



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

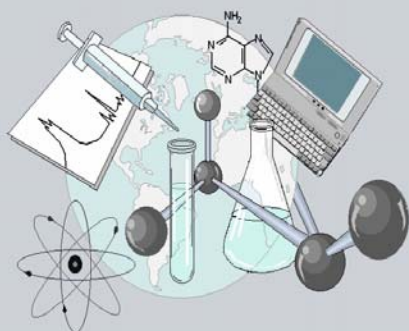
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL *Mabea fistulifera* Mart.  
(EUPHORBIACEAE)”

Dissertação apresentada por  
**Aline Coqueiro** ao Programa de Pós-  
Graduação em Química do  
Departamento de Química do Centro  
de Ciências Exatas da Universidade  
Estadual de Maringá como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de  
Mestre em Química

CEE



Centro de  
Ciências Exatas

MARINGÁ, MAIO/2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

C786e Coqueiro, Aline  
Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da espécie vegetal "*Mabea fistulifera* Mart." (*Euphorbiaceae*) / Aline Coqueiro. -- Maringá : [s.n.], 2006.  
111 f. : il. color., figs.

Orientador : Prof. Dr. Gentil José Vidotti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química, 2006.

1. *Mabea fistulifera* Mart. 2. *Euphorbiaceae* - Estudo químico e atividade biológica. 3. Flavonóides. 4. Triterpenos. 5. Ensaio biológicos. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-graduação em Química. II. Título.

CDD 21.ed. 583.69



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

*Dissertação de Mestrado*

*ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL “Mabea fistulifera  
Mart.” (Euphorbiaceae)*

*Mestranda: Aline Coqueiro*

*Orientador: Prof. Dr. Gentil José Vidotti*

**2006**

**Aline Coqueiro**

*ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL “Mabea fistulifera  
Mart.” (Euphorbiaceae)*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Gentil José Vidotti.

**2006**

*A* minha mãe Maria, ao meu pai Ubaldo e  
a minha irmã Letícia pelo amor, apoio,  
incentivo e dedicação incondicional. Em  
especial a minha avó Aparecida (in  
memorian) que mesmo com todas as palavras  
do mundo não conseguiria agradecer e dizer  
o quanto foi e sempre será importante para  
mim.

# *A* *gradecimentos*

- A Deus pela força e superação dos momentos mais difíceis, por todas as oportunidades e principalmente pela minha vida.
- Ao professor Dr. Gentil José Vidotti pela paciência, orientação, disponibilidade, apoio e por todos os ensinamentos profissionais e pessoais.
- À minha mãe pelo exemplo de coragem e superação e pelo incentivo constante durante toda minha vida.
- Ao meu pai pelo incentivo e força nas horas de alegria e tristeza.
- À minha irmã pelo amor e incentivo.
- Ao meu namorado Carlos Salamão Júnior pelo incentivo, compreensão e confiança.
- A todos os professores da UEM que contribuíram direta ou indiretamente com minha formação acadêmica.
- Aos Profs. Maria Helena Sarragiotto, Cleuza Conceição da Silva, Clara Megumi Abe Tanaka, Ernani Abchit Basso, Adley Forti Rubira e Gizilene Carvalho pelo apoio e contribuições para o trabalho.
- Ao Prof. Marcos Alberto Zocoler pela coleta da planta.
- À Profa. Dra. Ciomar A. Bersani Amado, ao técnico Jailson Araújo Dantas e ao aluno Arthur Estivalet Svidzinski pela realização do teste antiinflamatório.
- À Profa. Dra. Lucília Motinha Zamuner pela supervisão no teste moluscicida.
- Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura pela realização do teste antimicrobiano.
- À técnica Ivânia pela realização das análises de RMN e disposição para esclarecimento de dúvidas.
- Ao Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa e as alunas de doutorado Anelise e Lílian pela ajuda com o experimento de atividade antioxidante.
- À Inês Lunardi pela realização das análises de RMN realizadas na Unicamp.
- À Patrícia Valderrama pelos artigos fornecidos, pela paciência e apoio.
- Ao Claudemir e Cristina da secretaria de pós-graduação de química.
- Aos colegas do Laboratório pelo companheirismo.

- Aos amigos Ana Paula, Jacqueline e Marcos H. Kunita (Marcão) pela força e incentivo e pelos momentos de descontração.
- Aos colegas do laboratório Janaína, Juliana, Viviane, Cristiana, Raíssa, Elidia, Andrelson, Marcos J. L. Santos, Rafael Sanches, Luiz Henrique, Rafael e Washington.
- Aos familiares pela força e carinho.
- Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá por possibilitar a realização deste trabalho.
- E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Palavras-chave: *Mabea fistulifera* Mart., flavonóides, triterpenos e ensaios biológicos.

O presente trabalho teve por objetivo o estudo químico e avaliação de algumas atividades biológicas, tais como: toxicidade com *Artemia salina*, susceptibilidade antibacteriana/antifúngica, atividade moluscicida, atividade antioxidante e antiinflamatória de *Mabea fistulifera* Mart.

A espécie vegetal foi dividida em diferentes partes: folhas, galhos, pedúnculos florais, cascas do caule, cascas das sementes e sementes, sendo cada uma das partes submetida a diferentes extrações com vários solventes e os extratos tiveram suas atividades biológicas testadas, porém apenas os extratos hexânico, etanólico e diclorometânico das folhas e etanólico das cascas das sementes foram estudados quimicamente.

O fracionamento do extrato hexânico em diferentes solventes utilizando técnicas cromatográficas resultou na separação de duas misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa e de uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

As flavanonas: 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**2**), 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil) glucopiranosil] naringenina (**3**), 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**4**) e 7-O- $\beta$  glucopiranosil naringenina e uma mistura dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina foram isolados das cascas das sementes.

Todos os extratos etanólicos e as frações diclorometânica e butanólica foram ativos no teste de toxicidade com *Artemia salina* sendo o extrato etanólico das cascas do caule o mais ativo com  $IC_{50} = 48,17 \mu\text{g/mL}$ . No teste de susceptibilidade antibacteriana/antifúngica alguns extratos demonstraram atividade moderada para: *B. subtilis*; *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Nenhum dos extratos testados foi ativo para as bactérias Gram negativas: *E. coli* e *P. aeruginosa* e nem para a levedura *C. albicans*. Dos extratos e frações testados para atividade moluscicida, nenhum pode ser considerado ativo.

No teste de atividade antioxidante, a fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas foi a mais ativa com  $IC_{50} = 4,75 \mu\text{g/mL}$ .

Para o teste antiinflamatório somente os resultados do extrato etanólico dos pedúnculos florais sugerem uma possível atividade antiinflamatória.



## ABSTRACT

Keywords: *Mabea fistulifera* Mart., flavonoids, triterpenes and biological assays

In the present work we reported the chemical and biological evaluation, such as toxicity against *Artemia salina*, antibacterial, antifungal, molluscicidal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Mabea fistulifera* Mart.

The plant material was divided in: leaves, stem, floral stalks, peels, seeds peels and seeds and each one was submitted to different extractions using different solvents and were submitted to biological assays, however only the extracts hexane, ethanolic, dichloromethane on leaves and ethanolic on seeds peels were chemically study.

The fractionation of the hexane extract with different solvents using chromatographic techniques resulted on the isolation of two mixture of long chain hydrocarbon and of the mixture of  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol steroids.

The flavanons: naringenin 7-O- $\beta$ -(3'',6''-di-*p*-coumaroyl)glucoside (**2**), naringenin 7-O- $\beta$ -(3''-*p*-coumaroyl)glucoside (**3**), naringenin 7-O- $\beta$ -(6''-*p*-coumaroyl)glucoside (**4**) and naringenin 7-O- $\beta$ -glucoside and of the triterpene mixture of  $\alpha$  and  $\beta$ -amirine was isolated of seeds peels.

All the ethanolic extracts and dichloromethane and buthanol fractions were toxic against *Artemia salina* being ethanolic peels extract the most active with an  $IC_{50} = 48.17 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

For the antibacterial and antifungal evaluation some extracts gave a moderated activity for *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. None of the extracts were active on the Gram-negative *E. coli* and *P. aeruginosa* or even for the yeast *C. albicans*. For the molluscicidal evaluation none of the extracts were active.

For the antioxidant assay the ethyl acetate fraction most active with a  $IC_{50} = 4.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

For the antiinflammatory evaluation only the floral stalks ethanolic extract suggesting a possible antiinflammatory active.

## ÍNDICE ANALÍTICO

ÍNDICE DE TABELAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	vi
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Ocorrências e posição taxonômica .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Testes biológicos.....</b>	<b>7</b>
1.2.1. Toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	7
1.2.2. Atividade antibacteriana/antifúngica .....	7
1.2.3. Atividade moluscicida .....	8
1.2.4. Atividade antioxidante.....	10
1.2.5. Atividade antiinflamatória .....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Materiais e métodos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Preparação dos extratos e avaliação de atividades biológicas da espécie vegetal     Mabea fistulifera Mart. (Euphorbiaceae) .....</b>	<b>18</b>
3.2.1. Coleta e secagem da espécie vegetal .....	18
3.2.2. Avaliação das atividades biológicas .....	21
3.2.2.1. Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	22
3.2.2.2. Teste de susceptibilidade antibacteriana/antifúngica pelo método da microdiluição .....	23
3.2.2.2.1. Teste de susceptibilidade antibacteriana.....	23
3.2.2.2.2. Teste de susceptibilidade antifúngica .....	24
3.2.2.3. Atividade moluscicida .....	24
3.2.2.4. Atividade antioxidante.....	26
3.2.2.5. Teste de atividade antiinflamatória por indução de pleurisia em rato .....	27
<b>3.3. Estudo químico .....</b>	<b>28</b>
3.3.1. Estudo das folhas .....	28
3.3.1.1. Fracionamento do extrato hexânico bruto das folhas/Isolamento das substâncias MF-1 e MF-2 .....	29
3.3.1.1.1. Estudo da fração MF-HF 5/Isolamento da substância MF-3.....	30
3.3.1.2. Partição do extrato etanólico total das folhas .....	31
3.3.2. Estudo das cascas das sementes .....	31
3.3.2.1. Fracionamento do extrato etanólico total das cascas das sementes I .....	32
3.3.2.1.1. Estudo da fração MF-ECS 10/Isolamento das substâncias MF-4 e MF-5	34
3.3.2.1.2. Estudo da fração MF-ECS 12/Isolamento das substâncias MF-6, MF-7 e MF-4 .....	35

3.3.2.2. Fracionamento do extrato etanólico total das cascas das sementes II/Isolamento da substância MF-8 .....	35
3.3.2.2.1. Estudo da fração MF-ECS II.13/Isolamento da substância MF-4.....	37
3.3.2.2.1.1. Estudo da fração MF-ECS II.13.4 .....	39
3.3.2.2.1.1.1. Estudo da fração MF-ECS II.13.4.S.2/Isolamento das substâncias MF-4 e MF-5 .....	40
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. Avaliação das atividades biológicas .....</b>	<b>43</b>
4.1.1. Avaliação da toxicidade com <i>Artemia salina</i> .....	43
4.1.2. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica .....	44
4.1.3. Avaliação da atividade moluscicida .....	45
4.1.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	45
4.1.5. Avaliação da atividade antiinflamatória .....	47
<b>4.2. Identificação das substâncias isoladas .....</b>	<b>51</b>
4.2.1. Composto MF-1/MF-2 .....	51
4.2.2. Composto MF-3.....	55
4.2.3. Composto MF-6.....	61
4.2.4. Composto MF-4.....	68
4.2.5. Composto MF-7.....	80
4.2.6. Composto MF-5.....	91
4.2.7. Composto MF-8.....	101
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Relação da coleta das diferentes partes da planta e dos extratos obtidos.....	21
Tabela 2: Dados do fracionamento do extrato hexânico total da folhas (MF-HF) por coluna cromatográfica.....	30
Tabela 3: Dados do fracionamento do extrato etanólico total das cascas das sementes (MF-ECS) por coluna cromatográfica.....	33
Tabela 4: Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS.....	34
Tabela 5: Dados do fracionamento do extrato etanólico total da cascas das sementes II (MF-ECS II) por coluna cromatográfica.....	36
Tabela 6: Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.....	37
Tabela 7: Dados do fracionamento da fração MF-ECS II.13 por coluna cromatográfica.....	38
Tabela 8: Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.13.....	38
Tabela 9: Dados do fracionamento da fração MF-ECS II.13.4 por coluna cromatográfica em Sephadex LH-20.....	39
Tabela 10: Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.13.4.....	40
Tabela 11: Dados do fracionamento da fração MF-ECS II.13.4.S.2 por coluna cromatográfica.....	41
Tabela 12: Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.13.4.S.2.....	41
Tabela 13: Dados de letalidade de <i>Artemia salina</i> dos extratos obtidos da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart. (Euphorbiaceae) (LC <sub>50</sub> e LC <sub>90</sub> em µg/mL).....	43
Tabela 14: Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica com as respectivas CMI e CMB para os extratos e frações que demonstraram atividade.....	44
Tabela 15: Avaliação da atividade moluscicida da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart.....	45
Tabela 16: Comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN <sup>13</sup> C (75,45 MHz em CDCl <sub>3</sub> ) de MF-3 com os dados da literatura <sup>61,62</sup> para estigmasterol e β-sitosterol.....	56
Tabela 17: Correlações homonucleares <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H observadas no espectro de COSY de MF-6 em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	63
Tabela 18: Dados de RMN <sup>1</sup> H (300,06 MHz, C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO) para a substância MF-6 e comparação com os dados da literatura <sup>19</sup> (δ <sup>1</sup> <sub>H</sub> <sup>a</sup> ).....	64
Tabela 19: Correlações homonucleares <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H observadas através do espectro de COSY de MF-4 em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	71
Tabela 20: Dados de <sup>13</sup> C (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO) para o composto MF-4 (3) e comparação com dados da literatura <sup>19</sup> ( <sup>13</sup> C <sup>a</sup> e HMQC <sup>a</sup> ).....	72

Tabela 21: Correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ observadas no espectro de COSY de MF-7 em $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ . .....	83
Tabela 22: Dados de $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz em $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) para o composto MF-7 (4) e comparação com dados da literatura <sup>63</sup> ( $^{13}\text{C}^a$ , HMQC <sup>a</sup> ). .....	84
Tabela 23: Dados de RMN $^{13}\text{C}$ (75,45 MHz) para MF-5 em $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ . .....	94
Tabela 24: Dados de $^1\text{H}$ (300,06 MHz) para o composto MF-5 (2) ( $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) e comparação com dados da literatura <sup>19</sup> ( $\delta^1_{\text{H}^a}$ ). .....	95
Tabela 25: Dados de deslocamentos de carbono para MF-8 (a e b) em $\text{CDCl}_3$ e comparação com dados da literatura <sup>64</sup> para $\beta$ -amirina <sup>a</sup> , $\alpha$ -amirina <sup>a</sup> . .....	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Mabea fistulifera</i> Mart. (Euphorbiaceae). Quatá-SP, com detalhes dos pedúnculos florais, frutos e folhas. ....	6
Figura 2: Ciclo do <i>Schistosoma mansoni</i> a) ovo com miracídeo alcançando a água; b) miracídeo nadando para um caramujo – <i>Biomphalaria</i> ; c) penetração do miracídeo nas partes moles do caramujo; d) esporocisto 1º; e) esporocisto 2º; f) esporocisto 2º com cercárias dentro; g) cercária saindo do caramujo; h) cercária nadando para novo hospedeiro <sup>39</sup> .....	9
Figura 3: Materiais utilizados no laboratório de fitoquímica para realização do teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> . ....	22
Figura 4: Método de pleurisia em rato na determinação de atividade antiinflamatória. ....	28
Figura 5: Descoramento da solução de DPPH• à medida que a reação se processa. ....	46
Figura 6: Comparação entre valores de IC <sub>50</sub> (µg/mL) realizados pelo método do DPPH• (P<0,05). ....	47
Figura 7: Efeito dos extratos etanólicos da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart. sobre o volume do exsudato pleural induzido pela injeção de carragenina. *P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey). ....	48
Figura 8: Efeito dos extratos etanólicos da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart. sobre a migração de leucócitos induzida pela injeção de carragenina. *P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey). ....	48
Figura 9: Efeito do extrato etanólico dos pedúnculos florais da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart. utilizando água e solução de DMSO como solvente, sobre o volume do exsudato pleural induzido pela injeção de carragenina. *P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey). ....	49
Figura 10: Efeito do extrato etanólico da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart. utilizando água e solução de DMSO como solvente, sobre a migração de leucócitos induzida pela injeção de carragenina. *P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey). ....	49
Figura 11: Efeito dos extratos das folhas da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart. e comparação entre diferentes métodos de extração sobre o volume do exsudato pleural induzido pela injeção de carragenina. *P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey). ....	50
Figura 12: Efeito dos extratos das folhas da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart. e comparação entre diferentes métodos de extração sobre a migração de leucócitos induzida pela injeção de carragenina. *P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey). ....	50

Figura 13: A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H para MF-1 (mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa) (300,06 MHz) em CDCl <sub>3</sub> .....	53
Figura 14: A) Espectro de RMN <sup>1</sup> H para MF-2 (misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa) (300,06 MHz) em C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N. ....	54
Figura 15: Espectro de IV (KBr) para MF-3 (β-sitosterol e estigmasterol).....	57
Figura 16: Espectro de RMN <sup>1</sup> H para MF-3 (β-sitosterol e estigmasterol) (300,06 MHz) em CDCl <sub>3</sub> . ....	59
Figura 17: Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT para MF-3 (β-sitosterol e estigmasterol) (75,45 MHz) em CDCl <sub>3</sub> . ....	60
Figura 18: Conformação preferencial do anel C da flavanona.....	62
Figura 19: Espectro de IV (filme) para a substância MF-6 - 7-O-β-glucopiranosil naringenina. ....	65
Figura 20: Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a substância MF-6 - 7-O-β-glucopiranosil -naringenina (300,06 MHz) em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	66
Figura 21: Espectro de COSY para a substância MF-6 - 7-O-β-glucopiranosil naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO. ....	67
Figura 22: Principais correlações observadas no espectro de HMBC de MF-4.....	69
Figura 23: Representação das interações observadas pela irradiação do sinal em δ <sub>H</sub> 5,26 (H-1”) e 12,09 (HO-5). ....	70
Figura 24: Espectro de IV (KBr) para a substância MF-4 - 7-O-β-[(3”- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina. ....	73
Figura 25: Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a substância MF-4 - 7-O-β-[(3”- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina (300,06 MHz) em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	74
Figura 26: Espectro de <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H COSY para a substância MF-4 - 7-O-β-[(3”- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	75
Figura 27: Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT para a substância MF-4 - 7-O-β-[(3”- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina (75,45 MHz) em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	76
Figura 28: Espectro de HMQC para a substância MF-4 - 7-O-β-[(3”- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	77
Figura 29: Espectro de HMBC para a substância MF-4 - 7-O-β-[(3”- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	78
Figura 30: Espectro de diferença de NOE em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO de MF-4 - 7-O-β-[(3”- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	79

Figura 31: Principais correlações observadas no espectro de HMBC de MF-7.....	82
Figura 32: Espectro de IV (filme) para a substância MF-7 - 7-O-β-[(6''- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina. ....	85
Figura 33: Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a substância MF-7 - 7-O-β-[(6''- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina (300,06 MHz) em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	86
Figura 34: Espectro de COSY para a substância MF-7 - 7-O-β-[(6''- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	87
Figura 35: Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT para a substância MF-7 - 7-O-β-[(6''- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina (75,45 MHz) em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	88
Figura 36: Espectro de HMQC para a substância MF-7 - 7-O-β-[(6''- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	89
Figura 37: Espectro de HMBC para a substância MF-7 - 7-O-β-[(6''- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	90
Figura 38: Principais correlações observadas no espectro de HMBC de MF-5.....	93
Figura 39: Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a substâncias MF-5 - 7-O-β-[(3'',6''-di- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina (300,06 MHz) em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	96
Figura 40: Espectro de COSY para a substância MF-5 - 7-O-β-[(3'',6''-di- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	97
Figura 41: Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT para a substância MF-5 - 7-O-β-[(3'',6''-di- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina (75,45 MHz) em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	98
Figura 42: Espectro de HMQC para a substância MF-5 - 7-O-β-[(3'',6''-di- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	99
Figura 43: Espectro de HMBC para a substância MF-5 - 7-O-β-[(3'',6''-di- <i>p</i> -coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C <sub>2</sub> D <sub>6</sub> CO.....	100
Figura 44: Espectro de RMN <sup>1</sup> H para a substância MF-8 (α e β-amirina) (300,06 MHz) em CDCl <sub>3</sub> . ....	103
Figura 45: Espectro de RMN <sup>13</sup> C/DEPT da mistura MF-8 (α e β-amirina) (75,45 MHz) em CDCl <sub>3</sub> . ....	104
Figura 46: Espectro de HMQC para MF-8 (α e β-amirina) em CDCl <sub>3</sub> .....	105



## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Procedimento empregado para obtenção dos extratos das folhas (---) e das cascas das sementes (---) e atividades realizadas: 1- Toxicidade com <i>Artemia salina</i> ; 2- Atividade moluscicida; 3-Atividade antimicrobiana; 4- Atividade antioxidante e 5- Atividade antiinflamatória.....	19
Esquema 2: Procedimento empregado para obtenção dos extratos da casca do caule (---), galhos (---), pedúnculos florais (---) e sementes (---) e atividades realizadas: 1- Toxicidade com <i>Artemia salina</i> ; 2- Atividade moluscicida; 3-Atividade antimicrobiana; 4- Atividade antioxidante e 5- Atividade antiinflamatória.....	20
Esquema 3: Procedimento utilizado para avaliação da atividade moluscicida da espécie <i>Mabea fistulifera</i> Mart.....	25
Esquema 4: Procedimento empregado para o isolamento dos constituintes das folhas de <i>Mabea fistulifera</i> Mart.....	29
Esquema 5: Procedimento empregado para o isolamento dos constituintes das cascas das sementes de <i>Mabea fistulifera</i> Mart. ....	32

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento Químico (em ppm)
ATCC	American Type Culture Collection
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MHz	Megahertz
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
ppm	Partes por Milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica, desde que sejam utilizadas plantas cujas atividades biológicas tenham sido investigadas cientificamente, comprovando sua eficácia e segurança<sup>1,2</sup>.

A importância de plantas medicinais deve-se também por sua contribuição como fonte natural de fitoterápicos e por proporcionar grandes chances de obter-se uma molécula protótipo para a produção de fármacos devido à diversidade dos constituintes presentes nestas<sup>2,3,4,5</sup>. No entanto inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas carecem de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável<sup>6,7</sup>.

A utilização de plantas na arte de curar é uma forma de tratamento muito antiga, e está relacionada aos primórdios da medicina e fundamentada no acúmulo de informações através de sucessivas gerações. Ao longo dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diferentes doenças.

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque à civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos<sup>8</sup>.

Estima-se que 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretos ou indiretos de plantas medicinais<sup>9,10</sup>, nos países em desenvolvimento esta taxa alcança 80%<sup>11</sup>. Em alguns casos, como a terapia antitumoral e antimicrobiana, 60% dos medicamentos disponíveis no mercado e a maioria dos que se encontram nas últimas fases de ensaios clínicos, são provenientes de plantas superiores<sup>11</sup>.

Apesar dos estudos com plantas medicinais virem crescendo, eles revelam que somente de 15 a 17% das plantas que habitam o globo, foram estudadas do ponto de vista medicinal<sup>12</sup>. Da mesma forma é relativamente baixa a quantidade de plantas que tenham sido submetidas a uma avaliação científica com vistas a demonstrar seu uso seguro, efeitos potencias e efetividade<sup>7</sup>.

O Brasil possui uma das maiores diversidades genéticas de plantas do mundo, porém menos de 10% têm sido avaliadas com respeito às suas características biológicas e menos de 5% têm sido submetidas a estudos fitoquímicos detalhados. Apesar do recente aumento nas pesquisas na área das atividades, as plantas até agora são pouco utilizadas, porém potencialmente muito valiosas como fontes para futuras descobertas de substâncias biologicamente ativas<sup>13</sup>.

A família Euphorbiaceae consiste em 290 gêneros e 7500 espécies distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo, concentrando-se principalmente na África e América Tropical. A família Euphorbiaceae consiste de plantas dicotiledôneas, ervas, arbustos e árvores, algumas suculentas semelhantes a cactos que são caracterizadas freqüentemente pela ocorrência de seiva leitosa geralmente tóxica<sup>14</sup>, com folhas inteiras ou partidas, em geral com estípulas, latescentes ou não<sup>15</sup>. O gênero *Euphorbia*, que dá nome à família, é atípico, marcado por uma inflorescência de flores reduzidas, rodeadas por brácteas e glândulas. A coroa-de-cristo é um representante deste gênero muito cultivado como ornamental, sendo um grande causador de intoxicações.

Esta família possui espécies com grande interesse comercial como, por exemplo, a mamona (*Ricinus communis* L.) e o tungue (*Aleurites fordii* Hansley) que produzem óleo de baixo ponto de congelamento, usados em certos tipos de lubrificações. São desta família, ainda, as seringueiras (*Hevea Brasiliensis* M. Arg.) e a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). A primeira produz látex que é usado na fabricação de borracha, e a outra serve-nos de alimento<sup>2</sup>. Em geral se pode afirmar que as Euphorbiaceae têm sido muito menos estudadas que outras grandes famílias de angiospermas, tais como Compositae, Gramineae, Leguminosae, Curciferae, Solanaceae, Orchidaceae e Umbelliferae.

Atualmente, algumas plantas desta família têm despertado interesse pelo seu potencial moluscicida (agentes que exterminam moluscos vetores da esquistossomose). Outro interesse que leva ao estudo desta família é a presença de compostos químicos chamados diterpenóides, os quais mostram atividades promotoras de tumor. Vários outros terpenóides também são encontrados no látex das Euphorbiaceae, bem como em diferentes partes das plantas<sup>16</sup>.

Estudos realizados durante 150 anos para estabelecer os princípios purgativos de *Croton tiglium* Linneo, tomaram novos ímpetus depois do descobrimento da atividade potencializadora de tumores (co-carcinogênica) do “óleo de cróton”, estes esforços culminaram no isolamento de substâncias co-carcinogênicas do óleo como diterpenos ésteres de forbol tetracíclico. Depois da elucidação da estrutura do forbol, foram identificados muitos ésteres diterpenos relacionados, das espécies de *Euphorbia*. Alguns destes compostos são

promotores de tumores, enquanto que outros têm ação antitumoral. Porém, todos eles são potentes irritantes primários sobre a pele dos mamíferos<sup>16</sup>.

A maioria dos trabalhos publicados sobre as atividades tóxicas de representantes desta família discute os efeitos carcinogênicos de seus compostos químicos. Os tumores só se desenvolvem depois de uma exposição crônica a estas plantas, e este fenômeno tem sido demonstrado apenas na pele de camundongos. O efeito da exposição aguda da pele de humanos a estas plantas leva à inflamação, e os sintomas pré-inflamatórios são dor e necrose do tecido epitelial. Quando partes das plantas são ingeridas, os sintomas são ardências nos lábios, língua e mucosas orais, seguidos de dores intestinais, vômitos e diarréias severas. O contato com os olhos pode causar conjuntivite e edema<sup>16</sup>.

Vários gêneros já foram estudados quimicamente, especialmente *Euphorbia*, para o qual se encontram relatos de estudos de mais de 120 espécies. Uma revisão destes dados demonstrou que os triterpenóides (mais de 55 triterpenóides tetra e pentacíclicos já foram isolados), seguidos pelos flavonóides (principalmente flavonas, flavonols e flavanonas) e alcalóides são as principais classes de substâncias de interesses para os fitoquímicos. Entretanto, também existem relatos da presença de outras classes de compostos tais como cumarinas, glucosídeos cianogênicos, taninos, álcoois graxos (principalmente *n*-octacosanol e *n*-hexacosanol), hidrocarbonetos, ácidos graxos saturados e insaturados, saponinas triterpenoidais, antocianinas, lignanas, fenantrenos e quinonas, ácidos fenólicos, além de outros compostos aromáticos e demais classes de compostos que vêm sendo encontradas em plantas da família Euphorbiaceae<sup>16</sup>.

As plantas da família Euphorbiaceae têm demonstrado atividade antiinflamatória, além de sua atividade para conjuntivite<sup>16</sup>.

As principais aplicações e usos populares das Euphorbiaceae estão relacionados com aplicações para dores abdominais, antistamínicos, afrodisíacos, bronquites, diabetes, enfermidades urinárias entre outras<sup>16</sup>.

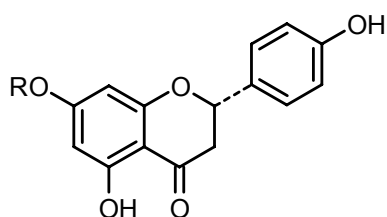
A planta em estudo *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae) é uma planta nativa, amplamente encontrada no Cerrado e em áreas de transição para Mata Estacional Semidecidual. Ocorre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. É normalmente encontrada agregada em bordas de mata e em locais com impacto antrópico acentuado. Sua presença é muito comum na região noroeste do estado de São Paulo. A floração desta planta ocorre de fevereiro a junho, atingindo o pico entre abril e maio, que corresponde ao início da estação seca na região; por ocorrer durante o período de escassez de alimento, muitos animais utilizam seu pólen e néctar, produzidos em abundância, como fonte

alternativa de alimento<sup>17</sup>. Popularmente esta espécie é conhecida como: Canudo-de-pito, Canudeiro, Mamoninha do mato e Leiteira preta. Neste trabalho realizamos o estudo desta espécie devido à inexistência de estudos químicos e biológicos da mesma.

Através da revisão da literatura para o gênero *Mabea*, foram encontrados relatos de estudos com duas espécies desse gênero: *Mabea excelsa*<sup>18</sup> e *Mabea fistulifera* subsp. *robusta*<sup>20</sup> e da espécie *Mabea caudata* Peth<sup>19</sup> do gênero *Mabea* Aubl.

Estudos realizados com as espécies *Mabea caudata* Peth<sup>19</sup> e *Mabea fistulifera* subsp. *robusta*<sup>20</sup> evidenciaram compostos com estrutura coumaroilglucopiranosil naringenina como principais componentes.

O gênero *Mabea* Aubl. compreende 50 espécies distribuídas sobre a América Central e América do Sul sendo uma delas a espécie *Mabea Caudata* Peth., bem representada nas florestas da região Amazônica. De frutos desta espécie foram isolados (2S)-5,7,4'-flavanona (naringenina, **1**), e dois novos compostos (**2 e 3**)<sup>19</sup>.

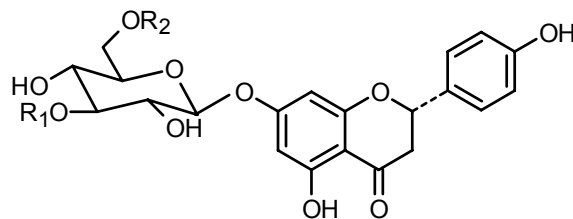


**1** R = H

**2** R =  $\beta$ -3'',6''-di-*p*- coumaroilglucopiranosil

**3** R =  $\beta$ -3''-*p*-coumaroilglucopiranosil

Para a espécie *Mabea fistulifera* subsp. *robusta* foi encontrado relato do estudo com o extrato etanólico dos frutos. A espécie originária do norte e centro-oeste do Brasil apresentou atividade significativa no bioensaio com *Artemia salina*. Desta espécie foram isolados os seguintes compostos: 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**2**), 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**3**) e 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**4**) sendo o composto **2** o bioativo no teste com *Artemia salina*<sup>20</sup>.



**2**  $R_1 = R_2 = p\text{-coumaroil}$

**3**  $R_1 = p\text{-coumaroil}, R_2 = H$

**4**  $R_1 = H, R_2 = p\text{-coumaroil}$

Pelo fato da família Euphorbiaceae ser pouco estudada quimicamente quando comparada a outras grandes famílias de plantas superiores, a investigação química e farmacológica de mais uma espécie, a *Mabea fistulifera* Mart., poderá ampliar os estudos, podendo resultar no isolamento de substâncias importantes farmacologicamente e que possam contribuir para o estudo quimiotaxonômico do gênero e da família.

### 1.1. Ocorrências e posição taxonômica

A espécie em estudo, *Mabea fistulifera* Mart. (Figura 1) tem como nomes populares: Canudo-de-Pito, Canudeiro, Mamoninha do mato e Leiteira preta.

Suas ocorrências são:

Porte: árvore

Ambiente em que se encontra: cerradão

Época de florescimento: fevereiro a junho

Época de frutificação: setembro-outubro

A espécie vegetal possui a seguinte posição taxonômica<sup>21</sup>:

Reino: Plantae

Filo: MAGNOLIOPHYTA

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Euphorbiales

Família: Euphorbiaceae

Gênero: *Mabea*

Espécie: *Mabea fistulifera* Mart.



**Figura 1:** *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae). Quatá-SP, com detalhes dos pedúnculos florais, frutos e folhas.



## 1.2. Testes biológicos

### 1.2.1. Toxicidade com *Artemia salina*

Muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre estes bioensaios encontra-se a Toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS).

O TAS se caracteriza por ser de baixo custo, rápido e não exigir técnicas assépticas. Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de extratos vegetais através da utilização deste teste na monitoração de estudos fitoquímicos<sup>22,23</sup>.

*Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. A simplicidade do bioensaio TAS facilita sua utilização rotineira, podendo ser desenvolvido no próprio laboratório de fitoquímica<sup>22</sup>.

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana<sup>24</sup>, parasiticida<sup>25</sup>, tripanocida<sup>26</sup>, entre outras. McLaughlin e colaboradores<sup>22,23,27-30</sup> têm utilizado sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais. As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação. Uma das classes de compostos com atividades antitumorais é a dos terpenóides, os quais são relatados em muitos gêneros da família Euphorbiaceae.

### 1.2.2. Atividade antibacteriana/antifúngica

Tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de se encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microorganismos<sup>31</sup>.

A savana brasileira é muito diversificada e rica, muitas das plantas encontradas nesse ecossistema são usadas na medicina natural, no tratamento de doenças tropicais, incluindo

infecções bacterianas<sup>32</sup>. Por outro lado, devido ao desconhecimento da possível existência da ação tóxica, bem como de sua indicação adequada, as plantas medicinais são muitas vezes usadas de forma incorreta, não produzindo os efeitos desejados.

Dentre as atividades biológicas mais estudadas nos laboratórios de Produtos Naturais está a atividade antibacteriana e antifúngica, com a perspectiva de obtenção de produtos que possam ser utilizados na produção de fármacos para a terapêutica das infecções produzidas por bactérias e fungos. Neste sentido inclui-se o estudo da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos, óleos e compostos em grande número de gêneros de plantas brasileiras<sup>33</sup>.

A atividade antimicrobiana pode ser atribuída a diferentes classes de compostos sendo uma delas os compostos fenólicos como evidenciado para o extrato alcoólico de própolis<sup>34</sup>, estando esta classe de compostos presente em diversos gêneros da família Euphorbiaceae, bem como para as espécies estudadas do gênero *Mabea*.

### **1.2.3. Atividade moluscicida**

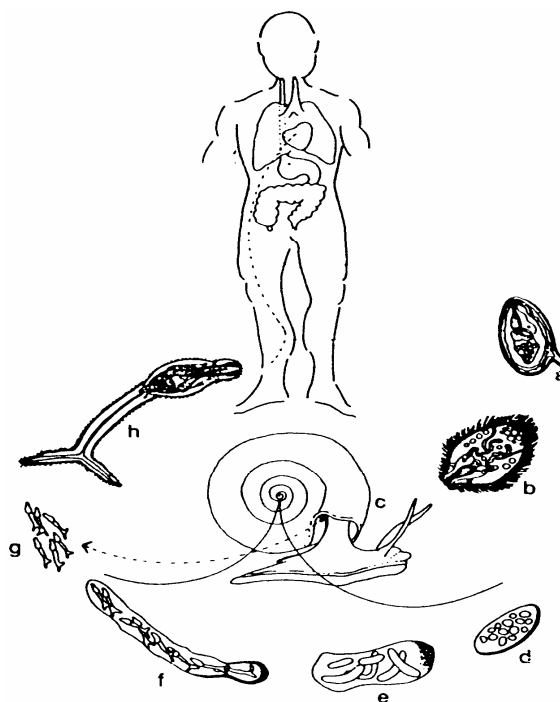
A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que afeta pessoas que têm contato com águas que abrigam caramujos infectados, tais como: trabalhadores rurais, crianças, lavadeiras em áreas sem tratamento de água e esgoto, etc. Esta doença afeta milhões de pessoas em vários países e é um dos principais problemas de saúde pública do mundo<sup>35</sup>.

Entre as doenças parasitárias humanas a esquistossomose é a segunda colocada, atrás da malária, em termos de gravidade sócio-econômica e saúde pública em áreas tropicais e sub-tropicais<sup>36</sup>.

Esta doença é endêmica em 74 países em desenvolvimento, infectando cerca de 200 milhões de pessoas em áreas rurais e urbanas. Destas 20 milhões sofrem severas conseqüências e 120 milhões são sintossomáticas. Em muitas áreas a esquistossomose contamina uma grande proporção de crianças menores de quatorze anos e estima-se que 500-600 milhões de pessoas mundialmente corram o risco de contrair esta doença<sup>37</sup>.

O verme *Schistosoma mansoni*, é o agente etiológico e requer o caramujo *Biomphalaria glabrata* como maior hospedeiro intermediário para transmissão<sup>38</sup>. Esta transmissão acontece quando as cercarias penetram na pele, mais freqüentemente nos pés e pernas por serem áreas do corpo que mais freqüentemente ficam em contato com águas contaminadas. O horário em que são vistas em maior quantidade na água e com maior

atividade é entre 10 e 16 horas, quando a luz solar e o calor são mais intensos. Os locais onde ocorrem a transmissão mais frequentemente são os focos peridomiciliares: valas de irrigação de horta, açudes (reservatórios de água e local de brinqueado de crianças) e pequenos córregos onde as lavadeiras e crianças costumam ir<sup>39</sup>. Por meio da Figura 2 pode-se observar o ciclo do *Schistosoma mansoni*.



**Figura 2:** Ciclo do *Schistosoma mansoni* a) ovo com miracídeo alcançando a água; b) miracídeo nadando para um caramujo – *Biomphalaria*; c) penetração do miracídeo nas partes moles do caramujo; d) esporocisto 1º; e) esporocisto 2º; f) esporocisto 2º com cercárias dentro; g) cercária saindo do caramujo; h) cercária nadando para novo hospedeiro<sup>39</sup>.

O uso de produtos naturais na terapêutica está crescendo em todo o mundo, tal como o interesse por pesquisas nesta área<sup>40</sup>. O Brasil devido a sua riqueza em biodiversidade tem estimulado e focado suas pesquisas em novos fármacos de derivados naturais e seu interesse tem se estendido para o campo do controle dos vetores<sup>40</sup>. As pesquisas por moluscidas eficazes, com menores custos e menor impacto ambiental estimularam a pesquisa por substâncias potencialmente ativas de plantas nativas<sup>41</sup>. As substâncias moluscidas são um fator crucial para o controle da esquistossomose. Apenas uma substância, a niclosamida, é recomendada pela OMS como moluscida<sup>42</sup>.

