Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA EM PLANTAS SUPERIORES: *Guapira* spp.

Juliana A. Severi
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara – 2010

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA

PROSPECÇÃO QUÍMICO-FARMACOLÓGICA EM PLANTAS SUPERIORES: *Guapira* spp.

Juliana A. Severi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara – 2010

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Severi, Juliana Aparecida

S493u Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Guapira* spp. / Juliana Aparecida Severi. – Araraquara, 2010.
144 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Wagner Vilegas

. 1.Guapira opposita. 2.Guapira graciliflora 3. Guapira noxia.4. Nyctaginaceae. 5. Fitoquímica. I.Vilegas, Wagner, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Tese desenvolvida no laboratório de Produtos Naturais
do Instituto de Química/ UNESP, com bolsa concedida pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP

DADOS CURRICULARES
Juliana Aparecida Severi

Dados Pessoais:

Filiação: Geraldo Severi e Elza de Vicente
Nascimento: 02/02/1981 - Ribeirão Preto/SP – Brasil
Endereço prof.: Instituto de Química - UNESP.
R. Prof. Francisco Degni, s/n - Depto de Química Orgânica
Quitandinha – Araraquara. CEP: 14800-900, SP - Brasil
Telefone: +55 16 33016600, R 6792.

Formação Acadêmica/Titulação

2007/2010 Doutorado em Ciências Farmacêuticas.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UNESP, Araraquara-SP.
Título: "Uso sustentável da Biodiversidade Brasileira - Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Guapira* spp"
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Bolsista FAPESP

2005/2007 Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UNESP, Araraquara-SP.
Título: "Uso sustentável da Biodiversidade Brasileira - Prospecção químico-farmacológico em plantas superiores: *Guapira* spp".
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Bolsista FAPESP

2000/2004 Graduação em Farmácia-Bioquímica.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/ UNESP, Araraquara-SP.
Título: "Prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: Atividade de *Mangifera indica* Lin. sobre o sistema gastrointestinal"
Orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas
Bolsista do Programa de Educação Tutorial (Mec-SESu) e FAPESP.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SEVERI, J. A., FERTIG, O., PLITZKO, I., HAMBURGER, M., VILEGAS, W., POTTERAT, O. Oleanane saponins and glycerogalactolipids from the leaves of *Guapira graciliflora*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 1058-1066, 2010.

2. CARDOSO, C. R. P., TUBALDINI, F. R., RODRIGUES, C. M., RINALDO, D., SEVERI, J. A., CÓLUS, I. M. S., VILEGAS, W., VARANDA, E. A. Mutagenic effect of native species of the Brazilian "Cerrado" with anti-ulcerogenic activity. **Current Topics in Toxicology**, v. 5, p. 31-41, 2009.

3. SEVERI, J. A., LIMA, Z. P., KUSHIMA, H., BRITO, A. R. M. S., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. Polyphenols with antiulcerogenic action from aqueous decoction of Mango leaves (*Mangifera indica* L.). **Molecules,** v. 14, p. 1098-1110, 2009.

4. SOUSA, T. M., SEVERI, J. A., SILVA, V. Y. A., SANTOS, E., PIETRO, R.C.L. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 221-226, 2007.

5. LIMA, Z. P., SEVERI, J. A., PELLIZZON, C. H., BRITO, A. R. M. S., SOLIS, P. N., CACERES, A., GIRON, L. M., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C. A. H. Can the aqueous decoction of mango flowers be used as an antiulcer agent? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 29-37, 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. PESCARINI, J. M., SEVERI, J. A., VILEGAS, W. Constituintes químicos de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz In: **7º Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2009, Maringá.

2. SOUZA, T. M., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., PIETRO, R.C.L. Myricetin from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel and activity against *Candida albicans* In: **57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research**, 2009, Genebra. Planta Medica. Thieme, 2009. v. 75. p. 926-927.

3. SEVERI, J. A., POTTERAT, O., HAMBURGER, M., VILEGAS, W. Oleanane saponins from *Guapira graciliflora* In: **57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research**, 2009, Genebra. **Planta Medica**. Thieme, 2009. v. 75. p. 908-908

4. SEVERI, J. A., MARTINS, A. R., GLORIA, B. A., SACRAMENTO, L. V. S., VILEGAS, W. Características anatômicas das superfícies foliares de espécies de *Guapira* (Nyctaginaceae) In: **59º Congresso Nacional de Botânica**, 2008, Natal - RN.

5. SOUSA, T. M., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., PIETRO, R.C.L. Chemical fingerprint and anti-Candida potential of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel In: **XVII Congresso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina "Bernardino Ducria"**, 2008, Palermo.

6. SOUSA, T. M., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., PIETRO, R.C.L. Chemical fingerprint of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Mirtaceae) In: **XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress od Ethnopharmacology**, 2008, São Paulo - SP.

7. SEVERI, J. A., PESCARINI, J. M., VILEGAS, W. Constituintes das folhas de *Guapira opposita* (Vell.) Reitz In: **XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Interncional de Etnofarmacologia**, 2008, São Paulo - SP.

8. SEVERI, J. A., PESCARINI, J. M., REIS, R. S., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. Estudo químico de espécies de *Guapira* (Nyctaginaceae) In: **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa BIOTA-FAPESP**, 2008, Araraquara - SP.

9. SOUSA, T. M., SEVERI, J. A., SILVA, V. Y. A., ISAAC, V. L. B., PIETRO, R.C.L. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae) antioxidant cream In: **XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress of Ethnopharmacology**, 2008, São Paulo - SP.

10. SOUSA, T. M., SEVERI, J. A., SILVA, V. Y. A., ISAAC, V. L. B., PIETRO, R.C.L. Anti-Candida potential of preparation with cerrado plant extract In: **XVI Congresso Ítalo-Latinoamericano de Etnomedicina "Carlo L. Spegazzini"**, 2007, La Plata, Argentina.

11. MAZZOLIN, L. P., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C. A. H. Avaliação da atividade secretora gástrica sistêmica e local e da atividade antioxidante do extrato metanólico de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae) In: **XVI Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Carlo L. Spegazzini"**, 2007, La Plata, Argentina.

12. PESCARINI, J. M., SEVERI, J. A., VILEGAS, W. Avaliação qualitativa da atividade antioxidante de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae) In: **I Simpósio Paulista de Farmacognosia**, 2007, Araraquara - SP.

13. SEVERI, J. A., MARTINS, A. R., SACRAMENTO, L. V. S., VILEGAS, W. Caracterização anatômica das folhas de *Guapira* spp. (Nyctaginaceae) In: **58º Congresso Nacional de Botânica**, 2007, São Paulo - SP.

14. SEVERI, J. A., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. Chemical profile of the infusion from *G. noxia* (netto) Lundell. In: **1st Brazilian Conference of Natural Products**, 2007, Águas de São Pedro - SP.

15. SASSA, M. F., LOPES, F. C. M., BENZATTI, F. P., PLACERES, M. C. P., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., CARLOS, I. Z. Efeito do extrato metanólico da planta *Guapira noxia* na produção de mediadores imunológicos por macrófagos peritoneais murinos In: **I Simpósio Paulista de Farmacognosia**, 2007, Araraquara - SP.

16. SOUSA, T. M., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., PIETRO, R.C.L. Flavonoids from *Plinia cauliflora* leaves In: **1st Brazilian Conference of Natural Products**, 2007, Águas de São Pedro - SP.

17. SEVERI, J. A., RODRIGUES, J., RINALDO, D., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. Metabólitos secundários de espécies de *Miconia* (Melastomataceae) In: **58º Congresso Nacional de Botânica**, 2007, São Paulo - SP.

18. SOUSA, T. M., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., PIETRO, R.C.L. *Plinia cauliflora* leaves against *Candida albicans* In: **1st Brazilian Conference of Natural Products**, 2007, Águas de São Pedro – SP.

19. SEVERI, J. A., CARBONE, V., NAPOLITANO, A., PIACENTE, S., PIZZA, C., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. Rapid identification of flavonoids from *Guapira noxia* (Nyctaginaceae) by direct-injection electrospray ionisation tandem mass spectrometry In: **XVI Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina** "Carlo L. Spegazzini", 2007, La Plata.

20. MARTINS, A. R., GLORIA, B. A., SEVERI, J. A., SACRAMENTO, L. V. S., VILEGAS, W. Análise microscópica da droga pulverizada e triagem fitoquímica de extratos de *Smilax polyantha* Grisebac (Smilacaceae) In: **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2006, Salvador - BA.

21. PAVAN, F. R., HIGUCHI, C. T., SATO, D. N., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., CALVO, T. R., RODRIGUES, J., COELHO, R. G., HONDA, N. K., CARDOSO, C. A. L., LEITE, C. Q. F. Antimicobacterial activity of crude extracts of plants from brazilian Cerrado against *M. tuberculosis* in vitro In: **II Encontro Nacional de Tuberculose**, 2006, São Paulo - SP.

22. BENZATTI, F. P., ROCHA, M. C., LOPES, F. C. M., CARLI, C. B. A., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., POLESI, M. C., CARLOS, I. Z. Ativação de macrófagos expostos ao extrato clorofórmico da planta *Guapira noxia* In: **53º Jornada Farmacêutica da UNESP**, 2006, Araraquara.

23. SEVERI, J. A., BAUAB, T. M., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Avaliação da atividade antibacteriana das folhas de *Guapira noxia* In: **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2006, Salvador.

24. MAZZOLIN, L. P., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C. A. H. Avaliação da atividade antiulcerogênica, analgésica e tóxica aguda dos extratos das folhas de *Guapira noxia* (Netto) Lundell (Nyctaginaceae) In: XXI **Reunião Anual da Federação de Sociedade de Biologia Experimental - FESBE**, 2006, Águas de Lindóia - SP.

25. MICHELIN, D. C., FIGUEIREDO, M. E., SANNOMIYA, M., SEVERI, J. A., SALGADO, H. R. N., SANTOS, L. C., VILEGAS, W. Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Convolvulaceae) In: **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2006, Salvador - BA.

26. CALVO, T. R., SEVERI, J. A., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Constituintes químicos do extrato metanólico das folhas de *Alchornea triplinervia* In: **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2006, Salvador - BA.

27. HIGUCHI, C. T., PAVAN, F. R., SEVERI, J. A., SACRAMENTO, L. V. S., PRINCE, K. A., VILEGAS, W., NAKAMURA, D., LEITE, C. Q. F. Estudo comparativo dos extratores polares e apolares na atividade antimicobacteriana das plantas do Cerrado brasileiro In: **X Congresso Brasileiro de Biomedicina**, 2006, Goiânia - GO.

28. ROCHA, M. C., BENZATTI, f. p., LOPES, F. C. M., CARLI, C. B. A., SASSA, M. F., POLESI, M. C., SEVERI, J. A., VILEGAS, W., CARLOS, I. Z. Estudo da influência dos extratos metanólico e clorofórmico da planta *Guapira noxia* sobra a liberação de peróxido de hidrogênio em culturas de macrófagos peritoneais In: **53º Joranada Farmacêutica da UNESP**, 2006, Araraquara - SP.

29. SEVERI, J. A., CALVO, T. R., SANTOS, L. C., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Flavonóides isolados de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae) In**: 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006, Águas de LIndóia.

30. SEVERI, J. A., MAZZOLIN, L. P., HIRUMA-LIMA, C. A. H., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Triglycoside flavonoids from *Guapira noxia* leaves In: **XVº Congresso Italo-Latino Americano di Etnomedicina "Ivano Morelli"**, 2006, Perugia.

31. SEVERI, J. A., SILVA, M. A., SUMITANI, J. S. A., SALGADO, H. R. N., PEPATO, M. T., VILEGAS, W., SANTOS, L. C. Evalution of the gastrointestinal activity of *Bauhinia forficata* Link In: **5th Intenacional Congress of Pharmaceutical Sciences,** 2005, Ribeirão Preto - SP.

32. SEVERI, J. A., CALVO, T. R., SALGADO, H. R. N., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Evalution of the gastrointestinal activity of *Indigofera suffruticosa* In: **5th Intenacional Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2005, Ribeirão Preto - SP.

33. SILVA, M. A., NASSER, A. L. M., SEVERI, J. A., SALGADO, H. R. N., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Evalution of the gastrointestinal activity of *Qualea* species In: **5th Intenacional Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2005, Ribeirão Preto - SP. Braziliam Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. v. 41. p. 333-333

34. SILVA, M. A., SEVERI, J. A., SALGADO, H. R. N., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Evalution of the gastrointestinal activity of *Strychnos pseudoquina* In: **5th Internacional Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2005, Ribeirão Preto - SP. Braziliam Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. v. 41. p. 324-324

35. SEVERI, J. A., RINALDO, D., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Perfil cromatográfico e atividade antioxidante de *Guapira noxia* (Nyctaginaceae) In: **V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2005, Recife - PE.

36. CALVO, T. R., RODRIGUES, C. M., SEVERI, J. A., TAMASHIRO, J., BRITO, A. R. M. S., VILEGAS, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae) In: **V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2005, Recife - PE.

37. SEVERI, J. A., VILEGAS, W., SILVA, M. A., CALVO, T. R., OLEA, R. S. G. Investigação química do extrato clorofórmico de *Mangifera indica* In: **XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2004, Ilha Solteira - SP.

Supervisão de estágio

1. Júlia Moreira Pescarini
   Título: Uso sustentável da Biodiversidade Brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Guapira* spp.
   Inicição Científica em Química de Produtos Naturais. Bolsista CNPq
2. Rodrigo Alexandre Reis
   Título: Uso sustentável da Biodiversidade Brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Guapira* spp.
   Inicição Científica em Química de Produtos Naturais. Bolsista BAE

Colaboração em projetos

1. Título: "Morfoanatomia dos órgãos vegetativos e perfil químico de espécies do gênero *Smilax* L. (Smilacaceae)".
   Nome: Aline R. Martins. Doutorado em Biologia Vegetal do Instituto de Biologia/ UNICAMP.
   Agência financiadora: FAPESP
2. Título: Estudo da composição química e atividade antifúngica de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) e de *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) para o desenvolvimento de preparações farmacêuticas..
   Nome: Tatiana M. S. Moreira. Doutorado em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Fármacos e Medicamentos/UNESP.
   Agência finaciadora: FAPESP

Realização de estágio no exterior

1. Período: 15/09/2008 a 15/03/2009.
   Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel, Basel - Suíça. Supervisão do Prof. Dr. Matthias Hamburger, Dr. Olivier Potterat.
2. Período: 15/04/2010 a 13/07/2010
   Bioorganic Chemistry Department, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle - Alemanha. Supervisão do Prof. Dr. Ludger Wessjohann e Dr. Jürgen Schmidt.

Dedico este trabalho

Aos meus pais Geraldo Severi e Elza de Vicente
pelo imenso amor, dedicação e apoio incondicional.
Aos meus irmãos Márcio, Luiz Henrique, Fabiana e Juninho,
que completam minha vida e dão forças para buscar outros desafios.

Agradecimentos

Ao meu orientador e amigo prof. Dr. Wagner Vilegas, que acreditou em mim e em meu potencial durante todos estes anos. Muito obrigada pela confiança, incentivo, orientação e amizade. À profa. Dra. Lourdes C. dos Santos e ao prof. Dr. Luis Vitor S. Sacramento pelos sábios ensinamentos pessoais, profissionais e pela valiosa amizade.

Aos professores e estudantes que participam do projeto BIOTA-FAPESP, pela realização dos ensaios biológicos e importantes discussões sobre as potencialidades das plantas estudadas. Também agradeço à profa. Dra. Regina M. B. Cicarelli, profa. Dra. Rosemeire. C. L. R. de Pietro e profa. Dra. Marcia Graminha pelos ensaios biológicos realizados fora do âmbito do BIOTA. Em especial agradeço às pós-graduandas Lucilene P. Mazzolin e Tatiana M. S. Moreira.

Aos alunos (e amigos) de iniciação científica Júlia M. Pescarini e Rodrigo A. Reis, pela motivação e incansável disposição durante a realização deste projeto.

Aos docentes de graduação e pós-graduação da FCFAr e IQ/UNESP que sempre estiveram abertos aos meus questionamentos e necessidades. Aos funcionários da FCFAr e IQ/UNESP pelos auxílios prestados. Em especial às funcionárias da Seção de Pós-graduação da FCFAr e ao Nivaldo Boralle pela ajuda com os experimentos de RMN.

À profa. Dra Maria Stella G. Radhi e profa. Dra. Isabele R. Nascimento, que participaram do exame de qualificação, bem como ao prof. Dr. Cid A. M. Santos; profa. Dra. Vera L. G. Rehder, profa. Dra. Claudia H. Pellizzon e profa. Dra. Isabele R. Nascimento, que gentilmente aceitaram participar do exame de defesa e contribuir com a melhoria deste trabalho.

Ao prof. Dr. Matthias Hamburger e Dr. Olivier Potterat pelo aprendizado durante o estágio realizado na UniBasel. Ao Orlando Fertig, Manuela Rogalski e demais colegas deste laboratório, em especial ao Xinzhou Yang, Yangfang Li e Inken Plitzko pelo excelente convívio em laboratório. Aos amigos "brazucas" de Basel que me proporcionaram tantas alegrias e apoio para superar as dificuldades de se aventurar em um país estrangeiro.

Ao prof. Dr. Ludger Wessjohann e Dr. Jürgen Schmidt que me deram a oportunidade de complementar este trabalho no IPB e pelos valiosos ensinamentos pessoais e profissionais transmitidos. Aos pós-graduandos Fernando Cotinguiba, Martin Brauer, Ana Áurea Barreto, Bruno, Francislene, Cecília e Ricardo pelo apoio e amizade em Halle.

Aos "velhos" amigos de laboratório do Iq-UNESP Daniel Rinaldo, Juliana Rodrigues, Mariana Pacífico, Adriana Moura, Michele Lira, Fabiano P. Amaral, todos os demais pós-graduandos, alunos de IC e tantos outros alunos que já encerraram seus projetos (Tamara R. Calvo, Marcelo Ap. Silva, Marcio A. Andreo, Ana Lúcia M. Nasser, Ana Elisa Wanczinski, Miriam Sannomiya, Claudia J. Nehme) e que me deixaram lições de um excelente convívio em laboratório, de respeito mútuo e de amizade.

Às amigas de república e "agregadas", pela sincera amizade, companherismo e por terem compartilhado comigo todas as experiências vivenciadas ao longo destes anos de moradia em Araraquara. Deixo à vocês meu carinho e um agradecimento mais que especial: Tatiana M. S. Moreira, Flávia Chiva, Tamara R. Calvo, Daniela B. Rosseto, Greiciane G. Panetto, Josiane P. Deliberto, Monica Ebel, Silvia M. Iha e à nova moradora Maria A. Spósito.

Ao João, pelo seu amor e que com simplicidade me traz alegria, segurança e paz de espírito, tão necessários diante de alguns momentos da vida. Obrigada por toda compreensão, dedicação, zelo e colo.

À todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, cujos nomes não caberiam nestas poucas linhas, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à Fapesp pela bolsa concedida.

"Um galo sozinho não tece a manhã:
ele precisará sempre de outros galos.

De um que apanhe esse grito que ele
e o lance a outro: de um outro galo
que apanhe o grito que um galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzam
os fios de sol de seus gritos de galo
para que a manhã, desde uma tela tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos.

E se encorpando em tela, entre todos,
se erguendo tenda, onde entrem todos, no toldo
(a manhã) que plana livre de armação.

A manhã, toldo de um tecido tão aéreo
que, tecido, se eleva por si: luz balão".

(Tecendo a manhã – João Cabral de Melo Neto)

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	deslocamento químico
AcOEt	acetato de etila
ACN	acetonitrila
AMG	ágar mínimo glicosado
api	apiose
ara	arabinose
ATCC	*American type culture collection*
BAW	mistura de *n*-butanol, ácido acético e água
BHI	*brain-heart infusion*
C18	octadecil sílica
CAD	*charged aerosol detection* (detector de aerosol carregado)
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CIM	concentração inibitória mínima
CG	cromatografia gasosa
CMH	caldo Mueller-Hinton
d	dubleto
dd	duplo dubleto
d.i.	diâmetro interno
DMSO-d_6	dimetilsulfóxido deuterado
DTNB	ácido 5,5´-ditio-bis 2-nitrobenzóico
ECHCl$_3$	extrato clorofórmico
EMeOH	extrato metanólico
ELL	extração líquido-líquido
ELSD	*evaporative light scattering detector* (detector por espalhamento de luz)
ESI-IT	*electrospray ionization – íon trap* (espectrometria de massas com ionização por *electrospray* acoplado a analisador do tipo *íon trap*)
ESI-TSQ	*electrospray ionization – triple stage quadrupolo* (espectrometria de massas com ionização por *electrospray* acoplado a analisador do tipo triplo quadrupolo)
FE	fase estacionária
FID	*flame ionization detector* (detector por ionização de chama)
FM	fase móvel
FrHex	fração hexânica
FrBuOH	fração butanólica
FrAq	fração aquosa
gal	Galactose
glic	Glicose
glicAc	ácido glicurônico
Gg	*Guapira graciliflora*
Gn	*Guapira noxia*
Go	*Guapira opposita*
GPC	*gel permeation chromatography* (cromatografia de permeação em gel)

LISTA DE FIGURAS

1.1	Betalaínas (betaxantinas) em plantas da família Nyctaginaceae	**28**
1.2	Betalaínas (betacianinas) em plantas da família Nyctaginaceae	**29**
1.3	Esteróides e Terpenóides em plantas da família Nyctaginaceae	**30**
1.4	Flavonóides em plantas da família Nyctaginaceae	**31**
1.5	Flavonóides em plantas da família Nyctaginaceae	**32**
1.6	Flavonóides (rotenóides) em plantas da família Nyctaginaceae	**33**
1.7	Flavonóides (rotenóides) em plantas da família Nyctaginaceae	**34**
1.8	Compostos nitrogenados em plantas da família Nyctaginaceae	**35**
1.9	Saponinas em plantas da família Nyctaginaceae	**36**
1.10	Glicolipídeos em plantas da família Nyctaginaceae	**37**
1.11	Lignanas em plantas da família Nyctaginaceae	**37**
1.12	Polifenóís em plantas da família Nyctaginaceae	**37**
1.13	Xantonas em plantas da família Nyctaginaceae	**37**
1.14	Substâncias presentes no EMeOH das folhas de *G. noxia*	**39**
1.15	*Guapira opposita* (Vell.) Reitz com ampliação das flores, frutos e sementes	**40**
1.16	*Guapira graciliflora* (Mart. ex J. A. Schimidt) Lundell com ampliação das flores, frutos e sementes	**41**
1.17	*Guapira noxia* (Netto) Lundell com ampliação das flores, frutos e sementes	**42**
1.18	Substâncias isoladas de *G. opposita* discutidas neste trabalho	**44**
1.19	Substâncias isoladas de *G. graciliflora* discutidas neste trabalho	**45**
1.20	Substâncias isoladas de *G. noxia* discutidas neste trabalho	**46**
4.2.1	Fluxograma de obtenção dos extratos das folhas das espécies de *Guapira*	**53**
4.4.1	Perfis cromatográficos dos extratos apolares das folhas das espécies de *Guapira* por CG-FID. Cromatogramas: A) *G. noxia*, B) *G. graciliflora* e C) *G. opposita*. Condições de análise: Coluna SPB-50 30 m × 0,25 mm × 0,25μm de espessura, temp. do injetor: 260 ºC, temp. do detector: 300 ºC, temp. da coluna: isoterma de 280 ºC por 45 min, volume de injeção: 2 μL, modo *split* - 1:50	**55**
4.4.2	Substâncias identificadas nos extratos apolares das espécies de *Guapira* por CG-FID: 1) sitosterol, 2) estigmasterol, 3) campesterol, 4) taraxerol e 5) lupenona	**57**
4.5.1	Espectros de UV representativos dos picos indicados nos cromatogramas de derivados de: A) ácidos fenólicos, t_r= 0 a 2 min; B) flavonóis, t_r= 24 a 34 min; C) flavonas, t_r= 24 a 34 min	**58**
4.5.2	Perfis cromatográficos dos EMeOH das folhas das espécies de *Guapira* obtidos por HPLC-UV-CAD (HPLC-A3). A) *G. noxia*, B) *G. opposita*, C) *G. graciliflora*.(150 × 4,6 mm d.i.,5 μm; Solvente A: H_2O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 2-14% de B em A em 20 min, de 14-30% de B em 40 min, de 30-38% de B em 50 min de 38-80% B em 60 min e 80-95% de B até 65 min; fluxo 1 mL/min	**59**
4.6.1	Fracionamento da FrAq do EMeOH das folhas de *G. opposita*	**60**
4.6.2	Fracionamento da FrBuOH do EMeOH das folhas de *G. opposita*	**62**
4.6.3	Estruturas de Go1: 3-*O*-metil-*chiro*-inositol e Go2: alantoína	**64**
4.6.4	Estrutura de Go3: quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(6''$\rightarrow$1''')-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo; Go4: luteolina-7-*O*-β-D-glicopiranosídeo; Go5: quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosídeo; Go6: luteolina; Go7: quercetina	**67**
4.6.5	Estruturas de Go8: (2'*S*)-3'-*O*-β-D-galactopiranosil-(6''$\rightarrow$1''')-α-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol e Go9: 3'-*O*-β-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol	**71**

4.6.6 Estrutura de Go10: kaempferol-3-*O*-*β*-D-glicopiranosil-(6’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rhamnopiranosídeo; Go11: 3’-metoxiquercetina-3-*O*-*β*-D-glicopiranosil-(6’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rhamnopiranosideo; Go12: apigenina 7-*O*-*β*-D-glicopiranosídeo; Go13: 3’-metoxiluteolina-7-*O*-*β*-D-glicopiranosídeo. Go14: quercetina-3-*O*-*α*-L-arabinopiranosídeo; Go15: 3’-metoxiluteolina **75**

4.7.1 Fracionamento da FrBuOH do EMeOH das folhas de *G. graciliflora* **78**

4.7.2 Estrutura de Gg1: oleanolato 3-*O*-*β*-D-[glicuronopiranosil-(3’→1’’)-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(2’’→1’’’)-*O*-*β*-D-rhamnopiranosídeo]-28-*O*-*β*-D-glicopiranosila e Gg4: ácido 3-*O*-*β*-D-[glicuronopiranosil-(3’→1’’)-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(2’’→1’’’)-*O*-*β*-D-rhamnopiranosídeo]-oleanólico **81**

4.7.3 Estrutura de Gg2: oleanolato 3-*O*-*β*-D-[glicuronopiranosil-(3’→1’’)-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(2’’→1’’’)-*O*-*β*-D-xilopiranosídeo]- 28-*O*-*β*-D-glicopiranosila e Gg5: ácido 3-*O*-*β*-D-[glicuronopiranosil-(3’→1’’)-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(3’’→1’’’)-*O*-*β*-D-xilopiranosídeo]-oleanólico **84**

4.7.4 Estruturas de Gg3: 3’-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(6’’→1’’’)-*α*-D-galactopiranosídeo-1’-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol e Gg6: 3’-*O*-*β*-D-galactopiranosídeo-1’-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol **88**

4.7.5 Estrutura de Gg7: *β*-sitosterol 3-*O*-*β*-D-glicopiranosídeo **88**

4.7.6 Estruturas de Gg8: quercetina-3-*O*-{*α*-L-rhamnopiranosil-(1’’’→2’’)-[*α*-L-rhamnopiranosil-(1’’’’→6’’)]}-*β*-D-galactopiranosídeo e Gg9: kaempferol-3-*O*-{*α*-L-rhamnopiranosil-(1’’’→2’’)-[*α*-L-rhamnopiranosil-(1’’’’→6’’)]}-*β*-D-galactopiranosídeo **92**

4.8.1 Fracionamento da FrBuOH do EMeOH das folhas de *G. noxia* **93**

4.8.2 Estrutura de Gn11 – A ou B e Gn12 **95**

4.8.3 Estrutura de Gn13: 3-metil-2-butenil-1-*O*-*β*-D-glicopiranosil-(6’→1’’)-*O*-*β*-D-apiofuranosídeo e Gn14: oleanolato 3-*O*-*β*-D-glicurono-30-*nor*-olean-12,20(29)-dien-23,28-dióico-28-*O*-*β*-D-glicopiranosila **97**

5.1.1 Determinação da participação dos grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico na gastroproteção promovida pelo EMeOH de *G. noxia*. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 7-8) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. *p<0,05 e **p<0,01 para comparações feitas com o respectivo grupo controle (Anova – Dunnet); letras para comparações feitas entre os grupos (Anova – Tuckey) **107**

5.1.2 Determinação bioquímica dos níveis de glutationa presente no tecido gástrico em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 4-7) da concentração de glutationa. Anova – Dunnet *p<0,05 e **p<0,01 -comparações feitas com o grupo controle negativo (salina). **108**

5.2.1 Efeito do EMeOH das folhas de *G. opposita* no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 5) da área de lesão. Anova – Dunnett ** p<0,01 **113**

LISTA DE TABELAS

4.2.1	Extratos obtidos das folhas das espécies de *Guapira* estudadas	**53**
4.3.1	Triagem fitoquímica comparativa dos extratos das folhas das espécies de *Guapira*	**54**
4.4.1	Picos de substâncias presentes nos perfis cromatográficos dos extratos $ECHCl_3$ das espécies de *Guapira* registrado por CG-FID	**56**
4.6.1	Resultado obtido do fracionamento da FrAq do EMeOH de *G. opposita*	**61**
4.6.2	Resultado obtido do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de *G. opposita*	**62**
4.6.3	químicos de RMN de Go1 (D_2O) e Go2 (DMSO-d_6)	**64**
4.6.4	Deslocamentos químicos de RMN de Go3, Go4 e Go5 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**68**
4.6.5	Deslocamentos químicos de RMN de Go6 e Go7 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**68**
4.6.6	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Go8 e Go9 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**70**
4.6.7	Deslocamentos químicos de RMN de Go10, Go11 e Go12 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**75**
4.6.8	Deslocamentos químicos de RMN de Go13, Go14 e Go15 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**76**
4.7.1	Resultado obtido do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de *G. graciliflora*	**77**
4.7.2	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gg1 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**81**
4.7.3	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gg4 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**82**
4.7.4	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gg2 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**85**
4.7.5	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gg5 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**86**
4.7.6	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gg3 e Gg6 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**87**
4.7.7	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C de Gg7 (Piridina-d_5, 11,7 T)	**89**
4.7.8	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gg8 e Gg9 (DMSO-d_6, 11,7 T)	**91**
4.8.1	Agrupamento resultante do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de *G. noxia*	**93**
4.8.2	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gn11 (DMSO-d_6,) e Gn12 (D_2O)	**95**
4.8.3	Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gn13 e Gn14 (DMSO-d_6)	**98**
4.9.1	Substâncias identificadas nos processos de purificação dos extratos e nos perfis cromatográficos HPLC-UV-ELSD das espécies de *Guapira* investigadas	**100**
5.1.1	Efeito do EMeOH das folhas de *G. noxia* no modelo de ligadura de piloro em ratos	**105**
5.3.1	Atividade antimicrobiana dos extratos das espécies de *Guapira*	**117**
5.4.1	Potencial mutagênico expresso pela média, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens celulares de *Salmonella typhimurium* expostas à várias doses dos extratos das espécies de *G. opposita*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica	**121**

LISTA DE QUADROS

1.1	Gêneros pertencentes à família Nyctaginaceae	**23**
1.2	Panorama químico representativo de plantas da família Nyctaginaceae	**27**

HPLC	*high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta performance)
Hex	*n*-hexano
^{1}H-^{1}H COSY	*homonuclear gradient correlation spectroscopy*
HMBC	*gradient heteronuclear multiple bond correlation*
HMQC	*gradient heteronuclear through multiple quantum coherence*
HSQC	*heteronuclear single quantum coherence*
HSQC- TOCSY	*heteronuclear single quantum coherence – total correlation spectroscopy*
IR	índice de refração
IV	infra vermeho
J	constante de acoplamento
NEM	*N*-etilmaleimida
LIT	meio *liver infusion tryptose*
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil ester
m	multipleto
MDA	malonil dialdeído
MPLC	*medium pressure liquid chromatography* (cromatografia líquida de média performance)
MeOH	metanol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
m/z	relação massa/carga
n-BuOH	*n*-butanol
NPD	4-nitrofenilenodiamino
NP/PEG	natural product/polietilenoglicol
n-PrOH	*n*-propanol
PDA	*photodiode array detector* (detector de arranjo de fotodiodos)
Rf	fator de retenção
Rha	rhamnose
RMN ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ^{1}H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	singleto
sl	singleto largo
SPE	*solid phase extraction* (extração em fase sólida)
TFA	ácido trifluoracético
TOCSY-1D	total correlation spectroscopy, 1D
t_r	tempo de retenção
UFC	unidades formadoras de colônias
xil	xilose

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1- INTRODUÇÃO

1.1 A família Nyctaginaceae **23**

1.2 O gênero *Guapira* **38**

2- OBJETIVOS **47**

3- MATERIAIS E EQUIPAMENTOS **48**

4- ESTUDO QUÍMICO- Desenvolvimento, resultados e discussões

4.1 Coleta das espécies **52**

4.2 Preparação dos extratos **52**

4.3 Triagem cromatográfica dos extratos **53**

4.4 Perfis cromatográficos dos extratos apolares das espécies de *Guapira* **54**

4.5 Perfis cromatográficos dos extratos polares das espécies de *Guapira* **57**

4.6 Fracionamento e purificação de *G. opposita* **60**

4.7 Fracionamento e purificação de *G. graciliflora* **76**

4.8 Fracionamento e purificação de *G. noxia* **99**

4.9 Identificação dos compostos isolados nos perfis cromatográficos obtidos por HPLC-UV-CAD e análise comparativa entre as espécies

5- ESTUDO BIOLÓGICO - Desenvolvimento, resultados e discussões

5.1 Avaliação do mecanismo de ação antiúlcera de *G. noxia* **104**

5.2 Avaliação da atividade antiúlcera do EMeOH de *G. opposita* **112**

5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das espécies de *Guapira* **113**

5.4 Avaliação do potencial mutagênico **118**

5.5 Avaliação do potencial citotóxico **122**

6- CONCLUSÕES **124**

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **125**

RESUMO

Esse trabalho é parte do projeto temático BIOTA-FAPESP: "Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica de Plantas Superiores" e visa contribuir com a caracterização de espécies presentes no estado de São Paulo, investigando seu potencial químico-medicinal. Dentre as espécies com particular interesse, foram investigadas neste trabalho *Guapira opposita*, *G. noxia* e *G. graciliflora*, pertencentes à família Nyctaginaceae. O estudo químico do extrato clorofórmico das folhas foi conduzido por CG-FID e levou à identificação de esteróides e triterpenos. Os extratos metanólicos das três espécies foram fracionados por técnicas cromatográficas convencionais (permeação em gel, MPLC, HPLC) e as substâncias resultantes foram identificadas através de métodos espectroscópicos e espectrométricos (RMN, IV, UV e EM). Com este estudo, foram identificados em *G. opposita* onze flavonóides, dois monoacilgliceróis, um ureídeo e um ciclitol; em *G. graciliflora* cinco saponinas, duas delas inéditas, dois flavonóides e dois monoacilgliceróis; e de *G. noxia* dois compostos nitrogenados, um hemiterpeno e uma saponina inédita. As análises por HPLC-PDA-ELSD apontaram perfis químicos qualitativamente semelhantes entre as espécies. Dentre as atividades biológicas investigadas nas espécies, verificou-se que o extrato de metanólico de *G. noxia* possivelmente oferece efeito gastroprotetor na formação de úlceras, por elevar os níveis de glutationa, associado ao efeito antioxidante. Também foi verificada atividade antimicrobiana nos extratos de *G.noxia* e *G. graciliflora*, mutagênica em *G. opposita* e ausência de citotoxicidade em todos os extratos testados. Dessa maneira, este estudo contribui para aprofundar o conhecimento químico-farmacológico sobre espécies de *Guapira*, que ocorrem no estado de São Paulo.

Palavras-chave: *Guapira noxia*, *Guapira opposita*, *Guapira graciliflora*, Nyctaginaceae

ABSTRACT

This work is part of the BIOTA-FAPESP thematic project “Sustaintable use of the Brazilian Biodiversity: Chemical and Pharmacological Prospection on Higher Plants”, and intents to contribute to improve the knowledge of plants present in the São Paulo State, by investigating their chemical and biological potential. Some of the species with particular interest are *Guapira opposita*, *G. noxia* and *G. graciliflora*, which belongs to the Nyctaginaceae family. The chemical study of the chloroformic extracts was performed by GC-FID and led to the identification of steroids and triterpenes. The methanolic extracts were fractionated by conventional chromatographic techniques (gel permeation, MPLC, HPLC) and the isolated compounds were identified by spectroscopic and spectrometric methods (NMR, IR, UV and MS). In this approach, have been identified from *G. opposita* eleven flavonoids, two monoacylglycerols, one ureide and one cyclitol; from *G. graciliflora* five saponins, two of them new, two flavonoids, and two monoacylglycerols; and from *G. noxia* two nitrogenated compounds, one hemiterpene and one new saponin. HPLC-PDA-ELSD analyses revealed similar qualitative chemical profile among the species. Concerning the investigated biological activities, it was observed that the methanolic extract of *G. noxia* has gastroprotector effects probably by incresing the levels of glutatione, associated to the antioxidant effect. Moreover, it was observed antimicrobial activity in *G.noxia* and *G. graciliflora*, mutagenic activity in *G. opposita* and absence of citotoxicy in all tested extracts. Thus, this work contributes to increase the chemical and pharmacological knowledge of plants from *Guapira* genus, presents in São Paulo State.

Keywords: *Guapira opposita*, *Guapira noxia*, *Guapira graciliflora*, Nyctaginaceae

1. INTRODUÇÃO

O projeto Biota FAPESP: "Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica em Plantas Superiores", do qual este trabalho faz parte, visa contribuir com a caracterização dos Biomas Cerrado e Mata Atlântica do estado de São Paulo, investigando o potencial químico-medicinal de espécies brasileiras. Dentre as espécies com particular interesse estão as do gênero *Guapira* (Nyctaginaceae).

1.1. A família Nyctaginaceae

A família Nyctaginaceae, descrita por Antoine Laurent de Jussieu em 1803, é representada por cerca de 33 gêneros (Quadro 1.1) e mais de 300 espécies distribuídas mundialmente em regiões de clima tropical e subtropical (APG II, 2003; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). Estudos sugerem a presença de seis tribos na família: Abronieae, Boldoeae, Boungainvilleeae, Leucastereae, Nyctagineae e Pisonieae, sendo esta última a que congrega o maior número de espécies (BITTRICH & KÜHN, 1993).

A denominação da família tem origem no prefixo grego "nyct" que significa "pertencente à noite" e refere-se ao hábito de florescimento noturno de algumas plantas (MORHARDT & MORHARDT, 2004). Por esta mesma razão, algumas espécies (*Mirabilis jalapa*) são conhecidas na América do Norte como "flor-das-quatro". Em território brasileiro estão presentes dez gêneros e cerca de setenta espécies, pertencentes principalmente aos gêneros *Boerhavia*, *Bougainvillea*, *Mirabilis*, *Pisonia*, *Andradea*, *Neea* e *Guapira* (FURLAN, 1996; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Quadro 1.1: Gêneros pertencentes à família Nyctaginaceae (APG II, 2003)

Abronia	*Colignonia*	*Neeopsis*
Acleisanthes	*Commicarpus*	*Nyctaginia*
Allionia	*Cryptocarpus*	*Okenia*
Ammocodon	*Cuscatlania*	*Phaeoptilum*
Andradea	*Cyphomeris*	*Pisonia*
Anulocaulis	*Guapira*	*Pisoniella*
Belemia	*Grajalesia*	*Ramisia*
Boerhavia	*Izabalaea*	*Reichenbachia*
Bougainvillea	*Leucaster*	*Salpianthus*
Caribea	*Mirabilis*	*Selinocarpus*
Cephalotomandra	*Neea*	*Tripterocalyx*

Na família Nyctaginaceae estão presentes árvores, arbustos ou ervas, de folhas simples, inteiras, opostas, raramente alternas, pecioladas a sésseis, com venação pinada e sem estípulas. O mesofilo apresenta cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas, ráfides e areias cristalinas. As flores são normalmente hermafroditas ou unisexuadas, solitárias ou agregadas em inflorescências do tipo cimeira, panícula, ponto ou umbelas; fixadas axilar ou terminalmente, com perianto geralmente actinomorfo, tricíclicas. Brácteas possuem cor vibrante, tamanho pequeno, regulares, cíclicas, ovário súpero, unilocular, uniovulado. Estilete curto a elongado, raramente ausente, estigma variável em formato. Fruto aquênio ou de paredes finas (BARROSO et al., 1986).

Dois principais centros de distribuição foram observados para Nyctaginaceae: o primeiro na região neotropical e do Caribe, caracterizado por gêneros arborescentes, tais como, *Neea*, *Guapira*, *Pisonia* e *Bougainvillea*, bem como para herbáceas *Colignonia* e *Salpianthus*. O segundo situa-se nas zonas áridas da América do Norte, onde vários gêneros são nativos, incluindo *Boerhavia*, *Mirabilis*, *Abronia*, *Acleisanthes* e *Commicarpus*. Alguns gêneros são comuns em regiões tropicais e subtropicais do mundo (*Boerhavia*, *Commicarpus*, *Pisonia*). *Mirabilis* está presente na América do Norte e do Sul, com uma espécie na Ásia; *Acleisanthes somalensis* um membro disjunto da Somália. *Mirabilis* (*M. jalapa*, *M. oxybaphoides*) e *Bougainvillea* (*B. glabra*, *B. spectabilis*, *B. peruviana* e vários cultivares híbridos) estão naturalizadas em muitas partes do mundo. Apenas um gênero é restrito ao Velho Mundo, o *Phaeoptilum* no sudoeste da África (DOUGLAS, 2007).

O nome popular “maria-mole” é comum em muitas espécies arbóreas, em referência à baixa qualidade da madeira (LORENZI & SOUZA, 2005). Muito embora a família não apresente significativo valor econômico, algumas espécies são úteis como ornamental e medicinal, sendo pertencentes principalmente aos gêneros *Boerhavia*, *Mirabilis* e *Bougainvillea*.

Especialistas em Nyctaginaceae (FURLAN, 1996) comentam que, analisando os trabalhos sobre essa família, chama atenção a quase inexistência de chaves de identificação para as espécies da tribo Pisonieae e de especialistas em Nyctaginaceae. Além disso, levantamento bibliográfico realizado em diversas fontes (SciFinder Scholar, Web of Science, Pubmed, Chemical Abstracts, Medline) evidenciou o quão escassos são os estudos referentes à composição química e à ensaios comprobatórios de atividade farmacológica de espécies dessa família.

Dentre os poucos trabalhos existentes, pode-se citar os realizados com *Boerhaavia diffusa* Willd., pois ela figura como uma das espécies pertencentes à família Nyctaginaceae que foi melhor investigada quanto seu potencial químico-medicinal. É uma planta herbáceo-arbustiva nativa de regiões tropicais das Antilhas, América do Sul, Índia e África. É conhecida popularmente no Brasil como erva-tostão e na Índia e Ásia como punarvava, nome de origem sânscrita proveniente do termo "karoti shariram punarnavam", que significa "aquele que rejuvenesce o corpo" (WAHI et al., 1997).

Suas cascas e folhas são utilizadas popularmente no tratamento de inúmeras doenças, tais como, icterícia, anemia, asma, dispepsia e dor abdominal. Na medicina Ayurvedica as cascas são prescritas como diuréticas, expectorante, vermífuga, analgésica e revigorante da função renal (ASLAM, 1996; LAD, 1999; KIRTKAR & BASU, 1956; GOYAL et al., 2010). No Brasil a infusão das folhas é útil na expulsão de vermes, particularmente contra lombrigas ou usa-se a infusão de toda a planta no tratamento de hepatite e diarréia (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Estudos farmacológicos demonstraram algumas de suas propriedades farmacológicas, dentre elas, de elevação dos níveis de bile e atividade hepatoprotetora em ratos com hepatotoxicidade induzida por CCl_4 e por tioacetamida (CHANDAN et al., 1991; RAWAT et al., 1997); imunomodulatória em camundongos (MUNGANTIWAR et al., 1999), antiproliferativa e imunosupressora na análise sobre células NK (*natural killer*), produção de NO, de IL-2 (interleucina tipo 2), TNF-α (fator de necrose tumoral alfa) e IFN-γ (interferon gama) (MEHROTRA et al., 2002a; MEHROTRA et al., 2002b; PANDEY et al., 2005); antidiabética devido à hipoglicemia mediada por aumento na liberação de insulina em ratos diabéticos (PARI & SATHEESH, 2004; CHUDE et al., 2001; NALAMOLU et al., 2004); analgésica e antiinflamatória frente os testes de placa quente e ácido acético, possivelmente por ação do central tipo opióide (HIRUMA-LIMA et al., 2000); atividade antifibrinolítica e anti-inflamatória (BARTHVAL & SRIVASTAVA, 1990, 1991), melhorias na nutrição e regeneração renal (MISHRA & SINGH, 1980), quimiopreventiva (BHARALI et al., 2003), anti-tumoral e antimetastática em células de melanoma mamário (MANU et al., 2009; MANU et al., 2007; LEYON et al., 2005), sequestradora de radicais livres e inibidora da acetilcolinesterase (PEREIRA et al., 2009; RACHH et al., 2009); aumento da resistência à infecção por vírus fitopatogênicos em *Nicotiana tabacum* (AWASTI & VERMA, 2010; LOHANI et al., 2007) e antibacteriana contra *Bacilus cereus, B. megaterium* e *Staphylococcus aureus* (GIRISH & SATISH, 2008), dentre outras.

