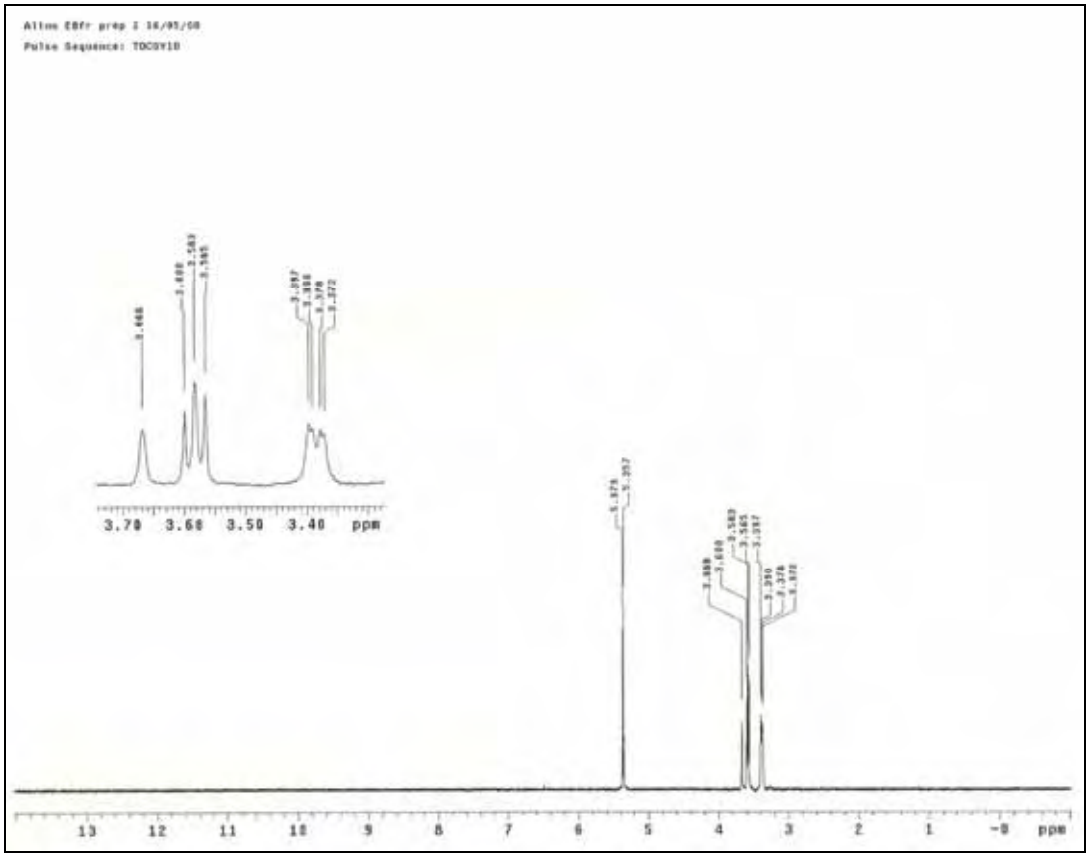
Anexo 114: Mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



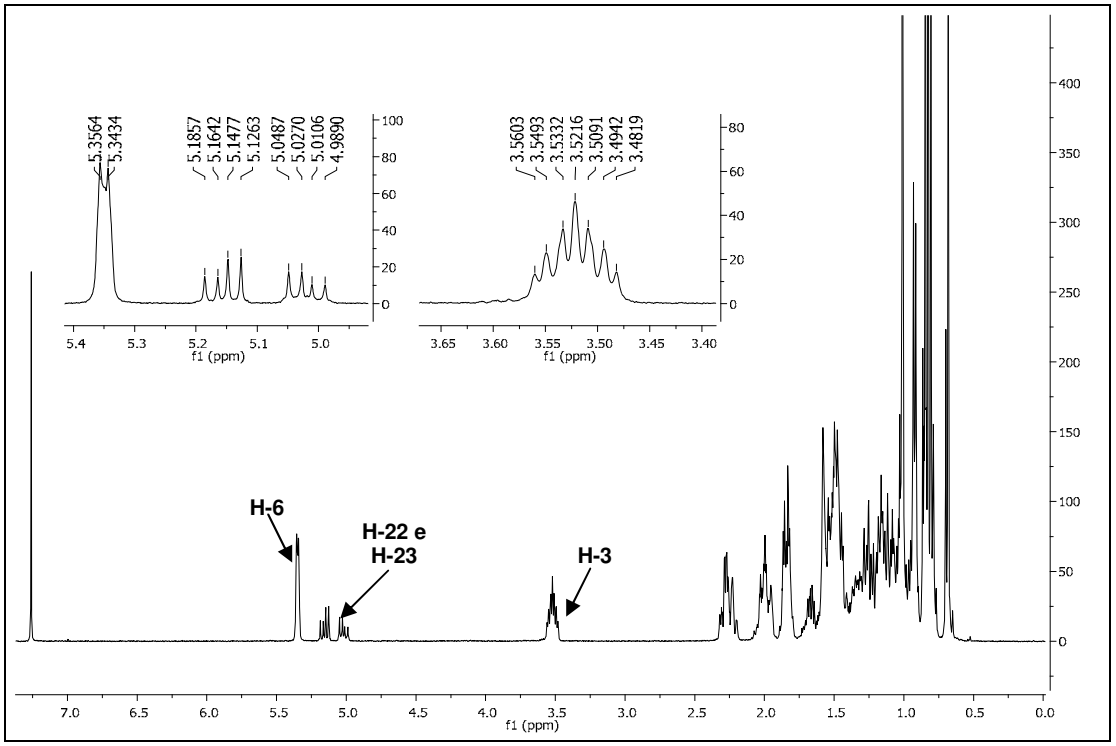
Anexo 115: Ampliação do mapa de contornos ^{1}H-^{1}H *g*COSY da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