Em países de Terceiro Mundo o uso de moluscidas sintéticos tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente e a resistência dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*) transmissores da esquistossomose. Em contraste, o uso de plantas com atividade moluscida pode representar uma alternativa barata, além de não poluir o meio ambiente<sup>43</sup>.

O ensaio para avaliação da atividade moluscida, utilizado neste trabalho, constitui uma importante alternativa para o controle do vetor dos parasitas da esquistossomose, pois é um teste rápido, barato e recomendado pela OMS, porém existem muitos pré-requisitos para uma planta ser utilizada como moluscida<sup>43,44</sup>. Apenas os extratos brutos de plantas em concentrações abaixo de 100 ppm são considerados ativos<sup>45</sup>.

Uma das desvantagens quanto aos moluscidas obtidos na forma de extratos brutos de plantas é a necessidade de uma padronização dos mesmos, em decorrência da variação do conteúdo dos princípios ativos nas plantas de acordo com a época do ano. Por outro lado, passam a ter valor comercial somente as substâncias puras com atividade moluscida nas concentrações menores que 10 ppm<sup>46</sup>.

A família Euphorbiaceae é rica em terpenóides, flavonóides e taninos, também são encontrados alcalóides em alguns gêneros desta família os quais fazem parte das maiores classes de compostos com reconhecida atividade moluscida<sup>43</sup>. Devido a isso a avaliação da atividade moluscida foi realizada para a espécie em estudo *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae).

#### **1.2.4. Atividade antioxidante**

As atividades metabólicas normais do organismo humano produzem constantemente radicais livres. Estes são intermediários que possuem elétrons livres, ou não emparelhados em sua órbita externa. Os elétrons livres destes intermediários fazem com que os mesmos se tornem altamente reativos, atacando componentes celulares como DNA e RNA, membrana celular e outras substâncias oxidáveis, acelerando o envelhecimento e, podendo assim, contribuir para a instalação de doenças degenerativas<sup>47</sup>.

A participação de radicais livres de oxigênio (RLO) nos processos patológicos, nas intoxicações e no envelhecimento tem se tornado uma área de pesquisa de grande interesse. Esses RLO estão envolvidos com diversas patologias, tais como: câncer, doenças cardíacas, doenças inflamatórias, doenças degenerativas (Alzheimer, Parkinson, arteriosclerose, demência senil) e em certas doenças sanguíneas<sup>48</sup>.

Na formação dos radicais livres, a molécula de oxigênio é a grande vilã, por ser relativamente lábil e reagir mais facilmente para formar radicais livres. Não está devidamente esclarecido, mas acredita-se que o oxigênio, na presença de catalisadores como luz visível, radiação ionizante, temperatura e metais pesados, sejam os iniciadores desta etapa.

Existem no nosso organismo enzimas e moléculas de baixo peso molecular que são denominadas genericamente de antioxidantes por inibirem a ação destes RLO. Um campo crescente de investigação tem sido à procura de antioxidantes de origem natural que possam ser utilizados como adjuvantes em muitas doenças. Esses constituintes são representados por flavonóides, triterpenóides, derivados fenólicos, peptídeos, etc<sup>48</sup>.

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários, de acordo com seu tipo de ação e sintéticos ou naturais, de acordo com a origem. Agem em pequenas concentrações, quando comparados com o substrato oxidável, prevenindo significativamente, a oxidação do mesmo<sup>49</sup>.

Os antioxidantes verdadeiros (primários) agem interrompendo a cadeia da reação através de doação do elétron ou hidrogênio aos radicais livres, transformando-os em compostos estáveis. Vários antioxidantes agem desta maneira como: butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, ésteres do ácido gálico, *t*-butilhidroquinona, tocoferol e flavonóides. Os antioxidantes secundários agem retardando a etapa da auto-oxidação por diferentes mecanismos que incluem: complexação com metais, seqüestro de oxigênio e decomposição de hidroperóxidos<sup>50</sup>.

O interesse por novos e seguros antioxidantes de fontes naturais tem aumentado, principalmente para prevenir a deterioração de alimentos e para minimizar o dano oxidativo às células vivas. O uso de antioxidantes sintético tem diminuído devido a suspeita de atividade como promotores de carcinogênese, bem como devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos. O papel de antioxidantes dietários e seus benefícios para a saúde têm atraído grande atenção nos últimos anos, especialmente os extraídos de plantas<sup>51</sup>.

Na década de 80 teve início o interesse pelos antioxidantes naturais, mais precisamente os de origem vegetal, devido aos estudos que comprovaram os efeitos tóxicos de doses elevadas de antioxidantes sintéticos (butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol e *t*-butilhidroquinona). Efeitos sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático foram observados<sup>47</sup>.

A maioria das substâncias naturais, com exceção do tocoferol, deve sua ação antioxidante à presença de hidroxilas fenólicas. A maioria dessas substâncias possui grupos funcionais ativos na posição *orto*, enquanto nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos

galatos, esses grupos encontram-se na posição *para*, mas, não possuindo por este motivo, mudança na ação dos mesmos.

Várias substâncias de origem vegetal têm sido apontadas como antioxidantes. Recentemente, o interesse por elas aumentou muito. Assim o uso terapêutico de antioxidantes requer que sejam determinados seus efeitos sobre diferentes moléculas biológicas, por isso, muito embora extratos de plantas tenham sido consagrados pelo uso, é necessário que trabalhos científicos analisem tais propriedades<sup>51</sup>.

As plantas produzem uma grande variedade de substâncias antioxidantes contra os danos moleculares causados por RLO. As substâncias fenólicas compreendem o principal grupo de antioxidantes de origem vegetal<sup>51</sup>.

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais<sup>52</sup>.

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

Como relatado pela literatura<sup>16</sup> os taninos e flavonóides assim como outras classes de compostos fenólicos vêm sendo isolados de plantas da família Euphorbiaceae, bem como do gênero *Mabea*, sendo um indicativo de atividade antioxidante para a espécie em estudo.

### **1.2.5. Atividade antiinflamatória**

A inflamação constitui um mecanismo de defesa local, exclusivo de tecidos mesenquimais (tecido conjuntivo, ósseo e cartilaginoso, vasos sanguíneos e linfáticos e tecidos musculares) lesados. Pode ser definida como sendo uma resposta local do tecido vascularizado agredido, caracterizada por alterações do tecido vascular, dos componentes líquidos e celulares, bem como adaptações do tecido conjuntivo vizinho<sup>53</sup>.

Essas alterações dos componentes teciduais são resultantes de modificações que ocorrem nas células agredidas, estas passando a adquirir comportamentos diferentes: movimentos novos, alterações de forma e liberação de enzimas e de substâncias farmacológicas.

Toda essa transformação morfológica e funcional do tecido, característica dos processos inflamatórios, visa destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo, portanto uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual.

Para se tornar um agente inflamatório, ou seja, um estímulo que desencadeie esses fenômenos de transformação nos tecidos, o agente lesivo tem que ser suficientemente intenso para provocar tais reações e ultrapassar as barreiras de defesas externas (como o derma, por exemplo), sem, contudo alterar a vitalidade do tecido em que atua. Portanto, qualquer causa de agressão, é potencialmente, um agente flogístico.

Classicamente, existem alguns fenômenos básicos comuns a qualquer tipo de inflamação e que independem do agente inflamatório. Esses momentos ou fases caracterizam a inflamação do tipo aguda, a qual sempre antecede a inflamação do tipo crônica.

Os fenômenos irritativos estão intimamente ligados aos fenômenos vasculares, por envolverem a mediação química de fármacos que agem diretamente sobre a parede vascular, ocasionando as alterações vasculares.

A fase vascular envolve todas as transformações ocorridas na microcirculação do local inflamado. Isso ocorre após alguns minutos do início da ação do agente flogístico, intervalo em que se processa a liberação dos mediadores químicos, tais como: histaminas, iminas, prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, etc.

As modificações vasculares incluem alterações no leito vascular e no fluxo sanguíneo, o que origina diferentes formas por hiperemia (aumento do volume de sangue em uma região por intensificação do aporte sanguíneo ou diminuição do escoamento venoso), estas moduladas pela intensidade do agente agressor e pelos graus de resposta do tecido. Acompanhando a hiperemia vêm à isquemia (diminuição do afluxo de sangue em uma região) e o edema (acúmulo de líquido no tecido intercelular, nos espaços ou nas cavidades do corpo), outras duas formas de reações vasculares. Esses três fenômenos juntos formam um conjunto de respostas vasculares imediatas à presença do estímulo agressor, sendo esse conjunto denominado de *Triplíce resposta de Lewis*. Em termos macroscópicos, assim, imediatamente após a agressão, observa-se inicialmente uma zona esbranquiçada (isquemia), a qual é substituída por uma zona avermelhada ou eritema (hiperemia) ao redor do local agredido; mais tardiamente, surge aumento de volume do local (edema)<sup>53</sup>.

Os fenômenos da exsudação referem-se à migração de células e saída de plasma para o foco migratório, provenham eles de vasos ou dos tecidos vizinhos. Distinguem-se dois tipos de exsudação nessa fase: a exsudação plasmática (saída de plasma para fora da luz vascular, com quantidades diversas de água, eletrólitos e proteínas), composta essencialmente por líquidos, e a exsudação celular (passagem de células pela parede vascular, em direção ao interstício, ao local atuante do agente inflamatório).

Os fenômenos celulares da inflamação envolvem o acionamento das capacidades celulares de movimentação, de adesão e de englobamento de partículas. O principal fenômeno é a saída de leucócitos da luz vascular e sua migração para o local agredido.

Os fatores que alteram a inflamação estão relacionados com o agente agressor e com o hospedeiro. Esses dois elementos (agressor e hospedeiro) estabelecem uma inter-relação que assume características particulares, ou seja, cada hospedeiro, dependendo de suas características próprias e da relação com as características do agente agressor, manifestará um quadro inflamatório peculiar a seu estado pessoal. Assim ao se analisar um processo inflamatório, deve-se observar principalmente o binômio agressão-reação.

Como citado anteriormente o interesse por substâncias ativas de origem natural é responsável pelo aumento dos estudos fitoquímicos e aplicações das substâncias isoladas para diversas atividades, sendo uma delas a atividade antiinflamatória.

Partindo do relato de que os flavonóides são substâncias de reconhecida atividade antiinflamatória e que estes estão presentes em vários gêneros da família Euphorbiaceae, principalmente no gênero estudado *Mabea* esta atividade foi avaliada para a espécie *Mabea fistulifera* Mart.



## 2. OBJETIVOS

- Avaliar as atividades de toxicidade com *Artemia salina*, susceptibilidade antibacteriana/antifúngica, moluscicida, antioxidante e antiinflamatória dos extratos obtidos das folhas, cascas das sementes, cascas do caule, sementes, pedúnculos florais e galhos.
- Isolar, purificar, caracterizar e elucidar estruturalmente os metabólitos secundários dos extratos das folhas e das cascas das sementes de *Mabea fistulifera* Mart.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais e métodos

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um equipamento CG/EM SHIMADZU a 70 eV, modelo QP 2000A, com sonda para sólidos.

Os espectros de transmissão na região de infravermelho (IV) foram registrados em pastilhas de KBr, na região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  por um espectrômetro BOMEN, modelo MB-series. A referência utilizada foi a banda de transmissão em 1601  $\text{cm}^{-1}$  de um filme de poliestireno.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em espectrômetro VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB e MERCURY plus BB ambos operando a 300,06 MHz para  $^1\text{H}$  e 75,45 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano TMS ( $\delta$  0,0 ppm). Os solventes deuterados utilizados foram  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$  e  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  ISOTEC ou Aldrich.

A interpretação dos dados foi realizada com o auxílio de dados espectroscópicos de correlações bidimensionais como COSY 45, HMQC e HMBC e da técnica DEPT, onde  $\text{CH}_3$  apresenta sinal positivo no espectro de DEPT 135°, CH sinal positivo tanto no DEPT 135° quanto no DEPT 90°,  $\text{CH}_2$  sinal negativo no DEPT 135° e C não ligado a hidrogênio não apresenta sinal em nenhum dos dois espectros DEPT.

Para realização dos extratos foram utilizados solventes orgânicos previamente tratados (evaporação e/ou destilação) tais como: hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e butanol.

O perfil cromatográfico dos extratos obtidos da maceração e das frações foram construídos através de cromatografia em camada delgada (CCD).

Foram utilizadas as seguintes técnicas de fracionamento: cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

As cromatografias em coluna foram realizadas em colunas de vidro, utilizando sílica gel 60 [(0,063 – 0,200 mm), (70 – 230 mesh ASTM)] da Merck e Vetec; sílica para cromatografia flash [(0,035 – 0,070 mm), (220 – 440 mesh ASTM)] da Fluka e Sephadex LH-20 da Sigma como fases estacionárias. A quantidade de adsorvente, o diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido. Foram utilizados como fase móvel, solventes puros e/ou combinados em ordem crescente de polaridade e as frações

coletadas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo. Para acompanhamento da cromatografia em coluna utilizou-se CCD.

As placas para cromatografia analítica em camada delgada e cromatografia em camada delgada preparativa foram feitas utilizando-se sílica gel 60 GF<sub>254</sub> e 60 G (Fluka), suspensa em água destilada numa proporção de 1:2 e distribuída em camada de aproximadamente 0,25 mm e 1,00 mm de espessura sobre placas de vidro de 5,0 x 20,0 e 20,0 x 20,0 cm, respectivamente.

Para visualização dos compostos em CCD utilizou-se irradiação com luz ultravioleta a 254 e 366 nm, e pulverização com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH (1:1) ou de ácido acético/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/anisaldeído (revelador específico para terpenos) seguido de aquecimento em chapa.

Na avaliação da toxicidade com *Artemia salina* foi utilizada solução de água marinha (3,8 g de NaCl para cada litro de água), ovos do microcrustáceo (*Artemia salina*) adquiridos em uma loja de aquários local e um recipiente plástico, com dois compartimentos onde um deles se encontrava ao abrigo da luz que foi desenvolvido no próprio laboratório.

Para a avaliação da atividade moluscicida foram utilizados caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, e DMSO utilizado na solubilização das amostras a serem testadas.

Na avaliação da atividade antibacteriana utilizou-se meio Ágar Mueller-Hinton, cepas das bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 e *Bacillus subtilis* ATCC-6623 e Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC-23110 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853; suspensão padrão de sulfato de bário (0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário; 99,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% (v/v); estufa de cultura FANEM, modelo 002CB e autoclave FABBE, modelo 103. Na avaliação da atividade antifúngica utilizou-se meio Ágar Sabourand, e fungos *Candida albicans* ATCC-10231, *Candida parapsilosis* ATCC-22019 e *Candida tropicalis* ATCC-28707.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de seqüestro do radical livre DPPH\* (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). As leituras de absorbância foram realizadas a 515,5 nm em um espectrofotômetro UV/VIS, marca VARIAN modelo CARY 50 Conc. Para solubilização das amostras foi utilizado metanol de alta pureza e como padrão o BHT (butilhidroxitolueno).

Para avaliação da atividade antiinflamatória o modelo utilizado foi o de indução de pleurisia em rato. Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar pesando de 180 a 220 gramas. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada a 22°C e ciclo claro/escuro de

12 horas, com água e ração à vontade. Foi mantido um jejum de 18 horas antecedentes à pleurisia, utilizando-se como agente irritante a carragenina.

### **3.2. Preparação dos extratos e avaliação de atividades biológicas da espécie vegetal *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)**

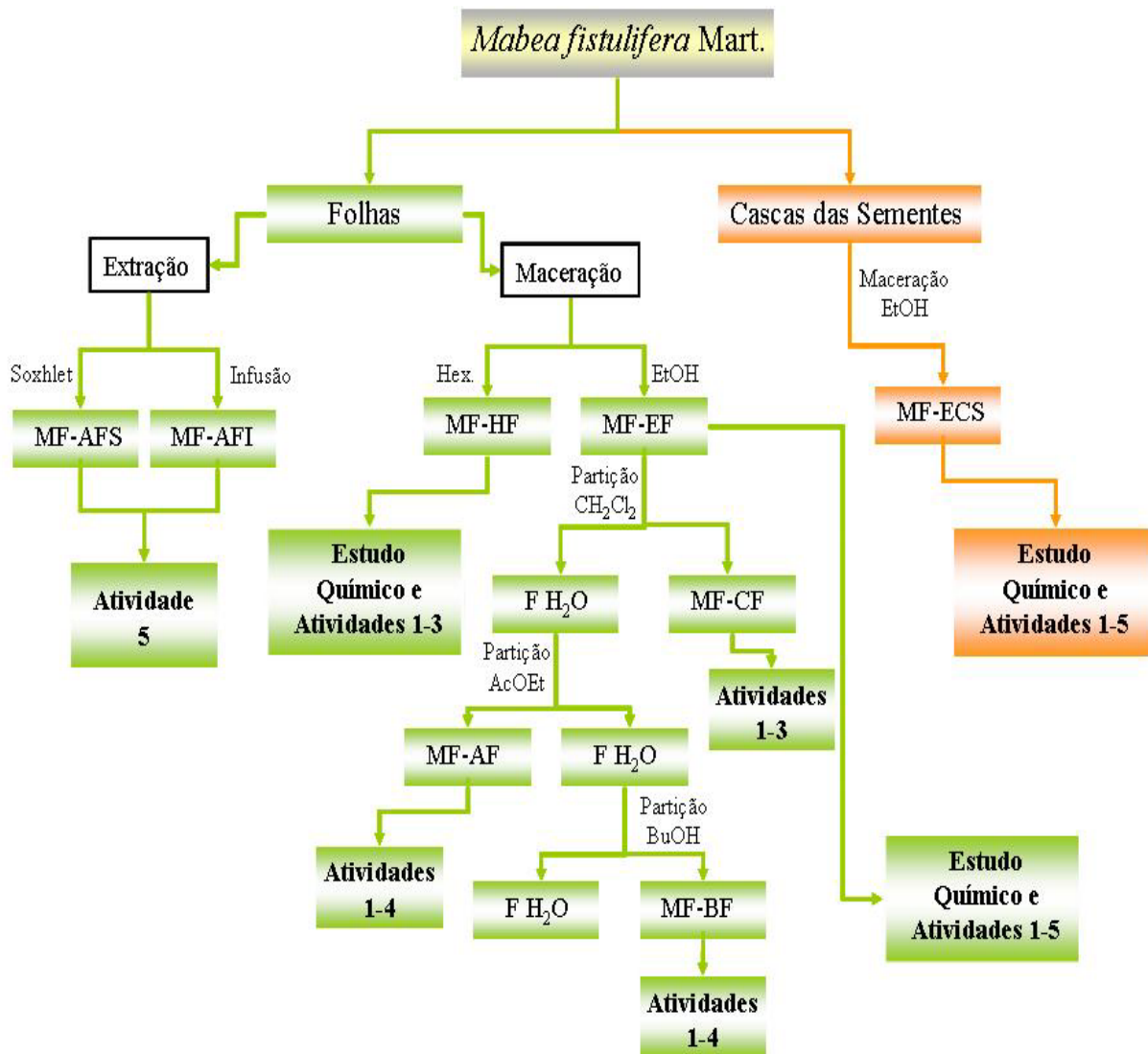
#### **3.2.1. Coleta e secagem da espécie vegetal**

A espécie vegetal *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae) foi coletada na cidade de Quatá-SP.

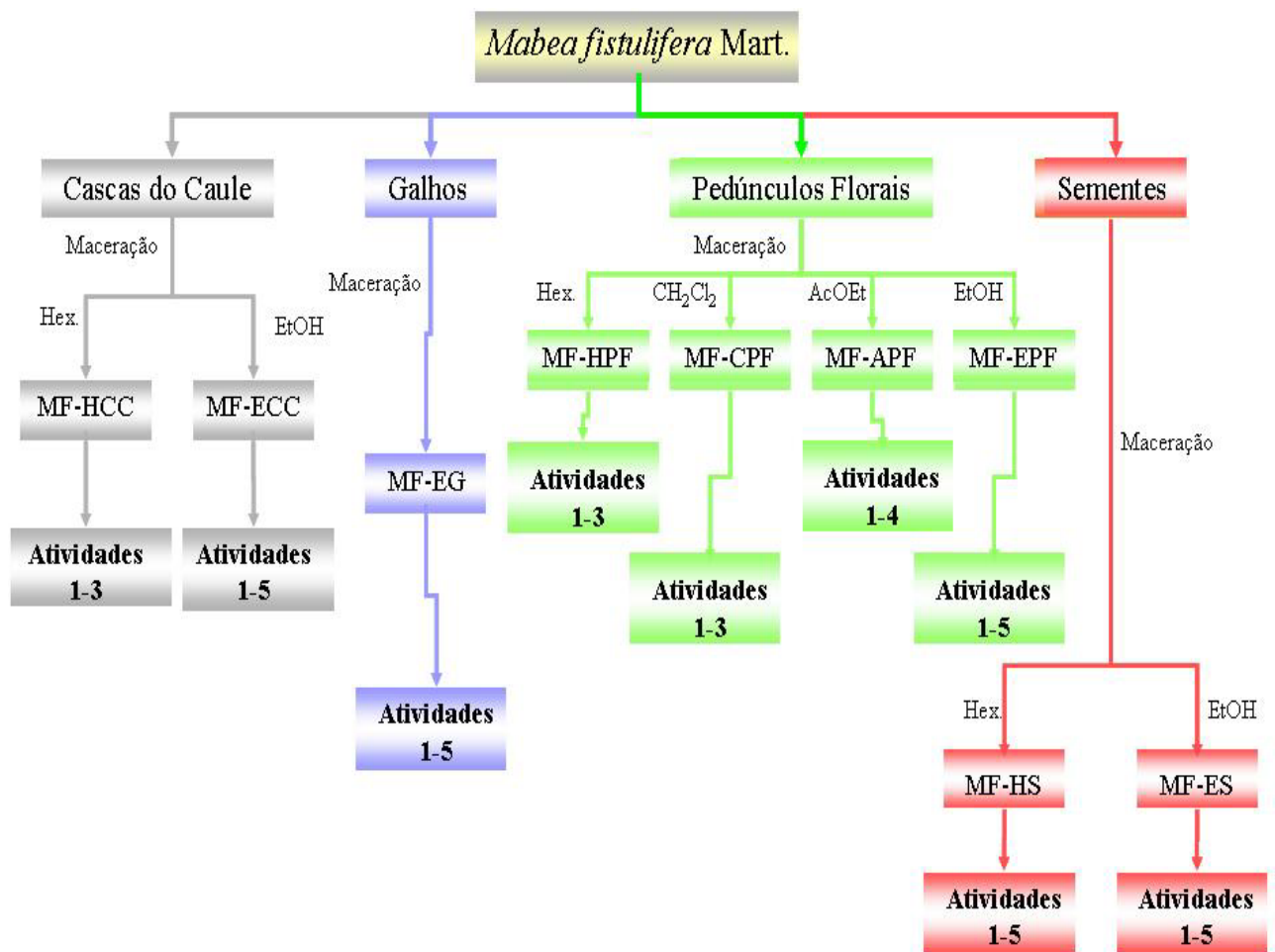
A identificação da espécie foi realizada pelo professor da UNOESTE Edson Bucchi e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá - HUM, sob registro nº 12.112.

As diferentes partes da planta foram secas em estufa de ar circulante a 35 °C e moídas em moinho de facas. Após a extração os extratos foram evaporados em evaporador rotativo e liofilizados. Por meio dos Esquema 1 e Esquema 2 pode-se ter uma visão geral da preparação dos extratos e das avaliações das atividades realizadas nas diferentes partes da planta.

A relação da coleta das diferentes partes da planta, assim como os extratos obtidos, seus respectivos códigos e massas estão apresentados na Tabela 1.



**Esquema 1:** Procedimento empregado para obtenção dos extratos das folhas (---) e das cascas das sementes (---) e atividades realizadas: 1- Toxicidade com *Artemia salina*; 2- Atividade moluscicida; 3-Atividade antimicrobiana; 4- Atividade antioxidante e 5- Atividade antiinflamatória.



**Esquema 2:** Procedimento empregado para obtenção dos extratos da casca do caule (---), galhos (---), pedúnculos florais (---) e sementes (---) e atividades realizadas: 1- Toxicidade com *Artemia salina*; 2- Atividade moluscicida; 3-Atividade antimicrobiana; 4- Atividade antioxidante e 5- Atividade antiinflamatória.

**Tabela 1:** Relação da coleta das diferentes partes da planta e dos extratos obtidos.

Partes da Planta	Data da Coleta	Massa da planta seca e moída (g)	Extratos	Massa do extrato (g) (Código)
Folhas	06/2004	750,0	Hexânico	26,1 (MF-HF)
			Etanólico	142,3 (MF-EF)
			Aquoso (Infusão)	3,1 (MF-AFI)
			Aquoso (Soxhlet)	2,7 (MF-AFS)
Casca do caule	04/2005	944,5	Hexânico	4,2 (MF-HCC)
			Etanólico	189,4 (MF-ECC)
Sementes	04/2005	223,5	Hexânico	92,3 (MF-HS)
			Etanólico	6,4 (MF-ES)
Pedúnculos florais	06/2005	405,5	Hexânico	7,4 (MF-HPF)
			Diclorometânico	2,7 (MF-CPF)
			Acetato de etila	12,1 (MF-APF)
			Etanólico	110,9 (MF-EPF)
Casca da semente	04/2005	1.162,9	Etanólico	93,6 (MF-ECS)
Galhos	04/2005	149,2	Etanólico	20,29 (MF-EG)

### 3.2.2. Avaliação das atividades biológicas

O ensaio de avaliação de atividade antimicrobiana foi realizado pelo laboratório de Microbiologia aplicado a Produtos Naturais e Sintéticos no departamento de Análises Clínicas – UEM sob orientação do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, aplicando-se o teste de susceptibilidade antibacteriana/antifúngica para determinação da concentração mínima inibitória e bactericida/fungicida.

A avaliação da atividade moluscicida foi realizada sob coordenação da Professora Dra. Maria Lucília Motinha Zamuner do departamento de Farmácia e Farmacognosia – UEM.

A avaliação da atividade antiinflamatória foi realizada no Departamento de Farmácia e Farmacognosia – UEM sob coordenação da Professora Dra. Ciomar A. Bersani Amado.

### 3.2.2.1. Teste de toxicidade com *Artemia salina*

Os ovos de camarão, *Artemia salina* foram adquiridos em uma loja de aquários local. A água marinha utilizada para o cultivo foi feita utilizando-se 3,8 g de sal marinho para cada litro de água conforme descrito pela literatura<sup>54</sup>.

Os ovos de *Artemia* foram eclodidos em um aquário oval montado no laboratório utilizando-se água do mar artificial (3,8 g de NaCl para 1000 mL de água). O aquário foi construído com uma divisão interna contendo vários orifícios, produzindo dois compartimentos de mesmo tamanho. Os ovos foram colocados no compartimento previamente escurecido. O outro compartimento foi extremamente iluminado, de modo a atrair os camarões para este compartimento após eclosão, através de fototropismo. Os ovos foram incubados durante 48 horas em temperatura ambiente. O procedimento descrito anteriormente está ilustrado na Figura 3.

As amostras foram preparadas nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 ppm. O solvente foi evaporado e o volume de cada frasco completado para 5 ml com água marinha. Quando necessário até 5 µl de DMSO foi adicionado à 5 ml de amostra sem que este fosse tóxico para os camarões. Todas as amostras inclusive o controle foram realizados em triplicata. Após 48 horas 10-15 camarões foram transferidos para cada frasco. As amostras, bem como os controles ficaram por mais 24 horas sob iluminação à temperatura ambiente, e após este período os sobreviventes foram contados com auxílio de uma lupa.



**Figura 3:** Materiais utilizados no laboratório de fitoquímica para realização do teste de toxicidade com *Artemia salina*.



### **3.2.2.2. Teste de susceptibilidade antibacteriana/antifúngica pelo método da microdiluição**

A CMI (concentração mínima inibitória/concentração bacteriostática ou concentração fungistática) é a menor concentração de uma droga em  $\mu\text{g/mL}$  que inibe o crescimento de microrganismos. No teste de susceptibilidade, a CMI é determinada pela ausência de crescimento de microrganismos na menor concentração da droga-teste. A concentração mínima tanto fungicida (CMF) ou bactericida (CMB) é a menor concentração da droga que mata 99,9% do fungo ou bactéria teste. A CMF ou CMB é determinada pela subcultura do poço (well) “sem crescimento” do teste de determinação do CMI em placa de Petri contendo o meio Agar Sabourand para o teste fungicida e Mueller-Hinton para o bactericida.

O potencial de atividade antibacteriana e antifúngica das amostras e dos antibióticos de referência foi estabelecido de acordo com a concentração mínima inibitória (CMI): CMI  $>500 \mu\text{g/mL}$  (inativa); CMI 250 à 125  $\mu\text{g/mL}$  (moderadamente ativa); CMI 62,5 à 31,2  $\mu\text{g/mL}$  (ativa); CMI 15,6  $\mu\text{g/mL}$  (mais ativa); CMI 7,8  $\mu\text{g/mL}$  (fortemente ativa).

O teste foi realizado com os extratos MF-HF, MF-EF, MF-EG, MF-HS, MF-ES, MF-HCC, MF-ECC, MF-ECS, MF-HPF, MF-CPF e MF-APF e com as frações MF-CF, MF-AF e MF-BF.

#### **3.2.2.2.1. Teste de susceptibilidade antibacteriana**

As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6623, *Escherichia coli* ATCC 23110 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e os antibacterianos penicilina, vancomicina e tetraciclina como padrões de referência para os extratos e frações citados anteriormente.

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados, aplicando-se o teste de susceptibilidade pelo método de microdiluição<sup>55</sup> para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) da amostra e dos antibióticos de referência usando meio Mueller-Hinton segundo normas descritas pelo NCCLS.

A solução estoque da amostra (20 mg) dissolvida em DMSO (1 mL) foi diluída repetidamente em meio Mueller-Hinton, obtendo-se uma série de concentrações na ordem de 1000  $\mu\text{g}$  para 10  $\mu\text{g/mL}$ . O inóculo bacteriano foi preparado com o mesmo meio e a densidade ajustada por comparação ao tubo nº 0,5 da escala Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), e em

seguida diluída 1:100 no mesmo meio. Aliquotas de 5 µL da suspensão de bactérias foram adicionadas a cada poço da placa de microdiluição contendo 100 µL das diluições decimais da amostra ou de antibióticos de referência. Foram utilizados também como controle, meio não inoculados (controle de esterilidade) e meio sem droga (controle negativo). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

#### **3.2.2.2.2. Teste de susceptibilidade antifúngica**

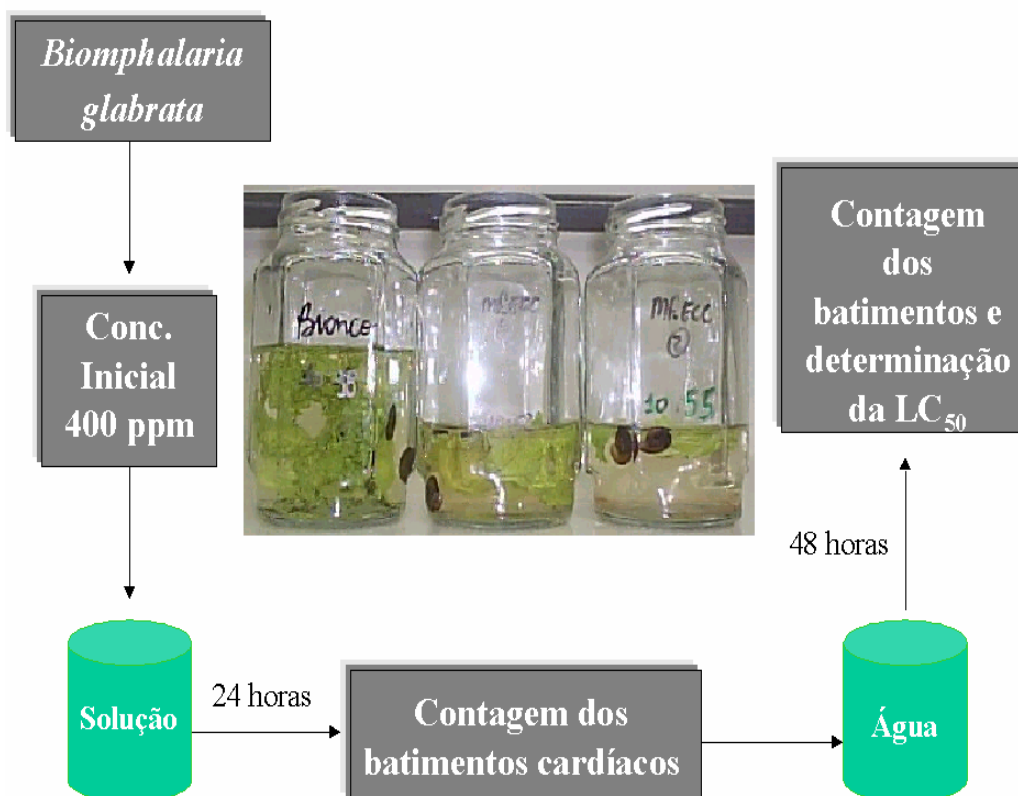
O teste foi realizado com os extratos e frações citadas anteriormente utilizando leveduras *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 28707 e como antifúngico padrão utilizou-se a nistatina.

Para a padronização do inóculo do fungo leveduriforme foram utilizadas 5 colônias de uma cultura de levedura Agar Sabourand, em 5 mL de solução salina estéril, e comparadas com o tubo 0,5 da escala Mc Farland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL). A suspensão do fungo leveduriforme foi diluída 1:100 em água destilada (4,95 mL de água destilada + 50 µL da suspensão). Em seguida 2 mL dessa suspensão foram adicionados em 38 mL de meio RPMI-1640 (diluição 1:20).

Para a determinação da concentração mínima inibitória (método de esterilidade), um volume de 0,9 mL da suspensão do fungo diluída em RPMI-1640 1:20 foi transferido para tubos (12 x 75 mm) estéreis numerados de 1 a 13. No tubo 13 (controle de crescimento em DMSO) foi colocado 100 µL de DMSO 80 a 1%. Nos tubos 1 a 11 foram adicionados 100 µL do extrato a ser testado diluído seriadamente. Os tubos foram incubados à temperatura de 37 °C por 24 horas.

#### **3.2.2.3. Atividade moluscicida**

O Esquema 3 mostra uma visão geral do procedimento utilizado para a avaliação da atividade moluscicida, conforme procedimento descrito por HOSTETTMANN<sup>46</sup>. Na seqüência será feita a descrição da metodologia utilizada.



**Esquema 3:** Procedimento utilizado para avaliação da atividade moluscicida da espécie *Mabea fistulifera* Mart.

O teste foi realizado com caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do parasita *Shistosoma mansoni*, causador da esquistossomose.

O bioensaio consiste basicamente na imersão do caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* na solução da amostra a ser testada.

O ensaio *in vivo* para avaliação da atividade moluscicida realizado no presente estudo testou os extratos: MF-HF, MF-EF, MF-EG, MF-ECS, MF-ECC, MF-HS, MF-ES, MF-HPF, MF-CPF, MF-APF e MF-EPF e as frações MF-CF, MF-AF e MF-BF.

Os extratos totais e as frações foram testados inicialmente na concentração de 400 ppm. Sendo confirmada a atividade nesta concentração a mesma foi reduzida até a obtenção da LC<sub>50</sub>.

Para cada caramujo foi utilizada a quantidade de 50 mL de solução. As amostras (40 mg cada) foram dissolvidas em até 0,2 mL de DMSO, sendo este o volume máximo de DMSO que pode ser utilizado sem interferir no teste. Após a solubilização da amostra em DMSO estas foram diluídas para 100 mL de água do aquário, onde estavam mantidos os

caramujos. O material foi dividido em dois béqueres (50 mL de solução cada), e em cada um deles foram colocados dois caramujos viáveis, ou seja, com batimentos cardíacos e tamanhos apropriados. Após 24 horas de permanência dos caramujos em solução, os batimentos cardíacos foram observados com auxílio de um estereomicroscópio, e foram transferidos para um béquer contendo a mesma quantidade de água (50 mL) onde permaneceram por mais 24 horas. Após as 48 horas (tempo total do teste) novamente foram avaliados os batimentos cardíacos. O teste foi considerado positivo quando os caramujos morreram. O branco (controle) foi realizado nas mesmas condições sem adição da amostra, porém foram utilizados quatro caramujos.

#### **3.2.2.4. Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos brutos, MF-EF, MF-EG, MF-ECS, MF-ECC, MF-ES, MF-APF e MF-EPF e das frações MF-AF e MF-BF foi efetuada através do método de seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>)<sup>56</sup>.

Inicialmente foi feita uma solução dos extratos totais e frações na concentração de 2 mg/mL em metanol de alta pureza. Em seguida diferentes volumes em µL da solução inicial foram adicionados em 2 mL da solução de DPPH<sup>•</sup> preparada a partir de 0,0047 g de DPPH<sup>•</sup> em 75 mL de MeOH.

A triagem foi então realizada em diferentes concentrações dos extratos totais e frações até a obtenção da IC<sub>50</sub>. As concentrações foram corrigidas para o volume final, após adição dos diferentes volumes da amostra aos 2 mL de solução de DPPH<sup>•</sup>. Cada concentração foi realizada em triplicata. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 30 min. Em seguida procedeu-se a leitura em espectrofotômetro UV/VIS a 515,5 nm.

A medida do branco foi realizada utilizando-se apenas a solução de DPPH<sup>•</sup> preparada anteriormente sem adição de extrato.

O padrão utilizado foi o butilhidroxitolueno (BHT) preparado nas mesmas concentrações feitas para as amostras testadas.

A atividade anti-radicalar (RSA – radical scavenging activity) foi calculada como uma porcentagem de descoloração do radical DPPH<sup>•</sup>, através da equação:

$$\% I = [(A_0 - A_{am})/A_0] \times 100$$

Onde:

$A_0$  = Absorbância da solução de DPPH\*.

$A_{am}$  = Absorbância da solução quando um extrato ou fração foi adicionado em determinada concentração.

Os resultados foram expressos em IC<sub>50</sub>, que representa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH\*. Esses cálculos foram realizados através da regressão linear utilizando-se o programa computacional ORIGIN 7.0<sup>®</sup>.

### **3.2.2.5. Teste de atividade antiinflamatória por indução de pleurisia em rato**

O protocolo para o experimento realizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Universidade Estadual de Maringá - UEM.

Os experimentos foram realizados utilizando ratos machos da linhagem Wistar pesando de 180 a 220 g. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada a 22 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração à vontade.

Os ratos foram mantidos sem alimentação por um período de 18 horas antecedentes à pleurisia.

A pleurisia foi induzida pela injeção de 0,25 mL de uma suspensão de carragenina (200 µg) na cavidade intrapleurial, na região do mediastino direito, entre a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> costelas, 30 minutos após a administração por via oral (gavagem) da droga (extrato) de acordo com a técnica descrita por Vinegar et al<sup>57</sup>.

A carragenina foi diluída em salina tamponada com fosfato (PBS – pH 7,4). Na 4<sup>a</sup> hora após a indução da pleurisia, os animais foram anestesiados utilizando-se éter etílico P. A. e sacrificados para a coleta do exsudato inflamatório intrapleurial.