O potencial medicinal ainda se estende a outras espécies da família Nyctaginaceae. *B. coccinea* é popularmente utilizada no tratamento de distúrbios renais, hepáticos e do sistema urinário (BRAGA, 1960), enquanto que o chá das cascas de *B. erecta* mostrou atividade antimalárica em roedores infectados por *Plasmodium berghei* (HILOU et al., 2006). O chá das raízes de *Coligonia scandens* Benth. é utilizado medicinalmente como depurativo em peles com sarampo (DE FEO et al., 1998). As folhas de *Pisonia umbellifera* são empregadas no tratamento de envenenamentos e no controle de nematóides fitopatogênicos. *Mirabilis jalapa* apresenta, além do valor ornamental, propriedades antibacteriana e antiviral (KUSAMBA et al., 1991) e é utilizada na medicina tradicional chinesa no tratamento de artrite, inflamação e outros (HOW, 1998). O extrato aquoso das folhas de *Boldoa purpurascens* apresentou atividades antibacteriana, diurética e anti-inflamatória (GONZALEZ et al., 2001; ABRAHAM et al., 1980; MISAS et al., 1980). *Neea theifera* foi apontada em estudos etnofarmacológicos com atividade antidiarréica e contra entero-colites (CORREA, 1984; ELVIN-LEWIS & LEWIS, 1983) e anticárie (DUKE & MARTINEZ, 1994). Levantamento etnofarmacológico realizado pela Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu-SP, revelou também o uso dessa espécie no tratamento de úlceras.

Apesar do potencial medicial acima mencionado, ainda são escassos os estudos de caracterização químico-biológica com outras espécies de plantas pertencentes à família Nyctaginaceae. Foram relatados alguns rotenóides, flavonóis, flavonas, isoflavonas, lignanas, terpenos, esteróides, saponinas, alcalóides, xantonas, peptídeos, dentre outros. Ademais, a família é conhecida por produzir betalaínas e não antocianinas, pigmentos restritos à plantas da ordem Caryopyllales e a certos fungos (TANAKA et al., 2008). Um panomara dos compostos já isolados e atividades biológicas mencionadas está apresentado no quadro 1.2 e figuras 1.1 a 1.13.

Quadro 1.2: Panorama químico representativo de plantas da família Nyctaginaceae

Espécie	Substâncias presentes*	Referência
Abronia latifolia	F4	WOLLENWEBER et al., 1993
Boerhaavia coccinea	R1, R2	MESSANA et al.,1986
	R15, R16	FERRARI & MESSANA, 1991
	R18	SANTOS et al., 1998
Boerhaavia diffusa	E1 a E8	KADOTA et al., 1989
	F1	GUPTA & AHMED, 1984
	L1, L2	LAMI et al., 1991b
	N1, N2	NANDI & CHATTERJEE, 1974
	N3	OJEWOLE & ADESINA, 1983
	N4	ASLAM, 1996
	R3, R4	KADOTA et al., 1989
	R5	KADOTA et al., 1988; LAMI et al., 1990
	R6, R7, R8	LAMI et al., 1991a
	R9, R10	BORELLI et al., 2005
	R17	BORELLI et al., 2006
	X1	AHMED & YU, 1992
	P1	JAIN & KHANNA, 1989
Boldoa purpurascens	F15 a F18	MOSQUERA et al., 2008
Bougainvillea glabra	B9 a B16	HEUER et al., 1994
	F6	PRICE & ROBINSON, 1937
Bougainvillea spectabilis	S8 a S10	AHMED, 2009
Boerhaavia repens	E1	AHMED et al., 1990
	N1, N2	NANDI & CHATTERJEE, 1974
	R11, R12	AHMED et al., 1990
	T1, T2	AHMED et al., 1990
Colignonia scandens	S2 , S3	DE FEO et al., 1998
Mirabilis jalapa	B1 a B8	PIATELLI et al., 1965
	F5	YANG et al., 2001
	N5	MICHALET et al., 2007
	N6	YI-FEN et al., 2002
	R13, R14	YANG et al., 2001
	R19 a R22	YI-FEN et al., 2002
Mirabilis viscosa	F13, F14, F19 a F43	WOLLENWEBER & DOR, 1996
Mirabilis himalaica	G1, G2	ZHANG et al., 1997
Neea theifera	F7 a F14	RINALDO et al., 2007
Pisonia umbellifera	S1 a S7	LAVAUD et al., 1996

(*) Classe de substância: betalaína (B), esteróide (E), flavonóide (F), glicolipídeo (G), lignana (L), composto nitrogenado (N), polifenol (P), rotenóide (R), saponina (S), terpenóide (T), xantona (X)

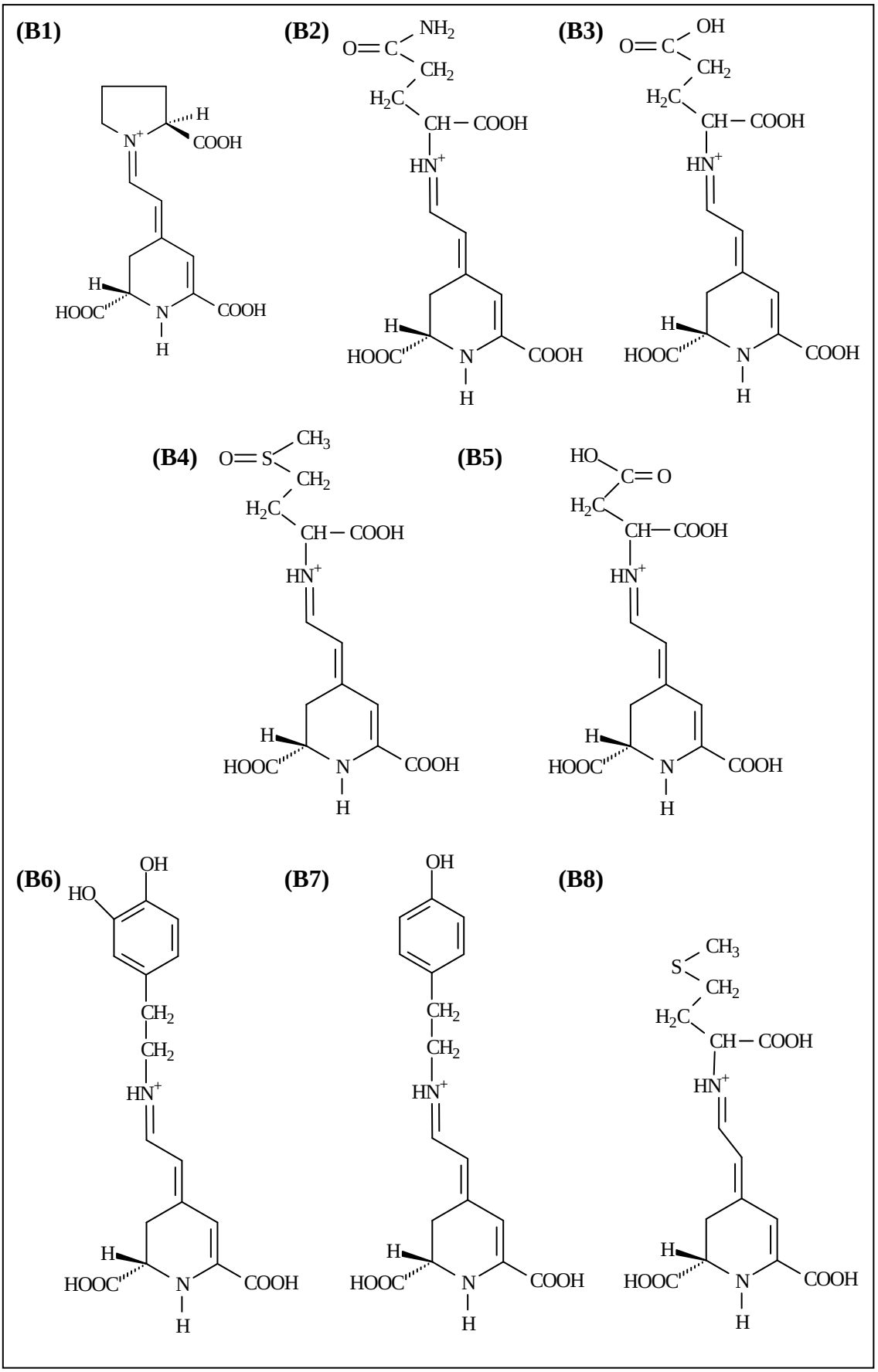
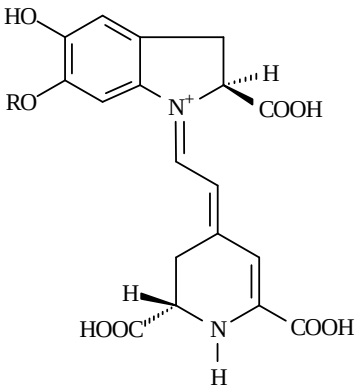
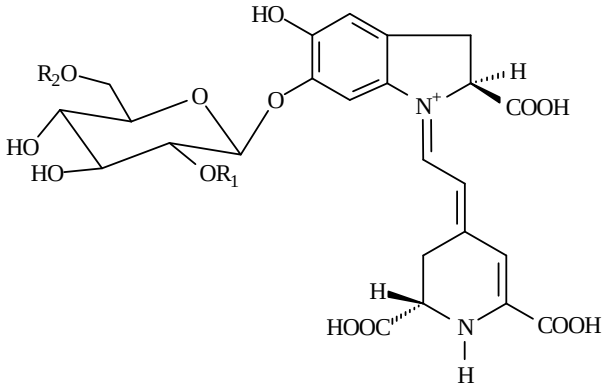


Fig. 1.1: Betalaínas (betaxantinas) em plantas da família Nyctaginaceae (PIATELLI et al., 1965)

(B9) R= β-D-glicopiranosídeo



(B10) R_1= β-D-glicopiranosídeo, R_2= H
(B11) R_1= β-D-glicopiranosídeo, R_2= cafeiola
(B12) R_1= β-D-glicopiranosídeo, R_2= cumaroila



(B13) R_1=R_3= H, R_2= cumaroila
(B14) R_1= β-D-glicopiranosídeo, R_2= cumaroila, R_3= cafeioila
(B15) R_1= β-D-glicopiranosídeo, R_2= R_3= cumaroila
(B16) R_1= H, R_2= R_3= cumaroila

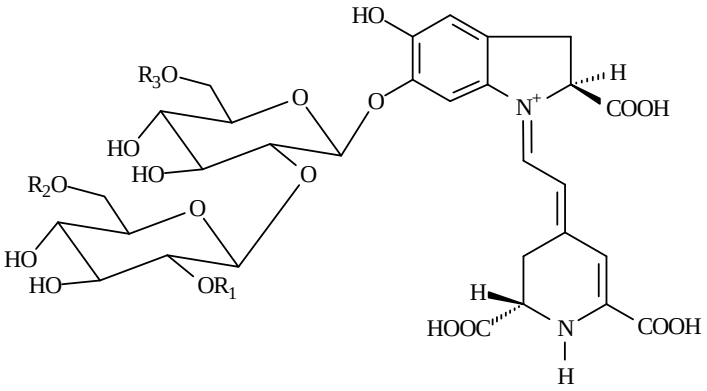
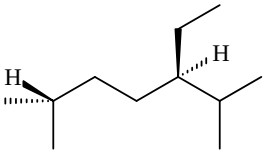
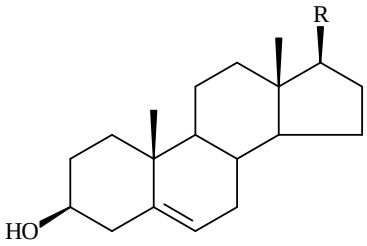


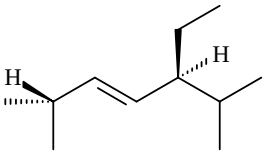
Fig. 1.2: Betalaínas (betacianinas) em plantas da família Nyctaginaceae (HEUER et al., 1994)

(E1) R=

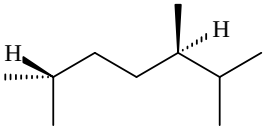


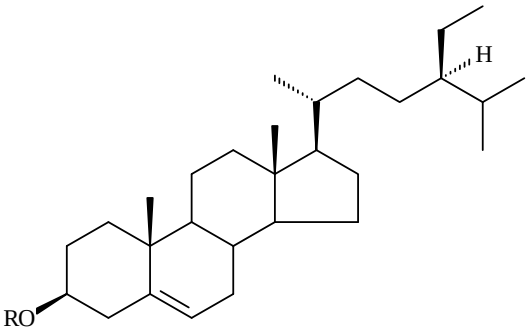


(E2) R=

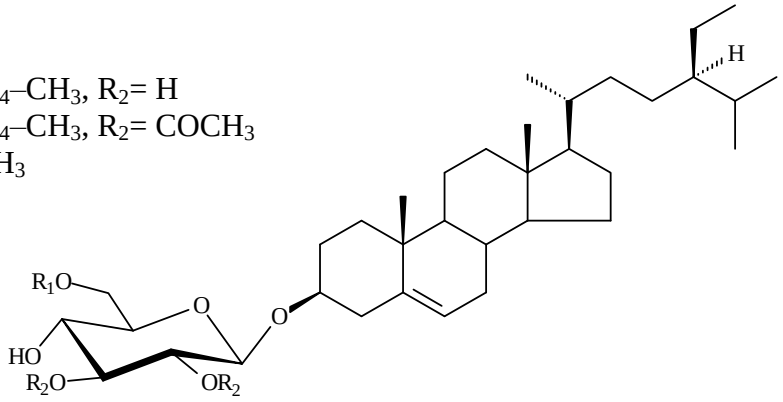


(E3) R=





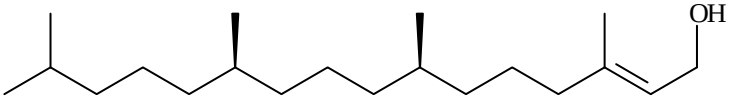
(E4) R= $CO(CH_2)_{14}–CH_3$
(E5) R= $CO(CH_2)_7=CH–(CH_2)_7–CH_3$



(E6) $R_1= CO(CH_2)_{14}–CH_3$, $R_2= H$
(E7) $R_1= CO(CH_2)_{14}–CH_3$, $R_2= COCH_3$
(E8) $R_1= R_2= COCH_3$

(KADOTA et al., 1989)

(T1)
(AHMED et al., 1990)



(T2)
(AHMED et al., 1990)

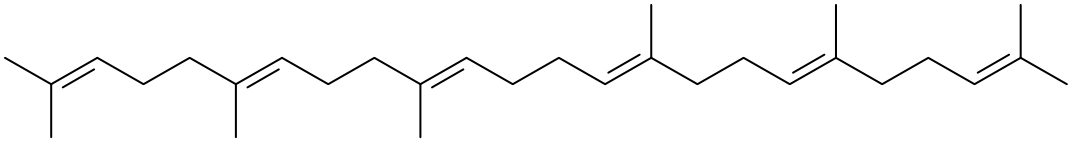
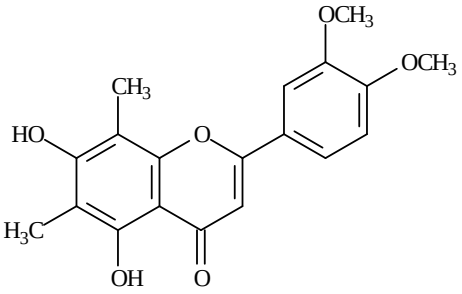
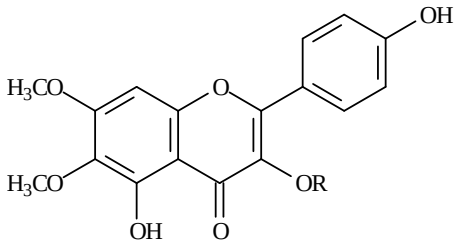


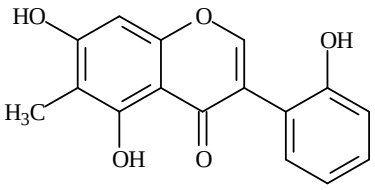
Fig. 1.3: Esteróides e Terpenóides em plantas da família Nyctaginaceae



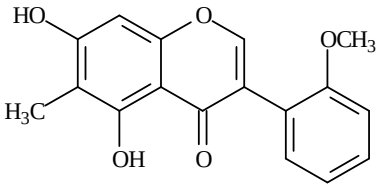
(F1)
(GUPTA & AHMED, 1984)



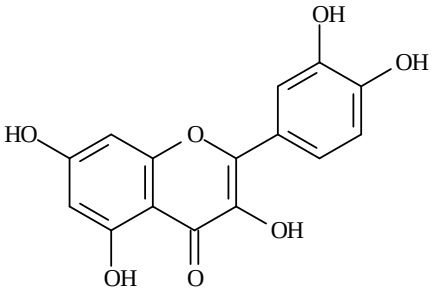
(F2) R= H
(F3) R= *β*-D-galactopiranosídeo



(F4) abronisoflavone
(WOLLENWEBER et al., 1993)



(F5)
(YANG et al., 2001)



(F6)
(PRICE & ROBSON, 1937)

(F7) R_1=R_3= H, R_2= *β*-D-glicopiranosídeo
(F8) R_2=R_3= H, R_1= *β*-D-glicopiranosídeo
(F9) R_1= *β*-D-glicopiranosídeo, R_2= H, R_3= OH
(F10) R_1=R_2= *β*-D-glicopiranosídeo, R_3= H
(F11) R_1= H, R_2= *β*-D-glicopiranosídeo, R_3= OH
(F12) R_1=R_2= H, R_3= OCH_3
(F13) R_1= R_2= H, R_3= OH
(F14) R_1= R_2= H, R_3= H
(RINALDO et al., 2007)

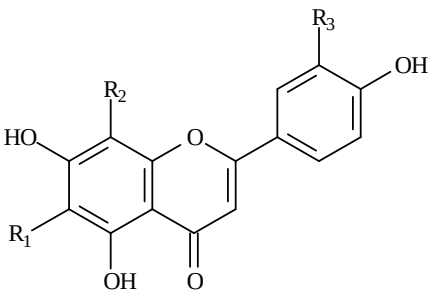
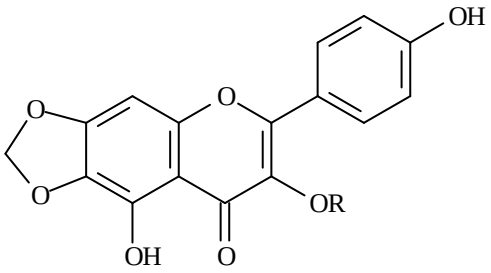
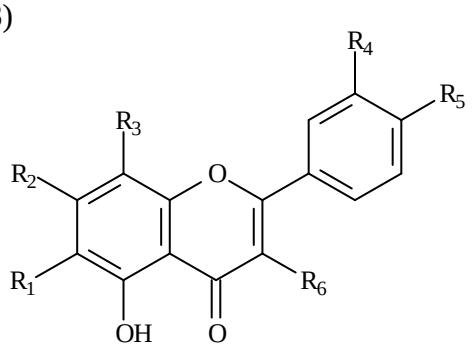


Fig. 1.4: Flavonóides em plantas da família Nyctaginaceae

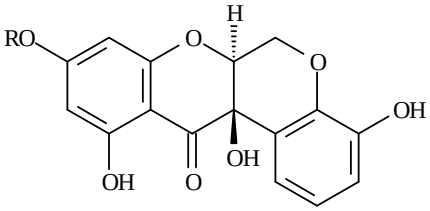


(F15) R= *β*-D-xilopiranosídeo-(2’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rhamnopiranosídeo
(F16) R= *β*-D-xilopiranosídeo
(F17) R= *β*-D-glicopiranosídeo-(2’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rhamnopiranosídeo
(F18) R= *β*-D-glicopiranosídeo
(MOSQUERA et al., 2008)

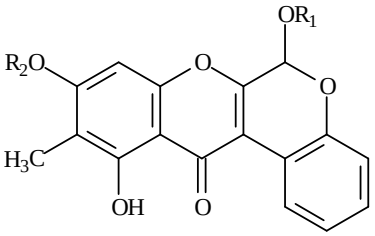


(F19) R_1= R_3= R_4= R_6= H, R_2= OCH_3, R_5= OH
(F20) R_1= R_3= R_4= R_6= H, R_2= OH, R_5= OCH_3
(F21) R_1= R_3= R_4= R_6= H, R_2= R_5= OCH_3
(F22) R_1= R_2= OCH_3, R_3= R_4= R_6= H, R_5= OH
(F23) R_1= R_3= R_6= H, R_2= R_5= OH, R_4= OCH_3
(F24) R_1= R_3= R_6= H, R_2= R_4= OCH_3, R_5= OH,
(F25) R_1= R_3= R_4= H, R_2= R_5= R_6= OH
(F26) R_1= R_3= R_4= H, R_2= R_5= OH, R_6= OCH_3
(F27) R_1= R_3= R_4= H, R_5= R_6= OH, R_2= OCH_3
(F28) R_1= R_3= R_4= H, R_2= R_6= OH, R_5= OCH_3
(F29) R_1= R_3= R_4= H, R_2= R_6= OCH_3, R_5= OH
(F30) R_1= R_3= R_4= H, R_2= OH, R_5= R_6= OCH_3
(F31) R_1= R_3= R_4= H, R_2= R_5= OCH_3
(F32) R_1= R_3= R_4= H, R_2= R_5= R_6= OCH_3
(F33) R_1= R_2= R_5= OH, R_3= R_4= H,
(F34) R_1= R_5= OCH_3, R_3= R_4=H, R_2= R_6= OH
(F35) R_1= R_3= H, R_2= R_4= R_5= OH, R_6= OCH_3
(F36) R_1= R_3= H, R_2= R_5= R_6= OH, R_4= OCH_3
(F37) R_1= R_3= H, R_4= R_5= OH, R_2= R_6= OCH_3
(F38) R_1= R_3= H, R_2= R_5= OH, R_4= R_6= OCH_3
(F39) R_1= R_3= H, R_2= R_4= OCH_3, R_5=R_6= OH
(F40) R_1= R_3= H, R_2= R_4= R_6= OCH_3, R_5= OH
(F41) R_1= R_3= H, R_2= R_4= R_5= OCH_3, R_6= OH
(F42) R_1= R_3= H, R_2= R_4= R_5= R_6= OCH_3
(F43) R_1= R_4= R_6= OCH_3, R_2= R_5= OH, R_3= H
(WOLLENWEBER & DORR, 1996)

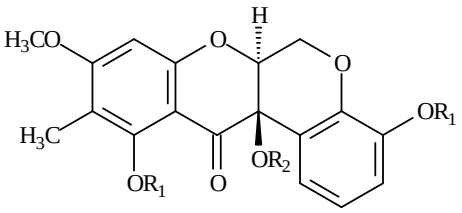
Fig. 1.5: Flavonóides em plantas da família Nyctaginaceae



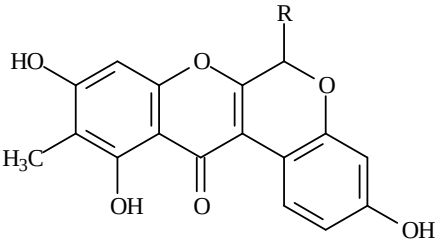
(R1) R= CH_3
(R2) R= H
(MESSANA et al., 1986)



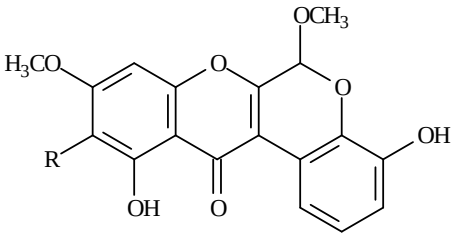
(R3) R_1= CH_3, R_2= H
(R4) R_1= R_2= H
(KADOTA et al., 1989)



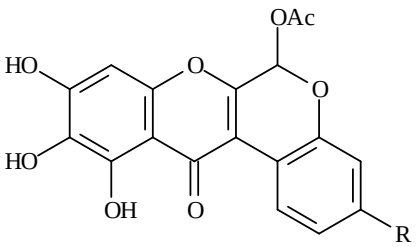
(R5) R_1= R_2= H
(KADOTA et al., 1988; LAMI et al., 1990)



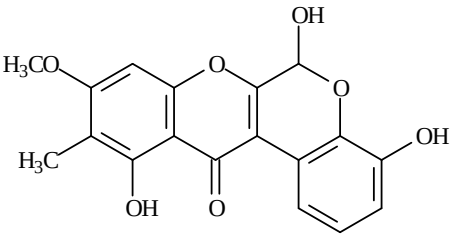
(R6) R= OCH_3
(R7) R= OH
(R8) R= O (C=O)
(LAMI et al., 1991a)



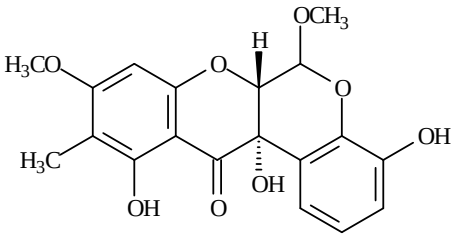
(R9) R= H
(R10) R= CH_3
(BORELLI et al., 2005)



(R11) R= H
(R12) R= OH
(AHMED et al., 1990)

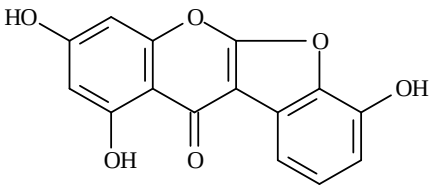


(R13)
(YANG et al., 2001)

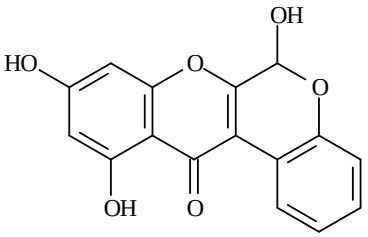


(R14)
(YANG et al., 2001)

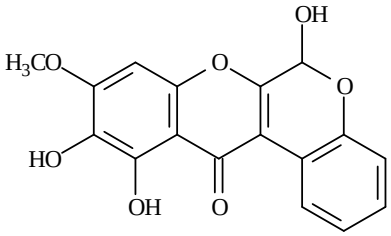
Fig. 1.6: Flavonóides (rotenóides) em plantas da família Nyctaginaceae



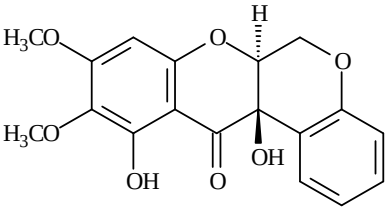
(R15)
(FERRARI & MESSANA, 1991)



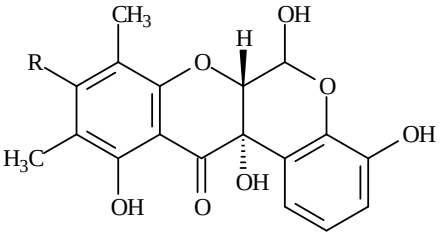
(R16)
(FERRARI & MESSANA, 1991)



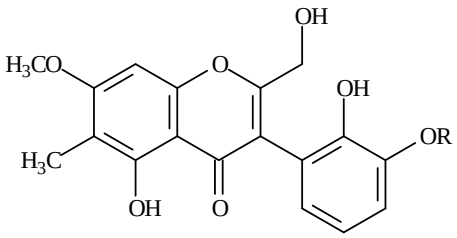
(R17)
(BORELLI et al., 2006)



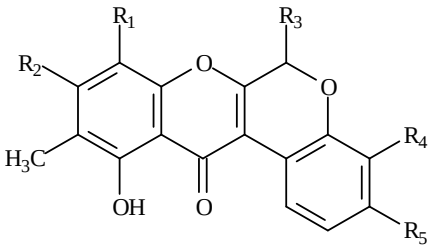
(R18)
(SANTOS et al., 1998)



(R19) R= OCH_3
(YI-FEN et al., 2002)



(R20) R= β-D-glucopiranosídeo
(YI-FEN et al., 2002)

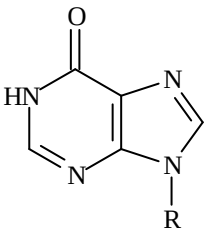


(R21) R_1= CH_3 R_2=R_3=R_4= OH, R_5= H
(R22) R_1=R_4= H, R_2= OCH_3, R_3=R_5= OH
(YI-FEN et al., 2002)

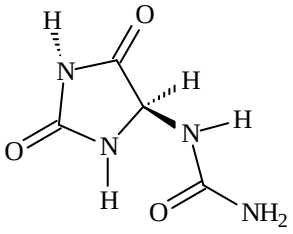
Fig. 1.7: Flavonóides (rotenóides) em plantas da família Nyctaginaceae

(N1) punarnavive-1
(N2) punarnavine-2
(NANDI & CHATTERJEE, 1974)

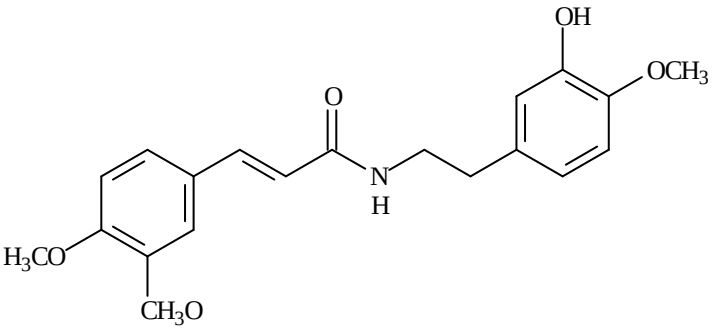
(N3) R= α-L-arabinofuranosídeo
(OJEWOLE & ADESINA, 1983)



(N4)
(ASLAM, 1996)



(N5)
(KUSAMBA et al., 1991)



(N6)
(YI-FEN et al., 2002)

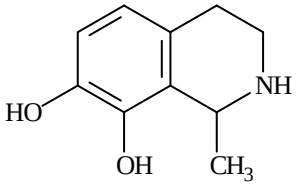
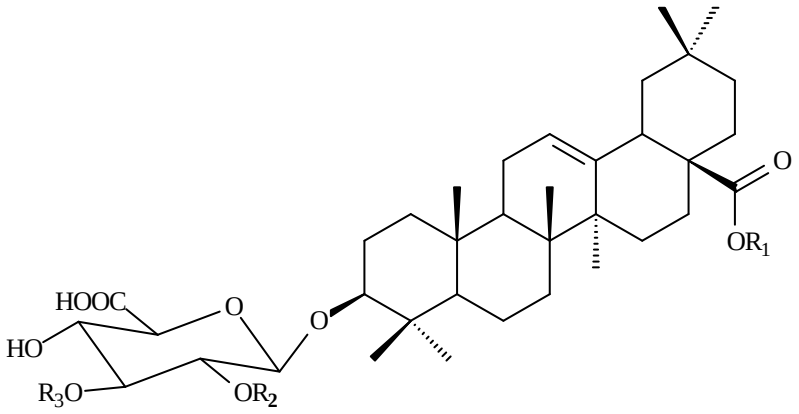
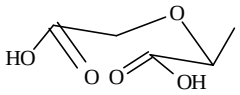
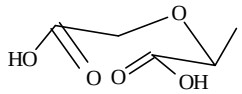
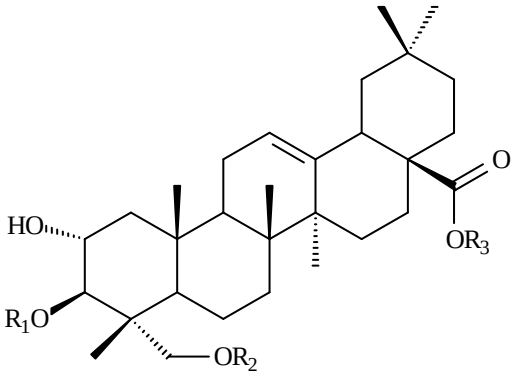


Fig. 1.8: Compostos nitrogenados em plantas da família Nyctaginaceae



	R_1	R_2	R_3
(S1)	H	H	H
(S2)	*β*-D-glic	H	H
(S3)	*β*-D-glic	*β*-D-glic	H
(S4)	*β*-D-glic	*β*-D-glic	*β*-D-xil
(S5)	*β*-D-glic	*β*-D-glic	*β*-D-xil-(2'→1''')-*β*-D-glic
(S6)	*β*-D-glic	H	
(S7)	H	H	

(DE FEO et al., 1998; LAVAUD et al., 1996)



	R_1	R_2	R_3
(S8)	*α*-L-rha-(1→2)-*α*-L-ara	CH_2OH	*α*-L-rha-(1→4)-*β*-D-glic-(1→6)-*β*-D-glic
(S9)		CH_3	H
(S10)	*β*-D-glic	CH_2OH	

(AHMED, 2009)

Fig. 1.9: Saponinas em plantas da família Nyctaginaceae

(G1) n= 23
(G2) n= 24

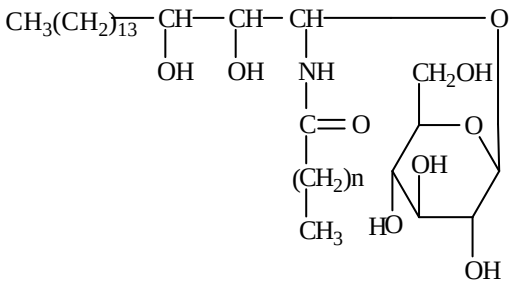


Fig. 1.10: Glicolipídeos em plantas da família Nyctaginaceae (ZHANG et al., 1997)

(L1) R_1=R_2= β-D-glicopiranosídeo
(L2) R_1= β-D-glicopiranosídeo, R_2= H

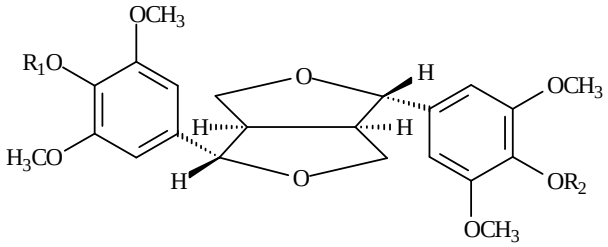


Fig. 1.11: Lignanas em plantas da família Nyctaginaceae (LAMI et al., 1991b)

(P1)

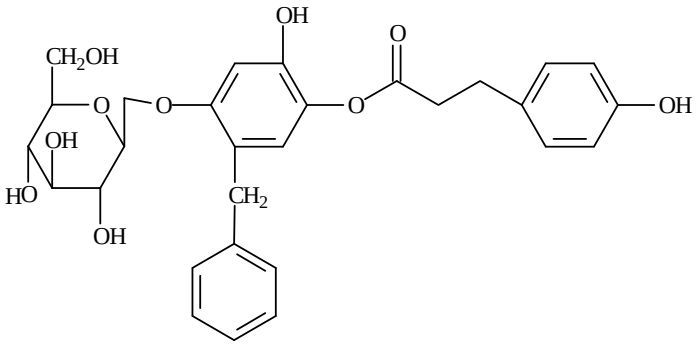


Fig. 1.12: Polifenóís em plantas da família Nyctaginaceae (JAIN & KHANNA, 1989)

(X1)

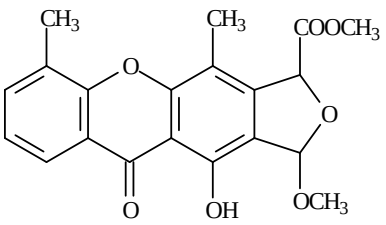


Fig. 1.13: Xantonas em plantas da família Nyctaginaceae (AHMED & YU, 1992)

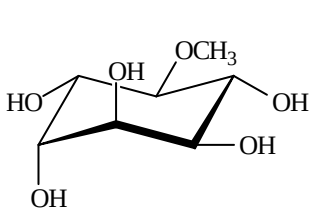
1.2. O gênero *Guapira*

O gênero *Guapira* foi descrito pela primeira vez por Aublet em 1775 e no Brasil há mais de dez espécies distribuídas em quase todos os biomas. Verifica-se uma baixa freqüência na região amazônica, tendo sido coletados poucos exemplares de *G. opposita* e *G. hirsuta* bem como um número maior de exemplares de *G. venosa*. Outras coletas esporádicas foram registradas com *G. graciliflora* e *G. opposita* no estado de Rondônia, indicando que estas espécies podem estar começando a colonizar novas áreas. Na região litorânea encontram-se as espécies *G. hirsuta*, *G. nitida*, *G. obtusata*, *G. opposita* e *G. pernambucensis*, enquanto que na caatinga ou restinga encontram-se preferencialmente *G. laxa* e nos campos de altitude e rupestres, *G. tomentosa*. Por fim, nas regiões de cerrado ocorrem principalmente as espécies *G. areolata, G. campestris, G. graciliflora* e *G. noxia* (FURLAN, 1996).

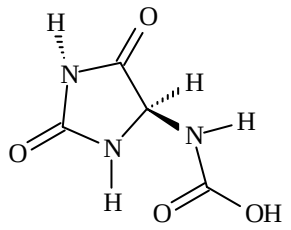
Dados do programa Biota/FAPESP (SINBIOTA, 2006) mostram que no estado de São Paulo já foram coletadas oito espécies de *Guapira*: *G. tomentosa, G. hirsuta*, *G. noxia, G. opposita, G. nitida, G. olfersiana, G. graciliflora* e *G. areolata*. Uma vez que, surpreendentemente, não havia nenhum registro de estudo químico ou biológico do gênero, nosso grupo de pesquisa iniciou sua investigação na tentativa de avaliar o potencial químico-medicinal. O interesse em estudar espécies de *Guapira* também reside no fato desta família possuir taxonomia conflitante, especialmente para diferenciação com o gênero *Neea*. As subdivisões propostas para o gênero, que têm sido aceitas por quase todos os pesquisadores, são baseadas exclusivamente em caracteres anatômicos e morfológicos, principalmente das folhas e flores (FURLAN, 1996). Apesar disso, muitas vezes é difícil separar espécies dos gêneros *Neea* e *Guapira*, como demonstram inúmeras identificações incorretas em herbários.

No nosso caso em particular, os resultados desta investigação poderão ser comparados àqueles obtidos por outro componente do grupo que investigou espécies de *Neea* (RINALDO et al., 2007), dentro do projeto temático BIOTA-FAPESP.

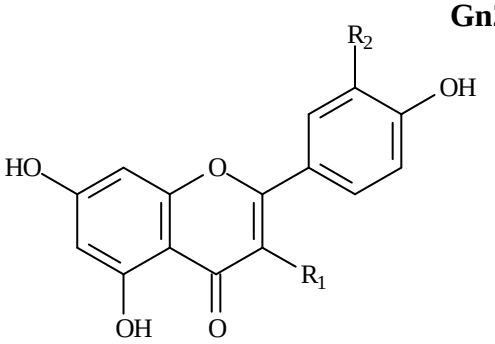
Em trabalhos anteriores foi iniciado esrtudo químico-biológico do gênero *Guapira*, a partir da espécie *G. noxia*. Estes estudos revelaram as atividades antiúlceras, anti-inflamatória, antimicrobiana e moduladora do sistema imunológico com os extratos dessa espécie e foram isolados principalmente flavonóides (SEVERI, 2007) (Figura 1.14). Dessa forma, neste trabalho foi dada continuidade ao estudo de *G.noxia* e inicou-se o estudo com *G. opposita* e *G. gracililflora.*



Gn1



Gn2



	R_1	R_2
Gn3	*O*-*β*-D-glic-(6’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rha	OH
Gn4	*O*-*β*-D-glic-(6’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rha	OCH_3
Gn5	*O*-*β*-D-gal-(6’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rha	OCH_3
Gn6	*O*-*β*-D-glic-(2’’→1’’’)-*O*-*β*-D-api-(6’’→1’’’’)-*O*-*α*-L-rha	OH
Gn7	*O*-*β*-D-gal-(2’’→1’’’)-*O*-*β*-D-api-(6’’→1’’’’)-*O*-*α*-L-rha	OH
Gn8	*O*-*β*-D-glic-(2’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rha-(6’’→1’’’’)-*O*-*α*-L-rha	OH
Gn9	*O*-*β*-D-gal-(2’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rha-(6’’→1’’’’)-*O*-*α*-L-rha	OH
Gn10	*O*-*β*-D-glic-(6’’→1’’’)-*O*-*α*-L-rha	H

Fig. 1.14. Substâncias presentes no EMeOH das folhas de *G. noxia* (SEVERI, 2007)

Guapira opposita (Vell.) Reitz (Figura 1.15) é conhecida popularmente como maria-mole, farinha-seca, Ciriba e/ou pau-piranha branco.

É uma espécie arbórea, dióica que pode chegar a 25 m de altura, dotada de copa alongada e pouco densa. Apresenta tronco tortuoso, revestido por casca fina quase lisa. As folhas são simples, opostas, subcoriáceas e semi-carnosas, muito variáveis em tamanho e forma, mais frequentemente elípticas, ou oblongas, com cerca de 6 cm de comprimento e 3 cm de largura, glabras. O fruto é do tipo drupa ovalada, de cor vinácea e polpa suculenta quando maduro. A madeira é do tipo pesada, macia, de baixa resistência mecânica podendo ser empregada localmente na construção civil e marcenaria leve. Os frutos são muito procurados por pássaros, que são seus disseminadores. Também é utilizada para a composição de reflorestamentos mistos destinados à recuperação de áreas degradadas. Seu desenvolvimento no campo é considerado lento (LORENZI, 1998; DURIGAN et al., 2004).



Fig. 1.15: *Guapira opposita* (Vell.) Reitz com ampliação das flores, frutos e sementes (LORENZI, 1998; SILVA JUNIOR, 2005)

Guapira graciliflora (Mart. ex J. A. Schimidt) Lundell (Figura 1.16), conhecida popularmente como maria-mole e pau-piranha, pode ser encontrada como árvore, arvoreta ou até arbusto de 0,3-8 m de altura, dióica, sem exudação ao se destacar a folha. Possui copa do tipo globosa, densa, dotada de gemas terminais e laterais cobertas com pilosidade ferrugínea. As folhas apresentam grande variabilidade morfológica. Em geral, são de formato oblongo a elíptico, de base e ápice agudos, obtusa ou arredondada, opostas, inteiras, coriáceas, membranáceas quando secas, rígidas, com nervura principal proeminente amarelada, glabras em ambas as faces. Os frutos são em forma de drupa elipsóide, de cor vermelho-vinácea, levemente pubescente e são apetecidos por diversas espécies de pássaros. O tronco geralmente é ereto e cilíndrico, revestido por casca grossa e fissurada quase lisa. A madeira é leve, muito flexível, pouco resistente e sujeita ao rápido apodrecimento quando exposta (LORENZI, 1998; SILVA JUNIOR, 2005).



Fig. 1.16: *Guapira graciliflora* (Mart. ex J. A. Schimidt) Lundell com ampliação das flores, frutos e sementes (LORENZI, 1998; SILVA JUNIOR, 2005)

Guapira noxia (Netto) Lundell (Figura 1.17) é conhecida popularmente como pao-judeo, pao-lepra, joão-mole, capa-rosa, joão-mole-do-campo e encontrada como árvore pequena (2-4 m de altura), dióica, decídua e sem exudação ao se destacar a folha. As folhas são simples, opostas, cruzadas, coriáceas, de formato largo-ovadas, largo-oblongas ou largo-elípticas de 6-16 cm de comprimento e 3-8 cm de largura, ápices obtusos, agudos ou acuminados e bases agudas ou obtusas, com ou sem pêlos ferrugíneos. Margens inteiras ou onduladas, nervura central amarelada. As folhas apresentam oxidação preta ao se trincarem dos galhos. Possui gemas apicais revestidas por pilosidades ferrugíneas. Os frutos são de formato elipsóide e vermelhos quando maduros. O tronco apresenta até 15 cm de diâmetro com cristas e fissuras descontínuas e sinuosas que formam blocos irregulares e veios profundos. A madeira é flexível e de baixa resistência. Os frutos alimentam a fauna e a espécie é útil na recuperação de áreas degradadas por atrair aves (DURIGAN et al., 2004; FURLAN, 1996).



Fig. 1.17: *Guapira noxia* (Netto) Lundell com ampliação das flores, frutos e sementes (DURIGAN et al., 2004; SILVA JUNIOR, 2005)

Com relação à distribuição destas espécies no Brasil, verifica-se que *G. graciliflora* ocorre em Campo cerrado, Cerrado sentido restrito, Cerradão e Bordas de mata de galeria. As plantas desta espécie que ocorrem em regiões sujeitas a fogo florescem rápido, às vezes com apenas 30 cm de altura. *G. noxia* ocorre em Campo sujo, Campo cerrado, Campo rupestre, Cerrado sentido restrito, Cerradão e Bordas de matas de galeria. *G. opposita* possui a distribuição mais ampla dentro do gênero, já encontrada em quase todos os estados do Brasil e em especial na Mata Atlântica (FURLAN, 1996; SILVA JUNIOR, 2005).

