



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

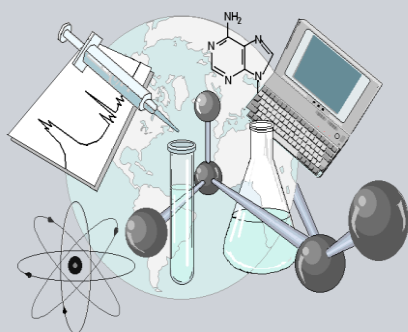
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Estudo químico e avaliação das atividades antiproliferativa, anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* da espécie vegetal *Maxillaria picta* (Orchidaceae), nativa do norte do Paraná.”**

Dissertação apresentada por **Thiago Luiz de Almeida** 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.

**CCE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, FEVEREIRO/2014**



Universidade Estadual de Maringá

Programa de Pós-Graduação em Química - PQU

**Estudo químico e avaliação das atividades  
antiproliferativa, anti-*Trypanosoma* e anti-  
*Leishmania* da espécie vegetal *Maxillaria picta*  
(Orchidaceae), nativa do norte do Paraná.**

**THIAGO LUIZ DE ALMEIDA**

**ORIENTADOR: PROFº. DRº. ARMANDO MATEUS POMINI**

**Fevereiro, 2014**

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

A447e Almeida, Thiago Luiz de  
Estudo químico e avaliação das atividades antiproliferativa, anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* da espécie vegetal *Maxillaria picta* (Orchidaceae), nativa do Norte do Paraná / Thiago Luiz de Almeida. -- Maringá, 2014.  
105 f. : il. color., figs., tabs. esquema, + Anexos

Orientador: Prof. Dr. Armando Mateus Pomini.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Química orgânica. 2. *Maxillaria picta* (Orchidaceae) - Estudo químico. 3. *Maxillaria picta* (Orchidaceae) - Análise antiproliferativa. 4. Estilbenos, Xantona, Compostos fenólicos - Estudo químico. I. Pomini, Armando Mateus, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 547.7

MN-001700



**Universidade Estadual de Maringá**

Centro de Ciências Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Thiago Luiz de Almeida**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 25 de fevereiro de 2014.

**COMISSÃO JULGADORA:**

Prof. Dr. Armando Mateus Pomini  
Presidente - DQI/UEM

Profa. Dra. Silvana Maria de Oliveira Santin  
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Dênis Pires de Lima  
Membro - UFMS

*Dedico este trabalho aos meus avós Ildete e Antônio, à minha mãe Renilda e à minha irmã Taís pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Armando Mateus Pomini pela orientação e pelos ensinamentos.

As Prof.as Dr.as Silvana Maria de Oliveira Santin e a Cleuza Conceição da Silva pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus queridos avós Antônio e Ildete por estarem sempre ao meu lado e por todo amor recebido por todos esses anos.

A minha irmã Taís por todo o companheirismo compartilhado e a minha mãe Renilda por todo apoio.

Aos meus demais familiares por todo afeto recebido.

As minhas grandes amigas de faculdade Francielle e Suélen pelo companheirismo, confidências e valiosa amizade.

Ao Vanderson pela amizade e grande ajuda com os termos biológicos.

Aos meus amigos Milena e Matheus e os amigos de “jogos” Oscar, Rodrigo, Bruno e Zé por todas as risadas durante a semana.

Aos meus amigos de “infância” Gabriela e Junior pela amizade valiosa e eterna.

Aos meus grandes amigos de laboratório Vanessa, Zé, Josi, Plínio, Manú, Ane, Letícia, Mari, Álika, Léo, Greice, Fran, Tay, Matheus, Emanuelle, Guilherme, Diogo, Nathi e Pati pelo companheirismo e gargalhadas.

Um agradecimento mais que especial a Greice pela grande ajuda no desenvolvimento do projeto e também ao Hugo e a Jucilene pelas confidências compartilhadas e pela valiosa amizade.

Ao Lucas pelos espectros de massas.

Ao professor Ricardo por ter cedido o material vegetal.

Aos professores João Ernesto, Ana Lúcia, Celso Nakamura e suas alunas Débora e Vanessa pela orientação nas atividades biológicas.

Aos professores do DQI, em especial à Elza, à Helena e ao Vítor, por toda a paciência, bom humor e incentivo.

À Ivânia pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear realizados e, principalmente, pelo grande auxílio fornecido.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. A Química de Produtos Naturais	1
1.2. A família Orchidaceae	1
1.3. O gênero <i>Maxillaria</i>	7
1.4. Espécie vegetal <i>Maxillaria picta</i>	8
1.5. Câncer	10
1.5.1. Câncer e o crescimento celular	11
1.5.2. Câncer: controle e tratamento	12
1.6. Doença de Chagas	13
1.6.1. Transmissão e ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.6.2. Doença de Chagas: controle e tratamento	15
1.7. Leishmaniose	16
1.7.1. Transmissão e ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	16
1.7.2. Leishmaniose: controle e tratamento	18
<b>2. OBJETIVO</b>	19
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	19
3.1. Materiais e métodos	19
3.2. Estudo fitoquímico de <i>M. picta</i>	20
3.2.1. Obtenção do Extrato Bruto de <i>M. picta</i>	20
3.2.2. Fracionamento do Extrato Bruto de <i>M. picta</i>	20
3.2.2.1. Fração hexânica (MPH)	22



3.2.2.2. Fração clorofórmica (MPC)	28
3.2.2.2.1. Fração clorofórmica-hexânica (MPCH)	29
3.2.2.2.2. Fração clorofórmica-clorofórmica (MPCC)	32
3.2.2.2.3. Fração clorofórmica-acetato de etila (MPCA)	36
3.2.2.2.4. Fração clorofórmica-metanólica (MPCM)	39
3.2.2.3. Fração acetato de etila (MPA)	40
3.2.2.4. Fração butanólica (MPB)	43
3.2.2.5. Fração hidrometanólica (MPM)	44
3.3. Atividades biológicas	46
3.3.1. Atividade antiproliferativa	46
3.3.1.1. Linhagens celulares	46
3.3.1.2. Teste de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais humanas	46
3.3.2. Atividade antiproliferativa em formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
3.3.2.1. Ensaio de toxicidade celular	47
3.3.2.2. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .	48
3.3.2.3. Viabilidade <i>in vitro</i> em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> .	48
3.3.3. Atividade antiproliferativa em formas promastigotas e amastigotas axênica de <i>Leishmania amazonensis</i> .	49
3.3.3.1. Parasitos e macrófagos	49
3.3.3.2. Ensaio antiproliferativos <i>in vitro</i>	49
3.3.3.3. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	50

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	51
<b>4.1. Elucidação estrutural de M1+M2</b>	51
<b>4.2. Elucidação estrutural de M3+M4+M5</b>	57
<b>4.3. Elucidação estrutural de M6+M7</b>	61
<b>4.4. Elucidação estrutural de M8</b>	67
<b>4.5. Elucidação estrutural de M9</b>	72
<b>4.6. Elucidação estrutural de M10</b>	76
<b>4.7. Elucidação estrutural de M11</b>	78
<b>4.8. Elucidação estrutural de M12</b>	81
<b>4.9. Elucidação estrutural de M13</b>	84
<b>4.10. Avaliação do potencial biológico</b>	87
<b>4.10.1. Avaliação da atividade antiproliferativa</b>	97
<b>4.10.2. Avaliação da atividade biológica frente à</b> <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
<b>4.10.3. Avaliação da atividade biológica frente à</b> <i>Leishmania amazonensis</i>	92
<b>5. CONCLUSÕES</b>	94
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	96

## RESUMO

Palavras-chave: Orchidaceae, *Maxillaria*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, câncer, estilbenos, xantona, compostos fenólicos.

O gênero *Maxillaria*, pertencente à família Orchidaceae, compreende aproximadamente 470 espécies de distribuição exclusivamente neotropical. No Brasil, ocorrem cerca de 100 espécies, sendo metade delas exclusivamente brasileiras. Considerando o número limitado de estudos relacionados ao gênero, o presente trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação dos constituintes químicos presentes na espécie *Maxillaria picta*, bem como a avaliação dos potenciais antiproliferativo, anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* do extrato, frações e substâncias isoladas. O estudo químico conduziu ao isolamento dos triterpenos 24-metilenocicloartenol e eburicol; da mistura de esteróides campesterol, estigmasterol e sitosterol e do esteróide glicosilado daucosterol; dos estilbenos foiumbeno B e foiumbeno C; e dos ácidos florético, 4-O-cafeiolchiquimico, 5-O-cafeiolchiquimico e 5-O-cafeiolquínico e da xantona mangiferina. A avaliação da atividade antiproliferativa da fração clorofórmica, bem como suas subfrações, mostrou atividade citostática inibindo o crescimento de algumas linhagens de células cancerosas humanas. A mistura de estilbenos proveniente da fração clorofórmica, na qual o foiumbeno B estava em maior proporção, apresentou uma promissora atividade antiproliferativa em todas as linhas testadas, indicando que a substância é, ao menos em parte, responsável, pela atividade observada no extrato bruto metanólico e na fração clorofórmica. A avaliação da atividade biológica frente à *Trypanosoma cruzi* mostrou uma significativa atividade da fração clorofórmica sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas do parasito. Na avaliação da atividade biológica frente à *Leishmania amazonensis* foi observada que a fração clorofórmica apresentou a

melhor atividade sobre a forma promastigota. Por apresentar melhor índice de seletividade, a fração hidrometanólica foi submetida ao ensaio com as formas amastigotas axênicas, sendo praticamente inativa. A mangiferina purificada não mostrou atividade positiva nos três ensaios biológicos realizados.

## ABSTRACT

Keywords: Orchidaceae, *Maxillaria*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, cancer, stilbenes, xanthone, phenolic compounds.

The genus *Maxillaria* belongs to the Orchidaceae family and comprises about 470 species of neotropical distribution, exclusively. In Brazil about 100 species are found, and half of which are exclusively Brazilian. Considering the lack of studies on the genus, the present study aimed to isolate and identify the chemical constituents present in the species *Maxillaria picta*, as well as to evaluate the anti-proliferative, anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* potential of the extract, fractions and isolated compounds. The chemical study led to isolation of the triterpenes eburicol and 24 metilenocicloartenol; the mixture of steroids campesterol, stigmasterol and sitosterol and the glycosylated steroid daucosterol; the stilbenes phoyunbene B and phoyunbene C; floretic, 5-O-caffeyolshikimic, 4-O-caffeyolshikimic and 5-O-caffeyolquinic acids and the xanthone mangiferin. The evaluation of the antiproliferative activity of chloroform fraction and subfractions showed positive cytostatic activity, with strong growth inhibition of some human cancer cell lines. The mixture of stilbenes in which phoyunbene B was in greater proportion, showed promising antiproliferative activity observed in the crude methanol extract and chloroform fraction. The evaluation of biological activity against *Trypanosoma cruzi* revealed a significant activity for the chloroform fraction against epimastigote and trypomastigote forms of the parasite. In the evaluation of biological activity against the *Leishmania amazonensis* the chloroform fraction showed again the best activity against the promastigote form. In spite of the highest selectivity index, the hydromethanolic fraction was subjected to the assay, being

virtually inactive against axenic amastigotes. The isolated xanthone mangiferin showed no activity in the three assays performed.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados da cromatografia em coluna da partição hexânica	23
<b>Tabela 2:</b> Dados das junções das frações obtidas na CC da partição hexânica	23
<b>Tabela 3:</b> Dados do fracionamento em CC de H-17	25
<b>Tabela 4:</b> Dados das junções das frações obtidas na CC de H-17	26
<b>Tabela 5:</b> Dados do fracionamento em CC de H-31	26
<b>Tabela 6:</b> Dados das junções das frações obtidas na CC de H-31	27
<b>Tabela 7:</b> Dados da cromatografia em coluna de MPCH	29
<b>Tabela 8:</b> Dados das junções das frações obtidas na CC de MPCH	30
<b>Tabela 9:</b> Dados do fracionamento em CC de CH-8	31
<b>Tabela 10:</b> Dados das junções das frações obtidas na CC de CH-8	31
<b>Tabela 11:</b> Dados da cromatografia em coluna de MPCC	33
<b>Tabela 12:</b> Dados das junções das frações obtidas na CC da fração clorofórmica-clorofórmica	34
<b>Tabela 13:</b> Dados da cromatografia em coluna da fração CC-9	35
<b>Tabela 14:</b> Dados do fracionamento em CC de CC-9	35
<b>Tabela 15:</b> Dados da cromatografia em coluna da fração CC-9H	36
<b>Tabela 16:</b> Dados do fracionamento em CC de CC-9H	36
<b>Tabela 17:</b> Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPCA.	37
<b>Tabela 18:</b> Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração CA-4	38
<b>Tabela 19:</b> Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPCA.	39
<b>Tabela 20:</b> Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPA.	41
<b>Tabela 21:</b> Dados do filtração em Sephadex LH 20 de A-4	41
<b>Tabela 22:</b> Dados do filtração em Sephadex LH 20 de A-5	42

<b>Tabela 23:</b> Dados filtração em Sephadex LH 20 de A-9	42
<b>Tabela 24:</b> Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPB.	43
<b>Tabela 25:</b> Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração MPM.	44
<b>Tabela 26:</b> Dados das junções das frações obtidas no fracionamento e em Sephadex LH 20 da fração MPM	45
<b>Tabela 27:</b> Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para <b>M1</b>	52
<b>Tabela 28:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para o composto <b>M1</b> e para o eburicol	53
<b>Tabela 29:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para o composto <b>M2</b> e para o 24-metilenocicloartenol	55
<b>Tabela 30:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ para a mistura <b>M3, M4 e M5</b> e para os compostos campesterol, sitosterol e estigmasterol	59
<b>Tabela 31:</b> Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para <b>M6</b>	62
<b>Tabela 32:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M6</b> e para o foiumbeno C	64
<b>Tabela 33:</b> Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para <b>M7</b>	65
<b>Tabela 34:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M7</b> e para o foiumbeno B	67
<b>Tabela 35:</b> Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para <b>M8</b>	70
<b>Tabela 36:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M8</b> e para o ácido florético	71



<b>Tabela 37:</b> Principais correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para <b>M9</b>	73
<b>Tabela 38:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M9</b> e para a mangiferina	74
<b>Tabela 39:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M10</b> e para o daucosterol	77
<b>Tabela 40:</b> Correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contornos HMBC para <b>M11</b>	79
<b>Tabela 41:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M11</b> e para o ácido 5- <i>o</i> -cafeoil chiquímico	80
<b>Tabela 42:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M12</b> e para o ácido 4- <i>o</i> -cafeoilchiquímico	83
<b>Tabela 43:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ para a substância <b>M13</b> e para o 5- <i>o</i> -ácido cafeoilquínico.	86
<b>Tabela 44:</b> Valores do $\text{GI}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para o extrato bruto, frações e da mangiferina isolada de <i>M. picta</i> frente à células tumorais humanas	88
<b>Tabela 45:</b> Valores de $\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e IS para o extrato bruto e frações de <i>M. picta</i> frente <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
<b>Tabela 46:</b> Valores de $\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e IS para o extrato bruto e frações de <i>M. picta</i> frente <i>Leishmania amazonensis</i>	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura I:</b> Espécie vegetal <i>Maxillaria picta</i> .	9
<b>Figura II:</b> Estimativa de novos casos de câncer em 2014.	10
<b>Figura III:</b> Diferença entre o tumor benigno (a) e maligno (b).	11
<b>Figura IV</b> – Metástase.	12
<b>Figura V:</b> Formas evolutivas do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> : amastigotas (a), epimastigotas (b) e tripomastigotas (c).	14
<b>Figura VI:</b> <i>Triatoma infestans</i> , vetor do <i>T. cruzi</i> .	16
<b>Figura VII:</b> Formas evolutivas do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i> : amastigotas (a) e promastigotas (b).	17
<b>Figura VIII:</b> <i>Lutzomyia longipalpis</i> , um dos vetores da <i>L. amazonensis</i> .	17
<b>Figura IX:</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para <b>M6</b> .	63
<b>Figura X:</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para <b>M7</b> .	66
<b>Figura XI:</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para <b>M8</b> .	70
<b>Figura XII:</b> Principais correlações observadas no mapa de contornos HMBC para <b>M9</b> .	73
<b>Figura XIII:</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para <b>M11</b> .	79
<b>Figura XIV:</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para <b>M12</b> .	82
<b>Figura XV:</b> Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para <b>M13</b> .	85

## LISTAS DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Procedimento empregado para o fracionamento do extrato bruto de <i>Maxillaria picta</i> .	21
<b>Esquema 2:</b> Estudo da fração hexânica (MPH).	22
<b>Esquema 3:</b> Solubilização da fração clorofórmica.	28
<b>Esquema 4:</b> Estudo da fração clorofórmica-hexânica (MPCH).	29
<b>Esquema 5:</b> Estudo da fração clorofórmica-clorofórmica (MPCC).	32
<b>Esquema 6:</b> Estudo da fração clorofórmica-acetato de etila (MPCA).	37
<b>Esquema 7:</b> Estudo da fração acetato de etila (MPA).	40
<b>Esquema 8:</b> Estudo da fração hidrometanólica (MPM)	44
<b>Esquema 9:</b> Visão global do potencial anticâncer das frações obtidas a Partir do extrato bruto de <i>Maxillaria picta</i> (linhagem U251, GI <sub>50</sub> )	90

## ANEXOS

- Figura 1:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura **M1+M2**
- Figura 2:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância **M1**.
- Figura 3:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M1+M2**.
- Figura 4:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M1+M2**.
- Figura 5:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M1+M2**.
- Figura 6:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,45MHz) de **M1+M2**.
- Figura 7:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M1+M2**.
- Figura 8:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M1+M2**.
- Figura 9:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância **M2**.
- Figura 10:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura **M3+M4+M5**
- Figura 11:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância **M3**.
- Figura 12:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância **M4**.
- Figura 13:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância **M5**.
- Figura 14:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M3+M4+M5**.
- Figura 15:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,45 MHz) de **M3+M4+M5**.
- Figura 16:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura **M6+M7**.
- Figura 17:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de **M6**
- Figura 18:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M6+M7**.
- Figura 19:** Expansão dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M6+M7**.
- Figura 20:** Expansão dos sinais do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M6+M7**.

**Figura 21:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) de **M6+M7**.

**Figura 22:** Expansão dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) de **M6+M7**.

**Figura 23:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC e expansão ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de **M6+M7**.

**Figura 24:** Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de **M6+M7**.

**Figura 25:** Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) de **M6+M7**.

**Figura 26:** Expansões do mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) das substâncias **M6+M7**.

**Figura 27:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de **M6+M7**.

**Figura 28:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de **M6+M7**.

**Figura 29:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de **M7**.

**Figura 30:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de **M8**.

**Figura 31:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M8**.

**Figura 32:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ; 75,45 MHz) de **M8**.

**Figura 33:** Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M8**.

**Figura 34:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M8**.

**Figura 35:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M8**.

**Figura 36:** Espectro de massas de baixa resolução (20 eV) de **M9**.

**Figura 37:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 300,06 MHz) de **M9**.

**Figura 38:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 75,45 MHz) de **M9**.

**Figura 39:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M9**.

**Figura 40:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M9**.

**Figura 41:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de **M10**.

**Figura 42:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M10**.

**Figura 43:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT  $90^\circ$  e  $135^\circ$  ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ; 75,45 MHz) de **M10**.

**Figura 44:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M11**.

**Figura 45:** Expansão dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M11**.

**Figura 46:** Expansão dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M11**.

**Figura 47:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) de **M11**.

**Figura 48:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M11**.

**Figura 49:** Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M11**.

**Figura 50:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M11**.

**Figura 51:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M11**.

**Figura 52:** Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M11**.

**Figura 53:** Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M11**.

**Figura 54:** Mapa de correlação NOESY e expansão ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M11**.

**Figura 55:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M12**.

**Figura 56:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M12**.

**Figura 57:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) de **M12**.

**Figura 58:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M12**.

**Figura 59:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M12**.

**Figura 60:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M12**.

**Figura 61:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M12**.

**Figura 62:** Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M12**.

**Figura 63:** Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M12**.

**Figura 64:** Mapa de correlação NOESY e expansão ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M12**.

**Figura 65:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M13**.

**Figura 66:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06 MHz) de **M13**.

**Figura 67:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45 MHz) de **M13**.

**Figura 68:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M13**.

**Figura 69:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) com expansão para **M13**.

**Figura 70:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M13**.

**Figura 71:** Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M13**.

**Figura 72:** Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M13**.

**Figura 73:** Mapa de correlação NOESY e expansão ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) para **M12**.

**Figura 74:** Porcentagem de crescimento de células tumorais humanas e célula normal versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer do padrão doxorrubina **(a)** e para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPH **(b)** e MPC **(c)**.

**Figura 75:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPCH **(a)**, MPCC **(b)** e MPCA **(c)**.

**Figura 76:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPCM **(a)**, MPCA **(b)** MPB **(c)**.

**Figura 77:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPM **(a)**, MPEB **(b)** e M1+M2 **(c)**.

**Figura 78:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de M1+M2 (MPCC) **(a)**, M1+M2 (MPCA) **(b)** e M8 **(c)**.

**Figura 79:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer da mangiferina **M4**.



## LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

$^{13}\text{C}$	Carbono-13
$^1\text{H}$	Hidrogênio-1
CCD	Cromatografia em camada delgada
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> $^1\text{H} \times ^1\text{H}$
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Incremento sem distorcao por transferencia de polarizacao.
HSQC	<i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
Hz	Hertz
$J$	Constante de acoplamento
m	Multipleteo
MHz	Megahertz
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
s	Singleto
t	Tripleteo
td	Tripleteo de dupletos
$\delta$	Deslocamento químico
$\delta_{\text{C}}$	Deslocamento químico de carbono-13
$\delta_{\text{H}}$	Deslocamento químico de hidrogênio

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

A humanidade sempre demonstrou um enorme interesse por muitas substâncias orgânicas extraídas de fontes naturais. A produção de pigmentos, venenos e perfumes, assim como o uso de produtos naturais para fins medicinais, particularmente da flora, são alguns dos exemplos da versatilidade dessa fonte para benefício humano (Bolzani, 2006).

Sinais do uso de plantas medicinais e até mesmo tóxicas foram encontrados nas mais antigas civilizações (Kanegusuku, 2006), sendo a prática mais antiga encontrada pelo homem para o tratamento, prevenção e até mesmo a cura de doenças, servindo como uma rica fonte de compostos biologicamente ativos (Andrade *et al*, 2007).

Através das observações de reações distintas nos indivíduos, essas civilizações obtiveram um conhecimento empírico que serviu de suporte para a descoberta das propriedades nocivas ou benéficas dos vegetais, utilizados ainda nos dias de hoje em pesquisas farmacológicas (Silva, 2011).

Os estudos fitoquímicos de plantas medicinais desempenham nos dias de hoje, um importante papel no processo de descoberta de novos fármacos, no qual o levantamento bibliográfico juntamente com o conhecimento popular servem de base para a identificação da possível atividade farmacológica de plantas medicinais, assim como a realização de investigações das plantas utilizadas para a garantia de sua eficácia e segurança terapêutica (Santos *et al*, 2008). Aproximadamente 40% de todos os fármacos disponíveis atualmente, foram desenvolvidos por meio de produtos naturais que, se somados às drogas usadas como antibióticos e antitumorais, o percentual sobe para cerca de 70% (Calixto, 2003).

Portanto, o estudo químico de plantas, visando à obtenção de compostos que possuem atividade biológica significativa no organismo humano, constitui uma linha de pesquisa de grande interesse na área de Produtos Naturais, sendo que a descoberta destes é de suma importância no desenvolvimento de novos medicamentos.

### 1.2. A FAMÍLIA ORCHIDACEAE

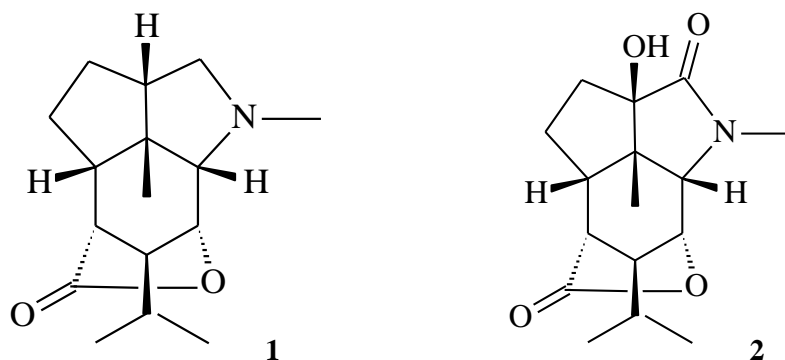
A família Orchidaceae constitui uma das mais numerosas famílias de plantas floríferas, recebendo destaque entre as demais em ornamentação por conta da grande

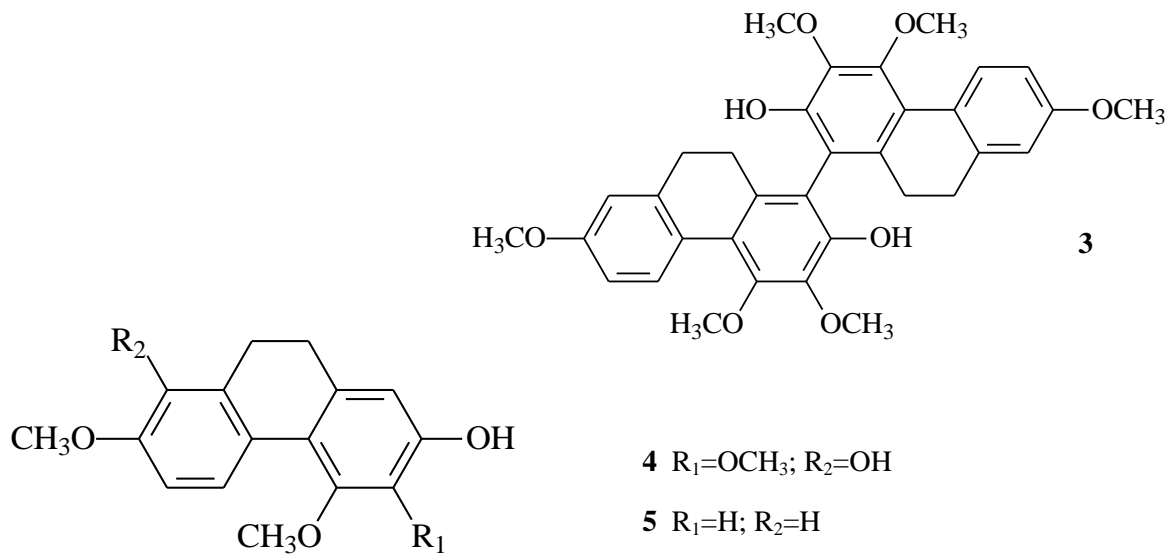
variedade de cores e formas (Azevedo e van den Berg, 2007). De acordo com Gutiérrez (2010), Cameron e colaboradores (1999) e Menini Neto e colaboradores (2007), a família é constituída por cerca de 800 gêneros, totalizando entre 20.000 e 30.000 espécies nativas e mais de 400.000 híbridos.

Além de possuírem sofisticados mecanismos de atração de polinizadores, as orquídeas são consideradas as plantas geneticamente mais evoluídas do planeta (Oliveira, 1999). Representantes da família podem ser encontrados em todo o mundo devido a sua capacidade de adaptação a diversos ambientes predominando, porém, nas áreas tropicais. As orquídeas podem crescer como epífitas sobre árvores e arbustos, ou ainda serem rupículas, terrícolas ou saprófitas (Muller *et al.*, 2007).

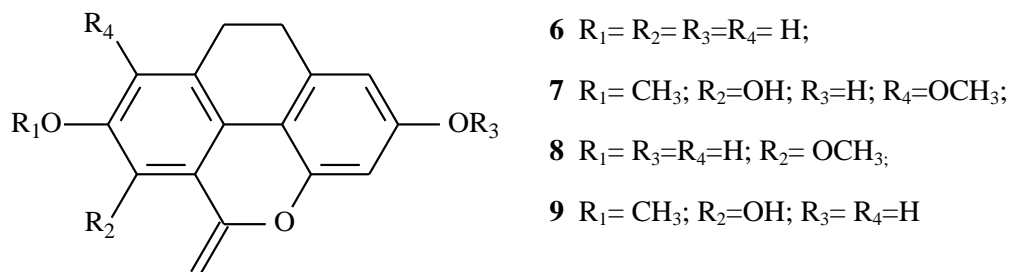
Apesar de todo o fascínio e do largo cultivo desta planta para ornamentação, existem poucos relatos do uso das orquídeas como plantas medicinais. Os primeiros remontam à idade antiga, na Grécia, no entanto, poucos grupos se dedicaram nos últimos anos ao estudo fitoquímico com espécies da família Orchidaceae (Suttleworth *et al.*, 1991).

Um dos primeiros relatos existentes na era moderna é o uso da orquídea Olho-de-boneca, nome popular da espécie vegetal *Dendrobium nobile*, na medicina tradicional chinesa. Estudos mostraram que os alcaloides isolados dos pseudobulbos dessa espécie, a dendrobina (**1**) e 3-hidroxi-2-oxodendrobina (**2**), estimulam a secreção da saliva e possuem atividade antipirética (Soares *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 1985), enquanto que os diidrofenantrenos 2,2'-diidroxi-3,3',4,4',7,7'-hexametóxi-9,9',10,10'-tetrahidro-1,1'-bifenantreno (**3**), 2,8-diidroxi-3,4,7-trimetoxi-9,10-diidrofenantreno (**4**) e 2-hidroxi-4,7-dimetoxi-9,10-diidrofenantreno (**5**) também isolados de *D. nobile*, apresentaram atividade antifibrótica quando testadas em células HSC-T6, uma linhagem imortalizada de células estreladas de fígado de camundongo (Yang *et al.*, 2007).

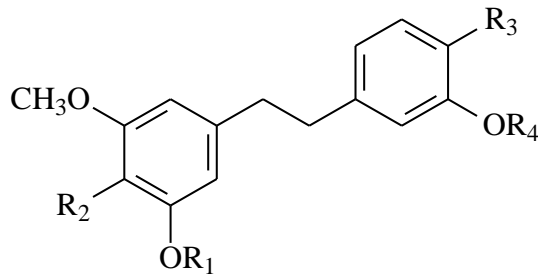




O estudo da espécie vegetal *Coelogyne nitida* levou ao isolamento dos fenantrenoides flavidina (**6**), coelogina (**7**), coeloginina (**8**) e flacidina (**9**) (Veerraju *et al.*, 1989).



De *Cymbidium aloifolium* foram isolados os estilbenoides aloifol I (**10**), aloifol II (**11**), batatasina III (**12**) e gigantol (**13**) (Juneja *et al.*, 1987). Já o estudo químico de *Pholidota yunnanensis* conduziu ao isolamento dos estilbenos *trans*-3,3'-diidroxí-2',4',5'-trimetoxiestilbeno (**14**), *trans*-3-diidroxí-2',3',5'-trimetoxiestilbeno (**15**), *trans*-3,3'-diidroxí-2,5'-dimetoxiestilbeno (**16**) e *trans*-3,4'-diidroxí-2',3',5'-trimetoxiestilbeno (**17**) (Guo *et al.* 2006), este último se apresentando altamente eficaz na inibição do crescimento de células carcinoma hepatocelular (Wang *et al.* 2012).

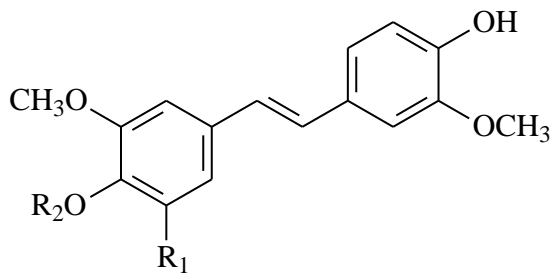


**10** R<sub>1</sub>= CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>= H

**11** R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H; R<sub>4</sub>=OH

**12** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H;

**13** R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=OH; R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>



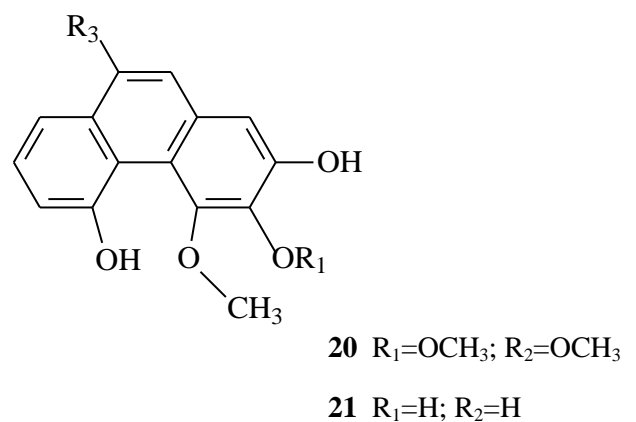
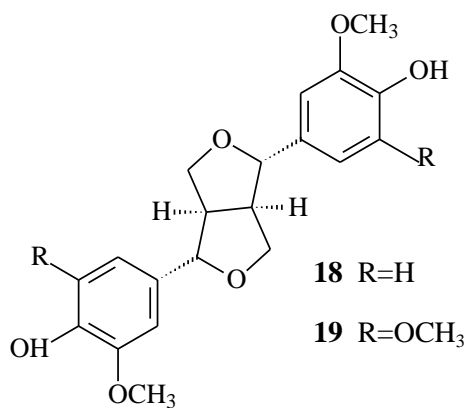
**14** R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>=H

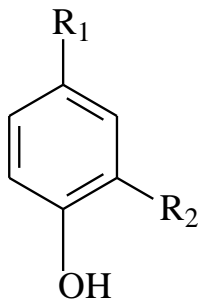
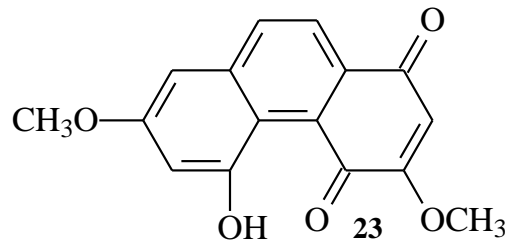
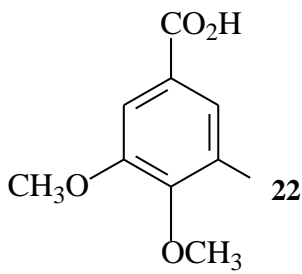
**15** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

**16** R<sub>1</sub>=H; R<sub>2</sub>=H

**17** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>

Em *Ephemerantha fimbriata* foram obtidas as lignanas (+)-pinoresinol (**18**) e (+)-siringaresinol (**19**), os fenantrenos frimbriol-A (**20**) e frimbriol-B (**21**), além do ácido trimetóxi benzóico (**22**) e da denbinobina (**23**) (Tezuka *et al.*, 1993), sendo que a último mostrou efeito contra a gênese de tumores em células de câncer de cólon (Yang *et al.*, 2005). Da espécie *Vanilla planifolia*, que durante muitos séculos foi cultivada visando a produção de baunilha (Cardoso *et al.*, 2005), foram isolados os compostos fenólicos vanilina (**24**), ácido vanílico (**25**), 4-hidroxibenzaldeído (**26**), ácido ferúlico (**27**), ácido *p*-cumárico (**28**) e 3,4-hidroxibenzaldeído (**29**) (Sinha *et al.*, 2007).





24  $R_1 = \text{CHO}$  e  $R_2 = \text{OCH}_3$

27  $R_1 = \text{CH}=\text{CHCOOH}$  e  $R_2 = \text{OCH}_3$

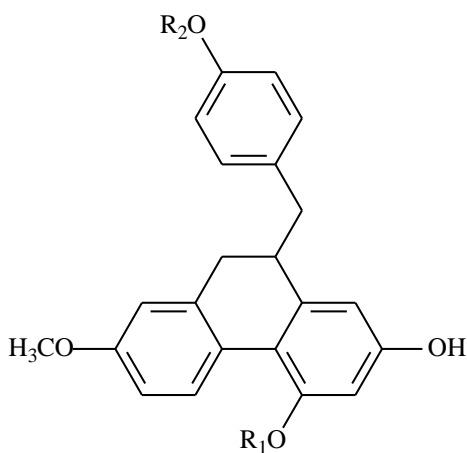
25  $R_1 = \text{COOH}$  e  $R_2 = \text{OCH}_3$

28  $R_1 = \text{CH}=\text{CHCOOH}$  e  $R_2 = \text{H}$

26  $R_1 = \text{CHO}$  e  $R_2 = \text{H}$

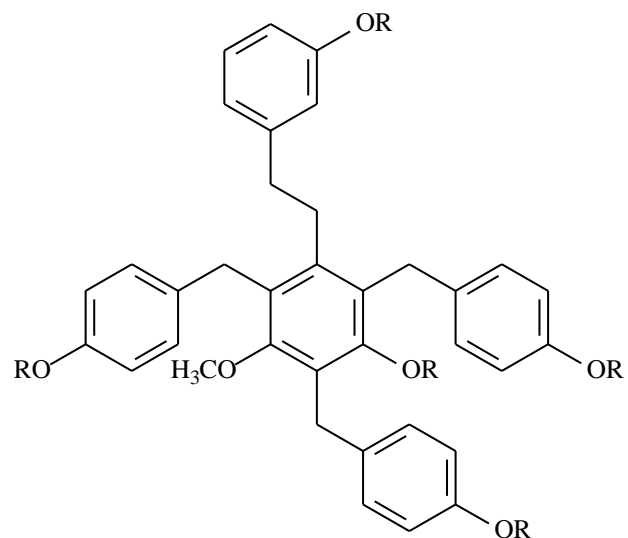
29  $R_1 = \text{CHO}$  e  $R_2 = \text{OH}$

Investigações químicas com a espécie vegetal *Pleione formosona* revelaram a presença dos polifenóis pleioantrenina (**30**), 1-(4-hidroxibenzil)-4,7-dimetoxi-9,10-diidrofenantreno-2-ol (**31**), pleiobibenzinina A (**32**) e pleiobibenzinina B (**33**) (Shiao *et al.*, 2009). Pomini e colaboradores (2012) realizaram em nosso laboratório o estudo químico de *Miltonia flavescens*, levando ao isolamento do flavonoide hortensina (**34**) que foi ativo contra linhagens de células cancerosas humanas.



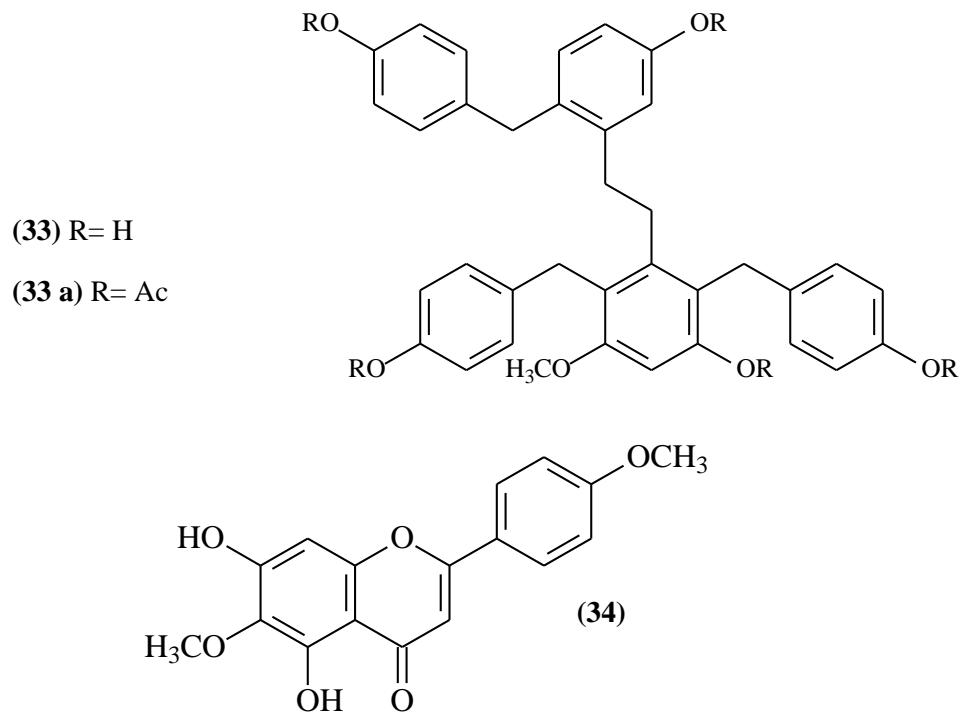
(**30**)  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$

(**31**)  $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{H}$

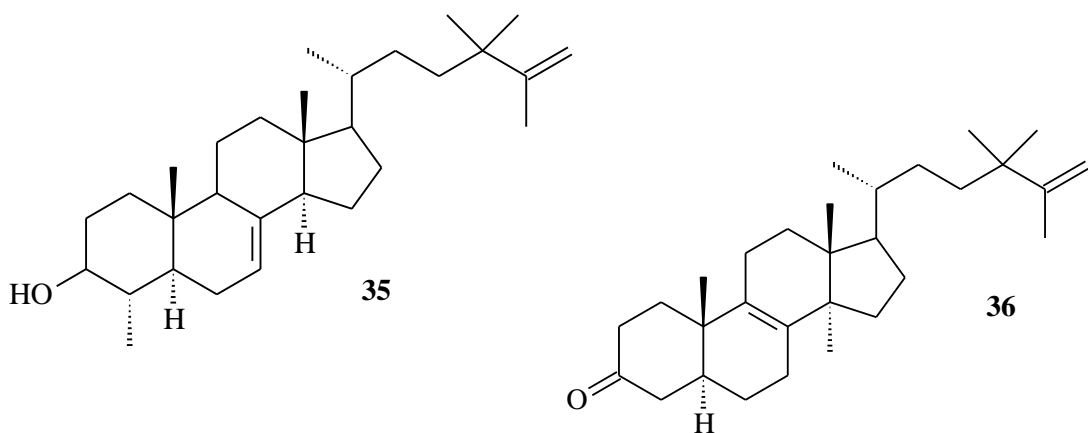


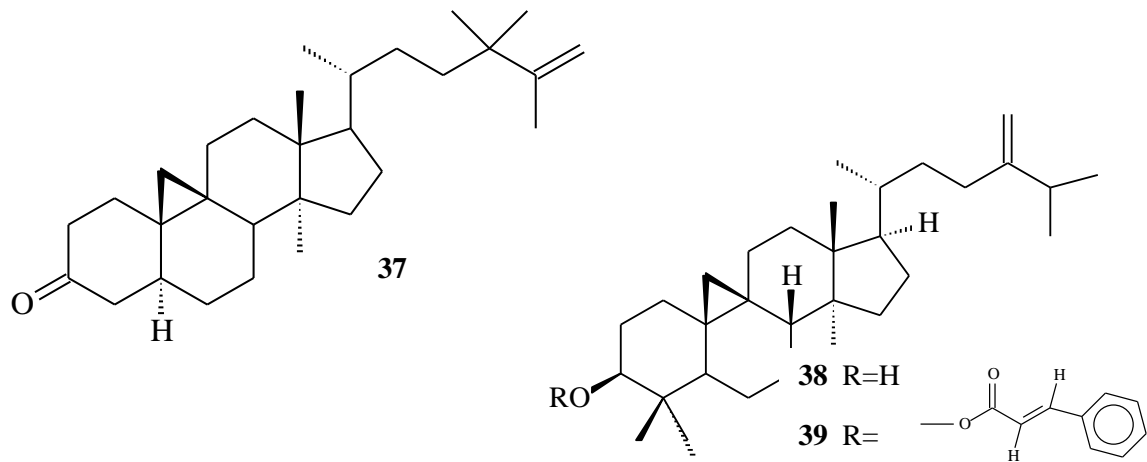
(**32**)  $R = \text{H}$

(**32 a**)  $R = \text{Ac}$



Em trabalhos anteriores realizados com a espécie *Eria convallarioides* foram relatados o isolamento dos compostos esteroidais erianol (35), otochilona (36) e ciclootochilona (37) (Majumder *et al.*, 1989) e de *Epidendrum mosenii*, conhecida popularmente como “orquídea-da-praia”, foram relatados o isolamento dos triterpenos 24-metilenocicloartanol (38) e folidotina A (39), os quais demonstraram potente efeito analgésico em vários modelos de dor (Cechinel Filho, 2000).





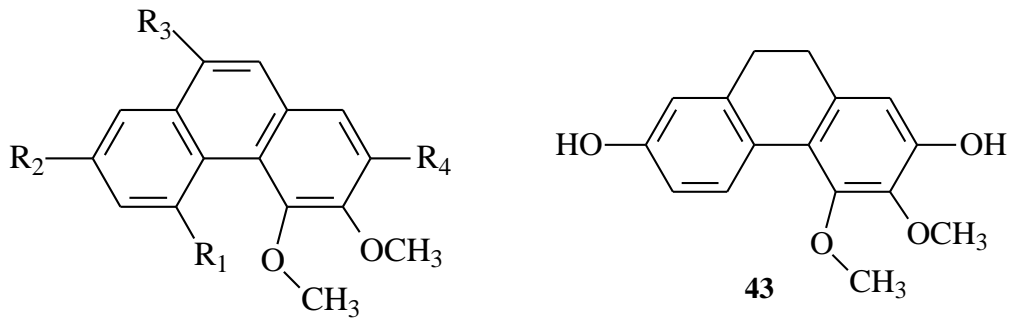
Todos esses resultados evidenciam a diversidade de metabólitos secundários presentes na família Orchidaceae, bem como seu potencial bioativo.

### 1.3. O GÊNERO *Maxillaria*

A subtribo Maxillariinae, pertencente à tribo Cymbideae, corresponde a aproximadamente 472 espécies de orquídeas de distribuição exclusivamente neotropical. No país, ocorrem cerca de 100 espécies, sendo metade delas exclusivamente brasileiras. Esta tribo está dividida em sete gêneros, sendo que um deles, *Maxillaria*, é objeto de nosso estudo (Koehler, 2007).

Pouco se sabe sobre as substâncias com potencial biológico do gênero em questão. Investigações químicas realizadas com a espécie de origem mexicana *M. densa*, muito utilizada como relaxante muscular (Gutiérrez, 2010), revelaram a presença dos estilbenoides 2,5-diidroxí-3,4-dimetoxifenantreno (**40**), nudol (**41**), gimnopusina (**42**) e eriantridina (**43**) (Estrada *et al*, 2004), sendo que os últimos apresentaram interessantes atividades antifúngicas (Déciga-Campos *et al*, 2007).





**40**  $R_1=R_4=OH$  e  $R_2=R_3=H$ ;

**41**  $R_1=R_3=H$  e  $R_2=R_4=OH$

**42**  $R_1=H$ ;  $R_2=R_4=OH$  e  $R_3=OCH_3$ ;

#### 1.4. ESPÉCIE VEGETAL *Maxillaria picta*

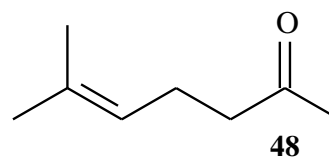
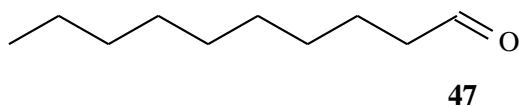
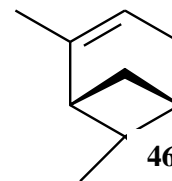
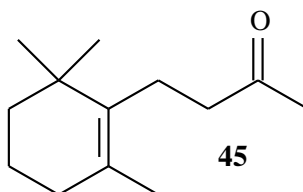
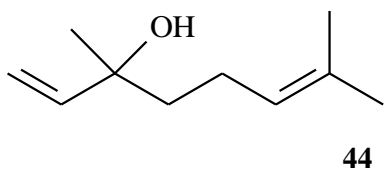
A espécie *M. picta* é endêmica do bioma Mata Atlântica, no Sul e Sudeste do Brasil. A distribuição principal é sobre a Serra do Mar, que vai do litoral norte de Santa Catarina ao estado do Rio de Janeiro. No Norte do Paraná é encontrada em modo epifítico sobre perobas.

A espécie é facilmente identificada pela presença de seus pseudobulbos bifoliados, sulcados a canaliculados e pelas suas flores campanuladas, duradouras e sem recompensas florais aos polinizadores (Singer e Koehler, 2003), mas apresentam fragrâncias e colorações que atraem abelhas operárias sem ferrão do gênero *Trigona* (Singer, 2003).



**Figura I:** Espécie vegetal *Maxillaria picta*

Um dos poucos trabalhos realizados com *M. picta* está relacionado aos seus componentes florais voláteis. No estudo realizado por Flach (2005), foram encontradas altas concentrações do monoterpreno linalol (**44**), constituindo cerca de 70% da composição de seus voláteis. Nessa espécie também foram encontrados diidro- $\beta$ -ionona (**45**),  $\alpha$ -pineno (**46**), n-decanal (**47**) e 6-metil-5-heptan-2-ona (**48**) todos em baixa concentração.

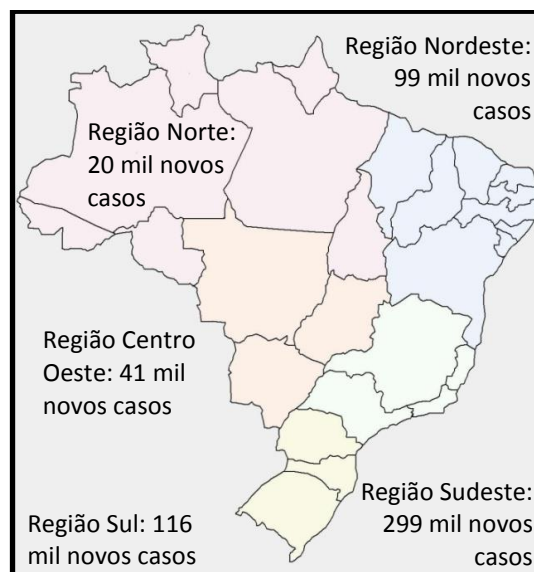


## 1.5. CÂNCER

Câncer é a denominação atribuída ao conjunto de mais de 100 doenças que se caracterizam pelo crescimento desordenado de células que invadem os órgãos e tecidos vizinhos (INCA, 2011). O nome da doença deriva da palavra *karkinos* que significa caranguejo em latim, por conta da semelhança entre as veias intumescidas de um tumor externo com as pernas de um caranguejo (Almeida *et al.*, 2005).

A doença é responsável por aproximadamente 12% de todas as causas de morte no mundo, representando um grande problema de saúde pública (Guerra *et al.*, 2005). As mais recentes estimativas mundiais mostram que no ano de 2012 ocorreram cerca de 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes por câncer em todo o planeta. As estimativas de prevalência para 2012 mostraram que 32,6 milhões de pessoas com idade superior a 15 anos, tiveram algum tipo de câncer diagnosticado nos últimos cinco anos (WHO, 2013). O câncer de pulmão é o mais frequente no mundo, representando 12,7% dos novos casos mundiais, seguido pelo câncer de mama (10,9%), tumores de cólon e reto (9,7%) e estômago (7,8%) (INCA, 2010).

No Brasil, a doença se apresenta como a segunda maior causa de morte nos últimos anos. As estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) indicaram que, até o final de 2008, ocorreram mais de 470 mil novos casos de câncer, número superior ao de pessoas infectadas pelo vírus da AIDS nos últimos 25 anos (Silva *et al.*, 2012). Para o ano de 2014, o INCA e o Ministério da Saúde estimam que cerca de 580 mil novos casos sejam registrados, índice que predomina na região sudeste (299 mil casos).



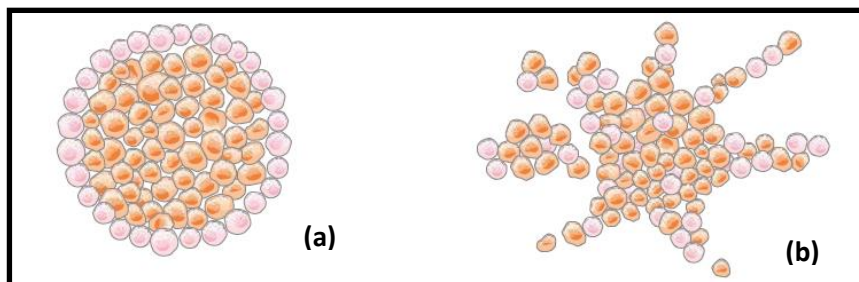
**Figura II:** Estimativa de novos casos de câncer em 2014.

Cerca de 80% dos casos, está relacionado ao meio ambiente, onde é encontrado um grande número de fatores de risco. Entende-se por ambiente, o meio em geral (água, terra e ar) e os ambientes sociais, ocupacionais (quando insalubre), culturais (estilo e hábitos de vida) e de consumo (alimentos, medicamentos). Além disso, os hábitos, o estilo de vida adotado pelas pessoas e até mesmo as mudanças no meio ambiente provocada pelo próprio homem, podem determinar os diferentes tipos de câncer (Almeida *et al.* 2005).

### 1.5.1. CÂNCER E O CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento das células cancerosas é diferente do crescimento das células normais que, no geral, crescem, multiplicam-se e morrem de maneira ordenada. As células cancerosas ao invés de morrerem, continuam formando outras novas células anormais que se dividem de forma rápida, agressiva e incontrolável, espalhando-se para outras regiões do corpo (INCA, 2011).

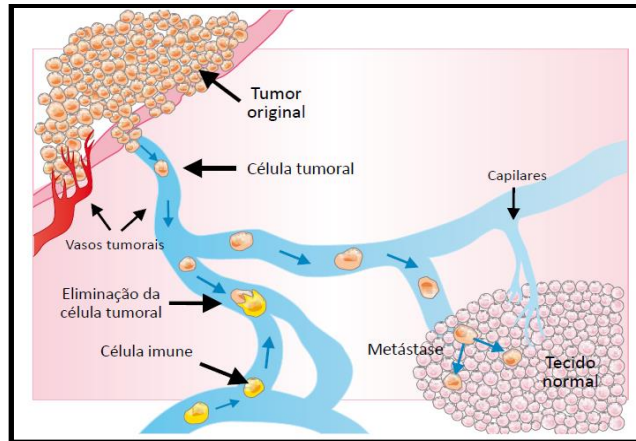
Os tumores ou neoplasias correspondem à forma não controlada de crescimento celular e podem ser benignas ou malignas. Os tumores benignos apresentam limites nítidos e seu crescimento é geralmente lento e de forma organizada, não invadindo outros tecidos (INCA, 2011). Atualmente, a definição científica de câncer se refere especificamente aos tumores malignos (Silva *et al.*, 2012), que se apresentam em dois estágios.



**Figura III:** Diferença entre o tumor benigno (a) e maligno (b). (Fonte: INCA, 2011)

No primeiro estágio da doença, denominado câncer não invasivo ou carcinoma *in situ* (classificação que não se aplica aos cânceres do sistema sanguíneo), as células cancerosas ainda não se difundiram para outras camadas do órgão de origem, estando somente na camada de tecido que se desenvolveram. Grande parte dos carcinomas *in situ* tem cura caso seja tratado antes de progredir para o segundo estágio da doença, denominada câncer invasivo. Nesse estágio, as células cancerosas invadem outras camadas

celulares do órgão e passam para a corrente sanguínea ou linfática podendo se difundir para outras partes do corpo gerando novos focos da doença, sendo esta principal característica do câncer. Esses novos focos de doença são chamados de metástases (INCA, 2011).



**Figura IV** – Metástase (Fonte: INCA, 2011).

### 1.5.2. CÂNCER: CONTROLE E TRATAMENTO

Embora apresente algumas limitações, a quimioterapia é a modalidade mais escolhida para o controle ou cura da doença (Sawada *et al.*, 2009). A resistência de alguns tumores ao tratamento é uma das principais limitações da quimioterapia e, além disso, a utilização de fármacos, quando não específico para células de câncer, podem prejudicar as células saudáveis. Por conta disso, muitos pacientes têm então recorrido às terapias alternativas como tratamento adjuvante, tal como o uso de plantas (Melo *et al.*, 2011).

Os produtos naturais são largamente usados para o tratamento do câncer (Pita *et al.*, 2010). Na década 60, o National Cancer Institute (NCI-EUA) realizou uma pesquisa com extratos de plantas com atividade antitumoral e desde então, tem crescido o interesse na pesquisa de substâncias isoladas de plantas, como uma importante fonte de novos fármacos que apresentam esse tipo de atividade (Gomes *et al.*, 2008). Há vários relatos na literatura sobre pronunciada atividade antiproliferativa de extratos e frações de plantas, além de uma diversa classe de compostos extraída de produtos naturais. Podem ser citados os alcaloides, flavonoides, terpenos, estilbenos, antraquinonas, ácidos fenólicos e lignanas como classes de moléculas com representantes bioativos contra o câncer (Cai *et al.*, 2004).

## 1.6. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase ou tripanossomíase americana trata-se de uma doença endêmica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida por insetos do bicho barbeiro (Haragushi, 2008). Embora a doença seja um problema epidemiológico apenas em alguns países da América Latina, ela também é encontrada no sul dos Estados Unidos, atingindo principalmente a camada mais pobre da população por conta das condições precárias e de higiene (Fernandes, 2005). Nos 21 países endêmicos reportam-se entre 12 e 14 milhões de indivíduos infectados, com uma incidência anual de até 200.000 casos e milhares mortes (OPAS, 2009).

Ainda que o número de óbitos ocasionados por doenças infecciosas tenha caído de 50% para 5% nos últimos anos, elas ainda são consideradas um problema na saúde pública brasileira. Vale ressaltar que mesmo que o total de mortes causadas por doenças infecciosas tenha diminuído consideravelmente, o número de mortes causadas pela doença de Chagas permaneceu estável (Souza *et al.*, 2012).

### 1.6.1. TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA DE *Trypanosoma cruzi*

Os parasitos do gênero *Trypanosoma*, da família dos *Trypanosomatidae*, são parasitas heteroxênicos e unicelulares que no seu ciclo de vida apresentam três formas morfológicas: amastigota, epimastigotas e promastigota.

A forma amastigota apresenta forma arredondada, flagelo curto (não visível ao microscópio óptico) e pode ser encontrada no interior das células de hospedeiros infectado. A forma tripomastigota é levemente achatada, alongada e possui flagelo aderido a parte do corpo do parasita, sendo altamente infectantes, podendo ser encontradas no mamífero (sangue e espaço intercelular) e no inseto (região posterior do tubo digestório). Por último, a forma promastigota é alongada, o flagelo se encontra aderido a parte do corpo do parasita e pode ser encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Carvalho, 2013).





**Figura V:** Formas evolutivas do protozoário *Trypanosoma cruzi*: amastigotas (a), epimastigotas (b) e tripomastigotas (c).

Os principais transmissores da doença são os insetos das espécies *Rhodnius prolixus*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*, pertencentes à família *Reduviidae* e popularmente conhecidos como barbeiro ou chupão. Esses insetos não nascem infectados e somente se tornam hospedeiros do parasito ao alimentar-se do sangue de algum indivíduo contaminado (Haragushi, 2008; Fernandes, 2005).

Ao picarem um animal parasitado, esses insetos sugam formas tripomastigotas que em seu tubo digestório se transformam em epimastigotas, que se multiplicam e voltam à primeira forma. Após seu desenvolvimento, estas as formas migram para o aparelho picador sugador do inseto e, ao picar o indivíduo, o inseto infectado defeca eliminando formas infectantes de tripomastigotas, que penetram pelo orifício da picada (Ministério da Saúde, 2005).



**Figura VI:** *Triatoma infestans*, vetor do *Trypanosoma cruzi*.

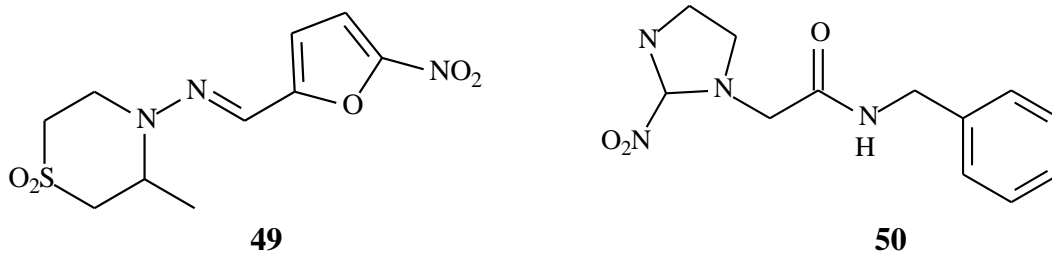
Ocorrem basicamente duas etapas fundamentais na infecção humana pelo *T. cruzi* após a entrada deste no organismo, a fase aguda e a fase crônica.

Na fase aguda (inicial), o parasito circula na corrente sanguínea em grandes quantidades e dentre os sintomas possíveis estão febre, mal estar e diarreia que desaparecem semanas após a infecção.

Na fase crônica, existem poucos parasitos na corrente sanguínea, sendo inicialmente assintomática. A fase pode apresentar-se na forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou associada. Na forma indeterminada, o paciente não apresenta nenhum tipo de sintoma ou comprometimento do aparelho circulatório e digestivo, podendo se perdurar por toda a vida da pessoa infectada ou evoluir tardiamente para uma das outras formas da doença. Na forma cardíaca há o acometimento cardíaco, sendo a maior responsável pela mortalidade na doença de Chagas crônica. A forma digestiva acomete do aparelho digestivo, enquanto que na forma associada (cardiodigestiva), ocorre de lesões compatíveis com as formas cardíacas e digestivas (Ministério da Saúde, 2005).

### 1.6.2. DOENÇA DE CHAGAS: CONTROLE E TRATAMENTO

Apesar da doença de Chagas ter sido descoberta no ano de 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas e seu ciclo descrito entre 1909 a 1935, ainda não há uma estratégia quimioterapêutica efetiva para o seu tratamento da doença. Os tratamentos clínicos empregados na década de 60-70 utilizaram o benzonidazol (**49**) e nifurtimox (**50**), fármacos que apresentam diversos efeitos colaterais. O benzonidazol é o único fármaco disponível para o tratamento da doença e apresenta índice de cura de 70-80% na fase aguda e 10-20% na fase crônica, enquanto que o nifurtimox apresenta o mesmo índice de cura e maiores efeitos citotóxicos. Os efeitos colaterais mais comuns são: vômitos, náuseas, neuropatia periférica e alergia cutânea (Souza *et al.*, 2012).



É importante considerar a relevância das pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novos fármacos para o combate da doença de Chagas, uma vez que a mesma tem sido negligenciada pelas indústrias farmacêuticas. Trata-se de uma doença que afeta setores menos favorecidos da sociedade e desassistidos pelo poder público; assim, a falta de um



mercado economicamente atrativo e seguro nos países em desenvolvimento, diminui o interesse de investimentos das indústrias no setor (Souza *et al.*, 2012).

## 1.7. LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma patologia crônica considerada um grande problema na saúde pública, sendo a segunda infecção mais fatal causada por protozoário, superada apenas pelas mortes causadas por malária (Silva, 2010). A doença tem uma ampla distribuição geográfica, predominando em países tropicais e subtropicais (Ferreira, 2010).

Segundo dados estatísticos mundiais, a doença ocorre em 88 países, afetando mais de 12 milhões de pessoas, sendo que, anualmente, em média de dois milhões de pessoas são infectadas. Acredita-se que cerca de 350 milhões vivem em áreas de risco de contaminação pela doença. (WHO, 2013).

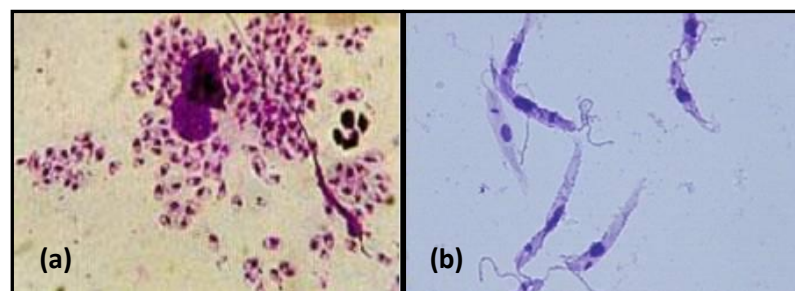
No homem, as leishmanioses são ocasionadas por aproximadamente 21 espécies de *Leishmania*, que infectam uma grande variedade de mamíferos e hospedeiros silvestres ou domésticos e são transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos. Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, bem como a relação hospedeiro-parasita, a doença pode apresentar manifestações clínicas e epidemiológicas distintas. Dessa maneira, a doença é classificada em *Leishmania* visceral (LV) e tegumentar americana (LTA). A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, que agride pele e mucosas, sendo usualmente causada, entre outras, pela espécie *L. amazonensis* (Ashfor, 2000; Freitas, 2010; Ministério da Saúde, 2007; WHO, 2013).

Cerca de 90% do total de casos já registrados de LTA, ocorreram em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru (Gontijo & Carvalho, 2003). No Brasil, a LTA apresentou uma média anual de 24.857 casos novos e coeficientes de detecção variando entre 10,5 a 20,3 casos por 100.000 habitantes no período entre 2000 e 2011. As maiores proporções de casos são das regiões Norte e Nordeste, sendo que ano de 2011 essas regiões atingiram a porcentagem de 46,8% e 33,3%, respectivamente de todos os novos casos deste ano (Portal da Saúde, 2013).

### 1.7.1. TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA DA *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania*, da família dos *Trypanosomatidae*, são parasitas heteroxênicos e unicelulares que no seu ciclo de vida apresentam duas formas

morfológicas: amastigota e promastigota. As formas amastigotas são arredondadas e com curto flagelo que não se exterioriza, são intracelulares obrigatórias e parasitam principalmente macrófagos do hospedeiro vertebrado, com diâmetro variando de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$ . As formas amastigotas vivem e multiplicam-se no interior de células do sistema monocítico fagocitário (SMF) dos hospedeiros vertebrados. As formas promastigotas, por sua vez, caracterizam-se por serem fusiformes e com longo flagelo, são extracelulares, vivem no trato digestório do inseto vetor e possuem dimensões entre 14 e 20  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1,5 a 4  $\mu\text{m}$  de largura (Silva, 2010; Nakamura *et al.*, 2006).



**Figura VII:** Formas evolutivas do protozoário *Trypanosoma cruzi*: amastigotas (a) e promastigotas (b).

A transmissão do parasito entre os hospedeiros ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos, conhecidos popularmente como birigui ou mosquito-palha. Esses insetos pertencem à Ordem *Díptera*, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia* (Gontijo & Carvalho, 2003; Ferreira, 2010).



