

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Gêneros tóxicos da nossa flora: química e biologia

Fernanda Peres Ferreira

Ribeirão Preto
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Gêneros tóxicos da nossa flora: química e biologia

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientado(a): Fernanda Peres Ferreira

Orientador(a): Dionéia Camilo Rodrigues
de Oliveira

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ferreira, Fernanda Peres

Gêneros tóxicos de nossa flora: química e biologia. Ribeirão Preto, 2011.

248 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Oliveira, Dionéia Camilo Rodrigues

1. *Ipomoea*. 2. *Senna*. 3. *Riedeliella*. 4. *Indigofera*. 5. *Crotalaria*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Fernanda Peres Ferreira

Título do trabalho: Gêneros tóxicos de nossa flora: química e biologia.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Dionéia Camilo
Rodrigues de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus,

Pelo caminho guiado.

*Aos meus pais Mauro e Jane,
Pelo incentivo, apoio e confiança e por
serem os melhores pais do mundo.*

*As minhas queridas irmãs Daniela e
Maira e ao meu cunhado, Márcio, pelo
companheirismo, ajuda e conselhos.*

*A minha avó Maria, pela vibração,
sempre positiva, e entusiasmo pela vida.*

*Ao Ricardo, por estar sempre presente
durante a realização deste trabalho,
apoiando e me ouvindo....*

Amo vocês!

*A professora Dionéia, pessoa a qual tive o
prazer de ter como orientadora. A esta
pessoa que me acompanhou até hoje no
mundo da pesquisa, me ensinou a descobrir
perguntas e me ajudou a encontrar muitas
respostas, não apenas no que se refere às
questões profissionais mas também àquelas
pessoais.*

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela oportunidade e acolhida.

Aos professores do Laboratório de Química Orgânica, pelos conselhos, amizade e conhecimentos transmitidos no decorrer desse trabalho.

À Izabel Cristina Casanova Turatti e ao José Carlos Tomáz, pela ajuda, sugestões e discussões, imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Química Orgânica, pela prontidão em ajudar.

Aos atenciosos funcionários da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Arnildo Pott (UFMS), pelo material vegetal fornecido.

À Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira (FCFRP-USP) por me dar a oportunidade de participar de uma coleta de material vegetal.

Ao funcionário Vinícius Palaretti (FFCLRP-USP), pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Gino Del Ponte, e à funcionária Áurea Donizete Lanchote (FCFRP-USP), pela realização dos experimentos para a obtenção das atividades ópticas.

Ao Prof. Dr. Richard John Ward (FFCLRP-USP), pela obtenção dos espectros de Dicroísmo Circular.

À Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa e sua equipe, da Universidade Federal do Ceará, pela avaliação das atividades citotóxicas dos extratos, frações e substâncias isoladas.

À Profa. Dra. Niece Araçari Jacometti Cardoso Furtado e sua equipe (FCFRP-USP), pela avaliação das atividades antimicrobianas.

À Profa. Dra. Rose Mary Zumstein G. Naal, à funcionária Maria Perpétua Freire de Moraes Del Lama e à aluna Natália Salotti Guardabaxo (FCFRP-USP), pela avaliação das atividades anti-alérgicas.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque e sua equipe (FCFRP-USP), pela avaliação das atividades tripanocidas dos extratos e frações.

A todos os amigos da Q.O., que fizeram do laboratório um lugar tão especial. Agradeço as idéias que surgiram das reuniões de grupo e que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho e agradeço principalmente pelos bons momentos...

A toda a minha família, pelo apoio e confiança.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Àqueles que aqui não citei, mas que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

A todos, o meu muito obrigada!

*“O começo da sabedoria é encontrado na dúvida;
duvidando começamos a questionar, e procurando
podemos achar a verdade.”*

Pierre Abelard

RESUMO

FERREIRA, F. P. **Gêneros tóxicos de nossa flora: química e biologia**. 2011. 248f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O conhecimento de plantas tóxicas tem apresentado um grande papel para a sociedade. Seus estudos são importantes desde que são responsáveis por diferentes enfermidades, e até mesmo mortes por envenenamento, assim como por tornar possível o conhecimento de moléculas bioativas, as quais muitas delas se tornaram importantes na terapêutica atual. Vários são os exemplos de fármacos que estão no mercado, provenientes da observação humana de sinais de intoxicação após a ingestão de plantas capazes de metabolizar essas estruturas. Portanto, o estudo de plantas tóxicas está intimamente relacionado com a saúde de homens e de animais. Todavia, estão envolvidas também em aspectos econômicos, se for considerado os milhões de ruminantes que morrem a cada ano pelas suas ingestões. O envenenamento do gado, ocasionado por essas espécies é um sério problema, principalmente no Brasil, onde aproximadamente um milhão de animais morre por ano, devido à ingestão dessas plantas. Após avaliação de diversas plantas, consideradas tóxicas ou potencialmente tóxicas para o gado, observou-se a presença de poucos estudos referentes à composição dos metabólitos secundários para várias espécies. Este trabalho apresentou como objetivos realizar um *screening* químico das espécies tóxicas *Riedeliella graciliflora*, *Indigofera truxillensis* e *Crotalaria micans*, além das espécies pertencentes a gêneros tóxicos *Senna pendula*, *Senna splendida*, *Senna aculeata* e *Ipomoea chiliantha*, envolvendo estudos farmacognósticos, além de análises espectroscópicas (RMN de ^1H) e observação do perfil químico em CLAE-UV-DAD, CG-EM. Tal *screening* permitiu selecionar as espécies para a realização de estudo químico mais detalhado. Também foram propostas as avaliações da atividade citotóxica dos extratos e frações, a partir de ensaios utilizando *Artemia salina*, e das atividades antimicrobianas, antitumorais, anti-alérgica e tripanocida. Quanto aos ensaios de citotoxicidade dos extratos para *Artemia salina*, apesar destes não se apresentarem muito ativos, observou-se maior toxicidade de *Crotalaria micans*, *Senna splendida* e *Indigofera truxillensis*, nas quais todos os microcrustáceos apresentaram comprometimento da motilidade ou morte nas concentrações 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$. No estudo químico de *I. chiliantha* foram identificados triterpenos, alcoóis, ácidos e ésteres graxos, derivados fenilpropanoides, flavonoide, além de calisteginas, as quais são alcaloides *nortropânicos*, e uma resina glicosídica ainda não descrita na literatura. As calisteginas são inibidoras de glicosidases, sendo tal atividade atribuída à toxicidade apresentada pelas espécies do gênero *Ipomoea*, ao gado. Já as resinas glicosídicas têm apresentado efeito catártico drástico, além de citotoxicidade, podendo contribuir para a toxicidade das espécies do gênero. No estudo químico de *R. graciliflora*, foram identificados triterpenos, esteroides, ácidos graxos, tocoferol, flavonoides *C*-glicosídeos e *O*-glicosídeos, benzenoide, além de quatro isoflavanos, sendo três inéditas na literatura e a outra inédita como produto natural. A fração diclorometânica de *R. graciliflora*, a partir da qual foram isolados os isoflavanóis descritos, apresentou-se muito ativa contra as linhagens celulares tumorais SP-295, HCT-8 e MDA-MB-435. No estudo químico de *I. truxillensis*, foram identificados triterpeno, esteroides, ácidos e ésteres graxos, benzenoides, flavonoides *O*-glicosídeos, e o alcaloide indoxil- β -glicopiranosídeo, ao qual

têm sido atribuído ser o responsável por toxicidade urêmica, em ratos, devido ao seu produto de biotransformação, indoxil (3-hidroxiindol) sulfato, ser uma toxina urêmica. Devido os sintomas de intoxicação apresentados pelo gado que ingeriram esta planta estarem relacionados à toxicidade nos rins, a presença deste alcaloide parece ter um importante papel em sua toxicidade. No estudo químico de *S. splendida* e *S. pendula*, foram identificados ácidos e ésteres graxos, tocoferóis, triterpeno, esteroides, flavonóis e antraquinona. Nenhuma destas substâncias parece estar relacionada à toxicidade. Quanto aos ensaios de atividade citotóxica frente às linhagens celulares tumorais, o extrato bruto de *C. micans* apresentou atividade moderada frente à linhagem celular SF-295. Quanto aos ensaios antimicrobianos, nenhum dos extratos brutos apresentou-se ativo. Porém, as frações de *S. splendida* provenientes das partições apresentaram atividade contra as bactérias *Klebsiela pneumoniae*/13883 e *Proteus mirabilis*/29906. Quanto aos ensaios para avaliação da atividade anti-alérgica, os derivados fenilpropanóides isolados de *I. chiliantha* apresentaram-se ativos. Quanto aos ensaios para avaliação da atividade tripanocida, apresentaram atividade o extrato etanólico bruto de *R. graciliflora* e a fração em acetato de etila de *S. splendida*.

Palavras-chave: 1. *Ipomoea*. 2. *Senna*. 3. *Riedeliella*. 4. *Indigofera*. 5. *Crotalaria*

ABSTRACT

FERREIRA, F. P. **Toxic genera of our flora: chemistry and biology**. 2011. 248f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Knowledge about toxic plants has played a fundamental role in our society. Investigation of such plants is important, because they are responsible for a wide range of malaise and even death by poisoning. Moreover, gaining insight into active biomolecules is paramount, since many of these compounds have become extremely relevant in current therapeutics. There are various examples of commercially available drugs originated from the human observation of signs of intoxication following ingestion of plants capable of metabolizing these structures. Therefore, the study of toxic plants is closely related to human and animal health. Economic issues are also involved, if one considers the millions of ruminants that die every year due to toxic plant ingestion. Cattle poisoning owing to these species is a serious matter, especially in Brazil, where approximately a million animals die due to poisoning by ingested plants every year. After evaluation of several plants deemed toxic or potentially toxic to cattle, we have observed that there are few works on the composition of secondary metabolites from these species. Therefore, the present investigation aimed at the chemical screening of the toxic species *Riedeliella graciliflora*, *Indigofera truxillensis*, and *Crotalaria micans*, and of species belonging to the toxic genera *Senna pendula*, *Senna splendida*, *Senna aculeate*, and *Ipomoea chiliantha*, by means of pharmacodiagnostic studies, spectroscopic analysis (^1H NMR), and examination of the chemical profile by HPLC-UV-DAD, GC-MS. Such screening allowed for selection of the species to be used in a more detailed chemical study. Assessment of the cytotoxic activity of the extracts and fractions was proposed on the basis of assays employing *Artemia salina* and evaluating its antimicrobial, antitumor, anti-allergic, and trypanocidal activities. Although the extracts from *Artemia salina* did not exhibit pronounced cytotoxicity, larger toxicity was detected for *Crotalaria micans*, *Senna splendida*, and *Indigofera truxillensis*, in the presence of which all the crustaceans presented reduced motility or death at concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The chemical investigation of *I. chiliantha* enabled identification of triterpenes, alcohols, fatty acids and esters, phenylpropanoid derivatives, flavonoids, as well as calystegines, which are nortropane alkaloids, and a resin glycosidic not yet described in the literature. Calystegines are inhibitors of glycosidases, and this action is attributed to the toxicity displayed by species of the genus *Ipomoea* against cattle. As for resins glycosidic, besides cytotoxicity they also present a drastic cathartic effect, thereby contributing to the toxicity inherent to the species of this genus. The chemical study of *R. graciliflora* allowed for identification of triterpenes, steroids, fatty acids, tocopherol, flavonoids, C-glycosides and O-glycosides, benzenoids, in addition to four isoflavans, three of which have not been reported in the literature yet and one of which is novel as natural product. The dichloromethane fraction of *R. graciliflora*, from which the described isoflavanols were isolated, was very active against the tumor cell strains SP-295, HCT-8, and MDA-MB-435. The chemical investigation of *I. truxillensis* revealed the existence of triterpene, steroids, fatty acids and esters, benzenoids, flavonoid O-glycosides, and the alkaloid indoxyl- β -glucopiranoside, to which uremic toxicity in rats has been attributed. This is because of its biotransformation product indoxyl (3-hydroxindol) sulfate, which is known to be a uremic toxin. Because the intoxication symptoms detected in the cattle that have ingested this plant are related to kidney toxicity, the presence of this alkaloid seems to play

an important part in the toxicity of this species. The chemical screening of *S. splendida* and *S. pendula* demonstrated the existence of fatty acid and esters, flavonols, and anthraquinone. None of these compounds seem to be related to toxicity. As for the assays regarding the cytotoxic activity against tumor cell strains, the crude extract of *C. micans* was moderately active against the cell strain SF-295. With respect to the antimicrobial assays, none of the crude extracts displayed activity. Nevertheless, *S. splendida* fractions originated from partitions presented activity against the bacteria *Klebsiella pneumoniae*/13883 and *Proteus mirabilis*/29906. Concerning the assays evaluating the anti-allergic action, the phenylpropanoid derivatives isolated from *I. chiliantha* exhibited interesting properties. When it comes to the trypanocidal activity, the crude ethanolic extract from *R. graciliflora* and the acetyl acetate fraction of *S. splendida* were active.

Keywords: 1. *Ipomoea*. 2. *Senna*. 3. *Riedeliella*. 4. *Indigofera*. 5. *Crotalaria*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos alcaloides tóxicos coniina (1) e aconitina (2).....	1
Figura 2. Estruturas dos fármacos provenientes de plantas tóxicas: quinina (3), morfina (4), codeína (5), digoxina (6), reserpina (7) e taxol (8).....	2
Figura 3. Estruturas de substâncias tóxicas provenientes de fontes naturais, as quais serviram de protótipos para a descoberta de medicamentos. (8a) podofilotoxina, (8b e 8c) etoposido e teniposido, (9a) peptídeo isolado de jararaca, (9b) captopril, (10a) dicumarol, (10b) varfarina, (11) cocaína, (12) d-tubocurarina, (13) epibatina.....	4
Figura 4. <i>Ipomoea chiliantha</i> Hallier (POTT, POTT, 1994).....	8
Figura 5. Exemplos de estruturas de alcaloides poli-hidroxiados encontrados em espécies de <i>Ipomoea</i>	9
Figura 6. Exemplos de resinas glicosídicas isoladas de <i>Ipomoea</i>	11
Figura 7. <i>Riedeliella graciliflora</i> Harms (POTT, POTT, 1994).....	11
Figura 8. <i>Indigofera truxillensis</i> (Coleta em Botucatu – SP, 2009)	12
Figura 9. Estruturas da indospicina e derivados do ácido 3-nitropropiónico encontrados no gênero <i>Indigofera</i>	13
Figura 10. <i>Senna aculeata</i> (POTT, POTT, 1994).....	13
Figura 11. <i>Senna pendula</i> (POTT, POTT, 1994).....	14
Figura 12. <i>Senna splendida</i> (POTT, POTT, 1994).....	14
Figura 13. <i>Crotalaria micans</i> (POTT, POTT, 1994).....	15
Figura 14. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de <i>I. chiliantha</i> - <u>Condições de análise CG 1</u> (item 3.3.4).....	35
Figura 15. Espectro de massas (IE – 70 eV), da substância IC-11 , obtido da análise por CG-EM, da fração hexânica de <i>I. chiliantha</i>	36
Figura 16. Espectro de massas (IE – 70 eV), da substância IC-12 , obtido da análise por CG-EM, da fração hexânica de <i>I. chiliantha</i>	36
Figura 17. Espectro de massas (IE – 70 eV), da substância IC-13 , obtido da análise por CG-EM, da fração hexânica de <i>I. chiliantha</i>	36
Figura 18. Espectro de Massas (IE) das substâncias ácido 2-hidroxicinâmico, ácido 3-hidroxicinâmico e ácido 4-hidroxicinâmico, obtidos da biblioteca Willey.	37
Figura 19. Ésteres graxos do ácido <i>p</i> -cumárico, identificados na fração hexânica de <i>I. chiliantha</i>	37
Figura 20. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (280 nm) da fração IC-DCM – 5-9[(1-7)-21-27)], obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 2</u> , página 28. O pico em 51,5 min. refere-se à substância IC-19 (30,0 mg).....	38
Figura 21. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 37-40, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 3</u> , página 28. O pico em 21,293 min. refere-se à substância IC-21 (9,0 mg).	40
Figura 22. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 50, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 3</u> , página 28. O pico em 42,752 min. refere-se à substância IC-22 (3,5 mg), o pico em 50,902 min. refere-se à substância IC-23 (20,9 mg), e o pico em 69,972 min. refere-se à substância IC-24 (4,0 mg).....	40
Figura 23. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 58-61, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 3</u> , página 28. O pico em 35,070 min. refere-se à substância IC-25 (17 mg), o pico em 47,267 min. refere-se à substância IC-26 (30,7 mg).....	41
Figura 24. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 62-70, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 3</u> , página 28. O pico em 37,391 min. refere-se à substância IC-27 (85,1 mg).	41
Figura 25. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 71-82, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 4</u> , página 28. Os picos em 11,534 e 11,848 min. refere-se à substância IC-27 (7,5 mg); 17,233 min. à substância IC-30 (8 mg), 19,3 à substância IC-28 (45 mg); 26,742 min. à substância IC-29 (27 mg).	42
Figura 26. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 83-91, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 4</u> , página 28. O pico em 19,443 min. refere-se à substância IC-28 (44,3 mg).	42
Figura 27. Cromatograma obtido em CG-EM da fração HA-H ₂ O de <i>I. chiliantha</i> , após purificação em resina Dowex-50 e sililação, utilizando <i>n</i> -octadecano como padrão interno e <u>Condições de análise CG 3</u> , página 27.	43
Figura 28. Expansão do cromatograma obtido em CG-EM da fração HA-H ₂ O de <i>I. chiliantha</i> ., após purificação em resina Dowex-50 e sililação, utilizando <i>n</i> -octadecano como padrão interno, sendo os	

