UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

"Estudo químico e avaliação da atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e moluscicida de *Ficus radicans* Variegata"

Dissertação apresentada por ***Maria Augusta Naressi*** 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

MARINGÁ, AGOSTO/2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO QUIMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E MOLUSCICIDA DE *Ficus radicans* Variegata

MARIA AUGUSTA NARESSI
Orientadora: Profª. Drª. Maria Helena Sarragiotto

Maringá-Pr, Agosto/2009

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e por permitir a realização deste trabalho.

À minha família, em especial a minha mãe Terezinha, meu pai Pedro e minha irmã Ana Paula, pelo apoio e compreensão.

Ao meu noivo Willians, pelo amor transmitido, apoio e confiança.

À Profª. Dra. Maria Helena Sarragiotto, pela orientação, respeito e amizade.

Ao departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, pela disponibilidade de concretização deste trabalho.

Ao amigo Willian, pelos ensinamentos e amizade.

À Valéria, pela amizade, alegria e confiança.

À Franciele pela amizade e carinho.

À Rose Matias, pelo apoio e amizade.

Ao Marcos, pela amizade e companheirismo.

Ao George pela amizade.

Às amigas Lílian e Anelise pela amizade e ajuda.

Aos professores Ernani e Gentil (*in memorian*) pela colaboração.

À Prof.ª. Dra. Clara M. Abe Tanaka (*in memorian*), pelo carinho e ajuda.

À Ivânia, pelo carinho e ajuda na realização dos espectros de RMN.

À Profª. Dra. Ciomar A. Bersani Amado, à Profª. Dra. Lucília Motinha Zamuner, ao Profº. Dr. Benedito Dias Prado Filho, ao técnico Jailson e a aluna de iniciação Laura Licia M. Arruda, pela realização dos ensaios biológicos.

Ao pessoal do laboratório pelo carinho e amizade, em especial, ao Moacir, à Letycia, à Manuele e à Beatriz.

A todos os professores, funcionários e amigos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Palavras chave: *Ficus radicans* Variegata, Moraceae, cumarina, esteróides, ácido *trans*-4-β-D-glucopiranosilóxi-2-metóxi cinamico, 3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→2)-α-L-raminopiranosídeo] quercetina, ensaios biológicos.

A espécie *Ficus radicans* Variegata, pertence à família Moraceae e ao gênero *Ficus*, o qual inclui cerca de 800 espécies e ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Em revisão da literatura não encontrou-se nenhum estudo químico da espécie *Ficus radicans* Variegata.

O presente trabalho tem como objetivo o estudo químico da espécie vegetal *Ficus radicans* Variegata e avaliação da atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e moluscicida do extrato bruto metanólico e das frações obtidas através do fracionamento do extrato bruto metanólico.

O estudo químico de *Ficus radicans* Variegata (folhas) resultou, após fracionamento e purificação das frações pelo uso de técnicas cromatográficas, no isolamento e identificação das cumarinas: 7-metóxicumarina (**FR-1**), 7-hidróxi-6-metóxi-cumarina (**FR-4**) e 7-metóxi-3,4-diidrocoumarina (**FR-5**), dos esteróides: 3-O-β-glucopiranosil sitosterol (**FR-2**) e β-sitosterol (**FR-3**), do ácido *trans*-cinâmico ácido t*rans*-4-β-D-glucopiranosilóxi-2-metóxi cinâmico (**FR-6**) e do flavonóide 3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→2)-α-L-raminopiranosídeo] quercetina (**FR-7**).

As estruturas das substâncias isoladas foram propostas pela análise de seus dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H e de ^{13}C e técnicas de COSY, DEPT, HMQC, HMBC, NOE e NOESY e comparação com dados obtidos da literatura. O isolamento da substância 7-metóxi-3,4-diidrocoumarina (**FR-5**) em plantas não foi ainda relatado na literatura.

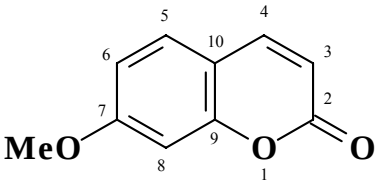
Os ensaios de atividade biológica foram realizados para o extrato bruto metanólico e para as frações hexânica, acetato de etila e hidrometanólica. Os potenciais de atividade antioxidante foram determinados com base na atividade seqüestradora de radical livre do 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e mostraram atividade moderada para a fração acetato de etila (IC_{50} =66,19 μg/mL**).**

Para a avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica utilizou-se o método de micro-diluição e cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* ATTCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e do fungo *Candida*

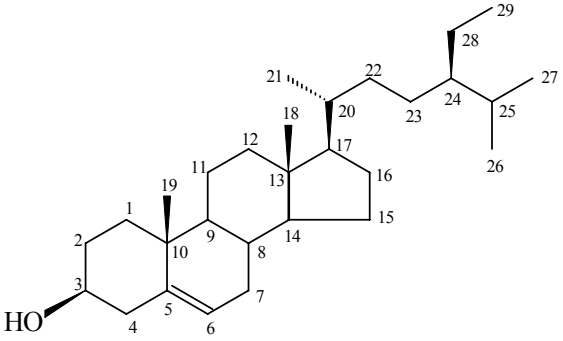
albicans. Os ensaios mostraram valores de concentração mínima inibitória (CMI) maiores que 1000 μg/mL para o extrato bruto metanólico e frações testadas.

Os ensaios biológicos para avaliação da atividade anti-inflamatória, utilizando-se o modelo de edema em pata de rato induzido por carragenina, mostraram que o extrato bruto metanólico e as frações hexânica e hidrometanólica provocaram uma redução da resposta inflamatória quando comparada ao grupo controle. No modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton, tanto o extrato bruto metanólico como as frações mostraram uma redução significativa da intensidade do edema. A aplicação da substância 7-metóxicumarina não causou redução significativa no edema de orelha.

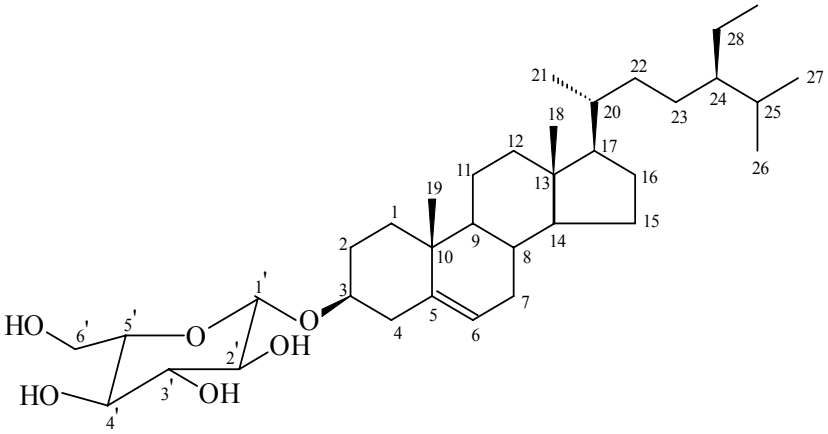
No ensaio de avaliação da atividade moluscicida frente a caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* apenas a fração hexânica apresentou uma fraca atividade.



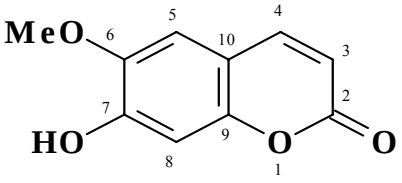
FR-1



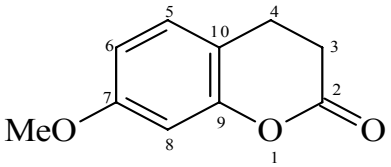
FR-2



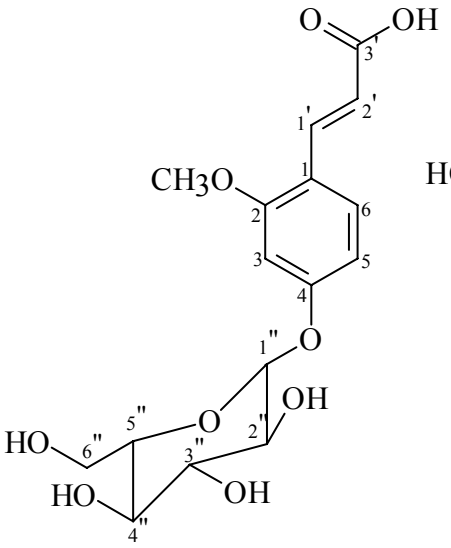
FR-3



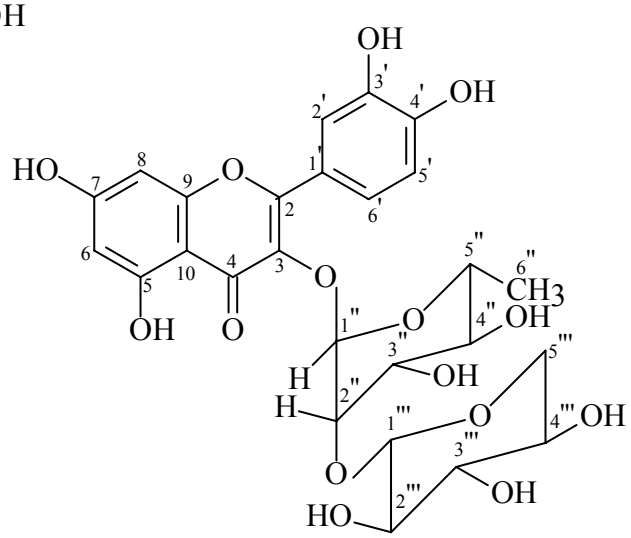
FR-4



FR-5



FR-6



FR-7

ABSTRACT

Keywords: *Ficus radicans* Variegata, Moraceae, Coumarins, steroids, *Trans*-4-β-D-glycopyranosyloxy-2-methoxy cinnamic acid, Quercetin 3-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranoside], Biological assays.

The *Ficus radicans* Variegate species belongs to the Moracea family and genus *Ficus*, which includes approximately 800 species and occurs in tropical and subtropical regions. In review of literature, no chemical study of species *Ficus radicans* Variegata was found. This work aims the chemical study of *Ficus radicans* Variegata and evaluation of anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant and molluscicide activities of methanol crude extract and of its fractions.

The chemical study of *Ficus radicans* Variegata (leaves) resulted, after purification and fractionation of fractions by using chromatographic methods, in isolation and identification of coumarins: 7-methoxycoumarin (**FR-1**), 7-hydroxy-6-methoxy-coumarin (**FR-4**) and 7-methoxy-3,4-dihidrocoumarin (**FR-5**), steroids: 3-O-β-glucopyranosyl sitosterol (**FR-2**) and β-sitosterol (**FR-3**), of t*rans*-4-β-D-glucopyranosyloxy-2-methoxy cinnamic acid (**FR-6**) and of quercetin 3-O-[β-D-xylopyranosyl-(1→2)-α-L-rhamnopyranoside] (**FR-7**).

The substances structures were proposed on the basis of their spectroscopic data of ^{1}H and ^{13}C NMR, COSY, DEPT, HMQC, HMBC, NOE and NOESY, as well as, comparison with data obtained from the literature. The isolation of substance 7-methoxy-3,4-dihidrocoumarin (**FR-5**) in plants has not been reported in literature yet.

Biological assays were carried out for the crude methanol extract and for its hexane, ethyl acetate and hydromethanol fractions. Antioxidant activity potentials were determined based on scavenging activity of free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and showed moderate activity for ethyl acetate fraction (IC_{50} = 66.19 μg/ml). To evaluate the antibacterial and antifungal activities was used the method of micro-dilution and strains of bacteria *Staphylococcus aureus* ATTCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* ATCC 6623 and the fungus *Candida albicans*. The tests showed values greater than 1000 μg/ml for minimum inhibitory concentration (MIC) for crude methanol extract and its fractions.

Biological tests to evaluate the anti-inflammatory activity, using the edema model of in rats paw induced by carrageenan, showed that the methanol crude extract

and fractions hexane and hydromethanol resulted in an inflammatory response reduction when compared to the control group. In the edema ear induced by croton oil model the methanol crude extract an fractions showed a significant reduction of inflammation. The application of the substance 7-methoxycoumarin did not cause significant reduction in edema ear in rats. In the assay for evaluation of molluscicide activity against *Biomphalaria glabrata* snails, only hexane fraction presented a weak activity.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS..... i
ÍNDICE DE ESQUEMAS..... ii
ÍNDICE DE FIGURAS..... iii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... v
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. DESCRIÇÃO DA PLANTA..... 10
3. OBJETIVOS..... 11
4. PARTE EXPERIMENTAL..... 12
4.1. Materiais e Métodos..... 12
4.2. Estudo Químico..... 14
4.2.1. Coleta da Planta..... 14
4.2.2. Isolamento dos Constituintes Químicos..... 14
4.2.3. Preparação e Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico..... 14
4.2.4 Estudo do Precipitado (**P**)..... 15
4.2.5 Estudo da Fração Hexano (**A**)..... 16
4.2.5.1. Estudo da Fração **A.11**..... 17
4.2.5.2. Estudo da Fração **A.19**..... 18
4.2.6. Estudo da Fração Acetato de Etila (**B**)..... 18
4.2.6.1. Estudo da Fração **B.7**..... 19
4.2.6.2 Estudo da Fração **B.8**..... 20
4.2.6.3. Estudo da Fração **B.9**..... 20
4.2.6.4. Estudo da Fração **B.13**..... 20
4.2.7. Estudo da Fração Hidrometanólica (**C**)..... 21
4.2.7.1. Estudo da Fração **C.4**..... 22
4.2.7.2. Estudo da Fração **C.8**..... 22
4.3. Atividade Antioxidante..... 23
4.3.1. Avaliação da Atividade Antioxidante (Método do DPPH)..... 23
4.4. Ensaios Biológicos..... 23
4.4.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana..... 23
4.4.1.1 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana..... 24
4.4.1.2. Teste de Susceptibilidade Antibacteriana..... 24
4.4.1.3. Teste de Susceptibilidade Antifúngica..... 25
4.4.2. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória..... 25
4.4.2.1. Indução do Edema na Pata de Rato..... 25
4.4.2.2. Indução do Edema na Orelha de Camundongo..... 27
4.4.3. Avaliação da Atividade Moluscicida..... 27
5. RESULTADOS E DISCUSÕES..... 30
5.1. Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas..... 30
5.1.1. Cumarinas..... 31
5.1.1.1 Substância **FR-1**..... 31
5.1.1.2. Substância **FR-4**..... 33
5.1.1.3. Substância **FR-5**..... 34
5.1.2 Esteróides..... 36
5.1.2.1 Substância **FR-2**..... 36
5.1.2.2. Substância **FR-3**..... 38
5.1.3. Derivado do Ácido *trans*-cinamico..... 40
5.1.3.1. Substância **FR-6**..... 40
5.1.4. Flavonóide..... 43

5.1.4.1. Substância **FR-7**..... 43
5.2. Avaliação da Atividade Antioxidante..... 46
5.3. Ensaios Biológicos..... 46
5.3.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana..... 46
5.3.2 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória..... 46
5.3.2.1. Efeito do extrato bruto metanólico e das frações (hexano e hidrometanólica) de *Ficus radicans* Variegata sobre o edema de pata..... 46
5.3.2.2. Efeito do extrato metanólico, das frações hexano (**A**), acetato de etila (**B**) e hidrometanólica (**C**) e da substância **FR-1** de *Ficus radicans* Variegata sobre o edema de orelha..... 47
5.3.3. Avaliação da Atividade Moluscicida..... 48
6. CONCLUSÕES..... 49
7. REFERÊNCIAS..... 50
ANEXOS..... 54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01: Dados obtidos da coluna cromatográfica do precipitado em sílica gel..... 15

Tabela 02: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **A** em sílica gel.. 17

Tabela 03: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **A.19** em sílica gel..... 18

Tabela 04: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **B** em sílica gel.. 19

Tabela 05: Dados obtidos da coluna empacotada com óxido de alumina neutro da fração **B.7**..... 20

Tabela 06: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **B.13** em sílica gel..... 21

Tabela 07: Dados da filtração da fração **C** em Sephadex LH-20..... 22

Tabela 08: Dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$) para a substância **FR-1** e para a substância **7-metóxicumarina**..... 32

Tabela 09: Dados de RMN de ^{1}H de **FR-4** (300 MHz, CD_3OD) e **7-hidróxi-6-metóxi-cumarina** (**escopoletina**) (300 MHz, acetona-d_6). 33

Tabela 10: Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) para **FR-5** e RMN de ^{1}H (60 MHz) para a substância **7-metóxi-3,4-diidrocoumarina**.... 35

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) da substância **FR-2** e do **β-sitosterol** (300, $CDCl_3$) 37

Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C de **FR-2** (300 MHz, CD_3OD) e do **3-O-β-glucopiranosil sitosterol** (75,5 MHz, C_5D_5N)..... 39

Tabela 13: Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para a substância **FR-6** (300 MHz, D_2O)**,** para o **ácido *trans*-2-metóxi-4-hidroxicinamico** (500 MHz, CD_3OD) e para o **ácido *trans*-2-β-D-glucopiranosilóxi-4-metóxi-cinamico** (400, MHz DMSO-d_6)..... 42

Tabela 14: Correlações ^{1}H x ^{1}H observadas no espectro de COSY para as unidades glicosídicas: **raminose** e **xilose**..... 44

Tabela 15: RMN de ^{1}H e de ^{13}C (300; 75,5 MHz, D_2O) para a substância **FR-7** e RMN de ^{1}H e de ^{13}C (CD_3OD) para a **3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→2)-α-L-raminopiranosídeo] quercetina**..... 45

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Isolamento dos constituintes de *Ficus radicans* Variegata..... 14

Esquema 2: Metodologia utilizada para avaliação da atividade anti-inflamatória de *Ficus radicans* Variegata..... 26

Esquema 3: Procedimento utilizado para avaliação da atividade moluscicida de *Ficus radicans* Variegata..... 28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Foto da espécie vegetal *Ficus radicans* Variegata..... 10

Figura 02: Efeito do extrato bruto de *Ficus radicans* Variegata e das frações hexano (**A**) e hidrometanólica (**C**) sobre o desenvolvimento do edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina em ratos Wistar... 47

Figura 03: Efeito do extrato bruto, da fração hexano (**A**), da fração acetato de etila (**B**), da fração hidrometanólica (**C**) e da substância pura **FR-1** de *Ficus radicans* Variegata sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos *Swiss*, machos (25-35 g)..... 48

Figura 04: Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-1**..... 55

Figura 05: Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75,5 MHz) de **FR-1**..... 56

Figura 06: Espectro de DEPT 135º-90º ($CDCl_3$) de **FR-1**..... 56

Figura 07: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-1**..... 57

Figura 08: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, $CDCl_3$) de **FR-1**..... 58

Figura 09: Espectro de NOEDIFF em $CDCl_3$ de **FR-1**..... 59

Figura 10: Espectro de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) de **FR-4**..... 60

Figura 11: Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-5**..... 61

Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75,5 MHz) de **FR-5**..... 62

Figura 13: Espectro de DEPT 135º-90º ($CDCl_3$) de **FR-5**..... 62

Figura 14: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-5**..... 63

Figura 15: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, $CDCl_3$) de **FR-5**..... 64

Figura 16: Espectro de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) de **FR-2**..... 65

Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD, 75,5 MHz) de **FR-2**..... 66

Figura 18: Espectro de DEPT 135º-90º (CD_3OD) de **FR-2**..... 66

Figura 19: Espectro de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) de **FR-3**..... 67

Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD, 75,5 MHz) de **FR-3**..... 68

Figura 21: Espectro de DEPT 135º-90º (CD_3OD) de **FR-3**..... 68

Figura 22: Espectro de RMN de ^{1}H (D_2O, 300 MHz) de **FR-6**..... 69

Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 75,5 MHz) de **FR-6**..... 70

Figura 24: Espectro de DEPT 135º-90º (D_2O) de **FR-6**..... 70

Figura 25: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY (D_2O, 300 MHz) de **FR-6**..... 71

Figura 26: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, D_2O) de **FR-6**..... 72

Figura 27: Espectro de HMBC ^{3}J (^{1}H x ^{1}H, D_2O) de **FR-6**..... 73
Figura 28: Espectro de ^{1}H x ^{1}H - NOESY (D_2O, 300 MHz) de **FR-6**..... 74
Figura 29: Espectro de massas (70 eV) de baixa resolução de **FR-6**..... 75
Figura 30: Espectro de RMN de ^{1}H (D_2O, 300 MHz) de **FR-7**..... 76
Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 75,5 MHz) de **FR-7**..... 77
Figura 32: Espectro de DEPT 135º-90º (D_2O) de **FR-7**..... 77
Figura 33: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY (D_2O, 300 MHz) de **FR-7**..... 78
Figura 34: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, D_2O) de **FR-7**..... 79
Figura 35: Espectro de HMBC ^{3}J (^{1}H x ^{1}H, D_2O) de **FR-7**..... 80

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CMB	Concentração mínima bactericida
CMI	Concentração mínima inibitória
CMF	Concentração mínima fungicida
COSY	H x H Correlation Spectroscopy
COX-1	Ciclooxigenase-1
d	dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EM	Espectrometria de massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC_{50}	Concentração mínima necessária para 50% de inibição
J	Constante de acoplamento
m	multipleto
NOE	Nuclear Overharuser Enhancement
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	singleto
t	tripleto
BHT	Butil-hidróxitolueno

1. INTRODUÇÃO

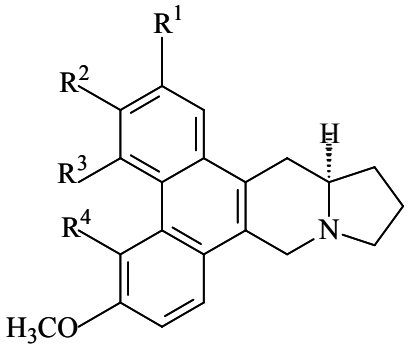
O consumo de plantas medicinais foi à primeira forma de uso de medicamento de que se tem notícia. Muitas descobertas foram feitas pela necessidade de se obter novas fontes de alimentos, mas provavelmente um número expressivo deve-se à curiosidade humana. Documentos arqueológicos possibilitam afirmar que muitos povos há milênios, tinham conhecimento do poder de grande quantidade de plantas, seja pelas suas qualidades curativas, seja por permitirem sensações anormais. [1]

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial fez o uso de algum tipo de planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% deu-se por indicação médica. A utilização de plantas medicinais tem inclusive recebido incentivos da própria OMS. São muitos os fatores que vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que incluam plantas medicinais, principalmente, práticas econômicas e sociais. [2]

O emprego de produtos naturais de origem vegetal no desenvolvimento de substâncias biologicamente ativas tem aumentado consideravelmente, porém, das 350.000 a 550.000 espécies de plantas existentes, apenas um pequeno percentual foi investigado fitoquimicamente. Além disto, a fração submetida a investigações farmacológicas ou biológicas é ainda menor. Dados revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal ou químico. Assim, a investigação fitoquímica é de grande importância, pois o isolamento de princípios ativos e a modificação química destes podem resultar em descobertas de novos produtos com aplicação terapêutica. Outro aspecto a ser considerado é o fato de que o estudo fitoquímico pode contribuir para a classificação das plantas em função de seus constituintes químicos fornecendo subsídio para estudos de quimiotaxonomia.[3]

Dentre uma grande variedade de plantas que ainda não foram estudadas quimicamente inclui-se a *Ficus radicans* Variegata, espécie que pertence à família Moraceae e ao gênero *Ficus*, o qual inclui cerca de 800 espécies e ocorre nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Várias espécies apresentam compostos com atividades farmacológicas como antimicrobianas, antioxidante, anticâncer e anti-AIDS.[4-7] Estudos fitoquímicos em espécies do gênero *Ficus* mostraram a presença de cumarinas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos.[8-11]

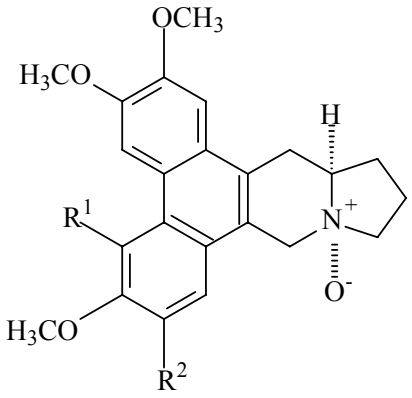
Na espécie *Ficus septica* foi descrito o isolamento e a caracterização de oito novos alcalóides **(1)** a **(8)**.[12]



(1) R^1, R^2=OCH_2O, R^3=H, R^4=OCH_3

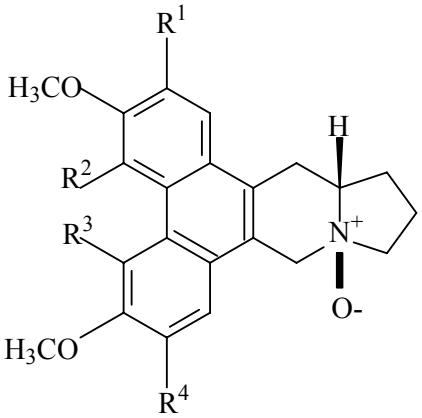
(2) R^1,R^2=OCH_2O, R^3=R^4=H

(3) R^1=H, R^2= R^3= OCH_3, R^4=H



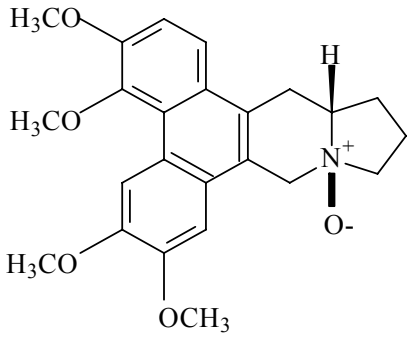
(4) R^1=H, R^2=OCH_3

(5) R^1=OCH_3, R^2=H



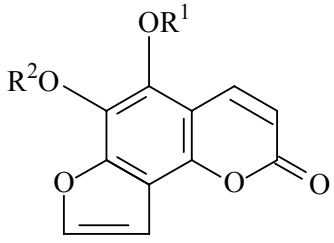
(6) R^1=OCH_3, R^2=H, R_3=OCH_3, R^4=H

(7) R^1=H, R^2=OCH_3, R^3=H, R^4= OCH_3



(8)

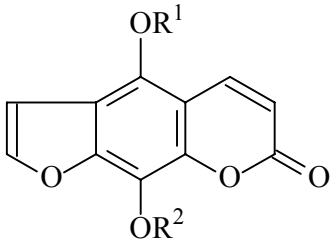
Da espécie *Ficus ruficaulis* Merr. *Var. antaoensis* foram isolados quatro novas furanocumarinas glicosiladas, 5-O-β-D-glucopiranosil-6-hidróxiangelicina **(9),** 6-O-β-D-glucopiranosil-5-hidróxiangelicina **(10)**, 5,6-O-β-D-diglucopiranosilangelicina **(11)**, 8-O-β-D-glucopiranosil-5-hidróxipsoloreno **(12)**, juntamente com a furanocumarina conhecida 5-O-β-D-glucopiranosil-8-hidróxipsaloreno **(13)**.[13]



(9) R^1=glc, R^2=H

(10) R^1=H, R^2=glc

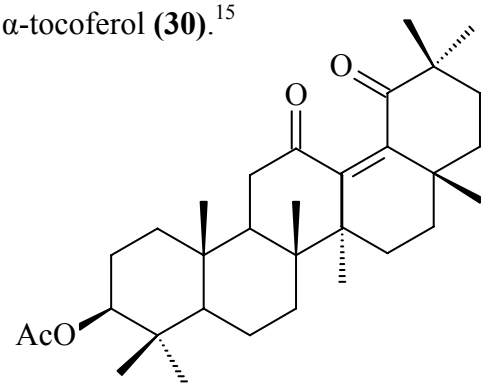
(11) R^1=glc, R^2=glc



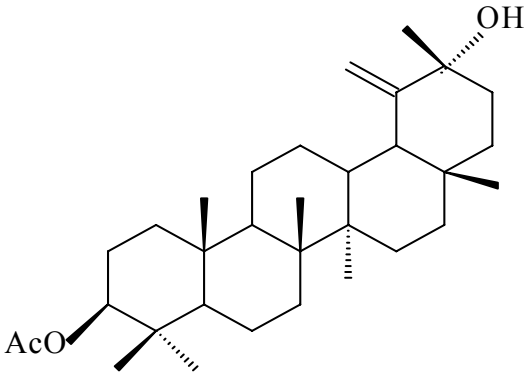
(12) R^1=H, R^2= glc

(13) R^1=glc, R^2= H

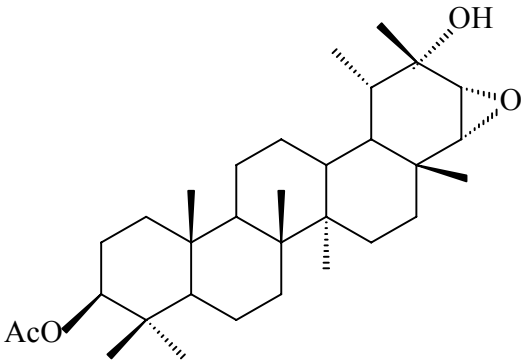
A presença de seis novos triterpenos, 3β-acetóxi-12,19-dioxo-13(18)-oleaneno **(13)**, 3β-acetóxi-19(29)-taraxasten-20α-ol **(14)**, 3β-acetóxi-21α,22α-epoxitaraxastan-20α-ol **(15)**, 3,22-dioxo-20-taraxasteno **(16)**, 3β-acetoxi-11α,12α-epoxi-16-oxo-14-taraxereno **(17)**, 3β-acetoxi-25-metóxi-lanosta-8,23-dieno **(18)** juntamente com nove triterpenos conhecidos **(19)** a **(27)** foi observada nas raízes da espécie *Ficus microcarpa*.[14] Também foram isolados a partir da folhas, frutos, cascas e raízes dois novos α-tocoferóides, nomeados tocospiros A **(28)** e B **(29)**, juntamente com α-tocoferol **(30)**.[15]



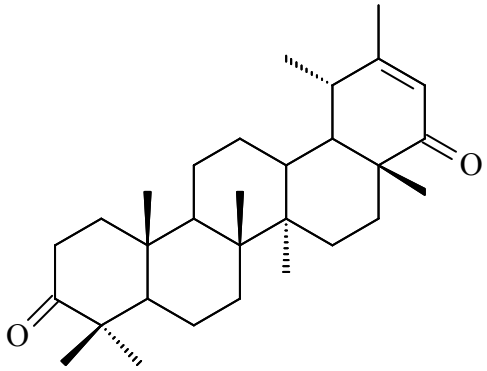
(13)



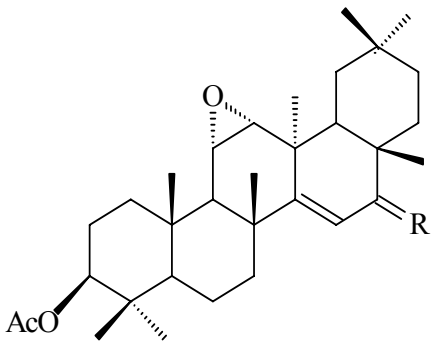
(14)



(15)