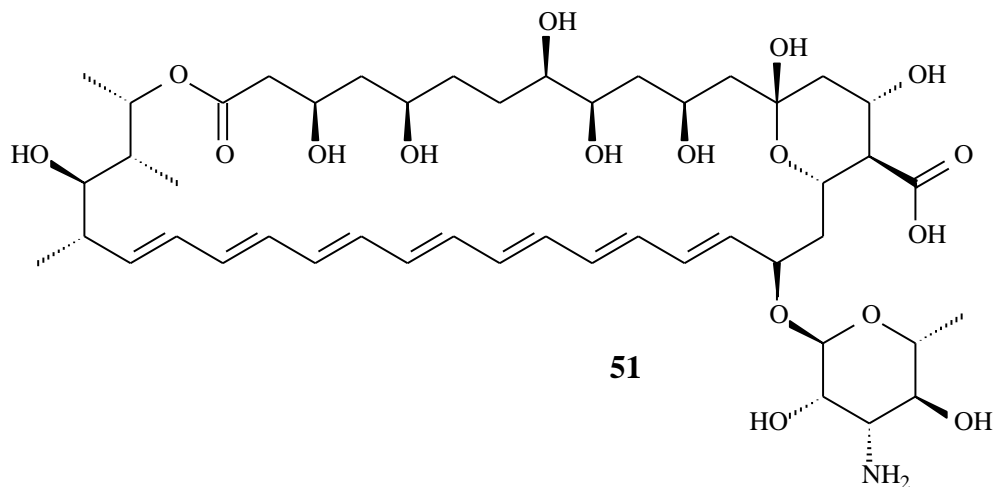
**Figura VIII:** *Lutzomyia longipalpis*, um dos vetores da *Leishmania amazonensis*.

Os flebotomíneos, ao picarem um animal parasitado, sugam formas amastigotas e em seu tubo digestório estas se transformam em promastigotas, multiplicando-se em seguida. Após seu desenvolvimento, estas formas migram para o aparelho picador sugador

do inseto e inoculam formas promastigotas na corrente sanguínea enquanto se alimentam nos capilares dermais. No hospedeiro vertebrado estas formas poderão penetrar em células do SMF, transformando-se em amastigotas em seu interior e multiplicando-se, completando o ciclo evolutivo do protozoário (Gontijo & Carvalho, 2003; Ferreira, 2010).

### 1.7.2. LEISHMANIOSES: CONTROLE E TRATAMENTO

Com relação ao tratamento da doença, o mais recomendado é a utilização de antimoniais pentavalentes, devido à rápida eliminação renal e limitada acumulação desses compostos nos tecidos. Outra opção é a utilização de antibióticos como a anfotericina B (**51**), a droga leishmanicida mais potente disponível comercialmente, com ação em formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, de maneira geral, a alta toxicidade de todas essas drogas e a resistência desenvolvida por algumas cepas de parasitas a esses produtos, exige a pesquisa de novos agentes terapêuticos (Ministério da Saúde, 2005; Silva, 2010).



Sem dúvida, o reino vegetal é uma fonte valiosa de novos agentes medicinais. Alguns relatos na literatura comprovam a atividade antiproliferativa de extratos e frações de plantas sobre formas evolutivas do parasito, além de uma diversidade de compostos orgânicos extraídos de produtos naturais. Podem ser citados alguns alcaloides, triterpenos, chalconas, estilbenos, flavonoides e acetogeninas (Gil *et al.*, 2008).

## 2. OBJETIVO

Com base nos resultados promissores provenientes dos estudos fitoquímicos realizados com espécies da família Orchidaceae e considerando a existência de poucos estudos químicos com o gênero *Maxillaria*, o presente trabalho teve por objetivo realizar o isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos presentes na espécie vegetal *Maxillaria picta*, uma orquídea nativa do Norte do Paraná, bem como avaliar o potencial antiproliferativo, anti-*Trypanosoma* e anti-*Leishmania* do extrato bruto, frações e substâncias isoladas.

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos através de um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas modelo Focus GC (Thermo-Finnigan), equipado com: amostrador automático com forno para extração *headspace*, modelo Triplus, sistema de injeção *split/splitless* com insersor (liner) de vidro silanizado com diâmetro interno (d.i.) de 3 mm; espectrômetro de massas modelo DSQ II (Thermo-Finnigan), equipado com fonte de ionização por elétrons (EI), analisador de massas do tipo quadrupolo e um multiplicador de elétrons (diodo) como detector; sistema de aquisição de dados através do software Xcalibur que acompanha base de dados de espectros contidos na biblioteca espectral NIST MS Search Version 2.0. O gás de arraste utilizado, foi o gás hélio com grau de pureza 99,999% (5.0) (White Martins) com vazão de 1,0 mL/min. A coluna capilar utilizada foi DB-5 (5% fenil-95% metilpolissiloxano) de sílica fundida, 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de espessura de filme da fase estacionária (J & W Scientific). A temperatura da fonte de ionização e do injetor utilizada nas análises foi de 250 °C em modo de injeção *splitless*. O volume de injeção foi de 1,0 µL e a temperatura inicial do forno foi de 50 °C, sendo elevado até 290 °C a uma taxa de 15°C/min mantendo na temperatura final por 15 min.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em espectrômetros Varian Mercury Plus, operando a 300,06 MHz para  $^1\text{H}$  e 75,45 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Também foram obtidos os espectros pela técnica DEPT e correlações bidimensionais a partir dos

mapas de contornos COSY, HMBC e HSQC. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano. Os solventes utilizados foram:  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  e  $\text{DMSO-}d_6$ , Aldrich ou Isotec.

As cromatografias em coluna foram realizadas utilizando sílica gel 60 e/ou Sephadex LH 20. Os diâmetros das colunas utilizadas variaram de acordo com a massa do material a ser tratado.

O acompanhamento das cromatografias e filtrações em coluna foi feito através de cromatografia em camada delgada (CCD), sendo que as placas cromatográficas foram preparadas com fase estacionária sílica-gel 60 G e sílica-gel 60 GF, com 0,25 mm de espessura. As substâncias separadas nas placas cromatográficas foram visualizadas através do revelador anisaldeído.

Os solventes orgânicos (hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) utilizados nas fases móveis nas cromatografias e filtrações apresentavam grau de pureza P.A ou foram destilados. O processo de evaporação de solventes foi realizado utilizando evaporador rotativo à pressão reduzida.

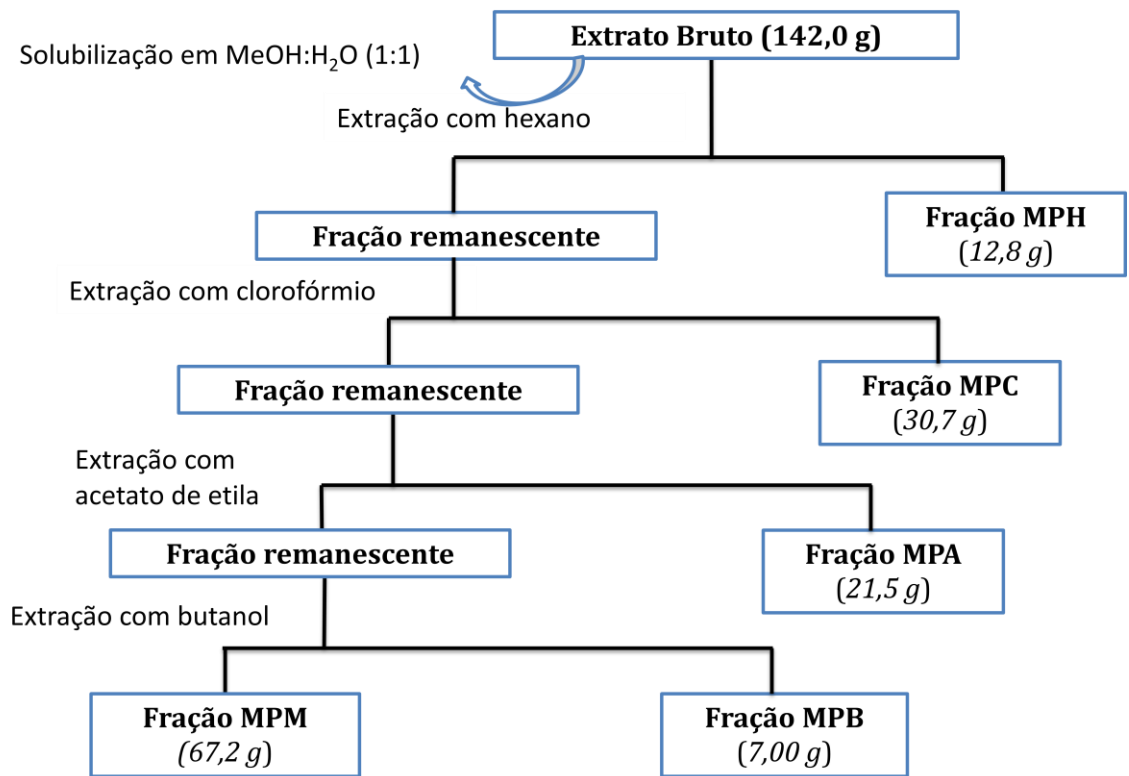
## **3.2. ESTUDO QUÍMICO DE *M. picta***

### **3.2.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *M. picta***

A espécie vegetal *M. picta* foi coletada a partir de uma peroba caída por incidência de raios no campus da Universidade Estadual de Londrina, em março/2012. Aproximadamente 6,0 kg do material vegetal (raízes, folhas e pseudobulbos) foram moídos e submetidos a uma extração exaustiva com uma mistura de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  70% a frio. A evaporação sob pressão reduzida produziu um extrato bruto (188,0g).

### **3.2.2. FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE *M. picta***

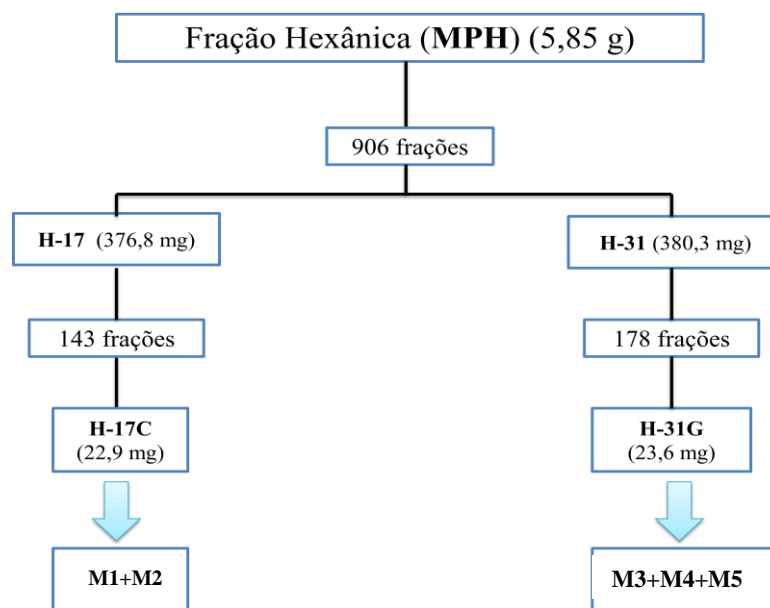
Parte do extrato bruto clorofórmico-metanólico (MPEB) (142,0g) foi solubilizado em  $\text{MeOH:H}_2\text{O}$  1:1 e particionado em funil de separação, utilizando os solventes orgânicos hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol em ordem crescente de polaridade, resultando nas partições hexânica (MPH; 12,8 g), clorofórmica (MPC; 30,7 g), acetato de etila (MPA; 21,5 g), butanólica (MPB; 7,0 g) e hidrometanólica remanescente (MPM; 67,2 g), como mostra o **esquema 1**.



**Esquema 1:** Procedimento empregado para o fracionamento do extrato bruto de *Maxillaria picta*.

### 3.2.2.1. FRAÇÃO HEXÂNICA (MPH)

Parte da partição hexânica (5,85 g) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel (200,0 g; Ø= 5,5 cm), empacotada com hexano e utilizando como eluentes hexano, hexano:clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio:metanol e metanol, em gradiente crescente de polaridade obtendo-se 906 frações (**tabela 1**). O **esquema 2**, a seguir, ilustra o processo de isolamento dos compostos dessa fração.



**Esquema 2:** Estudo da fração hexânica (MPH).

**Tabela 1: Dados da cromatografia em coluna da partição hexânica**

<b>Solvente</b>	<b>Frações coletadas</b>	<b>Volume somado (mL)</b>
Hex 100% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 20%	1-77	2000
Hex:CHCl <sub>3</sub> 25% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 40%	78-145	800
Hex:CHCl <sub>3</sub> 45% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 65%	146-234	1100
Hex:CHCl <sub>3</sub> 70% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 75%	235-305	1000
Hex:CHCl <sub>3</sub> 77%	306-427	1400
Hex:CHCl <sub>3</sub> 80% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 82%	428-489	1000
Hex:CHCl <sub>3</sub> 84% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 92%	490-576	1200
Hex:CHCl <sub>3</sub> 94% CHCl <sub>3</sub> :MeOH 4%	577-636	1200
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 6%	637-716	1000
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 8% a CHCl <sub>3</sub> :MeOH 16%	717-818	1000
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 18% a CHCl <sub>3</sub> :MeOH 35%	818-901	1000
CHCl <sub>3</sub> :MeOH 50% a MeOH 100%	902-906	500

As frações que apresentaram os mesmos perfis em CCD foram agrupadas resultando em 40 novas frações (**Tabela 2**).

**Tabela 2: Dados das junções das frações obtidas na CC da partição hexânica**

<b>Junção</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
1-9	H-1	48,3
10-16	H-2	15,8
17-30	H-3	16,7
31-40	H-4	12,9
41-81	H-5	31,0
82-93	H-6	18,4
94-100	H-7	13,6
101-128	H-8	12,5
129-137	H-9	28,5
138-149	H-10	21,8
150-177	H-11	13,5



178-190	H-12	27,1
191-212	H-13	25,9
213-230	H-14	158,9
231-239	H-15	26,9
240-263	H-16	54,1
264-289	H-17	376,8
290-305	H-18	258,3
306-310	H-19	104,3
311-316	H-20	159,0
317-348	H-21	255,7
349-380	H-22	248,4
381-425	H-23	178,1
426-472	H-24	65,0
473-519	H-25	80,6
520-534	H-26	38,5
535-592	H-27	15,9
593-617	H-28	68,4
618-632	H-29	19,7
633-660	H-30	258,2
661-679	H-31	380,3
680-727	H-32	112,6
728-741	H-33	42,2
742-755	H-34	134,2
756-810	H-35	36,2
811-842	H-36	39,2
843-855	H-37	78,2
856-869	H-38	77,8
870-882	H-39	46,0
883-906	H-40	88,7

---

A fração H-17, de massa igual a 376,8 mg, foi submetida a um segundo fracionamento em coluna de sílica-gel (11,0 g; Ø= 1,5 cm), sendo este realizado com os solventes hexano, hexano:clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio:acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila:metanol e metanol, em gradiente crescente de polaridade, fornecendo 143 novas frações (**Tabela 3**).

**Tabela 3: Dados do fracionamento em CC de H-17**

Solvente	Frações coletadas	Volume somado (mL)
Hex 100% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 20%	1-12	150
Hex:CHCl <sub>3</sub> 30% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 50%	13-37	300
Hex:CHCl <sub>3</sub> 55% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 65%	38-52	150
Hex:CHCl <sub>3</sub> 70% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 80%	53-65	150
Hex:CHCl <sub>3</sub> 85% a CHCl <sub>3</sub> 100%	66-85	200
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 5% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 20%	86-109	200
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 30% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 60%	110-123	150
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 80% a AcOEt 100%	124-131	100
AcOEt:MeOH 10% a AcOEt:MeOH 20%	132-141	100
AcOEt:MeOH 40% a AcOEt:MeOH 60%	143	50

As frações que apresentaram os mesmos perfis em CCD foram agrupadas em 14 novas frações (**Tabela 4**). A subfração H-17C resultou no isolamento da mistura de compostos **M1+M2** (22,9 mg).

**Tabela 4: Dados das junções das frações obtidas na CC de H-17**

<b>Junção</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Substância Isolada</b>
1-16	H-17A	37,4	
17-29	H-17B	28,5	
30-38	H-17C	22,9	<b>M1+M2</b>
39-47	H-17D	16,2	
48-56	H-17E	20,4	
57-59	H-17F	27,4	
60-62	H-17G	23,9	
63-82	H-17H	13,1	
83-86	H-17I	10,3	
87-89	H-17J	26,4	
90-93	H-17K	22,1	
94-101	H-17L	9,1	
102-119	H-17M	15,9	
120-147	H-17N	15,0	

A fração H-31 (380,3 mg), foi submetida a um fracionamento em coluna de sílica-gel (11,4 g; Ø= 1,5 cm), realizada com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade, fornecendo 178 frações (**Tabela 5**).

**Tabela 5: Dados do fracionamento em CC de H-31**

<b>Solvente</b>	<b>Frações coletadas</b>	<b>Volume somado (mL)</b>
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 100% a CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 5%	1-22	250
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 10% a CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 30%	44-56	300
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 40% a CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 50%	57-76	200
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 60% a CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 70%	77-93	200
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt 80% a AcOEt 100%	94-108	150
AcOEt:MeOH 2% a AcOEt:MeOH 5%	109-129	200
AcOEt:MeOH 10% a AcOEt:MeOH 18%	130-156	250
AcOEt:MeOH 20% a AcOEt:MeOH 40%	157-170	150
AcOEt:MeOH 60% a AcOEt:MeOH 80%	171-178	150

As frações que apresentaram os mesmos perfis em CCD foram agrupadas resultando em 19 novas frações, conforme **Tabela 6**. A fração H-31G resultou no isolamento da mistura **M3+M4+M5** de massa igual a 23,6 mg.

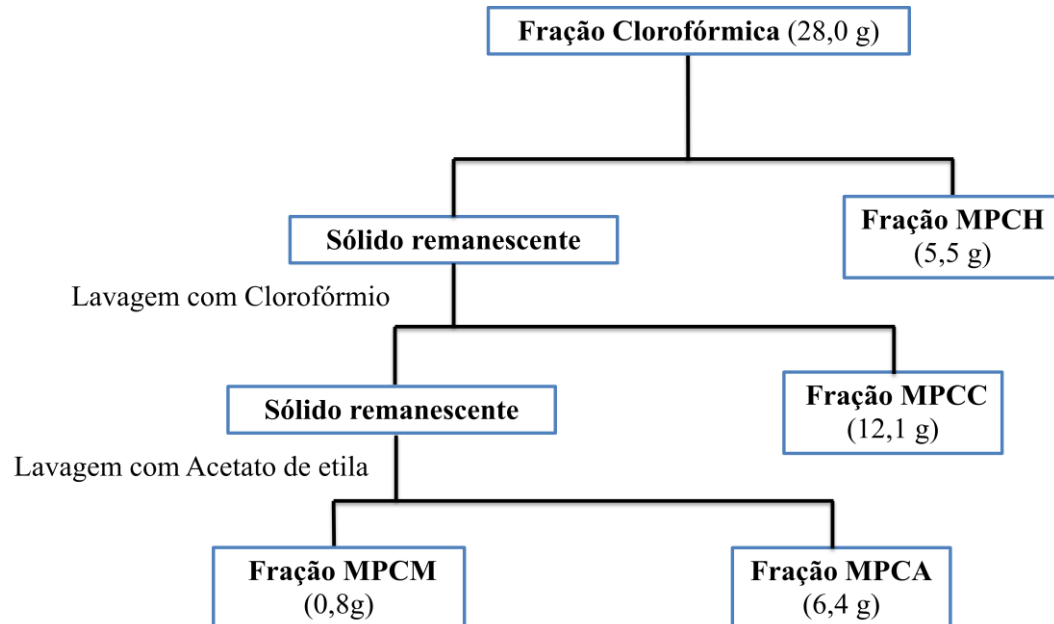
**Tabela 6: Dados das junções das frações obtidas na CC de H-31**

Junção	Código	Massa (mg)	Substância Isolada
1-10	H-31 <sup>a</sup>	6,3	
11-13	H-31B	9,4	
14-24	H-31C	13,2	
25-28	H-31D	18,2	
29-32	H-31E	12,2	
33-42	H-31F	28,3	
43-61	H-31G	23,6	<b>M3+M4+M5</b>
62-67	H-31H	13,1	
68-71	H-31I	7,1	
72-77	H-31J	5,9	
78-82	H-31K	17,3	
90-103	H-31L	14,5	
104-113	H-31M	9,5	
113-121	H-31N	26,4	
122-137	H-31 <sup>o</sup>	10,5	
138-142	H-31P	17,5	
143-151	H-31Q	8,5	
152-170	H-31R	14,3	
171-179	H-31S	2,7	

As frações H-18 (258,3 mg), H-21 (255,7 mg), H-23 (178,1 mg), H-34 (134,2 mg) e H-25 (80,1 mg) também foram submetidas a um fracionamento em coluna de sílica gel, realizada com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade, sem que substâncias puras fossem isoladas.

### 3.2.2.2. FRAÇÃO CLOROFÓRMICA (MPC)

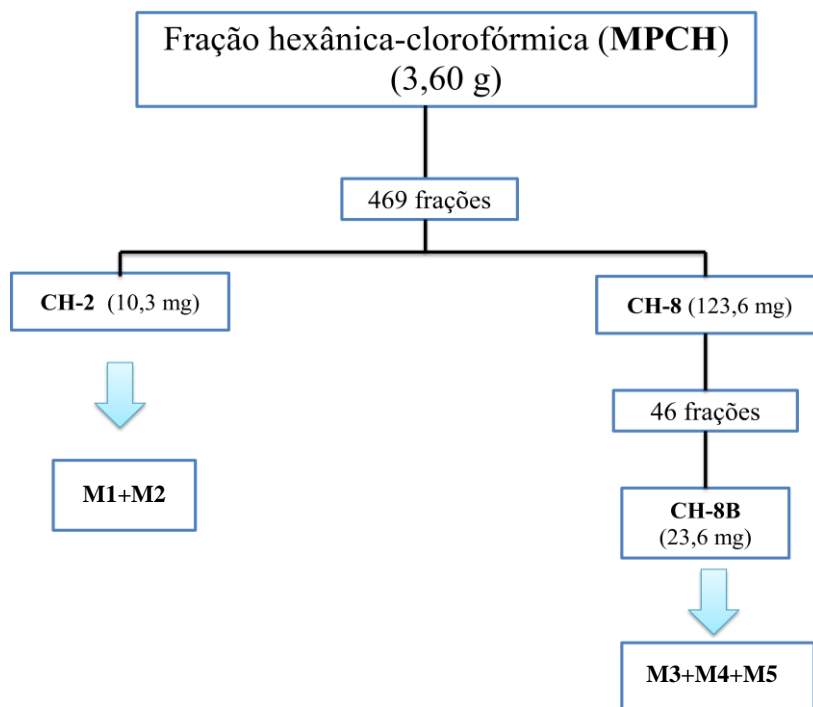
Parte da fração clorofórmica foi solubilizada sucessivamente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, resultando respectivamente nas subfrações MPCH (5,5g), MPCC (12,1g), MPCM (0,8g) e MPCM (0,8g), conforme **esquema 3**, a seguir:



**Esquema 3:** Solubilização da fração clorofórmica

### 3.2.2.2.1. SUBFRAÇÃO CLOFÓRMICA-HEXÂNICA (MPCH)

Parte da subfração clorofórmica-hexânica MPCH (3,6g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica (120,8g;  $\varnothing=5,5$  cm), empacotada com hexano e eluída com hexano, hexano:CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade (**Tabela 7**). O **esquema 4**, a seguir, ilustra o processo de isolamento dos compostos dessa fração.



**Esquema 4:** Estudo da fração clorofórmica-hexânica (MPCH).

**Tabela 7: Dados da cromatografia em coluna de MPCH**

Solvente	Frações coletadas	Volume somado (mL)
Hex 100% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 5%	1-19	700
Hex:CHCl <sub>3</sub> 10% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 35%	20-44	400
Hex:CHCl <sub>3</sub> 45% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 75%	45-80	500
Hex:CHCl <sub>3</sub> 80% a CHCl <sub>3</sub> 100%	81-129	500
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 2,5%	130-210	1000
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 5% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 15%	211-262	600
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 20% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 30%	263-312	600
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 35% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 45%	313-356	600
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 50%	357-388	800

CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 60% a AcOEt:MeOH 2%	389-428	600
AcOEt:MeOH 5%	429-445	600
AcOEt:MeOH 10% a AcOEt:MeOH 40%	446-463	400
AcOEt:MeOH 60% a MeOH 100%	464-469	600

As 469 frações coletadas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, como mostra a **tabela 8**. As frações que apresentaram os mesmos perfis em CCD foram agrupadas resultando em 20 novas frações. A subfração CH-2 (10,3 mg) também resultou no isolamento da mistura **M1+M2**.

**Tabela 8: Dados das junções das frações obtidas na CC de MPCH**

Junção	Código	Massa (mg)	Substância Isolada
1-37	CH-1	4,9	
38-52	CH-2	10,3	<b>M1+M2</b>
53-59	CH-3	8,7	
60-69	CH-4	23,1	
70-74	CH-5	42,6	
75-87	CH-6	73,4	
88-94	CH-7	78,1	
95-125	CH-8	123,6	
128-136	CH-9	45,5	
137-148	CH-10	113,1	
149-170	CH-11	104,6	
171-206	CH-12	174,0	
207-220	CH-13	46,2	
221-245	CH-14	83,6	
246-276	CH-15	67,2	
277-298	CH-16	81,9	
299-385	CH-17	30,6	
386-388	CH-18	29,4	
423-438	CH-19	12,4	
439-469	CH-20	43,7	

A fração CH-8 (123,6 mg) também foi submetida a um fracionamento em coluna de sílica gel (8,8g; Ø= 1,0 cm), realizada com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila, em gradiente crescente de polaridade, resultado em 46 frações, conforme **tabela 9**.

**Tabela 9: Dados do fracionamento em CC de CH-8**

Solvente	Frações coletadas	Volume somado (mL)
Hex 100% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 5%	1-2	50
Hex:CHCl <sub>3</sub> 10% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 35%	3-10	110
Hex:CHCl <sub>3</sub> 45% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 75%	11-31	150
Hex:CHCl <sub>3</sub> 80% a CHCl <sub>3</sub> 100%	32-34	40
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 2,5% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 15%	35-38	40
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 20% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 30%	39-42	50
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 35% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 45%	43-45	40
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 50%	46	20

Essas frações foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado em CCD, resultando no isolamento das substâncias **M3+M4+M5** de massa igual a 30,3 mg (fração CH-8B), conforme **tabela 10**.

**Tabela 10: Dados das junções das frações obtidas na CC de CH-8**

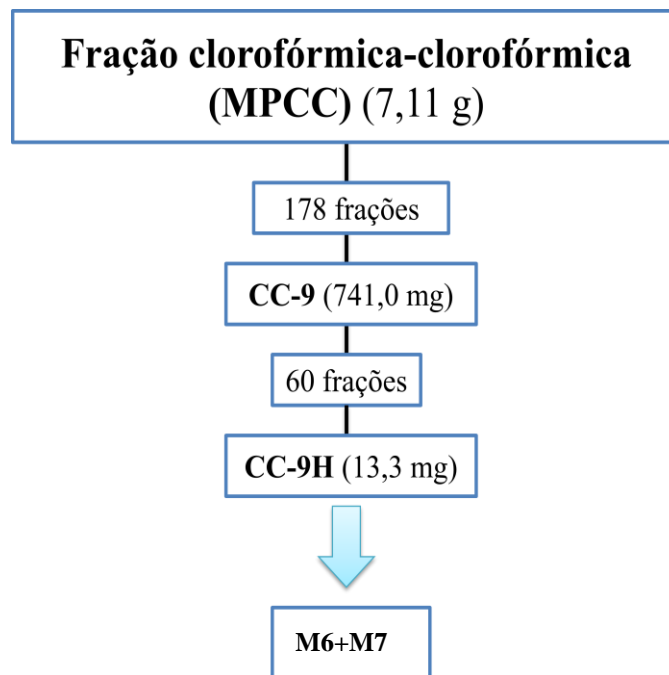
Junção	Código	Massa (mg)	Substância Isolada
1-10	CH-8 <sup>a</sup>	5,3	
11-23	CH-8B	30,3	<b>M3+M4+M5</b>
24-33	CH-8C	16,2	
33-46	CH-8D	10,2	

As frações CH-11 (104,6 mg) e CH-6 (73,4 mg) foram submetidas a um fracionamento em coluna de sílica gel, realizada com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade, sem que substâncias puras fossem isoladas.



### 3.2.2.2.2. SUBFRAÇÃO CLOROFÓRMICA-CLOROFÓRMICA (MPCC)

Parte da subfração clorofórmica-clorofórmica MPCC (7,11g) foi submetida a um fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel (120,80g; Ø= 5,5 cm), empacotada com hexano e eluída com hexano, hexano:CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH em gradiente crescente de polaridade, (tabela 11). O esquema 5, a seguir, ilustra o processo de isolamento dos compostos dessa fração.



**Esquema 5:** Estudo da fração clorofórmica-clorofórmica (MPCC).

**Tabela 11: Dados da cromatografia em coluna de MPCC**

<b>Solvente</b>	<b>Frações coletadas</b>	<b>Volume somado (mL)</b>
Hex 100% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 20%	1-9	800
Hex:CHCl <sub>3</sub> 25% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 55%	10-21	800
Hex:CHCl <sub>3</sub> 65% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 95%	22-32	600
CHCl <sub>3</sub> 100% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 5%	33-81	2000
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 10% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 25%	82-94	1400
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 30% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 45%	95-105	1400
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 50% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 65%	106-121	1600
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 70% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 85%	122-131	1600
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 90% a AcOEt 100%	132-137	1200
AcOEt:MeOH 2% a AcOEt:MeOH 10%	138-143	1700
AcOEt:MeOH 25% a MeOH 100%	144-148	500

As 148 frações coletadas foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**Tabela 12**).

**Tabela 12: Dados das junções das frações obtidas na CC da fração clorofórmica-clorofórmica**

Junção	Código	Massa (mg)
1-4	CC-1	4,3
5-10	CC-2	6,3
11-17	CC-3	7,9
18-23	CC-4	17,1
24-28	CC-5	58,4
29-38	CC-6	71,0
39-44	CC-7	62,0
45-47	CC-8	118,3
48-54	CC-9	741,6
55-62	CC-10	133,7
63-66	CC-11	81,3
67-77	CC-12	23,4
78-86	CC-13	161,0
87-95	CC-14	123,8
96-100	CC-15	85,7
101-108	CC-16	85,4
109-117	CC-17	78,4
118-123	CC-18	63,9
124-131	CC-19	59,6
132-136	CC-20	49,2
137-148	CC-21	57,4

A fração CC-9 (741,0 mg) foi submetida a um fracionamento em coluna de sílica gel (30,4g; Ø= 1,5 cm), realizada com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, em gradiente crescente de polaridade, resultando em 60 frações (**Tabela 13**) que foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico observado em CCD (**Tabela 14**).

**Tabela 13: Dados da cromatografia em coluna da fração CC-9**

Solvente	Frações coletadas	Volume somado (mL)
Hex:CHCl <sub>3</sub> 70% a Hex:CHCl <sub>3</sub> 80%	1-4	350
Hex:CHCl <sub>3</sub> 85%	5-20	800
Hex:CHCl <sub>3</sub> 90%	21-24	200
CHCl <sub>3</sub> 100% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 2%	25-39	300
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 4% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 8%	40-43	300
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 10% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 15%	44-45	150
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 20% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 40%	46-48	300
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 60% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 90%	49-53	300
AcOEt 100% a AcOEt:MeOH 30%	54-56	200
AcOEt:MeOH 50% a MeOH 100%	57-60	200

**Tabela 14: Dados do fracionamento em CC de CC-9**

Fração	Código	Massa (mg)
1-10	CC-9A	27,2
11-12	CC-9B	57,3
13-15	CC-9C	21,3
16-19	CC-9D	39,4
20-24	CC-9E	48,3
25-27	CC-9F	24,1
28-34	CC-9G	63,4
35-39	CC-9H	127,4
40-41	CC-9I	58,2
42-46	CC-9J	42,4
47-51	CC-9K	36,3
52-60	CC-9L	19,0

A subfração CC-9H (127,4 mg), foi submetida ao mesmo processo (coluna de sílica; 8,5g; Ø= 1,0 cm) (Tabelas 15 e 16), resultando no isolamento de 13,3 mg da mistura **M6+M7** (Fração CC-9H2).

**Tabela 15: Dados da cromatografia em coluna da fração CC-9H**

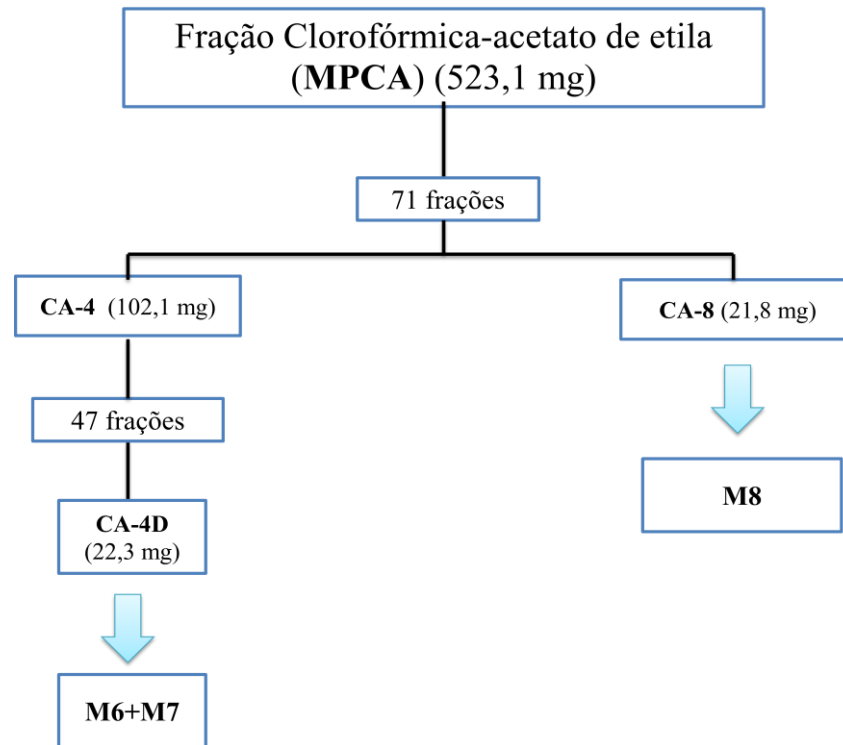
<b>Solvente</b>	<b>Frações coletadas</b>	<b>Volume somado (mL)</b>
Hex:CHCl <sub>3</sub> 90%	1	30
CHCl <sub>3</sub> 100% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 2%	2-8	200
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 5% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 10%	9-10	100
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 10% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 20%	14-15	100
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 30% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 50%	16-25	200
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 60% a CHCl <sub>3</sub> :AcOEt 90%	26-31	230
AcOEt 100% a AcOEt:MeOH 5%	32-40	180
AcOEt:MeOH 10% a AcOEt:MeOH 50%	41-45	140

**Tabela 16: Dados do fracionamento em CC de CC-9H**

<b>Junção</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Substância isolada</b>
1-8	CC-9H1	9,0	
9-11	CC-9H2	13,3	<b>M6+M7</b>
12-14	CC-9H3	31,9	
15-20	CC-9H4	19,2	
21-26	CC-9H5	17,9	
27-45	CC-9H6	8,5	

### 3.2.2.2.3. SUBFRAÇÃO CLOROFÓRMICA ACETATO DE ETILA (MPCA)

Parte da fração MPCA (523,1 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing = 2,0$  cm) somente com metanol, resultando em 71 frações de aproximadamente 2 mL que foram agrupadas de acordo com semelhança observada em CCD, conforme mostrado na **tabela 17**. A fração CA-8 apresentou um perfil simples quando submetida a CCD e após as análises de RMN, foi identificada a substância **M8** (21,0 mg). O **esquema 6**, a seguir, ilustra o processo de isolamento dos compostos dessa fração.



**Esquema 6:** Estudo da fração clorofórmica-acetato de etila (MPCA)

**Tabela 17:** Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPCA.

Junção	Código	Massa (mg)	Substância Isolada
1-6	CA-1	6,7	
7-9	CA-2	4,6	
10-11	CA-3	3,8	
12-17	CA-4	102,1	
18-19	CA-5	29,8	
20-27	CA-6	32,2	
28-31	CA-7	80,3	
32-34	CA-8	21,0	<b>M8</b>
36-42	CA-9	23,5	
43-48	CA-10	33,2	
49-53	CA-11	24,2	
54-62	CA-12	21,9	
63-66	CA-13	71,4	
67-71	CA-14	11,0	

A fração CA-4 (102,1 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing=1,0$  cm) com metanol, resultando em 47 frações de aproximadamente 2 mL que foram agrupadas de acordo com semelhança observada em CCD, conforme **tabela 18**. A subfração CA-4D resultou no isolamento da mistura de substâncias **M6+M7** (22,3 mg). A mistura foi submetida a diversas tentativas de separação, porém sem sucesso.

**Tabela 18: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração CA-4**

<b>Junção</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Substância Isolada</b>
<b>1-8</b>	CA-4 <sup>a</sup>	10,8	
<b>9-10</b>	CA-4B	13,2	
<b>11-15</b>	CA-4C	14,2	
<b>16-18</b>	CA-4D	22,3	<b>M6+M7</b>
<b>19-23</b>	CA-4E	21,3	
<b>26-33</b>	CA-4F	16,1	

As frações CA-7 (80,3 mg) e CA-13 (71,4 mg) foram submetidas a uma filtração em Sephadex LH 20, sem o isolamento de substâncias puras.

**3.2.2.2.4. SUBFRAÇÃO CLOROFÓRMICA METANÓLICA (MPCM)**

Parte da fração MPCM (499,1 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing= 2,0$  cm) somente com metanol, resultando em 199 frações de aproximadamente 2 mL. As frações que obtiveram o mesmo perfil cromatográfico em CCD foram reunidas, conforme mostrado na **tabela 19**.

**Tabela 19: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPCA.**

<b>Junção</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>
1-18	CM-1	40,3
18-36	CM-2	53,4
37-50	CM-3	55,1
51-80	CM-4	75,6
81-107	CM-5	58,3
108-121	CM-6	39,2
122-128	CM-7	33,1
129-157	CM-8	29,4
158-171	CM-9	57,2
172-199	CM-10	15,4

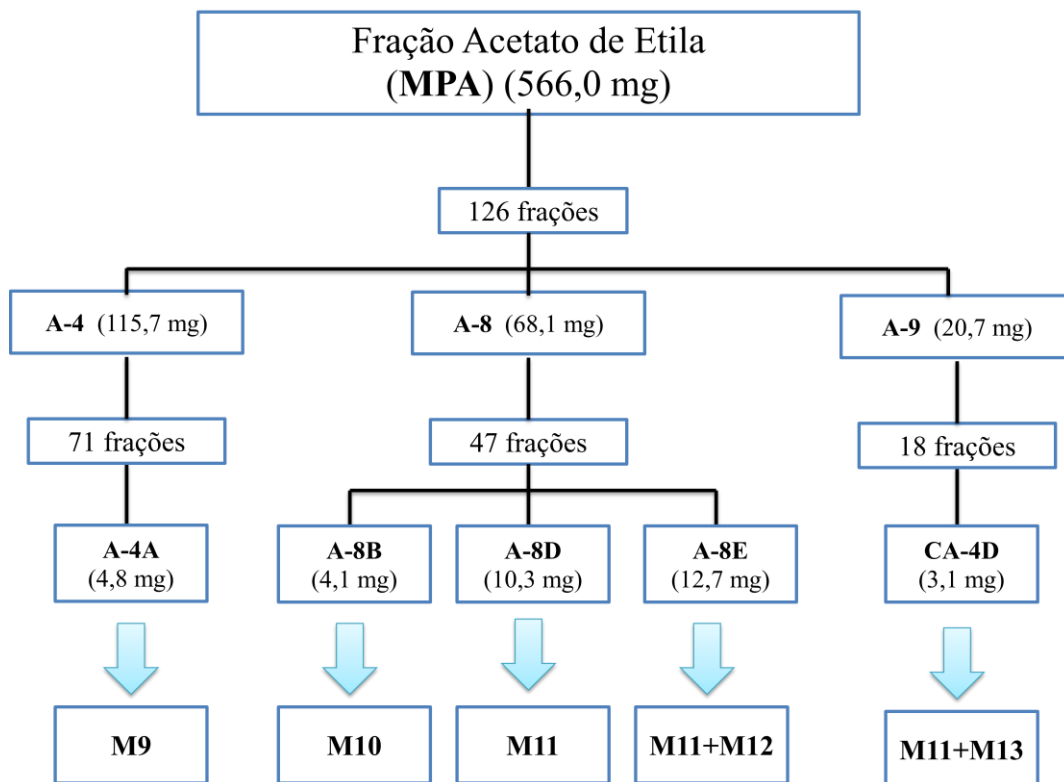
As frações CM-4 (75,6 mg), CM-5 (71,4 mg) e CM-9 (57,2 mg) foram submetidas a uma filtração em Sephadex LH 20, sem o isolamento de substâncias puras.



### 3.2.2.3. FRAÇÃO ACETATO DE ETILA (MPA)

Para o desenvolvimento do processo de purificação cromatográfica, a fração acetato de etila (21,5g) foi solubilizada em metanol; nesse ponto observou-se a formação de um precipitado sólido amarelado que foi separado e enviado para análises espectroscópicas, resultando no isolamento da substância **M9** (19,3 mg).

Após a retirada do precipitado, parte da fração MPA (566,0 mg), foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing=1,5$  cm) somente com metanol, resultando em 126 frações de aproximadamente 2 mL. As frações coletadas foram reunidas e codificadas de acordo com as semelhanças observadas em CCD (**tabela 20**). O **esquema 7**, a seguir, ilustra o processo de isolamento dos compostos dessa fração.



**Esquema 7:** Estudo da fração acetato de etila (MPA).

**Tabela 20: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPA.**

Frações	Código	Massa (mg)
1-11	A-1	4,6
12-16	A-2	17,1
17-20	A-3	31,4
21-28	A-4	115,7
29-35	A-5	71,5
36-37	A-6	16,1
38-40	A-7	13,3
41-52	A-8	68,1
53-60	A-9	20,7
61-64	A-10	18,3
65-94	A-11	16,9
95-102	A-12	26,6
103-126	A-13	6,7

A fração A-4 (115,7 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing=1,0\text{cm}$ ) usando somente metanol como eluente, onde foram coletadas 71 frações e reunidas em 8 frações de acordo com as semelhanças observadas em CCD. Nesse processo, o isolamento da substância **M9** foi realizado (Fração A-4A) (**Tabela 21**).

**Tabela 21: Dados da filtração em Sephadex em CC de A-4**

Junção	Código	Massa (mg)	Substância isolada
1-8	A-4A	4,8	<b>M9</b>
9-13	A-4B	9,2	
14-15	A-4C	7,8	
16-20	A-4D	7,5	
21-25	A-4E	5,6	
26-30	A-4F	7,2	
31-35	A-4G	4,9	
36-71	A-4H	4,8	

A fração A-8 (68,1 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing=1,0\text{cm}$ ) usando somente metanol como eluente, coletando-se 47 frações que foram reunidas em 8 frações de acordo com as semelhanças observadas em CCD. Observou-se a presença de um precipitado na subfração A-8B, que levou ao isolamento da substância **M10**, enquanto que nas subfrações A-8D e A-8E resultaram no isolamento da substância **M11** e da mistura de substâncias **M11+M12** (Tabela 22).

**Tabela 22: Dados da filtração em Sephadex em CC de A-8**

<b>Junção</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Substância isolada</b>
1-5	A-8 <sup>a</sup>	9,9	
11-15	A-8B	4,1	<b>M10</b>
16-20	A-8C	4,9	
21-25	A-8D	10,3	<b>M11</b>
26-31	A-8E	12,7	<b>M11+M12</b>
32-38	A-8F	5,3	
39-41	A-8G	2,4	
42-47	A-8H	2,0	

A fração A-9 (20,7 mg) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing=1,0\text{cm}$ ) usando somente metanol como eluente, onde foram coletadas 18 frações e reunidas em 4 frações de acordo com as semelhanças observadas em CCD. Nesse processo, o isolamento das substâncias **M11+M13** foi realizado (Tabela 23).

**Tabela 23: Dados da filtração em Sephadex em CC de A-9**

<b>Junção</b>	<b>Código</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Substância isolada</b>
1-4	A-9 <sup>a</sup>	5,1	
5-9	A-9B	3,1	<b>M11+M13</b>
10-15	A-9C	2,0	
16-18	A-9D	8,2	

### 3.2.2.4. FRAÇÃO BUTANÓLICA (MPB)

Antes do processo de purificação cromatográfica, a fração butanólica foi solubilizada em metanol, formando um precipitado sólido amarelado (**M9**), de massa igual a 34,7 mg, que foi enviado para análises espectroscópicas.

Parte da fração MPB (540,2 mg) foi submetida a filtração em Sephadex LH 20 ( $\varnothing=2,0$  cm) somente com metanol, resultando em 136 frações de aproximadamente 2 mL. As frações que obtiveram o mesmo perfil cromatográfico em CCD foram reunidas, conforme mostrado na **tabela 24**.

**Tabela 24: Dados da filtração em Sephadex LH 20 da fração MPB.**

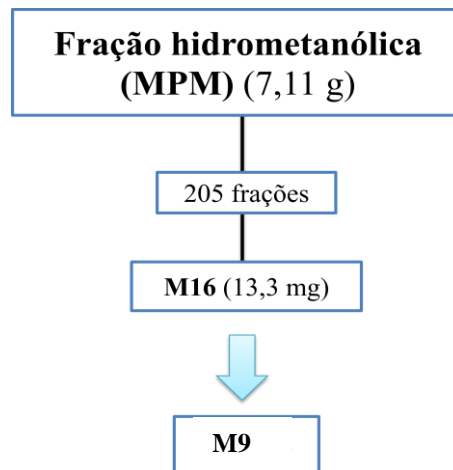
Frações	Código	Massa (mg)
1-5	B-1	6,3
6-13	B-2	12,5
14-24	B-3	23,6
25-29	B-4	31,1
30-37	B-5	29,3
38-42	B-6	45,9
43-49	B-7	46,1
50-64	B-8	74,4
65-80	B-9	99,2
81-96	B-10	39,2
97-116	B-11	36,4
117-136	B-12	20,1

As frações B-6 (45,9 mg), B-7 (46,1 mg), B-8 (74,4 mg) e B-9 (99,2 mg) foram submetidas a uma filtração em Sephadex LH 20, resultando em complexas misturas de açúcares.

### 3.2.2.5. FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA (MPM)

A fração hidrometanólica foi solubilizada em água, antes do processo de purificação cromatográfica, formando um precipitado sólido amarelado (**M9**), com massa de 2,510 g, sendo enviado para análises espectroscópicas.

O **esquema 8**, a seguir, ilustra o processo de isolamento dos compostos da fração hidrometanólica, na qual parte (601,8 mg) foi submetida a um fracionamento em Sephadex LH-20 usando como eluentes água e metanol em gradiente crescente de polaridade, resultando em 205 frações agrupadas de acordo com semelhança observada em CCD (**Tabela 25**). Nesse procedimento foi possível o isolamento da substância **M9** como pode ser observado na **Tabela 26**.



**Esquema 8:** Estudo da fração hidrometanólica (MPM).

**Tabela 25:** Dados do fracionamento em Sephadex LH 20 da fração MPM

Solvente	Frações coletadas	Volume somado (mL)
H <sub>2</sub> O 100%	1-102	60
MeOH:H <sub>2</sub> O 75%	103-129	40
MeOH:H <sub>2</sub> O 50%	130-149	30
MeOH:H <sub>2</sub> O 25%	150-186	60
MeOH 100%	187-205	50

**Tabela 26: Dados das junções das frações obtidas no fracionamento em Sephadex LH 20 da fração MPM**

Junções	Código	Massa (mg)	Substância Isolada
1-11	M-1	23,2	
12-20	M-2	28,3	
21-26	M-3	12,4	
27-37	M-4	29,3	
38-41	M-5	16,2	
42-45	M-6	15,2	
46-55	M-7	24,2	
56-67	M-8	20,1	
68-82	M-9	36,5	
106-116	M-10	67,3	
117-125	M-11	34,1	
126-136	M-12	50,1	
137-149	M-13	38,2	
150-156	M-14	15,1	
157-165	M-15	34,1	
166-187	M-16	26,0	<b>M9</b>
188-194	M-17	12,5	
194-205	M-18	11,4	

As demais frações apresentaram perfil bastante complexo em CCD, além de dificuldade de solubilização nos solventes testados (hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água, puros e em mistura), fato que impossibilitou o estudo das mesmas.

### **3.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

#### **3.3.1. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA**

A avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto, frações e de uma substância isolada, a xantona mangiferina, foi realizada contra diversas linhagens de células tumorais humanas.

##### **3.3.1.1. LINHAGENS CELULARES**

Para a realização da triagem *in vitro* foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas de rim (786-0), melanoma (UACC-62), leucemia (K562) mama (MCF-7), ovário (OVCAR-3), próstata (PC-3), cólon (HT29), pulmão (NCI-H460), glioma (U251), ovário resistente (NCI-ADR/RES) e células normais de queratinócito humano (HaCat) cedidas pelo Instituto Nacional do Cancer (NCI/EUA, Frederick MA). Todas as linhagens foram cultivadas em RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (1000U/mL:1000µg/mL), em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C e ambiente úmido.

##### **3.3.1.2. TESTE DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM CULTURA DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

Células tumorais humanas (100 µL suspensão celular.compartimento<sup>-1</sup>, densidade de inoculação entre 3x10<sup>4</sup> e 6,5x10<sup>4</sup> cel mL<sup>-1</sup>) foram expostas a diferentes concentrações das amostras em DMSO/RPMI/SFB 5% (0.25, 2.5, 25 and 250 µg mL<sup>-1</sup>) e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, em ambiente úmido, por 48h. A concentração final de DMSO não afetou a viabilidade celular. No momento da adição das amostras (T0) e após o período de exposição (T1), as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% e a proliferação celular foi determinada através da quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo proteico celular usando-se o teste de sulforrodamina B.<sup>13</sup> A partir da curva de proliferação celular em função da concentração de amostra, calculou-se a concentração efetiva GI<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular) através de regressão não linear usando o software ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation).

### 3.3.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM FORMAS EPIMASTIGOTAS E TRIPOMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

#### 3.3.2.1. ENSAIOS DE TOXIDADE CELULAR

Os ensaios de atividade contra *T. cruzi* e citotoxicidade foram realizados sob coordenação do Prof. Dr. Celso V. Nakamura (UEM). Os ensaios de toxicidade celular foram realizados com a linhagem LLCMK<sub>2</sub> (células epiteliais de rim de *Macaca mulata*). As células foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina 2 mM, 50 mg/mL de gentamicina e tamponado com bicarbonato de sódio até pH 7,6, de acordo com metodologia da *American Type Culture Collection* (ATCC®). Em seguida, a cultura foi incubada em garrafas plásticas específicas para cultura de células a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, em estufa umidificada, para obtenção das células para ensaios.

Para avaliar o efeito citotóxico sobre a linhagem LLCMK<sub>2</sub> foi empregado o método de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-fenil-tetrazólio). Após sua interação com desidrogenases mitocondriais, o MTT é convertido em formazan e, assim, deixa de ser um sal hidrossolúvel e incolor, tornando-se um precipitado púrpura (Mossmann, 1983). Partindo-se de uma suspensão com 2,5 x 10<sup>5</sup> células/mL, em placa de 96 poços incubada por 24 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, obteve-se, após confluência, uma monocamada de células. Então, diferentes concentrações dos compostos em teste, em DMEM, foram adicionadas e incubou-se por mais 96 h. Em seguida, a monocamada foi lavada com PBS e a solução de MTT (1 mg/mL) foi adicionada. Deixou-se por 4 h em reação no escuro e em estufa umidificada. Após este período, adicionou-se DMSO para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram lidas em leitor de ELISA (Bio-Tek-FL-600 Microplate Fluorescence Reader) a 570 nm. A concentração dos compostos com capacidade de reduzir em 50% a densidade óptica das células tratadas, em comparação com o controle, foi determinada pelo cálculo da concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata para cada ensaio.



### **3.3.2.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* EM FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*.**

Para o ensaio antiproliferativo, ressuspenderam-se em meio LIT suplementado com 10% de SFB as formas epimastigotas de *T. cruzi*, em fase exponencial de crescimento (96 h), o que resultou na concentração de  $1,0 \times 10^6$  parasitos/mL. Em placas de 24 poços, foi adicionado, em cada compartimento, 900  $\mu$ L da suspensão descrita, bem como 100  $\mu$ L de meio LIT, na presença ou não de diferentes concentrações dos compostos a serem testados. As placas foram incubadas a 28 °C por 96 h e, em seguida, avaliou-se o crescimento celular através da contagem dos parasitos em câmara de Neubauer observada em microscópio óptico. Para mensurar o efeito antiproliferativo, foi tomado o percentual de inibição de crescimento dos parasitos em relação ao controle em 50% (IC<sub>50</sub>). A substância de referência utilizada como controle foi o Benzonidazol®. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata para cada ensaio.

### **3.3.2.3. VIABILIDADE *in vitro* EM FORMAS TRIPOMASTIGOTAS DE *T. cruzi*.**

O sobrenadante da cultura de células LLMCK<sub>2</sub> no pico parasistêmico (sexto dia de infecção) foi centrifugado para obtenção das formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A seguir, as mesmas foram ressuspensas em meio DMEM, chegando-se a uma concentração de  $1,0 \times 10^7$  parasitos/mL. Cada compartimento das placas de 96 poços utilizadas para o ensaio recebeu, além da suspensão de protozoários, uma alíquota dos compostos a serem avaliados em diferentes concentrações, e também dos controles positivo (Benzonidazol®) e negativo (somente meio DMEM). Então, as placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em estufa umidificada. A contagem dos parasitos foi realizada de acordo com o método de Pizzi-Brener (Brener, 1962). De cada poço previamente homogeneizado foi transferido 5,0  $\mu$ L para uma lâmina de vidro, que foi coberta por uma lamínula e procedeu-se à contagem de 50 campos em microscópio óptico. Dessa forma, foi possível quantificar o número de tripomastigotas em movimento, dado que foi utilizado para calcular a concentração de droga capaz de reduzir em 50% a viabilidade dos parasitos (EC<sub>50</sub>). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata para cada ensaio.

### **3.3.3. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS AXÊNICA DE *Leishmania amazonensis*.**

#### **3.3.3.1. PARASITOS E MACRÓFAGOS**

Os ensaios de atividade contra *L. amazonensis* e citotoxicidade foram realizados sob coordenação do Prof. Dr. Celso V. Nakamura (UEM). As formas promastigotas (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) foram mantidas e cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração “Difco®” adicionado de hemina e ácido fólico), pH 7, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e incubados a 25 °C.

As formas amastigotas axênicas foram obtidas a partir de cultura de promastigotas e cultivadas em meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA), pH 4, suplementado com 20% de SFB e incubados a 32 °C (Ueda-Nakamura *et al.*, 2001).

Os macrófagos (linhagem J774.A1) foram mantidos em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium - Sigma, St Louis, MO, USA), pH 7, suplementado com 10% de SFB e incubados a 37 °C, em tensão de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.3.3.2. ENSAIOS ANTIPROLIFERATIVOS *in vitro***

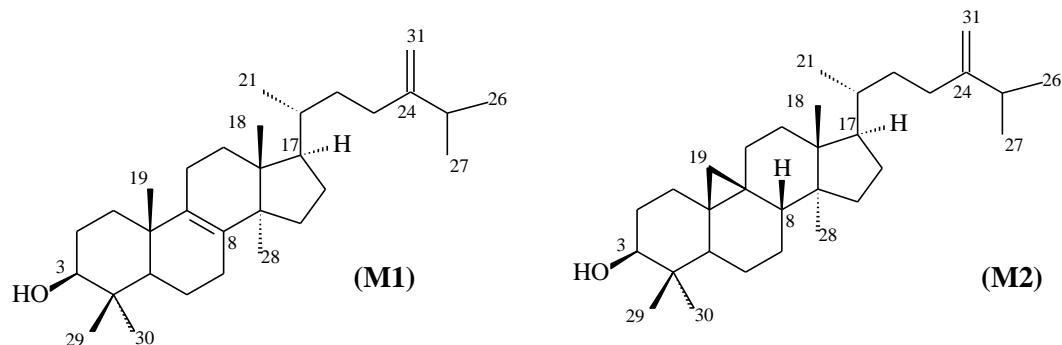
O ensaio de atividade antiproliferativa *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* foi realizado como descrito por Britta e colaboradores (2012), no qual  $1 \times 10^6$  promastigotas em fase log de crescimento (48h), foram colocadas na presença de concentrações crescentes dos extratos e compostos isolados, previamente solubilizados em, no máximo, 10% de DMSO (dimetilsulfóxido - Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) para os extratos e 1% para os compostos isolados, em placas estéreis de 24 poços. O mesmo foi feito com amastigotas axênicas em fase log do crescimento (72h), em placas estéreis de 12 poços. Após incubação de 72h, em 25 e 32°C para promastigotas e amastigotas axênicas, respectivamente, a contagem de células foi feita em hemocítômetro. A média dos resultados de três experimentos independentes foram plotados em um gráfico relacionando concentração do composto e porcentagem de inibição do crescimento, para cálculo da concentração capaz de inibir 50% do crescimento do parasito em relação ao controle (IC<sub>50</sub>).

### 3.3.3.3 ENSAIO DE CITOXICIDADE *in vitro*

O ensaio citotóxico *in vitro* em macrófagos de linhagem J774.A1 foi descrito por Volpato e colaboradores (2013), no qual  $5 \times 10^5$  macrófagos de linhagem J774.A1 em fase log do crescimento (72h) foram plaqueados em placa estéril de 96 poços e incubados por 24h, a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período de aderência das células nos poços, o sobrenadante foi retirado e foram adicionadas concentrações crescentes dos extratos e compostos isolados. Os resultados foram obtidos, após 48h de incubação nas mesmas condições citadas anteriormente, por meio da metodologia de redução do MTT (Amresco®) (brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazólio). Para isso, as substâncias e os materiais em suspensão foram retirados e os poços foram lavados com PBS (*phosphate-buffered saline*), sendo adicionado, posteriormente, 50µL de MTT (2mg/mL PBS) e incubados na ausência de luz. Após 4h, foram adicionados 150 µL de DMSO para romper as células e solubilizar os cristais de púrpuras de formazan, provenientes do MTT metabolizado pelas enzimas mitocondriais das células viáveis, seguindo-se da leitura em espectrofotômetro (BIO-TEK Power WaveXS spectrophotometer) a 570 nm (Mosmann, 1983). Os resultados de três experimentos independentes foram plotados em um gráfico relacionando porcentagem de células inviáveis e concentração do composto, determinando-se assim a concentração de droga capaz de inviabilizar 50% das células aderidas (CC<sub>50</sub>) em relação ao controle.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE M1+M2



A mistura **M1+M2** foi isolada das frações hexânica (22,9 mg, proporção 9:1) e clorofórmica-hexânica (10,3 mg, proporção 8:2) na forma de um sólido amarelado solúvel em clorofórmio.

No cromatograma obtido na análise por CG-EM para a amostra observa-se a presença de duas substâncias, com tempos de retenção de 24,83 min. e 25,94 min., como pode ser observado na **Figura 1 (anexo)**. O tempo de retenção 24,83 min., refere-se à substância **M1** que apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  440, pico base em  $m/z$  55 e um pico em  $m/z$  83 representando a perda de parte da cadeia lateral da molécula (**Figura 2, anexo**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figuras 3, 4 e 5, anexo**) para a substância majoritária **M1**, apresentou um singleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  4,71 e um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,66 com constante de acoplamento de 1,2 Hz característico de acoplamento *geminal*, correspondentes aos hidrogênios olefínicos da dupla terminal H-31. Também foram observados dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  0,92 ( $J = 6,3$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  1,03 ( $J = 6,6$  Hz) e 1,02 ( $J = 7,2$  Hz) referentes aos hidrogênios H-21 metílicos, H-26 e H-27. Na região de  $\delta_{\text{H}}$  1,00 a  $\delta_{\text{H}}$  0,69 observaram-se os singletos referentes aos hidrogênios ligados dos metilas C-18, C-19, C-28, C-29 e C-30, além de sinais sobrepostos que foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos e metínicos. O duplete de dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,24 ( $J = 5,5$  e 7,0 Hz) se refere ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (**Figura 6, anexo**) foram observados quatro sinais na região de carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  157,1 (C-24),  $\delta_{\text{C}}$  134,6 (C-8),  $\delta_{\text{C}}$  134,6 (C-9) e  $\delta_{\text{C}}$  106,1 (C-31), referentes a três carbonos não ligados a hidrogênio e a um metínico,

juntamente com o sinal em  $\delta_c$  79,2 correspondente ao carbono carbinólico C-3. Os sinais com deslocamentos em 28,2, 24,5, 22,2, 22,1, 19,4, 18,9, 16,0 e 15,6 ppm foram atribuídos aos metilas C-29, C-28, C-26, C-27, C-19, C-21, C-18 e C-30 respectivamente.

Foram observadas através do mapa de contornos HSQC (**Figura 7, anexo**), as correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono que auxiliaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para esta substância.

No mapa de contornos HMBC (**Figura 8, anexo**), foi observada a correlação entre os hidrogênios em  $\delta_H$  4,66 e  $\delta_H$  4,71 com os carbonos em  $\delta_C$  31,5 (C-23) e 34,0 (C-25). Também foi observada a correlação do hidrogênio em  $\delta_H$  3,24 com os carbonos em  $\delta_C$  28,2 (C-30) e 15,6 (C-31). As principais correlações se encontram na **Tabela 27**.

**Tabela 27: Principais correlações heteronucleares  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contornos HMBC para M1**

$\delta_H$	$\delta_C$
3,24 (H-3)	28,2 (C-29) e 15,6 (C-30)
0,98 (H-19)	134,6 (C-9)
2,23 (H-25)	106,1 (C-31)
4,66 (H-31a) e 4,72 (H-31b)	31,5 (C-23) e 34,0 (C-25)
0,88 (H-28)	134,6 (C-8)

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para **M1** foram comparados com os da literatura (Shirane, 1990) para o triterpeno eburicol (24-metileno-24,25-diidrolanosterol) e foram concordantes, conforme **Tabela 28**, a seguir.

Tabela 28: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto M1 e para o eburicol

C	Substância M1		Eburicol*	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ / DEPT	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ / DEPT
1		35,8 (CH <sub>2</sub> )		35,6 (CH <sub>2</sub> )
2		28,0 (CH <sub>2</sub> )		27,9 (CH <sub>2</sub> )
3	3,24 (dd; 4,8 e 11,4)	79,2 (CH)	3,24 (dd; 5,5 e 7,0)	79,0 (CH)
4		39,1 (C)		38,9 (C)
5		50,6 (CH)		50,4 (CH)
6		18,7 (CH <sub>2</sub> )		18,3 (CH <sub>2</sub> )
7		26,7 (CH <sub>2</sub> )		26,5 (CH <sub>2</sub> )
8		134,6 (C)		134,4 (C)
9		134,6 (C)		134,4 (C)
10		37,2 (C)		37,0 (C)
11		21,1 (CH <sub>2</sub> )		21,0 (CH <sub>2</sub> )
12		31,2 (CH <sub>2</sub> )		31,1 (CH <sub>2</sub> )
13		44,7 (C)		44,5 (C)
14		50,0 (C)		49,8 (C)
15		31,0 (CH <sub>2</sub> )		30,9 (CH <sub>2</sub> )
16		28,4 (CH <sub>2</sub> )		28,2 (CH <sub>2</sub> )
17		50,6 (CH)		50,4 (CH)
18	0,69 (s)	16,0 (CH <sub>3</sub> )	0,70 (s)	15,8 (CH <sub>3</sub> )
19	0,98 (s)	19,4 (CH <sub>3</sub> )	0,98 (s)	19,2 (CH <sub>3</sub> )
20		36,7 (CH)		36,5 (CH)
21	0,92 (d; 6,2)	18,9 (CH <sub>3</sub> )	0,93 (d; 6,2)	18,7 (CH <sub>3</sub> )
22		35,2 (CH <sub>2</sub> )		35,0 (CH <sub>2</sub> )
23		31,5 (CH <sub>2</sub> )		31,3 (CH <sub>2</sub> )
24		157,1 (C)		156,9 (C)
25	2,23 (m)	34,0 (CH)	2,22 (m)	33,8 (CH)
26	1,03 (d; 6,6)	22,2 (CH <sub>3</sub> )	1,03 (d; 6,8)	22,0 (CH <sub>3</sub> )

27	1,02 (d; 7,2)	22,1 (CH <sub>2</sub> )	1,03 (d; 7,0)	21,9 (CH <sub>2</sub> )
28	0,88 (s)	24,5 (CH <sub>3</sub> )	0,88 (s)	24,3 (CH <sub>3</sub> )
29	1,00 (s)	28,2 (CH <sub>3</sub> )	1,01 (s)	27,8 (CH <sub>3</sub> )
30	0,81 (s)	15,6 (CH <sub>3</sub> )	0,81 (s)	15,4 (CH <sub>3</sub> )
31	4,66 (d; 1,2)	106,1 (CH <sub>2</sub> )	4,67 (d; 1,4)	105,9 (CH <sub>2</sub> )
	4,71 (s)		4,72 (s)	

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>; \* $\delta$ -ppm; 500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Para a substância **M2**, o espectro de massas para o pico com tempo de retenção 25,94 min. (**Figura 9, anexo**), apresentou o pico do íon molecular em m/z 440 e pico base em m/z 96.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (**Figuras 3, 4 e 5, anexo**) apresentou os mesmos sinais para os hidrogênios da dupla *geminal* (H-3) e para os hidrogênios H-21, H-26, H-27. O multiplete em  $\delta_H$  3,29 foi atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3. Adicionalmente, foram observados dois dupletos em  $\delta_H$  0,55 e  $\delta_H$  0,33, ambos com  $J = 4,0$  Hz, correspondente ao carbono metilênico C-19.

Foram observados nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT (**Figura 6, anexo**), dois sinais na região de carbonos olefinicos em  $\delta_c$  157,1 (C-24) e  $\delta_c$  106,1 (C-31), juntamente com o sinal em  $\delta_c$  79,0 correspondente ao carbono carbinólico C-3. Também foram observados sinais com deslocamentos em 25,6, 22,2, 22,1, 19,5, 18,5, 18,3, 14,2 ppm, correspondendo respectivamente aos carbonos metílicos C-28, C-26, C-27, C-30, C-21, C-18 e C-29.