picos (–) e (–) referentes aos íons fragmentos m/z 217 e m/z 244, respectivamente, tendo suas intensidades multiplicadas por 200.....	43
Figura 29. Espectros de Massas Espectro de massas (IE – 70 eV), das substâncias IC-31 e IC-32 , com tempos de retenção 10,825 min. e 10,035 min., obtido da análise por CG-EM, da fração HA-H ₂ O de <i>I. chiliantha</i>	44
Figura 30. Estruturas das calisteginas B1 e B4, identificadas na fração hidro-alcoólica de <i>I. chiliantha</i>	44
Figura 31. Principais correlações dos mapas de contorno do HMBC (→) e ¹ H- ¹ H COSY (–) para a substância IC-19	48
Figura 32. Proposta de fragmentação (ESI-MS/MS) da substância IC-19 , para a formação dos íons m/z 417 e m/z 1172.....	50
Figura 33. Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz; C ₅ D ₅ N-TMS) da substância IC-19	51
Figura 34. Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, C ₅ D ₅ N-TMS) da substância IC-19	51
Figura 35. Mapa de contorno do HSQC (125 MHz/500 MHz; C ₅ D ₅ N - TMS) da substância IC-19	52
Figura 36. Mapa de contorno do HMBC (125 MHz/500 MHz; C ₅ D ₅ N - TMS) da substância IC-19	52
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H- ¹ H COSY (500 MHz, C ₅ D ₅ N) da substância IC-19	53
Figura 38. Espectro de massas de alta resolução da substância IC-19 (Ionização por “Electrospray” (modo negativo).	54
Figura 39. Espectro de massas de alta resolução da substância IC-19 (Ionização por “Electrospray” (modo positivo).	54
Figura 40. Espectro de massas da substância IC-19 (Ionização por “Electrospray”-MS/MS (modo negativo).....	54
Figura 41. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz) da substância IC-20	56
Figura 42. Espectro de RMN de ¹³ C da substância IC-20 . (DMSO-d ₆ – 125 MHz).	56
Figura 43. Dept 135° da substância IC-20 . (DMSO-d ₆ – 125 MHz).	57
Figura 44. Mapa de contorno do HMQC da substância IC-20 . (DMSO-d ₆ – TMS – 500 e 125 MHz).	57
Figura 45. Mapa de contorno do HMBC da substância IC-20 . (DMSO-d ₆ – TMS – 500 e 125 MHz).	58
Figura 46. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-20 (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 207 u – energia de colisão 15 eV).	58
Figura 47. Estruturas do ácido quínico e da porção fenilpropanoide.	59
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-21 (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz).	61
Figura 49. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-21 (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 367 u (10 eV)).	61
Figura 50. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-22 . (DMSO-d ₆ -TMS, 500 MHz).....	63
Figura 51. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-22 (ESI-MS e ESI-MS/MS dos íons 529 u (15 eV) e 367 u (5eV)).	63
Figura 52. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-23 (DMSO-d ₆ -TMS, 500 MHz).....	65
Figura 53. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-23 (ESI-MS e ESI-MS/MS dos íons 529 u (15 eV) e 367 u (0 eV)).	65
Figura 54. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-24 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz).....	67
Figura 55. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-24 (ESI-MS e ESI-MS/MS dos íons 529 u (20 eV) e 367 u (0 eV)).	67
Figura 56. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-25 (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz).	69
Figura 57. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-25 (ESI-MS e ESI-MS/MS dos íons 515 u (10 eV) e 353 u (5 eV)).	69
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-26 (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz).	71
Figura 59. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-26 (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 353 u (5 eV)).	71
Figura 60. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-27 (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz).	73
Figura 61. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-27 (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 677 u (15 eV)).	73
Figura 62. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-28 (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz).	75
Figura 63. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-28 (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 677 u (20 eV)).	75
Figura 64. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-29 (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz).	77
Figura 65. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-29 (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 691 u (30 eV)).	77
Figura 66. Espectro de RMN de ¹ H da substância IC-30 (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz).	79
Figura 67. Espectro de RMN de ¹³ C – DEPT 135° da substância IC-30 . (CD ₃ OD-TMS, 125 MHz).....	80
Figura 68. Mapa de contorno do HMQC da substância IC-30 . (CD ₃ OD-TMS, 500 e 125 MHz).	80
Figura 69. Mapa de contorno do HMBC da substância IC-30 . (CD ₃ OD-TMS, 500 e 125 MHz).	81

Figura 70. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-30	81
Figura 71. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de <i>R. graciliflora</i> - <u>Condições de análise CG 1</u> , página 26).....	85
Figura 72. Cromatograma obtido em CLAE-UV (280 nm) da fração RGDCM 26-31, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 5</u> , página 28. O pico com $t_R = 30,11$ min. refere-se à substância RG-12 , o pico com $t_R = 27,16$ min. refere-se à substância RG-13 , o, o pico com $t_R = 39,90$ min. refere-se à substância RG-14	86
Figura 73. Cromatograma obtido em CLAE-UV (293 nm) da fração RG DCM 32-35, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 6</u> , página 28. O pico com $t_R = 67,8$ min. refere-se à substância RG-15 e o pico com $t_R = 59,3$ min. refere-se à substância RG-14	86
Figura 74. Cromatograma obtido em CLAE-UV (340 nm) da fração RG AcOEt 40-48, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 7</u> , página 28. O pico com $t_R = 21,0$ min. refere-se à substância RG-16 e o pico com $t_R = 64,0$ min. refere-se à substância RG-17	87
Figura 75. Cromatograma obtido em CLAE-UV (340 nm) da fração RG AcOEt 50-53, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 7</u> , página 28. O pico com $t_R = 57,6$ min. refere-se à substância RG-18 e o pico com $t_R = 58,3$ min. refere-se à substância RG-19	87
Figura 76. Esqueletos bases de um flavonoide (1) e um isoflavonoide (2). Nota-se em (1) a presença de um carbono metínico ligado ao oxigênio, e em (2) a presença de um carbono metilênico ligado ao oxigênio.....	89
Figura 77. Principais correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC para a substância RG-12 (H→C).....	90
Figura 78. Acoplamentos observados entre H-2a e H-3 e H-4a e H-3.	91
Figura 79. Proposta de fragmentação para a isoflavana RG-12	91
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-12 . (DMSO- d_6 -TMS; 500 MHz).....	92
Figura 81. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância RG-12 . (DMSO- d_6 -TMS; 500 MHz)....	92
Figura 82. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância RG-12 . (DMSO- d_6 -TMS; 500 MHz)....	93
Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C da substância RG-12 . (DMSO- d_6 -TMS, 125 MHz).....	93
Figura 84. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da substância RG-12 . (DMSO- d_6 -TMS, 125 MHz)....	94
Figura 85. Mapa do contorno do HMQC da substância RG-12 . (DMSO- d_6 -TMS; 125 e 500 MHz).....	94
Figura 86. Mapa do contorno do HMBC da substância RG-12 . (DMSO- d_6 -TMS; 125 e 500 MHz).....	95
Figura 87. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância RG-12 . (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 317 u (15 eV)).	95
Figura 88. Proposta de fragmentação para a isoflavana RG-13	97
Figura 89. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-13 . (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).	98
Figura 90. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância RG-13 . (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz). .	98
Figura 91. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância RG-13 . (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).	99
Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C da substância RG-13 . (DMSO- d_6 – TMS, 125 MHz).	99
Figura 93. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da substância RG-13 . (DMSO- d_6 – TMS, 125 MHz). 100	
Figura 94. Mapa de contorno do HMQC da substância RG-13 . (DMSO- d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).....	100
Figura 95. Mapa de contorno do HMBC da substância RG-13 . (DMSO- d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).....	101
Figura 96. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância RG-13 . (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 317 u (10 eV)).	101
Figura 97. Propostas 1 e 2 para o padrão de substituição do anel A da substância RG-14 . As setas indicam correlação H→C no mapa de contorno do HMBC.	103
Figura 98. Proposta de fragmentação para a isoflavana RG-14	104
Figura 99. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-14 . (CDCl ₃ – TMS, 500 MHz).....	104
Figura 100. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância RG-14 . (CDCl ₃ – TMS, 500 MHz)....	105
Figura 101. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância RG-14 . (CDCl ₃ – TMS, 500 MHz)...	105
Figura 102. Espectro de RMN de ^{13}C da substância RG-14 . (CDCl ₃ – TMS, 125 MHz).....	106
Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135°, da substância RG-14 . (CDCl ₃ – TMS, 125 MHz). 106	
Figura 104. Mapa de contorno do HMQC da substância RG-14 . (CDCl ₃ – TMS, 500 e 125 MHz).	107
Figura 105. Mapa de contorno do HMBC da substância RG-14 . (CDCl ₃ – TMS, 500 e 125 MHz).	107
Figura 106. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância RG-14 . (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 331 u (15 eV)).	108
Figura 107. Propostas 1 e 2 para o padrão de substituição do anel A da substância RG-15	110
Figura 108. Proposta de fragmentação para a isoflavana RG-14	111
Figura 109. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-15 . (CDCl ₃ -TMS, 500 MHz).....	111
Figura 110. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância RG-15 . (CDCl ₃ -TMS, 500 MHz).....	112
Figura 111. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância RG-15 . (CDCl ₃ -TMS, 500 MHz).	112

Figura 112. Espectro de RMN de ^{13}C da substância RG-15 . (CDCl_3 -TMS, 125 MHz).	113
Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da substância RG-15 . (CDCl_3 -TMS, 125 MHz).	113
Figura 114. Mapa de contorno do HMQC da substância RG-15 . (CDCl_3 - TMS, 500 e 125 MHz).	114
Figura 115. Mapa de contorno do HMBC da substância RG-15 . (CDCl_3 - TMS, 500 e 125 MHz).....	114
Figura 116. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância RG-15 . (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 301 u (15 eV)).	115
Figura 117. Proposta de fragmentações das isoflavanos isoladas de <i>R. graciliflora</i> por ESI-MS.	116
Figura 118. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-16 . (DMSO-d_6 – TMS; 500 MHz).	120
Figura 119. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-17 . (DMSO-d_6 – TMS, 500 MHz).	120
Figura 120. Espectro de RMN de ^1H da mistura das substâncias RG-16 e RG-17 . (DMSO-d_6 – TMS, 500 MHz).	121
Figura 121. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura das substâncias RG-16 e RG-17 . (DMSO-d_6 – TMS, 125 MHz).	121
Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da mistura das substâncias RG-16 e RG-17 . (DMSO-d_6 – TMS, 125 MHz).....	122
Figura 123. Mapa de contorno do HMQC da mistura das substâncias RG-16 e RG-17 . (DMSO-d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).....	122
Figura 124. Expansão I do mapa de contorno do HMBC da mistura das substâncias RG-16 e RG-17 . (DMSO-d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).	123
Figura 125. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-18 . (DMSO-d_6 – TMS; 500 MHz).	126
Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C da substância RG-18 . (DMSO-d_6 – TMS; 125 MHz).	126
Figura 127. Mapa de contorno do HMQC da substância RG-18 . (DMSO-d_6 – TMS; 500 e 125 MHz.	127
Figura 128. Mapa de contorno do HMBC da substância RG-18 . (DMSO-d_6 – TMS; 500 e 125 MHz.	127
Figura 129. Espectro de RMN de ^1H da substância RG-19 . (DMSO-d_6 – TMS; 500 MHz.....	129
Figura 130. Mapa de contorno do HMQC da substância RG-19 . (DMSO-d_6 – TMS; 500 e 125 MHz.....	130
Figura 131. Mapa de contorno do HMBC da substância RG-19 . (DMSO-d_6 – TMS; 500 e 125 MHz).....	130
Figura 132. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica dos frutos de <i>I. truxillensis</i> (<u>Condições de análise CG 1</u> , página 26).....	133
Figura 133. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (270 nm) da fração ItF-AcOEt – 20-28, obtido utilizando as <u>Condições de análise CLAE 7</u> , página 28. O pico em 8,5 min. refere-se à substância ItF-9 (1 mg), o pico em 11,6 min. refere-se à substância ItF-10 (6,8 mg), o pico em 19,2 min. refere-se à substância ItF-11 (3,7 mg).	134
Figura 134. Espectros de Massas obtidos das frações (a) hidro-alcoólica ácida do caule de <i>I. truxillensis</i> e (b) obtida por CCDP da fração hidro-alcoólica do caule de <i>I. truxillensis</i> , a qual revelou com o reagente de ninidrina.	135
Figura 135. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica das raízes de <i>I. truxillensis</i> <u>Condições de análise CG 1</u> , página 26.	136
Figura 136. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (260 nm) da fração ItR-AcOEt – 25-30, obtido utilizando as <u>Condições de análise CLAE 7</u> , página 28. O pico em 27,0 min. refere-se à substância ItR-11 (1 mg), o pico em 31,6 min. refere-se à substância ItR-12 (4 mg).....	137
Figura 137. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (214 nm) da fração ItC-AcOEt-2, obtido utilizando as <u>Condições de análise CLAE 8</u> , página 29. O pico em 14,9 min. refere-se à substância ItC-1 (7,1 mg).	138
Figura 138. Esquemas das reações de <i>p</i> -nitroanilina diazotada com derivado do ácido 3-nitropropionico (A) e com isatana (B).	138
Figura 139. Espectro de RMN de ^1H da substância ItF-9 . (CD_3OD - TMS; 300 MHz).	140
Figura 140. Espectro de RMN de ^{13}C da substância ItF-9 . (CD_3OD - TMS; 75 MHz).	140
Figura 141. Mapas de contorno do HMQC da substância ItF-9 . (CD_3OD - TMS; 300 e 75 MHz).....	141
Figura 142. Mapas de contorno do HMBC da substância ItF-9 . (CD_3OD - TMS; 300 e 75 MHz).	141
Figura 143. Espectro de RMN de ^1H da substância ItF-10 . (CD_3OD - TMS; 300 MHz).	143
Figura 144. Espectro de RMN de ^{13}C da substância ItF-10 . (CD_3OD - TMS; 75 MHz).	143
Figura 145. Mapas de contorno do HMQC da substância ItF-10 . (CD_3OD - TMS; 300 e 75 MHz).....	144
Figura 146. Mapas de contorno do HMBC da substância ItF-10 . (CD_3OD - TMS; 300 e 75 MHz).	144
Figura 147. Espectro de RMN de ^1H da substância ItF-11 . (CD_3OD - TMS; 300 MHz).	146
Figura 148. Espectro de RMN de ^{13}C da substância ItF-11 . (CD_3OD - TMS; 75 MHz).	146
Figura 149. Mapas de contorno do HMQC da substância ItF-11 . (CD_3OD - TMS; 300 e 75 MHz).....	147
Figura 150. Mapas de contorno do HMBC da substância ItF-11 . (CD_3OD - TMS; 300 e 75 MHz).	147
Figura 151. Espectro de RMN de ^1H da substância ItR-11 . (CD_3OD - TMS; 300 MHz).....	149
Figura 152. Mapas de contorno do HMBC da substância ItR-11 . (CD_3OD - TMS; 300 e 75 MHz).....	150
Figura 153. Espectro de RMN de ^1H da substância ItR-12 . (CD_3OD - TMS; 500 MHz).....	152