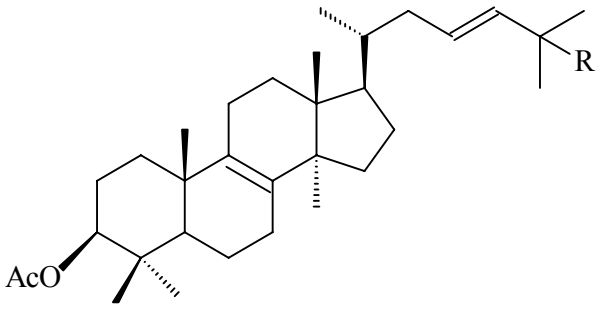


(16)



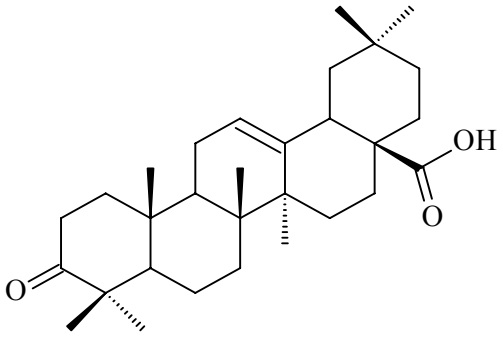
(17) R=O

(19) R=H_2

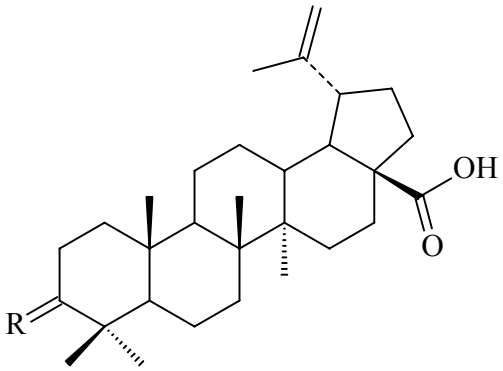


(18) R=OMe

(20) R=OH

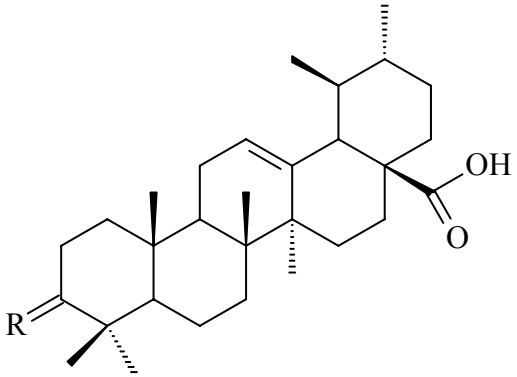


(21)



(22) R= OMe

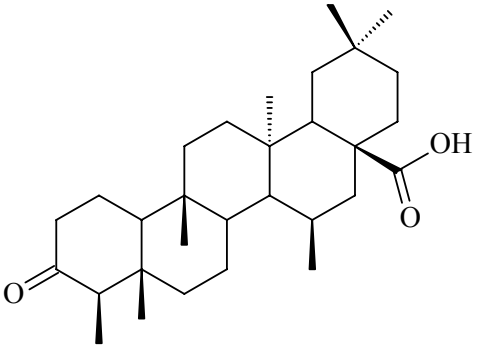
(23) R=OH



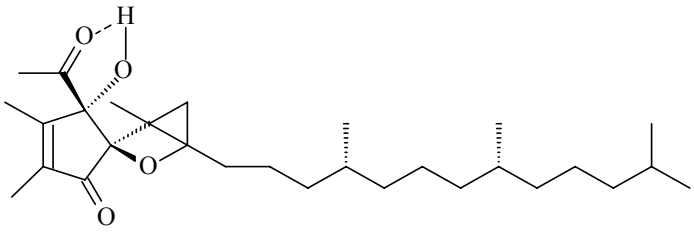
(24) R=α-H, β-Oac

(25) R= O

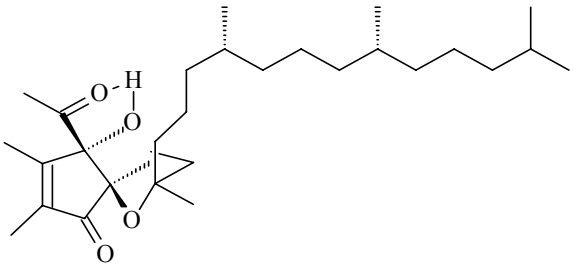
(26) R=α-H, β-OH



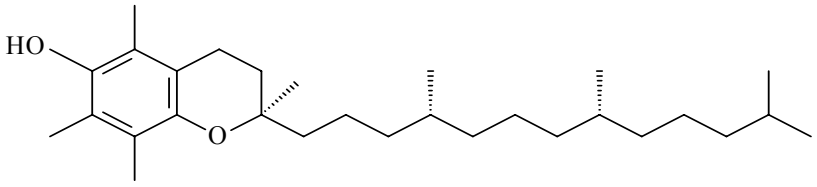
(27)



(28)

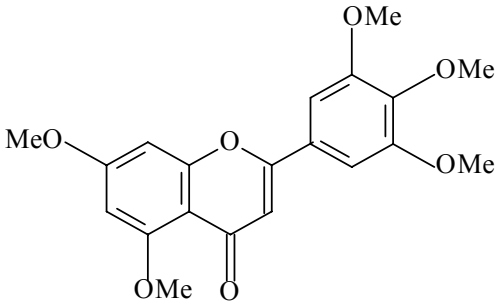


(29)

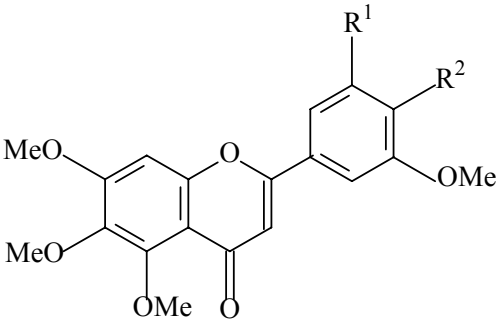


(30)

Quatro metoxiflavonas, 5,7,3',4',5'-pentametoxiflavona **(31)**, 5,6,7,5'-tetrametóxi-3',4'-metilenodióxiflavona **(32)**, 5,6,7,3',4',5'-hexametóxiflavona **(33)**, 5,6,7,3',5'-pentametóxi-4'-preniloxiflavona **(34)** foram isolados das folhas de *Ficus máxima*. Compostos desse tipo não tinham sido descritos na família Moraceae.[16]

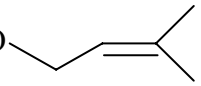


(31)

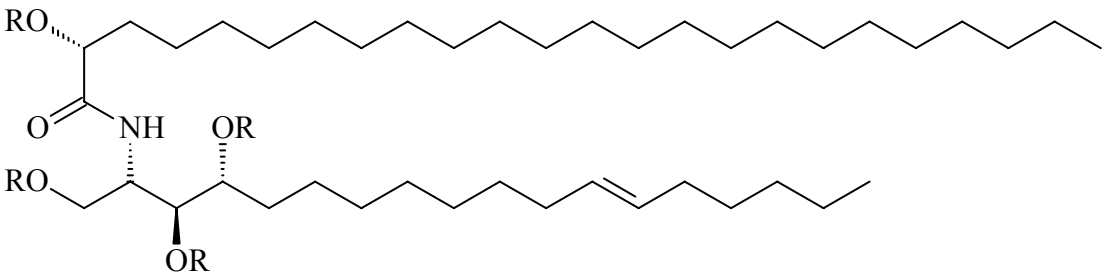


(32) R^1,R^2 = OCH_2O

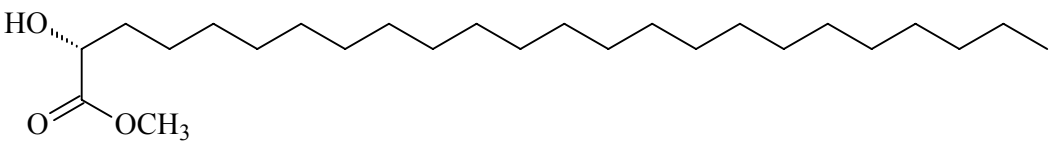
(33) R^1=R^2=OMe

(34) R^1= OMe, R^2 = O 

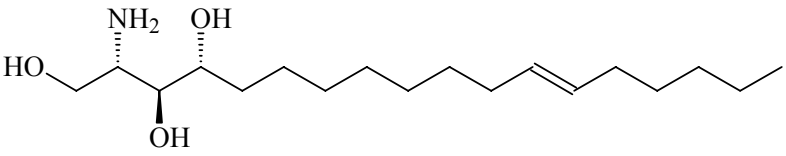
Dos galhos de *Ficus benjamina* foi isolado uma nova ceramida, 2-amino-octadec-12-eno-1,3,4-triol **(35)** identificada com base em dados espectroscópicos de RMN da substância pura e de seu derivado acetilado, o tetra-acetato de benjaminamida **(36)**, além das substâncias já conhecidas: metil 2- hidroxitetracosanoato **(37)**, espingosina **(38,** psoraleno **(39)**, β-sitosterol glicosilado **(40)**, acetato de β-amirina **(41)**, β-amirina **(42)**, ácido betulínico **(43)**, lupeol **(44)** e ácido platanico **(45)**.[17]



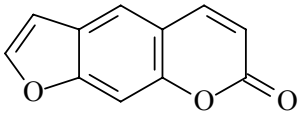
(35) R=H
(36) R=Ac



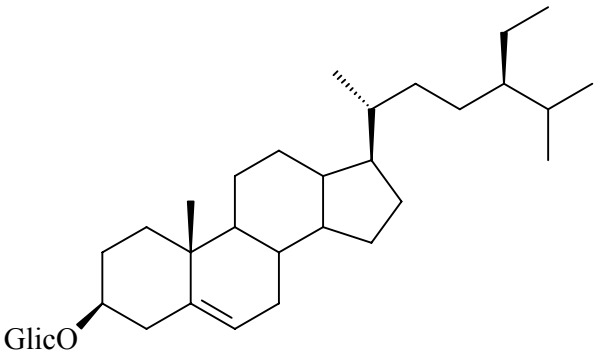
(37)



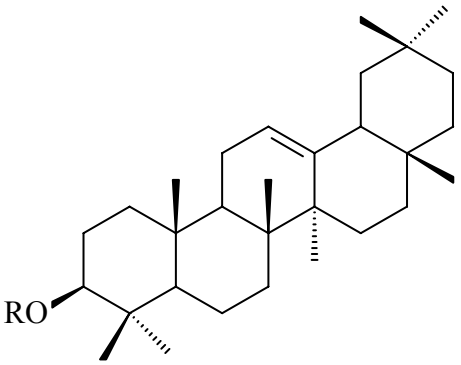
(38)



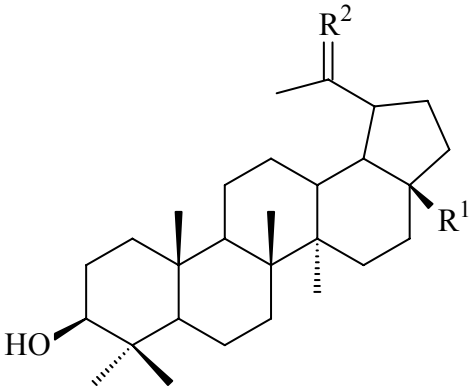
(39)



(40)

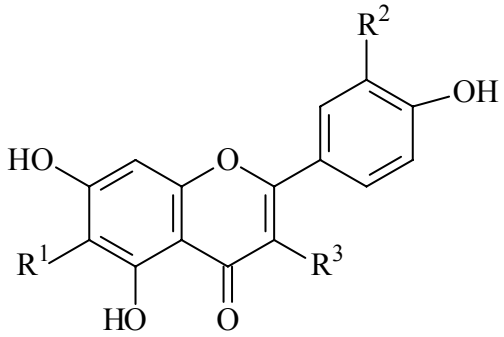


(41) R=Ac
(42) R=H



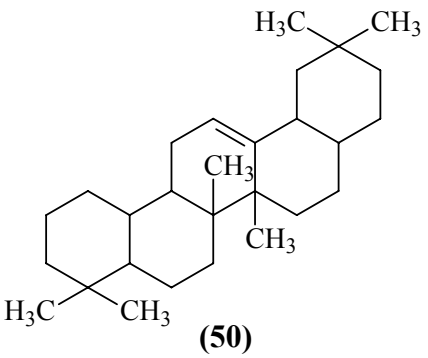
(43)R^1= COOH, R^2= CH_2
(44) R^1=CH_3, R^2=CH_2
(45) R^1=COOH, R^2=O

Quatro flavonóides glicosilados **(46)** a **(49)** foram isolados das folhas de *Ficus pumila L.*. O composto **(46)** apresentou forte atividade antioxidante utilizando o método do DPPH (IC_{50} = 0,05 mM comparado com a referência α-tocoferol IC_{50} = 0,17 mM) e inibição do radical superóxido (O_2^-) (IC_{50} = 0,14 mM).[18]

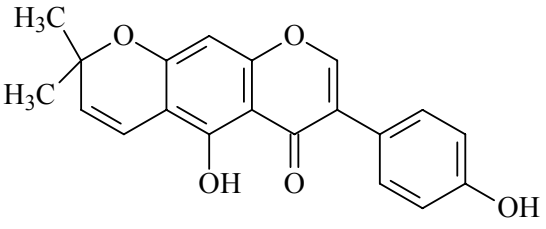


(46) R^1= H, R^2=OH, R^3=O-α-L-raminopiranosil-(1-6)β-D-glicopiranosida
(47) R^1= O-α-L-raminopiranosil-(1-2)β-D-glicopiranosida, R^2= H, R^3= H
(48) R^1=H, R^2=H, R^3= O-α-L-raminopiranosil-(1-6)β-D-galactopiranosida
(49) R^1=H, R^2=H, R^3= O-α-L-raminopiranosil-(1-6)β-D-glicopiranosida

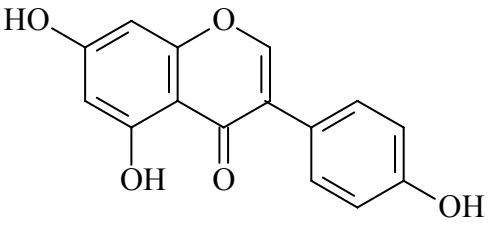
Das espécies *Ficus chlamydocarpa* e *Ficus cordata* foram isolados oito compostos: β-amirina **(50),** alpinumisoflavona **(51)**, genisteina **(52)**, laburnetina **(53)**, luteolina **(54)**, β-sitosterol-3-O-β-O-glucopiranosideo **(55)**, catequina **(56)** e epi-catequina **(57)**, os quais, com exceção de **(56),** apresentaram atividade frente a *Mycobacterium smegmatis,* sendo que a concentração mínima inibitória (CMI) variou de 0,61 a 321,5 μg/mL. O composto **(53)** apresentou a melhor atividade antimicrobiana contra a *Mycobacterium turbeculosis* (CMI=4,88 μg/mL). O extrato metanólico de *Ficus cordata* e a mistura dos dois extratos de *Ficus chlamydocarpa* e *Ficus cordata* assim como os compostos **(54)** e **(57)** foram capazes de inibir o crescimento de fungos (*Candida albicans* e *Candida glabrata*) e de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus faecalis*, *Staphylococcua aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klesbsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella typhi*). O efeito do extrato bruto de *Ficus chlamydocarpa* foi observado em dez dos dezesseis microorganismos testados (excluindo *Mycobateria*), sendo que os compostos **(53)**, **(51)** e **(52)** foram eficazes em quatorze, oito e sete dos dezesseis microorganismos testados. *Ficus cordata* foi mais ativa que *Ficus chlamydocarpa* na maioria dos microorganismos testados. [19]



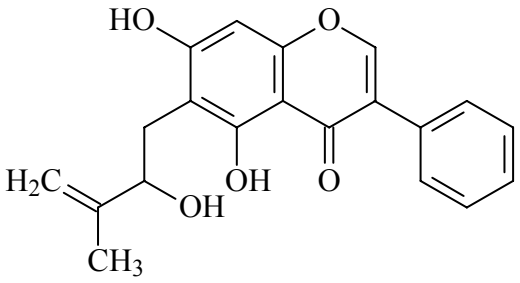
(50)



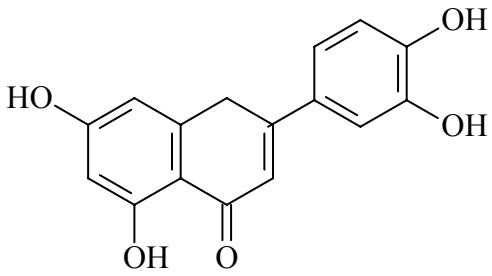
(51)



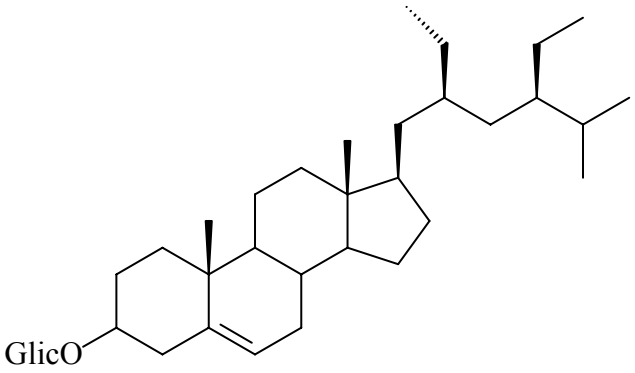
(52)



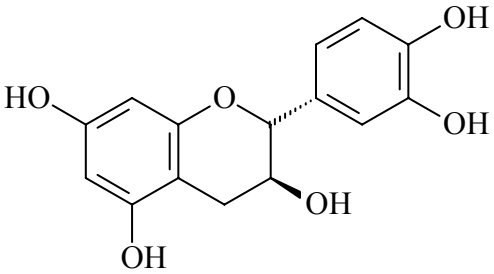
(53)



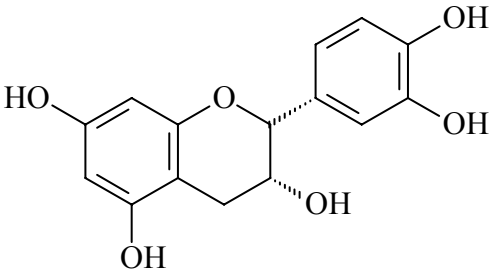
(54)



(55)



(56)



(57)

Três novos glicosídeos foram isolados dos extratos clorofórmico e metanólico das cascas de *Ficus hispida* Linn. Dos compostos isolados o composto 24-cetopentacosil-γ-hidróxipentanoato apresentou potente inibição dos organismos coliformes e o composto 4-acetildelfiinidina-3-0-α-L-raminosídeo apresentou propriedade antibiótica em espécies *Penicillium*.[20] O extrato das cascas da espécie *Ficus asperifolia* Miq. apresentou um significativo efeito ($p<0,001$) no crescimento do fibroblasto dérmico humano em concentração igual ou menor que 50 μg/mL e uma significante ação protetora das células do fibroblasto contra danos oxidativos em doses maiores que 50 μg/mL.[21]

A atividade antioxidante dos extratos metanólicos das raízes e dos obtidos em acetona: água (70:30) de *Ficus bengalensis* L. e *Ficus racemosa* L. foram avaliados utilizando os métodos de DPPH, $ABTS^{+}$, seqüestrador do radical OH^{-} e emulsão do ácido linoleico.[22] Os extratos apresentaram atividade antioxidante pelo método da emulsão do ácido linoleico (34-38%). Os extratos utilizados de *Ficus bengalensis* L. e *Ficus racemosa* L continham fenóis, flavonóides e taninos.[22] Os resultados de atividade antioxidante foram comparáveis aos da espécie *Camellia sinensis* (L.) Kuntz usada em muitos países asiáticos por possuir forte capacidade antioxidante. Esta espécie possui polifenóis que têm sido utilizados em medicamentos como antidiabéticos, antiivirais e antimaláricos.[22] A atividade antioxidante do extrato aquoso das cascas de *Ficus bengalensis* foi avaliada em coelhos hipercolesterolanemicos. Os resultados mostraram que o extrato aquoso de *Ficus bengalensis* apresentou um significativo efeito antioxidante. [23]

A atividade anti-inflamatória do extrato das folhas de *Ficus racemosa* Linn. foi avaliada em edema de pata de rato induzido por carragenina, serotonina, histamina e dextrana. Os extratos nas doses de 200 e 400 mg/Kg apresentaram significativa antividade antiinflamatória nos edemas de pata de rato. O efeito produzido pelo extrato foi compatível ao da fenilbutazona, um agente antiinflamatório não esteroidal utilizado com padrão.[24] O extrato das cascas de *Ficus racemosa* foi também avaliado quanto a sua atividade antiinflamatória pelo método baseado no efeito inibitório da biossintese de prostaglandina E-2 e D-2, a partir do ácido aracdônico, catalisada pela ciclooxigenase-1 (COX-1). O extrato bruto apresentou inibição da COX-1 com IC_{50} de 100 μg/mL. A aspirina e a indometacina, usadas como referência no estudo em COX-1, apresentaram IC_{50} de 241 e 1,2 μg/mL, respectivamente. [25]

A atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Ficus thonnongii* foi testada frente a diversas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas sendo ativo para as bactérias *Enterococus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*.[26] A atividade anti-helmintica do látex de *Ficus insipida* Will e *Ficus carica* L., foi avaliada em camundogos NIH infectados com os parasitas *Syphacia obvelata, Aspiculuris* e *Vampirolepis nana*. Os resultados mostraram que o látex de *Ficus carica* administrado em dose de 3 mL/Kg/dia durante três dias consecutivos foi eficaz na remoção de *Syphacia abvelata* (41,7%).[27]

2. DESCRIÇÃO DA PLANTA

Ficus radicans Roxb.

Sinônimo: *Ficus rostrata* Lam.

Angiospermae – Família Moraceae

Nome vulgar: **figueira trepadeira**

Planta semi-herbácea, reptante ou ascendente, de folhagem ornamental, originária das Índias Orientais. Folhas ovaladas, um tanto onduladas, coriáceas e ásperas na face de baixo. A ramagem emite numerosas raízes adventícias pequenas que aderem a arrimos, permitindo a ascenção da planta. Na variedade hortícola "Variegata" as folhas são verde-acinzentadas com manchas branco-amareladas a partir das margens (**Figura 01**)[28].

Possui florescimento eventual, não despertando valor ornamental. Planta cultivada em vasos com suportes de xaxim, prestando-se muito bem para revestimento de muros, paredes e colunas. É sensível a geadas, sendo mais indicada para o cultivo nos trópicos. Multiplica-se facilmente por estacas, que enraízam com certa facilidade em qualquer época do ano[28].

Figura 01: Foto da espécie vegetal *Ficus radicans* Variegata.

3. OBJETIVOS

Constituem objetivos do nosso trabalho:

- Isolar e caracterizar metabólitos secundários de *Ficus radicans* Variegata*;*

- Avaliar a capacidade "seqüestradora" de radicais livres do extrato do bruto metanólico e dos compostos isolados em maior quantidade, utilizando o método de descoramento do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil);

- Realizar ensaios biológicos para avaliação das atividades antifúngica, antimicrobiana, moluscicida e anti-inflamatória do extrato, frações e compostos puros.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais e Métodos

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em espectrômetro SHIMADZU-CG/MS modelo QP 2000A a 70eV, equipado com probe para sólidos.

Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros VARIAN modelo MERCURY plus BB, ambos operando à 300,06 MHZ para ^{1}H e 75,45 MHz para ^{13}C. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano TMS (δ=0,0ppm). Os solventes utilizados foram D_2O, $CDCl_3$, CD_3OD e DMSO-d_6.

A interpretação dos dados foi realizada com auxílio da técnica DEPT e confirmado por dados espectroscópicos de correlações bidimensionais como COSY, HMQC, HMBC e NOE.

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

As cromatografias em coluna foram realizadas em colunas de vidro, utilizando-se sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) da Merck e Sephadex LH-20 como fase estacionária. A quantidade de adsorvente, o diâmetro e a altura das colunas variaram de acordo com a quantidade de material adsorvido. Foram utilizados, como fase móvel, solventes puros ou misturas de solventes combinados em ordem crescente ou decrescente de polaridade e as frações coletadas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotativo.

Para a cromatografia em camada delgada e cromatografia em camada delgada preparativa, utilizou-se placas de vidro de 5,0 x20 cm e 20,0 x 20,0 cm, preparadas com sílica gel 60 G e 60 GF_{254} (Aldrich ou Merck) suspensa em água destilada numa proporção de 1:2, e distribuída em uma espessura de aproximadamente 0,25 mm e 1,0 mm.

Para a visualização dos compostos em CCD utilizou-se irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm, e pulverização com solução de ácido sulfúrico/metanol 1:1, ou de ácido acético/ H_2SO_4 / anisaldeído (revelador para terpenos), seguido de aquecimento.

Para avaliação da atividade antioxidante em um aparelho de UV/VIS-Cary 50, VARIAN, em 515,5 nm.

O modelo utilizado para a avaliação da atividade antiinflamatória foi o de indução de edema em pata do rato, empregando ratos da linhagem Wistar e como agente irritante carregenina e dextrana, e para medição pletismógrafo digital (UGO BASILE®).

Na avaliação da atividade antibacteriana utilizou-se meio Ágar Mueller-Hinton, cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* ATTCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Bacillus subtilis* ATCC 6623; suspensão padrão de sulfato de bário (0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário; 99,5 mL de H_2SO_4 a 1% (v/v); estufa de cultura FANEM, modelo 002CB e autoclave FABBE, modelo 103. Na avaliação da atividade antifúngica utilizou-se meio Ágar Sabouraud, e o fungo *Candida albicans*.

Para avaliação da atividade moluscicida utilizou-se um estereomicroscópico binocular com zoom, iluminação dupla episcótica diascópica 45X e agitador de tubos (Vortex), PHOENIX/PHOENIX/NAC, modelo AP-56.

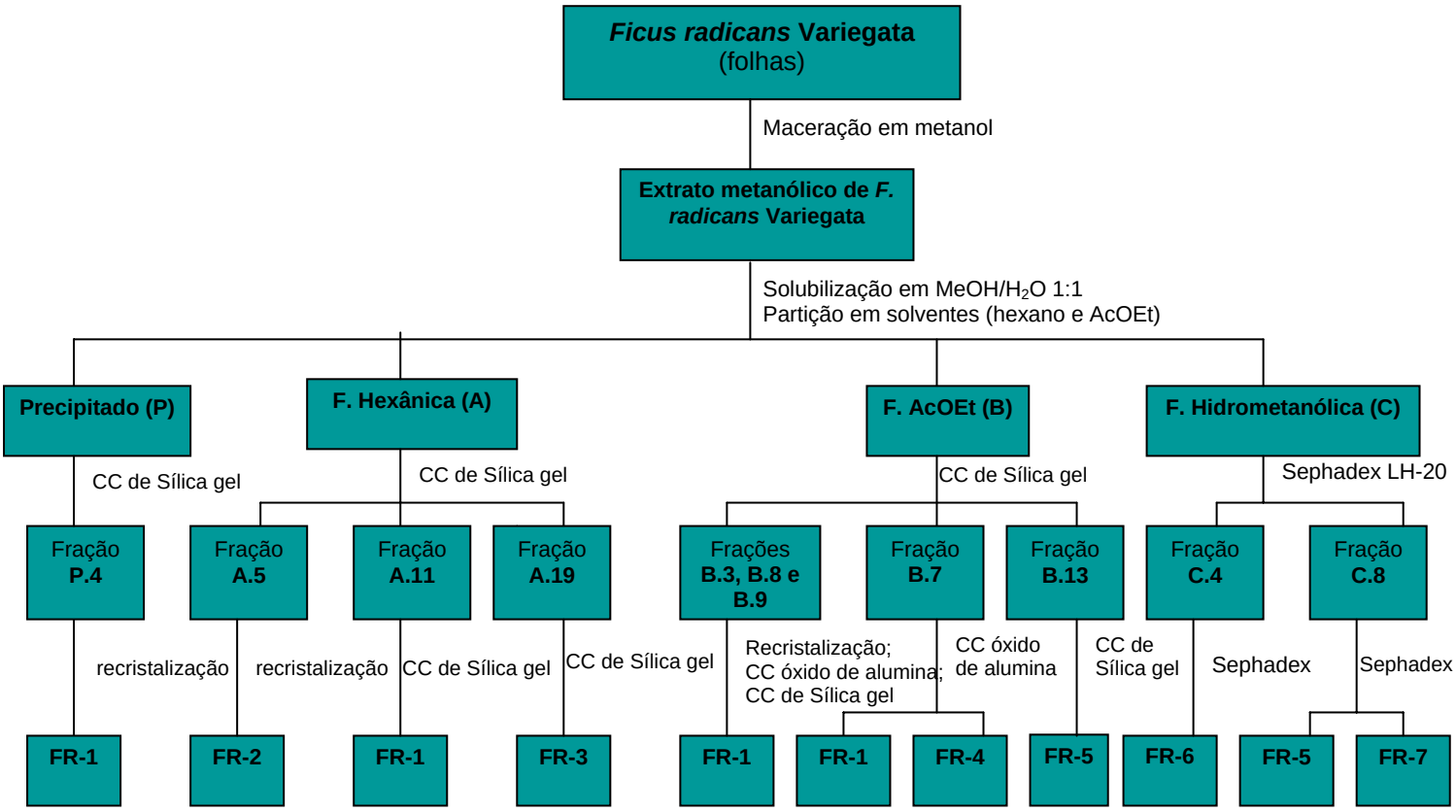
4.2. Estudo Químico

4.2.1. Coleta da Planta

A planta foi coletada em Maringá – Paraná em dezembro de 2007. A identificação da espécie foi feita pela professora Dra. Maria Conceição de Souza do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá.

4.2.2. Isolamento dos Constituintes Químicos

O **Esquema 1** mostra uma visão geral do procedimento empregado para o isolamento dos constituintes de *Ficus radicans* Variegata.



Esquema 1: Isolamento dos constituintes de *Ficus radicans* Variegata.

4.2.3. Preparação e Fracionamento do Extrato Bruto Metanólico

As folhas da *Ficus radicans* Variegata foram secas à temperatura ambiente e moídas, obtendo-se 658,55g. O material moído foi extraído com metanol, deixando-se o material em maceração à temperatura ambiente. Após remoção do solvente sob vácuo em evaporador rotativo, foi obtido o extrato metanólico (51,41 g).

Parte do extrato foi submetido a um fracionamento por partição em solventes. O extrato bruto (51,41g) foi dissolvido em MeOH/H_2O 1:1 e particionado em solventes de polaridade crescente (hexano e AcOEt). Este procedimento resultou nas frações: hexânica (**A**) (5,937 g), acetato de etila (**B**) (8,405 g) e hidrometanólica (**C**) (34,489 g).

Com a adição de hexano ao extrato bruto dissolvido em MeOH/H_2O formou-se um precipitado (2,79g), codificado como **P**.