Através do mapa de contornos HSQC (**Figura 7, anexo**), observou-se as correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono que ajudaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para a substância, enquanto que no mapa de contornos HMBC (**Figura 8, anexo**), foram observadas correlações semelhantes as atribuídas anteriormente para **M1**.

Desta forma, os dados de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT de **M2** foram comparados com os dados constantes na literatura (Lee *et al*, 2010) para o triterpeno 24-metilenocicloartenol e foram concordantes (**Tabela 29**).

**Tabela 29: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para o composto M2 e para o 24-metilenocicloartenol**

Substância M2		24-metilenocicloartenol *		
C	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ /DEPT	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ /DEPT
1		32,2 (CH <sub>2</sub> )		32,2 (CH <sub>2</sub> )
2		30,6 (CH <sub>2</sub> )		30,6 (CH <sub>2</sub> )
3	3,29 (m)	79,0 (CH)	3,29 (dd; 4,6 e 11,5)	79,1 (CH)
4		40,7 (C)		40,7 (C)
5		47,3 (CH)		47,3 (CH)
6		21,3 (CH <sub>2</sub> )		21,3 (CH <sub>2</sub> )
7		26,7 (CH <sub>2</sub> )		26,7 (CH <sub>2</sub> )
8		48,2 (CH)		48,2 (CH)
9		20,2 (C)		20,2 (C)
10		26,2 (C)		26,3 (C)
11		26,7 (CH <sub>2</sub> )		26,7 (CH <sub>2</sub> )
12		33,1 (CH <sub>2</sub> )		33,1 (CH <sub>2</sub> )
13		45,5 (C)		45,5 (C)
14		49,0 (C)		49,0 (C)
15		35,8 (CH <sub>2</sub> )		35,8 (CH <sub>2</sub> )
16		28,4 (CH <sub>2</sub> )		28,4 (CH <sub>2</sub> )
17		52,5 (CH)		52,5 (CH)
18		18,3 (CH <sub>3</sub> )		18,2 (CH <sub>3</sub> )
19	0,56 (1H; d; 4,0) 0,33 (1H; d; 4,0)	30,1 (CH <sub>2</sub> )	0,56 (d; 4,0) 0,33 (d; 4,0)	30,1 (CH <sub>2</sub> )
20		36,3 (CH)		36,3 (CH)
21		18,5 (CH <sub>3</sub> )		18,5 (CH <sub>3</sub> )
22		35,2 (CH <sub>2</sub> )		35,2 (CH <sub>2</sub> )
23		31,5 (CH <sub>2</sub> )		31,5 (CH <sub>2</sub> )
24		157,1 (C)		157,1 (C)
25		34,0 (CH)		34,0 (CH)
26	1,02 (2H; d; 6,9)	22,1 (CH <sub>3</sub> )	1,02 (d; 6,5)	22,2 (CH <sub>3</sub> )
27	1,03 (3H; d; 6,6)	22,1 (CH <sub>2</sub> )	1,03 (d; 6,5)	22,1 (CH <sub>2</sub> )



---

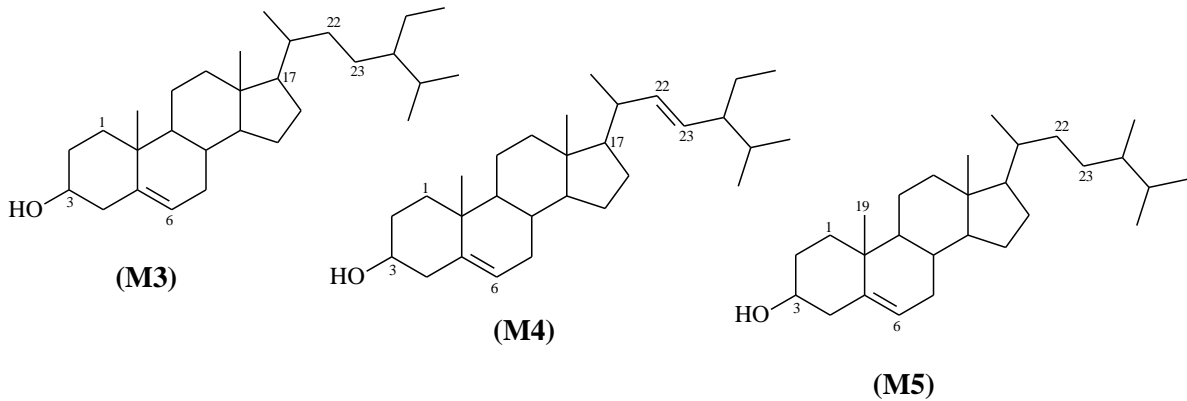
28		25,6 (CH <sub>3</sub> )		25,6 (CH <sub>3</sub> )
29		14,2 (CH <sub>3</sub> )		14,2 (CH <sub>3</sub> )
30		19,5 (CH <sub>3</sub> )		19,6 (CH <sub>3</sub> )
31	4,73 (s)	106,1	4,73 (s)	106,1
	4,68 (d; 1,5)	(CH <sub>2</sub> )	4,68 (d; 1,5)	(CH <sub>2</sub> )

---

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>; \* $\delta$ -ppm; 500 e 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Ferreira e colaboradores (2000) demonstraram através de modelos experimentais *in vitro* que esse triterpeno apresenta efeitos analgésicos, com atividade superior à do diclofenaco, medicamento que apresenta ação sobretudo analgésica e antiinflamatória, além de moderada atividade contra *P. falciparum*, parasito transmissor da malária (Onguené, 2013).

## 4.2. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE M3+M4+M5



Das frações hexânica (23,6 mg) e subfração clorofórmica-hexânica (30,3 mg) de *M. picta*, foi isolada na forma de um sólido branco solúvel em clorofórmio, a mistura **M3+M4+M5** na proporção 16:8:1.

No cromatograma obtido na análise por CG-EM (**Figura 10, anexo**) da amostra observa-se a existência de três substâncias, com tempos de retenção de 22,08 min., 22,62 min. e 23,69 min. O espectro de massas para a substância **M3** com o tempo de retenção 23,69 min. (**Figura 11, anexo**), apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  414, e o pico base em  $m/z$  104. Para a substância **M4** com tempo de retenção 22,62 min. (**Figura 12, anexo**), o pico do íon molecular ocorre em  $m/z$  412 e o pico base em  $m/z$  55, enquanto que para a substância **M5** com tempo de retenção 22,08 min. (**Figura 13, anexo**), os mesmos ocorrem em  $m/z$  400 e em  $m/z$  107.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 14, anexo**) apresentou um multipletto entre  $\delta_{\text{H}}$  3,48 a  $\delta_{\text{H}}$  3,59 correspondente ao hidrogênio carbinólico H-3 e sinais na região de hidrogênios olefinicos, entre  $\delta_{\text{H}}$  5,35 e  $\delta_{\text{H}}$  5,37 atribuídos ao H-6 (**M4**). Os sinais na região entre  $\delta_{\text{H}}$  4,98 e  $\delta_{\text{H}}$  5,20 (**M4 + M5 + M6**) foram atribuídos aos hidrogênios H-22 e H-23, enquanto os sinais encontrados na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,67 a  $\delta_{\text{H}}$  1,03 são característicos de hidrogênios de grupos metila.

No espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (**Figura 15, anexo**) foram observados os sinais atribuídos aos carbonos olefínicos C-6 em  $\delta_{\text{C}}$  122,0 e C-22 e C-23 em  $\delta_{\text{C}}$  138,5 e  $\delta_{\text{C}}$  29,5. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  72,0 corresponde ao carbono carbinólico C-3.

Os dados espectrais da mistura foram comparados com os dados da literatura (Goulart, 1993), sendo possível concluir que a mistura isolada continha os esteroides 24 $\alpha$ -etil-colest-5-enol (**M3**), 24 $\alpha$ -etil-colest-5,22-dienol (**M4**) e 24 $\alpha$ -metil-colest-5-enol (**M5**),

também conhecidos como sitosterol, estigmasterol e campesterol respectivamente (**Tabela 30**).

**Tabela 30: Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a mistura M3, M4 e M5 e para os compostos campesterol, sitosterol e estigmasterol**

	M3	M4	M5	Sitosterol*	Estigmasterol*	Campesterol*
	$\delta_{\text{C}} / \text{DEPT}$	$\delta_{\text{C}} / \text{DEPT}$	$\delta_{\text{C}} / \text{DEPT}$	$\delta_{\text{C}} / \text{DEPT}$	$\delta_{\text{C}} / \text{DEPT}$	$\delta_{\text{C}} / \text{DEPT}$
<b>1</b>	37,5 (CH <sub>2</sub> )	37,5 (CH <sub>2</sub> )	37,5 (CH <sub>2</sub> )	37,2 (CH <sub>2</sub> )	37,2 (CH <sub>2</sub> )	37,2 (CH <sub>2</sub> )
<b>2</b>	31,9 (CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )	31,6 (CH <sub>2</sub> )	31,6 (CH <sub>2</sub> )	31,6 (CH <sub>2</sub> )
<b>3</b>	72,0 (CH)	72,0 (CH)	72,0 (CH)	71,9 (CH)	71,9 (CH)	71,8 (CH)
<b>4</b>	42,4 (CH <sub>2</sub> )	42,4 (CH <sub>2</sub> )	42,4 (CH <sub>2</sub> )	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,3 (CH <sub>2</sub> )
<b>5</b>	140,9 (C)	140,9 (C)	140,9 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)	140,7 (C)
<b>6</b>	122,0 (CH)	122,0 (CH)	122,0 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)	121,7 (CH)
<b>7</b>	31,9 (CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )	31,8 (CH <sub>2</sub> )	31,8 (CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )
<b>8</b>	32,1 (CH)	32,1 (CH)	32,1 (CH)	31,8 (CH)	31,8 (CH)	31,8 (CH)
<b>9</b>	50,3 (CH)	50,3 (CH)	50,3 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)	50,1 (CH)
<b>10</b>	36,4 (C)	36,4 (C)	36,4 (C)	36,4 (C)	36,4 (C)	36,5 (C)
<b>11</b>	21,3 (CH <sub>2</sub> )	21,3 (CH <sub>2</sub> )	21,3 (CH <sub>2</sub> )	21,1 (CH <sub>2</sub> )	21,1 (CH <sub>2</sub> )	21,1 (CH <sub>2</sub> )
<b>12</b>	40,0 (CH <sub>2</sub> )	39,9 (CH <sub>2</sub> )	40,0 (CH <sub>2</sub> )	39,7 (CH <sub>2</sub> )	39,6 (CH <sub>2</sub> )	39,8 (CH <sub>2</sub> )
<b>13</b>	42,5 (C)	42,5 (C)	42,5 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)	42,3 (C)
<b>14</b>	57,0 (CH)	57,0 (CH)	57,0 (CH)	56,7 (CH)	56,8 (CH)	56,7 (CH)
<b>15</b>	24,5 (CH <sub>2</sub> )	24,5 (CH <sub>2</sub> )	24,5 (CH <sub>2</sub> )	24,3 (CH <sub>2</sub> )	24,3 (CH <sub>2</sub> )	24,3 (CH <sub>2</sub> )
<b>16</b>	28,5 (CH <sub>2</sub> )	28,5 (CH <sub>2</sub> )	28,5 (CH <sub>2</sub> )	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,2 (CH <sub>2</sub> )	28,2 (CH <sub>2</sub> )
<b>17</b>	56,3 (CH)	56,3 (CH)	56,3 (CH)	56,0 (CH)	55,9 (CH)	56,0 (CH)
<b>18</b>	12,1 (CH <sub>3</sub> )	12,1 (CH <sub>3</sub> )	12,1 (CH <sub>3</sub> )	11,8 (CH <sub>3</sub> )	11,8 (CH <sub>3</sub> )	11,8 (CH <sub>3</sub> )
<b>19</b>	19,6 (CH <sub>3</sub> )	19,6 (CH <sub>3</sub> )	19,6 (CH <sub>3</sub> )	19,3 (CH <sub>3</sub> )	19,3 (CH <sub>3</sub> )	19,3 (CH <sub>3</sub> )
<b>20</b>	36,4 (CH)	40,7 (CH)	36,4 (CH)	36,1 (CH)	40,5 (CH)	36,1 (CH)
<b>21</b>	19,2 (CH <sub>3</sub> )	21,4 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	21,2 (CH <sub>3</sub> )	18,9 (CH <sub>3</sub> )
<b>22</b>	33,9 (CH <sub>2</sub> )	138,5 (CH)	33,9 (CH <sub>2</sub> )	33,9 (CH <sub>2</sub> )	138,4 (CH)	33,6 (CH <sub>2</sub> )
<b>23</b>	40,0 (CH <sub>2</sub> )	129,5 (CH)	29,1 (CH <sub>2</sub> )	39,1 (CH <sub>2</sub> )	129,3 (CH)	28,9(CH <sub>2</sub> )
<b>24</b>	46,0 (CH)	51,5 (CH)	56,3 (CH)	45,8 (CH)	51,2 (CH)	56,1 (CH)
<b>25</b>	29,4 (CH)	32,1 (CH)	29,4 (CH)	26,0 (CH)	31,9 (CH)	29,7 (CH)
<b>26</b>	19,0 (CH <sub>3</sub> )	19,2 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	18,7 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	18,7 (CH <sub>3</sub> )

---

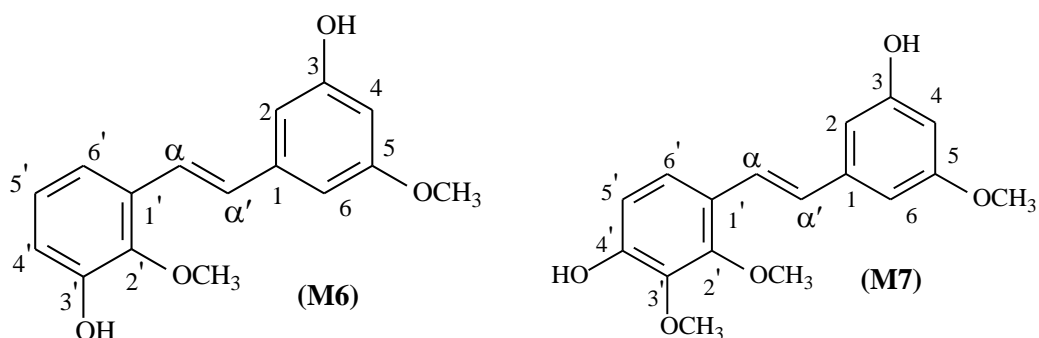
<b>27</b>	19,6 (CH <sub>3</sub> )	19,2 (CH <sub>3</sub> )	19,6 (CH <sub>3</sub> )	19,8 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	19,8 (CH <sub>3</sub> )
<b>28</b>	23,3 (CH <sub>3</sub> )	25,6 (CH <sub>3</sub> )	19,0 (CH <sub>3</sub> )	23,0 (CH <sub>3</sub> )	25,4 (CH <sub>3</sub> )	18,2 (CH <sub>3</sub> )
<b>29</b>	12,2 (CH <sub>3</sub> )	12,5 (CH <sub>3</sub> )	-	11,9 (CH <sub>3</sub> )	12,2 (CH <sub>3</sub> )	-

---

( $\delta$ -ppm; 75,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>; \* $\delta$ -ppm; 75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Os esteroides apresentam atividades anti-inflamatórias (Cechinel Filho, 2000) e especificamente para o estigmasterol, há relatos de atividade antinociceptiva, hipocolesterolêmica e preventiva de câncer mamário e prostático (Oliveira, 2007).

## 4.3. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE M6+M7



A mistura das substâncias **M6** (majoritária) e **M7** foi isolada como um óleo avermelhado das subfrações clorofórmica-clorofórmica (13,3 mg) e clorofórmica-acetato de etila (22,3 mg), nas proporções 6:1 e 3:2, respectivamente.

No cromatograma obtido na análise por CG-EM para a amostra observa-se a existência de duas substâncias, com tempos de retenção de 16,82 min. e 17,96 min., como pode ser observado na **Figura 16 (anexo)**. O espectro de massas para a substância **M6**, com o tempo de retenção de 16,82 min. (**Figura 17, anexo**), apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  272. Verifica-se um pico em  $m/z$  241, correspondendo a uma perda de um grupo oximetilênio e o pico base em  $m/z$  240 representando a perda de um hidrogênio.

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**Figuras 18, 19 e 20**), para a substância **M6**, mostrou dupletos em  $\delta_H$  7,04 que foi atribuído ao H- $\alpha'$  e em  $\delta_H$  7,33, atribuído ao H- $\alpha$ , ambos com constante de acoplamento de 16,2 Hz, indicando uma configuração *trans* para esses hidrogênios. Também foram observados duplos dupletos em  $\delta_H$  7,12 ( $J = 1,2$  e 8,1 Hz) e em  $\delta_H$  6,77 ( $J = 1,2$  e 8,1 Hz), além de um tripleto em  $\delta_H$  6,93 ( $J = 8,1$  Hz), referentes aos hidrogênios H-4', H-6' e H-5' respectivamente, sugerindo a presença de um anel aromático 1, 2 e 3 substituído. O tripleto em  $\delta_H$  6,30 ( $J = 2,1$  Hz), juntamente com os multipletos em  $\delta_H$  6,61 (H-2) e  $\delta_H$  6,57 (H-6), sugerem a existência de um segundo anel aromático 1, 3 e 5 substituído. Os sinais em  $\delta_H$  3,80 e  $\delta_H$  3,78 foram atribuídos aos hidrogênios oximetílicos.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**Figuras 21 e 22**) mostrou sinais correspondentes a dupla ligação em  $\delta_C$  130,9 (C- $\alpha'$ ) e  $\delta_C$  124,1 (C- $\alpha$ ) e sinais em  $\delta_C$  61,4 e  $\delta_C$  55,7, correspondendo aos carbonos oximetílicos. Os sinais encontrados entre  $\delta_C$  125,5 e  $\delta_C$  101,8, foram atribuídos aos carbonos dos anéis aromáticos.

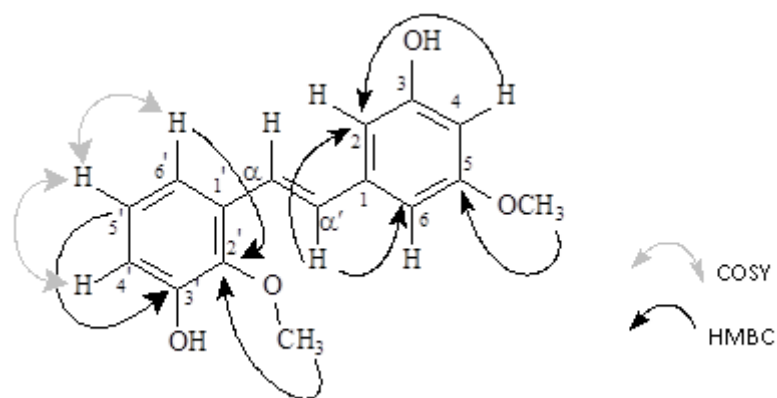
Foram observadas através do mapa de contornos HSQC (**Figuras 23 e 24, anexo**), as correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono que ajudaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para essa substância.

Foi observado no mapa de contornos COSY (**Figuras 25 e 26, anexo**), o acoplamento do hidrogênio H-4' em  $\delta_H$  7,12 com o hidrogênio H-5' em  $\delta_H$  6,93. Também observou-se a correlação do hidrogênio H-5' em  $\delta_H$  6,93 com o hidrogênio H-6' em  $\delta_H$  6,77.

A posição dos grupos oximetílicos foi confirmada no mapa de contornos HMBC (**Figuras 27 e 28, anexo**), onde se observou a correlação dos hidrogênios oximetílicos localizados em  $\delta_H$  3,78 com o carbono C-5 em  $\delta_C$  162,6 e entre os hidrogênios em  $\delta_H$  3,80 com o C-2', em  $\delta_C$  147,0. Foi observada ainda, a correlação dos hidrogênios H-6' em  $\delta_H$  6,76 e H-4' em  $\delta_H$  7,12 com o carbono C-2' em  $\delta_C$  147,0, do hidrogênio H- $\alpha$ ' em  $\delta_H$  7,04 com os carbonos C-2 e C-9 em  $\delta_C$  106,7 e  $\delta_C$  104,9 respectivamente, bem como a correlação do hidrogênio H-4 em  $\delta_H$  6,30 com o carbono  $\delta_C$  106,7. Essas e outras correlações se encontram na **Tabela 31**.

**Tabela 31: Principais correlações heteronucleares  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contornos HMBC para M6**

$\delta_H$	$\delta_C$
7,04 (H- $\alpha$ ') e 6,30 (H-4)	106,7 (C-2)
3,78 (OCH <sub>3</sub> )	162,6 (C-5)
7,04 (H- $\alpha$ ') e 6,30 (H-4)	104,9 (C-6)
7,33 (H- $\alpha$ ), 3,80 (OCH <sub>3</sub> ), 7,12 (H-4') e 6,77 (H-6)'	147,0 (C-2')
6,93 (H-5')	151,5 (C-3')



**Figura IX:** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para **M6**.

Os dados espectrais de **M6** foram comparados com os dados da literatura (Guo, 2006) para o *trans*-3,3'-di-hidróxi-2',5-dimetóxiestilbeno ou foiumbeno C e foram concordantes (**Tabela 32**). Desta forma foi possível concluir que **M6** trata-se deste estilbeno.



**Tabela 32: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância M6 e para o foiumbeno C**

Substância M6			Foiumbeno C	
C	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		141,1		141,1
2	6,61 (m)	106,7	6,60 (t; 1,8)	106,8
3		159,8		159,8
4	6,30 (t; 2,1)	101,8	6,29 (t; 1,8)	101,9
5		162,6		162,6
6	6,57 (m)	104,9	6,57 (t; 1,8)	105,0
1'		132,4		132,4
2'		147,0		147,0
3'		151,5		151,5
4'	7,11 (dd; 8,1; 1,2)	117,9	7,10 (dd; 7,9; 1,5)	118,0
5'	6,93 (t; 8,1)	125,6	6,92 (t; 7,9)	125,6
6'	6,76 (dd; 8,1; 1,2)	116,7	6,76 (dd; 7,9; 1,5)	116,7
A	7,33 (d; 16,2)	124,1	7,31 (d; 16,4)	124,1
$\alpha'$	7,04 (d; 16,2)	130,9	7,02 (d; 16,4)	130,9
OCH <sub>3</sub>	3,78 (s)	55,7	3,76 (s)	55,7
OCH <sub>3</sub>	3,80 (s)	61,4	3,78 (s)	61,4

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75 ,5 MHz, CD<sub>3</sub>OD; \* $\delta$ -ppm; 400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

O espectro de massas para a substância **M7**, com o tempo de retenção 17,96 min. (**Figura 29, anexo**), apresentou o pico do íon molecular em m/z 302. Observou-se também um pico em m/z 255 referente a perda de um grupo oximetilênico e de uma hidroxila.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 18, 19 e 20, anexo**) mostrou dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,90 ( $J = 16,5$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  7,24 ( $J = 16,5$  Hz), que foram atribuídos respectivamente ao H- $\alpha'$  e H- $\alpha$ , com constante de acoplamento indicando uma configuração *trans* para esses hidrogênios. Observou-se ainda a presença de dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,63 ( $J = 8,7$  Hz) e em  $\delta_{\text{H}}$  7,24 ( $J = 8,7$  Hz), correspondendo aos hidrogênios H-5' e H-6' respectivamente, indicando a presença de um anel aromático 1, 2, 3, 4 substituído. O tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  6,26 ( $J = 1,8$  Hz), juntamente com os multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,54 e  $\delta_{\text{H}}$  6,57, sugerem a presença de um anel

aromático 1, 3 e 5 substituído. Além disso, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou sinais referentes aos hidrogênios oximetílicos em  $\delta_{\text{H}} 3,87$ ,  $\delta_{\text{H}} 3,86$  e  $\delta_{\text{H}} 3,78$ .

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 21 e 22, anexo**) apresentou sinais em  $\delta_{\text{C}} 128,3$  (C- $\alpha'$ ) e  $\delta_{\text{C}} 124,0$  (C- $\alpha$ ), correspondentes a dupla ligação e sinais em  $\delta_{\text{C}} 61,6$ ,  $\delta_{\text{C}} 61,1$  e  $\delta_{\text{C}} 55,6$ , correspondendo aos carbonos oximetílicos. Os demais sinais, encontrados entre  $\delta_{\text{C}} 125,5$  e  $\delta_{\text{C}} 101,8$ , foram atribuídos aos carbonos dos anéis aromáticos.

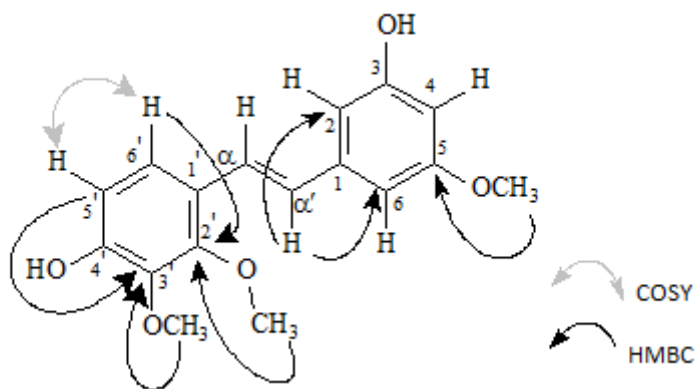
No mapa de contornos HSQC (**Figuras 23 e 24, anexo**), foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono, colaborando nas atribuições e na confirmação da estrutura para esta substância.

Na análise das correlações observadas no mapa de contornos COSY (**Figuras 25 e 26, anexo**), foi observado o acoplamento dos hidrogênios H-5' em  $\delta_{\text{H}} 6,63$  com o hidrogênio H-6' em  $\delta_{\text{H}} 7,24$ .

Através do mapa de contornos HMBC (**Figuras 27 e 28, anexo**) foi estabelecida a posição dos grupos oximetílicos, onde os hidrogênios localizados em  $\delta_{\text{H}} 3,78$  apresentaram correlação com o carbono C-5 em  $\delta_{\text{C}} 162,5$  além das correlações do sinal em  $\delta_{\text{H}} 3,87$  com o carbono C-2', em  $\delta_{\text{C}} 152,7$  e em  $\delta_{\text{H}} 3,86$  com C-3', em  $\delta_{\text{C}} 142,2$ . Também foi observada a correlação dos hidrogênios H-5' em  $\delta_{\text{H}} 6,63$  com o carbono C-2 em  $\delta_{\text{C}} 142,2$ , do hidrogênio H- $\alpha'$  em  $\delta_{\text{H}} 6,90$  com os carbonos C-2 em  $\delta_{\text{C}} 106,5$  e C-6 em  $\delta_{\text{C}} 104,7$  bem como a correlação do hidrogênio H-2 em  $\delta_{\text{H}} 6,57$  com o carbono C- $\alpha'$  em  $\delta_{\text{C}} 128,3$ . Estas e outras correlações estão expostas na **Tabela 33**.

**Tabela 33: Principais correlações heteronucleares  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contornos HMBC para M7**

$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
6,63 (H-5') e 3,86 (OCH <sub>3</sub> )	142,2 (C-3)
3,87 (OCH <sub>3</sub> )	153,0 (C-2')
6,90 (H- $\alpha$ )	106,4 (C-2) e 104,7 (C-6)
6,57 (H-2)	128,3 (C- $\alpha'$ )
6,26 (H-4)	104,7 (C-6)
3,78 (OCH <sub>3</sub> )	162,5 (C-5)



**Figura X:** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para **M7**.

Os dados espectrais de **M7** foram comparados com os dados existentes na literatura (Guo, 2006) para o *trans*-3,4'-di-hidróxi-2',3',5-trimetóxiestilbeno ou foiumbeno B, sendo concordantes. Desta forma foi possível concluir que **M7** trata-se deste estilbeno. Esses dados estão expostos na **Tabela 34**.

**Tabela 34: Dados de RMN de <sup>1</sup>H e de RMN de <sup>13</sup>C para a substância M7 e para o foiumbeno B**

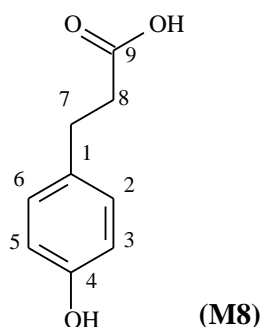
Substância M7			Foiumbeno B	
C	$\delta_H$ (mult.; J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult.; J em Hz)	$\delta_C$
1		141,5		141,5
2	6,56 (m)	106,4	6,57 (t; 1,8)	106,5
3		159,7		159,7
4	6,25 (t; 2,1)	101,4	6,26 (t; 1,8)	101,4
5		162,5		162,5
6	6,53 (m)	104,7	6,53 (t; 1,8)	104,7
1'		124,1		124,1
2'		153,0		152,9
3'		142,2		142,2
4'		152,1		152,0
5'	6,62 (d; 9,0)	113,2	6,62 (d; 8,7)	113,2
6'	7,23 (d; 8,7)	122,2	7,21 (d; 8,7)	122,2
A	7,23 (d; 16,2)	124,0	7,22 (d; 16,7)	124,0
$\alpha'$	6,89 (d; 16,5)	128,3	6,88 (d; 16,7)	128,3
OCH <sub>3</sub>	3,87 (s)	61,6	3,85 (s)	61,6
OCH <sub>3</sub>	3,86 (s)	61,1	3,84 (s)	61,1
OCH <sub>3</sub>	3,78 (s)	55,6	3,76 (s)	55,6

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz, CD<sub>3</sub>OD; \* $\delta$ -ppm; 100 e 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Wang e colaboradores (2012) testaram a atividade inibitória destes dois estilbenos isolados da orquídea *Pholidota yunnanensis*, frente a células de carcinoma hepatocelular (HepG2) e células de hepatoma humano (FHCC-98). Nesse estudo, o foiumbeno C apresentou uma pequena atividade inibitória sobre a linhagem HepG2 ( $GI_{50} = 90,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ), mas não inibiu o crescimento da linhagem FHCC-98. O foiumbeno B mostrou-se capaz de inibir fortemente o crescimento das células HepG2 ( $GI_{50} = 37,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$ ), e das células FHCC-98 ( $GI_{50} = 45,8 \pm 4,2 \mu\text{M}$ ) em comparação ao resveratrol ( $GI_{50} = 80,3 \pm 2,8 \mu\text{M}$  e  $95,2 \pm 3,5 \mu\text{M}$  respectivamente). Ao mesmo tempo, nenhum dos compostos demonstrou ação inibitória sobre células normais do fígado (QSG-7701). A presença destas substâncias na subfração clorofórmica-clorofórmica obtida a partir de *M. picta* explica,

portanto, sua grande atividade citotóxica frente a diversas linhagens de células tumorais humanas, como mostrado à frente.

#### 4.4. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE M8



A substância **M8** (21,0 mg) foi isolada da subfração clorofórmica-acetato de etila de *M. picta* como um sólido avermelhado solúvel em acetato de etila.

O espectro de massas de baixa resolução para essa substância apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  166 e um pico em  $m/z$  91 representando a formação do íon tropílio. O pico em  $m/z$  107, representa a formação do anel tropílio ligado a uma hidroxila (**Figura 30, anexo**).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 31, anexo**) mostrou dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,05 ( $J = 8,4$  Hz), correspondendo aos hidrogênios H-2 e H-6 e em  $\delta_{\text{H}}$  6,73 ( $J = 8,4$  Hz), referente aos hidrogênios H-3 e H-5, sugerindo a presença de um anel aromático *p*-substituído. Também foram observados tripletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,85 ( $J = 7,8$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,56 ( $J = 7,8$  Hz), correspondendo aos hidrogênios H-7 e H-8 respectivamente.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 32, anexo**) foram observados sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  115,8 e  $\delta_{\text{C}}$  155,9, correspondendo aos carbonos do anel aromático e sinais em  $\delta_{\text{C}}$  30,8 e  $\delta_{\text{C}}$  36,8 referentes aos carbonos C-7 e C-8. Não foi observado o sinal do carbono carbonílico C-9.

O acoplamento dos hidrogênios H-7 em  $\delta_{\text{H}}$  2,85 com os hidrogênios H-8 em  $\delta_{\text{H}}$  2,56, foi observado no mapa de contornos COSY (**Figura 33, anexo**). Também observou-se a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  6,73, correspondente aos hidrogênios H-3 e H-5, com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,04, correspondente aos hidrogênios H-2 e H-6.

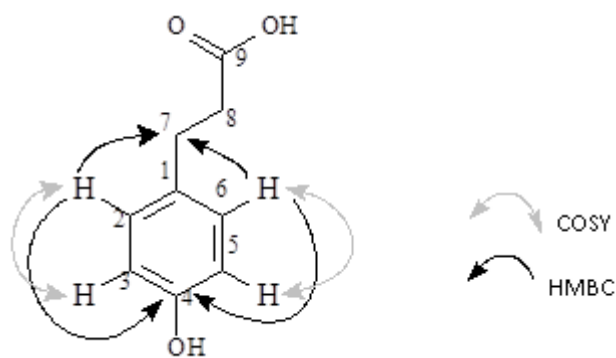
Através do mapa de contornos HSQC (**Figura 34, anexo**), foi possível a observação das correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono, que ajudaram nas atribuições e na confirmação da estrutura para esta substância.

Através do mapa de correlação HMBC (**Figura 35, anexo**) foram observadas as correlações dos hidrogênios H-2 e H-6 em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  155,9 e  $\delta_{\text{C}}$  30,8. Além disso, foi observado um sinal de carbono carbonílico (C-9) em  $\delta_{\text{C}}$  177,2 que

correlacionou com os hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  2,85 (H-7) e  $\delta_{\text{H}}$  2,56 (H-8), comprovando assim a existência de um carbono carbonílico na molécula. As demais correlações se encontram na **Tabela 35**.

**Tabela 35: Principais correlações heteronucleares  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contornos HMBC para M8**

$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
7,05 (H-2)	129,4 (C-6), 155,9 (C-4) e 30,8 (C-7)
6,73 (H-3)	115,8 (C-5)
6,73 (H-5)	115,8 (C-3)
7,05 (H-6)	129,4 (C-2), 155,9 (C-4) e 30,8 (C-7)
2,85 (H-7) e 2,56 (H-8)	177,2 (C-9)



**Figura XI:** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para **M8**.

Todas essas observações confirmam a estrutura do ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico, também conhecido como ácido florético. Os dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram comparados com os da literatura e se mostraram concordantes (**Tabela 36**) (Owen *et al*, 2003).

**Tabela 36: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância M8 e para o Ácido Florético**

Substância M8			Ácido Florético	
C	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		132,4 (C)		133,6 (C)
2	7,05 (d; 7,8)	129,8 (CH)	7,03 (d; 7,8)	130,2 (CH)
3	6,73 (d; 8,4)	115,8 (CH)	6,70 (d; 8,3)	116,2 (CH)
4		155,9 (C)		156,1 (C)
5	6,73 (d; 8,4)	115,8 (CH)	6,70 (d; 8,3)	116,2 (CH)
6	7,04 (d; 7,8)	129,8 (CH)	7,03 (d; 7,8)	130,2 (CH)
7	2,84 (t; 7,8)	30,8 (CH <sub>2</sub> )	2,79 (t; 7,8)	31,7 (CH <sub>2</sub> )
8	2,56 (t; 7,8)	36,8 (CH <sub>2</sub> )	2,48 (t; 7,8)	38,6 (CH <sub>2</sub> )
9		177,2 (C)**		179,1 (C)

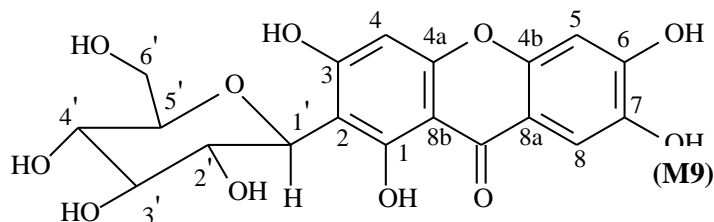
( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz, CD<sub>3</sub>OD+CDCl<sub>3</sub>; \* $\delta$ -ppm; 500,14 e 125,76 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

\*\* sinal observado pelo HMBC

Segundo Soares (2002), os ácidos fenólicos apresentam consideráveis propriedades antioxidantes. O ácido florético é um dos principais responsáveis do potencial antioxidante do óleo de *Canarium schweinfurthii* (família Burseraceae), possuindo IC<sub>50</sub> 3,0 mM (Atawodi, 2010).



#### 4.5. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE M9



A substância **M9** foi isolada das frações acetato de etila (20,4 mg), butanólica (34,7 mg) e hidrometanólica (2,510 g) na forma de um sólido amarelado solúvel em DMSO.

Para a substância **M9**, o espectro de massas de baixa resolução obtido via *probe* (**Figura 36, anexo**) apresentou o pico do íon molecular em  $m/z$  422 e o pico base em  $m/z$  259, que representa a perda da unidade C-glicosídica.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 37, anexo**) para a substância **M9** evidencia a presença de singletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,37,  $\delta_{\text{H}}$  6,85 e  $\delta_{\text{H}}$  7,37, correspondendo aos hidrogênios H-4, H-5 e H-8 respectivamente, indicando assim a presença de anéis aromáticos na molécula. Também foram observados sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  3,14 e  $\delta_{\text{H}}$  4,58, que foram atribuídos a unidade C-glicosídica.

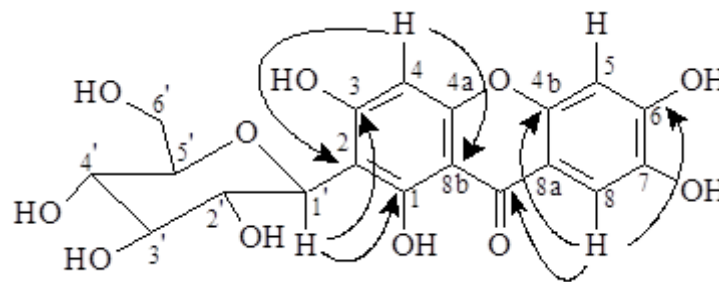
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$  (**Figura 38, anexo**) foi observado um sinal de carbono carbonílico em  $\delta_{\text{C}}$  179,2, sinais de carbonos aromáticos não hydrogenados entre  $\delta_{\text{C}}$  101,4 e  $\delta_{\text{C}}$  164,0 e de carbonos aromáticos metínicos em  $\delta_{\text{C}}$  93,3 (C-4),  $\delta_{\text{C}}$  102,6 (C-5) e  $\delta_{\text{C}}$  108,0 (C-8) correlacionados com os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  6,37 (H-4),  $\delta_{\text{H}}$  6,86 (H-5) e  $\delta_{\text{H}}$  7,39 (H-8) no mapa de contornos HSQC. Os sinais entre  $\delta_{\text{C}}$  81,6 e  $\delta_{\text{C}}$  61,5 foram atribuídos a unidade glicosídica.

No mapa de contornos HSQC (**Figura 39, anexo**), observou-se as correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono, auxiliando nas atribuições e na confirmação da estrutura para esta substância.

O mapa de contornos HMBC (**Figura 40, anexo**) mostrou as correlações entre o hidrogênio H-4 em  $\delta_{\text{H}}$  6,37 e os carbonos C-2 em  $\delta_{\text{C}}$  107,7 e C-8b em  $\delta_{\text{C}}$  101,4, entre o hidrogênio H-8 em  $\delta_{\text{H}}$  7,37 com o carbono carbonílico e os carbonos C-4b em  $\delta_{\text{C}}$  150,9 e C-6 em  $\delta_{\text{C}}$  154,2 bem como a correlação entre o hidrogênio H-1' em  $\delta_{\text{H}}$  4,58 e os carbonos C-1 e C-3, localizados em  $\delta_{\text{C}}$  164,0 e  $\delta_{\text{C}}$  161,8 respectivamente. Essas e outras correlações são mostradas na **Tabela 37**.

**Tabela 37: Principais correlações heteronucleares  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contornos HMBC para M9**

$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
6,37 (H-4)	107,7 (C-2) e 101,4 (C-8b)
4,58 (H-1')	161,9 (C-1) e 163,9 (C-3)
7,37 (H-8)	154,2 (C-6), 179,2 (C=O) e 93,4 (C-4)
6,86 (H-5)	143,3 (C-7) e 111,6 (8a)



**Figura XII:** Principais correlações observadas nos mapas de contornos HMBC para **M9**.

Os sinais analisados foram concordantes aos da literatura (Kim *et al*, 2007) para a 1,3,6,7-tetrahidroxi-2-C-[ $\beta$ -D-glicopiranosil]xantona ou mangiferina (**Tabela 38**) permitindo estabelecer que o composto isolado tratava-se desta xantona.

**Tabela 38: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância M9 e para a mangiferina**

Substância M9			Mangiferina*	
C	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ / DEPT	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$ / DEPT
1		161,9 (C)		161,8 (C)
2		107,7 (C)		107,6 (C)
3		164,0 (C)		163,9 (C)
4	6,37 (s)	93,4 (CH)	6,37 (s)	93,3 (CH)
4 <sup>a</sup>		156,3 (C)		156,2 (C)
4b		150,9 (C)		150,9 (C)
5	6,86 (s)	102,7 (CH)	6,85 (s)	102,6 (CH)
6		154,2 (C)		154,3 (C)
7		143,9 (C)		143,3 (C)
8	7,37 (s)	108,2 (CH)	7,37 (s)	108,0 (CH)
8 <sup>a</sup>		111,8 (C)		111,6 (C)
8b		101,4 (C)		101,3 (C)
C = O		179,2 (C)		179,1 (C)
1'	4,58 (d; 9,7)	73,2 (CH)	4,58 (d; 9,8)	73,1 (CH)
2'	4,05 (d; 9,0)	70,7 (CH)	4,04 (t, 9,0)	70,7 (CH)
3'	3,16 (m)	79,1 (CH)	3,20 (m)	79,0 (CH)
4'	3,16 (m)	70,3 (CH)	3,14 (m)	70,2 (CH)
5'	3,16 (m)	81,7 (CH)	3,16 (m)	81,6 (CH)
6'	3,68 (d; 11,1)	61,6 (CH <sub>2</sub> )	3,68 (d; 11,3)	61,5 (CH <sub>2</sub> )

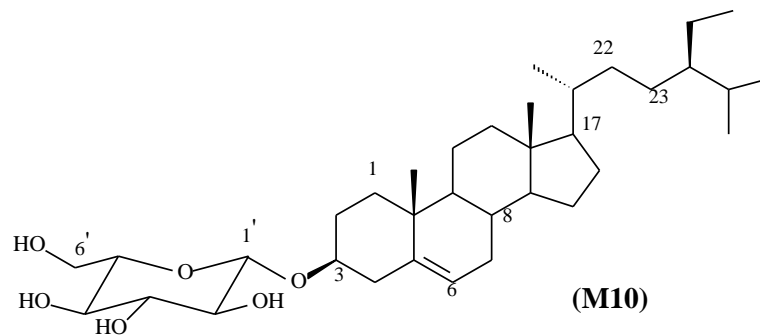
( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; \* $\delta$ -ppm; 400, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

De acordo com Canuto (2009), esta substância demonstra atividades farmacológicas em diferentes órgãos e tecidos, exercendo efeito preventivo e terapêutico contra uma considerável gama de doenças. A mangiferina mostrou grande atividade anti-hiperlipidêmica, antidiabética e antiaterogênica em ratos com diabetes *mellitus* (Maruganandan *et al*, 2002 e 2005), além de ser eficaz na prevenção de câncer intestinal neste tipo de animal (Yoshimi *et al*, 2011). A molécula desempenhou efeitos positivos nos ensaios de atividade inibitória sobre a replicação do HIV-1 (Wang *et al*, 2011) e também possui atividade antioxidante (Stoilova *et al*, 2008). Um estudo realizado por Chen e

colaboradores (2008), mostrou que esta xantona apresenta atividade antioxidante cerca de três vezes superior a do  $\alpha$ -tocoferol.

Além de todas essas atividades biológicas já mencionadas, a mangiferina demonstrou outras ações farmacológicas como anti-helmíntica (García *et al*, 2003), radioprotetora (Jagetia e Baliga, 2005), gastroprotetora (Carvalho, 2008) e imunomodulatória (Leiro *et al*, 2004). Tais relatos mostram que a mangiferina é uma substância promissora para o desenvolvimento de novas terapias no combate a diversas doenças.

#### 4.6. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE M10



A substância **M10** (4,8 mg) foi isolada da fração acetato de etila na forma de um sólido branco solúvel em mistura de metanol e clorofórmio na proporção 3:1.

O espectro de massas de baixa resolução (**Figura 41, anexo**) da substância **M10** apresentou um pico em  $m/z$  414 representando a porção aglicônica (sitosterol) e pico base em  $m/z$  43.

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 42, anexo**) foi observado um multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  5,37 pertencente ao hidrogênio vinílico H-6 e um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,40, correspondente ao hidrogênio H-3. Os sinais correspondentes aos hidrogênios metílicos tiveram deslocamento químico entre  $\delta_{\text{H}}$  0,71 e 2,50. O sinal do hidrogênio anomérico H-1' aparece como duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,41 e o valor da constante de acoplamento de  $J = 7,8$  Hz, evidencia a configuração  $\beta$ .

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (**Figura 43, anexo**) apresentaram sinais em  $\delta_{\text{C}}$  122,5 e 140,8 referentes aos carbonos vinílicos C-6 e C-5 e sinais de carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  12,1 (C-18), 19,6 (C-19), 19,1 (C-21), 19,3 (C-26), 20,1 (C-27) e 12,2 (C-29). O sinal característico de carbono anomérico de unidade glicosídica C-1' foi observado em  $\delta_{\text{C}}$  101,6, enquanto que os demais sinais dessa unidade foram observados em  $\delta_{\text{C}}$  74,0 (C-2'), 76,5 (C-3'), 70,6 (C-4'), 77,0 (C-5') e 62,1 (C-6'). Os deslocamentos químicos do núcleo esteroidal e da unidade glicosídica foram comparados com os dados da literatura para o daucosterol (Matida, 1996), se mostrando concordantes (**Tabela 39**).

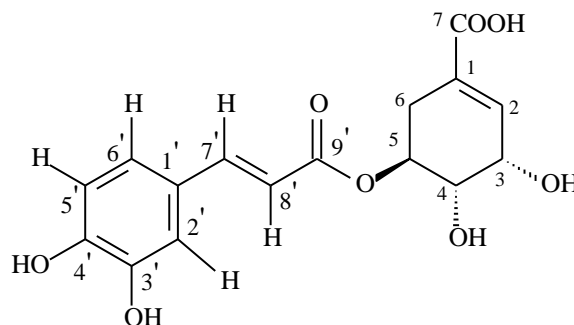
**Tabela 39: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância M10 e para o daucosterol**

	<b>Substância M10</b>	<b>Daucosterol*</b>		<b>Substância M10</b>	<b>Daucosterol*</b>
1	37,7 (CH <sub>2</sub> )	37,2 (CH <sub>2</sub> )	19	19,6 (CH <sub>3</sub> )	19,1 (CH <sub>3</sub> )
2	30,0 (CH <sub>2</sub> )	29,9 (CH <sub>2</sub> )	20	36,5 (CH)	36,1 (CH)
3	79,4 (CH)	78,2 (CH)	21	19,2 (CH <sub>3</sub> )	18,9 (CH <sub>3</sub> )
4	39,1 (CH <sub>2</sub> )	39,0 (CH <sub>2</sub> )	22	34,4 (CH <sub>2</sub> )	33,9 (CH <sub>2</sub> )
5	140,8 (C)	140,6 (C)	23	39,1 (CH <sub>2</sub> )	39,1 (CH <sub>2</sub> )
6	122,5 (CH)	122,6 (CH)	24	46,3 (CH)	45,7 (CH)
7	32,3 (CH <sub>2</sub> )	31,9 (CH <sub>2</sub> )	25	29,6 (CH)	29,2 (CH)
8	32,3 (CH)	31,8 (CH)	26	19,0 (CH <sub>3</sub> )	18,7 (CH <sub>3</sub> )
9	50,7 (CH)	50,0 (CH)	27	20,0 (CH <sub>3</sub> )	19,7 (CH <sub>3</sub> )
10	37,1 (C)	36,6 (C)	28	23,4 (CH <sub>3</sub> )	23,1 (CH <sub>3</sub> )
11	21,5 (CH <sub>2</sub> )	21,0 (CH <sub>2</sub> )	29	12,2 (CH <sub>3</sub> )	11,9 (CH <sub>3</sub> )
12	40,2 (CH <sub>2</sub> )	39,6 (CH <sub>2</sub> )	1'	101,6 (CH)	102,2 (CH)
13	42,8 (CH <sub>2</sub> )	42,2 (C)	2'	74,5 (CH)	75,0 (CH)
14	57,2 (CH <sub>2</sub> )	56,5 (CH)	3'	76,4 (CH)	77,0 (CH)
15	24,7 (CH <sub>2</sub> )	24,2 (CH <sub>2</sub> )	4'	70,6 (CH)	71,3 (CH)
16	28,6 (CH <sub>2</sub> )	28,2 (CH <sub>2</sub> )	5'	79,4 (CH)	78,1 (CH)
17	56,5 (CH)	55,9 (CH)	6'	62,1 (CH <sub>2</sub> )	62,2 (CH <sub>2</sub> )
18	12,2 (CH <sub>3</sub> )	11,7 (CH <sub>3</sub> )			

( $\delta$ -ppm; 75,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD; \* $\delta$ -ppm; 75,5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

O daucosterol é significativamente citotóxico frente à *Artemia salina* apresentando uma DL<sub>50</sub> = 67  $\mu\text{g/mL}$  (Gallota *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Lee e colaboradores (2007) demonstrou que o daucosterol apresenta atividade imunomoduladora, induzindo resposta imune linfocitária do tipo Th1 e, assim, protegendo contra a disseminação da candidíase em camundongos.

## 4.7. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE M11



O composto **M11** (12,7 mg) foi isolado da fração acetato de etila como um sólido marrom solúvel em metanol.

Foi observado, através do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 44, 45 e 46 anexos**), um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,27 ( $J = 15,9$  Hz) que foi atribuído ao H-8 e em  $\delta_{\text{H}}$  7,55 ( $J = 15,9$  Hz) ao H-7 característicos de um sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, sendo que a constante de acoplamento indica uma configuração *trans* para esses hidrogênios. Os dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 ( $J = 2,1$  Hz, H-2) e em  $\delta_{\text{H}}$  6,77 ( $J = 8,1$  Hz, H-5) e o duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,94 ( $J = 8,1$  e  $2,1$  Hz, H-6), indicaram a presença de um anel aromático 1, 3 e 4 substituído. Também foram observados duplos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  2,90 ( $J = 18,6$  e  $6,0$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,30 ( $J = 18,6$  e  $6,0$  Hz) correspondendo aos hidrogênios H-6, além de multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  6,71 (H-2) e  $\delta_{\text{H}}$  5,23 (H-5). O tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  4,36 ( $J = 3,6$  Hz) foi atribuído ao H-3, enquanto que o duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,86 ( $J = 8,1$  e  $4,2$  Hz) foi atribuído ao H-4.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 47, anexos**) apresentou um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  em 168,7 (C-9') característico de carbonila de éster  $\alpha,\beta$ -insaturado e sinais em  $\delta_{\text{C}}$  115,2 e 147,1 atribuídos aos C-8' e C-7' desse sistema. Os sinais dos carbonos metínicos do anel aromático foram observados em  $\delta_{\text{C}}$  115,1,  $\delta_{\text{C}}$  116,5 e  $\delta_{\text{C}}$  123,0 e foram atribuídos carbonos C-2', C-5' e C-6'. Também foi observado um sinal de carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  30,4 (C-6) e de carbonos oximetínicos em  $\delta_{\text{C}}$  67,6 (C-3),  $\delta_{\text{C}}$  70,7 (C-4) e  $\delta_{\text{C}}$  71,6 (C-5). Fora isso, foram observados sinais em  $\delta_{\text{C}}$  135,6 referente ao carbono C-2 e um sinal em 168,7, referente ao carbono carbonílico C-7.

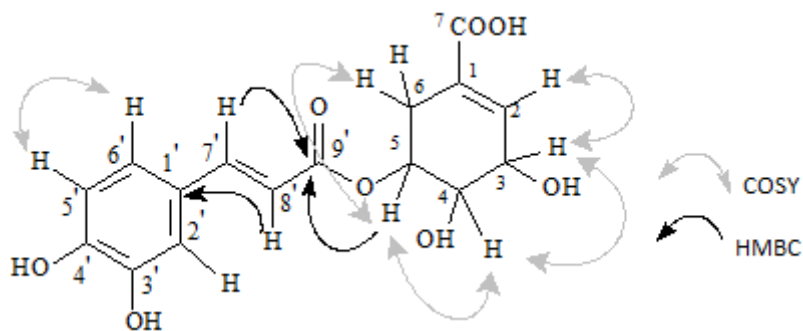
No mapa de contornos HSQC (**Figuras 48 e 49, anexos**), foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono, colaborando nas atribuições e na confirmação da estrutura para esta substância.

A presença do grupo  $\alpha,\beta$ -insaturado na posição 1 do anel aromático foi confirmada através do mapa de contornos HMBC (**Figuras 50 e 51, anexos**), onde foram observadas as correlações à longa distância entre o carbono carbonílico em  $\delta_C$  168,7 (C-9') e o hidrogênio H-7' em  $\delta_H$  7,55, entre o H-8' ( $\delta_H$  6,27) e o carbono C-1' ( $\delta_C$  127,7) e entre o H-2' ( $\delta_H$  7,03) com o carbono C-7' ( $\delta_C$  147,1). No grupo chiquímico foi verificada a correlação entre o H-5 ( $\delta_H$  5,23) e os carbonos C-1 ( $\delta_C$  133,6), C-3 ( $\delta_C$  67,6) e C-4 ( $\delta_C$  70,7). Estas e demais correlações estão na **Tabela 39**, a seguir.

**Tabela 40: Correlações heteronucleares  $^1\text{H}$  x  $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contornos HMBC para M11**

$\delta_H$	$\delta_C$
5,23 (H-5)	133,6 (C-1), 67,6 (C-3), 70,7 (C-4) e 168,7 (C-9')
2,90 e 2,30 (H-6)	133,6 (C-1), 135,6 (C-2) e 71,6 (C-5)
7,03 (H-2')	147,1 (C-7')
6,76 (H-5')	115,1 (C-2'), 149,6 (C-4') e 147,1 (C-7')
7,55 (H-7')	115,1 (C-2'), 123,0 (C-6') e 168,7 (C-9')
6,27 (H-8')	127,7 (C-1')

Observou-se no mapa de contornos ( $^1\text{H}\text{X}^1\text{H}$ ) COSY (**Figura 52 e 53, anexos**), as correlações entre os hidrogênios em  $\delta_H$  6,76 (H-5') e  $\delta_H$  6,94 (H-6') do anel aromático e correlações entre os hidrogênios da dupla ligação em  $\delta_H$  6,27 (H-8') e  $\delta_H$  7,55 (H-7'). No grupo chiquímico, o hidrogênio H-2, em  $\delta_H$  6,71, apresentou correlação com o H-3, em  $\delta_H$  4,36, e este, por sua vez, correlacionou com o H-4, em  $\delta_H$  3,86. Também foi observada a correlação do H-4 com o H-5, em  $\delta_H$  5,23 e este, por sua vez, correlacionou com o H-6, em  $\delta_H$  2,90 e  $\delta_H$  2,30.



**Figura XIII:** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para M11.



Foi comprovada a correlação espacial do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,36 (H-3) com o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,86 (H-4), através do mapa de contornos NOESY, comprovando a estereoquímica do grupo chiquímico (**Figura 54, anexos**).

Os dados espectrais de **M11** foram comparados com os dados existentes na literatura (Ivanova *et al*, 2010) para o ácido 5-O-cafeoilchiquímico sendo concordantes. Esses dados estão expostos na **Tabela 41**.

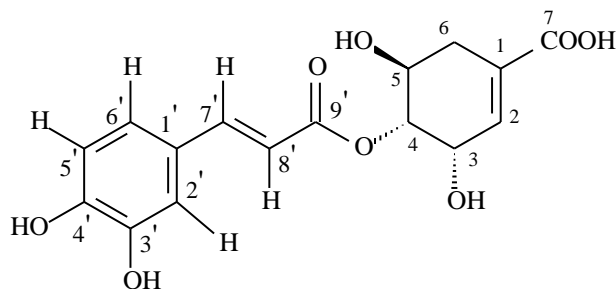
**Tabela 41: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância M11 e para o ácido 5-O-cafeoil chiquímico**

C	Substância M11	ácido 5-O-cafeoil chiquímico*		
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		133,6**		134,2
2	6,71 (m)	135,6	6,69 (m)	135,1
3	4,36 (t; 3,6)	67,6	4,36 (t; 4,1)	67,6
4	3,86 (dd; 8,1 e 4,2)	70,7	3,85 (dd; 8,3 e 4,2)	70,7
5	5,23 (m)	71,6	5,23 (q; 6,4)	71,7
6	2,90 (dd; 18,6 e 6,0)	30,4	2,90 (m)	30,7
	2,30 (dd, 18,6 e 6,0)		2,30 (m)	
7		168,8		172,7
1'		127,7		127,8
2'	7,04 (d; 2,1)	115,1	7,04 (d; 2,0)	115,2
3'		146,8		146,9
4'		149,6		149,7
5'	6,77 (d; 8,1)	116,5	6,77 (d; 8,2)	116,5
6'	6,94 (dd; 8,1 e 2,1)	123,0	6,93 (dd; 8,2 e 2,0)	123,0
7'	7,55 (d; 15,9)	147,1	7,55 (d; 15,9)	147,1
8'	6,27 (d; 15,9)	115,2	6,28 (d; 15,9)	115,3
9'		168,7		168,9

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; \* $\delta$ -ppm; 250,13 e 62,8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

\*\* sinal observado pelo HMBC

#### 4.8. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA M12



A substância **M12** foi obtida em mistura com a substância **M11** na proporção 1:1 na fração acetato de etila como um sólido marrom solúvel em metanol.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **M12** (**Figuras 55 e 56, anexos**) mostrou sinais semelhantes ao de **M11**. A presença da unidade cafeoíla foi caracterizada devido aos sinais dos hidrogênios vinílicos *trans* em  $\delta_{\text{H}}$  7,59 e 6,33 (d,  $J = 15,9$  Hz, H-7' e H-8'), dos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,04 (d,  $J=2,1$ , H-2') e 6,77 (d,  $J=8,4$ Hz, H-5') e do duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,96 (dd,  $J=2,1$  e 8,4Hz, H-6'). Além desses sinais, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou a presença de quatro hidrogênios oximetínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,82 (m), em  $\delta_{\text{H}}$  4,61 (3,9 Hz, H-3), em  $\delta_{\text{H}}$  5,01 (dd,  $J=4,2$  e 7,8 Hz, H-4) e em  $\delta_{\text{H}}$  4,20 (dt,  $J=5,7$  e 7,2 Hz, H-5) e multipletos na faixa de  $\delta_{\text{H}}$  2,24 a 2,36 e  $\delta_{\text{H}}$  2,68 a 2,83 (H-6) característicos de hidrogênios metilênicos do grupo chiquímico.

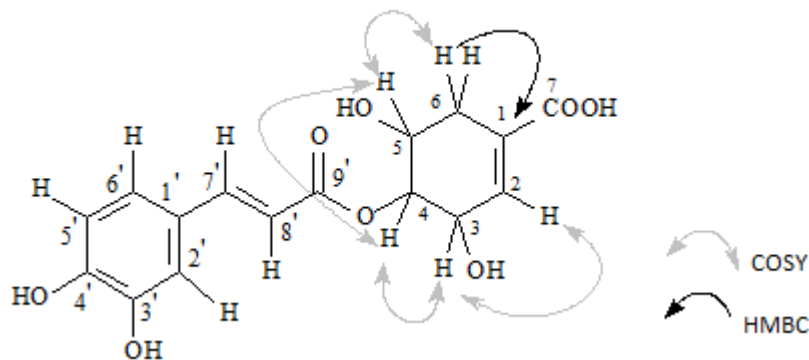
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 57, anexos**) da substância **M12** também mostraram sinais semelhantes ao da substância **M12** em relação ao grupo cafeoíla. O grupo chiquímico foi evidenciado pela presença de um carbono em  $\delta_{\text{C}}$  169,8 (C-7), além de sinais de carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  32,1 (C-6) e de carbonos oximetínicos em  $\delta_{\text{C}}$  65,6 (C-3), 75,0 (C-4) e 65,8 (C-5). Fora isso, observou-se o sinal do carbono carbinólico C-1 em  $\delta_{\text{C}}$  130,5 e do carbono metínico em C-2 em  $\delta_{\text{C}}$  138,0.

No mapa de contornos HSQC (**Figuras 58 e 59, anexos**), foram observadas as correlações entre os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono, colaborando nas atribuições e na confirmação da estrutura para esta substância.

Através do mapa de correlação HMBC (**Figura 60 e 61, anexos**), foi vista a correlação entre o hidrogênio H-5, em  $\delta_{\text{H}}$  4,20 com o carbono C-4, em  $\delta_{\text{C}}$  75,0 bem como a correlação do multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  2,75 (H-6) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  130,5 (C-1).

No mapa de correlações COSY (**Figura 62 e 63, anexos**), foram observadas as correlações entre os hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  6,84 com  $\delta_{\text{H}}$  4,61;  $\delta_{\text{H}}$  4,61 com  $\delta_{\text{H}}$  5,01;  $\delta_{\text{H}}$  5,01 com  $\delta_{\text{H}}$  4,20 e  $\delta_{\text{H}}$  4,20 com o multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  2,75. Considerando os valores dos

deslocamentos químicos encontrados na literatura, percebeu-se que o grupo chiquímico da molécula estava substituído na posição 4.



**Figura XIV:** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para **M12**.

Foi comprovada a correlação espacial do hidrogênio H-3 em  $\delta_H$  4,61 com o hidrogênio H-4 em  $\delta_H$  5,01, através do mapa de contornos NOESY (**Figura 64, anexos**).

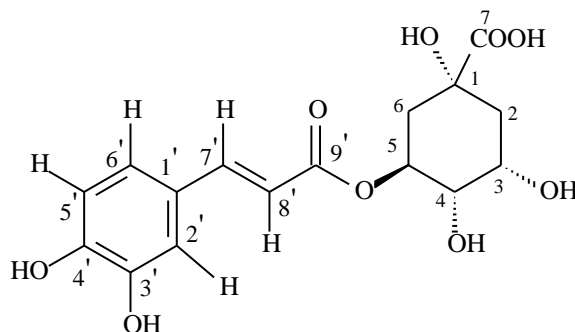
Os dados espectroscópicos foram comparados com os dados da literatura (Saito, 1997) e foram concordantes para o ácido 4-O-cafeoilchiquímico, conforme observado na **tabela 42**.

**Tabela 42: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância M12 e para o ácido 4-*o*-cafeoilchiquímico**

C	Substância M12		ácido 4- <i>o</i> -cafeoilchiquímico*	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		130,5		131,0
2	6,82 (m)	138,0	6,84 (m)	138,2
3	4,61 (tl; 3,9)	65,6	4,61 (tl)	65,6
4	5,01 (dd; 4,2 e 7,8)	75,0	5,02 (dd)	75,0
5	4,20 (dt; 7,2 e 5,7)	65,8	4,20 (dt)	65,8
6	2,30 (m)	32,2	2,30 (ddl)	32,1
	2,75 (m)		2,72 (ddl)	
7		169,8		169,8
1'		127,7		127,8
2'	7,04 (d; 2,1)	115,1	7,04 (d)	115,1
3'		146,8		147,2
4'		149,6		146,7
5'	6,77 (d; 8,1)	116,5	6,77 (d)	116,5
6'	6,96 (dd; 8,4 e 2,1)	123,0	6,95 (dd)	123,0
7'	7,59 (d; 15,9)	147,2	7,59 (d)	147,2
8'	6,33 (d; 15,9)	115,2	6,33 (d)	115,2
9'		168,9		168,9

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; \* $\delta$ -ppm; 300 e 75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

## 4.9. ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA M13.



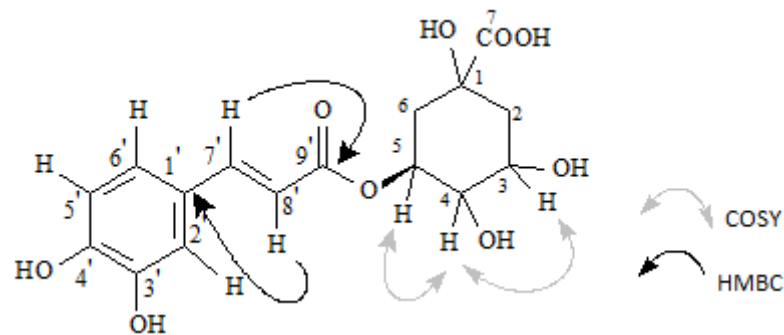
Para a substância **M13**, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 65 e 66, anexos**) mostrou sinais semelhantes ao de **M11** em relação a unidade cafeoila, devido aos sinais dos hidrogênios vinílicos *trans* em  $\delta_{\text{H}}$  7,55 e 6,27 (d,  $J=16,2$  Hz, H-7' e H-8'), dos dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,03 (d,  $J=2,1$ , H-2') e 6,76 (d,  $J=8,1$  Hz, H-5') e do duplo duplete em  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (dd,  $J=2,1$  e 8,1 Hz, H-6'). Além desses sinais, o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrou a presença de hidrogênios oximetínicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,16 (d,  $J=3,0$  Hz, H-3), em  $\delta_{\text{H}}$  3,70 (dd,  $J=3,0$  e 9,4 Hz, H-4), em  $\delta_{\text{H}}$  5,36 (ddd,  $J=9,3$ , 9,3 e 4,2 Hz, H-5) e multipletos entre  $\delta_{\text{H}}$  1,94-2,25, correspondendo aos hidrogênios H-2 e H-6, característicos de hidrogênios metilênicos do grupo quínico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 67, anexos**) apresentou sinais semelhantes ao composto **M11** para a unidade cafeoila. Apesar de não ter sido observado os sinais de carbono carbinólico (C-1) e carboxílico (C-7), foram observados sinais de carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  38,3 e  $\delta_{\text{C}}$  40,1 correspondentes aos carbonos C-6 e C-2 e de carbonos oximetínicos C-3, C-4 e C-5 na região entre  $\delta_{\text{C}}$  72,5 e  $\delta_{\text{C}}$  74,6 que foram atribuídos aos carbonos do grupo quínico.