Figura 154. Mapas de contorno do HMQC da substância ItR-12 . (CD ₃ OD - TMS; 500 e 125 MHz).	153
Figura 155. Mapas de contorno do HMBC da substância ItR-12 . (CD ₃ OD - TMS; 500 e 125 MHz).....	153
Figura 156. Espectro de RMN de ¹ H da substância ItC-1 . (CD ₃ OD - TMS; 500 MHz).....	155
Figura 157. Espectro de RMN de ¹³ C da substância ItC-1 . (CD ₃ OD - TMS; 125 MHz).....	156
Figura 158. Mapas de contorno do HMQC da substância ItC-1 . (CD ₃ OD - TMS; 500 e 125 MHz).	156
Figura 159. Mapas de contorno do HMBC da substância ItC-1 . (CD ₃ OD - TMS; 500 e 125 MHz).....	157
Figura 160. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo positivo, da substância ItC-1 . .	157
Figura 161. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de <i>S. splendida</i> – (<u>Condições de análise CG 1</u> , página 26).	160
Figura 162. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração SS HA-MeOH 13-16, obtido utilizando <u>Condições de análise CLAE 9</u> , página 29. O pico com t _R = 34,7 min. refere-se à substância SS-16	161
Figura 163. Espectro de RMN de ¹ H da substância SS-13 (DMSO-d ₆ -TMS, 300 MHz).....	164
Figura 164. Expansão do Espectro de RMN de ¹ H da substância SS-13 (DMSO-d ₆ -TMS, 300 MHz).	164
Figura 165. Espectro de Massas da substância SS-13 – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo. 164	
Figura 166. Espectro de RMN de ¹ H da substância SS-14 (DMSO-d ₆ -TMS, 300 MHz).....	165
Figura 167. Expansão do Espectro de RMN de ¹ H da substância SS-14 (DMSO-d ₆ -TMS, 300 MHz).	165
Figura 169. Espectro de RMN de ¹ H da substância SS-15 (DMSO-d ₆ -TMS, 300 MHz).	166
Figura 168. Espectro de Massas da substância SS-14 – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo. 166	
Figura 170. Expansão do Espectro de RMN de ¹ H da substância SS-15 (DMSO-d ₆ -TMS, 300 MHz).	167
Figura 171. Espectro de Massas da substância SS-15 – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo. 167	
Figura 172. Espectro de RMN de ¹ H da substância SS-16 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz).	170
Figura 173. Mapa de contorno do HMQC da substância SS-16 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 e 125 MHz).	170
Figura 174. Mapa de contorno do HMBC da substância SS-16 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 e 125 MHz).	171
Figura 175. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de <i>S. pendula</i> (<u>Condições de análise CG 1</u> , página 26).	172
Figura 176. Cromatograma obtido em CLAE-UV (297 nm) da fração SP-DCM 3438 (<u>Condições de análise CLAE 10</u> , página 29). O pico com t _R = 84,17 min. refere-se à substância SP-16 , o pico com t _R = 45,99 min. refere-se à substância SP-17 , o pico com t _R = 52,0 min. refere-se à substância SP-18 , e pico com t _R = 52,76 min. refere-se à substância SP-19	173
Figura 177. Espectro de RMN de ¹ H da substância SP-16 (CDCl ₃ /CD ₃ OD – TMS, 500 MHz).....	175
Figura 178. Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância SP-16 (CDCl ₃ /CD ₃ OD – TMS, 500 MHz).	175
Figura 179. Espectro de RMN de ¹ H da substância SP-17 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz).....	177
Figura 180. Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância SP-17 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz)..	178
Figura 181. Espectro de RMN de ¹ H da substância SP-18 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz).....	178
Figura 182. Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância SP-18 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz)..	179
Figura 183. Espectro de RMN de ¹ H da substância SP-19 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz).....	179
Figura 184. Expansão do espectro de RMN de ¹ H da substância SP-19 (DMSO-d ₆ – TMS, 500 MHz)..	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de calisteginas no gênero <i>Ipomoea</i>	10
Tabela 2. Dados das coletas das plantas pertencentes a este estudo.	17
Tabela 3. Massas dos pós dos materiais vegetais e dos extratos etanólicos brutos obtidos por percolação.....	24
Tabela 4. Massas das frações dos extratos etanólicos brutos das plantas obtidas a partir do fracionamento líquido-líquido (gramas).....	24
Tabela 5. Resultados dos ensaios farmacognósticos.....	32
Tabela 6. Número de sobreviventes de <i>Artemia salina</i> em ensaio dos extratos brutos.	33
Tabela 7. Substâncias identificadas na fração hexânica de <i>I. chiliantha</i>	35
Tabela 8. Frações obtidas de CC da fração em DCM de <i>I. chiliantha</i>	38
Tabela 9. Frações obtidas de CC da fração em AcOEt de <i>I. chiliantha</i>	39
Tabela 10. Comparação entre os TRR e os fragmentos obtidos com os valores da literatura*.	44
Tabela 11. Dados de RMN da substância IC-19	46
Tabela 12. Dados de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ -TMS, 500 MHz) da substância IC-20 , comparados com dados obtidos da literatura.....	55
Tabela 13. Dados de RMN de ¹ H (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz) da substância IC-21 , comparados com dados obtidos da literatura.....	60
Tabela 14. Dados de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ -TMS, 500 MHz) da substância IC-22 , comparados com dados obtidos da literatura.....	62
Tabela 15. Dados de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ -TMS, 500 MHz) da substância IC-23 , comparados com dados obtidos da literatura.....	64
Tabela 16. Dados de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆ -TMS, 500 MHz) da substância IC-24 , comparados com dados obtidos da literatura.....	66
Tabela 17. Dados de RMN de ¹ H (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz) da substância IC-25 , comparados com dados obtidos da literatura.....	68
Tabela 18. Dados de RMN de ¹ H (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz) da substância IC-26 , comparados com dados obtidos da literatura.....	70
Tabela 19. Dados de RMN de ¹ H (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz) da substância IC-27 , comparados com dados obtidos da literatura.....	72
Tabela 20. Dados de RMN de ¹ H (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz) da substância IC-28 , comparados com dados obtidos da literatura.....	74
Tabela 21. Dados de RMN de ¹ H (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz) da substância IC-29 , comparados com dados obtidos da literatura.....	76
Tabela 22. Dados de RMN de ¹ H (CD ₃ OD-TMS, 500 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância IC-30 , comparados com dados obtidos da literatura.....	78
Tabela 23. Substâncias identificadas na fração hexânica de <i>R. graciliflora</i>	84
Tabela 24. Frações obtidas de CC da fração em DCM de <i>R. graciliflora</i>	85
Tabela 25. Frações obtidas de CC da fração em AcOEt de <i>R. graciliflora</i>	87
Tabela 26. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO-d ₆ -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-12 , comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura*.....	88
Tabela 27. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO-d ₆ -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-13 , comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura*.....	96
Tabela 28. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-14 , comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura*.....	102
Tabela 29. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃ -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-15 , comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura**.....	109
Tabela 30. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO-d ₆ -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-16 , comparados com dados obtidos da literatura. ..	117
Tabela 31. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO-d ₆ -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-17 , comparados com dados obtidos da literatura. ..	119
Tabela 32. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (DMSO-d ₆ -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-18 , comparados com dados obtidos da literatura. ..	124

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância RG-19 , comparados com dados obtidos da literatura. ..	128
Tabela 34. Substâncias identificadas na fração hexânica dos frutos de <i>I. truxillensis</i>	133
Tabela 35. Frações reunidas da fração AcOEt dos frutos de <i>Indigofera truxillensis</i>	133
Tabela 36. Substâncias identificadas na fração hexânica das raízes de <i>I. truxillensis</i>	136
Tabela 37. Frações reunidas da fração AcOEt das raízes de <i>Indigofera truxillensis</i>	136
Tabela 38. Frações obtidas do fracionamento da fração AcOEt do caule de <i>Indigofera truxillensis</i>	138
Tabela 39. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD $_3$ OD-TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância ItF-9 , comparados com dados obtidos da literatura.	139
Tabela 40. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD $_3$ OD-TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância ItF-10 , comparados com dados obtidos da literatura.	142
Tabela 41. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD $_3$ OD-TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância ItF-11 , comparados com dados obtidos da literatura.	145
Tabela 42. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD $_3$ OD-TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância ItR-11 , comparados com dados obtidos da literatura.....	148
Tabela 43. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD $_3$ OD-TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância ItR-12 , comparados com dados obtidos da literatura.....	151
Tabela 44. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD $_3$ OD-TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância ItC-1 , comparados com dados obtidos da literatura.....	154
Tabela 45. Substâncias identificadas na fração hexânica de <i>S. splendida</i>	159
Tabela 46. Frações obtidas de CC da fração em DCM de <i>S. splendida</i>	160
Tabela 47. Frações obtidas de CC da fração em HA-MeOH de <i>S. splendida</i>	161
Tabela 48. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 300 MHz) das substâncias SS-13 , SS-14 e SS-15 , comparados com dados obtidos da literatura.	163
Tabela 49. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância SS-16 , comparados com dados obtidos da literatura.	169
Tabela 50. Substâncias identificadas na fração hexânica de <i>S. pendula</i>	172
Tabela 51. Frações obtidas de CC da fração DCM de <i>S. pendula</i>	173
Tabela 52. Dados de RMN de ^1H (CDCl $_3$ /CD $_3$ OD-TMS, 500 MHz) da substância SP-16 , comparados com dados obtidos da literatura.	174
Tabela 53. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz) das substâncias SP-17 , SP-18 e SP-19 , comparados com dados obtidos da literatura.	177
Tabela 56. Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos etanólicos brutos das plantas frente às linhagens de células tumorais humanas MDAMB-435, HCT-8 e SF-295	182
Tabela 57. Percentual de inibição do crescimento celular das frações provenientes das partições dos extratos etanólicos brutos das plantas frente às linhagens de células tumorais humanas MDAMB-435, HCT-8 e SF-295	183
Tabela 58. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos.....	185
Tabela 59. Atividade antimicrobiana das frações provenientes das partições dos extratos brutos.	186
Tabela 60. Valores de IC $_{50}$ obtidos para as substâncias estudadas.....	189
Tabela 61. Porcentagem da viabilidade celular (% VC) nas concentrações do IC $_{50}$ e de 400 μM	190
Tabela 62. Porcentagem de inibição da mobilização de Ca $^{2+}$ na concentração do IC $_{50}$	191
Tabela 63. Atividade tripanocida dos extratos etanólicos brutos das plantas deste estudo.....	192
Tabela 64. Atividade tripanocida de frações provenientes dos extratos etanólicos brutos de algumas plantas deste estudo.	192

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AcOEt: Acetato de etila
 ATCC: “American type cultured collection”
 CC: Cromatografia em Coluna
 CCDC: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
 CCDP: Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
 CG-EM: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas
 CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
 CLAE-UV-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta,
 CM: *Crotalaria micans*
 DCM: Diclorometano
 DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado
 ESI-MS: “Electrospray Ionization – Mass Spectrometry”
 FM: Fase Móvel
 HMBC: Heteronuclar Multiple Bond Coherence”
 HMQC: “Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
 IC: *Ipomoea chiliantha*
 ICAcOEt: Fração em acetato de etila de *Ipomoea chiliantha* ICHX: Fração hexânica de *Ipomoea chiliantha*
 ICDCM: Fração diclorometânica de *Ipomoea chiliantha*
 ICH₂O: Fração aquosa de *Ipomoea chiliantha*
 ICMeOH: Fração metanólica de *Ipomoea chiliantha*
 IK: Índice de Kovats
 IT: *Indigofera truxillensis*
 ItF: frutos de *Indigofera truxillensis*
 ItR: raízes de *Indigofera truxillensis*
 ItC: caule de *Indigofera truxillensis*
 ITAcOEtFruto: Fração em acetato de etila dos frutos de *Indigofera truxillensis*
 ITAcOEtRaiz: Fração em acetato de etila das raízes de *Indigofera truxillensis*
 ITDCMFruto: Fração diclorometânica dos frutos de *Indigofera truxillensis*
 ITDCMRaiz: Fração diclorometânica das raízes de *Indigofera truxillensis*
 ITHAfruto: Fração hidro-alcoólica dos frutos de *Indigofera truxillensis*
 ITHARaiz: Fração hidro-alcoólica das raízes de *Indigofera truxillensis*
 ITHXFruto: Fração hexânica dos frutos de *Indigofera truxillensis*
 ITHXRaiz: Fração hexânica das raízes de *Indigofera truxillensis*
 MeOH: Metanol
 MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio bromide
 NP-PEG: Reagente Natural Product – polietilenoglicol
 RG: *Riedeliella graciliflora*
 RGAcOEt: Fração em acetato de etila de *Riedeliella graciliflora*
 RGDcm: Fração diclorometânica de *Riedeliella graciliflora*
 RGHX: Fração hexânica de *Riedeliella graciliflora*
 RGMeOH: Fração metanólica de *Riedeliella graciliflora*
 RMN de ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono-13
 RMN de ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
 SA: *Senna aculeata*
 SP: *Senna pendula*
 SPAcOEt: Fração em acetato de etila de *Senna pendula*

SPDCM: Fração diclorometânica de *Senna pendula*
SPH₂O: Fração aquosa de *Senna pendula*
SPHX: Fração hexânica de *Senna pendula*
SPMeOH: Fração metanólica de *Senna pendula*
SS: *Senna splendida*
SSAcOEt: Fração em acetato de etila de *Senna splendida*
SSDCM: Fração diclorometânica de *Senna splendida*
SSHX: Fração hexânica de *Senna splendida*
SSMeOH: Fração metanólica de *Senna splendida*
SSH₂O: Fração aquosa de *Senna splendida*
TMS: Tetrametilsilano
t_R: Tempo de retenção

SUMÁRIO

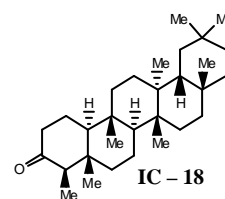
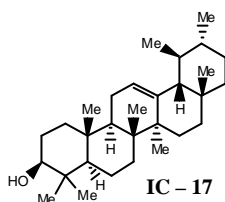
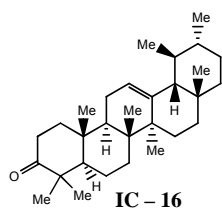
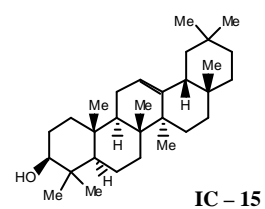
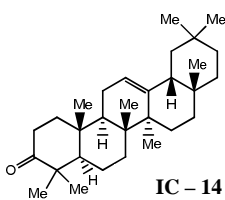
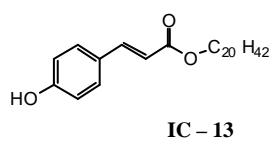
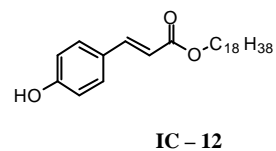
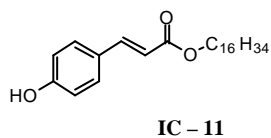
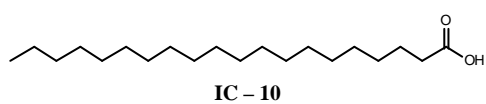
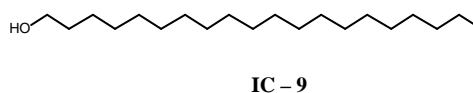
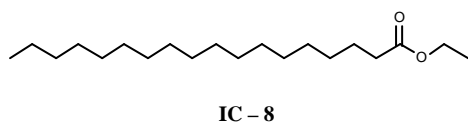
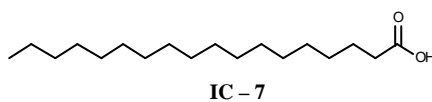
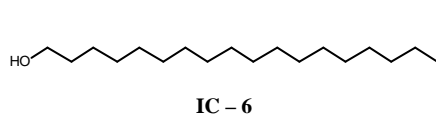
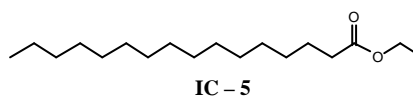
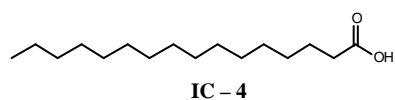
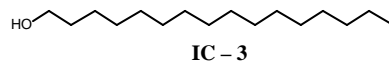
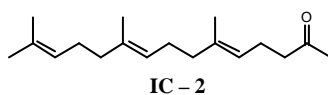
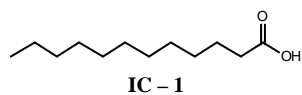
RESUMO	I
ABSTRACT.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XII
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E/OU IDENTIFICADAS DAS ESPÉCIES VEGETAIS ESTUDADAS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. GÊNERO <i>Ipomoea</i>	8
1.2. GÊNERO <i>Riedeliella</i>	11
1.3. GÊNERO <i>Indigofera</i>	12
1.4. GÊNERO <i>Senna</i>	13
1.5. GÊNERO <i>Crotalaria</i>	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. OBTENÇÃO DOS MATERIAIS VEGETAIS	17
3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	18
3.3. METODOLOGIA	20
3.3.1. <i>Ensaio farmacognósticos</i>	20
3.3.2. <i>Ensaio de citotoxicidade: Artemia salina</i>	22
3.3.3. <i>Extrações</i>	23
3.3.4. <i>Análises cromatográficas</i>	26
3.3.5. <i>Avaliação da presença do aminoácido não proteico Indospicina</i>	29
3.3.6. <i>Avaliação da presença de nitrocompostos alifáticos</i>	30
3.3.7. <i>Avaliação da presença de alcaloides poli-hidroxiados em Ipomoea chiliantha</i>	30