4.2.4. Estudo do Precipitado (P)

O precipitado **(P)** (1,31g) foi submetido à cromatografia em coluna (CC) de sílica gel (60,0 g; ∅ 2,5cm), utilizando os eluentes: hexano, hexano-AcOEt e AcOEt-MeOH resultando em 117 frações. As frações foram reunidas conforme semelhança apresentada através de análise em cromatografia em camada delgada (CCD), resultando em 21 novas frações **(Tabela 01).**

Tabela 01: Dados obtidos da coluna cromatográfica do precipitado em sílica gel

Código	Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
P.1	Hexano/ AcOEt 20%	1-7	1,0	
P.2	Hexano/ AcOEt 40%	8-9	10,9	
P.3	Hexano/ AcOEt 40%	10	60,5	
P.4	Hexano/ AcOEt 40%	11-12	360,6	FR-1
P.5	Hexano/ AcOEt 40%	13-15	81,7	
P.6	Hexano/ AcOEt 40%	16-18	8,8	
P.7	Hexano/ AcOEt 50%	19-23	30,7	
P.8	Hexano/ AcOEt 60%	24	18,9	
P.9	Hexano/ AcOEt 70%	25-32	32,6	
P.10	Hexano/ AcOEt 80%	33-41	41,4	
P.11	Hexano/ AcOEt 90%	42-55	194,4	
P.12	AcOEt /MeOH 10%	56-58	37,7	
P.13	AcOEt /MeOH 20%	59-61	33,3	
P.14	AcOEt /MeOH 30%	62-65	39,3	
P.15	AcOEt /MeOH 30%	66-68	7,3	
P.16	AcOEt /MeOH 50%	69-81	67,4	
P.17	AcOEt /MeOH 70%	82-83	13,5	
P.18	AcOEt /MeOH 70%	84	7,5	
P.19	AcOEt /MeOH 70%	85-87	10,6	
P.20	AcOEt /MeOH 80%	88-107	34,3	
P.21	AcOEt /MeOH 90%	108-117	20,3	

A fração **P.4** foi recristalizada com hexano, fornecendo uma substância pura como um sólido branco codificado como **FR-1** (360,6 mg).

Pela análise das frações **P.1** a **P.21** em CCD, observou-se que as frações que se apresentaram menos complexas quando submetidas à presença de iodo e pulverização com revelador para terpenos foram às frações **P.9** e **P.20**.

A fração **P.9** foi submetida à CC de sílica gel (3,5 g; ∅ 1,0 cm), utilizando como eluentes: hexano, hexano-AcOEt 10, 20, 30, 50 e 70%, AcOEt, AcOEt-MeOH 20%, porém não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

A fração **P.20** foi submetida à CC de sílica gel (3,30 g; ∅ 1,0 cm), utilizando como eluentes AcOEt, AcOEt-$CHCl_3$ 10, 30 e $CHCl_3$, $CHCl_3$-MeOH 10, 20, 40 e 60%, porém não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

4.2.5. Estudo da Fração Hexânica (A)

A fração hexânica **(A)** (2,98g) foi submetida à CC de sílica gel (90,0 g; ∅ 2,5 cm), utilizando como eluentes: hexano, hexano-AcOEt e AcOEt-MeOH, fornecendo 56 frações, que após reunidas de acordo com semelhança em CCD, resultaram em 21 frações **(Tabela 02).**

Tabela 02: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **A** em sílica gel

Código	Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
A.1	Hexano	1-5	1,0	
A-2	Hexano/ AcOEt 10%	6	8,0	
A-3	Hexano/AcOEt 10%	7-9	606,9	
A.4	Hexano/AcOEt 10%	10	81,3	
A.5	Hexano/AcOEt 20%	11-12	206,7	FR-2
A-6	Hexano/AcOEt 30%	13	39,9	
A.7	Hexano/AcOEt 30%	14	37,2	
A.8	Hexano/AcOEt 30%	15	56,9	
A.9	Hexano/AcOEt 30%	16	36,3	
A.10	Hexano/AcOEt 30%	17	91,3	
A.11	Hexano/AcOEt 30%	18-22	746,0	
A.12	Hexano/AcOEt 30%	23-27	133,9	
A.13	Hexano/AcOEt 40%	28	16,3	
A.14	Hexano/AcOEt 40%	29-30	35,0	
A.15	Hexano/AcOEt 60%	31-37	125,5	
A.16	Hexano/AcOEt 80%	38	8,6	
A.17	Hexano/AcOEt 90%	39-43	41,8	
A.18	AcOEt	44	15,5	
A.19	AcOEt/MeOH 20%	45-52	172,8	
A.20	AcOEt/MeOH 40%	53-54	157,8	
A.21	AcOEt/MeOH 60%	55-56	193,2	

A fração **A.5** foi recristalizada com MeOH, fornecendo a substância codificada como **FR-2** (180,9 mg).

Pela análise das frações **A.1** a **A.21** em CCD, observou-se que as frações que se apresentaram menos complexas quando submetidas à presença de iodo e pulverização com revelador para terpenos foram às frações **A.11, A.15,** e **A.19**.

A fração **A.15** (125,5g) foi submetida ao processo de purificação em uma coluna cromatográfica empacotada com óxido de alumina neutro e eluída em sistema de solventes hexano/AcOEt 10, 20, 30, 50, 70, 80 e 90%, AcOEt e AcOEt/MeOH 10, 20 e 40%, porém não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

4.2.5.1. Estudo da Fração A.11

Parte da fração **A.11** (435 mg) foi submetida à CC de sílica gel (25,0 g; ∅ 1,5 cm), utilizando como eluentes hexano, hexano-AcOEt e AcOEt-MeOH, fornecendo 50 sub-frações, que após reunidas conforme semelhança apresentada em análise de CCD, resultaram em 13 novas sub-frações. A sub-fração **A.11.3** (174,9 mg) forneceu a substância **FR-1**.

4.2.5.2. Estudo da fração A.19

Parte da fração **A.19** (149,2 mg) foi submetida à CC de sílica gel (12,0 g; ∅ 1,5 cm), utilizando como eluentes hexano-AcOEt, AcOEt e AcOEt-MeOH, fornecendo 35 sub-frações, que após reunidas conforme análise em CCD, resultaram em 11 novas sub-frações **(Tabela 03)**.

Tabela 03: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **A.19** em sílica gel

Código	Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
A.19.1	Hexano/AcOEt 50%	1	1,7	
A.19.2	Hexano/AcOEt 50%	2-3	17,5	
A.19.3	Hexano/AcOEt 50%	4-8	2,4	FR-3
A.19.4	Hexano/AcOEt 70%	9-17	30,8	
A.19.5	Hexano/AcOEt 90%	18-20	5,2	
A.19.6	AcOEt	21	4,8	
A.19.7	AcOEt	22-23	13,9	
A.19.8	AcOEt/MeOH 20%	24	2,5	
A.19.9	AcOEt/MeOH 20%	25-27	6,7	
A.19.10	AcOEt/MeOH 40%	28-31	7,3	
A.19.11	AcOEt/MeOH 60%	32-35	3,4	

A sub-fração **A.19.3** forneceu uma substância codificada como **FR-3** (2,4 mg).

4.2.6. Estudo da Fração Acetato de Etila (B)

A fração acetato de etila **(B)** (2970,0 mg) foi submetida à CC de sílica gel (95,0 g; ∅ 2,5 cm), utilizando como eluentes hexano-AcOEt, AcOEt e AcOEt-MeOH, resultando em 117 frações, que após reunidas de acordo com semelhança em CCD, resultaram em 17 novas frações **(Tabela 04).**

Tabela 04: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **B** em sílica gel

Código	Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
B.1	Hexano/AcOEt 10%	1-12	1,6	
B.2	Hexano/AcOEt 20%	13-17	7,4	
B.3	Hexano/AcOEt 30%	18-22	138,7	FR-1
B.4	Hexano/AcOEt 30%	23-32	211,5	FR-1
B.5	Hexano/AcOEt 40%	33-37	24,2	
B.6	Hexano/AcOEt 40%	38-42	7,5	
B.7	Hexano/AcOEt 50%	43-45	64,7	
B.8	Hexano/AcOEt 50%	46-62	74,1	
B.9	Hexano/AcOEt 80%	63-91	197,8	
B.10	Hexano/AcOEt 90%	92	12,5	
B.11	Hexano/AcOEt 90%	93	12,0	
B.12	AcOEt	94	16,0	
B.13	AcOEt	95-98	74,1	
B.14	AcOEt/MeOH 10%	99-104	909,0	
B.15	AcOEt/MeOH 30%	105-127	456,7	
B.16	AcOEt/MeOH 50%	128	5,2	
B.17	AcOEt/MeOH 80%	129-146	83,9	

A fração **B.3** e **B.4** foi recristalizada com MeOH, fornecendo a substância pura codificada como **FR-1** (311,2 mg).

A fração **B.5** foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP, sílica gel 60) eluída com hexano-AcOEt 40%, porém não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

4.2.6.1. Estudo da Fração B.7

A fração **B.7** (64,7 mg) foi submetida ao processo de purificação em uma coluna cromatográfica empacotada com óxido de alumina neutro eluído em sistema de solventes: hexano-AcOEt, AcOEt e AcOEt-MeOH, fornecendo em 76 sub-frações, que após reunidas conforme análise em CCD, resultaram em 11 novas sub-frações **(Tabela 05)**.

Tabela 05: Dados obtidos da coluna empacotada com óxido de alumina neutro da fração **B.7**

Código	Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
B.7.1	Hexano/AcOEt 5%	1-5	2,7	
B.7.2	Hexano/AcOEt 5%	6-9	8,5	FR-1
B.7.3	Hexano/AcOEt 5%	10	4,1	
B.7.4	Hexano/AcOEt 5%	11	2,8	
B.7.5	Hexano/AcOEt 10%	12-22	3,5	
B.7.6	Hexano/AcOEt 25%	23-35	3,3	
B.7.7	Hexano/AcOEt 50%	36-38	2,4	FR-4
B.7.8	Hexano/AcOEt 75%	39-64	4,0	
B.7.9	AcOEt	65-68	3,2	
B.7.10	AcOEt/MeOH 20%	69	2,9	
B.7.11	AcOEt/MeOH 20%	70-76	3,3	

As sub-frações **B.7.2** e **B.7.7** forneceram as substâncias **FR-1** (8,5 mg) e **FR-4** (2,4 mg) respectivamente.

4.2.6.2. Estudo da Fração B.8

Parte da fração **B.8** (110,6 mg) foi submetida à CC de sílica gel (9,74 g; ∅ 1,0 cm), utilizando como eluentes hexano, hexano-AcOEt e AcOEt-MeOH, fornecendo 50 sub-frações, que após reunidas conforme semelhança apresentada através de análise em CCD, resultaram em 17 novas sub-frações. As sub-frações **B.8.3** e **B.8.4** foram recristalizadas com MeOH fornecendo a substância **FR-1**(33,6 mg).

4.2.6.3. Estudo da Fração B.9

A fração **B-9** (197,8 mg) foi submetida ao processo de purificação em uma coluna cromatográfica empacotada com óxido de alumina neutro eluído em sistema solventes hexano-AcOEt, AcOEt e AcOEt-MeOH em gradiente de polaridade, resultando em 69 sub-frações, que após reunidas conforme a semelhança apresentada através da análise em CCD, resultaram em 17 novas sub-frações. As sub-frações **B.9.2** e **B.9.3** forneceram a substância **FR-1** (26,1 mg).

4.2.6.4. Estudo da Fração B.13

A fração **B.13** (74,1 mg) foi submetida à CC de sílica gel (4,0 g; ∅ 1,0 cm), utilizando como eluentes hexano-AcOEt, AcOEt e AcOEt-MeOH, fornecendo 25 sub-frações, que após

reunidas conforme de acordo com semelhança em CCD, resultam em 10 novas sub-frações **(Tabela 06)**.

Tabela 06: Dados obtidos da coluna cromatográfica da fração **B.13** em sílica gel

Código	Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)	Substância isolada
B.13.1	Hexano/AcOEt 20%	1	7,5	FR-5
B.13.2	Hexano/AcOEt 20%	2	6,6	
B.13.3	Hexano/AcOEt 20%	3	7,2	
B.13.4	Hexano/AcOEt 40%	4	6,1	
B.13.5	Hexano/AcOEt 40%	5-7	23,3	
B.13.6	Hexano/AcOEt 50%	8-9	3,2	
B.13.7	Hexano/AcOEt 70%	10-12	3,2	
B.13.8	AcOEt	13-20	7,5	
B.13.9	AcOEt/MeOH 30%	21	2,1	
B.13.10	AcOEt/MeOH 50%	22-25	2,4	

A sub-fração **B.13.1** forneceu a substância codificada como **FR-5** (7,5 mg).

A sub-fração **B.14** foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20, eluída em H_2O, H_2O-MeOH 20, 40, 50, 70 % e MeOH, porém devido a complexidade das frações quando analisadas em CCD não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

A sub-fração **B.15** foi submetida à CC de sílica gel (24,0 g), utilizando como eluentes: hexano-AcOEt 30, 40, 50, 60, 70 e 90%, AcOEt, AcOEt-MeOH 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% e MeOH, porém não foi possível o isolamento de nenhuma substância pura.

4.2.7. Estudo da Fração Hidrometanólica (C)

A fração hidrometanólica **(C)** (2034,2 mg) foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20, eluída em H_2O, H_2O-MeOH e MeOH, resulando em 35 frações, que após reunidas de acordo com semelhança em CCD, resultam em 12 novas frações **(Tabela 07)**.

Com a adição de água na coluna observou-se que quase toda massa da amostra **C** foi obtida nas frações **C.1** e **C.2**.

Tabela 07: Dados da filtração da fração **C** em Sephadex LH-20

Código	Eluente	Frações reunidas	Massa (mg)
C.1	H_2O	1	265,9
C.2	H_2O	2	1130,1
C.3	H_2O	3	60,7
C.4	H_2O	4	17,3
C.5	H_2O	5	16,4
C.6	H_2O/MeOH 20%	6-7	19,8
C.7	H_2O/MeOH 20%	8	10,8
C.8	H_2O/MeOH 20%	9-12	19,6
C.9	H_2O/MeOH 40%	13-20	38,6
C.10	H_2O/MeOH 60%	21-23	5,4
C.11	H_2O/MeOH 60%	24-30	4,2
C.12	MeOH	31-35	7,0

4.2.7.1 Estudo da Fração C.4

A fração **C.4** (17,3 mg) foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20, eluída em H_2O e H_2O-MeOH resultando em 08 sub-frações, que após foram reunidas de acordo com semelhança em CCD, resultaram em 05 novas sub-frações. A sub-fração **C.4.2** forneceu a substância **FR-6** (2,8 mg).

4.2.7.2 Estudo da Fração C.8

A fração **C.8** (19,6 mg) foi submetida à filtração em coluna de Sephadex LH-20, eluída em H_2O, H_2O-MeOH e MeOH, fornecendo 10 sub-frações, que após reunidas conforme semelhança apresentada através de análise em CCD, resultaram em 07 frações. As sub-frações **C.8.4** e **C.8.11** forneceram as substâncias **FR-5** (3,2 mg) e **FR-7** (2,8 mg), respectivamente.

4.3. Avaliação da Atividade Antioxidante

Os testes para avaliação da atividade antioxidante foram realizados no Departamento de Química /UEM, sob responsabilidade do Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa.

O teste foi realizado com o extrato bruto metanólico, as frações **A**, **B** e **C** e a substância pura **FR-1** da planta *Ficus radicans* Variegata. A avaliação da atividade antioxidante foi feita através do método de descoramento via radical livre DPPH.

4.3.1. Avaliação da Atividade Antioxidante (Método do DPPH)

Os potenciais de atividade antioxidante para o extrato bruto metanólico, as frações **A**, **B**, **C** e substância **FR-1** foram determinados com base na atividade seqüestradora de radical livre do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)[29]. Pesaram-se as amostras a serem testadas (0,020g para o extrato metanólico, as frações **A**, **B**, **C** e 0,01 g para a substância **FR-1**) e diluiu-se em 10 mL de metanol. Pesou-se 0,0047g de DPPH e diluiu-se em 75 mL de metanol. Adicionou-se 25 μL das amostras diluídas em metanol e 2 mL de solução de DPPH e realizou-se a leitura de absorbância em um aparelho de UV/VIS-Cary 50, VARIAN, em 515,5 nm. Para o cálculo do IC_{50} (concentração correspondente à inibição de 50%) foram preparadas e determinadas as absorbâncias de soluções das amostras em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 300, 400, 600 μL). Os testes foram realizados em triplicata. O butil-hidróxitolueno (BHT) foi utilizado como padrão e sua absorbância foi determinada para 5, 10, 25 e 50 μL. A porcentagem de inibição foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%I=\frac{(A_O-A_x)\times 100}{A_O}$$

A_0: Absorbância da solução de DPPH

Ax: Absorbância da solução de DPPH em presença das amostras

4.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado no Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, pela técnica Marinete Martinez, sob coordenação do Prof. Dr. Benedito Dias Prado Filho, aplicando-se o teste de susceptibilidade para a determinação da concentração mínima inibitória.

4.4.1.1. Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

A CMI (concentração mínima inibitória/concentração bacteriostática ou concentração fungiostática) é a menor concentração de uma droga em μg/mL que inibe o crescimento do microorganismo. No teste de susceptibilidade, a CMI é determinada pelo poço da placa de microtitulação com a menor concentração da droga-teste que está sem turvação. A concentração mínima tanto fungicida (CMF) ou bactericida (CMB) é a menor concentração da droga que mata 99,9% do fungo ou bactéria teste. A CMF ou CMB é determinada pela subcultura do poço (well) "sem crescimento" do teste de determinação do CMI em placa de Petri contendo o meio Agar Sabourand para o teste fungicida e Mueller-Hinton para o bactericida.

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

4.4.1.2. Teste de Susceptibilidade Antibacteriana

O teste foi realizado com o extrato bruto metanólico, as frações **A**, **B**, **C** e a substância **FR-1** de *Ficus radicans* Variegata e as bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Escherichia coli* ATCC 2522 e os antibióticos controle penicilina, vancomicina e tetracilina, respectivamente.

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados, aplicando-se o teste de susceptibilidade pelo método de microdiluição[30] para a determinação da concentração mínima inbitória (CMI) da amostra e dos antibióticos de referência usando meio Mueller-Hinton segundo normas descritas pelo NCCLS.

A solução estoque da amostra (20 mg) dissolvida em DMSO (1mL) foi diluída repedidamente em meio Mueller-Hinton, obtendo uma série de concentrações na ordem de 1 mg para 10 μg/mL. O inóculo bacteriano foi preparado com o mesmo meio e a densidade ajustada por comparação ao tubo n° 0,5 da escala Mac Farland ($1,5 \times 10^{18}$ UFC/mL), e em seguida diluída 1:100 no mesmo meio. Alíquotas de 5 μL da suspensão de bactérias foram adicionadas a cada poço da placa de microdiluição contendo 100 μL das diluições decimais da amostra ou de antibióticos de referência. Foram utilizados também como controle, meio não inoculado (controle de esterilidade) e meio sem droga (controle negativo). As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas.

4.4.1.3. Teste de Susceptibilidade Antifúngica

O teste foi realizado com o extrato metanólico, as frações **A**, **B**, **C** e a substância **FR-1** de *Ficus radicans* Variegata, utilizando o fungo leviduforme *Candida albicans* e como antifúngico padrão utilizou-se a micostatina**.**

Para a padronização do inóculo do fungo leviduforme foi utilizado 5 colônias de uma cultura de levedura em Ágar Sabouraud, em 5 mL de solução salina estéril, e comparadas com o tubo 0,5 da escala Mac Farland (1,5 x 10^8 UFC/mL). A suspensão do fungo leviduforme foi diluída 1:100 em água destilada (4,95 mL de água destilada + 50 μL da suspensão). Em seguida 2 mL dessa suspensão foram adicionados em 38 mL de meio RPMI-1640 (diluição 1:20).

Para a determinação da concentração mínima inibitória (método da microdiluição), um volume de 0,9 mL da suspensão do fungo diluída em RPMI-1640 1:20 foi transferido para tubos (12 x 75 mm) estéreis numerados de 1 a 13. No tubo 14 foi colocado somente o meio RPMI-1640 diluído (controle de esterilidade). No tubo 13 (controle de crescimento em tween) foi colocado 100 μL de tween 80 a 1%. Nos tubos 1 a 11 foram adicionados 100 μL do extrato metanólico diluídos seriadamente. Os tubos foram incubados à temperatura de 37°C por 24 horas.

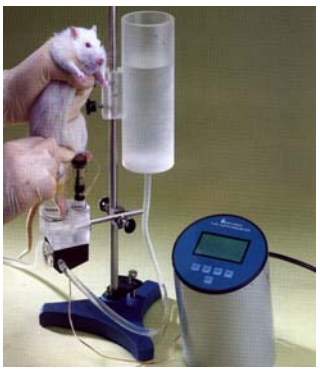
4.4.2. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

A avaliação da atividade anti-inflamatória por indução do edema na orelha de camundongo e por Indução do edema na pata de rato foi realizada no departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, sob coordenação da Profª. Drª. Ciomar A. Bersani Amado.

4.4.2.1. Indução do Edema na Pata de Rato

O **Esquema 2** mostra uma visão geral da sequência utilizada para a avaliação da atividade anti-inflamatória, que é de indução de edema em pata de rato. Na sequência será feita a descrição mais detalhada da metodologia utilizada.

ratos machos (Wistar)
Peso: 200-220g



Medida das patas até a articulação, com auxilío do pletismógrafo

Injeção da amostra (extrato metanólico e frações **A** e **C** de *Ficus radicans* Variegata) via oral

Após meia hora, é injetado o agente irritante (carregenina) em uma das patas e na outra é injetado um volume igual de solução salina, a mesma que é utilizada para dissolver o agente irritante.

Após vários intervalos de tempo (1, 2, 4 horas), fez-se a leitura novamente.

Esquema 2: Metodologia utilizada para avaliação da atividade anti-inflamatória de *Ficus radicans* Variegata.

O edema de pata foi induzido pela injeção intradérmica de 0,1 mL de uma suspensão de carragenina dissolvida em salina estéril (2,0 mg/mL), em uma das patas posteriores do rato. Na pata contralateral foi injetado igual volume de salina (controle).[31]

O volume das patas (μL) até a articulação tíbio-társica foi medido 1, 2 e 4 horas após a injeção de carragenina, utilizando um pletismógrafo digital (Ugo Basile®).

O edema foi expresso em termos de aumento do volume da pata, subtraindo-se os valores da pata injetada com salina (pata controle) dos valores da pata injetada com carragenina.

O extrato total de *Ficus radicans* Variegata (500 $mg.Kg^{-1}$) e a indometacina (5 $mg.kg^{-1}$), fármaco anti-inflamatório de referência, e o veículo (DMSO 16 %), foram administrados por via oral (gavagem) nos animais sob jejum de 18 h, 1 hora antes da indução do edema. Um grupo de

animais recebeu volume equivalente de salina 0,9% (controle), por via oral, sob as mesmas condições anteriores.

4.4.2.2 Indução do Edema na Orelha de Camundongo

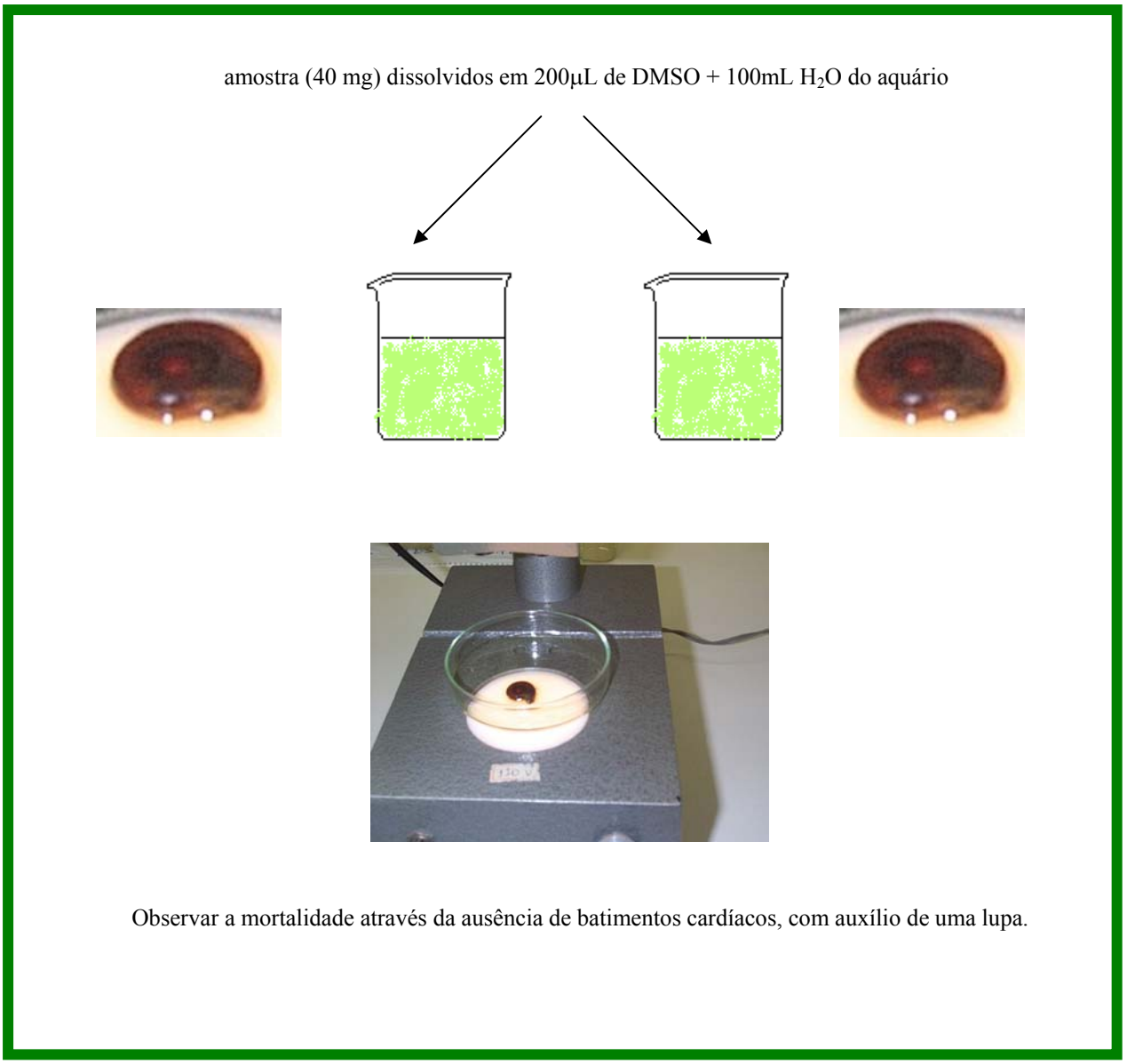
O edema foi induzido através da aplicação de 20 µL de óleo de cróton (200 µg) diluído em solução de acetona/água (7:3) ou em solução de clorofórmio/água (7:3) na face interna da orelha esquerda do camundongo. A orelha direita recebeu somente o veículo (20 µL). Imediatamente após a injeção do agente irritante 20 µL do extrato bruto, das frações, hexânica (**A**), acetato (**B**) e aquosa (**C**) (5,0 mg), ou da substância pura (**FR-1**), na dose de 5,0 mg foi aplicado na orelha esquerda. No grupo controle foi aplicado 20 µL de veículo na orelha esquerda. Após 6 horas, os animais foram sacrificados, as orelhas seccionadas em discos circulares de 6,0 mm de diâmetro e pesadas (mg) em balança analítica. A porcentagem de inibição do edema foi determinada pela fórmula:

$$(\%)\ \text{de inibição} = \frac{\text{peso da orelha E}_{\text{controle}} - \text{peso da orelha E}_{\text{tratada}}}{\text{peso da orelha E}_{\text{controle}} - \text{peso da orelha D}_{\text{veículo}}} \times 100$$

4.4.3 Avaliação da Atividade Moluscicida

A avaliação da atividade moluscicida foi realizada no departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, sob a coordenação da Profª. Drª. Maria Lucília Motinha Zamuner.

O **Esquema 3** mostra uma visão geral da metodologia utilizada para a avaliação da atividade moluscicida, conforme procedimento descrito por HOSTETTMANN et al[32]. Na seqüência será feita a descrição da metodologia utilizada.



Esquema 3: Procedimento utilizado para avaliação da atividade moluscicida de *Ficus radicans* Variegata.

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

Para realização do teste foram utilizadas amostras de extrato metanólico, frações **A**, **B** e **C** de *Ficus radicans* Variegata. As amostras (40 mg cada) foram dissolvidas em 200 µL de DMSO e diluídas em 100 mL de água do aquário, onde estavam mantidos os caramujos. O material foi dividido em dois béqueres, e em cada um deles, foi colocado três caramujos viável, ou seja, com batimentos cardíacos e tamanhos apropriados. Após 24 horas, os batimentos cardíacos foram observados através de lupa.

O teste é considerado positivo, quando os caramujos morrem ou demonstram alteração nos batimentos cardíacos.

O ensaio em branco (controle) foi realizado nas mesmas condições sem adição do extrato metanólico ou frações.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas

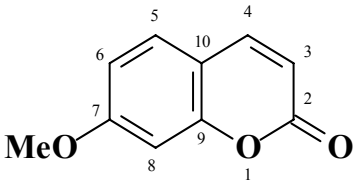
O estudo químico de *Ficus radicans* Variegata (folhas) resultou no isolamento de sete substâncias puras codificadas como **FR-1**, **FR-2**, **FR-3**, **FR-4**, **FR-5**, **FR-6** e **FR-7**.

As substâncias isoladas correspondem à classe de cumarinas (**FR-1**, **FR-4** e **FR-5**), esteróides (**FR-2** e **FR-3**), sendo também observado a presença de um derivado do ácido *trans*-cinamico (**FR-6**) e um flavonóide (**FR-7**).

As estruturas das substâncias isoladas foram propostas pela análise de seus dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H e de ^{13}C e técnicas de COSY, DEPT, HMQC, HMBC, NOE, NOESY e espectrometria de massas (EM) e comparação com dados obtidos da literatura, conforme descrito a seguir. A discussão sobre a identificação das substâncias isoladas será feita por classe de compostos.

5.1.1. CUMARINAS

5.1.1.1. Substância FR-1



A substância **FR-1** foi isolada nas frações **P**, **A** e **B** e nas sub-frações **P.4**, **A.11.3**, **B.3**, **B.4**, **B.7**, **B.8** e **B.9**. O espectro de RMN de ^{1}H **(Figura 04)** apresentou sinais de hidrogênios de um sistema carbonílico α,β-insaturado em δ_H 6,25 (d, *J*=9,6 Hz, H-3) e em 7,65 (d, *J*=9,6 Hz, H- 4) e sinais para os hidrogênios do anel aromático H-5, H-6 e H-8 em δ_H 7,38 (d, *J*=8,7 Hz), δ_H 6,86 (dd, *J*=8,7; 2,4 Hz) e δ_H 6,80 (d, *J*=2,4 Hz), respectivamente, característicos de compostos contendo o esqueleto básico de cumarinas. O sinal em δ_H 3,90 foi atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila.

Os dados obtidos a partir do espectro de RMN de ^{13}C e do experimento de DEPT **(Figuras 05 e 06)** apresentaram cinco sinais de carbonos ligados a hidrogênios na região entre δ_C 100,9 a 143,6, um sinal em δ_C 55,9 correspondente ao carbono metílico do grupo metoxila. O sinal do carbono carbonílico aparece no espectro de RMN de ^{13}C em δ_C 163,0.