O material coletado por aspiração foi transferido para tubos cônicos de centrífuga. O volume total do exsudato foi medido e uma alíquota de 50 µL usada para determinar o número de leucócitos em câmara de Neubauer. O procedimento empregado no teste de pleurisia em rato se encontra ilustrado na Figura 4.

Grupos de animais controles receberam o veículo (água ou DMSO 16%) por via oral (gavagem), trinta minutos antes da indução da pleurisia.



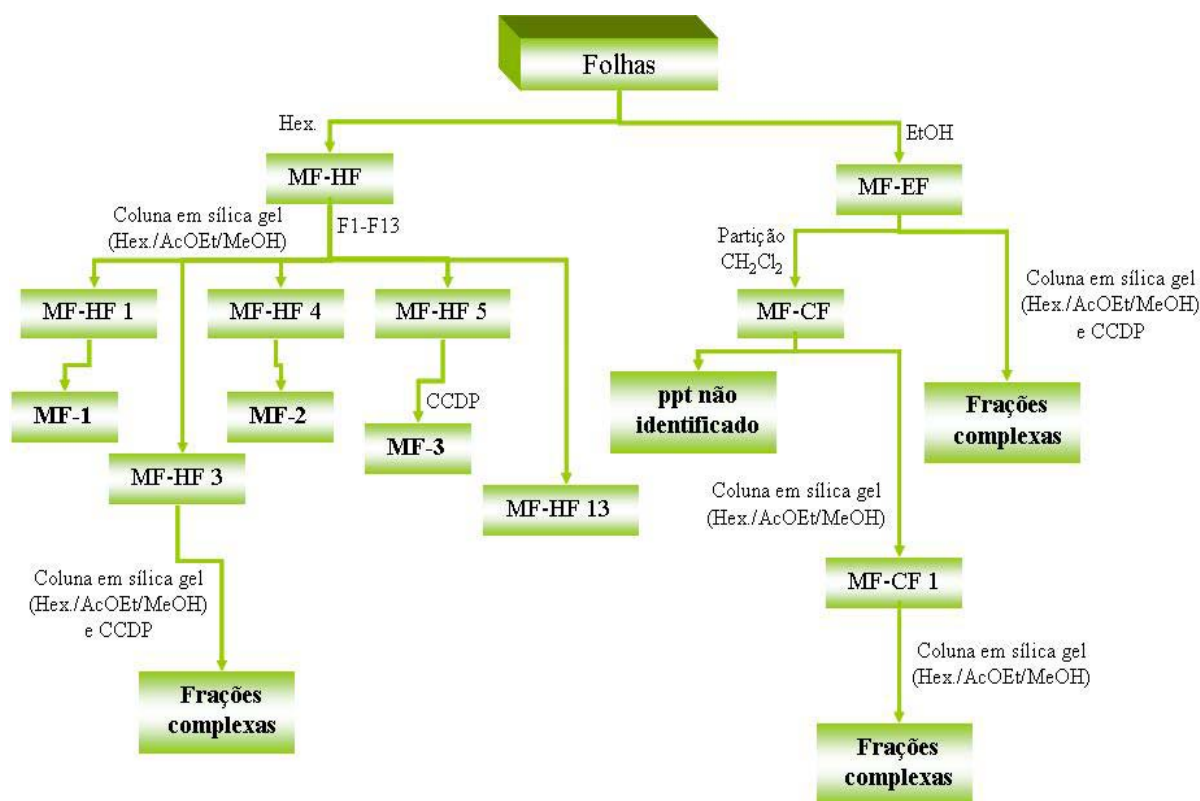
**Figura 4:** Método de pleurisia em rato na determinação de atividade antiinflamatória.

### 3.3. Estudo químico

#### 3.3.1. Estudo das folhas

O estudo fitoquímico da espécie *Mabea fistulifera* Mart. foi realizado inicialmente com as folhas, pois este material foi o primeiro a ser coletado.

O Esquema 4 mostra uma visão geral do procedimento empregado no isolamento das substâncias das folhas de *Mabea fistulifera* Mart.



**Esquema 4:** Procedimento empregado para o isolamento dos constituintes das folhas de *Mabea fistulifera* Mart.

### 3.3.1.1. Fracionamento do extrato hexânico bruto das folhas/Isolamento das substâncias MF-1 e MF-2

Parte do extrato hexânico total MF-HF (8,0 g) foi adsorvido em 16,0 g de sílica gel e submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica ( $\phi = 5,5$  cm; 150,0 g sílica gel). Foram utilizados como eluentes: hexano como eluente de empacotamento, misturas de hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol em ordem crescente de polaridade. Após obtenção das frações, estas foram reunidas baseando-se na análise em CCD (Tabela 2).

A fração MF-HF 3 foi recromatografada em coluna de sílica gel e algumas de suas frações submetidas à CCDP, porém devido à complexidade das frações e a baixa quantidade de massa obtida não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

**Tabela 2:** Dados do fracionamento do extrato hexânico total da folhas (MF-HF) por coluna cromatográfica.

Eluente utilizado	Código das frações	Massa das frações (g)
Hexano	MF-HF 1	0,2390
Hexano/AcOEt 1%	MF-HF 2	-----
Hexano/AcOEt 5%	MF-HF 3	3,6080
Hexano/AcOEt 10%	MF-HF 4	1,1400
Hexano/AcOEt 25% (I)	MF-HF 5	0,1630
Hexano/AcOEt 25% (II)	MF-HF 6	1,8000
Hexano/AcOEt 50%	MF-HF 7	0,5150
Hexano/AcOEt 80%	MF-HF 8	0,4400
AcOEt	MF-HF 9	0,0570
ACOEt/MeOH 2%	MF-HF 10	0,0240
ACOEt/MeOH 10%	MF-HF 11	0,0240
ACOEt/MeOH 50%	MF-HF 12	0,2750
MeOH	MF-HF 13	0,0050

\* Recuperou-se 97 % do material inicial.

Após análise em CCD pode-se verificar que a fração MF-HF 1 estava pura como cristais brancos em formato de agulhas sendo esta denominada por **MF-1** (239 mg).

Após a evaporação do solvente da fração MF-HF 4 houve a formação de um pó branco, este foi então denominada por **MF-2** (1,14 g).

A fração MF-HF 5 apresentou fortes manchas rosa e marrom quando cromatografada em CCD e revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguida de aquecimento, sendo assim esta fração foi selecionada para estudo.

#### **3.3.1.1.1. Estudo da fração MF-HF 5/Isolamento da substância MF-3**

A fração MF-HF 5 foi submetida a uma CCDP em sílica gel (hexano/acetato de etila 30%), fornecendo a mistura **MF-3** (12,4 mg) na forma de cristais do tipo agulha após dessorção da faixa com fluorescência sob irradiação com luz UV a 365 nm. Esta substância quando revelada com revelador de terpenos ácido acético/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/anisaldeído apresentou uma forte mancha cor rosa escura característica de terpenos.



### **3.3.1.2. Partição do extrato etanólico total das folhas**

Parte do extrato etanólico (10,0 g) foi solubilizado em água e submetido à partição com diferentes solventes. A partir deste procedimento foram obtidas as seguintes frações: diclorometânica (MF-CF-1,0 g), acetato de etila (MF-AF-2,3 g) e butanólica (MF-BF-2,5 g).

O Esquema 1 mostra uma visão geral do procedimento empregado na partição por solvente do extrato etanólico.

Durante a partição do extrato etanólico com diclorometano houve o aparecimento de um precipitado pardo na forma de um pó, porém este não foi identificado.

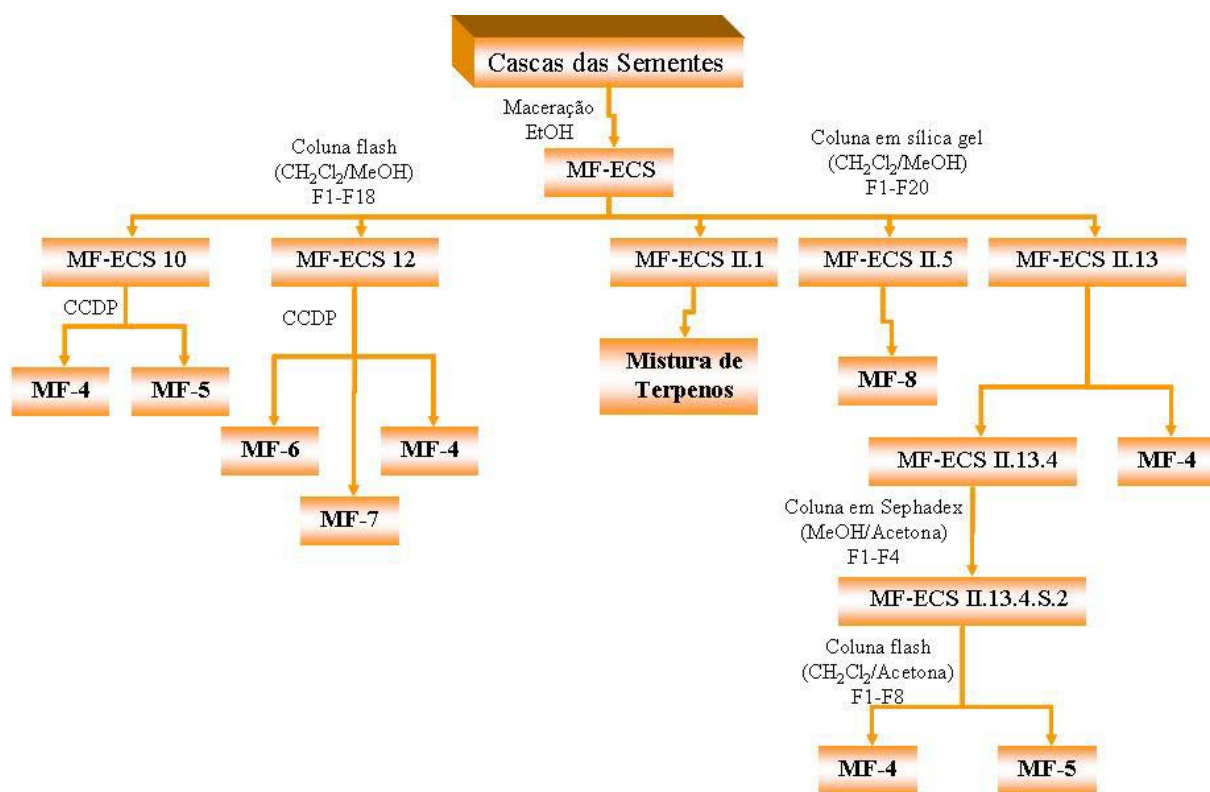
Os extratos MF-EF e a fração MF-CF foram submetidos à coluna (ver procedimento Esquema 1) em sílica gel e algumas de suas frações foram submetidas à CCDP, porém devido a grande quantidade de clorofila e complexidade das frações, assim como a baixa quantidade de massa não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

As frações MF-AF e MF-BF não foram estudadas quimicamente. A fração aquosa foi descartada.

### **3.3.2. Estudo das cascas das sementes**

Por meio do perfil cromatográfico obtido para os diferentes extratos da planta, pode-se selecionar o extrato das cascas das sementes para estudo fitoquímico devido a menor complexidade quando comparado aos demais e à presença de flavonóides, substâncias com reconhecida atividade antioxidante.

Através do Esquema 5 têm-se uma visão geral dos procedimentos empregados para o isolamento das substâncias do extrato etanólico das cascas das sementes.



**Esquema 5:** Procedimento empregado para o isolamento dos constituintes das cascas das sementes de *Mabea fistulifera* Mart.

### 3.3.2.1. Fracionamento do extrato etanólico total das cascas das sementes I

A amostra do extrato etanólico total das cascas das sementes (2,5 g) foi adsorvida em 3,0 g de sílica gel e em seguida submetida ao fracionamento por cromatografia “flash” ( $\phi = 2,5$  cm; 30,0 g, sílica para cromatografia “flash” - 0,035 à 0,070 mm). Foram utilizados como eluentes: diclorometano como eluente de empacotamento e misturas de diclorometano/metanol em ordem crescente de polaridade como pode ser observado na Tabela 3. Foram coletadas 204 frações de aproximadamente 20 mL cada.

**Tabela 3:** Dados do fracionamento do extrato etanólico total das cascas das sementes (MF-ECS) por coluna cromatográfica.

Eluente utilizado	Frações coletadas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-45
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 3%	46-84
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%	85-109
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 8%	110-128
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 15%	129-143
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 20%	144-148
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 30%	149-158
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 40%	159-165
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 50%	166-179
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 80%	180-193
MeOH	194-204

Todas as frações foram submetidas à CCD e reunidas conforme apresentado na Tabela 4, porém a fração denominada por MF-ECS 10 (122,9 mg) eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 5 % chamou a atenção pelo fato de apresentar um precipitado branco na forma de cristal solúvel em acetona, com uma massa considerável (50,0 mg), este precipitado foi lavado com diclorometano e quando submetido a CCD apresentou duas fluorescências amarelas sob irradiação na luz UV a 365 nm. Esta fração quando revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguido por aquecimento apresentou duas manchas fortes de cor amarela característica de flavonóides.

A fração MF-ECS 12 eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15 % (123,7 mg) quando submetida a CCD apresentou várias manchas de coloração amarela intensa sob luz UV a 365 nm e quando revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguida por aquecimento surgiu uma coloração amarela. Devido a estas características estas frações foram selecionadas para estudo.

**Tabela 4:** Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS.

Frações reunidas	Código das frações	Massa das frações (mg)
1-4	MF-ECS 1	0,0122
5-6	MF-ECS 2	0,0032
7-10	MF-ECS 3	0,0060
13-16	MF-ECS 4	0,0112
17-26	MF-ECS 5	0,0323
27-34	MF-ECS 6	0,0078
35-52	MF-ECS 7	0,0044
53-59	MF-ECS 8	0,0702
60-90	MF-ECS 9	0,1030
91-102	MF-ECS 10	0,1229
103-134	MF-ECS 11	0,7562
135-137	MF-ECS 12	0,1237
138-142	MF-ECS 13	0,0958
143-151	MF-ECS 14	0,2835
152-161	MF-ECS 15	0,3130
162-180	MF-ECS 16	0,0741
181-190	MF-ECS 17	0,1305
191-201	MF-ECS 18	0,0986

\* Recuperou-se 89,9 % do material inicial.

#### 3.3.2.1.1. Estudo da fração MF-ECS 10/Isolamento das substâncias MF-4 e MF-5

O precipitado da fração MF-ECS 10 foi submetido a uma CCDP ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10%), onde pode-se visualizar duas faixas com fluorescência amarela sob irradiação na luz UV a 365 nm. A dessorção dessas faixas forneceu as substâncias denominadas por **MF-4** (14,7 mg) e **MF-5** (7,6 mg). Estas substâncias quando reveladas com  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$  seguido por aquecimento apresentaram uma mancha forte de cor amarela característica de flavonóides.

### **3.3.2.1.2. Estudo da fração MF-ECS 12/Isolamento das substâncias MF-6, MF-7 e MF-4**

A fração MF-ECS 12 foi submetida a uma CCDP (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 20%), na qual pode-se visualizar quatro fluorescências sob luz UV a 365 nm. Uma das faixas com fluorescência azul e as demais com fluorescência amarela. A faixa de fluorescência azul não estava pura, portanto não pode ser identificada. As demais faixas após a dessorção e análise em CCD apresentaram após revelação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguido por aquecimento manchas amarelas. Este procedimento levou ao isolamento de duas substâncias que ainda não haviam sido isoladas no presente estudo e que foram denominadas por **MF-6** (2,6 mg) e **MF-7** (37,9 mg) e de uma terceira substância que por comparação com os Rfs das substâncias anteriormente isoladas foi novamente denominada por **MF-4** (8,7 mg).

### **3.3.2.2. Fracionamento do extrato etanólico total das cascas das sementes II/Isolamento da substância MF-8**

Uma nova coluna cromatográfica do extrato etanólico total foi realizada com maior quantidade de massa no intuito de isolar novas substâncias das frações que não puderam ser anteriormente estudadas por falta de massa.

Parte do extrato total das cascas das sementes (10 g) foi adsorvido em 16 g de sílica gel e em seguida submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica ( $\phi = 4,50$  cm; 91 g sílica gel). Foram utilizados como eluentes: diclorometano como eluente de empacotamento e misturas de diclorometano/metanol em ordem crescente de polaridade como mostra a Tabela 5.

Após obtenção das frações, estas foram reunidas baseando-se na análise em CCD como demonstrado na Tabela 6.

Algumas das frações chamaram a atenção pelo seu perfil cromatográfico e por não se mostrarem tão complexas. Algumas frações pela análise em CCD apresentaram apenas uma mancha, por esta razão estas frações foram submetidas a análises espectroscópicas.

**Tabela 5:** Dados do fracionamento do extrato etanólico total da cascas das sementes II (MF-ECS II) por coluna cromatográfica.

Eluente utilizado	Frações coletadas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-76
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 3%	77-116
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%	117-125
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 8%	126-149
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10%	150-158
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 15%	159-187
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 25%	188-196
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 50%	197-219
MeOH	220-242

A fração denominada por MF-ECS II.1 eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> apresentou mancha de coloração rosa escuro característica de terpenos quando submetida à análise em CCD e revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguida por aquecimento. Após análises espectroscópicas verificou-se que se tratava de uma mistura de terpenos a qual não foi posteriormente purificada devido à baixa quantidade de massa.

A fração denominada por MF-ECS II.5 eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> assim como a fração MF-ECS II.1 apresentou uma mancha de forte coloração rosa característica de terpenos quando revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguida por aquecimento. Esta substância foi denominada por **MF-8** (32,2 mg) e submetida a análises espectroscópicas.

A fração que apresentou manchas de coloração amarela característica de flavonóides chamou a atenção por seu perfil cromatográfico e pela quantidade de massa (1,460 g) sendo esta a fração denominada por MF-ECS II.13, sendo assim esta foi recromatografada.

**Tabela 6:** Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.

Frações reunidas	Código das frações	Massa das frações (g)
1-9	MF-ECS II.1	0,0207
10-16	MF-ECS II.2	0,0695
17-27	MF-ECS II.3	0,0215
28-29; 34-36	MF-ECS II.4	0,0326
30-33	MF-ECS II.5	0,0322
37-46	MF-ECS II.6	0,1823
47-59	MF-ECS II.7	0,1575
60-77	MF-ECS II.8	0,1148
78-116	MF-ECS II.9	0,0129
117-122	MF-ECS II.10	0,0147
123-132	MF-ECS II.11	0,9000
133-138	MF-ECS II.12	0,070
139-143	MF-ECS II.13	1,4600
144-149	MF-ECS II.14	0,1823
150-158	MF-ECS II.15	0,7263
159-187	MF-ECS II.16	0,0492
188-196	MF-ECS II.17	1,3400
197-219	MF-ECS II.18	3,8970
220-242	MF-ECS II.19	0,5802
243-251	MF-ECS II.20	0,0323

\* Recuperou-se 98,33 % do material inicial.

#### 3.3.2.2.1. Estudo da fração MF-ECS II.13/Isolamento da substância MF-4

A fração MF-ECS II.13 (1,3 g) foi submetida à cromatografia “flash” ( $\phi = 2,50$  cm; 36,5 g sílica para cromatografia “flash” - 0,035 à 0,070 mm). Foram utilizados como eluentes: diclorometano como eluente de empacotamento e misturas de diclorometano/metanol em ordem crescente de polaridade. Estes dados estão dispostos na Tabela 7.

**Tabela 7:** Dados do fracionamento da fração MF-ECS II.13 por coluna cromatográfica.

Eluente utilizado	Frações coletadas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1-69
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 2%	70-77
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 4%	78-109
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 5%	110-124
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 8%	125-149
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 10%	150-157
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 15%	158-170
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 20%	171-178
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 30%	179-185
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 50%	186-193
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /MeOH 80%	194-201
MeOH	202-209
MeOH/H <sub>2</sub> O 50%	210-222
H <sub>2</sub> O	223-242

As frações coletadas foram submetidas à análise em CCD e reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos como demonstrado na Tabela 8.

**Tabela 8:** Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.13.

Frações reunidas	Código das frações	Massa das frações (g)
1-97	MF-ECS II.13.1	0,0079
98-119	MF-ECS II.13.2	0,0092
120-135	MF-ECS II.13.3	0,0104
137-175	MF-ECS II.13.4	1,0980
145-175	MF-ECS II.13.5	0,0320
176-181	MF-ECS II.13.6	0,0285
182-204	MF-ECS II.13.7	0,0115
205-219	MF-ECS II.13.8	0,0162
220-226	MF-ECS II.13.9	0,0221
227-230	MF-ECS II.13.10	-----

\* Recuperou-se 95,06 % do material inicial.



A fração MF-ECS II.13.4 eluída em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8% foi selecionada para estudo por apresentar fluorescências amarelas sob luz UV a 365 nm e manchas amarelas quando submetida a CCD e revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguida por aquecimento e também por possuir uma considerável quantidade de massa. Esta fração foi recromatografada em Sephadex LH-20.

Houve a formação de um precipitado branco nos tubos 164 e 165 que foram eluídos em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 15% sendo este solúvel em acetona e seu R<sub>f</sub> comparado ao das demais substâncias isoladas, sendo assim a substância foi novamente denominada por **MF-4** (6,2 mg). O precipitado quando submetido à CCD e revelado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguido por aquecimento evidenciou mancha característica de flavonóide.

As demais frações não foram estudadas, pois seus perfis cromatográficos se mostraram complexos, além da baixa quantidade de massa.

#### 3.3.2.2.1.1. Estudo da fração MF-ECS II.13.4

A fração MF-ECS II.13.4 (1,1 g) foi cromatografada em coluna de Sephadex LH-20 ( $\phi = 2,5$  cm; 13,0 g). Foram utilizados como eluentes: metanol/acetona em ordem decrescente de polaridade como exposto na Tabela 9.

**Tabela 9:** Dados do fracionamento da fração MF-ECS II.13.4 por coluna cromatográfica em Sephadex LH-20.

Eluente utilizado	Frações coletadas
MeOH	1-53
MeOH/Acetona 10%	54-56
MeOH/Acetona 20%	57-60
MeOH/Acetona 50%	61-92
Acetona	93-102

As frações foram reunidas com base em seus perfis cromatográficos como demonstrado na Tabela 10.

**Tabela 10:** Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.13.4.

Frações reunidas	Código das frações	Massa das frações (mg)
1-10	MF-ECS II.13.4.S.1	0,0270
11-32	MF-ECS II.13.4.S.2	0,7000
33-41	MF-ECS II.13.4.S.3	0,035
42-102	MF-ECS II.13.4.S.4	0,040

\* Recuperou-se 72,91 % do material inicial.

A fração MF-ECS II.13.4.S.2 eluída em metanol evidenciou através de análise em CCD compostos com características de flavonóides, sendo assim esta fração foi submetida a análise tanto em CCDP como por cromatografia “flash”.

A fração MF-ECS II.13.4.S.3 eluída em metanol também evidenciou através da análise em CCD, perfil cromatográfico característico de flavonóides, porém devido a baixa quantidade de massa esta foi submetida apenas à análise em CCDP.

#### **3.3.2.2.1.1.1. Estudo da fração MF-ECS II.13.4.S.2/Isolamento das substâncias MF-4 e MF-5**

A fração MF-ECS II.13.4.S.2 (500,0 mg) foi submetida à cromatografia “flash” ( $\phi = 2,5$  cm; 36,5 g sílica para cromatografia “flash” - 0,035 à 0,070 mm). Foram utilizados como eluentes: diclorometano/acetona 40% como eluente de empacotamento e misturas destes solventes em ordem crescente de polaridade, sendo utilizados posteriormente misturas de acetona/metanol também em ordem crescente de polaridade. Estes dados estão dispostos na Tabela 11.

Após análise em CCD as frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos (Tabela 12).

Após análise em CCD da fração denominada por MF-ECS CS.2.1 eluída em diclorometano/acetona 40% pode-se observar que a mesma não estava pura e devido à baixa quantidade de massa esta não foi submetida a uma nova purificação.

A fração MF-ECS CS.2.3 eluída em diclorometano/acetona 40% evidenciou uma fluorescência amarela sob radiação UV a 365 nm. Quando submetida à CCD e revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguida por aquecimento houve o aparecimento de uma mancha amarela. Por

meio do procedimento realizado e comparação com os perfis cromatográficos das substâncias anteriormente isoladas, a substância foi caracterizada por **MF-4** (10,8 mg).

**Tabela 11:** Dados do fracionamento da fração MF-ECS II.13.4.S.2 por coluna cromatográfica.

Eluente utilizado	Frações reunidas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona 40%	1-75
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona 50%	76-93
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona 60%	94-101
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona 70%	102-109
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona 80%	110-118
Acetona	119-127
Acetona/MeOH 2%	128-135
Acetona/MeOH 5%	136-143
Acetona/MeOH 10%	144-162
Acetona/MeOH 30%	163-180
Acetona/MeOH 50%	181-198
MeOH	199-216

**Tabela 12:** Códigos e massas das frações reunidas da CC de MF-ECS II.13.4.S.2.

Frações reunidas	Código das frações	Massa das frações (mg)
1-3	MF-ECS CS.2.1	1,5
4	MF-ECS CS.2.2	24,4
5	MF-ECS CS.2.3	12,9
6-16	MF-ECS CS.2.4	159,3
17	MF-ECS CS.2.5	10,8
18-40	MF-ECS CS.2.6	102,2
41-81	MF-ECS CS.2.7	38,7
81-150	MF-ECS CS.2.8	20,1

\* Recuperou-se 73,98 % do material inicial.

A fração MF-ECS CS.2.5 eluída em diclorometano/acetona 40% quando exposta à luz UV a 365 nm apresentou fluorescência amarela. Quando submetida à CCD e revelada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguida por aquecimento houve o aparecimento de uma mancha amarela porém quando comparada com a fração MF-ECS CS.2.3 pode-se observar diferença de R<sub>f</sub>. Através da comparação do R<sub>f</sub> da substância isolada de MF-ECS CS.2.5 com as demais substâncias isoladas esta foi caracterizada como sendo novamente a substância **MF-5** (12,9 mg).

As demais frações obtidas pelo fracionamento de MF-ECS II.13.4.S.2 devido a baixa quantidade de massa e a presença de várias substâncias não foram submetidas a purificação.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Avaliação das atividades biológicas

#### 4.1.1. Avaliação da toxicidade com *Artemia salina*

O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado conforme procedimento descrito na literatura<sup>54</sup>. Através das porcentagens de mortalidade foi possível determinar a LC<sub>50</sub> para os extratos.

O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi realizado para os extratos: MF-HF, MF-EF, MF-EG, MF-ECS, MF-HCC, MF-ECC, MF-HS, MF-ES, MF-HPF, MF-CPF, MF-APF e MF-EPF e para as frações MF-CF, MF-AF e MF-BF.

Os extratos que apresentaram LC<sub>50</sub> >1000 ppm foram considerados inativos sendo que os extratos testados que mostraram toxicidade para *Artemia salina* estão dispostos na Tabela 13 assim como suas respectivas LC<sub>50</sub> e LC<sub>90</sub>.

**Tabela 13:** Dados de letalidade de *Artemia salina* dos extratos obtidos da espécie *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae) (LC<sub>50</sub> e LC<sub>90</sub> em µg/mL).

Extrato	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>
MF-EF	554	892
MF-CF	156	>1000
MF-BF	386	>1000
MF-EG	215	417
MF-ECS	150	239
MF-ECC	48	348
MF-ES	78	187
MF-EPF	114	230

Das quinze amostras testadas entre elas extratos hexânicos, etanólicos, diclorometânico e acetato de etila e as frações diclorometânica, acetato de etila e butanólica

das folhas apenas os extratos etanólicos das diferentes partes da planta e as frações diclorometânica e butanólica das folhas demonstraram atividade.

Essa atividade pode ser atribuída a compostos fenólicos presentes nas diferentes partes da planta sendo que o extrato mais ativo foi o extrato etanólico das cascas do caule (MF-ECC) com LC<sub>50</sub> de 48 µg/mL. O teste de atividade antioxidante realizado para o extrato MF-ECC foi um dos que deram resultado mais positivo indicando a presença de alta concentração dessa classe de compostos.

#### 4.1.2. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

Os microorganismos testados foram bactérias do tipo Gram positivas, tais como: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 23110 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os extratos foram também testados frente às leveduras *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

Através da Tabela 14 pode-se observar quais os extratos e frações que demonstraram atividade nas bactérias e leveduras testadas, sendo esta atividade considerada moderada (entre 125 e 500 µg/mL).

**Tabela 14:** Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica com as respectivas CMI e CMB para os extratos e frações que demonstraram atividade.

Bactérias/fungos	Extrato/fração	CMI (µg/mL)	CMB/CMF (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	MF-ECC	250	>1000
	MF-AF	250	500
	MF-BF	250	>1000
<i>B. subtilis</i>	MF-CPF	250	500
<i>C.parapsilosis</i>	MF-CF	250	>1000
<i>C. tropicalis</i>	MF-CF	125	>1000
	MF-AF	125	500
	MF-EF	250	>1000

Nenhum dos extratos testados mostrou atividade frente às bactérias Gram negativas e também frente à levedura *Candida albicans*.

#### 4.1.3. Avaliação da atividade moluscicida

O ensaio *in vivo* para a avaliação da atividade moluscicida realizado no presente estudo testou os extratos: MF-HF; MF-EF; MF-EG; MF-ECS; MF-ECC; MF-HS; MF-ES; MF-HPF; MF-CPF; MF-APF e MF-EPF e as frações; MF-CF; MF-AF e MF-BF. Estes foram testados inicialmente na concentração de 400 ppm, sendo esta concentração reduzida até a obtenção da LC<sub>50</sub>. Foram realizadas duplicatas para cada extrato contendo dois caramujos por amostra.

Dos extratos testados apenas os extratos MF-EPF, MF-ECC e as frações MF-BF e MF-AF demonstraram mortalidade dos caramujos com LC<sub>50</sub> = 300, 300-400, 400 e >400 ppm respectivamente após 48 h como evidenciado na Tabela 15.

**Tabela 15:** Avaliação da atividade moluscicida da espécie *Mabea fistulifera* Mart.

Concentração (ppm)	MF-AF		MF-BF		MF-ECC		MF-EPF	
	% mortalidade		% mortalidade		% mortalidade		% mortalidade	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
400	0	25	0	50	75	100	75	100
300	---	---	---	---	---	---	---	---

Apesar da mortalidade provocada pelos extratos citados anteriormente, são considerados ativos apenas extratos totais de plantas com concentração abaixo de 100 ppm<sup>58</sup>.

#### 4.1.4. Avaliação da atividade antioxidante

Existem várias metodologias para determinação da atividade antioxidante. O método do seqüestro do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) tem sido muito utilizado para avaliar a atividade de seqüestro de radicais livres de antioxidantes naturais.

A atividade antioxidante foi realizada utilizando o método citado anteriormente (DPPH•), o qual é um radical livre estável, que na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina<sup>59</sup>. Esta

redução pode ser acompanhada espectrofotometricamente a 515,5 nm, pela diminuição da absorbância, com simultânea mudança de coloração violeta escura original do radical livre para uma coloração amarela do produto reduzido, descorando à medida que a reação se processa (Figura 5). Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH• residual, mensurado após um período de tempo, corresponde inversamente à atividade antioxidante da substância analisada. A intensidade dessa mudança de coloração é proporcional à concentração da(s) substância(s) com potencial antioxidante presente(s), em conformidade com as leis de Lambert e Beer. Essa descoloração gradativa deve-se ao pareamento, também gradativo, dos elétrons de DPPH• disponíveis<sup>60</sup>.



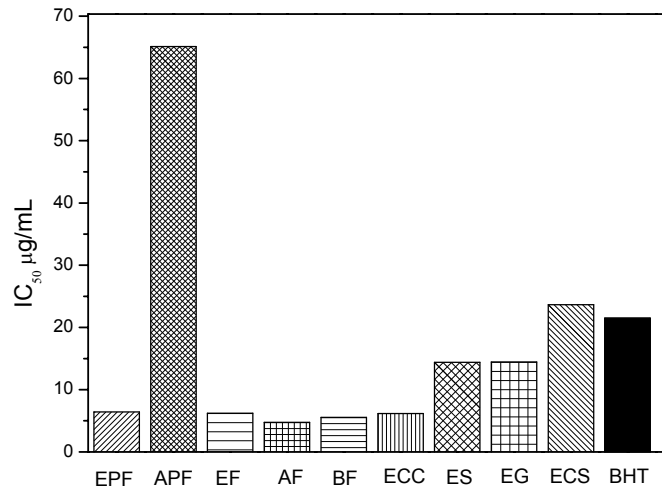
**Figura 5:** Descoramento da solução de DPPH• à medida que a reação se processa.

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos totais (MF-EF, MF-EG, MF-EPF, MF-APF MF-ES, MF-ECC e MF-ECS) e das frações (MF-AF e MF-BF) foi realizada pelo método do seqüestro do radical livre DPPH•, empregando-se o BHT como padrão de referência.

Na Figura 6 pode-se observar os valores de IC<sub>50</sub> dos extratos totais, frações e do padrão BHT.

Pode-se avaliar que os extratos etanólicos totais e as frações das folhas testadas da espécie *Mabea fistulifera* Mart. possuem atividade antioxidante consideráveis quando comparadas com BHT substância esta de reconhecida ação antioxidante, utilizada como conservante em diferentes produtos (alimentos, cosméticos, etc.). A amostra testada que apresentou melhor potencial antioxidante foi a fração acetato de etila das folhas (MF-AF).





**Figura 6:** Comparação entre valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) realizados pelo método do DPPH<sup>•</sup> (P<0,05).

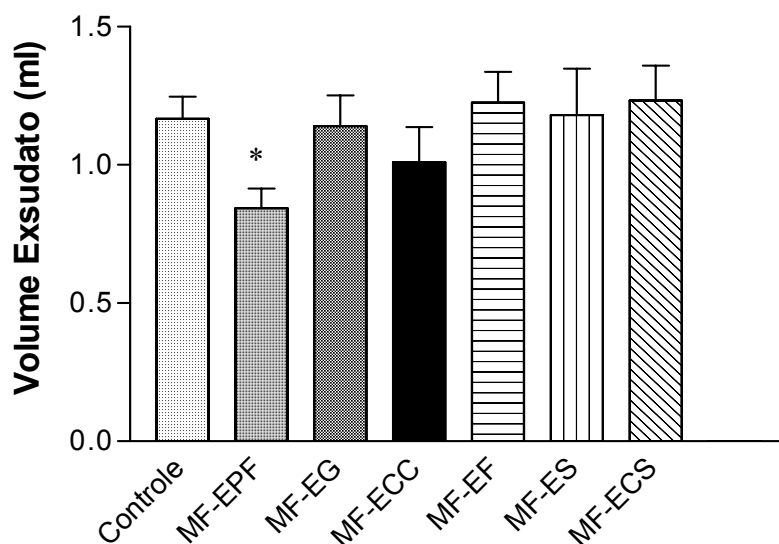
A ação antioxidante dos extratos testados pode ser atribuída à presença de substâncias fenólicas. A presença destas substâncias foi confirmada com o isolamento de quatro flavonóides do extrato etanólico das cascas das sementes. Para os demais extratos e frações a presença de flavonóides foi confirmada pela análise dos perfis cromatográficos, os quais demonstraram ao serem analisados por CCD e revelados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH seguido por aquecimento manchas amarelas que antes da revelação apresentavam fluorescência amarela sob luz UV a 365 nm características para estas substâncias.

#### 4.1.5. Avaliação da atividade antiinflamatória

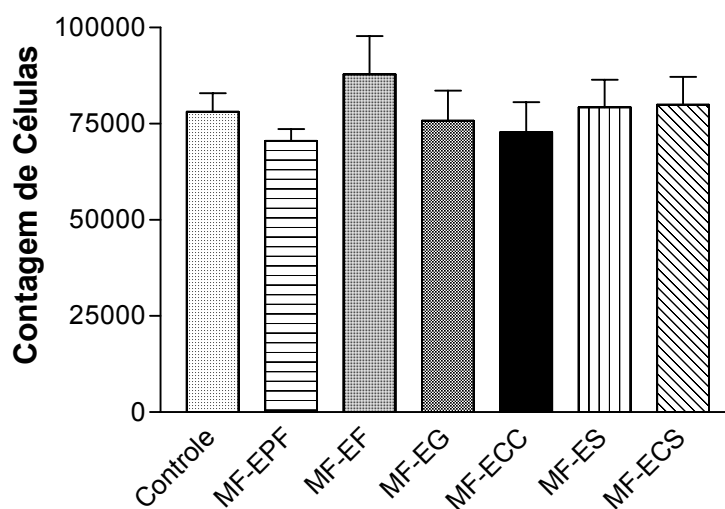
O teste de atividade antiinflamatória, utilizando os extratos MF-EF, MF-EPF, MF-ES, MF-EG, MF-ECC, MF-ECS, MF-AFS e MF-AFI, foi realizado frente ao agente irritante carragenina, pelo modelo de pleurisia induzida no rato.

O extrato foi utilizado na concentração de 500 mg/Kg de massa corporal. A injeção intrapleural de carragenina em grupos de animais pré-tratados, via oral, com água ou DMSO induziu uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pelo aumento do volume do exsudato pleural e no número de leucócitos migrados para a cavidade (Vol. Exsudato: Cg + salina = 1,1 ± 0,08 mL; Cg + DMSO = 1,0 ± 0,07 mL; número de leucócitos / mm<sup>3</sup>: Cg + salina = 78080 ± 4841; Cg + DMSO = 77130 ± 1625). Como apresentado nas Figura 7Figura 8Figura 11Figura 12. O tratamento dos animais com o extrato total dos pedúnculos florais (MF-EPF) dissolvido

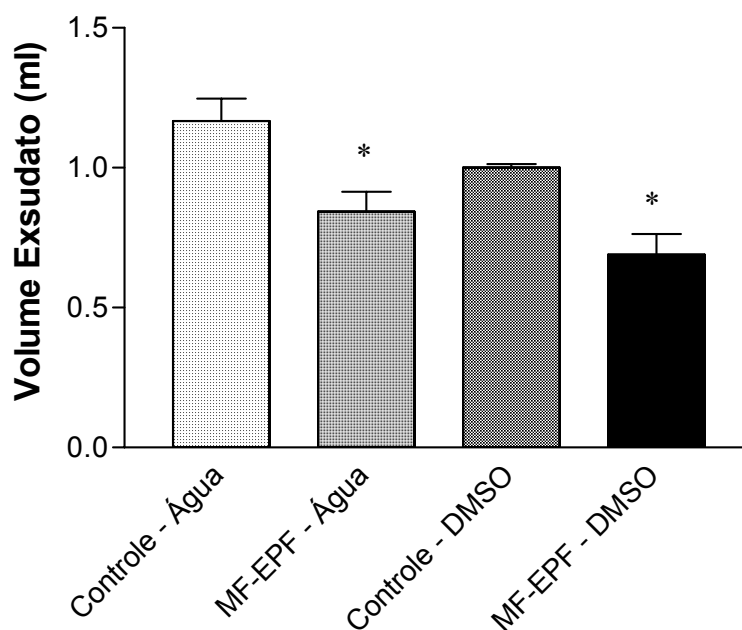
em água ou DMSO 16% reduziu o volume do exsudato inflamatório pleural (MF-EPF  $_{500 \text{ mg/kg}}$  = 24% e 37% ( $P < 0,05$ ), respectivamente (Figura 9). Também ocorreu uma redução no número de células migradas. Os resultados estão apresentados na Figura 10.