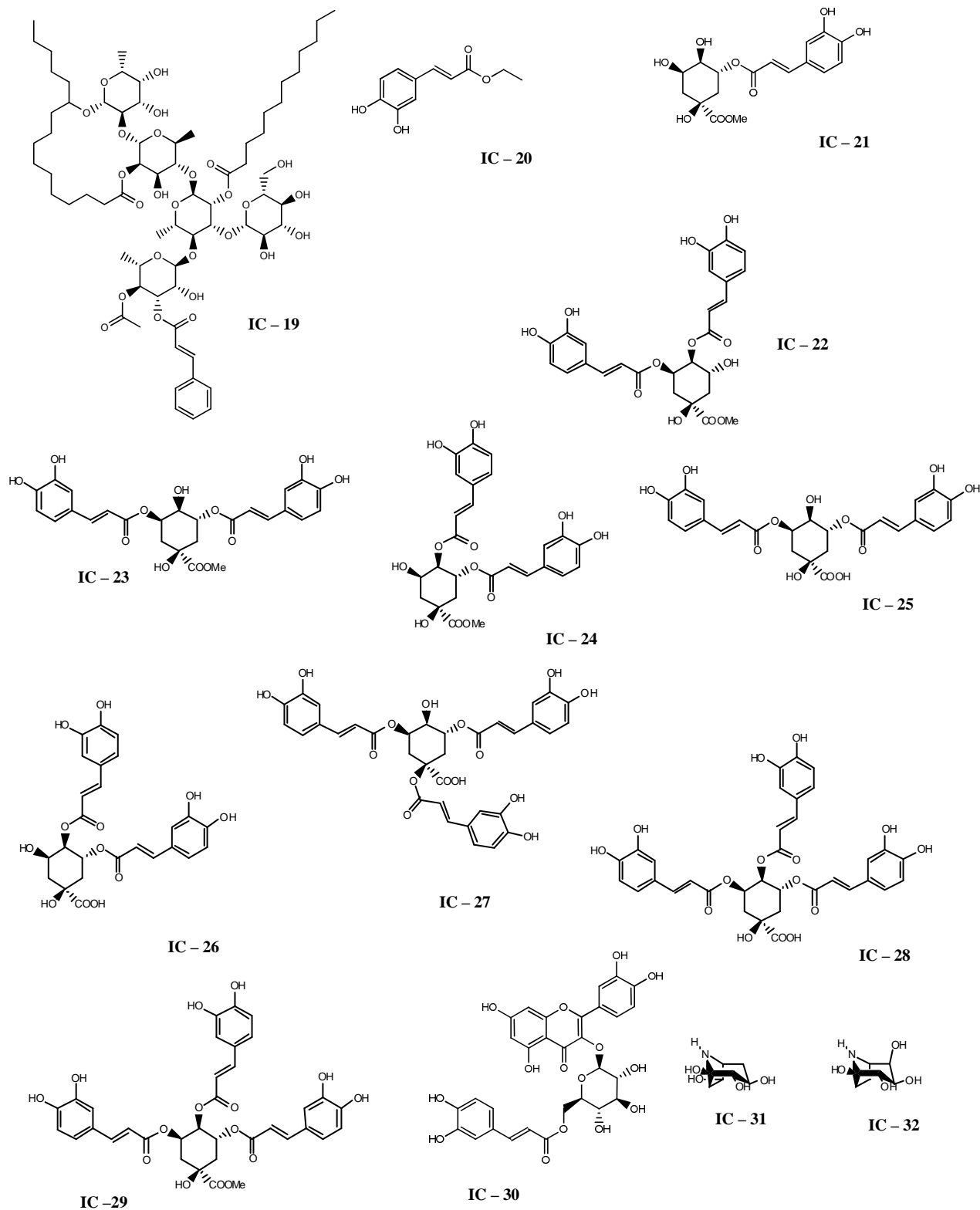
3.3.8.	<i>Avaliações das atividades biológicas</i>	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1.	ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS	32
4.2.	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – <i>Artemia salina</i>	33
4.3.	ESTUDO QUÍMICO DE <i>Ipomoea chiliantha</i>	34
4.3.1.	<i>Fração Hexânica</i>	34
4.3.2.	<i>Fração DCM</i>	37
4.3.3.	<i>Fração AcOEt</i>	39
4.3.4.	<i>Frações HA-MeOH e HA-H₂O</i>	43
4.3.5.	<i>Elucidação estrutural das substâncias isoladas de I. chiliantha</i>	45
4.3.6.	<i>Considerações sobre o estudo químico de I. chiliantha</i>	82
4.4.	ESTUDO QUÍMICO DE <i>Riedeliella graciliflora</i>	84
4.4.1.	<i>Fração hexânica</i>	84
4.4.2.	<i>Fração DCM</i>	85
4.4.3.	<i>Fração AcOEt</i>	86
4.4.4.	<i>Elucidação estrutural das substâncias isoladas de R. graciliflora</i>	88
4.4.5.	<i>Considerações sobre o estudo químico de R. graciliflora</i>	131
4.5.	ESTUDO QUÍMICO DE <i>Indigofera truxillensis</i>	132
4.5.1.	<i>Frutos – Fração hexânica</i>	132
4.5.2.	<i>Frutos – Fração AcOEt</i>	133
4.5.3.	<i>Fração hidro-alcoólica</i>	134
4.5.4.	<i>Raízes – Fração hexânica</i>	135
4.5.5.	<i>Raízes – Fração AcOEt</i>	136
4.5.6.	<i>Caule</i>	137
4.5.7.	<i>Elucidação estrutural das substâncias isoladas de I. truxillensis</i>	139
4.5.8.	<i>Considerações sobre o estudo químico de Indigofera truxillensis</i>	158
4.6.	GÊNERO <i>Senna</i>	159
4.6.1.	<i>Estudo químico de Senna splendida</i>	159
4.6.1.1.	<i>Fração hexânica</i>	159
4.6.1.2.	<i>Fração DCM</i>	160
4.6.1.3.	<i>Fração HA-MeOH</i>	161
4.6.1.4.	<i>Elucidação estrutural das substâncias isoladas de S. splendida</i>	162
4.6.2.	<i>Estudo químico de Senna pendula</i>	172

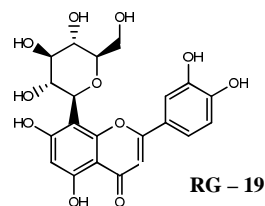
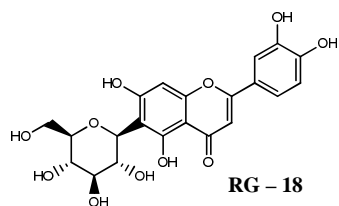
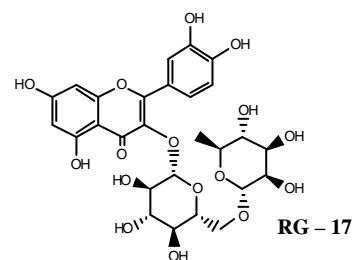
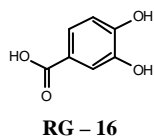
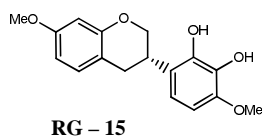
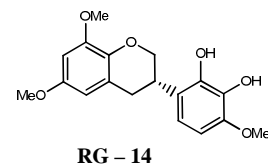
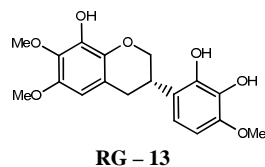
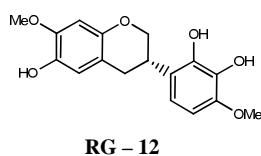
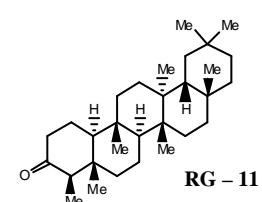
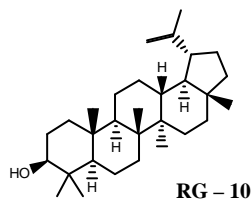
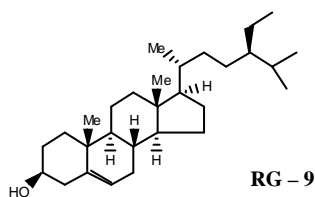
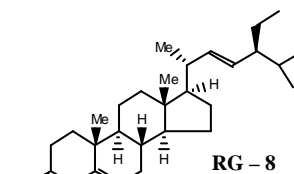
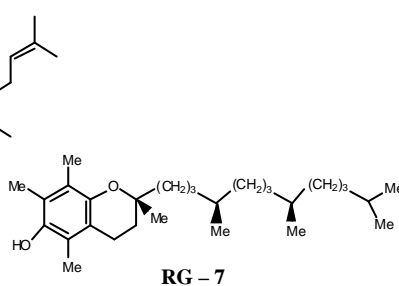
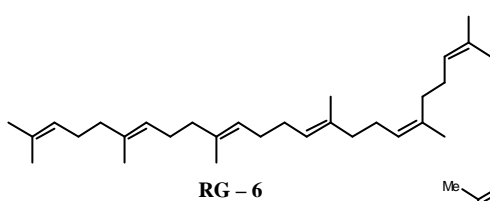
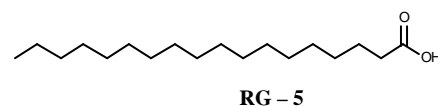
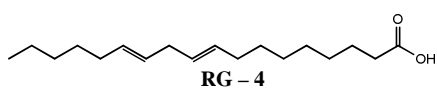
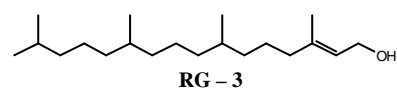
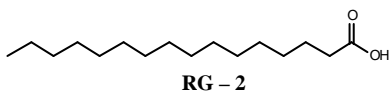
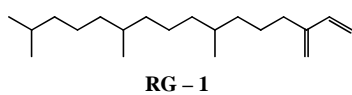
4.6.2.1. Fração hexânica	172
4.6.2.2. Fração DCM	173
4.6.2.3. Elucidação estrutural das substâncias isoladas de <i>S. pendula</i>	174
4.6.3. Considerações sobre o estudo químico do gênero <i>Senna</i>	181
5. AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	182
5.1. Avaliações das atividades citotóxicas frente às linhagens de células tumorais HCT-8, SF-295 e MDAMB-435 dos extratos e frações	182
5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações	184
5.3. Avaliação da atividade anti-alérgica dos derivados fenilpropanoides isolados de <i>I. chiliantha</i>	189
5.4. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos e frações	192
6. CONCLUSÕES	193
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	195
APÊNDICES	207
<i>APÊNDICE 1. Avaliações das atividades citotóxicas frente às linhagens de células tumorais HCT-8, SF-295 e MDAMB-435 dos extratos e frações</i>	<i>207</i>
<i>APÊNDICE 2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações</i>	<i>208</i>
<i>APÊNDICE 3. Avaliação da atividade anti-alérgica dos derivados fenilpropanoides isolados de <i>I. chiliantha</i></i>	<i>211</i>
<i>APÊNDICE 4 – Avaliação da atividade tripanocida dos extratos e frações</i>	<i>215</i>

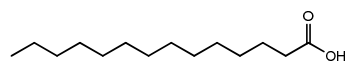
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E/OU IDENTIFICADAS DAS ESPÉCIES VEGETAIS ESTUDADAS

Substâncias identificadas de *I. chiliantha*

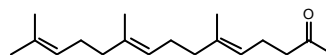


Substâncias isoladas de *I. chiliantha*

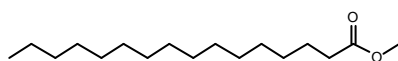
Substâncias isoladas e/ou identificadas de *R. graciliflora*

Substâncias isoladas e/ou identificadas de *I. truxillensis* (FRUTO)

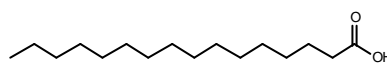
ItF - 1



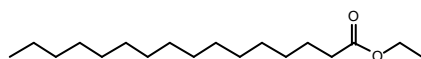
ItF - 2



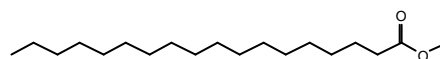
ItF - 3



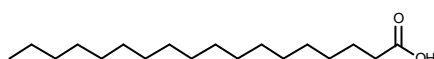
ItF - 4



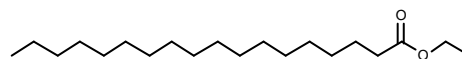
ItF - 5



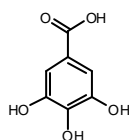
ItF - 6



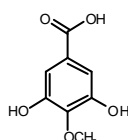
ItF - 7



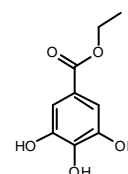
ItF - 8



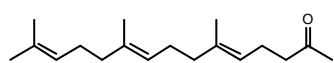
ItF - 9



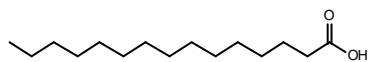
ItF - 10



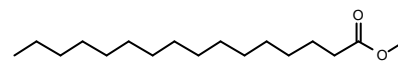
ItF - 11

Substâncias isoladas e/ou identificadas de *I. truxillensis* (RAIZ)

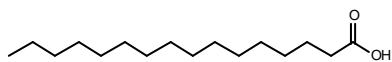
ItR - 1



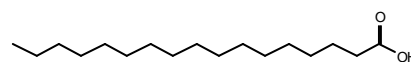
ItR - 2



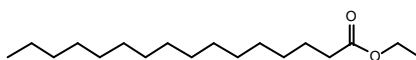
ItR - 3



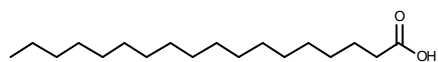
ItR - 4



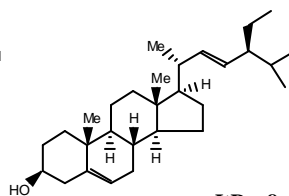
ItR - 6



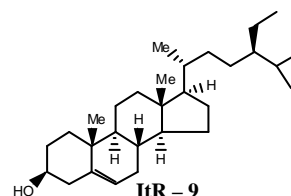
ItR - 5



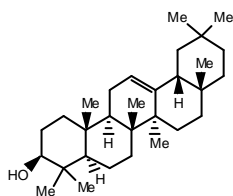
ItR - 7



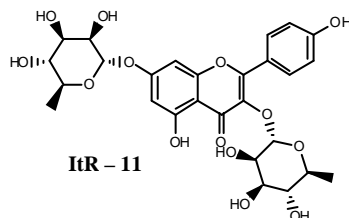
ItR - 8



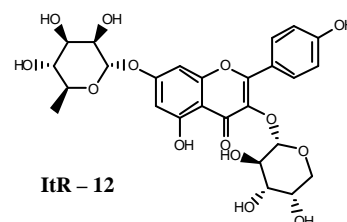
ItR - 9



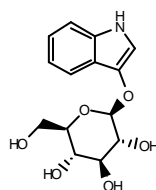
ItR - 10



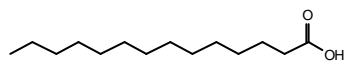
ItR - 11



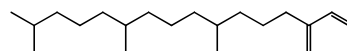
ItR - 12

Substância isolada de *I. truxillensis* (CAULE)

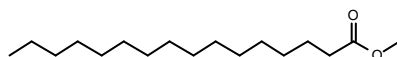
ItC - 1

Substâncias isoladas e/ou identificadas de *Senna splendida*

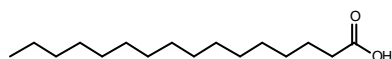
SS-1



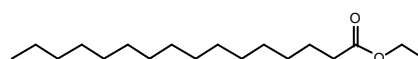
SS-2



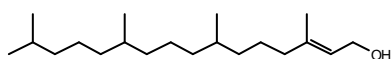
SS-3



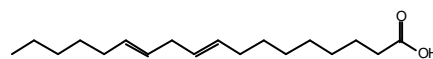
SS-4



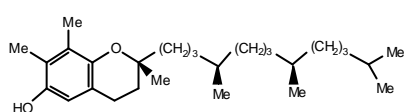
SS-5



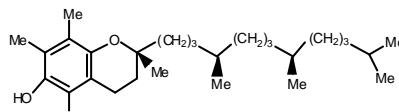
SS-6



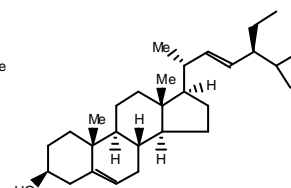
SS-7



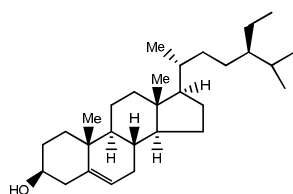
SS-8



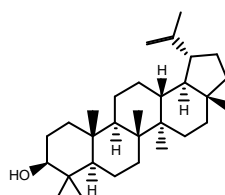
SS-9



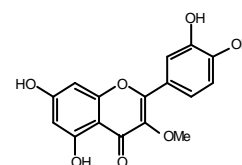
SS-10



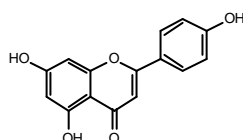
SS-11



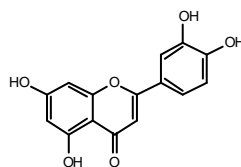
SS-12



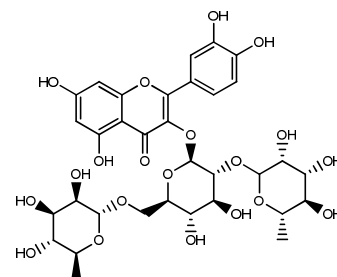
SS-13



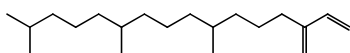
SS-14



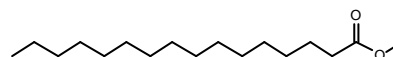
SS-15



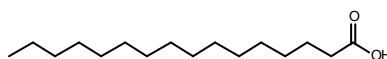
SS-16

Substâncias isoladas e/ou identificadas de *Senna pendula*

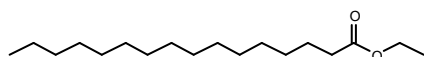
SP-1



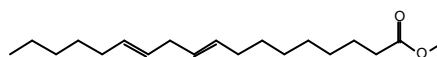
SP-2



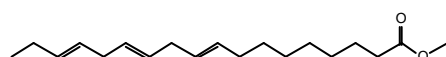
SP-3



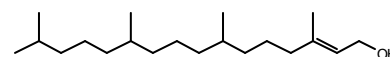
SP-4



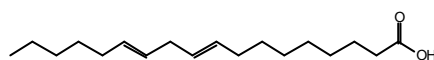
SP-5



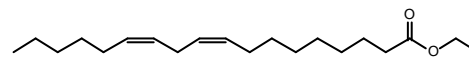
SP-6



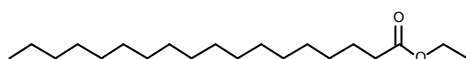
SP-7



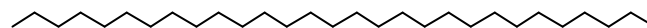
SP-8



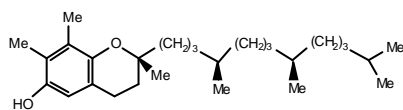
SP-9



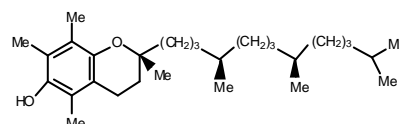
SP-10



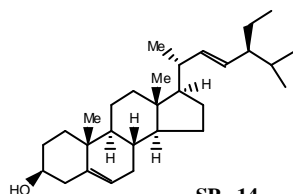
SP-11



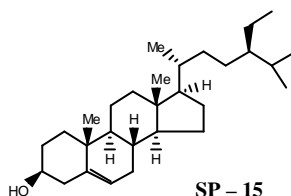
SP-12



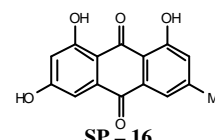
SP-13



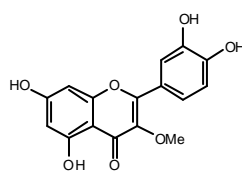
SP-14



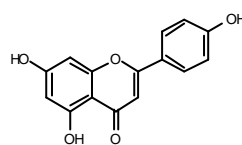
SP-15



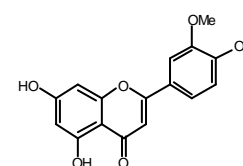
SP-16



SP-17



SP-18



SP-19

1. INTRODUÇÃO

Segundo Paracelsus (1493-1541), considerado o pai da toxicologia atual, “todas as substâncias são tóxicas; não há nenhuma que não seja. A dose correta diferencia um veneno de um remédio” (LANGMAN, KAPUR, 2006).