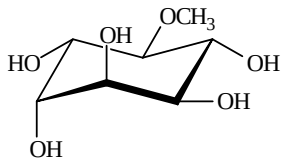
Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade de Mumbuca-Jalapão revelou o uso de *G. graciliflora* como cicatrizante (COELHO & SANTOS, 2007; COELHO et al., 2005). Em outro trabalho, verificou-se em *G. opposita* atividade antimicrobiana contra *Cladosporium cladosporides* (MORENO et al., 2004).

Um aspecto de interesse ecológico refere-se à observação feita por Delitti e colaboradores (2007) com o fato de que, tanto em Campo cerrado quanto em Cerradão, algumas espécies de Nyctaginaceae (*Guapira* e *Neea*) apresentaram as maiores concentrações de nitrogênio por massa foliar, o que pode estar relacionado à maior proteção contra a herbivoria (DELITTI ET al., 2007). Após um estudo realizado na Floresta Atlântica, Aidar (2000) verificou que *G. opposita* apresentou elevado teor de nitrogênio foliar, em quantidade quase comparável à encontrada em Leguminosas. Segundo o mesmo autor, essa característica também deve ser importante como estratégia de adaptação específica e de ocupação no ecossistema (AIDAR, 2000).

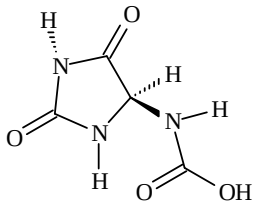
Outra característica interessante encontrada em *G. opposita* é sua capacidade biacumuladora. Atualmente, há um crescente interesse em pesquisas ambientais relacionadas ao estudo de organismos bioacumuladores, como ferramenta para monitoração da poluição por elementos químicos. Plantas bioacumuladoras naturalmente concentram elementos químicos em maior quantidade em comparação com as demais espécies ocorrentes em um mesmo *habitat*, sendo reflexo de sua habilidade de concentrar e das características do meio. A bioacumulação foliar de elementos químicos foi verificada em *G. opposita*, principalmente os elementos Na (FRANÇA et al., 2007a; 2007b), Sr (*ca*. 350 mg/kg), Rb (*ca*. 70 mg/kg), Br (*ca*. 40 mg/kg), K (*ca*. 20 mg/kg) e Ca (*ca*. 15 mg/kg) (FERRARI, 2004).

Esse conjunto de informações estimulou a investigação de espécies de *Guapira*, na tentativa de se obter informações químico-biológicas relevantes sobre o gênero e/ou que possam contribuir com a quimiotaxonomia da família Nyctaginaceae.

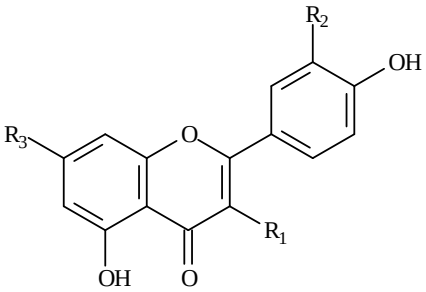
As Figuras 1.18, 1.19 e 1.20 apresentam as estruturas das substâncias isoladas/identificadas nas espécies estudadas e discutidas neste trabalho. Os compostos isolados de *G. noxia*, *G. opposita* e *G. graciliflora* foram nomeados, respectivamente com os códigos Gn, Go e Gg.



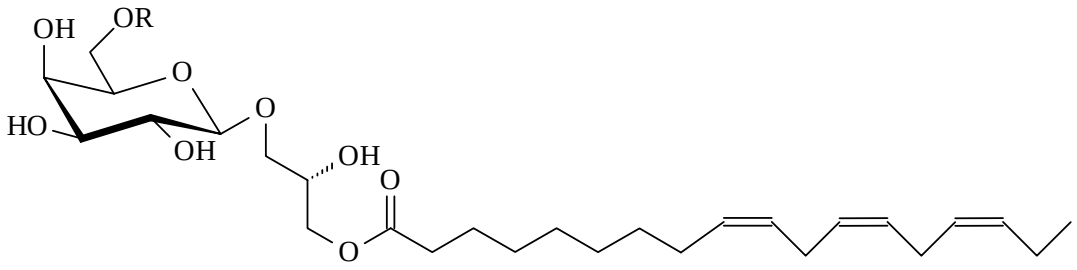
Go1



Go2



	R_1	R_2	R_3
Go3	*O*-*β*-D-glic-(6’’→1’’’)-*α*-L-rha	OH	OH
Go4	H	OH	*O*-*β*-D-glic
Go5	*O*-*β*-D-glic	OH	OH
Go6	H	OH	OH
Go7	OH	OH	OH
Go10	*O*-*β*-D-glic-(6’’→1’’’)-*α*-L-rha	H	OH
Go11	*O*-*β*-D-glic-(6’’→1’’’)-*α*-L-rha	OCH_3	OH
Go12	H	H	*O*-*β*-D-glic
Go13	H	OCH_3	*O*-*β*-D-glic
Go14	*O*-*α*-L-ara	OH	OH
Go15	H	OCH_3	OH



	R
Go8	*α*-D-gal
Go9	H

Fig. 1.18: Substâncias isoladas de *G. opposita* discutidas neste trabalho

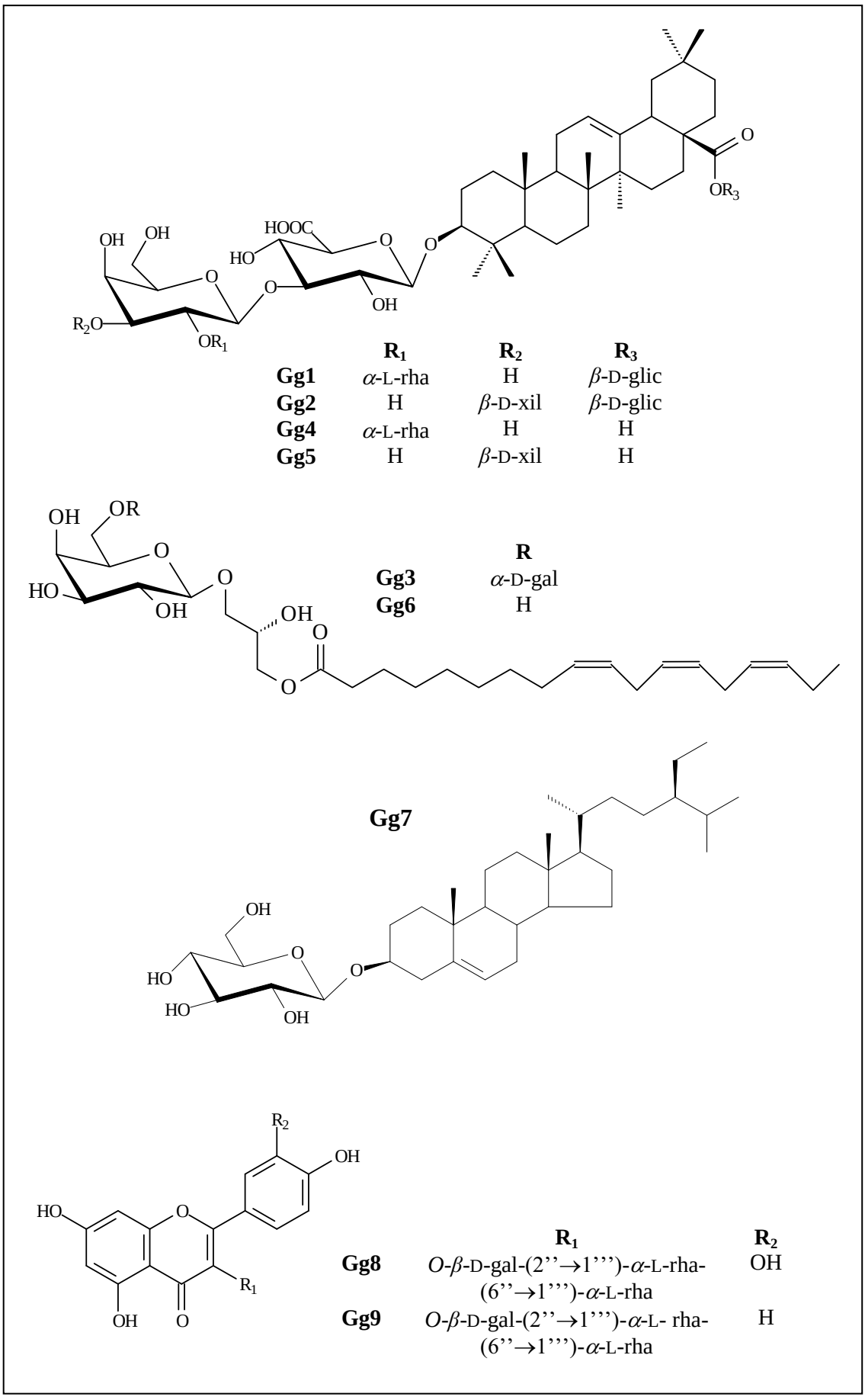
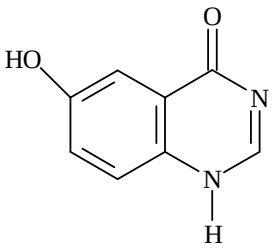
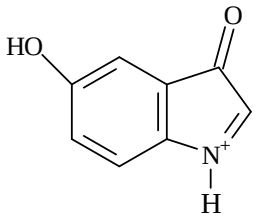


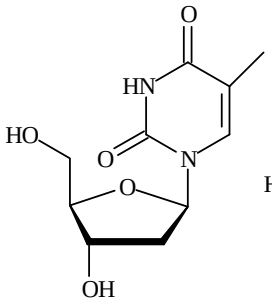
Fig. 1.19: Substâncias isoladas de *G. graciliflora* discutidas neste trabalho



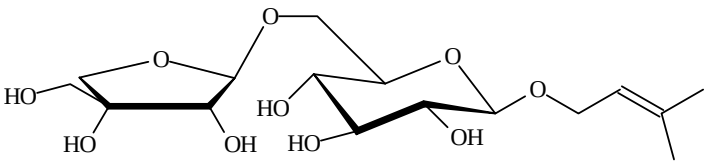
Gn11 - A



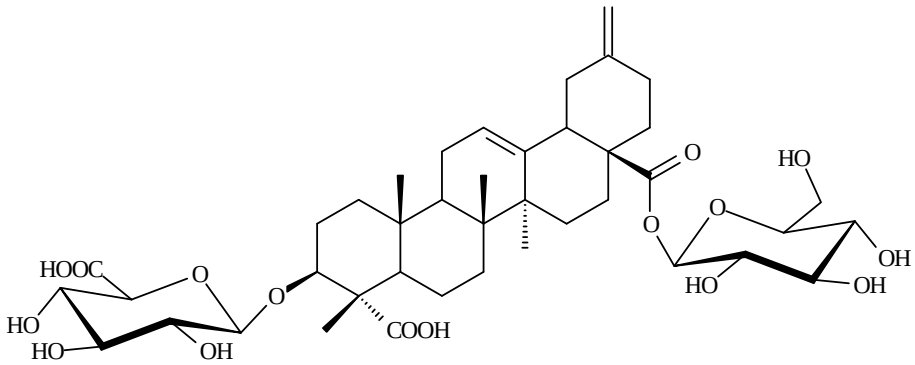
Gn11 - B



Gn12



Gn13



Gn14

Fig. 1.20: Substâncias isoladas de *G. noxia* discutidas neste trabalho

2. OBJETIVOS

O presente estudo visa contribuir com o aumento do conhecimento sobre a composição química e atividades biológicas de espécies brasileiras, particularmente das pertencentes ao gênero *Guapira*. Esse trabalho está engajado no projeto temático BIOTA-FAPESP (02/05503-6). Foram estabelecidos alguns objetivos:

I. Isolar e/ou caracterizar os metabólitos secundários presentes nos extratos das folhas de *G. noxia*, *G. opposita* e *G. graciliflora;*
II. Avaliar o mecanismo de proteção antiulcerogênica do EMeOH de *G. noxia* e os potenciais antimicrobiano, citotóxico e mutagênico nos extratos dessas espécies.

3. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Solventes

- ✓ Solventes grau PA: *n*-hexano, acetato de etila, ácido acético, clorofórmio, metanol, *n*-butanol, *n*-propanol, ácido sulfúrico (Synth® e Quemis®);
- ✓ Solventes grau HPLC: *n*-hexano, acetato de etila, metanol, acetonitrila (Mallinckrodt®, JT Baker® e Tedia®), água purificada em sistema Milli-Q Progard 2 (Millipore®) e ácido trifluoracético (Tedia®);
- ✓ Solventes deuterados: DMSO-d_6 e D_2O (Sigma Aldrich®).

Equipamentos e sistemas cromatográficos

- ✓ Moinho de facas Marconi®;
- ✓ Estufa Marconi® MA033;
- ✓ Câmara de Luz UV Procidicil®;
- ✓ Espectrofotômetro Shimadzu® FT–IR 8300 e Jasco® FT-IR 4100;
- ✓ Espectrofotômetro HACH® UV–Vis DR4000;
- ✓ Polarímetro Jasco® P1020 e Perkin Elmer® 341;
- ✓ Agitador de tubos AP56 Phoenix®;
- ✓ Centrífuga CELM®, modelo COMBATE, a 2500 rpm;
- ✓ Banho ultrassônico Unique® USC1850 e USC14000;
- ✓ Micropipetas Gilson Pipette® P20, P200 e P1000;
- ✓ Balanças semi-analítica Marte® AL200C e de precisão Quimis® BG4000;
- ✓ Rotaevaporador Heidolph® Laborata 4001, 4000-*efficient*, acoplado a banho refrigerador e bomba de água Solab® SL152 e bomba à vácuo Heidolph® Rotavac valve;
- ✓ Para realização das etapas de *clean up*, foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase normal (SiO_2) e fase reversa (C_{18}) com 100 mg (Supelco®), 200 mg (Phenomenex®) e 360 mg de adsorvente (Waters®). As soluções resultantes foram filtradas em membranas PTFE (teflon) (Millex®) de 0,45 μm ou 0,22 μm de poro;
- ✓ Cromatografia em permeação em gel:

GPC-1: Coluna de vidro (70 × 2 cm d.i.) preenchida com Sephadex LH-20, Pharmacia®, acoplada à bomba peristáltica P1 18-1110-91 e a um coletor automático de frações RedFrac (Pharmacia®), com capacidade para 95 frações;

GPC-2: Coluna de vidro (85 × 5 cm d.i.) preenchida com Sephadex LH-20 (Pharmacia®), acoplada a um sistema Sepacore para cromatografia Flash (Büchi®), contendo duas bombas C-601 (Büchi®), controlador de gradiente C-610/C615 (Büchi®) e coletor automático de frações C-660 (Büchi®), com capacidade para 190 frações;

- ✓ MPLC: sistema Pump Manager (Büchi®) constituído por injetor C-615, com *loop* de 5 mL, bombas modelo C-60 (Büchi®), com capacidade de fluxo de 2,5 a 50 mL/min e empacotador de colunas modelo C-670 (Büchi®) acoplado à bomba à vácuo TE-058 Tecnal®;
- ✓ Análises por HPLC no modo analítico:

HPLC-A1: Uitlizado no monitoramento das frações obtidas por GPC-1 e purificadas por HPLC-SP1. Cromatógrafo Jasco® PU 2089 de gradiente quaternário acoplado a um detector do tipo arranjo de foto diodos (PDA) MD-2010 (Jasco®). Utilizou-se coluna Phenomenex® Synergi Hydro (C_{18}, 250 × 4,6 mm d. i., 4 μm), conectada à pré-coluna Phenomenex® (C_{18}, 4 × 3 mm d. i.). O software EZChrom foi utilizado para aquisição e manipulação dos dados.

HPLC-A2: Utilizado no monitoramento das frações obtidas por GPC-2 e purificadas por HPLC-SP2. Cromatógrafo Alliance® E2695 (Waters®) de gradiente quaternário, com detector Waters® PDA 996 e detector Alltech® ELSD 2000ES (detector evaporativo por espalhamento de luz). Utilizou-se coluna analítica de fase reversa Sunfire (Waters®) (C_{18}, 150 mm × 3 mm d.i., 5 μm). Condições do detector ELSD: temp. tubo 100 ºC, impactor off, fluxo N_2 2,9 L/min.

HPLC-A3: Utilizado no registro dos perfis cromatográficos e análise comparativa dos compostos isolados. Cromatógrafo Agilent® 1100 acoplado a injetor automático G1367A e detector PDA G1315B, seguido do detector ESA® Corona-CAD (detector de aerosol carregado). Utilizou-se coluna analítica de fase reversa YMC ODS-A (Waters®) (C_{18} de 150 mm × 4,6 mm d.i., 5 μm).

- ✓ Análises por HPLC no modo semipreparativo

HPLC-SP1: Cromatógrafo Knauer® Chance 330, acoplado a detector de índice de refração Knauer® D-14163, injetor Rheodyne® 7125 com *loop* de 100 μL e registrador Knauer® L250E. A coluna semipreparativa usada foi de fase reversa Phenomenex® Luna

2 (C_{18}, 250 × 10 mm, 10 μm). As condições do registrador foram: atenuação 16, velocidade do papel 5 mm/min, voltagem 10 mV.

HPLC-SP2: Cromatógrafo HPLC Agilent® 1100, constituído por detector PDA G1315A, bomba quaternária G1311A, injetor automático G215 e coluna SunFire (Waters®) semipreparativa de fase reversa (C_{18}, 150 × 10 mm, 5 μm), conectada à pré-coluna (C_{18}, 10 × 10 mm, 5 μm)

- ✓ Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetro Varian® INOVA 500 e em espectrômetro Bruker® Avance III, equipado com probe de 5 mm ou 1 mm, ambos operando a 11,7 T e uso de TMS (tetrametilsilano) como padrão interno.
- ✓ Os espectros de massas foram registrados em um sistema ESI-IT equipado com espectrômetro Esquire-3000 plus (Brucker®) acoplado a um HPLC Agilent® 1100 e em um segundo instrumento do tipo ESI-TSQ espectrômetro Thermo Finnigan® TSQ Quantum Ultra AM acoplado a um Surveyor Plus micro-HPLC (Thermo Electron®). Os espectros de alta resolução (ESI-TOF) foram obtidos por injeção direta em um equipamento micrOTOF-Q (Bruker®). A aquisição e processamento dos dados foram feitos com uso dos softwares HyStar 3.0 e Xcalibur 1.4.
- ✓ Cromatógrafo a gás Varian® CP-3800, equipado com detector de ionização de chama (FID), coluna Supelco® SPB-5 (5% fenil, 95% metilpolissiloxano) e SPB-50 (50% fenil, 50% metilpolissiloxano) ambas de 30 m de comprimento × 0,25 mm d.i. × 0,25 μm de espessura do filme. Vazão do gás de arraste (N_2) 1 mL/min; Vazão dos gases no detector: Ar sintético: 371 mL/min, H_2: 33 mL/min, N_2: 34 mL/min.

Cromatografia em Camada Delgada

- ✓ Foram usadas placas comerciais em suporte de alumínio contendo sílica gel 60 (Sorbent Technologies® e Merck®) com e sem indicador de fluorescência, de diversos tamanhos e 0,20 mm de espessura de adsorvente.
- ✓ Para a inspeção as placas cromatográficas foram visualizadas sob luz ultravioleta (254-366 nm) Cromatovue® com a sem a nebulização pelos seguintes reveladores:
  1) Solução de anisaldeído/ácido sulfúrico: 0,85 mL de anisaldeído + 85 mL de metanol + 10 mL de ácido acético + 5 mL de H_2SO_4 (WAGNER et al., 1984). Borrifa-se a cromatoplaca e aquece a 100 ^oC até o aparecimento de cor;

2) Solução de NP/PEG: 100 mg de difeniletilaminoborato (NP) + 500 mg de polietilenoglicol 2000 (PEG) + 20 mL de metanol. Borrifa-se sobre a placa cromatográfica e observa-se no visível e sob luz UV. Fornece mancha amarela para flavonóides derivados do kaempferol e alaranjadas para derivados da quercetina (WAGNER et al., 1984);
3) Cloreto férrico: solução a 2% em metanol. Borrifa-se a placa cromatográfica até que o revelador espalhe bem e atingir revelação instantânea. Observa-se se as manchas da cromatoplaca adquirem coloração verde-azulada como positivo para compostos fenólicos (WAGNER et al., 1984);
4) Dragendorff (MATOS, 1997): 5 g de nitrato de bismuto em 50 mL de água, 12 mL de ácido clorídrico, 25 g de iodeto de potássio, completa para 100 mL de água. A presença de alcalóides é evidenciada pela coloração púrpura a alaranjada nas manchas eluídas.

- ✓ Nas análises comparativas por CCDC ou HPLC foram utilizados padrões de origem comercial Sigma Aldrich® e Rhodia® ou de compostos isolados que estão disponíveis no banco de padrões existentes no laboratório de Produtos Naturais coordenado pelo prof. Dr. Wagner Vilegas.

4. ESTUDO QUÍMICO- Desenvolvimento, resultados e discussões

4.1 Coleta das espécies

As folhas de *Guapira noxia* (Netto) Lundell foram coletadas no município de Botucatu-SP pelo Sr. Clemente José Campos (IB-UNESP/Botucatu) em abril de 2007 e a exsicata correspondente encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob o número UEC 145.858. As folhas de *G. graciliflora* (Mart.) Lundell e *G. opposita* (Vell.) Reitz foram coletadas em Itapetininga-SP (maio/2007) e Itirapina-SP (agosto/2006), respectivamente, pelo prof. Dr. Jorge Y. Tamanshiro e os *vouchers* de números UEC 1441 e UEC 1437, respectivamente, encontram-se depositados no Herbário da UNICAMP.

Depois de coletadas, as plantas foram secas em estufa de ar circulante a 40 °C e em seguida, o material seco de cada espécie foi finamente triturado em moinhos de facas com malha de 1 mm de d.i., pesado e armazenado ao abrigo da luz e da umidade.

4.2 Preparação dos extratos

Os pós das folhas foram individualmente submetidos aos processos de extração a frio por maceração estática com $CHCl_3$ (1:4 p/v, três vezes, por 72 h cada), seguido por percolação com MeOH puro (1:5 p/v) até que o peso seco do percolado variasse menos de 5%. Após cada extração, o extrato obtido foi filtrado em papel-filtro pregueado, concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida (temperatura inferior a 40 ºC), transferido para vidro tarado e deixado em capela até a eliminação dos solventes. Após a evaporação dos solventes foram obtidos os extratos clorofórmico ($ECHCl_3$) e metanólico (EMeOH), respectivamente. A figura 4.2.1 ilustra, esquematicamente, o processo de preparação dos extratos e a tabela 4.2.1 as quantidades obtidas.

Os extratos clorofórmicos forneceram os menores rendimentos, se comparados aos metanólicos das mesmas espécies. O rendimento dos extratos polares foi por volta 10%, em relação ao peso seco do material de partida.

Tab. 4.2.1: Extratos obtidos das folhas das espécies de *Guapira* estudadas

	G. noxia	***G. opposita***	***G. graciliflora***
Material seco (g)	1.000	1.000	500
$ECHCl_3$ (g)	46,8 (4,7%)	31,2 (3,1%)	8,2 (1,6%)
EMeOH (g)	96,4 (9,6%)	105,1 (10,5%)	49,4 (9,9%)

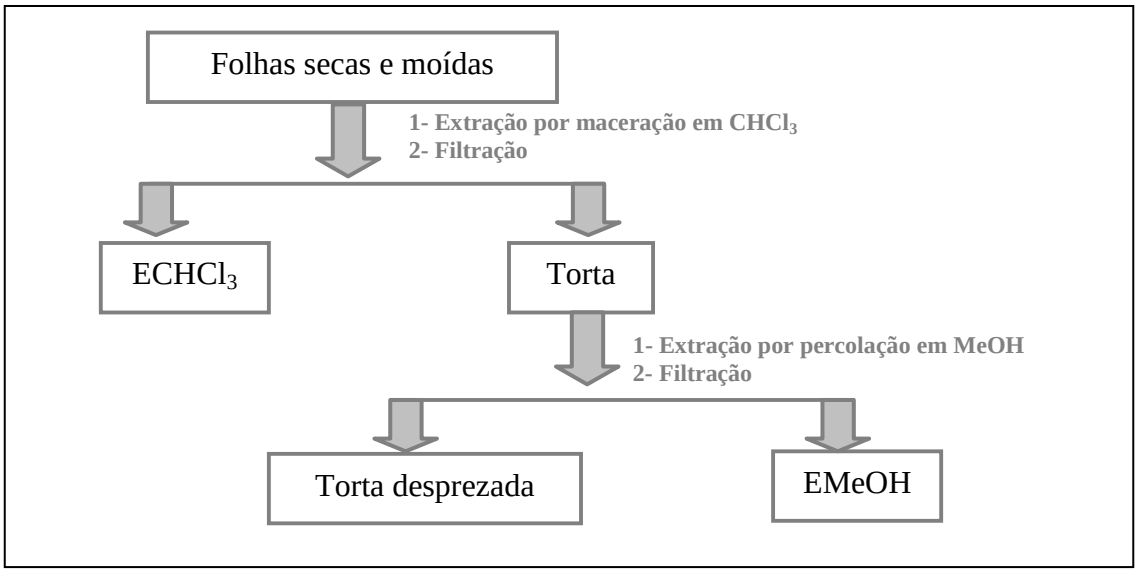


Fig. 4.2.1: Fluxograma de obtenção dos extratos das folhas das espécies de *Guapira*

4.3 Triagem cromatográfica dos extratos

A caracterização inicial das substâncias presentes nos extratos das espécies de *Guapira* foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) em sílica gel e uso de reveladores específicos a fim de obter um panorama geral das classes de substâncias presentes e assim direcionar os procedimentos de fracionamento.

Para isso, uma alíquota de 10 mg de cada extrato foi dissolvida em 5 mL de $CHCl_3$ ou MeOH e analisados por CCDC (sílica gel) com a aplicação simultânea de padrões de diferentes classes de compostos. Após eluição em diferentes sistemas de solvente (misturas de Hex/AcOEt, $CHCl_3$/MeOH, $CHCl_3$/MeOH/H_2O e BAW), as placas foram visualizadas sob luz UV de 254 nm e reveladas empregando-se os reveladores: anisaldeído/H_2SO_4, cloreto férrico, NP/PEG e Dragendorff (MATOS, 1997; WAGNER et al., 1984).

Estas análises indicaram a ocorrência principalmente de terpenóides nos extratos $ECHCl_3$ das espécies (manchas roxas com anisaldeído), enquanto que nos extratos EMeOH, observou-se a presença de terpenos, flavonóides, ácidos fenólicos e saponinas. A confirmação desta última foi feita através do teste de agitação de uma solução aquosa dos EMeOH e observação da formação de espuma persistente. A presença de alcalóides foi pouco conclusiva e as demais classes não foram detectadas. Um panorama geral das classes de substâncias presentes nas três espécies estudadas encontra-se resumido na tabela 4.3.1.

Tab. 4.3.1: Triagem fitoquímica comparativa dos extratos das folhas das espécies de *Guapira*

	G. noxia		***G. opposita***		***G. graciliflora***	
Classe de compostos	**$ECHCl_3$**	**EMeOH**	**$ECHCl_3$**	**EMeOH**	**$ECHCl_3$**	**EMeOH**
esteróides	+	+	+	+	+	+
terpenos	+	+	+	+	+	+
flavonóides	+	+	+	+	+	+
alcalóides	-	*	-	*	-	*
saponinas	-	+	-	+	-	+
catequinas	-	-	-	-	-	-
taninos	-	-	-	-	-	-

Os sinais (+) e (-) indicam presença ou ausência da classe de substância investigada. * Resultado positivo pouco conclusivo

4.4 Perfis cromatográficos dos extratos apolares das espécies de *Guapira*

A determinação dos perfis cromatográficos dos extratos $ECHCl_3$ das espécies foi realizada por CG-FID de acordo com metodologia descrita por Crevelin (2006). Uma alíquota de 10 mg de cada extrato foi solubilizada em 3 mL de $CHCl_3$ e submetido a *clean up* em cartucho de carvão ativo/celite (200 mg, 1:1 p/p), eluído com 10 mL de CH_2Cl_2. As soluções resultantes foram secas em capela de exaustão e em seguida solubilizadas a 1 mg/mL em Hex/AcOEt (7:3, v/v), filtradas em microfiltro de 0,45 μm e analizadas por CG-FID. Após a aquisição dos cromatogramas (figura 4.4.1), foram calculados os tempos de retenção relativos dos picos e estes comparados aos de um banco de padrões de terpenos e esteróides composto pelas substâncias: esqualeno, estigmasterol, sitosterol, campesterol, germanicona, taraxerol, acetil taraxerol, α-amirina, β-amirina, α-amirenona, β-amirenona, acetil β-amirina, lupeol, lupenona, acetil lupeol, acetil baurenila, friedelina, acetil friedelanol. Utilizou-se colesterol como padrão interno para obtenção dos tempos de retenção relativos**.**

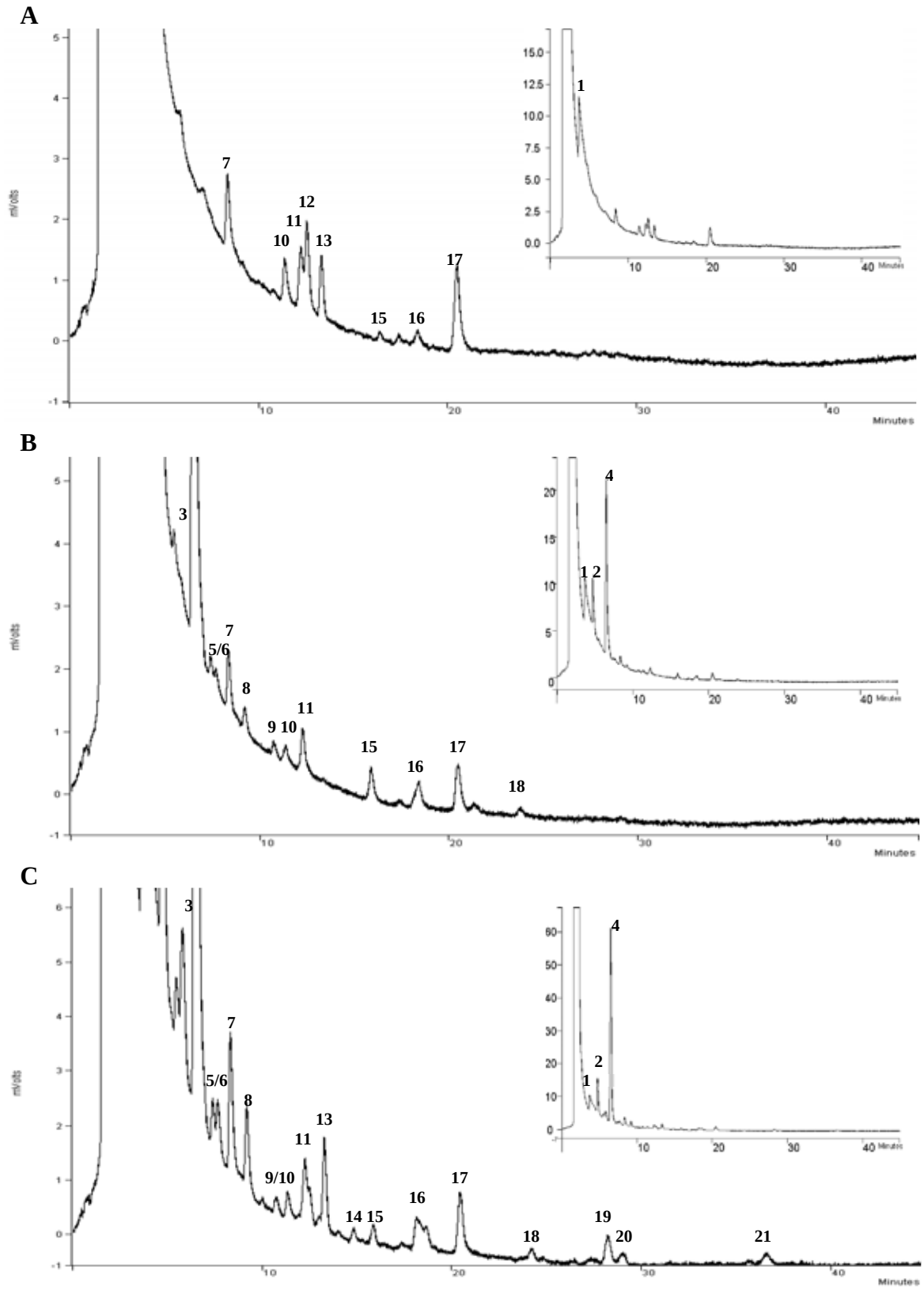


Fig. 4.4.1: Perfis cromatográficos dos extratos apolares das folhas das espécies de *Guapira* por CG-FID. Cromatogramas: A) *G. noxia*, B) *G. graciliflora* e C) *G. opposita*. Condições de análise: Coluna SPB-50 30 m × 0,25 mm × 0,25μm de espessura, temp. do injetor: 260 ºC, temp. do detector: 300 ºC, temp. da coluna: isoterma de 280 ºC por 45 min, volume de injeção: 2 μL, modo *split* - 1:50

As análises cromatográficas evidenciaram certa similaridade de substâncias presentes (picos 1, 7, 10, 11, 15, 16, 17) nas espécies investigadas (figura 4.4.1, tabela 4.4.1). Nas condições utilizadas, *G. opposita* demonstrou possuir o maior número de picos, enquanto que *G. noxia* mostra-se qualitativamente menos complexa.

Com base na análise dos tempos de retenção relativos, verificou-se que as três espécies possuem os esteróides campesterol (pico 15), estigmasterol (pico 16) e sitosterol (pico 17), enquanto que em *G. graciliflora* e *G. opposita* sugere-se ainda a ocorrência do triterpeno taraxerol (pico 18) e apenas em *G. opposita* a presença do triterpeno lupenona (pico 19) (figura 4.3.2). As demais substâncias presentes no banco de padrões não foram identificadas nos extratos.

Tab. 4.4.1: Picos de substâncias presentes nos perfis cromatográficos dos extratos $ECHCl_3$ das espécies de *Guapira* registrado por CG-FID

Pico	t_r (min)	*G. noxia*	*G. graciliflora*	*G. opposita*	Composto identificado
1	3,5	+	+	+	
2	4,6	-	+	+	
3	5,4	-	+	+	
4	6,4	-	+	+	
5	7,3	-	+	+	
6	7,6	-	+	+	
7	8,3	+	+	+	
8	9,1	-	+	+	
9	10,7	-	+	+	
10	11,3	+	+	+	
11	12,2	+	+	+	
12	12,5	+	-	-	
13	13,3	+	-	+	
14	14,7	-	-	+	
15	15,8	+	+	+	campesterol
16	18,2	+	+	+	estigmasterol
17	20,4	+	+	+	sitosterol
18	24,3	-	+	+	taraxerol
19	28,4	-	-	+	lupenona
20	29,3	-	-	+	
21	36,5	-	-	+	

Os sinais (+) e (-) indicam presença ou ausência do pico nos perfis cromatográficos

Estudos conduzidos por Kadota e colaboradores (KADOTA et al., 1989) revelaram a presença dos esteróides campesterol, estigmasterol e β-sitosterol em *Boerhaavia diffusa*. Porém, não foram encontrados relatos da presença dos triterpenos lupenona e taraxerol em outras plantas da família Nyctaginaceae, o que demonstra a necessidade de estudos complementares para a caracterização dos demais compostos apolares presentes nos extratos $ECHCl_3$.

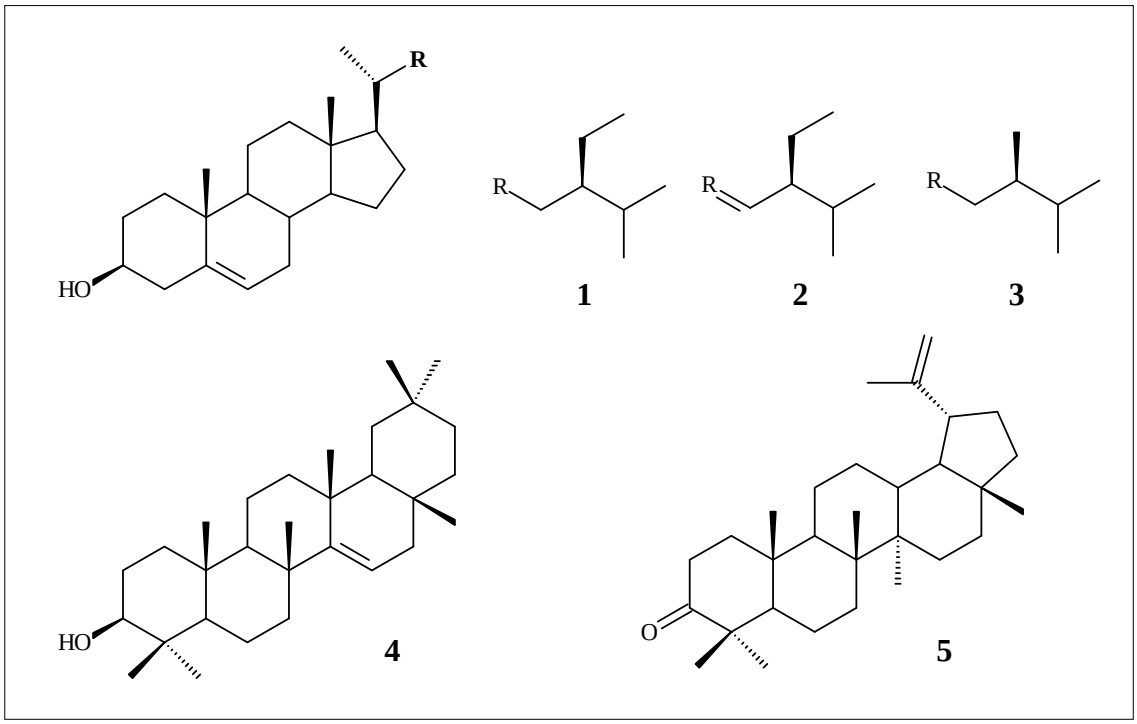


Fig. 4.4.2: Substâncias identificadas nos extratos apolares das espécies de *Guapira* por CG-FID: 1) sitosterol, 2) estigmasterol, 3) campesterol, 4) taraxerol e 5) lupenona

4.5 Perfis cromatográficos dos extratos polares das espécies de *Guapira*

Para a identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos metanólicos da folhas das três espécies de *Guapira*, foram determinados os perfis cromatográficos por HPLC acoplado ao detector de UV do tipo arranjo de fotodiodos (PDA) e ao detector de aerosol carregado (CAD). Esta etapa foi desenvolvida inicialmente com uso do sistema HPLC-A1 e posteriormente otimizada com o sistema HPLC-A3 durante o estágio reazilado no IPB-Halle/Alemanha.

Uma alíquota de 10 mg dos EMeOH das espécies foi submetida à etapa de *clean up* em cartucho *SEP Pak* – C_{18} utilizando 2 mL de H_2O/MeOH 1:9 (v/v) como eluente. As soluções resultantes foram secas sob jato de ar comprimido, dissolvidas a 10 mg/mL em H_2O/MeOH 1:1, filtradas em microfiltro de 0,22 μm e utilizadas nas análises seguintes. O sistema de eluição foi otimizado no modo gradiente, utilizando-se como solventes acetonitrila (Solvente B) e água (Solvente A), ambos acidificados com 0,05% de ácido trifluoracético (TFA). O monitoramento dos picos eluídos foi feito por varredura na faixa espectral de 200-400 nm e o registro final dos cromatogramas em 254 nm.

Com base na análise dos espectros de ultravioleta dos picos, verificam-se nos cromatogramas (Figura 4.5.2) substâncias polares eluídas na região de t_r= 0 a 2 min e que apresentam dois máximos de absorção, um na região de 270 nm e outro na faixa de 300-330 nm (Figura 4.5.1 - A), sugestivo de ácidos fenólicos (KOWALSKI & WOLSKI, 2003). Na região de t_r= 24 a 34 min é evidenciado um segundo grupo de substâncias (picos 10 a 16), que apresentam bandas com dois máximos de absorção, um na faixa de 240-290 nm e outro na faixa de 300-390 nm, característicos de flavonols (Figura 4.5.1 - B) e flavonas (Figura 4.5.1 - C) (MABRY et al., 1970; MERKEN & BEECHER, 2000). Com o uso do detector CAD, verifica-se na região de t_r= 44 a 52 min em *G. noxia* e em *G. graciliflora* um terceiro conjunto de compostos de natureza não-cromofórica (ou que absorvem fracamente no UV), possivelmente terpenóides, pois a triagem por CCD indicou a presença destas substâncias nos extratos. Os demais picos não apresentaram espectros de UV bem definidos e por isso não foram caracterizados.