Através do mapa de contornos HSQC (**Figuras 68 e 69, anexos**) as correlações entre os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio foram observadas, auxiliando nas atribuições e na confirmação estrutural do composto.

O mapa de contornos HMBC (**Figura 70, anexos**) apresentou as correlações entre carbono C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  72,0) e o hidrogênio H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  3,70) no grupo quínico. Na unidade cafeoila, observou-se a correlação do carbono C-7', em  $\delta_{\text{C}}$  168,8, com o hidrogênio H-7' em  $\delta_{\text{H}}$  7,58, bem como as correlações entre o H-8' ( $\delta_{\text{H}}$  6,28) e C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  127,5) e entre o H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7,03) e C-7' ( $\delta_{\text{C}}$  146,8).

O mapa de contornos ( $^1\text{HX}^1\text{H}$ ) COSY (**Figuras 71 e 72, anexos**) mostrou as correlações dos hidrogênios da dupla *trans* vinílicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,30 (H-8') e  $\delta_{\text{H}}$  7,58 (H-7') da unidade cafeoila. No grupo quínico, foi observado a correlação do H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4,16) com o H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  3,70), que por sua vez mostrou correlação com H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  5,36).



**Figura XV:** Principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY e HMBC para **M13**.

A análise do espectro de NOESY (**Figura 73, anexos**) forneceu a correlação espacial entre o hidrogênio H-3 em  $\delta_{\text{H}}$  4,16 e o hidrogênio H-4 em  $\delta_{\text{H}}$  3,70, respectivamente.

Os dados espectroscópicos foram comparados com os dados da literatura (Chan *et al.*, 2009) e foram concordantes para o ácido 5-O-cafeoilquínico, conforme observado na **tabela 43**.

**Tabela 43: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a substância M13 e para o 5-*o*-ácido cafeoilquínico.**

C	Substância M13		5- <i>o</i> -ácido cafeoilquínico*	
	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult.; J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1		-		76,1
2	1,94-2,25 (m)	38,2	1,92-1,98 (m)	38,2
3	4,16 (m)	72,3	4,10 (m)	71,3
4	3,70 (dd; 9,3 e 3,0)	74,6	3,67 (m)	72,0
5	5,36 (ddd, 9,3, 9,3 e 4,2)	72,1	5,36 (m)	73,5
6	1,94-2,25 (m)	39,7	2,11 (m)	38,8
7		-		177,0
1'		127,6		127,8
2'	7,03 (d; 2,1)	115,0	7,04 (d; 1,8)	115,2
3'		146,6		147,1
4'		149,4		149,6
5'	6,76 (d; 8,1)	116,3	6,76 (d; 8,2)	116,5
6'	6,93 (dd; 8,1 e 2,1)	122,9	6,94 (dd; 8,2 e 1,8)	123,0
7'	7,55 (d; 16,2)	147,2	7,56 (d; 15,9)	146,8
8'	6,27 (d; 16,2)	115,2	6,28 (d; 15,9)	115,1
9'		168,7		168,7

( $\delta$ -ppm; 300,06 e 75,5 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; \* $\delta$ -ppm; 300 e 75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

## 4.10. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO

### 4.10.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

O extrato bruto de *M. picta* e suas partições em hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol foram avaliados em culturas de células tumorais de glioma (U521), melanona (UACC-62), leucemia (K562), mama (MCF-7), ovário resistente a múltiplas drogas (NCI/ADR-RES), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT29) e células normais de queratinócitos humanos (HaCat), utilizando o método colorimétrico de avaliação de inibição de crescimento. O quimioterápico comercial doxorrubicina foi utilizado como controle positivo. Os resultados são mostrados nas **Figuras 74 a 79 (anexos)** e na **Tabela 44**, a seguir:



**Tabela 44:** Valores do GI<sub>50</sub> (µg/mL) para o extrato bruto, frações e alguns compostos isolados de *M. picta* frente à células tumorais humanas.

	2	u	m	a	7	4	p	o	h	k	q
Doxorrubicina	0,034	0,029	0,041	0,40	1,5	<0,025	0,25	0,33	0,21	1,0	0,034
MPH	29,6	73,4	40,8	67,3	124,0	97,1	54,4	84,7	68,5	158,7	58,7
MPC	23,0	3,5	6,9	8,3	26,5	13,9	6,9	7,1	24,7	>250	13,9
MPCH	32,2	-	41,5	-	-	110,8	-	-	-	-	-
MPCC	7,0	-	9,2	-	-	13,2	-	-	-	-	-
MPCA	6,0	-	3,3	-	-	12,2	-	-	-	-	-
MPCM	53,9	-	28,8	-	-	70,8	-	-	-	-	-
MPA	51,4	13,4	21,7	27,4	>250	61,0	38,9	113,1	49,4	37,9	68,0
MPB	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
MPM	>250	>250	15,6	>250	>250	>250	>250	161,4	>250	>250	104,6
MPEB	63,5	35,1	89,0	83,4	>250	114,4	50,1	58,0	38,6	>250	48,6
M1+M2	128,5	-	172,9	48,9	60,2	>250	-	-	>250	-	170,3
M6+M7	25,6	-	26,9	3,9	20,9	28,4	-	-	32,8	-	40,6
(MPCC)											
M6+M7	2,7	-	19,5	2,8	5,8	7,3	-	-	9,8	-	6,1
(MPCA)											
M8	29,7	-	29,0	26,1	27,5	30,7	-	-	31,3	-	29,9
M9	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250

2 = U251 (glioma, SNC); u = UACC-62 (melanona); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT29 (colorectal); k = K562 (leucemia); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

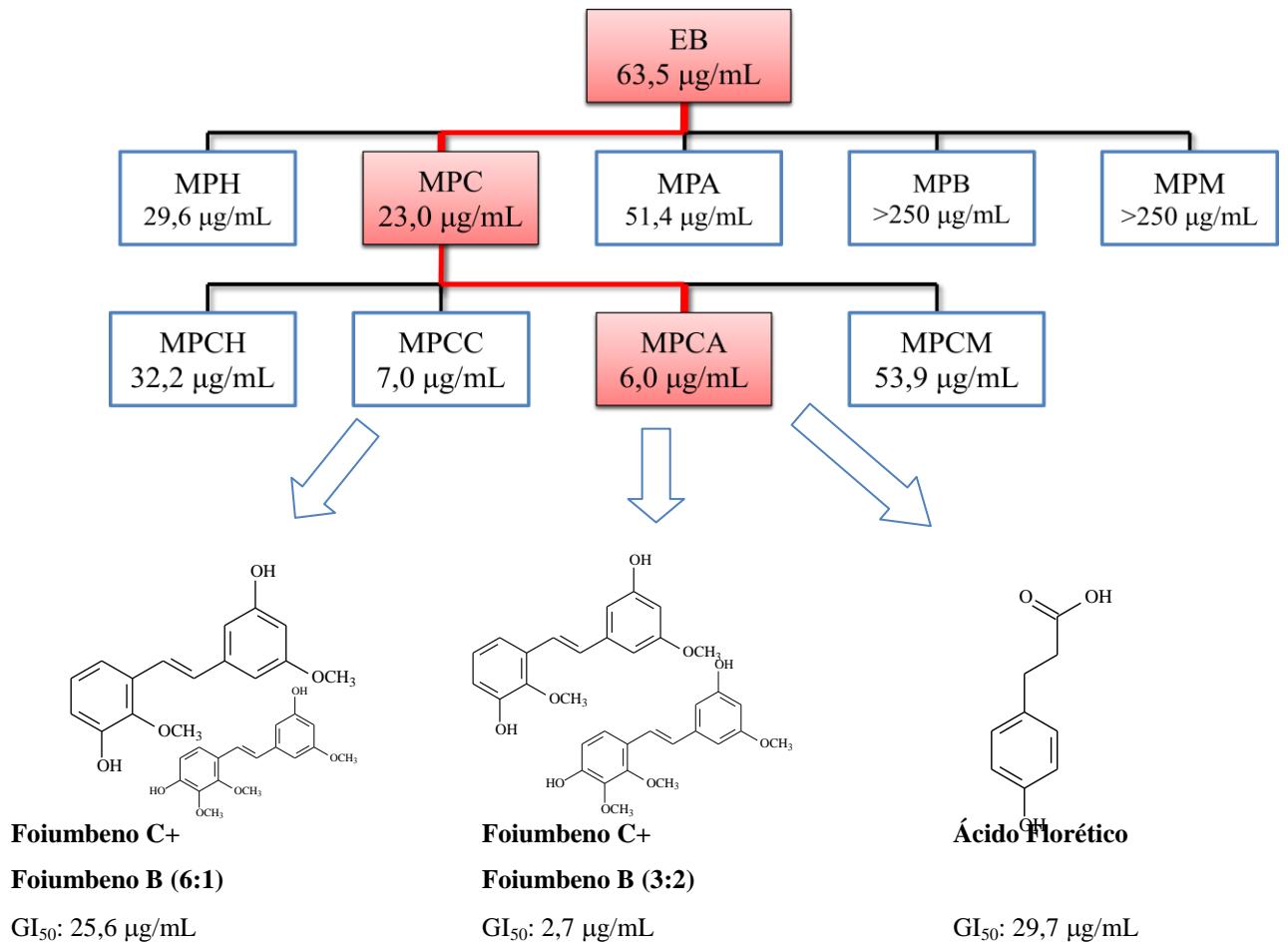
Foi evidenciada que a fração clorofórmica (MPC) apresentou atividade antiproliferativa mais promissora, com GI<sub>50</sub> entre 6,9 e 26,5 µg/mL em dez linhagens de células. As demais frações apresentaram uma atividade menor do que MPC ou foram inativas nas condições avaliadas. Vale a pena ressaltar que a fração MPM apresentou uma ação citostática seletiva sobre a linhagem MCF-7 (mama, GI<sub>50</sub> = 15,6 µg/mL).

Em adição, a fração clorofórmica (MPC) foi solubilizada com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, resultando nas subfrações MPCH, MPCC, MPCA e MPCM respectivamente, as quais também foram avaliadas quanto à atividade

antiproliferativa em três linhagens de células. Foi possível evidenciar que o fracionamento concentrou as substâncias com atividade antiproliferativa nas subfrações com clorofórmio e com acetato de etila, inferindo que as substâncias responsáveis pela atividade biológica se concentraram nessas subfrações. Por outro lado, as outras duas subfrações foram significativamente menos ativas do que a fração MPC original.

A mistura dos triterpenos 24-metilenocicloartenol e eburicol (**M1+M2**), o ácido florético (**M3**) e a mistura de estilbenos foiumbeno C e foiumbeno B (**M6+M7**), isolada nas subfrações MPCC e MPCA em diferentes proporções, foram avaliados quanto à atividade antiproliferativa em sete linhagens de células.

A mistura de triterpenos (**M1+M2**) apresentou uma moderada atividade sobre as linhagens NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas,  $GI_{50} = 48,9 \mu\text{g/mL}$ ) e 786-0 (rim,  $GI_{50} = 60,2 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto que o ácido florético (**M8**) apresentou uma ação citostática significativa em todas as linhagens testadas, com  $GI_{50}$  entre 26,1 e 31,3  $\mu\text{g/mL}$ . A mistura dos estilbenos (**M6+M7**) proveniente da fração MPCC na proporção 6:1, apresentou boa seletividade sobre a linhagem NCI-ADR/RES ( $GI_{50} = 3,9 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto que as demais linhagens obtiveram um  $GI_{50}$  entre 20,9 e 40,6  $\mu\text{g/mL}$ . No entanto, a mesma mistura isolada na fração MPCA em proporção 3:2, apresentou promissora atividade antiproliferativa, inibindo fortemente o crescimento de todas as linhagens testadas, com valores de  $GI_{50}$  entre 2,7 e 19,5  $\mu\text{g/mL}$  (média  $GI_{50} = 7,7 \mu\text{g/mL}$ ). Através desses resultados, pode-se concluir que foiumbeno B (**M7**) é, ao menos em parte, responsável pela atividade observada no extrato bruto metanólico e na fração clorofórmica. A mangiferina (**M9**), avaliada nas onze linhagens celulares tumorais humanas, mostrou-se inativa nas condições empregadas.



**Esquema 9:** Visão global do potencial anticâncer das frações obtidas a partir do extrato bruto de *Maxillaria picta* (linhagem U251, GI<sub>50</sub>).

#### 4.10.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA FRENTE À *Trypanosoma cruzi*.

O extrato bruto de *M. picta* e suas filtrações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol foram avaliadas quanto à atividade antiproliferativa contra formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*.

A fração clorofórmica de *M. picta* apresentou atividade antiproliferativa sobre as formas epimastigotas ( $IC_{50}$  70,0  $\mu\text{g/mL} \pm 0,0$ ) bem como afetou de modo expressivo a viabilidade das formas tripomastigotas ( $IC_{50}$  55,0  $\mu\text{g/mL} \pm 7,0$ ). Por manifestar ação relevante sobre esta última forma, a fração clorofórmica foi, então, submetida ao ensaio de citotoxicidade em células LLCMK<sub>2</sub>, apresentando uma  $CC_{50}$  de 103,4  $\mu\text{g/mL} \pm 18,88$ . As partições hexânica, acetato de etila e o extrato bruto apresentaram atividade antiproliferativa contra formas epimastigotas, mas não apresentaram atividade sobre as formas tripomastigotas nas concentrações testadas. Os dados estão expostos na **Tabela 45**, a seguir.

**Tabela 45:** Valores de  $CC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) e IS para o extrato bruto e frações de *M. picta* frente *Trypanosoma cruzi*.

Fração ou substância testada	Citotoxicidade em LLCMK <sub>2</sub>	Epimastigotas		Tripomastigotas		
		$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS
MPH			154,5 $\pm$ 19,09		> 200	ND
MPC	103,4 $\pm$ 18,9		70,0 $\pm$ 0,0	1,48	55,0 $\pm$ 7,0	1,88
MPA			563,2 $\pm$ 4,24		> 200	ND
MPB			>1000		> 200	ND
MPM			>1000		> 200	ND
MPEB			153,3 $\pm$ 0,0		> 200	ND
Mangiferina			> 100		> 200	ND

#### 4.10.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA FRENTE À *Leishmania amazonensis*.

A avaliação da atividade antiproliferativa do extrato bruto, frações e substância precipitada durante a preparação dos extratos (mangiferina), contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, mostrou que a fração clorofórmica apresentou a melhor atividade sobre as formas evolutivas do parasito, com um  $IC_{50}$  de 67,15  $\mu\text{g/mL}$ . Já a fração hidrometanólica apresentou moderada atividade sobre promastigotas ( $IC_{50}$  126,66  $\mu\text{g/mL}$ ). No entanto, os valores de  $CC_{50}$  relativos a algumas frações suplantaram os  $IC_{50}$  das mesmas, sugerindo que a atividade está diretamente relacionada à citotoxicidade. As frações MPC, MPM, MPA apresentaram índice de seletividade ( $CC_{50}/IC_{50}$ ) maior que 1, denotando que essas frações em particular são mais ativas contra os protozoários e menos ativas contra as células de mamíferos. Dentre essas três frações, a hidrometanólica foi a que apresentou o melhor índice de seletividade sendo, portanto, submetida ao ensaio antiproliferativo contra formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, que resultou em uma  $IC_{50}$  de 196,34  $\mu\text{g/mL}$ . Esses dados podem ser observados na **tabela 46**.

**Tabela 46: Valores de CC<sub>50</sub> (µg/mL), IC<sub>50</sub> (µg/mL) e IS para o extrato bruto e frações de *M. picta* frente *Leishmania amazonensis*.**

DROGA	Citotoxicidade em J.774.A1		Promastigotas		Amastigotas	
	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IS	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IS	
MPH	77,50 ± 3,54	187,32 ± 5,72	0,41			
MPC	73,47 ± 1,68	67,15 ± 1,63	1,09			
MPA	336,76 ± 4,79	258,31 ± 3,97	1,30			
MPB	143,34 ± 4,72	158,50 ± 4,92	0,90			
MPM	313,34 ± 4,72	126,66 ± 6,67	2,47	196,34 ± 4,72	1,60	
MPEB	92,75 ± 6,72	186,67 ± 0,01	1,30			
Mangiferina	300,74 ± 3,91	> 100	ND			

ND: não determinado.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da espécie vegetal *Maxillaria picta* resultou no isolamento dos esteroides campesterol, sitosterol e estigmasterol e dos triterpenos eburicol e 24-metilenocicloartenol a partir das partições hexânica (MPH) subfração clorofórmica-hexânica (MPCH), sendo que em trabalhos anteriores realizados com espécies desta família, relata-se o isolamento dessas substâncias, com exceção do triterpeno eburicol. Todavia, não foram encontrados na literatura relatos sobre o isolamento desses compostos em espécies do gênero.

O ácido florético foi isolado da subfração clorofórmica-acetato de etila (MPCA), juntamente com a mistura de estilbenos foiumbeno B e foiumbeno C que também foram isolados da subfração clorofórmica-clorofórmica (MPCC). O único relato de isolamento do ácido florético em plantas da família Orchidaceae, ocorreu em nosso grupo de pesquisa simultaneamente ao isolamento dessa substância na espécie vegetal em questão, no estudo de *Oncidium baueri* (dados não publicados). Trata-se também do segundo relato de isolamento dos estilbenos foiumbeno B e foiumbeno C na natureza, sendo que estudos anteriores mostraram uma significativa atividade anticâncer para estas substâncias. Ao que tudo indica, os estilbenos podem ser o princípio ativo antiproliferativo de *M. picta*, já que a avaliação da atividade antiproliferativa das frações ricas nessas substâncias mostraram resultados positivos.

Da fração acetato de etila (MPA) foi isolado o esteróide glicosilado daucosterol, além dos ácidos 4-O-cafeiolchiquímico, 5-O-cafeiolchiquímico e 5-O-cafeiolquínico. A xantona mangiferina foi isolada a partir da precipitação das frações acetato de etila (MPA), butanólica (MPB) e em grande quantidade na fração hidrometanólica (MPM).

O extrato bruto e as partições de *M. picta* apresentaram atividade citostática, especialmente a fração clorofórmica, concluindo-se que as substâncias responsáveis pela atividade antiproliferativa da espécie vegetal em estudo se concentram nessa fração. A avaliação da atividade antiproliferativa das substâncias isoladas dessas subfrações mostraram moderada ou significativa atividade. O estilbeno foiumbeno B, foi o que apresentou o resultado mais promissor, concluindo-se que a substância é o principal responsável pela atividade observada no extrato bruto, frações e subfrações da espécie vegetal.

A avaliação da atividade biológica frente a *T. cruzi* mostrou que a fração clorofórmica de *M. picta*, apresenta uma efetiva atividade sobre a viabilidade das formas

epimastigotas e tripomastigotas, embora possua certo grau de citotoxicidade. De forma semelhante, as avaliações biológicas contra *L. amazonensis* também mostraram que a fração clorofórmica apresenta a melhor atividade sobre as formas evolutivas do parasito. Além disso, esta fração juntamente com frações acetato de etila (MPA) e hidrometanólica (MPM) apresentaram índice de seletividade maior que 1, sendo mais ativas contra os protozoários do que contra células de mamíferos.

Finalmente, o presente estudo contribuiu para uma melhor compreensão do potencial de orquídeas como fontes de moléculas bioativas. Trata-se de um gênero vegetal de composição química relativamente desconhecida e ao mesmo tempo com um grande número de espécies, representando um nicho potencial de estudos na área de química de produtos naturais.



## 6. REFERÊNCIAS

Almeida, V. L.; Leitão, A.; Reina, L. C. B., Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. **P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.** *Química Nova*, 28(1), 118-129, 2005.

Andrade, S.F.; Cardoso, L.G.V.; Carvalho, J.C.T.; Bastos, J.K. **Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*.** *Journal of Ethnopharmacology*, 109: 464–471, 2007.

Ashfor, R. W. **The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses.** *International Journal for Parasitology*, 30(12-13): 1269-1281, 2000.

Atawodi, S. E. **Pholyphenol composition and *in vitro* antioxidant potential of nigerian *Canarium schweinfurthii* Engl. Oil.** *Advances in Biological Research* 4(6): 314-322, 2010.

Azevedo, C. O.; van den Berg, C. **A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil.** *Hoehnea*, 34(1): 1-47, 2007.

Bolzani, V. S.; Trevisan, L. M. V.; Young, M. C. M. **Triterpenes of *Palicourea rigida* H. B. K.** *Revista Latinoamericana de Química*, 23(1): 20-21, 1992.

Brener, Z. **Therapeutic activity criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4: 386-396, 1962.

Calixto, J. B.; **Biodiversidade como fonte de medicamentos.** *Revista Ciência e Cultura*, 55(3): 37-39, 2005.

Cechinel Filho, V. C. **Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALi.** *Química Nova*, 23: 680-685, 2000.

Cai, Y.; Luo, Q.; Sun.; Corke. H. **Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer.** *Life Sciences*, 74: 2157-2184, 2004.

Cameron, K. M.; Chase, M. W.; Whitten, W. M.; Kores, P. J.; Jarrel, D. C.; Albert, V. A.; Yukawa; Hills, H.G.; Goldman, D.H. **A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences.** *American Journal of Botany*, 86(2): 208–224, 1999.

Campelo, C. R.; Ramalho, R. C.; Contribuição ao estudo das plantas medicinais do estado do alago

Cardoso, J. C.; Israel, M. **Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo.** *Horticultura Brasileira*, 23(2): 169-173, 2005.

Carvalho, A. C. S. **Efeito pré clínicos do efeito gastroprotetor da mangiferina, uma glicosilxantona isolada de *Mangifera indica* L. em modelos experimentais de lesão gástrica aguda.** Dissertação de mestrado, UFC, 2008.

Carvalho, T. M. U. Estudo por microscopia óptica. Fiocruz. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=69>>. Acesso em 23 nov. 2013.

Chan, E. W. C; Lim, Y. Y.; Ling, S.K.; Tan, S.P.; Lim, K.K.; Khoo; M.G.H.; **Caffeoylquinic acids from leaves of *Etilingera* species (Zingiberaceae).** *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1026-1030, 2009.

Chen, Y. H.; Chang, F. R.; Lin, Y. J.; Hsieh, P. W.; Wub, M. J.; Wu, Y. C. **Identification of antioxidants from rhizome of *Davallia solida*.** *Food Chemistry*, 107(2): 684–691, 2008.

Déciga-Campos, M.; Rivero-Cruz, I.; Arriaga-Alba, M.; Castañeda-Corral, G.; Angeles-López G. E.; Navarrete, A.; Mata, R. **Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican**

**plants used in traditional medicine.** *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2): 334–342, 2007.

Estrada, S.; López-Guerrero, J. J.; Villalobos-Molina, R.; Mata, R. **Spasmolytic stilbenoids from *Maxillaria densa*.** *Fitoterapia*, 75: 690–695, 2004.

Ferreira, J.; Floriani, A. E. O.; Cechinel Filho, V.; Monache, Yunes, R. A.; Calixto, J. B., Santos A. R. S.; **Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* Stems (Orchidaceae).** *Life Sciences*, 66(9): 791-802, 2000.

Fernandes, R. M.; **A Evolução no Conhecimento e o Controle da Doença de Chagas no Brasil: um estudo de caso sobre a interação entre a ciência, a tecnologia, a saúde e a economia.** Dissertação de mestrado, UFMG, 2005.

Ferreira, E. C. **Estudo dos hospedeiros de *Leishmania* em área de ocorrência das leishmanioses no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.** Tese de doutorado, Fiocruz, 2010.

Flach, A. **Ecologia Química de Maxillariinae, *Spathodea campanulata* e Meliponiinae.** Tese de doutorado, UNICAMP, 2005.

Freitas, V. C. **O processo de interação de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* com *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* e a importância do lipofosfoglicano (LPG).** Tese de doutorado, Fiocruz, 2010.

Gallota, A. L. Q. A.; Boaventura, M. A. D. **Constituintes químicos da raiz e do talo da folha do açaí (*Euterpe precatoria*, Mart., Arecaceae).** *Química Nova*, 28: 610-613, 2005.

García, D.; Escalante, M.; Delgado, R.; Ubeira, F. M.; Leiro, J. **Anthelmintic and anti-allergic activities of *Mangifera indica* L. stem bark components vimang and mangiferin.** *Phytotherapy Research*, 17: 1203–1208, 2003.

Gil, E. S.; Paula, J.R; Nascimento, F.R.F; Bezerra, J.C.B. **Produtos naturais com potencial leishmanicida.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 29 (3), 223-230, 2008.

Gomes, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral de mutagênica in vitro de produtos naturais.** *Dissertação de mestrado.* Universidade Estadual Paulista, 2008.

Gontijo, B.; Carvalho M. R. L. **Leishmaniose tegumentar americana.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80, 2003.

Goulart, M. O. F.; Sant'ana, A. E. G.; Lima, R. A.; Calvacante, S. **Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elleptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos jatrofolanos A e B.** *Química Nova*, 16(2): 95-100, 1993.

Guerra, M. R.; Gallo, C. V. M.; Mendonça, G. A. S. **Riscos de câncer no Brasil: tendências e estudos epistemiológicos mais recentes.** *Revista Brasileira de Canceriologia*, 51 (3): 227-234, 2005.

Gutiérrez, R. M. P. **Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology.** *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(8): 592-638, 2010.

Guo, X.Y.; Wang, J.; Wang, N.L.; Kitanaka, S.; Liu, H.W.; Yao, X.S. **New stilbenoids from *Pholidota yunnanensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54(1): 21-25, 2006.

Haragushi, S. K.; **Síntese e avaliação anti-Tripanossoma e citotóxica de benzaldeído-tiossemicarbonas derivadas do ácido caurenóico.** Dissertação de mestrado, 2008.

Hwang, J. S.; Lee, S. A.; Hong, S. S.; Han, X. H.; Lee, C.; Kang, S. J.; Lee, D.; Kim, Y.; Hong, J. T.; Lee, M. K.; Hwang. **Phenanthrenes from *Dendrobium nobile* and their inhibition of the LPS-induced production of nitric oxide in macrophage RAW 264.7 cells.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 3785–3787, 2010.

INCA, **Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional**, Instituto Nacional do Câncer, 4: 2010.

INCA, **ABC do câncer – Abordagens para o controle do câncer**. Instituto Nacional do Câncer, 2011.

Ivanova A.; Mikhova, B.; Kostova, I.; Evstatieva L.; **Bioactive chemical constituents from *Smilax excelsa***. *Chemistry of Natural Compounds* 46(2): 294-297, 2010.

Jagetia, G. C.; Baliga, M. S. **Radioprotection by mangiferin in DBAxC<sub>57</sub>L mice: a preliminary study**. *Phytomedicine*, 12: 209-215, 2005.

Juneja, R. K.; Sharma, S. C.; Tandon, J. S.; **Two substituted bibenzyls and a dihydrophenanthrene from *Cymbidium aloifolium***. *Phytochemistry*, 26(4): 1123-1125, 1987.

Kanegusuku, M. **Estudo fitoquímico e biológico de duas espécies do gênero *Rubus* encontradas na flora catarinense**. Dissertação de mestrado, Univale, 2006.

Koehler, S. **Relações filogenéticas e diversificação no complexo '*Maxillaria madida*' (Maxillariinae: Orchidaceae)**. Tese de doutorado, Unicamp, 2007.

Lee, J. H.; Lee J. Y.; Park J. H.; Jung H. S.; Kim J. S.; Kang S. S.; Kim, Y. S.; Han, Y. **Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice**. *Vaccine*, 25(19): 3834-3840, 2007.

Lee, S.Y.; Choi, S. U.; Lee, J. H.; Lee D. U.; Lee K. R. **A new phenylpropane glycoside from the rhizome of *Sparganium stoloniferum***. *Archives of Pharmacal Research*, 33(4): 515-521, 2010.

Leiro, J.; Arranz, J. A.; Yáñez, M.; Ubeira, F. M.; Sanmartín, M. L.; Orallo, F. **Expression profiles of genes involved in the mouse nuclear factor-kappa B signal transduction**

**pathway are modulated by mangiferin.** *International Immunopharmacology*, 4(6): 763–778, 2004.

Majumder, P. L.; Kar, A. **Erianol, a 4-methylsterol from the orchid *Eria convallarioides*.** *Phytochemistry*, 28(5):1487-1490, 1989.

Maruganandan, S.; Gupta, S.; Kataria, M.; Lal, J.; Gupta, P.K. **Mangiferin protects the streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats.** *Toxicology*, 176(3): 165-173, 2002.

Maruganandan, S.; Gupta, S.; Kataria, M.; Lal, J.; Gupta, P.K. **Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats.** *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3): 497–501, 2005.

Matida, A. K.; Rossi, M. H.; Blumenthal, E. E. A.; Schuquel, I. T. A.; Malheiros, A.; Vidotti, G. J. **3-O- $\beta$ -glucopyranosilsterol in species of Labitae, Verbenaceae and Apocynaceae,** *Anais Associação Brasileira de Química*, vol. 45, 147-151, 1996.

Menini Neto, L.; Alves, R. J. V.; Barros, F.; Forzza, R. C. **Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, MG, Brasil.** *Acta Botanica Brasílica*, 21: 687-696, 2007.

Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005.

Melo, J. G.; Santos, A. G.; Amorim, E. L. C.; Nascimento, S. C.; Albuquerque, U. P. **Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach,** *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, doi: 10.1155/2011/365359, 2011.

Muller, T. S.; Dewes, D.; Karsten, J.; Schuelter, A. R.; Stefanello, S.; **Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens*,** *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2): 252-254, 2007.

Mossmann, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunology Methods*, 65: 55-63, 1983.

Nakamura, C. V.; Santos, A. O.; Vendrametto, M. C.; Luize, P. S.; Dias Filho, B. P.; Cortez, D. A. G.; Ueda-Nakamura, T.; **Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C. DC.) Yunck.** *Revista Brasileira de Farmacologia*, 16(1): 61-66, 2006.

Oliveira, V. C.; Sajo, M. G. **Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae.** *Revista Brasileira de Botânica*, 22(3): 365-374, 1999.

OPAS; **Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos.** *Organização Pan-americana de Saúde*, 2009.

Owen, R.W.; Haubner, R.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. **Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes.** *Food and Chemical Toxicology*, 41(5): 703–717, 2003.

Pita, J. C. L.; **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade de trachylobano-360 de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae).** *Dissertação de mestrado.* Universidade Federal da Paraíba, 2010.

Pomini, A. M.; Santin, S. M. O.; Silva, C. C.; Faria, T. J.; Faria, R. T.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E. C.; Dela Porte, L. F. **Bioguided identification of anticancer and antifungal substances from the South Brazilian orchid *Miltonia flavescens*.** *Planta Medica*, 78(11): 1169-1169, 2012.

Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>> Acesso em: 02 dez. 2013.

Saito, T.; Yamane, H.; Murofushi, N.; Takahashi, T.; Phinney, B. O. **4-O-caffeoylshikimic and 4-O-(p-coumaroyl)shikimic acids from the dwarf tree fern, Dicksonia Antarctica.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 61(8): 1397-1398, 1997.

Santos, M. R. A.; Lima, M. R.; Ferreira, M. G. **Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia.** *Horticultura Brasileira*, 6(2): 244-250, 2008.

Sawada, N. O.; Nicolussi, A. C.; Okino, L.; Cardozo, F. M. C.; Zago, M. M. F. Z.; **Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia.** *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 43(3): 581-587, 2009.

Shiao, Y.; Chen, W.; Lin, Y.; **New polyphenols and triterpenes from the Pseudobulbs of *Pleione formosana*.** *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56: 828-833, 2009.

Shirane, N.; Murabayashi, A., Masuko, M.; Uomori, A.; Yoshimura, Y.; Seo, S.; Uchida, K.; Takeda, K. **Effect on ergosterol biosynthesis of a fungicide, SFF-109, in *Botrytis cinerea*.** *Phytochemistry*, 29(8): 2513-2520, 1990.

Silva, J. K. M. **Levantamento epistemológico da hipertensão arterial versus conhecimentos etnobotânicos: conexão entre saúde e meio ambiente.** Dissertação de mestrado, UFT, 2011.

Silva, L. L.; Donnici, C. L.; Lopes, J. C. D.; Goulart, M. O. F.; Abreu, F. C.; Paula, F. S.; Bravo, C. E.; Santoro, M. M.; Denadai, A. M. L.; Santos, A. M. C.; Montanari, C. A.; **Investigação eletroquímica e colorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA.** *Química Nova*, 35(7): 1318-1324, 2012.

Silva, M. F. L. **Relação entre a localização celular da enzima arginase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seu papel na infecção de macrófagos murinos.** Tese de doutorado, USP, 2010.

Singer, R. B.; Koehler, S. **Toward a phylogeny of Maxillariinae orchids: multidisciplinary studies with emphasis on Brazilian species.** *Lankesteriana* 7: 57-60, 2003.



Singer, R.B.; **Orchid pollination: recent developments from Brazil.** *Lakesteriana*, 7: 111-114, 2003.

Sinha, A. K.; Verma, S. C.; Sharma, U. K. **Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*.** *Journal of Separation Science*, 30: 15–20, 2007.

Soares, J. S.; Rosa, Y. B. C. J., Suzuki, R. M.; Scalon, S. P. Q., Rosa Júnior, E. J. **Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(4): 617-623, 2012.

Soares, S.E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** *Revista de nutrição*, 15(1):71-81, 2002.

Souza, V. A.; Nakamura, C. V.; Corrêa; A. G.; **Atividade antichagásica de lignanas e neolignanas.** *Revista Virtual de Química*, 4(3): 197-207, 2012.

Stoilova, I.; Jirovetz, L.; Stoyanova, A.; Krastanov, A.; Gargova, S.; Ho, L.; **Antioxidant activity of the polyphenol mangiferin.** *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(13): 2706-2716, 2008.

Suttleworth, F. S.; Zim, H. S.; Dillon, G. W.; *Orquídeas – Guia dos Orquidófilos.* Expressão e Cultura, 3ª ed., Rio de Janeiro, 1991.

Tezuka, T.; Yoshida, Y.; Kikuchi, T.; Xu, G. J.; **Constituents of *Ephemerantha fimbriata*. Isolation and structure elucidation of two new phenanthrenes, Fimbriol-A and Fimbriol-B, and a new dihydrophenanthrene, Ephemeranthol-C.** *Pharmaceutical Society of Japan*, 41(8): 1346-1349, 1993.

Veerraju, P. Prakasa Rao, N. S; Jaganmohan Rao, L; Jagannadha Rao, K. V.; Mohana Rao, P. R. **Bibenzyls and phenanthrenoids of some species of Orchidaceae.** *Phytochemistry*, 28(11): 3031-3034, 1989.

Wang, H.; Zhao, T.; Che, C. T. **Dendrobine and 3-hydroxy-2-oxodendrobine from *Dendrobium nobile***. *Journal of Natural Products*, 48(5): 796-801, 1985.

Wang, R. R.; Gao, Y. D.; Ma, C. H.; Zhang, X. J.; Huang, C. G.; Huang, J. F.; Zheng, Y. T. **Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains**. *Molecules*, 16(5): 4264-4277, 2011.

Wang, G.; Guo, X.; Chen, H.; Lin, T.; Xu, Y.; Chen, Q.; Liu, J.; Zeng, J.; Zhang, X. K.; Yao, X. **A resveratrol analog, phoyunbene B, induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 liver cancer cells**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(5):2114-2118, 2012.

WHO, Leishmaniasis, Burden of disease. World Health Organization, Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>> Acesso em: 01 dez. 2013.

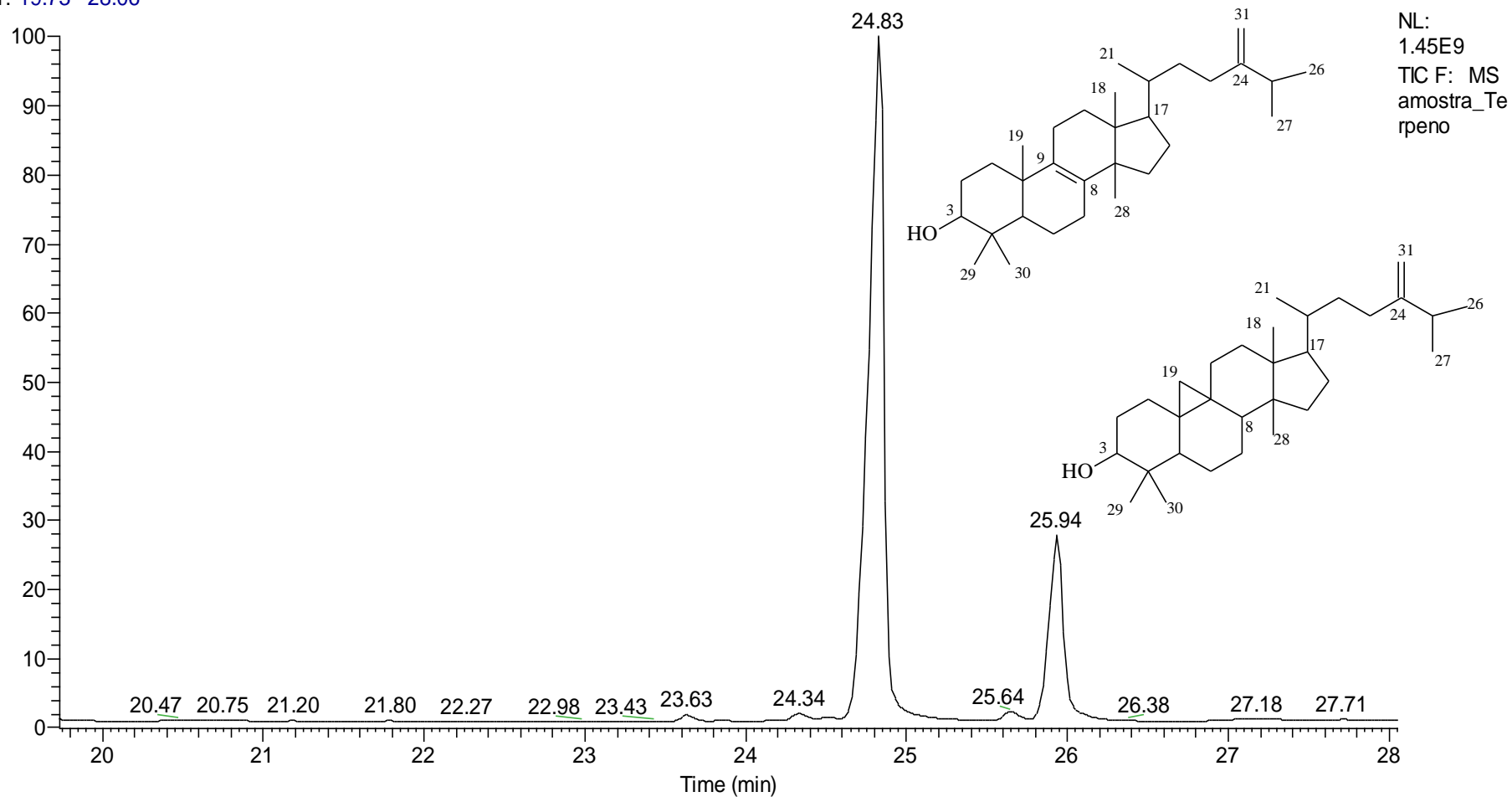
Yang, K. C.; Uen, Y. H.; Suk, F. M.; Liang, Y. C.; Wang, Y. J.; Ho, Y. S.; Li, I. H.; Lin, S. Y. **Molecular mechanisms of denbinobin-induced anti-tumorigenesis effect in colon cancer cells**. *World Journal of Gastroenterology*, 11(20): 3040-3045, 2005.

Yang, H.; Sung, S.H.; Kim, Y.C. **Antifibrotic phenanthrenes of *Dendrobium nobile* stems**. *Journal of Natural Products*, 70(12): 1925-1929, 2007.

Yoshimi, N.; Matsunaga, K.; Katayama, M.; Yamada, Y.; Kuno, T.; Qiao, Z.; Hara, A.; Yamahara, J.; Mori, H. **The inhibitory effects of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone, in bowel carcinogenesis of male F344 rats**. *Cancer Letters*, 163, 703–717, 2001.

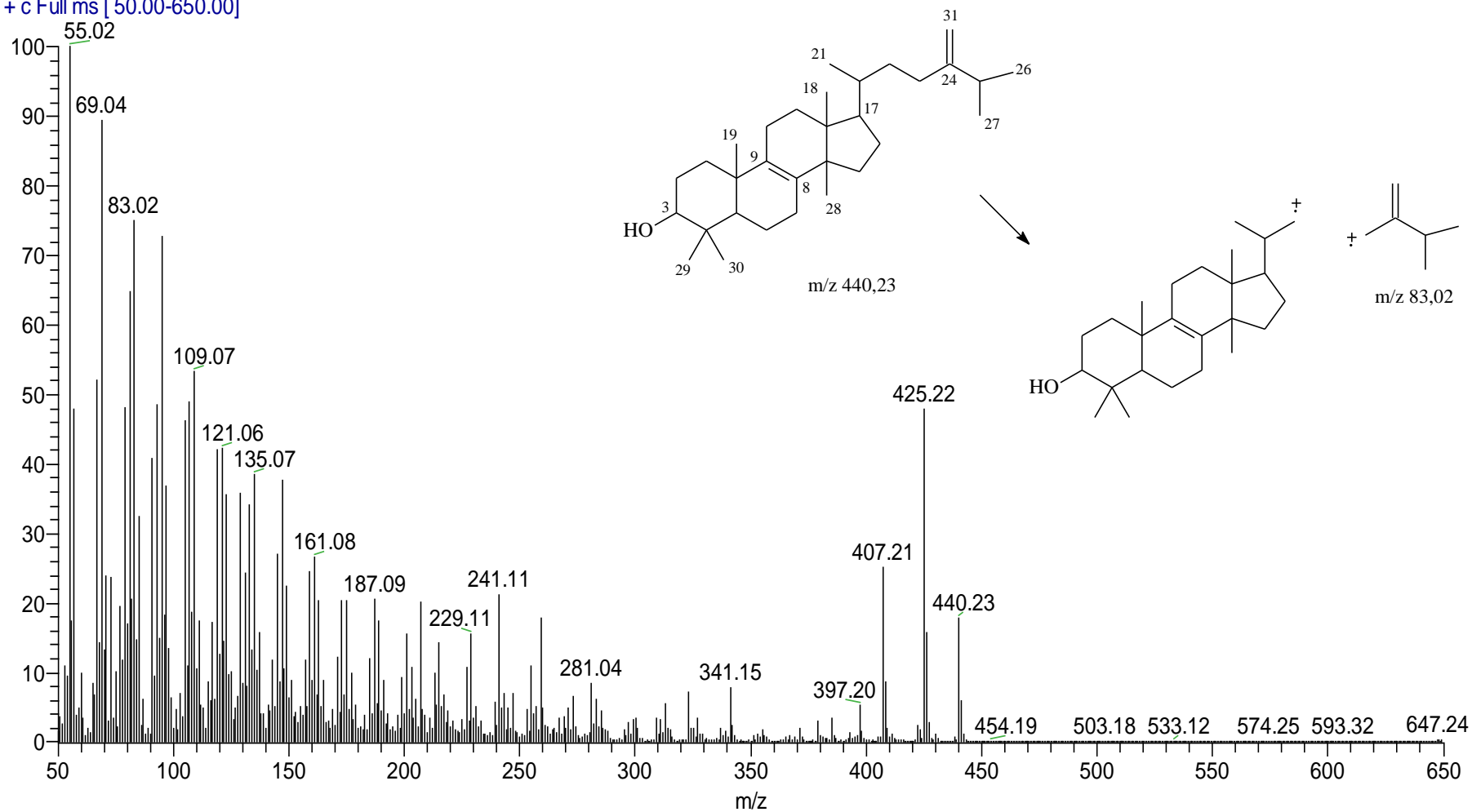
# ANEXOS

RT: 19.73 - 28.06

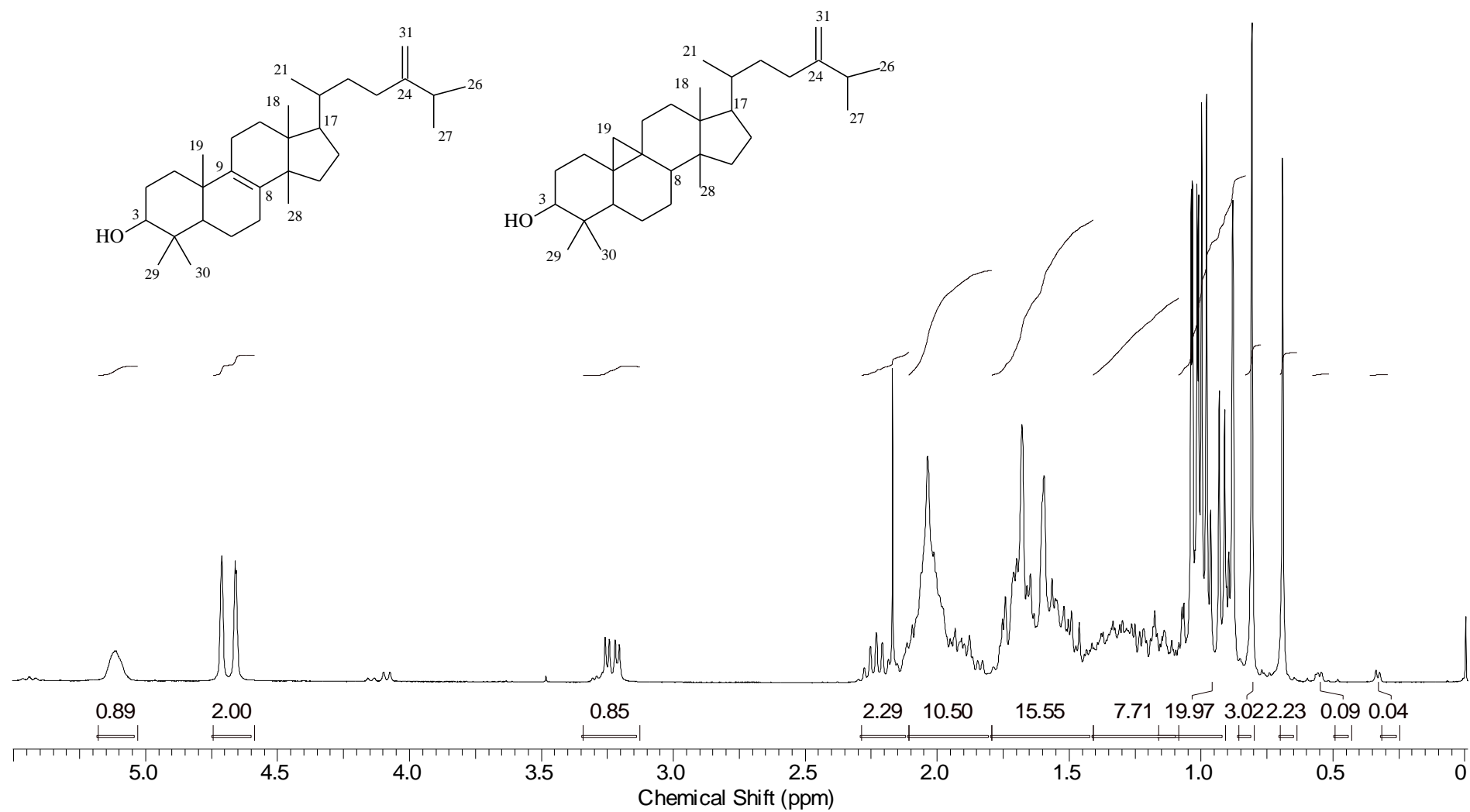


**Figura 1:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura **M1+M2**

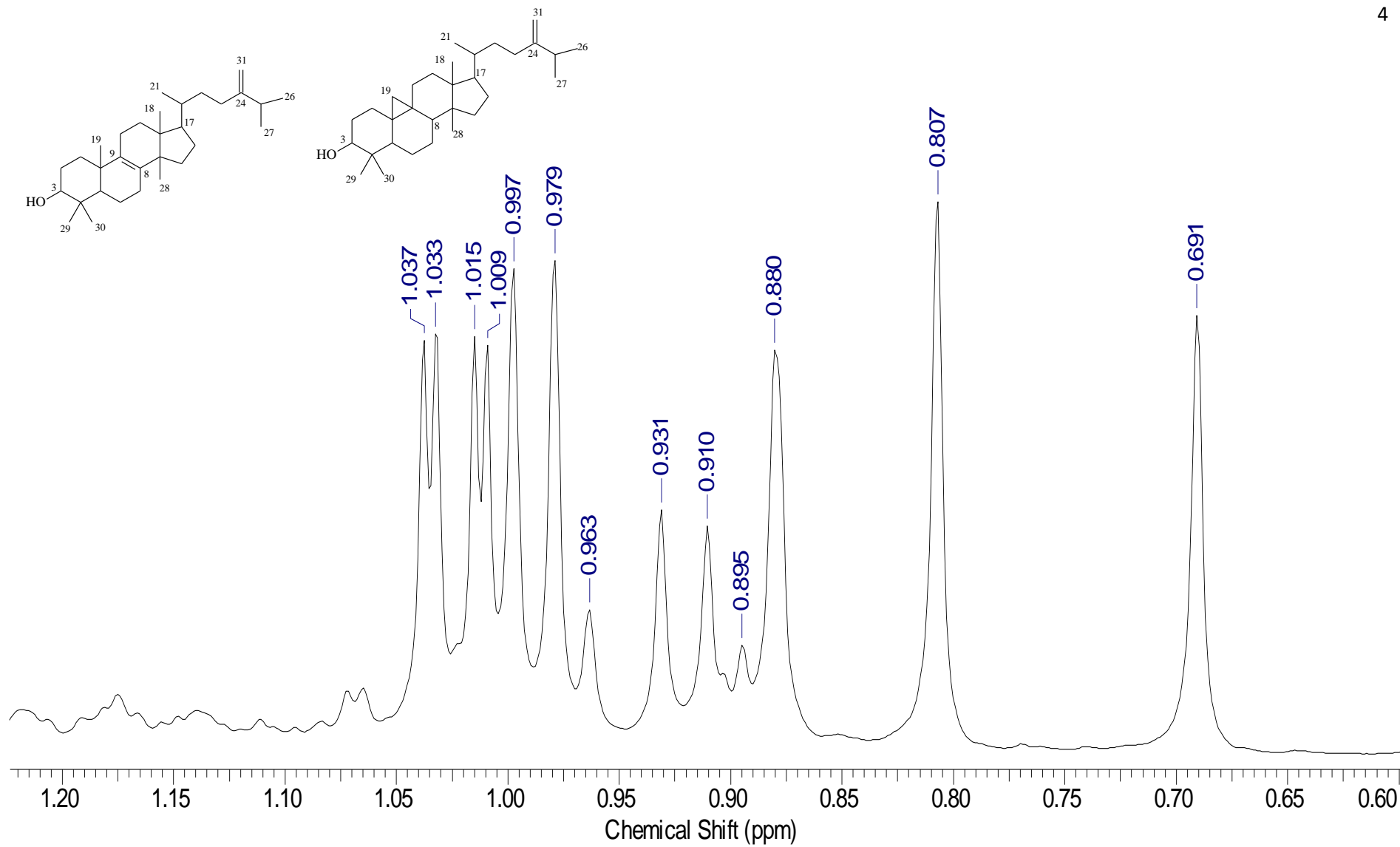
amostra\_Terpeno #613-1253 RT: 17.00-30.27 AV: 641 NL: 1.09E6  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]



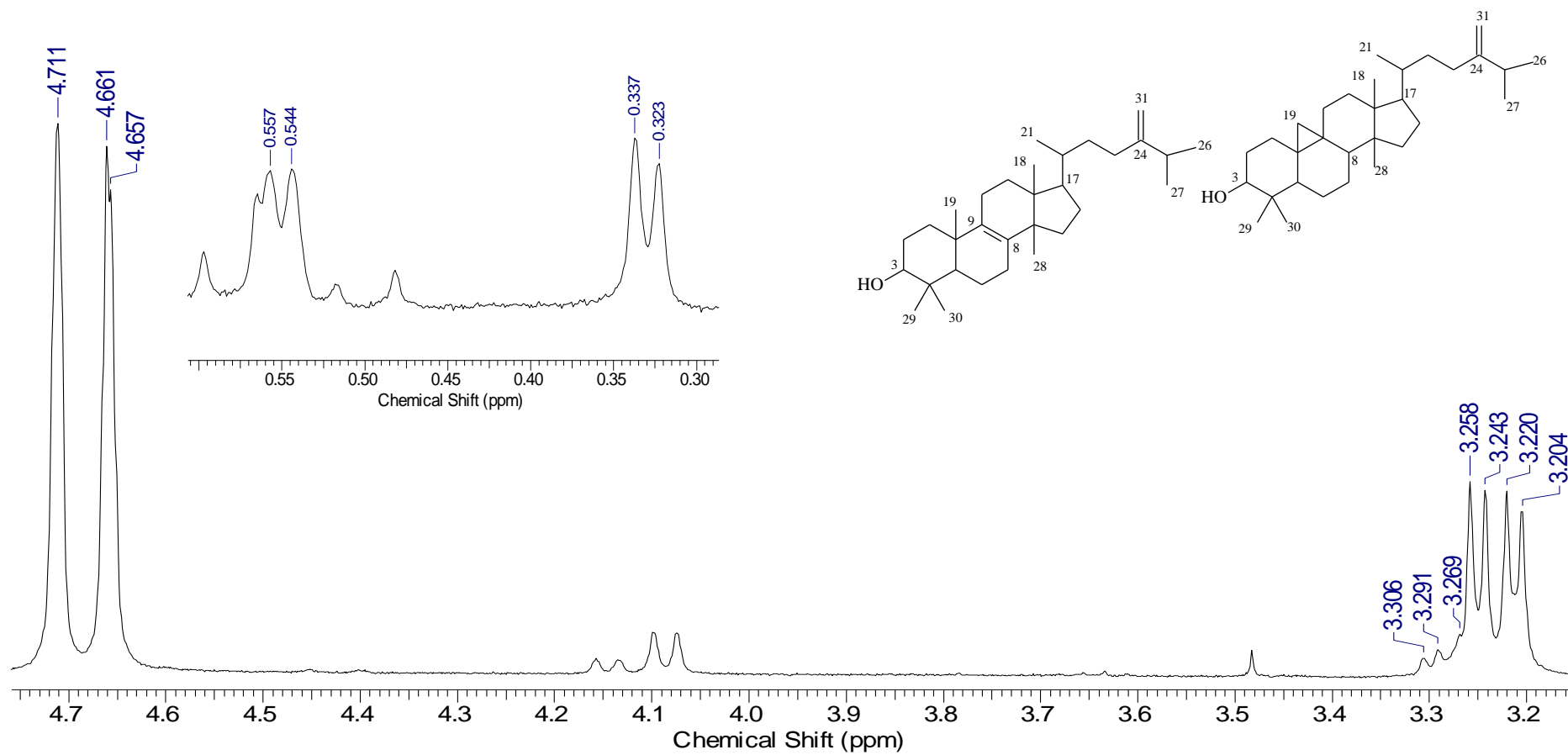
**Figura 2:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância **M1**.



**Figura 3:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M1+M2**.

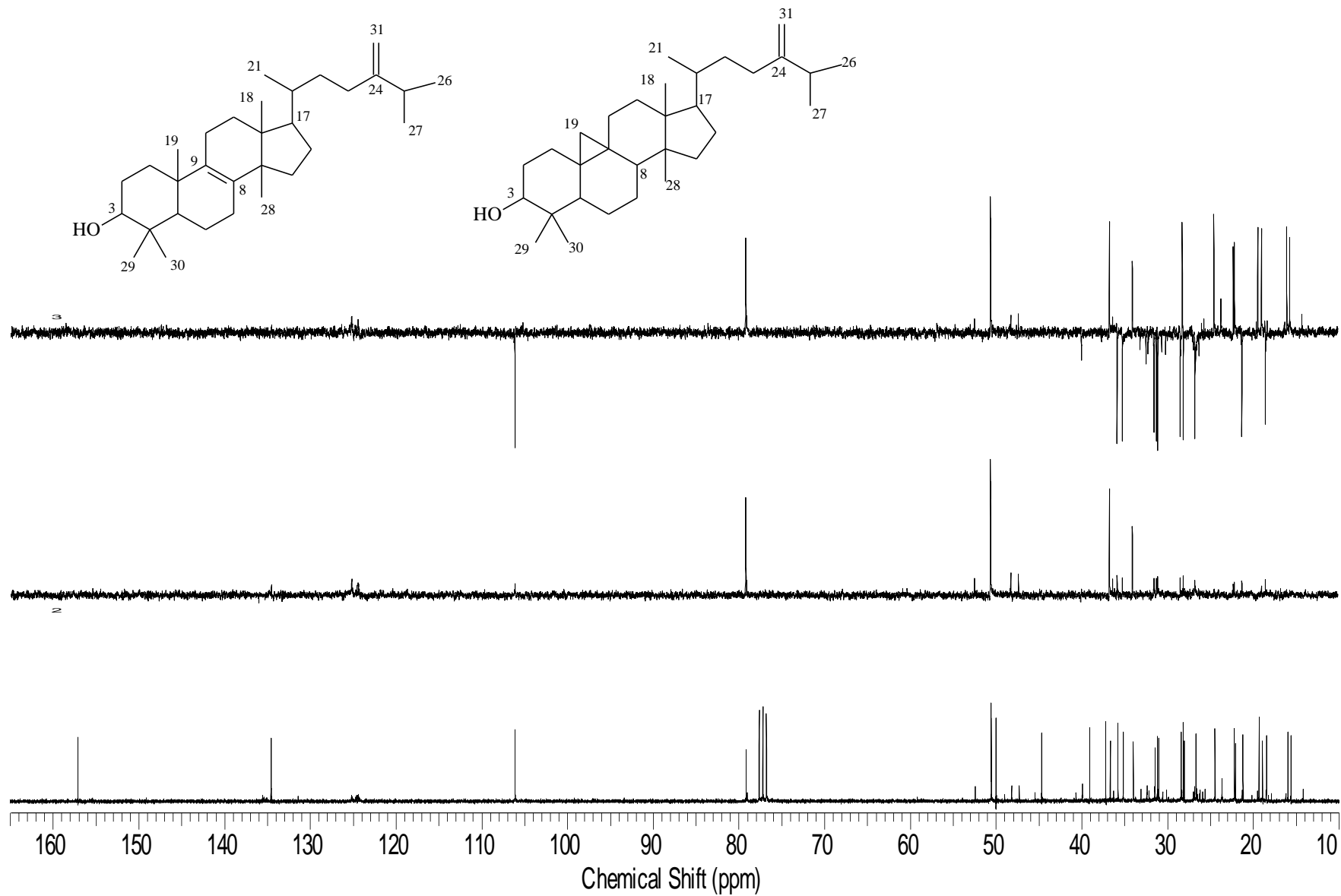


**Figura 4:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M1+M2**.

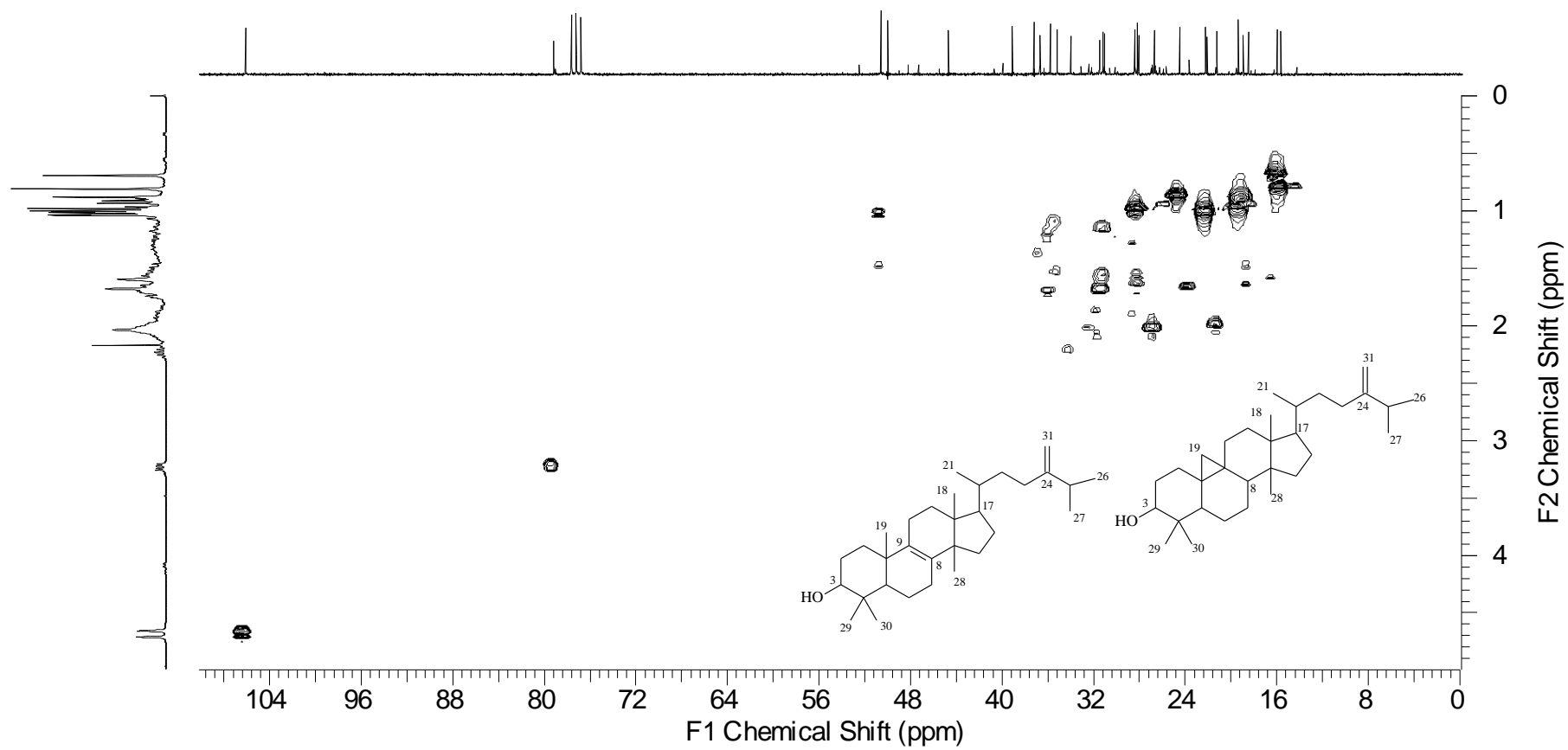


**Figura 5:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de M1+M2.

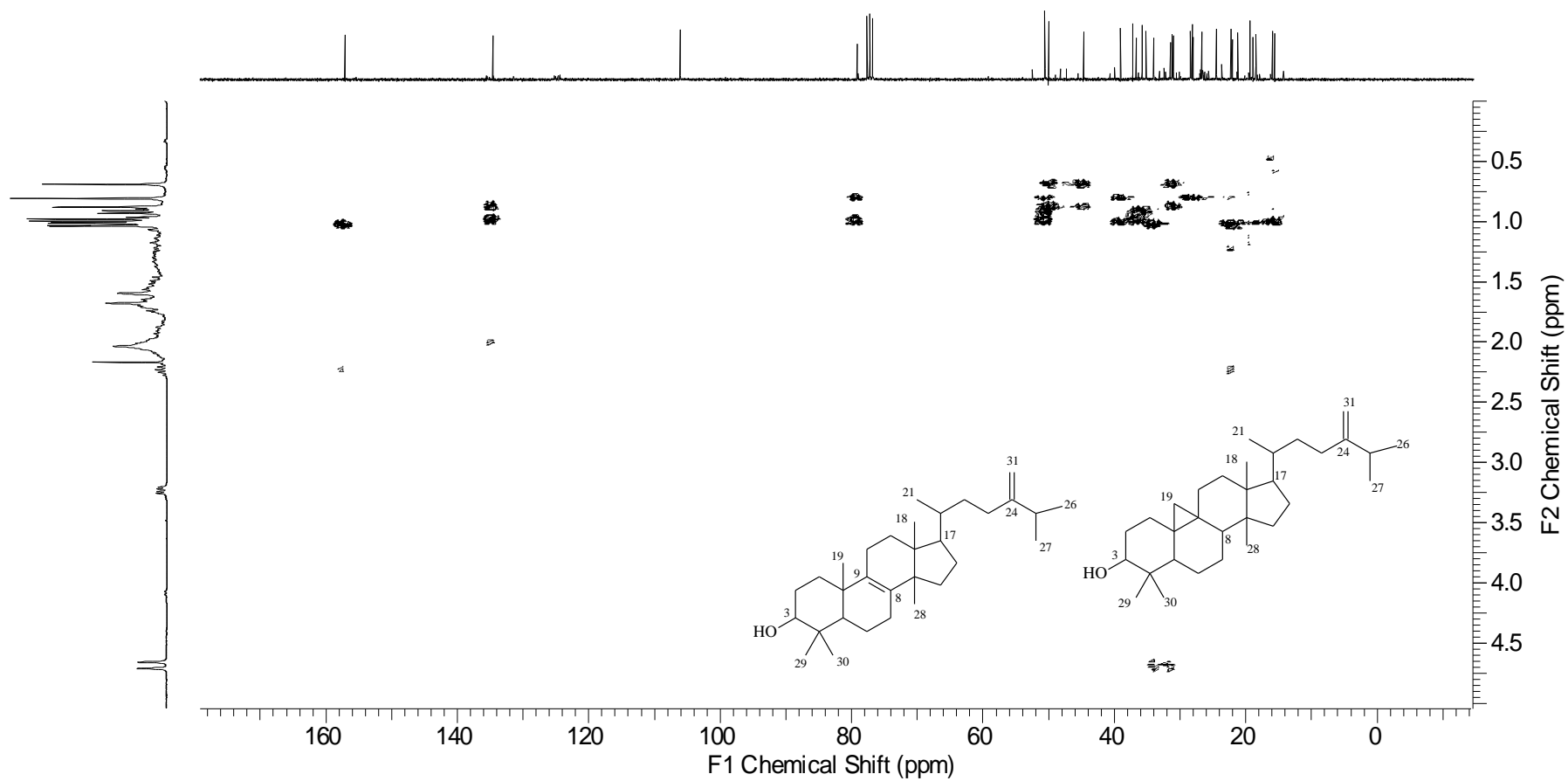




**Figura 6:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 90° e 135° ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,45MHz) de **M1+M2**.