A análise das correlações observadas nos espectros bidimensionais de ^{1}H x ^{1}H COSY **(Figura 07)** confirmaram o acoplamento entre os sinais em δ_H 6,25 (*J*=9,6 Hz, H-3) com δ_H 7,65 (*J*=9,6 Hz, H- 4); δ_H 7,38 (*J*=8,7 Hz, H-5) com δ_H 6,86 (*J*=8,7 Hz, H-6) e entre os sinais em δ_H 6,86 (*J*=8,7; 2,4 Hz, H-6) com δ_H 6,80 (*J*=2,4 Hz, H-8).

O espectro de HMQC **(Figura 08)** mostrou as correlações entre os sinais em δ_H 6,25 (H-3) com δ_C 113, 2 (C-3); δ_H 6,80 (H-8) com δ_C 100,9 (C-8); δ_H 6,86 (H-6) com δ_C 112,6 (C-6); δ_H 7,38 (H-5) com δ_C 128,9 (C-5) e δ_H 7,65 (H-4) com δ_C 143,6 (C-4).

A partir da análise do espectro de NOEDIFF (**Figura 09**) foi possível determinar o posicionamento da metoxila ligada a C-7, mostrando um aumento na intensidade do sinal de hidrogênio aromático H-8 pela irradiação do sinal em δ_H 3,90 (OMe).

Os dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para a substância **FR-1** foram comparados com os obtidos da literatura[33-34] (**Tabela 08**) o que nos permitiu confirmar a estrutura da substância isolada como 7-metóxicumarina.

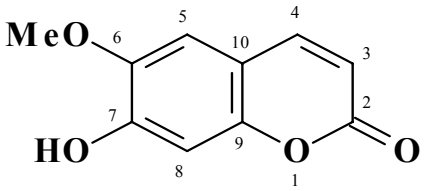
Tabela 08: Dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) e de ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$) para a substância **FR-1** e para a substância **7-metóxicumarina**.

	FR-1		**7-metóxicoumarina**	
	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{13}C	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{13}C
OMe	3,90 (s)	55,9	3,90 (s)	56,1
2	-	163,0	-	162,7
3	6,25 (d, *J*=9,6 Hz)	113,2	6,26 (d, *J*=9,5 Hz)	112,8
4	7,65 (d, *J*=9,6 Hz)	143,6	7,65 (d, *J*=9,5 Hz)	144,9
5	7,38 (d, *J*=8,7 Hz)	128,9	7,38 (d, *J*=8,6 Hz)	129,6
6	6,86 (dd, *J*=8,7, 2,4 Hz)	112,6	6,85 (dd, *J*= 8,6, 2,5 Hz)	113,2
7	-	161,4	-	163,6
8	6,80 (d, *J*=2,4 Hz)	100,9	6,82 (d, *J*= 2,5 Hz)	101,1
9	-	156,0	-	156,2
10	-	112,7	-	113,1

Não há relatos na literatura da substância 7-metóxicumarina ter sido isolada no gênero *Ficus*, mas esta substância já foi isolada na família Moraceae, da espécie *Treculia obovoidea*.[35]

Com relação a estudos biológicos, a literatura descreve a atividade antimicrobiana desta substância, pelo método da microdiluição, frente a várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e frente aos fungos *Candida albicans*, *Candida gabrata* e *Candida krusei*, sendo que a substância 7-metóxicumarina apresentou atividade moderada com valor de CMI=156,25 μg/mL.[36]

5.1.1.2. Substância FR-4



A substância **FR-4** foi isolada da sub-fração **B.7**. O espectro de RMN de ^{1}H (**Figura 10**) mostrou sinais característicos do núcleo de cumarina em δ_H 6,23 (d, *J*=9,6 Hz) e em δ_H 7,55 (d, *J*=9,6 Hz) correspondentes aos hidrogênios H-3 e H-4 do sistema carbonilico α,β-insaturado, além dos sinais para os hidrogênios do sistema aromático H-5 e H-8 em δ_H 6,78 (s) e 6,90 (s). O sinal em δ_H 3,90 (s) foi atribuído aos hidrogênios da metoxila.

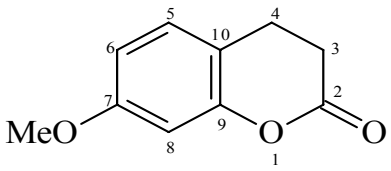
Não foi possível a realização do espectro de RMN de ^{13}C devido à substância isolada apresentar massa insuficiente. A comparação com dados espectroscópicos de RMN de ^{1}H obtidos da literatura[37] (**Tabela 09**) nos permitiu confirmar a estrutura da substância isolada **FR-4** como 7-hidróxi-6-metóxi-cumarina (escopoletina).

Tabela 09: Dados de RMN de ^{1}H de **FR-4** (300 MHz, CD_3OD) e **7-hidróxi-6-metóxi-cumarina** (**escopoletina**) (300 MHz, acetona-d_6).

	FR-4	**escopoletina**
H	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{1}H (mult., *J*)
OMe	3,90 (s)	3,9 (s)
3	6,23 (d, *J*=9,6 Hz)	6,20 (d, *J*=9,5 Hz)
4	7,55 (d, *J*=9,6 Hz)	7,85 (d, *J*=9,5 Hz)
5	6,90 (s)	6,84 (s)
8	6,78 (s)	6,59 (s)

A escopoletina já foi isolada em *Ficus pumila*[38] e várias atividades são descritas na literatura para esta substância, dentre elas, atividade anti-angiogênica[39], atividade vasorelaxante quando testada em aortas de ratos[40] e atividade anti-inflamatória, com significativa inibição do edema de pata e inibição de 56,5% do edema de orelha[41]. A escopoletina foi também testada em linfócitos normais T e linfoma hiperproliferativo T, causando a indução e proliferação de células linfócito normal T, o que demonstra o potencial antitumoral e o possível uso desta substância no tratamento de câncer.[42]

5.1.1.3. Substância FR-5



A substância **FR-5** foi isolada da sub-fração **B.13**. O espectro de RMN de ^{1}H (**Figura 11**) indicou a presença de 3,4-diidrocumarina pelos sinais em δ_H 2,51 (t, *J*=7,3 Hz) e δ_H 2,73 (t, *J*=7,3 Hz) referentes aos hidrogênios dos carbonos metilênicos H-3 e H-4, respectivamente, além dos sinais em δ_H 6,89 (d, *J*=7,5 Hz), δ_H 6,25 (dd, *J*=10,8, 2,7 Hz) e δ_H 6,29 (d, *J*=2,7 Hz) referentes aos hidrogênios H-5, H-6 e H-8 do anel aromático. O sinal em δ_H 3,64 foi atribuído aos hidrogênios da metoxila ligado ao carbono C-7.

Os espectros de RMN de ^{13}C/DEPT (**Figuras 12** e **13**) apresentaram sinais em δ_C 34,5 e 24,9 referentes aos carbonos saturados C-3 e C-4, respectivamente, sinal em δ_C 159,2 referente ao carbono aromático ligado ao grupo metoxila C-7 e os sinais em δ_C 130,5, 105,0 e 101,9 correspondentes aos carbonos C-5, C-6 e C-8, respectivamente, do sistema aromático. O sinal em δ_C 55,2 foi atribuído ao carbono metílico do grupo metoxila.

O espectro de ^{1}H x ^{1}H COSY (**Figura 14**) confirmou a conectividade entre os hidrogênios H-3 e H-4 devido às correlações entre os sinais em δ_H 2,51 (*J*=7,3 Hz, H-3) com δ_H 2,73 (*J*=7,3 Hz, H-4), bem como, os acoplamentos entre os hidrogênios aromáticos devido as correlações entre os sinais em δ_H 6,89 (*J*=7,5 Hz, H-5) com δ_H 6,29 (*J*= 2,7 Hz, H-8) e δ_H 6,29 (*J*=2,7 Hz, H-8) com δ_H 6,25 (*J*=10,8, 2,7 Hz, H-6).

O espectro de HMQC (**Figura 15**) mostrou as correlações entre δ_H 3,64 com δ_C 55,2 δ_H; 2,51 (H-3) com δ_C 34,5 (C-3); δ_H 2,73 (H-4) com δ_C 24,9 (C-4); δ_H 6,29 (H-8) com δ_C 101,9 (C-8); δ_H 6,89 (H-5) com δ_C 130,5 (C-5) e δ_H 6,25 (H-6) com δ_C 105,0 (C-6) confirmando a presença de 7-metóxi-3,4-diidrocumarina.

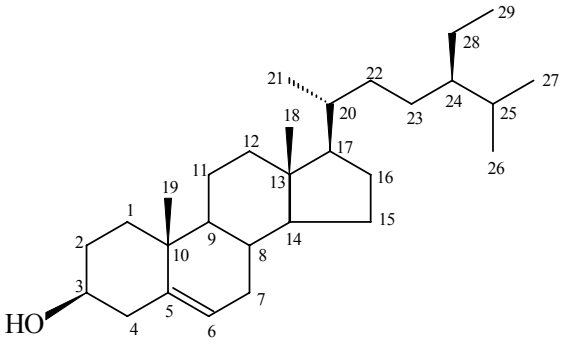
Os dados espectroscópicos de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) para a substância isolada **FR-5** foram concordantes com os da literatura de RMN de ^{1}H (60 MHz) para a substância 7-metóxi-3,4-diidrocumarina[43] que de acordo com levantamento bibliográfico ainda não foi isolada em plantas (**Tabela 10**).

Tabela 10: Dados espectroscópicos de RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) para **FR-5** e RMN de ^{1}H (60 MHz) para a substância **7-metóxi-3,4-diidrocumarina**.

	FR-5		**7-metóxi-3,4-diidrocumarina**
C	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{13}C	δ ^{1}H (mult.)
OMe	3,64 (s)	55,2	3,85 (s)
2	-	177,0	-
3	2,51 (t, *J*=7,3 Hz)	34,5	2,74 (t)
4	2,73 (t, *J*=7,3 Hz)	24,9	2,93 (t)
5	6,89 (d, *J*=7,5 Hz)	130,5	7,08 (d)
6	6,25 (dd, *J*=10,8, 2,7 Hz)	105,0	6,65 (dd)
7	-	159,2	-
8	δ_H 6,29 (d, *J*=2,7 Hz)	101,9	6,59 (d)
9	-	155,6	-
10	-	119,8	-

5.1.2. ESTERÓIDES

5.1.2.1. Substância FR-2



A substância **FR-2** foi isolada da sub-fração **A.5**. O espectro de RMN de ^{1}H (**Figura 16**) apresentou sinais entre δ_H 0,68 - 1,01 referentes às metilas H-18, H-19, H-21, H-26, H-27 e H-29, um sinal em δ_H 3,52 (m) correspondente ao hidrogênio oximetínico H-3, um sinal em δ_H 5,35 (sl) referente ao hidrogênio H-6. Estes dados indicaram a presença de esqueleto esteroidal para **FR-2**.

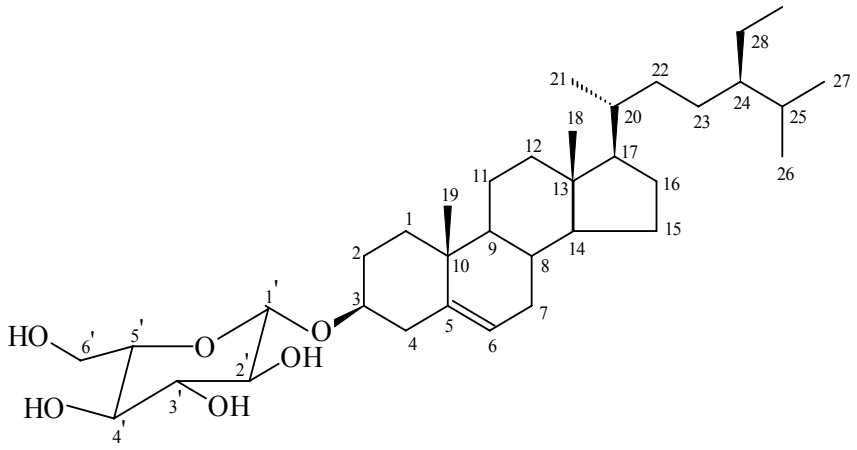
O esqueleto esteroidal foi evidenciado também pelos espectros de RMN de ^{13}C/DEPT (**Figuras 17** e **18**) devido aos sinais em δ_C 121,9 e 140,9 referentes aos carbonos C-6 e C-5, respectivamente; seis sinais entre δ_C 12,0 e 19,6 atribuídos aos carbonos metílicos C-18, C-19, C-21, C-26, C-27 e C-29; onze sinais de carbonos metilênicos na região entre δ_C 21,3 e 42,4 correspondentes aos carbonos C-1, C-2, C-4, C-7, C-11, C-12, C-15, C16, C-22, C-23 e C-28, além dos sinais de carbonos metínicos na região de δ_C 29,3 a 71,6. Os sinais de carbonos saturados não ligados a hidrogênios aparecem no espectro de RMN de ^{13}C na região de δ_C 36,4 a 42,5.

Os dados de RMN de ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) da substância **FR-2** foram comparados com os dados da literatura[44] (300 MHz, $CDCl_3$) e foram concordantes com os do β-sitosterol (**Tabela 11**).

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C (300 MHz, $CDCl_3$) da substância **FR-2** e do **β-sitosterol** (300, $CDCl_3$)

	FR-2	**β-Sitosterol**
C	δ ^{13}C	δ ^{13}C
1	37,4	37,2
2	31,8	31,6
3	71,9	71,8
4	42,5	42,3
5	140,9	140,8
6	121,9	121,7
7	32,1	31,8
8	32,1	31,8
9	50,3	50,1
10	36,4	36,5
11	21,3	21,1
12	39,9	39,7
13	42,5	42,3
14	56,9	56,8
15	24,5	24,3
16	28,4	28,2
17	56,9	56,1
18	12,0	11,9
19	19,2	19,4
20	36,3	36,1
21	18,9	18,9
22	34,1	33,9
23	26,2	26,0
24	46,0	45,8
25	29,3	29,1
26	19,6	19,8
27	19,0	19,0
28	23,2	23,0
29	12,0	12,0

5.1.2.2. Substância FR-3



A substância **FR-3** foi isolada da sub-fração **A.19.3**. O espectro de RMN de ^{1}H (**Figura 19**) apresentou sinais característicos de compostos contendo núcleo esteroidal, como em δ_H 5,30 referente ao hidrogênio da posição 6; em δ_H 3,14 do hidrogênio carbinólico H-3, além dos sinais para seis grupos metilas entre δ_H 0,61 – 1,10. Os sinais na região de δ_H 3,01 – 3,79 de hidrogênios oximetínicos e em δ_H 4,31 (d, *J*=7,8 Hz), relativo a um hidrogênio anomérico, indicaram a presença de uma unidade glicosídica.

Os espectros de RMN de ^{13}C/ DEPT (**Figuras 20** e **21**) também revelaram sinais característicos de substâncias contendo núcleo esteroidal, mostrando dois carbonos insaturados em δ_C 141,2 e 122,6, seis carbonos metílicos em 21,7; 20,1; 19,7; 19,3; 19,1; 12,2 e sinais de carbonos metilênicos na região de δ_C 21,7 a 39,2. Além dos sinais referentes ao núcleo esteroidal foram observados sinais para carbonos metínicos (CH) em δ_C 101,9 ; 74,4; 76,9; 71,0 ; 74,4 e metilênico em δ_C 62,4 (CH_2) evidenciando uma unidade glicosídica, a qual foi identificada como glicose.

O sinal em δ_H 4,31 (d, *J*=7,8 Hz) indicou que o hidrogênio anomérico encontra-se em posição axial, levando a uma configuração β para o carbono anomérico da glicose.

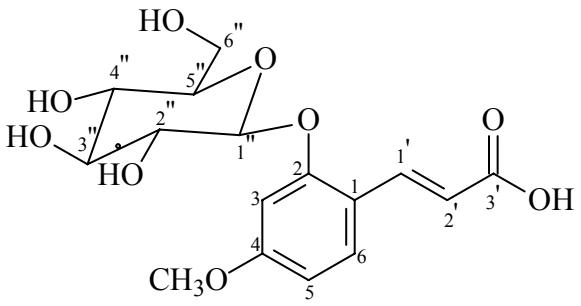
Os dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C (300 MHz, CD_3OD) da substância isolada **FR-3** foram comparados com a literatura[45] (75,5 MHz, C_5D_5N) (**Tabela 12**) e foram concordantes com os do 3-O-β-glucopiranosil sitosterol**.**

Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C de **FR-3** (300 MHz, CD_3OD) e do **3-O-β-glucopiranosil sitosterol** (75,5 MHz, C_5D_5N).

	FR-3	**3-O-β-glucopiranosil sitosterol**
C	δ ^{13}C	δ ^{13}C
1	37,9	37,2
2	30,2	29,9
3	78,5	78,2
4	39,2	39,0
5	141,2	140,6
6	122,6	122,6
7	32,6	31,8
8	29,8	31,9
9	51,0	50,0
10	36,8	36,6
11	21,7	21,0
12	39,2	39,6
13	42,9	42,2
14	56,7	56,5
15	24,9	24,2
16	28,8	28,2
17	56,8	55,9
18	12,3	11,7
19	19,1	19,1
20	39,2	38,1
21	19,3	18,9
22	34,6	33,9
23	26,6	26,1
24	46,6	45,7
25	28,9	29,2
26	19,7	18,7
27	20,1	19,7
28	28,9	23,1
29	12,2	11,9
1’	101,9	102,2
2’	74,4	75,0
3’	77,4	77,0
4’	71,0	71,3
5’	79,6	78,1
6’	62,4	62,5

5.1.3. DERIVADO DO ÁCIDO TRANS-CINAMICO

5.1.3.1. Substância FR-6



A substância **FR-6** foi isolada da sub-fração **C.4.2**. O espectro de RMN de ^{1}H (**Figura 22**) mostrou sinais em δ_H 7,73 (d, *J*=16,2 Hz) e δ_H 6,45 (d, *J*=16,2 Hz), referentes à H-1' e H-2', característicos de hidrogênios olefínicos em configuração *trans*. Os sinais em δ_H 6,83 (d, *J*=2,1 Hz), δ_H 6,77 (dd, *J*=8,7; 2,1 Hz) e δ_H 7,64 (d, *J*=8,7 Hz) correspondem aos hidrogênios H-3, H-5 e H-6 ligados ao anel aromático. Estes sinais indicaram que a substância **FR-6** apresenta o esqueleto básico de um derivado do ácido *trans*-cinamico.

Os sinais na região de δ_H 3,20 a 3,98, juntamente com o dupleto em δ_H 5,13 (d, *J*=7,5 Hz) referente ao hidrogênio anomérico, evidenciam a presença de uma unidade de glicose. O sinal em δ_H 3,87 refere-se aos hidrogênios da metoxila.

Os espectros de RMN de ^{13}C/DEPT (**Figuras 23** e **24**) confirmaram a presença do esqueleto básico de um derivado do ácido *trans*-cinamico pelos sinais de dois carbonos olefínicos em δ_C 138,1 (C-1') e δ_C 125,4 (C-2'), três sinais de carbonos aromáticos ligados a hidrogênio em δ_C 104,5 (C-3), δ_C 111,9 (C-5) e δ_C 131,8 (C-6), além de quatro sinais de carbonos não ligados a hidrogênios em δ_C 120,6 (C-1), δ_C 164,2 (C-4), δ_C 158,8 (C-2) e δ_C 178,9 (C-3'). A unidade de glicose foi evidenciada pelo sinal em δ_C 103,5, correspondente ao carbono anomérico, os sinais na região de δ_C 63,5 a 79,2 referente aos demais carbonos dessa unidade e o sinal em δ_C 58,4 foi atribuído ao grupo metoxila.

A análise das correlações observadas nos espectros bidimensionais de ^{1}H x ^{1}H COSY (**Figura 25**) confirmaram os acoplamentos entre δ_H 7,73 (*J*=16,2 Hz, H- 1') com δ_H 6,45 (*J*=16,2 Hz, H- 2'); δ_H 7,64 (*J*=8,7 Hz, H-6) com δ_H 6,77 (*J*=8,7; 2,5 Hz, H-5) e entre δ_H 6,77 (*J*=2,5; 8,7 Hz, H-5) com δ_H 6,83 (d, *J*=2,5Hz, H-3).

O espectro de HMQC (**Figura 26**) mostrou as correlações entre δ_H 6,45 (H-2') com δ_C 125,4 (C-2'); δ_H 6,83 (H-3) com δ_C 104,5 (C-3); δ_H 6,77 (H-5) com δ_C 111,9 (C-5); δ_H 7,64 (H-6)

com δ_C 131,8 (C-6); δ_H 7,73 (H-1') com δ_C 138,1 (C-1'), além das correlações entre δ_H 5,13 (H-1") com δ_C 103,5 C-1") para a unidade glicosídica e δ_H 3,87 com δ_C 58,4 para o grupo metoxila.

Pelo espectro de HMBC (**Figura 27**) foi possível confirmar a posição da unidade glicosídica e do grupo metoxila ligados aos carbonos C-2 e C-4 devido as correlação dos sinais entre δ_H 5,13 (H-1") com δ_C 158,8 (C-2); δ_C 158,8 (C-2) com δ_H 7,73 (H-1'); δ_H 6,83 (H-3) com δ_C 158,8 (C-2); δ_H 7,64 (H-6) com δ_C 158,8 (C-2); δ_H 6,83 (H-3) com δ_C 164,2 (C-2); δ_H 6,77 (H-5) com δ_C 120,7 9 (C-1); δ_H 6,45 (H-2') com δ_C 120,7 (C-1); δ_H 7,64 (H-6) com δ_C 138,1 (C-1'); δ_H 6,83 (H-3) com δ_C 111,9 (C-5) e δ_H 3,87 com δ_C 164,2 (C-4) e δ_H 7,73 (H-1') com δ_C 178,9 (C-3').

O espectro de NOESY (**Figura 28**) mostrou a correlação espacial de δ_H 6,45 (H-2') com δ_H 7,64 (H-6); δ_H 5,13 (H-1") com δ_H 6,83 (H-3) confirmando a posição da glicose ligado no carbono C-2; δ_H 6,77 (H-5) com δ_H 7,64 (H-6) e δ_H 6,77 (H-5) com os hidrogênios da metoxila δ_H 3,87, além das outras correlações correspondentes a unidade glicosídica.

A estrutura de **FR-6** foi confirmada pelo espectro de massas (**Figura 29**), o qual mostrou o pico do íon molecular em *m/z* 356 e picos resultantes da fragmentação do íon molecular em *m/z* 326, referente à perda de 30 unidades (CH_2O), provavelmente da glicose, o fragmento em *m/z* 176, referente à perda do grupo glucopiranosilóxi ($C_{10}H_9O_3$) e o pico em *m/z* 132, sendo referente à perda de 44 unidades (CO_2).

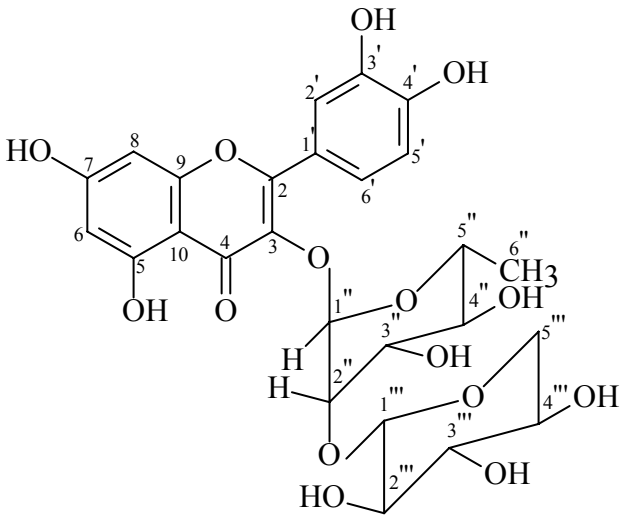
Os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância **FR-6** foram comparados e concordantes com os da literatura[46] (**Tabela 13**) para o ácido *trans*-2-β-D-glucopiranosilóxi-4-metoxi-cinamico.

Tabela 13: Dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C para a substância **FR-6** (300 MHz, D_2O)**,** para o **ácido *trans*-2-metóxi-4-hidroxicinamico** (500 MHz, CD_3OD) e para o **ácido *trans*-2-β-D-glucopiranosilóxi-4-metóxi-cinamico** (400, DMSO-d_6)**.**

	FR-6		**ácido *trans*-2-β-D-glucopiranosiloxi -4-metóxi-cinamico**	
	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{13}C	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{13}C
1	-	120,6	-	115,9
2	-	158,8	-	162,0
3	6,83 (d, *J*=2,5 Hz)	104,5	6,76 (d, *J*=2,4 Hz)	101,0
4	-	164,2	-	157,0
5	6,77 (dd, *J*=8,7;2,5 Hz)	111,9	6,62 (dd, *J*=8,7; 2,4 Hz)	108,0
6	7,64 (d, *J*=8,7 Hz)	131,8	7,62 (d, *J*=8,7 Hz)	129,3
1’	7,73 (d, *J*=16,2 Hz)	138,1	7,82 (d, *J*=16,2 Hz)	138,7
2’	6,45 (d, *J*=16,2 Hz)	125,4	6,41 (d, *J*=16,2 Hz)	116,6
3’	-	178,9	-	168,1
OMe	3,87 (s)	58,4	3,78 (s)	55,3
1”	5,13 (d, *J*=7,5 Hz)	103,4	5,01 (d, *J*=7,5 Hz)	99,9
2”-6”	~3,20-3,98	63,5-79,2	3,10-3,78	60,6-77,1

5.1.4. FLAVONÓIDE

5.1.4.1. Substância FR-7



A substância **FR-7** foi isolada da sub-fração **C.8.11**. O espectro de RMN de ^{1}H (**Figura 30**) apresentou sinais característicos de flavonóides em δ_H 6,04 (sl), 6,10 (sl), 7,11 (sl), 6,81 (d, *J*=8,1 Hz), 6,95 (dl, *J*=8,1 Hz) referentes aos hidrogênios H-6, H-8, H-2', H-5', H-6', respectivamente. Os sinais de hidrogênios anoméricos em δ_H 5,13 (sl, H-1") e δ_H 4,25 (d, *J*=7,5 Hz, H-1'") juntamente como sinal de hidrogênios metílicos em δ_H 1,01 (d, *J*=6,0 Hz, H-6") evidenciaram a presença de duas unidades glicosídicas, sendo uma a raminose e a outra a xilose.

Os espectros de RMN de ^{13}C/DEPT (**Figuras 31** e **32**) evidenciaram a presença da quercetina, como aglicona, devido a quatro sinais de carbonos aromáticos ligados a oxigênio em δ_C 146,7 (C-3'), 150,3 (C-4'), 162,8 (C-5) e 165,9 (C-7), cinco sinais de carbonos metínico em δ_C 98,0 (C-8), 101,8 (C-6), 119,0 (C-2'), 125,1 (C-6') e 118,5 (C-5'), três sinais de carbonos aromáticos não ligados a hidrogênios δ_C 107,2 (C-10), 159,1 (C-9) e 124,1 (C-1') e um sinal para o carbono de um grupo carbonila em δ_C 180,5 (C-4). As unidades glicosídicas foram evidenciadas pela presença de seis sinais característicos de raminose em δ_C 103,9 (C-1"), 83,5 (C-2"), 72,6 (C-3"), 74,5 (C-4"), 73,4 (C-5") e 18,2 (C-6") e cinco sinais característicos de xilose em δ_C 108,3 (C-1'"), 76,0 (C-2'"), 78,4 (C-3'"), 71,9 (C-4'") e 68,0 (C-5'").

A análise das correlações observadas nos espectros bidimensionais de ^{1}H x ^{1}H COSY (**Figura 33**) confirmaram a presença da quercetina, como aglicona devido aos acoplamentos entre δ_H 6,95 (dl, *J*=8,1 Hz, H-6') com δ_H 6,81(d, *J*=8,1 Hz, H-5') e entre δ_H 7,11(sl, H-2') com δ_H 6,95 (dl, *J*=8,1 Hz, H-6') e permitiram evidenciar os sinais correspondentes a cada uma das unidades correspondentes a cada uma das unidades glicosídicas, conforme mostrado na **Tabela 14**.

Tabela 14: Correlações ^{1}H x ^{1}H observadas no espectro de COSY para as unidades glicosídicas: **raminose** e **xilose**.

raminose		xilose	
δ^1_H (mult., *J*, H)	δ^1_H (mult., *J*, H)	δ^1_H (mult., *J*, H)	δ^1_H (mult., *J*, H)
5,10 (sl, H-1")	4,10 (sl, H-2")	4,25 (d, J=7,5 Hz, H-1'")	3,25 (t, *J*=10,7Hz, H-2'")
4,10 (sl, H-2")	3,94 (dd, J=12,9; 3,0 Hz, H-3")	3,25 (t, *J*=10,7Hz, H-2'")	3,38 (m, H-3'")
3,94 (dd, J=12,9; 3,0 Hz, H-3")	3,40 (m, H-4")	3,38 (m, H-3'")	3,50 (m, H-4'")
3,40 (m, H-4")	3,75 (m, H-5")	3,50 (m, H-4'")	3,01 (t, *J*=10,8 Hz, H-5'")
3,75 (m, H-5")	1,01 (d, J=6,0 Hz, H-6")		3,63 (dd, *J*=11,2; 5,5 Hz, H-5'")

O espectro de HMQC (**Figura 34**) mostrou as correlações entre δ_H 6,10 (H-6) com δ_C 101,8 (C-6); δ_H 6,04 (H-8) com δ_C 101,8 (C-8); δ_H 6,95 (H-6') com δ_C 125,1 (C-6'); δ_H 6,81 (H-5') com δ_C 118,5 (C-5'); δ_H 7,11 (H-2') com δ_C 119,0 (C-2') para a aglicona. A partir das correlações observadas para as unidades glicosídicas foi possível a atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios para estas unidades. Para a raminose verificou-se as correlações entre δ_H 5,13 (H-1") com δ_C 103,9 (C-1"); δ_H 4,10 (H-2") com δ_C 83,5 (C-2"); δ_H 3,94 (H-3") com δ_C 72,6 (C-3"); δ_H 3,40 (H-4") com δ_C 74,5 (C-4"); δ_H 3,75 (H-5") com δ_C 73,4 (C-5") e δ_H 1,01 (H-6") com δ_C 18,2 (C-6"). Para a xilose foram observadas as correlações entre δ_H 4,25 (H-1'") com δ_C 108,3 (C-1'"); δ_H 3,25 (H-2'") com δ_C 76,0 (C-2'"); δ_H 3,38 (H-3'") com δ_C 78,4 (C-3'"); δ_H 3,50 (H-4'") com δ_C 71,9 (C-4'"); δ_H 3,01 e δ_H 3,63 (H-5'") com δ_C 68,0 (C-5'") da xilose.