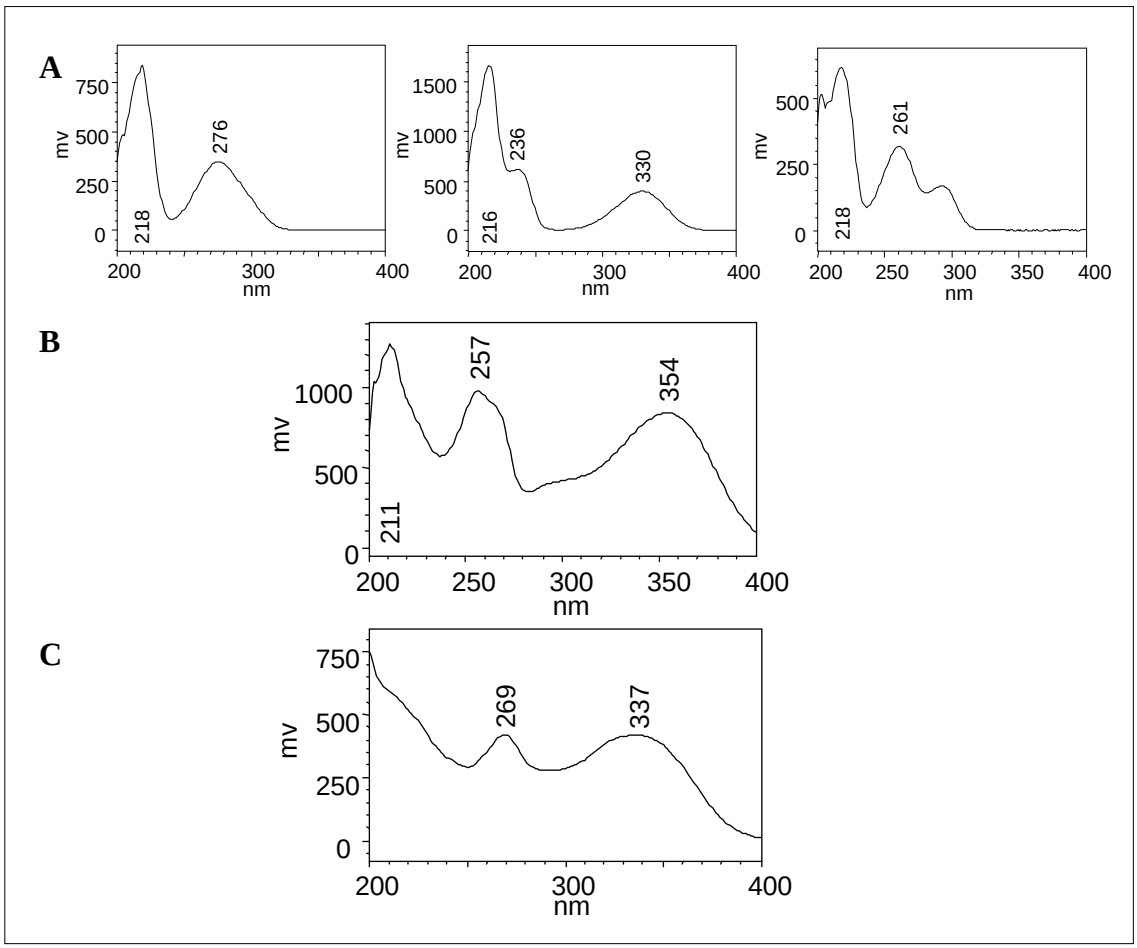


Fig. 4.5.1: Espectros de UV representativos dos picos indicados nos cromatogramas de derivados de: A) ácidos fenólicos, t_r= 0 a 2 min; B) flavonóis, t_r= 24 a 34 min; C) flavonas, t_r= 24 a 34 min

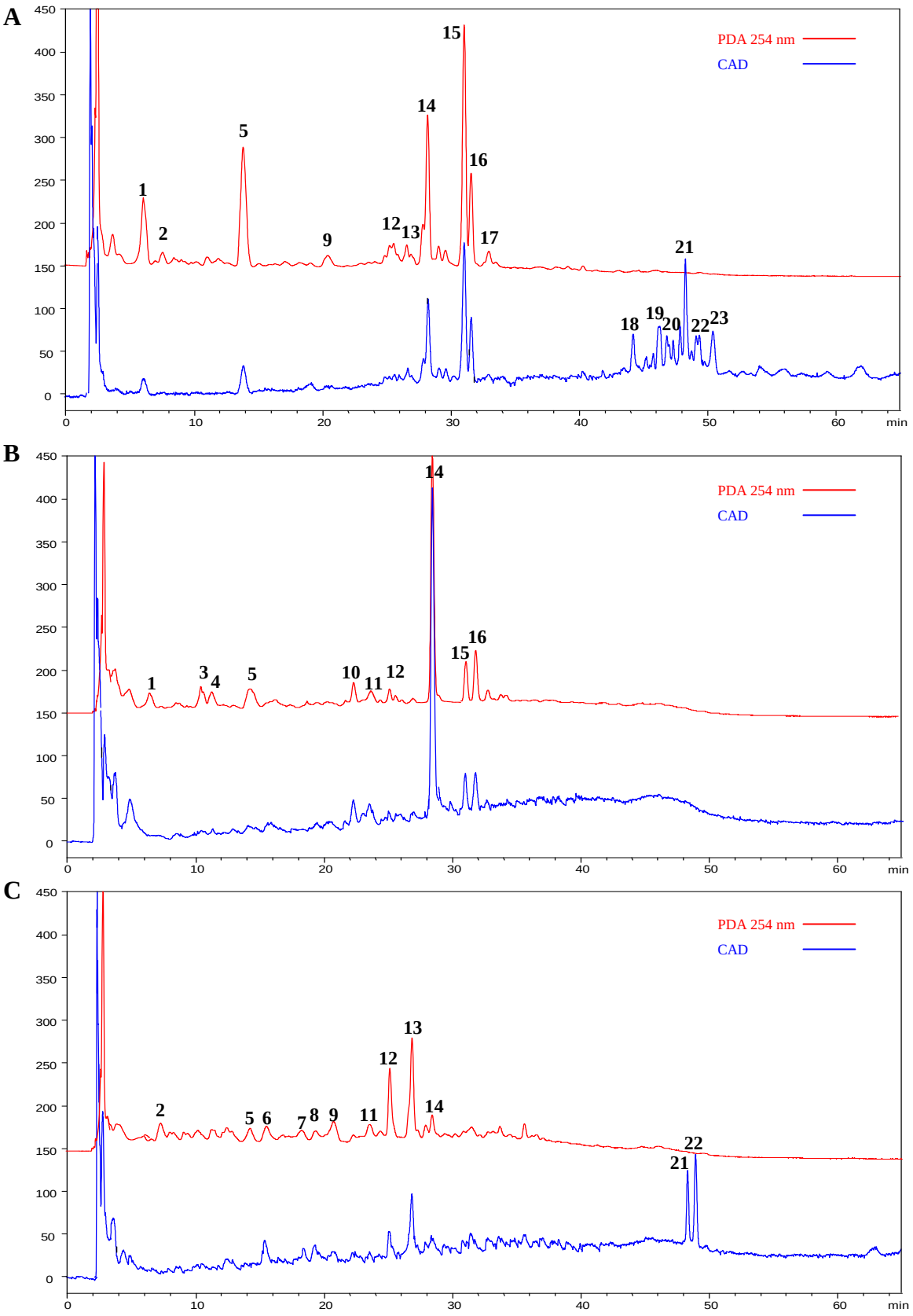
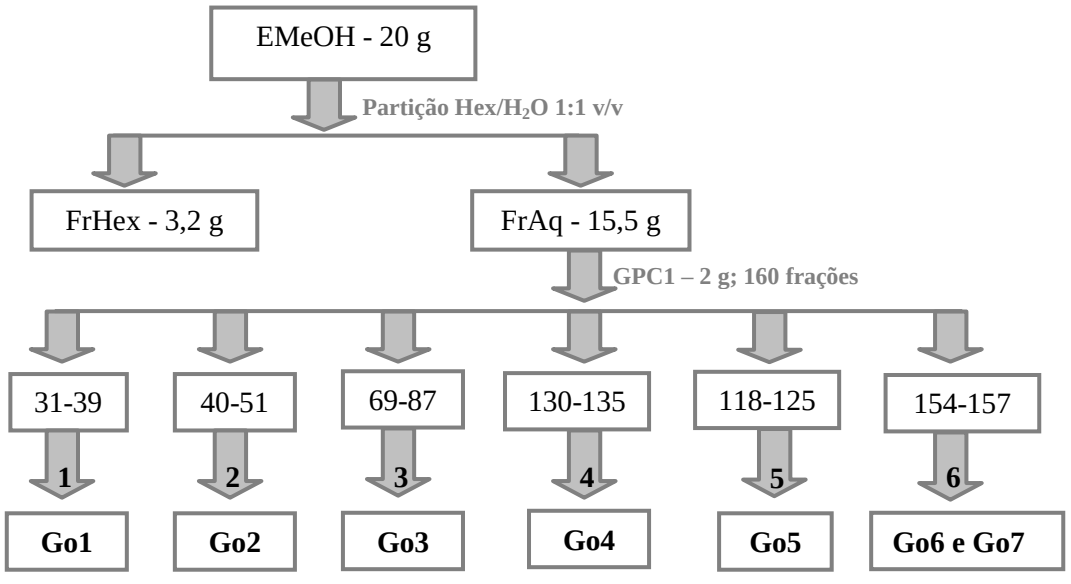


Fig. 4.5.2: Perfis cromatográficos dos EMeOH das folhas das espécies de *Guapira* obtidos por HPLC-UV-CAD (HPLC-A3). A) *G. noxia*, B) *G. opposita*, C) *G. graciliflora*.(150 × 4,6 mm d.i.,5 μm; Solvente A: H_2O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 2-14% de B em A em 20 min, de 14-30% de B em 40 min, de 30-38% de B em 50 min de 38-80% B em 60 min e 80-95% de B até 65 min; fluxo 1 mL/min

4.6 Fracionamento e purificação de *G. opposita*

O EMeOH (20 g) foi solubilizado em 500 mL de água e em seguida particionado com hexano 1:1 v/v (3 vezes, 500 mL). As frações resultantes foram secas em rotaevaporador, transferidas para recipientes de vidros pesados e colocadas em capela sob jato de ar comprimido, obtendo-se 3,2 g da fração hexânica (FrHex) e 15,5 g da fração aquosa (FrAq).

Uma amostra de 2 g da FrAq foi solubilizada em 10 mL de MeOH e centrifugada por 15 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de permeação em gel (GPC1), empregando-se metanol como eluente (1 mL/min). Um total de 160 frações (4 mL cada) foram coletadas. Estas foram analisadas por CCDC (sílicagel, $CHCl_3$/MeOH/*n*-PrOH/H_2O 5:6:1:4 v/v, $CHCl_3$/MeOH/H_2O 43:37:20 v/v, fase orgânica, anisaldeído/H_2SO_4, luz UV, NP/PEG) e reunidas conforme similaridade de Rf e colorações diante dos reveladores empregados, como mostram a figura 4.6.1 e tabela 4.6.1.



1: Centrigugação e lavagem do precipitado em MeOH
2: MPLC: C_{18} 16 cm × 1,5 cm × 5 μm, H_2O/MeOH 9:1, 2,5 mL/min.
3: Análise por CCD: sílica gel, $CHCl_3$/MeOH/*n*-PrOH/H_2O 5:6:1:4 - fase orgânica, luz UV e NP/PEG
4: HPLC-SP1: C_{18} 25 cm × 1 cm × 5 μm, H_2O/MeOH 40:60; 2 mL/min, t_r= 11 min
5: MPLC: C_{18} 15 cm × 1 cm × 5 μm, H_2O/MeOH 40:60, 2,5 mL/min.
6: HPLC-SP1: C_{18} 25 cm × 1 cm × 5 μm, H_2O/MeOH 25:75; 2 mL/min, t_r= 19 min

Fig. 4.6.1: Fracionamento da FrAq do EMeOH das folhas de *G. opposita*

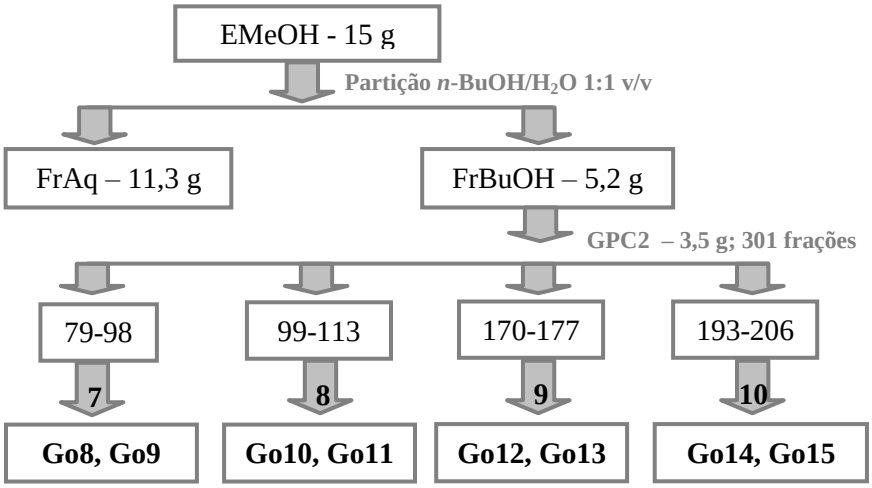
Tab. 4.6.1: Resultado obtido do fracionamento da FrAq do EMeOH de *G. opposita*

Código	Massa da fração (mg)		Substância presente	Massa da subst. (mg)
1-10	12			
11-21	174			
22-30	261			
31-39	372	Go1	3-*O*-metil-*chiro*-inositol (pinitol)	160
40-51	124	Go2	alantoína	60
52-60	140			
61-68	82			
69-87	201	Go3	quercetina-3-*O*-β-D-glic-(6''$\rightarrow$1''')-*O*-α-L-rha (rutina)	40
88-95	120			
96-117	110			
118-125	80	Go5	quercetina-3-*O*-β-D-glic	8
126-129	45			
130-135	65	Go4	luteolina-7-*O*-β-D-glic	12
136-139	46			
140-146	42			
147-153	37			
154-157	53	Go6	luteolina	15
		Go7	quercetina	
158-160	24			

O EMeOH (15 g) foi novamente particionado entre *n*-BuOH e H_2O (400 mL, v/v, três vezes) e concentrado sob pressão reduzida, obtendo-se 5,2 g da porção butanólica (FrBuOH) e 11,3 g da aquosa (FrAq).

Uma alíquota de 3,5 g da FrBuOH foi solubilizada em 20 mL de MeOH e centrifugada por 15 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi submetido à GPC2 e a eluição feita com o uso de MeOH (4 mL/min). Frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas em tubos de ensaio por um coletor automático, obtendo-se o total de 301 frações. Essas foram analisadas por CCDC (silicagel, $CHCl_3$/MeOH/*n*-PrOH/H_2O 5:6:1:4 v/v, fase inferior, anisaldeído/H_2SO_4, luz UV, NP/PEG) e reunidas conforme similaridade de Rf e colorações diante dos reveladores empregados. Em seguida frações foram purificadas conforme mostra a figura 4.6.2.

A tabela 4.6.2 apresenta o agrupamento das subfrações resultantes desta GPC.



7: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN: 35-70% B em 20 min, 70-95% B em 25 min; 4 mL/min; Go8 t_r= 16 min, Go9 t_r= 20,5 min.

8: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN 83:17 em 30 min, 4 mL/min; Go10 t_r= 13,5 min, Go11 t_r= 15 min.

9: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN 82:18 em 30 min, 4 mL/min; Go12 t_r= 19,5 min, Go13 t_r= 21,5 min.

10: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN: 17-50% B em 30 min; 4 mL/min; Go14 t_r=12 min, Go15 t_r= 25 min.

Fig. 4.6.2: Fracionamento da FrBuOH do EMeOH das folhas de *G. opposita*

Tab. 4.6.2: Resultado obtido do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de *G. opposita*

Código	Massa da fração (mg)		Substância presente	Massa da subst. (mg)
1-41	112			
42-51	274			
52-61	361			
62-78	472			
79-98	224	Go8	(2'S)-3'-*O*-*β*-D-[gal-(6''→1''')-*O*-*α*-D-gal]-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol	9
		Go9	3'-*O*-*β*-D-gal-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol	3
99-113	240	Go10	kaempferol-3-*O*-*β*-D-glic-(6''→1''')-*O*-*α*-L-rha	6
		Go11	3'-metoxiquercetina-3-*O*-*β*-D-glic-(6''→1''')-*O*-*α*-L-rha	4
114-130	182			
131-142	301			
143-169	220			
170-177	210	Go12	apigenina 7-*O*-*β*-D-glic	4
		Go13	3'-metoxiluteolina-7-*O*-*β*-D-glic	5
178-192	180			
193-206	145	Go14	quercetina-3-*O*-*α*-L-ara	4
		Go15	3'-metoxiluteolina	4
207-242	165			
243-259	146			
260-300	142			
Final	114			

*Identificação de **Go1***

O espectro de absorção na região do IV (E1) de Go1 exibiu bandas vibracionais de absorção características de ν_{O-H} (3.404 cm^{-1}), ν_{C-H} (2.900 cm^{-1}) e ν_{C-O} (1.072 cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^{1}H (E2) em D_2O apresentou sinais referentes a hidrogênios carbinólicos entre δ 3,25 a 3,94: um multipleto em δ 3,94 (2H); dois duplo-dubletos em δ 3,74 (1H, *J*= 10; 2,5 Hz) e δ 3,69 (1H, *J*= 10; 2,5 Hz); e outros dois duplo-dubletos em δ 3,59 (1H, *J*= 9,5 Hz) e δ 3,27 (1H, *J*= 9,5 Hz), além de um singleto em δ 3,52 (3 H), indicativo de uma metila. A partir da análise dos espectros de RMN de ^{13}C (E3) e HMQC (E4) verificou-se a presença de seis sinais de carbonos carbinólicos e um de metoxila em δ 59,8. O experimento ^{1}H-^{1}H COSY (E5) forneceu as correlações dos hidrogênios vicinais, verificando-se tratar de um ciclitol.

O espectro de massas (E6) ESI-IT (modo negativo) apresentou o íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 193, compatível com a fórmula molecular $C_7O_6H_{14}$. Com base nesse conjunto de informações (tab. 4.6.3, fig. 4.6.3), em comparação com dados da literatura (ABDOULAYE et al., 2004), Go1 foi identificado como o 3-*O*-metil-*chiro*-inositol (pinitol).

*Identificação de **Go2***

O espectro na região do IV (E7) de Go2 forneceu bandas de absorção características de amida primária ν_{N-H} (3.438, 3.344 cm^{-1}), ν_{O-H} (3.209 cm^{-1}) e ν_{C-H} (3.058 cm^{-1}), $\nu_{C=O}$ (1.778, 1.714 e 1.652 cm^{-1}) e δ_{N-H} (1.529 cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^{1}H (E8) exibiu três singletos largos correspondentes aos grupos HN-1 (δ 10,51), HN-3 (δ 8,02) e H_2N-8 (δ 5,75) e dois dubletos em δ 6,88 (1H, *J*= 8,5 Hz) e δ 5,25 (1H, *J*= 8 Hz) correpondentes aos hidrogênios HN-6 e H-5, respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C (E9) apresentou três sinais correspondentes a átomos de carbono dos grupos carbonílicos C-2 (δ 156,7), C-4 (δ 173,5) e C-7 (δ 157,3) e um de carbono metínico em δ 62,4 atribuído ao CH-5. O experimento HMQC de ^{13}C (E10) forneceu apenas uma correlação em δ 5,25/62,4, indicando que os demais carbonos observados no espectro de RMN ^{13}C eram quaternários. Os demais foram identificados como de N-H com base no espectro HMQC de ^{1}H-^{14}N (E11).

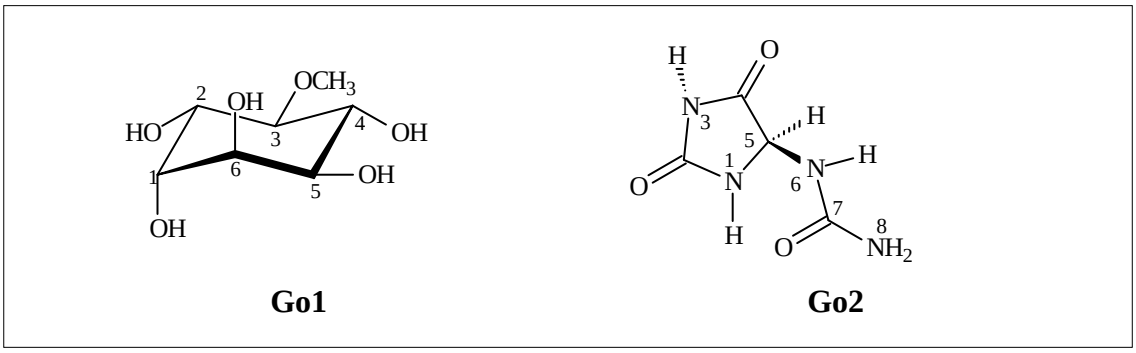
Análise do experimento ^{1}H-^{1}H COSY (E12) evidenciou a correlações dos hidrogênios vicinais H-5 (δ5,25) e HN-6 (δ6,88) e do tipo W entre H-5 (δ5,25) e HN-3 (δ8,02), o que indica que estes átomos possam estar num mesmo plano.

O espectro de massas (E13) ESI-IT (modo negativo) exibiu íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 157, compatível com a fórmula molecular $C_4H_6N_4O_3$. Esse conjunto de informações e comparação com dados da literatura (FERREIRA et al., 2000), levaram à identificação da alantoína (fig. 4.6.3, tab. 4.6.3).

Tab. 4.6.3: Deslocamentos químicos de RMN de Go1 (D_2O) e Go2 (DMSO-d_6)

	Go1			**Go2**		
	δ^1H (*J* Hz)	**δ^{13}C**	**δ^{13}C***	**δ^1H, (*J* Hz)**	**δ^{13}C**	**δ^{13}C****
1	3,94 (m), 1H	71,6	71,5	10,51 (s), 1H		
2	3,74 (dd, *J*= 9,5; 5,5), 1H	70,0	69,8		157,3	157,7
3	3,27 (dd, *J*= 9,5; 9,5), 1H	82,9	82,7	8,02 (s), 1H		
4	3,59 (dd *J*= 9,5; 9,5), 1H	72,3	72,1		173,5	173,4
5	3,69 (dd, *J*= 9,5; 5,5), 1H	70,7	70,5	5,25 (d, *J*= 8,0), 1H	62,4	62,6
6	3,94 (m), 1H	71,9	71,4	6,88 (d, *J*= 8,5), 1H		
7	3,52 (s), 3H	59,8	59,7		156,7	156,7
8				5,75 (s), 2H		

*ABDOULAYE et al., 2004; ** FERREIRA et al., 2000



Go1 **Go2**

Fig. 4.6.3: Estruturas de Go1: 3-*O*-metil-*chiro*-inositol e Go2: alantoína

.

*Identificação de **Go3***

Go3 apresentou-se como sólido amarelo. A análise cromatográfica por CCDC e revelação amarela em NP/PEG indicou que poderia se tratar de um flavonóide. O espectro na região do UV de Go3 (E14) apresentou máximos de absorção em 257 e 354 nm, com perfil espectral característico de um flavonol (MABRY et al.,1970).

O espectro de RMN de ^{1}H de Go3 (E15) exibiu sinais na região de absorção dos hidrogênios aromáticos de um flavonóide. Um duplo-dubleto em δ 7,51 (1H, *J*= 8 e 2 Hz) e dois dubletos (1H, *J*= 2 Hz) em δ 7,53 e δ 6,83 (1H, *J*= 8 Hz) que caracterizam, respectivamente, os hidrogênios H6', H2' e H5'do anel B flavonoídico, além de outros dois dubletos *meta*-acoplados (1H cada, *J*= 2 Hz) em δ 6,17 e δ 6,37 que são relativos, respectivamente, aos hidrogênios H6 e H8 do anel A. Duas unidades sacarídicas foram caracterizadas pela presença dos dubletos de hidrogênios anoméricos em δ 5,32 (1H, *J*= 7 Hz) e δ 4,37 (1H, *J*= 1 Hz), bem como pelo dubleto (3H, *J*= 6 Hz) em δ 0,97, indicativo de uma metila (H-6''') de rhamnose. O espectro de RMN de ^{13}C (E16) mostra a existência de 27 sinais, quinze dos quais foram atribuídos à aglicona do flavonóide e outros doze à porção sacarídica. Por análise do experimento TOCSY-1D, com irradiação no hidrogênios anoméricos, juntamente com a verificação das constantes de acoplamento $J_{H1\text{-}H2}$,verificou-se a presença dos açúcares β-glicose (δ 5,32) e α-rhamnose (δ 4,37). O experimento HMBC forneceu as correlações existentes à longa distância. Dentre elas, entre o sinal em δ 5,32 (H1-glicose) e o sinal em δ 133,3 (C3-aglicona), e entre o sinal em δ 4,37 (H1-rhamnose) e o sinal em δ 67,0 (C6-glicose), mostrando que a glicose está ligada no C-3 da aglicona e a rhamnose no C-6 da glicose.

O espectro de massas (E17) ESI-TSQ exibiu o íon da molécula desprotonada $[M\text{-}H]^-$ em *m/z* 609, compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$. Comparação dos dados de Go3 com os da literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996) permitiu a identificação da quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(6''$\rightarrow$1''')-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo, conhecida como rutina (fig. 4.6.4, tab. 4.6.4).

*Identificação de **Go4***

O espectro na região do UV de Go4 (E18) exibiu máximos de absorção em 254 e 347 nm e perfil espectral característicos de flavonas (MABRY et al.,1970).

O espectro de RMN de ^{1}H de Go4 (E19) apresentou sinais na região aromática característicos de uma flavona derivada da luteolina: um singleto (H3) em δ 6,72, os sinais do H6' em δ 7,44 (1H, dd, *J*= 8 e 2,5 Hz), do H2' em δ 7,40 (1H, d, *J*= 2,5 Hz), do H5'em δ 6,90 (1H, d, *J*= 8,5 Hz), do H6 em δ 6,43 (1H, d, *J*= 2 Hz) e do H8 em δ 6,77 (1H, d, *J*= 2 Hz). O mesmo espectro mostra também o dubleto de um próton anomérico em δ 5,06 (1H, *J*= 7,5 Hz).

A partir da análise dos experimentos ^{1}H-^{1}H COSY, TOCSY-1D e das constantes de acoplamento, verificou-se e presença de uma β-glicose. Sua localização foi deduzida pelo experimento HMBC (E21) através da correlação entre o sinal H1-glicose (δ 5,06) e o C7-aglicona (δ 163,0).

O espectro de massas (E22) ESI-TSQ exibiu o íon da molécula protonada $[M+H]^+$ em *m/z* 449, compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$. Esse conjunto de informações (tab. 4.6.4), em comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996), permitiu a identificação da luteolina-7-*O*-β-D-glicopiranosídeo (fig.4.6.4).

*Identificação de **Go5***

O espectro no UV de Go5 (E24) apresentou máximos de absorção em 253 e 350 nm, característicos de flavonóides (MABRY et al.,1970).

O espectro de RMN de ^{1}H (E25) indicou mistura de dois flavonóides. Além dos sinais de Go4, há outro grupo de sinais de um segundo flavonóide minoritário derivado da quercetina: em δ 7,56 há o sinal do H6' (1H, dd, *J*= 8 e 2 Hz), em δ 7,55 do H2' (1H, d, *J*= 2 Hz); do H5' em δ 6,84 (1H, d, *J*= 9 Hz) do anel B flavonoídico, e os sinais dos hidrogênios H6 em δ 6,19 (1H, *J*= 2 Hz) e H8 em δ 6,40 (1H, *J*= 2,5 Hz) do anel A. Um dubleto (*J*= 7,5 Hz) de hidrogênio anomérico em δ 5,43 indica uma unidade de açúcar.

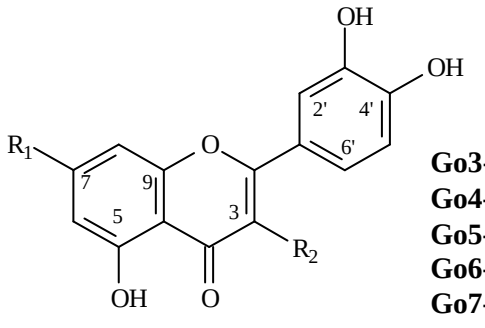
A análise detalhada dos experimentos ^{1}H-^{1}H COSY, TOCSY-1D, juntamente com a deterninação das constantes de acoplamento, revelou a ocorrência de uma unidade de β-glicose. Dentre as correlações exibidas no experimento HMBC (E27), verificou-se principalmente a existente entre o sinal em δ 5,43 (H1-glicose) e o sinal em δ 133,2 (C3-aglicona), o que mostra que a glicose está ligada no C-3 do flavonol.

O espectro de massas (E23) ESI-TSQ de Go5 forneceu o íon da molécula protonada $[M+H]^+$ em *m/z* 465, compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$. Essas informações, juntamente com comparação dos dados disponíveis na literatura (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996), permitiram identificar a quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosídeo (figura 4.6.4, tab. 4.6.4).

*Identificação de **Go6** e **Go7***

O espectro de RMN de ^{1}H (E28) exibiu sinais na região aromática referentes a uma mistura de dois flavonóides. No majoritário são verificados dois dubletos em δ 7,40 (1H, H2', *J*= 2 Hz) e δ 6,88 (1H, H5', *J*= 8,5 Hz) e um duplo-dubleto em δ 7,38 (1H, H6', *J*= 2 e 8,5 Hz), o que mostra que o anel B do núcleo flavonoídico é *orto*-di-oxigenado e tri-substituído. Na caracterização do anel A, verificam-se dois dubletos *meta*-acoplados (*J* = 2 Hz) em δ 6,19 (1H, H6) e δ 6,40 (1H, H8). A presença de um singleto em δ 6,64 (H3) sugere uma flavona. Estes sinais, juntamente com comparação com os dados da literatura (HARBORNE, 1996) levaram ao reconhecimento de Go6 como a flavona luteolina (fig. 4.6.5, tab. 4.6.5).

Além dos sinais acima mencionados, o espectro de RMN de ^{1}H (E28) também indicou um composto minoritário com sinais do anel B flavonoídico em δ 7,65 (H2', *d*, *J*= 2,5 Hz, 1H), δ 7,53 (H6', dd, *J*= 8,5 e 2 Hz; 1H) e em δ 6,87 (H5', d, *J*= 8,5 Hz). Ainda foram observados os sinais dos hidrogênios H6 e H8 *meta*-acoplados (*J*= 2 Hz) em δ 6,17 e δ 6,39 do anel A. Diante dessas informações, juntamente com comparação com dados da literatura (HARBORNE, 1996), Go7 foi identificada como o flavonol quercetina (fig. 4.6.4, tab. 4.6.5).



	R_1	R_2
Go3-	OH	*O*-β-D-glic-(6''→1''')-*O*-α-L-rha
Go4-	*O*-β-D-glic	H
Go5-	OH	*O*-β-D-glic
Go6-	OH	H
Go7-	OH	OH

Fig. 4.6.4: Estrutura de Go3: quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(6''→1''')-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo; Go4: luteolina-7-*O*-β-D-glicopiranosídeo; Go5: quercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosídeo; Go6: luteolina; Go7: quercetina

Tab. 4.6.4: Deslocamentos químicos de RMN de Go3, Go4 e Go5 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	Go3		Go4		Go5	
	δ^1H (*J* Hz)	δ^{13}C	δ^1H (*J* Hz)	δ^{13}C*	δ^1H (*J* Hz)	δ^{13}C*
2		156,7		164,6		156,0
3		133,3	6,72 (s), 1H	103,0		133,2
4		177,4		182,5		[a]
5		161,2		162,0		162,0
6	6,17 (d, *J*= 2), 1H	98,8	6,43 (d, *J*= 2), 1H	99,6	6,19 (d, *J*= 2), 1H	99,2
7		164,2		163,0		164,4
8	6,37 (d, *J*= 2), 1H	93,7	6,77 (d, *J*= 2), 1H	94,8	6,40 (d, *J*= 2,5), 1H	94,0
9		156,5		157,6		156,6
10		104,0		105,2		104,0
1'		121,2		121,2		121,0
2'	7,53 (d, *J*= 2), 1H	116,3	7,40 (d, *J*= 2,5), 1H	113,8	7,55 (d, *J*= 2), 1H	116,8
3'		144,8		146,0		144,0
4'		148,5		150,0		145,0
5'	6,83 (d, *J*= 8), 1H	115,3	6,90 (d, *J*= 8,5), 1H	116,4	6,84 (d, *J*= 9), 1H	116,0
6'	7,51 (dd, *J* = 8; 2), 1H	121,7	7,44 (dd, *J*= 8; 2,5), 1H	119,4	7,56 (dd, *J*= 8; 2), 1H	122,2
	3-*O*-glic		**7-*O*-glic**		**3-*O*-glic**	
1''	5,32 (d, *J*= 7), 1H	101,2	5,06 (d, *J* = 7,5), 1H	100,0	5,43 (d, *J* = 7,5), 1H	101,6
2''	3,22 (m)	74,1	3,24 (m)	73,4	3,22 (m)	74,2
3''	3,29 (m)	76,5	3,30 (m)	76,4	3,30 (m)	77,0
4''	3,04 (m)	70,1	3,17 (m)	69,8	3,08 (m)	70,0
5''	3,26 (m)	75,9	3,44 (m)	77,0	3,36 (m)	77,8
6''	3,68; 3,21 (m)	67,0	3,72; 3,46 (m)	60,6	3,32; 3,54 (m)	60,4
	rha-(1'''→6'')glic					
1'''	4,37 (d, *J*= 1), 1H	100,8				
2'''	3,38 (m)	70,4				
3'''	3,27 (m)	70,6				
4'''	3,06 (m)	71,9				
5'''	3,24 (m)	68,3				
6'''	0,97 (d, *J*= 6), 3H	17,7				

* Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HMQC e HMBC, ([a]) valor não determinado.

Tab. 4.6.5: Deslocamentos químicos de RMN de Go6 e Go7 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	Go6		Go7	
	δ^1H (*J* Hz)	δ^1H*(*J* Hz)	δ^1H (*J* Hz)	δ^1H*(*J* Hz)
2				
3	6,64 (s), 1H	6,60 (s), 1H		
4				
5				
6	6,17 (d, *J*= 2), 1H	6,17 (d, *J*= 2)	6,17 (d, *J*= 2), 1H	6,17 (d, *J*= 2)
7				
8	6,43 (d, *J*= 2), 1H	6,39 (d, *J*= 2)	6,39 (d, *J*= 2), 1H	6,39 (d, *J*= 2)
9				
10				
1'				
2'	7,40 (d, *J*= 2), 1H	7,65 (d, *J*= 2)	7,65 (d, *J*= 2,5), 1H	7,65 (d, *J*= 2)
3'				
4'				
5'	6,88 (d, *J*= 8,5), 1H	6,87 (d, *J*= 8,5)	6,87 (d, *J* = 8,5), 1H	6,87 (d, *J*= 8,5)
6'	7,38 (dd, *J*=8,5; 2), 1H	7,39 (dd, *J*= 8,5; 2)	7,53 (dd, *J*=8,5; 2), 1H	7,53 (dd, *J*= 8,5; 2)

* HARBORNE, 1996

*Identificação de **Go8** e **Go9***

O espectro de RMN ^{1}H (E29) de Go8 exibiu sinais de hidrogênios olefínicos em δ5,34 (6H), de dois hidrogênios anoméricos em δ4,70 (J= 3,5 Hz) e δ4,11 (J= 7,5 Hz), de hidrogênios metilênicos na região de δ1,27 - δ2,79, carbinólicos entre δ3,31 – δ4,07 e de um metílico em δ0,94 (3H). No espectro de RMN de ^{13}C (E30, E31) são verificados 33 sinais, dos quais doze foram atribuídos a duas unidades de hexoses (dois carbonos anoméricos em δ104,9 e δ99,5 e dez carbonos carbinólicos entre δ73,1 – δ60,6); três pertencentes a uma unidade de glicerol di-substituído em δ70,5; δ67,5 e δ65,6; restando dezoito sinais característicos de um ácido graxo do tipo linolênico (18:3$\Delta^{9, 12, 15}$) (carbonila em δ173,1; três pares de duplas em δ131,6/130,0, δ128,0/128,0 e δ127,6/127,0 e onze carbonos alifáticos entre δ33,5-14,2).

A análise dos experimentos bidimensionais Edited-HSQC (E32) e HSQC-TOCSY (E33) e comparação com dados da literatura (WEGNER et al., 2000; LI et al., 2009) permitiu a diferenciação dos carbonos grupos metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários, sugerindo se tratar de um glicolipídeo com duas hexoses. Os experimentos ^{1}H-^{1}H COSY e HSQC-TOCSY (E33), juntamente com a determinação das constantes de acoplamento J_{H1-H2}, evidenciaram sistemas de *spin* referentes à β-galactose (δ4,11; J= 7,5 Hz) e α-galactose (δ4,70; J= 3,5 Hz). O experimento HMBC (E34) forneceu as correlações à longa distância, destacando-se a existente entre o H3' do glicerol (δ4,03 e 3,99) e o C1 do ácido graxo (δ173,1), entre o H1'' da β-galactose (δ4,11) e o C1' do glicerol (δ70,5) e entre o H1'''da α-galactose (δ4,70) e o C6'' da β-galactose (δ66,5).

A confirmação dos açúcares foi feita após hidrólise de Go8 (1 mg em TFA 2M, 100 ºC, 1h) e análise da porção aquosa por CCDC (*iso*-PrOH/EtOAc/H_2O, 7:2:1 v/v e $CHCL_3$/MeOH/AcOH/H_2O 60:32:12:8 v/v, anisaldeído/H_2SO_4), juntamente com a aplicação de padrões de açúcares disponíveis.

O espectro de massas ESI-TSQ (E35) (modo positivo) forneceu o íon da molécula protonada $[M+H]^+$ em *m/z* 677, compatível com a fórmula molecular $C_{33}H_{56}O_{14}$. Esse conjunto de informações (fig. 4.6.5, tab. 4.6.6), associado à análise da rotação ótica ($[\alpha]^{20}_{D}$ + 30; *c*= 0,5; MeOH) e comparação com dados da literatura mostrou que o composto Go8 se trata do (2'*S*)-3'-*O*-β-D-galactopiranosil-(6''$\rightarrow$1''')-α-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol, composto isolado de *Zingiberis rhizoma* (gingerglicolipídeo A) (YOSHIKAWA et al., 1994).

O conjunto dos espectros de RMN de ^{1}H (E36), ^{1}H-^{1}H COSY, Edited-HSQC (E37), HSQC-TOCSY e HMBC de Go9 são similares à Go8. A principal diferença é devido à ausência da unidade *α*-galactose, tratando-se, portanto, do derivado monoglicosilado de Go8. A análise da rotação ótica não forneceu resultados conclusivos.

O espectro de massas (E38) ESI-TSQ (modo negativo) de Go9 exibiu o íon do aduto da molécula com acetato [M+59] em *m/z* 573, compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{46}O_9$. Assim o composto Go9 foi identificado como o 3'-*O*-*β*-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol, isolado em *Sonchus arvensis* (BARUAH et al., 1981; TUNTIWACHWUTTIKUL et al., 2004) (fig. 4.6.5, tab. 4.6.6).

Tab. 4.6.6: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Go8 e Go9 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	Go8				Go9			
	δ^{1}H (*J* Hz)	**δ^{13}C**	**δ^{13}C***	******	**δ^{1}H (*J* Hz)**	**δ^{13}C*****	**δ^{13}C***	******
1		173,1	175,0	C		173,0	175,0	C
2	2,29 (dd, *J*= 7; 14,5)	33,5	34,9	CH_2	2,28 (dd, *J*= 7,5; 15 Hz)	34,0	34,9	CH_2
3	1,52 (m)	24,5	26,5	CH_2	1,54 (m)	25,0	26,5	CH_2
4	1,27 (m)	28,6	30,8	CH_2	1,29 (m)	29,0	30,8	CH_2
5	1,27 (m)	28,6	30,4	CH_2	1,29 (m)	29,0	30,4	CH_2
6	1,27 (m)	28,7	30,2	CH_2	1,29 (m)	29,0	30,2	CH_2
7	1,32 (m)	29,1	30,2	CH_2	1,33 (m)	29,5	30,2	CH_2
8	2,03 (m)	26,7	28,1	CH_2	2,03 (m)	27,0	28,1	CH_2
9	5,34 (m)	127,0	128,2	CH	5,34 (m)	127,0	128,2	CH
10	5,34 (m)	127,6	128,9	CH	5,34 (m)	127,5	128,9	CH
11	2,77 (m)	25,2	26,4	CH_2	2,77 (m)	26,0	26,4	CH_2
12	5,34 (m)	128,0	129,2	CH	5,34 (m)	128,0	129,2	CH
13	5,34 (m)	128,0	129,0	CH	5,34 (m)	128,0	129,0	CH
14	2,77 (m)	25,3	26,0	CH_2	2,77 (m)	26,0	26,0	CH_2
15	5,34 (m)	130,0	131,0	CH	5,34 (m)	130,0	131,0	CH
16	5,34 (m)	131,6	132,7	CH	5,34 (m)	132,0	132,7	CH
17	2,03 (m)	20,1	21,5	CH_2	2,03 (m)	20,5	21,5	CH_2
18	0,94 (dd, *J*= 7,5; 16)	14,2	14,6	CH_3	0,93 (dd, *J*= 7,5; 15)	14,3	14,6	CH_3
1'	4,03; 3,99 (m)	65,6	66,1	CH_2	4,04; 3,98 (m)	65,5	66,1	CH_2
2'	3,82 (m)	67,5	68,0	CH	3,83 (m)	68,0	68,0	CH
3'	3,67; 3,46 (m)	70,5	71,0	CH_2	3,69; 3,48 (m)	71,0	71,0	CH_2
3'-*O*-gal					**3'-*O*-gal**			
1''	4,11 (d, *J*= 7,5), 1H	104,0	104,6	CH	4,09 (d, *J*= 7,5), 1H	105,0	104,6	CH
2''	3,33 (m)	70,6	71,8	CH	3,32 (m)	71,0	71,8	CH
3''	3,33 (m)	73,1	73,7	CH	3,30 (m)	73,5	73,7	CH
4''	3,60 (m)	68,5	68,6	CH	3,66 (m)	68,5	68,6	CH
5''	3,58 (m)	72,9	73,5	CH	3,34 (m)	75,5	73,5	CH
6''	3,65; 3,59 (m)	66,5	67,1	CH_2	3,55/ 3,49 (m)	61,0	67,1	CH_2
gal-(1'''→6'')-gal								
1'''	4,70 (d, *J*= 3,5), 1H	99,5	100,0	CH				
2'''	3,55 (m)	69,6	69,0	CH				
3'''	3,74 (m)	68,9	70,1	CH				
4'''	3,64 (m)	68,1	69,4	CH				
5'''	3,72 (m)	71,3	71,1	CH				
6'''	3,55; 3,48 (m)	60,6	61,1	CH_2				

(*) Yoshikawa et al., 1994; Li et al., 2009, Wegner et al. 2000. (**) Multiciplidade obtida pelo experimento Edited-HSQC; (***) Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HSQC e HMBC

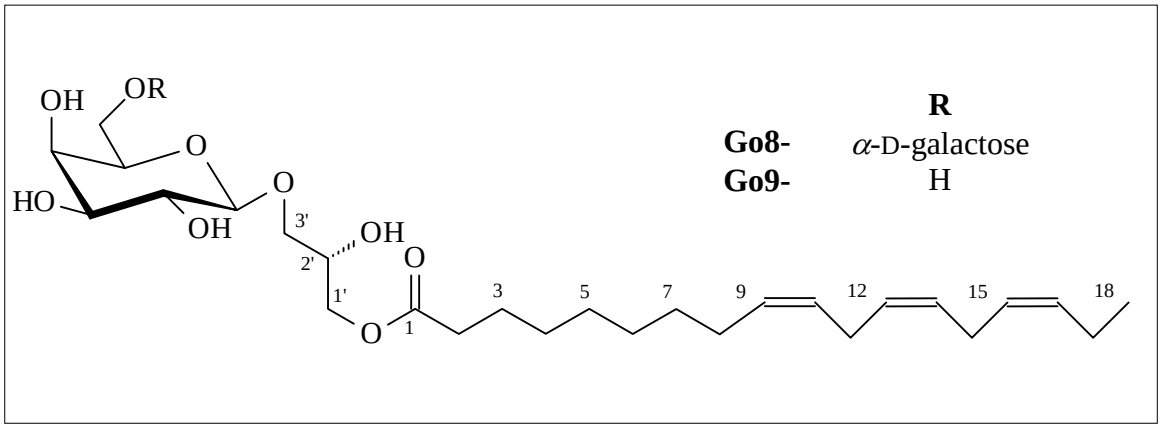


Fig. 4.6.5: Estruturas de Go8: (2'*S*)-3'-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(6''→1''')-*α*-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol e Go9: 3'-*O*-*β*-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol

*Identificação de **Go10***

Go10 apresentou aspecto sólido de cor amarelo. O espectro de Go10 na região do UV (E39) apresentou perfil espectral e máximos de absorção em 265 e 347 nm, típicos de flavonol.

O espectro de RMN de ^{1}H (E40) de Go10 mostrou sinais na região aromática de um flavonóide derivado do kaempferol: dos hidrogênios H3'/H5' (d, *J*= 8,5 Hz, 2H) em δ 6,88 e H2'/H6' em δ 7,97 (d, *J*=8,5 Hz, 2H) do anel B flavonoídico; além dos sinais dos hidrogênio H6 em δ 6,17 (sl, 1H) e H8 (sl, 1H) em δ 6,38 do anel A. O mesmo espectro também exibiu os sinais de dois hidrogênios anoméricos de açúcares em δ 5,29 (1H, *J*= 7,5 Hz) e δ 4,41 (1H, sl) e de um dubleto (3H, *J*= 6 Hz) em δ 1,01, indicativo do grupo CH_3 de uma rhamnose. A natureza dos açúcares foi deduzida com base nos experimentos ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC (E42), HSQC-TOCSY e nas constantes de acoplamento J_{H1-H2}, verificando-se os açúcares *β*-glicose (δ 5,29) e *α*-rhamnose (δ 4,41). O espectro HMBC (E43) de Go10 mostrou o acoplamento à longa distância entre o C3 da aglicona e o H1-Glic, além da correlação entre H1-Rha (δ 4,41) com o C6-Glic (δ 67,5).

O espectro de massas (modo negativo) ESI-IT (E41) exibiu o íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 593, compatível com a fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{15}$. Esse conjunto de informações e comparação com a literatura (AGRAWAL, 1989), permitiram identificar Go10 como o kaempferol-3-*O*-*β*-D-glicopiranosil-(6''→1''')-*O*-*α*-L-rhamnopiranosídeo (fig. 4.6.6, tab. 4.6.7).

*Identificação de **Go11***

O espectro na região do UV de Go11 (E44) apresentou perfil espectral e máximos de absorção em 254 e 354 nm, característicos de um flavonol.

O espectro de RMN de ^{1}H de Go11 (E45) revelou sinais na região aromática característicos de um flavonóide derivado da quercetina: sinal do H6' em δ 7,54 (dd, *J*= 2 e 8,5 Hz), do H2' em δ 7,84 (d, *J*= 2 Hz), do H5' em δ 6,93 (d, *J*= 8,5 Hz) pertencentes ao anel B di-oxigenado, além dos sinais dos hidrogênios H8 e H6 em δ 6,43 e δ 6,21, respectivamente, do anel A flavonoídico. A presença de um singleto em δ 3,84 (3H) indica uma metoxila. Duas unidades sacarídicas foram verificadas em δ 5,42 (1H, *J*= 7 Hz) e δ 4,43 (1H, sl), além do dubleto (3H, *J*= 6,0 Hz) em δ 1,00, indicativo do grupo CH_3 de uma unidade de rhamnose. A análise dos experimentos HSQC-TOCSY e ^{1}H-^{1}H COSY, levou à identificação dos açúcares β-glicose (δ 5,42) e α-rhamnose (δ 4,43). Os experimentos HSQC (E47) e HMBC (E48) permitiram completar a atribuição dos sinais, além de verificar que a glicose (δ 5,42) está ligada ao C-3 (δ 134,0) da aglicona do flavonóide, que a rhamnose (δ 4,43) encontra-se ligada no C-6 (δ 66,0) da glicose e que o singleto da metoxila (δ 3,84) correlaciona-se com o C3'(δ 148,0) da aglicona.

O espectro de massas ESI-IT (E46) exibiu o íon da molécula desprotonada [M-H]$^-$ em *m/z* 623, compatível com a fórmula molecular $C_{28}H_{32}O_{16}$. Esses dados, em comparação com os da literatura específica (AGRAWAL, 1989), confirmaram e estrutura da 3'-metoxiquercetina-3-*O*-β-D-glicopiranosil-(6''$\rightarrow$1''')-*O*-α-L-rhamnopiranosídeo (fig. 4.6.6, tab. 4.6.7).

*Identificação de **Go12***

O espectro de UV (E49) de Go12 apresentou perfil espectral e máximos de absorção em 266 e 337 nm, típicos de flavonas.

O espectro de RMN de ^{1}H (E50) apresentou sinais na região aromática característicos de uma flavona derivada da apigenina: um singleto (1H) do hidrogênio H3 em δ 6,81, dois dubletos (*J*= 8,5 Hz, 2H cada) dos hidrogênios H2'/H6' em δ 7,94 e dos hidrogênios H3'/H5' em δ 6,95 (d, *J*=8,5 Hz, 2H); além dos dubletos (1H, *J*= 2,0 Hz, cada) dos hidrogênios H6 em δ 6,45 e H8 em δ 6,82.