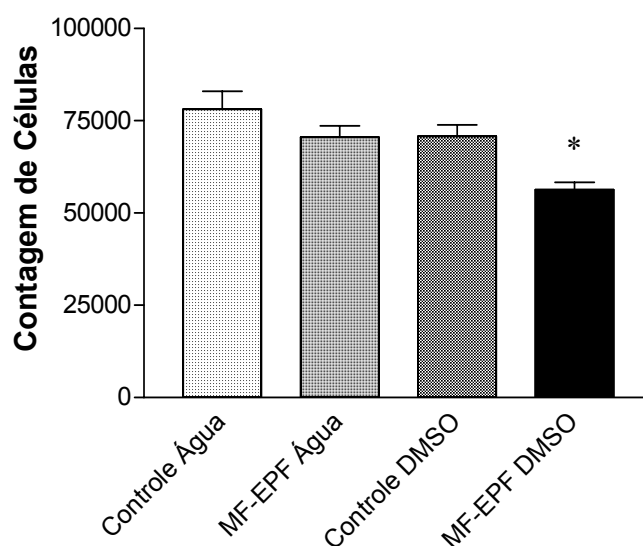
**Figura 7:** Efeito dos extratos etanólicos da espécie *Mabea fistulifera* Mart. sobre o volume do exsudato pleural induzido pela injeção de carragenina. \* $P < 0,05$  comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).



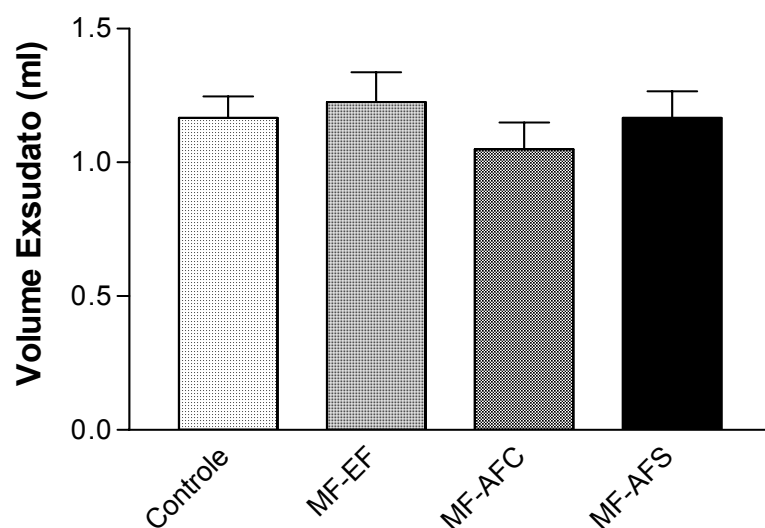
**Figura 8:** Efeito dos extratos etanólicos da espécie *Mabea fistulifera* Mart. sobre a migração de leucócitos induzida pela injeção de carragenina. \* $P < 0,05$  comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).



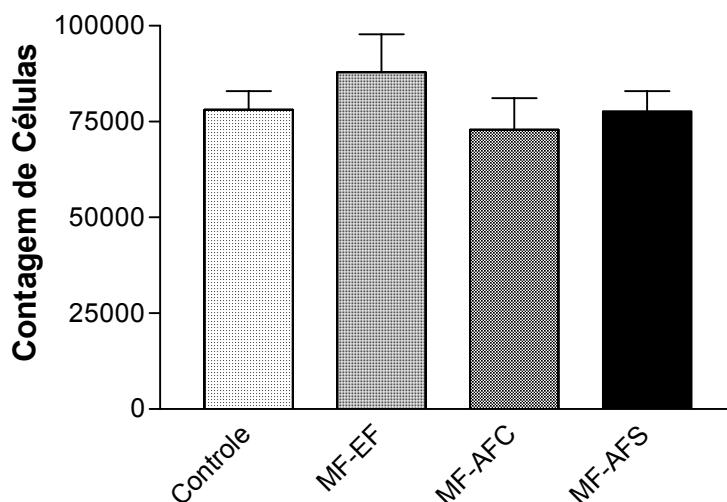
**Figura 9:** Efeito do extrato etanólico dos pedúnculos florais da espécie *Mabea fistulifera* Mart. utilizando água e solução de DMSO como solvente, sobre o volume do exsudato pleural induzido pela injeção de carragenina. \* $P < 0,05$  comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).



**Figura 10:** Efeito do extrato etanólico da espécie *Mabea fistulifera* Mart. utilizando água e solução de DMSO como solvente, sobre a migração de leucócitos induzida pela injeção de carragenina. \* $P < 0,05$  comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).



**Figura 11:** Efeito dos extratos das folhas da espécie *Mabea fistulifera* Mart. e comparação entre diferentes métodos de extração sobre o volume do exsudato pleural induzido pela injeção de carragenina. \*P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).



**Figura 12:** Efeito dos extratos das folhas da espécie *Mabea fistulifera* Mart. e comparação entre diferentes métodos de extração sobre a migração de leucócitos induzida pela injeção de carragenina. \*P<0,05 comparado ao controle (Anova, teste de Tukey).

De todos os extratos testados somente o extrato MF-EFP reduziu significativamente o volume do exsudato inflamatório e a migração de células no modelo de pleurisia induzida pela carragenina no rato, sugerindo uma possível atividade antiinflamatória. É importante

ressaltar, no entanto, que apenas o extrato dissolvido em DMSO reduziu significativamente o número de células migradas.

Pode-se observar pela comparação dos resultados obtidos para a redução do volume do exsudato inflamatório (Figura 9) e a migração de células (Figura 10) para o extrato MF-EPF que quando este foi solubilizado apenas em água formando uma suspensão e quando se utilizou DMSO para melhora da solubilização houve uma melhora na atividade antiinflamatória. Por meio destes dados comprova-se também que o DMSO na concentração utilizada não interferiu no resultado final da avaliação da atividade.

Comparando os resultados obtidos para redução do volume do exsudato inflamatório (Figura 11) e para migração de células (Figura 12) dos extratos aquosos das folhas obtidos por diferentes métodos de extração (Infusão e Soxhlet), pode-se observar que não houve uma diferença significativa na atividade antiinflamatória entre os extratos. Neste caso pode-se afirmar que o método de extração não interferiu no resultado.

## 4.2. Identificação das substâncias isoladas

### 4.2.1. Composto MF-1/MF-2

#### ◆ MF-1

O composto **MF-1** foi isolado da fração MF-HF 1 como cristais brancos na forma de agulhas.

Através da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 13 **A**), observou-se a presença de um singleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,25, integração de 92 hidrogênios, sinal este característico de uma seqüência de hidrogênios metilênicos e um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,88, integração de 6 hidrogênios, característico de metila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 13 **B**), confirmou sinais característicos de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

O composto **MF-1** foi identificado como sendo uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa, obedecendo a fórmula  $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ .

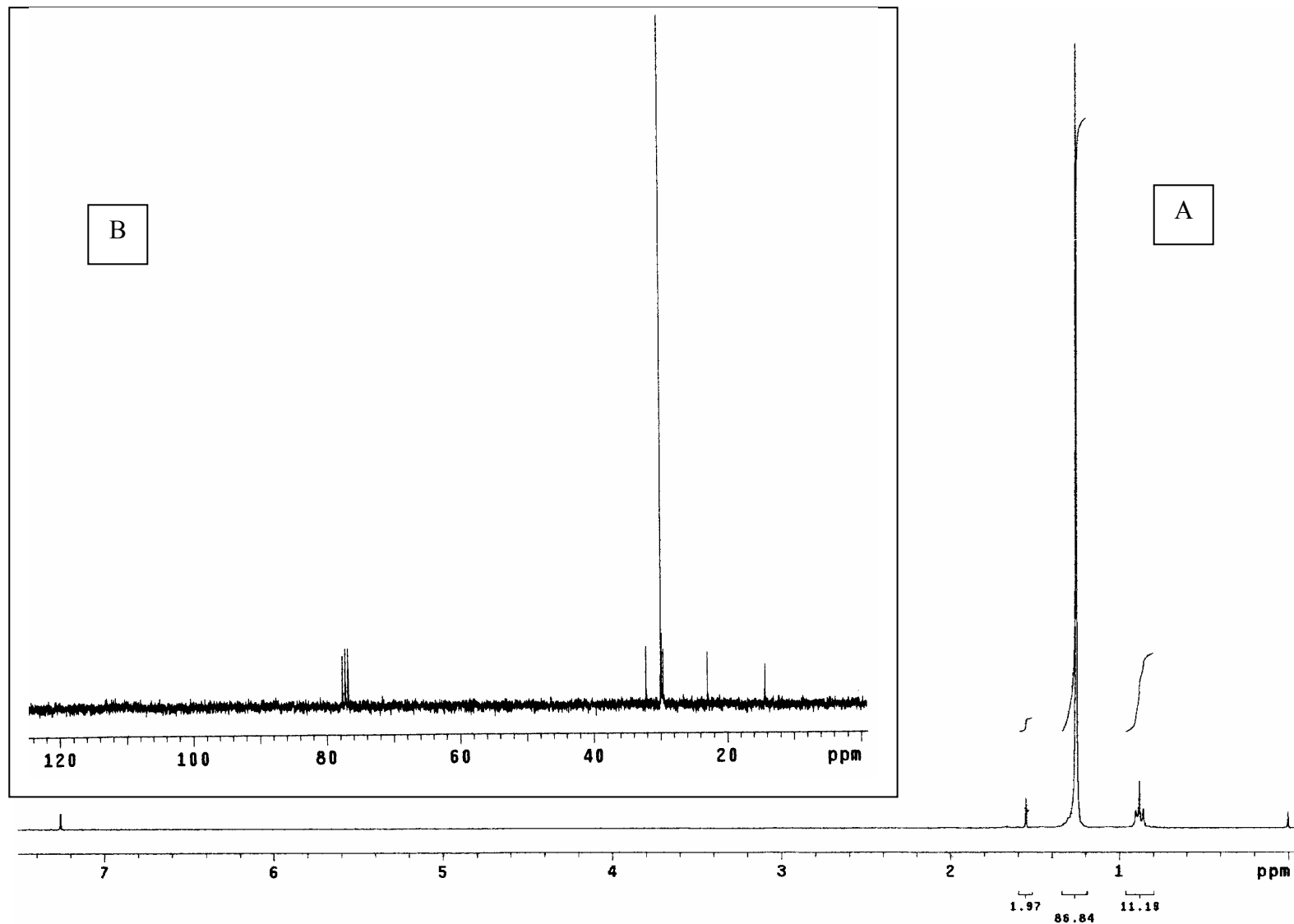
## ◆ MF-2

O composto **MF-2** foi isolado da fração MF-HF 4 na forma de um pó branco.

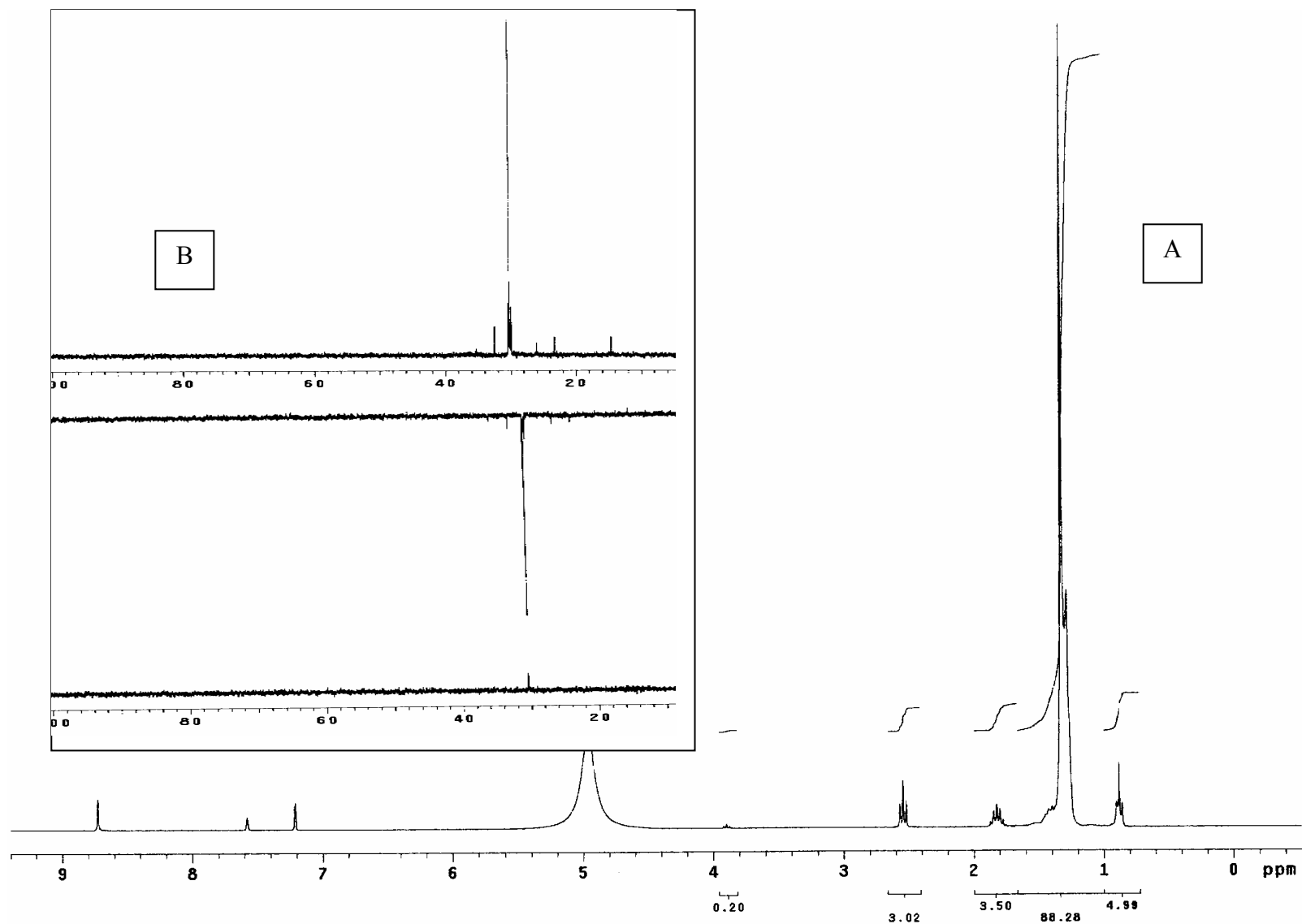
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 14 **A**) para **MF-2** observam-se um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  0,88, integração de 6 hidrogênios, um quinteto em  $\delta_{\text{H}}$  1,82, integração de 4 hidrogênios; um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  2,54, integração de 4 hidrogênios e sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,42, 1,33 e 1,28, integração total para 58 grupamentos  $\text{CH}_2$ , sinais estes característicos de hidrogênios de hidrocarbonetos.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 14 **B**) confirmou sinais característicos de  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ .

A substância **MF-2** assim como a substância **MF-1** foi caracterizada como sendo uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa.



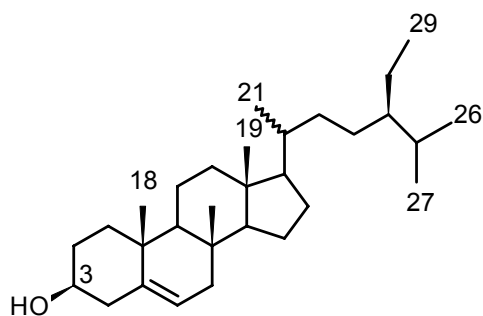
**Figura 13:** A) Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para **MF-1** (mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa) (300,06 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ .  
 B) Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para **MF-1** (mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa) (75,45 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ .



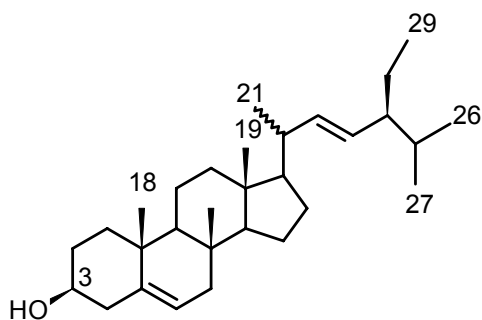
**Figura 14:** **A)** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para **MF-2** (misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa) (300,06 MHz) em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .  
**B)** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para **MF-2** (misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa) (75,45 MHz) em  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .



#### 4.2.2. Composto MF-3



**MF-3a** ( $\beta$ -sitosterol)



**MF-3b** (Estigmasterol)

**MF-3** foi isolado da fração MF-HF 5 da coluna do extrato hexânico total das folhas como cristais transparentes em formato de agulhas.

No espectro de IV (Figura 15) observam-se bandas de transmissão em  $3432\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração de estiramento  $-\text{OH}$ , bandas na região de  $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$  referentes à deformação axial C-H, em  $1651\text{ cm}^{-1}$  relativa à deformação axial da insaturação entre os carbonos C-22 e C-23 do estigmasterol e bandas em  $1466$  e  $1382\text{ cm}^{-1}$  deformação axial dos carbonos do anel C-5 e C-6.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 16) observam-se sinais característicos de hidrogênios olefinicos *trans* em  $\delta_{\text{H}} 5,15$  ( $J = 8,4$  e  $15,3$  Hz, dd) atribuído ao H-22 e  $\delta_{\text{H}} 5,01$  ( $J = 8,4$  e  $15,3$  Hz, dd) atribuído ao H-23 do estigmasterol (**MF-3b**).

A presença do H-3 (multipeto) na região de  $3,55\text{-}3,51$  ppm e do hidrogênio olefinico H-6 em  $\delta_{\text{H}} 5,35$  ppm ( $J = 5,1$  Hz, d) e o acúmulo de sinais na região de  $0,60 - 2,40$  ppm atribuídos à presença de vários hidrogênios metílicos, metínicos e metilênicos são sinais característicos dos esteróides  $\beta$ -sitosterol (**MF-3a**) e estigmasterol (**MF-3b**).

Pela análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Figura 17) podem-se observar entre outros, sinais de carbonos insaturados em  $\delta_{\text{C}} 140,98$  (C),  $121,95$  (CH),  $138,54$  (C) e  $129,45$  (CH).

Baseado nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e por comparação destes com os dados encontrados na literatura<sup>61,62</sup> (Tabela 16) a mistura **MF-3** foi identificada como uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

**Tabela 16:** Comparação dos dados de deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz em  $\text{CDCl}_3$ ) de **MF-3** com os dados da literatura<sup>61,62</sup> para estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol.

C	MF-3a	MF-3b	$\beta$ -sitosterol	Estigmasterol
1	37,46	37,46	37,25	37,25
2	31,88	31,88	31,64	31,64
3	72,02	72,02	71,81	71,81
4	42,51	42,51	42,29	42,29
5	140,98	140,98	140,73	140,73
6	121,95	121,95	121,72	121,72
7	32,10	32,10	31,89	31,89
8	32,10	32,10	31,89	31,89
9	50,33	50,33	50,12	50,12
10	36,71	36,71	36,40	36,40
11	21,30	21,30	21,08	21,08
12	39,98	39,98	39,78	39,68
13	42,51	42,51	42,29	42,29
14	56,97	57,08	56,75	56,87
15	24,52	24,58	24,30	24,38
16	28,47	28,47	28,24	28,24
17	56,25	56,19	56,05	55,93
18	12,08	12,08	11,87	11,87
19	19,62	19,62	19,38	19,38
20	36,36	40,56	36,16	40,50
21	19,24	21,43	19,03	21,20
22	34,15	138,54	33,94	138,40
23	26,26	129,50	39,12	129,27
24	46,04	51,43	45,83	51,23
25	29,34	31,88	26,03	31,89
26	18,99	19,25	18,76	19,00
27	20,04	19,25	19,81	19,00
28	23,27	25,62	23,06	25,42
29	12,20	12,47	11,99	12,27

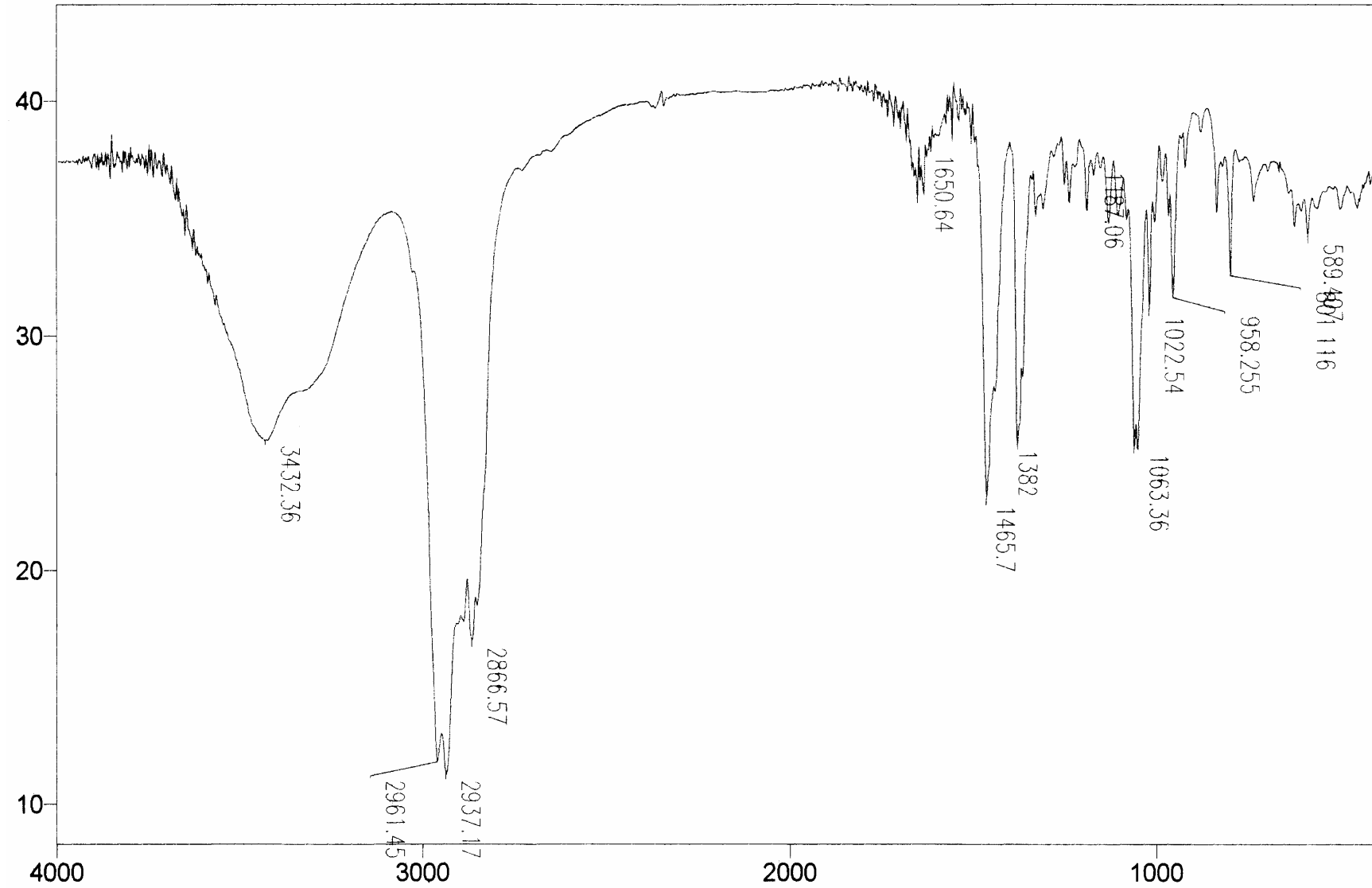
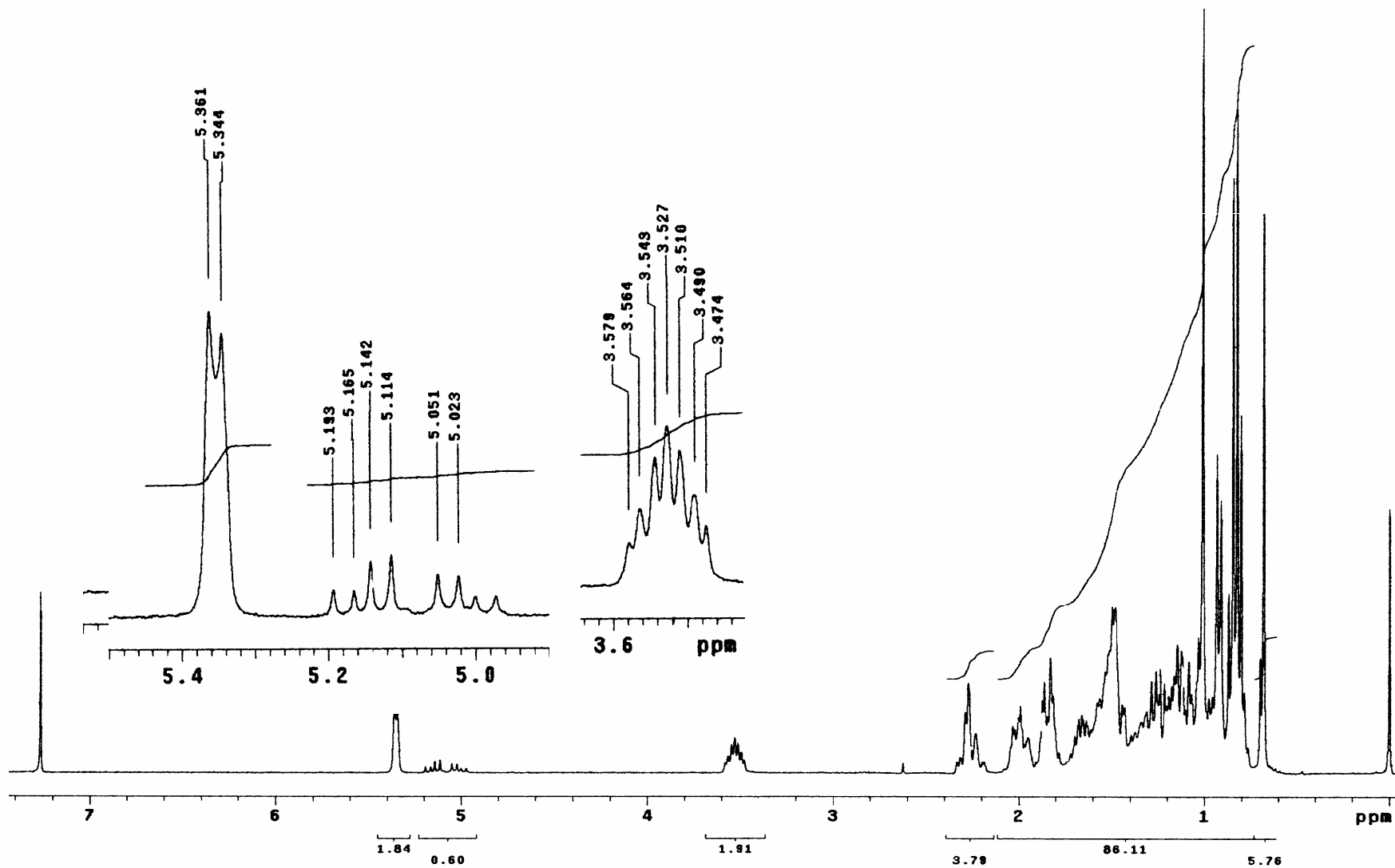
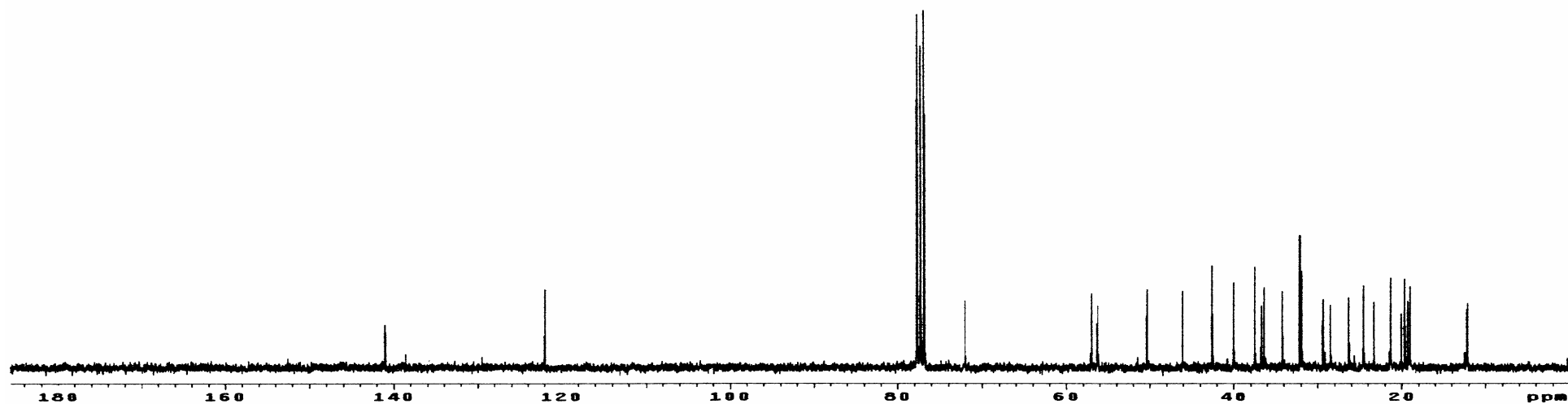


Figura 15: Espectro de IV (KBr) para MF-3 ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol).



**Figura 16:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para **MF-3** ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol) (300,06 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ .



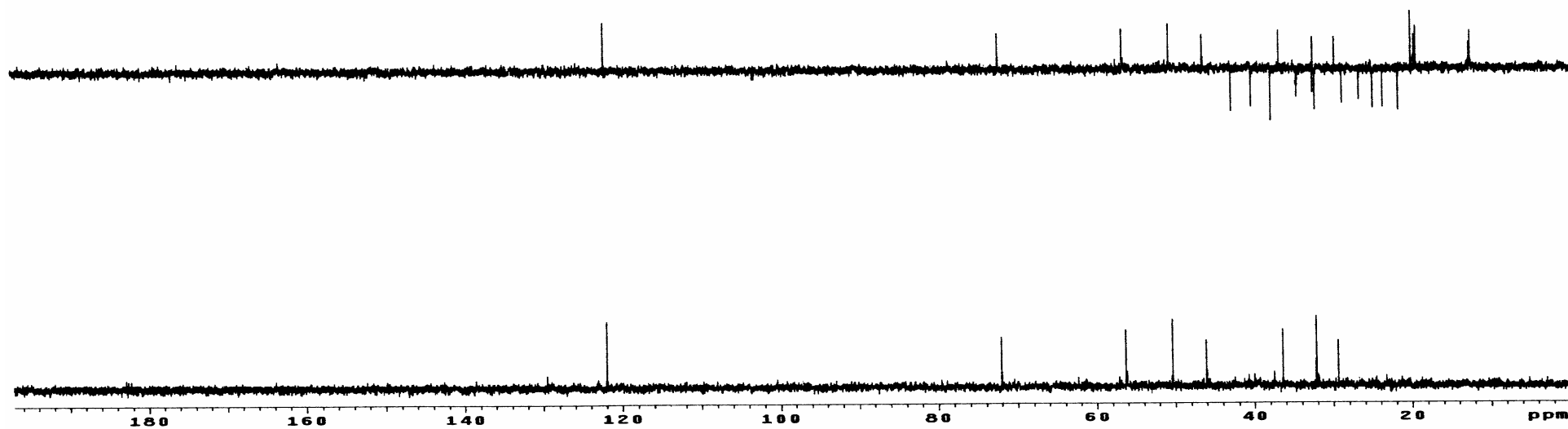
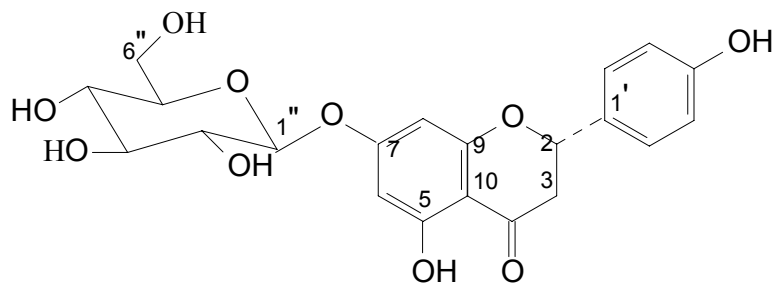


Figura 17: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  para MF-3 ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol) (75,45 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ .

### 4.2.3. Composto MF-6



**MF-6**

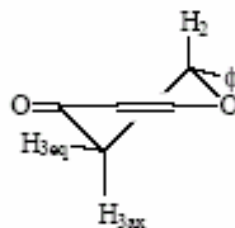
A substância **MF-6** foi isolada da fração MF-ECS 12 da coluna do extrato etanólico das cascas das sementes na forma de cristais brancos.

No espectro no IV (Figura 19) observam-se bandas de transmissão em  $3414\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração de estiramento -OH e em  $1727\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração de estiramento C=O da carbonila do anel C.

A unidade aglicona da substância **MF-6** foi evidenciada como uma flavanona pela presença de quatro sinais na região de hidrogênios ligados a anel aromático em  $\delta_{\text{H}} 7,40$  ( $J = 8,4\text{ Hz}$ , d) (H-2'/6'), integração para dois hidrogênios; e  $\delta_{\text{H}} 6,90$  ( $J = 8,4\text{ Hz}$ , d) (H-3'/5'), integração para dois hidrogênios ambos correspondentes ao anel B da flavanona e pelos sinais em  $\delta_{\text{H}} 6,17$  ( $J = 2,1\text{ Hz}$ , d) (H-8) e  $\delta_{\text{H}} 6,13$  ( $J = 2,1\text{ Hz}$ , d) (H-6) ambos com integração para um hidrogênio sendo estes atribuídos ao anel A da flavanona que puderam ser observados pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 20).

As constantes de acoplamento dos sinais dos hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}} 7,40$  ( $J = 8,4\text{ Hz}$ , d) e  $\delta_{\text{H}} 6,90$  ( $J = 8,4\text{ Hz}$ , d) evidenciam acoplamento *orto*, e as constantes de acoplamento dos hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}} 6,17$  ( $J = 2,1\text{ Hz}$ , d) e  $6,13$  ( $J = 2,1\text{ Hz}$ , d) indicam acoplamento *meta* entre eles.

Ainda por meio do espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram observados sinais em  $\delta_{\text{H}} 5,50$  ( $J = 3,0$  e  $12,9\text{ Hz}$ ; dd) (H-2), integração para um hidrogênio e os sinais em  $\delta_{\text{H}} 2,78$  ( $J = 3,0$  e  $17,1\text{ Hz}$ , dd) (H-3<sup>eq</sup>) e  $3,24$  ( $J = 12,9$  e  $17,1\text{ Hz}$ ; dd) (H-3<sup>ax</sup>) integração para um hidrogênio cada, estes deslocamentos, constantes de acoplamento e multiplicidades estão em concordância com a conformação meia cadeira, preferencialmente assumida pelo anel C da flavanona. Por meio da Figura 18 é possível a visualização destes acoplamentos.



**Figura 18:** Conformação preferencial do anel C da flavanona.

Nesta conformação o hidrogênio em  $\delta_H$  2,78 se encontra em posição equatorial e o hidrogênio em  $\delta_H$  3,24 em posição axial concordando com as constantes de acoplamento entre eles e com o hidrogênio em  $\delta_H$  5,50 (H-2). Além destes sinais foram observados também dois singletos em  $\delta_H$  12,07 e 8,58 atribuídos às hidroxilas fenólicas.

Por meio dos deslocamentos de hidrogênio e constantes de acoplamento encontrados e por comparação destes com modelos da literatura<sup>19</sup> (Tabela 18) caracterizou-se a aglicona como sendo a naringenina.

O espectro de COSY (Figura 21) confirma as correlações entre os hidrogênios  $\delta_H$  7,40 e  $\delta_H$  6,90 correspondentes ao anel B da naringenina. O anel C também foi confirmado pelos acoplamentos entre os hidrogênios H-3<sup>eq</sup> e H-3<sup>ax</sup> e destes com o H-2. É possível observar o acoplamento dos hidrogênios em  $\delta_H$  6,13 e  $\delta_H$  6,17 correspondentes aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A da naringenina. Os acoplamentos observados pelo espectro de COSY estão apresentados na Tabela 17.

A unidade glicosídica foi confirmada pela presença do sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  5,07 ( $J = 7,5$  Hz, d) com integral para um hidrogênio, correspondente ao hidrogênio anomérico. Por meio da constante de acoplamento ( $J = 7,5$  Hz) para o hidrogênio anomérico foi possível estabelecer a configuração  $\beta$  para o carbono anomérico, acoplamento este do tipo axial-axial entre o hidrogênio anomérico H-1'' e o hidrogênio H-2'' (multipeto  $\delta_H$  3,40-3,90) da unidade glicosídica. Os demais hidrogênios da unidade glicosídica também foram atribuídos ao multipeto em  $\delta_H$  3,40-3,90.



**Tabela 17:** Correlações homonucleares  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  observadas no espectro de COSY de **MF-6** em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .

$\delta^1_{\text{H}}$ (mult., $J$ Hz, H)	$\delta^1_{\text{H}}$ (mult., $J$ Hz, H)
6,13 (d, $J = 2,1$ Hz, H-6)	6,17 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8)
5,50 (dd, $J = 3,0$ e $12,9$ Hz, H-2)	2,78 (dd, $J = 3,0$ e $17,1$ Hz, H-3 <sup>eq</sup> )
	3,24 (dd, $J = 12,9$ e $17,1$ Hz, H-3 <sup>ax</sup> )
2,78 (dd, $J = 3,0$ e $17,1$ Hz, H-3 <sup>eq</sup> )	3,24 (dd, $J = 12,9$ e $17,1$ Hz, H-3 <sup>ax</sup> )
6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3'/5')	7,40 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2'/6')

Por meio das análises de RMN  $^1\text{H}$ , COSY, IV e comparação com modelo da literatura<sup>19</sup> (Tabela 18) caracterizou-se a substância **MF-6** como 7-O- $\beta$ -glucopiranosil naringenina (prunin).

**Tabela 18:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (300,06 MHz,  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) para a substância **MF-6** e comparação com os dados da literatura<sup>19</sup> ( $\delta^1_{\text{H}^a}$ ).