O espectro de HMBC (**Figura 35**) confirmou o posicionamento dos grupos OH ligados aos anéis aromáticos devido às entre δ_H 7,11 (H-2') com δ_C 150,3 (C-4'); δ_H 6,04 (H-6) com δ_C 162,8 (C-5); δ_H 6,04 (H-6) com δ_C 107,2 (C-10); δ_H 5,13 (H-1") com δ_C 137,7 (C-3). O posicionamento das unidades glicosídicas ligadas ao carbono C-3 foram também evidenciadas pelo espectro de HMBC. As correlações entre δ_H 5,13 (H-1") com δ_C 137,7 (C-3); δ_H 3,38 (H-3'") com δ_C 72,6 (C-3"); δ_H 5,13 (H-1") com δ_C 72,6 (C-3"); 3,38 (H-3'") com δ_C 76,0 (C-2'"); δ_H 3,25 (H-2'") com δ_C 108,3 (C-1'") e δ_H 1,01 (H-6") com δ_C 73,4 (C-5") mostraram que o C-3 encontra-se ligado ao C-anomérico da unidade de raminose.

A conectividade entre as unidades de raminose e xilose, ou seja, a ligação do C-2" da raminose ao C-1'" da xilose foi evidenciada pelo deslocamento químico do carbono C-2" (δ_C 83,5), o qual apresenta uma valor de δ_C maior (mais desblindado) que os valores observados na literatura para a 3-O-α-L-raminopiranosil quercetina[47] (δ_C para C-2" = 70,4), onde não há outra unidade de açúcar ligada à raminose.

Em revisão bibliográfica verificamos que a substância contendo a estrutura proposta para **FR-7** já havia sido isolada anteriormente da espécie *Licania pyrifolia* [47]. Desta forma, os dados de RMN de ^{1}H e de ^{13}C de **FR-7** foram comparados com os da literatura para a 3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→2)-α-L-raminopiranosídeo] quercetina[47] (**Tabela 15**) e mostraram-se concordantes com os mesmos, confirmando assim a estrutura proposta para **FR-7**.

Tabela 15: RMN de ^{1}H e de ^{13}C (300; 75,5 MHz, D_2O) para a substância **FR-7** e RMN de ^{1}H e de ^{13}C (CD_3OD) para a **3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→2)-α-L-raminopiranosídeo] quercetina**.

	FR-7		**3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→2)-α-L-raminopiranosídeo] quercetina**	
	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{13}C	δ ^{1}H (mult., *J*)	δ ^{13}C
2	-	160,5	-	156,9
3	-	137,7	-	134,2
4	-	180,5	-	177,9
5	-	162,8	-	161,3
6	6,04 (sl)	101,8	6,15 (d, *J*=2,1 Hz)	98,7
7	-	165,9	-	164,1
8	6,10 (sl)	98,0	6,32 (d, *J*=2,1 Hz)	93,6
9	-	159,1	-	156,4
10	-	107,2	-	103,9
1’	-	124,1	-	121,0
2’	7,11 (sl)	119,0	7,30 (d, *J*=2,0 Hz)	115,6
3’	-	146,7	-	145,2
4’	-	150,3	-	148,9
5’	6,81 (d, *J*=8,1 Hz)	118,5	6,81 (d, *J*=8,4 Hz)	115,4
6’	6,95 (dl, *J*=8,1 Hz)	125,1	7,18 (dd, *J*=2,0; 8,4 Hz)	120,4
1”	5,13 (sl)	103,9	5,23 (d, *J*=1,2 Hz)	101,1
2”	4,10 (sl)	83,5	3,98 (s)	80,6
3”	3,94 (dd, *J*=12,9; 3,0 Hz)	72,6		70,3
4”	3,40 (m)	74,5		71,7
5”	3,75 (m)	73,4		69,4
6”	1,01 (d, *J*=6,0 Hz)	18,2	0,89 (d, *J*=6,4 Hz)	17,4
1”’	4,25 (d, *J*=7,5 Hz)	108,3	4,09 (d, *J*=7,5 Hz)	106,4
2”’	3,25 (t, *J*=10,7 Hz)	76,0		73,7
3”’	3,38 (m)	78,4		76,2
4”’	3,50 (m)	71,9		70,2
5”’	3,63 (dd, *J*=11,2; 5,5 Hz) 3,01 (t, *J*=10,8 Hz)	68,0		65,7

5.2. Avaliação da Atividade Antioxidante

Os resultados dos testes de avaliação da atividade antioxidante para o extrato bruto metanólico, para as frações hexânica (**A)**, acetato de etila (**B)**, hidrometanólica (**C)** e para a substância isolada **FR-1** mostraram uma atividade moderada para a fração AcOEt (IC_{50} =66,19 μg/mL). As demais frações avaliadas e a substância pura **FR-1** apresentaram valores de IC_{50} superiores à 100 μg/mL e foram consideradas não ativas quando comparados ao antioxidante padrão BHT que mostrou valor de IC_{50} igual a 16,9 μg/mL.

5.3. Ensaios Biológicos

5.3.1. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica, pelo teste de susceptibilidade antibacteriano e antifúngico, utilizando método de microdiluição, mostrou que não houve inibição do crescimento dos microorganismos testados: bactérias (*Staphylococus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*) e fungo (*Candida albicans*) para as frações **A**, **B**, **C** e para a substância isolada **FR-1**. Os valores de CMI foram maiores que 1000 μg/mL para as amostras testadas.

5.3.2. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

5.3.2.1 Efeito do extrato bruto metanólico e das frações (hexânica e hidrometanólica) de *Ficus radicans* Variegata sobre o edema de pata

Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. $p < 0,05$ foi considerado como nível de significância.

A injeção intradérmica de carragenina em uma das patas posteriores de ratos normais, sadios e pré-tratados com salina 0,9 % (controle) provocou uma resposta inflamatória local, que atingiu intensidade máxima de edema na 4ª hora após a aplicação do agente irritante.

O tratamento dos animais com o extrato bruto metanólico e as frações (hexânica e hidrometanólica) de *Ficus radicans* Variegata, na dose de 500 $mg.Kg^{-1}$, provocou uma redução da resposta inflamatória na pata quando comparada ao grupo controle. A fração hexânica (**A**) causou uma redução, estatisticamente significativa, da intensidade da resposta, na 2ª hora após a injeção de carragenina ($p<0,01$). O tratamento dos animais com indometacina, fármaco anti-inflamatório de referência, reduziu significativamente a intensidade do edema na 2ª e 4ª h após a indução da

reação inflamatória, quando comparado ao grupo controle. Os resultados estão apresentados na **Figura 02**.

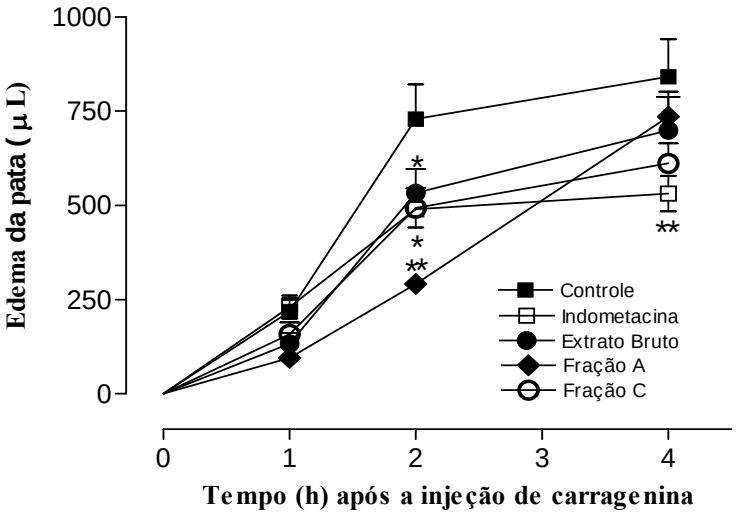


Figura 02: Efeito do extrato bruto metanólico de *Ficus radicans* Variegata e das frações hexânica (**A**) e hidrometanólica (**C**) sobre o desenvolvimento do edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina em ratos Wistar, machos (180-220 g). Os animais (n= 6-8 por grupo) foram tratados, por gavagem, com extrato bruto ou as frações na dose de 500 $mg.Kg^{-1}$, uma hora antes da injeção de carragenina (200 µg). A indometacina (Indo) administrada por gavagem, 5 $mg.kg^{-1}$, foi utilizada como anti-inflamatório de referência (I). Cada ponto representa o volume médio das patas ± E.P.M., na 1ª, 2ª e 4ª h após a injeção de carragenina.* p <0,05; ** P<0,01, quando comparado ao grupo controle, tratado com salina (ANOVA, Teste de Tukey).

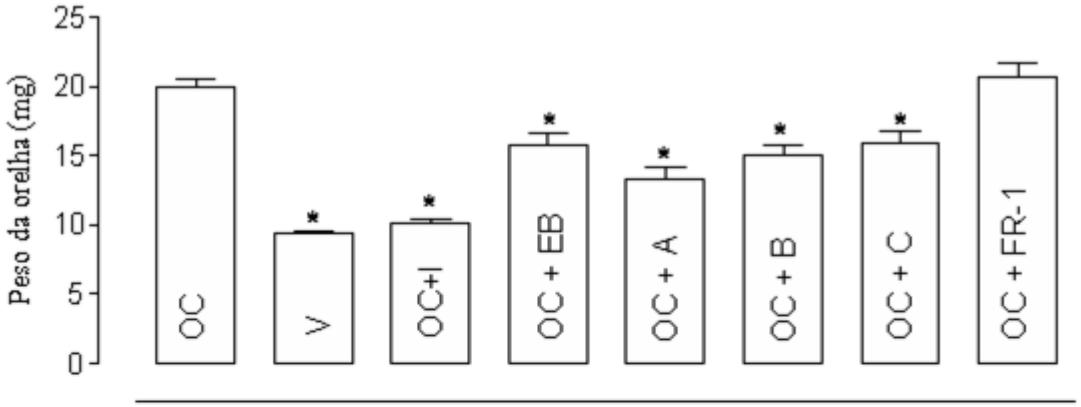
5.3.2.2 Efeito do extrato bruto metanólico, das frações hexânica (A), acetato de etila (B), hidrometanólica (C) e da substância (FR-1) de *Ficus radicans* Variegata sobre o edema de orelha

Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. $p < 0,05$ foi considerado como nível de significância.

A aplicação de óleo de cróton na orelha esquerda de camundongos induziu uma resposta inflamatória bastante evidente na 6ª h. Como observado o peso da orelha aumentou duas vezes quando comparada a orelha direita (controle, sem aplicação do óleo de cróton). A fração hexânica de *Ficus radicans* Variegata na dose de 5,0 mg, reduziu significativamente a intensidade do edema

(62,5%, p<0,001). Adicionalmente, a aplicação do extrato bruto metanólico e das frações acetato e hidrometanólica, na dose de 5,0 mg, também reduziram significativamente o edema de orelha, sendo tal efeito semelhante para as três frações testadas (EB= 39,25% p<0,001; B= 46,37% p<0,001; C= 39,07% p<0,001). A aplicação da substância pura (**FR-1**) não causou redução significativa no edema de orelha, na dose de 5mg. O tratamento com indometacina (I), controle positivo, causou uma inibição acentuada da resposta inflamatória, mostrando uma diferença significativa (p<0,001), quando comparados aos demais tratamentos (**Figura 03**).



03: Efeito do extrato bruto, da fração hexânica (A), da fração acetato (B), da fração aquosa (C), e da da substância pura (FR-1), da *Ficus radicans* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss, machos (25-35 g). O extrato bruto e as respectivas frações (5mg/orelha), foram aplicadas topicamente nas orelhas, imediatamente após a aplicação do óleo de cróton (200 µg). Cada barra representa o peso médio das orelhas ± E.P.M., 6 h após aplicação de óleo de cróton. * P<0,001, comparado ao grupo OC+Veículo, (ANOVA seguida do teste de Tukey).

OC = OC
V = veículo
OC + I = OC + indometacina (1mg)
OC + EB = extrato bruto (5mg)
OC + A = fração hexânica (5mg)
OC + B = fração acetato (5mg)
OC + C = fração aquosa (5mg)
OC + FR-1= substânica pura (5mg)

5.3.3. Avaliação da Atividade Moluscicida

A avaliação da atividade moluscicida com os caramujos *Biomphalaria glabrata*, realizada com o extrato bruto metanólico e as frações acetato de etila e hidrometanólia, não apresentou alteração nos batimentos cardíacos perante a metodologia utilizada.

A fração hexânica também foi avaliada e apresentou uma fraca atividade, pois 50 % dos caramujos utilizados morreram, quando testados na concentração de 400 ppm.

5. CONCLUSÕES

O estudo químico de *Ficus radicans* Variegata resultou no isolamento e identificação da 7-metóxicumarina (**FR-1**), 3-O-β-glucopiranosil sitosterol (**FR-2**), β-sitosterol (**FR-3**), 7-hidróxi-6-metóxi-cumarina (**FR-4**), 7-metóxi-3,4-diidrocoumarina (**FR-5**), ácido trans-4-β-D-glucupiranosil cinamico e 3-O-[β-D-xilopiranosil-(1→2)-α-L-raminopiranosídeo] quercetina (**FR-7**).

De acordo com nosso levantamento bibliográfico não há relatos sobre o isolamento em plantas da 7-metóxi-3,4-diidrocoumarina (**FR-5**) e o ácido trans-4-β-D-glucupiranosil cinamico (**FR-6**) trata-se de uma substância inédita.

Os ensaios para a avaliação da atividade antioxidante para o extrato bruto metanólico e frações hexânica (**A)**, acetato de etila (**B)**, hidrometanólica (**C)** mostraram atividade "seqüestradora" de radicais livres DPPH moderada para a fração acetato de etila **(B)** (IC_{50} =66,19 μg/mL);

O extrato bruto metanólico e as frações **A**, **B**, **C**, bem como a substância isolada **FR-1** não apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana frente aos microorganismos testados (valores de CMI maiores que 1000 μg/mL).

O extrato bruto metanólico e as frações **A** e **C**, provocaram uma redução da resposta inflamatória quando comparada ao grupo controle no ensaio para avaliação da atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata de rato. O extrato bruto metanólico e as frações **A**, **B** e **C** mostraram uma redução significativa do edema de orelha induzido por óleo de cróton em ratos.

O ensaio biológico para avaliação da atividade moluscicida apresentou fraca atividade para fração **A**.

.

7. REFERÊNCIAS

1-BRAGANÇA, L.A.R., Plantas Medicinais Antidiabéticas: uma abordagem multidiclinar. Niterói - RJ. Editora da Universidade Federal de Fluminense, p. 29, 1996.

2- MARTINS, E.R., Plantas Medicinais. Viçosa – MG. Imprensa Universitária, p. 17, 1995.

3- SIMÕES, C. M. O., Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre-Florianópolis: Editora/UFSC/Editora da UFRGS, 1999.

4-RØNSTED, N., SALVO, G., SAVOLAINEN, V., Biogeographical and phylogenetic origins of African Wg species (*Ficus* section Galoglychia). *Molecular Phylogenetics and Evolutions* 43, 190-201, 2007.

5-AL-FATIMI, M., WURSTER, M., SCHRODER, G., LINDEQUIST, U., Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of select medicinal plants from Yemen. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 657-666, 2007.

6-SOLOMON, A., GOLUBOWICZ, S., YABLOWICZ, Z., GROSSMAN, S., BERGMAN, M., GOTTLIEB, H.E., ALTMAN, A., KEREM, Z., FLAISHMAN, M.A., Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7717-7723, 2006.

7- MORAES, D.J.M., TELLES, E. F., PORTO, R.A.J., COSTA, A.P., BATISTA, N.C., CHAVES, C.P., MELO, C.P., ASSIS, L.F., SOARES, L.J., NUNES, C.E.M., Formulations based on vegetable extracts of *Euphorbia tirucalli* L. and *Ficus carica* L. are useful as anti-cancer and anti-AIDS products for e.g. oral administration. *Amazonia Fitomedicamentos LTDA (AMAZ-N)* 50, 411867, 2006.

8-LORENZI, H., MATOS, F.J.A., Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.155, 2002.

9-SUTTER, V.L., BARRY, A.L., WILKINS, T.D., ZABRANSKI, R.J., Collaborative evalution of a proposed reference diluition method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents & Chemothemotherapy* 16, 495-502, 1979.

10-BAUMGARTNER, B., ERDELMEIER, C.A.J., WRIGHT, A.D., RALI, T., STICHER, O., An antimicrobial alkaloid from *Ficus septica*. *Phytochemistry* 29, 3327-3330, 1990.

11-OGUNGBAMILA F. O., ONAWUNMI G. O., IBEWUIKE J. C., FUNMILAYO K. A., Antibacterial Constituints of *Ficus barteri* Fruits. *International Journal of Pharmacognos* 35, 185-189, 1997.

12-DAMU, A.G. KUO, P., SHI, L., LI, C., KUOH, C., WU, P. and WU, T., Phenanthroindolizidine Alkaloids from the of *Ficus septica*. *Journal of Naural. Products* 68, 1071-1975, 2005.

13-CHANG, M.A., YANG, Y., KUO, Y., KUO, Y., CHANG, C., CHEN, C. and LEE, T., Furocoumarin Glycosides from the Leaves of *Ficus ruficaulis* Merr. Var. antaoensis. *Journal of Natural. Products* 68, 11-13, 2005.

14-CHIANG, Y.M., CHANG, J., KUO, C., CHANG, C., KUO, Y., Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry* 66, 495-501, 2005.

15-CHIANG, Y., KUO, Y., Two novel α-tocopheroids from the aerial roots os *Ficus microcarpa. Tetrahedron Letters* 44, 5125-5128, 2003.

16-DIAZ M.G., ARRUDA, C.A., ARRUDA, M.S.P., MULLER, H.A., Methoxyflavones from *Ficus maxima. Phytochemistry* 45, 1697-1699, 1997.

17-SIMO, C.C.F., KOUAM, S.F., POUMALE, H.M.P., SIMO, I.K., NGADJUI, B.J., GREEN, I.R., KROHN. K., Benjaminamide: A new ceramide and other compounds from the twings of *Ficus benjamina* (Moraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 36, 238-234, 2008.

18-ABRAHAM, L.C.N., MASAKUNI, T., ISAO, H., HAJIME, T., Antioxidant flavonoid glycosides from leaves os *Ficus pumila* L. *Food Chemistry* 109, 415-420, 2008.

19-KUETE, V., NGAMENI, B., SIMO, C.C.F., TANKEU, R.K., NGADJUI, B.T., MEYER, J.J.M., LALL,N., KUIATE, J.R., Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* e *Ficus cordata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 120, 17-24, 2008.

20-ASEM, B.D., LAITONJAM, W.S., Isolation and antimicrobial studies of the compounds isolated from the stem bark of *Ficus hispida* Linn.. *Asian Journal of Chemistry* 20, 6027-6032, 2008.

21-ANNAN, K., HOUGHTON, P.J., Antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of extracts of *Ficus asperifolia* Miq. and *Gossypium arboreum* L.,wound-healing plants of Ghana. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 141-144, 2008.

22-MANIAN, R., ANUSUYA, N., SIDDHURAJU, P.,MANIAN, S., The antioxidant activity and free radical scavenging potential of different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry* 107, 1000-1007, 2008.

23- SHUKLA, R. GUPTA, S., GAMBHIR, J.K., PRABHU, K.M., MURTHY, P.S., Antioxidant effect of aqueous extract of the bark of *Ficus bengalalensis* in hypercholesterolaemic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 47-51, 2004.

24-MANDAL, S.C., MAITY, T.K., DAS, J., SABA, B.P., PAL, M., Anti-inflammatory evaluation of *Ficus racemosa* Linn. Leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 87-92, 2000.

25-LI, R. W., MYERS, S. P., LEACH, D. N., LIN, G. D., LEACH, G., A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australia and Chinese plants. *Journal of Ethnopharmacology* 85, 25-32, 2003.

26-KONÉ, W.M., ATINDEHOU, K.K., TERREAUX, C., HOSTETTMANN K., TRAORÉ, D., DOSSO, M., Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 43-49, 2004.

27-AMORIN, A., BORBA, H. R., CARAUTA, J. P. P., LOPES, D., KAPLAN, M. A. C., Anthelmintic activity of the lates of *Ficus* species. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 255-258, 1999.

28-LORENZI, H., SOUZA, H. M., Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2ª ed. 1999, p. 767.

29- EL-MASSRY, K.F., EL-GHORAB, A.H., FAROUK, A., Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L.. *Food Chemistry*. 79, 331–336, 2002.

30-NATIONAL COMMITE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS; Reference method for diluition antifungical susceptibility testing of years. Aproved standard M-27A, NCCLS: Wayne, PA, 1997.

31-WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.V., Carrageenin-induced edema in the hindpaw of the rat as an assay for anti-inflamtory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medecine* 111, 544-547, 1962.

32- HOSTETTMANN, K., KIZU, H., TOMINOU, T., Molluscicidal propriets of various saponins. *Planta Médica* 44, 33-35, 1982.

33-WATANABE, J.; SHINMOTO, H.; TSUSHIDA, T., Coumarin and Flavone Derivatives from Estragon and Thyme as Inhibitors of Mediator Release form RBL-2H3 Celss. *Biosciense Biotechnology Biochemistry* 69,1-6, 2005.

34-GOTTLIEB, H. E., LIMA, R. A., MONACHE, F., ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of 6- and 7-Substituted Coumarins. Correlation with Hammaett Constants. *Journal of the Chemical Society-Perkin Trasnsactions 2* 4, 435-437, 1979.

35-KUETE, V., METUNI, R., NGAMENI, B., MBAVENG, A., TSAFACK, M., NGANDEU, F., FOTSO, G, W., BEZABIH, M., ETOA, F., NGADJUI, B, T., ABEGAZ, B, M., BENG, V, P., Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from Treculia obovoidea (Moraceae). Journal of Ethnopharmacology 112, 531-536, 2007.

36-CÉSPEDES, C. C., AVILA, J. G., MARTÍNEZ, A., SERRATO, B., MUGICA, J. C. C., GARCILGLIA, R. S., Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 3521-3527, 2006.

37- KAISER, O.; KOLODZIEJ, H., Highly Oxigenated Coumarins Pelargonium Sidoides. *Phytochemistry* 39, 1181-1185, 1995.

38-PISTELLI, L., CHIELLINI, E. E., MORELLI, I., Flavonoids from *Ficus pumila*. *Biochemical Systematcs an Ecology* 28, 287-289, 2000.

39-PAN, R., DAI, Y., YANG, J., LI, Y., YAO, X. J., XIA, Y. F., Anti-angiogenic Potential of Scopoletin is Associated With the Inhibition of ERK1/2 Activation. *Drug Development Research* 3, 214-219, 2009.

40-DING, Z. Q., DAI, Y., HAO, H. P., PAN, R., YAO, X. J., WANG, Z. T., Anti-Inflammatory Effects of Scopoletin and Underlying Mechanism. *Pharmaceutical Biology* 12, 854-860, 2008.

41-IIZUKA, T., NAGUMO, S., YOTSUMOTO, H., MORIYAMA, H., NAGAI, M., Vasorelaxant effects of Acer nikoense extract and isolated coumarinolignans on rat aortic rings. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30, 1164-1166, 2007.

42-MOON, P. D., LEE, B. H., JEONG, H. J., AN, H. J., PARK, S. J., KIM, H. R., KO, S. G., UM, J. Y., HONG, S. H., KIM, H. M., Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines trough inhibition of the I kappa B/NF-kappa B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *European Journal of Pharmacology* 555, 218-225, 2007.

43-GUNNEWEGH, E. A., HOEFNAGEL, A. J., BENKKUM, H., Zeolite catalysed synteses of coumarin derivatives. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 100, 87-92, 1995.

44- HUNG, C.Y.; YEN, G.C. Extraction and identification of antioxidative components of Hsian-tsao (Mesona procumbens Hemsl.). *Lebensm.- Wiss. u.- Technol* 34, 306-11, 2001.

45-ALAN, M.S., COPRA, N., ALI, M., NIWA,M. Oleanen and stigmasterol derivates from Ambrama augusta. *Phytochemistry* 41, 1197-1200, 1966.

46-WEBER, B., HERRMANN, M., HARTMANN, B., JOPPE, H., SCHMILDT, C. O., BERTRAM, H., HPLC/MS and HPLC/NMR as hyphenated techniques for accelerated characterization of the main constituents in Chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Europen Food Resarch Technology* 226, 755-760, 2008.

47-BILIA, A. R., CIAMPI, L., MENDEZ, J., MORELLI, I., Phythochemical investigations of *Licania genus*. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 71, 199-204, 1996.

ANEXOS

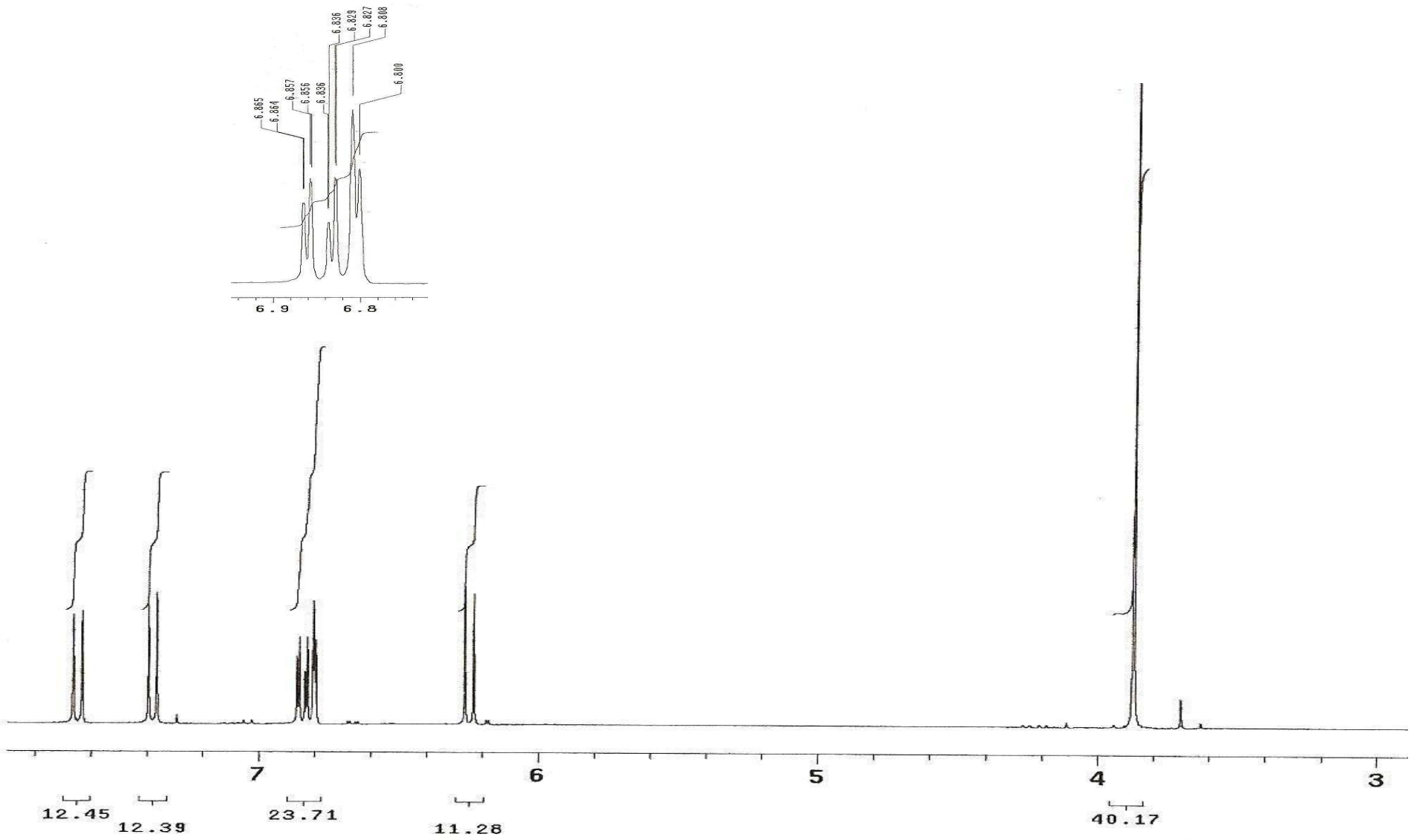


Figura 04: Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-1**.

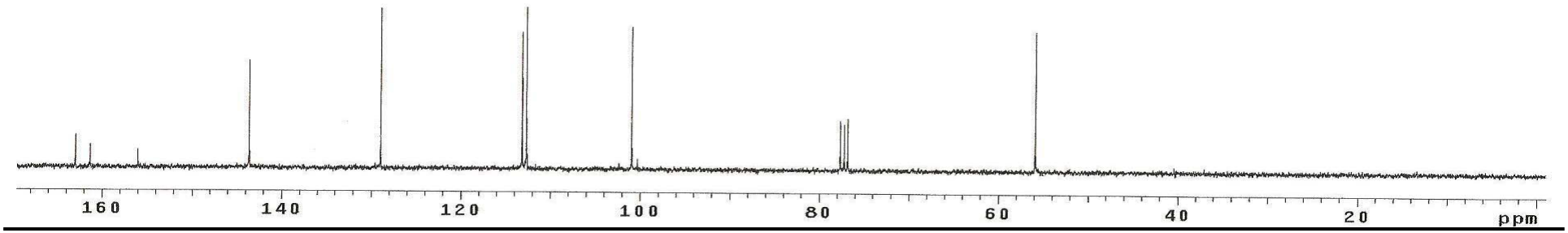


Figura 05: Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75,5 MHz) de **FR-1**.

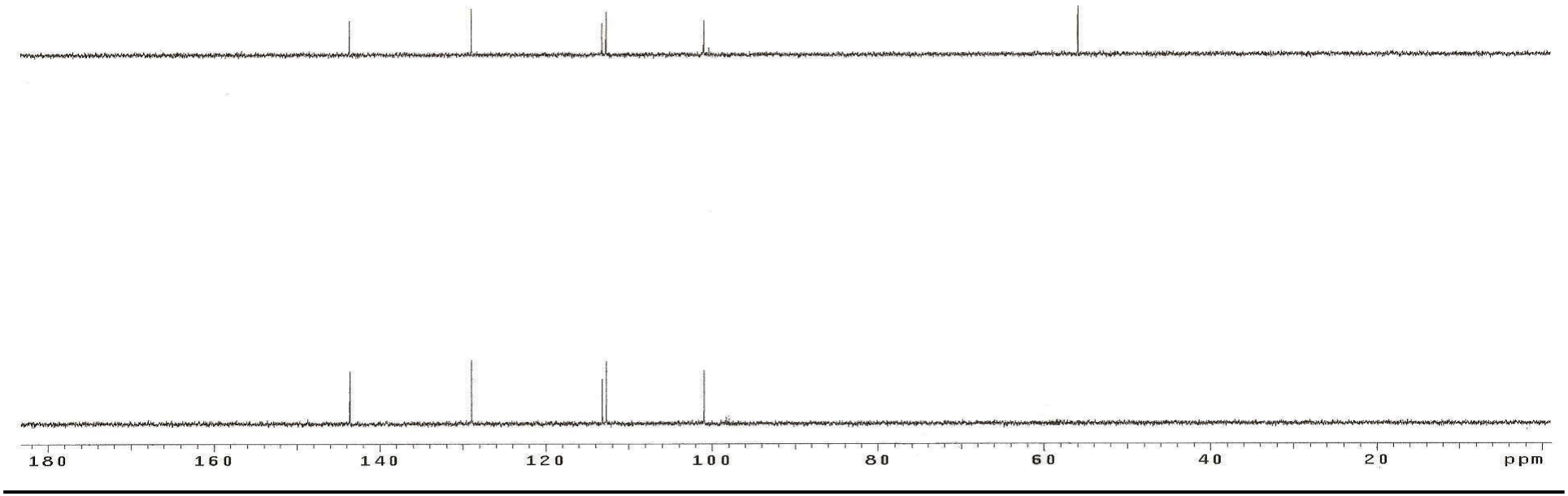


Figura 06: Espectro de DEPT 135º-90º ($CDCl_3$) de **FR-1**.