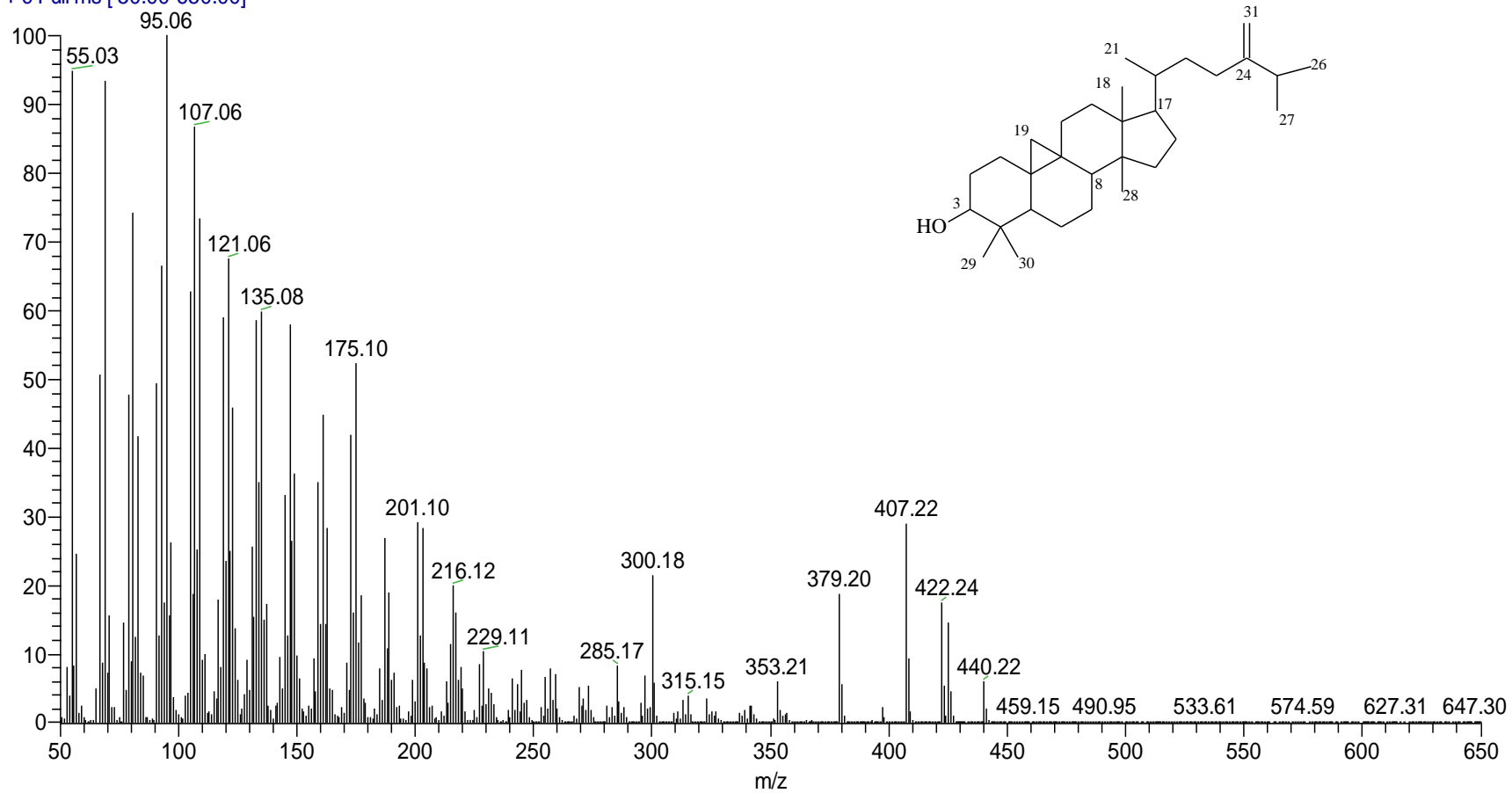


**Figura 7:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para M1+M2.



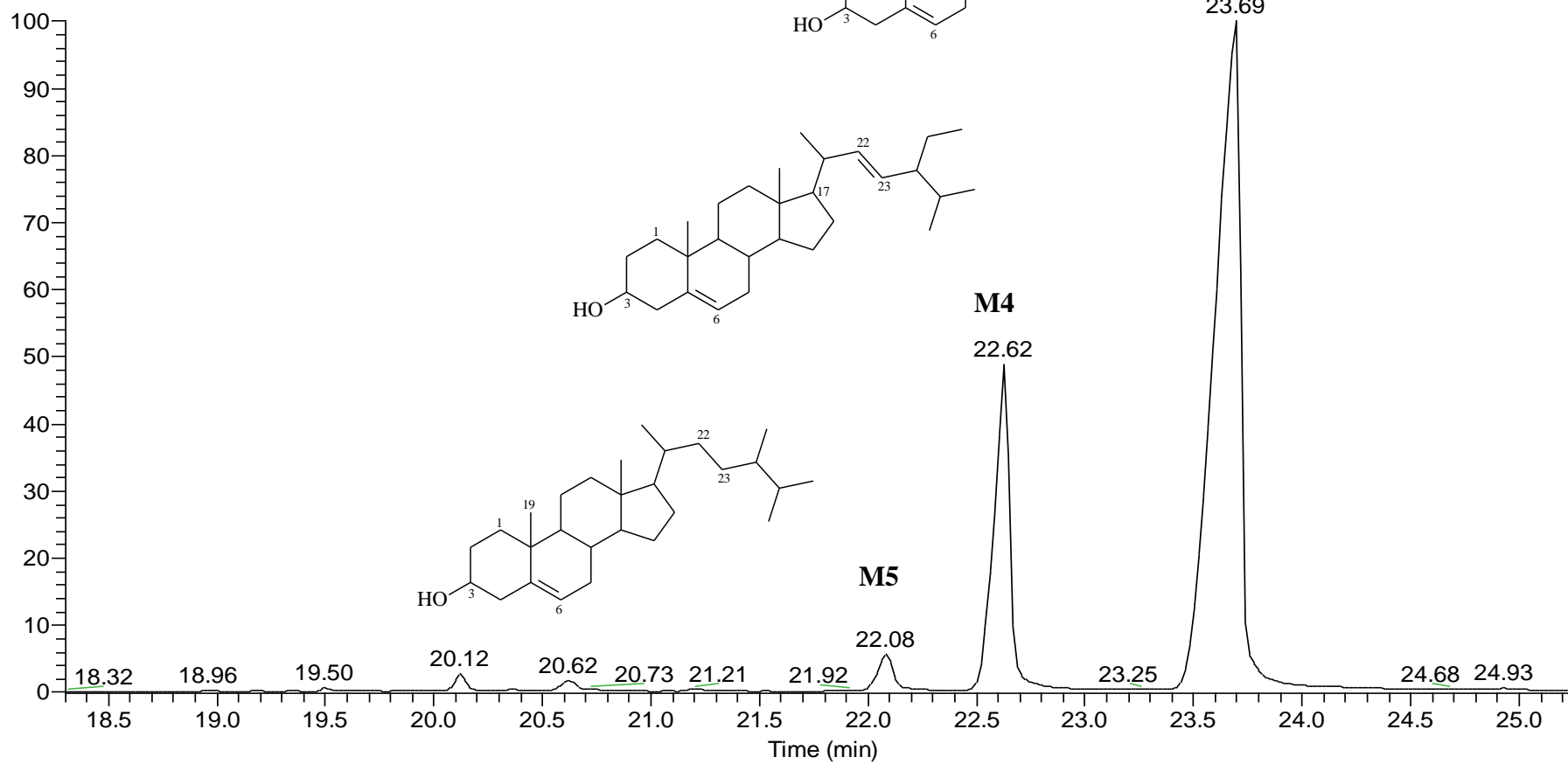
**Figura 8:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M1+M2**.

amostra\_Terpeno #1043 RT: 25.94 AV: 1 NL: 1.41E7  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]



**Figura 9:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância **M2**.

RT: 18.30 - 25.29



NL:  
3.62E9  
TIC F: MS  
amostra\_M  
PH\_7

**Figura 10:** Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura **M3+M4+M5**.

amostra\_MPH\_7 #902 RT: 23.67 AV: 1 NL: 8.45E7  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]

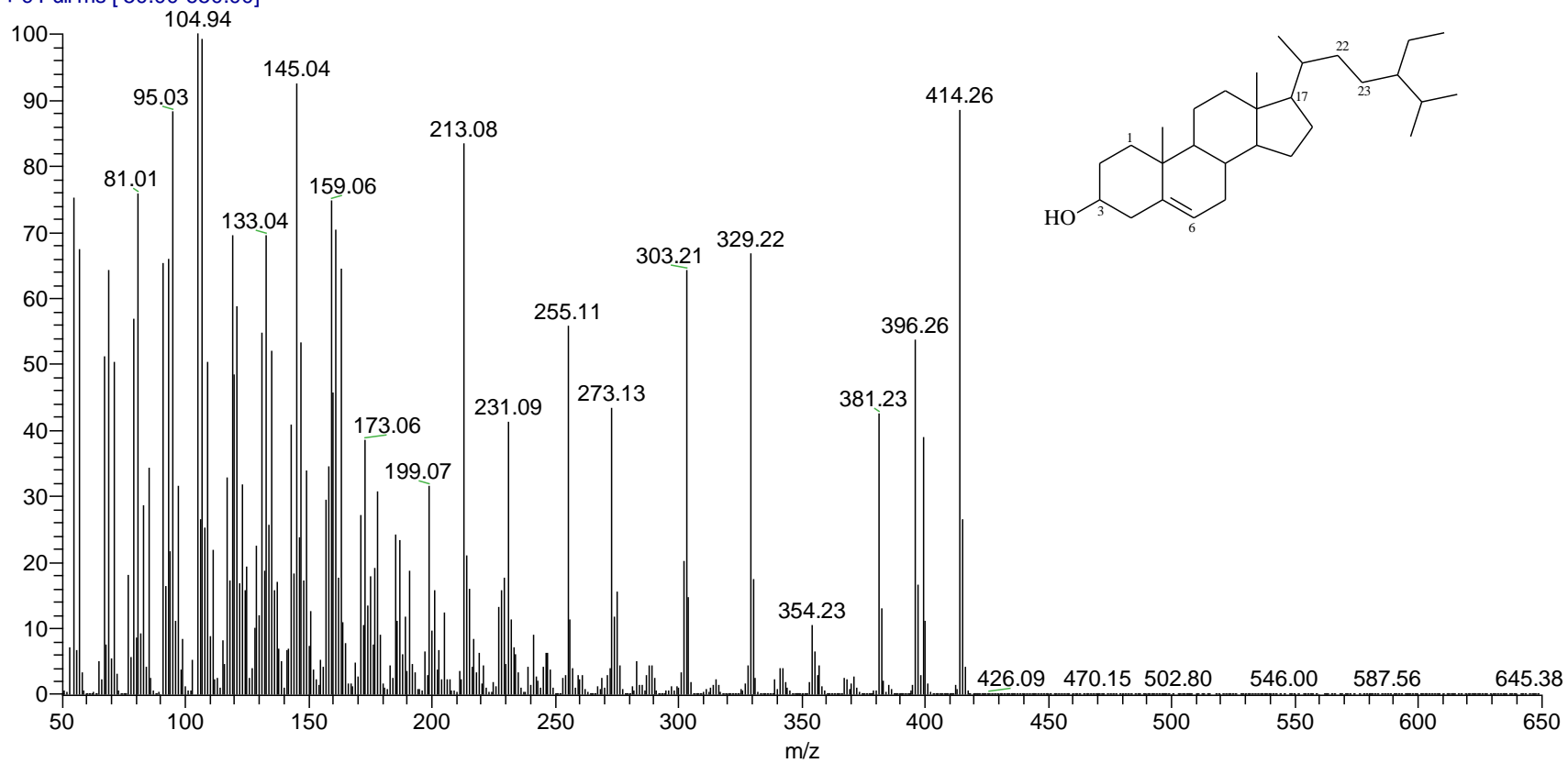


Figura 11: Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância M3.

amostra\_MPH\_7 #850 RT: 22.58 AV: 1 NL: 3.64E7  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]

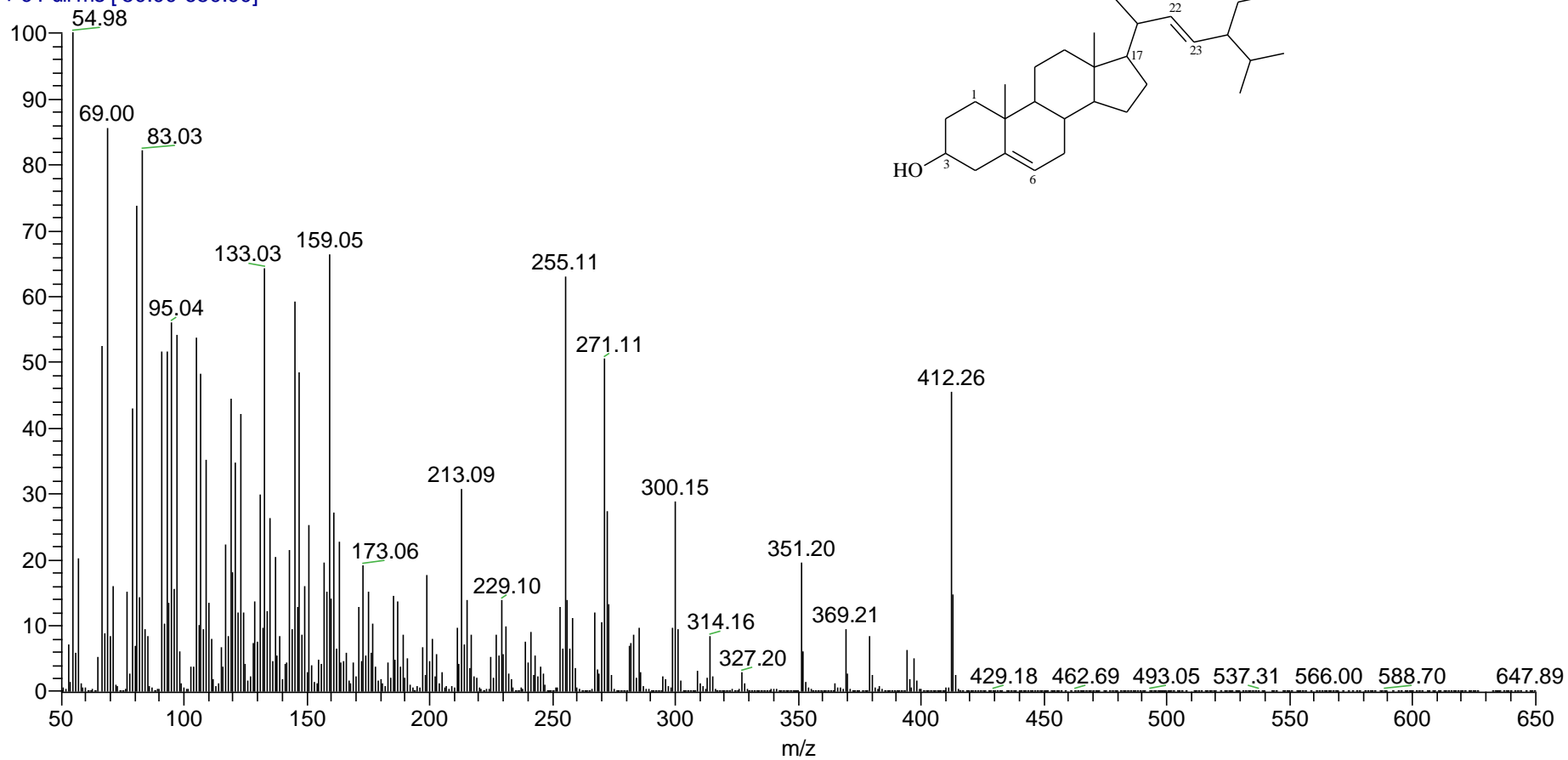


Figura 12: Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância M4.

amostra MPH\_7 #826 RT: 22.08 AV: 1 NL: 5.46E6  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]

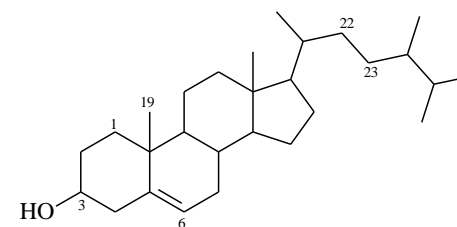
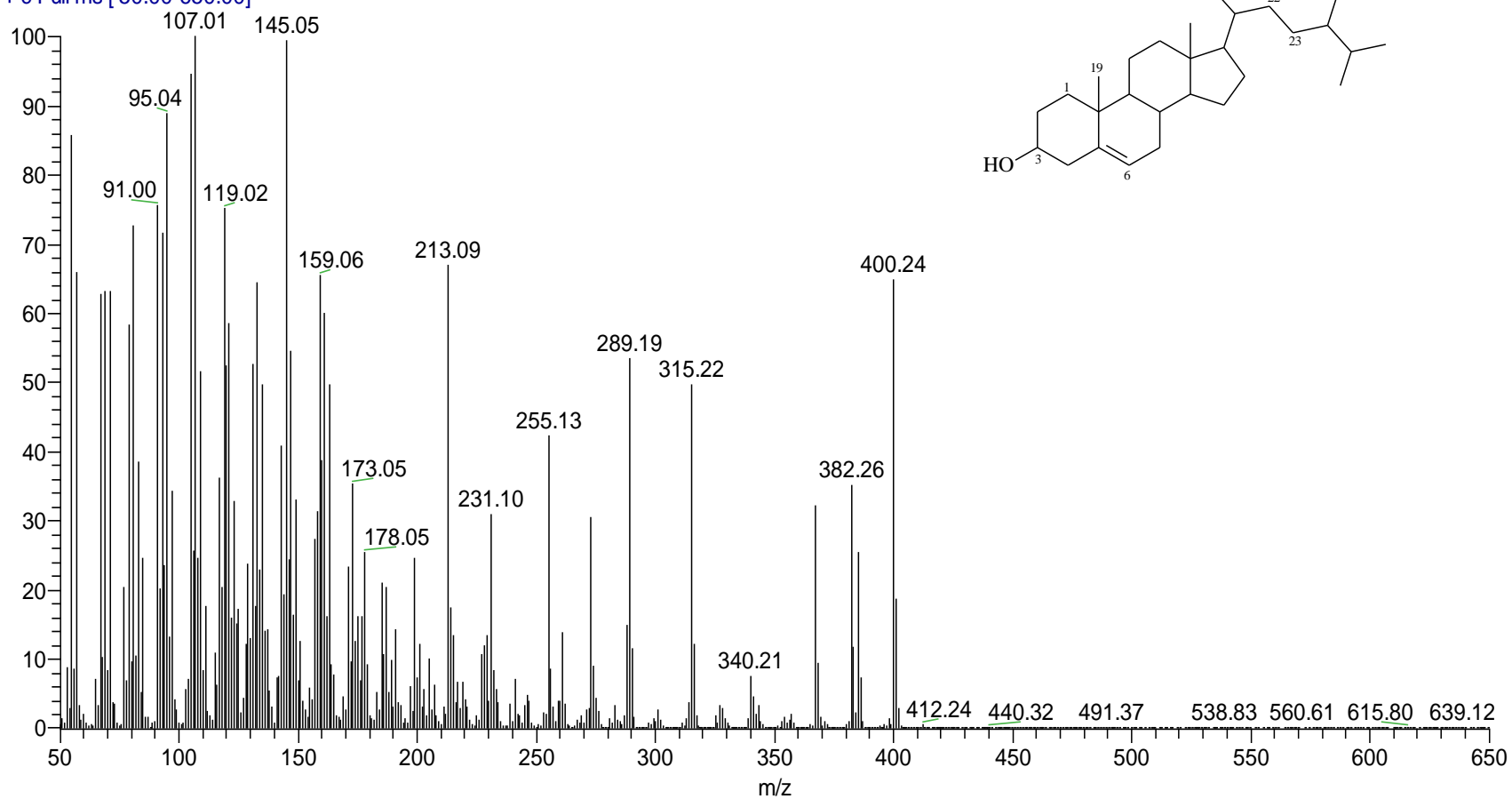
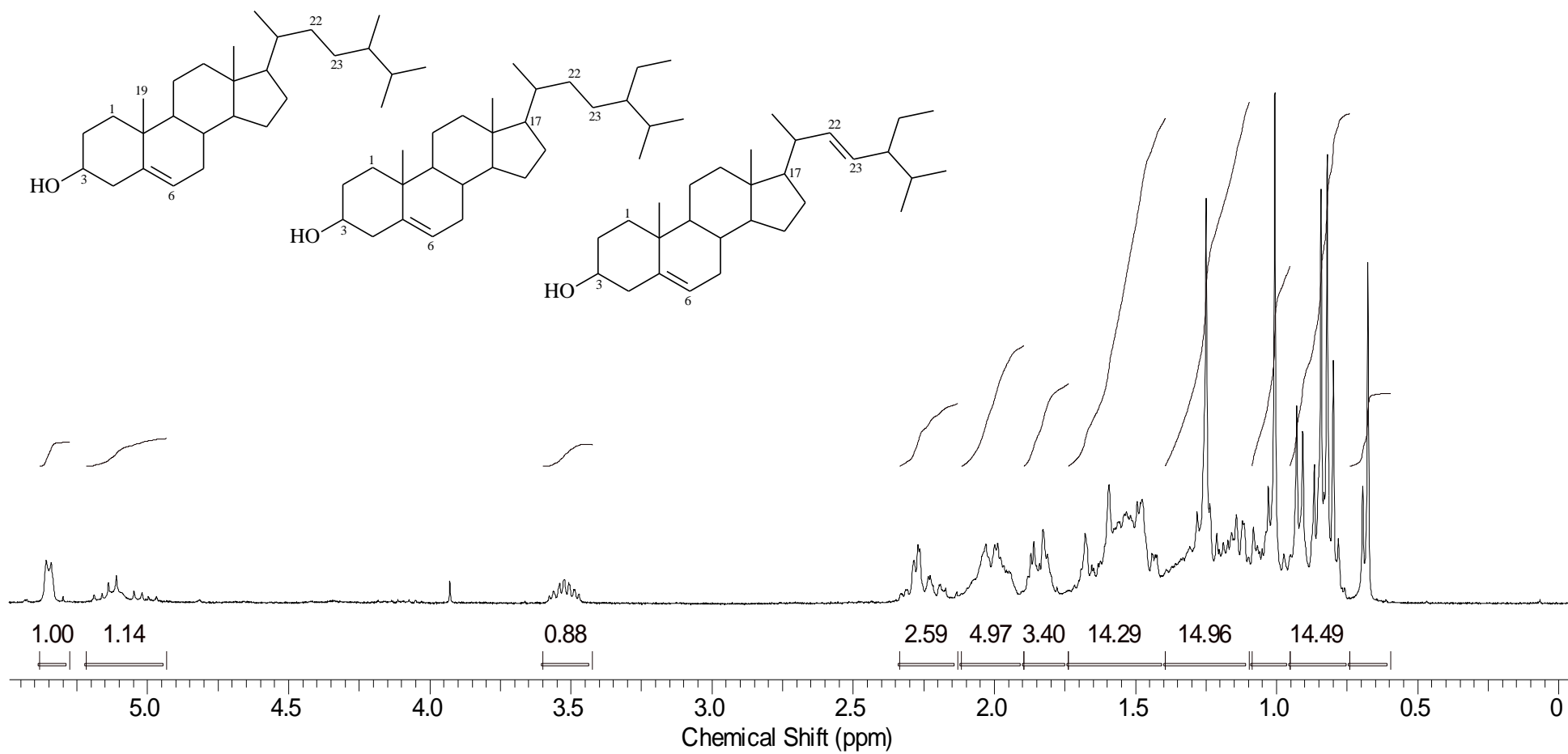
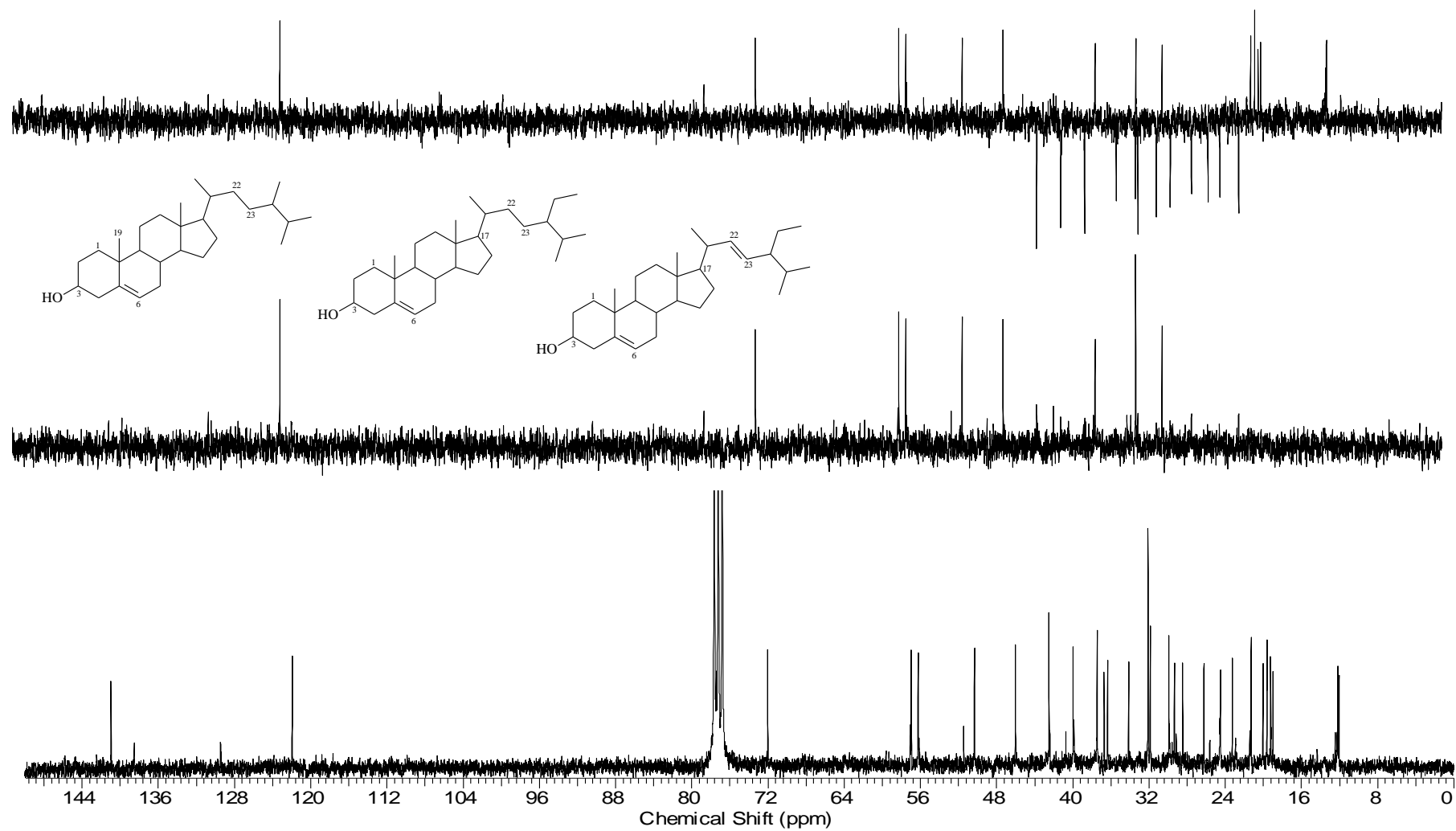


Figura 13: Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) da substância M5.





**Figura 14:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M3+M4+M5**.



**Figura 15:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT 90° e 135° ( $\text{CDCl}_3$ ; 75,45MHz) de M3+M4+M5.

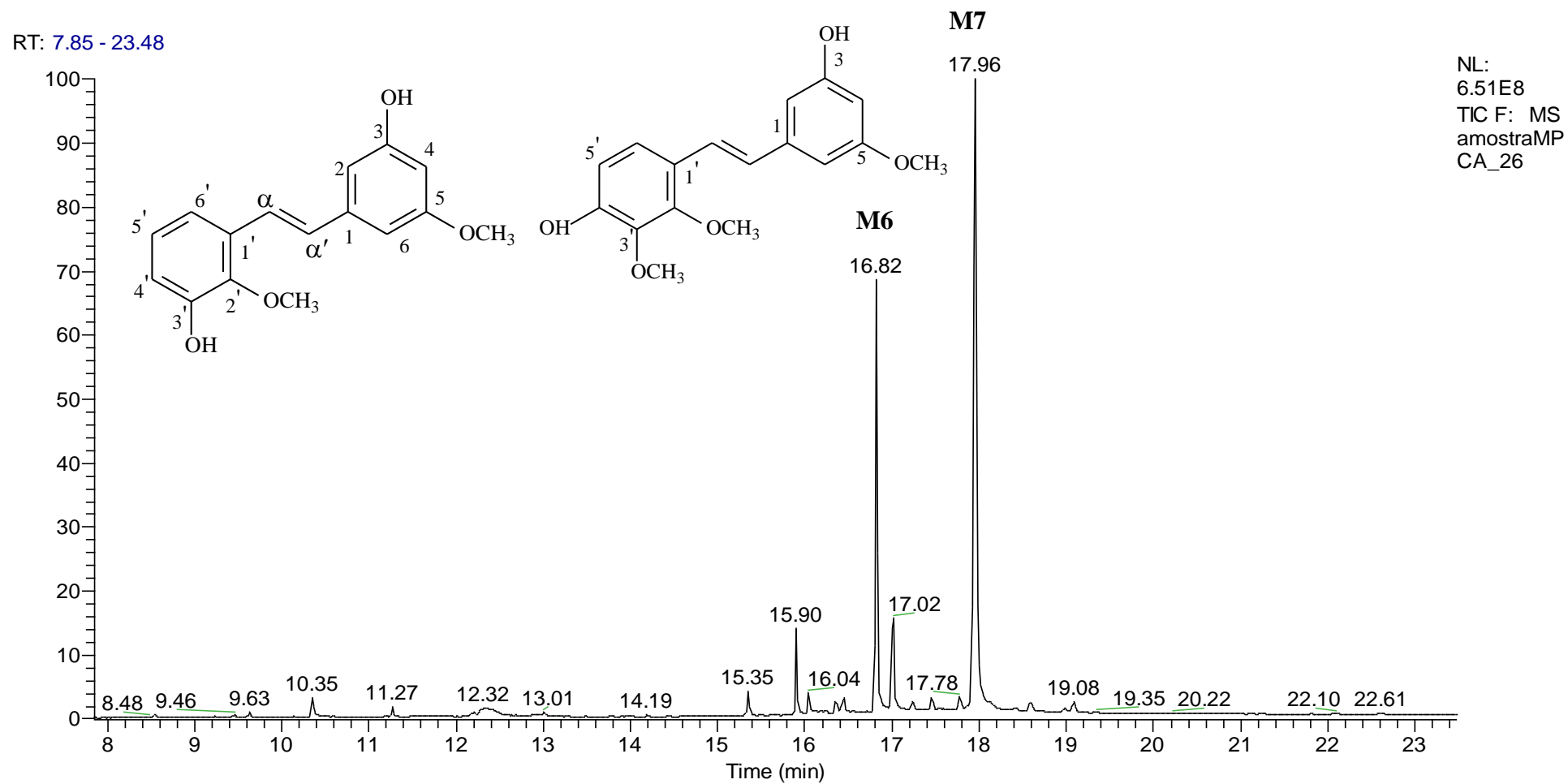


Figura 16: Cromatograma obtido na análise por CG-EM para a mistura M6+M7.

amostraMPCA\_26 #625 RT: 16.80 AV: 1 NL: 5.97E6  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]

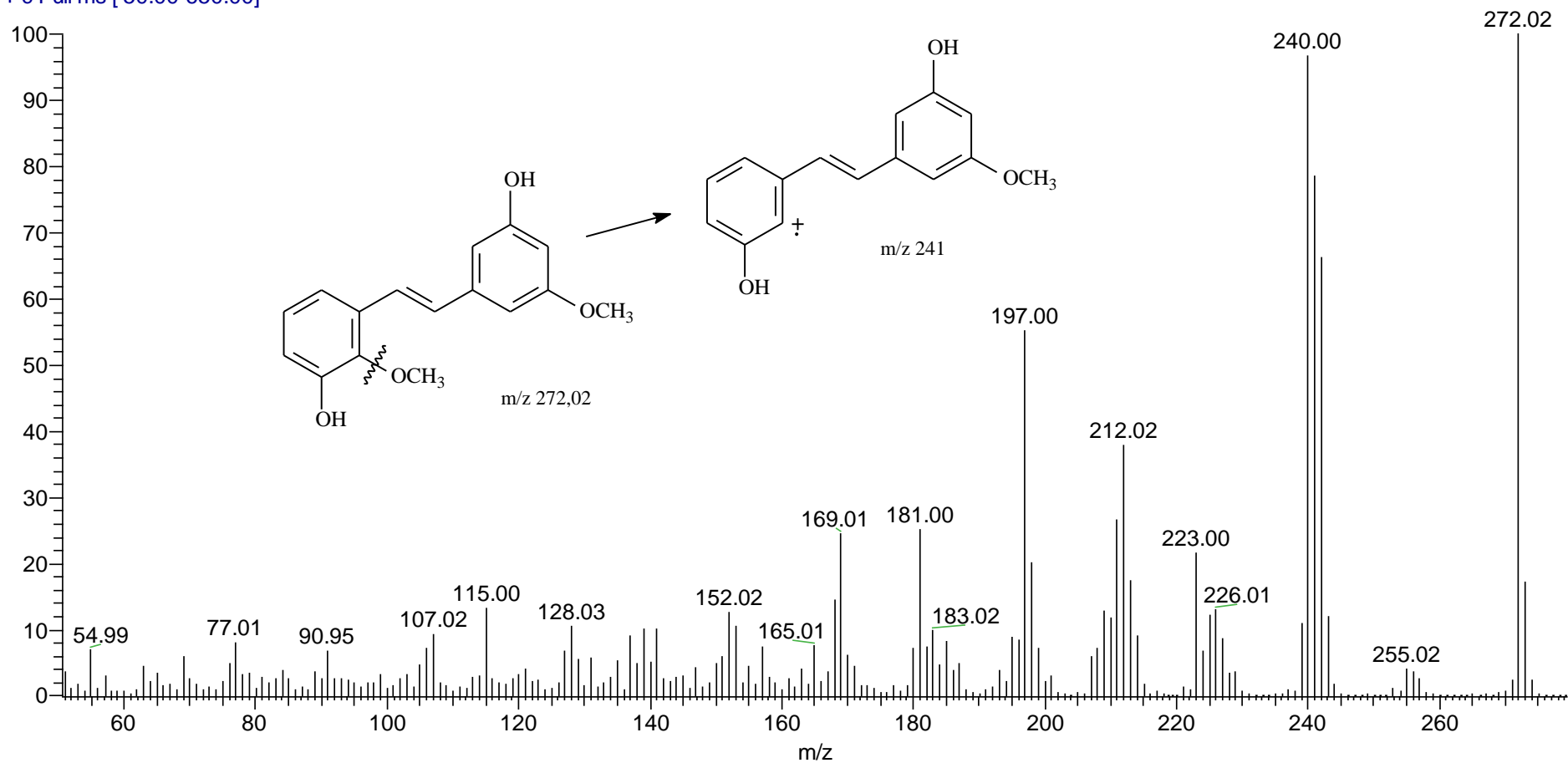
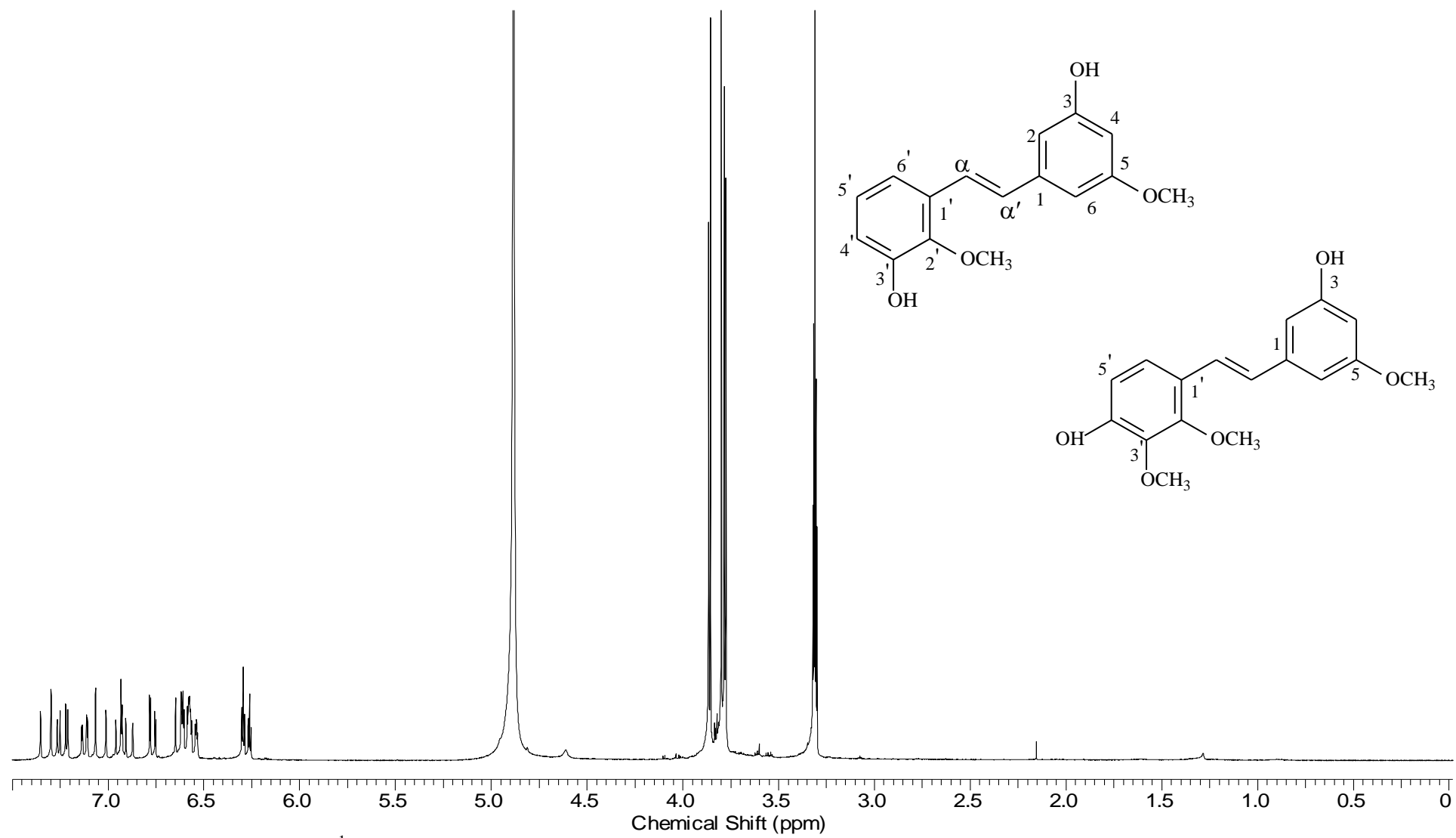
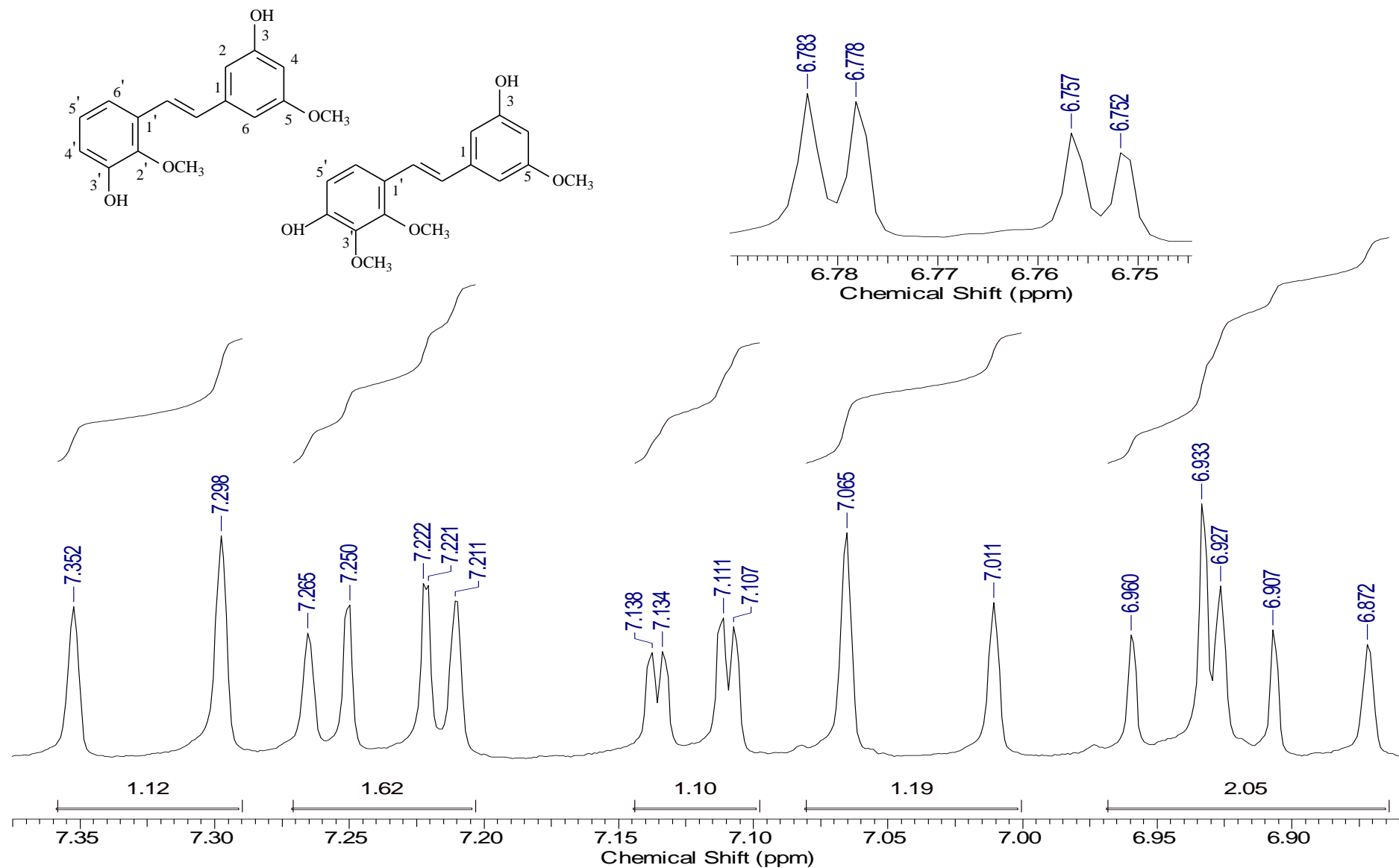


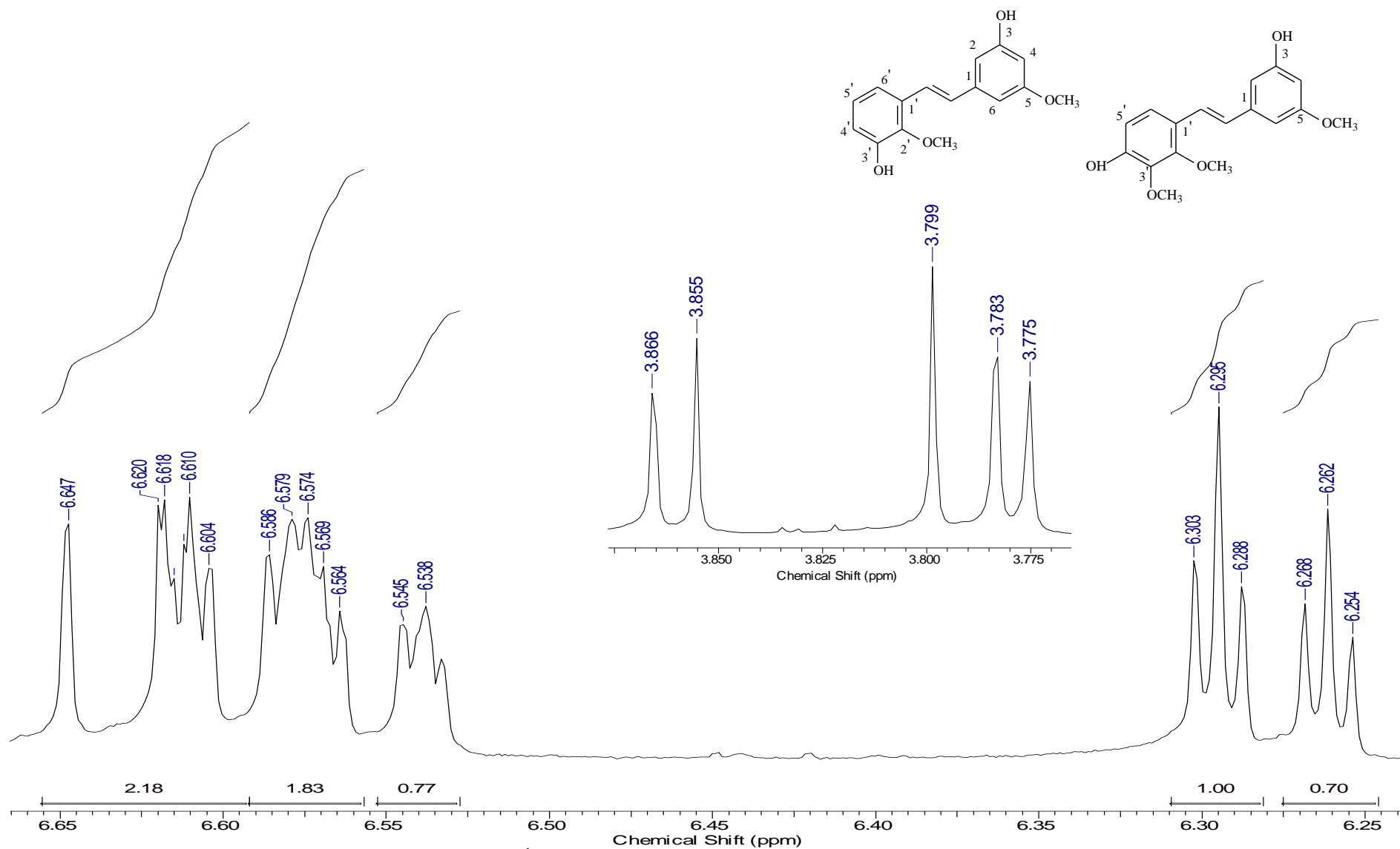
Figura 17: Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de M6.



**Figura 18:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06MHz) de **M6+M7**.



**Figura 19:** Expansão dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (CD<sub>3</sub>OD; 300,06MHz) de M6+M7.



**Figura 20:** Expansão dos sinais do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06MHz) de M6+M7.

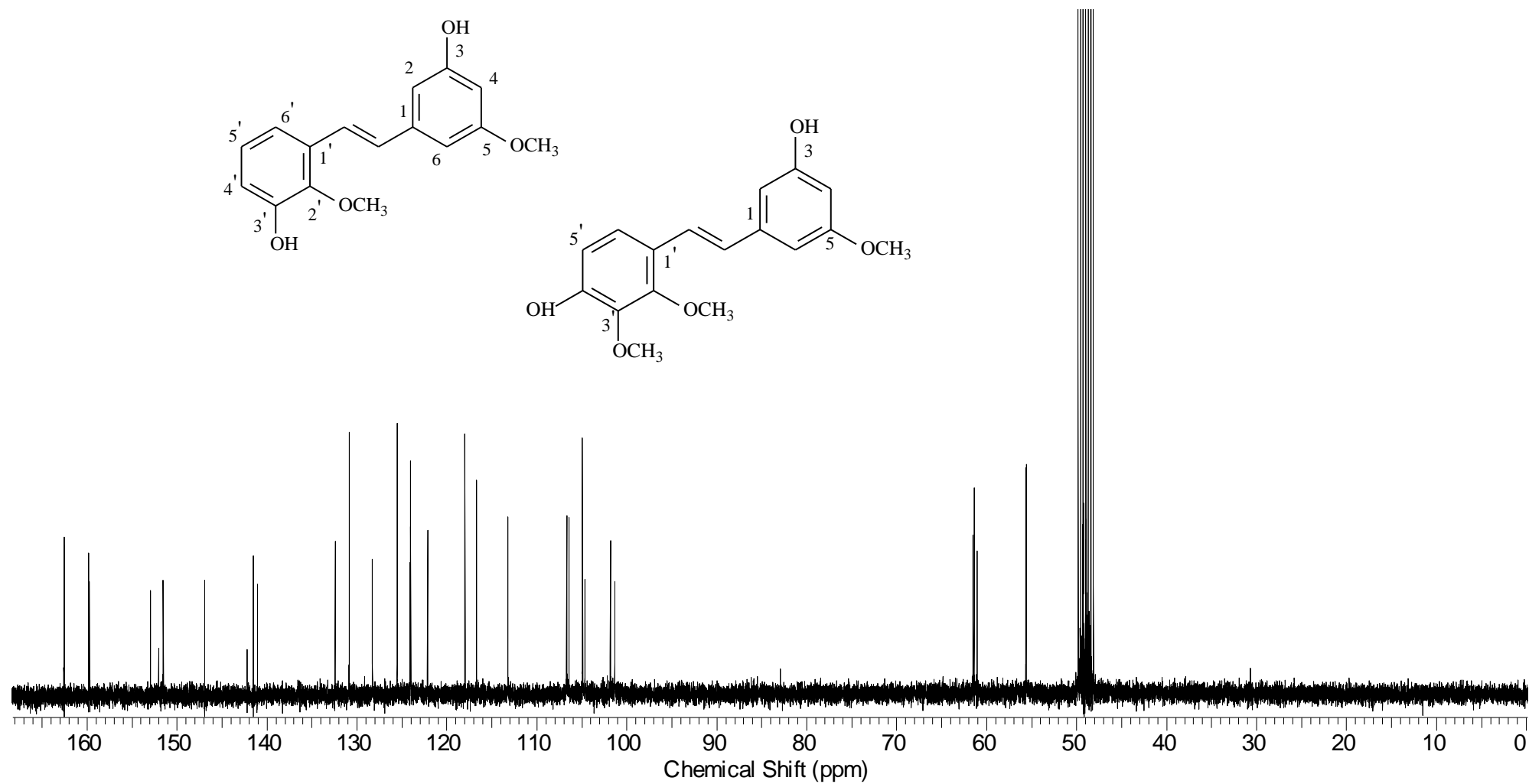
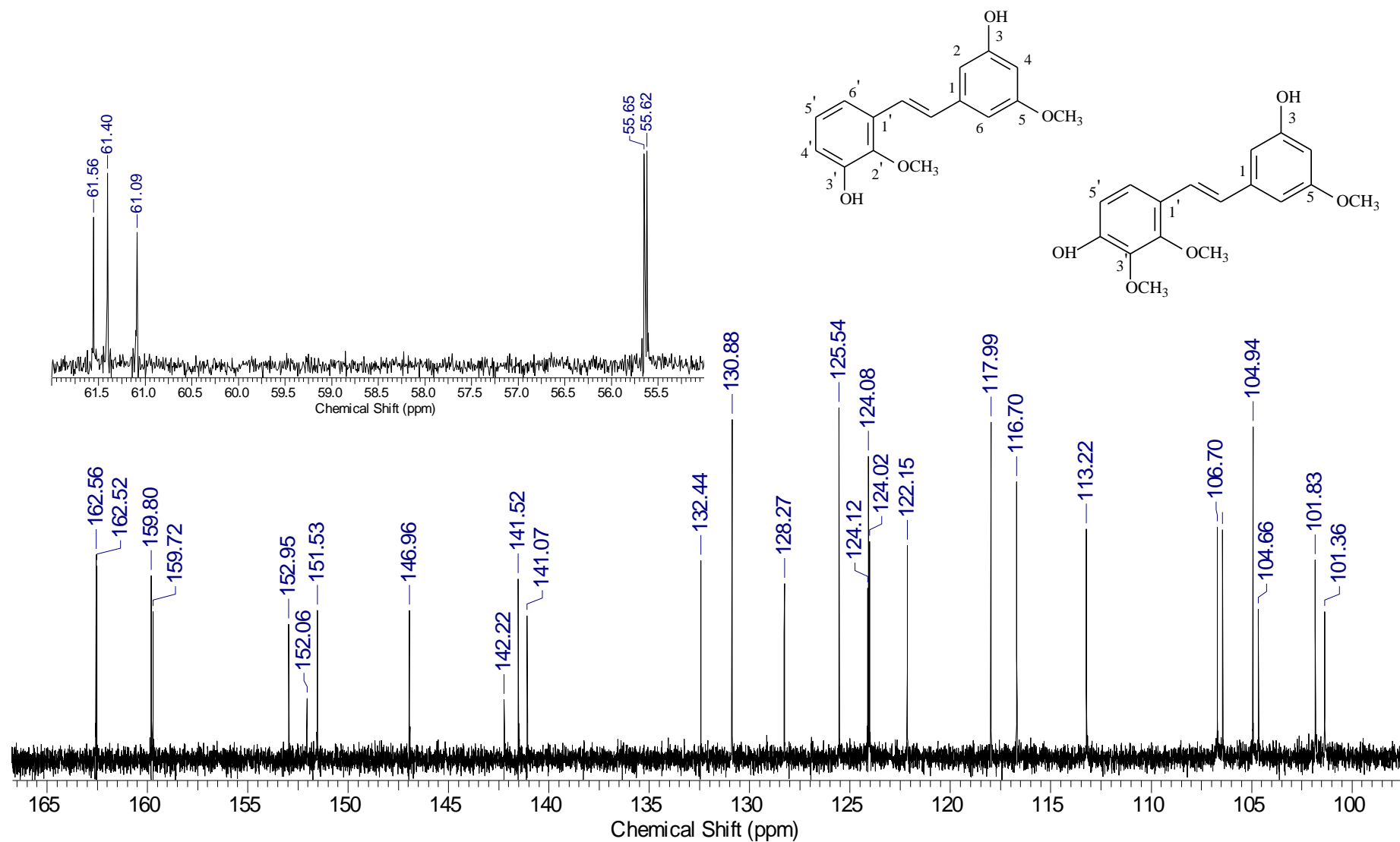
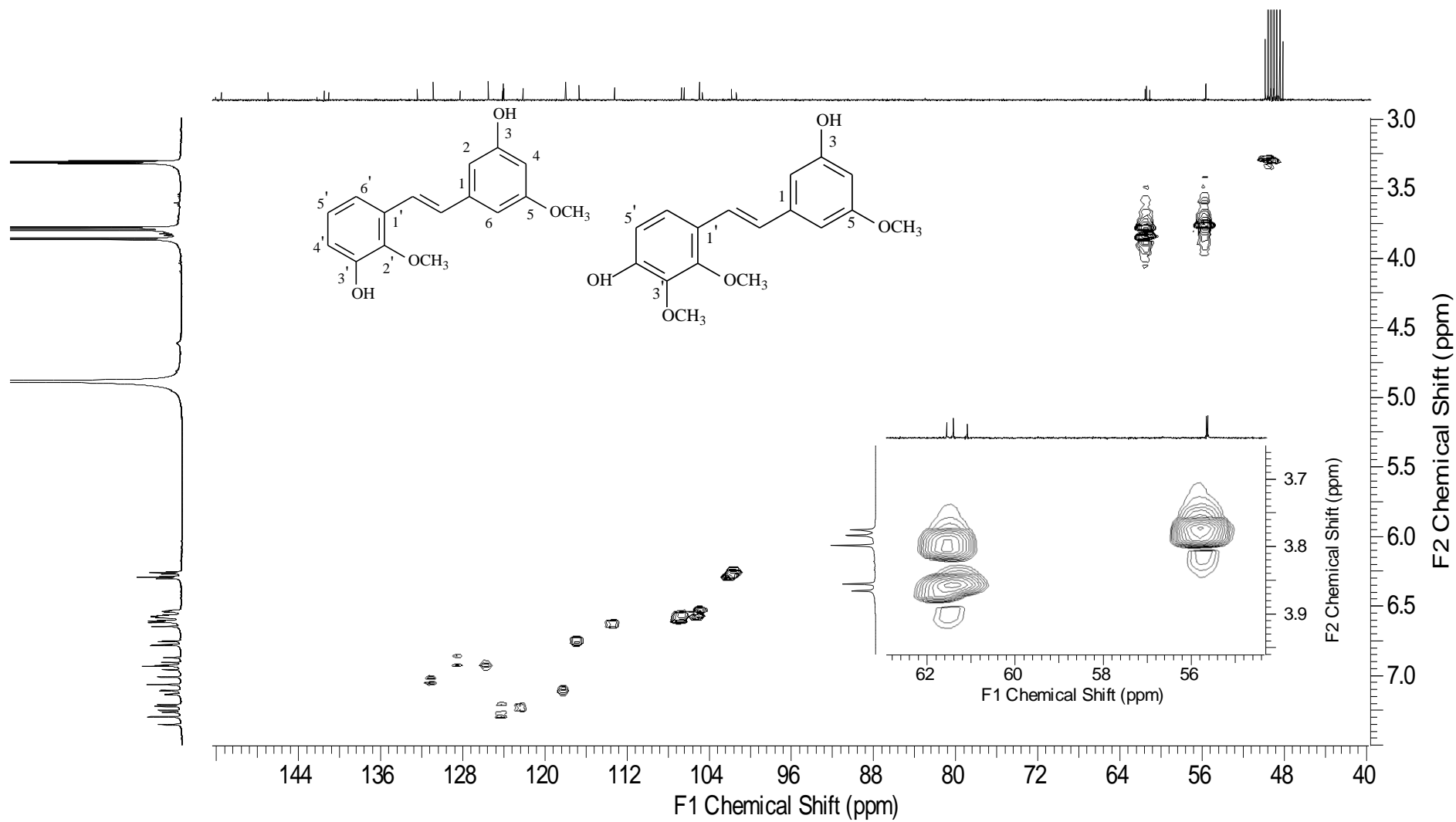


Figura 21: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45MHz) de M6+M7.

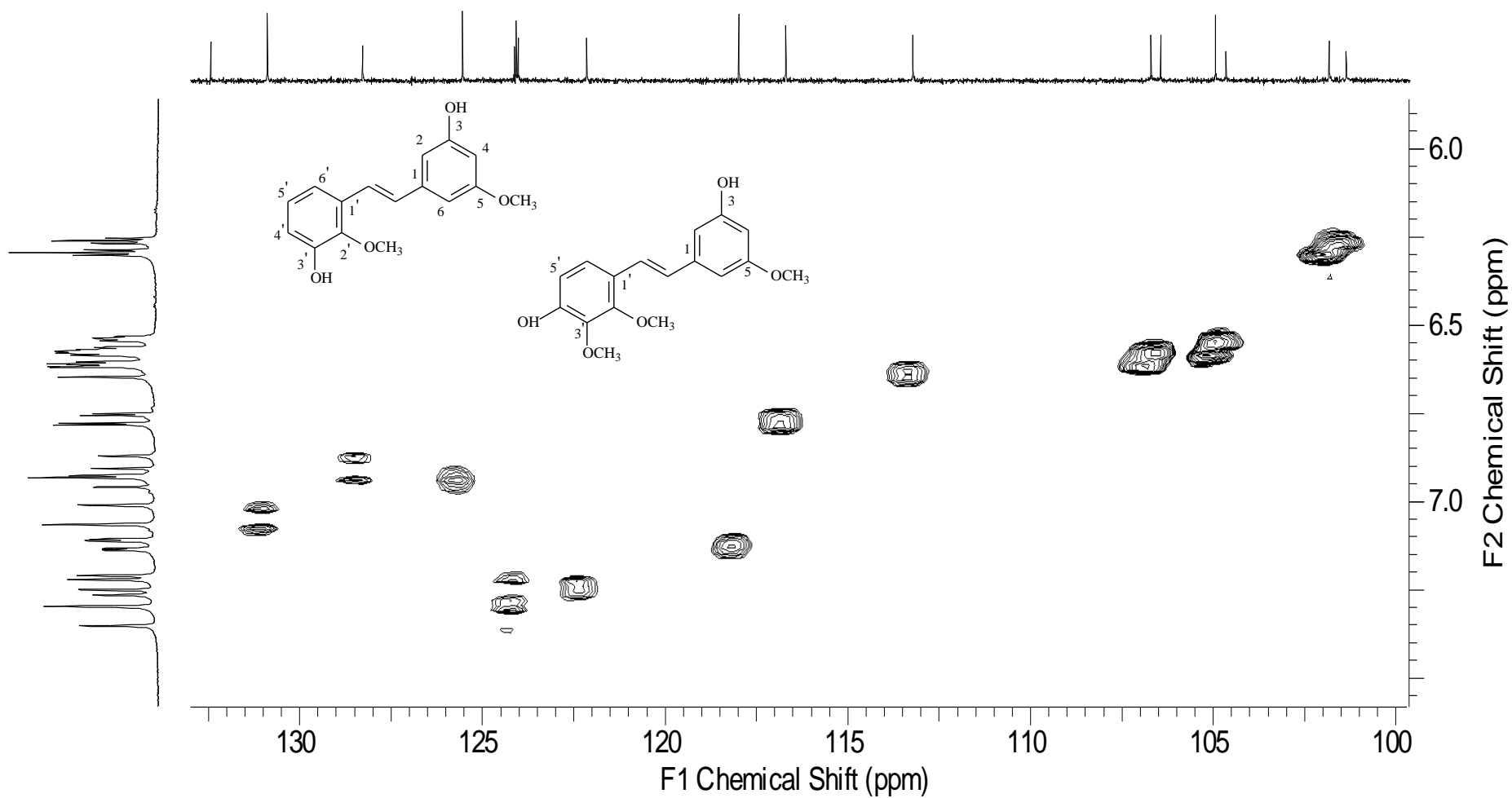




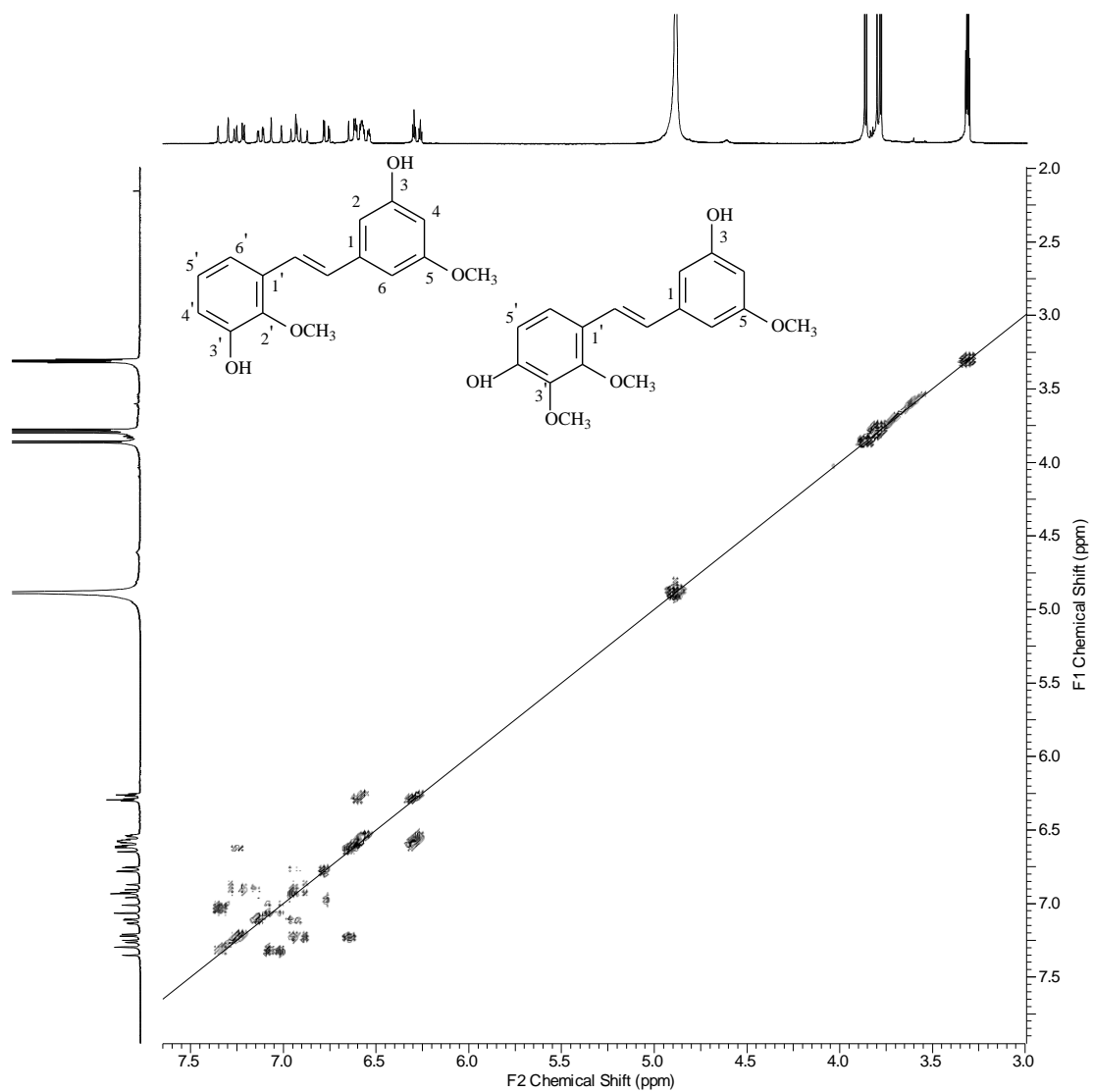
**Figura 22:** Expansão dos sinais do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45MHz) de **M6+M7**.