H	$\delta^1_{\text{H}^a}$ mult. (J Hz)	$\delta^1_{\text{H}}$ (Hz) mult. (J Hz)
H-2	5,50 dd (12,5; 3,0)	5,50 dd (12,9;3,0)
H-3 <sup>eq</sup>	2,79 dd (17,0;3,0)	2,78 dd (17,1;3,0)
H-3 <sup>ax</sup>	3,25 dd (17,0;12,5)	3,24 dd (17,1;12,9)
HO-5	11,50 s	12,07 s
H-6	6,17 d (2,5)	6,13 d (2,1)
H-8	6,21 d (2,5)	6,17 d (2,1)
H-2'/6	7,40 d (8,7)	7,40 d (8,4)
H-3'/5'	6,90 d (9,0)	6,90 d (8,4)
H-1''	5,26 dd (7,5;4,5)	5,07 d (7,5)
H-2''	3,70 dd (9,5; 7,5)	3,49 m
H-3''	5,23 m	3,41-3,89 m
H-4''	3,92 d (7,5)	3,41-3,89 m
H-5''	3,75 m	3,41-3,89 m
H-6'' <sup>a</sup>	3,75 m	3,41-3,89 m
H-6'' <sup>b</sup>	3,75 m	3,41-3,98 m

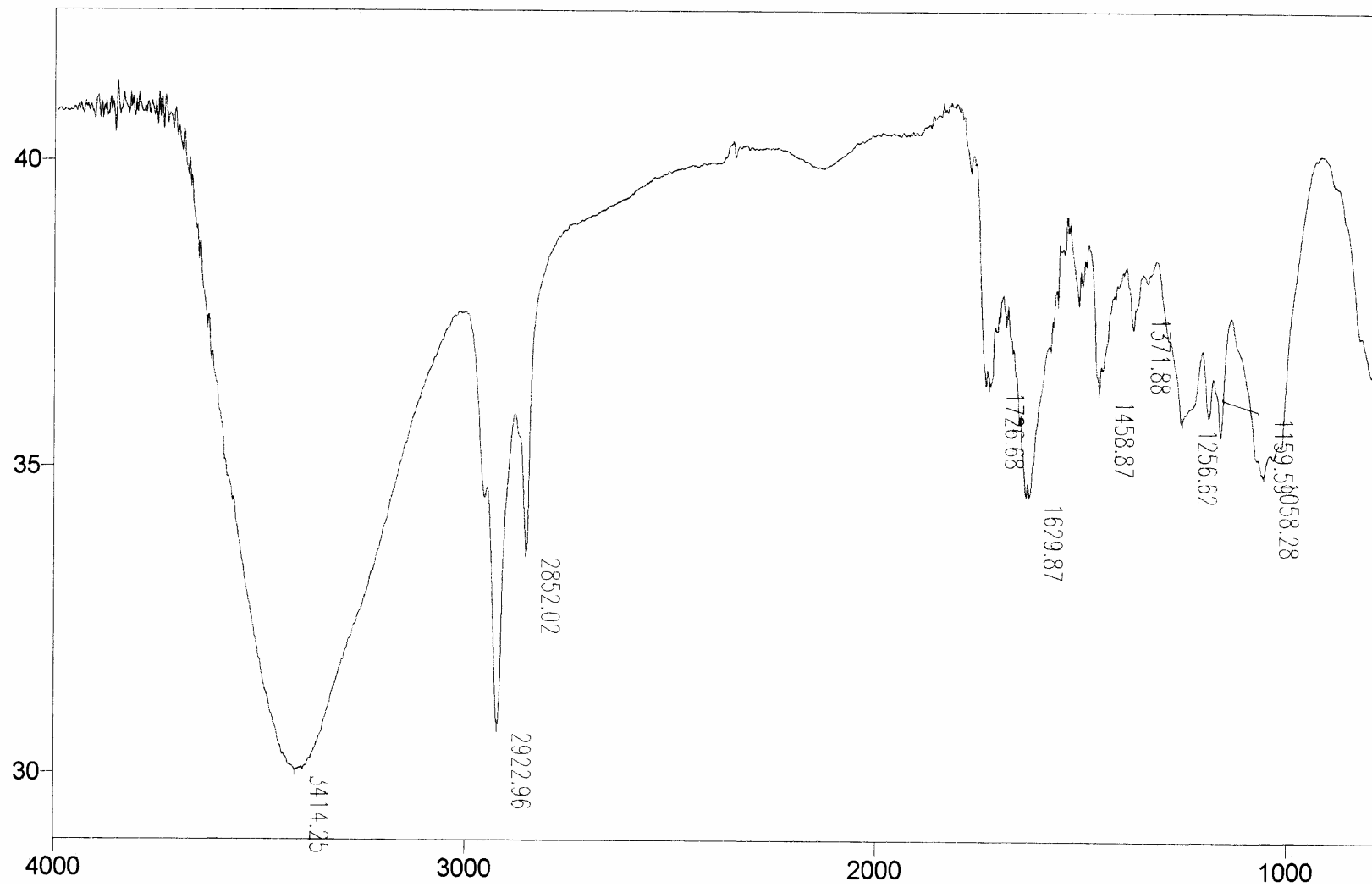


Figura 19: Espectro de IV (filme) para a substância MF-6 - 7-O-β-glucopiranosil naringenina.

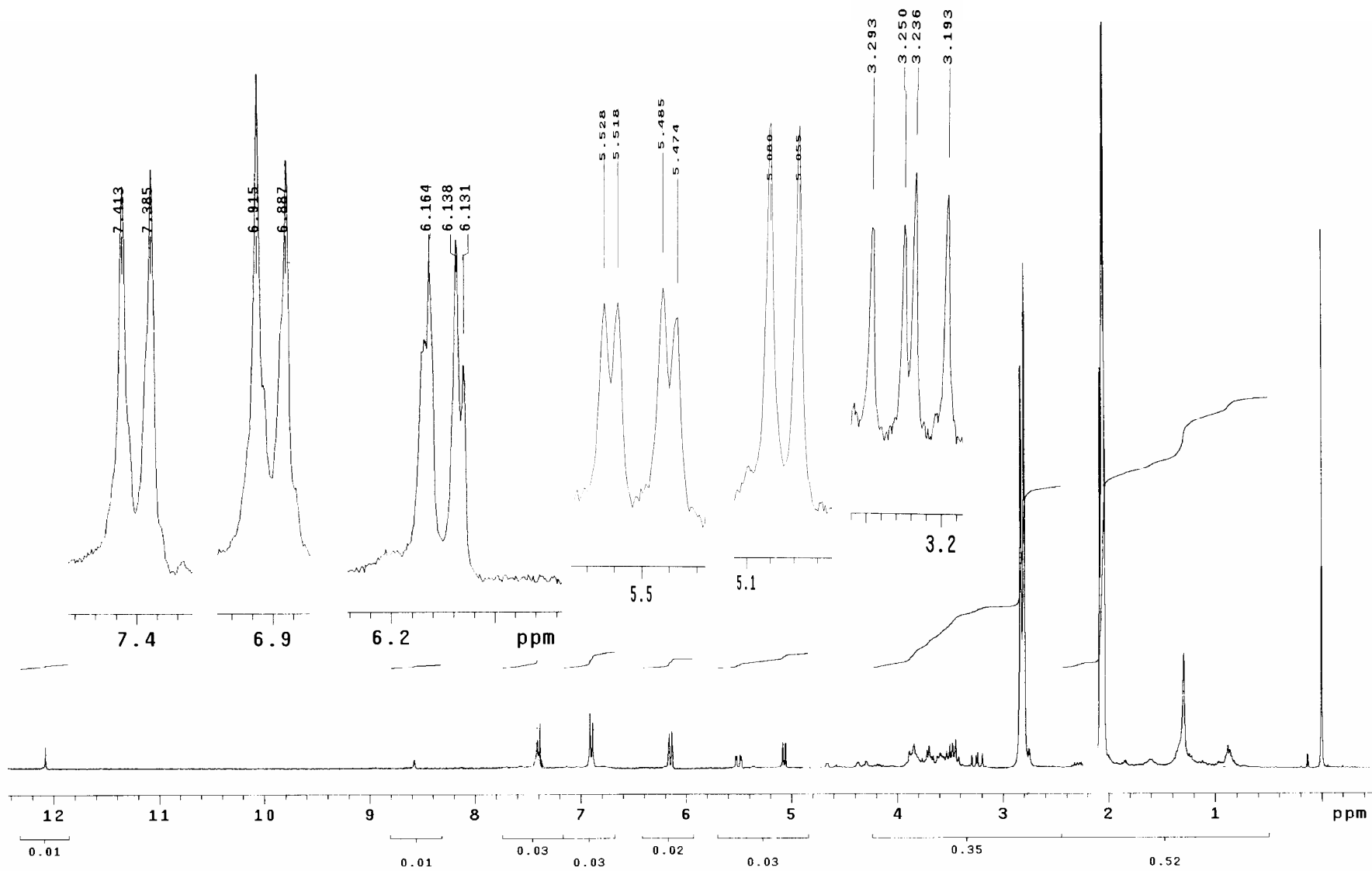
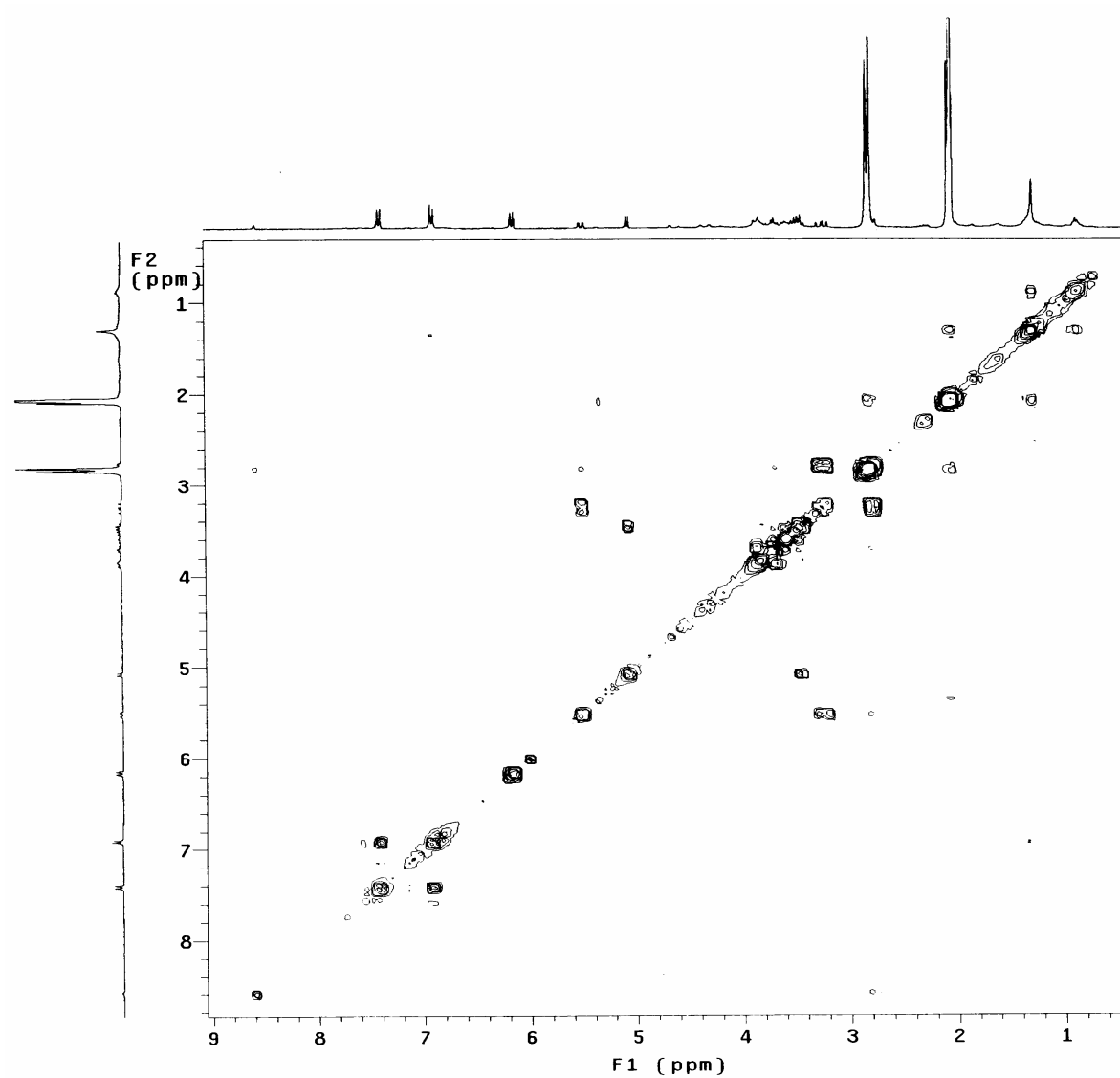
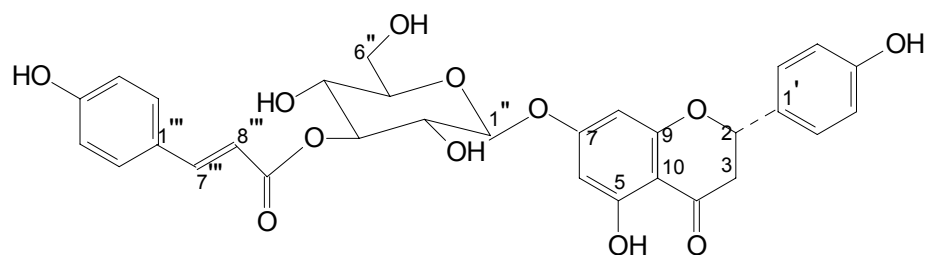


Figura 20: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substância **MF-6** - 7-O- $\beta$ -glucopiranosil -naringenina (300,06 MHz) em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .



**Figura 21:** Espectro de COSY para a substância **MF-6** - 7-O- $\beta$ -glucopiranosil naringenina em  $C_2D_6CO$ .

#### 4.2.4. Composto MF-4



(MF-4)

A substância **MF-4** foi isolada da fração MF-ECS 10 da coluna do extrato etanólico das cascas das sementes na forma de cristais brancos.

No espectro de IV (Figura 24) verificam-se bandas de transmissão em  $3397\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração de estiramento  $\text{-OH}$ , uma banda em  $1702\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração de estiramento  $\text{C=O}$  da carbonila do anel **C** e bandas em  $1604$  e  $1643\text{ cm}^{-1}$  referentes à vibração de estiramento  $\text{C=C}$  e de  $\text{C=O}$   $\alpha, \beta$  insaturada respectivamente.

A unidade aglicona da substância **MF-4** foi evidenciada como uma flavanona assim como para a substância **MF-6**, pelos sinais, no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 25) de dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,17 e 6,19, integração de um hidrogênio cada, com padrão de acoplamento *meta* ( $J = 2,1\text{ Hz}$ ) correspondendo ao anel **A** da flavanona (H-6 e H-8) e dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,40 e 7,56, integração de dois hidrogênios cada, ambos com acoplamento *orto* ( $J = 8,7\text{ Hz}$ ) com um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,90, integração de quatro hidrogênios correspondentes aos hidrogênios H-3'/5' do anel **B** da flavanona e H-3'''/5''' do grupo coumaroil. Por meio das correlações homonucleares  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  observadas no espectro de COSY (Figura 26) pode-se confirmar os acoplamentos descritos anteriormente entre os hidrogênios dos anéis aromáticos H-6 com H-8 do anel **A**, H-2'/H-6' com H-3'/5' do anel **B** da flavanona e H-2'''/6''' com H-3'''/5''' do grupo coumaroil. Além destes, também foram observado os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  12,09, 8,58 e 8,93 correspondentes respectivamente às hidroxilas fenólicas dos anéis **A** e **B** da flavanona e a do grupo coumaroil.

O anel **C** da flavanona foi confirmado pelos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 25) dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  2,78 ( $J = 3,0$  e  $17,1\text{ Hz}$ , dd) com integral equivalente a um hidrogênio, em  $\delta_{\text{H}}$  3,26 ( $J = 12,9$  e  $17,1\text{ Hz}$ , dd) correspondente a um hidrogênio e em  $\delta_{\text{H}}$  5,50 ( $J = 3,0$  e  $12,9\text{ Hz}$ , dd) também com integral para um hidrogênio, estes deslocamentos químicos, constantes de acoplamento e multiplicidades são típicos de H-3<sup>eq</sup>, H-3<sup>ax</sup> e H-2 na

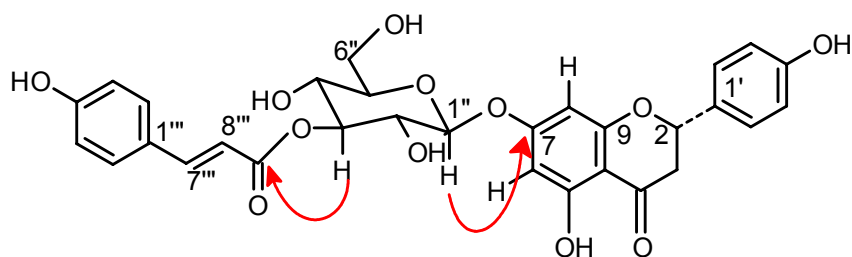
conformação meia cadeira do anel **C** de uma flavanona, como observado para o composto **MF-6**.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Figura 27) é característico de uma flavanona pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  43,5 correspondente ao carbono metilênico, em  $\delta_{\text{C}}$  80,2, carbono metínico, em  $\delta_{\text{C}}$  198,1 referente à carbonila e em  $\delta_{\text{C}}$  158,8 correspondente ao carbono aromático ligado a hidroxila, além dos sinais atribuídos aos carbonos aromáticos.

Através dos deslocamentos químicos, constantes de acoplamento e comparação com modelos da literatura<sup>19</sup> para a unidade aglicona, esta foi caracterizada como sendo a naringenina assim como para o composto **MF-6**.

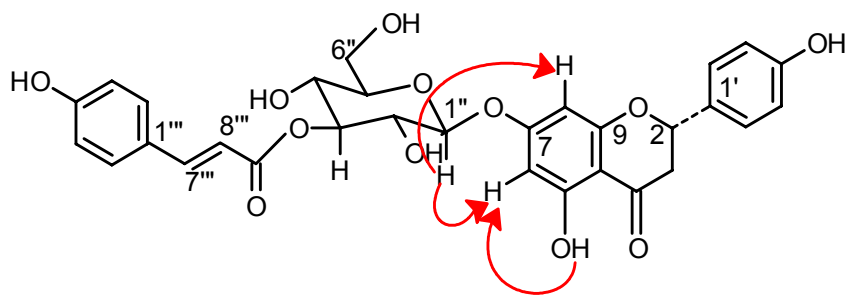
A unidade glicosídica foi evidenciada pela presença do carbono anomérico em  $\delta_{\text{C}}$  100,9 o qual está correlacionado com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,26 ( $J = 7,8$  Hz, H-1'') pelo espectro de HMQC (Figura 28) e pela presença do carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  62,1 (C-6'') correlacionado pelo HMQC (Figura 28) com o multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,75 e 3,92.

A posição da glucose foi estabelecida com base na correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a três ligações ( $^3J$ ) observada pelo espectro de HMBC (Figura 29) entre o hidrogênio anomérico H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  5,26) e o carbono da flavanona C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  166,5) (Figura 22).



**Figura 22:** Principais correlações observadas no espectro de HMBC de **MF-4**.

O espectro de diferença de NOE (Figura 30) também confirmou o posicionamento da glucose ligada ao carbono C-7, mostrando um aumento na intensidade dos sinais dos hidrogênios H-6 e H-8 pela irradiação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,26 (H-1''). A posição do H-6 também pode ser confirmada pelo espectro de diferença de NOE, mostrando um aumento na intensidade do H-6 pela irradiação do hidrogênio da hidroxila em  $\delta_{\text{H}}$  12,09 (HO-5) (Figura 23).



**Figura 23:** Representação das interações observadas pela irradiação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  5,26 (H-1'') e 12,09 (HO-5).

A constata de acoplamento de ( $J = 7,8$  Hz) do hidrogênio anomérico H-1'' da glucose indica que o hidrogênio anomérico encontra-se em posição axial, levando a uma configuração  $\beta$  para o carbono anomérico. Este valor corresponde a um acoplamento de tipo axial-axial entre os hidrogênios H-1'' com o hidrogênio H-2''  $\delta_{\text{H}}$  3,70 multiplete observada pelo espectro de HMBC (Figura 29), estando o hidrogênio H-2'' correlacionado através do espectro de HMQC (Figura 28) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  72,9. Os demais hidrogênios da glucose foram atribuídos ao multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,75 e  $\delta_{\text{H}}$  3,92 (Figura 25), os quais se correlacionaram com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  78,4; 69,3; 77,8 e 62,1 no espectro de HMQC (Figura 28).

A correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a três ligações ( $^3J$ ) do hidrogênio da glucose em  $\delta_{\text{H}}$  5,24 (multiplete, H-3'') com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  167,5 (Figura 22), observada no espectro de HMBC (Figura 29) evidenciou uma substituição no carbono C-3'' da glucose, sendo que o maior deslocamento apresentado pelo hidrogênio H-3'' da glucose também é característico desta substituição.

Por meio do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 25) observou-se sinais para uma unidade coumaroila, os quais não foram observados para o composto **MF-6** sendo esta evidenciada pelos sinais para hidrogênios olefínicos com acoplamento *trans* em  $\delta_{\text{C}}$  7,65 ( $J = 15,9$  Hz, d) e  $\delta_{\text{C}}$  6,40 ( $J = 15,9$  Hz, d) e os já citados hidrogênios aromáticos em  $\delta_{\text{H}}$  7,56 ( $J = 8,7$  Hz, d) e  $\delta_{\text{H}}$  6,90 ( $J = 8,7$  Hz, d). Por meio do espectro de HMBC (Figura 29) pode-se verificar a correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a duas ligações ( $^2J$ ) do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,40 com o carbono da carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  167,5 sendo este então o H- $\alpha$  (H-8'') e a correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a três ligações ( $^3J$ ) da carbonila com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  7,65 sendo este, portanto o H- $\beta$  (H-7'').



A unidade coumaroila pode ser confirmada pelos sinais de carbonos olefinicos em  $\delta_C$  145,6 e 115,4, pelo sinal de carbono da carbonila em  $\delta_C$  167,5 e pelos sinais de carbonos aromáticos. Observou-se no espectro de RMN  $^1H$  (Figura 25) sinal de aromático ligado à hidroxila da unidade coumaroila em  $\delta_C$  160,6.

As correlações heteronucleares  $^1H \times ^{13}C$  através do espectro de HMQC (Figura 28) e HMBC (Figura 29) auxiliaram na atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios da substância **MF-4**.

A análise das correlações  $^1H \times ^1H$  confirmou os acoplamentos descritos anteriormente, os quais estão apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19:** Correlações homonucleares  $^1H \times ^1H$  observadas através do espectro de COSY de **MF-4** em  $C_2D_6CO$ .

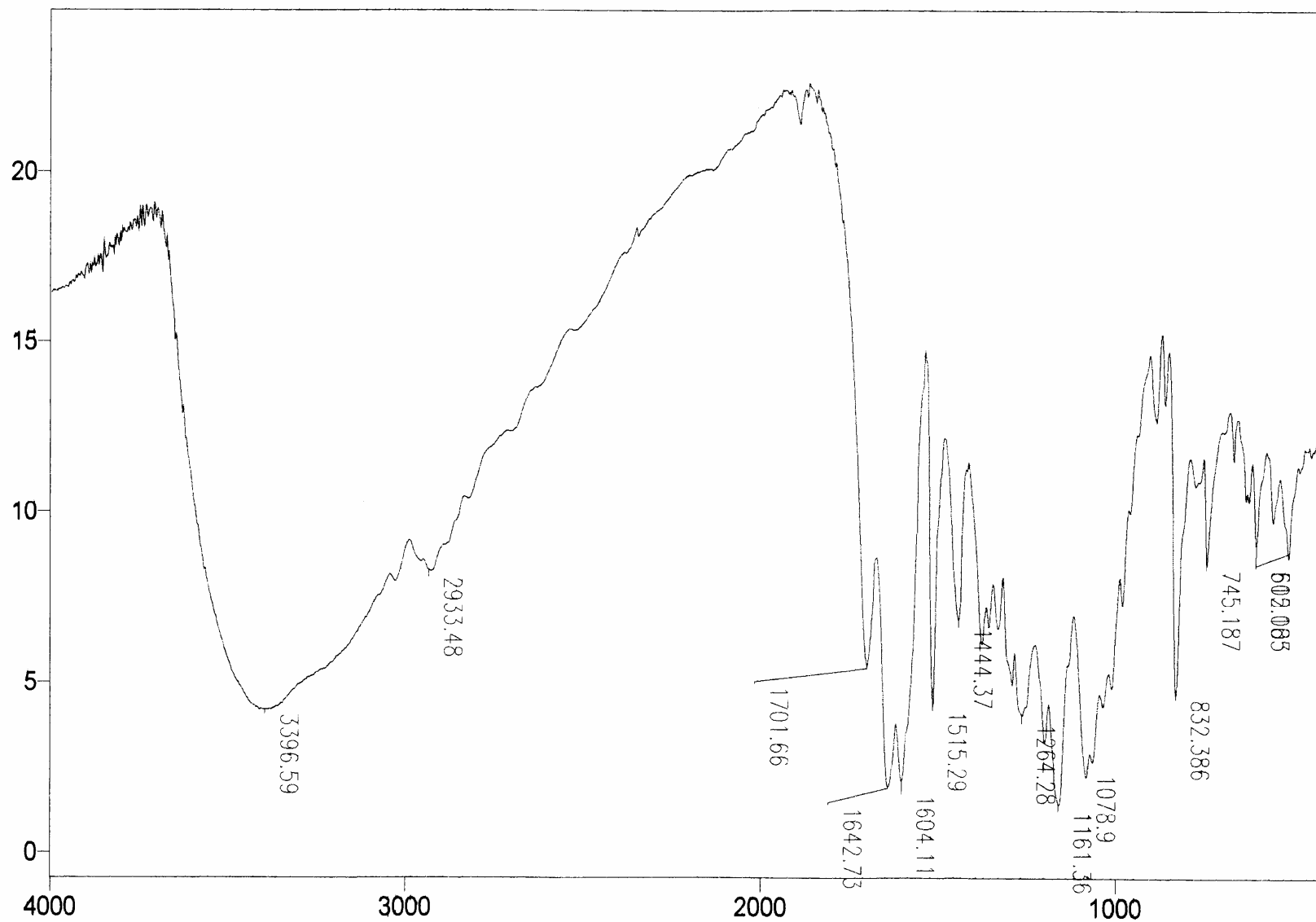
$\delta ^1H$ (mult., $J$ Hz, H)	$\delta ^1H$ (mult., $J$ Hz, H)
6,17 (d, $J = 2,1$ Hz, H-6)	6,19 (d, $J 2,1$ Hz, H-8)
5,50 (dd, $J = 3,0$ e 12,9 Hz, H-2)	2,78 (dd, $J = 3,0$ e 17,1 Hz, H-3 <sup>eq</sup> )
	3,26 (dd, $J = 12,9$ e 17,1 Hz, H-3 <sup>ax</sup> )
2,78 (dd, $J = 3,0$ e 17,1 Hz, H-3 <sup>eq</sup> )	3,26 (dd, $J = 12,9$ e 17,1 Hz, H-3 <sup>ax</sup> )
6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3'/5')	7,40 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2'/6')
6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3''/5'')	7,56 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2''/6'')
7,65 (d, $J = 15,9$ Hz, H- $\beta$ )	6,40 (d, $J = 15,9$ Hz, H- $\alpha$ )

A concordância dos dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  da substância **MF-4** isolada da fração MF-ECS 10 com os dados da literatura para 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina<sup>19</sup> (**3**) (Tabela 20) confirmou a estrutura proposta.

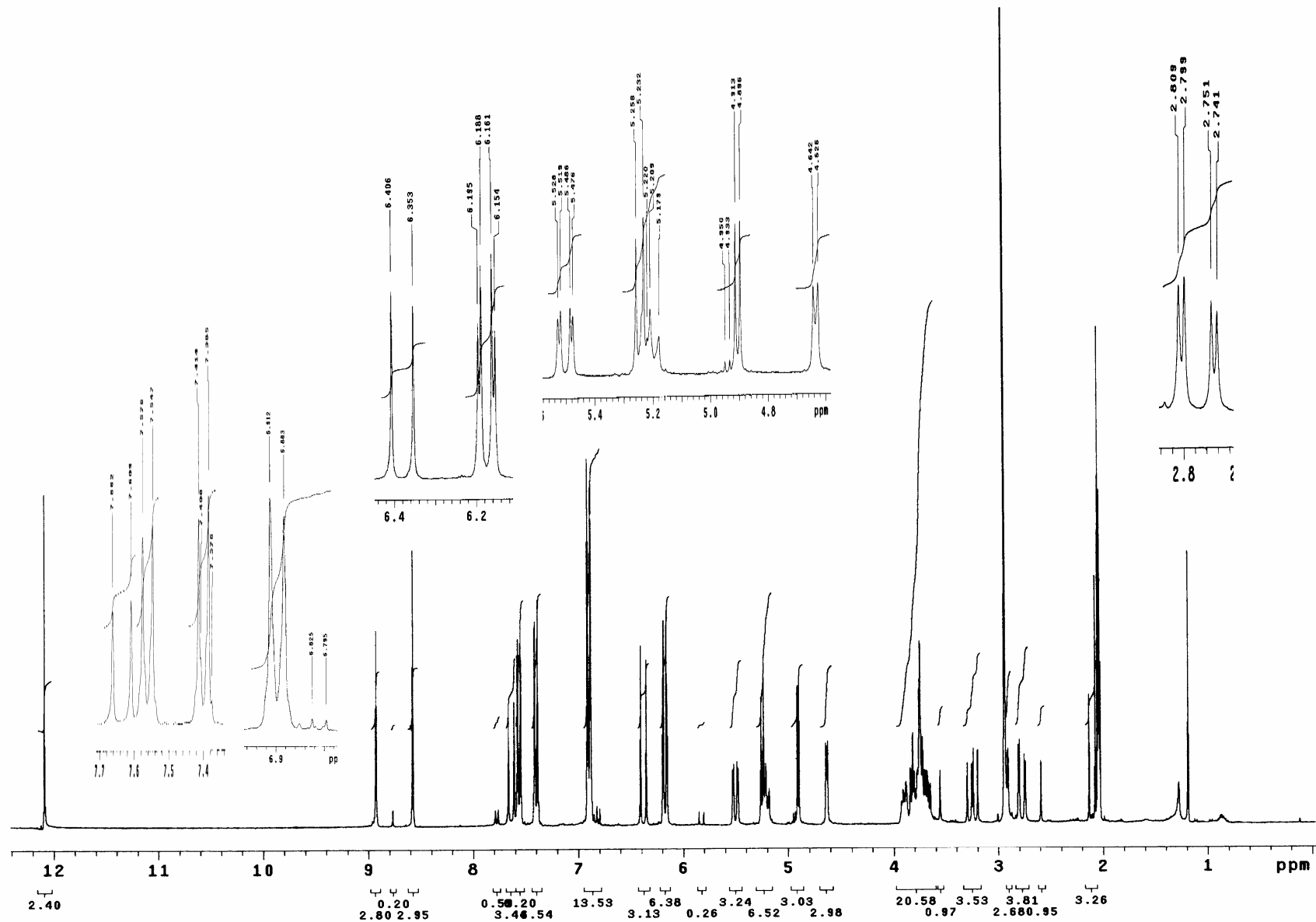
Os espectros das substâncias isoladas das frações MF-ECS 12, MF-ECS II.13 e MF-ECS II.13.4.S.2 que também receberam a denominação de **MF-4** por apresentarem mesmo Rf que a substância isolada da fração MF-ECS 10 quando comparados entre si e com os dados da literatura mostraram que realmente a substância **MF-4** foi isolada de quatro frações diferentes.

**Tabela 20:** Dados de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) para o composto **MF-4 (3)** e comparação com dados da literatura<sup>19</sup> ( $^{13}\text{C}^a$  e HMQC<sup>a</sup>).

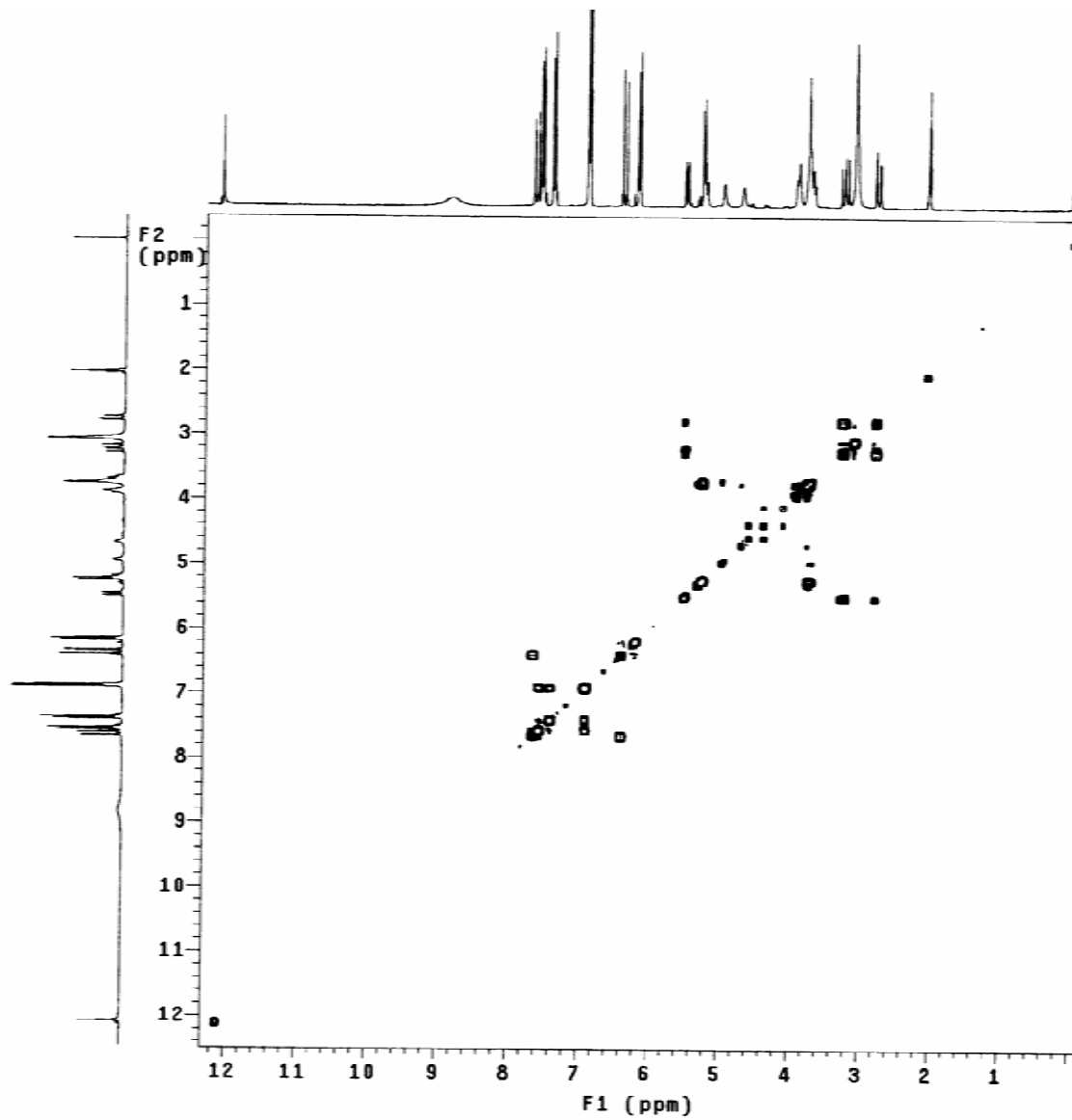
C	$\delta^{13}\text{C}^a$	HMQC <sup>a</sup> ( $^{13}\text{C}$ x $^1\text{H}$ ) $\delta^1\text{H}$ mult. (JHz)	HMQC ( $^{13}\text{C}$ x $^1\text{H}$ ) $\delta^1\text{H}$ mult. (JHz)	$\delta^{13}\text{C}/(\text{DEPT})$
2	79,3	<b>H-2</b> 5,50 dd (12,5; 3,0)	<b>H-2</b> 5,50 dd (12,9; 3,0)	80,2 (CH)
3	42,6	<b>H-3<sup>eq</sup></b> 2,79 dd (17,0; 3,0) <b>H-3<sup>ax</sup></b> 3,25 dd (17,1; 12,9)	<b>H-3<sup>eq</sup></b> 2,78 dd (17,1; 3,0) <b>H-3<sup>ax</sup></b> 3,26 dd (17,1; 12,9)	43,5 (CH <sub>2</sub> )
4	197,8		-----	198,1 (C)
OH-5	163,5	11,50 s	12,09 s	164,8 (C)
6	97,1	<b>H-6</b> 6,17 d (2,5)	<b>H-6</b> 6,17 d (2,1)	97,7 (CH)
7	165,6		-----	166,5 (C)
8	96,0	<b>H-8</b> 6,21 d (2,5)	<b>H-8</b> 6,21 d (2,1)	96,5 (CH)
9	163,3		-----	164,2 (C)
10	103,9		-----	104,6 (C)
1'	129,1		-----	130,6 (C)
2' e 6'	129,0	<b>H-2',6'</b> 7,40 d (8,5)	<b>H-2',6'</b> 7,40 d (8,7)	129,2 (CH)
3' e 5'	115,4	<b>H-3',5'</b> 6,90 d (9,0)	<b>H-3',5'</b> 6,90 d (8,7)	116,2 (CH)
4'	158,4		-----	158,8 (C)
1''	99,8	<b>H-1''</b> 5,26 dd (7,5;4,5)	<b>H-1''</b> 5,26 d (7,8)	100,9 (C)
2''	71,7	<b>H-2''</b> 3,70 dd (9,5; 7,5)	<b>H-2''</b> 3,70 m	72,9 (CH)
3''	77,7	<b>H-3''</b> 5,23 m	<b>H-3''</b> 5,24 m	78,4 (CH)
4''	68,0	<b>H-4''</b> 3,92 $\approx$ d (7,5)	<b>H-4''</b> 3,80 m	69,3 (CH)
5''	77,3	<b>H-5''</b> 3,75 m	<b>H-5''</b> 3,75 m	77,8 (CH)
6''	60,8	<b>H-6''<sup>a</sup></b> 3,75 m <b>H-6''<sup>b</sup></b> 3,75 m	<b>H-6''<sup>a</sup></b> 3,75 m <b>H-6''<sup>b</sup></b> 3,92 m	62,1 (CH <sub>2</sub> )
1'''	126,0		-----	127,1 (C)
2''' e 6'''	130,8	<b>H-2''',6'''</b> 7,55 d (8,5)	<b>H-2''',6'''</b> 7,56 d (8,7)	131,0 (CH)
3''' e 5'''	116,4	<b>H-3''', 5'''</b> 6,90 d (8,5)	<b>H-3''', 5'''</b> 6,90 d (8,7)	116,8 (CH)
4'''	160,3		-----	160,6 (C)
7'''	145,1	<b>H-7'''</b> 7,65 d (16,0)	<b>H-7'''</b> 7,65 d (15,9)	145,6 (CH)
8'''	115,9	<b>H-8'''</b> 6,38 d (16,0)	<b>H-8'''</b> 6,40 d (15,9)	115,4 (CH)
9'''	168,7		-----	167,5 (C)



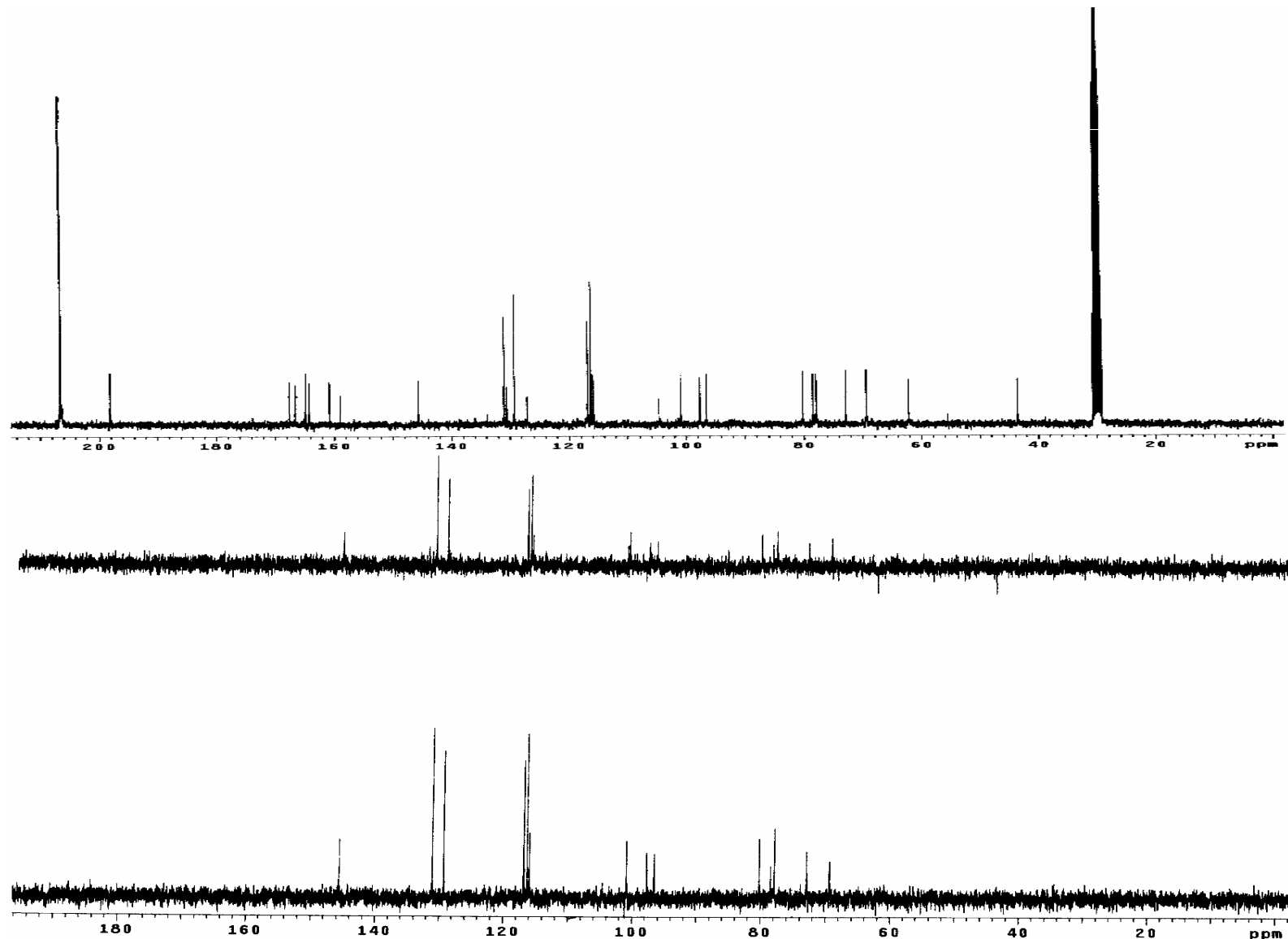
**Figura 24:** Espectro de IV (KBr) para a substância **MF-4** - 7-O-β-[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina.