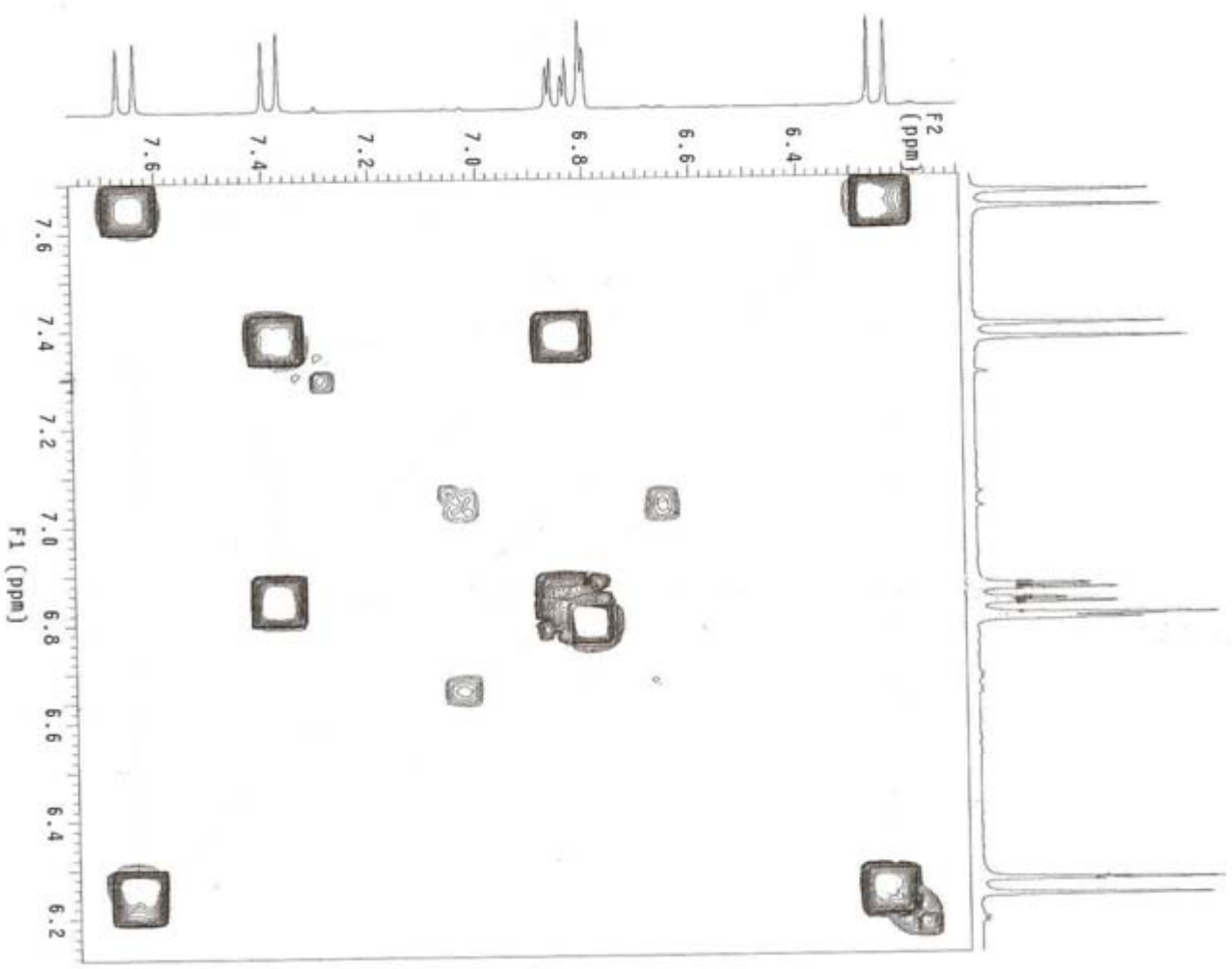


Figura 07: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-1**.

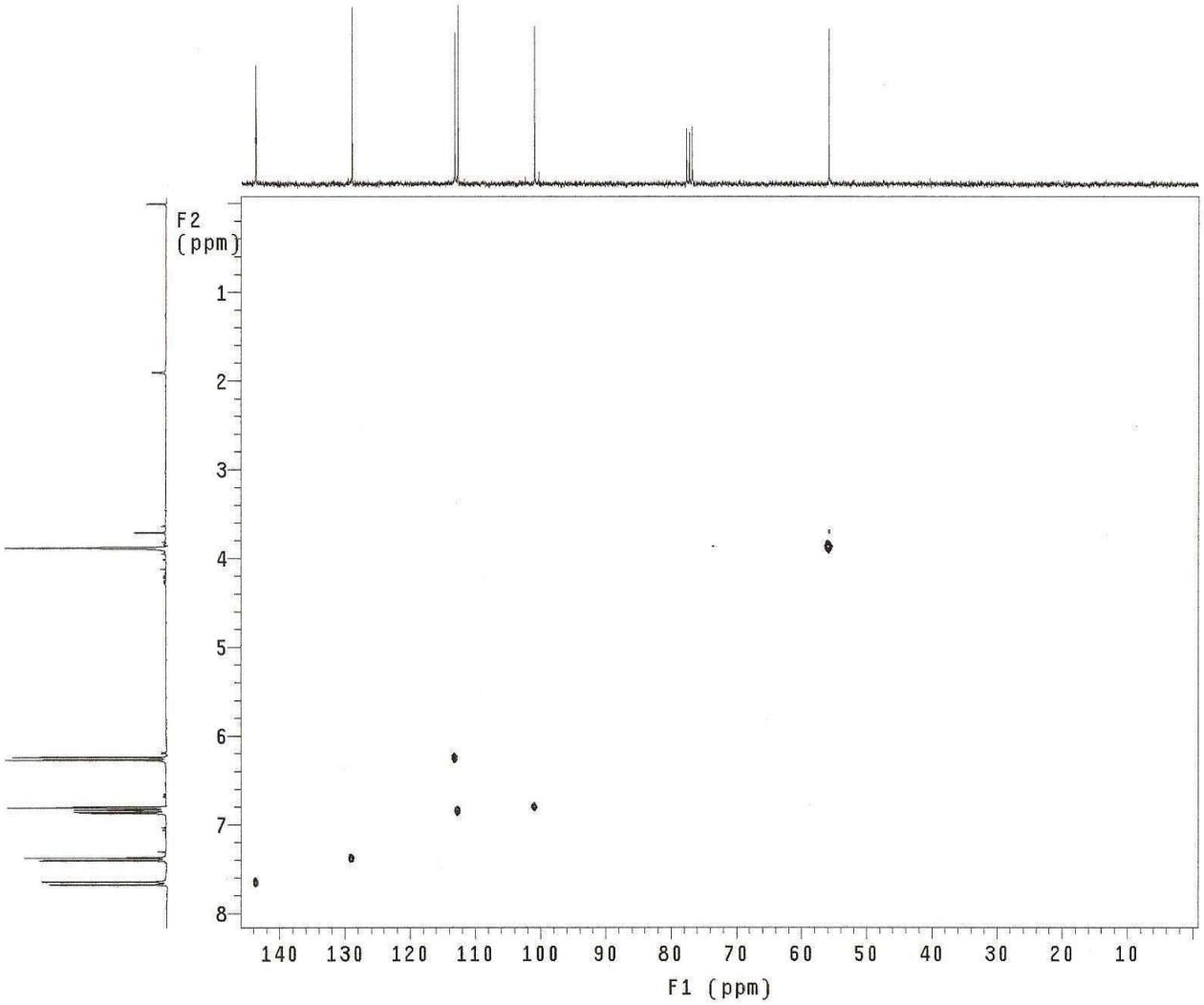


Figura 08: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, $CDCl_3$) de **FR-1**.

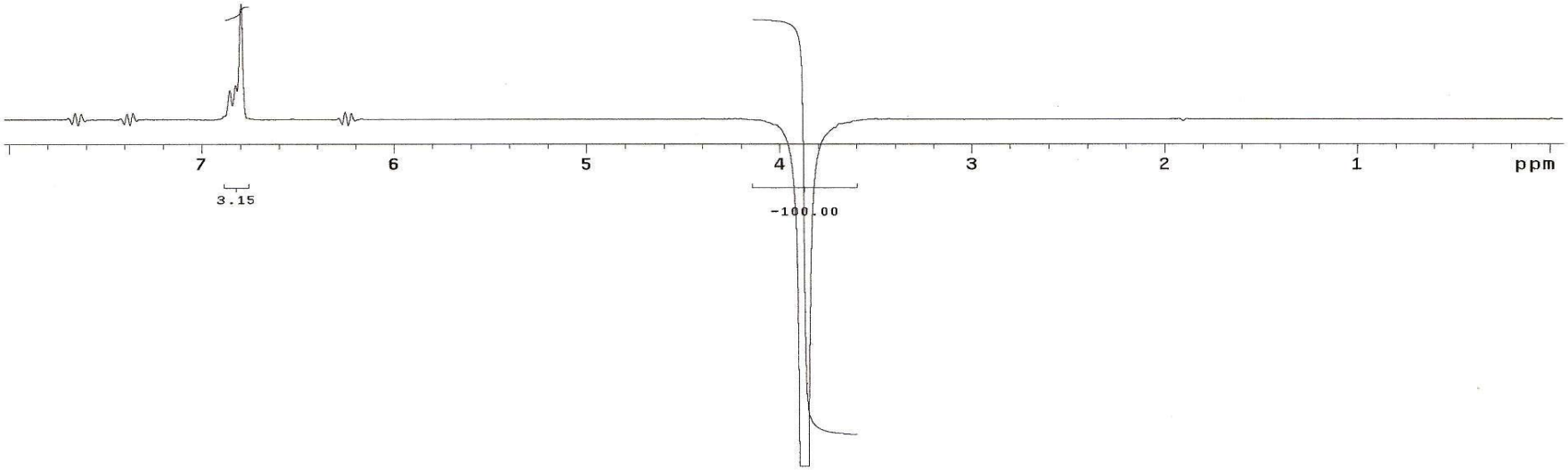


Figura 09: Espectro de NOEDIF em $CDCl_3$ de **FR-1**.

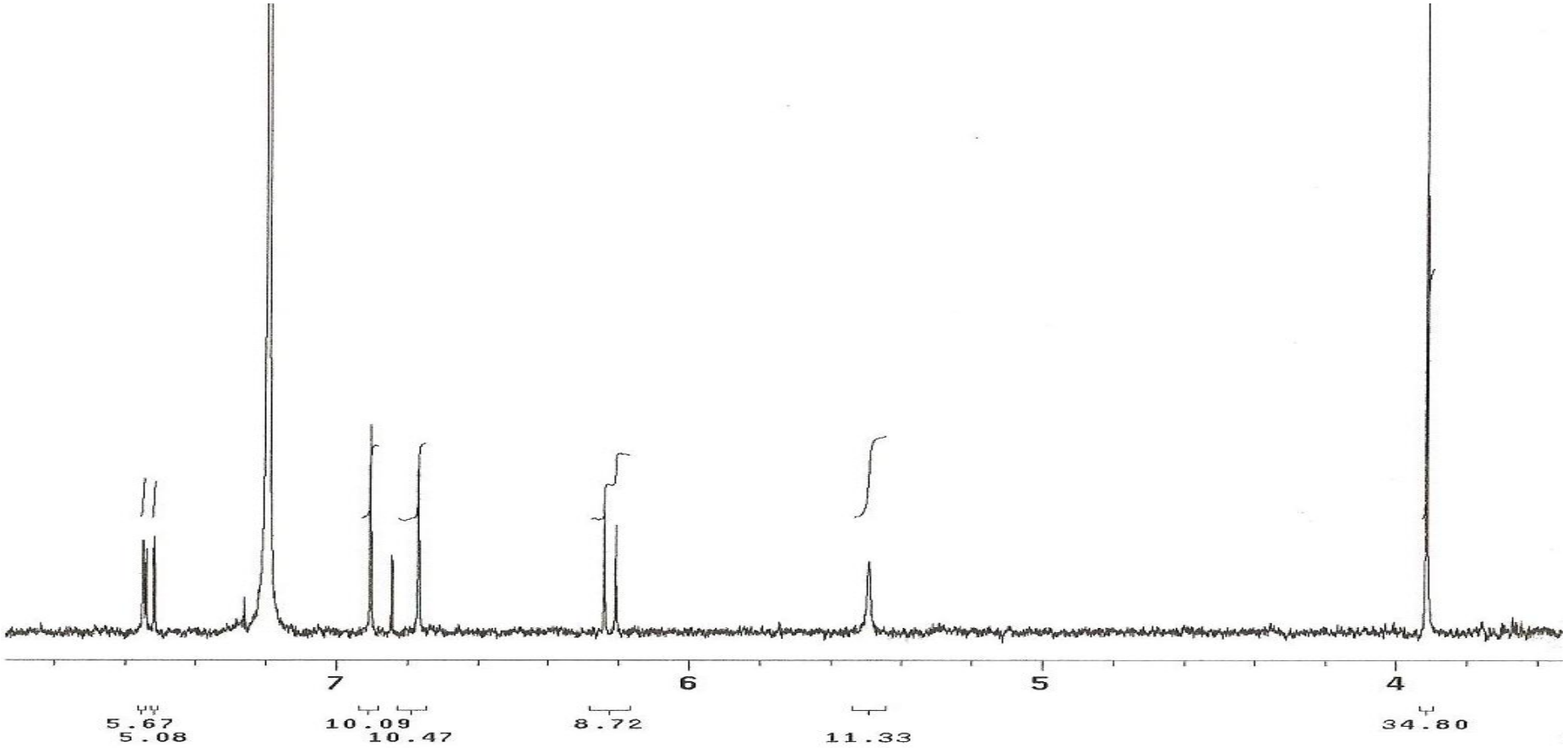


Figura 10: Espectro de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) de **FR-4**.

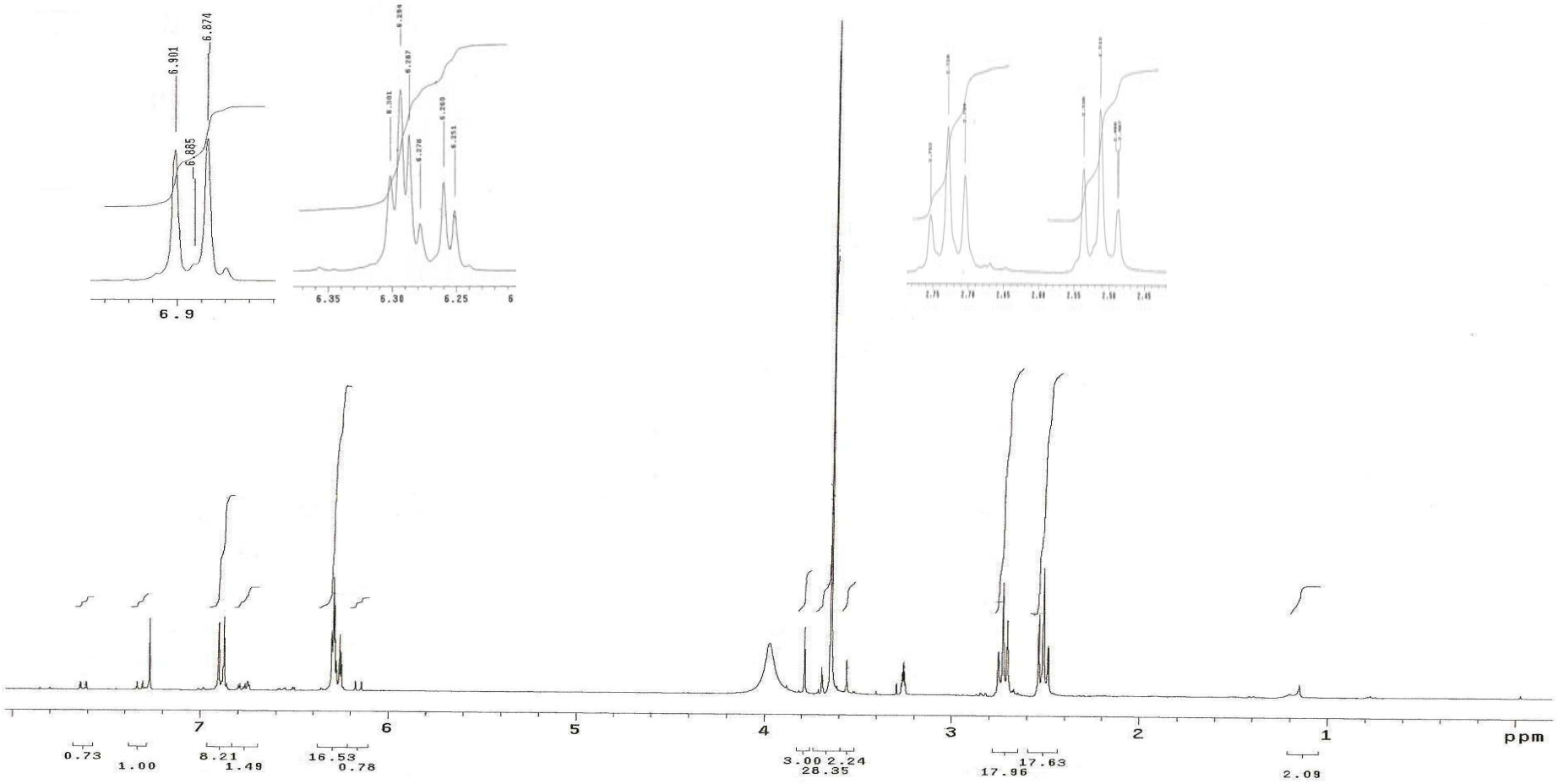


Figura 11: Espectro de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-5**.

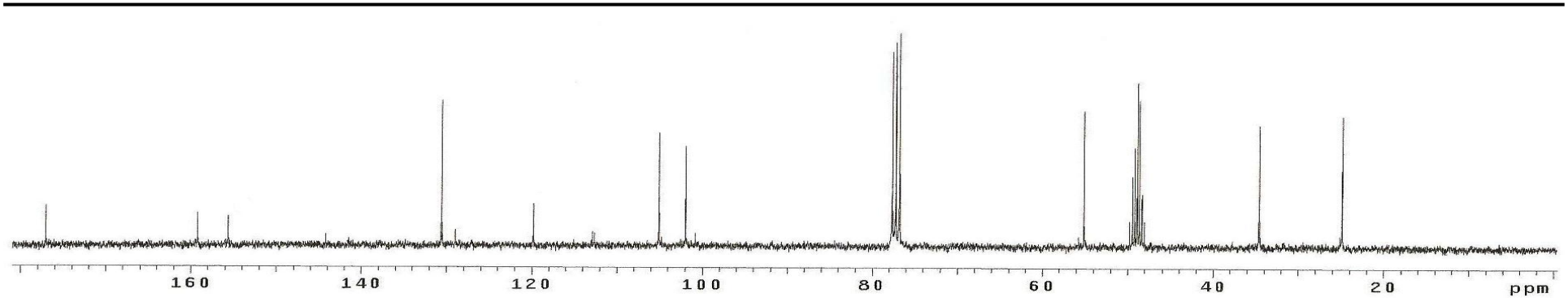


Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75,5 MHz) de **FR-5**.

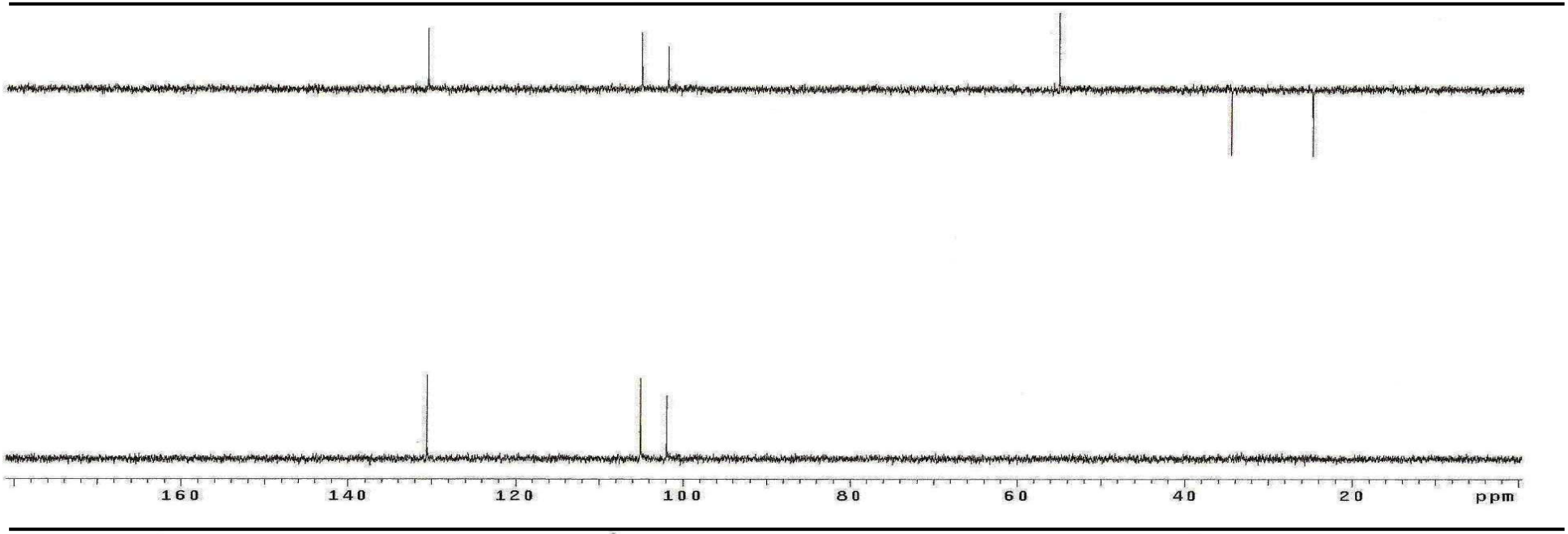


Figura 13: Espectro de DEPT 135º-90º ($CDCl_3$) de **FR-5**.

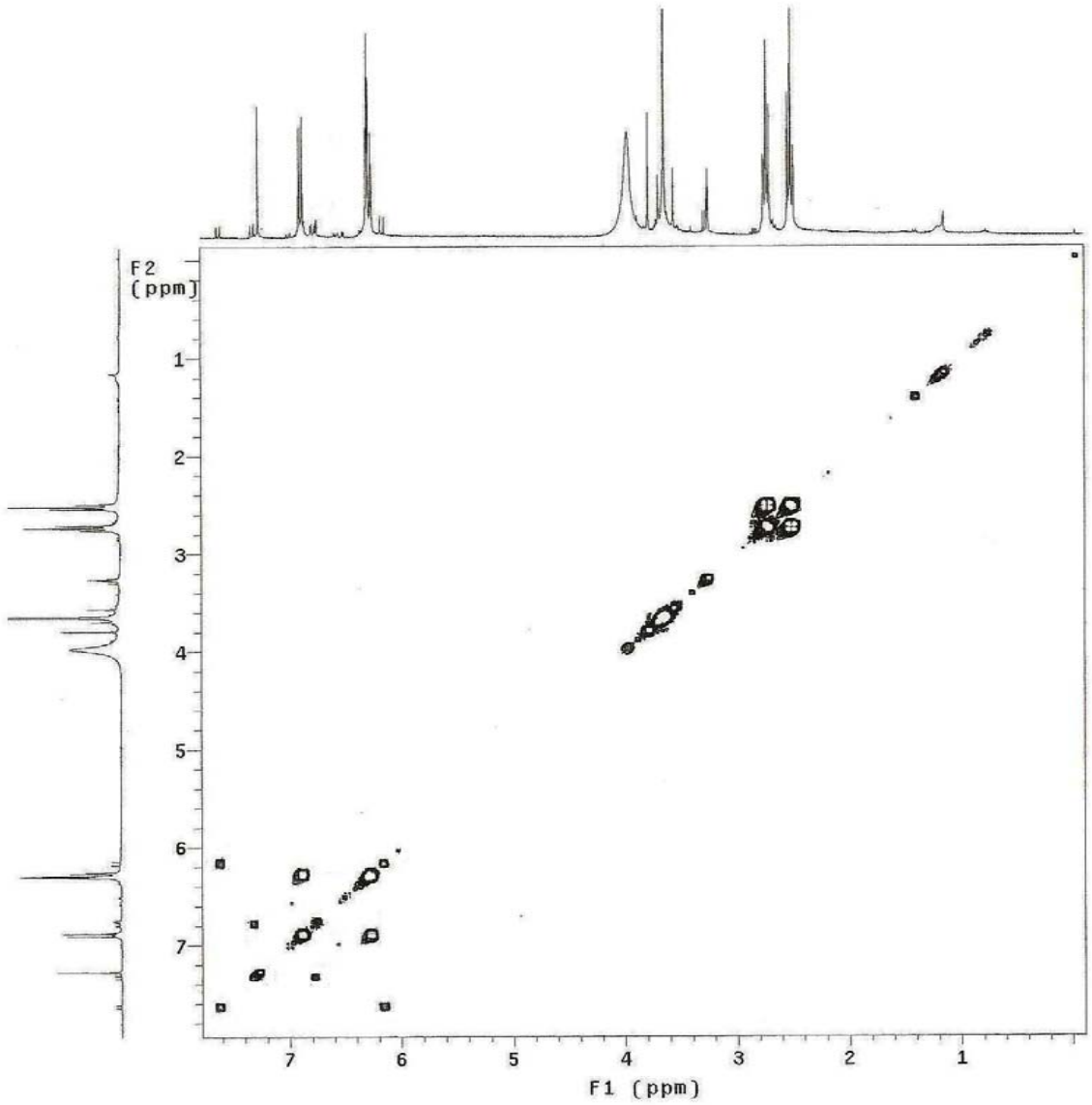


Figura 14: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY ($CDCl_3$, 300 MHz) de **FR-5**.

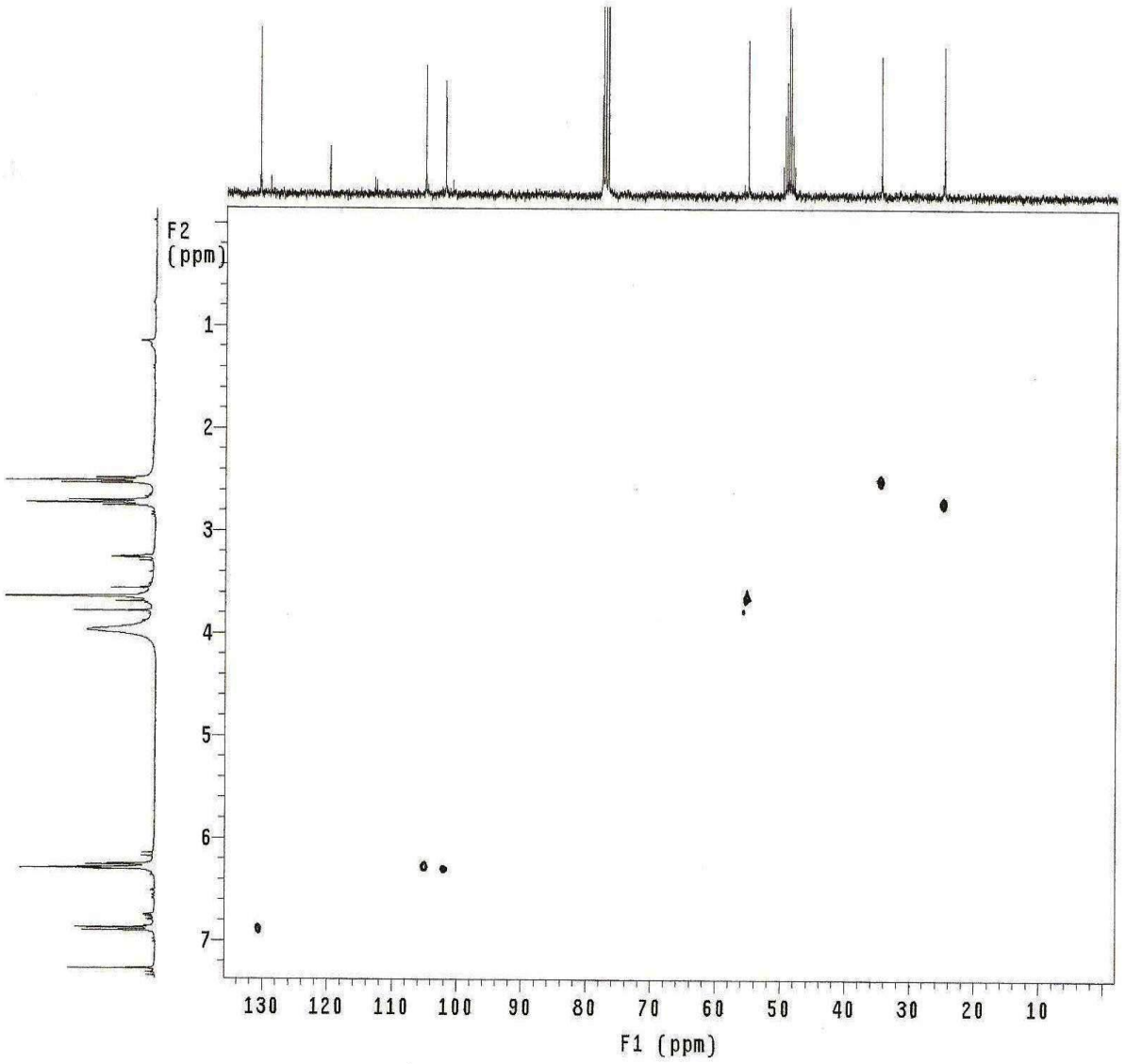


Figura 15: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, $CDCl_3$) de **FR-5.**

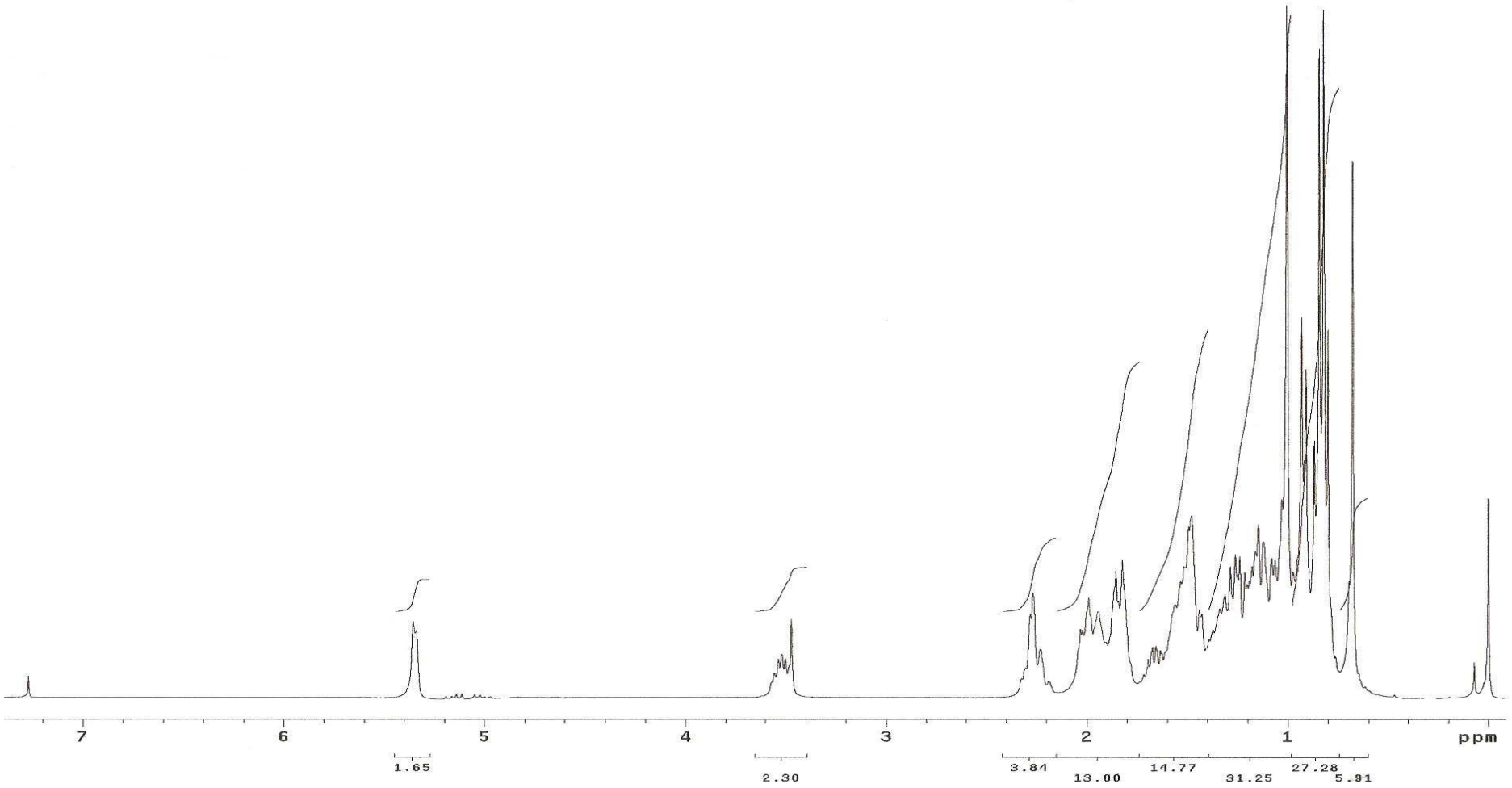


Figura 16: Espectro de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) de **FR-2**.