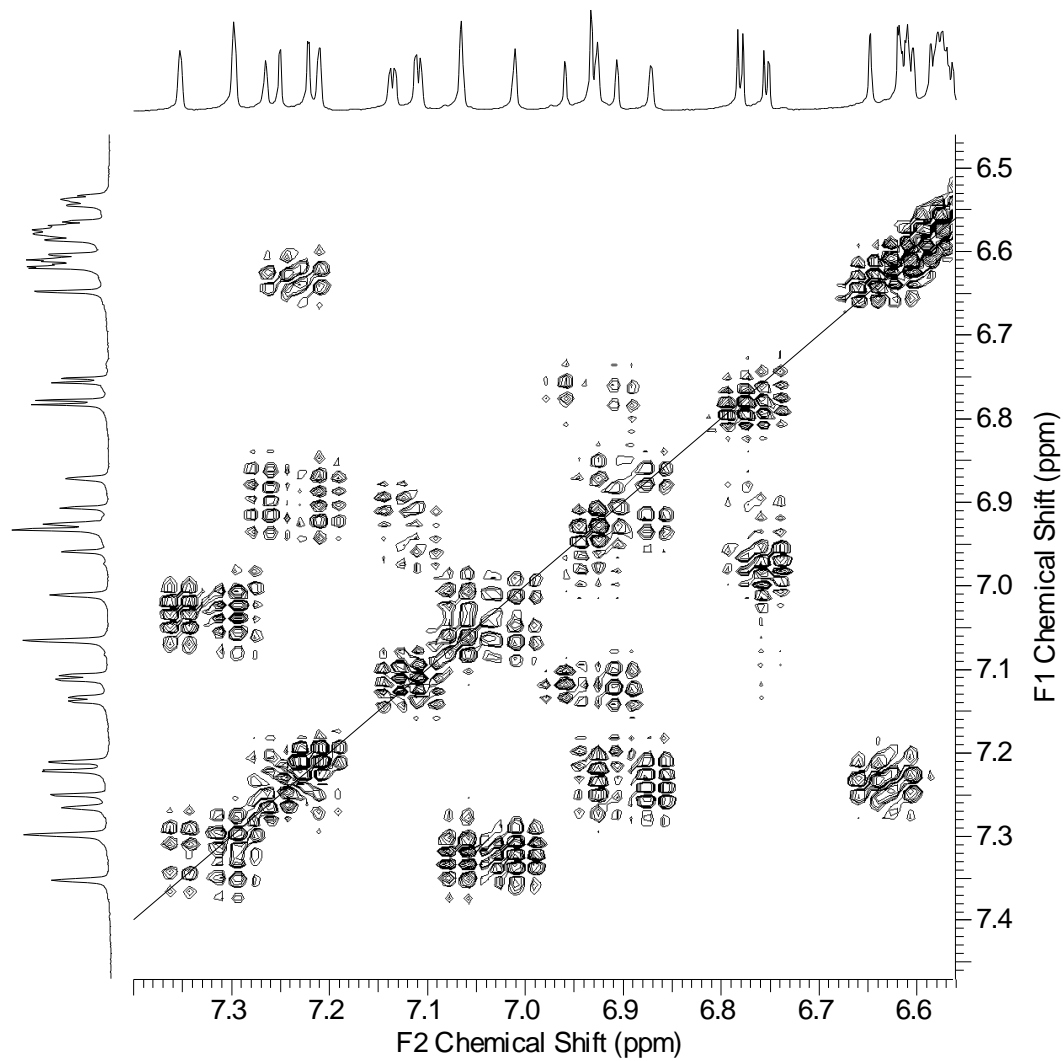
**Figura 23:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC e expansão ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de M6+M7.



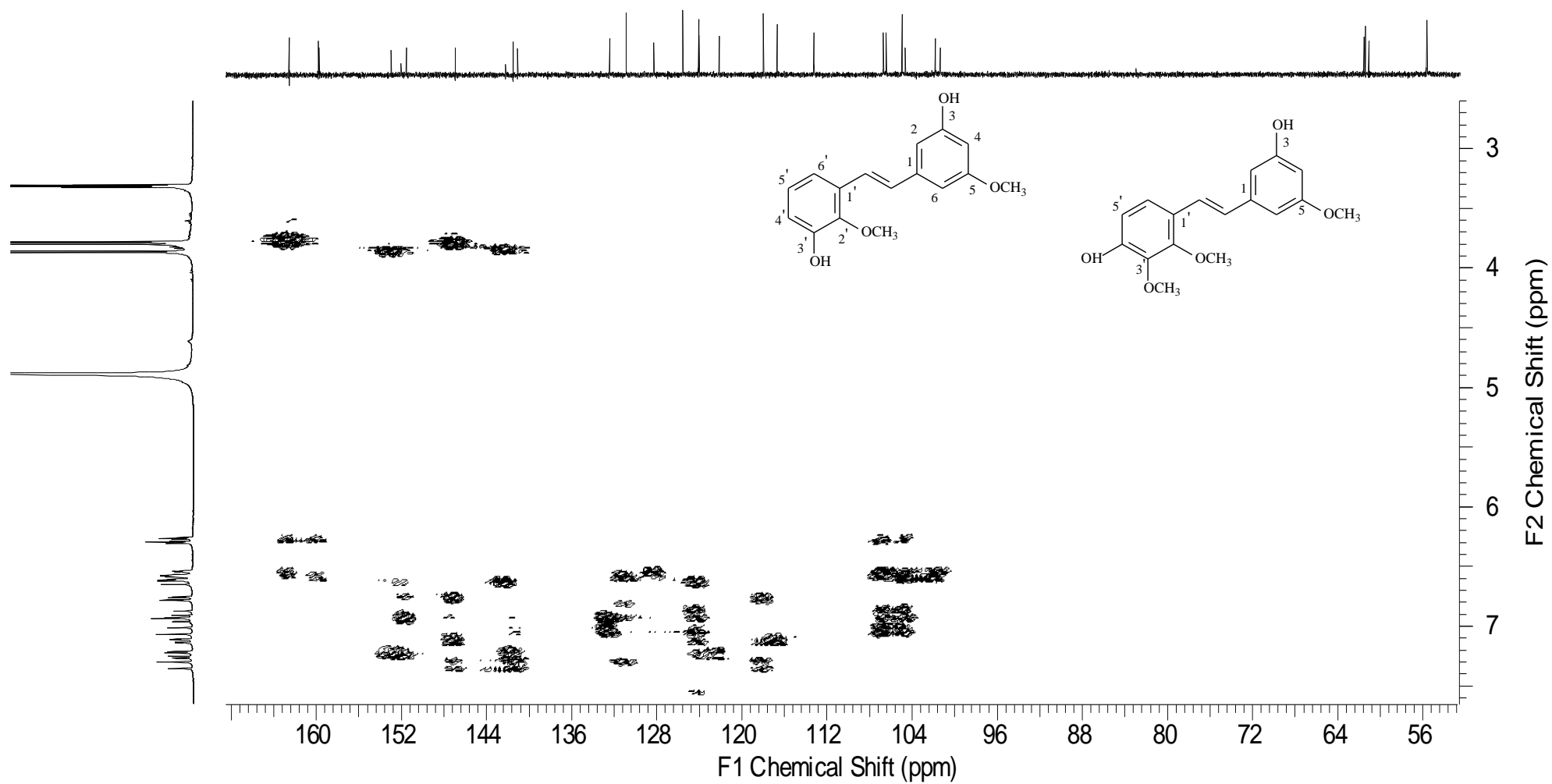
**Figura 24:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de M6+M7.



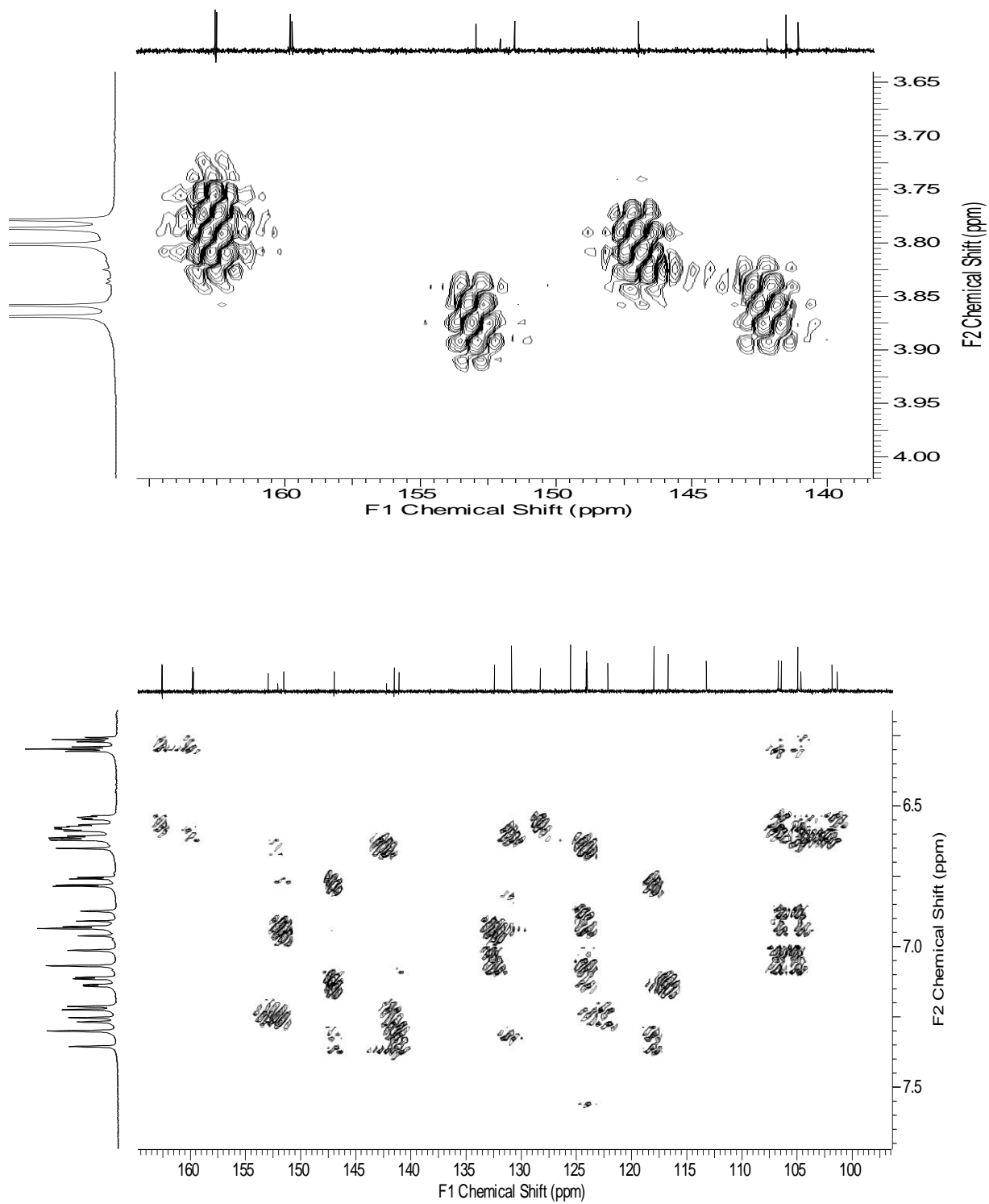
**Figura 25:** Mapa de correlação homonuclear COSY (<sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H) de M6+M7.



**Figura 26:** Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ ) das substâncias **M6+M7**.

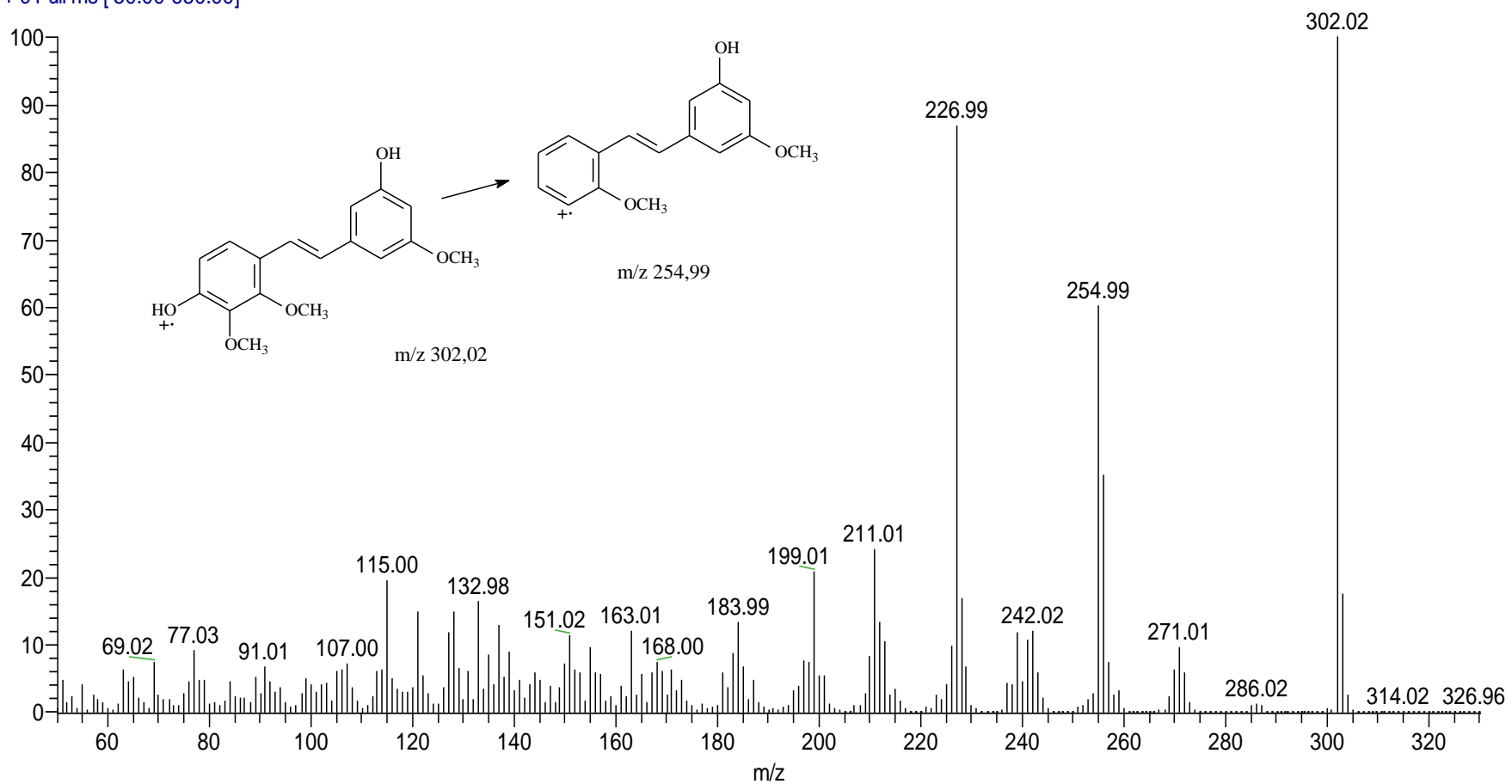


**Figura 27:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de M6+M7.



**Figura 28:** Expansões do mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) de M6+M7.

amostraMPCA\_26 #682 RT: 17.96 AV: 1 NL: 5.61E7  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]



**Figura 29:** Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de **M7**.



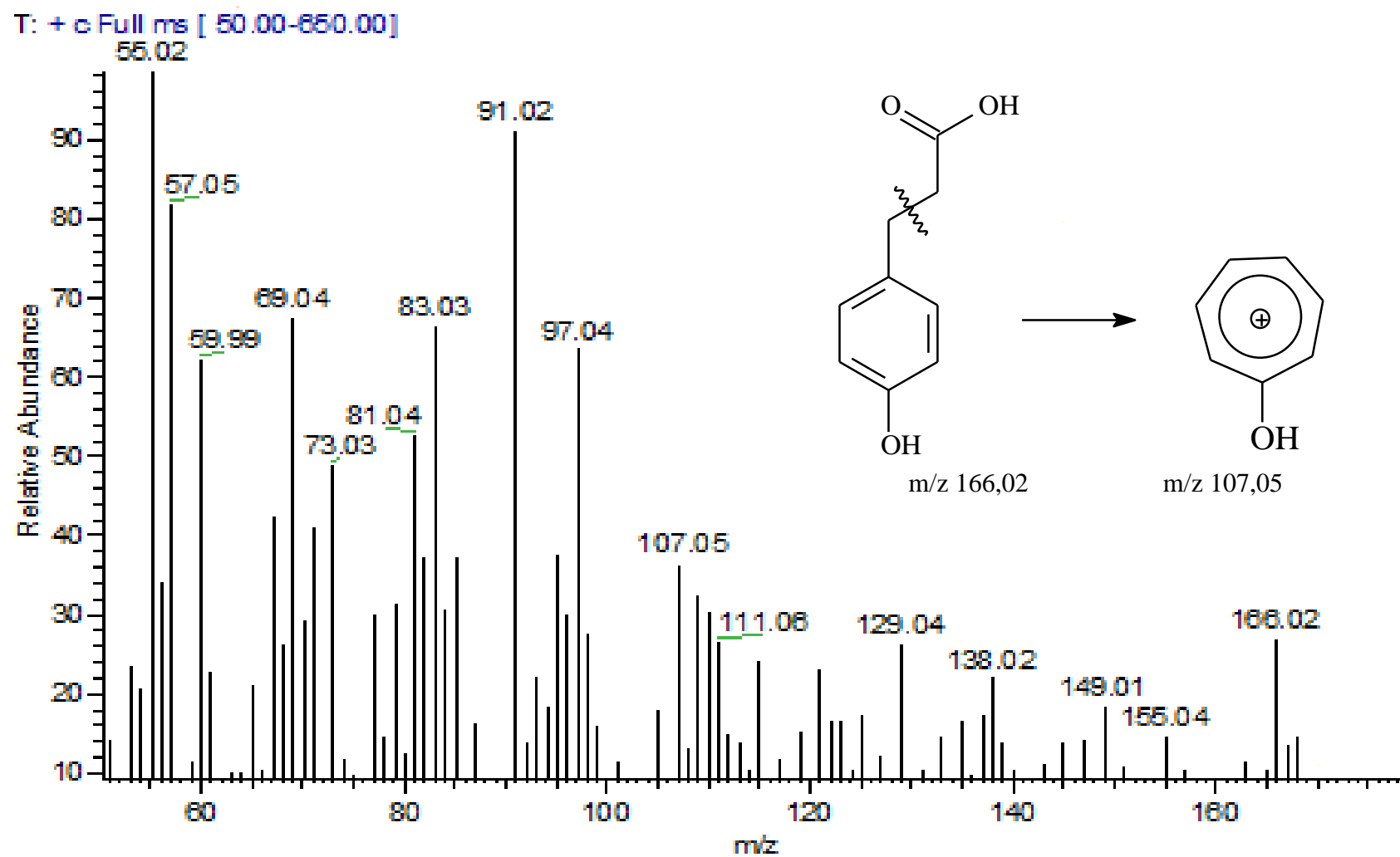
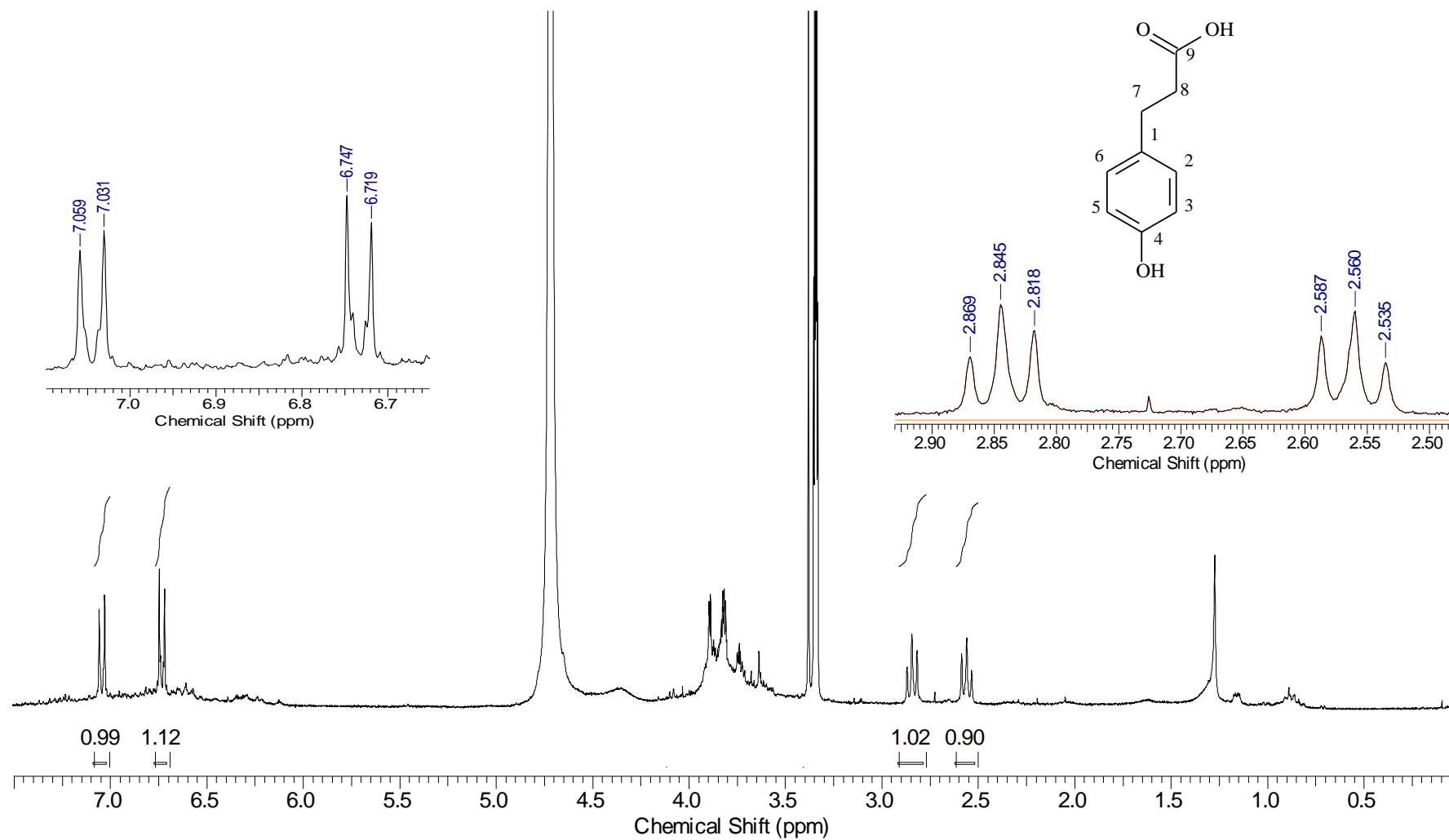
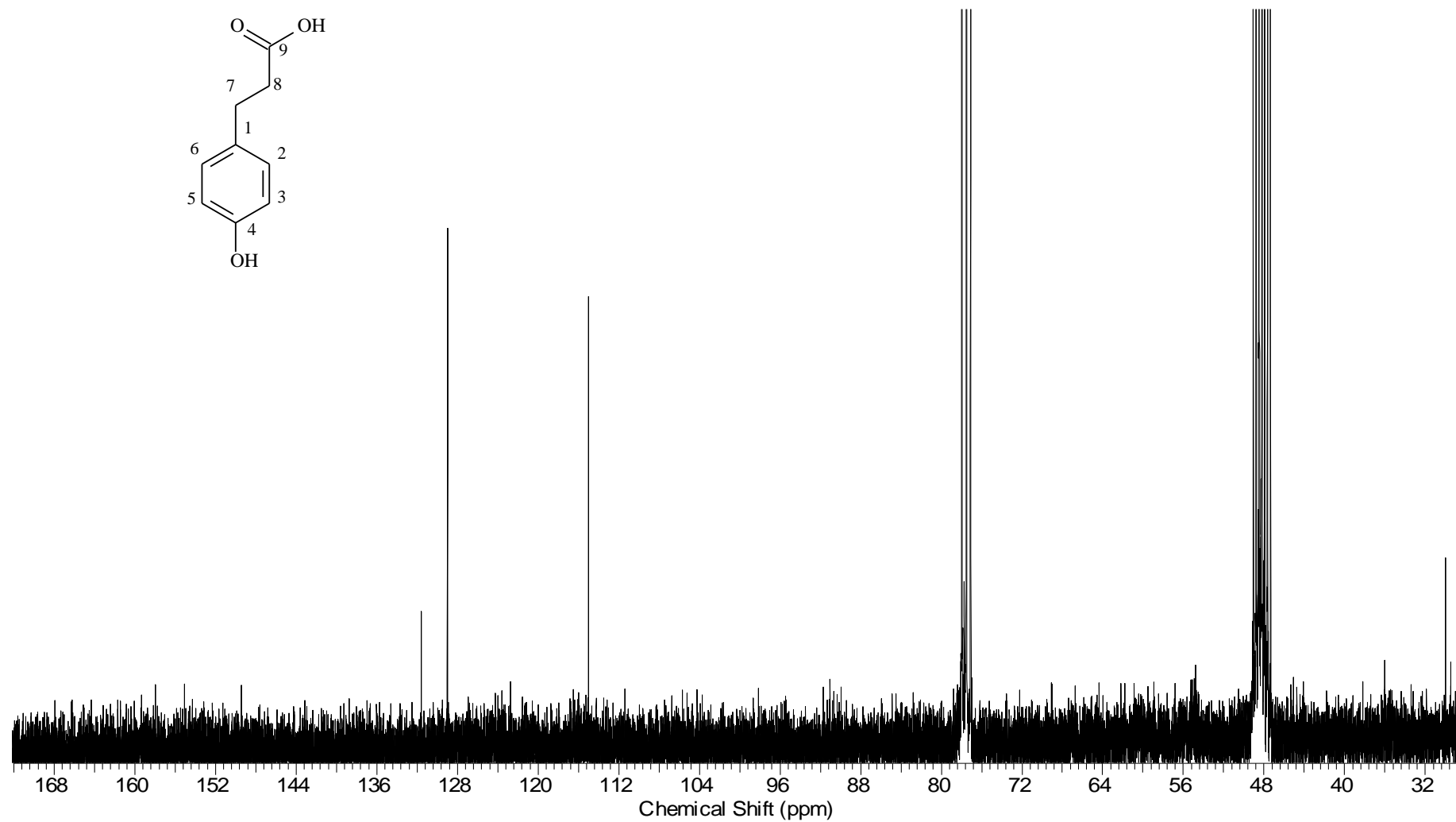


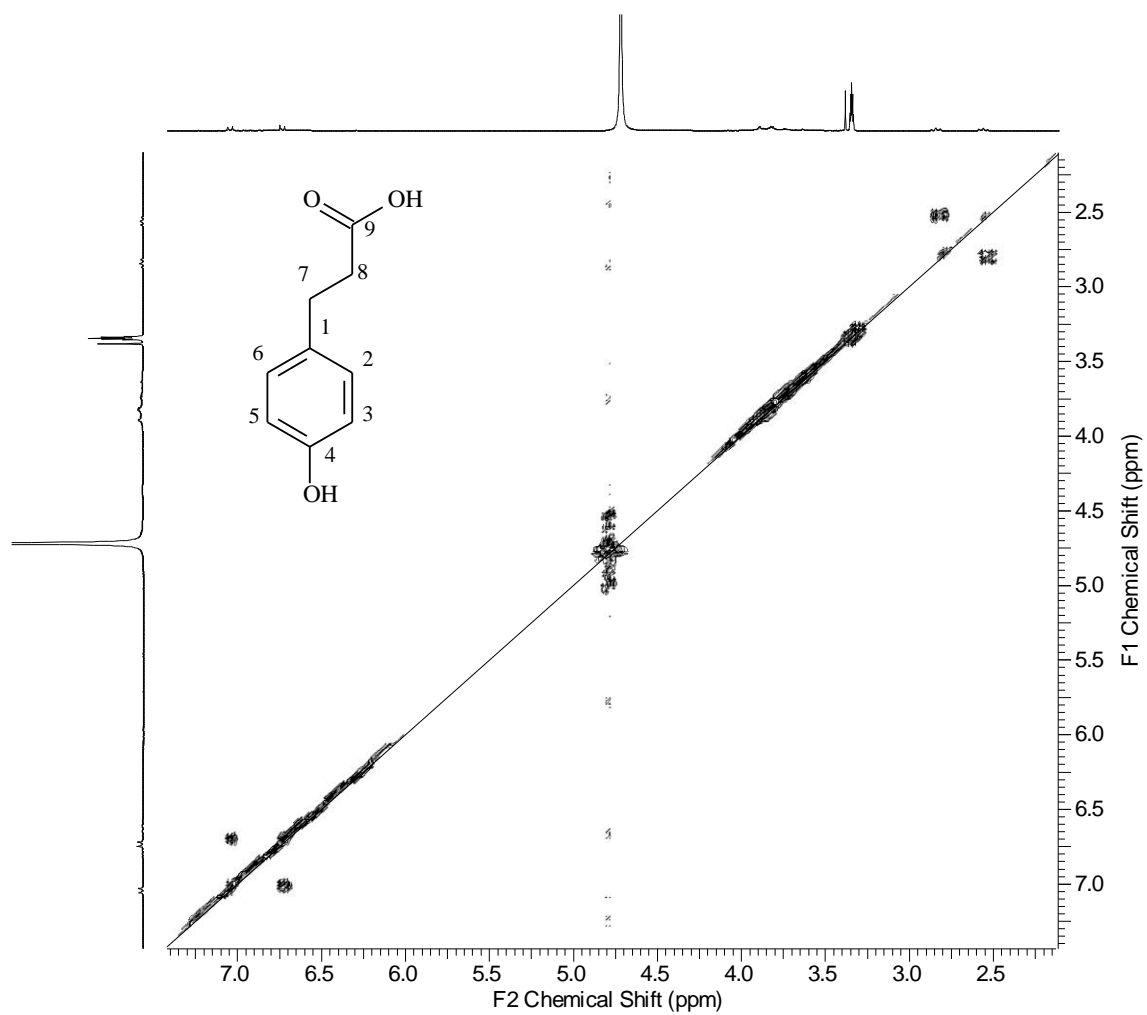
Figura 30: Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de M8.



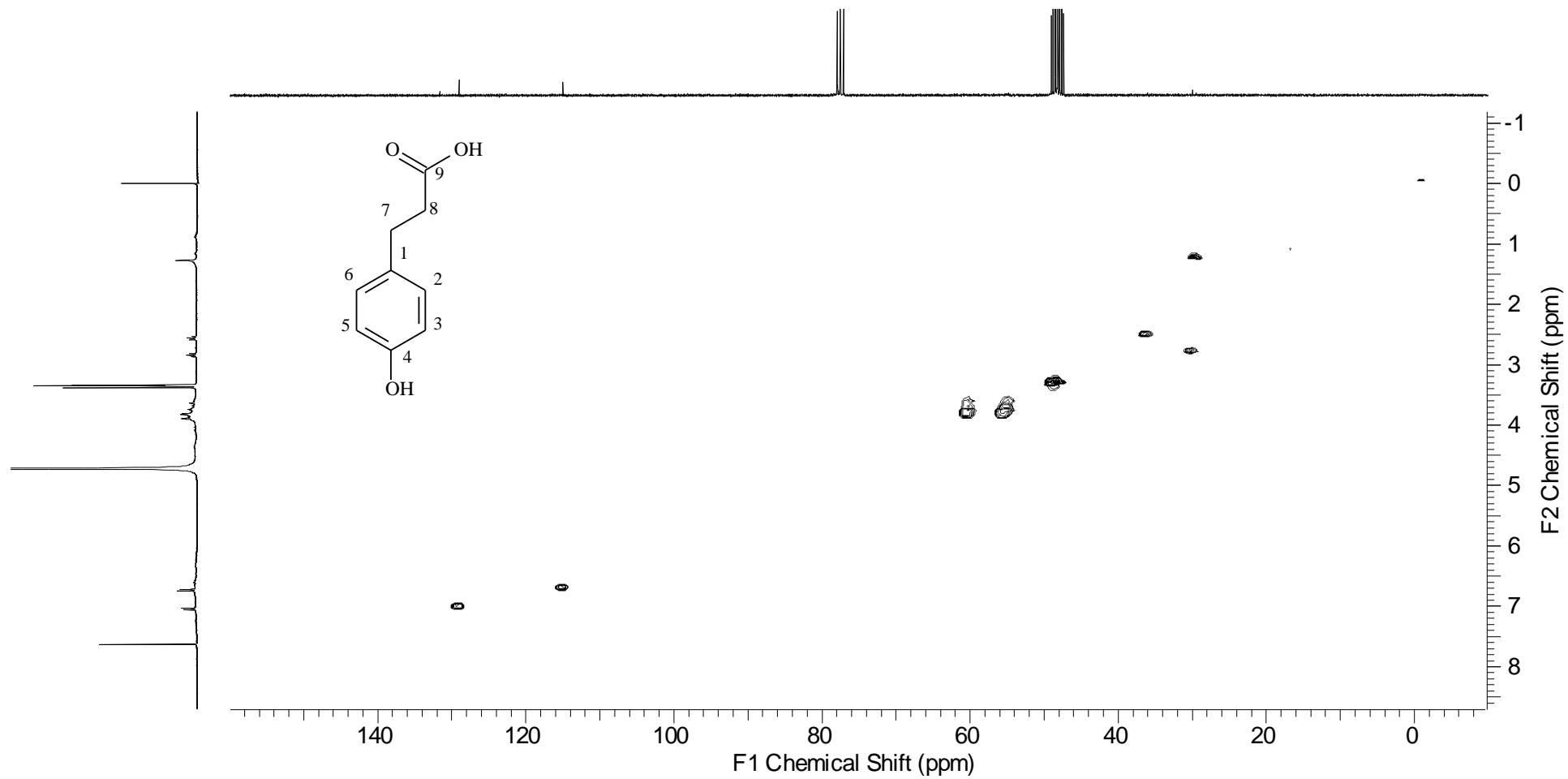
**Figura 31:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M8**.



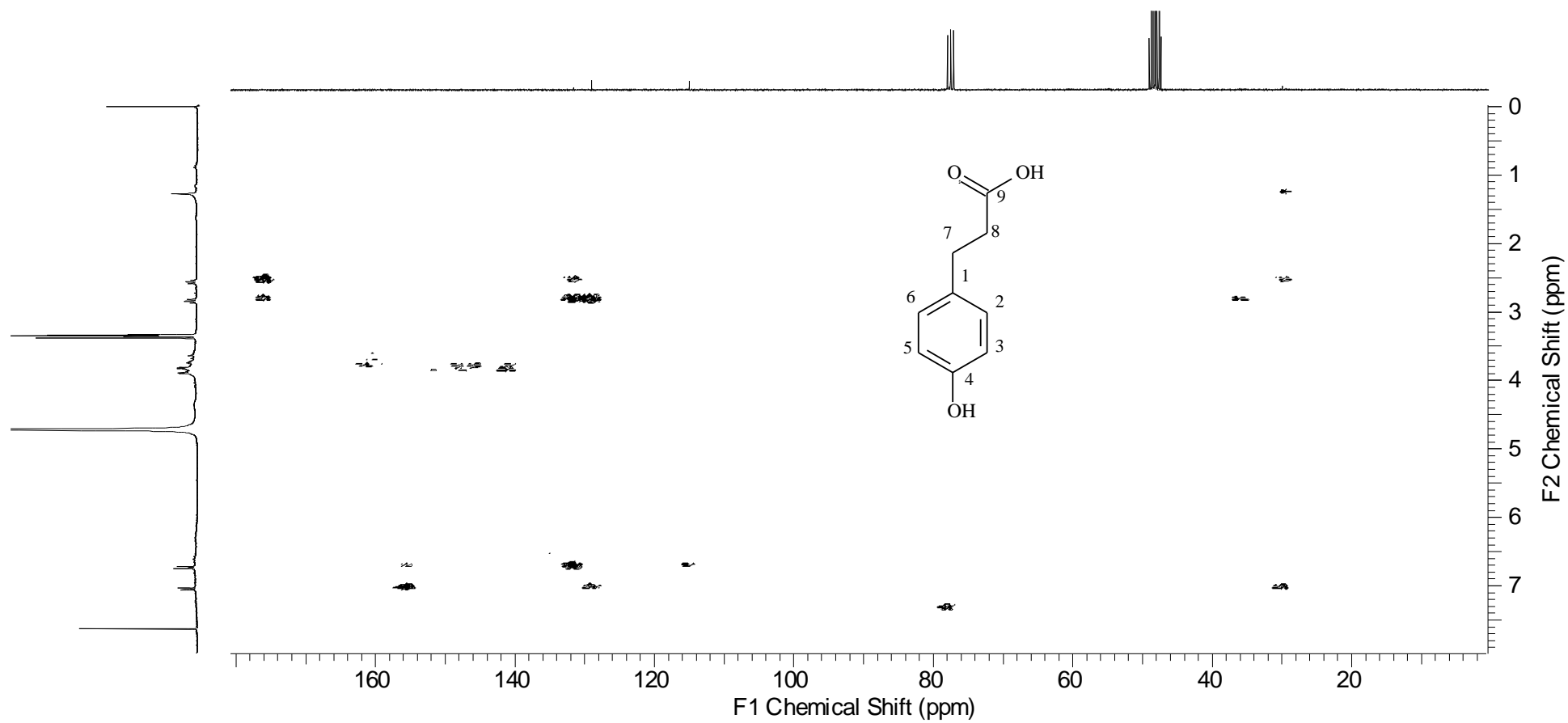
**Figura 32:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ; 75,45MHz) de **M8**.



**Figura 33:** Mapa de correlação homonuclear COSY (<sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H) para **M8**.



**Figura 34:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M8**.



**Figura 35:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M8**.

Composto-Thiago-20eV-1 #297 RT: 6.21 AV: 1 NL: 1.45E5  
T: + c Full ms [ 50.00-650.00]

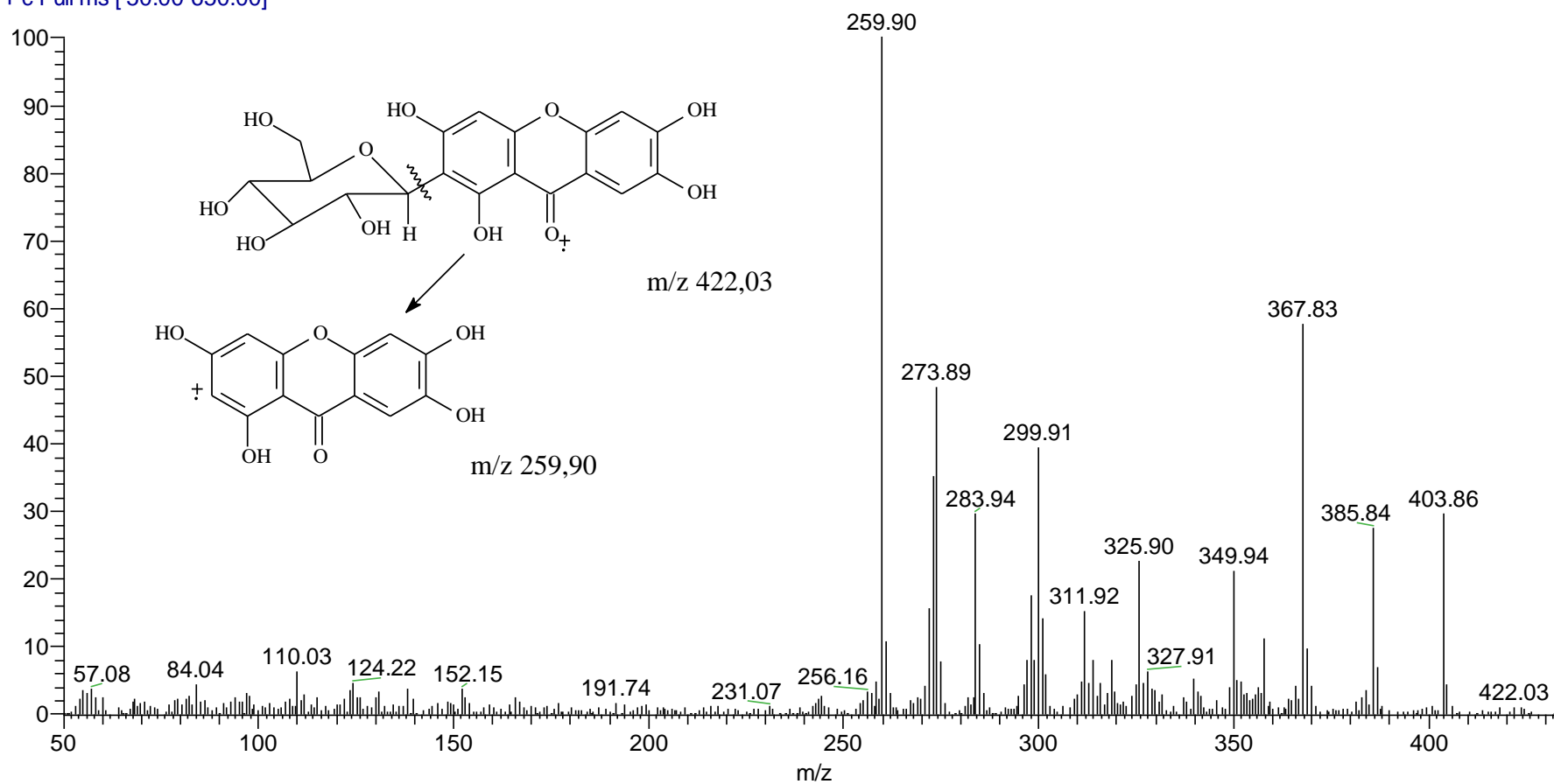
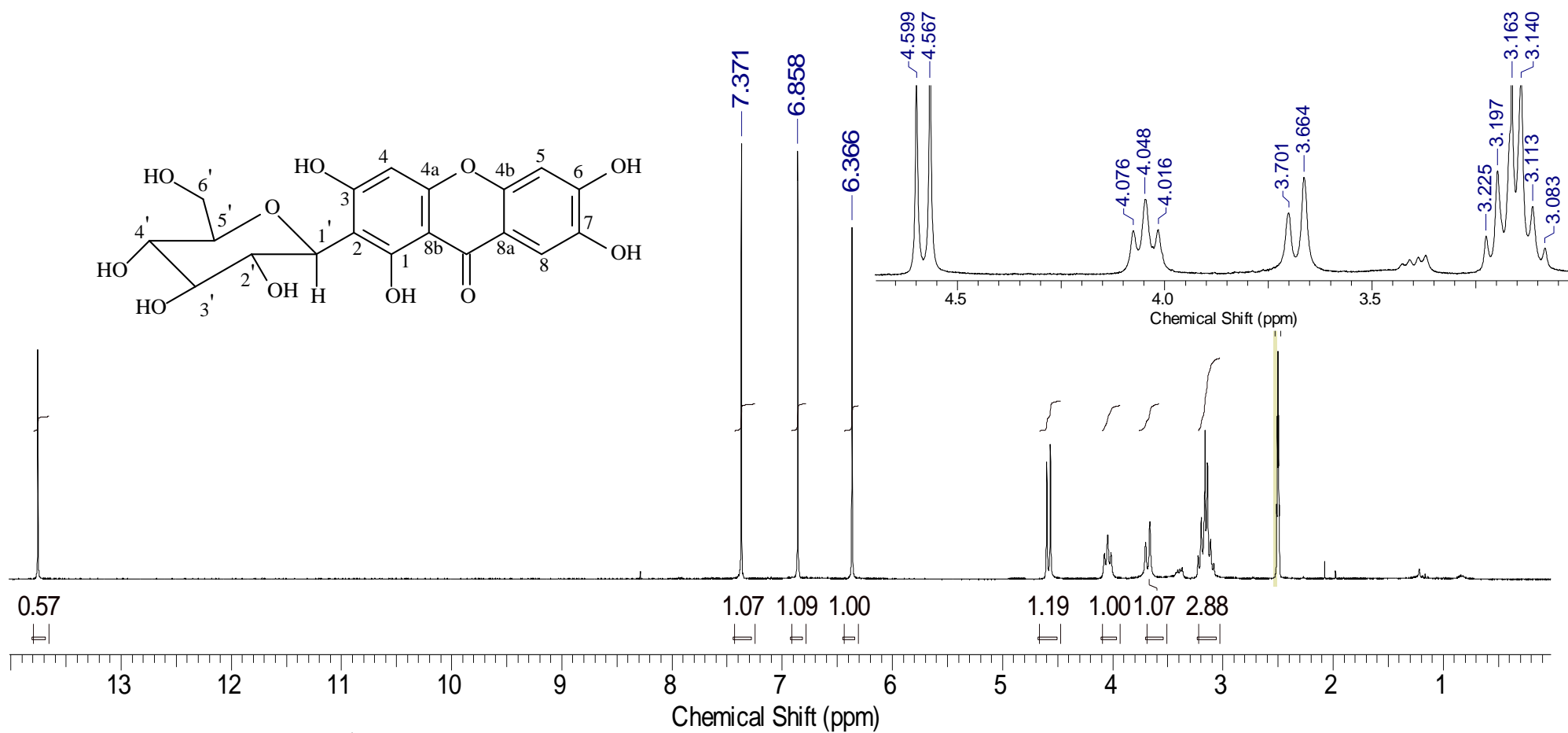
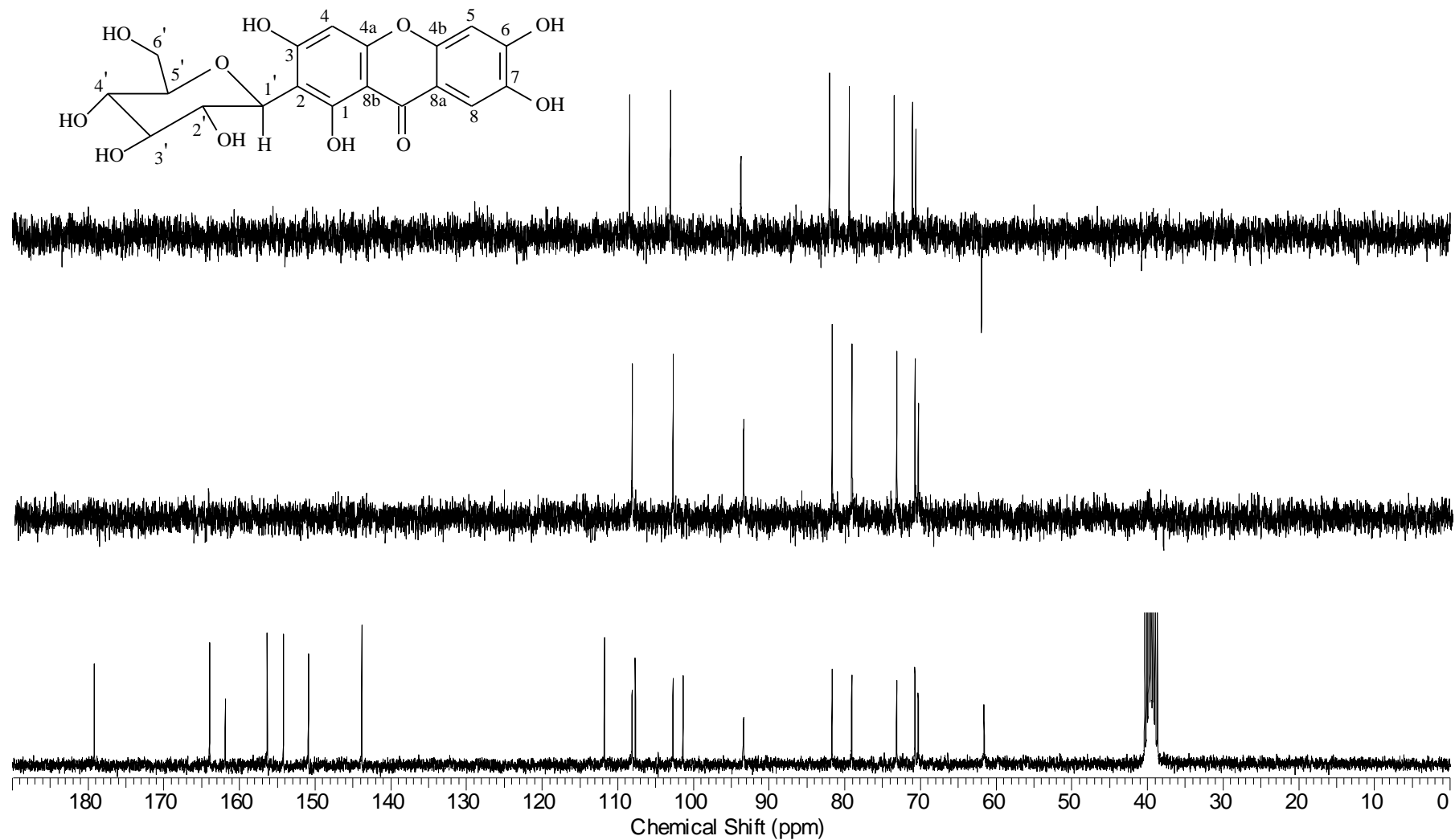


Figura 36: Espectro de massas de baixa resolução (20 eV) de M9.

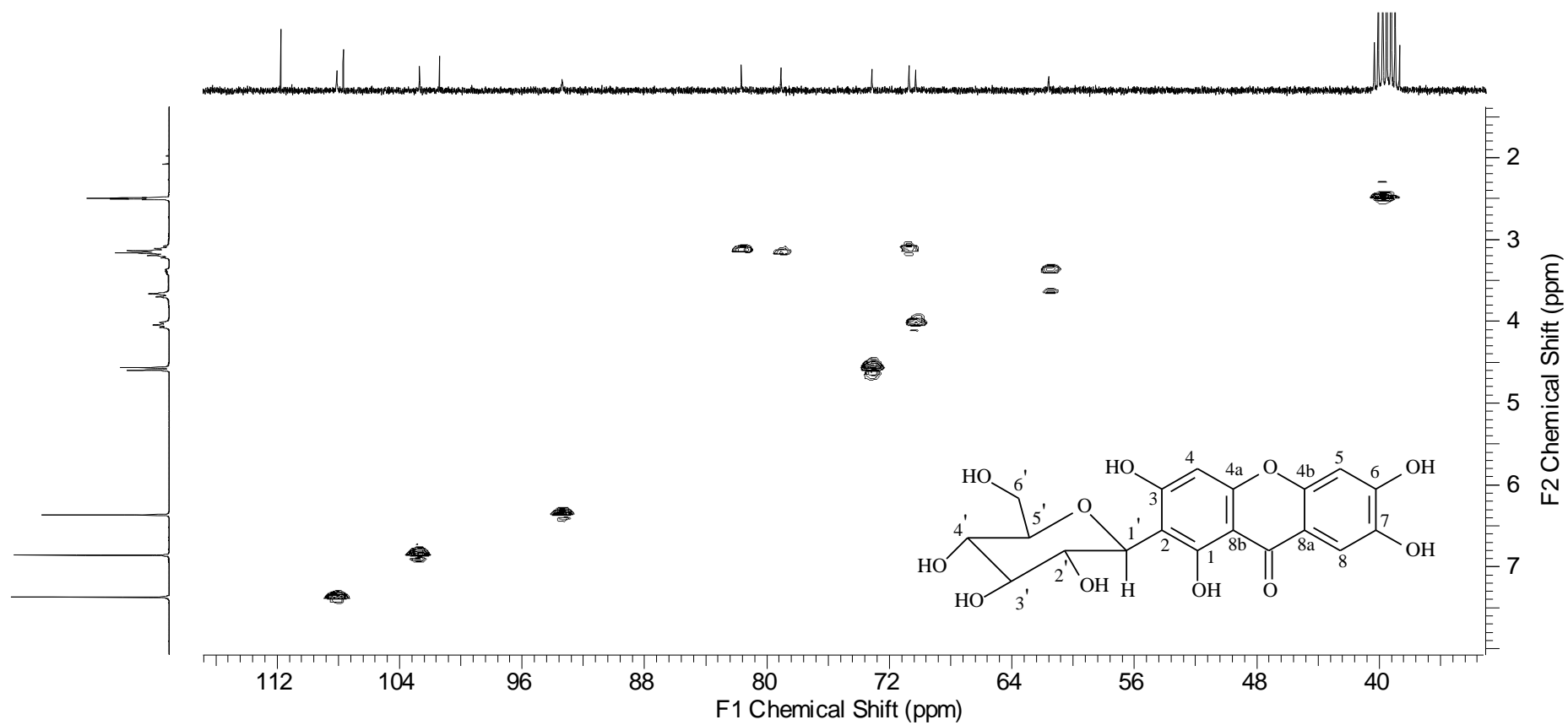


**Figura 37:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ; 300,06 MHz) de **M9**.

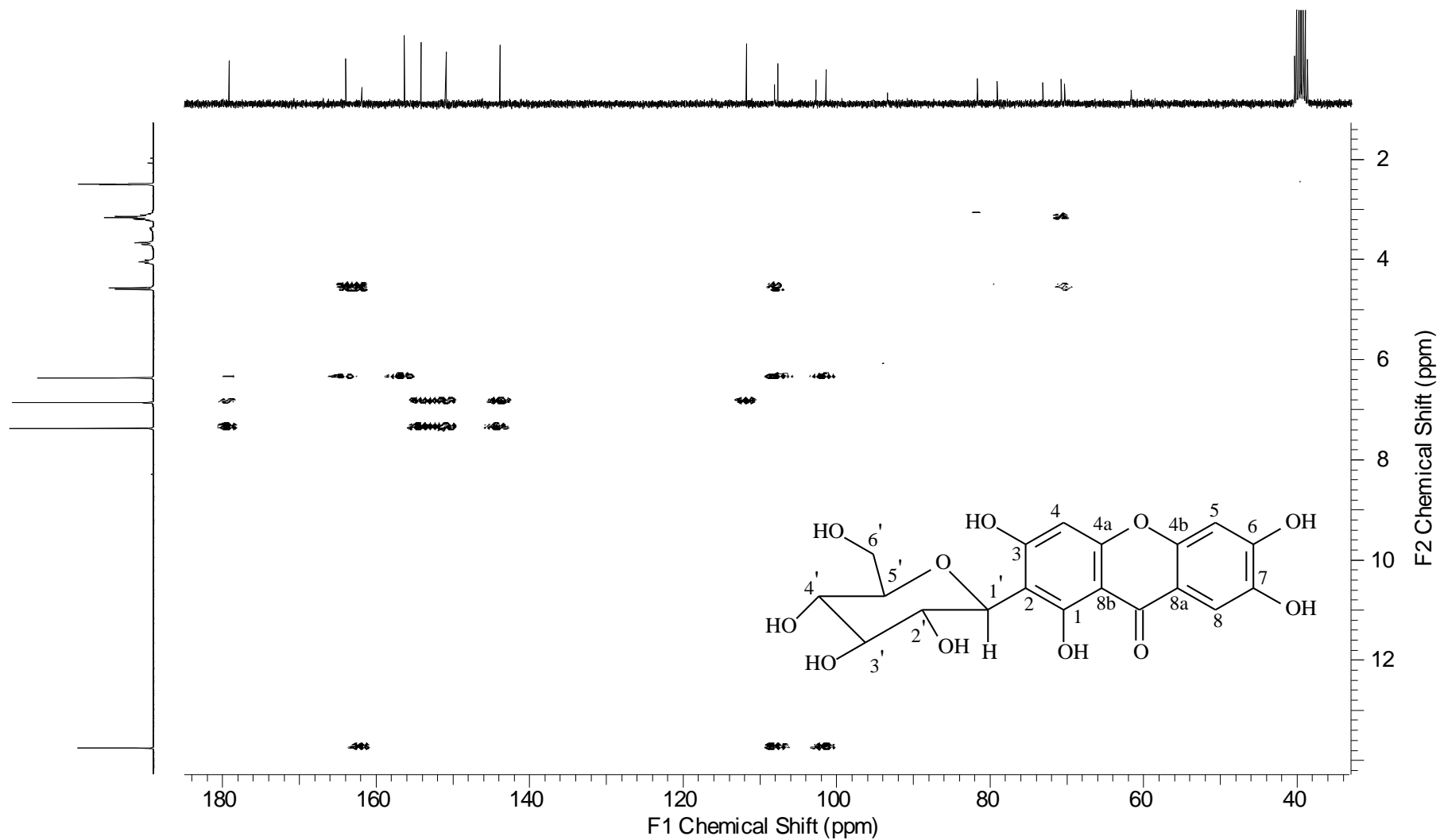




**Figura 38:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 90° e 135° (DMSO- $d_6$ ; 75,45MHz) de **M9**.



**Figura 39:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M9**.



**Figura 40:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ ) para **M9**.

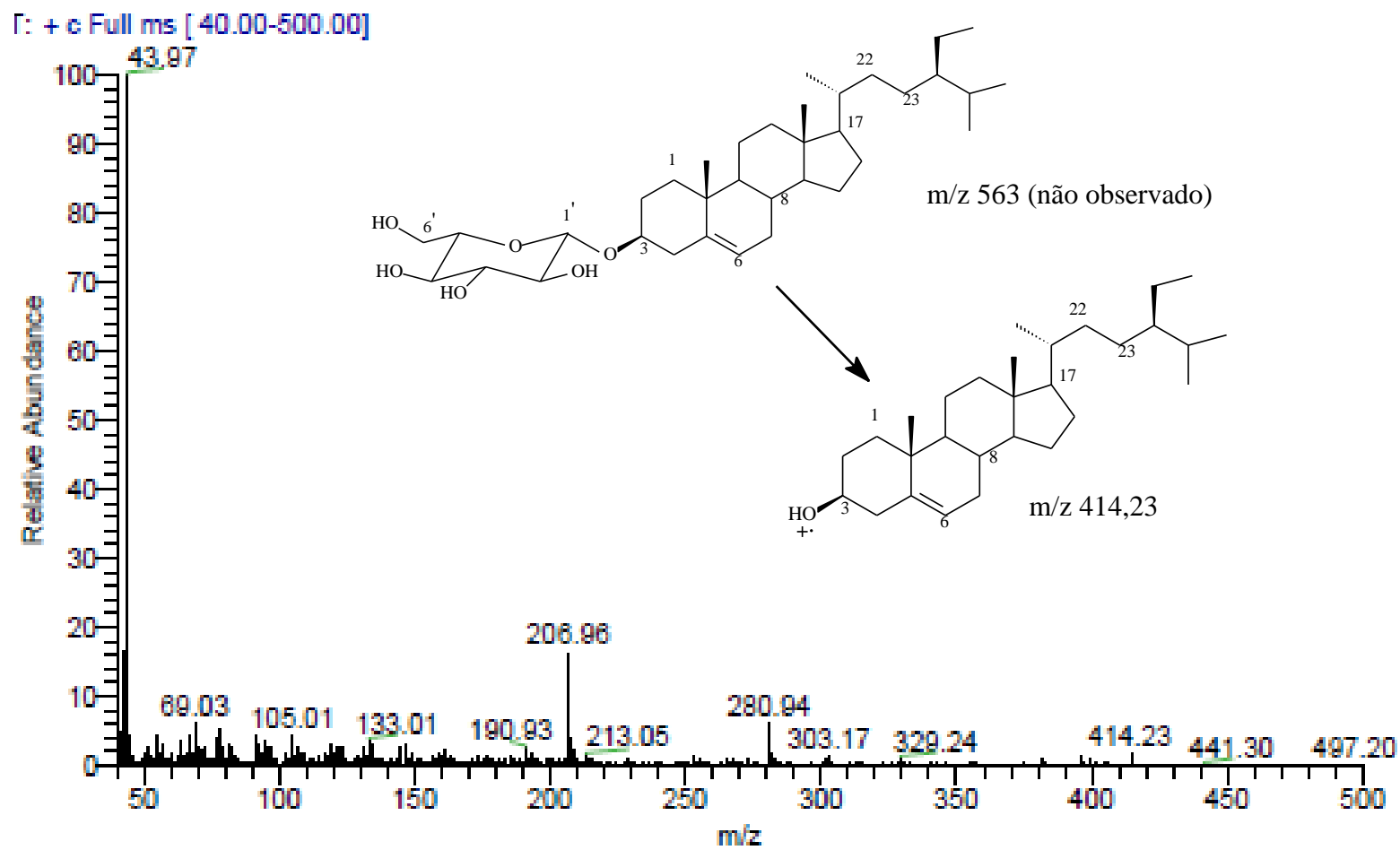
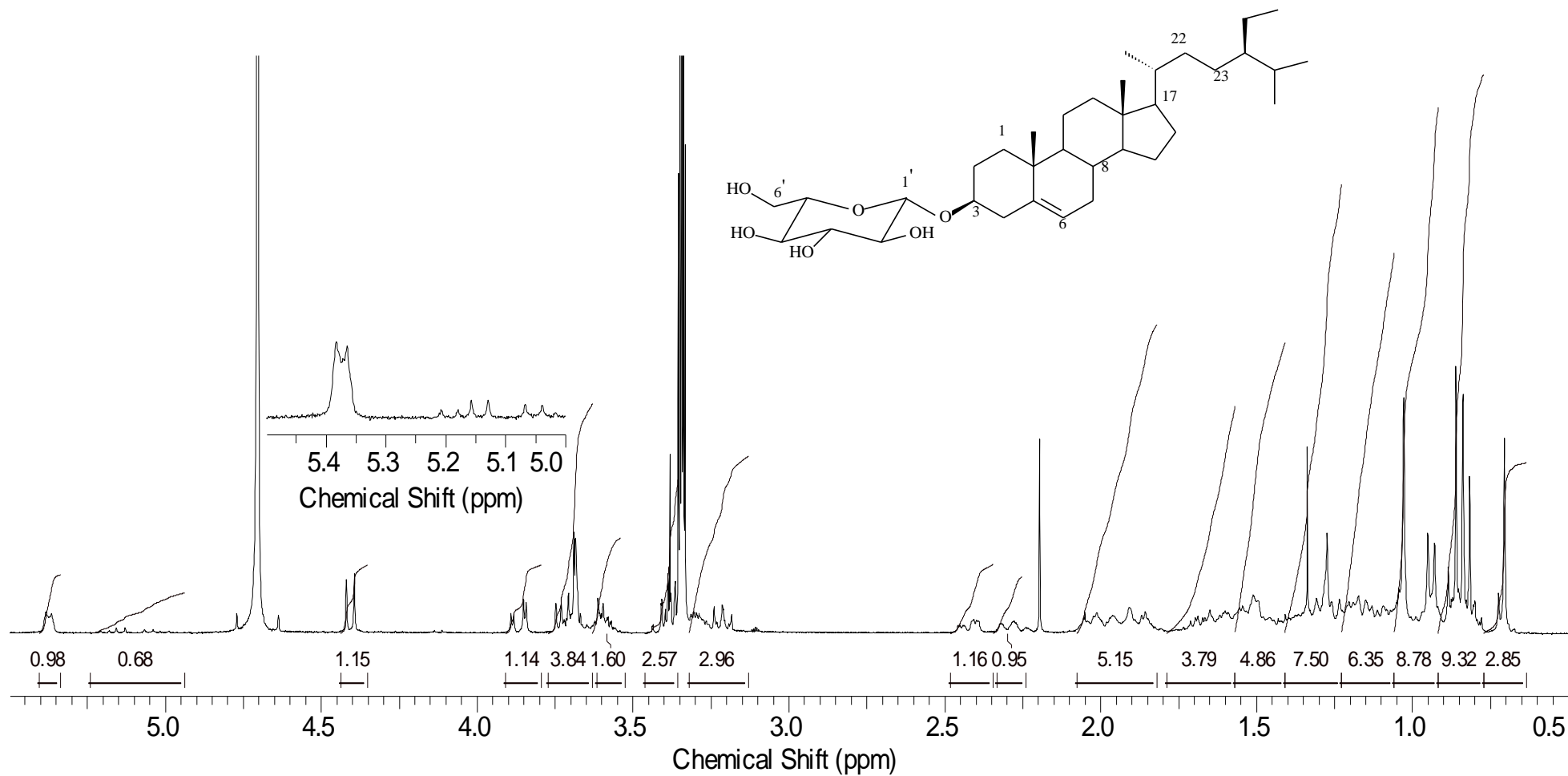
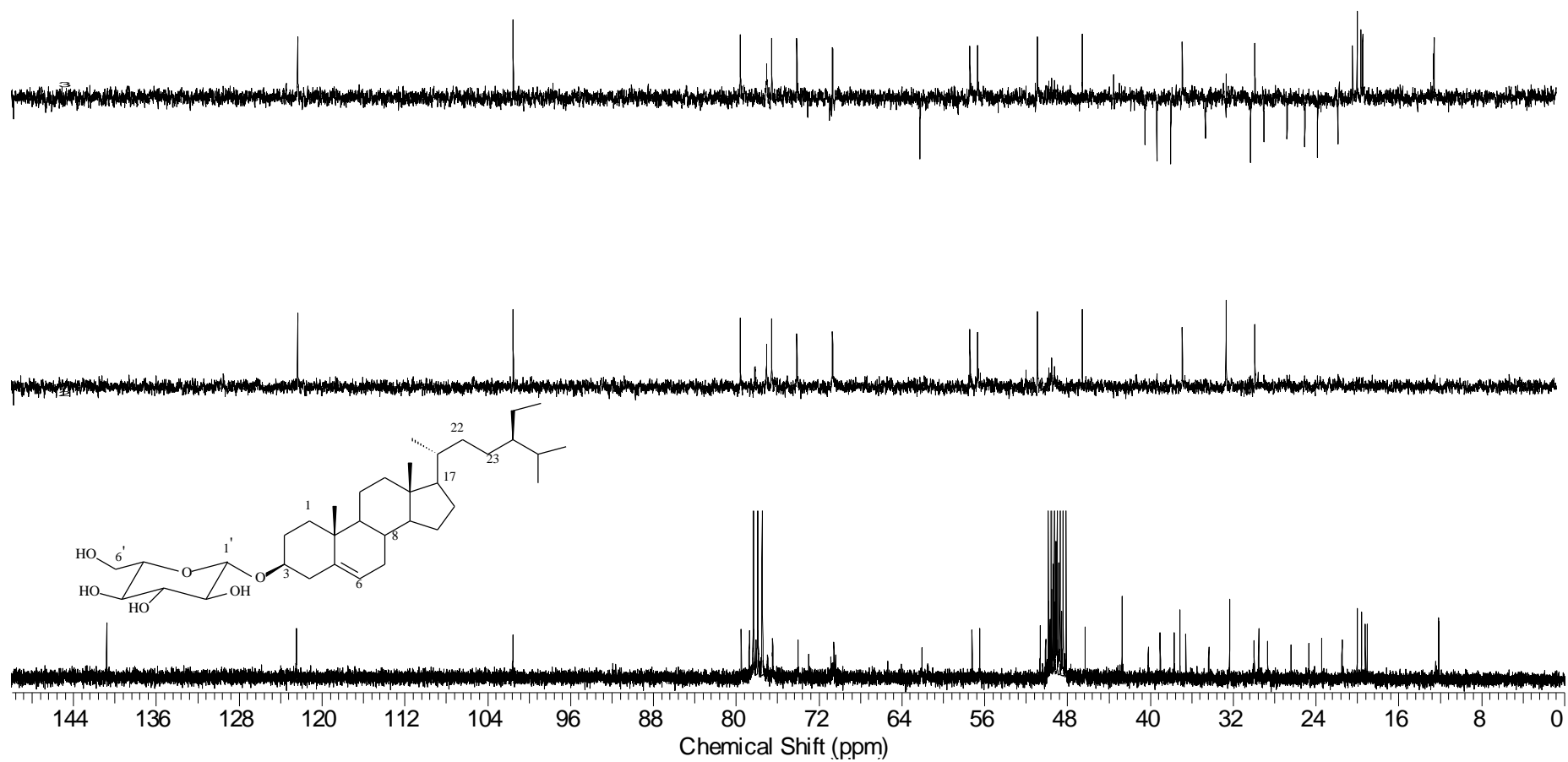


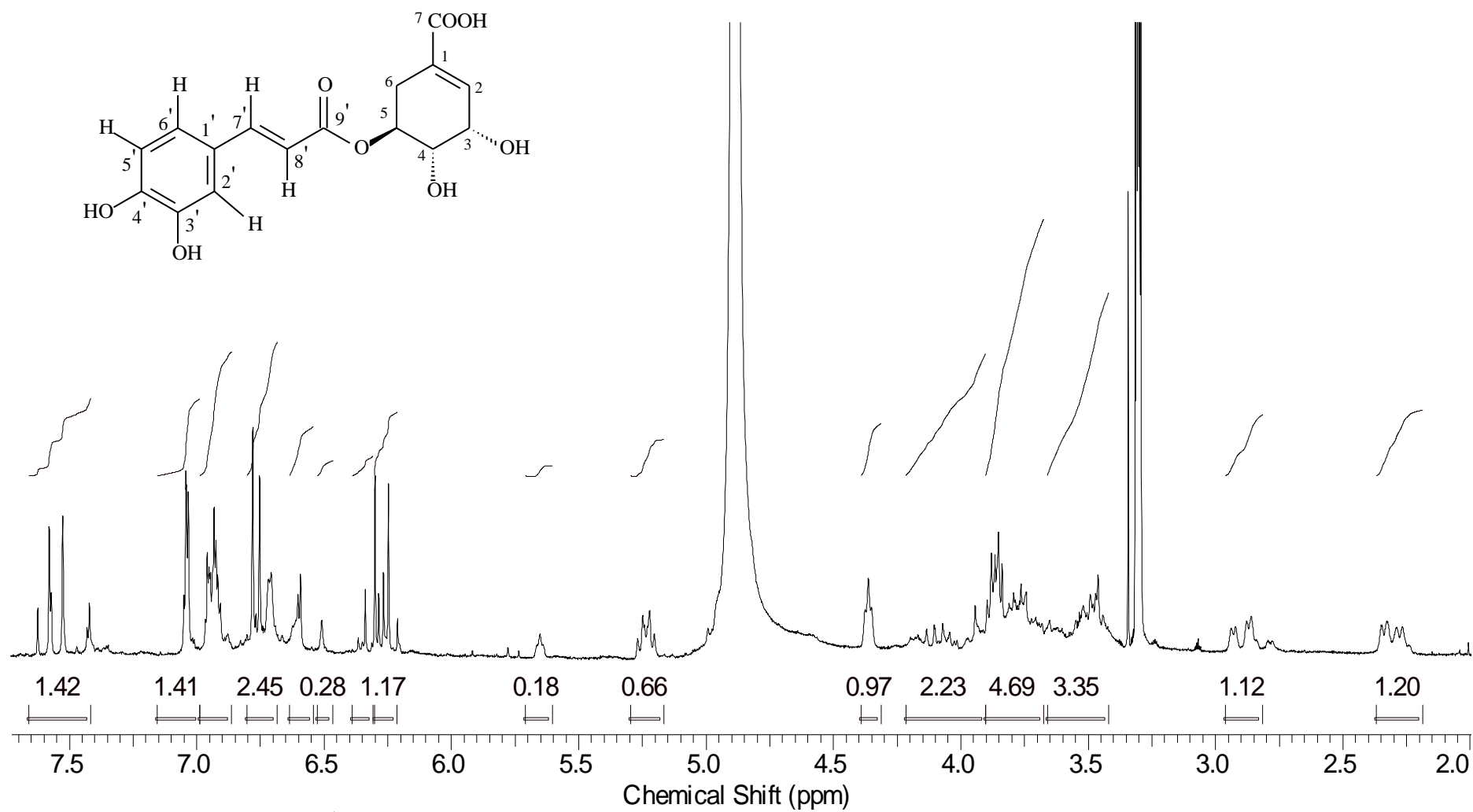
Figura 41: Espectro de massas de baixa resolução (70 eV) de M10.