Durante o curso da evolução, muitas espécies de plantas têm sobrevivido através de suas capacidades de sintetizar e acumular substâncias tóxicas, que as protegem de microrganismos, insetos, herbívoros e até mesmo de outras plantas (PHILIPPE, ANGENOT, 2005).

A história dos venenos data de muitos anos atrás. Antigamente os homens provavelmente observavam os efeitos danosos ou letais causados pela ingestão dessas plantas capazes de produzir toxinas, ou até mesmo produtos tóxicos provenientes de animais, e possivelmente utilizavam os extratos desses materiais para a cura de diversas enfermidades (LANGMAN, KAPUR, 2006).

Na antiguidade, houve muitos relatos de envenenamentos, utilizando plantas ou metais para execuções. Dentre eles, há notáveis vítimas, como Sócrates (coniina, isolada de cicuta, *Conium maculatum*), Cleópatra (veneno de serpente) e o imperador romano Claudius (aconitina, isolada de *Aconitum* sp) (LANGMAN, KAPUR, 2006) (**Figura 1**).

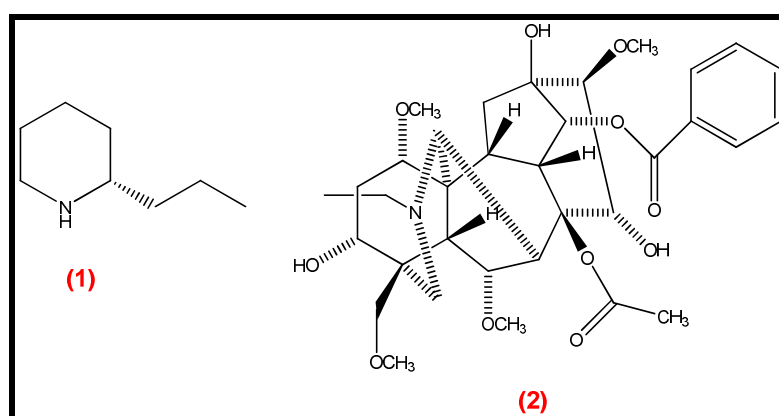


Figura 1. Estruturas dos alcaloides tóxicos coniina (1) e aconitina (2).

O estudo de plantas com potencial tóxico levou a importantes descobertas de fármacos utilizados hoje, porque sua toxicidade geralmente reflete alta atividade biológica, sendo que o segredo de um medicamento potente e seguro é a dose administrada. Os extratos

desses materiais vegetais contêm principalmente alcaloides, diterpenoides ou triterpenoides e esteroides, incluindo os glicosídeos cardiotônicos. (BISSET, 1991; PHILIPPE, ANGENOT, 2005).

Vários são os exemplos de substâncias isoladas de plantas tóxicas, e seus estudos renderam compostos com importantes atividades farmacológicas. Dentre essas se incluem a quinina (antimalárico), isolada de *Cinchona* sp., morfina e codeína (analgésicos), isoladas do látex da papoula, digoxina e digitoxina (cardiotônicos), isoladas das folhas de *Digitalis* sp., atropina e hioscina, isoladas de espécies de Solanaceae, reserpina (anti-hipertensivo), isolada de *Rauwolfia* sp. e o taxol (anticancerígeno), isolado de *Taxus* sp. (PHILLIPSON, 2001; RATES, 2001; MOLYNEUX *et al*, 2007) (**Figura 2**).

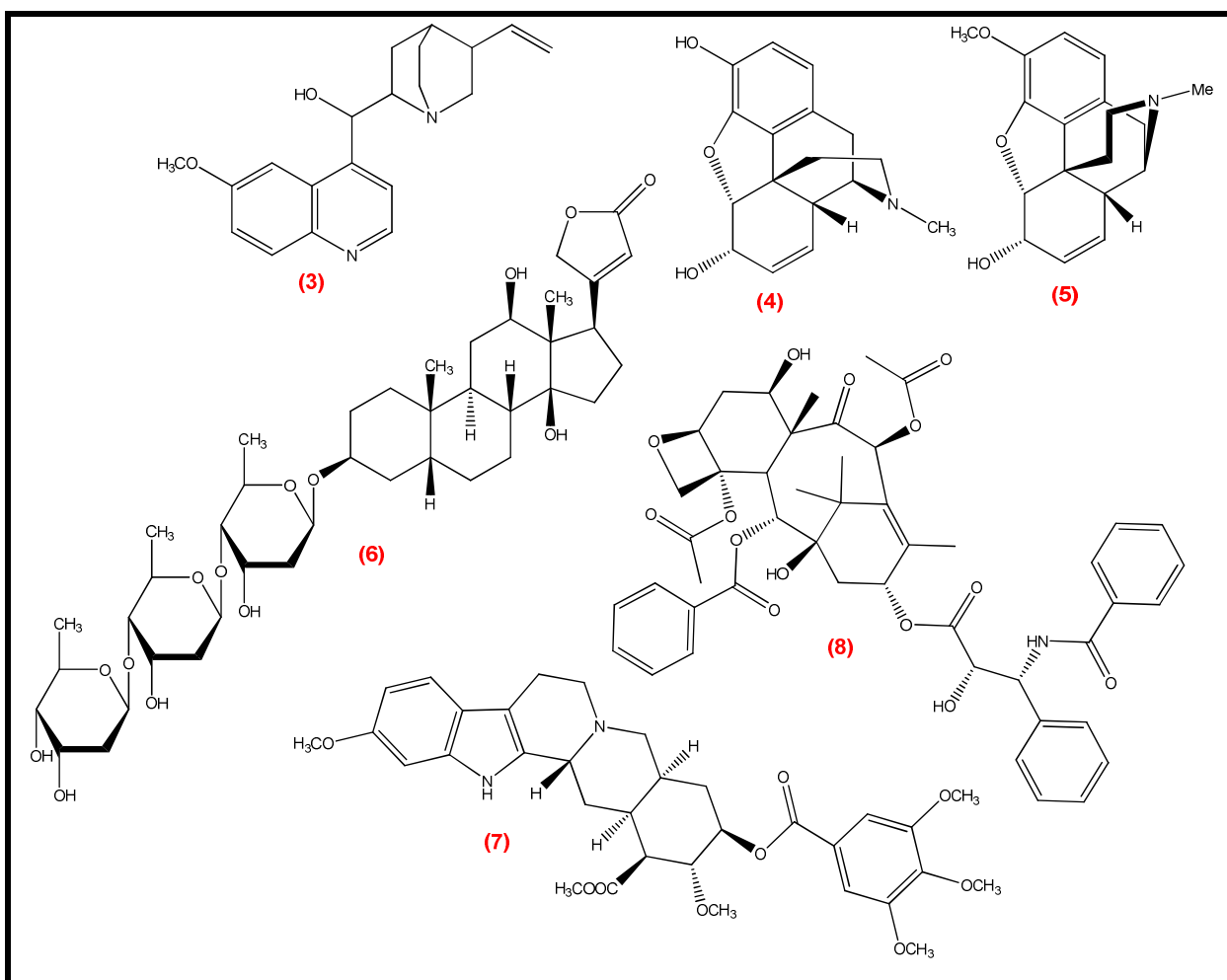


Figura 2. Estruturas dos fármacos provenientes de plantas tóxicas: quinina (3), morfina (4), codeína (5), digoxina (6), reserpina (7) e taxol (8).

É importante ressaltar que diferentes atividades farmacológicas têm sido descritas, nas últimas décadas, àqueles princípios ativos tóxicos. Como exemplo, tem-se atribuído atividade contra *Plasmodium falciparum*, o agente etiológico causador da malária, aos

alcaloides isolados ou até mesmo aos extratos de *Strychnos* sp, dos quais foram obtidos os curares (relaxantes musculares). Também, a fração alcaloídica de *Strychnos nux vomica* apresentou atividade antinociceptiva com potência 1000 vezes maior àquela atribuída à morfina (PHILIPPE, ANGENOT, 2005).

Outro exemplo bastante interessante está relacionado aos glicosídeos cardiotônicos, consagrados por suas efetividades na falência cardíaca. Estudos relativamente recentes têm demonstrado outros campos importantes na terapêutica em que podem atuar, tais como no tratamento da inflamação ou câncer. A digitoxina (*Digitalis* sp), um consagrado glicosídeo cardíaco, é capaz de induzir a apoptose em diferentes linhagens de células malignas, *in vitro*, em concentrações clinicamente relevantes. Juntamente com a digoxina, têm um grande potencial no tratamento do câncer de mama. Também a oubaína (*Strophanthus* sp) demonstrou atividade no tratamento de câncer de próstata não dependente de andrógeno. Vale ressaltar que essa classe de metabólitos representa um atrativo para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle da inflamação (PHILIPPE, ANGENOT, 2005).

Muitas substâncias altamente tóxicas, provenientes de produtos naturais, foram utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, hoje amplamente utilizados na clínica (**Figura 3**). Dentre estes fármacos, incluem-se os anticancerígenos etoposido e teniposido, baseados na estrutura da podofilotoxina, isolada de *Podophylum* sp (PHILLIPSON, 2007), o anti-hipertensivo captopril, cuja estrutura foi baseada em um peptídeo do veneno da cobra *Bothrops jararaca* (KOH *et al*, 2006), vários anestésicos, baseados na estrutura da cocaína, isolada de *Erythroxylon coca*, relaxantes musculares baseados na estrutura da *d*-tubocurarina, isolada de *Strychnos toxifera* e *S. guaianensis*, e a pesquisa de uma nova classe de analgésicos altamente potentes, baseados na estrutura da epibatidina, uma lignana isolada do sapo equatoriano *Epipedobates tricolor* (AGUAYO *et al*, 2006). A varfarina, o principal fármaco antitrombótico utilizado atualmente derivou de uma prática veterinária no Canadá por volta de 1920, quando foi notado o desenvolvimento de hemorragia estomacal no gado após ingestão de uma planta com sabor adocicado (*Melilotus officinalis*). Esta contém em seu metabolismo secundário, o dicumarol, uma cumarina dimérica com potencial anticoagulante, a qual foi o protótipo para o desenvolvimento da varfarina. Embora tenha esta importante utilização clínica, a varfarina é conhecida popularmente como veneno para matar ratos, desde 1940 (GILANI, ATTA-UR-RAHMAN, 2005).

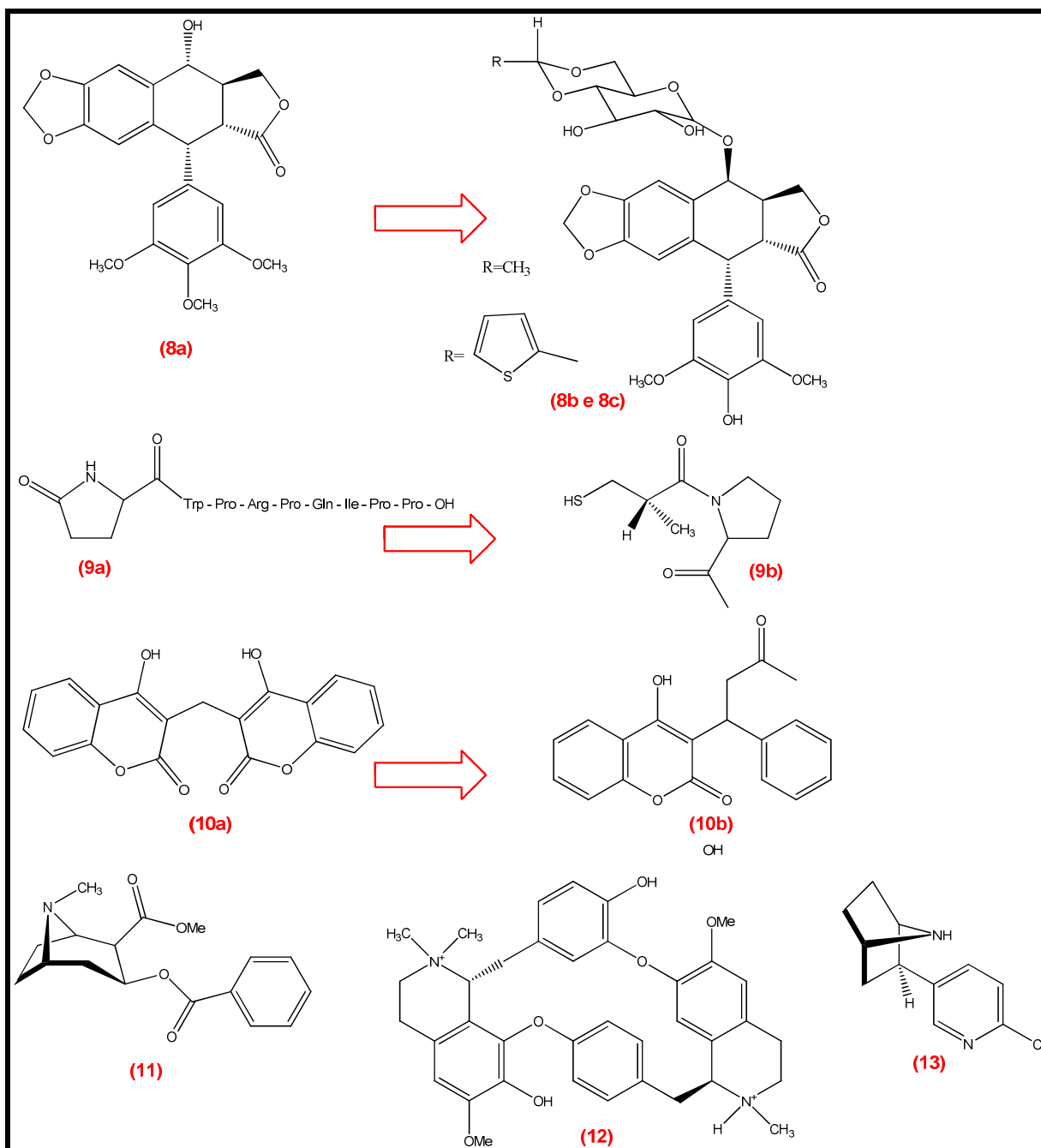


Figura 3. Estruturas de substâncias tóxicas provenientes de fontes naturais, as quais serviram de protótipos para a descoberta de medicamentos. **(8a)** podofilotoxina, **(8b e 8c)** etoposido e teniposido, **(9a)** peptídeo isolado de jararaca, **(9b)** captopril, **(10a)** dicumarol, **(10b)** varfarina, **(11)** cocaína, **(12)** *d*-tubocurarina, **(13)** epibatina.

Portanto, o estudo de plantas tóxicas está intimamente relacionado com a saúde de homens e de animais. Todavia, estão envolvidas também em aspectos econômicos, se for considerado os milhões de animais que morrem a cada ano pela ingestão de plantas tóxicas. Essas e os metabólitos secundários que elas produzem podem causar grande perda econômica na indústria pecuária em todo o mundo. Por exemplo, nos estados do oeste dos Estados

Unidos, foi estimada uma perda de \$340 milhões de dólares anuais devido a intoxicações. Outro aspecto importante é que a maioria dessas plantas são espécies invasoras, e acarretam perdas em outros setores, tais como o agrícola (PANTER *et al*, 2007).

O envenenamento ocasionado pela ingestão de plantas tóxicas, pelo gado, é um sério problema, principalmente no Brasil. Dados estatísticos indicam que aproximadamente um milhão de animais morre por ano, devido à ingestão de plantas tóxicas. Os estados do sul do país perdem aproximadamente 10% do gado por envenenamento (HABERMEHL, 1994). Os mais altos números de mortes ocorrem no norte do Brasil, seguido pela região nordeste e centro-oeste respectivamente, e os menores números nas regiões sul e sudeste (RIET-CORREA, MEDEIROS, 2001; TOKARNIA, DÖBEREINER, PEIXOTO, 2002). Muitas vezes os animais fazem uso dessas plantas devido à escassez de outras pastagens, e embora muitas das plantas não se apresentarem palatáveis, tornam-se única opção para esses animais (PANTER *et al*, 2007).

Além do envenenamento agudo, que causa mortes mais ou menos repentinas, também se deve considerar o envenenamento crônico, sem sinais aparentes, pois pode haver acúmulo de substâncias tóxicas ou seus metabólitos no leite ou carne, futuramente consumidas por humanos. É o que ocorre com o envenenamento pela ingestão de *Eupatorium rugosum*, nos Estados Unidos, causando uma doença conhecida como enfermidade do leite. Além dessa, deve-se considerar as plantas capazes de produzir alcaloides pirrolizidínicos, tais como aquelas pertencentes aos gêneros *Senecio* e *Crotalaria*. O leite do gado intoxicado por *Senecio* sp, tem aparência “aguada” e sabor amargo, e apesar de não haver descrições em humanos de doenças devido ao consumo de leite contendo essas substâncias, seu uso pode representar um risco à saúde humana, devido a possíveis efeitos mutagênicos ou teratogênicos (HABERMEHL, 1994; PANTER, JAMES, 1990; RIET-CORREA, MEDEIROS, 2001).

Dentre os principais constituintes responsáveis pela intoxicação do gado, estão os metabólitos secundários. Porém, também é causa de envenenamento plantas capazes de acumular oxalato de cálcio (*Setaria anceps*, *Brachiaria humidicola*), nitrito/nitrato (*Brachiaria radicans*), causar calcinose, comumente conhecida como “espichamento”, devido à presença de precursores ou substâncias similares à vitamina D₃ (*Solanum malacoxylon*, *Nierembergia veitchii*), além de plantas cianogênicas (*Manihot esculenta*, *Prunus sphaerocarpa*). Outra importante planta tóxica, amplamente distribuída no Brasil, e responsável por muitas mortes de gado, devido a sua cardiotoxicidade, é a *Paulicourea marcgravii*, sendo o ácido monofluoroacético seu principal constituinte tóxico (TOKARNIA, DÖBEREINER, PEIXOTO, 2002).