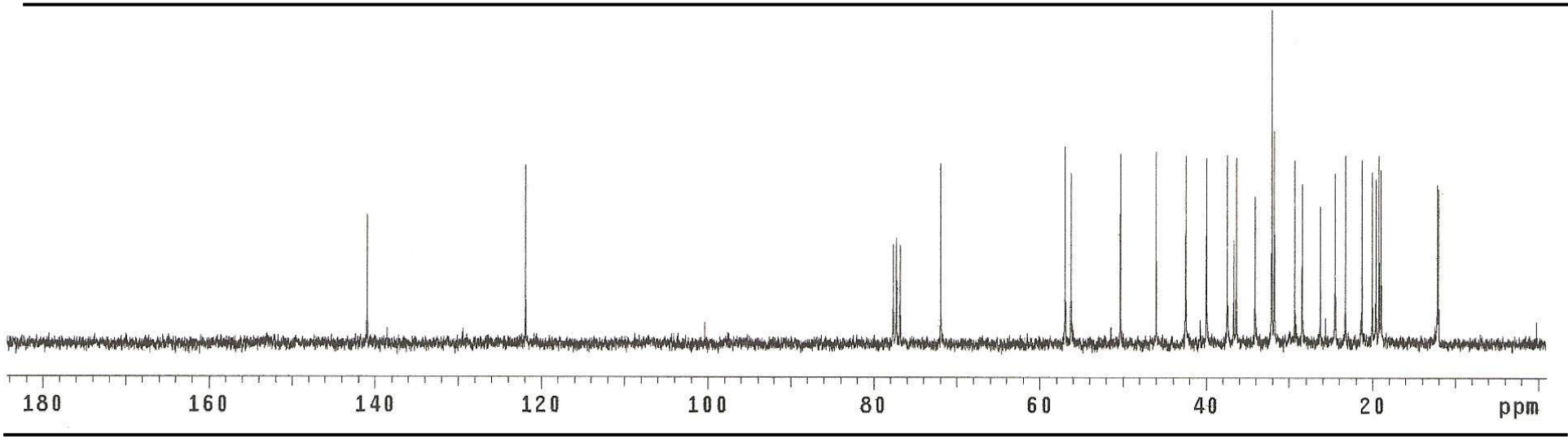


Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD, 75,5 MHz) de **FR-2**.

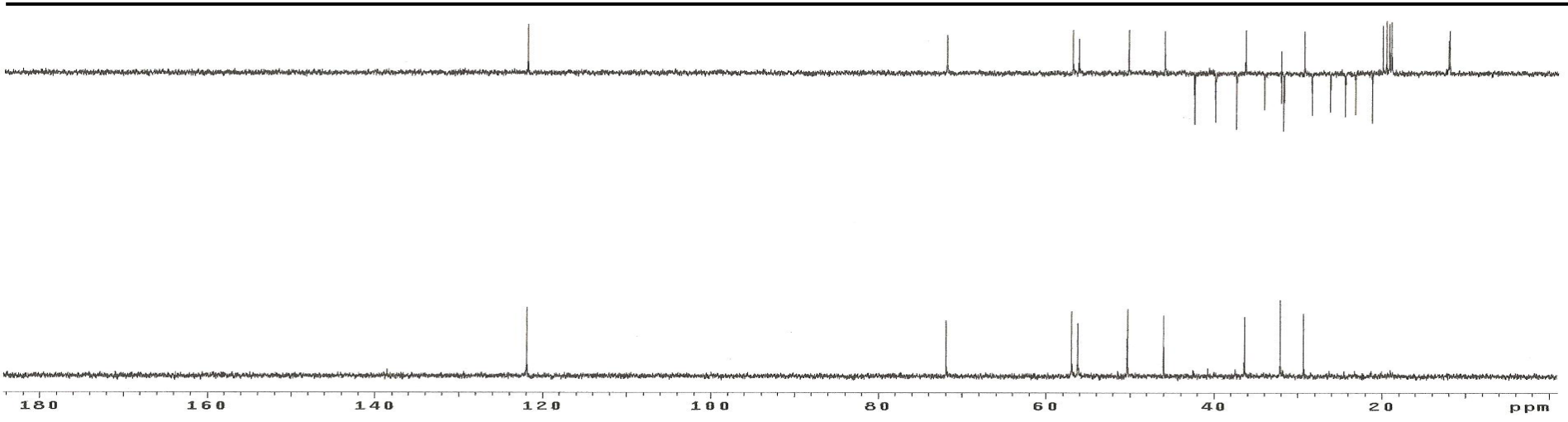


Figura 18: Espectro de DEPT 135º-90º (CD_3OD) de **FR-2**.

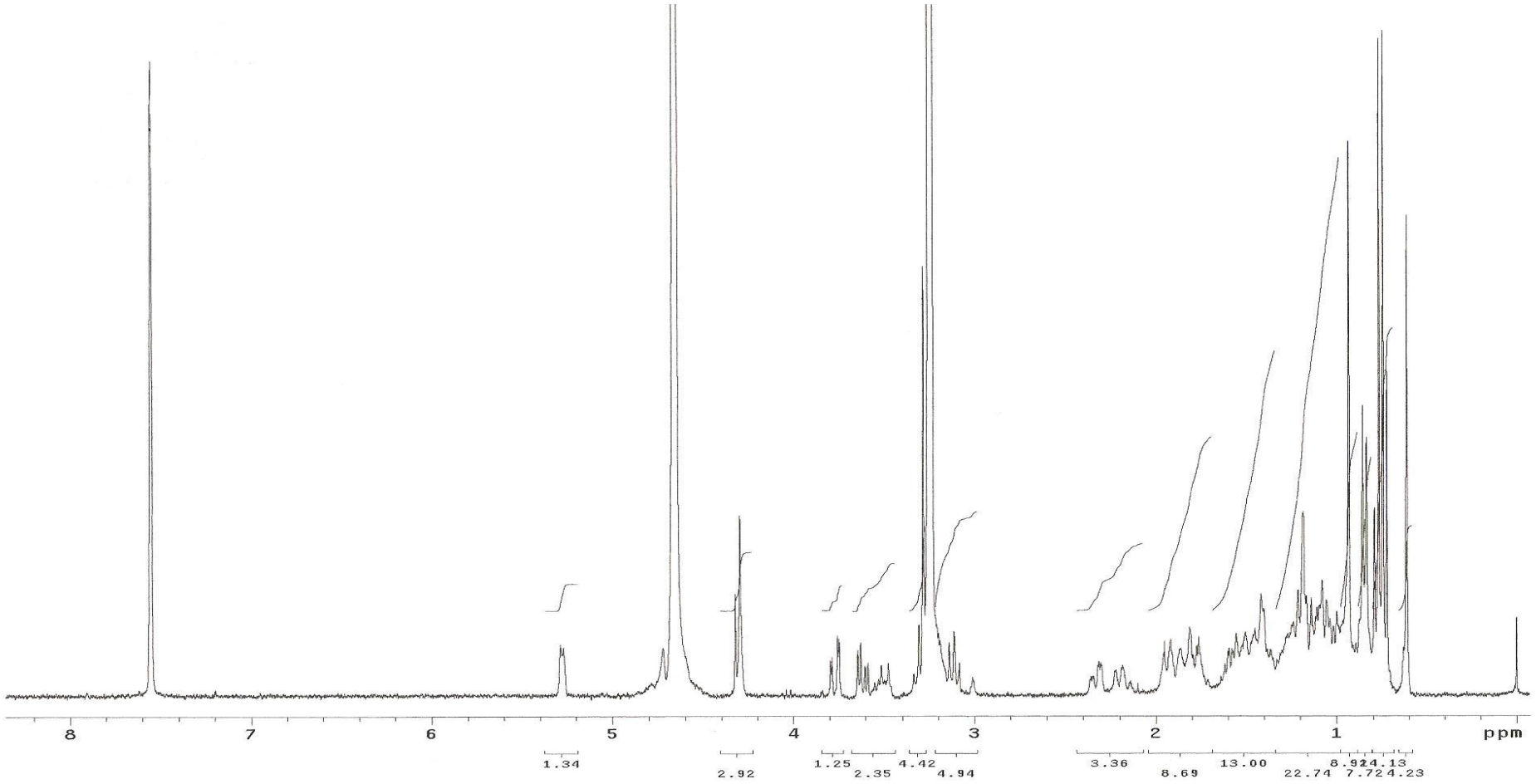


Figura 19: Espectro de RMN de ^{1}H (CD_3OD, 300 MHz) de **FR-3**.

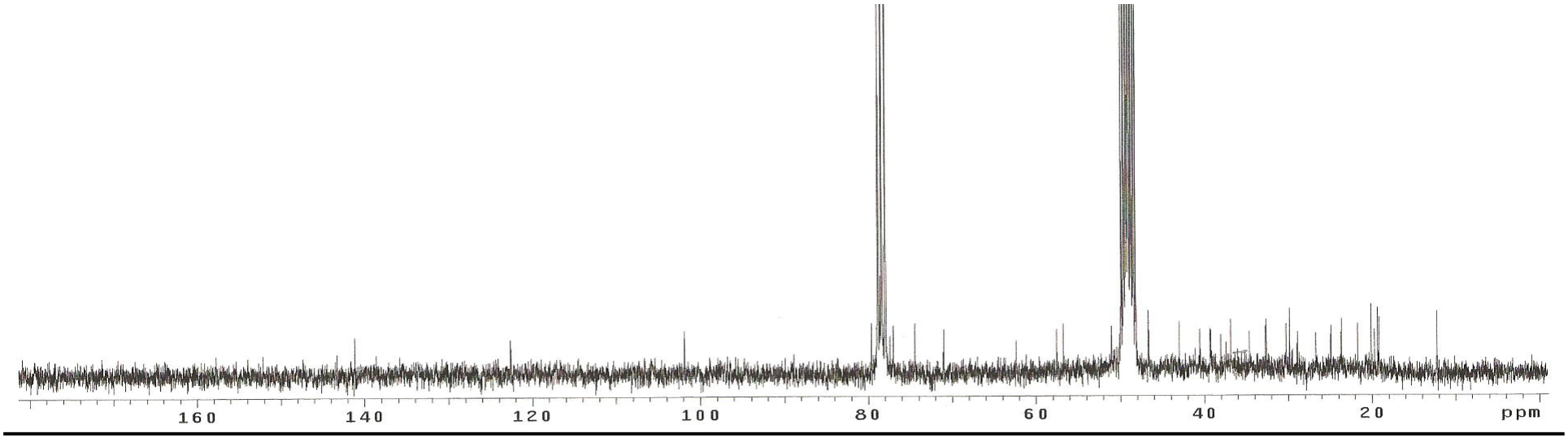


Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD, 75,5 MHz) de **FR-3**.

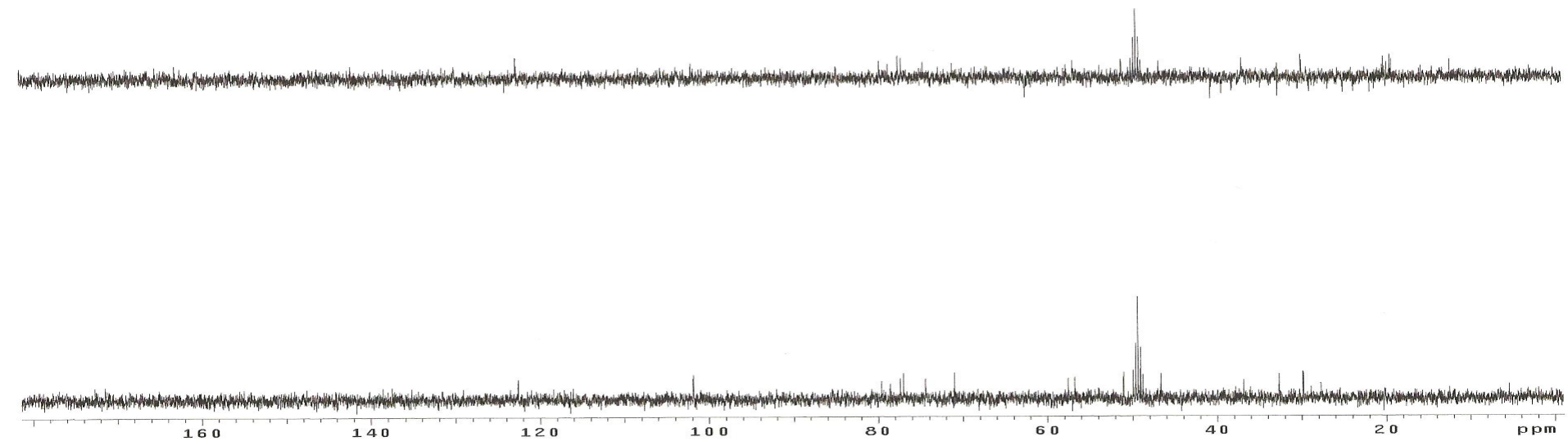


Figura 21: Espectro de DEPT 135º-90º (CD_3OD) de **FR-3**.

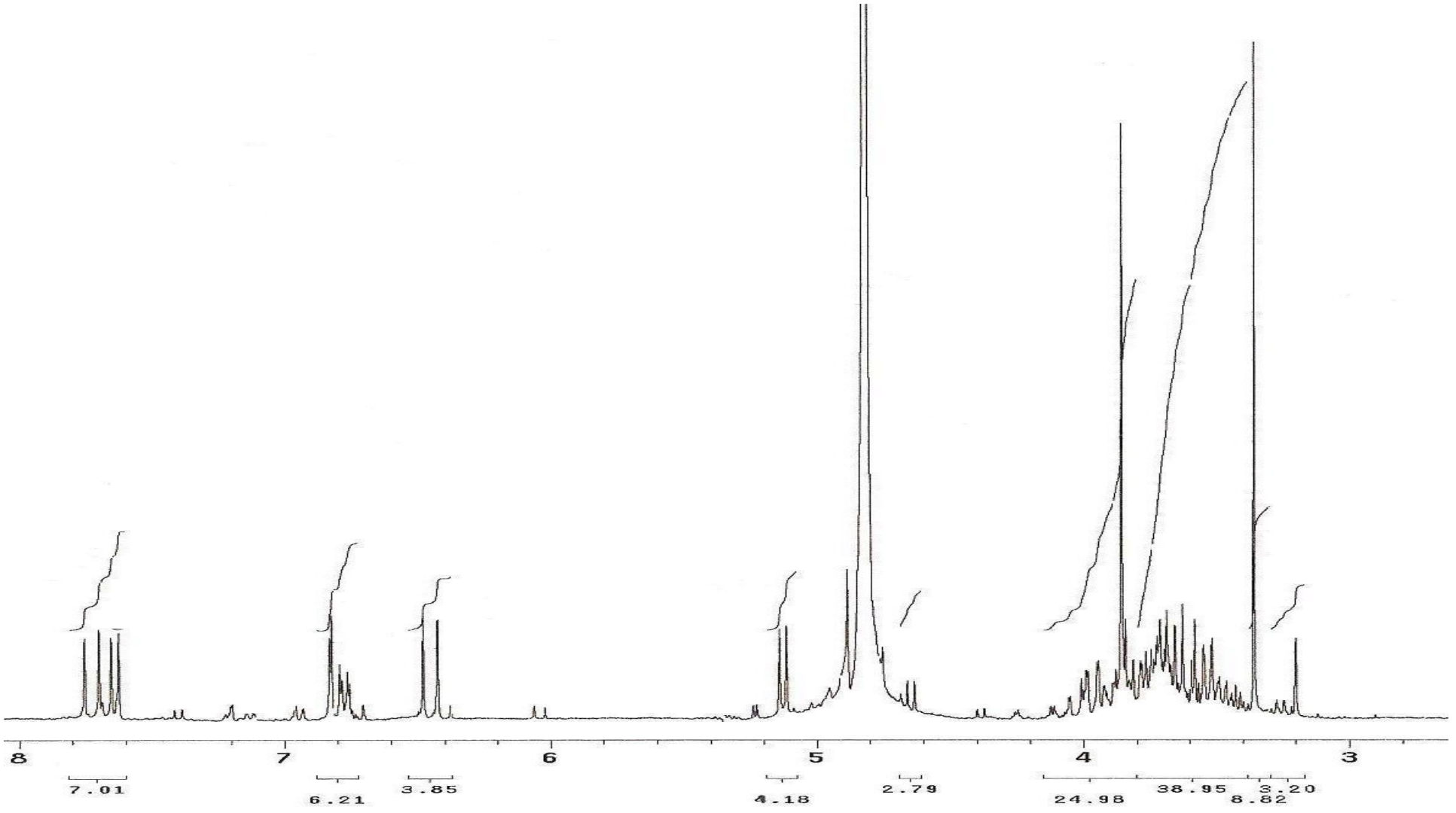


Figura 22: Espectro de RMN de ^{1}H (D_2O, 300 MHz) de **FR-6**.

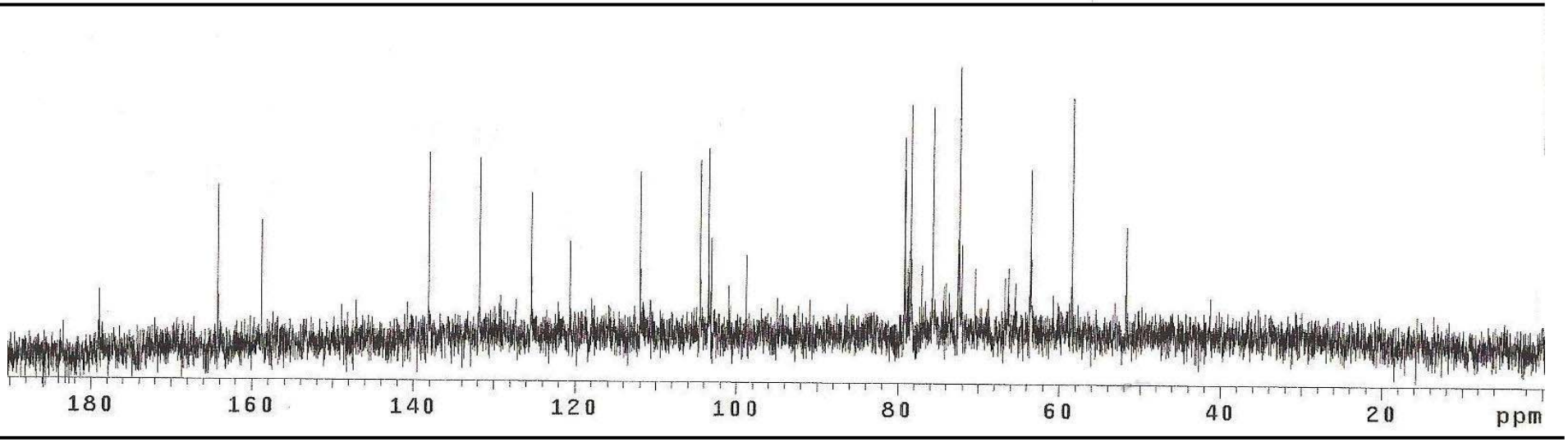


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 75,5 MHz) de **FR-6**.

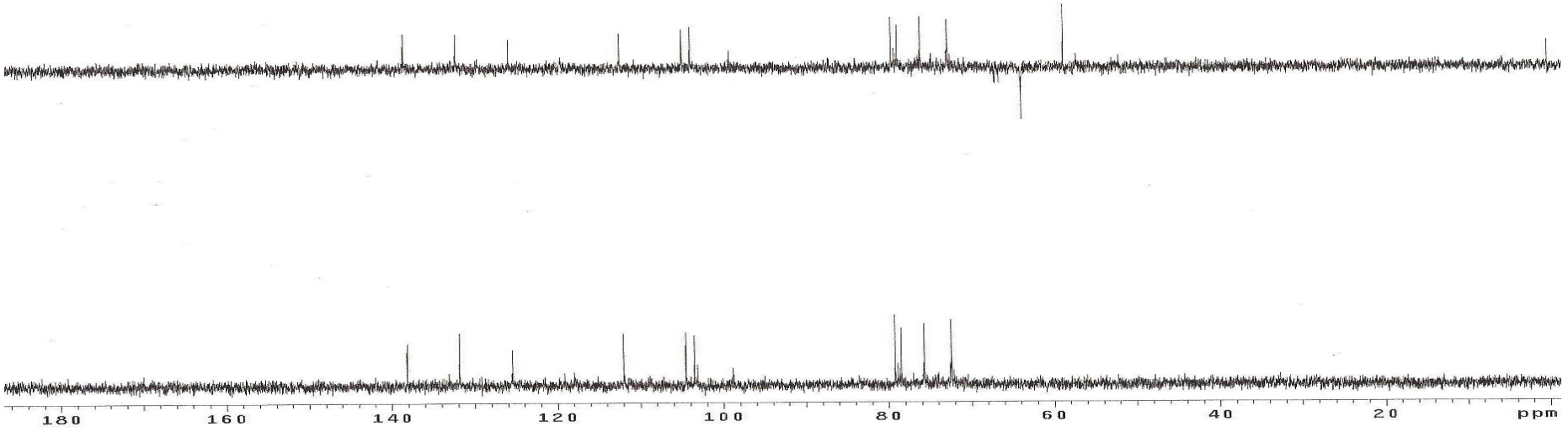


Figura 24: Espectro de DEPT 135º-90º (D_2O) de **FR-6**.

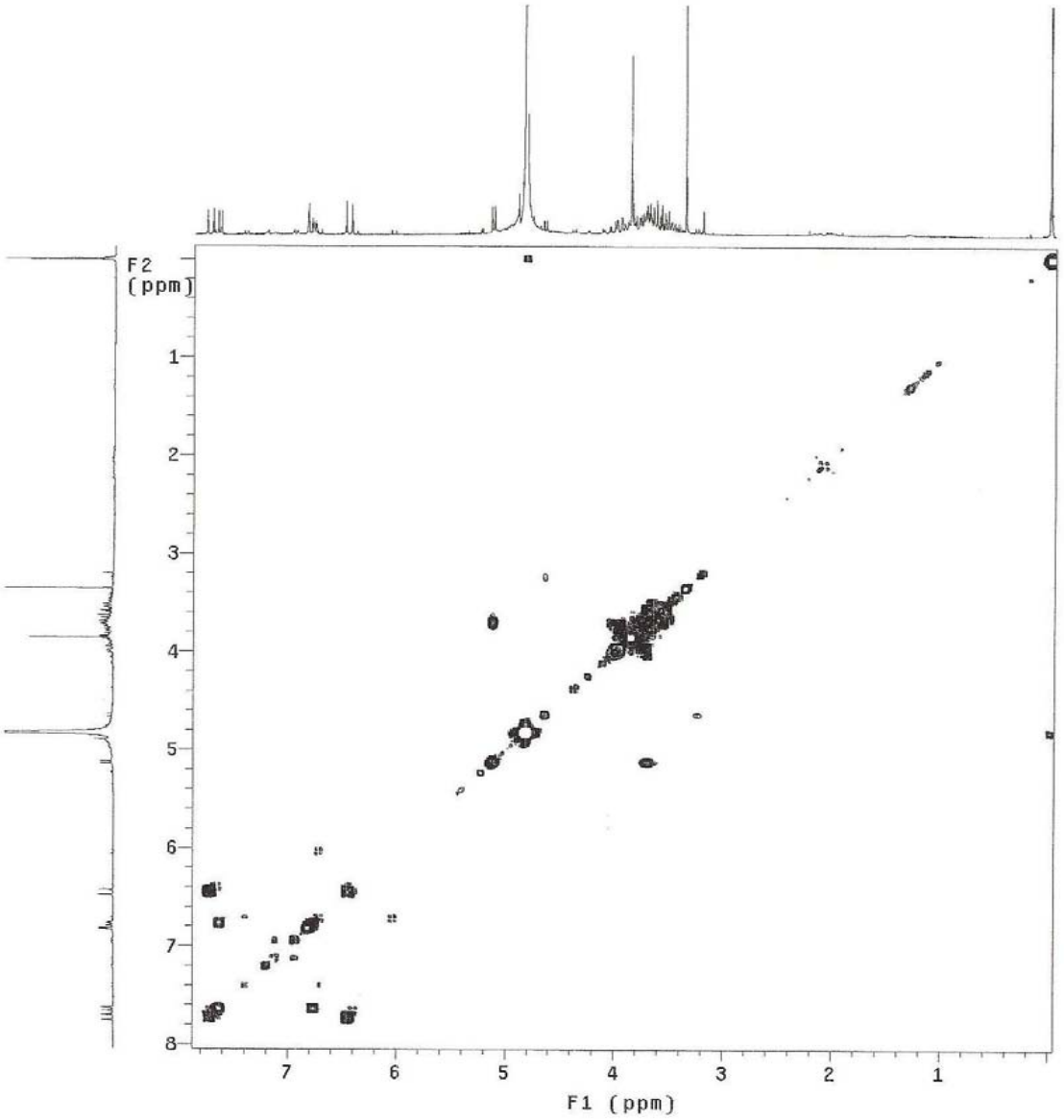


Figura 25: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY (D_2O, 300 MHz) de **FR-6**.