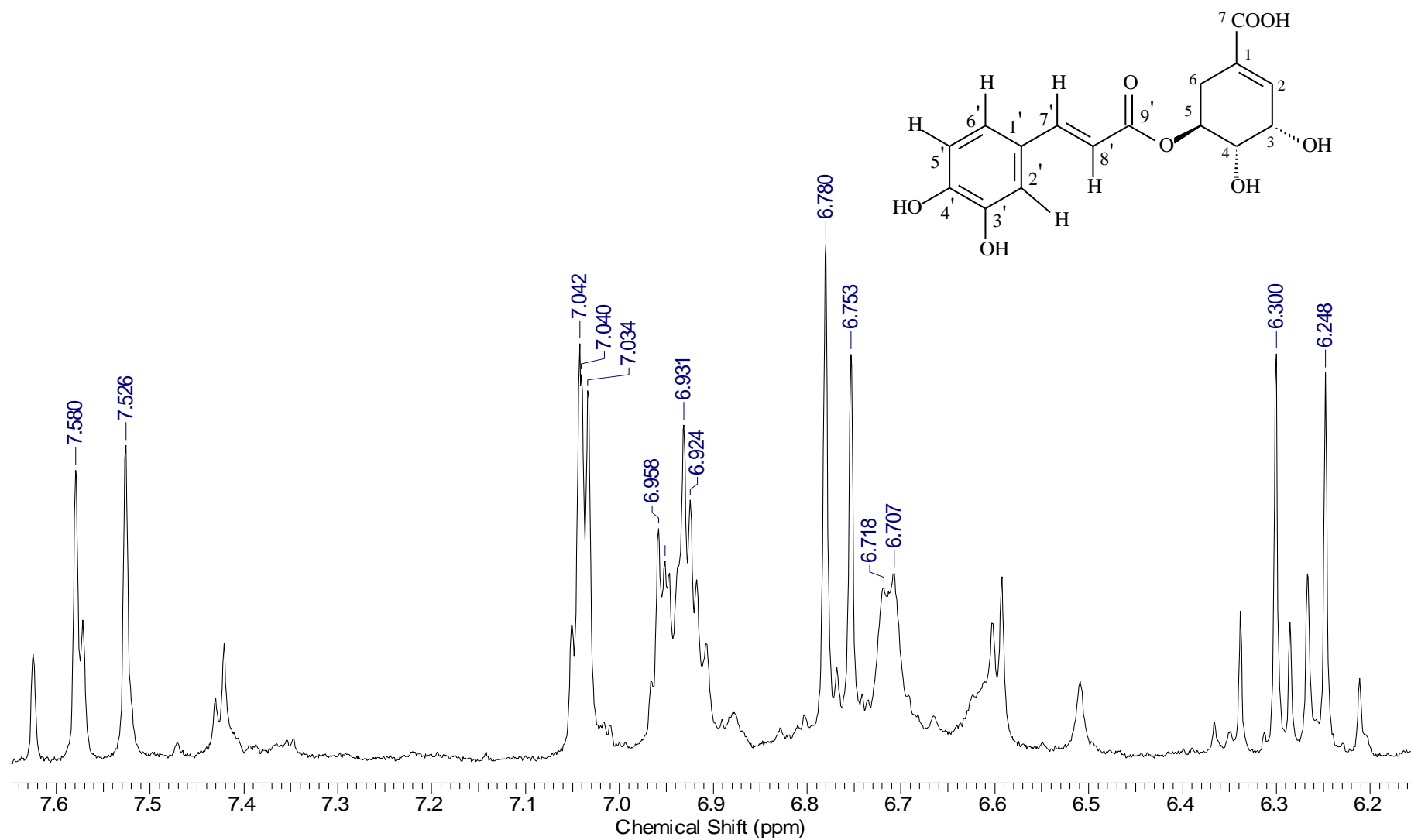
**Figura 42:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ; 300,06 MHz) de **M10**.



**Figura 43:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 90° e 135° ( $\text{CD}_3\text{OD}+\text{CDCl}_3$ ; 75,45MHz) de **M10**

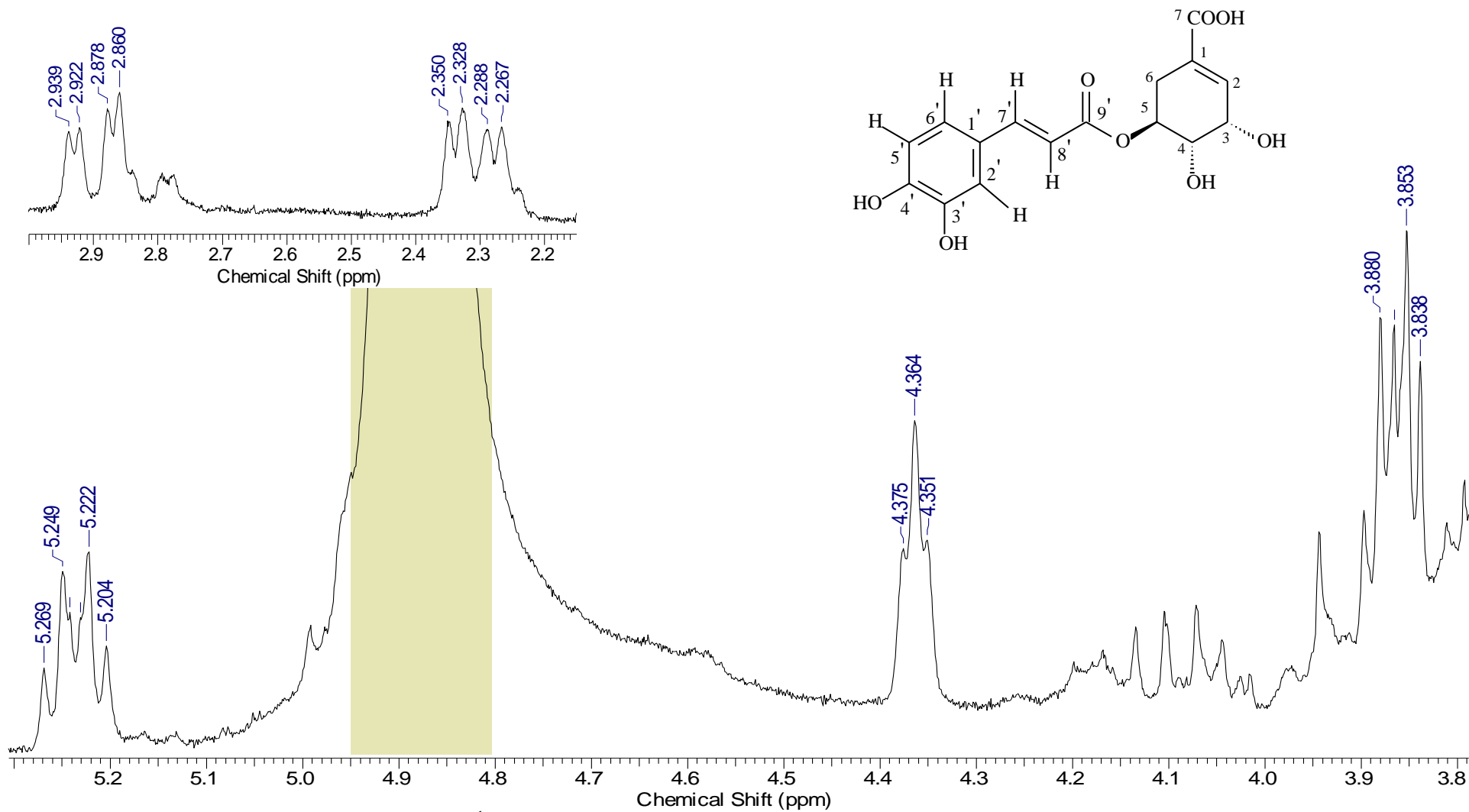


**Figura 44:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (CD<sub>3</sub>OD; 300,06 MHz) de **M11**.



**Figura 45:** Expansão dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06MHz) de **M11**.





**Figura 46:** Expansão dos sinais do espectro de  $^1\text{H}$  (CD<sub>3</sub>OD; 300,06 MHz) de M11.

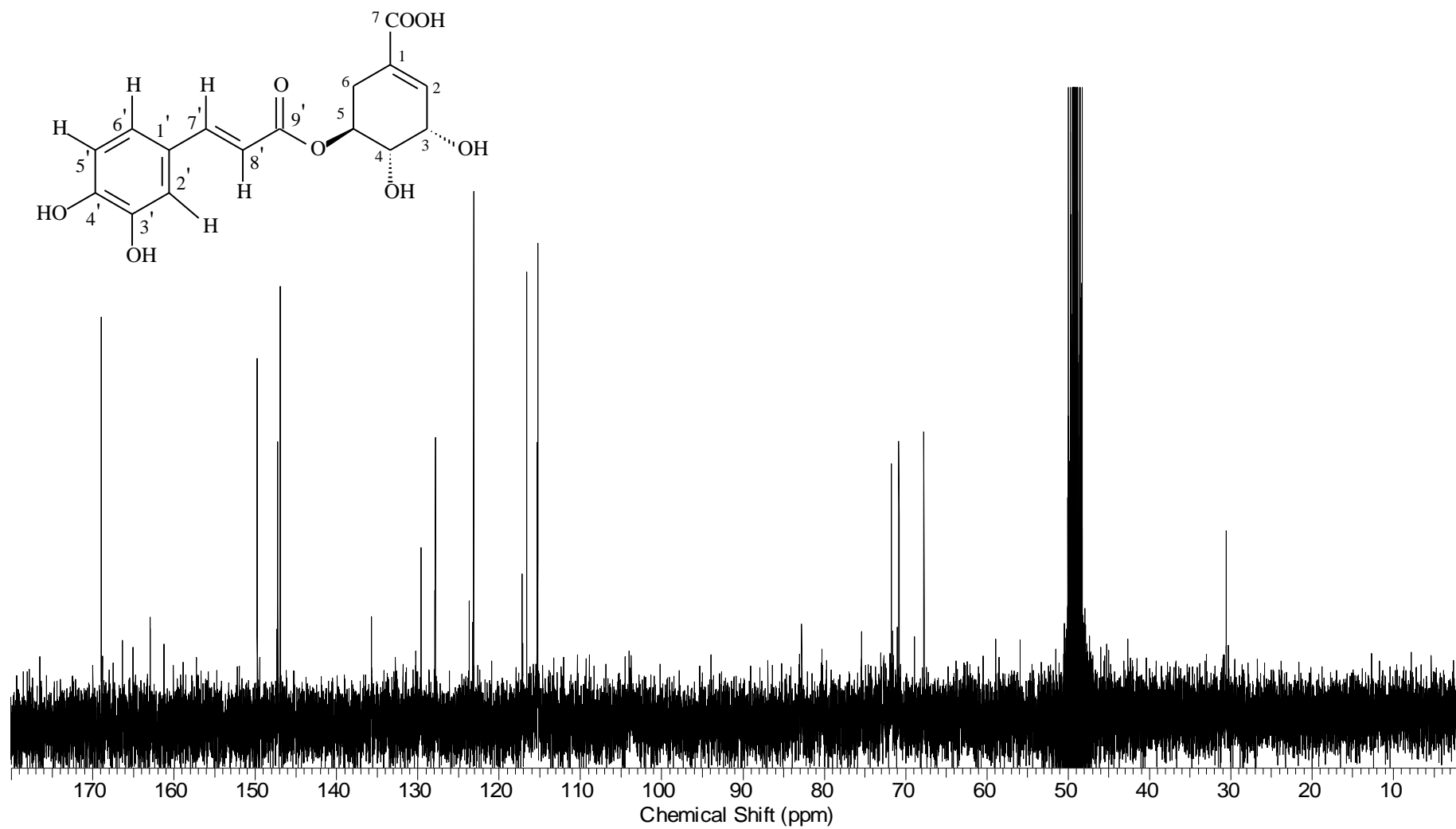
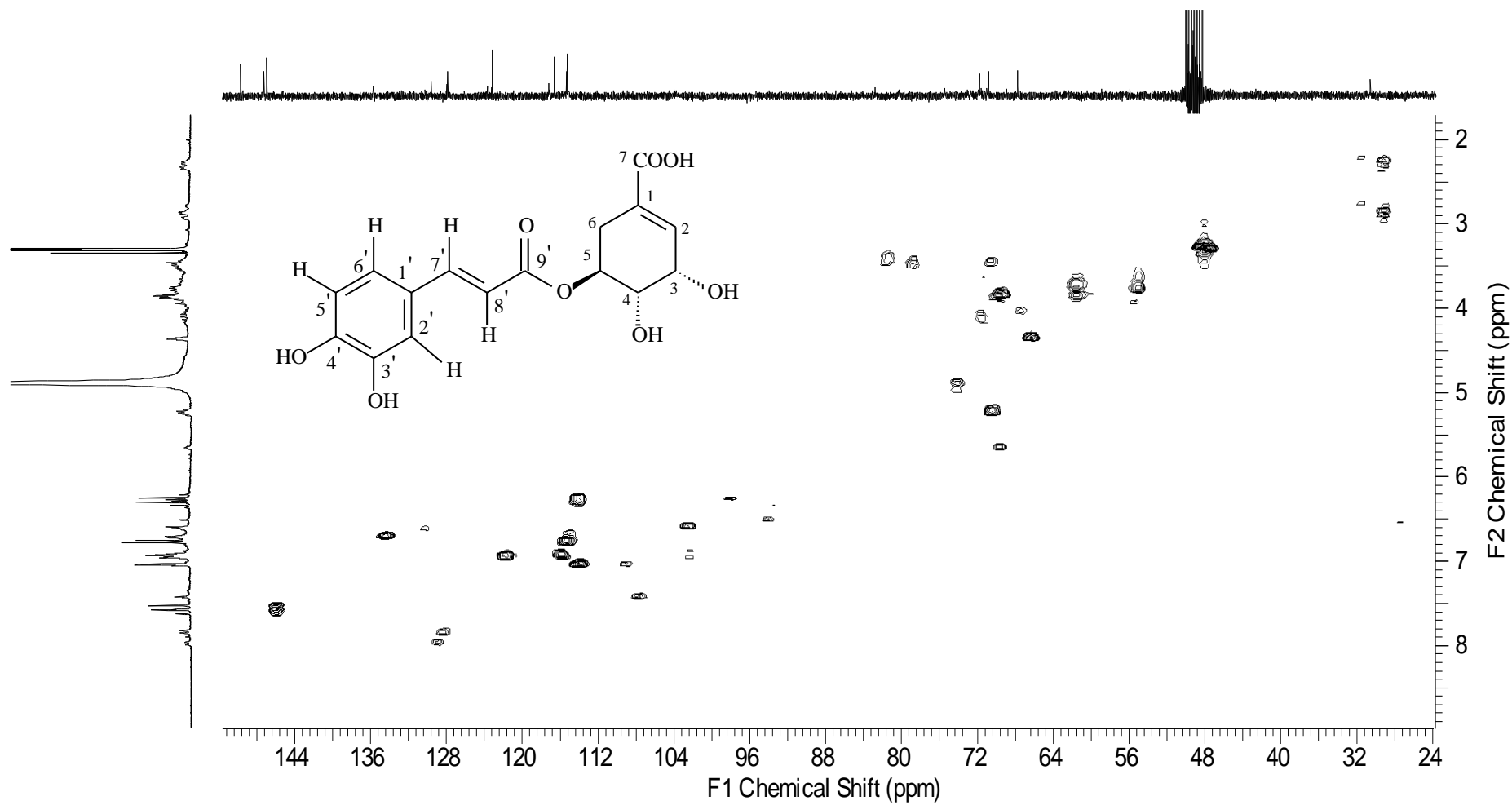
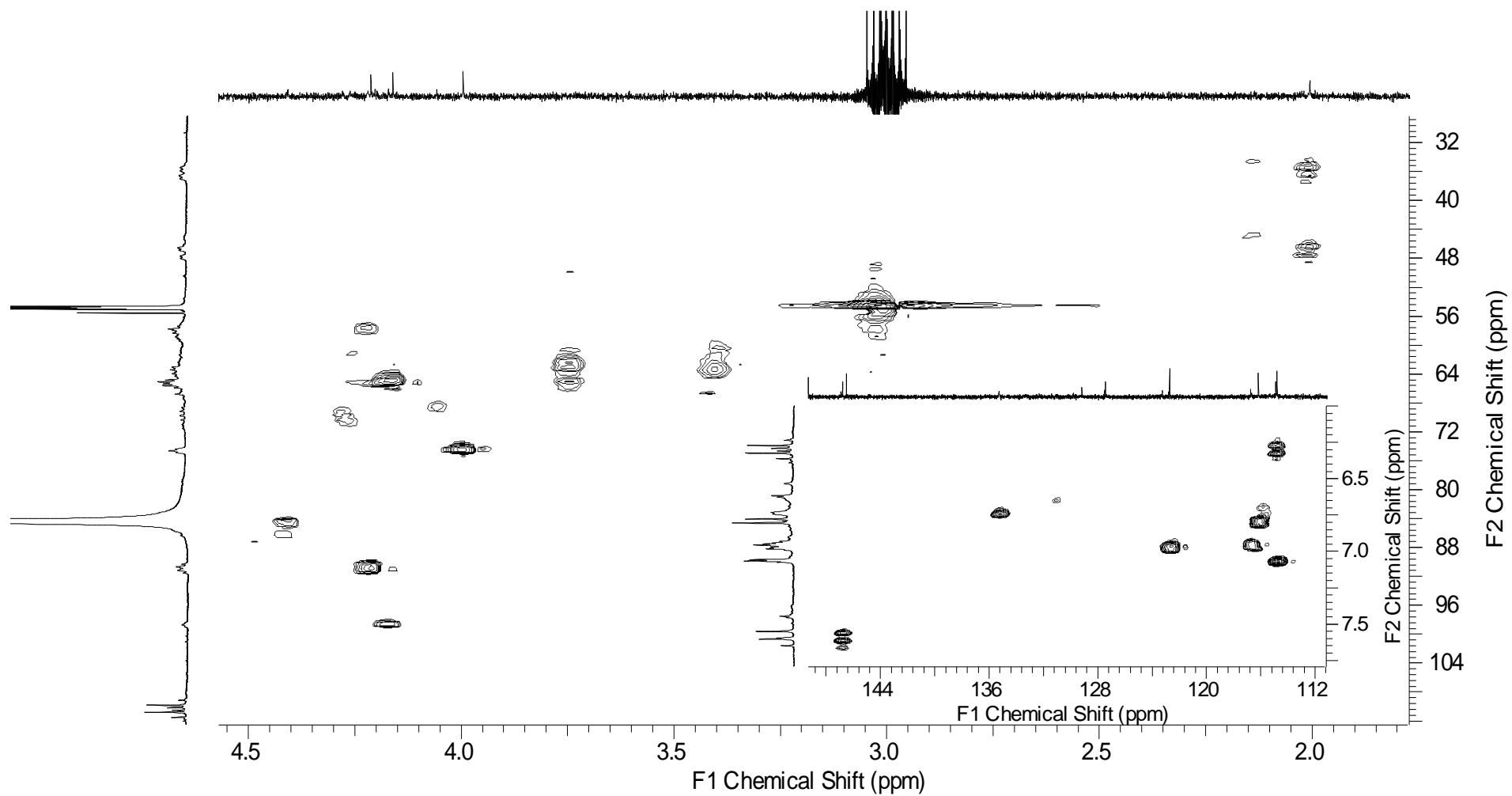


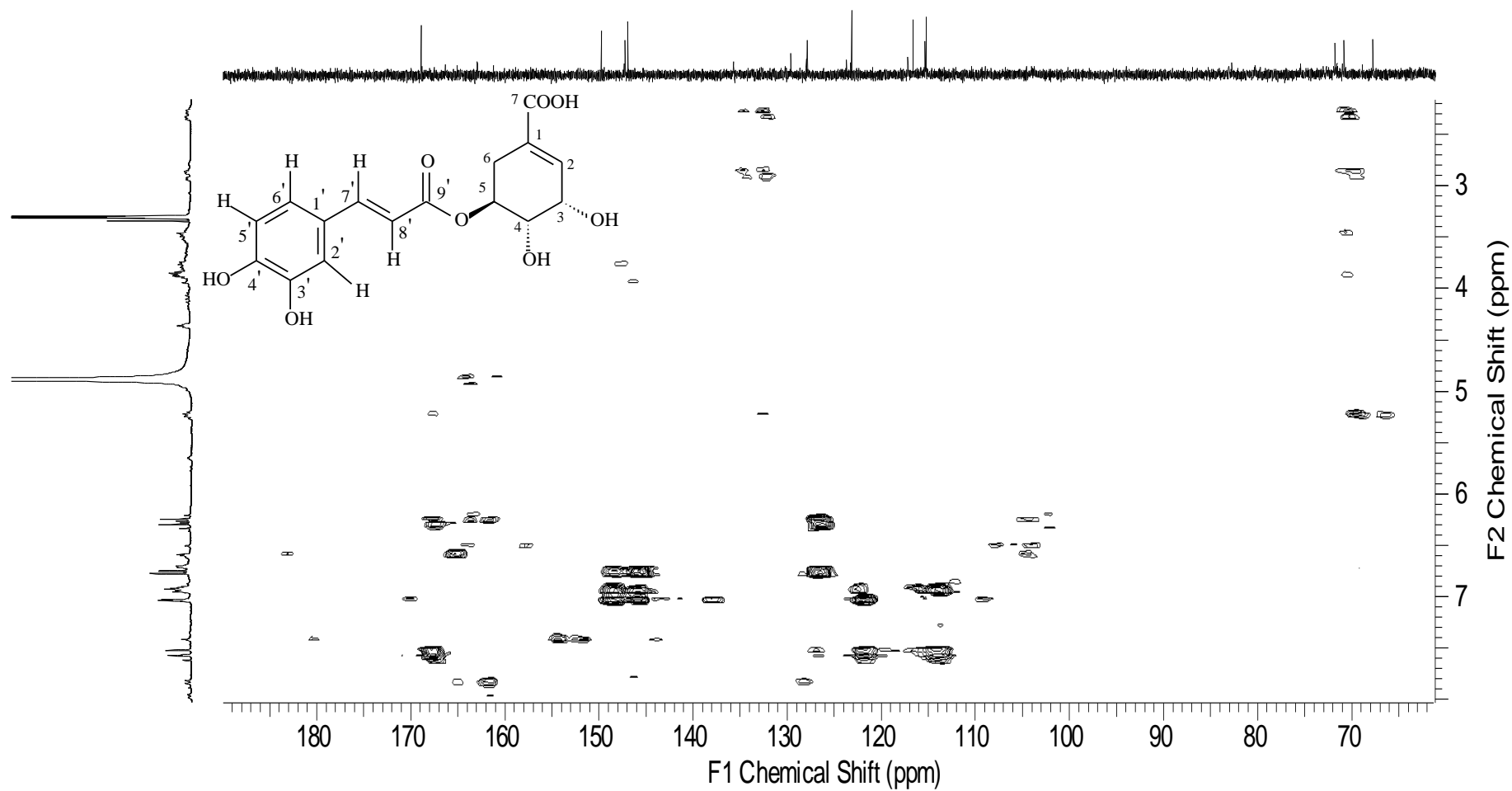
Figura 47: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (CD<sub>3</sub>OD; 75,45MHz) de M11.



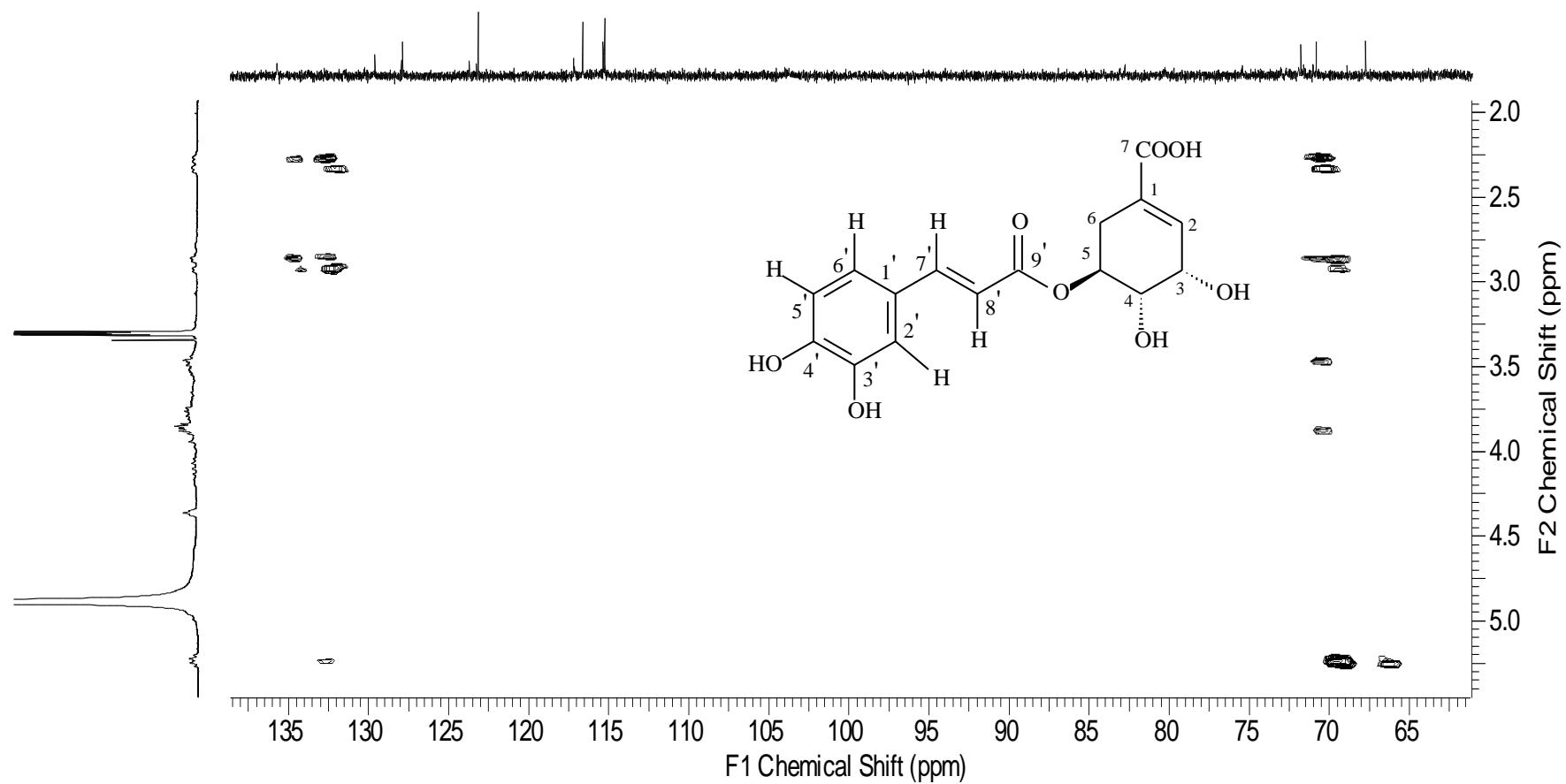
**Figura 48:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M11**.



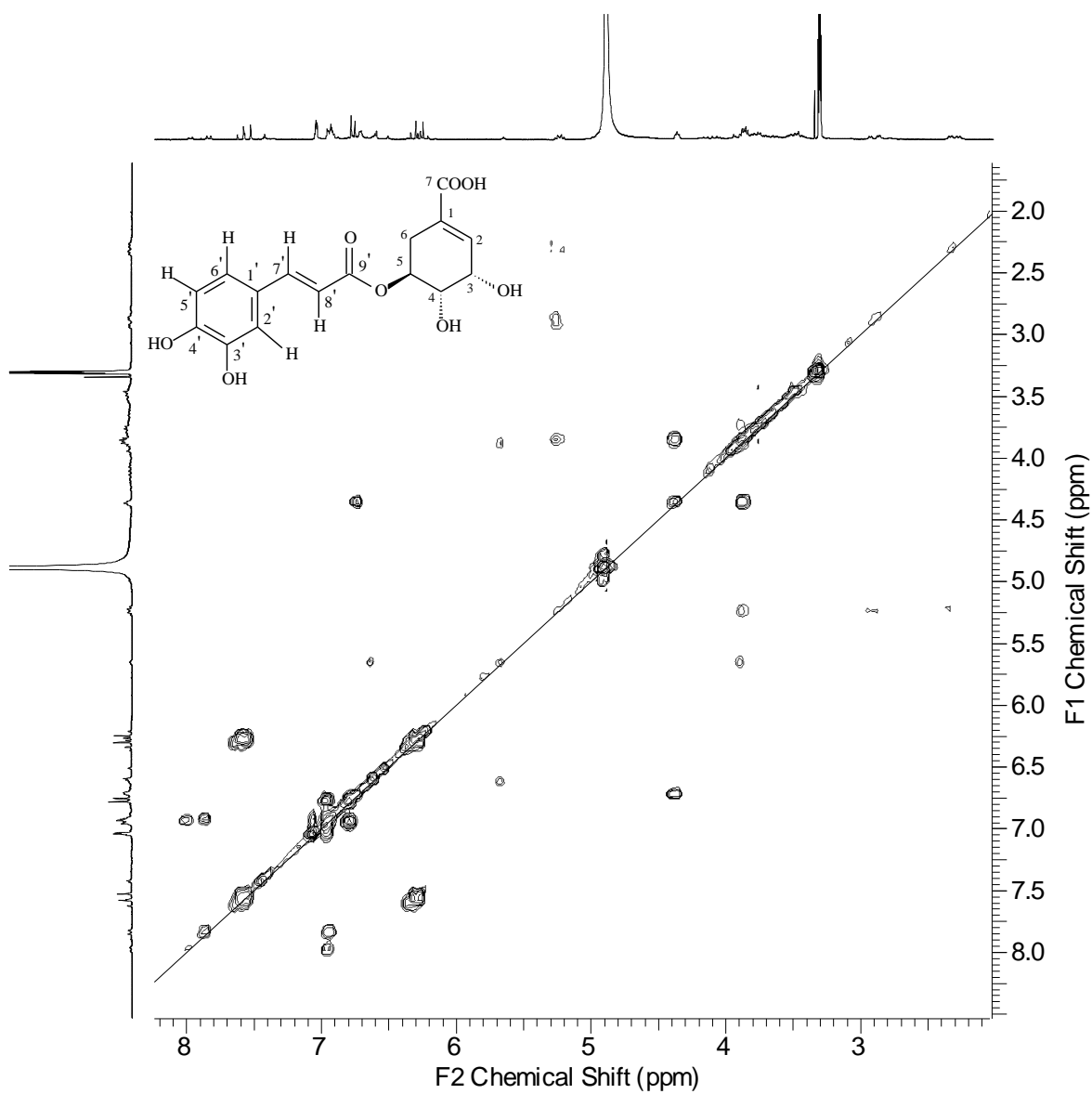
**Figura 49:** Expansões do mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M11**.



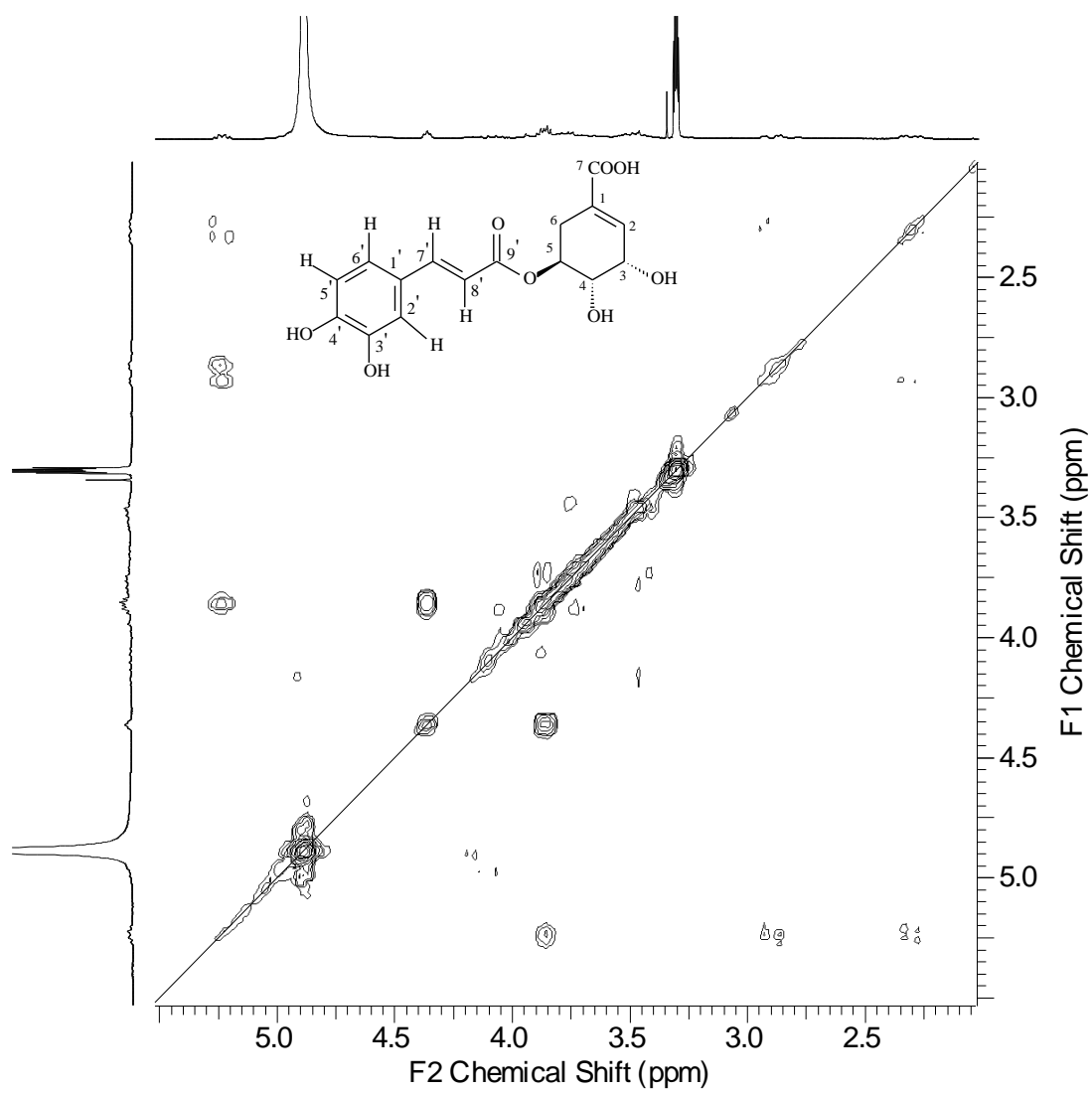
**Figura 50:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para M11.



**Figura 51:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ ) para **M11**.



**Figura 52:** Mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ ) para **M11**.



**Figura 53:** Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY (<sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H) para **M11**.



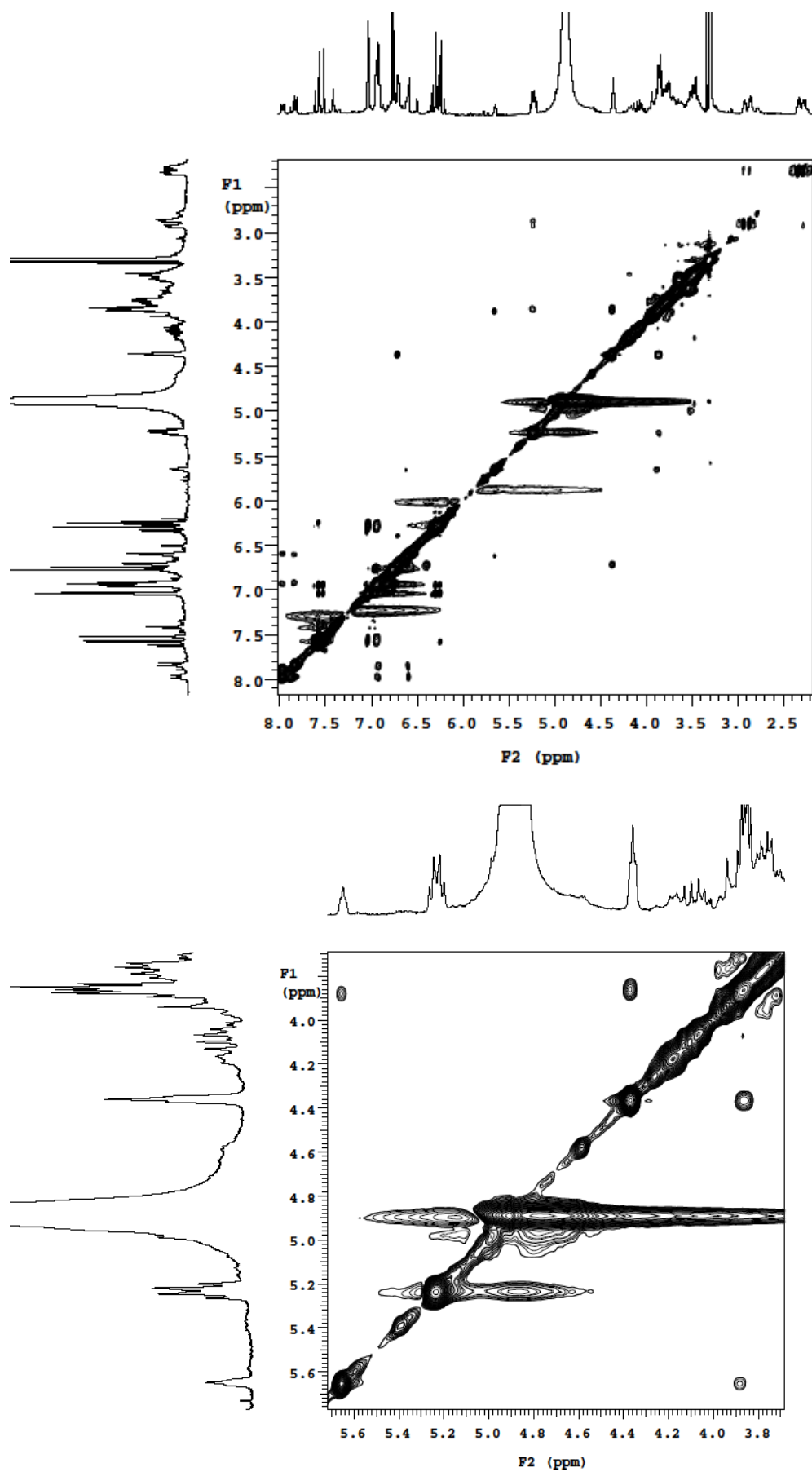
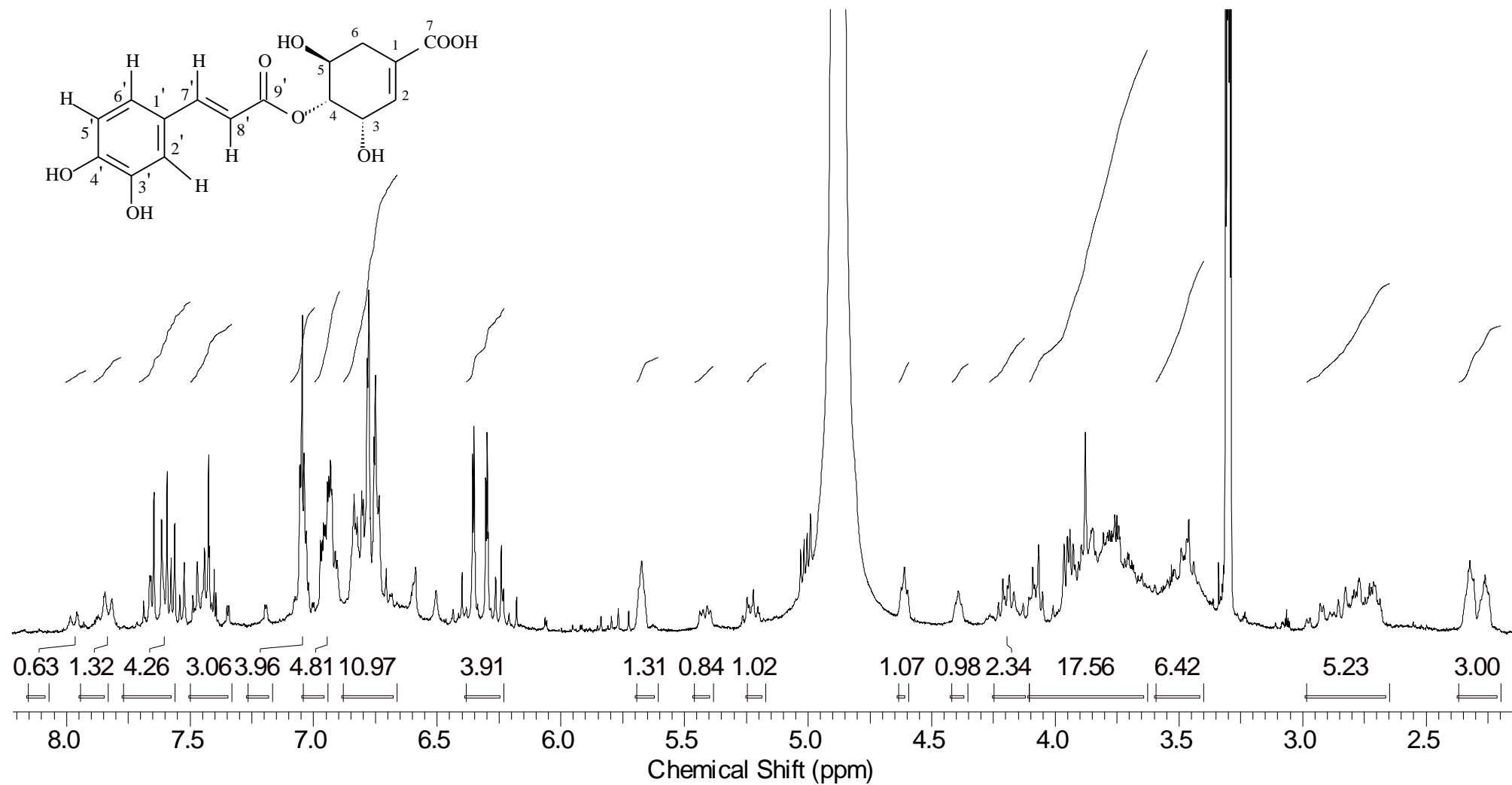
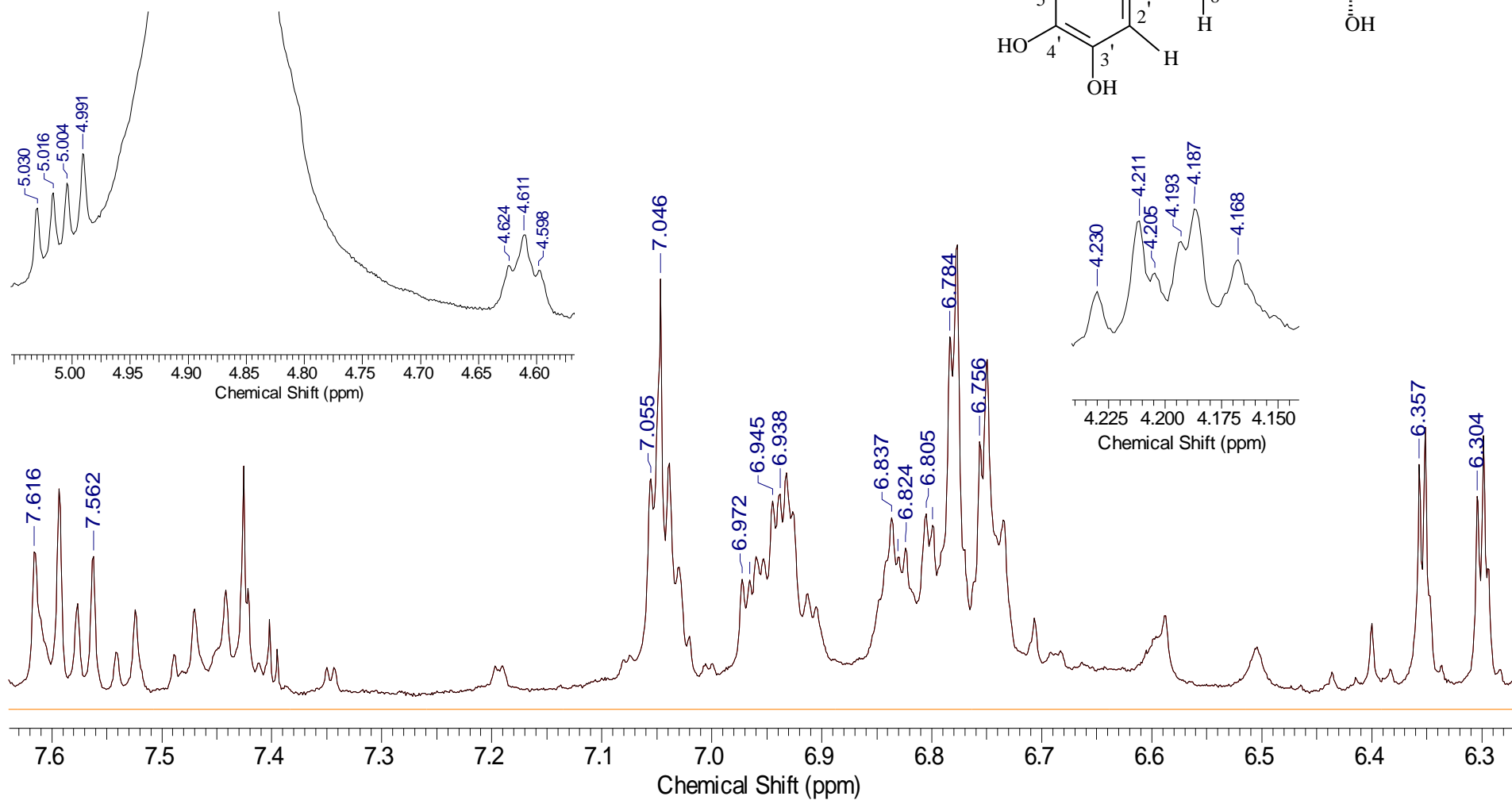
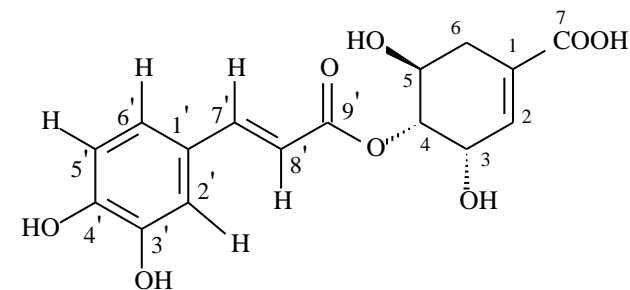


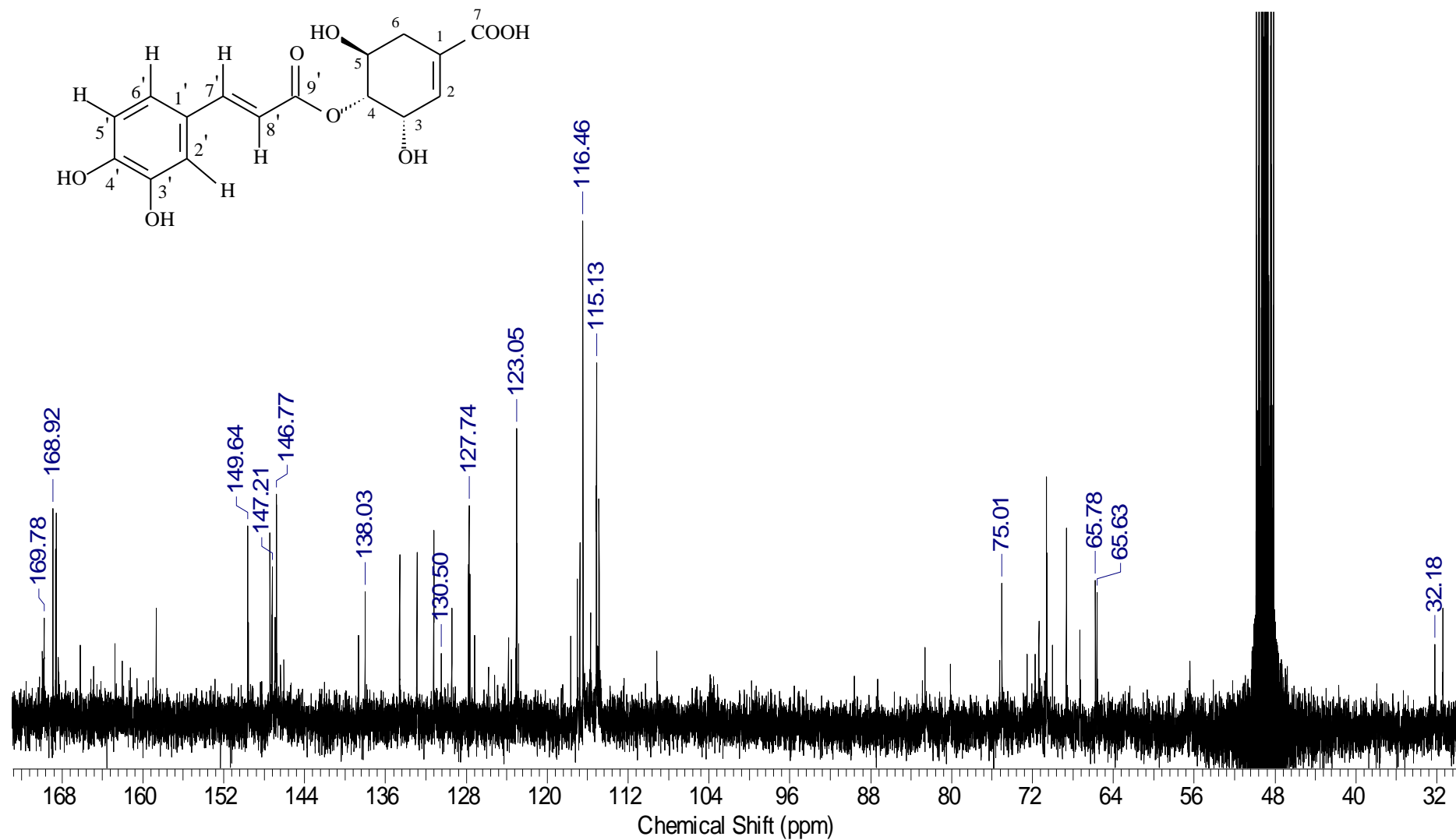
Figura 54: Mapa de correlação homonuclear NOESY e expansão ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ ) para M11.



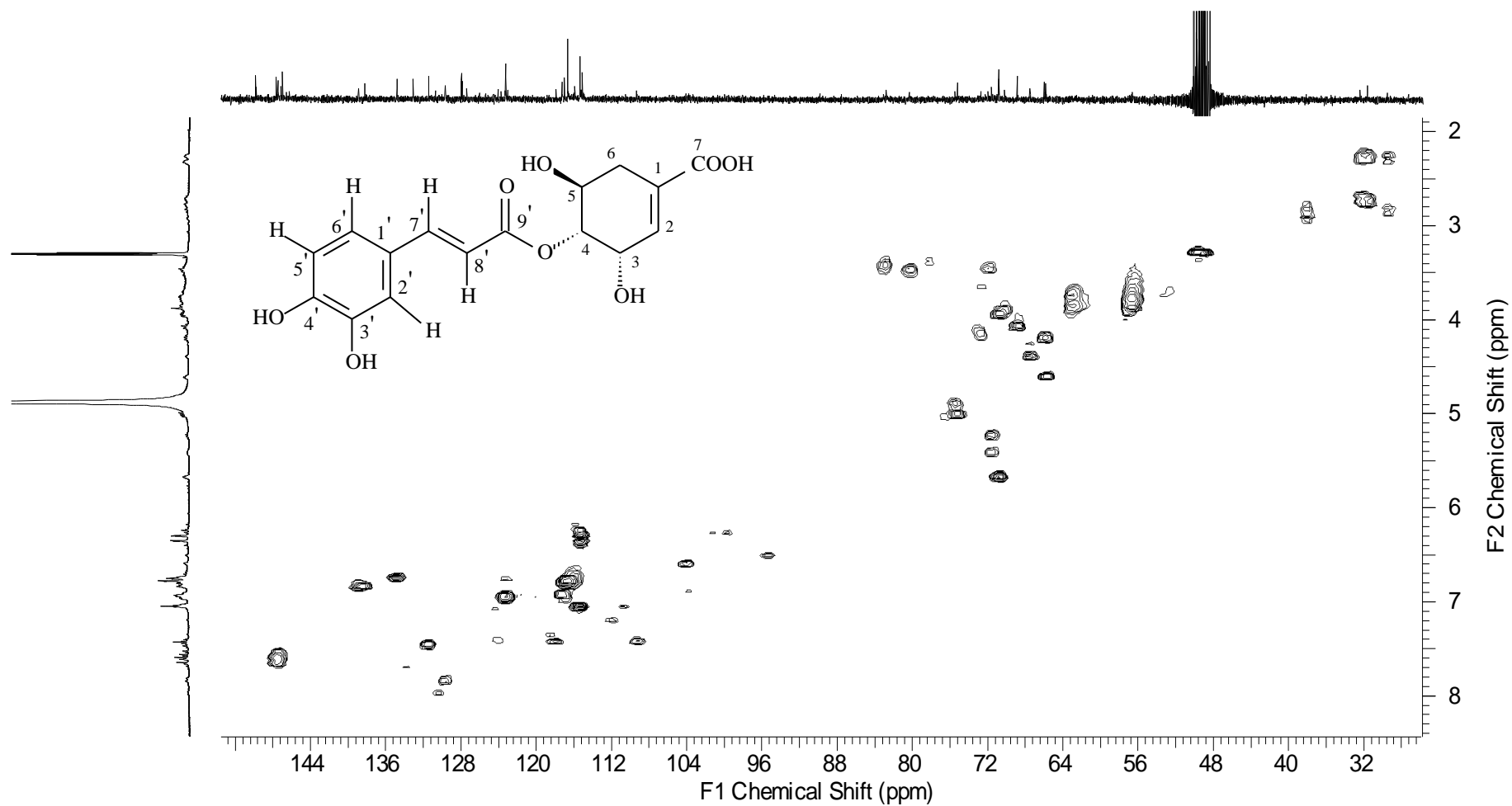
**Figura 55:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06MHz) de M12.



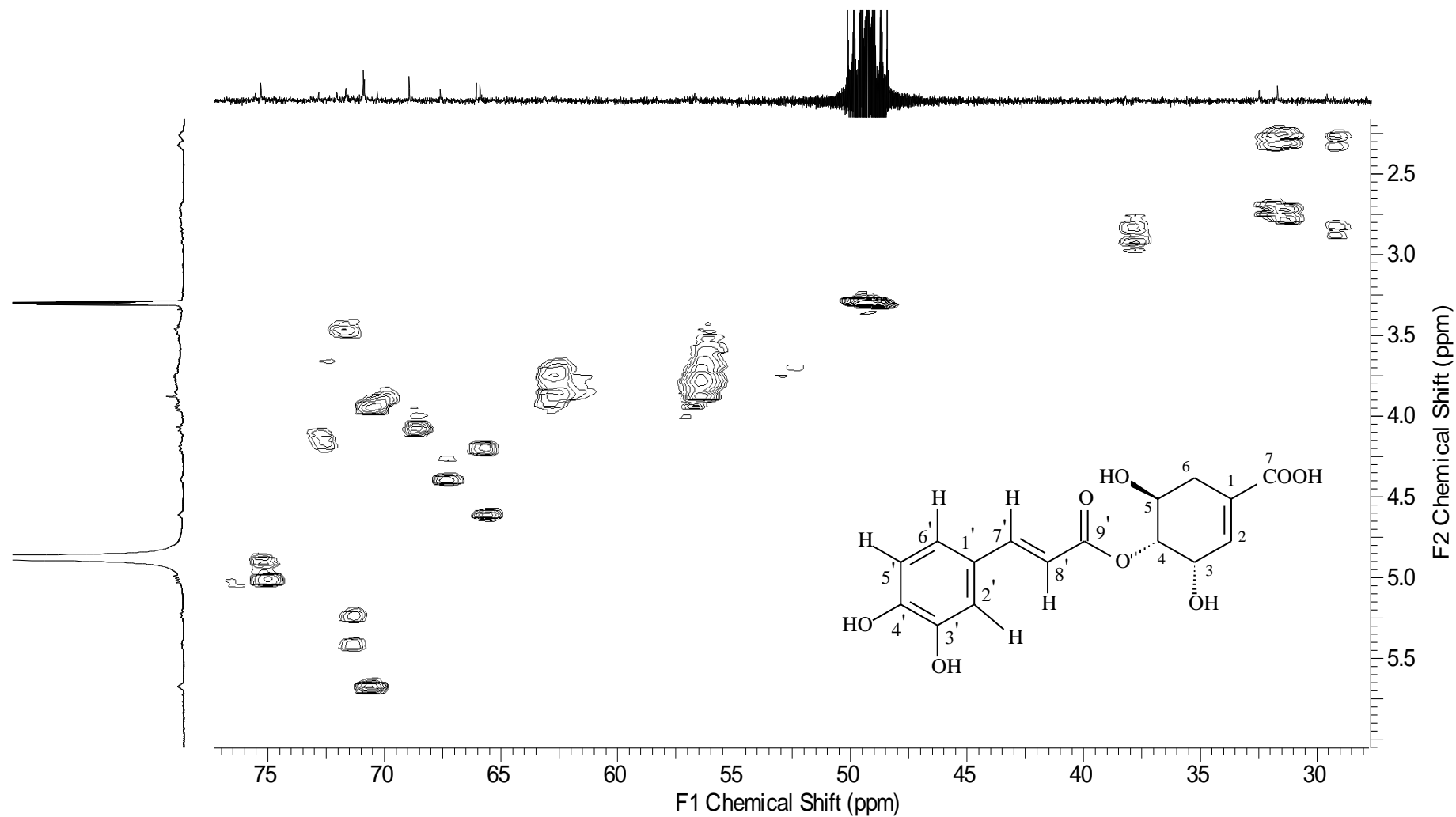
**Figura 56:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06MHz) de M12.



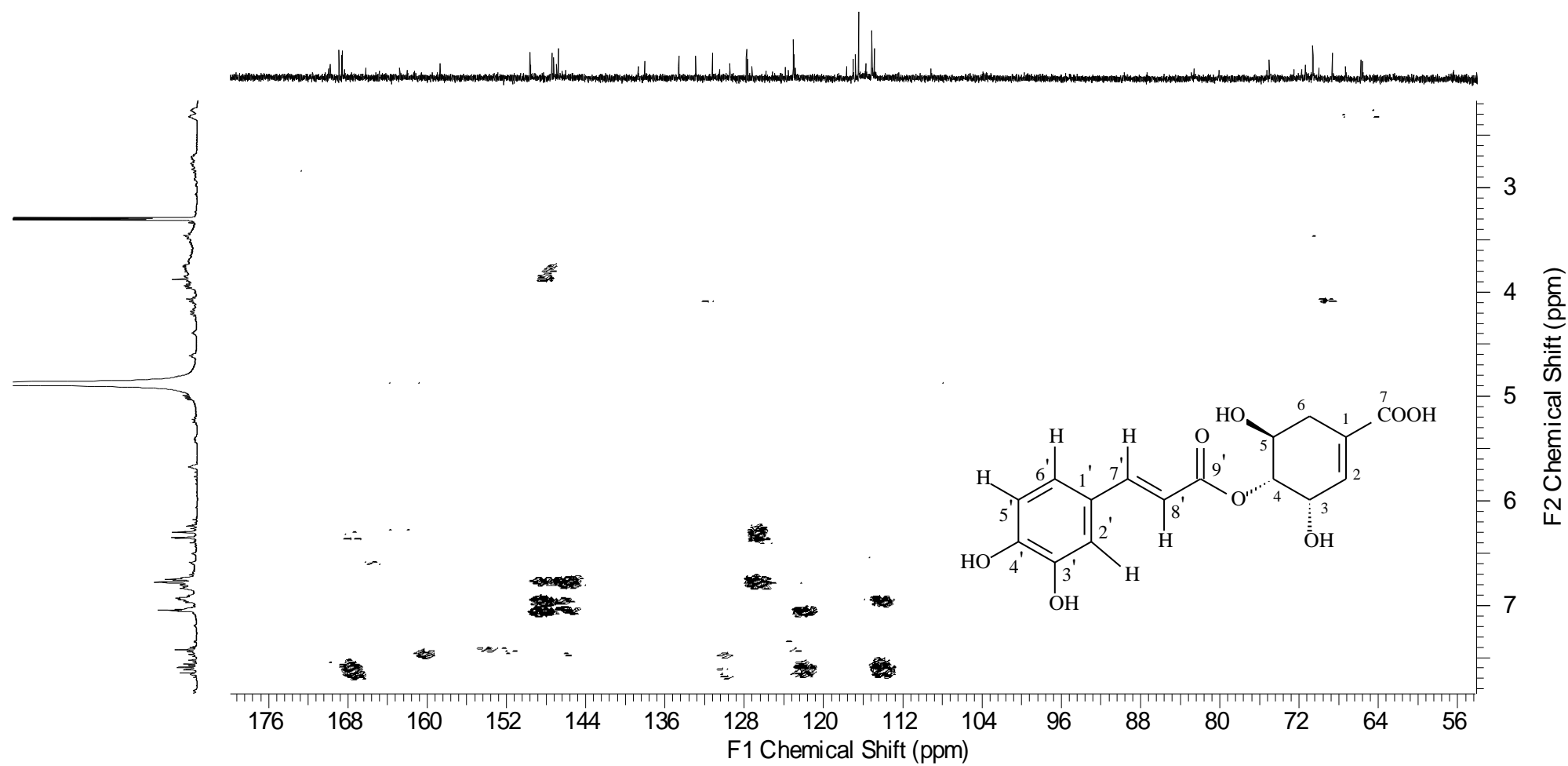
**Figura 57:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD; 75,45MHz) de M12.