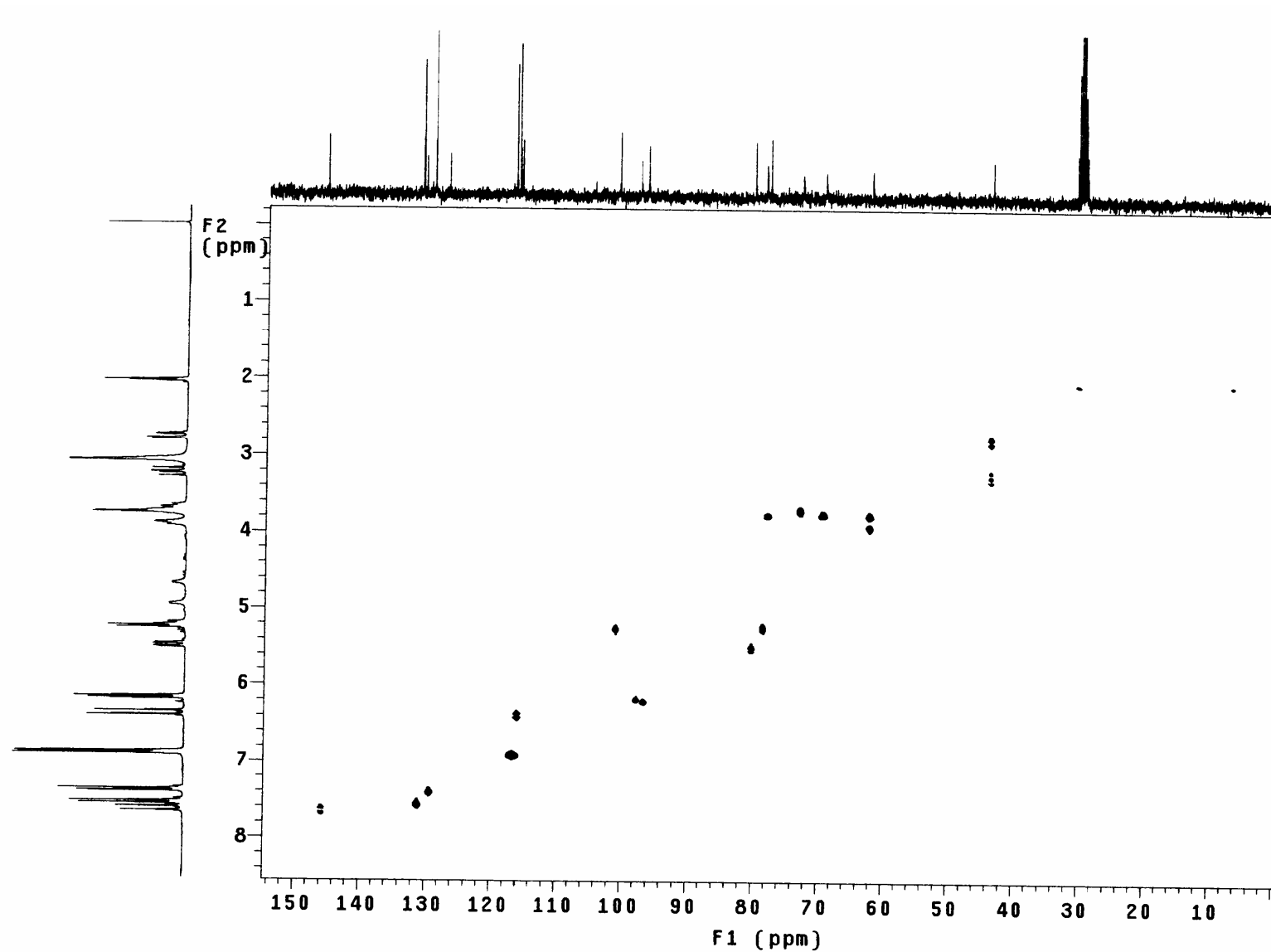
**Figura 25:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substância MF-4 - 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (300,06 MHz) em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .



**Figura 26:** Espectro de <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H COSY para a substância MF-4 - 7-O-β-[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO.



**Figura 27:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT para a substância MF-4 - 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (75,45 MHz) em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .



**Figura 28:** Espectro de HMQC para a substância **MF-4** - 7-O-β-[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO.

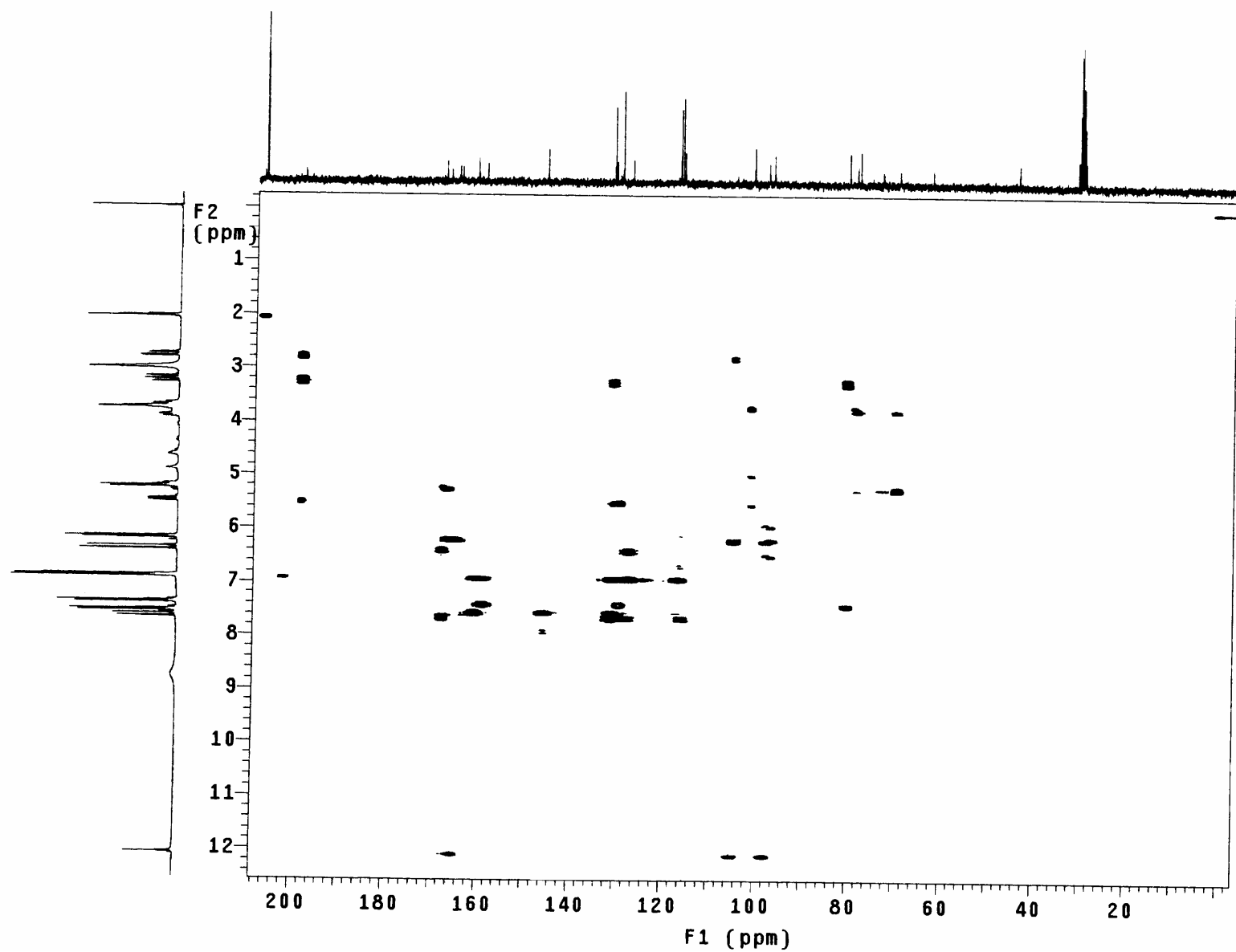
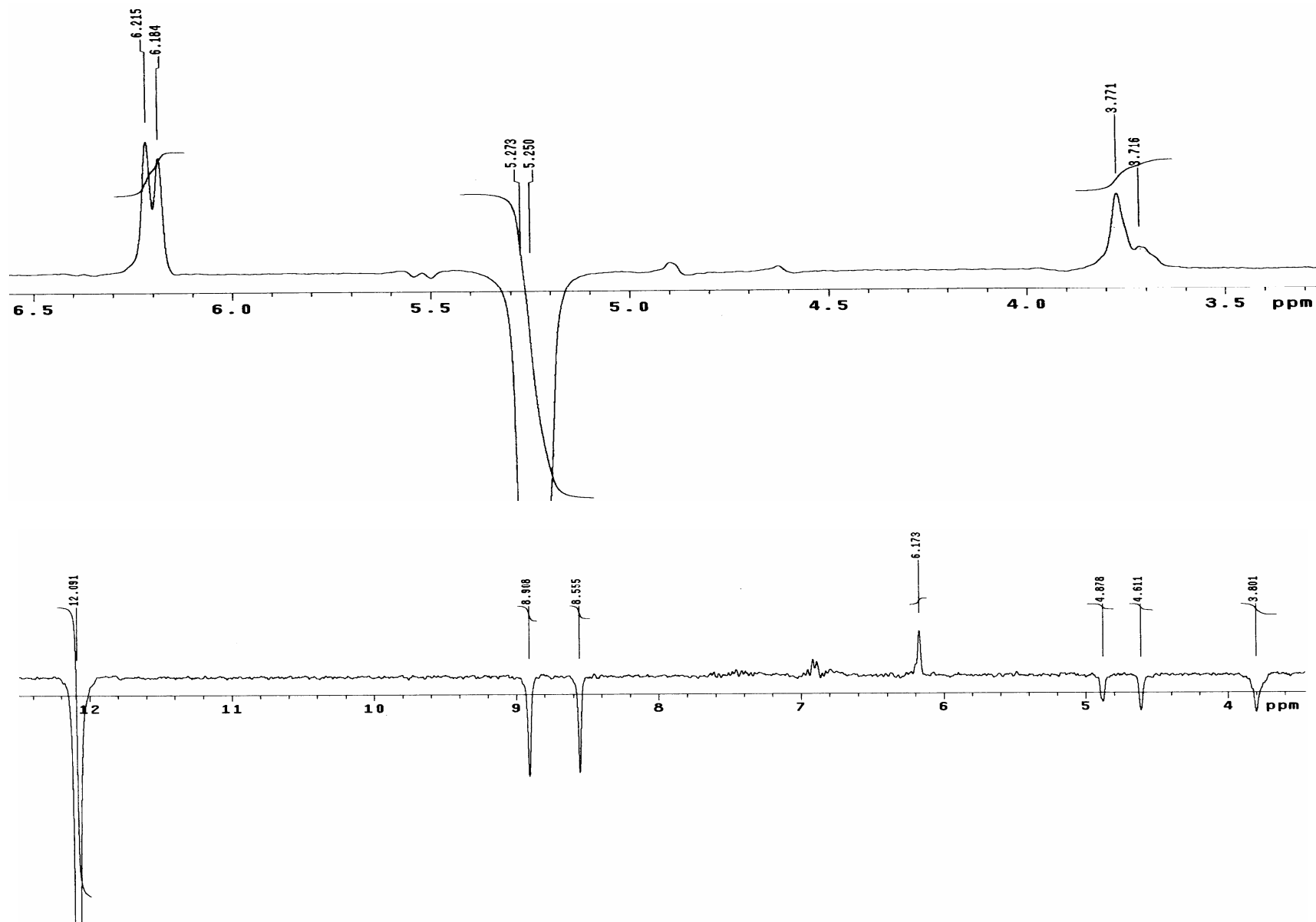


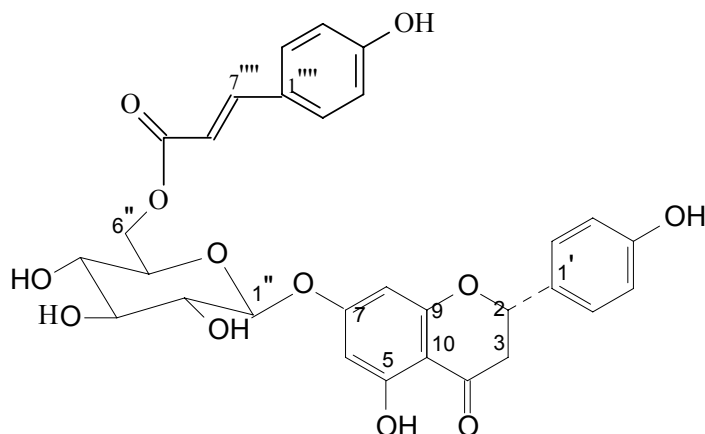
Figura 29: Espectro de HMBC para a substância MF-4 - 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO.





**Figura 30:** Espectro de diferença de NOE em  $C_2D_6CO$  de **MF-4** - 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em  $C_2D_6CO$ .

#### 4.2.5. Composto MF-7



(MF-7)

A substância **MF-7** foi isolada como um precipitado amarelado da fração MF-ECS 12 da coluna do extrato etanólico das cascas das sementes após cromatografia em CCDP.

Observaram-se no espectro de IV (Figura 32) bandas de transmissão em  $3388\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração de estiramento -OH, uma banda em  $1700\text{ cm}^{-1}$  relativa à vibração de estiramento C=O da carbonila do grupamento do anel **C** e bandas em  $1640$  e  $1604\text{ cm}^{-1}$  referentes respectivamente à vibração de estiramento C=O e de C=C  $\alpha, \beta$  insaturada.

Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 33) da substância **MF-7** foi possível caracterizar a unidade aglicona como sendo uma flavanona, pelos sinais de dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,37, e 7,51, integração de dois hidrogênios cada e ambos com acoplamento *orto* ( $J = 8,7\text{ Hz}$ ) com um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,89, integração de quatro hidrogênios correspondentes aos hidrogênios (H-3'/5') do anel **B** da flavanona e H-3''/5'' do grupo coumaroil. O anel **A** da flavanona foi evidenciado pela presença dos sinais de hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,16 e 6,22, integração de um hidrogênio cada, com padrão de acoplamento *meta* ( $J = 2,4\text{ Hz}$ ) correspondentes aos hidrogênios H-6 e H-8. Por meio das correlações homonucleares  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  observada no espectro de COSY (Figura 34), pode-se confirmar os acoplamentos descritos anteriormente entre os hidrogênios aromáticos H-2''/6'' com H-3''/5'' do anel **B** da flavanona e H-2''/6'' com H-3''/5'' do grupo coumaroil. Além destes também foram observados sinais em  $\delta_{\text{H}}$  12,11, 8,63 e 8,99 correspondentes às hidroxilas fenólicas dos anéis **A** e **B** da flavanona e a do grupo coumaroil.

Os sinais de hidrogênio em  $\delta_H$  5,45 (3,0 e 12,9 Hz, dd), integração de um hidrogênio;  $\delta_H$  2,78 (3,0 e 17,3 Hz, dd), integração de um hidrogênio e  $\delta_H$  3,26 (12,9 e 17,3 Hz, dd), integração de um hidrogênio, evidenciam deslocamentos, acoplamentos e multiplicidades característicos do anel C da flavanona em sua conformação meia cadeira assumida preferencialmente. Estes sinais podem ser atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2, H-3<sup>ax</sup> e H-3<sup>eq</sup>. Pelo espectro de COSY (Figura 34) pode-se confirmar a existência do acoplamento axial entre os hidrogênios H-2 e H-3<sup>ax</sup> e equatorial entre os hidrogênios H-2 e H-3<sup>eq</sup> e também o acoplamento geminal entre os hidrogênios H-3<sup>ax</sup> e H-3<sup>eq</sup>.

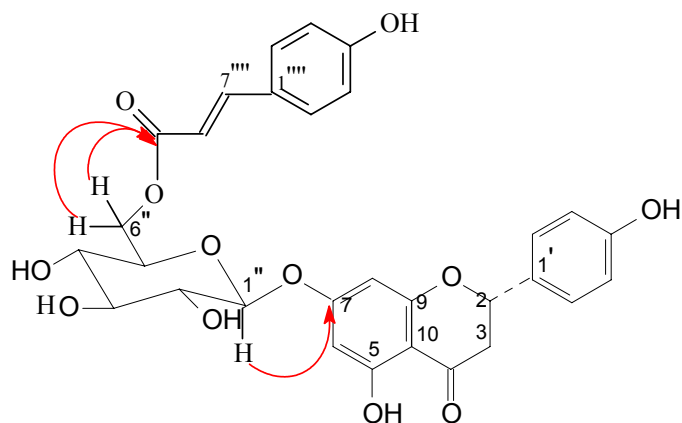
O espectro de RMN <sup>13</sup>C e DEPT (Figura 35) mostrou-se característico de uma flavanona pelos sinais em  $\delta_C$  42,9 correspondentes ao carbono metilênico,  $\delta_C$  79,4 carbono metínico,  $\delta_C$  197,4 referente à carbonila e  $\delta_C$  158,2 correspondente ao carbono aromático ligado a hidroxila, além dos outros atribuídos aos carbonos aromáticos.

As correlações entre <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (<sup>1</sup>J, <sup>2</sup>J e <sup>3</sup>J) obtidas através dos espectros de HMQC (Figura 36) e HMBC (Figura 37), confirmam a estrutura proposta para a unidade aglicona como sendo a da naringenina, assim como para as substâncias **MF-6** e **MF-4 (3)**.

A presença da unidade glicosídica foi evidenciada pela presença do carbono anomérico em  $\delta_C$  100,3 o qual está correlacionado com o hidrogênio em  $\delta_H$  5,14 ( $J = 7,8$  Hz, d, H-1''), integração de um hidrogênio, através do espectro de HMQC (Figura 36). Esta foi caracterizada como sendo a glucose, pela presença do carbono metilênico em  $\delta_C$  63,6 (C-6'') o qual se correlaciona com os hidrogênios em  $\delta_H$  4,29 (6,9 e 11,9 Hz, dd, H-6''<sup>a</sup>), e  $\delta_H$  4,57 (2,1 e 11,9 Hz, dd, H-6''<sup>b</sup>), ambos com integração de um hidrogênio (Figura 33).

A constata de acoplamento de ( $J = 7,8$  Hz) para a glucose indica que o hidrogênio anomérico encontra-se em posição axial, levando a uma configuração  $\beta$  para o carbono anomérico (C-1'').

A posição da glucose foi estabelecida com base na correlação heteronuclear <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C a três ligações (<sup>3</sup>J) observada pelo espectro de HMBC (Figura 37) entre o hidrogênio anomérico H-1'' ( $\delta_H$  5,14) com o carbono da flavanona C-7 ( $\delta_C$  166,0) (Figura 31).



**Figura 31:** Principais correlações observadas no espectro de HMBC de **MF-7**.

Por meio do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 33) observaram-se sinais para uma unidade coumaroila, sendo esta evidenciada pelos sinais para hidrogênios olefínicos com acoplamento *trans* em  $\delta_{\text{H}} 7,60$  ( $J = 15,9$  Hz, d) e  $\delta_{\text{H}} 6,36$  ( $J = 15,9$  Hz, d), ambos com integração de um hidrogênio e os hidrogênios ligados a anéis aromáticos em  $\delta_{\text{H}} 7,51$  ( $J = 8,7$  Hz, d), integração de dois hidrogênios e  $\delta_{\text{H}} 6,89$  ( $J = 8,4$  Hz, d), integração para quatro hidrogênios. Por meio do espectro de HMBC (Figura 37) pode-se verificar a correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a duas ligações ( $^2J$ ) do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 6,36$  com o carbono da carbonila em  $\delta_{\text{C}} 166,9$  sendo este então o H- $\alpha$  (H-8'') e a correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a três ligações ( $^3J$ ) da carbonila com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 7,60$  sendo este, portanto o H- $\beta$  (H-7'').

A unidade coumaroila pode ser confirmada pelos sinais de carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{C}} 145,1$  e  $115,6$ , pelo sinal de carbono de carbonila em  $\delta_{\text{C}} 166,9$  e pelos sinais de carbonos aromáticos. Observou-se no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 33) sinal de carbono aromático ligado à hidroxila da unidade coumaroila em  $\delta_{\text{C}} 160,1$ .

Os deslocamentos e sinais observados anteriormente estão em concordância com os dados encontrados para a substância **MF-4 (3)** que foi caracterizada como 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina, divergindo apenas na correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a três ligações ( $^3J$ ) do carbono da carbonila do grupamento coumaroila em  $\delta_{\text{C}} 166,9$  com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 4,29$  ( $J = 6,6$  e  $11,9$  Hz, 1H, dd, H-6''<sup>a</sup>) e  $\delta_{\text{H}} 4,57$  ( $J = 2,1$  e  $11,9$  Hz, 1H, dd, H-6''<sup>b</sup>) observada pelo espectro de HMBC (Figura 37) para **MF-7** e em **MF-4 (3)** foi observada correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  ( $^3J$ ) entre o hidrogênio H-3'' e o carbono carbonílico do grupamento coumaroila.

Pela correlação entre o carbono da carbonila do radical coumaroil com os hidrogênios H-6'' observada no espectro de HMBC (Figura 37) confirmou-se a posição do grupamento coumaroila estando este ligado ao carbono C-6'' da glucose (Figura 31).

As correlações heteronucleares  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  do espectro de HMQC (Figura 36), auxiliaram na atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios da substância **MF-7**.

A análise das correlações homonucleares  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  observadas para o espectro de COSY (Figura 34) confirmou os acoplamentos descritos anteriormente, os quais estão apresentados na Tabela 21.

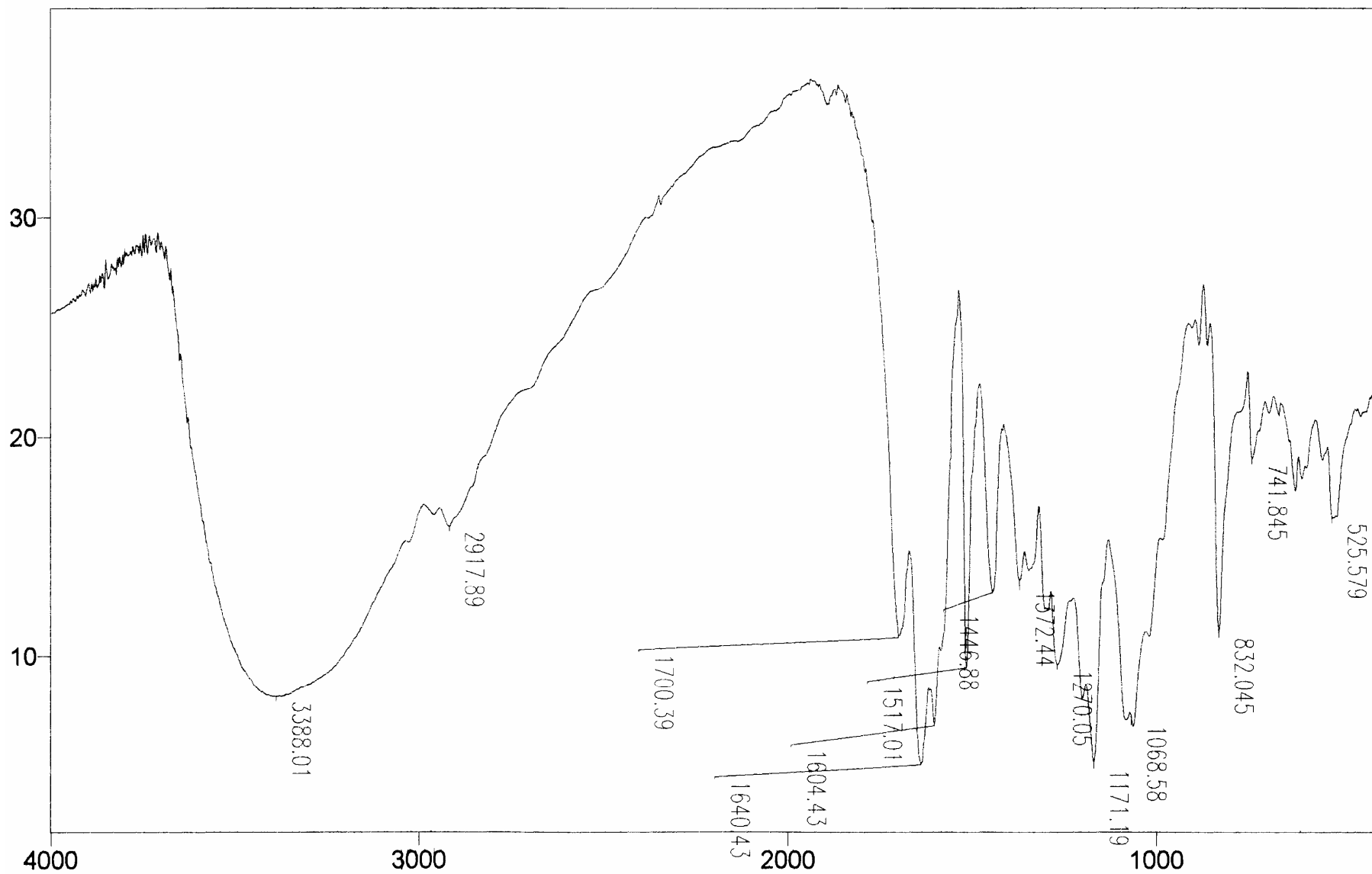
**Tabela 21:** Correlações homonucleares  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  observadas no espectro de COSY de **MF-7** em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .

$\delta ^1\text{H}$ (mult., $J$ Hz, H)	$\delta ^1\text{H}$ (mult., $J$ Hz, H)
6,16 (d, $J = 2,4$ Hz, H-6)	6,22 (d, $J = 2,4$ Hz, H-8)
5,45 (dd, $J = 12,9$ e $3,0$ Hz, H-2)	2,76 (dd, $J = 3,0$ e $17,25$ Hz, H-3 <sup>eq</sup> )
	3,21 (dd, $J = 12,9$ e $17,25$ Hz, H-3 <sup>ax</sup> )
2,76 (dd, $J = 3,0$ e $17,25$ Hz, H-3 <sup>eq</sup> )	3,21 (dd, $J = 12,9$ e $17,25$ Hz, H-3 <sup>ax</sup> )
6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3'/5')	7,37 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2'/6')
6,90 (d, $J = 8,7$ Hz, H-3''/5'')	7,51 (d, $J = 8,7$ Hz, H-2''/6'')
7,60 (d, $J = 15,9$ Hz, H- $\beta$ )	6,40 (d, $J = 15,9$ Hz, H- $\alpha$ )

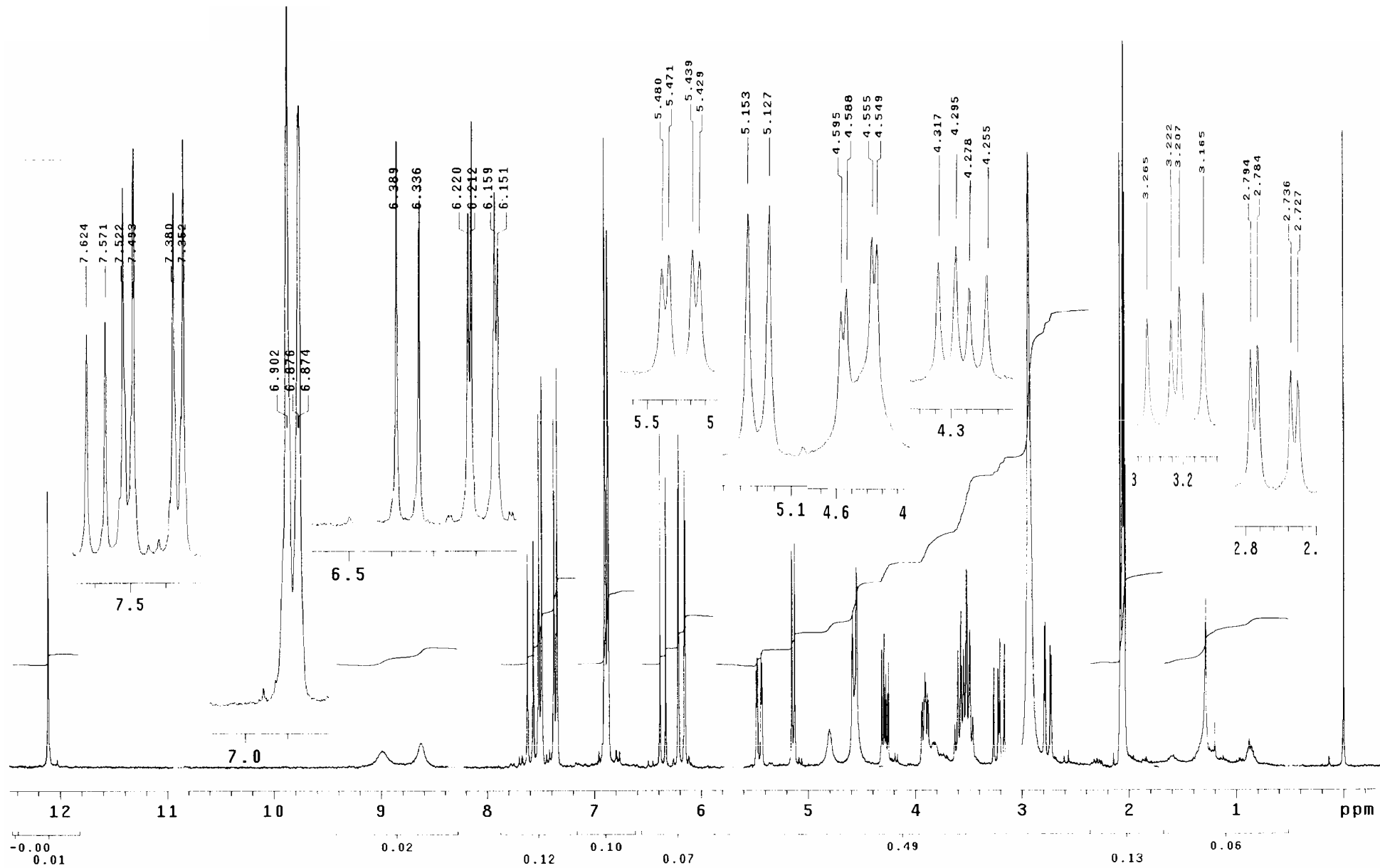
A concordância dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **MF-7** com os dados da literatura para 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina<sup>63</sup> (**4**) (Tabela 22) confirmou a estrutura proposta.

**Tabela 22:** Dados de  $^{13}\text{C}$  (75,45 MHz) e valores de RMN 2D (300,06 MHz em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) para o composto **MF-7 (4)** e comparação com dados da literatura<sup>63</sup> ( $^{13}\text{C}^a$ , HMQC<sup>a</sup>).

C	$\delta^{13}\text{C}^a$	HMQC <sup>a</sup> ( $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ ) $\delta^1\text{H}$ mult. (JHz)	HMQC( $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ ) $\delta^1\text{H}$ mult (JHz)	$\delta^{13}\text{C}$ / (DEPT)
2	78,6	<b>H-2</b> 5,50 d (12,0)	<b>H-2</b> 5,45 dd (12,9; 3,0)	79,4 (CH)
3	42,0	<b>H-3<sup>eq</sup></b> 2,70-4,15m <b>H-3<sup>ax</sup></b> 2,70-4,15 m	<b>H-3<sup>eq</sup></b> 2,76 dd (17,3; 3) <b>H-3<sup>ax</sup></b> 3,21 dd (17,3;12,9)	42,9 (CH <sub>2</sub> )
4	197,2		-----	197,4 (C)
OH-5	163,0		12,09 s	164,2 (C)
6	96,3	<b>H-6</b> 6,22 sl	<b>H-6</b> 6,16 d (2,4)	96,9 (CH)
7	165,0		-----	166,0 (C)
8	95,5	<b>H-8</b> 6,22 sl	<b>H-8</b> 6,22 d (2,4)	96,0 (CH)
9	162,6		-----	163,4 (C)
10	103,3		-----	104,0 (C)
1'	128,6		-----	130,0 (C)
2' e 6'	128,4	<b>H-2',6'</b> 7,35 d (8,5)	<b>H-2',6'</b> 7,37 d (8,7)	128,5 (CH)
3' e 5'	115,1	<b>H-3',5'</b> 6,83d (9)	<b>H-3',5'</b> 6,90 d (8,7)	116,1 (CH)
4'	157,7		-----	158,2 (C)
1''	99,2	<b>H-1''</b> 5,13 dl (6)	<b>H-1''</b> 5,14 d (7,8)	100,3 (C)
2''	72,9	<b>H-2''</b> 2,70-4,15 m	<b>H-2''</b> 3,52 m	73,9 (CH)
3''	76,1	<b>H-3''</b> 2,70-4,15 m	<b>H-3''</b> 3,60 m	77,1 (CH)
4''	69,8	<b>H-4''</b> 2,70-4,15 m	<b>H-4''</b> 3,50 m	70,6 (CH)
5''	73,8	<b>H-5''</b> 2,70-4,15 m	<b>H-5''</b> 3,91 m	74,6 (CH)
6''	63,3	<b>H-6''<sup>a</sup></b> 4,41 m <b>H-6''<sup>b</sup></b> 4,41 m	<b>H-6''<sup>a</sup></b> 4,29 dd (2,1 e 11,9) <b>H-6''<sup>b</sup></b> 4,57 dd (6,6 e 11,9)	63,6 (CH <sub>2</sub> )
1'''	125,0		-----	126,4 (C)
2''' e 6'''	130,3	<b>H-2''',6'''</b> 7,55 d (9)	<b>H-2''',6'''</b> 7,51 d (8,7)	130,4 (CH)
3''' e 5'''	115,7	<b>H-3''',5'''</b> 6,83 d (9)	<b>H-3''',5'''</b> 6,9 d (8,7)	116,1 (CH)
4'''	159,8		-----	160,1 (C)
7'''	144,9	<b>H-7'''</b> 7,59d (16)	<b>H-7'''</b> 7,60d (15,9)	145,1 (CH)
8'''	113,9	<b>H-8'''</b> 6,63 d (16)	<b>H-8'''</b> 6,40 d (15,9)	115,6 (CH)
9'''	166,4		-----	166,9 (C)



**Figura 32:** Espectro de IV (filme) para a substância **MF-7** - 7-O-β-[(6''-p-coumaroil)glucopiranosil] naringenina.



**Figura 33:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substância MF-7 - 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (300,06 MHz) em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .



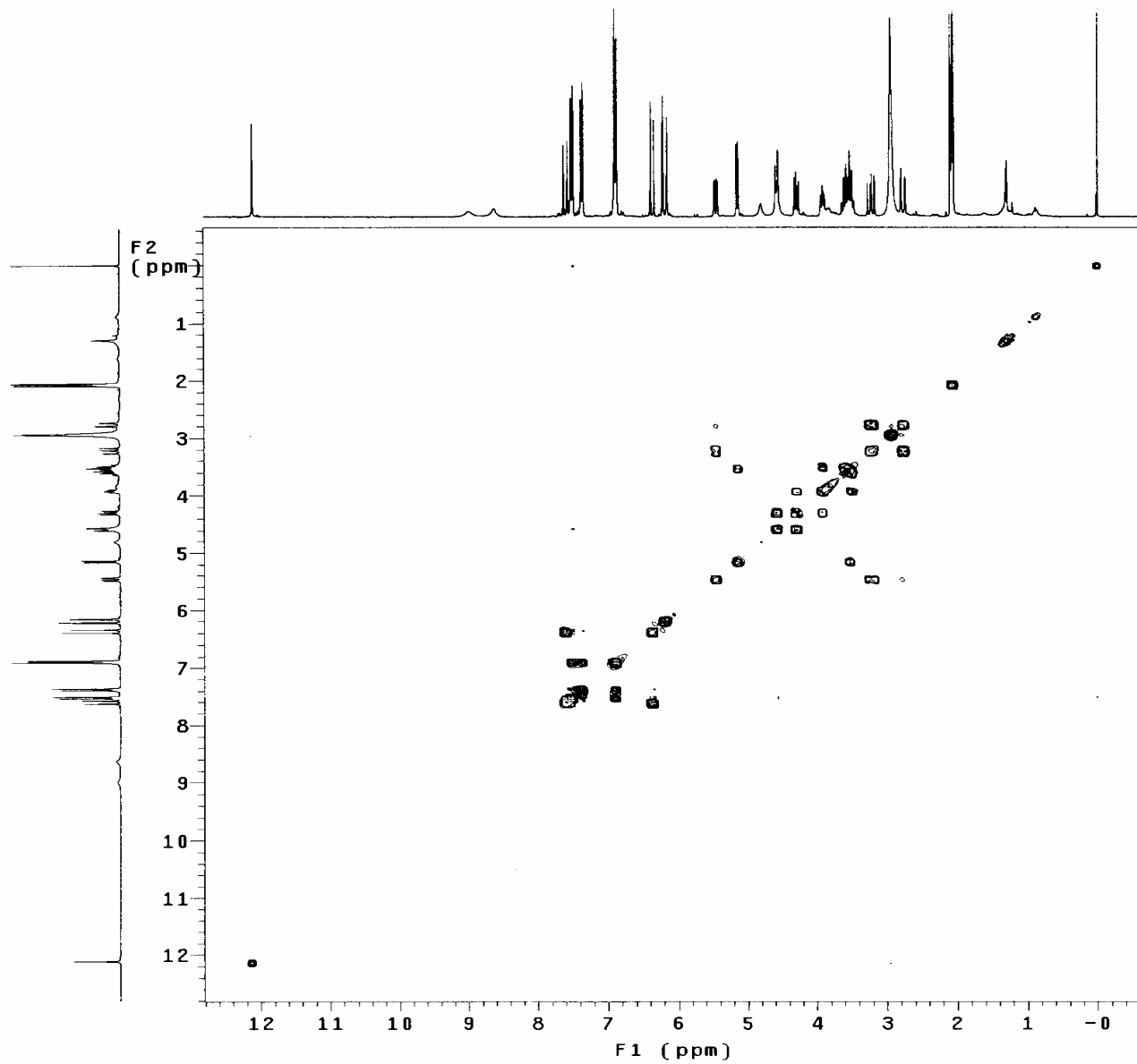


Figura 34: Espectro de COSY para a substância **MF-7** - 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em  $C_2D_6CO$ .

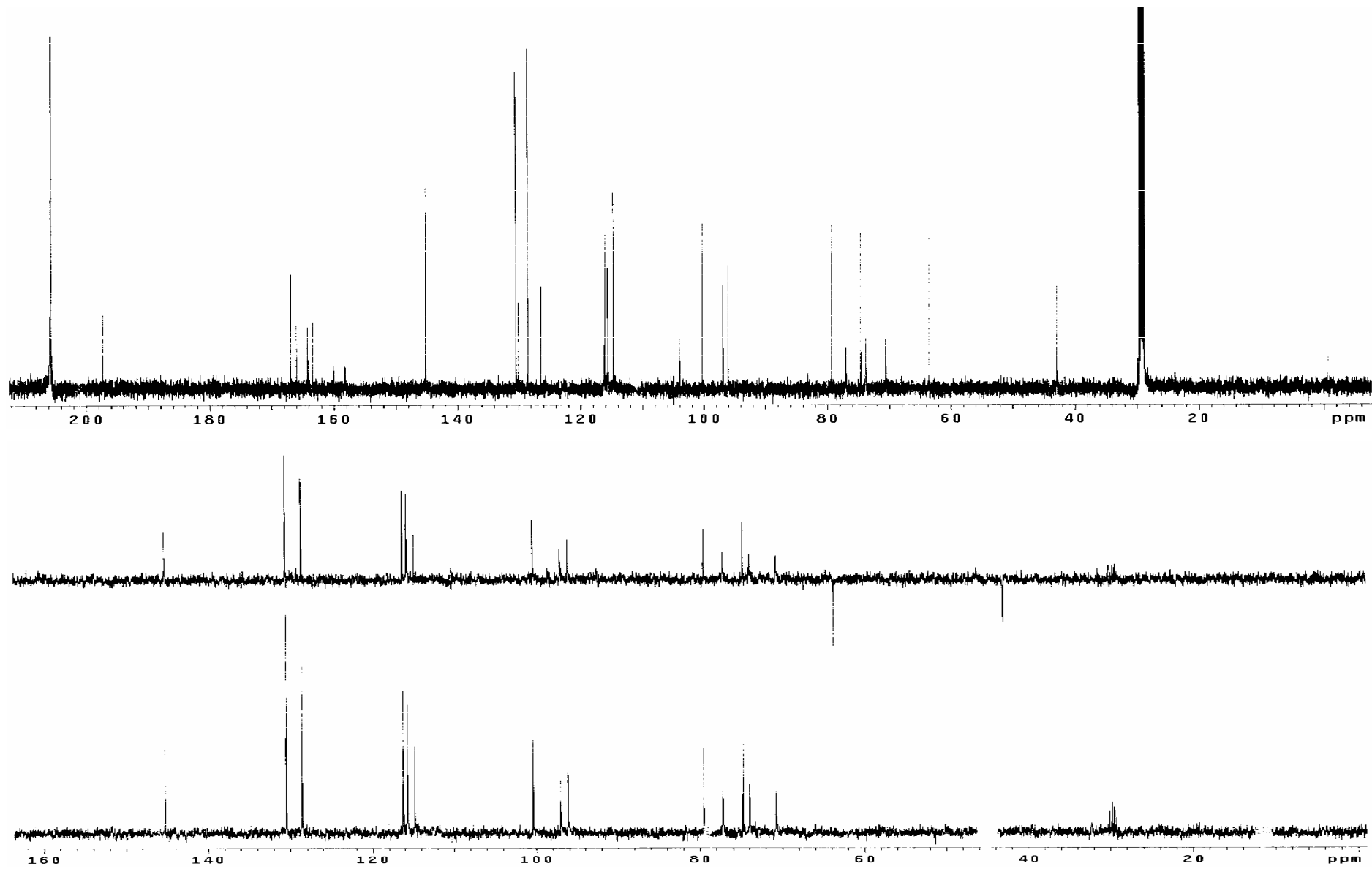
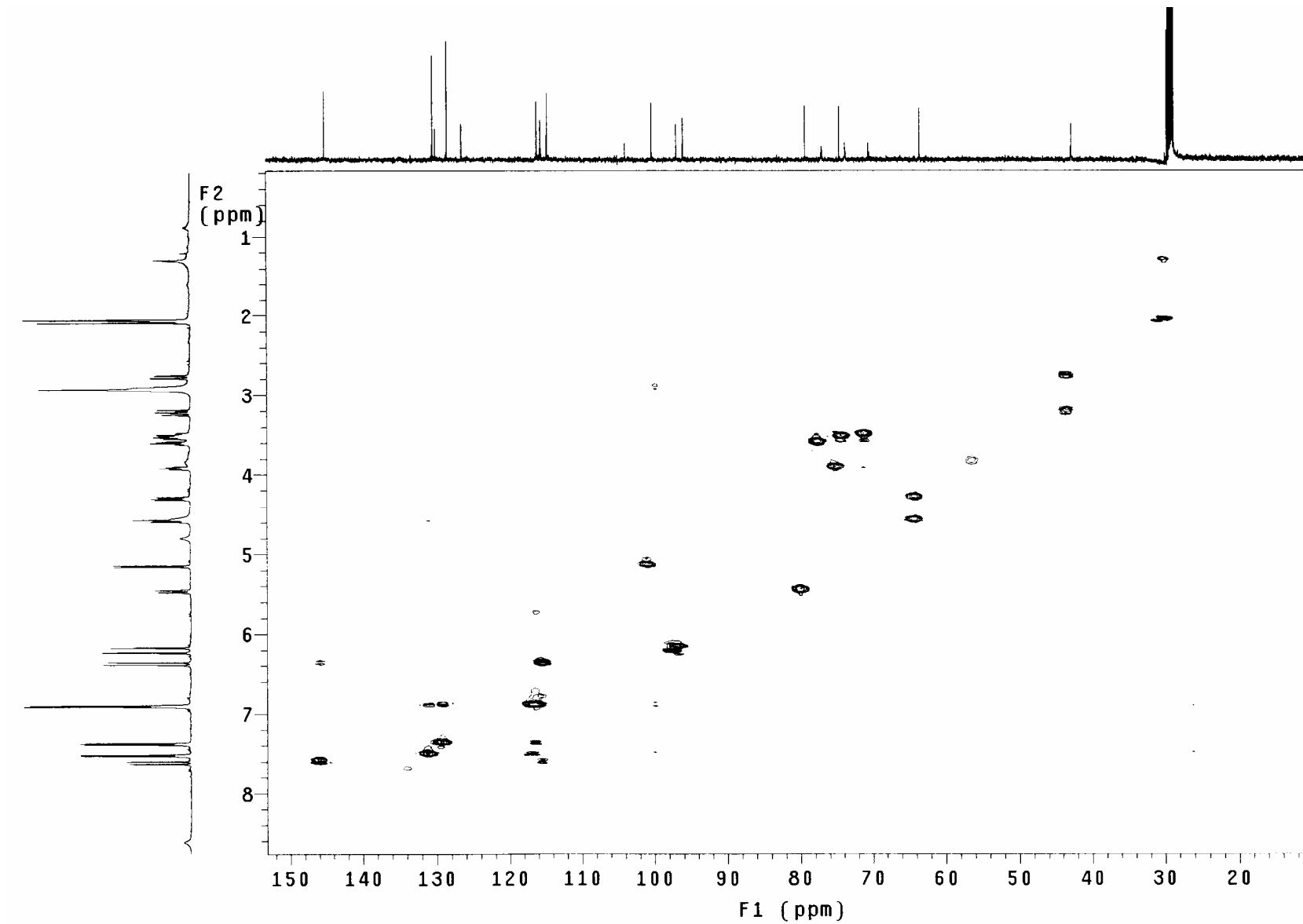
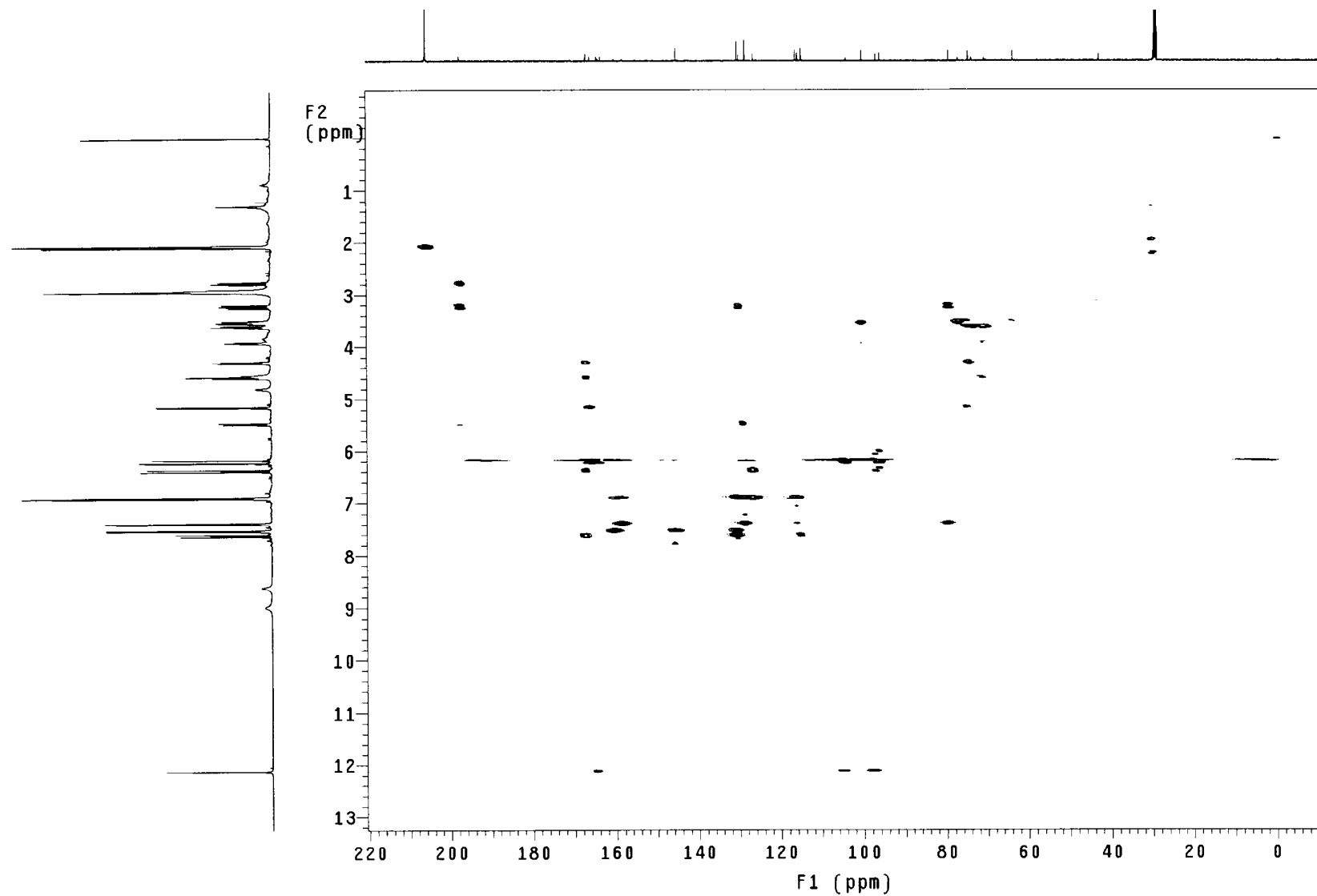


Figura 35: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT para a substância MF-7 - 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (75,45 MHz) em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .

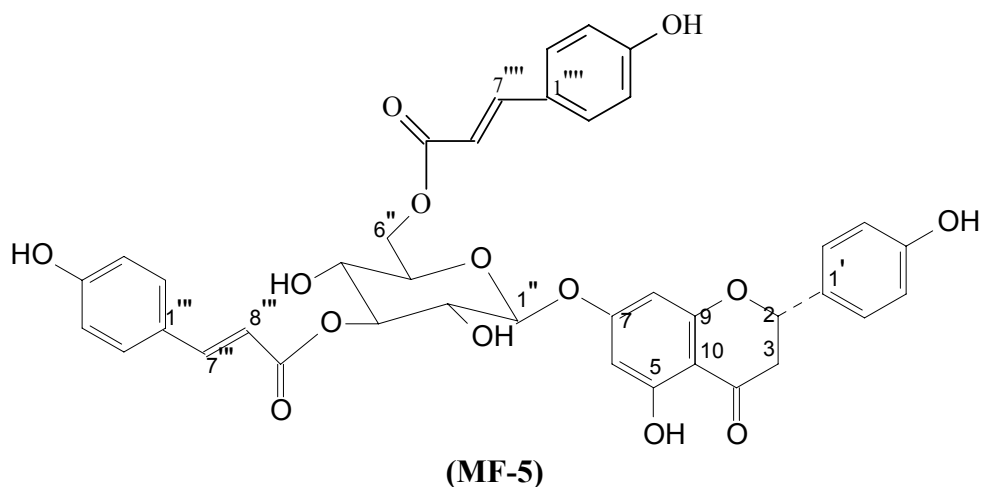


**Figura 36:** Espectro de HMQC para a substância **MF-7** - 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .



**Figura 37:** Espectro de HMBC para a substância **MF-7** - 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .

#### 4.2.6. Composto MF-5



Pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 39) da substância **MF-5** isolada da fração MF-ECS 10 da coluna do extrato etanólico das cascas das sementes na forma de um precipitado branco, pode-se observar sinais característicos de uma flavanona, tais como os sinais de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,06 e 6,12, integração de um hidrogênio cada, com padrão de acoplamento *meta* ( $J = 2,1$  Hz) correspondentes aos hidrogênios do anel **A** da flavanona (H-6 e H-8) e dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,26 e 6,77, integração de dois hidrogênios cada, acoplando entre si com constante de acoplamento *orto* ( $J = 8,7$  Hz) correspondentes aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5' do anel **B** da flavanona. Por meio das correlações homonucleares  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  observadas no espectro de COSY (Figura 40), pode-se confirmar os acoplamentos descritos anteriormente entre os hidrogênios aromáticos H-6 e H-8 do anel **A** e H-2'/6' com H-3'/5' do anel **B**. Além destes também foram observados sinais em  $\delta_{\text{H}}$  12,00 e 8,44 ambos com integração para um hidrogênio, correspondendo às hidroxilas fenólicas dos anéis **A** e **B** da flavanona.

O anel **C** da flavanona foi confirmado pelos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 39) em  $\delta_{\text{H}}$  2,64 ( $J = 17,25$  e 3,0 Hz, dd), integração equivalente a um hidrogênio, em  $\delta_{\text{H}}$  3,11 ( $J = 17,25$  e 12,9 Hz, dd), integração de um hidrogênio e em  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ( $J = 12,9$  e 3,0 Hz, dd), integração para um hidrogênio, estes deslocamentos químicos, constante de acoplamento e multiplicidades são típicos de H-3<sup>eq</sup>, H-3<sup>ax</sup> e H-2 do anel **C** de uma flavanona.

O anel **C** como discutido anteriormente possui preferencialmente a conformação meia cadeira, onde observam-se claramente os acoplamentos equatorial e axial entre os hidrogênios H-3<sup>eq</sup> e H-2 com constante de acoplamento  $J = 3,0$  Hz e entre H-3<sup>ax</sup> e H-2 com constante de acoplamento  $J = 12,9$  Hz. A constante de acoplamento  $J = 17,25$  Hz entre os hidrogênios H-3<sup>eq</sup> e H-3<sup>ax</sup> concorda com o acoplamento geminal entre eles.

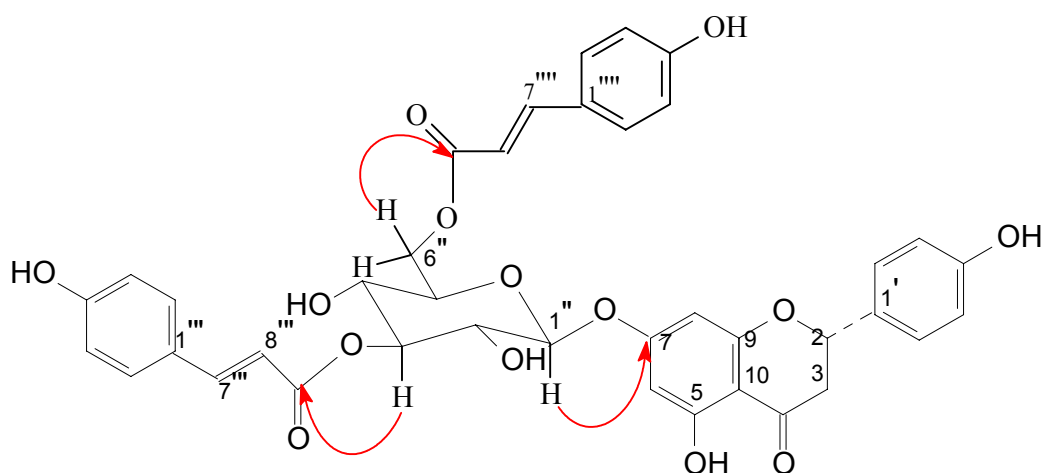
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Figura 41) é característico de uma flavanona pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  43,5 correspondente ao carbono metilênico, em  $\delta_{\text{C}}$  80,1 para o carbono metínico, em  $\delta_{\text{C}}$  198,1 correspondente ao deslocamento do carbono da carbonila,  $\delta_{\text{C}}$  158,9 correspondente ao carbono aromático do anel **B** ligado à hidroxila e em  $\delta_{\text{C}}$  164,9 correspondente ao carbono aromático do anel **A** ligado à hidroxila, além dos demais sinais atribuídos a carbonos aromáticos.

Os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento observados para a unidade aglicona e comparação com dados da literatura<sup>19</sup> levaram a estrutura da naringenina, assim como para as demais flavanonas isoladas.

A unidade glicosídica foi evidenciada pela presença do carbono anomérico em  $\delta_{\text{C}}$  100,8 o qual se correlaciona com o hidrogênio  $\delta_{\text{H}}$  5,20 ( $J = 7,8$  Hz, dd) pelo espectro de HMQC (Figura 42) e pela presença do carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  63,9 (C-6'') o qual se correlaciona pelo HMQC com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4,46 ( $J = 12,0$  e 2,0 Hz, dd) e em  $\delta_{\text{H}}$  4,24 ( $J = 12,0$  e 6,0 Hz, dd). A presença do carbono metilênico C-6'' leva à estrutura da glucose.

A constante de acoplamento de ( $J = 7,8$  Hz) para a glucose indica que o hidrogênio anomérico encontra-se em posição axial, levando a uma configuração  $\beta$  para o carbono anomérico. Este valor corresponde a um acoplamento do tipo axial-axial com o hidrogênio H-2'' ( $\delta_{\text{H}}$  3,63, m) que pode ser observado no espectro de COSY (Figura 40). Pelas demais correlações entre os hidrogênios do açúcar (Figura 40) e entre estes e seus respectivos carbonos (Figura 42) foi possível atribuir aos hidrogênios em:  $\delta_{\text{H}}$  5,13 ( $J = 9,3$  Hz, t) à posição 3'' o qual se correlaciona com carbono em  $\delta_{\text{C}}$  78,2 (C-3''), o maior deslocamento deste hidrogênio indica uma substituição neste carbono, em  $\delta_{\text{H}}$  3,68 (m) correlação com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  69,6 (C-4''); em  $\delta_{\text{H}}$  3,97 ( $J = 6,3$ ; 6,3 e 2,0 Hz, ddd) correlacionado com 75,2 (C-5''); em  $\delta_{\text{H}}$  4,24 ( $J = 12,0$  e 6,0 Hz, dd) e 4,46 ( $J = 12,0$  e 2,0 Hz, dd) ambos correlacionados com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  63,9 (C-6'').

A posição da glucose foi estabelecida com base na correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a três ligações ( $^3J$ ) observada pelo espectro de HMBC (Figura 43), entre o hidrogênio anomérico H-1'' ( $\delta_{\text{H}}$  5,20) com o carbono C-7 da flavanona em  $\delta_{\text{C}}$  166,4 (Figura 38).



**Figura 38:** Principais correlações observadas no espectro de HMBC de **MF-5**.

Por meio do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 39) observaram-se sinais para duas unidades coumaróilas, sendo evidenciada pelos sinais para hidrogênios olefínicos com acoplamento *trans* em  $\delta_{\text{H}}$  6,27, 6,26, 7,49 e 7,53 (integração de um hidrogênio cada). Por meio do espectro de HMBC (Figura 43) pode-se verificar a correlação heteronuclear  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  dos carbonos das carbonilas em  $\delta_{\text{C}}$  167,4 e 167,5 a duas ligações ( $^2J$ ) com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,26 e 6,27, sendo estes portanto os hidrogênios H- $\alpha$  (H-8''') e as correlações heteronucleares  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  a três ligações ( $^3J$ ) das carbonilas anteriormente citadas com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  7,49 e 7,53, sendo estes os hidrogênios H- $\beta$  (H-7''').

Outra evidência da existência de duas unidades coumaróila é o sinal da hidroxila correspondente a este grupo em  $\delta_{\text{H}}$  8,80 ter integração para dois hidrogênios e ainda o fato de se observar sempre dois carbonos de deslocamentos muito próximos para o grupamento coumaróila, sendo que o mesmo não ocorre para os carbonos da glucose e tão pouco para a flavanona. Isso pode ser evidenciado pela presença de dois carbonos correspondentes aos carbonos  $\beta$  (C-7''') em  $\delta_{\text{C}}$  145,9 e 145,7 e em  $\delta_{\text{C}}$  115,2 e 115,8 correspondentes aos carbonos  $\alpha$  (C-8''') e pela duplicação dos sinais de deslocamentos típicos dos aromáticos do grupo coumaróila (Tabela 23).

Outra evidencia da existência de dois grupos coumaróila é a presença de quatro dupletos na região de aromático com constante de acoplamento *orto* em  $\delta_{\text{H}}$  7,41 ( $J = 8,7$  Hz, d),  $\delta_{\text{H}}$  7,45 ( $J = 8,4$  Hz, d),  $\delta_{\text{H}}$  6,78 ( $J = 8,7$  Hz, d) e  $\delta_{\text{H}}$  6,76 ( $J = 8,4$  Hz, d), integração de dois hidrogênios cada, além dos já discutidos dupletos pertencentes ao anel **B** da unidade aglicona. A posição dos dois grupamentos coumaróila pode ser evidenciada pelas correlações entre os carbonos das carbonilas em  $\delta_{\text{C}}$  167,5 e 167,4 com os hidrogênios do açúcar em  $\delta_{\text{H}}$  5,13 (H-3'')

e em  $\delta_H$  4,24 (H-6'') a três ligações ( $^3J$ ) (Figura 43). Porém devido à proximidade dos deslocamentos das carbonilas não foi possível definir qual estaria na posição 3'' e qual estaria na posição 6''.

As correlações entre  $^1H$  e  $^{13}C$  ( $^1J$ ,  $^2J$  e  $^3J$ ) obtidas através dos espectros de HMQC (Figura 42) e HMBC (Figura 43) e comparação dos deslocamentos de hidrogênio com os encontrados na literatura<sup>19</sup> (

Tabela 24) confirmam a estrutura proposta para a substância **MF-5**, como sendo 7-O- $\beta$ [(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**2**).

A comparação dos espectros da substância isolada da fração MF-ECS II.13.4.S.2 que por comparação de Rf com a substância isolada da fração MF-ECS 10 recebeu também a denominação de **MF-5** confirmou que realmente se trata da mesma substância.

**Tabela 23:** Dados de RMN  $^{13}C$  (75,45 MHz) para **MF-5** em  $C_2D_6CO$ .

$\delta^{13}C$ (flavanona)	$\delta^{13}C$ ( <i>p</i> -coumaroil)	$\delta^{13}C$ (glucosil)
80,06 (C-2)	127,03 (C-1''')	100,8 (C-1'')
43,51 (C-3)	127,00 (C-1''')	72,8 (C-2'')
198,10 (C-4)	131,03 (C-2'''/6''')	78,2 (C-3'')
164,87 (C-5)	131,10 (C-2'''/6''')	69,6 (C-4'')
97,56 (C-6)	116,82 (C-3'''/5''')	75,2 (C-5'')
166,40 (C-7)	116,78 (C-3'''/5''')	63,9 (C-6'')
96,66 (C-8)	160,81 (C-4''')	
164,08 (C-9)	160,84 (C-4''')	
104,68 (C-10)	145,70 (C-7''')	
130,56 (C-1')	145,90 (C-7''')	
129,15 (C-2'/6')	115,25 (C-8''')	
158,92 (C-4')	115,77 (C-8''')	
116,29 (C-3'/5')	167,51 (C-9''')	
	167,44 (C-9''')	



**Tabela 24:** Dados de  $^1\text{H}$  (300,06 MHz) para o composto **MF-5 (2)** ( $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ ) e comparação com dados da literatura<sup>19</sup> ( $\delta^1_{\text{H}^a}$ ).

H	$\delta^1_{\text{H}^a}$ (mult., J Hz)	$\delta^1_{\text{H}}$ (mult., J Hz)
H-2	5,40 dd (12,9 e 3,0)	5,35 dd (12,9 e 3,0)
H-3 <sup>eq</sup>	2,77 dd (17,0 e 3,0)	2,64 dd (17,3 e 3,0)
H-3 <sup>ax</sup>	3,21 dd (17,0 e 12,5)	3,11 dd (17,3 e 12,9)
HO-5	11,50 s	12,00
H-6	6,20 d (2,0)	6,06 d (2,1)
H-8	6,25 d (2,0)	6,12 (2,1)
H-2'/6'	7,51 d (8,5)	7,26 d (8,7)
H-3'/5'	6,90 d (9,0)	6,77 d (8,7)
H-1''	5,32 d (7,5)	5,20 d (7,8)
H-2''	3,78 dd (9,0 e 7,5)	3,63 m
H-3''	5,28 t (9,0)	5,13 t (9,3)
H-4''	3,78 dd (9,0 e 7,5)	3,68 m
H-5''	4,08 ddd (9,5; 6,0 e 2,0)	3,97 ddd (6,3; 6,3 e 2,0)
H-6''	4,37 dd (12,0 e 2,0) 4,60 dd (12,0 e 6,0)	4,46 dd (12,0 e 2,0) 4,24 dd (12,0 e 6,0)
H-2'''/6'''	7,37 d (8,5) 7,56 d (8,5)	7,41 d (8,7) 7,45 d (8,7)
H-3'''/5'''	6,90 d (8,4) 6,90 d (8,5)	6,76 d (8,4) 6,78 d (8,4)
H-8'''	6,38 d (16,0) 6,40 d (16,0)	6,26 d (15,9) 6,27 d (15,9)
H-7'''	7,62 d (16,0) 7,67 d (16,0)	7,49 d (15,9) 7,53 d (15,9)

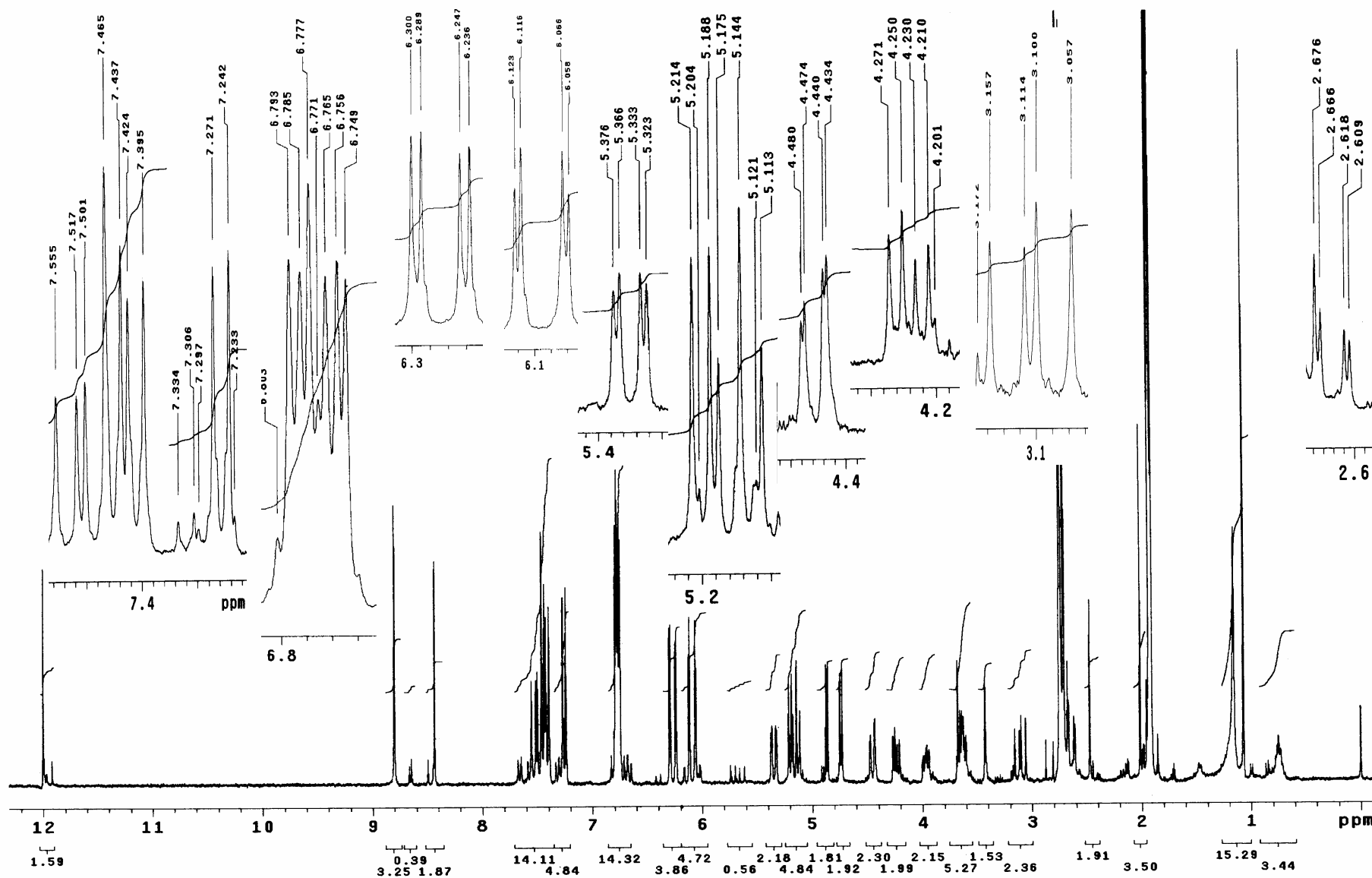
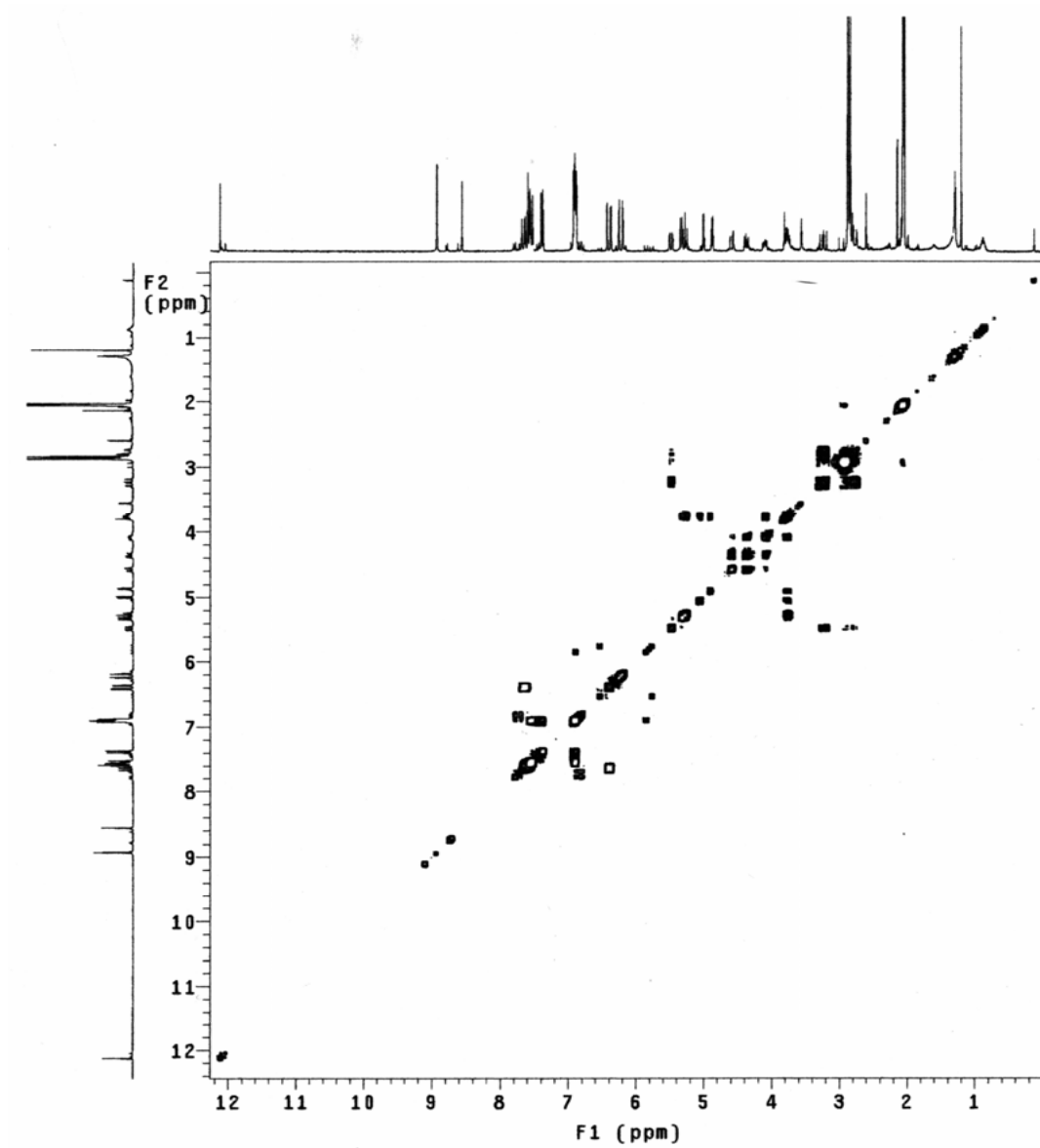


Figura 39: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substâncias MF-5 - 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (300,06 MHz) em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .



**Figura 40:** Espectro de COSY para a substância **MF-5** - 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO.

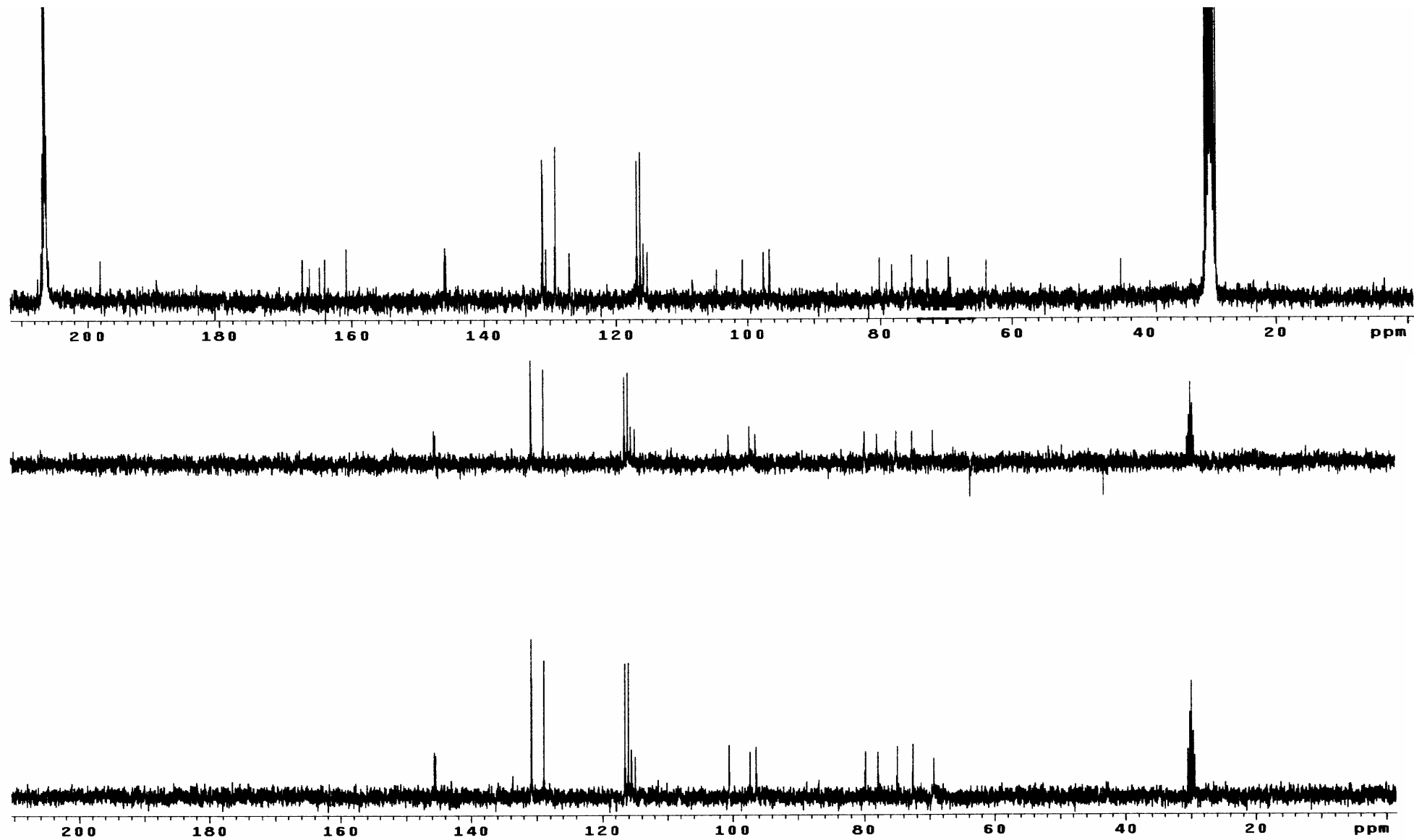


Figura 41: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  para a substância MF-5 - 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (75,45 MHz) em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .

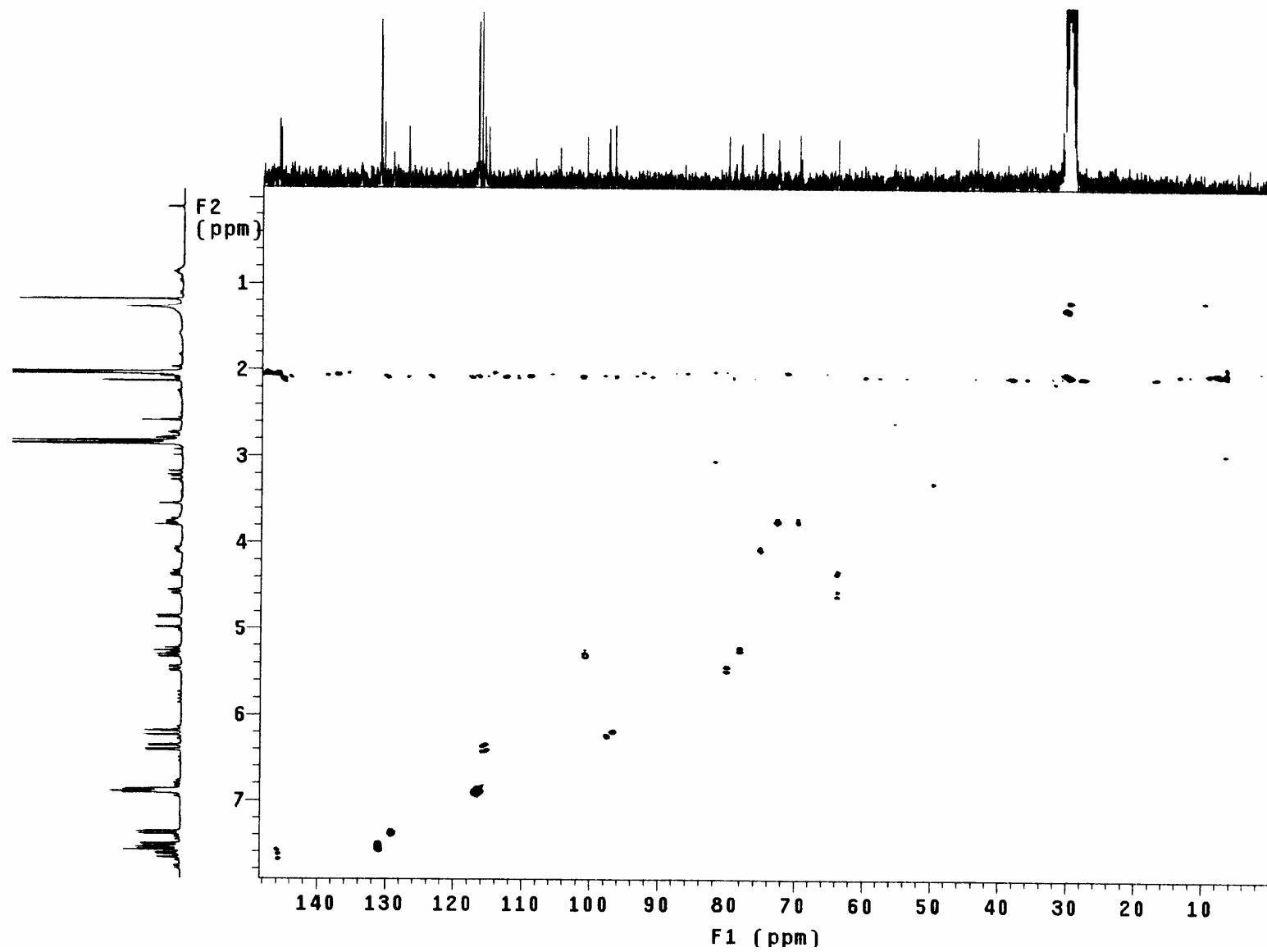
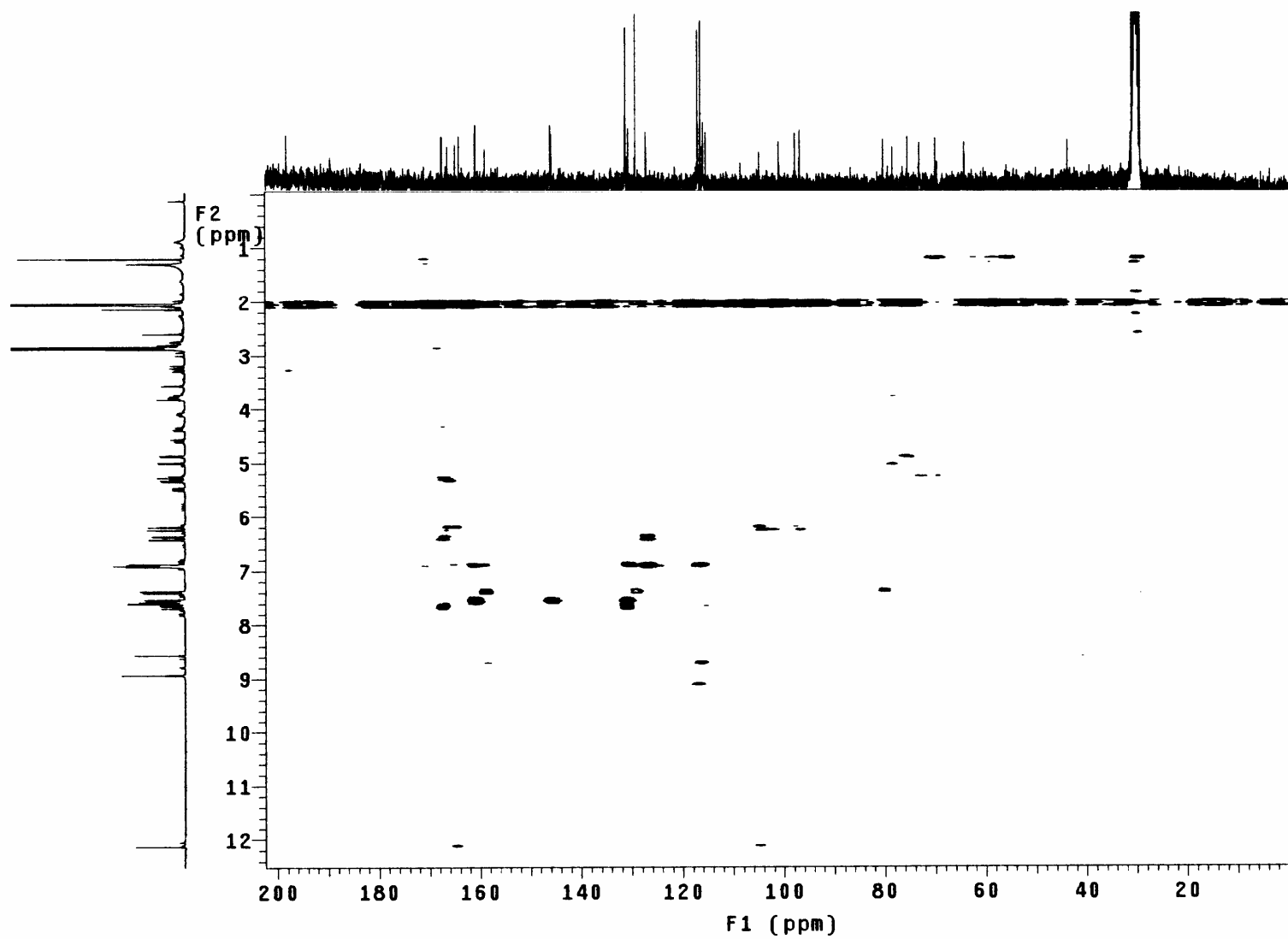
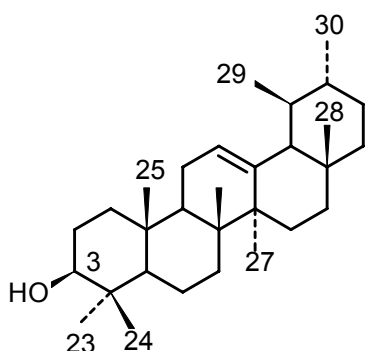


Figura 42: Espectro de HMQC para a substância MF-5 - 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em  $\text{C}_2\text{D}_6\text{CO}$ .

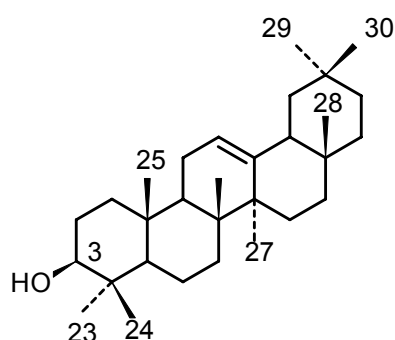


**Figura 43:** Espectro de HMBC para a substância **MF-5** - 7-O-β-[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina em C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO.

#### 4.2.7. Composto MF-8



**MF-8a** ( $\alpha$ -amirina)



**MF-8b** ( $\beta$ -amirina)

Através do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 44) pode-se observar dois tripletos, ambos com integração para um hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,13 ( $J = 3,6$  Hz) ligado ao carbono metínico em  $\delta_{\text{C}}$  124,65 (C-12) (Figura 46) e em  $\delta_{\text{H}}$  5,20 ( $J = 3,6$  Hz) ligado ao carbono metínico em  $\delta_{\text{C}}$  121,95 (C-12) (Figura 46). Esses deslocamentos de hidrogênio e carbono são característicos dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina.

Os deslocamentos de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  139,8 (C) e  $\delta_{\text{C}}$  145,4 (C) podem ser atribuídos aos carbonos C-13 e os deslocamentos de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  124,7 e 121,9 aos carbonos C-12 da  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, respectivamente.

O deslocamento de RMN  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (Figura 45) para o carbono C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  79,26 (CH) encontrado está em concordância com o valor encontrado na literatura<sup>64</sup>. Através do espectro de HMQC (Figura 46) atribui-se aos hidrogênios H-3 da  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,22 (m).

Os demais sinais de hidrogênio na região de 0,7-2,3 ppm são característicos de triterpenos.

Por meio dos deslocamentos de hidrogênios e carbonos encontrados e comparação com os deslocamentos de carbono encontrados na literatura<sup>64</sup> confirmaram-se as estruturas propostas.

**Tabela 25:** Dados de deslocamentos de carbono para **MF-8 (a e b)** em CDCl<sub>3</sub> e comparação com dados da literatura<sup>64</sup> para  $\beta$ -amirina<sup>a</sup>,  $\alpha$ -amirina<sup>a</sup>.

C	$\beta$ -amirina <sup>a</sup>	<b>MF-8b</b>	$\alpha$ -amirina <sup>a</sup>	<b>MF-8a</b>
1	38,7 (CH <sub>2</sub> )	39,0	38,7 (CH <sub>2</sub> )	38,8
2	27,3 (CH <sub>2</sub> )	27,4	27,2 (CH <sub>2</sub> )	27,5
3	79,0 (CH)	79,3	78,3 (CH)	79,3
4	38,8 (C)	38,6	38,7 (C)	38,3
5	55,3 (CH)	55,4	55,2 (CH)	55,4
6	18,5 (CH <sub>2</sub> )	18,6	18,3 (CH <sub>2</sub> )	18,3
7	32,8 (CH <sub>2</sub> )	32,7	32,9 (CH <sub>2</sub> )	33,2
8	38,8(C)	38,3	40,0 (C)	40,3
9	47,7 (CH)	47,9	47,7 (CH)	47,9
10	37,6 (C)	37,6	36,9 (C)	37,2
11	23,6 (CH <sub>2</sub> )	23,8	23,3 (CH <sub>2</sub> )	23,6
12	121,8 (CH)	121,9	124,3 (CH)	124,7
13	145,1 (C)	145,4	139,3 (C)	139,8
14	41,8 (C)	41,8	42,0 (C)	42,3
15	26,2 (CH <sub>2</sub> )	26,4	28,7 (CH <sub>2</sub> )	29,6
16	27,0 (CH <sub>2</sub> )	27,2	26,6 (CH <sub>2</sub> )	26,8
17	32,5 (C)	32,9	33,7 (C)	34,0
18	47,4 (CH)	47,4	58,9 (CH)	59,3
19	46,9 (CH <sub>2</sub> )	47,0	39,6 (CH)	39,2
20	31,1 (C)	31,3	39,6 (CH)	39,9
21	34,8 (CH <sub>2</sub> )	35,0	31,2 (CH <sub>2</sub> )	31,3
22	37,2 (CH <sub>2</sub> )	37,4	41,5 (CH <sub>2</sub> )	41,9
23	28,2 (CH <sub>3</sub> )	28,3	28,1 (CH <sub>3</sub> )	28,6
24	15,5 (CH <sub>3</sub> )	15,7	15,6 (CH <sub>3</sub> )	15,9
25	15,6 (CH <sub>3</sub> )	15,8	15,6 (CH <sub>3</sub> )	15,9
26	16,9 (CH <sub>3</sub> )	17,0	16,8 (CH <sub>3</sub> )	17,1
27	26,0 (CH <sub>3</sub> )	26,2	23,3 (CH <sub>3</sub> )	23,5
28	28,4 (CH <sub>3</sub> )	28,6	28,1 (CH <sub>3</sub> )	28,2
29	33,3 (CH <sub>3</sub> )	33,6	17,4 (CH <sub>3</sub> )	17,7
30	23,7 (CH <sub>3</sub> )	23,9	21,3 (CH <sub>3</sub> )	21,6



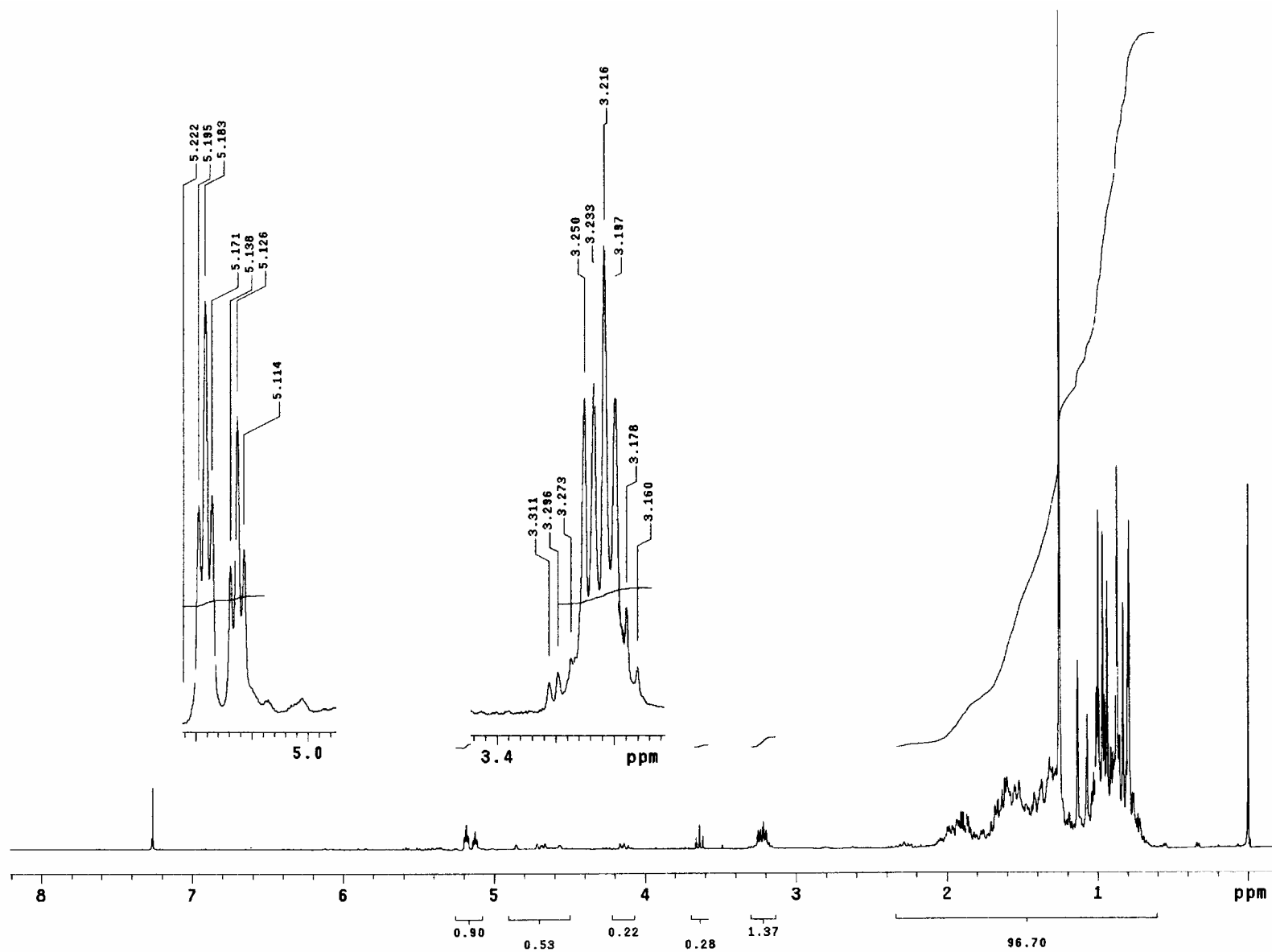


Figura 44: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para a substância MF-8 ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirina) (300,06 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ .

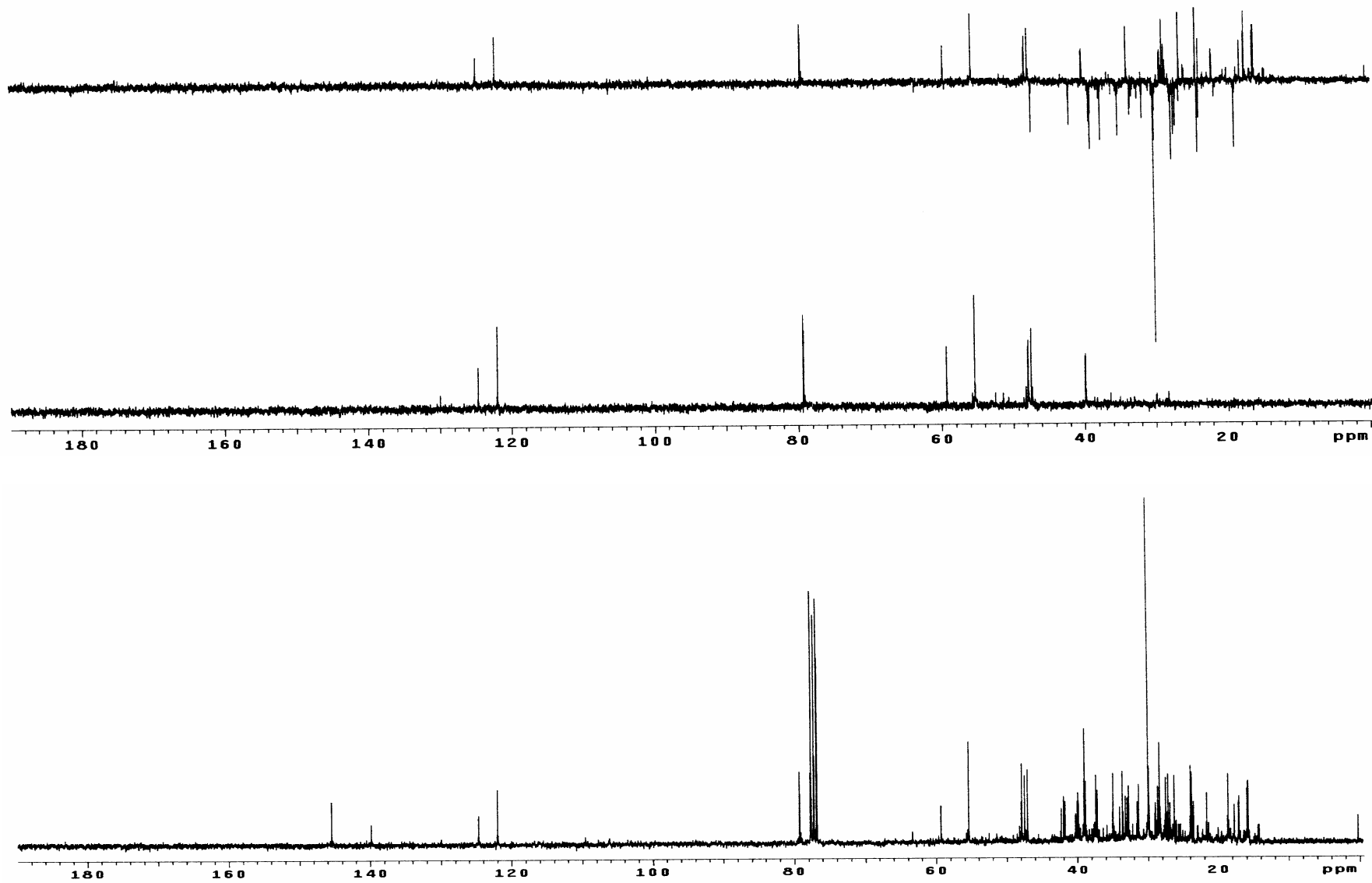


Figura 45: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT da mistura MF-8 ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirina) (75,45 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ .

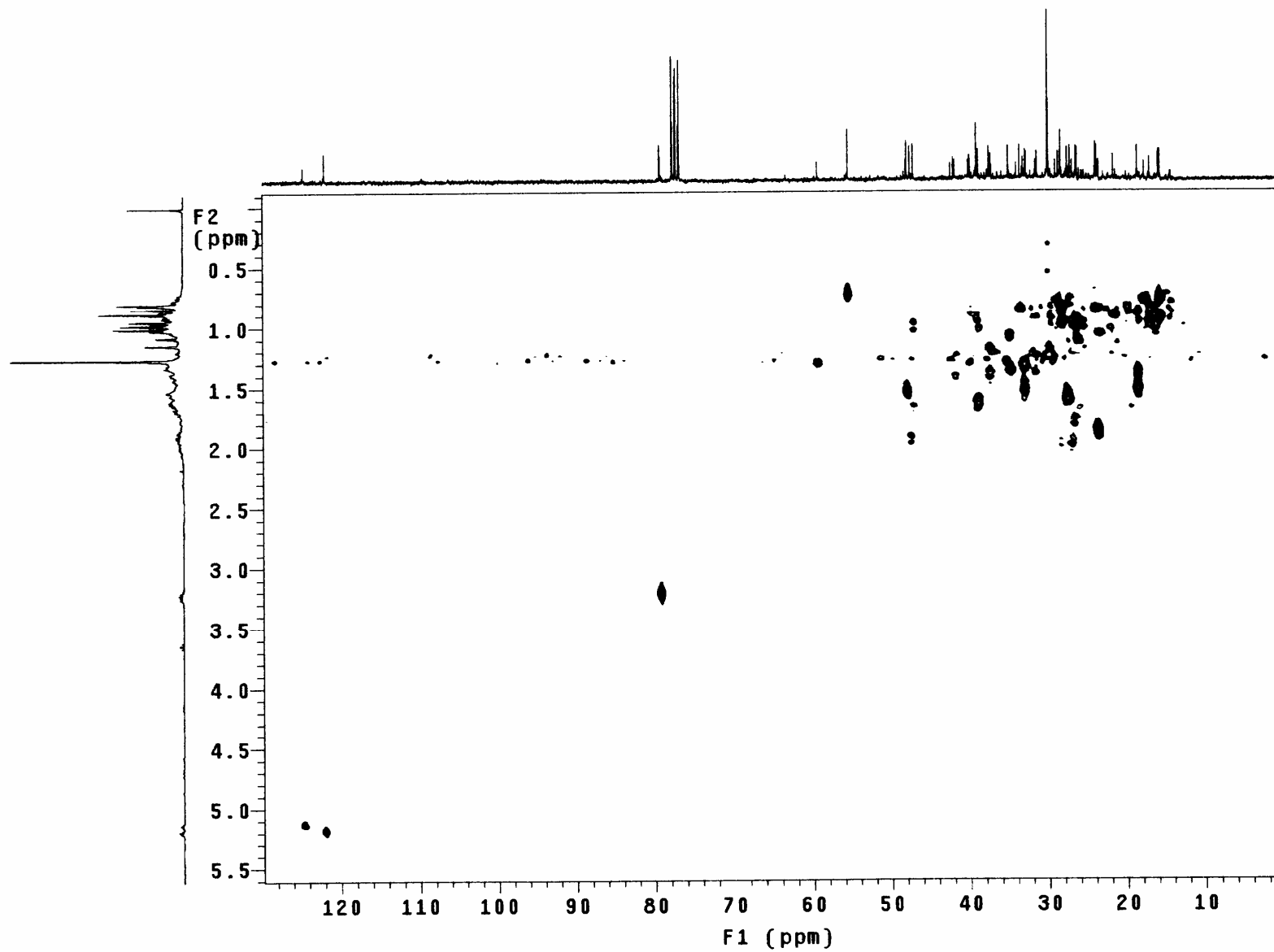


Figura 46: Espectro de HMQC para MF-8 ( $\alpha$  e  $\beta$ -amirina) em  $\text{CDCl}_3$ .

## 5. CONCLUSÕES

Através da revisão bibliográfica realizada pode-se observar que não constam relatos de uso na medicina popular, assim como não constam relatos de estudo fitoquímico da planta *Mabea fistulifera* Mart.

O estudo fitoquímico das folhas e cascas das sementes resultou no isolamento e identificação de: duas misturas de hidrocarbonetos de cadeia longa, quatro flavanonas glicosiladas e duas misturas de triterpenos.

Através do levantamento bibliográfico observou-se que a substância **MF-3a**, identificada como sendo o  $\beta$ -sitosterol, **MF-3b** identificada com sendo o estigmasterol, **MF-8a** caracterizada como  $\alpha$ -amirina e **MF-8b** identificada como  $\beta$ -amirina ainda não haviam sido isoladas neste gênero apesar de terem sido isoladas de outros gêneros da família Euphorbiaceae.

As substâncias isoladas: **MF-4** identificada como sendo 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**3**) ; **MF-5** identificada como 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**2**) e **MF-7** identificada como 7-O- $\beta$ -[(6''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**4**) já haviam sido isoladas de outras duas espécies do gênero *Mabea*<sup>19,20</sup>.

O composto 7-O- $\beta$ -glucopiranosil naringenina (**MF-6**) apesar de já ter sido isolado<sup>63</sup> de várias outras espécies ainda não havia sido relatado no gênero em estudo.

O isolamento das flavanonas 7-O- $\beta$ -[(3'',6''-di-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**2**) e 7-O- $\beta$ -[(3''-*p*-coumaroil)glucopiranosil] naringenina (**3**) de duas outras espécies *Mabea caudata* Peth. e *Mabea fistulifera* subsp. *robusta* e agora também de *Mabea fistulifera* Mart. é significativo do ponto de vista quimiotaxonômico, podendo contribuir para estudos de outras espécies do gênero *Mabea*.

O teste realizado para *Artemia salina* com a espécie em estudo mostrou que todos os extratos etanólicos e as frações MF-CF e MF-BF foram ativos, sendo o extrato etanólico das cascas do caule (MF-ECC) o mais ativo.

Os resultados para os testes antibacteriano e antifúngico demonstraram apenas uma atividade considerada moderada para alguns extratos.

Apenas alguns extratos causaram mortalidade no teste moluscicida, porém não foram considerados moluscicidas potencias, pois apenas os extratos brutos de plantas com concentração abaixo de 100 ppm são considerados ativos.

O teste antioxidante mostrou que todos os extratos etanólicos totais e as frações butanólica e acetato das folhas possuem atividade antioxidante considerável quando comparados ao padrão BHT sendo a fração MF-AF a mais antioxidante, sendo assim esta pode ser alvo para novos estudos, visando o isolamento de substâncias com potencial antioxidante.

De todos os extratos testados somente o extrato MF-EPF reduziu significativamente o volume do exsudato inflamatório e a migração de células no modelo de pleurisia induzida pela carragenina no rato, sugerindo uma possível atividade antiinflamatória.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- <sup>1</sup> C. V. Filho, R. A. Yunes, *Quim. Nova* **1998**, *21*, 99.
- <sup>2</sup> A. D. Kinghorn, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 135.
- <sup>3</sup> R. A. Yunes, R. C. Pedrosa, C. V. Filho, *Quim. Nova* **2001**, *24*, 147.
- <sup>4</sup> R. A. Yunes, J. B. Calixto, *Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*, Ed. Argos, **2001**.
- <sup>5</sup> L. D. Moretto, *Pharm. Technol.* **2000**, *4*, 46.
- <sup>6</sup> R. Capasso, A. A. Izzo, L. Pinto, T. Bifulco, C. Vitobello, N. Mascolo, *Fitoterapia* **2000**, *71*, S58.
- <sup>7</sup> J. B. Calixto, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**, *33*, 179.
- <sup>8</sup> C. Viegas Jr, V. S. Bolzani, E. J. Barreiro, *Quim. Nova* **2006**, *29*, 326.
- <sup>9</sup> G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52.
- <sup>10</sup> Y. Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053.
- <sup>11</sup> G. M. Cragg, S. A. Schepartz, M. Suffiness, E. J. Rozhon, *J. Nat. Prod.* **1997**, *56*, 1657.
- <sup>12</sup> D. D. Soejarto, *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *51*, 1.
- <sup>13</sup> J. S. Luna, A. F. Santos, M. R. F. Lima, M. C. Omena, F. A. C. Mendonça, L. W. Bieber, A. E. G. Sant'Ana, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 199.
- <sup>14</sup> J. P. David, M. Meira, J. M. David, M. L. S. Guedes, *Quim. Nova* **2004**, *27*, 62.
- <sup>15</sup> A. B. JOLY, *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. Editora Nacional, São Paulo, **1987**.
- <sup>16</sup> <http://www.ut.edu.co/fc/0940/gsg/euforbiaceae.pdf>, 14/02/06 às 17:36 h.
- <sup>17</sup> R. D. Daud, R. J. F. Feres, *Rev. Bras. Zool.* **2004**, *21*, 453.
- <sup>18</sup> G. Brooks, A. T. Evans, D. P. Markby, M. E. Harrison, M. A. Baldwin, F. J. Evans, *Phytochemistry*, **1990**, *29*, 1615.
- <sup>19</sup> D. A. D. Barros, M. A. Alvarenga, O. R. Gottlieb, H. E. Gottlieb, *Phytochemistry*, **1982**, *21*, 2107.
- <sup>20</sup> W. S. Garcez, F. R. Garcez, I. Pellicciari, S. M. Hara, F. C. Ferreira, L. Y. Nakasse, J. M. Siqueira, *Planta Med.* **1997**, *63*, 386.
- <sup>21</sup> [www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0129/f01640.htm](http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0129/f01640.htm) - 12k - 09/02/2005 às 9:30h.

- 
- <sup>22</sup> J. L. McLaughlin, C-J. Chang, D. L. Smith, In *Studies in Natural Products Chemistry*, Ed. Atta-ur-Rahman, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam **1991**, 9, 383.
- <sup>23</sup> J. L. McLaughlin, C-J. Chang, D. L. Smith, In *Human Medicinal Agents from Plants*, Kinghorn, A. D. & Balandrin, M. F., eds., Symposium Series N<sup>o</sup>. 534, American Chemical Society, Washington, D.C. **1993**, 112.
- <sup>24</sup> W. D. MacBae, J. B. Hudson, G. H. N. Towers, *J. Ethnopharmacol.* **1988**, 22, 143.
- <sup>25</sup> S. Sahpaz, C. Boris, P. M. Loieau, D. Cortes, R. Hacquemiller, A. Laurens; A. Cavé, *Planta Med.* **1994**, 60, 538.
- <sup>26</sup> C. L. Zani, P. P. G. Chaves, R. Queiroz, A. B. Oliveira, J. E. Cardoso, A. M. G. Anjos, T. S. M. Grandi, *Phytomedicine* **1995**, 2, 47.
- <sup>27</sup> B. N. Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, L. B. Jacobsen, D. E. Nichols; J. L. McLaughlin, *Planta Med.* **1982**, 45, 31.
- <sup>28</sup> J. L. McLaughlin; In *Methods in Plant Biochemistry*, Ed. Hostettmann K., Academic Press, London **1991**, 6, 1.
- <sup>29</sup> J. K. Rupprecht; Y-H. Hui, J. L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 237.
- <sup>30</sup> T. Colman-Saizarbitoria; Z-M. Gu, G-X. Zhao; L. Zeng, J. F. Kozlowski; J. L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.* **1995**, 58, 532.
- <sup>31</sup> R. S. Pereira; T. C. Sumita; M. R. Furlan; A. O. C. Jorge; M. Ueno, *Rev. Saúde Pública* **2004**, 38.
- <sup>32</sup> T. M. A. Alves, A. F. Silva, M. Brandão, T. S. M. Grandi, E. F. A. Smânia, A. Smânia Jr, C. L. Zani, *Mem I. Oswaldo Cruz* **2000**, 95, 367.
- <sup>33</sup> A. Zimmermann, *Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antibacteriana das Folhas de Pedilanthus tithymaloides (L.) Poit (Euphorbiaceae)* - Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá-UEM **2002**, 4.
- <sup>34</sup> Y. K. Park, M. Ikegaki, J. A. S. Abreu, N. M. F. Alcici, *Ciênc. Tecnol. Alimentos* **1998**, 18.
- <sup>35</sup> OMS – Organização Mundial de Saúde. O Controle da Esquistossomose: Segundo Relatório do Comitê de saúde da OMS, Fiocruz, Rio de Janeiro **1994**.
- <sup>36</sup> J. P. Pointier, M. Giboda, *Parasitol. Today*, **1999**, 15, 395.
- <sup>37</sup> A Capron, *Parasitol. Today*, **1998**, 14, 379.
- <sup>38</sup> T. M. S. Silva, C. A. Câmara, T. P. Barbosa, A. Z. Soares, L. C. Cunha, A. C. Pinto, M. D. Vargas, *Bioorgan. Med. Chem.* **2005**, 13, 193.

- 
- <sup>39</sup> D. P. Neves, *Parasitologia Humana*, 7ª edição, Livraria Atheneu- Rio de Janeiro-São Paulo **1998**, capítulo 20,181.
- <sup>40</sup> J. A. A. dos Santos, T. C. B. Tomassini, D. C. D. Xavier, I. M. Ribeiro, M. T. G. Silva, Z. B. Morais Filho. *Molluscicidal Activity of Physalis angulata L. Extracts and Fractions on Biomphalaria tenagophila (d'Orbgny) under Laboratory Conditions*, **1985**.
- <sup>41</sup> L. Pinheiro, D. A. G. Cortez, G. J. Vidotti, M. C. M. Yong, A. G. Ferreira, *Quim. Nova*, **2003**, *26*, 157.
- <sup>42</sup> P. D'Arey, D. W. G. Harron, *Pharm. Int.* **1983**, *4*, 16.
- <sup>43</sup> A. Marston, K. Hostettmann, *Phytochemistry* **1983**, *24*, 639.
- <sup>44</sup> K. Hostettmann, In: *Economic and Medicine Plant Research*; H. Wagner; N. R. Farnsworth; Academic Press, London **1989**, *3*, 73.
- <sup>45</sup> A. C. Reyes, C. Chavarin, M. P. C. Arias, J. Taboada, M. E. Jimenez, *Men. I. Oswaldo Cruz* **1989**, *84*, 34.
- <sup>46</sup> H. Hostettmann, H. Kizu, T. Tomimori, *Planta Med.* **1982**, *44*, 34.
- <sup>47</sup> A. M. D. Zocoler, *Avaliação da Qualidade Fitoquímica e da Capacidade Antioxidante de Extratos das Cascas de Stryphnodendron obovatum Benth (Leguminoae)* - Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá-UEM **2005**, 41.
- <sup>48</sup> [www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/1076-1/index.html](http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/1076-1/index.html) - 11k -03/05/06 às 14:10 h.
- <sup>49</sup> B Halliwell, *Annu. Rev. Nutrition* **1996**, *16*, 33.
- <sup>50</sup> M. H. Gordon, *The mecanism of antioxidant action in vitro*. In: B. J. F. HUDSON, (Ed). *Food antioxidants*, **1988**, *14*, 453.
- <sup>51</sup> J. C. T. Carvalho, *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto: Tecmedd, **2004**.
- <sup>52</sup> S. E. Soares, *Revista de Nutrição*, Campinas, SP, **2002**, *15*, 71.
- <sup>53</sup> <http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoarteinfl.htm>, 09/03/2006 às 09:25h.
- <sup>54</sup> J. B. Harborne and P. M. Dey, *Methods in Plant Biochemistry*. Assays for Bioactivity Academic Press, London **1982**, *6*, 8.
- <sup>55</sup> NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS; Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A, NCCLS: Wayne, PA, 1997.
- <sup>56</sup> E. J. Cho, T. Yokozawa, D. Y. Rhyu, S. C. Kim, N. Shibahara, J. C. Park, *Phytomedicine* **2003**, *10*, 544.



- 
- <sup>57</sup> R. Vinegar, J. F. Truax, J. L. Selph, *Proc. Soc. Exp. Biol.* **1973**, *143*, 711.
- <sup>58</sup> A. C. Reyes, C. Chavarin, M. P. C. Arias, J. Taboada, M. E. Jimenez, *Men. Inst. Oswaldo Cruz* **1989**, *84*, 34.
- <sup>59</sup> T. A. Koleva, V. Beek, J. P. Lissen, A. Groota, L. N. Evstatieva, *Phytochemical Analysis* **2002**, *13*, 8.
- <sup>60</sup> M. S. Blois, *Nature* **1958**, *181*, 1199.
- <sup>61</sup> M. O. F. Goulart, A. E. G. Sant'Ana, R. A. Lima, S. H. Cavalcante, M. G. Carvalho, R. Braz Filho, *Quim. Nova* **1993**, *16*, 95.
- <sup>62</sup> A. K. Matida, M. H. Rossi, E. E. A. Blumenthal, I. T. A. Schuquel, A. Malheiros.& G. J. Vidotti, *An. Assoc. Bras. Quim.* **1996**, *45*, 147.
- <sup>63</sup> W. Rahman, K. Ishratullah, H. Wagner, O. Seligmann, V. Mohan Chari and B-G. Osterdahl, *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1064.
- <sup>64</sup> S. B. Mahato and A. P. Kundu, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.