Pott e Afonso, 2000, realizaram um estudo das plantas tóxicas para o gado, na região de Mato Grosso do Sul, correlacionando as espécies, sinais clínicos de intoxicação e a dose letal. Os resultados estão apresentados no Quadro 1, obtido de seu artigo.

QUADRO 1. Principais plantas tóxicas encontradas em Mato Grosso do Sul (POTT, AFONSO, 2000).

NOME COMUM E ONDE OCORRE	NOME CIENTÍFICO	SINAIS CLÍNICOS DE INTOXICAÇÃO	QUANTIDADE LETAL (kg/100 kg PESO VIVO)
Algodão-bravo (Pantanal, brejos)	<i>Ipomoea carnea subsp. fistulosa</i>	Intoxicação lenta; emagrecimento, lassidão, pêlo áspero; andar desequilibrado , caindo.	9 kg/dia
Barbatimão (Pantanal, Cerrados)	<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Baba, lágrima; rúmen lento; fezes fétidas com sangue e muco; desequilíbrio ; tristeza, cabeça no solo; emagrecimento; cólica, gemidos, ranger de dentes; queda de pêlos, pele solta e necrosada; fotossensibilização ; aborto .	1 (0,5 dá aborto)
Batatarana (Pantanal)	<i>Ipomoea asarifolia</i>	Tremor , balanço da cabeça, desequilíbrio ; apetite bom. Pode haver recuperação.	Desconhecida
Braquiária-d'água ou "Tanner grass"	<i>Brachiaria subquadrifera B. radicans</i>	Urina escuro-avermelhada e freqüente; diarreia, fraqueza, desequilíbrio ; mucosas pálidas. Pode haver recuperação.	Grande, dependendo do solo
Caruru-de-espinho (geral)	<i>Amaranthus spinosus</i>	Diarréia escura fétida, edema no pescoço; emagrecimento; permanece deitado, dificuldade de andar; pode soltar o casco.	Desconhecida
Cipó-prata (Pantanal e serras)	<i>Mascagnia spp.</i>	Morte súbita : mesmo sadia, se correr, a rês cai morta, de ataque do coração.	0,5 a 2
Coerana (baixadas e grotas)	<i>Cestrum laevigatum</i>	Morte em um ou dois dias; tristeza, rúmen pára; fezes secas , às vezes com sangue e muco; tremor, desequilíbrio ; inquietação ; cólica, gemidos, ranger, pedalagem.	1 a 5
Cutóbea (Pantanal e brejos)	<i>Coutobea ramosa</i>	Andar lerdo; cólica, inquietação , rúmen lento; pele fria, aceleração do coração e da respiração; agonia e morte.	2
Espichadeira (Pantanal)	<i>Solanum glaucophyllum</i>	Intoxicação lenta. Calcifica pulmões, veias e tendões (rigidez das pernas); apoio na ponta do casco (" espichado "), dificuldade de andar, emagrecimento, morte por fome. Ataca mais vaca nova.	0,1/dia
Falsa-ciganinha, rideliela (cerrados)	<i>Riedeliella graciliflora</i>	Morte em horas: baba, olhos retraídos, diarréia e descoordenação; queda de lado, com agonia e hemorragia pelos orifícios.	Ainda não foi determinada
Fava-de-anta, faveira	<i>Dimorphandra mollis</i>	Distúrbios intestinais, fezes com muco e sangue ; baba, pêlo arrepiado,	2,5

(Pantanal, cerrados)		timpanismo, cólica; coração fraco, emagrecimento, tremor; deita, geme, até a morte. Favas causam aborto .	
Fedegoso (geral)	<i>Senna occidentalis</i>	Diarréia, fraqueza, tremor e desequilíbrio, arrasta os cascos traseiros; no final, mais diarréia, cai e não se levanta mais.	Folhas: desconhecida Sementes: 1 kg
Guizo, guizo-de-cascavel, xiquexique (geral)	<i>Crotalaria micans e outras espécies</i>	Ataca o fígado; contrações e perturbações digestivas, desequilíbrio ; excitação ou depressão; dificilmente se recupera.	5,5
Laranjinha ou limãozinho (sul e sudeste)	<i>Polygala klotzschii</i>	Morte em um dia; forte desequilíbrio ; batidas da cabeça no solo; respiração difícil; diarréia líquida.	1
Louco (Pantanal, serras)	<i>Plumbago scandens</i>	Morte em horas: baba; boca cinza-escura, urina escuro-avermelhada ; rúmen pára, empacha; cólica, balanço da cabeça, deita/levanta, gemidos; focinho seco e extremidades frias.	1
Mamona, mamoneira (geral)	<i>Ricinus communis</i>	Folhas: desequilíbrio, tremor ; arroto e baba; dificuldade de andar longe e procura deitar. Sementes: fraqueza, tristeza e diarréia de sangue.	Folhas: 2 kg Sementes: 0,2 kg
Maria-mole (sudeste)	<i>Senecio brasiliensis</i>	Ataca o fígado ; sem apetite, rúmen pára, emagrecimento, sangue nas fezes, com ou sem diarréia; acelera coração e respiração; contração, inquietação, andar em círculos .	7,5 a 15 (ou 60 g/dia a 500 g/dia em um a oito meses)
Vernônia (Pantanal)	<i>Vernonia rubricaulis</i>	Morte em 24 horas: ataca o fígado ; focinho seco, tristeza, gemidos, tremor da cabeça, contração e desequilíbrio ; deita com pescoço virado; pedalagem, berros.	2 a 3
Vernônia (campos do sul)	<i>Vernonia molissima</i>	Morte em 24 h: ataca o fígado ; perda de apetite, constipação, tremores, respiração difícil.	1 a 2
Ximbuva, timbaúva, tamboril (geral)	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Morte em horas: tristeza; diarréia amarelada fétida; olhos retraídos; pedalagem. Poucas favas já provocam aborto .	1,4

A seguir estão apresentadas descrições de alguns gêneros, os quais são objetos deste estudo.

1.1. GÊNERO *Ipomoea*

Pertence à família Convolvulaceae, a qual é constituída por aproximadamente 55-60 gêneros e cerca de 1600 a 1700 espécies (STEFANOVIC *et al*, 2003). *Ipomoea* é o gênero mais representativo da família, com aproximadamente 600 espécies (MILLER *et al*, 2004). Em investigações químicas prévias, foram encontrados esteroides, triterpenos, lignanas,



Figura 4. *Ipomoea chiliantha* Hallier (POTT, POTT, 1994).

polifenóis, cumarinas, resinas glicosídicas e alcaloides com esqueletos indólicos, pirrolizidínicos, isoquinolínicos, além dos alcaloides poli-hidroxiados indólicos e *nortropânicos* (EICH, 2008). Várias espécies apresentaram-se tóxicas ao gado, dentre elas: *Ipomoea carnea subsp. fistulosa*; *I. asarifolia*, *I. sericophylla*; *I. riedelii*. Os principais sintomas de intoxicação estão relacionados ao acometimento do sistema nervoso, os quais levam à desordem comportamental e desequilíbrio (BARBOSA *et al*, 2007; MOLYNEUX *et al*, 2007).

Experimentos histopatológicos evidenciaram vacuolização de neurônios do sistema nervoso central e periférico, devido a uma desordem no estoque lisossomal. Estudos demonstram que os alcaloides poli-hidroxiados indolizidínicos e *nortropânicos* encontrados no gênero (**Figura 5**) têm a capacidade de inibir glicosidases, as quais são enzimas lisossomais, sendo assim os principais responsáveis por esta toxicidade (BIASTOFF, DRAGER, 2007).

As calisteginas são alcaloides *nortropânicos*, com 3 a 5 posições hidroxiladas (calisteginas A, B e C, respectivamente, **Figura 5**). Possuem na estrutura um aminocetal, o que as tornam semelhantes a aminoaçúcares. São altamente hidrofílicas, e por isso, o método convencional para o isolamento de alcaloides em que envolve um sistema de extração líquido-líquido entre fase aquosa alcalinizada e fase orgânica, não é funcional para este tipo de substância, pois esses compostos permanecerão na fase aquosa mesmo se o pH é elevado acima de 7. Desta maneira, outra metodologia deve ser empregada para o seu isolamento ou identificação (DRAGER, 2004).

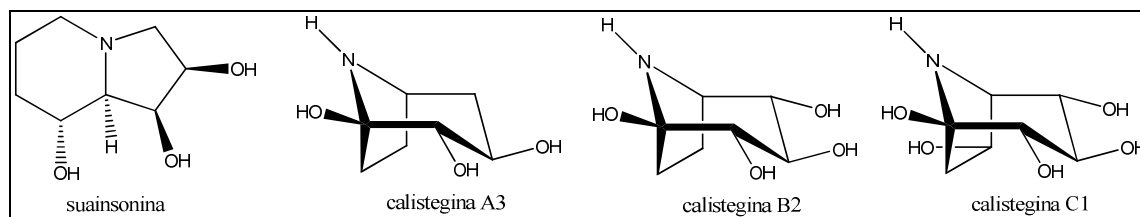


Figura 5. Exemplos de estruturas de alcaloides poli-hidroxilados encontrados em espécies de *Ipomoea*.

Esta classe de substância foi detectada pela primeira vez em 1990, nas raízes de *Calystegia sepium* (Convolvulaceae), e tem sido utilizada como marcador químico desta família. Também foi encontrada na família Solanaceae, a qual pertence a ordem Solanales, mesma ordem de Convolvulaceae, assim como nas famílias Erythroxylaceae, Rhizophoraceae, Brassicaceae e Moraceae (BIASTOFF, DRAGER, 2007). Por serem encontradas nas frações aquosas dos extratos, as quais frequentemente são desprezadas, sua descoberta é relativamente recente, e portanto não se tem ainda uma distribuição bem esclarecida no reino vegetal. Enquanto as calisteginas foram encontradas apenas em dicotiledôneas, suainsonina, outro alcaloide poli-hidroxilado, com esqueleto indolizidínico foi encontrada tanto em plantas como em produto do metabolismo de fungos endofíticos. Assim como as calisteginas, este alcaloide indolizidínico também é um inibidor de glicosidases. Sabe-se que a suainsonina é absorvida pelo intestino do gado, porém, nada se pode afirmar a respeito da absorção das calisteginas. Sabe-se ainda que a suainsonina é mais lipofílica que as calisteginas. Em experimentos *in vitro*, com enzimas isoladas, as calisteginas apresentaram forte inibição de glicosidases, porém sua toxicidade *in vivo* ainda não foi comprovada (DRAGER, 2004; BIASTOFF, DRAGER, 2007).

Os inibidores de glicosidases são utilizados na terapêutica para doenças como diabetes, para doença de Gaucher tipo I, como contraceptivo masculino, assim como possuem atividades promissoras como anti-cancer ou anti-viral. Por isso, essas plantas têm sido importantes no estudo da terapêutica para doenças que envolvem essas enzimas. (MOLYNEUX *et al*, 2007; TOKARNIA, DÖBEREINER, PEIXOTO, 2002).

A **Tabela 1** apresenta uma relação das calisteginas que já foram encontradas em *Ipomoea*.

Tabela 1. Ocorrência de calisteginas no gênero *Ipomoea*.

Espécie	Tipo	Referências
<i>I. alba</i>	A3, A5, B1, B2, B3, C1	3, 8
<i>I. aquatica</i>	A3, B1, B2, B4	3, 8
<i>I. batatas</i>	A3, A5, B1, B2, B3	2, 3, 5, 8
<i>I. cairica</i>	B2	8
<i>I. carnea</i>	A3, B1, B2, B4, C1	4, 5, 6, 7, 8, 9
<i>I. chiriquiensis</i>	B1, B2	8
<i>I. eremnobrocha</i>	B2	3
<i>I. eriocarpa</i>	B2	8
<i>I. hederifolia</i>	A5, B1, B2	3
<i>I. involucrata</i>	B1, B3	8
<i>I. lobata</i>	B1, B2, C1	8
<i>I. obscura</i>	B1, B2, B3, B4, C1	5, 8
<i>I. pes-caprae</i>	B2	5, 8
<i>I. polpha</i>	B2	1
<i>I. setifera</i>	A3, B1, B2	3, 8
<i>I. squamosa</i>	B1, B2	8
<i>I. stolonifera</i>	B2	8
<i>I. SP Q6 (aff calobra)</i>	B2	1
<i>I. tricolor</i>	B2	8
<i>I. trichosperma</i>	A5	8
<i>I. trifida</i>	B1, B2	8
<i>I. violacea</i>	B1, B2, C1	3, 8
<i>I. wightii</i>	B1	8

¹Molyneux *et al*, 1995, ²Asano, 1997, ³Schimming *et al*, 1998, ⁴Balogh, 1999, ⁵Asano *et al*, 2001, ⁶Haraguchi *et al*, 2003, ⁷Schwarz *et al*, 2004, ⁸Schimming *et al* 2005, ⁹Cholich *et al*, 2009.

Outra classe de substâncias encontradas em *Ipomoea* que merece destaque são as resinas glicosídicas. Estes metabólitos foram encontrados, até o momento, apenas na família Convolvulaceae, e foram descobertos devido suas altas atividades farmacológicas. Possuem efeitos catárticos drásticos, o que justifica a utilização terapêutica de muitas espécies de *Ipomoea* para este fim. Foram encontradas em 34 espécies da família, pertencentes a 6 gêneros. Destas, 23 espécies pertencem ao *Ipomoea*. Devido à complexidade estrutural, a primeira substância desta classe foi completamente elucidada apenas em 1987, de *I. orizabensis*. Algumas destas estruturas estão exemplificadas na **Figura 6**. Por possuírem uma porção hidrofílica, composta pelas unidades de açúcar, e uma porção lipofílica, composta por ésteres de ácidos graxos, têm propriedades químicas semelhantes às saponinas, o que justifica suas atividades hemolíticas. Possuem também atividades antimicrobiana, antifúngica, citotóxica contra células tumorais, e anti-serotoninérgica (PEREDA-MIRANDDA, ROSAS-RAMIREZ, CASTANEDA-GÓMEZ, 2010; EICH, 2008). De acordo com alguns pesquisadores, é possível que contribuam para a toxicidade ao gado, tendo em vista que foram letais em experimentos com ratos, utilizando resinas glicosídicas provenientes de *I. lonchophylla*, planta tóxica ao gado (MACLEOD, WARD, 1997).

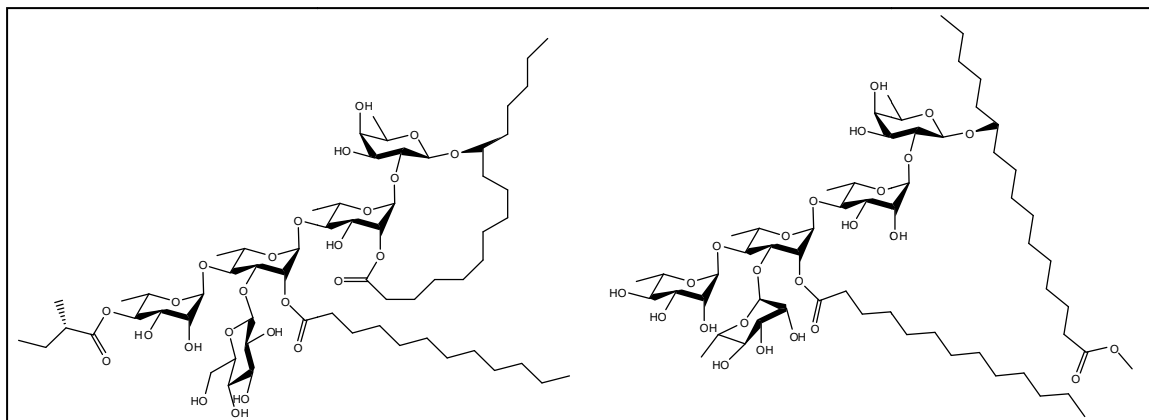


Figura 6. Exemplos de resinas glicosídicas isoladas de *Ipomoea*.

Neste estudo, será avaliada a química de *I. chiliantha* (**Figura 4**, página 8), espécie com ocorrência em terrenos argilosos, e distribuição nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, além dos países Argentina e Paraguai (POTT, POTT, 1994). Esta espécie ainda não foi estudada sobre esta abordagem.

1.2. GÊNERO *Riedeliella*



Figura 7. *Riedeliella graciliflora* Harms (POTT, POTT, 1994).

O gênero *Riedeliella* Harms pertence à família Leguminosae (subfamília Faboideae, tribo Acosmiaea Yakovl.), e apresenta pouco estudo químico. Consiste de 3 espécies, encontradas apenas no sudeste da América do Sul, as quais são *Riedeliella graciliflora*, *R. sessiliflora* e *R. magalhaesii* (LIMA, VAZ, 1984).

R. graciliflora (**Figura 7**), conhecida como falsa-ciganinha ou riedélia, é tóxica a ruminantes, levando-os à morte em horas após sua ingestão (POTT, POTT, SOUZA, 2006). Pouco se conhece a respeito de seu metabolismo secundário, sendo até o momento identificadas as substâncias procianidina B₃, rutina, fitol, ficaprenol-12 e β -sitosterol (HARAGUCHI *et al*, 1992; ZANELLA *et al*, 2007), sendo objeto deste estudo químico.