A molécula em questão também apresentou uma unidade de açúcar, pela presença de dubleto de um próton anomérico em δ 5,06 (1H, *J*= 7 Hz), que foi determinada como sendo uma β-glicose pela análise dos experimentos ^{1}H-^{1}H COSY e HSQC-TOCSY. O posicionamento da glicose foi deduzido a partir da observação da correlação existente no experimento HMBC (E53) entre o sinal do hidrogêncio anomérico (δ 5,06) e o C-7 da aglicona flavonoídica (δ 163,0).

O espectro de massas ESI-IT (E51) exibiu o íon da molécula desprotonada [M-H]$^{-}$ em *m/z* 431, correspondente a $C_{21}H_{20}O_{10}$. A partir desse conjunto de informações, juntamente com os da literatura específica (Agrawal, 1989), confirmou-se e estrutura da flavona apigenina 7-*O*-β-D-glicopiranosídeo (fig. 4.6.6, tab. 4.6.7).

*Identificação de **Go13***

O espectro na região do UV (E54) de Go13 apresentou máximos de absorção em 252 e 348 nm e perfil espectral típicos de uma flavona.

O espectro de RMN de ^{1}H (E55) evidencia a mistura de dois flavonóides. Na região de δ 6,41 a 7,94 observa-se o mesmo conjunto de sinais de Go12, além dos sinais de uma segunda flavona derivada da luteolina: H2' em δ 7,52; H5' em δ 6,94 (d, *J*= 8,5 Hz) e H6' em δ 7,52 (dd, *J*= 2; 8 Hz); H8 em δ 6,86 (*J*= 1,5 Hz) e H6 em δ 6,45 (*J*= 1,5 Hz). O singleto em δ 6,93 (1H) caracteriza o H3 de uma flavona. Em δ 3,90 (3H) observa-se um singleto de uma metoxila e um hidrogênio anomérico de açúcar em δ 5,07 (*J*= 7,0 Hz).

Com base nos experimentos ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC-TOCSY e nas constantes de acoplamento do açúcar, verificou-se uma β-glicose. De maneira similar à Go12, o experimento HMBC revelou que a glicose está ligada ao C-7 da aglicona e que a metoxila encontra-se ligada no C-3' do anel B flavonoídico.

O espectro de massas ESI-IT (E56) exibiu o íon da molécula desprotonada [M-H]$^{-}$ em *m/z* 461, compatível com a fórmula $C_{22}H_{22}O_{11}$. Este conjunto de dados e comparação com os da literatura (AGRAWAL, 1989) possibilitaram identificar a 3'-metoxiluteolina-7-*O*-β-D-glicopiranosídeo (fig. 4.6.6, tab. 4.6.8).

*Identificação de **Go14***

O espectro na região do UV de Go14 (E57) forneceu perfil espectral e máximos de absorção em 255 e 355 nm, caracteríticos de um flavonol.

O espectro de RMN de ^{1}H (E58) de Go14 exibiu sinais na região aromática de um derivado da quercetina monoglicosilado: um duplo-dubleto em δ 7,55 (1H, *J*= 2 e 8 Hz, H6'), dubletos em δ 7,48 (1H, *J*= 2 Hz, H2') e em δ 6,77 (1H, *J*= 8,5 Hz, H5'), sinal do H8 em δ 6,26 (sl, 1H), do H6 em δ 6,06 (sl, 1H) e do hidrogênio anomérico em δ 5,20 (1H, d, *J*= 5,5 Hz).

Com base na análise dos espectros ^{1}H-^{1}H COSY, HSQC-TOCSY e HMBC foi identificado o açúcar α-arabinose e que este está ligado ao C3 da aglicona (δ 135,5).

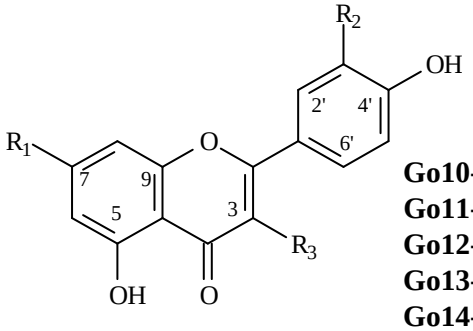
O espectro de massas ESI-IT (E59) exibiu o íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 433, compatível com a fórmula $C_{20}H_{18}O_{11}$. Esses dados, juntamente com os da literatura específica (AGRAWAL, 1989), confirmaram e estrutura de Go14 como quercetina-3-*O*-α-L-arabinopiranosídeo (fig. 4.6.6, tab. 4.6.8).

*Identificação de **Go15***

O espectro no UV (E60) de Go15 apresentou perfil espectral e máximos de absorção em 251 e 347 nm, típicos de flavonas.

O espectro de RMN de ^{1}H (E61) mostrou sinais na região aromática, confirmando o esqueleto de uma flavona derivada da luteolina: um singleto (1H) H3 em δ 6,74, dubletos em δ 7,50 (1H, *J*= 1,5 Hz, H2') e em δ 6,93 (1H, *J*= 8,5 Hz, H5') e um duplo-dubleto em δ 7,52 (1H, *J*= 1,5 e 8 Hz, H6'), sinal do H6 em δ 6,12 e H8 em δ 6,41. Também é observado um singleto de metoxila em δ 3,88 (3H), que foi posicionada com base correlação do experimento HMBC existente com o C3' (δ 149,0) da aglicona flavonoídica.

O espectro de massas (E62) ESI-IT, forneceu íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 299, compatível com a fómula molecular $C_{16}H_{12}O_6$. Estes dados, jutamente com os da literatura específica, permitram a identificação de Go15 como 3'-metoxiluteolina (crisoeriol) (fig. 4.6.6, tab. 4.6.8).



	R_1	R_2	R_3
Go10-	OH	H	*O*-*β*-D-glic-(6→1)-*α*-L-rha
Go11-	OH	OCH_3	*O*-*β*-D-glic-(6→1)-*α*-L-rha
Go12-	*O*-*β*-D-glic	H	H
Go13-	*O*-*β*-D-glic	OCH_3	H
Go14-	OH	OH	*O*-*α*-L-ara
Go15-	OH	OCH_3	H

Fig. 4.6.6: Estrutura de Go10: kaempferol-3-*O*-*β*-D-glicopiranosil-(6''→1''')-*O*-*α*-L-rhamnopiranosídeo; Go11: 3'-metoxiquercetina-3-*O*-*β*-D-glicopiranosil-(6''→1''')-*O*-*α*-L-rhamnopiranosideo; Go12: apigenina 7-*O*-*β*-D-glicopiranosídeo; Go13: 3'-metoxiluteolina-7-*O*-*β*-D-glicopiranosídeo. Go14: quercetina-3-*O*-*α*-L-arabinopiranosídeo; Go15: 3'-metoxiluteolina

Tab. 4.6.7: Deslocamentos químicos de RMN de Go10, Go11 e Go12 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	Go10		**Go11**		**Go12**	
	δ^1H (*J* Hz)	**δ^{13}C***	**δ^1H (*J* Hz)**	**δ^{13}C***	**δ^1H (*J* Hz)**	**δ^{13}C**
2		155,5		157,0		165,0
3		134,5		134,0	6,81 (s), 1H	103,0
4		[a]		[a]		183,0
5		[a]		[a]		[a]
6	6,17 (s), 1H	99,0	6,21 (d, *J*= 1,5), 1H	99,0	6,45 (d, *J*= 2,0), 1H	99,0
7		[a]		[a]		163,0
8	6,38 (s), 1H	94,0	6,43 (d, *J*= 1), 1H	94,5	6,82 (d, *J*= 2,0), 1H	95,0
9		[a]		[a]		[a]
10		105,0		104,5		106,0
1'		121,0		121,0		121,0
2'	7,97 (d, *J*= 8,5), 1H	131,0	7,84 (d, *J*= 2), 1H	114,0	7,94 (d, *J*= 8,5), 1H	129,0
3'	6,89 (d, *J*= 8,5), 1H	115,0		148,0	6,95 (d, *J*= 8,5), 1H	117,0
4'		160,0		150,0		161,0
5'	6,89 (d, *J*= 8,5), 1H	115,0	6,93 (d, *J*= 8,5), 1H	116,0	7,94 (d, *J*= 8,5), 1H	117,0
6'	7,97 (d, *J*= 8,5), 1H	131,0	7,53 (dd, *J*= 8,5, 2), 1H	123,0	6,95 (d, *J*= 8,5), 1H	129,0
	3-*O*-glic		**3-*O*-glic**		**7-*O*-glic**	
1''	5,29 (d, *J*= 7,5 Hz), 1H	102,0	5,42 (d, *J*= 7), 1H	102,0	5,06 (d, *J*= 7,0), 1H	100,5
2''	3,19 (m)	74,5	3,24 (m)	74,5	3,30 (m)	73,5
3''	3,24 (m)	76,0	3,29 (m)	76,5	3,33 (m)	77,0
4''	3,11 (m)	72,5	3,08 (m)	72,0	3,21 (m)	70,5
5''	3,22 (m)	77,0	3,23 (m)	77,0	3,46 (m)	78,0
6''	3,70; 3,28 (m)	67,5	3,72; 3,30 (m)	68,0	3,74; 3,51 (m), 2H	61,0
	rha-(1'''→6'')-glic		**rha-(1'''→6'')-glic**			
1'''	4,41 (sl), 1H	101,0	4,43 (sl), 1H	101,0		
2'''	3,46 (m)	71,0	3,43 (m)	71,0		
3'''	3,22 (m)	71,5	3,27 (m)	71,5		
4'''	3,08 (m)	70,5	3,06 (m)	70,5		
5'''	3,28 (m)	68,5	3,25 (m)	68,5		
6'''	1,01 (d, *J*= 6), 3H	18,0	1,00 (d, *J*= 6), 3H	18,0		
OMe			3,84 (s), 3H	56,0		

* Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HSQC, HSQC-TOCSY e HMBC, ([a]) valores não determinados

Tab. 4.6.8: Deslocamentos químicos de RMN de Go13, Go14 e Go15 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	Go13		Go14		Go15	
	δ^1H (*J* Hz)	δ^{13}C*	δ^1H (*J* Hz)	δ^{13}C*	δ^1H (*J* Hz)	δ^{13}C*
2		165,0		158,0		164,0
3	6,86 (s), 1H	103,0		135,0	6,74 (s)	103,0
4		183,0		[a]		180,0
5		[a]		[a]		162,0
6	6,45 (d, *J*= 2), 1H	99,0	6,06 (s), 1H	99,0	6,12 (d, *J*= 1), 1H	100,0
7		163,0		[a]		164,0
8	6,86 (d, *J*= 1,5), 1H	95,0	6,26 (s), 1H	94,0	6,41 (d, *J*= 1), 1H	94,0
9		[a]		[a]		[a]
10		106,0		105,0		104,0
1'		121,0		122,0		121,0
2'	7,58 (s), 1H	129,0	7,48 (d, *J*= 2), 2H	117,0	7,50 (d, *J*= 2), 1H	110,0
3'		117,0		146,0		149,0
4'		161,0		150,0		150,0
5'	6,94 (d, *J*= 8,5), 1H	117,0	6,77 (d, *J*= 8,5), 1H	116,0	6,93 (d, *J*= 8,5), 1H	117,0
6'	7,58 (dd, *J*= 8, 2,5), 1H	129,0	7,56 (dd, *J*= 2, 8,5), 1H	122,0	7,52 (dd, *J*= 8,5, 2,5), 1H	121,0
	7-*O*-glic		**3-*O*-ara**			
1''	5,06 (d, *J*= 7), 1H	100,5	5,20 (d, *J*= 5,5), 1H	102,0		
2''	3,28 (m)	74,0	3,75 (m)	71,0		
3''	3,35 (m)	77,0	3,47 (m)	72,0		
4''	3,18 (m)	70,5	3,61 (m)	66,0		
5''	3,45 (m)	78,5	3,57; 3,18 (m)	65,0		
6''	3,75; 3,50 (m), 2H	61,5				
OMe	3,90 (s), 3H	57,0			3,88 (s)	56,5

* Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HSQC, HSQC-TOCSY e HMBC, ([a]) valores não determinados

4.7 Fracionamento e purificação de *G. graciliflora*

As etapas de isolamento e identificação das substâncias Gg1 a Gg7 foram realizadas no "Department of Pharmaceutical Sciences, University of Basel"/Suiça, em colaboração com o prof. Dr. Matthias Hamburger e Dr. Olivier Potterat.

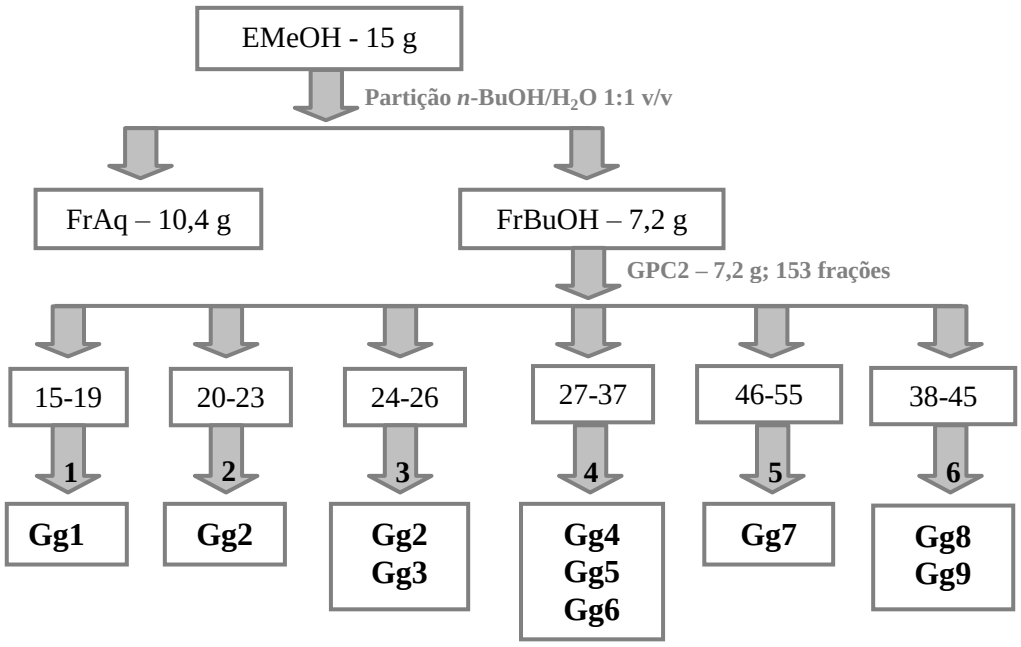
O EMeOH das folhas de *G. graciliflora* (15 g) foi solubilizado em 500 mL de água e em seguida particionado com *n*-butanol 1:1 v/v (3×). As frações resultantes foram secas sob pressão reduzida, transferidas para recipientes de vidro pesados e colocadas em capela sob jato de nitrogênio até secagem completa, obtendo-se 7,2 g da porção butanólica (FrBuOH) e 10,4 g da porção aquosa (FrAq).

Em seguida, toda a porção butanólica foi solubilizada em 25 mL de MeOH e centrifugada por 20 min a 2500 rpm. O sobrenadante foi fracionado por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC2), empregando-se metanol como fase móvel a um fluxo de 4 mL/min. Frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas, obtendo-se o total de 153 frações.

Estas foram analisadas por CCD (silicagel, $CHCl_3$/MeOH/*n*-prOH/H_2O 5/6/1/4, v/v, fase orgânica) e reunidas conforme similaridade de Rf e colorações diante dos reveladores empregados (anisaldeído/H_2SO_4, luz UV). A tabela 4.7.1 apresenta o agrupamento resultante das subfrações obtidas por CPG. Em seguida as mesmas foram analisadas por HPLC-UV-ELSD e purificadas com o uso de MPLC e HPLC (HPLC-SP1 e HPLC-SP2), conforme ilustrado na figura 4.7.1.

Tab. 4.7.1: Resultado obtido do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de *G. graciliflora*

Código	Massa da fração (mg)		Substância pesente	Massa da subst. (mg)
1-10	285,3			
11-14	356,7			
15-19	180,7	Gg1	oleanolato 3-*O*-*β*-D-[glicAc-(3'→1'')-*O*-*β*-D-gal-(2''→1''')-*O*-*α*-L-rha]-28-*O*-*β*-D-glicopiranosila	5
20-23	150,1	Gg2	oleanolato 3-*O*-*β*-D-[glicAc-(3'→1'')-*O*-*β*-D-gal-(3''→1''')-*O*-*β*-D-xil]-28-*O*-*β*-D-glicopiranosila	7
24-26	101,0	Gg2	oleanolato 3-*O*-*β*-D-[glicAc-(3'→1'')-*O*-*β*-D-gal-(3''→1''')-*O*-*β*-D-xil]-28-*O*-*β*-D-glicopiranosila	8
		Gg3	(2'*S*)-3'-*O*-*β*-D-galactopiranosil(6''→1''')-*α*-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol	2
27-37	470,3	Gg4	ácido 3-*O*-*β*-D-[glicAc-(3'→1'')-*O*-*β*-D-gal-(2''→1''')-*O*-*α*-L-rha]-oleanólico	2,5
		Gg5	ácido 3-*O*-*β*-D-[glicAc-(3'→1'')-*O*-*β*-D-gal-(3''→1''')-*O*-*β*-D-xil]-oleanólico	2
		Gg6	3'-*O*-*β*-D-gal-1'-*O*-(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol	2,5
38-45	420,1	Gg7	*β*-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glic	5
46-55	621,9	Gg8	quercetina-3-*O*-{*α*-L-rha-(1'''→2'')-[*O*-*α*-L-rha-(1''''→6'')]}-*O*-*β*-D-gal	5
		Gg9	kaempferol-3-*O*-{*α*-L-rha-(1'''→2'')-[*O*-*α*-L-rha- (1''''→6'')]}-*O*-*β*-D-gal	8
56-65	398,6			
66-75	288,0			
76-78	229,3			
79-84	251,0			
85-87	122,5			
88-93	162,2			
94-104	200,4			
105-119	306,1			
120-152	245,7			
Final	333,0			



1: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN 71:29, 4 mL/min; t_r= 13 min
2: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN 67:33, 4 mL/min; t_r= 12 min
3: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN 33% B em 20 min; 33-80% B em 25 min; 4 mL/min; Gg2 t_r = 12 min, Gg3 t_r =20 min
4: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN 25-40% B em 10 min, 40-55%B em 17 min, 55-65% B em 23 min, 65-85% B em 30 min; 4 mL/min; Gg4 t_r=13, Gg5 t_r =21, Gg6 $t_{r=}$ 26 min
5: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, H_2O/ACN; 4 mL/min; Gg7 t_r=18 min
6: HPLC-SP1: C_{18} 250 × 10 mm × 5,0 μm, H_2O/MeOH 60:40; 2,5 mL/min, Gg8 t_r=12 min, Gg9 t_r = 15 min

Fig. 4.7.1: Fracionamento da FrBuOH do EMeOH das folhas de *G. graciliflora*

*Identificação de **Gg1** e **Gg4***

O espectro de RMN de ^{1}H de Gg1 (E63) exibiu um conjunto de sinais característicos de um triterpeno da classe oleanano: sete singletos na região de δ 1,10-0,69 (3H cada) e um singleto largo olefínico em δ 5,16. O mesmo espectro também mostrou a presença de quatro prótons anoméricos em δ 5,25 (d, *J*= 8 Hz, 1H), δ 5,06 (sl), δ 4,45 (d, *J*= 7,5 Hz, 1H) e δ 4,32 (d, *J*= 7,5 Hz, 1H) e de um dubleto em δ 1,11 (*J*= 6 Hz, 3H), sugestivo de uma metila de rhamnose. No espectro de RMN de ^{13}C (E64) são observados trinta sinais pertencentes à uma aglicona triterpênica e vinte e quatro à porção sacarídica.

Os valores de deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 (δ 121,6 e δ 143,4), corroboram com a proposta de um triterpeno-Δ^{12}-oleanano (AGRAWAL & JAIN, 1992). Os valores de deslocamentos químicos das posições C3 (δ 88,2) e C28 (δ 175,3), quando comparados aos do ácido oleanólico (KOJIMA et al., 1990; MAHATO & KUNDU, 1994), é sugestivo de uma saponina bidesmosídica. O experimento Edited-HSQC (E65, E66, E67) permitiu diferenciar carbonos de grupos metila, grupos metilênicos, grupos metínicos e carbonos quaternários.

Para a identificação preliminar dos açúcares foi realizada a hidrólise de Gg1. Aqueceu-se a 105 ºC 1 mg do composto em 1 mL de TFA 2M, em refluxo por 1 h. A mistura foi fracionada por ELL em AcOEt e H_2O (0,5 mL, v/v) e as frações aquosa e orgânica analisadas por CCDC com a aplicação simultânea de padrões. Assim, foram identificados os açúcares glicose, galactose, rhamnose e o ácido glicurônico na fase aquosa (*iso*-PrOH/AcOEt/H_2O, 7:2:1 v/v e $CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O 60:32:12:8 v/v, anisaldeído/H_2SO_4) e o ácido oleanólico na orgânica (Hex/AcOEt 4:6 v/v).

A análise detalhada dos espectros ^1H-^1H COSY e HSQC-TOCSY, juntamente com a determinação das constantes de acoplamento $J_{H1\text{-}H2}$, permitiram confirmar os resultados obtidos com a hidrólise. Verificou-se a presença da β-glicose (δ 5,25; J= 8 Hz), α-rhamnose (δ 5,06), β-galactose (δ 4,45; J= 7,5 Hz) e β-ácido glicurônico (δ 4,32; J= 7,5 Hz).

Os experimentos bidimensionais HSQC e HMBC (E68) forneceram as correlações dos carbonos e hidrogênios da molécula em questão. Dentre as correlações à longa distância observadas, destacam-se aquelas existentes entre o entre o H1'-GlicAc (δ 4,32) e o C3 da aglicona (δ 88,2); entre o H1''-Gal (δ 4,45) e o C3' do GlicAc (δ 85,2), entre o H1'''-Rha (δ 5,06) e o C2'' da Gal (δ 74,9), além do acoplamento entre o H1''''-Glic (δ 5,25) e o C28 (δ 175,2).

O espectro de massas ESI-TSQ de Gg1 (E69) exibiu o íon da molécula desprotonada $[M\text{-}H]^-$ em *m/z* 1101, compatível com a fórmula molecular $C_{54}H_{86}O_{23}$. Desta maneira, Gg1 foi identificada como o oleanolato 3-*O*-β-D-[glicuronopiranosil-(3'$\rightarrow$1'')-*O*-β-D-galactopiranosil-(2''$\rightarrow$1''')-*O*-β-D-rhamnopiranosídeo]-28-*O*-β-D-glicopiranosila (fig. 4.7.2, tab. 4.7.2), isolado anteriormente de *Ximenia americana* (Olacaceae) (D'AGOSTINO et al., 1994).

O espectro de RMN de ^{1}H (E70) e experimentos bi-dimesionais (E71 a E73) de Gg4 foram similares aos de Gg1. Foram verificados sete grupos metílicos: Me-23 (δ 0,97/27,8), Me-24 (δ 0,77/17,0), Me-25 (δ 0,87/15,5), Me-26 (δ 0,72/17,3), Me-27 (δ 1,09/26,0); Me-29 (δ 0,87/33,0) e Me-30 (δ 0,87/24,5); além dos sinais de carbonos sp^2 (δ 121,5 e δ 143,0) e de três prótons anoméricos em δ 5,02; δ 4,67 e δ 4,16. A principal diferença é devido à ausência do açúcar em C28; o que sugere que Gg4 seja o derivado monodesmosídico de Gg1.

A identificação adicional da porção sacarídica veio da hidrólise de Gg4, nas mesmas condições descritas para Gg1 (0,5 mg em TFA 2M, 105 ºC, 1 h, CCDC: *iso*-PrOH/AcOEt/H_2O, 7:2:1 v/v e $CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O 60:32:12:8 v/v, anisaldeído/H_2SO_4), juntamente com a análise detalhada das constantes de acoplamento e dos experimentos HSQC-TOCSY e ^{1}H-^{1}H COSY. Assim, foi confirmada a presença dos açúcares α-rhamnose (δ 5,02), β-galactose (δ 4,67; J= 7,5 Hz) e β-ácido glicurônico (δ 4,16; J= 8 Hz).

O experimento HMBC forneceu as principais correlações existentes à longa distância, dentre elas, entre o H1'-GlicAc (δ 4,16) e o C3 da aglicona (δ 88,4); entre o H1''-Gal (δ 4,67) e o C3' do GlicAc (δ 84,0) e entre o H1'''-Rha (δ 5,02) e o C2'' da Gal (δ 75,2), o que permitiu definir cadeia de açúcares.

O espectro de massas (E74) exibiu o íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 939, compatível com a fórmula molecular $C_{48}H_{75}O_{18}$. Desta maneira, Gg4 foi identificada como o ácido 3-*O*-β-D-[glicuronopiranosil-(3'$\rightarrow$1'')-*O*-β-D-galactopiranosil-(2''$\rightarrow$1''')-*O*-β-D-rhamnopiranosídeo]-oleanólico (fig. 4.7.2 e tab. 4.7.3), obtido anteriormente apenas como produto da hidrólise de Gg1 (D'AGOSTINO et al., 1994).

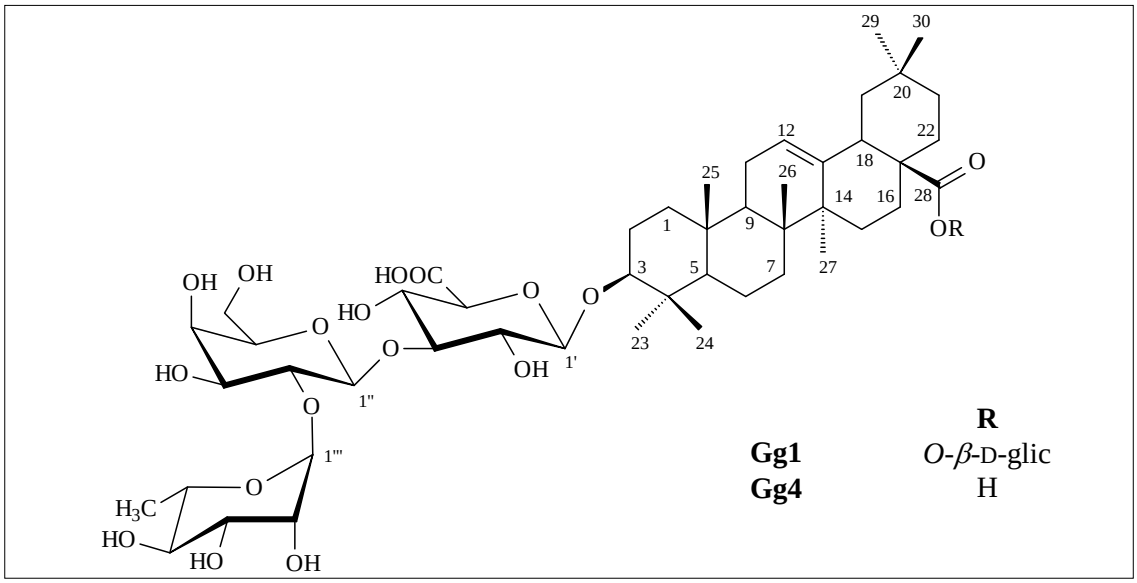


Fig. 4.7.2: Estrutura de Gg1: oleanolato 3-*O*-*β*-D-[glicuronopiranosil-(3'→1'')-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(2''→1''')-*O*-*β*-D-rhamnopiranosídeo]-28-*O*-*β*-D-glicopiranosila e Gg4: ácido 3-*O*-*β*-D-[glicuronopiranosil-(3'→1'')-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(2''→1''')-*O*-*β*-D-rhamnopiranosídeo]-oleanólico

Tab. 4.7.2: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Gg1 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C	δ^{13}C*	**		δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C	**
1	1,54; 0,93 (m)	38,0	38,1	CH_2	**3-*O*-glicAc**			
2	1,72; 1,58 (m)	25,5	25,4	CH_2	**1'**	4,32 (d, *J*= 7,5), 1H	105,2	CH
3	3,10 (m)	88,2	88,5	CH	**2'**	3,16 (m)	72,4	CH
4		38,6	38,5	C	**3'**	3,41 (m)	85,2	CH
5	0,74	54,8	55,0	CH	**4'**	3,34 (m)	70,4	CH
6	1,50; 1,33 (m)	17,7	17,6	CH_2	**5'**	3,44 (m)	75,1	CH
7	1,42; 1,26 (m)	32,1	32,0	CH_2	**6'**		170,4	C
8		39,0	38,9	C	**gal-(1''→3')-glcAc**			
9	1,51 (m)	47,0	46,9	CH	**1''**	4,45 (d, *J*= 7,5), 1H	102,0	CH
10		36,2	36,1	C	**2''**	3,60 (m)	74,9	CH
11	1,98; 1,63 (m)	22,4	22,3	CH_2	**3''**	3,58 (m)	73,5	CH
12	5,16 (sl), 1H	121,6	122,0	CH	**4''**	3,56 (m)	68,7	CH
13		143,4	143,4	C	**5''**	3,48 (m)	74,1	CH
14		41,2	41,0	C	**6''**	3,50; 3,43 (m)	60,3	CH_2
15	1,76; 1,02 (m)	27,1	27,3	CH_2	**rha-(1'''→2'')-gal**			
16	1,83 (m)	22,8	23,1	CH_2	**1'''**	5,06 (sl), 1H	99,7	CH
17		45,8	45,8	C	**2'''**	3,64 (m)	70,2	CH
18	2,78 (m)	40,7	40,5	CH	**3'''**	3,59 (m)	69,8	CH
19	1,66; 1,12 (m)	45,4	45,1	CH_2	**4'''**	3,12 (m)	72,2	CH
20		30,2	30,2	C	**5'''**	4,07 (m)	67,3	CH
21	1,37; 1,20 (m)	33,1	33,0	CH_2	**6'''**	1,11 (d, *J*= 6), 3H	17,7	CH_3
22	1,60; 1,54 (m)	31,5	31,5	CH_2	**28-*O*-glic**			
23	0,97 (s)	27,5	27,8	CH_3	**1''''**	5,25 (d, *J*= 8), 1H	94,0	CH
24	0,75 (s)	16,4	16,5	CH_3	**2''''**	3,10 (m)	72,3	CH
25	0,86 (s)	15,1	15,1	CH_3	**3''''**	3,20 (m)	76,5	CH
26	0,69 (s)	16,6	17,1	CH_3	**4''''**	3,11 (m)	69,4	CH
27	1,08 (s)	25,4	25,9	CH_3	**5''''**	3,14 (m)	77,6	CH
28		175,2	175,6	C	**6''''**	3,61/3,43 (m)	60,5	CH_2
29	0,87 (s)	32,7	32,6	CH_3				
30	0,87 (s)	23,3	23,5	CH_3				

(*) Mitaine-Offer et al., 2001 (**) Multiplicidades obtidas pelo experimento Edited-HSQC

Tab. 4.7.3: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Gg4 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$*	$\delta^{13}C$**	***		$\delta^{1}H$	$\delta^{13}C$*	
1	1,55; 0,92 (m)	38,0	38,1	CH_2	**3-*O*-glcAc**			
2	1,90; 1,57 (m)	26,0	25,4	CH_2	**1'**	4,16 (d, *J*= 8), 1H	105,0	CH
3	3,10 (m)	88,4	88,5	CH	**2'**	3,16 (m)	72,9	CH
4		38,5	38,5	C	**3'**	3,45 (m)	84,6	CH
5	0,78	55,5	55,0	CH	**4'**	3,30 (m)	71,0	CH
6	1,53; 1,30 '(m)	18,0	17,6	CH_2	**5'**	3,45 (m)	75,0	CH
7	1,45; 1,28 (m)	32,8	32,0	CH_2	**6'**		170,2	C
8		39,0	38,9	C	**gal-(1''→3')-glicAc**			
9	1,55 (m)	47,5	46,9	CH	**1''**	4,68 (d, *J*= 7,5), 1H	102,0	CH
10		36,0	36,1	C	**2''**	3,59 (m)	75,2	CH
11	1,95; 1,85 (m)	23,0	22,3	CH_2	**3''**	3,40 (m)	75,5	CH
12	5,16 (sl), 1H	121,5	122,0	CH	**4''**	3,61 (m)	69,0	CH
13		143,0	143,4	C	**5''**	3,46 (m)	74,9	CH
14		41,5	41,0	C	**6''**	3,54; 3,40 (m)	60,5	CH_2
15	1,70; 1,03 (m)	27,5	27,3	CH_2	**rha-(1'''→2'')-gal**			
16	1,85; 1,55 (m)	23,0	23,1	CH_2	**1'''**	5,02 (sl), 1H	99,8	CH
17		45,5	45,8	C	**2'''**	3,68 (m)	70,8	CH
18	2,76 (m)	41,0	40,5	CH	**3'''**	3,57 (m)	70,8	CH
19	1,63; 1,12 (m)	46,0	45,1	CH_2	**4'''**	3,18 (m)	72,8	CH
20		30,0	30,2	C	**5'''**	4,02 (m)	68,0	CH
21	1,35; 1,17 (m)	34,0	33,0	CH_2	**6'''**	1,10 (d, *J*= 5,5), 3H	17,1	CH_3
22	1,63; 1,48 (m)	32,2	31,5	CH_2				
23	0,97 (s)	27,8	27,8	CH_3				
24	0,77 (s)	17,0	16,5	CH_3				
25	0,87 (s)	15,5	15,1	CH_3				
26	0,72 (s)	17,3	17,1	CH_3				
27	1,09 (s)	26,0	25,9	CH_3				
28		178,0	175,6	C				
29	0,87 (s)	33,0	32,6	CH_3				
30	0,87 (s)	24,5	23,5	CH_3				

(*) Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HSQC e (**) MITAINE-OFFER et al., 2001; (***) Multiplicidades obtidas pelo experimento Edited-HSQC

*Identificação de **Gg2** e **Gg5***

Os espectros de RMN de ^{1}H (E75) e de ^{13}C (E76) de Gg2 exibiram sinais de uma saponina derivada do ácido oleanólico similar à Gg1: sete grupos metílicos terciários em δ 0,99/27,3 (Me-23), δ 0,77/16,4 (Me-24), δ 0,85/15,1 (Me-25), δ 0,68/16,6 (Me-26), δ 1,08/25,4 (Me-27); δ 0,87/32,7 (Me-29) e δ 0,86/23,3 (Me-30); um singleto largo olefínico em δ 5,16/121,6 e quatro prótons anoméricos em δ 5,23/94,0 (d, *J*= 8 Hz), δ 4,40/105,9 (d, *J*= 6 Hz), δ 4,43/102,1 (sl) e δ 4,38/104,1 (*J*= 7,5 Hz). A principal diferença encontrada entre Gg1 e Gg2 refere-se à natureza de um dos açúcares.

Sua identificação foi estabelecida inicialmente por análise do hidrolisado de Gg2 por CCDC nas mesmas condições descritas para Gg1 (TFA 2M, 105º C, refluxo por 1h, CCDC: *iso*-PrOH/AcOEt/H_2O 7:2:1 v/v e $CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O 60:32:12:8 v/v, anisaldeído/H_2SO_4), o que levou ao reconhecimento da glicose, galactose, xilose e do ácido glicurônico na fase aquosa.

Com base na análise dos experimentos bi-dimensionais ^{1}H-^{1}H COSY e HSQC-TOCSY (E77 a E79), juntamente com a determinação das constantes de acoplamento J_{H1-H2}, foram confirmados os açúcares *β*-glicose (δ 5,27; *J*= 8 Hz), *β*-xilose (δ 4,40; *J*= 6 Hz), *β*-galactose (δ 4,43) e *β*-ácido glicurônico (δ 4,38; *J*= 7,5 Hz). O espectro de HMBC (E80 e E81) forneceu as principais correlações existentes à longa distância, dentre elas, entre o H1'-GlicAc (δ4,38) e o C3 (δ87,9), entre o H1''''-Glic (δ5,23) com o C28 (δ 175,1). Além disso, verificou-se as existentes entre o H1''-Gal (δ 4,43) e o C3' do GlcAc (δ88,3), entre o H1'''-Xil (δ 4,40) e o C3'' da Gal (δ82,2), o que é compatível com os valores de RMN descritos na literatura para o mesmo tipo de ligações interglicosídicas (Magid et al., 2006).

O espectro de massas ESI-IT (E82) de Gg2, exibiu íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 1087 (ESI-TOF 1087.5339, calc. 10875325), compatível com a fórmula molecular $C_{53}H_{84}O_{23}$. A análise por MS^n ESI-IT de Gg2 confirmou a cadeia de açúcar a partir da presença dos íons produtos desprotonados em *m/z* 925 $[M-162-H]^-$, 793 $[M-162-132-H]^-$, 631 $[M-162-132-162-H]^-$ e 455 $[M-162-132-162-176-H]^-$ Com base nesse conjunto de informações, Gg2 foi identificado como o oleanolato 3-*O*-*β*-D-[glucuronopiranosil-(3'→1'')-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(3''→1''')-*O*-*β*-D-xilopiranosídeo]-28-*O*-*β*-D-glicopiranosila ($[\alpha]^{25}_D$= + 17; *c*= 0,4; MeOH), inédito (fig. 4.7.3, tab. 4.7.4).

Os espectros de RMN (^{1}H e experimentos bi-dimensionais) de Gg5 exibiram um conjunto de sinais compatíveis com o do derivado monosdemosídico de Gg2, caracterizado pela ausência da glicose em C28. Foram verificados sete grupos metílicos Me-23 (δ 0,99/28,0), Me-24 (δ 0,75/17,0), Me-25 (δ 0,87/15,5), Me-26 (δ 0,72/17,0), Me-27 (δ 1,09/26,3); Me-29 (δ 0,87/33,0) e Me-30 (δ 0,87/23,7); um singleto largo olefínico em δ 5,16; três prótons anoméricos em δ 4,34 (d, *J*=7,5 Hz), δ 4,40 (*J*= 7,5 Hz) e δ 4,46 (*J* = 7,0 Hz); carbonos sp^2 (δ 121,5 e 143,5) de um triterpeno-Δ^{12}-oleanano (AGRAWAL & JAIN, 1992) (E83 a E86).

A natureza dos açúcares foi confirmada após hidrólise ácida pelo mesmo método descrito para Gg1 (TFA 2M, 105º C, refluxo por 1h, CCDC: *iso*-PrOH/AcOEt/H_2O 7:2:1 v/v e $CHCl_3$/MeOH/AcOH/H_2O 60:32:12:8 v/v, anisaldeído/H_2SO_4), em associação com a análise dos espectros ^{1}H-^{1}H COSY e HSQC-TOCSY. Assim, verificaram-se os açúcares β-xilose (δ 4,40; *J*=7,5 Hz), β-galactose (δ 4,46) e β-ácido glicurônico (δ 4,34; *J*= 7,5 Hz).

O experimento HMBC forneceu as principais correlações à longa distância da molécula em questão, principalmente as existentes entre o H1'-GlicAc (δ 4,34) e o C3 da aglicona (δ 88,5); entre o H1''-Gal (δ 4,46) e o C3' do GlicAc (δ 88,8) e entre o H1'''-Xil (δ 40,4) e o C3'' da Gal (δ 82,5), o que corrobora com a proposta do derivado monodesmosídico de Gg2.

O espectro de massas ESI-IT (E87) exibiu o íon da molécula desprotonada [M-H]$^-$ em *m/z* 925 (ESI-TOF 925.4820, calc. 925.4797). A análise por MS^n ESI-IT de Gg5 confirmou a sequência de açúcares a partir da presença dos íons produtos desprotonados em *m/z* 793 [M-132-H]$^-$ e 631 [M-132-162-H]$^-$, o que corrobora com a fórmula molecular $C_{48}H_{75}O_{18}$. Com base neste conjunto de informações, Gg5 foi identificada como o ácido 3-*O*-β-D-[glicuronopiranosil-(3'→1'')-*O*-β-D-galactopiranosil-(3''→1''')-*O*-β-D-xilopiranosídeo]-oleanólico ([α]$^{20}_D$= 22; *c*= 0,25; MeOH), inédito (fig. 4.7.3, tab. 4.7.5).

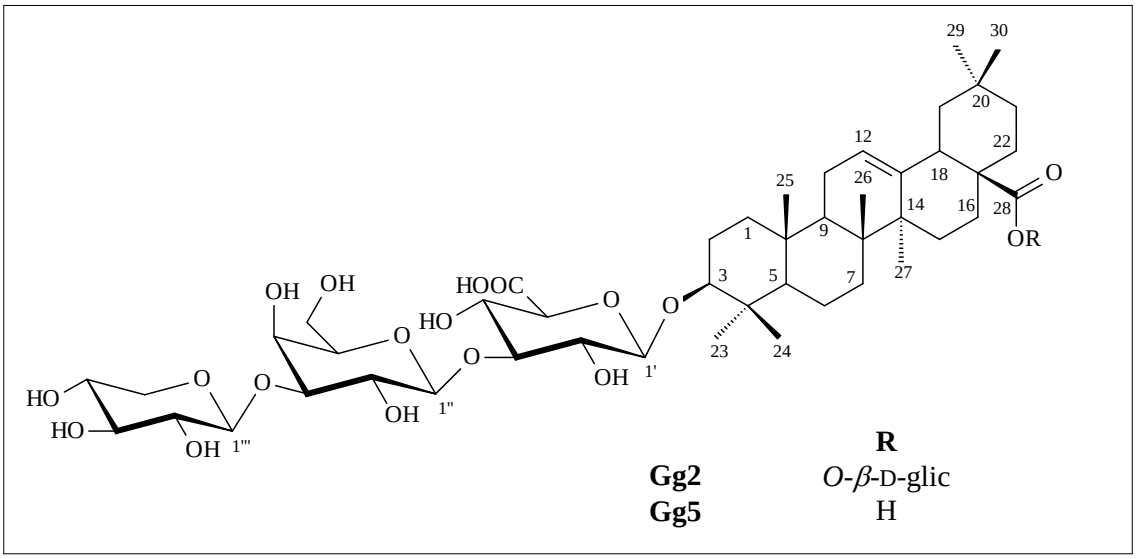


Fig. 4.7.3: Estrutura de Gg2: oleanolato 3-*O*-β-D-[glicuronopiranosil-(3'→1'')-*O*-β-D-galactopiranosil-(2''→1''')-*O*-β-D-xilopiranosídeo]- 28-*O*-β-D-glicopiranosila e Gg5: ácido 3-*O*-β-D-[glicuronopiranosil-(3'→1'')-*O*-β-D-galactopiranosil-(3''→1''')-*O*-β-D-xilopiranosídeo]-oleanólico

Tab. 4.7.4: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Gg2 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C	δ^{13}C*	**		δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C	**
1	1,51; 0,89 (m)	37,9	38,1	CH_2	**3-*O*-glicAc**			
2	1,74; 1,55 (m)	25,4	25,4	CH_2	**1'**	4,38 (d, *J*= 7,5), 1H	104,1	CH
3	3,09 (m)	87,9	88,5	CH	**2'**	3,24 (m)	72,4	CH
4		38,6	38,5	C	**3'**	3,36 (m)	88,3	CH
5	0,71 (m)	54,8	55,0	CH	**4'**	3,45 (m)	70,0	CH
6	1,47; 1,29 (m)	17,7	17,6	CH_2	**5'**	3,62 (m)	75,1	CH
7	1,39; 1,23 (m)	32,1	32,0	CH_2	**6'**		170,5	C
8		39,0	38,9	C	**gal-(1''→3')-glicAc**			
9	1,49 (m)	46,9	46,9	CH	**1''**	4,43 (sl), 1H	102,1	CH
10		36,2	36,1	C	**2''**	3,60 (m)	72,8	CH
11	1,94; 1,60 (m)	22,4	22,3	CH_2	**3''**	3,61 (m)	82,2	CH
12	5,16 (sl), 1H	121,6	122,0	CH	**4''**	3,71 (m)	67,5	CH
13		143,3	143,4	C	**5''**	3,51 (m)	75,4	CH
14		41,2	41,0	C	**6''**	3,54; 3,50 (m)	60,3	CH_2
15	1,74; 0,95 (m)	27,1	27,3	CH_2	**xil-(1'''→3'')-gal**			
16	1,79 (m)	22,8	23,1	CH_2	**1'''**	4,40 (d, *J* = 6), 1H	105,9	CH
17		45,8	45,8	C	**2'''**	3,16 (m)	74,4	CH
18	2,76 (m)	40,6	40,5	CH	**3'''**	3,21 (m)	75,8	CH
19	1,64; 1,09 (m)	45,4	45,1	CH_2	**4'''**	3,32 (m)	69,0	CH
20		30,2	30,2	C	**5'''**	3,16; 3,69 (m)	65,9	CH_2
21	1,32; 1,15 (m)	33,1	33,0	CH_2	**28-*O*-glic**			
22	1,60; 1,50 (m)	31,5	31,5	CH_2	**1''''**	5,23 (d, *J*= 8), 1H	94,0	CH
23	0,98 (s)	27,3	27,8	CH_3	**2''''**	3,16 (m)	72,2	CH
24	0,77 (s)	16,4	16,5	CH_3	**3''''**	3,26 (m)	76,5	CH
25	0,85 (s)	15,1	15,1	CH_3	**4''''**	3,17 (m)	69,4	CH
26	0,68 (s)	16,6	17,1	CH_3	**5''''**	3,19 (m)	77,6	CH
27	1,08 (s)	25,4	25,9	CH_3	**6''''**	3,64; 3,49 (m)	60,5	CH_2
28		175,1	175,6	C				
29	0,87 (s)	32,7	32,6	CH_3				
30	0,86 (s)	23,3	23,5	CH_3				

(*) MITAINE-OFFER et al., 2001; (**) Multiplicidades obtidas pelo experimento Edited-HSQC

Tab. 4.7.5: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Gg5 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C*	δ^{13}C**	***		δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C*	***
1	1,58; 0,92 (m)	38,5	38,1	CH_2	**3-*O*-glicAc**			
2	1,81; 1,60 (m)	25,5	25,4	CH_2	**1'**	4,34 (d, *J*= 7,5), 1H	104,5	CH
3	3,17 (m)	88,5	88,5	CH	**2'**	3,28 (m)	72,9	CH
4		38,5	38,5	C	**3'**	3,40 (m)	88,8	CH
5	0,78 (m)	55,2	55,0	CH	**4'**	3,47 (m)	70,0	CH
6	1,52; 1,40 (m)	18,0	17,6	CH_2	**5'**	3,61 m)	75,5	CH
7	1,48; 1,31 (m)	33,0	32,0	CH_2	**6'**		170,0	C
8		39,0	38,9	C	**gal-(1''→3')-glicAc**			
9	1,57 (m)	47,2	46,9	CH	**1''**	4,46 (sl), 1H	102,5	CH
10		36,0	36,1	C	**2''**	3,64 (m)	73,0	CH
11	1,94; 1,58 (m)	23,0	22,3	CH_2	**3''**	3,65 (m)	82,5	CH
12	5,16 (m), 1H	121,5	122,0	CH	**4''**	3,76 (m)	68,0	CH
13		143,5	143,4	C	**5''**	3,54 (m)	75,5	CH
14		41,0	41,0	C	**6''**	3,63; 3,58 (m)	61,0	CH_2
15	1,74; 1,05 (m)	27,9	27,3	CH_2	**xil-(1'''→3'')-gal**			
16	1,87; 1,58 (m)	23,3	23,1	CH_2	**1'''**	4,40 (d, *J*= 7,5), 1H	106,5	CH
17		45,5	45,8	C	**2'''**	3,14 (m)	75,0	CH
18	2,75 (m)	41,4	40,5	CH	**3'''**	3,26 (m)	76,5	CH
19	1,67; 1,13 (m)	46,0	45,1	CH_2	**4'''**	3,37 (m)	69,0	CH
20		30,0	30,2	C	**5'''**	3,74; 3,22 (m)	66,0	CH_2
21	1,35; 1,21 (m)	33,5	33,0	CH_2				
22	1,70; 1,52 (m)	32,2	31,5	CH_2				
23	0,99 (s)	28,0	27,8	CH_3				
24	0,75 (s)	17,0	16,5	CH_3				
25	0,87 (s)	15,5	15,1	CH_3				
26	0,72 (s)	17,0	17,1	CH_3				
27	1,09 (s)	26,3	25,9	CH_3				
28		178,0	175,6	C				
29	0,87 (s)	33,0	32,6	CH_3				
30	0,87 (s)	23,7	23,5	CH_3				

(*) Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HSQC e HMBC; (**) MITAINE-OFFER et al., 2001; (***) Multiplicidades obtidas pelo experimento Edited-HSQC

*Identificação de **Gg3** e **Gg6***

Os espectros de RMN mono e bi-dimensionais de Gg3 e Gg6 (^{1}H, Edited-HSQC e HMBC) exibiram o mesmo conjunto de sinais dos monoacilglicerols isolados de *G. opposita*, Go8 e Go9, respectivamente. Verificaram-se os sinais de um resíduo de ácido linolênico (hidrogênios olefínicos em δ 5,33, metilênicos na região de δ 1,27 a δ 2,79; carbinólicos entre δ 3,31 e δ 4,07 e de um metílico em δ 0,94); os de uma unidade de glicerol di-substituído e os de hidrogênios anoméricos em δ 4,70 (*J*= 3,5 Hz) e δ 4,11 (*J*= 7,5 Hz) em Gg3 e em δ 4,09 em Gg6 (E88 e E90). Com base nas projeções dos experimentos HSQC-TOCSY e HMBC, foram feitas as atribuições dos átomos de hidrogênio e carbono das moléculas em questão.