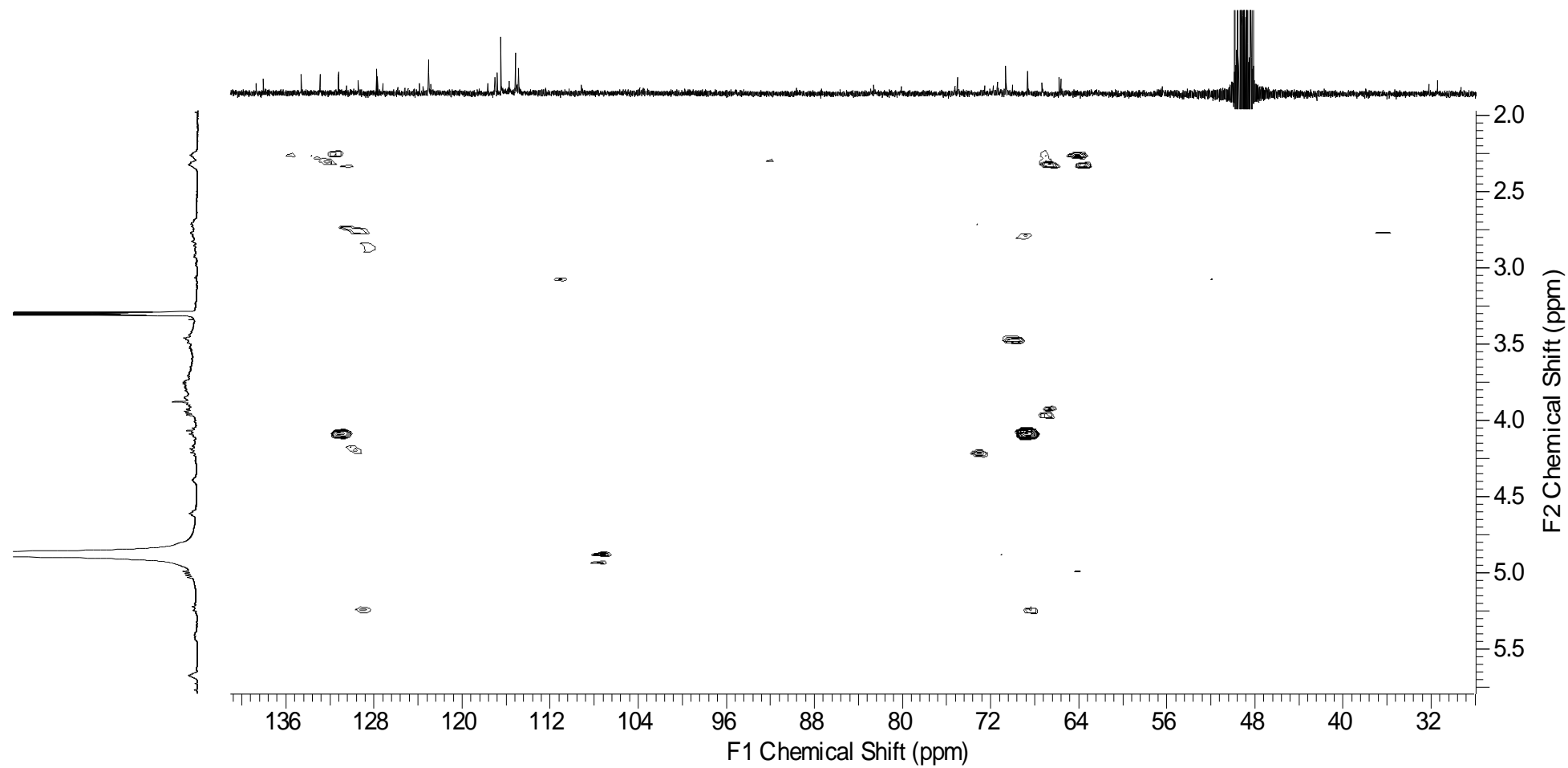


**Figura 58:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M12**.



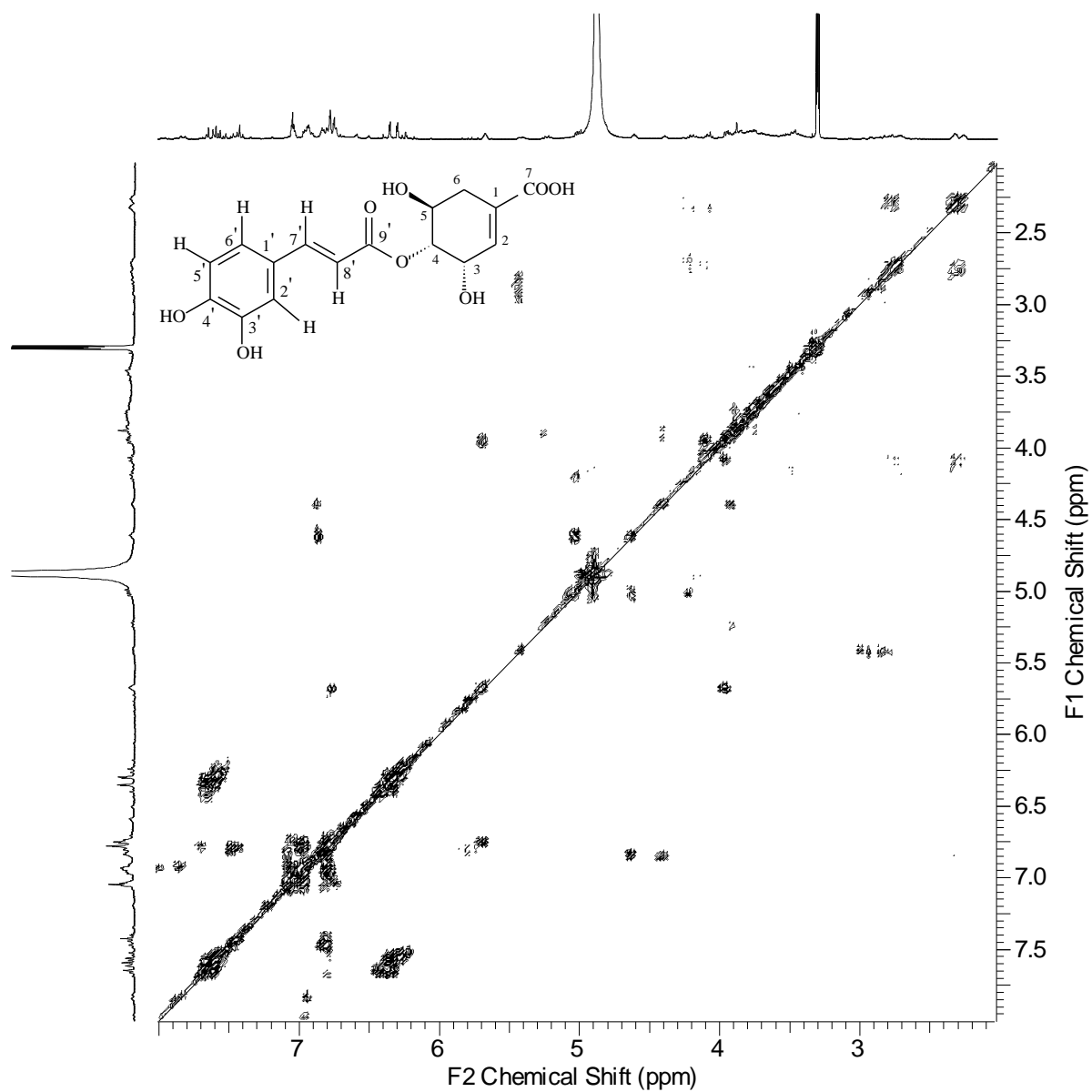
**Figura 59:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para **M12**.



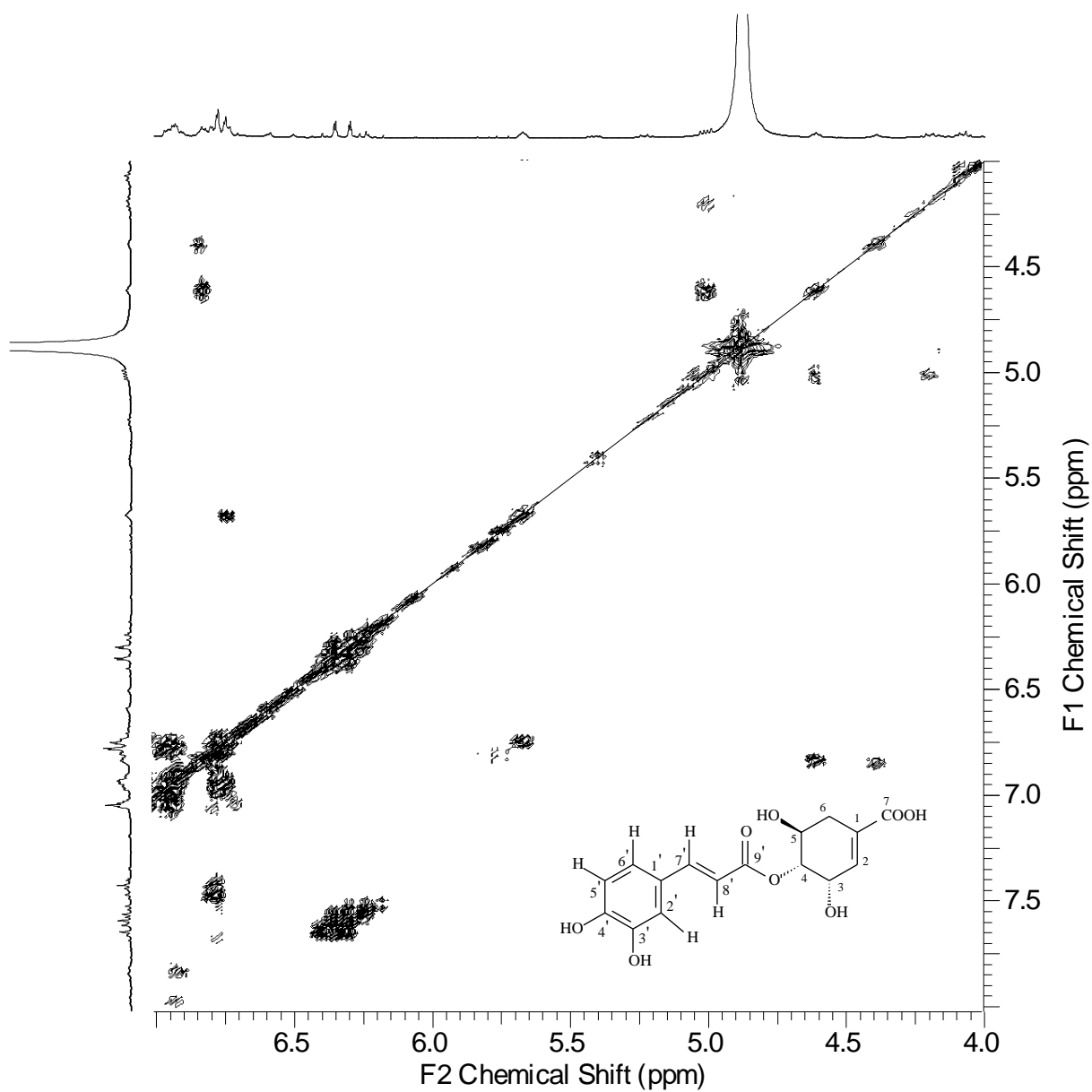


**Figura 61:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para M12.





**Figura 62:** Mapa de correlação homonuclear COSY (<sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H) para M12.



**Figura 63:** Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ ) para M12.

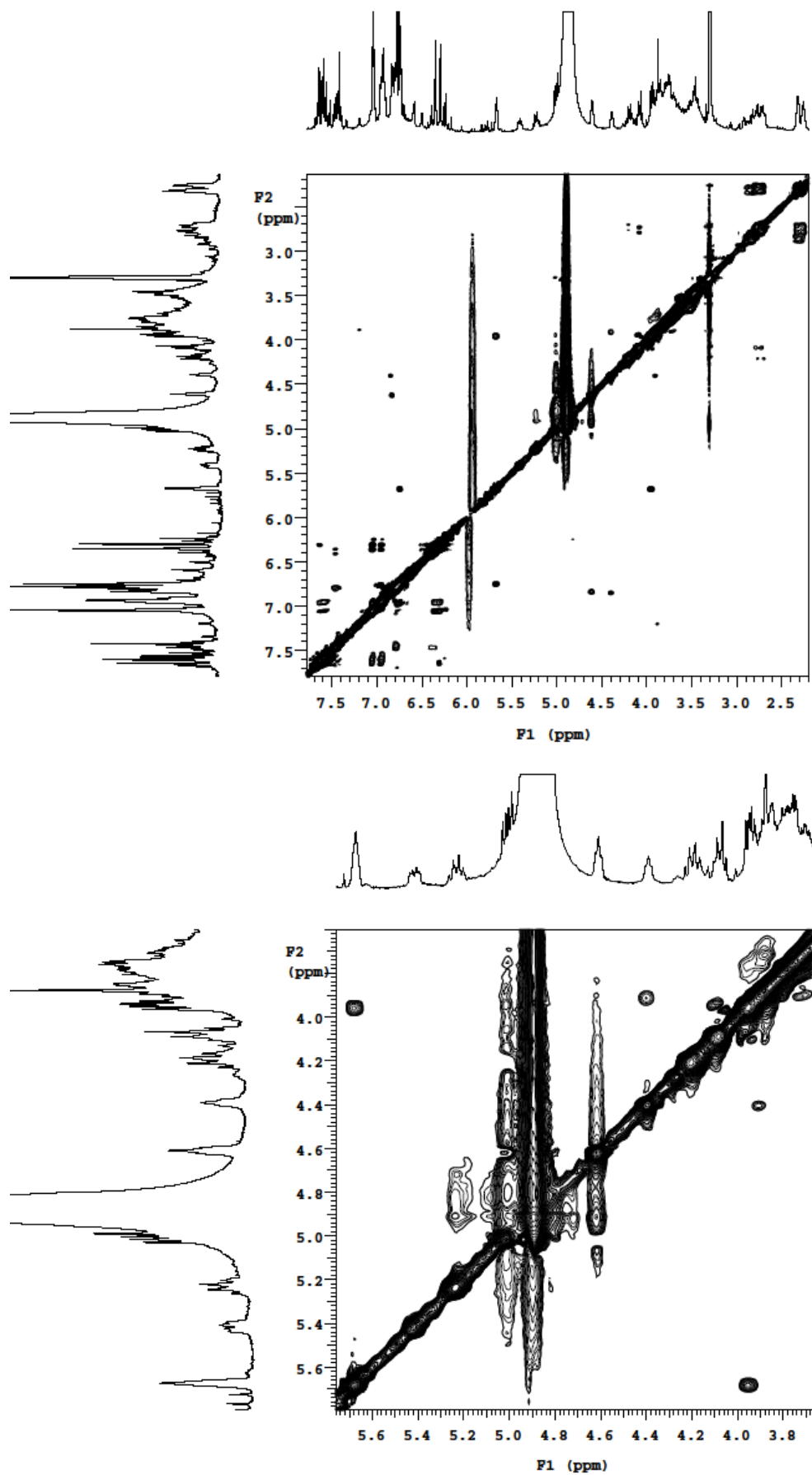
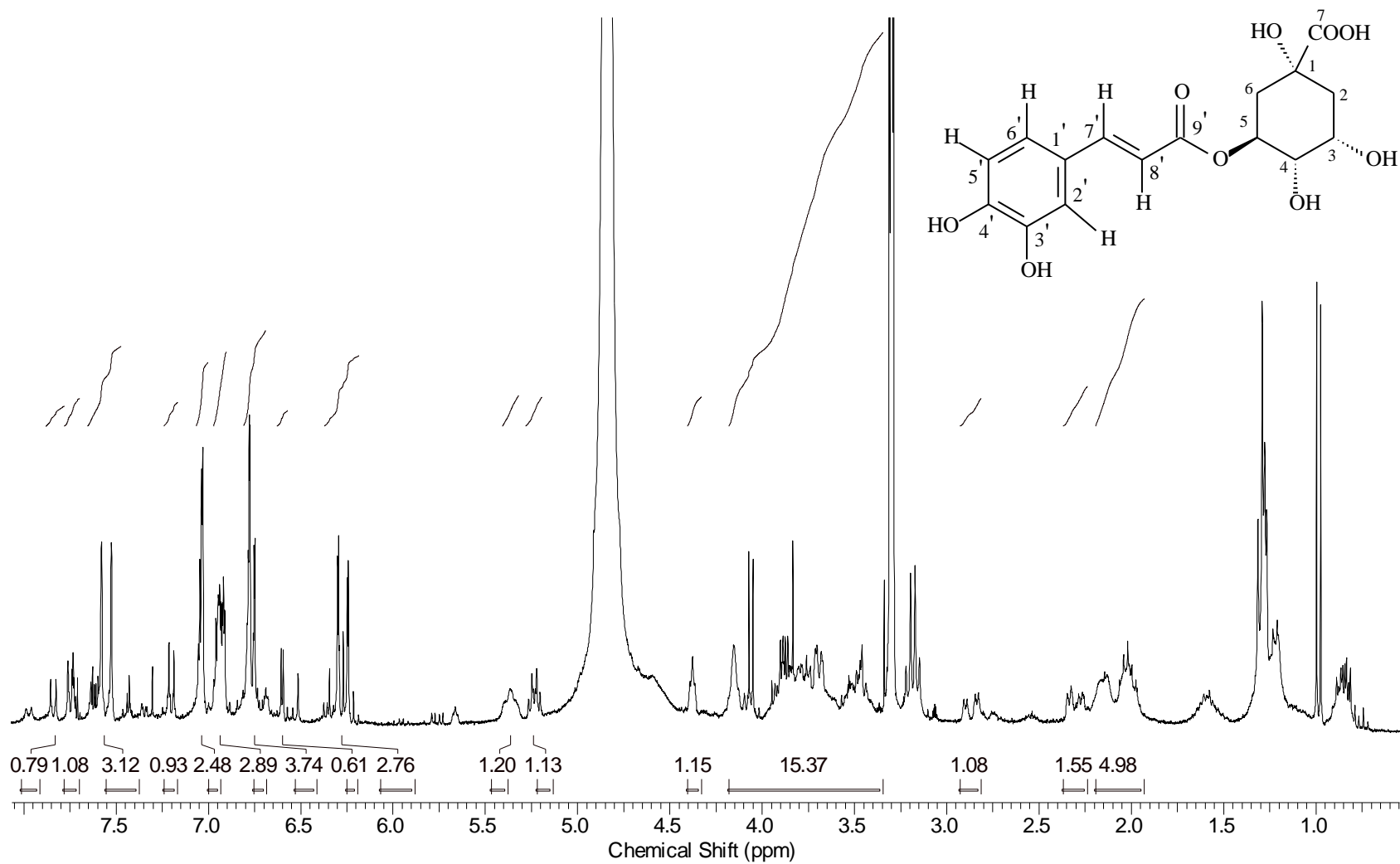
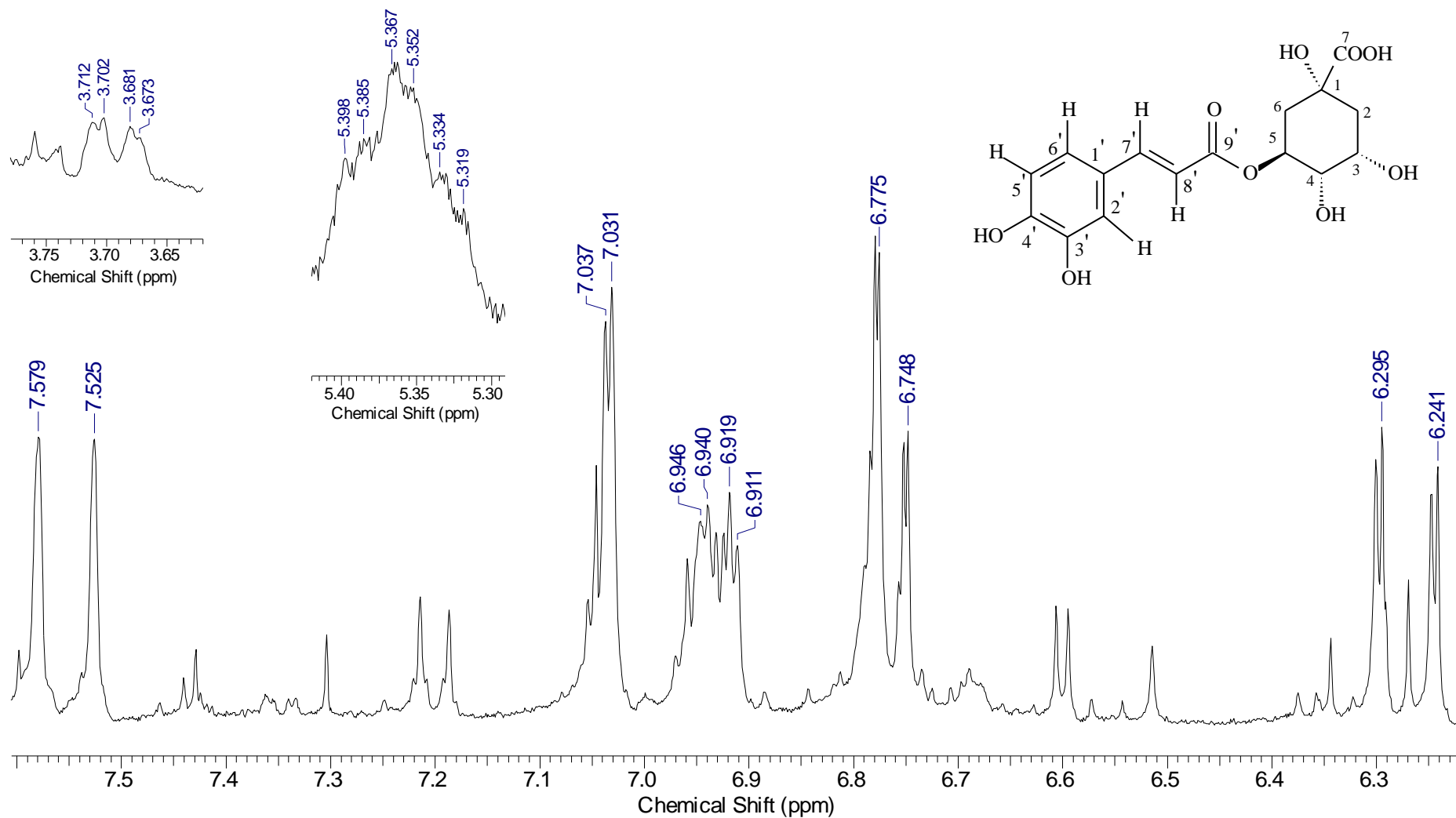


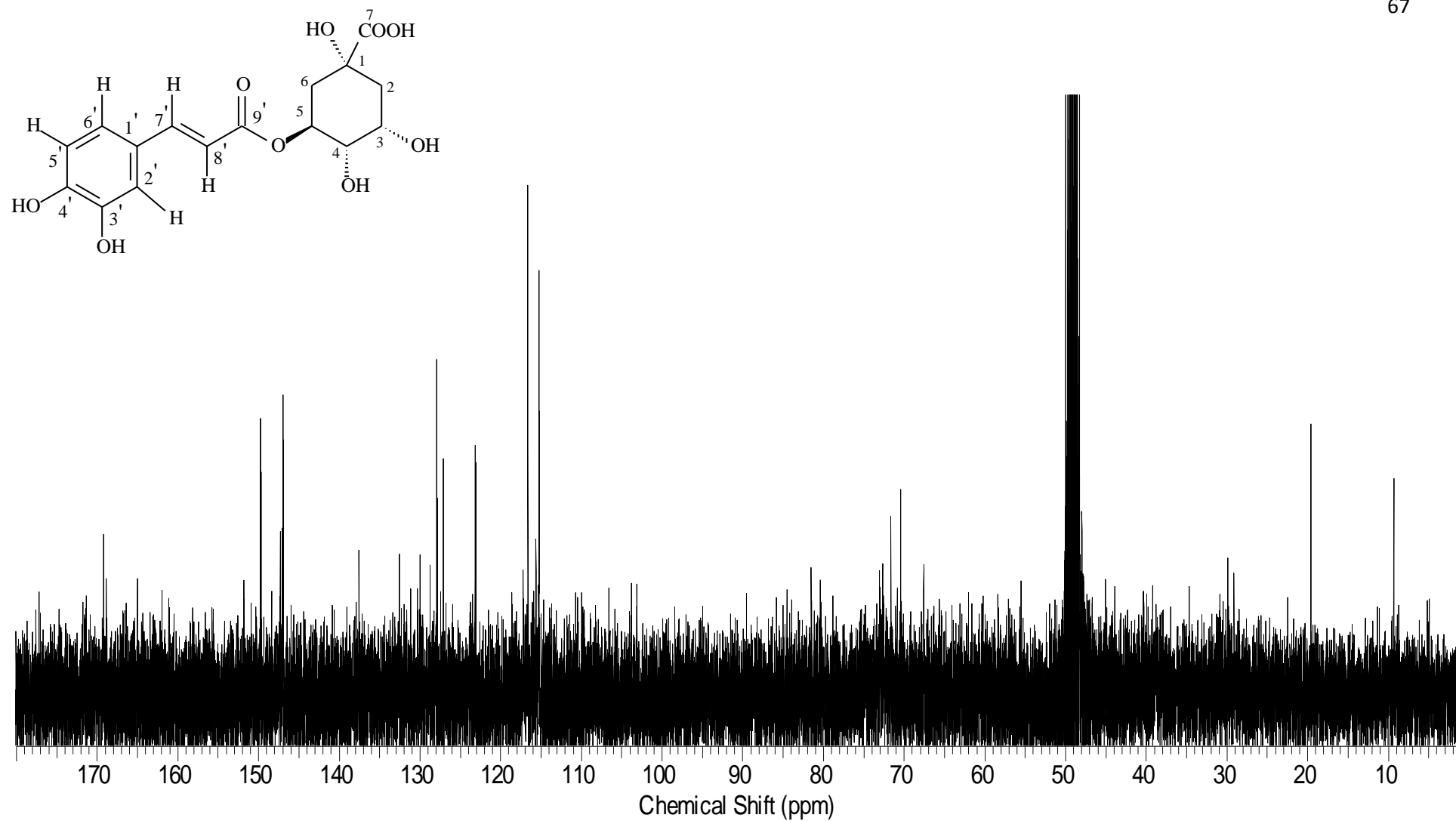
Figura 64: Mapa de correlação homonuclear NOESY e expansão ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ ) para M12.



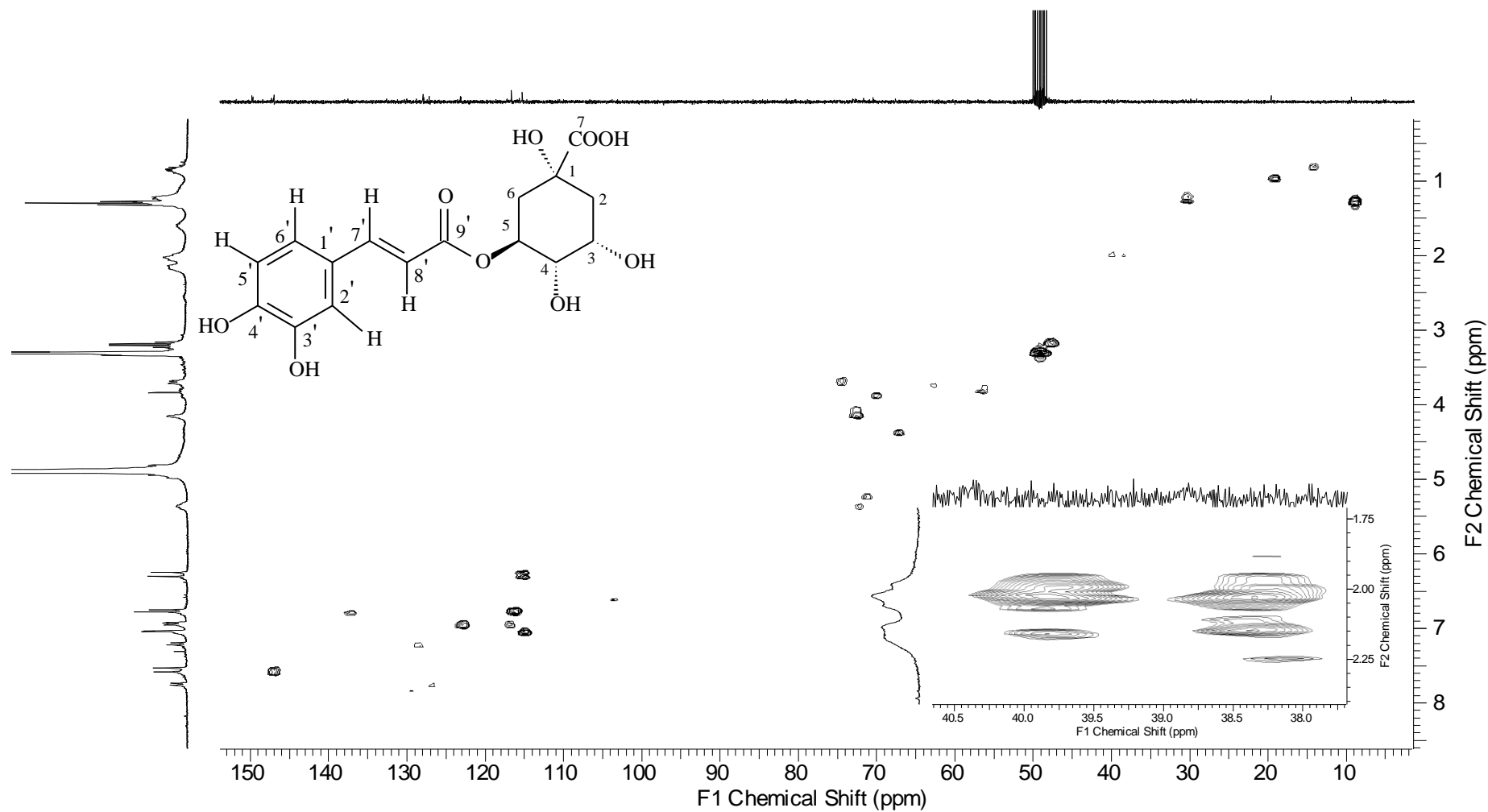
**Figura 65:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06MHz) de **M13**.



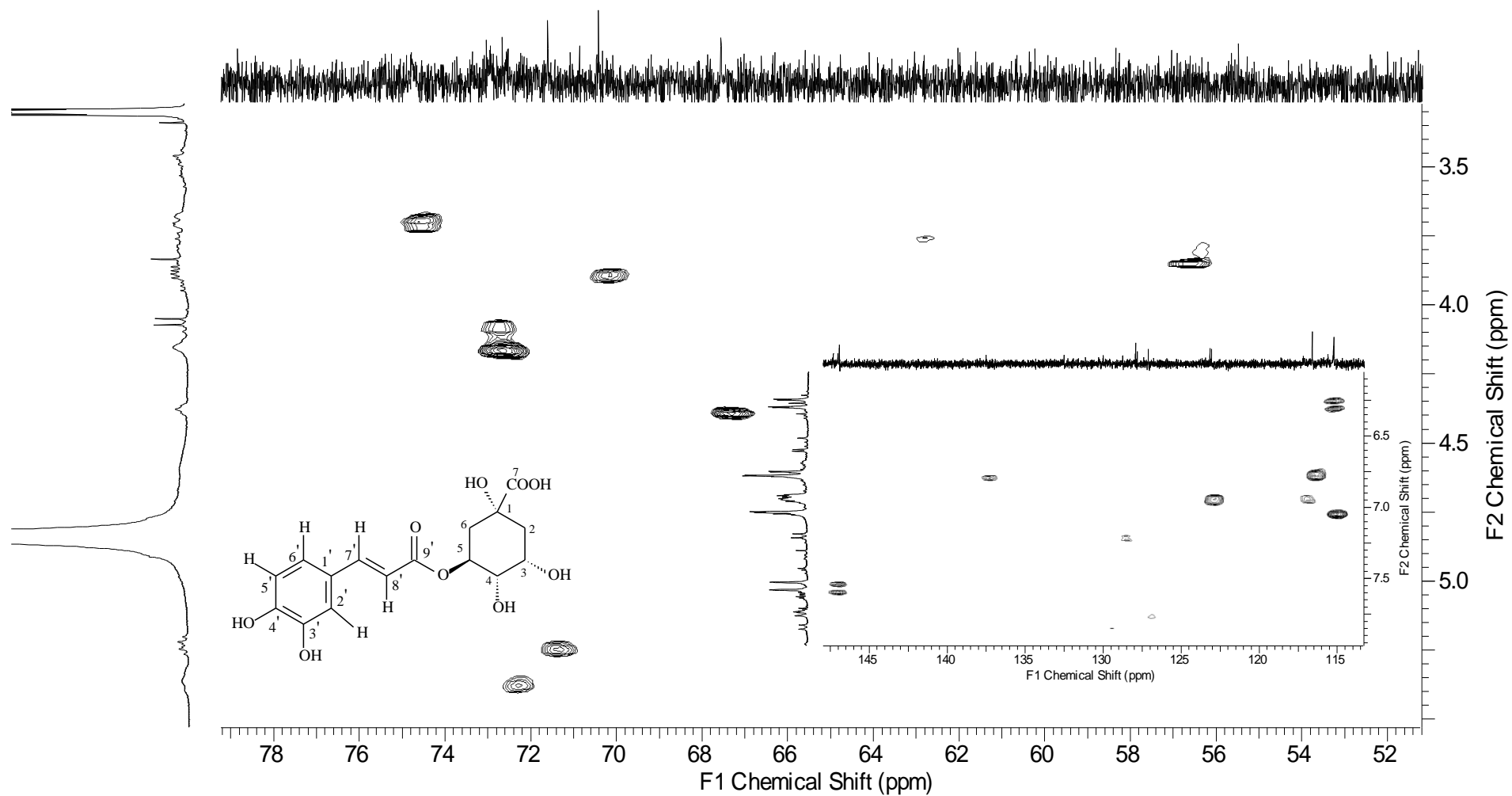
**Figura 66:** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300,06MHz) de M13.



**Figura 67:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 75,45MHz) de M13.

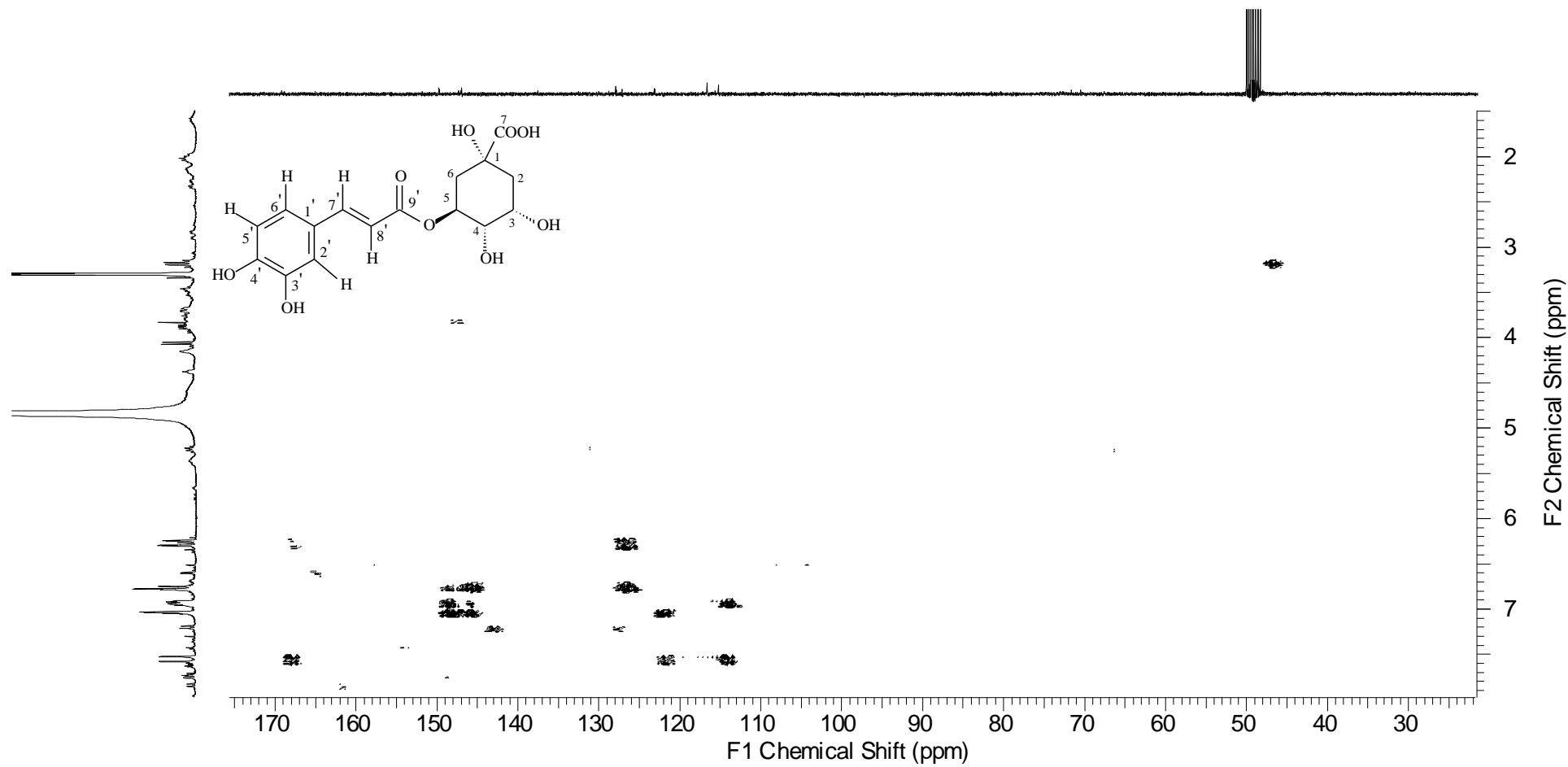


**Figura 68:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) com expansão para M13.

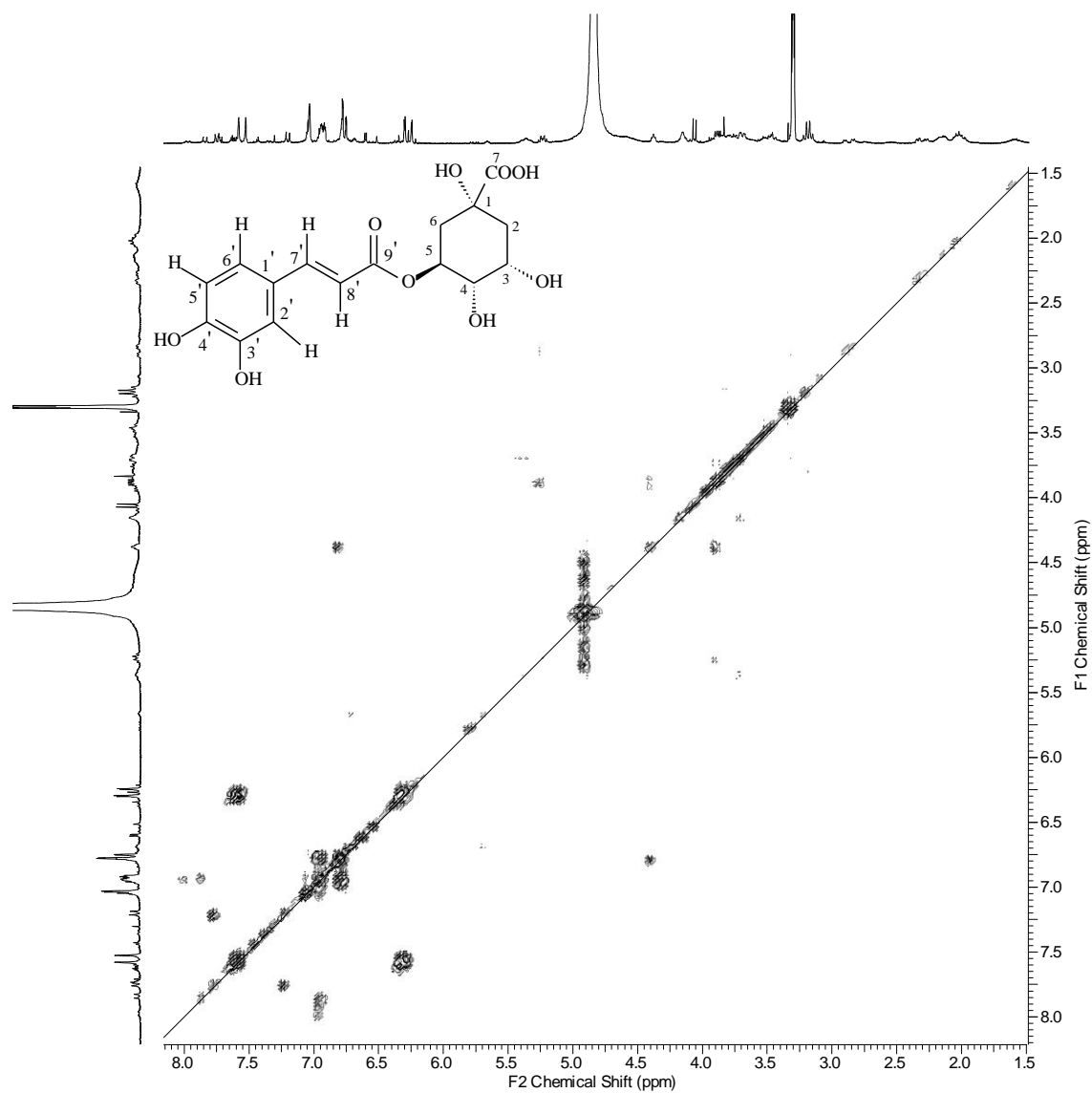


**Figura 69:** Expansão do mapa de correlação heteronuclear HSQC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) com expansão para **M13**.

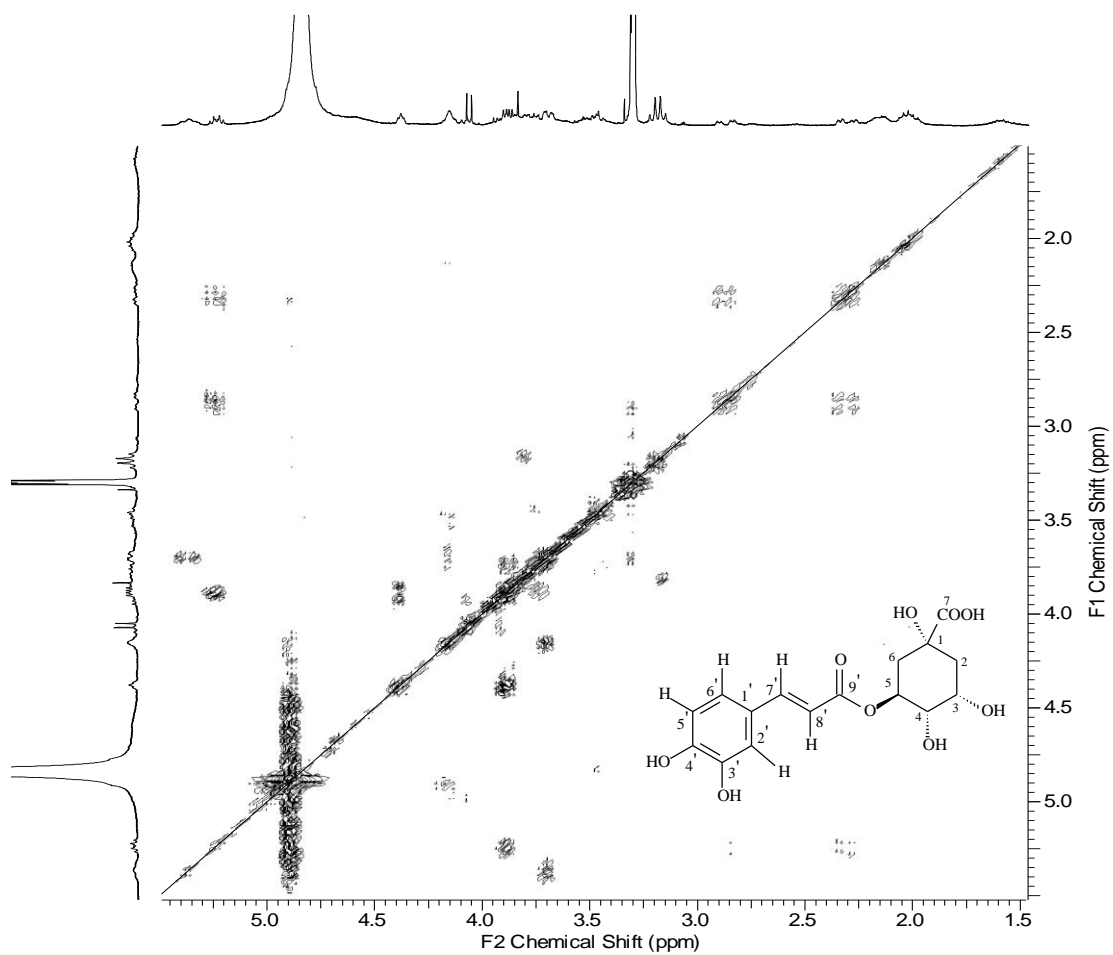




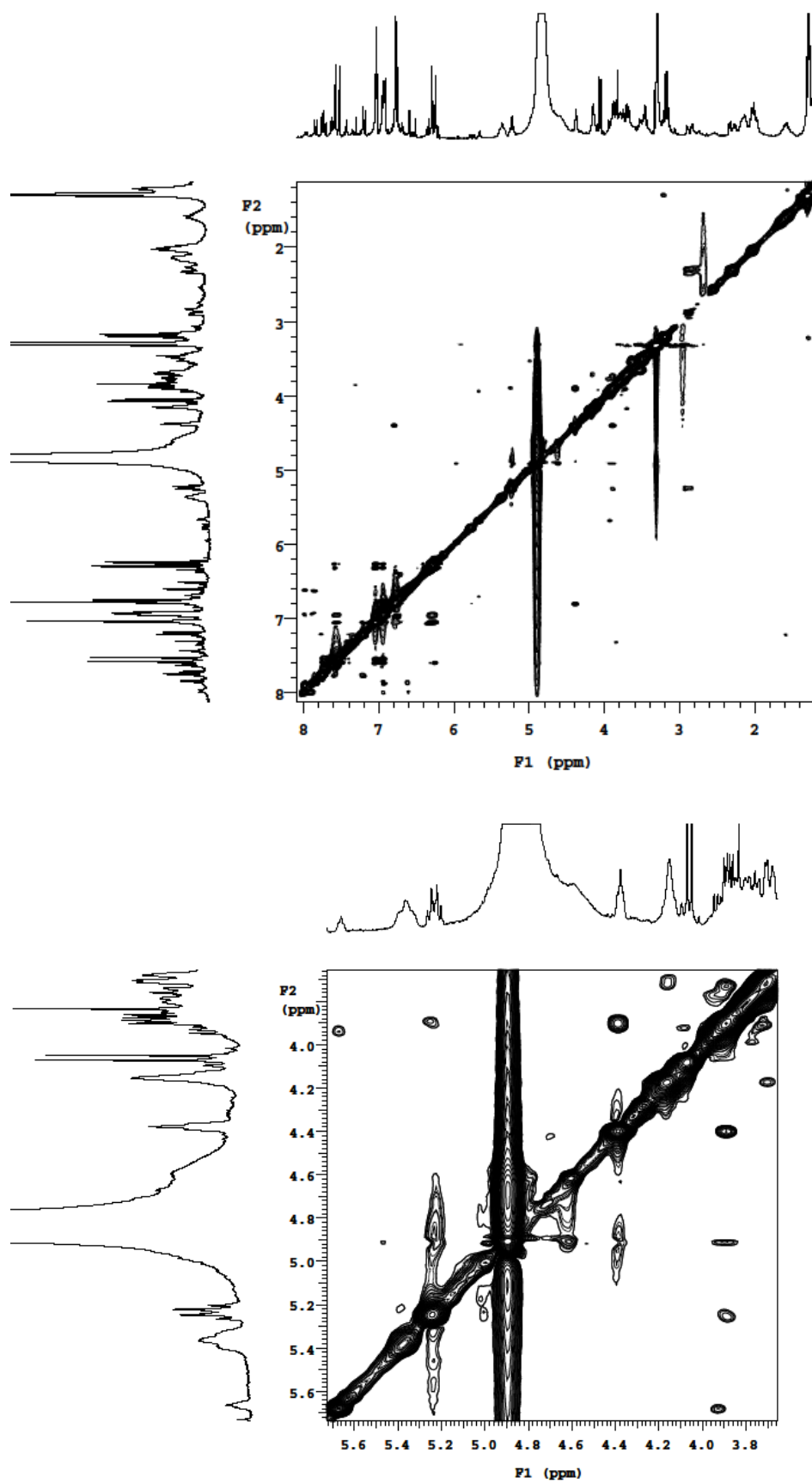
**Figura 70:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC ( $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ ) para M13.



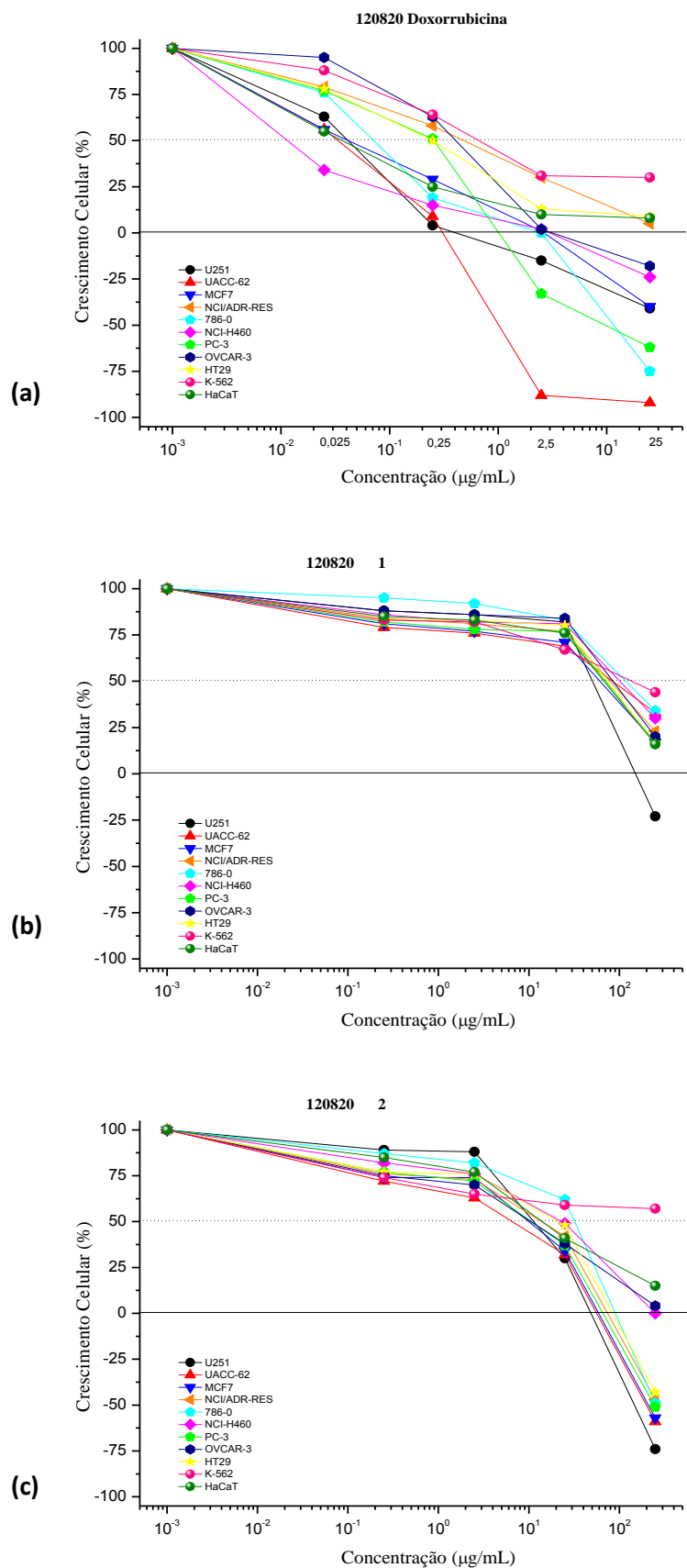
**Figura 71:** Mapa de correlação homonuclear COSY (<sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H) para M13.



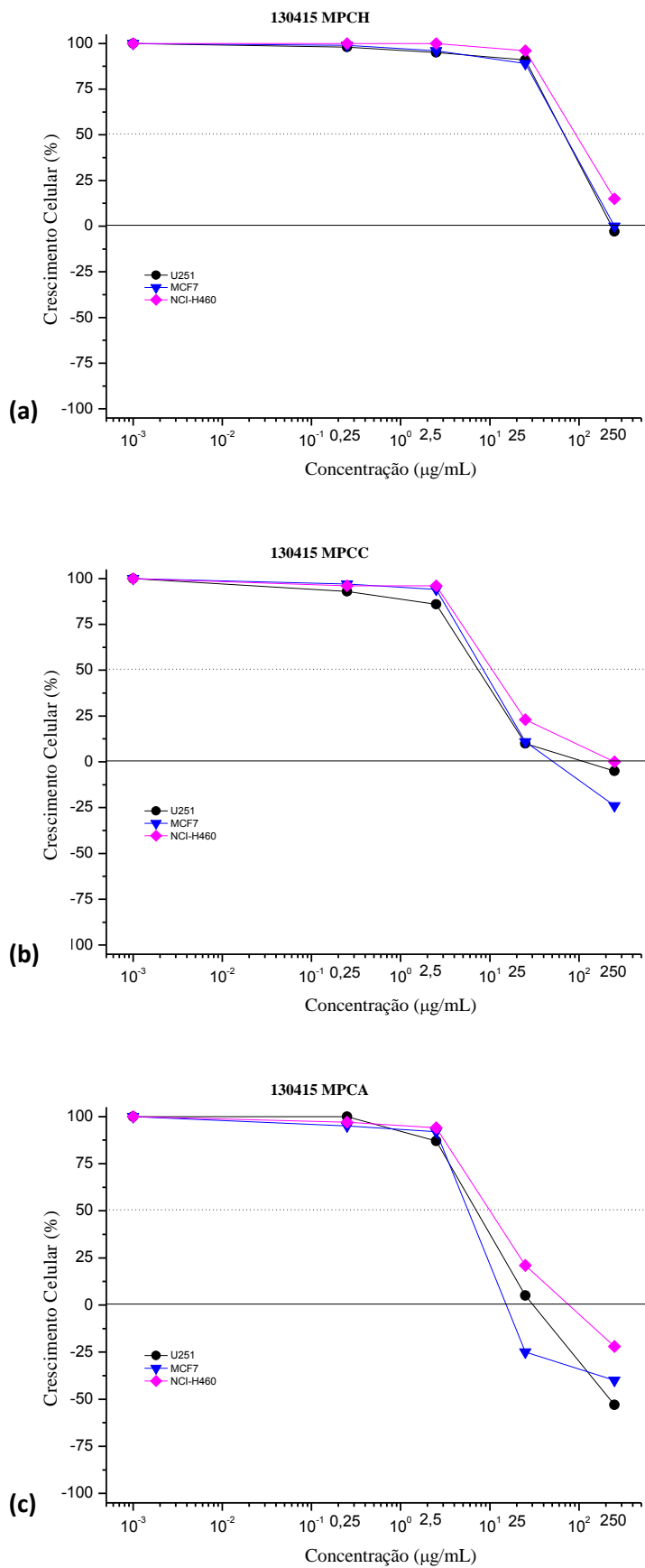
**Figura 72:** Expansão do mapa de correlação homonuclear COSY (<sup>1</sup>Hx<sup>1</sup>H) para **M13**.



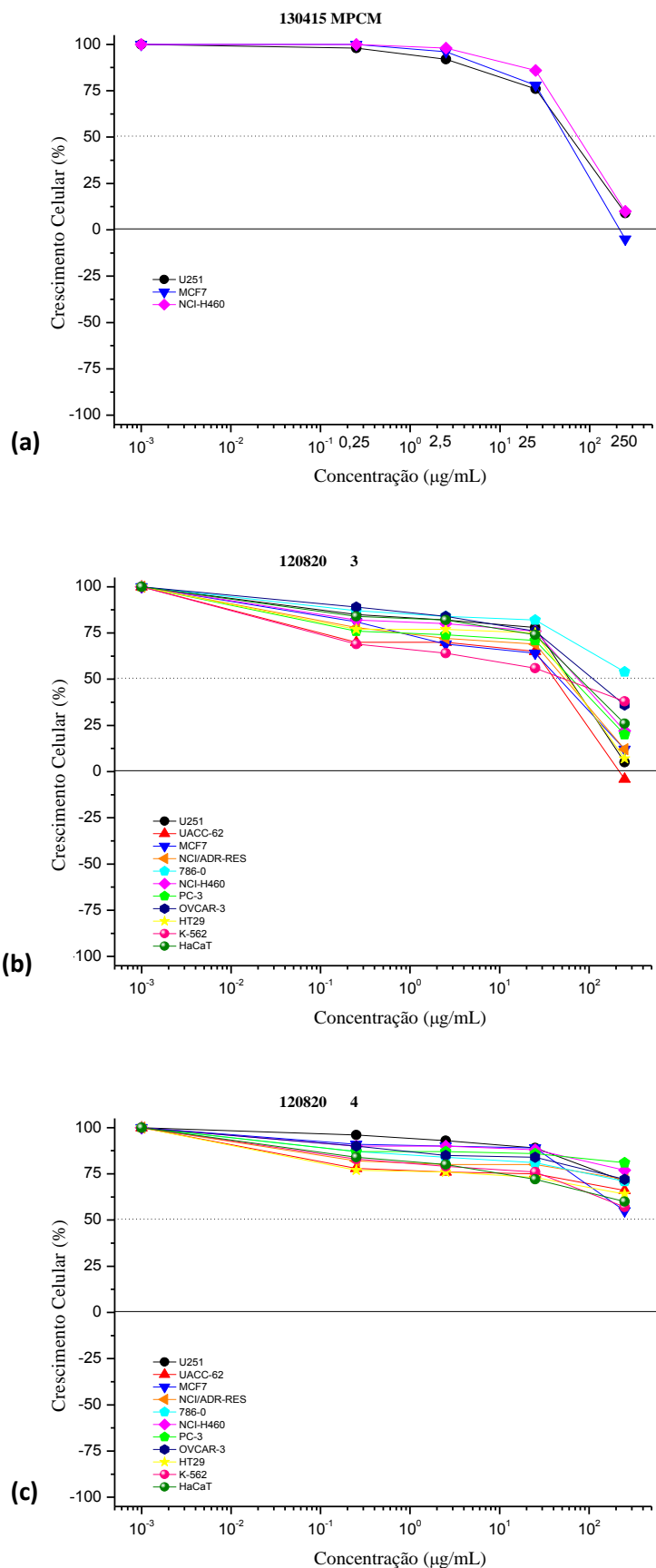
**Figura 73:** Mapa de correlação homonuclear NOESY e expansão ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ ) para M13.



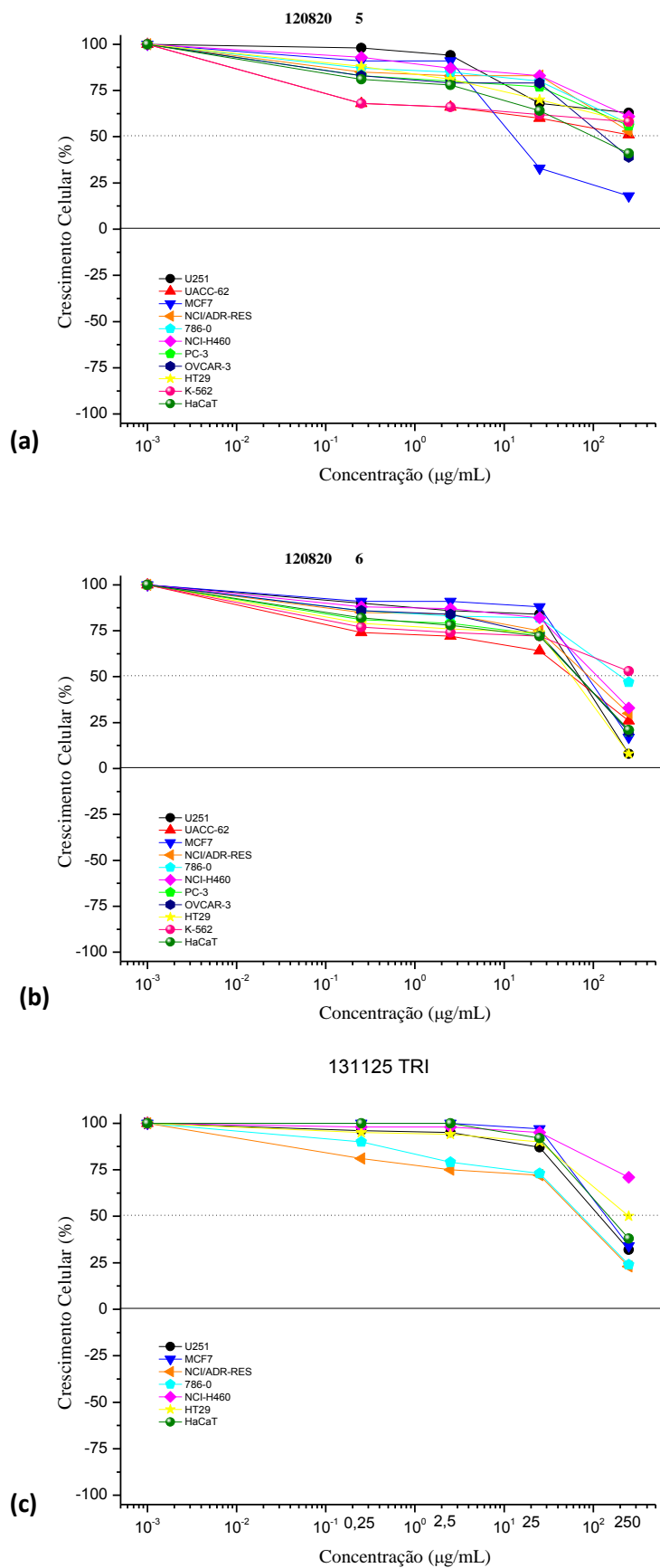
**Figura 74:** Porcentagem de crescimento de células tumorais humanas e célula normal versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer do padrão doxorrubicina (a) e para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPH (b) e MPC (c).



**Figura 75:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração (µg/mL) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPCH (a), MPCC (b) e MPCA (c).

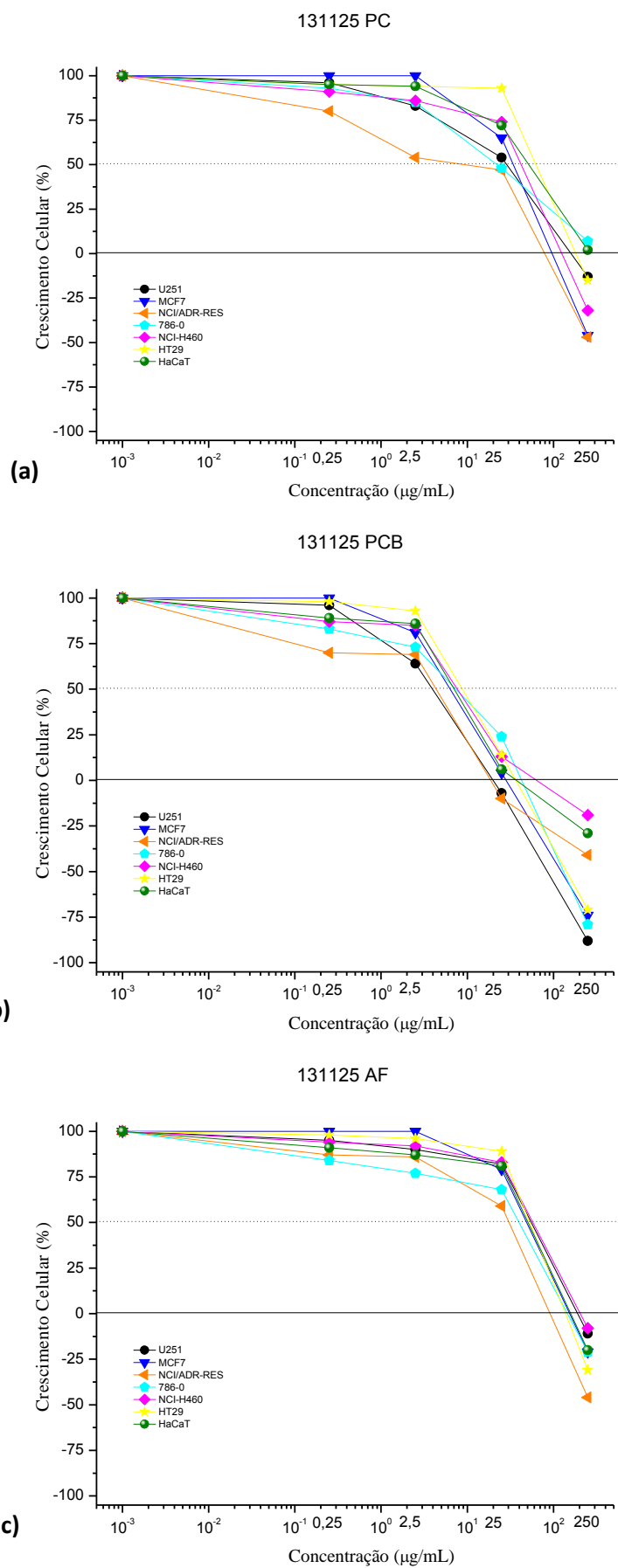


**Figura 76:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPCM (a), MPCA (b) MPB (c).

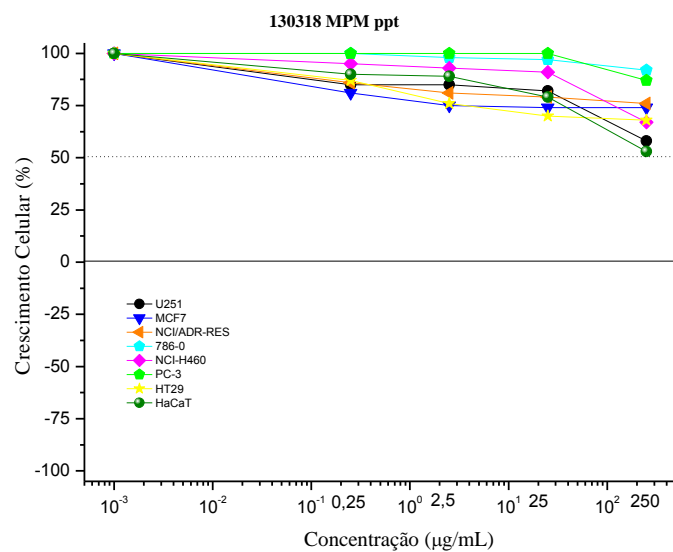


**Figura 77:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de MPM (a), MPEB (b) e M1+M2 (c).





**Figura 78:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer de M1+M2 (MPCC) (a), M1+M2 (MPCA) (b) e M8 (c).



**Figura 79:** Gráfico de porcentagem de crescimento versus concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o ensaio de avaliação da atividade anticâncer da mangiferina **M4**.