1.3. GÊNERO *Indigofera*

O gênero *Indigofera* (Leguminosae, Papilionaceae, Indigofereae) consiste de aproximadamente 700 espécies de origem tropical e subtropical, representado por plantas arbustivas e herbáceas (BARROS, TEIXEIRA, 2008). A literatura apresenta dados a respeito da toxicidade de algumas espécies deste gênero, tais como *I. suffruticosa*, *I. linnaei* e *I. truxillensis*. Dentre os sintomas apresentados pelo animal que ingeriu plantas do gênero, estão anorexia, fezes pastosas, aumento do volume abdominal, taquicardia e anemia hemolítica (TOKARNIA, DÖBEREINER, PEIXOTO, 2000; BARBOSA *et al*, 2007). Embora os constituintes químicos responsáveis por esta toxicidade ainda não tenham sido confirmados, há relatos de tratar-se de nitrocompostos alifáticos, os quais são derivados do ácido 3-nitropropiónico, encontrados principalmente nas raízes, considerados tóxicos por inibir irreversivelmente a succinato desidrogenase, uma enzima da cadeia respiratória (ALSTON *et al*, 1977), e à indospicina, um aminoácido hepatotóxico não proteico encontrado nas sementes (HEGARTY, POUND, 1968; MILLER, SMITH, 1973) (**Figura 9**). Salvador e colaboradores, 2011, mencionam a possibilidade de o constituinte tóxico de *I. suffruticosa* ser a anilina, produto de degradação do índigo, alcaloide já isolado desta espécie. A anilina é capaz de ocasionar anemia hemolítica em humanos e cachorros.

Dentre as classes químicas já isoladas no gênero, estão os flavonoides, dentre eles os isoflavonoides, chalconas, flavonóis, flavanonas, flavonas. Também foram identificados pterocarpanos, rotenoides, diidroestilbenos, nitrocompostos alifáticos, e alcaloides do índigo (MUSA *et al*, 2008; SU *et al*, 2005).

Quanto à espécie incluída neste estudo, *I. truxillensis* (**Figura 8**), apresenta toxicidade a ruminantes, porém o constituinte responsável por esta atividade ainda não foi identificado.

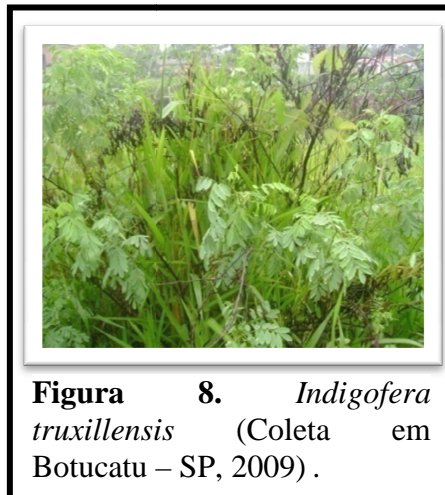


Figura 8. *Indigofera truxillensis* (Coleta em Botucatu – SP, 2009).

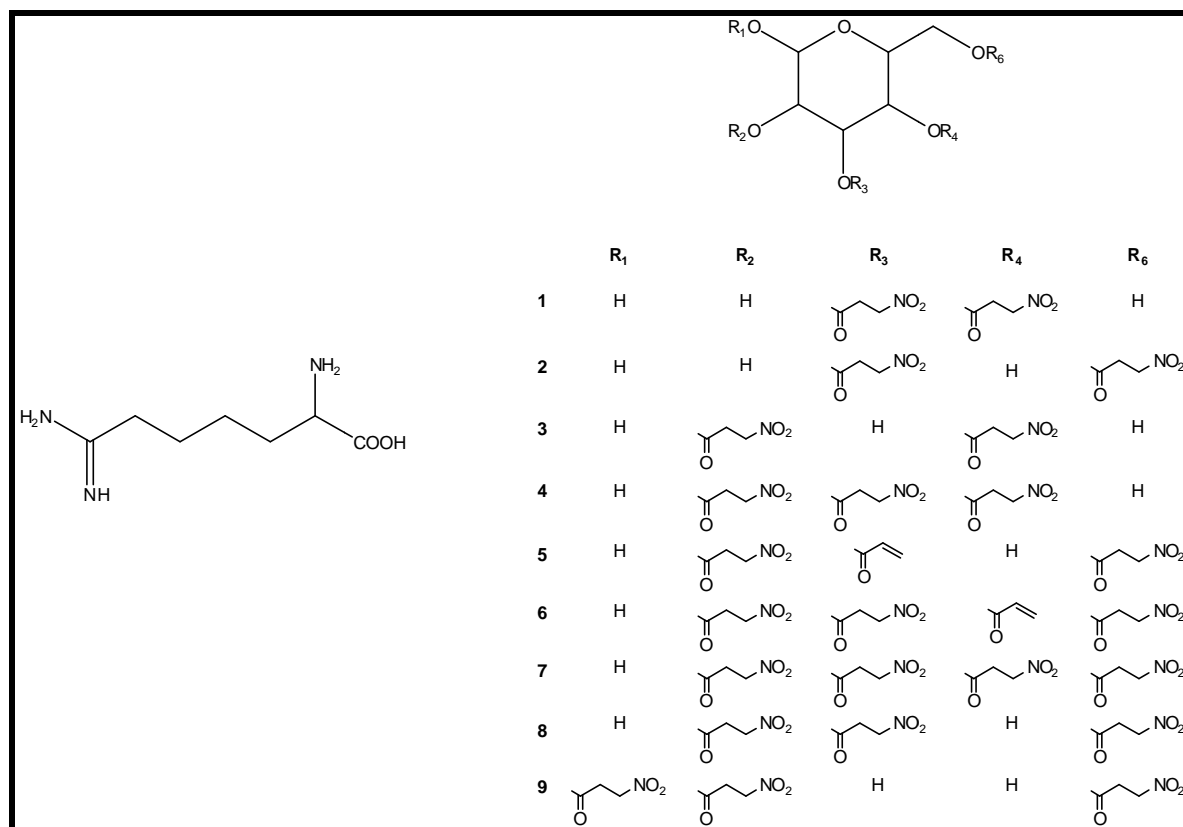


Figura 9. Estruturas da indospicina e derivados do ácido 3-nitropropiónico encontrados no gênero *Indigofera*.

1.4. GÊNERO *Senna*



Figura 10. *Senna aculeata* (POTT, POTT, 1994).

O gênero *Cassia*, pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinaceae, foi recentemente revisado, tendo sido realizadas transposições taxonômicas de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*. Ambos os gêneros constituem os maiores da família Leguminosae (JUNIOR *et al*, 2006).

Em uma revisão do gênero em questão, realizada por Junior *et al*, 2006, são enumerados seus constituintes químicos comumente encontrados, assim como as atividades biológicas atribuídas aos seus extratos e substâncias isoladas, evidenciando um grande interesse na investigação química desses para a bioprospecção de fármacos, devido a grande diversidade de substâncias inéditas e bioativas encontradas. Dentre



Figura 11. *Senna pendula* (POTT, POTT, 1994).

as principais atividades farmacológicas atribuídas, incluem antibacteriana, antifúngica, hepatoprotetora, antiinflamatória, antitumoral e antimalárica, sendo que várias espécies são utilizadas popularmente para diferentes fins terapêuticos, em todo o mundo.

Estudos evidenciaram a ocorrência de várias classes de metabólitos, tais como derivados antraquinônicos, flavonoides e outros compostos fenólicos, além de alcaloides piperidínicos, tais como os aza-açúcares, interessantes por apresentarem similaridade estrutural com o fosfolípido de membrana

esfingosina, sendo que muitos deles apresentaram atividades anestésicas, analgésicas e antimicrobiana (JUNIOR *et al*, 2006).

S. occidentalis, apesar de apresentar atividade tóxica para bovinos, por causar degeneração e necrose muscular, atribuída às presenças de *N*-metilmorfolina e oximetiltraquinonas, tem o extrato de suas folhas indicado como anti-inflamatório, bactericida e antimalárico. A infusão de suas folhas é utilizada como purgativo, diurético e como loção ocular (TOKARNIA *et al*, 2002; JUNIOR *et al*, 2006).

As espécies enquadradas nesse estudo são *S. aculeata* (guelra-de-dourado) (**Figura 10**), *S. pendula* (papoula-do-brejo) (**Figura 11**) e *S. splendida* (amendoim-bravo) (**Figura 12**); sendo que nenhuma destas havia sido quimicamente estudada.



Figura 12. *Senna splendida* (POTT, POTT, 1994).

1.5. GÊNERO *Crotalaria*

Pertence à família Leguminosae (Faboideae), sendo facilmente encontradas em plantações de grãos e pastos. No Brasil, já foram encontradas aproximadamente 40 espécies.

Essas plantas são conhecidas por terem em seu metabolismo secundário, alcaloides pirrolizidínicos, que são substâncias hepatotóxicas, e provavelmente as responsáveis pela toxicidade ao gado, apresentada por algumas espécies do gênero (BOGHOSSIAN *et al*, 2007; TOKARNIA, DÖBEREINER, PEIXOTO, 2002).

Dentre as principais espécies tóxicas, estão *Crotalaria spectabilis*, *C. saltiana*, *C. juncea*, *C. retusa*, *C. micans*, *C stipularia* (BARRI, ADAM, 1981; BOGHOSSIAN *et al*, 2007; POTT, POTT, 1994).

C. micans (= *C. anagyroides*) já apresenta estudos químicos, sendo a grande maioria relativos às sementes. Nestes estudos foram identificados alcaloides pirrolizidínicos, flavonoides C-glicosídeos, esteroides, e triterpenos. Porém, estudos de atividades biológicas não foram encontrados (RASTOGI, RAJAGOPALAN, 1982; SURI *et al*, 1978; SUBRAMANIAN, NAGARAJAN, 1970; SUBRAMANIAN, NAGARAJAN, 1967; SETHI, ATAL, 1964).

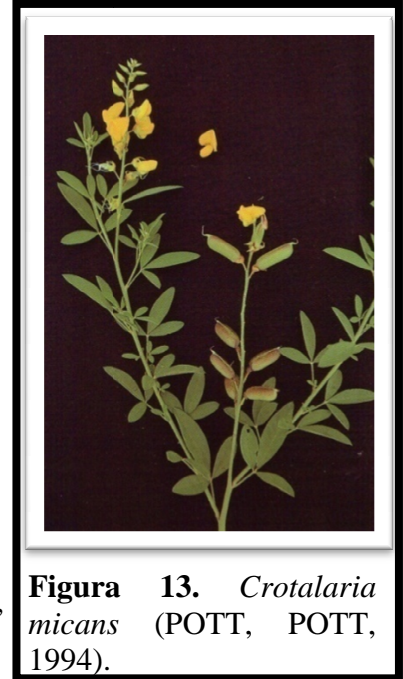


Figura 13. *Crotalaria micans* (POTT, POTT, 1994).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância em se conhecer quimicamente plantas tóxicas ou potencialmente tóxicas, tanto sob o ponto de vista agropecuário, quanto por se tratarem de plantas com potencialidades biológicas, a partir das informações apresentadas anteriormente, este estudo tem como objetivos:

- Realizar um *screening* químico das espécies propostas, a partir dos extratos brutos, o qual envolverá estudos farmacognósticos, além de análises espectroscópicas e observação do perfil químico em CLAE-UV, CG-EM.
- Avaliar a atividade citotóxica dos extratos, a partir de ensaios utilizando *Artemia salina*.
- Após avaliação dos parâmetros acima, serão escolhidas as espécies que apresentarem os resultados mais promissores, para a realização de suas fitoquímicas.
- Avaliar atividades biológicas dos extratos, frações e substâncias isoladas, tais como: citotóxicas, a partir de ensaios utilizando células tumorais, atividades antimicrobianas, tripanocidas, e atividades anti-alérgicas – avaliações biológicas a serem realizadas em laboratórios especializados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DOS MATERIAIS VEGETAIS

Os materiais vegetais (partes aéreas) *Riedeliella graciliflora* (falsa-ciganinha); *Crotalaria micans* (guizo-de-cascavel); *Ipomoea chiliantha* (cipó-de-leite), *Senna splendida* (amendoim-bravo); *Senna aculeata* (guelra-de-dourado), *Senna pendula* (papoula-do-brejo), foram coletados e identificados pelo Dr. Arnildo Pott, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na região de Mato Grosso do Sul/ Pantanal, em julho de 2008. *Indigofera truxillensis* (planta total) foi coletada pela Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, na cidade de Botucatu (SP), em outubro de 2009. Os dados das coletas estão apresentados na **Tabela 2**. O acesso ao patrimônio genético foi permitido pela licença número 010174/2011-7, concedida pelo CGEN/CNPq.

Tabela 2. Dados das coletas das plantas pertencentes a este estudo.

Espécie	Herbário	Coletor	Local	Coordenada
<i>Riedeliella graciliflora</i>	Herbário CGMS – n° 31.477	A.Pott –n° 15.369	Fazenda Modelo, Embrapa, Terenos, MS	20°33'24 1 S – 54°47'23.6 W
<i>Crotalaria micans</i>	Herbário CGMS – n° 31.478	A.Pott –n° 11683	Fazenda Potreiro do Sucuriu, Costa Rica, MS	19°01'23 S – 53°11'34W
<i>Ipomoea chiliantha</i>	Herbário CGMS – n° 31.479	A.Pott –n° 15.108	Passo do Lontra, Base de Estudos da UFMS, Corumbá, MS	19°34'32 S – 57°00'52 W
<i>Senna splendida</i>	Herbário CGMS – n° 31.476	A.Pott –n° 6448	Fazenda Ipanema, Nhecolândia, Corumbá, MS	19°04' S – 57°47' W
<i>Senna aculeata</i>	Herbário CGMS – n° 31.474	V.J.Pott –n° 6373	Fazenda Boa Sorte – Leque, Corumbá, MS	19°22'36 S – 57°02'51.1 W
<i>Senna pendula</i>	Herbário CGMS – n° 31.475	A.Pott –n° 15.111	Estrada Parque, Corumbá, MS	19°34'36 S – 57°01'06W
<i>Indigofera truxillensis</i>	Herbário: SPFR - n° 7922	SP Teixeira s/n	Distrito de Rubião Junior – SP	

3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- ✓ Os solventes utilizados foram de grau técnico, purificados no laboratório, e de grau P.A..
- ✓ As placas cromatográficas foram preparadas a partir da suspensão de gel de sílica 60 (GF254 – Merck) em água destilada, sendo a espessura de 0,25 mm para as placas comparativas e 0,75 mm para as placas preparativas.
- ✓ Utilizou-se Sephadex LH-20 para a realização das colunas cromatográficas clássicas.
- ✓ Os reveladores utilizados na cromatografia em camada delgada foram: irradiação UV de 254 e 366 nm (método físico), NP-PEG, sulfato cérico, anisaldeído sulfúrico, KOH-5% em etanol e Dragendorff (métodos químicos).
- ✓ Utilizou-se o ultrassom da marca Odontobrás, modelo 1440D.
- ✓ Utilizou-se centrífuga da marca Fanem[®], modelo 206.
- ✓ Utilizaram-se filtros Millipore LCR – 0,45µm da marca Millex[™].
- ✓ Para efetuar a secagem de algumas frações foi utilizado o evaporador rotatório, sob pressão reduzida, da marca TECNAL, modelo TE-120.
- ✓ Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos através dos espectrômetros BRUKER DRX 500 e BRUKER DPX 300, com a utilização de solventes deuterados da marca Aldrich.
- ✓ Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um Espectrômetro de Massas UltrOTOFG (Bruker Daltonics) ESI-qTOF.
- ✓ Para os ensaios farmacognósticos, utilizaram-se os reagentes: cloreto férrico, ácido clorídrico, ácido acético glacial, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio, peróxido de hidrogênio, ácido 3,5-dinitrobenzoico, e os reagentes de Mayer, Bouchardat, Bertrand e Dragendorff. Todos os reagentes foram grau P.A.
- ✓ As obtenções dos $[\alpha_D]$ foram realizadas em Polarímetro digital, marca Jasco, modelo DIP-370. As leituras foram realizadas em 589 nm.
- ✓ Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos em um Espectropolarímetro JASCO 810 (J 810-150s).
- ✓ As análises por CG-EM foram realizadas em Cromatógrafo gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas com modo de ionização por elétrons, marca Shimadzu, modelo GC-MS-QP2010. As análises foram realizadas utilizando-se coluna DB-5 MS e DB-1 MS (30m x

0,25mm x 0,25µm) e hélio como gás de arraste. Utilizaram-se as bibliotecas de espectros de massas Willey, NIST e de padrões do laboratório.

✓ As análises em CLAE foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu, modelo SCL-10AVP, equipado com três bombas Shimadzu, modelo LC-6AD, detector de arranjo de diodos UV-Vis DAD Shimadzu, modelo SPD-M10AVP, injetores manual e automático e sistema de integração computadorizada com *software* CLASS-VP. Foram utilizadas coluna analítica C-18 (4,6 x 250 mm; 5 µm) e coluna semipreparativa C18 (20 x 250 mm, 5 µm) modelo SHIM-PACK PREP. ODS(H) KIT, Shimadzu. Foi utilizada também a pré-coluna ODS-8, Shimadzu.

✓ As artemias (Maramar) e o sal marinho foram obtidos em loja especializada. Utilizou-se sal marinho para as culturas e dicromato de potássio como controle positivo.

✓ As linhagens tumorais utilizadas, MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (côlon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (USA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. *Informações fornecidas pela pesquisadora responsável pelo ensaio.*

✓ Utilizaram-se as cepas padrão provenientes da *American Type Culture Collection* de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e de bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Proteus mirabilis* (ATCC 29906). As soluções das amostras foram preparadas em DMSO e ágar Mueller Hinton, e os antibióticos estreptomicina e penicilina foram utilizados como controles positivos, em tampão fosfato de potássio. Cloreto de trifeniltetrazólio foi utilizado como agente revelador. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. *Informações fornecidas pela pesquisadora responsável pelo ensaio.*

✓ Na avaliação da atividade anti-alérgica, foram utilizadas células RBL-2H3, sensibilizadas pelo anti-DNP-IgE; tampão de Tyrode/BSA, o substrato 4-metil-umbeliferil-N-acetil-β-D-glucosaminida, Triton X-100; o fármaco de referência fumarato de cetotifeno, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT); antígeno DNP-BSA, a sonda para Ca²⁺, Fluo 4-AM e sulfinpirazona. *Informações fornecidas pela pesquisadora responsável pelo ensaio.*

✓ Na avaliação da atividade tripanocida, foram utilizadas Formas tripomastigotas da cepa CL B5, ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado. As contagens dos parasitos foram realizadas em hemocitômetro de Neubauer. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços, sendo utilizado solução de CPRG (“chlorophenol red β-D-galactopyranoside”), e

tampão Triton X-100, pH 7,4. *Informações fornecidas pelo pesquisador responsável pelo ensaio.*

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Ensaio farmacognósticos

Os ensaios farmacognósticos foram realizados a partir de adaptações daquelas descritas por Matos, 1988 e Simões e colaboradores, 2004. Estes ensaios foram realizados para todas as plantas que constam neste estudo, à exceção de *I. truxillensis*. Foram obtidas maiores quantidades de material vegetal desta planta, o que permitiu optar por realizar o estudo químico clássico de cada órgão da planta em separado (raízes, caule, folhas e frutos). Porém, as massas obtidas referentes a cada uma destas partes da planta foram insuficientes para a realização dos ensaios farmacognósticos aqui descritos. Então, para esta espécie foram realizados ensaios específicos para algumas classes de substâncias tóxicas encontradas neste gênero, descritos nos itens 3.3.5 e 3.3.6.