Confirmou-se a presença de duas unidades de galactose em Gg3 (β-galactose em δ 4,11 e α-galactose em δ 4,70) e de uma unidade de β-galactose (δ 4,09) em Gg6.

Os espectros de massas ESI-IT de Gg3 (E89) e de Gg6 (E91) também corroboram com a estrutura dos monoacilglicerols Go8 e Go9 a partir da observação dos íons de *m/z* 721 $[M+45]^-$ para Gg3 e em *m/z* 559 $[M+45]^-$ para Gg6, respectivamente. Assim o composto Gg3 foi identificado como o 3'-*O*-β-D-galactopiranosil-(6''$\rightarrow$1''')-α-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol e Gg6 o 3'-*O*-β-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol (fig. 4.7.4, tab. 4.7.6).

Tab. 4.7.6: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Gg3 e Gg6 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	Gg3				**Gg6**			
	δ^1H (*J* Hz)	**δ^{13}C*****	**δ^{13}C***	******	**δ^1H (*J* Hz)**	**δ^{13}C*****	**δ^{13}C***	******
1		173,0	175,0	C		173,0	175,0	C
2	2,29 (m)	33,5	34,9	CH_2	2,28 (dd, *J*= 7,5; 15 Hz)	34,0	34,9	CH_2
3	1,52 (m)	24,5	26,5	CH_2	1,54 (m)	25,0	26,5	CH_2
4	1,27 (m)	28,5	30,8	CH_2	1,29 (m)	29,0	30,8	CH_2
5	1,27 (m)	28,5	30,4	CH_2	1,29 (m)	29,0	30,4	CH_2
6	1,27 (m)	28,7	30,2	CH_2	1,29 (m)	29,0	30,2	CH_2
7	1,32 (m)	29,0	30,2	CH_2	1,33 (m)	29,5	30,2	CH_2
8	2,03 (m)	26,5	28,1	CH_2	2,03 (m)	27,0	28,1	CH_2
9	5,34 (m)	127,0	128,2	CH	5,35 (m)	127,0	128,2	CH
10	5,34 (m)	127,5	128,9	CH	5,35 (m)	127,5	128,9	CH
11	2,77 (m)	25,1	26,4	CH_2	2,77 (m)	26,0	26,4	CH_2
12	5,34 (m)	128,0	129,2	CH	5,35 (m)	128,0	129,2	CH
13	5,34 (m)	128,0	129,0	CH	5,34 (m)	128,0	129,0	CH
14	2,77 (m)	25,5	26,0	CH_2	2,77 (m)	26,0	26,0	CH_2
15	5,34 (m)	130,0	131,0	CH	5,35 (m)	130,0	131,0	CH
16	5,34 (m)	131,5	132,7	CH	5,35 (m)	132,0	132,7	CH
17	2,03 (m)	20,0	21,5	CH_2	2,03 (m)	20,5	21,5	CH_2
18	0,94 (m)	14,0	14,6	CH_3	0,93 (dd, *J*= 7,5 Hz, 15)	14,5	14,6	CH_3
1'	4,03; 3,99 (m)	65,5	66,1	CH_2	4,04; 3,98 (m)	65,5	66,1	CH_2
2'	3,82 (m)	67,5	68,0	CH	3,82 (m)	68,0	68,0	CH
3'	3,67; 3,46 (m)	70,5	71,0	CH_2	3,69; 3,48 (m)	71,0	71,0	CH_2
3'-*O*-gal					**3'-*O*-gal**			
1''	4,11 (d, *J*= 7,5), 1H	104,0	104,6	CH	4,09 (d, *J*= 7,5), 1H	105,0	104,6	CH
2''	3,33 (m)	70,8	71,8	CH	3,32 (m)	71,0	71,8	CH
3''	3,33 (m)	73,0	73,7	CH	3,30 (m)	73,5	73,7	CH
4''	3,60 (m)	68,5	68,6	CH	3,65 (m)	68,5	68,6	CH
5''	3,58 (m)	72,8	73,5	CH	3,35 (m)	75,5	73,5	CH
6''	3,65; 3,59 (m)	66,5	67,1	CH_2	3,55/ 3,50 (m)	61,0	67,1	CH_2
gal-(1'''$\rightarrow$6'')-gal								
1'''	4,70 (d, *J*= 3,5), 1H	99,5	100,0	CH				
2'''	3,55 (m)	69,5	69,0	CH				
3'''	3,74 (m)	69,0	70,1	CH				
4'''	3,64 (m)	68,0	69,4	CH				
5'''	3,72 (m)	71,5	71,1	CH				
6'''	3,55; 3,48 (m)	60,5	61,1	CH_2				

(*) Yoshikawa et al., 1994; Li et al., 2009, Wegner et al. 2000. (**) Multiciplidade obtida pelo experimento Edited-HSQC; (***) Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HSQC e HMBC

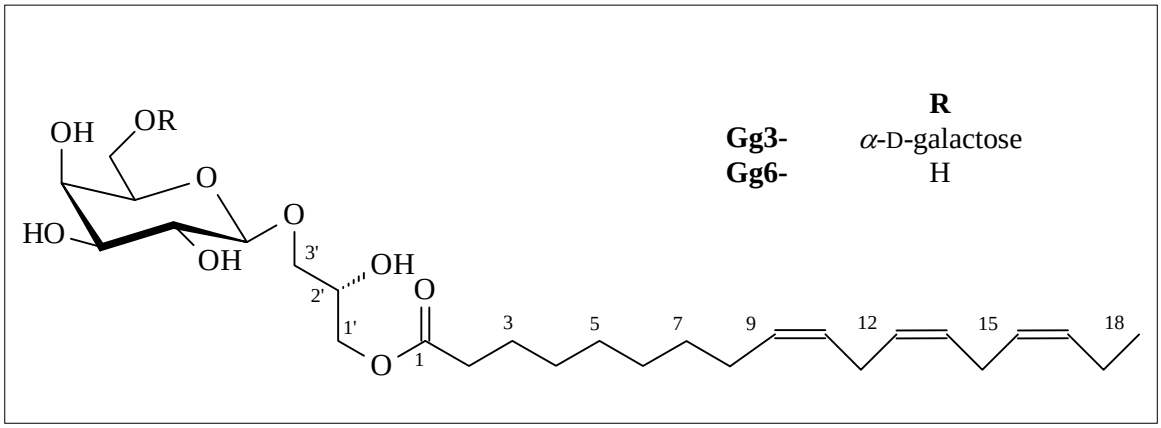


Fig. 4.7.4: Estruturas de Gg3: 3'-*O*-*β*-D-galactopiranosil-(6''→1''')-*α*-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol e Gg6: 3'-*O*-*β*-D-galactopiranosídeo-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil)-*sn*-glicerol

*Identificação de **Gg7***

O espectro de RMN de ^{13}C (E94) de Gg7 apresentou 35 sinais de carbono, dentre eles, seis grupos metílicos (δ 12,2, δ 12,3, δ 19,5, δ 19,3, δ 19,7, δ 20); dois sinais de carbono sp^2 (δ122,2 e δ141,2), de grupos carbinólicos em δ78,3, δ78,1, δ75,6, δ71,9, e δ63,1 e de um carbono C1 de açúcar em δ102,8.

O espectro de massas ESI-IT de Gg7 (E92) exibiu o íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 575. Estes dados, quando comparados com os da literatura (BILIA et al., 1996), permitiram identificar o *β*-sitosterol-3-*O*-*β*-D-glicopiranosídeo (tab. 4.7.7, fig. 4.7.5).

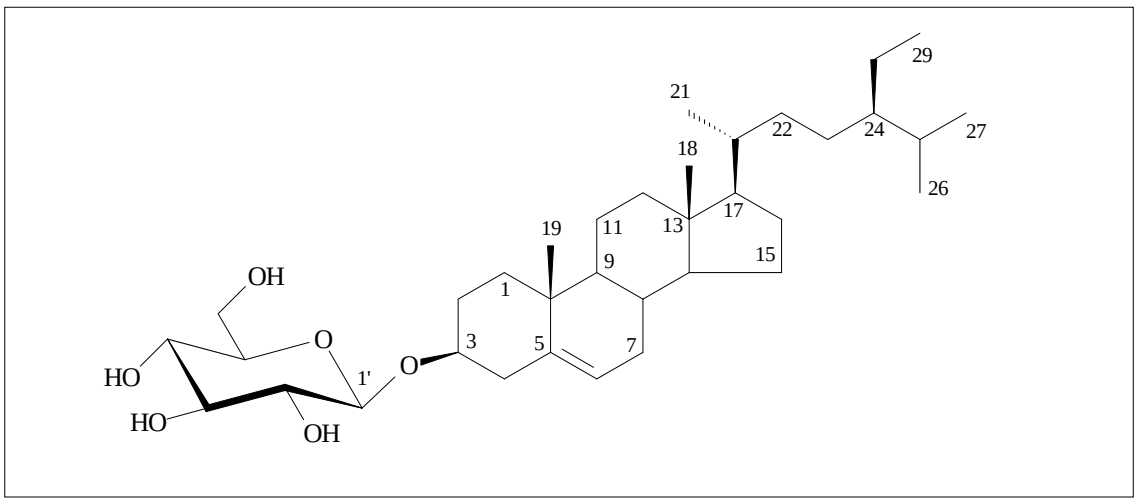


Fig. 4.7.5: Estrutura de Gg7: *β*-sitosterol 3-*O*-*β*-D-glicopiranosídeo

Tab. 4.7.7: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de Gg7 (Piridina-d_5, 11,7 T)

	δ^{1}**H (*J* HZ)**	δ^{13}**C**	δ^{13}**C***	**
1	1,0; 1,7 (m)	37,2	37,6	CH_2
2	1,73; 2,13 (m)	30,5	30,3	CH_2
3	4,2 (m)	78,8	79,7	CH
4	2,48; 2,71 (m)	39,6	39,4	CH_2
5		141,2	141,0	C
6	5,35 (m) 1H	122,2	123,8	CH
7	1,57; 1,95 (m)	32,5	32,3	CH_2
8	1,44 (m)	32,3	32,1	CH
9	0,91 (m)	50,6	50,5	CH
10		37,2	37,0	C
11	1,49 (m)	21,6	21,4	CH_2
12	1,1; 2,03 (m)	40,2	40,0	CH_2
13		42,8	42,7	C
14	0,98 (m)	57,1	57,0	CH
15	1,12; 1,61 (m)	24,8	24,6	CH_2
16	1,31; 1,88 (m)	28,9	28,7	CH_2
17	1,15 (m)	56,5	56,4	CH
18	0,69 (s)	12,3	12,1	CH_3
19	0,95 (s)	19,5	19,4	CH_3
20	1,44 (m)	36,7	36,5	CH
21	0,89 (d)	19,7	19,5	CH_3
22	1,16; 1,44 (m)	34,5	34,3	CH_2
23	1,31 (m)	26,6	26,4	CH_2
24	1,04 (m)	46,3	46,1	CH
25	1,71 (m)	29,7	29,5	CH
26	0,90 (d)	19,3	19,3	CH_3
27	0,88 (d)	20,3	20,1	CH_3
28	1,35 (m)	23,7	23,4	CH_2
29	0,92 (m)	12,5	12,2	CH_3
3-*O*-glic				
1'	4,98 (d, *J*= 7,5), 1H	102,8	102,0	CH
2'	4,01 (m), 1H	75,6	75,2	CH
3'	3,92 (m), 1H	78,8	78,1	CH
4'	4,21 (m), 1H	71,9	71,8	CH
5'	4,20 (m), 1H	78,3	77,9	CH
6'	4,49; 4,33 (m), 2H	63,1	63,7	CH_2

(*) BILIA et al., 1996; (**) Multiplicidades obtidas pelo experimento Edited-HSQC

*Identificação de **Gg8** e **Gg9***

Gg8 apresentou-se como sólido amarelo. O espectro na região do UV (E95) apresentou perfil espectral e máximos de absorção em 255 e 352 nm, típicos de flavonóis.

O espectro de RMN de ^{1}H (E96) mostrou um conjunto de sinais na região aromática típicos de um derivado da quercetina: um duplo-dubleto em δ 7,69 (H6', *J*= 2,0 e 8,5 Hz), dois dubletos em δ 7,49 (H2', *J*= 2,0 Hz) e em δ 6,82 (H5', *J*= 9,0 Hz) do anel B de um flavonóide di-oxigenado; além dos dubletos em δ 6,18 e δ 6,38 *meta*-acoplados (*J*= 2,0 Hz, 1H cada) característicos dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A.

Três prótons anoméricos foram observados em δ 5,58 (J= 7,5 Hz), δ 5,06 e δ 4,39 (J= 1,0 Hz), além de dois dubletos (J= 6,0 Hz, 3H) em δ 0,81 e δ 1,05, indicativos do grupo CH_3 de duas rhamnoses. Análise do espectro ^{1}H-^{1}H COSY, das constantes de acoplamento J_{H1-H2} e irradiação dos prótons anoméricos no experimento TOCSY-1D levaram à identificação dos sistemas de *spin* compatíveis com o da β-galactose (δ 5,58) e de duas α-rhamnoses (δ 5,06 e δ 4,39). Análise dos espectros HMQC (E97 e E98) e HMBC (E99 e E100) levaram à atribuição dos sinais de ^{13}C. Dentre as correlações observadas no HMBC verificou-se: entre o H1''-Gal (δ 5,58) com o C3 da aglicona (δ 132,0), entre o H1'''-Rha (δ 5,06) e o C2''-Gal (δ 74,6) e entre o H1''''-Rha (δ 4,39) e o C6''-Gal (δ 65,0).

O espectro de massas ESI-TSQ (E101) de Gg8 mostrou o íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 755, o que é compatível com $C_{33}H_{40}O_{20}$. A partir destas informações e comparação com dados disponíveis na literatura (AGRAWAL, 1989), Gg8 foi identificado como quercetina-3-*O*-{α-L-rhamnopiranosil-(1'''→2'')-[α-L-rhamnopiranosil (1''''→6'')]}-β-D-galactopiranosídeo (fig. 4.7.6 e tab. 4.7.8).

De maneira similar à Gg8 o espectro de UV de Gg9 (E102) apresentou máximos de absorção em 265 e 347 nm, característicos de flavonóide.

O espectro de RMN de ^{1}H de Gg9 (E103) forneceu sinais de um flavonóide derivado do kaempferol com três unidades de açúcares: dois dubletos *orto*-acoplados (J= 8,5 Hz, 2H cada) em δ 6,86 (H3'/H5') e δ 8,04 (H2'/H6'); dois sinais em δ 6,19 (H6) e δ 6,42 (H8); três prótons anoméricos em δ 5,56 e δ 5,05 e δ 4,37, além dos dois dubletos (J= 6,0 Hz) em δ 0,80; δ 1,06, indicativos do grupo CH_3 de duas rhamnoses.

Análise detalhada dos experimentos HMQC (E104 e E105) ^{1}H-^{1}H COSY, TOCSY-1D e das constantes de acoplamento levaram ao reconhecimento dos açúcares β-galactose (δ 5,56) e α-rhamnose (δ 5,05; δ 4,37). O experimento HMBC (E106 e E107) revelou que os açúcares estes estão ligados de maneira similar à Gg8.

O espectro de massas ESI-TSQ de Gg9 (E108) exibiu o íon da molécula desprotonada em *m/z* 740 ($C_{33}H_{40}O_{19}$). Esse conjunto de informações permitiu identificar Gg9 como kaempferol-3-*O*-{α-L-rhamnopiranosil-(1'''→2'')-[α-L-rhamnopiranosil-(1''''→6'')]}-β-D-galactopiranosídeo (fig. 4.7.6 e tab. 4.7.8).

Tab. 4.7.8: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Gg8 e Gg9 (DMSO-d_6, 11,7 T)

	Gg8			Gg9		
	δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C*	δ^{13}C**	δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C*	δ^{13}C***
2		156,2	156,3		156,4	156,5
3		132,0	132,7		133,0	132,9
4		[a]	177,0		[a]	177,5
5		162,4	161,1		161,4	161,3
6	6,18 (d, *J*= 2), 1H	98,6	98,9	6,19 (d, *J*= 2), 1H	98,5	98,9
7		164,2	165,1		164,0	164,0
8	6,38 (d, *J*= 2), 1H	93,4	93,6	6,42 (d, *J*= 2), 1H	93,5	93,8
9		156,6	155,9		156,4	156,5
10		104,0	103,5		103,8	104,2
1'		121,4	121,9		121,0	121,3
2'	7,49 (d, *J*= 2), 1H	115,6	115,1	8,04 (d, *J*= 8,5), 1H	130,5	130,6
3'		144,8	144,9	6,86 (d, *J*= 9), 1H	115,0	115,2
4'		148,4	148,5		159,8	159,7
5'	6,82 (d, *J*= 9,0), 1H	115,2	115,6	6,86 (d, *J*= 9), 1H	115,0	115,2
6'	7,69 (dd, *J*= 8,5; 2), 1H	122,0	121,0	8,04 (d, *J*= 8,5), 1H	130,5	130,6
3-*O*-gal				**3-*O*-gal**		
1''	5,58 (d, *J*= 8), 1H	99,0	99,2	5,56 (d, *J*= 8), 1H	99,0	99,2
2''	3,80 (m)	74,6	75,7	3,78 (m)	74,4	75,6
3''	3,62 (m)	73,8	73,9	3,60 (m)	73,4	73,7
4''	3,58 (m)	68,6	68,8	3,58 (m)	68,4	68,3
5''	3,56 (m)	73,2	73,8	3,56 (m)	73,0	74,0
6''	3,22; 3,52 (m)	64,8	65,8	3,22; 3,56 (m)	65,0	65,8
rha-(1'''→2'')-gal				**rha-(1'''→2'')-gal**		
1'''	5,06 (sl), 1H	100,4	100,5	5,05 (s), 1H	101,0	100,7
2'''	3,74 (m)	70,6	70,3	3,75 (m)	70,4	70,9
3'''	3,48 (m)	70,6	70,5	3,50 (m)	70,4	70,8
4'''	3,12 (m)	71,8	71,8	3,14 (m)	71,8	72,3
5'''	3,74 (m)	68,2	68,2	3,79 (m)	68,0	68,8
6'''	0,81 (d, *J* = 6z), 3H	17,2	17,2	0,80 (d, *J*= 6), 3H	17,0	17,2
rha-(1'''→6''')-gal				**rha-(1'''→6'')-gal**		
1''''	4,39 (d, *J*= 1), 1H	100,0	100,5	4,37 (d, *J*= 1,5), 1H	100,0	100,3
2''''	3,36 (m)	70,6	70,5	3,37 (m)	70,2	70,9
3''''	3,28 (m)	70,6	70,5	3,29 (m)	70,4	70,5
4''''	3,08 (m)	71,8	71,8	3,10 (m)	71,6	72,3
5''''	3,36 (m)	68,4	68,2	3,34 (m)	68,2	68,3
6''''	1,05 (d, *J*=6), 3H	17,6	17,6	1,06 (d, *J* = 6,5), 3H	17,5	17,7

(*) Valores de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HMQ e HMBC; (**) AGRAWAL, 1989, (***) YASUKAWA & TAKIDO, 1987; ([a]) Sinal não verificado.

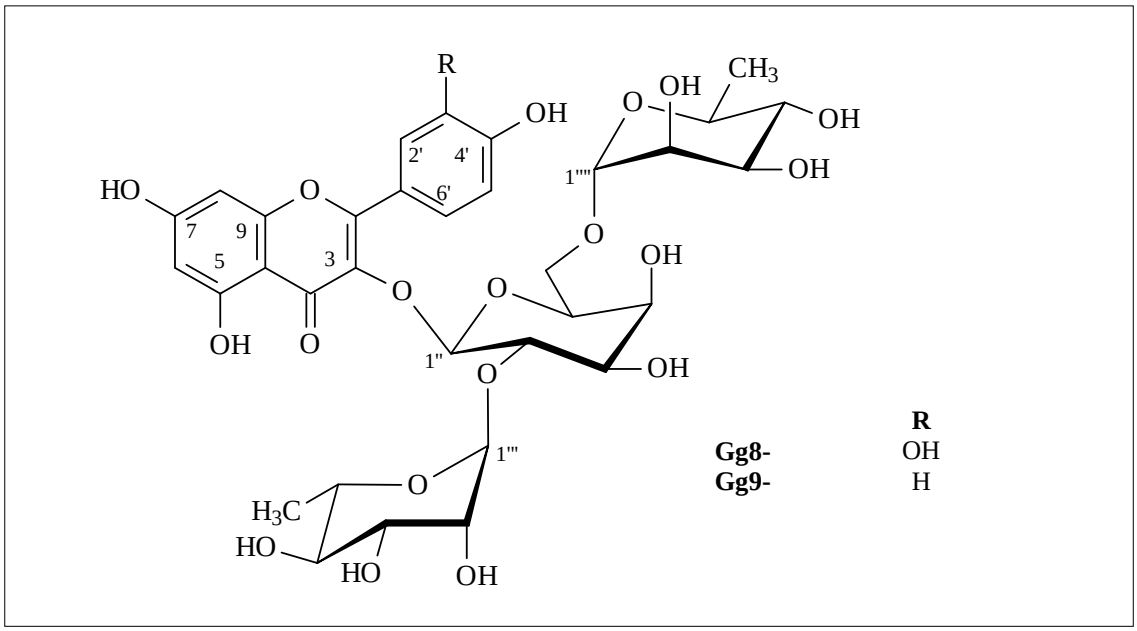


Fig. 4.7.6: Estruturas de Gg8: quercetina-3-*O*-{α-L-rhamnopiranosil-(1’’’→2’’)-[α-L-rhamnopiranosil-(1’’’’→6’’)]}-β-D-galactopiranosídeo e Gg9: kaempferol-3-*O*-{α-L-rhamnopiranosil-(1’’’→2’’)-[α-L-rhamnopiranosil-(1’’’’→6’’)]}-β-D-galactopiranosídeo

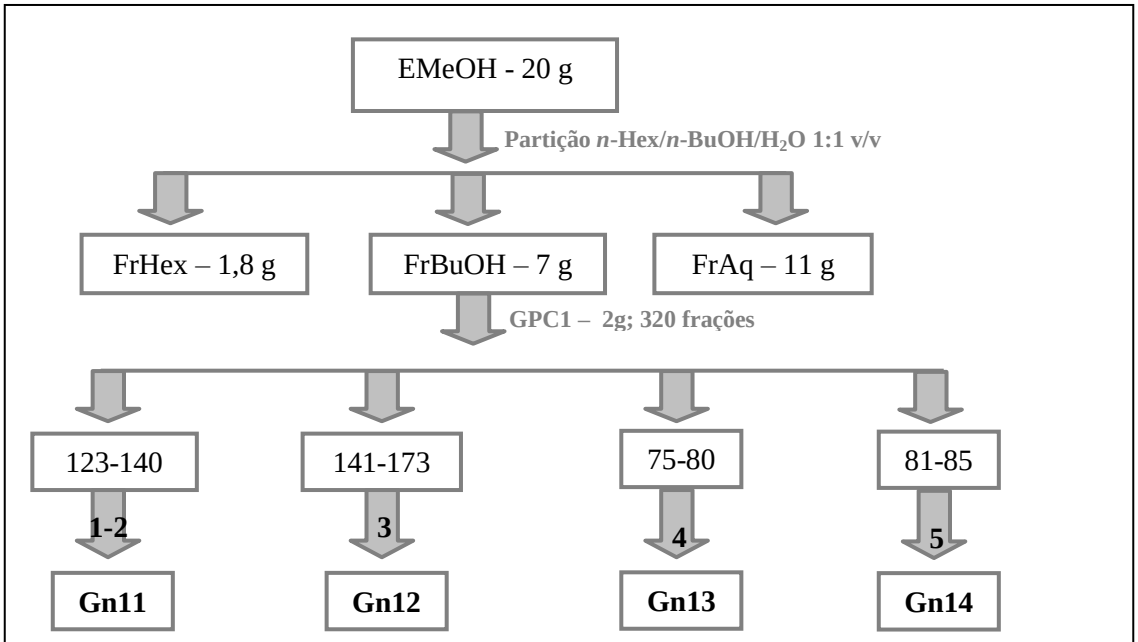
4.8 Fracionamento e purificação de *G. noxia*

Estudos anteriores realizados com o EMeOH das folhas de *G. noxia* em nosso grupo (SEVERI, 2007) levaram ao isolamento e identificação de dez substâncias (Gn1 a Gn10), das quais oito eram flavonóides, além da alantoína e do pinitol (fig. 1.13). Ainda assim, verificamos que o EMeOH de *G. noxia* apresentava uma porção que continha saponinas e que por isso foi investigada.

O EMeOH (20 g) foi solubilizado em 400 mL de H_2O e em seguida, realizou-se extrações sucessivas por partição com hexano 1:1 v/v (4×), seguido por *n*-BuOH, 1:1 v/v, (5×), obtendo-se 1,8 g da fração hexânica (FrHex), 7 g da butanólica (FrBuOH) e 11 g da aquosa (FrAq). A FrBuOH (2 g) foi solubilizada em 10 mL de MeOH e centrifugada. O sobrenadante foi fracionado por Sephadex (GPC1), utilizando MeOH como fase móvel. Frações com aproximadamente 8 mL foram coletadas, obtendo-se o total de 316 frações. Essas foram analisadas por CCDC (silicagel, $CHCl_3$/MeOH/*n*-PrOH/H_2O 5:6:1:4 v/v- fase inferior) e reunidas conforme similaridade de Rf e colorações diante dos reveladores empregados (tab. 4.8.1). Os procedimentos de purificação estão resumidos na figura 4.8.1.

Tab. 4.8.1: Agrupamento resultante do fracionamento da FrBuOH do EMeOH de *G. noxia*

Código	Massa da fração (mg)		Substância identificada	Massa da subst. (mg)
1-48	27			
49-58	42			
60-65	29			
66-74	84			
75-80	94	Gn13	3-metil-3-butenil-1-*O*-*β*-D-glic-(6'→1'')-*O*-*β*-D-api	7
81-85	170	Gn14	oleanolato 3-*O*-*β*-D-glicurono-30-*nor*-olean-12,20(29)-dien-23,28-dióico-28-*O*-*β*-D-glic	5
99-122	123			
123-140	70	Gn11	alcalóide A ou B	10
141-173	175	Gn12	Desoxitimidina	12
174-191	174			
192-230	155			
233-248	176			
249-315	249			
316-F	168			



1: MPLC: C_{18} 16 cm × 1,5 cm × 5 μm, H_2O/MeOH 40:60; 2 mL/min
2: HPLC-SP1: C_{18} 250 × 10 mm × 5 μm, H_2O/MeOH 30-60% de B em A em 25 min, 3 mL/min. t_r= 8 min.
3: HPLC-SP1: C_{18} 250 × 10 mm × 5,0 μm, 10-30% de B em A em 7 min, de 30-45% B até 20 min e 45-100% de B até 30 min; 3,5 mL/min. t_r = 17 min
4: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, 24 a 30% de B em A em 10 min, de 30-50% B em A em 20 min, 4,0 mL/min. t_r= 9 min
5: HPLC-SP2: C_{18} 10 × 150 mm × 5,0 μm, 24-30% de B em A em 20 min, de 33-80% B até 40 min, 4,0 mL/min. t_r= 16 min.

Fig. 4.8.1: Fracionamento da FrBuOH do EMeOH das folhas de *G. noxia*

*Identificação de **Gn11***

O espectro de UV de Gn11 exibiu bandas com máximos de absorção em 216, 256 e 292 nm (E109).

O espectro de RMN de ^{1}H (E110) exibiu sinais na região aromática, sendo um duplo-dubleto δ 7,27 (1H, *J*= 8 e 2 Hz) e outros dois dubletos em δ 7,33 (1H, *J*= 2 Hz) e δ 6,77 (1H, *J*= 8 Hz); além de dois singletos em δ 8,88 (1H) e δ 5,64 (1H). O espectro de RMN de ^{13}C (E111) apresentou oito sinais, dos quais sete são característicos de carbonos de sistema aromático e um de carbonila.

O experimento ^{1}H-^{1}H COSY (E113), juntamente com análise das constantes de acoplamento, auxiliou no esclarecimento das posições dos hidrogênios *orto* e *meta* acoplados do sistema aromático. Com base no experimento HMQC (E112) foram atribuídos os hidrogênios e carbonos diretamente ligados, e também se verificou que o singleto δ 8,88 não apresenta correlação com carbono, sugerindo a presença de N-H. O experimento HMBC (E114) destacou as correlações à longa distância. O conjunto de dados fornecidos com esses experimentos é compatível com as estruturas dos alcalóides derivados da quinazolinona A ou B (figura 4.8.2). A fim de atribuir com maior segurança a estrutura de Gn11, foi realizadas análises por ESI-IT e ESI-TSQ porém os dados obtidos não foram conclusivos pois a molécula apresentou aspecto degradado.

*Identificação de **Gn12***

O espectro de RMN de ^{1}H (D_2O) de Gn12 exibiu sinais característicos de um nucleosídeo: um dubleto em δ 7,60 (H6, *J*= 1 Hz), um grupo metílico em δ 1,85 (*J*= 1,5 Hz, 3H), sinais de uma deoxi-pentose em δ 6,24 (H1'), δ 4,43 (H3'), δ 3,98 (H4'); δ 3,71/δ 3,79 (H5') e δ 2,33 (H2'). Também foi verificado que o valor de deslocamento do hidrogênio H1' é compatível com o de uma ligação *N*-glicosídica entre o C1' do açúcar e o N1 de uma base nitrogenada pirimidínica (WEVERS et al., 1999), o que corrobora com a proposta de um nucleosídeo.

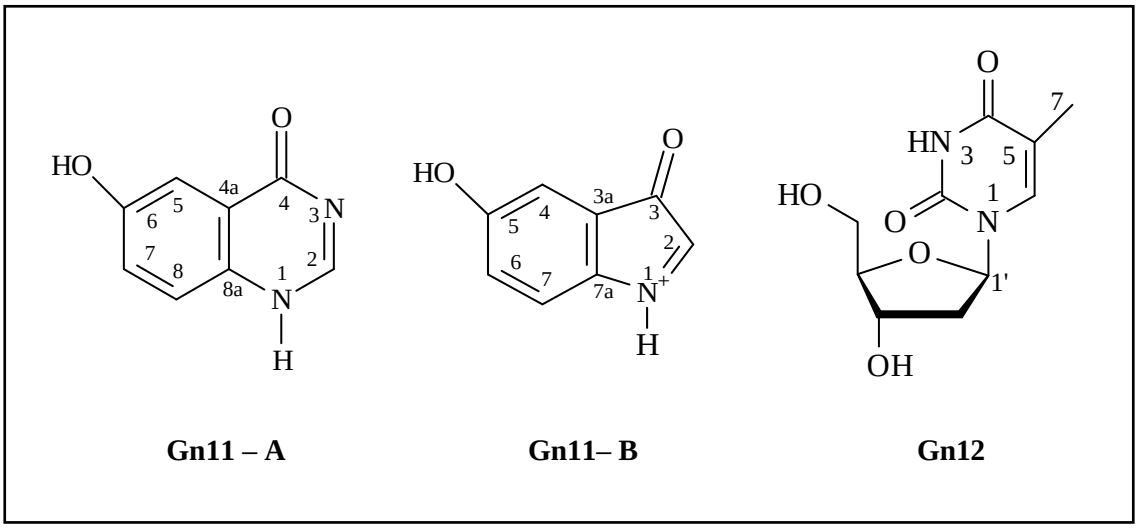
A atribuição dos sinais de ^{13}C RMN foi feita com base nas projeções dos espectros HMQC (E17) e HMBC (E18). O experimento ^{1}H-^{1}H COSY (E117) forneceu as correlações entre os hidrogênios vicinais do açúcar, levando ao reconhecimento de uma 2'-desoxiribose.

O espectro de massas ESI-TSQ de Gn12 (E120) forneceu o íon da molécula protonada $[M+H]^+$ em *m/z* 243, compatível com $C_{10}H_{14}N_2O_5$. Este conjunto de informações, e comparação com dados da literatura permitiu identificar Gn12 como o nucleosídeo desoxi-timidina (fig. 4.8.2, tab.4.8.2).

Tab. 4.8.2: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de Gn11 (DMSO-d_6,) e Gn12 (D_2O)

	Gn11- A		**Gn11- B**		**Gn12**	
	δ^1H, *J* (Hz)	**δ^{13}C**	**δ^1H, *J* (Hz)**	**δ^{13}C**	**δ^1H, *J* (Hz)**	**δ^{13}C***
1	8,88 (s), 1H		8,88 (s), 1H			
2	5,64 (s), 1H	94,8	5,64 (s), 1H	94,8		152,1
3				167,9		
4		167,9	7,32 (d, *J*= 2), 1H	117,2		168,2
5	7,32 (d, *J*= 2), 1H	117,2		150,7		112,5
6		150,7	7,27 (dd, *J*= 8; 2), 1H	122,5	7,60 (d, *J*= 1,5), 1H	138,5
7	7,27 (dd, *J*= 8; 2), 1H	122,5	6,77 (d, *J*= 8), 1H	115,8	1,85 (d, *J*= 1,5), 3H	11,0
8	6,77 (d, *J*= 8), 1H	115,8				
3a				145,5		
4a		145,5				
7a				159,6		
8a		159,6				
1'					6,24 (t, *J*= 13,5; 7), 1H	86,3
2'					2,34 (m), 2H	38,5
3'					4,43 (m), 1H	70,2
4'					3,98 (m), 1H	87,2
5'					3,71; 3,79 (m), 2H	61,3

(*) Deslocamentos de ^{13}C obtidos pelas projeções dos experimentos HMQC e HMBC



Gn11 – A **Gn11– B** **Gn12**

Fig. 4.8.2: Estrutura de Gn11 – A ou B e Gn12

*Identificação de **Gn13***

No espectro de RMN de ^{1}H (E121) de Gn13 verificou-se o sinal de um hidrogênio olefínico em δ 5,29, de hidrogênios carbinólicos na região entre δ 2,95 a 3,84, de dois prótons anoméricos em δ 4,11 (J= 7,5 Hz) e δ 4,86 (J= 2,5 Hz), além de duas metilas geminais em δ 1,62 (3H) e δ 1,70 (3H).

No espectro de RMN de ^{13}C (E122) são verificados dezesseis sinais, dos quais, onze são pertencentes aos dois açúcares e os outros cinco formam um hemiterpeno-C5: dois carbonos sp^2 em δ 121,2 e δ 136,8, um carbono metilênico oxigenado em δ 64,5 e duas metilas geminais em δ 25,9 e δ 18,2.

A análise detalhada dos espectros ^{1}H-^{1}H COSY e HSQC (E123) levou à identificação dos açúcares β-glicose (δ 4,11) e β-apiose (δ 4,86). Dentre as correlações observadas no experimento HMBC (E124), destacam-se as existentes entre o sinal δ 4,11 (H1'-Glic) com o sinal δ 64,6 (C1) e entre o sinal em δ 4,86 (H1''-Api) com 68,1 (C6'-Gli), evidenciando qua a apiose encontra-se ligada ao C6 da glicose e esta ao C1 do hemiterpeno. O espectro de massas ESI-IT (E125) mostrou o íon do aduto da molécula em *m/z* 425 $[M+45]^-$, compatível com a fórmula $C_{16}H_{28}O_{10}$. Este conjunto de informações, juntamente com a análise de dados da literatura, confirma a estrutura de Gn13 como sendo 3-metil-2-butenil-1-*O*-β-D-glicopiranosil-(6'$\rightarrow$1'')-*O*-β-D-apiofuranosídeo (fig. 4.8.3, tab. 4.8.3), já isolado de vinho produzido com *Vitis vinifera* (BALTENWECK-GUYOT et al., 1997).

*Identificação de **Gn14***

O espectro de RMN ^{1}H de Gn14 (E126) forneceu quatro singletos (3H cada) na região de δ 1,12-0,69, um singleto largo olefínico em δ 5,25 (1H) e dois dubletos de prótons anoméricos em δ 5,23 (d, J= 8,0 Hz) e δ 4,18 (J= 8,0 Hz).

No espectro de RMN de ^{13}C (E127) são verificados 41 sinais, sendo 29 pertencentes à aglicona terpênica e 12 aos açúcares. Os valores de deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 C12/C13 (δ 121,6 e δ 143,4), C3 (δ 83,1) e C28 (δ 175,2), indicam que este composto é similar aos outros triterpenos Δ^{12}-oleanano descritos anteriormente em *G. graciliflora* (KOJIMA, 1990; MAHATO, 1994).

As principais diferenças notadas são devido à presença de uma dupla exocíclica (δ 143,0 e δ 108,0) em substituição às duas metilas geminais em C20, além de um segundo grupo carboxílico (δ 179,0) em substituição à metila C23 do ácido oleanólico, indicando que se trata de um derivado diácido *nor*-oleanano.

O experimento Edited-HSQC (E128 e E129) permitiu diferenciar carbonos de grupos metila, grupos metilênicos, grupos metínicos e carbonos quaternários. A análise detalhada dos espectros ^{1}H-^{1}H COSY e HSQC-TOCSY, juntamente com a determinação das constantes de acoplamento J_{H1-H2}, permitiram identificar os açúcares β-glicose (δ 5,23; J= 8,0 Hz), e β-ácido glicurônico (δ 4,18; J= 8,0 Hz). O espectro HMBC (E130) exibiu correlações à longa distância entre o H1'-GlicAc (δ 4,18) e o C3 da aglicona (δ 83,1); entre o H1''-Glic (δ 5,23) e o C28 (δ 175,2), o que indica a natureza de uma saponina bi-desmosídica. A posição da segunda insaturação foi confirmada a partir da observação da correlação existente entre o H29 do grupo exo-metilênico (δ 4,61) e os carbonos C19 (δ 41,3) e C21 (δ 29,6). Além destas correlações, observou-se a existente entre a metila H24 (δ 1,03) com a carbonila do grupo carboxila em C23 (δ 179,0).

O espectro de massas ESI-IT de Gn14 (E131), exibiu o íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em *m/z* 807, compatível com a fórmula molecular $C_{41}H_{60}O_{16}$. Desta maneira, Gn14 foi identificada o oleanolato 3-*O*-β-D-glicurono-30-*nor*-olean-12,20(29)-dien-23,28-dióico-28-*O*-β-D-glicopiranosila, inédita (fig. 4.8.3, tab. 4.8.3).