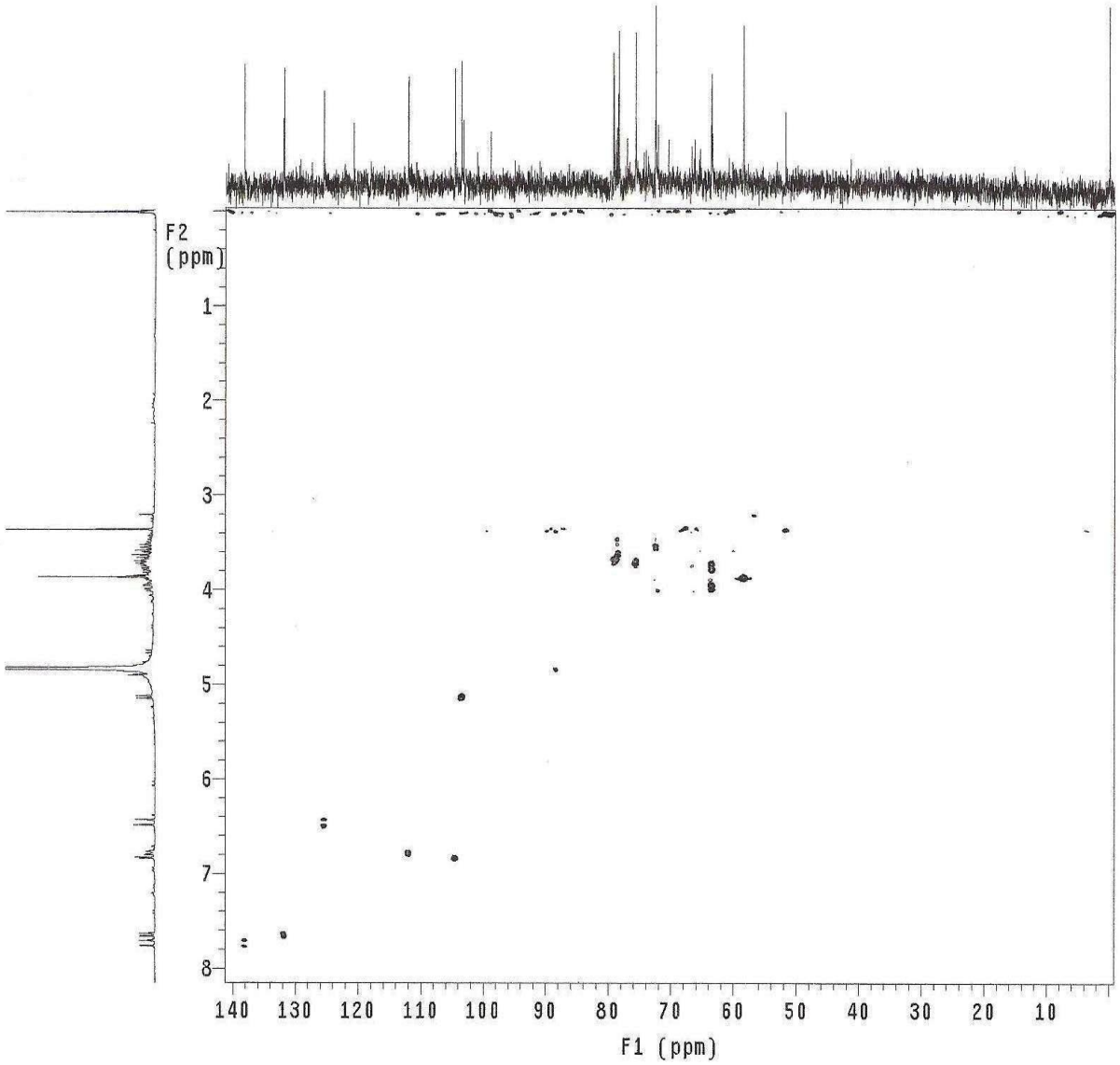


Figura 26: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, D_2O) de **FR-6.**

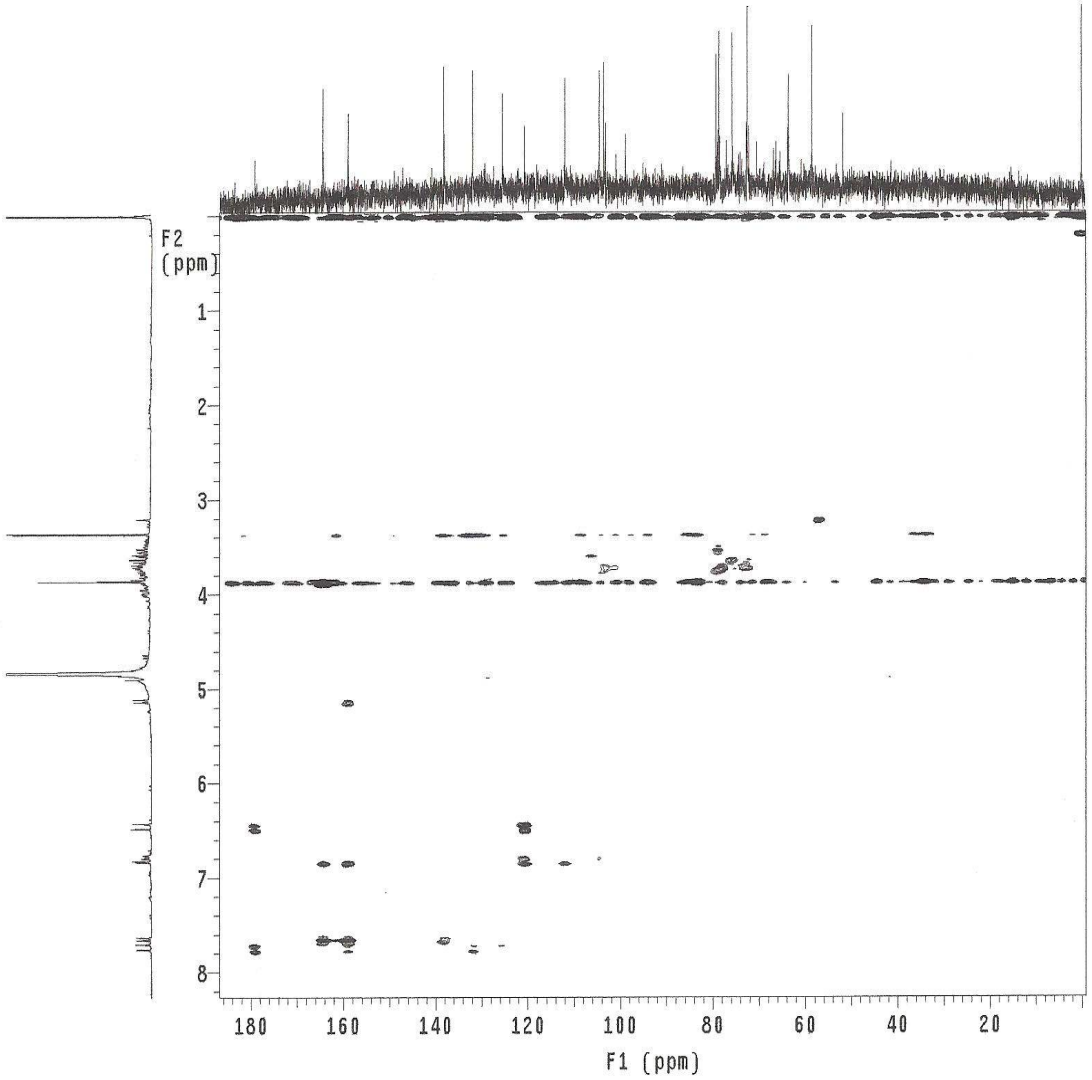


Figura 27: Espectro de HMBC ^{3}J (^{1}H x ^{1}H, D_2O) de **FR-6**.

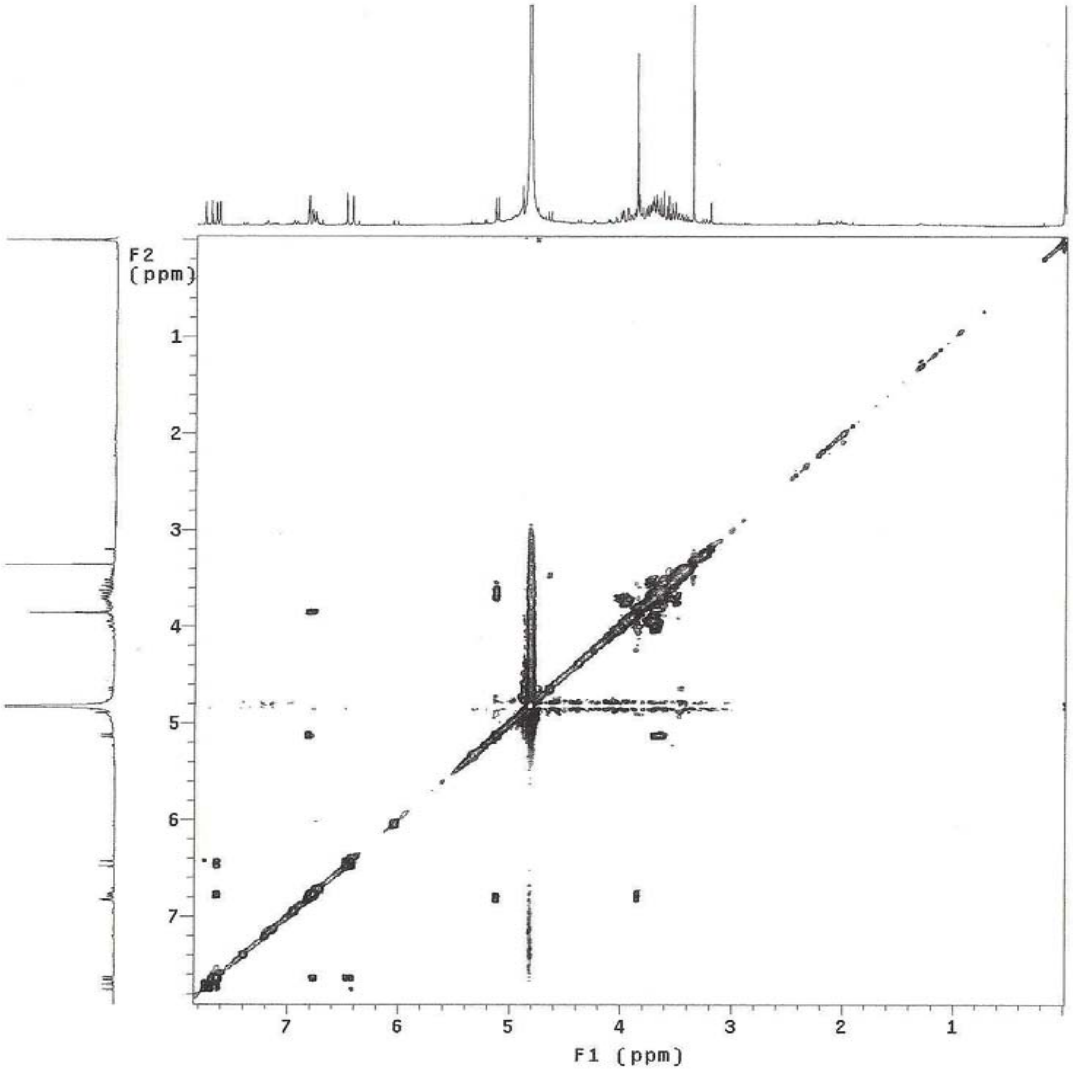


Figura 28: Espectro de ^{1}H x ^{1}H - NOESY (D_2O, 300 MHz) de **FR-6**.

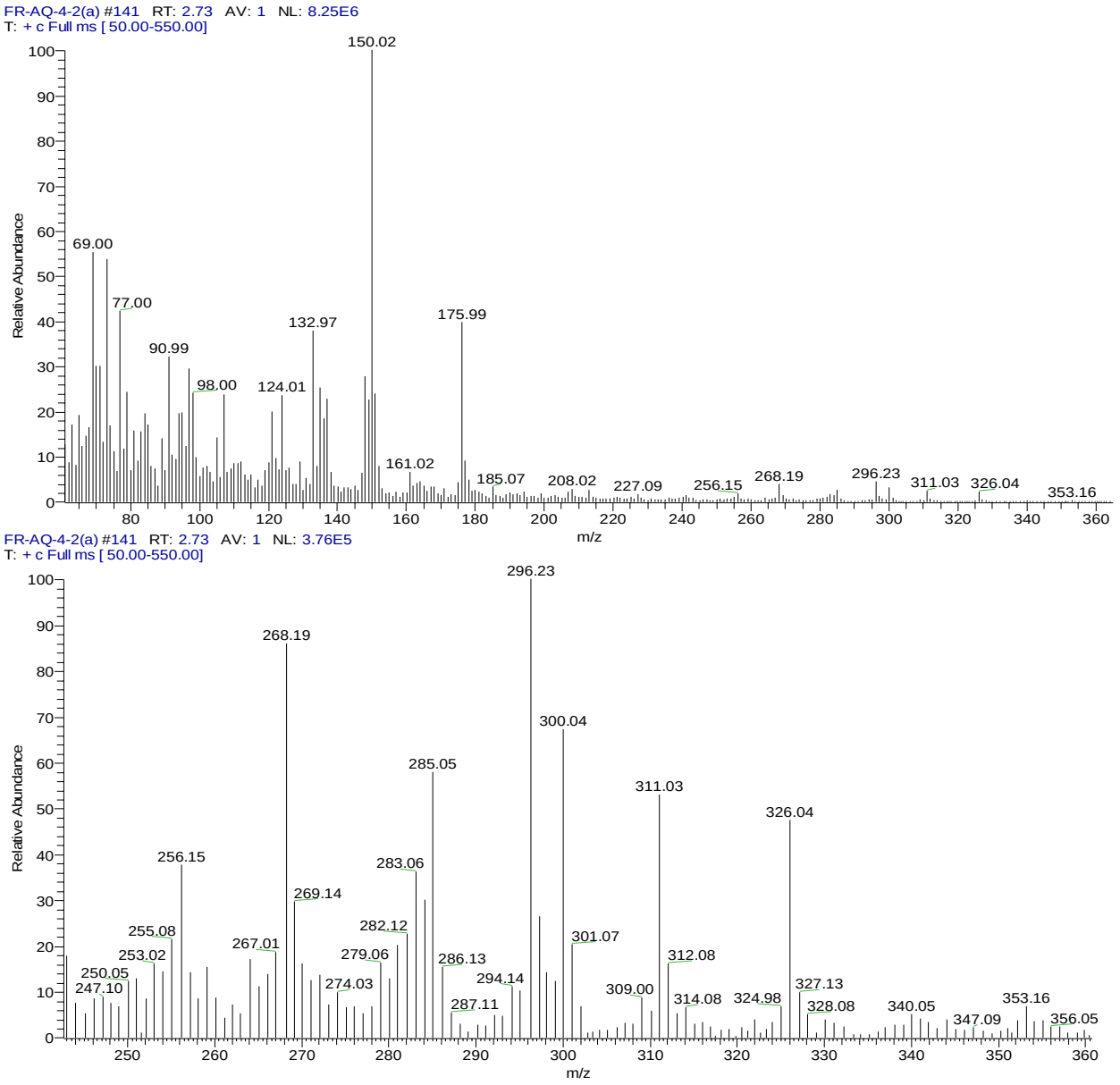


Figura 29: Espectro de massas (70 eV) de baixa resolução de **FR-6**.

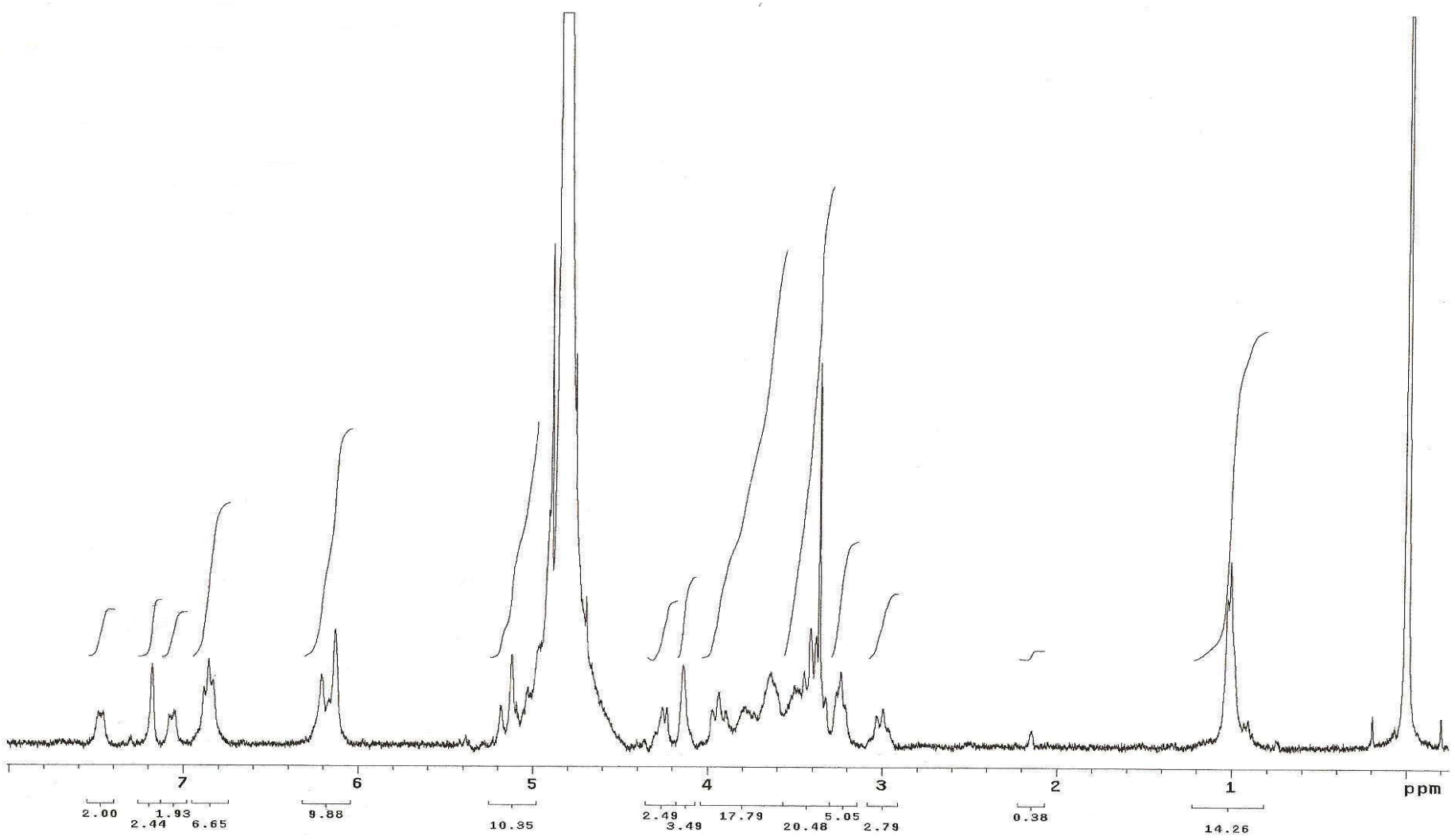


Figura 30: Espectro de RMN de ^{1}H (D_2O, 300 MHz) de **FR-7**.

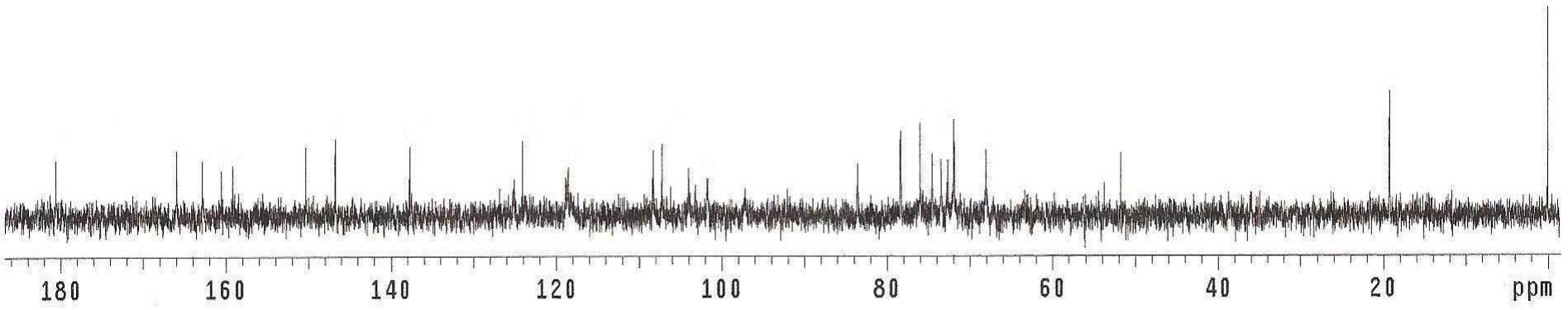


Figura 31: Espectro de RMN ^{13}C (D_2O, 75,5 MHz) de **FR-7**.

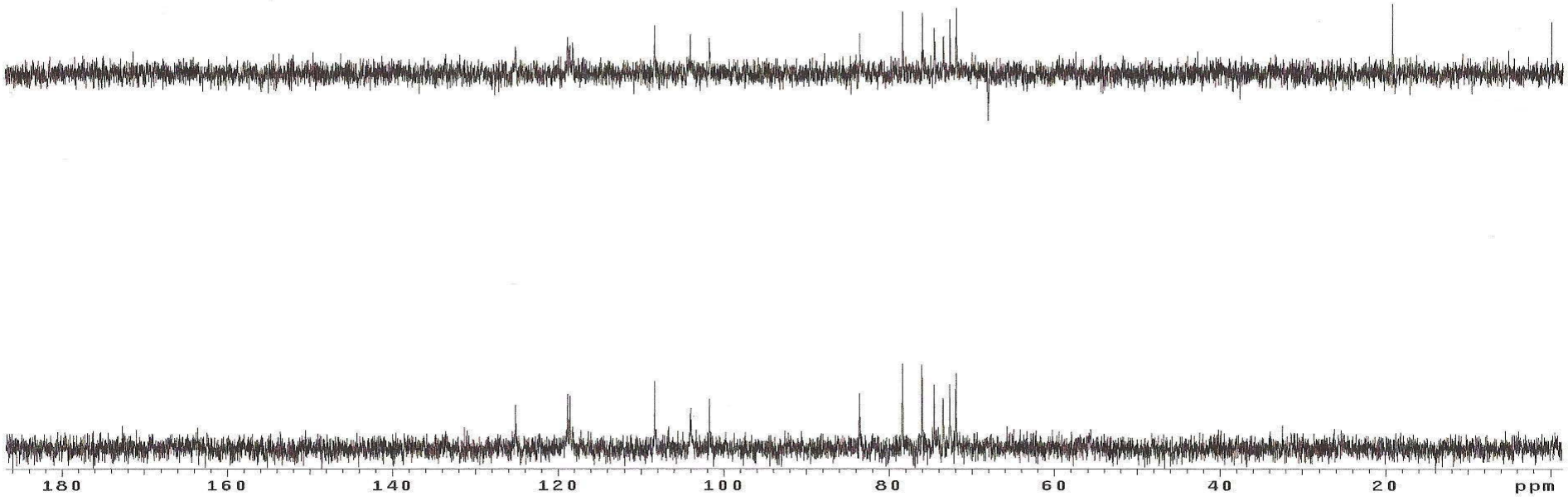


Figura 32: Espectro de DEPT 135º-90º (D_2O) de **FR-7**.

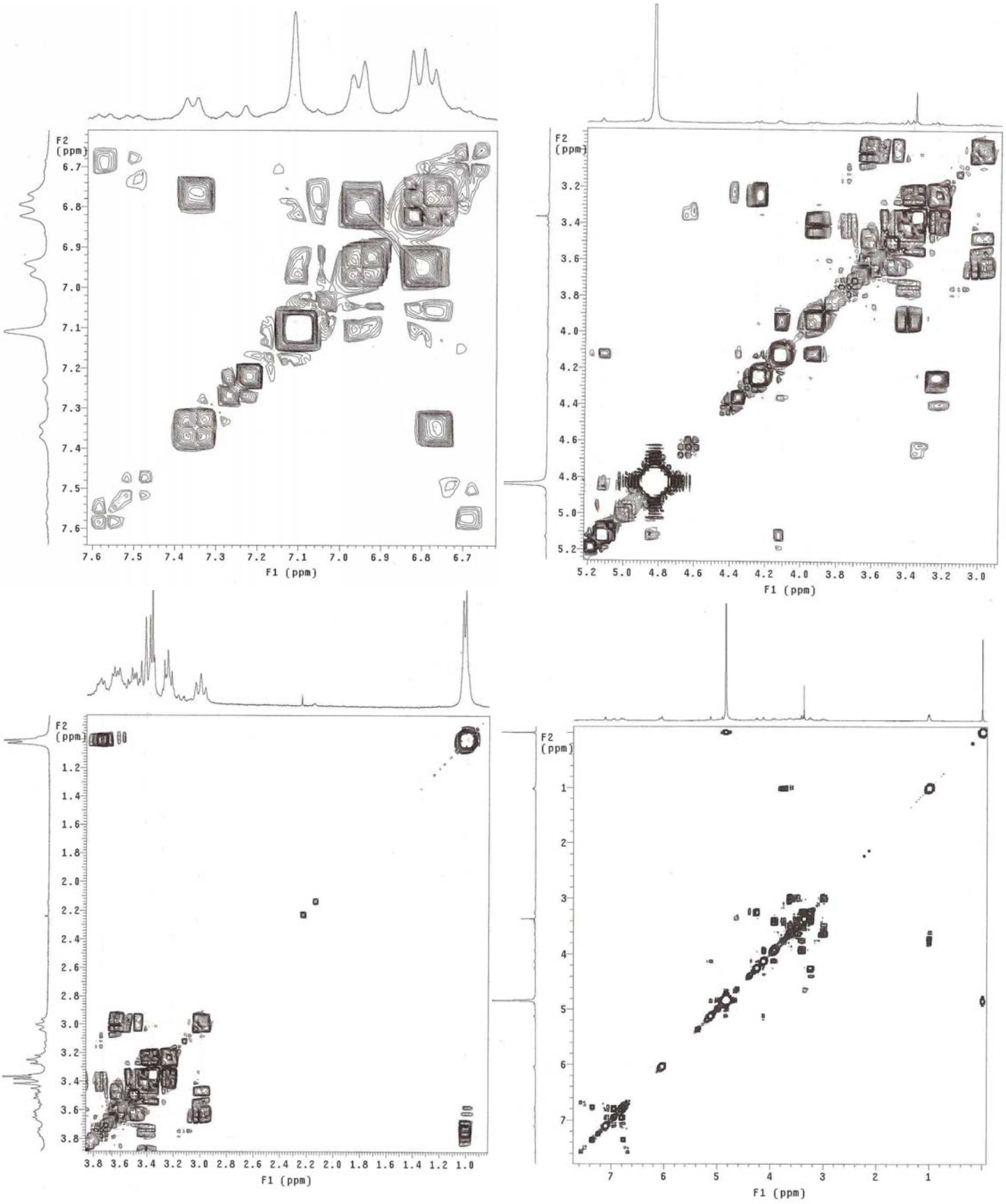


Figura 33: Espectro de ^{1}H x ^{1}H – COSY (D_2O, 300 MHz) de **FR-7**.

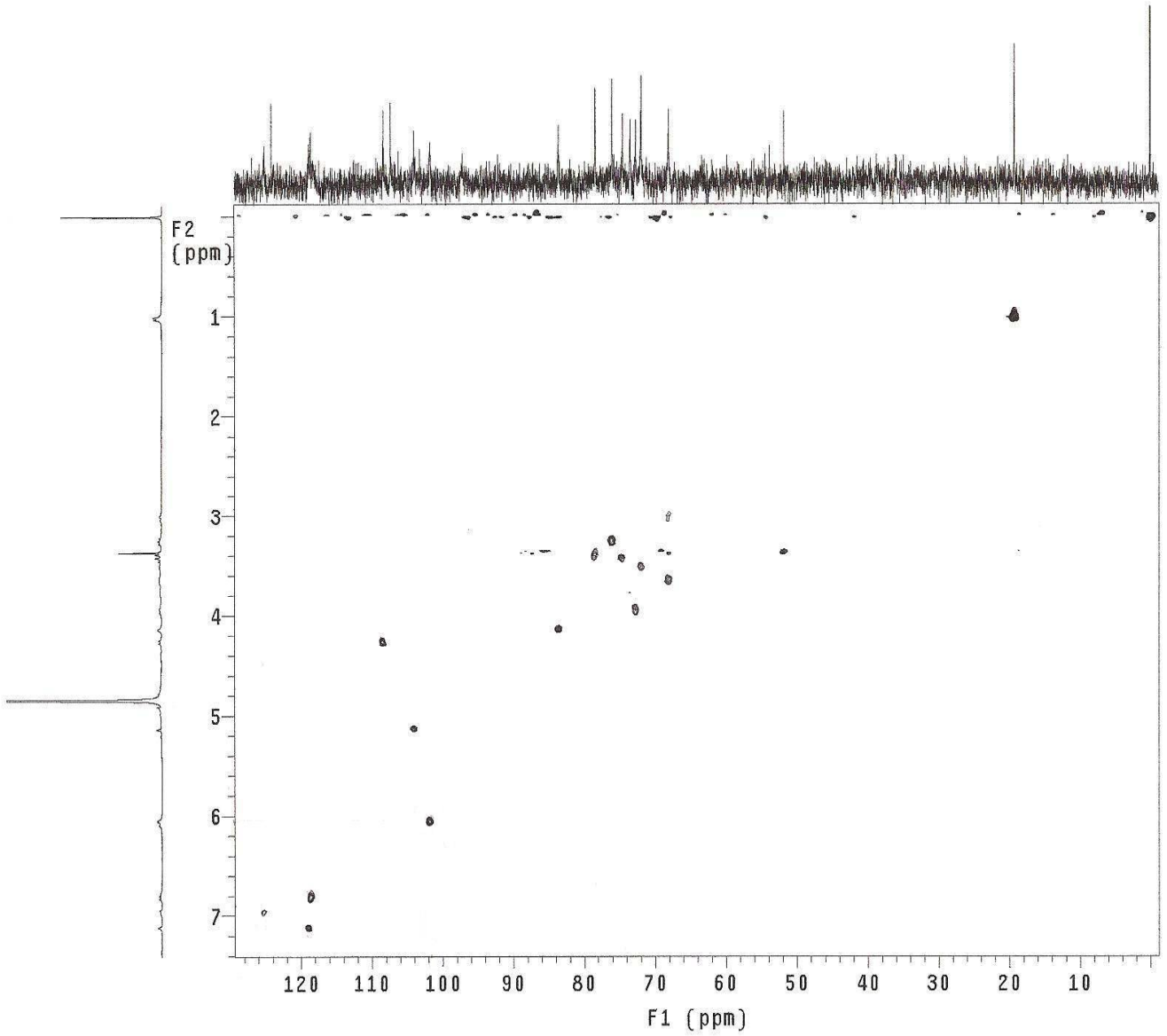


Figura 34: Espectro de HMQC (^{1}H x ^{13}C, D_2O) de **FR-7.**

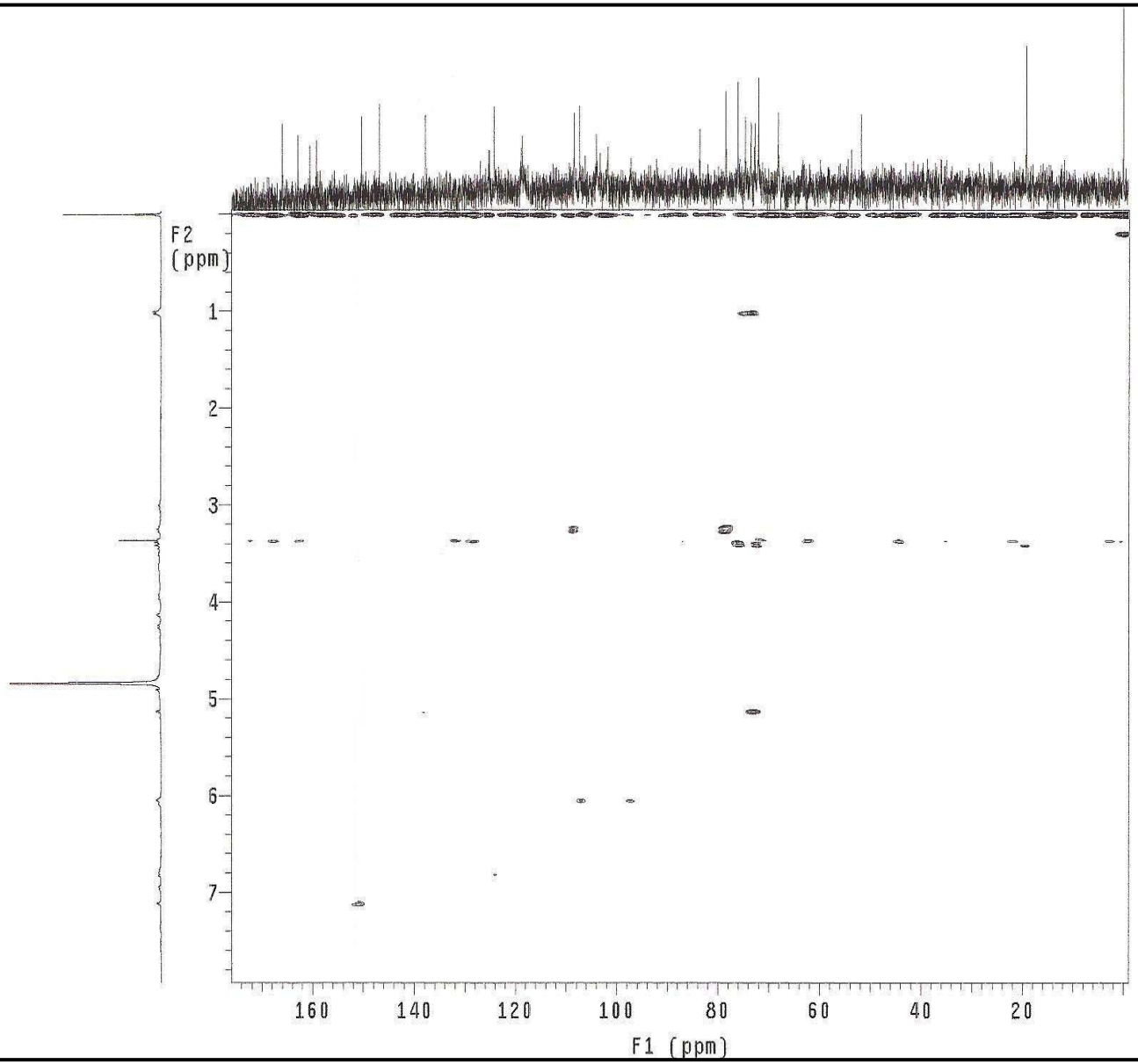


Figura 35: Espectro de HMBC ^{3}J (^{1}H x ^{1}H, D_2O) de **FR-7**.