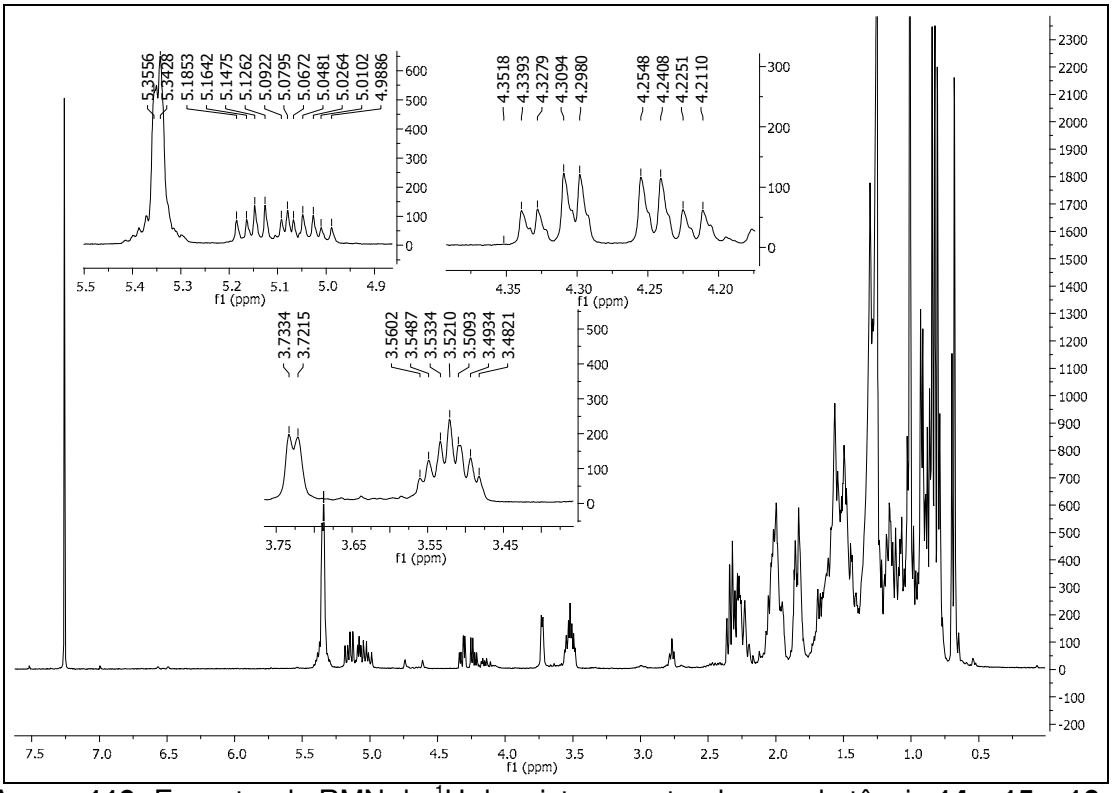
Anexo 116: Espectro TOCSY 1D da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



Anexo 117: Espectro TOCSY 1D da mistura contendo as substâncias **12** e **13** (500 MHz – DMSO-d_6).



Anexo 118: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substância **14** e **15** (500 MHz – CDCl3-d_1).



Anexo 119: Espectro de RMN de ^{1}H da mistura contendo as substância **14** e **15** e **16** (500 MHz – CDCl3-d_1).