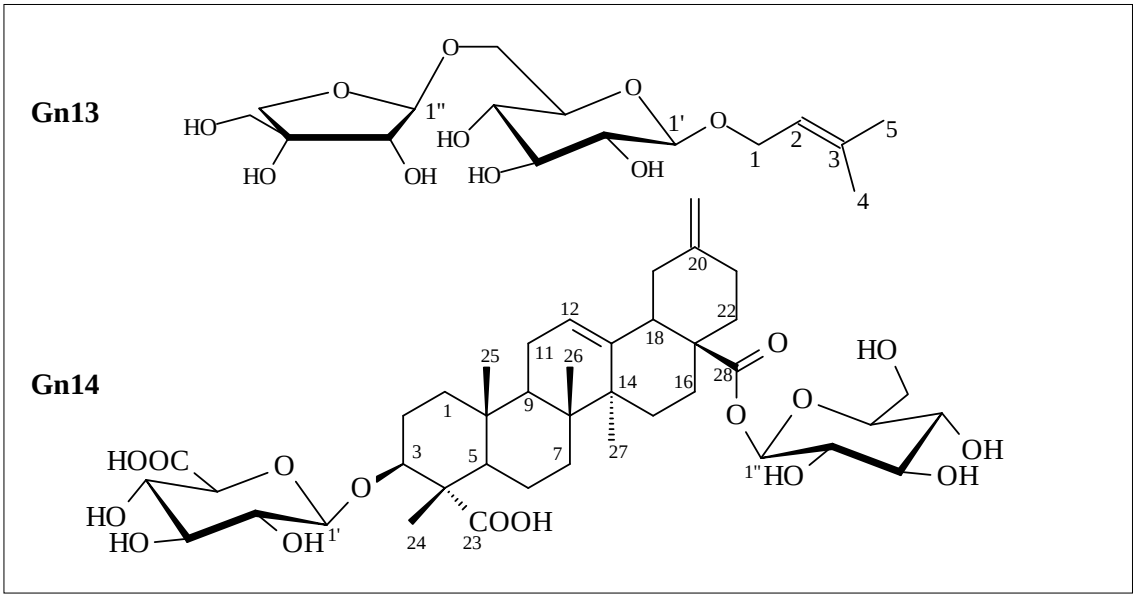


Fig. 4.8.3: Estrutura de Gn13: 3-metil-2-butenil-1-*O*-β-D-glicopiranosil-(6'→1'')-*O*-β-D-apiofuranosídeo e Gn14: oleanolato 3-*O*-β-D-glicurono-30-*nor*-olean-12,20(29)-dien-23,28-dióico-28-*O*-β-D-glicopiranosila

Tab. 4.8.3: Deslocamentos químicos de RMN de ^{1}H e ^{13}C de Gn13 e Gn14 (DMSO-d_6)

	Gn14				Gn13			
	δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C	δ^{13}C*	**		δ^{1}H (*J* Hz)	δ^{13}C	**
1	1,55; 1,09 (m)	38,2	44,9	CH_2	**1**	4,15, 4,06 (m), 2H	64,5	CH_2
2	1,74; 1,55 (m)	25,4	70,7	CH_2	**2**	5,28 (m), 1H	121,2	CH
3	3,96 (m)	83,1	86,5	CH	**3**		136,8	C
4		52,1	53,0	C	**4**	1,70 (s), 3H	25,9	CH_3
5	1,37	51,4	53,7	CH	**5**	1,62 (s), 3H	18,2	CH_3
6	1,43; 1,09 (m)	20,4	21,7	CH_2				
7	1,39; 1,19 (m)	32,2	33,5	CH_2		**3-*O*-glic**		
8		39,0	41,0	C	**1'**	4,11 (d, *J*= 7,5), 1H	101,6	CH
9	1,55 (m)	47,5	48,0	CH	**2'**	2,95 (m), 1H	73,6	CH
10		36,1	37,4	C	**3'**	3,22 (m), 1H	75,9	CH
11	2,09; 1,84 (m)	23,2	24,1	CH_2	**4'**	2,99 (m), 1H	70,7	CH
12	5,25 (sl), 1H	122,4	124,3	CH	**5'**	3,13 (m), 1H	77,0	CH
13		143,0	144,2	C	**6'**	3,42; 3,84 (m), 2H	68,1	CH_2
14		41,5	41,2	C				
15	1,75; 1,09 (m)	27,5	28,8	CH_2		**api-(1''→6')-glic**		
16	1,84; 1,71 (m)	22,9	24,7	CH_2	**1''**	4,86 (d, *J*= 2,5), 1H	109,6	CH
17		46,6	47,5	C	**2''**	3,73 (d, *J*= 2,5), 1H	76,3	CH
18	2,65 (s)	47,0	48,0	CH	**3''**		79,2	C
19	2,48; 2,04 (s)	41,3	42,5	CH_2	**4''**	3,84 (d, *J*= 9), 1H 3,58 (d, *J*= 9), 1H	73,7	CH_2
20		148,6	149,4	C	**5''**	3,35 (d, *J*= 8), 2H	63,5	CH_2
21	2,18; 2,07 (d)	29,6	38,4	CH_2				
22	1,78; 1,43 (m)	37,0	30,9	CH_2				
23		179,0	177,0	C				
24	1,03 (s)	12,0	13,7	CH_3				
25	0,88 (s)	15,7	17,1	CH_3				
26	0,69 (s)	16,8	17,7	CH_3				
27	1,12 (s)	25,7	26,4	CH_3				
28		175,2	177,3	C				
29	4,61 (d, *J*=6,5)	108,0	107,4	CH_2				
	3-*O*-glicAc							
1'	4,18 (d, *J*= 8), 1H	103,7		CH				
2'	2,93 (m)	73,6		CH				
3'	3,11 (m)	76,4		CH				
4'	3,14 (m)	71,9		CH				
5'	3,43 (m)	75,5		CH				
6'		171,5		C				
	28-*O*-glic							
1''	5,23 (d, *J*= 8), 1H	94,5		CH				
2''	3,24 (m)	72,5		CH				
3''	3,20 (m)	76,8		CH				
4''	3,14 (m)	69,8		CH				
5''	3,14 (m)	77,9		CH				
6''	3,61; 3,44 (m)	60,9		CH_2				

(*) RASTRELLI et al., 1998. Deslocamentos obtidos de um derivado com a aglicona 2β-hidroxi (CD_3OD). (**) Multiciplidade obtida pelo experimento Edited-HSQC

4.9 Identificação dos compostos isolados nos perfis cromatográficos obtidos por HPLC-UV-CAD e análise comparativa entre as espécies

A etapa de identificação dos compostos presentes nos cromatogramas da figura 4.5.2 e análise qualitativa comparativa entre os extratos EMeOH das espécies de *Guapira* foi realizada no "Leibniz Institute of Plant Biochemistry - Halle/Alemanha, em colaboração com o prof. Dr. Ludger Wessjohann e Dr. Jürgen Schmidt. Foram realizados experimentos de co-injeção de uma mistura da solução dos extratos com soluções de cada substância (misturas na proporção de 4:1, a 1 mg/mL) isolada neste trabalho e de padrões disponíveis no grupo, sob as mesmas condições cromatográficas apresentadas no item 4.5. Dessa maneira, com base na análise dos espectros de UV e tempos de retenção dos picos gerados por co-injeção, estabeleceu-se um panorama geral comparativo da composição química nas três espécies de *Guapira* investigadas (tabela 4.9.1).

As substâncias alantoína (Go1) e pinitol (Go2) não foram identificadas nos perfis com precisão por terem sido eluídas no volume morto junto com outras substâncias de alta polaridade. Os picos 1, 2, 3, 4 e 6 possivelmente pertencem à classe dos ácidos fenólicos, devido aos espectros de UV apresentado no item 4.5. O pico 5 (t_r= 14,2 min) foi identificado como a desoxi-timidina, que neste trabalho foi isolada somente de Gn (Gn12), mas que também deve estar presente em Go e Gg. Os monoacilgliceróis foram identificados nos picos 10 (t_r= 22,2 min) e 11 (t_r= 23,6 min).

As substâncias correspondentes aos picos 7, 8 e 17 apresentam espectros de UV típicos de flavonóides, porém ainda não foram caracterizadas. Os flavonóides com três unidades de açúcares (Gg8 e Gg9) foram identificados nas regiões 12 e 13. Devido aos problemas de resolução cromatográfica, não foi possível a atribuição precisa do t_r de cada substância, pois outros flavonóides minoritários são co-eluídos no mesmo intervalo. O pico 14 (t_r= 28,4 min) corresponde à rutina (Go3) e está presente nas três espécies.

O uso do detector CAD possibilitou a identificação de compostos não-cromofóricos presentes, principalmente, na região de t_r= 44 a 52 min de Gn e Gg. Assim, foram identificados em Gg os picos 21 (t_r= 48,3 min) e 22 (t_r= 49,2 min) como correpondentes, respectivamente, à Gg1 e Gg2. Estes possivelmente também estão presentes em Gn. Em Gn ainda identificou-se o pico 18 (t_r= 44,3 min), relativo à Gn14.

Tab. 4.9.1: Substâncias identificadas nos processos de purificação dos extratos e nos perfis cromatográficos HPLC-UV-ELSD das espécies de *Guapira* investigadas

	t_r (min)	Cód.	Substância ou classe identificada[a]	*Gn*	*Go*	*Gg*
	0-1,5	Go1	3-*O*-metil-*chyro*-inositol	X [c]	X [b]	
	0-1,5	Go2	alantoína	X [c]	X [b]	
1	6,4		AF	X	X	
2	7,8		AF	X		X
3	10,3		AF		X	
4	11,2		AF		X	
5	14,2	Gn12	desoxi-timidina	X [b]	X	X
6	15,5		AF			X
7	18,4		F			X
8	19,3		F			X
9	20,7	Gn6	quercetina-3-*O*-{α-L-api-(1'''→2'')-[α-L-rha-(1'''→6'')]}-β-D-glic	X [c]		X
10	22,2	Go8, Gg3	(2'*S*)-3'-*O*-β-D-gal-(6''→1''')-α-D-gal-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol		X [b]	X [b]
11	23,6	Go9, Gg6	3'-*O*-β-D-gal-(6''→1''')-1'-*O*-[(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoil-*sn*-glicerol		X [b]	X[b]
12	25,1-25,8	Gg8	quercetina-3-*O*-{α-L-rha-(1'''→2'')-[α-L-rha-(1''→6'')]}-β-D-gal	X [c]	X	X [b]
13	26,9-27,2	Gg9	kaempferol-3-*O*-{α-L-rha-(1'''→2'')-[α-L-rha-(1''→6'')]}-β-D-gal	X		X [b]
14	28,4	Go3	quercetina-3-*O*-β-D-glic-(6''→1''')-*O*-α-L-rha	X [c]	X [b]	X
	28,6	Go5	quercetina 3-*O*-β-D-glic		X [b]	
	28,8	Go4	luteolina 7-*O*-β-D-glic		X [b]	
	29,2	Go10	kaempferol-3-*O*-β-D-glic-(6''→1''')-*O*-α-L-rha	X [c]	X [b]	
	29,8	Go14	quercetina 3-*O*-α-L-ara		X [b]	
15	31,2	Go11	3'-metoxiquercetina-3-*O*-β-D-gli-(6''→1''')-*O*-α-L-rha	X [c]	X [b]	
16	31,7	Go12	apigenina 7-*O*-β-D-glic	X	X [b]	
	32,7	Go13	3'- metoxiluteolina 7-*O*-β-D-glic		X [b]	
17	33,1		F	X	X	
	37,2	Gg7	quercetina		X [b]	
	37,8	Gg6	luteolina		X [b]	
	42,9	Go12	3'-metoxiluteolina		X [b]	
18	44,3	Gn14	3-*O*-β-D-glicurono-30-*nor*-olean-12,20(29)-dien-23,28-dióico-28-*O*-β-D-glic	X[b]		
19	46,4		T	X		
20	47,9		T	X		
21	48,3	Gg1	oleanolato 3-*O*-β-D-[glicAc-(3'→1'')-*O*-β-D-gal-(2''→1''')-*O*-β-D-rha]-28-*O*-β-D-glicopiranosila	X		X
22	49,2	Gg2	oleanolato 3-*O*-β-D-[glicAc-(3'→1'')-*O*-β-D-gal(3''→1''')-*O*-β-D-xil]-28-*O*-β-D-glicopiranosila	X[b]		X
23	50,4	Gn13	3-metil-3-butenil-1-*O*-β-D-glic-(6'→1'')-*O*-β-D-api	X[b]		
	61,9	Gg7	β-sitosterol 3-*O*-β-D-glicopiranosídeo			X[b]

(X) Indica que a presença do composto no perfil cromatográfico
([a]) Indica a classe de substância identificada a partir do espectro de UV: ác. fenólico (AF), flavonóide (F)
([b]) Indica que o composto foi isolado neste trabalho e identificado no perfil cromatográfico
([c]) Indica que o composto foi isolado no trabalho Severi (2007) e identificado no perfil cromatográfico

As análises cromatográficas conduzidas por CG-FID e HPLC-UV-CAD visaram determinar os perfis químicos dos extratos apolares e polares a fim de obter informações suficientes para direcionar os processos de purificação. Verificou-se nos extratos $ECHCl_3$ os esteróides sitosterol, estigmasterol, campesterol e os triterpenos lupenona e taraxerol. Com relação aos perfis cromatográficos dos EMeOH, foram observadas algumas similaridades em termos de classes de substâncias presentes, o que pode estar relacionada à proximidade taxonômica das espécies.

A purificação dos extratos EMeOH das folhas levou ao isolamento de quinze substâncias em *G. opposita*, sendo onze flavonóides (Go3-Go7, Go10-Go15), dois monoacilgliceróis (Go8, Go9), alantoína (Go2) e pinitol (Go1); enquanto que de *G. graciliflora* foram obtidas cinco saponinas (Gg1, Gg2, Gg4, Gg5 e Gg7), duas delas inéditas, dois flavonóides (Gg8 e Gg9) e dois monoacilgliceróis (Gg3 e Gg6). Por último, foram isolados de *G. noxia* dois compostos nitrogenados (Gn11, Gn12) um hemiterpeno glicosilado (Gn13) e uma saponina inédita (Gn14).

Os flavonóides estão presentes em grande parte das plantas, incluindo folhas, raízes, cascas, pólen e sementes e por isso representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados dentre os produtos de origem natural. Essas substâncias estão amplamente distribuídas no reino vegetal, e desempenham importantes funções nas plantas, tais como: proteção contra radiação UV, contra insetos, fungos, vírus e bactérias, na atração de agentes polinizadores, como antioxidantes, agentes alelopáticos, dentre outras. O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é reconhecidamente importante. Muitas atividades biológicas são atribuídas a eles, como: antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica, vasodilatadora, anti-proliferativa, antidiarréica, antiúlcera, antiestrogênica, anticâncer, antidiabética, anti-hepatotóxica (ROSS & KASUM, 2002; HARBORNE & WILLIAMS, 2000).

Ademais, no campo da quimiossistemática, flavonóides podem ser utilizados como marcadores da evolução de plantas, uma vez que os níveis e posições das modificações estruturais são decorrentes do sistema enzimático (além do stress biótico) específico da espécie (IWASHINA, 2000). Dessa maneira, acredita-se que os flavonóides possam ser colocados em uma seqüência evolutiva a partir de um precursor da classe das chalconas e, por esta seqüência, as flavonas estariam em posição de desenvolvimento inferior quando comparadas aos flavonóis.

Com essas informações, verifica-se que dentre as espécies investigadas até o momento *G. noxia* seria uma espécie de maior evolução dentro do gênero, se comparado à *G. opposita* e *G. graciliflora*. Enquanto que na primeira verificou-se apenas a presença de flavonols, nas duas últimas há ocorrência também de flavonas. Este aconjunto de informações poderá, futuramente, contribuir com a quimiossistemática do gênero. Sabemos ainda que estes resultados poderão ser úteis na diferenciação taxonômica entre os gêneros *Guapira* e *Neea*, uma vez que estudos já realizados anteriormente revelaram a presença de flavonas em *Neea theifera* (RINALDO et al., 2007).

Saponinas fazem parte de um complexo grupo de substâncias encontradas em muitas espécies vegetais. Tradicionalmente, podem ser classificadas como glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, sendo que os derivados triterpênicos representam o grupo mais abundante na natureza (VINEKEN et al., 2007). O caráter anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determinam a estas um número variado de propriedades biológicas, dentre elas a ação sobre membranas celulares. Frequentemente são observadas as atividades: hemolítica, ictiotóxica e molusquicida (SCHENKEL et al., 2003). Apesar da importância, a literatura carece de informações quanto ao tipo de saponinas presentes em plantas da família Nyctaginaceae. Até o momento foram descritos apenas poucos derivados do ácido oleanólico em *Pisonia umbellifera* (LAVAUD et al., 1996), em *Colignonia scandens* (DE FEO et al., 1998) e recentemente em *Bouganvillea spectabilis* (AHMED, 2009).

No caso dos alcalóides, as estruturas até então descritas em espécies da família Nyctaginaceae possuem núcleo indólico, conhecidas como betalaínas. Neste trabalho foi encontrado um ureídeo (alantoína), um nucleosídeo (timidina) e possivelmente um derivado da quinazolinona. A alantoína é produto do catabolismo oxidativo dos nucleotídeos da purina, e, como tal, encontra-se disseminada em organismos animais e vegetais. Pode servir como fonte alternativa de nitrogênio em plantas que não o fixam. Dessa maneira, ureídeos como a alantoína, possuem papel essencial na assimilação, metabolismo, transporte e acúmulo de nitrogênio em plantas (SCHUBERT & BOLAND, 1990). São bem reconhecidas suas propriedades cicatrizantes, queratolítica, hidratante, epitelizante e anti-irritante, o que faz com este composto seja empregado em muitas preparações farmacêuticas (REYNOLDS, 1996).

Alcalóides derivados da quinazolinona pertecem a um grupo constituído por cerca de 150 substâncias isoladas de plantas, animais e microrganismos. O interesse despertado pela química medicinal de derivados da quinazolinona foi estimulado na década de 50, após a elucidação do alcalóide febrifugina (KOEPFLY, 1947), proveniente de uma planta utilizada na medicina tradicional chinesa e ativa contra malária. Sabe-se atualmente que as quinazolinonas e os derivados sintéticos possuem uma grande gama de atividades biológicas importantes, principalmente, como hipnótica, sedativa, anti-convulsivante, anti-depressiva, antitumoral, dentre outras (MHASKE & ARGADE, 2006).

Ciclitóis são derivados do 1,2,3,4,5,6-hexaidróxicicloexano (IUPAC, 2006) e na natureza há pelo menos seis isômeros descritos: *myo*, *scyllo*, *neo*, D-*chiro*, L-*chiro* e *muco*-inositol, além de outros três sintéticos: *allo*-, *epi*- e *cis*-inositol (SURESHAM et al., 2004; PODESCHWA et al., 2003). Inositóis e seus derivados estão diretamente envolvidos na sinalização celular, no aumento da concentração de cálcio intracelular (BERRIDGE, 1993; IRVINE & SCHELL, 2001). Estudos com D-pinitol (3-*O*-metil-*chiro*-inositol), isolado de *Bougainvillea spectabilis* (Nyctaginaceae), mostram que ele apresenta ação similar à da insulina, sendo considerado uma das substâncias responsáveis pelo efeito antidiabético atribuído a esta espécie (BATES et al., 2000). Estudos mostram que o pinitol também foi eficaz na diminuição e inibição de citoquinas pró-inflamatórias do desenvolvimento da aterosclerose, além de comprovada a ação moduladora da insulina e inibitória de linfócitos Th1 e Th2 (CHOI et al., 2007; LEE et al., 2007).

5. ESTUDO BIOLÓGICO- Desenvolvimento, resultados e discussões

O grupo de pesquisa em química de produtos naturais do IQ-UNESP/ Araraquara, e os pesquisadores da área de farmacologia de produtos naturais do IB-UNICAMP, IB-Botucatu-UNESP e de Ciências Biológicas da FCF- UNESP/Araraquara iniciaram colaboração há cerca de sete anos (Projeto-Biota/FAPESP) para o desenvolvimento de pesquisas em biodiversidade e prospecção de produtos naturais farmacologicamente ativos, ao qual este trabalho está inserido.

Assim, nesse trabalho os dados obtidos dos ensaios biológicos serão apresentados a fim de se obter um panorama geral sobre as atividades biológicas presentes e a composição química das espécies.

Nos estudos realizados anteriormente para explorar o potencial biológico de *G. noxia*, destacou-se a proteção antiulcerogênica do EMeOH das suas folhas, quando administrado na dose de 125 mg/kg no modelo de indução de úlceras por anti-inflamatório não esteroidal (SEVERI, 2007). Isso motivou a investigação do provável mecanismo de ação pelo qual tal extrato possa atuar. Dentro do mesmo contexto, também são apresentandos os resultados de investigação das possíveis atividades biológicas presentes nas outras duas espécies de *Guapira* estudadas.

5.1- Avaliação do mecanismo de ação antiúlcera de *G. noxia*

O ensaio de atividade antiulcerogênica foi realizado no laboratório de Fisiologia do Instituto de Biociências-UNESP/Botucatu pela pós-graduanda Lucilene P. Mazzolin, sob a supervisão da profa. Dra. Clélia A. Hiruma-Lima.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu, aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura (23±2 ºC) e ciclo claro-escuro (12 horas) controlado. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram a protocolos experimentais aprovados previamente pela Comissão de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu. O número de animais por grupo experimental variou de 4–8. Os resultados foram expressos na forma de média ± erro padrão da média dos parâmetros obtidos.

Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett ou Tukey. A análise estatística dos resultados considerou como nível de significância mínima $p<0,05$.

A) Ligadura do piloro (SHAY, 1945)

Após serem submetidos a jejum prévio de 24 horas, os animais foram divididos nos diferentes grupos experimentais e tratados com solução salina 0,9% (controle negativo), cimetidina 100 mg/kg (controle positivo) e com EMeOH na dose de 500 mg/kg. Nos tratamentos foram utilizadas as vias oral e intraduodenal, no intuito de avaliar, respectivamente, o efeito local e sistêmico. Trinta minutos após os tratamentos os animais foram anestesiados e foi realizada a ligadura do piloro através de uma incisão longitudinal logo abaixo da apófise xifóide, a qual em seguida foi suturada. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos, a incisão reaberta e, após ligadura da cárdia (para preservação do conteúdo estomacal), o estômago foi retirado. O conteúdo estomacal foi coletado para determinação do volume e do pH da secreção gástrica, seguido de titulação para determinação da concentração de H^+.

Neste modelo, não foram observadas alterações significativas nos parâmetros volume e pH do conteúdo gástrico para nenhuma das vias de tratamento empregadas. Entretanto, foi possível notar um aumento significativo da concentração de H^+ quando EMeOH foi administrado oralmente (tabela 5.1.1).

Tab. 5.1.1: Efeito do EMeOH das folhas de *G. noxia* no modelo de ligadura de piloro em ratos

Modelo	Tratamento	Dose (mg/kg)	N	pH (unidade)	Vol. Conteúdo (mL/4h)	Concentração H^+ (mEq/L)
Piloro	salina	-	6	2,17 ± 0,17	5,57 ± 0,82	7,67 ± 0,43
Via oral	cimetidina	100	7	4,57 ± 0,48**	3,36 ± 0,43	3,29 ± 0,53**
	EMeOH	500	6	2,17 ± 0,17	6,92 ± 0,88	10,15 ± 0,14**
Piloro	salina	-	7	1,86 ± 0,14	6,37 ± 1,08	7,99 ± 0,79
Via intraduodenal	cimetidina	100	6	2,33 ± 0,21	4,95 ± 0,59	4,90 ± 0,43**
	EMeOH	500	6	2,17 ± 0,17	6,50 ± 1,30	8,77 ± 0,42

Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 6-7) dos parâmetros avaliados.
Anova – Dunnett ** $p<0,01$.

B) Determinação da participação dos grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico na gastroproteção (ARRIETA et al., 2003)

Foram utilizados ratos submetidos a jejum prévio de 24 h e divididos em nove grupos experimentais. Todos os grupos receberam pré-tratamentos intraperitoneal, sendo três grupos pré-tratados com solução salina 0,9% (10 mL/kg); três grupos pré-tratados com o inibidor dos grupamentos sulfidrílicos, *N*-etilmaleimida (NEM) 70 mg/kg; e três grupos pré-tratados com o inibidor da síntese do óxido nítrico, NG-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) 10 mg/kg. Após 30 min, os animais foram tratados oralmente por gavagem com solução salina 0,9% no volume de 10 mL/kg (controle negativo), carbenoxolona na dose de 100 mg/kg (controle positivo) e com o EMeOH na dose de 500 mg/kg (maior dose que apresentou gastroproteção no modelo de indução com etanol absoluto).

Como agente indutor das lesões gástricas todos os animais receberam 1 mL de etanol absoluto (v.o.) 1 hora após o tratamento oral e, decorrido 1 hora da administração do agente indutor, os animais foram mortos e seus estômagos retirados e abertos na grande curvatura para a medição da área das lesões com o auxílio do software AVSoft BioView 4 – Spectra Module e os resultados apresentados na forma de área de lesão e de porcentagem de inibição das lesões.

Os agentes inibidores de fatores protetores endógenos usados neste experimento (NEM – inibidor dos grupamentos sulfidrílicos e L-NAME – inibidor da síntese de óxido nítrico) são capazes de aumentar significativamente as lesões em relação aos mesmos grupos pré-tratados com salina, evidenciando a sua importância na gastroproteção.

Como apresentado na figura 5.1.1, o EMeOH na dose de 500 mg/kg foi testado frente ao NEM e observou-se uma reversão da gastroproteção (52%), enquanto que frente ao L-NAME observou-se a persistência da mesma (96%). Estes dados sugerem o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção apresentada por este extrato.

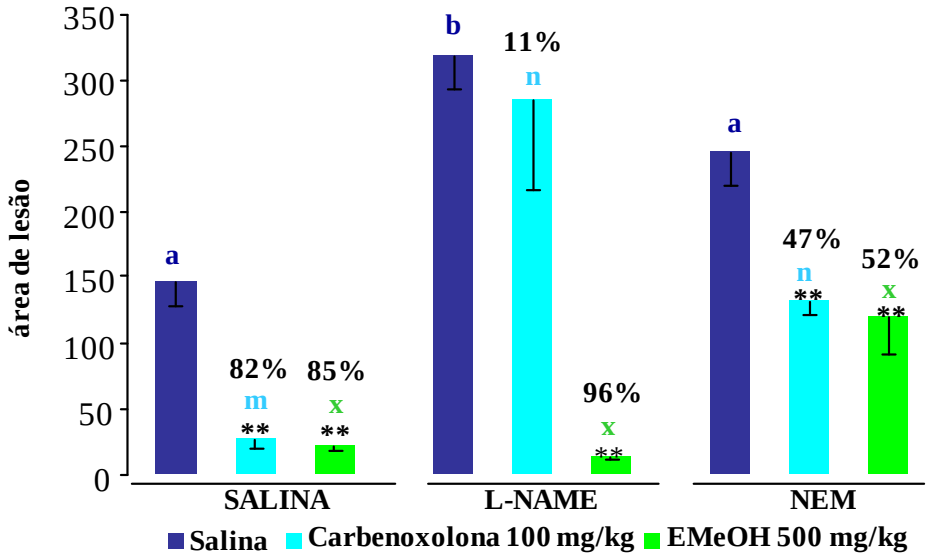


Fig. 5.1.1: Determinação da participação dos grupamentos sulfidrílicos e do óxido nítrico na gastroproteção promovida pelo EMeOH de *G. noxia*. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 7-8) da área de lesão e na forma de porcentagem de proteção. *p<0,05 e **p<0,01 para comparações feitas com o respectivo grupo controle (Anova – Dunnet); letras para comparações feitas entre os grupos (Anova – Tuckey)

C) Determinação bioquímica dos níveis de glutationa total (ANDERSON, 1985)

Os animais foram submetidos a jejum prévio de 24 h, divididos nos devidos grupos experimentais e realizado o modelo agudo de indução de lesão gástrica usando etanol absoluto como agente lesivo (MORIMOTO et al., 1991). Os animais foram tratados por gavagem com carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo), solução salina 0,9% no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e com o EMeOH na dose de 500 mg/kg (dose efetiva na gastroproteção). Decorridos 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam por via oral 1 mL de etanol absoluto e decorridos mais 60 minutos, os animais foram mortos e seus estômagos retirados e abertos na grande curvatura.

O método é baseado na oxidação total da glutationa com o uso do reativo DTNB (ácido 5,5´-ditio-bis 2-nitrobenzóico), seguido de redução da forma oxidada com a enzima glutationa redutase e NADPH. A concentração da glutationa reduzida foi determinada pela velocidade de redução do DTNB, que gera uma coloração detectável em espectrofotômetro a 412 nm.

Como apresentado na figura 5.1.2, o tratamento com o EMeOH das folhas de *G. noxia* na dose de 500 mg/kg mostrou prevenção significativa da diminuição dos níveis de glutationa, o que sugere o envolvimento deste agente gastroprotetor.

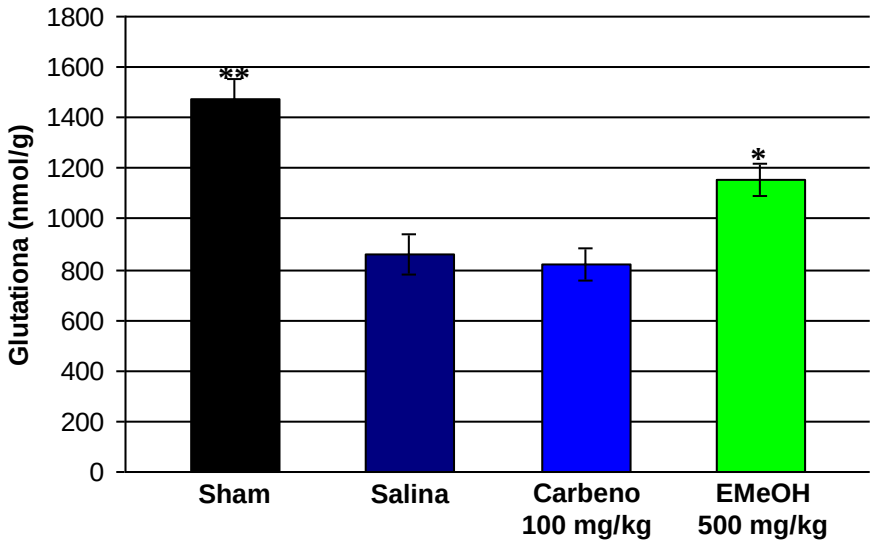


Fig. 5.1.2: Determinação bioquímica dos níveis de glutationa presente no tecido gástrico em modelo de úlcera induzida por etanol absoluto em ratos. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 4-7) da concentração de glutationa. Anova – Dunnet *p<0,05 e **p<0,01 - comparações feitas com o grupo controle negativo (salina)

D) Avaliação da atividade antioxidante - Inibição da lipoperoxidação induzida por sulfato ferroso e ácido ascórbico (STOCKS et al., 1974; FEE & TEITELBAUM, 1972)

A avaliação da atividade antioxidante neste ensaio é baseada na determinação colorimétrica da formação de malonildialdeído (MDA) após a peroxidação lipídica induzida por sulfato ferroso e ácido ascórbico em membranas lipídicas de encéfalo de rato. A peroxidação lipídica é classicamente determinada pela reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico. A atividade antioxidante do EMeOH foi determinada utilizando-se uma curva de calibração em concentrações que variaram de 10 a 100 μg/mL. A medição da atividade antioxidante foi feita em microplacas de 96 poços e a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica é obtida em relação ao controle que representa o máximo de peroxidação. O resultado é expresso na forma de IC_{50}.

Neste ensaio, verificou-se que o EMeOH apresentou IC_{50} de 75 ± 6 μg/mL, valor bastante elevado quando se tem como comparação a quercetina (1,49 ± 0,02 μg/mL).

Ao realizar a ligadura de piloro nos animais, as ulcerações são formadas em decorrência da hipersecreção gástrica. Acredita-se que a secreção ácida seja liberada por reflexo vago-vagal em decorrência da distensão gástrica provocada pelo aumento do volume gástrico devido à obstrução do piloro. Isso estimula a secreção do hormônio gastrina, cuja função no trato gastrointestinal é estimular as células parietais a secretar HCl (BAGGIO et al., 2003). Porém, o entendimento do mecanismo desencadeador desse processo ainda é obscuro. Entretanto, pode-se avaliar a atividade anti-secretória dos extratos utilizando o modelo de ligadura de piloro (SHAY, 1945).

O tratamento com EMeOH, tanto pela via oral quanto pela via intraduodenal, não foi capaz de alterar significativamente alguns dos parâmetros avaliados, sendo eles, o volume do conteúdo gástrico (indicativo de hipersecreção), bem como o seu pH. Entretanto, ao se determinar a concentração de H^+ presente no conteúdo gástrico, pode-se observar aumento significativo da concentração deste íon nos animais tratados com EMeOH pela via oral.

O aumento da concentração de H^+ não é condizente com a atividade antiulcerogênica apresentada por este extrato. Contudo, pode ser explicado pela presença de grande quantidade do extrato (solução) no conteúdo gástrico destes animais, devido à ligadura do piloro. Este extrato, solubilizado em salina a 0,9% exibe caráter ácido (pH por volta de 2). Estes dados descartam a possibilidade do extrato EMeOH estar agindo por um mecanismo que reduza a secreção gástrica, dada a ausência de alterações significativas nos parâmetros avaliados.

Ainda tentando elucidar o mecanismo de ação do EMeOH, foi utilizado o modelo de avaliação da participação de substâncias endógenas na gastroproteção. Um dos fatores que contribui para a integridade da mucosa gástrica é a formação de compostos sulfidrílicos. Estes compostos têm como finalidade básica o fortalecimento de pontes dissulfeto e redução da formação de radicais livres, relacionando-se com a proteção celular (KONTUREK et al., 2002; MATSUDA, 1999). Os efeitos gastroprotetores dos compostos sulfidrílicos incluem também processos redutores e de proteção celular frente ao estresse oxidativo induzido por diversos agentes e circunstâncias, como ocorre com as exposições tóxicas com etanol (TAKEUCHI et al., 1988).

Em contrapartida, a redução dos níveis normais de compostos sulfidrílicos tem impacto significativo na mucosa, tornando-a susceptível ao ataque de substâncias ulcerogênicas, afetando o mecanismo defensivo da mucosa e dessa forma, facilitando a formação de lesões gástricas (GLAVIN & SZABO, 1992; KO & CHO, 1995). Apesar de se conhecer o envolvimento dos compostos sulfidrílicos na proteção da mucosa em experimentos de indução de úlcera por etanol, os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos (HIRAISHI et al., 1999).

Outro fator protetor da mucosa gástrica é o óxido nítrico. Estudos indicam o envolvimento de óxido nítrico na preservação da mucosa, em modelos experimentais de úlcera, por promover vasodilatação, redução da peroxidação lipídica e também seu envolvimento como agente antiinflamatório nos tecidos (CHO, 2001; ANCHA et al., 2003). O óxido nítrico é também um importante regulador da secreção de muco no estômago e seus efeitos são produzidos pela estimulação da guanilatociclase nas células epiteliais (WALLACE & MILLER, 2000). Assim, óxido nítrico parece ser produzido na célula epitelial em resposta à ativação de receptores colinérgicos e provoca a liberação de muco para essas células, garantindo assim, a integridade da mucosa. É responsável tanto pela mediação das funções teciduais normais, quanto pelas lesões na mucosa gástrica. É, portanto, um mediador das defesas e do reparo na mucosa gastrointestinal, podendo também contribuir com as injúrias teciduais em algumas doenças digestivas e alterar a motilidade gástrica (WALLACE, 1999), além de promover ou iniciar respostas inflamatórias quando combinado com outras espécies reativas de oxigênio no trato gastrointestinal (CHO, 2001).

Para avaliar a participação destas substâncias no efeito gastroprotetor apresentado pelo extrato EMeOH utilizou-se agentes inibidores destes fatores protetores. Nos animais tratados com estes agentes inibidores há o agravamento das lesões ulcerativas causadas pelo etanol. O EMeOH na dose de 500 mg/kg foi testado frente ao L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico) e a gastroproteção foi persistente, enquanto que frente ao NEM (inibidor dos grupamentos sulfidrílicos) observou-se uma reversão da gastroproteção. Estes dados sugerem o envolvimento dos grupamentos sulfidrílicos na gastroproteção apresentada por este extrato.

A peroxidação lipídica mediada por espécies reativas de oxigênio é uma importante causa da destruição e lesão nas membranas celulares e está envolvida na patogênese de injúrias na mucosa induzidas por etanol, isquemia/reperfusão e indometacina (KVIETYS et al., 1990).

Uma das vias de formação destas espécies reativas de oxigênio consiste na redução unieletrogênica do oxigênio à água, promovendo o aparecimento de radical superóxido, peróxido de hidrogênio e do radical hidroxila (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1995). Estas espécies reativas de oxigênio oxidam fosfolipídios de membranas celulares e subcelulares, do DNA e das proteínas. Em condições normais, a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem um conjunto de enzimas antioxidantes que as removem ou impedem sua formação, sendo elas, a glutationa peroxidase, a glutationa redutase, a superóxido dismutase e a catalase (MECCORD & FRIDOVICH, 1969).

A glutationa é um tripeptídeo (*γ*-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER & ANDERSON, 1983). É consenso que os efeitos lesivos do etanol na mucosa gástrica são conseqüência de peroxidação lípidica e diminuição do nível de glutationa. Um dos papéis do ciclo redox da glutationa e enzimas que compõe seu metabolismo é o de manter os níveis de hidroperóxidos lipídicos controlados, para evitar danos celulares provenientes do ataque destes radicais. O controle dos níveis de glutationa pode fornecer importantes informações bioquímicas do balanço oxidante-antioxidante no organismo (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Então, a determinação bioquímica dos níveis de glutationa presente na mucosa gástrica de ratos submetidos à lesão induzida por etanol faz-se importante para elucidação do mecanismo de ação da atividade gastroprotetora exibida pelos extratos.

Neste modelo, o EMeOH de *G. noxia* foi capaz de prevenir significativamente a diminuição dos níveis de glutationa causada pelo etanol. Este resultado reafirma a participação do composto endógeno sulfidrila na gastroproteção e leva a acreditar que esta gastroproteção envolva mecanismos antioxidativos deste extrato. Dessa forma, para complementação desta informação, foi realizado o teste de lipoperoxidaçao "*in vitro*", onde os extratos tiveram a capacidade em inibir a peroxidação de lipídios induzida por sulfato ferroso e ácido ascórbico avaliada. O EMeOH mostrou atividade antioxidante neste modelo, sugerindo que este efeito também possa contribuir com a proteção gástrica.

5.2- Avaliação da atividade antiúlcera do EMeOH de *G. opposita*

Diante do potencial efeito gastroprotetor encontrado no EMeOH de *G.noxia*, decidiu-se avaliar a antividade antiúlcera do EMeOH de *G. opposita* através do modelo de úlcera induzida por etanol absoluto (MORIMOTO et al., 1991). Foram utilizados animais provenientes do mesmo local e condições que os do item 5.1.

Os animais foram tratados oralmente por gavage com carbenoxolona 100 mg/kg (controle positivo), solução salina 0,9% no volume de 10 mL/kg (controle negativo) e com o EMeOH em diversas doses (125, 250 e 500 mg/kg). Decorridos 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam, também por via oral, 1 mL de etanol absoluto (agente indutor das lesões). Após 60 minutos da administração do agente indutor de lesão gástrica, os animais foram mortos e seus estômagos retirados para mensuração das lesões.

As lesões ulcerativas tiveram suas áreas medidas com o auxílio do software AVSoft BioView 4 – Spectra Module. Os resultados foram obtidos na forma de área de lesão (média ± erro padrão da média área de lesão) e submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste 'à posteriori' de Dunnett. A análise estatística dos resultados considerou como nível de significância mínima $p< 0,05$.

A figura 5.2.1 apresenta a área de lesão ulcerativa dos animais tratados com EMeOH nas doses de 125, 250 ou 500 mg/kg frente as lesões induzidas pelo etanol absoluto. Não se pode observar proteção efetiva nas doses testadas. Ao se aumentar a dose do extrato pode-se observar agravamento das lesões. Para que se possa descartar a atividade gastroprotetora deste extrato, há que se testar em doses menores que as do presente experimento, pois o extrato pode também exercer efeito lesivo em altas concentrações, o que justificaria o aumento das lesões.

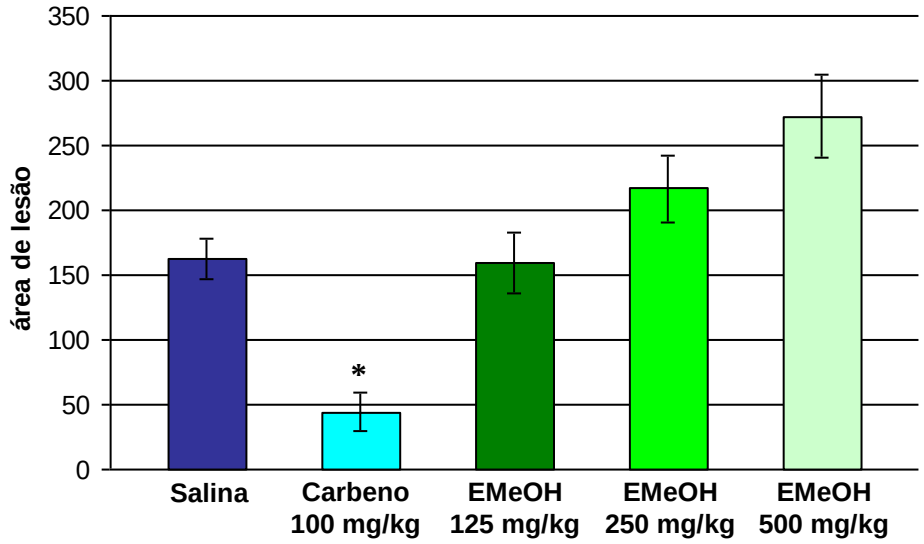


Fig. 5.2.1: Efeito do EMeOH das folhas de *G. opposita* no modelo de lesão ulcerativa induzida por etanol absoluto. Resultados expressos na forma de média ± E.P.M. (n: 5) da área de lesão. Anova – Dunnett ** p<0,01

5.3- Avaliação da atividade antimicrobiana das espécies de *Guapira*

A avaliação da atividade antimicrobiana é uma abordagem relevante na caracterização de extratos vegetais, dada a importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem. Neste sentido, foi avaliada a atividade antimicrobiana das espécies de *Guapira* estudadas.

O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado no laboratório de Microbiologia da FCF/UNESP-Araraquara, sob a supervisão da profa. Dra. Taís Maria Bauab. A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pela pós-graduanda Tatiana M. S. Moreira no laboratório de Biotecnonoliga da FCF/UNESP-Araraquara sob a supervisão da profa. Dra. Rosimeire C. L. de Pietro, enquanto que a de atividade tripanocida foi conduzida pela graduanda Júlia M. Pescarini no laboratório de Imunologia da FCF/UNESP, com o apoio de Mariana da Costa Siqueira e supervisão da Profa. Dra Regina M. B. Cicarelli.

A) *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ELLOF, 1998)

Colônias das cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram inoculadas em caldo de infusão de cérebro e coração (Brain-Heart Infusion – BHI) e incubadas a 37 ºC, durante 24 h. A partir dos inóculos, foi realizada a diluição até a turvação 0,5 da escala de McFarland em solução salina estéril e posteriormente nova diluição até 1:10 v/v a fim de obter a concentração final de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL.

Utilizou-se ampicilina e tetraciclina como fármacos antimicrobianos controles para *S. aureu* e *E. coli*, respectivamente, os quais foram ensaiados na concentração de 5 e 25 μg/mL, respectivamente.

As soluções das amostras testadas foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 1.000 μg/mL em Mueller-Hinton (CMH) e 5% de DMSO. Aos orifícios da microplaca foram adicionados 100 μL CMH, seguido da adição 100 μL das soluções de extratos e estes diluídos, atingindo concentrações variadas (de 1.000 a 37,5 μg/mL). Seguiu-se com a adição de 10 μL da suspensão bacteriana em cada orifício e posterior incubação da microplaca a 37 ºC por 24 h. Foram preparados grupos controle das bactérias, dos antibióticos e do meio de cultura nas mesmas condições acima descritas. Decorrido o período de incubação, realizou-se a análise do teste através da leitura espectrofotométrica a 595 nm. Os testes foram feitos em triplicata na mesma microplaca, e em duas microplacas diferentes.

A inibição do crescimento bacteriano foi detectada pela ausência de crescimento no meio, evidenciado pela presença ou não de turvação nos orifícios. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir no mínimo 90% do crescimento microbiano.

B) *Candida albicans* (CLSI, 2009)

Colônias de *Candida albicans* (ATCC 64548) com diâmetro de cerca de 1 mm, de cultura de 24 h a 35 ºC, foram suspensas em 5,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A suspensão foi agitada em vórtex e ajustada para obtenção de suspensão de turvação na escala 0,5 de McFarland, relativa a 1×10^6 a 5×10^6 leveduras/mL. Para o teste de difusão em ágar, foram aplicados 100 μL dessa suspensão sobre o meio de cultura sólido na placa, através do uso de alça de Drigalsky.

O teste foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio ágar-Müeller Hinton acrescido de 2% de D-glicose e 0,5 μg/mL de azul de metileno. A aplicação de 100 μL das amostras em concentrações varidas (maior concentração testada 5.000 μg/mL) foi feita individualmente nos poços de 6 mm de diâmetro dos "templates" e 20 μL nos discos de papel. Antes de incubadas a 35 ºC por 48 h, as placas foram deixadas 1 h a 4 ºC para permitir a difusão das amostras. Foram adicionados 50 μL de anfotericina B (64 μg/mL) nos "templates" e 20 μL nos discos de papel como controle de inibição do crescimento das leveduras.

A atividade antimicrobiana das amostras foi verificada pela medida do halo de inibição de crescimento e comparada com o halo formado pelo controle. Os testes foram feitos em triplicata para os "templates" e em duplicata para discos de papel.

C) *Trypanossoma cruzi* (MUELAS-SERRANO et al., 2000)

A forma epimastigota de *T. cruzi* foi escolhida para se realizar este experimento por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura. Os parasitos (cepas Y e Bolívia) foram cultivados em meio LIT - *Liver Infusion Tryptose* (FERNANDES & CASTELLANI, 1966), com repiques a cada quinze dias para a manutenção da cultura no laboratório. A cepa Y foi descrita por Silva & Nussenzweig (1953) e a cepa Bolívia foi isolada de triatomíneo em Vitichi – Bolívia por Funayama e Prado Júnior (1974).

Após diluições em DMSO, 3 μL de cada amostra testada (concentrações que variaram de 500 a 1 μg/mL), foram adicionados a 95 μL de meio LIT contendo 1×10^7 parasitos/mL na forma epimastigota de *T. cruzi* (fase log). A placa foi incubada em câmara úmida por 72 h. Os testes foram realizados em triplicata em placas de poliestireno com 96 poços estéreis e com tampa em fluxo laminar.

Decorrido o período de incubação, adicionou-se 10 μL de solução MTT/PMS em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo de luz por 75 min a 28 ºC. Neste momento, ocorre a redução do sal tetrazolium MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio em um produto colorido, *formazan*, pela ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias (DUTTA et al., 2005). Adicionou-se 100 μL da solução 10% SDS/0,01N HCl, para dissolver os cristais de formazan, incubou-se a temperatura ambiente por 30 min ao abrigo da luz.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm e os resultados foram obtidos em absorvância. A porcentagem de citotoxicidade (% C) foi calculada segundo a equação abaixo:

$$\% C = [(G_c - G_p)/G_c] \times 100,\ G_c = A_c - A_m,\ G_p = A_p - A_{pm}$$

Sendo que, G_c representa o número de parasitos/mL nos poços controle e G_p, o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações da amostra em teste. A_c corresponde ao valor de absorvância nos poços controle (na ausência da amostra em teste) sem parasito; A_p, o valor da absorvância nos testes e A_{pm}, o valor da absorvância das diferentes concentrações da substância na ausência do parasito. Foram realizados dois controles, um na ausência do parasito para cada poço teste, mas na presença da substância e outro na ausência desta, mas contendo parasitos.

D) *Leishmania amazonensis* (MUELAS-SERRANO et al., 2000)

O teste de atividade contra *Leishmania* foi realizado pela graduanda Júlia M. Pescarini no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, com o apoio da Dra. Isabel Martinez e supervisão da Profa. Dra. Márcia A. S. Graminha.

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 28 °C. As formas promastigotas foram utilizadas na fase logarítmica de crescimento. Em uma placa de cultura de células de 96 orifícios foram adicionados 97 μL por orifício de promastigotas de *L. amazonensis* na fase exponencial de crescimento em meio LIT e 3 μL dos compostos a serem testados (concentração variando de 500 a 7,8 μg/mL) dissolvidas em DMSO (3% v/v) e incubadas por três dias a 28 °C.

Como controle negativo utilizou-se os parasitas incubados na ausência de compostos e as várias concentrações de compostos na ausência do parasito. Cada concentração foi testada em triplicata, em dois experimentos independentes. A viabilidade de promastigotas foi determinada por meio da técnica colorimétrica de MTT (sal de tetrazólio) após três dias de incubação. Foi realizada também a avaliação visual e subjetiva para posterior confirmação dos resultados obtidos pelo método MTT.

O fármaco pentamidina foi utilizado como controle positivo para obtenção do IC_{50} (4 μg/mL), considerado valor de referência para análise dos resultados dos diferentes compostos testados. A análise dos dados foi feita baseada na curva dose-resposta (viabilidade de parasitas em cultura), utilizando as diferentes concentrações das substâncias testadas com o controle negativo (somente parasitas em meio de cultura). A curva dose-resposta foi obtida na forma de gráfico e a IC_{50} calculada por meio da equação da reta entre os pontos. Foram utilizadas as funções do Excel e Origin 7.0 Professional.

Os valores das CIM e IC_{50} estão apresentados na tabela 5.3.1 e revelam os perfis de susceptibilidade ou de resistência aos extratos e frações frente os diferentes microorganismos testados.

Tab.5.3.1 : Atividade antimicrobiana dos extratos das espécies de *Guapira*

Espécie	Amostra	***Sa*[1]** CIM (μg/mL)	***Ec*[2]** CIM (μg/mL)	***Ca*[3]**	***Tc*** IC_{50} (μg/mL)	***La*[4]** IC_{50} (μg/mL)
G. opposita	$ECHCl_3$	> 500	> 500	([a])	([b])	357,5
	EMeOH	> 500	> 500	([a])	155,3	438,5
G. graciliflora	$ECHCl_3$	> 500	> 500	([a])	216,0	385,5
	EMeOH	> 500	> 500	([a])	336,2	> 500
G. noxia	$ECHCl_3$	125	> 500	([a])	211,8	438,5
	EMeOH	75	250	([a])	> 500	494,5

Sa: *Staphylococcus aureus*; Ec: *Escherichia coli*, Ca: *Candida albicans*, Tc: *Trypanossoma cruzi*, La: *Leishmania braziliensis*. [1]C(+) ampicilina (5 μg/mL); [2]C(+) tetraciclina (25 μg/mL); [3]C(+) anfotericina (64 μg/mL), [4]C(+) pentamidina (4 μg/mL); ([a]) Halo de inibição ausente, ([b]) Não avaliado

De acordo com Holetz (2002) em extratos vegetais considerados com fortes agentes antimicrobianos a CIM deve ser menor ou igual a 100 μg/mL; para os moderados o valor passa a ser de 100 a 500 μg/mL, fracos para CIM entre 500 e 1000 μg/mL e acima de 1000 μg/mL, o extrato é considerado inativo.

Os ensaios de atividade antimicrobiana revelam que os resultados mais promissores foram os encontrados nos extratos $ECHCl_3$ (CIM 125 μg/mL) e EMeOH (CIM 75 μg/mL) de *G. noxia* contra *S. aureus*. Com relação à atividade antifúngica, nenhuma das amostras testadas causou inibição do crescimento da levedura, indicando não possuírem atividade contra a espécie *C. albicans*, nas condições testadas. Na avaliação da atividade tripanocida, o melhor resultado encontrado foi obtido com no EMeOH de *G. opposita* (IC_{50} 155,3 μg/mL) e no caso da atividade leishmanicida, a atividade foi considerada fraca ou moderada.

Os ensaios preliminares de atividade antimicrobiana evidenciaram forte atividade antibacteriana do EMeOH de *G. noxia* contra cepas de *S. aureus* e moderado efeito tripanocida do EMeOH de *G. opposita*, o que demonstra a possibilidade da existência de compostos antimicrobianos em plantas do gênero *Guapira*.

S. aureus geralmente é causadora de infecções humanas, tanto de origem comunitária, quanto hospitalar. Além disso, é o agente mais comum em infecções piogênicas localizadas na pele (foliculite, terçol) ou em regiões mais profundas (bacteremia, endocardite, dentre outras), além de intoxicações alimentares (TORTORA et al., 2000; TRABULSI et al., 1999).

A Tripanossomíase ou Doença de Chagas é uma doença transmitida por triatomíneos infectados pelo *Trypanossoma cruzi*. O *T. cruzi* também pode ser transmitido por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e pela via transplacentária (CDC, 2009). Em alguns locais do Brasil a prevalência dessa doença chega a cerca de 3% da população, o que mostra que a doença ainda possui número de casos bastante significativo no país (BORGES-PEREIRA, 2008). Sabe-se ainda que esta doença ainda não possui tratamento 100% eficaz, o que reforça a importância da busca de novos medicamentos e/ou substâncias para o tratamento ou cura da tripanossomíase. Este estudo deverá ter continuidade em busca de caracterizar as substâncias potencialmente ativas presentes nos extratos.

5.4- Avaliação do potencial mutagênico

A avaliação da mutagenicidade foi realizada no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, em colaboração com a Msc. Ana Paula S. de Oliveira e sob a supervisão da Profa. Dra. Eliana Ap. Varanda.

No ensaio foi avaliado o potencial mutagênico empregando-se o teste de AMES. Uma vez que o efeito mutagênico *G. noxia* já foi investigado em em etapas anteriores (CARDOSO et al., 2010), foi dada continuidade à investigação com *G. opposita*.

Foram utilizadas linhagens celulares denominadas TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA. Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron & Ames (1983).

O controle negativo foi feito com DMSO, usado como solvente dos extratos vegetais. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica o 4-nitrofenilenodiamino (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina C para a linhagem TA102. Para os ensaios em presença de metabolização foi utilizado o 2-antramine para as linhagens TA100, TA98 e TA97a e 2-aminofluorene para a TA102.

O crescimento das linhagens de *S. typhimurium* foi realizado em caldo nutriente Oxoid nº 2 e ágar nutriente elaborado a partir do meio nutriente, com ou sem ampicilina dependendo do ensaio, solidificado com 1,5% de ágar. Nos ensaios de mutagenicidade foram utilizados ágar mínimo glicosado (AMG) e ágar de superfície (*top-agar*), ambos previamente esterilizados em autoclave a 121 ^{o}C por quinze minutos. Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de meio nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 14 h, em banho-maria (37 ^{o}C) com agitação (160 rpm), de modo a obter uma densidade de 1–2 × 10^{9} bactérias/mL.

Preparo da mistura S9

Foi utilizada a fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial), suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas (Aroclor 1254).

A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Essa fração foi obtida da MOLTOX (Molecular Toxicology). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4 M e cloreto de potássio 0,4 M, glicose-6-fosfato 1 M, *β*-nicotinamida adenina dinucleotídeofosfato 0,1 M, tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio e, preparadas sempre a fresco e utilizadas por um período de, no máximo, 3 h.

Em tubos de ensaios foram colocados 0,1 mL de cultura de bactérias (1-2 ×10^{9} bactérias/mL), a concentração adequada do extrato e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5 mL de S9 mix (4%) nos ensaios com ativação metabólica. Os tubos assim compostos foram incubados a 37 ºC durante 20 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (*top-agar*) acrescido de uma solução de histidina/biotina 0,05 mM na proporção de 10/100 mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri contendo o meio mínimo glicosado.

Após incubação das placas por 48 h a 37 ºC foi efetuada a contagem das colônias. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

Análise dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra. Maria Ines Sato (CETESB). Esse programa permite avaliar o efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o modelo Bernstein (BERNSTEIN et al., 1982).

A cepa TA98 detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA. A cepa TA100 detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente no par Guanina-Citosina. A cepa TA102 detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes *cross-link*, como mitomicina- C. A cepa TA97a detecta mutágenos do tipo *frameshift*.

Uma amostra é considerada com potencial mutagênico quando a RM for maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Será considerada sem potencial mutagênico quando a mesma não induzir aumento significativo no número de revertentes e suas RM forem todas menores que 2. Quando apenas um dos parâmetros for atendido considera-se a amostra com indícios de mutagenicidade.

O extrato metanólico das folhas de *G. opposita* apresentou mutagenicidade na linhagem TA98, que detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA nas concentrações de 12,5 e 6,25 μg/mL, sem sofrer metabolização. Nas demais cepas o extrato não foi mutagênico (tab. 4.5.1). Este resultado difere dos de *G. noxia*, cujo extrato não causou mutagenicidade. Isso pode ser devido à presença de compostos potencialmente mutagênicos presentes em *G. opposita*. A composição química desta espécie difere em relação à *G. noxia*, principalmente pela presença de flavonas e de glicolipídeos, até então não encontrados em *G. noxia*.

Tabela 5.4.1: Potencial mutagênico expresso pela média, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) nas linhagens celulares de *Salmonella typhimurium* expostas à várias doses dos extratos das espécies de *G. opposita*, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica

				Número médio de revertentes em presença do EMeOH μg/mL (Razão de Mutagenicidade)				
		(C-)	**C(+)**	**75**	**50**	**25**	**12,5**	**6,25**
TA100	-S9	142 ± 6	1030 ± 154	164 ± 13 (1,1)	159 ± 3 (1,1)	188 ± 27 (1,3)	177 ± 33 (1,2)	176 ± 36 (1,2)
	+S9	163 ± 21	2073 ± 238	219 ± 5 (1,3)	209 ± 11 (1,3)	251 ± 20 (1,5)	242 ± 26 (1,5)	284 ± 58 (1,7)
TA98	-S9	27 ± 4	2477 ± 392	40 ± 5 (1,5)	44 ± 13 (1,6)	48 ± 7 (1,8)	66 ± 15 (2,4)	59 ± 6 (2,2)
	+S9	42 ± 4	2673 ± 144	48 ± 3 (1,1)	60 ± 15 (1,4)	56 ± 7 (1,3)	71 ± 7 (1,7)	75 ± 12 (1,8)
TA97a	-S9	131 ± 5	2045 ± 155	107 ± 7 (0,8)	93 ± 2 (0,7)	95 ± 16 (0,7)	76 ± 14 (0,6)	70 ± 13 (0,6)
	+S9	175 ± 12	2664 ± 238	194 ± 9 (1,1)	197 ± 29 (1,1)	196 ± 46 (1,1)	157 ± 34 (0,9)	125 ± 40 (0,7)
TA102	-S9	215 ± 17	1586 ± 446	161 ± 24 (0,6)	158 ± 10 (0,6)	198 ± 9 (0,8)	161 ± 18 (0,6)	171 ± 9 (0,7)
	+S9	246 ± 6	272 ± 34	282 ± 13 (1,1)	265 ± 45 (1,1)	258 ± 27 (1,0)	224 ± 9 (0,9)	242 ± 30 (1,0)

Controle (+) sem metabolização: TA100 = NDP (10 μg/placa), TA98 = azida sódica (5 μg/placa), TA97a = NDP (10 μg/placa), TA102 = mitomicina (0,25 μg/placa).
Controle (+) com metabolização: TA100 = 2-antramina (1,25 μg/placa), TA98 = 2-antramina (1,25 μg/placa), TA97a = 2-antramina (1,25 μg/placa), TA102 = 2-aminofluoreno (10 μg/placa)

A avaliação dos potencial mutagênico é outro item relevante na caracterização de plantas, dado a composição bastante complexa de moléculas presentes em matrizes vegetais. O teste de Ames é um ensaio já consolidado para a o reconhecimento de compostos puros ou em mistura que causam mutações gênicas e possuem alto valor preditivo de carcinogenicidade *in vivo*. Dados da literatura apontam o potencial mutagênico das agliconas de flavonóides, especialmente de flavonas.

Flavonóides são comumente considerados substâncias de baixa toxidade, porém sabe-se que alguns quesitos estruturais podem acentuar o efeito mutagênico, tais como presença da dupla C2-C3 no anel C flavonoídico e hidroxila livre em C3 (CARDOSO et al., 2006). Assim, os flavonóides derivados da apigenina, luteolina e quercetina encontrados em *G. opposita* podem estar relacionados ao efeito mutagênico observado.

5.5- Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação do potencial citotóxico foi realizada no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, em colaboração com a doutoranda Tatiana M. de Sousa e sob a supervisão da Profa. Dra. Rosimeire C. L. de Pietro.

Os testes de citotoxicidade dos extratos e frações das espécies de *Guapira* foram realizados com células de macrófagos da linhagem J774 e de fibroblastos de córnea de coelho ATCC CCL-60. As células foram mantidas em garrafas de cultura celular, em estufa a 37 ºC sob atmosfera de 5% de CO_2. O meio de cultura utilizado para cultivo utilizado foi o meio mínimo essencial de Eagle (pH 7) suplementado com 50% de meio Leibovitz L-15, 10% de soro bovino fetal, com 0,2% de bicarbonato de sódio. Ao acondicionamento das garrafas foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina/penicilina e 0,1% de solução de anfotericina B, ambas na concentração de 10 μg/mL. Para a cultura de fibroblastos foi utilizado o meio Eagle (pH 7) suplementado com 50% de meio Leibovitz L-15, 15% de soro bovino fetal, sem bicarbonato de sódio.

As amostras testadas foram solubilizadas em 1 mL de DMSO estéril, diluídas 1:5 em meio de cultura e testadas no intervalo de concentração de 2000-15,62 μg/mL. Em seguida, o ensaio consistiu em coletar as células de macrófago por raspagem e as de fibroblastos por tripsinização (solução tripsina 0,25% –EDTA 0,53 mM), centrifugá-las a 1500 rpm por 10 minutos e contá-las com auxílio do corante Turk, em câmara de Neubauer, ajustando para a concentração de 1×10^5 células/mL em meio de cultura.

As células de cada uma destas suspensões foram incubadas em diferentes microplacas de 96 poços, a 37 ºC e 5% de CO_2 por 72 h. Após este período, foi observada a formação de tapete celular e foi retirado o meio existente, já inadequado para a manutenção celular. Em outra microplaca de 96 poços foram colocados 100 μL de meio em todos os poços, exceto nos primeiros poços da coluna 1, que recebeu 180 μL de meio de cultura e 20 μL das amostras diluídas 1:5. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:1 (v/v) nos demais poços da respectiva microplaca. As amostras diluídas foram transferidas para a microplaca contendo o tapete celular e esta foi incubada por 24 h a 37 ºC e 5% de CO_2 (OHNO et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2008).

Posteriormente, foram adicionados 15 μL de solução aquosa de resazurina a 0,1 mg/mL, incubando a microplaca por 3 h em estufa a 37 ºC e 5% de CO_2. Foram realizados o controle do solvente (20 μL de solução DMSO/meio, 1:5; v/v), controle positivo do crescimento celular e controle negativo de ausência de crescimento. A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa (presença de células vivas) (O'BRIEN et al., 2000) e por meio do leitor de fluorescência Spectra Fluor Plus – Tecan, com filtros de luz de 530 e 590 nm e programa de análise Magellin.

Nas condições experimentais descritas, não foi observado efeito citotóxico na presença dos extratos metanólicos das três espécies de *Guapira*, pois o índice de citotoxicidade (IC_{50}) foi maior que a mais alta concentração testada (2000 μg/mL).

6. CONCLUSÕES

O principal objetivo deste trabalho foi o de investigar a composição química dos extratos das folhas de *G. noxia*, *G. opposita* e *G. graciliflora*, associado à avaliação do potencial biológico das mesmas no âmbito do projeto temático BIOTA-FAPESP.

Assim, a composição química dos extratos $ECHCl_3$ e EMeOH foi amplamente investigada por técnicas cromatográficas e espectroscópicas, o que revelou, sobretudo, a presença de esteróides e terpenóides nos extratos $ECHCl_3$; de flavonas e glicerolipídeos em *G. opposita*, de saponinas, glicerolipídeos e flavonóis em *G. graciliflora* e de flavonóis e saponinas em *G. noxia*, além de alguns compostos minoritários do tipo nitrogenados e de um ciclitol. A análise comparativa qualitativa entre os perfis cromatográficos dos EMeOH das espécies foi conduzida mediante o uso de HPLC-UV-CAD, o que também revelou a presença de outros compostos ainda não isolados, derivados da classe dos ácidos fenólicos, outros triterpenos e flavonóides. Estes resultados são condizentes com composição química de outras espécies pertencentes à família Nyctagniceae e poderão futuramente contribuir com a quimiossistemática do gênero e/ou da família.

A avaliação do potencial biológico do gênero *Guapira* revelou efeito gastroprotetor do EMeOH de *G. noxia* e que este deva interferir possivelmente na elevação dos níveis de compostos sulfidrílicos (agente citoprotetor), associado à atividade antioxidante. Ademais, verificou-se atividade antimicrobiana nos extratos de *G. noxia* e *G. opposita*, indícios de mutagenicidade no EMeOH de *G. opposita* e ausência citotoxicidade nas três espécies. Esta investigação deverá ter continuidade a fim de estabelecer possíveis correlações existentes entre a composição química e as atividades biológicas do gênero.

O estudo de plantas brasileiras é fundamental e deve ser constante, a fim de melhor aproveitar o grande potencial oferecido pela biodiversidade do país. A identificação de metabólitos vegetais de interesse terapêutico continua sendo área de relevada importância para a saúde humana. Por isso, o estudo químico-farmacológico de espécies do gênero *Guapira*, que está sendo descrito neste trabalho, representa uma importante contribuição para o estudo do conhecimento de espécies presente nos biomas Cerrado e Mata Atlântica, na medida em que apresenta os dados farmacológicos, complementado pelo estudo fitoquímico, de maneira interdisciplinar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOULAYE, A.; MAOUSSA, I.; KEITA, D. A.; IKHIRI, K. Le pinitol isolé de *Lemeum pterocarpum*. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 989-991, 2004.

ABRAHAM, A. M. L.; HERNANDEZ, N. M. R.; MISAS, C. A. J. Extractos de plantas que crecen en Cuba con potenciales antitumorales. Parte III. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 14, p. 35–42, 1980.

AGRAWAL, P. K. **Carbon 13 NMR of Flavonoids**. New York: Elsevier, 1989. 564 p.

AGRAWAL, P. K.; JAIN, D. C. ^{13}C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. **Progress in NMR spectroscopy**, v. 24, p. 1-90, 1992.

AHMED, A. H. Biologically active saponins from *Bougainvillea spectabilis* growing in Egypt. **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, p. 5510-5516, 2009.

AHMED, M.; DATTA, B. K.; ROUF, A. S. S. Rotenoids from *Boerhaavia repens*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1709-1710, 1990.

AHMED, B.; YU, C. P. Borhavine, a dihydroisofuranoxanthone from *Boerhaavia diffusa*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4382-4384, 1992.

AIDAR, M. P. M. **Ecofisiologia das estratégias de utilização de nitrogênio em árvores da floresta neotropical.** 2000. 136 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2000.

ANCHA, H.; OJEAS, H.; TEDESCO, D.; WARD, A.; HARTY, R. F. Somatostatin-induced gastric against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. **Regulatory Peptides**, v. 110, p. 107-113, 2003.

ANDERSON, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in enzymology**, v. 113, p. 548-555, 1985.

APG II. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

ARRIETA, J.; BENITEZ, J.; FLORES, E.; CASTILHO, C.; NAVARRETE, A. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*: role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, v. 69, p. 905-909, 2003.

ASLAM, M. Asian and its practice in Britain. In: EVANS, W. C. **Pharmacognosy**. Londres: Saunders Company, 1996. p. 499-500.

AWASTHI, L. P.; VERMA, H. N. *Boerhaavia diffusa* – a wild herb with potent biological and antimicrobial properties. **Asian Agri-History**, v. 10, p. 55-68, 2010.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BALTENWECK-GUYOT, R.; TRENDEL, J. M.; ALBRECHT, P. New hemiterpene glycosides in *Vitis vinifera* wine. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1326-1327, 1997.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária de Viçosa, 1986. 326 p.

BARTHWAL, M.; SRIVASTAVA, K. Histologic studies on endometrium of menstruating monkeys wearing IUDs: comparative evaluation of drugs. **Advances in Contraception**, v. 6, p. 113–114, 1990.

BARTHWAL, M.; SRIVASTAVA, K. Management of IUD-associated menorrhage in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **Advances in Contraception**, v. 7, p. 67–76, 1991.

BARUAH, P.; BARUAH, N. C.; SHARMA, R. P.; BARUAH, J. N.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. A monoacyl galactosylglycerol from *Sonchus arvensis*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1741-1744, 1981.

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

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. **Nature**, v. 361, p. 315-325, 1993.

BHARALI, R.; AZAD, M. R. H.; TABASSUM, J. Chemopreventive action of *Boerhaavia diffusa* on DMBA–induced skin carcinogenesis in mice. **Indian Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 47, p. 459–464, 2003.

BILIA, A. R.; MENDEZ, J.; MORELI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. **Pharmaceutica Acta Helvetica**, v. 71, p. 191-197, 1996.

BITTRICH, V.; KÜHN, U. **Nyctaginaceae**. In: Kubitzki, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. The families and genera of flowering plants. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p. 473-486.

BORELLI, F.; MILIC, N.; ASCIONE, V.; CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PETRUCCI, F.; VALENTE R.; FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Isolation of new rotenoids from *Boerhaavia diffusa* and evaluation of their effect on intestinal motility. **Planta Medica**, v. 71, p. 928-932, 2005.

BORRELLI, F.; ASCIONE, V.; CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; FATTORUSSO, E.; SCAFATI, O. T. Spasmolytic effects of nonprenylated rotenoid constituents of *Boerhaavia diffusa* roots. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 903-906, 2006.

BORGES-PEREIRA, J.; SARQUIS, O.; ZAUZA, P. L.; BRITTO, C., LIMA; M. M. Epidemiologia da doença de Chagas em quatro localidades rurais de Jaguaruana, Estado do Ceará. Soroprevalência da infecção, parasitemia e aspectos clínicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, 2008.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960. p. 406.

CARDOSO, C. R. P.; CÓLUS, I. M. S.; BERNARDI, C. C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p. 55–63, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/chagas/> Acesso em: 08 abr. 2009.

CHANDAN, B. K.; SHARMA, A. K.; ANAND, K. K. *Boerhaavia diffusa*: a study of its hepatoprotective activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 299-307, 1991.

CHO, C. H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders. **Journal of Physiology**, p. 253-256, 2001.

CHOI, M. S.; LEE, W. H.; KWON, E. Y.; KANG, M. A.; LEE, M. K.; PARK, Y. B.; JEON, S. M. Effects of soy pinitol on the pro-inflammatory cytokines and scavenger receptors in oxidized low-density lipoprotein-treated THP-1 macrophages. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 4, p. 594-601, 2007.

CHUDE, M. A.; ORISAKWE, O. J.; AFONNE, O. J.; GAMANIEL, K. S.; VONGTAU, O. H.; OBI, E. Hypoglycemic effect of the aqueous extract of *Boerhaavia diffusa* leaves. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 215–216, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for Antifungal disk Diffusion Susceptibility Testing for Yeasts**. Approved Guideline. CLSI document M44-A2. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2009

COELHO, F. B. R.; SANTOS, M. G. **Plantas medicinais utilizadas pela comunidade Mumbuca Jalapão – TO: um estudo etnofarmacológico**. Disponível em: <http://www.pequi.org.br/Coelho_&_Santos.pdf> Acesso em: 10 out. 2007.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura; IBDF, 1984. 6v. 4330 p.

CREVELIN, E. J.; TURATTI, I. C. C.; CROTTI, A. E. M.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, J. L.C.; LOPES, N. P.; CUNHA, W. R. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827–830, 2006.

D'AGOSTINO, M.; BIAGI, C.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. An oleanolic acid saponin from *Ximenia americana*. **Fitoterapia**, v. 65, p. 59-61, 1994.

DE FEO, V.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; SORIA, R. U. Saponins from *Colignonia scandens* Benth. (Nyctaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 251-253, 1998.

DELITT, W. B. C.; MEIRELLES, S. T.; MANTOVANI, W.; COSTA, V. C. I.; PAGANO, F.; BOZZO, G. O. **Esclerofilia e nitrogênio em plantas dos Cerrados de Emas, Pirassununga, SP**. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/~delitti/simposio.html>. Acesso em: 10 nov. 2007.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** São Paulo: UNESP, 2002. p. 165-173.

DOUGLAS, N. A.; MANOS, P. S. Molecular phylogeny of Nyctaginaceae: taxonomy, biogeography, and characters associated with a radiation of xerophytic genera in North America. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 5, p. 856–872, 2007.

DUKE, J. A.; MARTINEZ, R. V. **Amazonian ethnobotanical dictionary**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 201.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C.; DE SIQUEIRA, M. F. **Plantas do cerrado paulista:** imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo: Páginas & Letras Editora e Gráfica, 2004. 475 p.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.

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

ELVIN-LEWIS, M.; LEWIS, W. H. The dental use of plants in Amazonia. **Odonto-stomatologie Tropicale**, v. 6, n. 4, p. 178-187, 1983.

FEE, J. A.; TEITELBAUM, H. D. Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 49, p. 150-58, 1972.

FERNANDES, J. F.; CASTELLANI O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 18, p. 195-202, 1966.

FERRARI, A. A.; DE NADAI FERNANDES, E. A.; DE FRANÇA, E. J.; BACCHI, M. A. Análise por ativação neutrônica instrumental em estudos de contaminação da superfície de folhas da Mata Atlântica. In: Simpósio interno do projeto parcelas permanentes, 3, 2004, Cananéia. **Anais…**Cananéia, 2004. p. 107-111.

FERRARI, F.; MESSANA, I. Two new isoflavonoids from *Boerhaavia coccinea.* **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 597-598, 1991.

FERREIRA, D. T.; ÁLVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v. 23, p. 42-46, 2000.

FRANÇA, E. J.; DE NADAI FERNANDES, E. A,; ELIAS, C.; BACCHI, M. A.; ARAÚJO, A. L. **Árvores acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica.** Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/328.PDF>. Acesso em: 10 nov. 2007a.

FRANÇA, E. J.; DE NADAI FERNANDES, E. A.; BACCHI, M. A.; TAGLIAFERRO, F. S.; SAIKI, M. **Soil-plant transfer of chemical elements in the Atlantic Forest.** In: III Simpósio Interno do Projeto Parcelas Permanentes. Disponível em: <http://www.biota.org.br/publi/banco/docs/30031_1090352763.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2007b.

FUNAYAMA, G. K.; PRADO, J. C. Estudo dos caracteres de uma amostra boliviana do *T. cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 8, p. 75-81, 1974.

FURLAN, A. **A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil.** 1996. 359 f. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo: IBB/ USP, 1996.

GIRISH, H. V.; SATISH, S. Antibacterial activity of important medicinal plants on human pathogenic bacteria-a comparative analysis. **World Applied Sciences Journal**, v. 5, p. 267-271, 2008.

GLAVIN, B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 825-831, 1992.

GONZALEZ, D. M. M.; CUÉLLAR, A. C.; CABRERA, K.; HERNANDEZ, P. Evaluation of the diuretic effect of aqueous extract of *Boldoa purpurascens*. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 35, p. 174–176, 2001.

GOYAL, B. M.; BANSAL, P.; GUPTA, V.; KUMAR, S.; SINGH, R.; MAITHANI, M. Pharmacological potential of *Boerhaavia diffusa*: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 2, n. 1, p. 17-22, 2010.

GUPTA, D. R.; AHMED, B. A new *C*-methylflavone from *Boerhaavia diffusa* Linn. roots. **Indian Journal of Chemistry**, v. 23 (B), p. 682–684, 1984.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 125-126, 1995.

HARBORNE, J. B. **The Flavonoids:** advances in research since 1986. Londres: Chapman Hall. 1996, 676p.

HARBORNE, J. B.; WILLIANS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HEUER, S.; RICHTER, S.; METZGER, J. W.; WRAY, V.; NIMTZT, M.; STRACK, D. Betacyanins from bracts of *Bougainvillea glabra.* **Phytochemistry**, v. 37, p. 761-767, 1994.

HILOU, A.; NACOULMA, O. G.; GUIGUEMDE, T. R. In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 236-240, 2006.

HIRAISHI, H.; SHIMADA, T.; IVEY, K. J.; TERANO, A. Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 103-109, 1999.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BIGHETTI, E. J. B.; GERMONSÉN ROBINEOU, L.; SOUZA BRITO, A. R. M. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 267–274, 2000.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the braziliam folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOW, F. C. **A dictionary of the families and genera of chinese seed plants.** Beijing: Science Press, 1998, p. 312.

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

IRVINE, R. F.; SCHELL, M. J. Back in the water: the return of the inositol phosphates. **Nature Review**, v. 2, p. 327-338, 2001.

IWASHINA, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. **Journal of Plant Research**, v. 113, p. 287-299, 2000.

JAIN, G. K.; KHANNA, N. M. Purnanovoside: a new antifibrinolytic agent from *Boerhaavia diffusa*, Linn. **Indian Journal of Chemistry**, v. 28(b), n. 13, p. 163–166, 1989.

KADOTA, S.; LAMI, N.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa*, L. I. Examination of sterols and structures of new rotenoids, boeravinones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 3214-3220, 1989.

KADOTA, S.; LAMI, N.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T. Structure and NMR spectra of Boeravinone C, a new rotenoid analogue from *Boerhaavia diffusa* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 2289-2292, 1988.

KIRTIKAR, K. R.; BASU, B. D. **Indian medicinal plants**, 2. ed., Lalit Mohan Basu: Allahabad - India, 1956, v. 3. p. 2045–2048.

KO, J. K. S.; CHO, C. H. The role of non-protein sulfhydryl compound in gastric adaptative cytoprotections against ethanol-induced mucosal damage in rats. **Inflammation Research**, v. 44, p. 242-244, 1995.

KOEPFLY, J. B.; MEAD, J. F.; BROCKMAN, J. A. An alkaloid with high antimalarial activity from *Dichroa febrifuga.* **Journal of the American Chemical Society**, v. 69, p. 1837, 1947.

KOJIMA, H.; SATO, N.; HATANO, A.; OGURA, H. Sterol glucosides from *Prunella vulgaris*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2351-2355, 1990.

KONTUREK, P. C.; BRZOZOWSKI, T.; KWIECIEŃ, S.; DROZDOWICZ, D.; HARSCH, I. A.; MEIXNER, H,; STACHURA, J.; HAHN, E. G.; KONTUREK, S. J. Effect of *Helicobacter pylori* on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. **European Journal of Pharmacology,** v. 451, p. 191-202, 2002.

KOWALSKI, R.; WOLSKI, T. Evaluation of phenolic acid content in *Silphium perfoliatum* leaves, inflorescences and rhizomes. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 6, p. 2003. Disponível em:
< http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue1/horticulture/art-03.html>

KUSAMBA, C.; BYAMANA, K.; MBUYI, W. M. Antibacterial activity of *Mirabilis jalapa* seed powder. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 197-199, 1991.

KVIETYS, P. R.; TWOHIG, B.; DANZELL, J.; SPECIAN, R. D. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa. Role of neutrophils and xanthine oxidase-derived radicals. **Gastroenterology**, v. 98, p. 909–920, 1990.

LAD, V. **The complete book of Ayurvedic home remedies**. New York: Three Rivers Press. 1999. 326 pp.

LAMI, N.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa*, L. II. Structure and stereochemistry of a new rotenoid, Boeravinone C. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 1558-1562, 1990.

LAMI, N.; KADOTA, S.; KIKUCHI, T. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. Isolation and structure determination of Boeravinone-D, Boeravinone-E and Boeravinone-F. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 1863-1865, 1991a.

LAMI, N.; KADOTA, S.; KIKUCHI, T.; MOMOSE, Y. Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. Identification of Ca-2+ channel antagonistic compound from the methanol extract. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, p. 1551-1555, 1991b.

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

LEE, J. S.; LEE, C. M.; JEONG, Y.; JUNG, I. D.; KIM, B.; SEONG, E.; KIM, J.; CHOI, I.; CHUNG, H. Y.; PARK, Y. D-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma. **FEBS Letters**, p. 57–64, 2007.

LEYON, P. V.; LINI, C. C.; KUTTAN, G. Inhibitory effect of *Boerhaavia diffusa* on experimental metastasis by B16F10 melanoma in C57BL/6 Mice. **Life Sciences**, v. 76, p. 1339–1349, 2005.

LI, L.; WANG, C. Y.; SHAO, C. L.; GUO, Y. W.; LI, G. Q.; SUN, X. P.; HAN, L.; HUANG, H.; GUAN, H. S. Sarcoglycoside A-C, new *O*-glycosilglycerol derivatives from the South China sea soft coral *Sarcophyton unfundibuliforme*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, p. 1495, 2009.

LOHANI, S.; JAN, A.; VERMA, H. N. *In vivo* and *in vitro* resistance induction in *Tobacco* by *Boerhaavia diffusa* systemic resistance inducing protein and transfer of induced resistance in *in vitro Tobacco* plants. **Biotechnology**, v. 3, p. 389-392, 2007.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum Ltda. 1994, p. 327.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras:** Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998, v.2, p. 269-270.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática:** guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora Brasileira, baseado em PAG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum Ltda. 2005, p. 227.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of Flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970. 354 p.

MAGID, A. A.; VOUTQUENNE, L.; HARAKAT, D.; POUNY, I.; CARON, C.; MORETTI, C.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar villosum*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 919-926, 2006.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids: a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MANU, K. A; KUTTAN, G. Anti-metastatic potential of Punarnavine, an alkaloid from *Boerhaavia diffusa* Linn. **Immunobiology**, v. 214, p. 245–255, 2009.

MANU, K. A.; LEYON, P. V.; KUTTAN, G. Studies on the protective effects of *Boerhaavia diffusa* L. against gamma radiation induced damage in mice. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, p. 381-388, 2007.

MARON, D. M.; AMES, B. M. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MATOS, J. F. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: EUFC, 1997. 141 p.

MATSUDA, H.; LI, Y.; YOSHIKAWA, M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydrils, and prostaglandins in gastroprotection by momordin IC, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. **Life Sciences**, v. 65, p. 27-32, 1999.

MECCORD, J. M. E.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p. 6056-63, 1969.

MEISTER, A. E.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-60, 1983.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K. P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C.; SINGH, V. K. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 987-96, 2002a.

MEHROTRA, S.; SINGH, V. K.; AGARWAL, S. S.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C. Antilymphoproliferative activity of ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. Immunomodulation by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* roots. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 236-242, 2002b.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, 2000.

MESSANA, I.; FERRARI, F.; GOULART SANT'ANA, A. E. Two 12a-hydroxyrotenoids from *Boerhaavia coccinea*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2688-2689, 1986.

MHASKE, S. B.; ARGADE, N. P. The chemistry of recently isolated naturally occurring quinazolinone alkaloids. **Tetrahedron**, v. 62, p. 9787-9826, 2006.

MICHALET, S.; CARTIER, G.; DAVID, B.; MARIOTTE, A. M.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; KAATZ, G. W.; STAVRI, M.; GIBBONS, S. *N*-caffeoylphenylkylamide derivatives as bacterial efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1755-1758, 2007.

MISAS, C. A. J.; HERNANDEZ, N. M. R.; ABRAHAM, A. M. L.; Resultados comparativos de la actividad biologica de extractos de plantas que crecen en Cuba. III. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 14, p. 301–10, 1980.

MISHRA, J.; SINGH, R. Studies on the the effect of indigenous drug *Boerhaavia diffusa* on kidney regeneration. **The Indian Journal of Pharmacy**, v**.** 12, p. 59–64, 1980.

MITAINE-OFFER, A. C.; MAROUF, A.; HANQUET, B.; BIRLIRAKIS, N.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Two triterpene saponins from *Achyranthes bidentata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 1492-1494, 2001.

MORHARDT, S.; MORHARDT, E. **California desert flowers:** an introduction to families, genera and species. Los Angeles: University of California Press. 2004. p. 203.

MORENO, P. R. H.; AGRIPINO, B. D. G.; LIMA, M. E. L.; SILVA, M. R.; MEDA, C. I.; BOLZANI, V. S; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA- damaging activities. I. Atlantic rain forest - ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotrópica**, v. 4, p. 1-15, 2004.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of terprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 495-505, 1991.

MOSQUERA, D. M. G.; KILONDA, A.; TOPPET, S.; COMPERNOLLE, F.; DEHAEN, W.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; APERS, S.; PIETERS, L; CUÉLLAR, A. C. New flavonoids from *Boldoa purpurascens* Cav. **Planta Medica**, v. 74, p. 1468–1473, 2008.

MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, p. 999-1002, 2000.

MUNGANTIWAR, A. A.; NAIR, A. M.; SHIND, U. A.; DIKSHIT, V. J.; SARAF, M. N.; THAKUR, V. S.; SAINIS, K. B. Studies on the immunomodulatory effects *of Boerhaavia diffusa* alkaloidal fraction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 2, p. 125-131, 1999.

NALAMOLU, R. K.; BOINI, K. M.; NAMMI, S. Effect of chronic administration of *Boerhaavia diffusa* Linn. leaf extract on experimental diabetes in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 305-309, 2004.

NANDI, R. P.; CHATTERJEE, S. K. Occurrence of Purnanavines in *Boerhaavia repens* Linn. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 12, p. 509-511, 1974.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 569-573, 1998.

OJEWOLE, J. A. O.; ADESINA, S. K. Effects of hypoxanthine-9-L-arabino-furanoside, a nucleoside from the roots of *Boerhavia diffusa* L. (Nyctaginaceae), on isolated coronary arter. **Fitoterapia**, v. 54, p. 163–169, 1983

PANDEY, R.; MAURYA, R.; SINGH, G.; SATHIAMOORTHY, B.; NAIK, S. Immunosupressive properties of flavonoids isolated from *Boerhaavia diffusa* Linn. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 541-553, 2005.

PARI, L.; SATHEESH, M. A. Antidiabetic activity of *Boerhaavia diffusa* L.: effect on hepatic key enzymes in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 109–113, 2004.

PEREIRA, D. M.; FARIA, J.; GASPAR, L.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. *Boerhaavia diffusa*: metabolite profiling of a medicinal plant from Nyctaginaceae. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2142-2149, 2009.

PIATELLI, M.; MINALE, L.; NICOLAUS, R. A. Pigments of Centrospermae-V. Betaxanthins from *Mirabilis jalapa*. **Phytochemistry**, v. 4, p. 817-823, 1965.

PODESCHWA, M.; PLETTENBURG, O.; BROCKE, J. V.; BLOCK, O.; ADELT, S.; ALTENBACH, H. J. Stereoseletive synthesis of *myo*-, *neo*-, L-*chiro*, D-*chiro*, *allo*-, *scyllo*, and *epi*-Inositol systems via conduritols prepared from *p*-benziquinone. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1958-1972, 2003

PRICE, J. R.; ROBSON, R. Nitrogenous anthocyanis. Part IV. The colouring matter of *Bougainvillea glabra.* **Journal of the Chemical Society**, p. 449 – 453, 1937.

RACHH, P. R.; RACHH, M. R.; MODI, D. C.; SHAH, B. N.; BHARGAVA, A. S.; PATEL, N. M.; RUPARELIYA, M. T. In vitro evaluation of antioxidant activity of Punarnava (*Boerhaavia diffusa* Linn.). **International Journal of Pharmaceutical Research**, v. 1, p. 36-40, 2009.

RASTRELLI, L.; AQUINO, R.; ABDO, S.; PROTO, M.; DE SIMONE, F.; DE TOMMASI, N. Studies on the Constituents of *Amaranthus caudatus* leaves: isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and ionol-derived glycosides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1797-1804, 1998.

RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S.; TRIPATHI, S. C.; SHOME, U. Hepatoprotective activity of *Boerhaavia diffusa* L. roots - a popular Indian ethnomedicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 61-66, 1997.

REYNOLDS J. E. F. (Ed.) **Martindale** - The extra pharmacopoeia. 31.ed. London: Royal pharmaceutical society. 1996.

RINALDO, D.; RODRIGUES, C. M.; RODRIGUES, J.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. New flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1132-1135, 2007.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

ROVER-JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SANTOS, A. S.; CAETANO, L. C.; SANTANA, A. E. G. A 12a-Hydroxyrotenoid from roots of *Boerhaavia coccinea*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 255-258, 1998.

SCHENKEL, E. P.; GOSMMAN, G.; ATHAYDE, M. L. S. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

SCHUBERT, K. R.; BOLAND, M. J. The ureides. In: MIFLIN, B. J.; LEA, P. J. **The biochemistry of Plants**. San Diego: Academic Press. 1990, p. 197-282.

SEVERI, J. A. **Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica Em Plantas Superiores: *Guapira noxia.*** 2007. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2007.

SHAY, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

SILVA JUNIOR, M. C. **100 Árvores do Cerrado:** guia de campo. Brasília: Ed. Rede de Sementes do Cerrado, 2005, p. 136-139,.

SILVA, L. H. P.; Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *Trypanossoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica e Biológica**, v. 20, p. 191-207, 1953.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO AMBIENTAL (SINBIOTA). Disponível em <http://sinbiota.cria.org.br/atlas/>. Acesso em: 01 set. 2006.

STOCKS, J.; GUTTERID, J. M.; SHARP, R. J.; DORMANDY, T. L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clinical Science and Molecular Medicine**, v. 47, p. 215-22, 1974.

SURESHAN, K. M.; MIYASOU, T.; WATANABE, Y. Total synthesis of the proposed structure of "brahol" and the structural revision. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 3197-3201, 2004.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, H.; SUZUKI, H.; NISHIYAMA, N. Development of the short time exposure (STE) test: an in vitro eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 760–770, 2008.

TAKEUCHI, K.; MEGUMU, O.; HIROMICHI, M.; OKABE, S. Role of suphydryls in mucosa injury caused by ethanol. Relation to microvascular permeability, gastric motility and cytoprotection. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 48, p .836-839, 1988.

TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733–749, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p. 670-671.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1999.

TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; POOTAENG-ON, Y.; PHANSA, P.; TAYLOR, W. C. Cerebrosides and a Monoacylmonogalactosylglycerol from *Clinacanthus nutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 1, p. 27-32, 2004.

VINEKEN, J. P.; HENG, L.; GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins: classification and ocurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, p. 275-297, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant drug analysis:** a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer Verlag, 1984. 320p.

WAHI, A. K.; AGRAWAL, V. K.; GUPTA, R. C. Phytochemicals and pharmacological studies on *Boerhaavia diffusa* Linn. (*punarnava*) alkaloids. **National Academy of Science Letters**, v. 20, p. 9-10, 1997.

WALLACE, J. L. Mechanisms of protection a leaking: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**, v. 110, p. 19S-23S, 1999.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. S. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 19, p .512-521, 2000.

WEGNER, C.; HAMBURGER, M.; KUNERT, O.; HASLINGER, E. Tensoactive compounds from the aquatic plant *Ranunculus fluitans* L. (Ranunculaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 83, p. 1454-1464, 2000.

WEVERS, R. A.; ENGELKE, U. F. H.; MOOLENAAR, S. H.; BRAUTIGAM, C.; JONG, J. G. N.; DURAN, R.; ABREU, R. A.; GENNIP, A. H. ^{1}H-NMR Spectroscopy of body fluids: inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. **Clinical Chemistry**, v. 45, p. 539–548, 1999.

WOLLENWEBER, E.; PAPENDIECK, S.; SCHILLING, GERHARD. A novel *C*-methyl isoflavone from *Abronia latifolia.* **Natural Product Research**, v. 3, p. 119 – 122, 1993.

WOLLENWEBER, E.; DORR, M. Exudate flavonoids from aerial parts of *Mirabilis viscosa* (Nyctaginaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 799, 1996.

YANG, S. W.; UBILLAS, R.; MCALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D.M.; TALBOT, M. K. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 313-317, 2001.

YASUKAWA, K.; TAKIDO, M. A Flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*, **Phytochemistry**, v. 26, p. 1224-1226, 1987.

YI-FEN, W.; JI-JUNA, C.; YAN, Y.; YONG-TANG, Z.; SHAO-ZONG, T.; SHI-DE, L. New rotenoids from roots of *Mirabilis jalapa*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 85, p. 2342-2348, 2002.

YOSHIKAWA, M.; YAMAGUCHI, S.; KUNIMI, K.; MATSUDA, H.; OKUNO, Y.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI, N. Stomachic Principles in Ginger. III.[1)] Antiulcer principle, 6-Ginsesulfonic acid and three Monoacyldigalactosylglycerols, Gingerglycolipids A, B and C, from *Zingiberis Rhizoma* originating in Taiwan. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 1226-1230, 1994.

ZHANG; G. L.; XING, K. Y.; ZHANG, M. Z. Glycolipids from *Mirabilis himalaica*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1213-1215, 1997.