I. chiliantha também foi avaliada quando a presença de substâncias específicas, descritas no item 3.3.7.

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Foram pesados 10 g do material vegetal seco e triturado, sendo adicionados 100 ml da mistura etanol:água (7:3), e macerado por uma semana à temperatura ambiente. Após este período, o material foi filtrado em buchner, sendo o extrato obtido, seco e pesado. Foram obtidas massas de extrato entre 2 e 3 g para todas as plantas. O extrato foi então ressuspensionado em 100 ml de etanol:água (7:3) e filtrado em buchner.

Desta amostra, foram transferidos 3 ml para cada um de 5 tubos de ensaio, para a realização de testes para constituintes fenólicos.

TANINOS E FENÓIS:

Tubo 1. Foram adicionadas 3 gotas de solução aquosa de cloreto férrico – 4%. Coloração variável entre azul e vermelho indica a presença de fenóis. Precipitado escuro entre o verde e azul indica a presença de taninos.

ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONOIDES:

Tubo 2. Foi acidulado com HCl 2 N, até pH 3. Coloração vermelha é indicativo da presença de antocianinas, antocianidinas, chalconas e auronas.

Tubo 3. Foi basificado com NaOH 2 N, até pH 11. Coloração azul-púrpura é indicativo da presença de antocianinas e antocianidinas. Coloração amarela é indicativo da presença de flavonas, flavonóis e xantonas. Coloração vermelho-púrpura é indicativo da presença de chalconas e auronas. Coloração vermelho-laranja é indicativo da presença de flavanonóis.

Tubo 4. Foi acidificado com HCl 2 N, até pH 1-3, e aquecido em banho-maria. Coloração vermelha indica presença de leucoantocianidinas e pardo-amarelada, de catequinas.

Tubo 5. Foi basificado com NaOH 2 N, até pH 11, e aquecido em banho-maria. Coloração vermelho-laranja é indicativo da presença de flavanonas.

ESTEROIDES E TRITERPENOIDES (Liebermann-Burchard)

10 ml do extrato etanólico foram secos em ar comprimido, sendo posteriormente extraído com diclorometano (3 x 2 ml), sendo esta fração transferida para um tubo de ensaio. Foram adicionados 1 ml de anidrido acético, e após suave agitação, foram adicionadas 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Coloração verde é indicativo da presença de esteroides, e coloração vermelha é indicativo da presença de triterpenos.

SAPONINAS

10 ml do extrato etanólico foram secos em ar comprimido, sendo posteriormente extraído 3 vezes com água, filtrado, e transferido para um tubo de ensaio. Este foi fortemente agitado. A formação de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas.

CONFIRMATÓRIO DE SAPONINAS

Aos tubos de ensaio acima testados, foram adicionados 2 ml de ácido clorídrico concentrado, seguido de aquecimento em banho-maria por 1 hora. Após este período, o extrato foi neutralizado com NaOH 2 N, seguido de forte agitação. A presença de precipitado e a não formação de espuma confirmam a presença de saponinas.

HETEROSÍDEOS ANTRAQUINÔNICOS (Reação de Bornträger)

A 10 ml do extrato etanólico foram adicionados 10 ml de KOH 0,5 N e 1 ml de peróxido de hidrogênio puro, sendo posteriormente fervido em banho-maria por 5 minutos. A seguir, o extrato foi acidificado com ácido acético glacial, e particionado com diclorometano (3 x 2 ml), sendo a fase orgânica transferida para um tubo de ensaio. À fase orgânica foram adicionados 2 ml de NaOH 2 N, e agitada. As antraquinonas conferem coloração vermelha à fase alcalina e incolor à fase orgânica.

HETEROSÍDEOS CARDIOTÔNICOS (Reação de Kedde)

10 ml do extrato etanólico foi extraído com diclorometano (3 x 2 ml), sendo a fração diclorometânica transferida para um tubo de ensaio e seca em ar comprimido. Ao resíduo seco foram adicionadas 6 gotas do reagente de Kedde (solução alcoólica a 1% do ácido 3,5-dinitrobenzoico), e 3 gotas de hidróxido de potássio 1 N. Coloração vermelho-violácea é indicativo da presença do anel lactônico.

MARCHA ALCALOÍDICA

As espécies foram submetidas a marcha alcaloídica, sendo realizados testes químicos com reveladores específicos para avaliar a presença de alcaloides. 1 g do pó de cada espécie foi solubilizado em 8 ml de HCl – 2% e aquecido em banho-maria – 80°C por 20 minutos. Os extratos foram filtrados com algodão, e alcalinizado com NH₄OH até o pH 9-11 ser atingido. Particionou-se com diclorometano, sendo a fração orgânica seca em ar comprimido, e ressesuspendida em 6 ml de HCl – 2%. Foram testados os reagentes de Mayer, Bouchardat, Dragendorf e Bertrand.

3.3.2. Ensaio de citotoxicidade: *Artemia salina*

Este ensaio utilizado para a avaliação preliminar de citotoxicidade foi escolhido devido às vantagens de ser rápido, simples, de fácil execução, e requerer pequenas quantidades de amostras. Embora seja preliminar, requerendo posteriores ensaios mais específicos, ainda é amplamente utilizado, tendo sido o responsável pela descoberta e isolamento de moléculas com notáveis atividades citotóxicas, com potenciais atividades antitumorais (COLEGATE, MOLYNEUX, 2008).

Foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al*, 1982, com algumas modificações. Os cistos de *Artemia salina* foram colocados em um aquário contendo sal marinho em água destilada (38 g/l) sob aeração, luz e controle de temperatura (23-25°C), e após 48 horas de incubação, as larvas foram retiradas para o ensaio. As análises foram realizadas em triplicata, sendo em cada tubo adicionados 5 ml da solução testada, e 10 larvas. Após 24 h em contato com a suspensão das amostras, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes, sendo também observado o comprometimento da mobilidade das mesmas.

Preparo das soluções

Extratos e frações

Os extratos e frações foram solubilizados em DMSO – 3% em salina (38 g/l), na concentração 1000 ppm, sendo então realizadas diluições de 500, 100, 50 e 10 ppm.

Controle positivo

Foram utilizados como controle positivo, soluções em salina (38 g/l) de $K_2Cr_2O_7$ a 90, 45 e 9 ppm.

Controle negativo

Foi utilizado solução de DMSO – 3% em salina (38 g/l).

3.3.3. Extrações

Percolação

Neste trabalho, este processo extrativo foi utilizado na obtenção dos extratos etanólicos brutos das espécies coletadas, para posteriores estudos químicos da espécie.

Maceração

Foi utilizado este método de extração no caule de *Indigofera truxillensis*. O caule, seco e triturado, foi macerado com acetona por 48 horas, e depois foi filtrado e seco em rotaevaporador.

As massas dos extratos brutos obtidos estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Massas dos pós dos materiais vegetais e dos extratos etanólicos brutos obtidos por percolação.

Planta	Massa do pó (gramas)	Extrato etanólico bruto (gramas)
<i>Ipomoea chiliantha</i>	149	22
<i>Riedeliella graciliflora</i>	200	36
<i>Senna pendula</i>	142	27
<i>Senna splendida</i>	200	24
<i>Senna aculeata</i>	114	28
<i>Crotalaria micans</i>	66	13
<i>Indigofera truxillensis</i> - raízes	55	4
<i>Indigofera truxillensis</i> - frutos	117	4
<i>Indigofera truxillensis</i> - caule	225	3

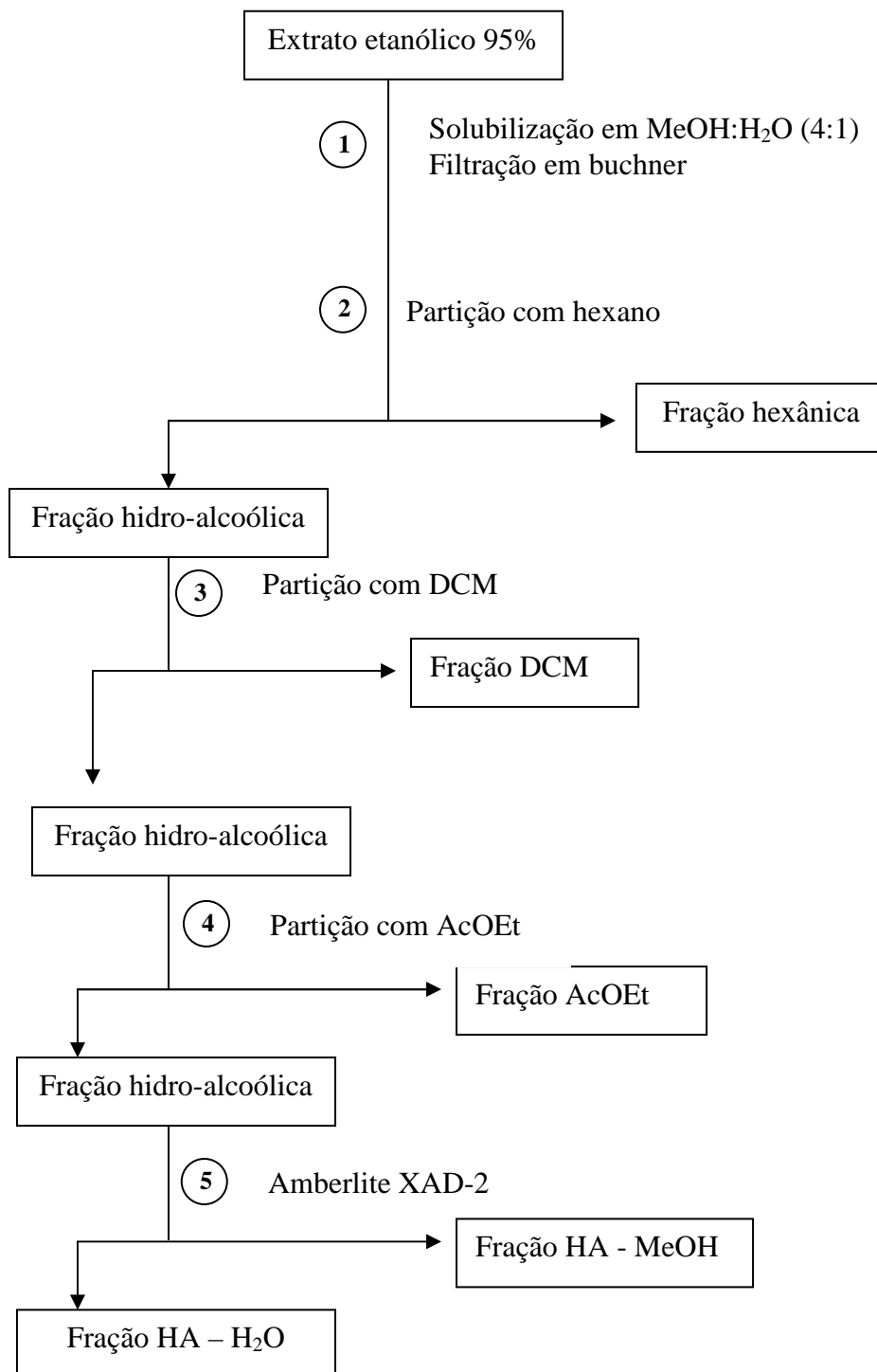
Partição líquido-líquido

Os extratos etanólicos foram solubilizados em MeOH:H₂O (8:2) com a ajuda de ultrassom. Filtrou-se em buchner. Este procedimento foi realizado com o intuito de se retirar da amostra, ácidos e ésteres graxos e sais, cuja presença no extrato prejudicaria as purificações posteriores. O filtrado foi então submetido ao particionamento com hexano, diclorometano e acetato de etila (fluxograma 1). A fração hidro-alcoólica remanescente foi submetida à secagem em ar comprimido, até a completa remoção do solvente orgânico, para finalmente, ser submetida à purificação prévia em resina Amberlite XAD-2. Neste procedimento, primeiramente a resina foi eluída com H₂O destilada, até a completa eluição dos constituintes de alta polaridade do extrato. Em seguida, eluiu-se com MeOH, exaustivamente. Para *I. truxillensis*, não foi realizada purificação prévia em amberlite XAD-2 da fração hidro-alcoólica, devido às pequenas massas obtidas. Além disso, o extrato bruto proveniente do caule desta planta não foi particionado com diclorometano.

As partições foram realizadas para as espécies *S. splendida*, *S. pendula*, *I. chiliantha*, *R. graciliflora*, e *I. truxillensis*, cujas massas estão apresentadas na

Tabela 4.**Tabela 4.** Massas das frações dos extratos etanólicos brutos das plantas obtidas a partir do fracionamento líquido-líquido (gramas)

Planta	Hexânica	DCM	AcOEt	HA	HA-MeOH
<i>S. splendida</i>	0,534	1,296	5,760		0,839
<i>S. pendula</i>	1,374	1,653	2,424		2,293
<i>I. chiliantha</i>	0,672	2,992	4,018		2,310
<i>R. graciliflora</i>	3,948	1,336	3,948		3,451
<i>I. truxillensis</i> – raiz	0,069	0,479	1,282	2,022	
<i>I. truxillensis</i> -fruto	0,179	0,503	0,656	1,864	
<i>I. truxillensis</i> -caule	0,4399		1,6769	0,9984	



Fluxograma 1. Partições do extrato etanólico – 95%

3.3.4. Análises cromatográficas

Cromatografia em camada delgada

Os reveladores utilizados foram luz UV a 254 e 366 nm (método físico), sulfato cérico e anisaldeído sulfúrico seguidos de aquecimento, KOH-5% em etanol, reagente Natural Products, Dragendorff, reagente de ninidrina, *p*-nitroanilina diazotada (métodos químicos). Os reagentes foram preparados conforme descrito por Wagner e Zgainski, 1984; Miller, Smith, 1973 e Majak, Bose, 1974.

Cromatografia em coluna

✓ *Sephadex LH-20*

Neste trabalho, utilizou-se metanol como fase móvel. As amostras foram submetidas a um “clean-up”, o qual consiste na sua solubilização em 10 ml de metanol, e posterior centrifugação a 3000 rpm, por 20 min, sendo o sobrenadante eluído na coluna.

Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

Esta técnica foi empregada na tentativa de identificação estrutural de substâncias presentes nos extratos das lavagens foliares e nas frações hexânicas, baseado na comparação dos espectros de massas das bibliotecas Willey 7.0, NIST e padrões do laboratório. Nas análises de esteroides e triterpenos, foram também utilizados o tempo de retenção de padrões do laboratório relativo ao 5- α -colestano. Foram obtidos os índices de retenção de Kovats (IK), sendo que para a determinação dos IK foi necessária a injeção de hidrocarbonetos *n*-alcanos (C₉-C₄₂). Também foi empregada na avaliação da presença de alcaloides poli-hidroxilados em *I. chiliantha*, cuja técnica está descrita no item 3.3.7, página 30.

Condições de análise CG 1:

Foi realizada em um sistema operando em impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250 °C) e com proporção slipt 1/40. A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), utilizando hélio como gás carreador. O fluxo na coluna foi 1,10 ml/min., pressão de 81,5 kPa e aquecimento com a programação de temperatura de de 100 °C a 290 °C a 3 °C/min.; 290 °C por 20,0 min.

Condições de análise CG 2:

Foi realizada em um sistema operando em impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250 °C) e com proporção split 1/20. A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás carreador. O fluxo na coluna foi 1,03 ml/min., pressão de 114,8 kPa e aquecimento com a programação de temperatura de 200°C por 12,0 min., de 200 °C a 290 °C a 10 °C/min.; e 290 °C por 30,0 min.

Condições de análise CG 3:

Foi realizada em um sistema operando em impacto eletrônico (70 eV) equipado com injetor split (250 °C) e com proporção split 1/10. A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando hélio como gás carreador. O fluxo na coluna foi 1,00 ml/min., pressão de 96,1 kPa e aquecimento com a programação de temperatura de 160°C por 2,0 min., de 160 °C a 240 °C a 5 °C/min.; 240 °C por 15,0 min.; de 240 °C a 300 °C a 10 °C/min.; e 300 °C por 10,0 min.

Cromatografia líquida de alta eficiência – UV (DAD)

Esta técnica foi empregada na avaliação química de extratos etanólicos brutos, e frações provenientes de partições ou de fracionamento em colunas, frente a constituintes químicos que absorvem na região do UV. A partir destas análises tornou-se possível averiguar alguns tipos de esqueletos presentes, tais como flavonoides e derivados fenilpropanoides, e selecionar frações de menor complexidade para posterior separação em CLAE-semi-preparativo ou até mesmo para análises por RMN de ¹H, para a identificação estrutural.

Nas análises comparativas, foram utilizadas colunas analíticas C-18 (*Shimadzu*), e gradientes de MeOH: H₂O e MeOH-1% ácido acético: H₂O-1% ácido acético; MeCN: H₂O. Nas análises semi-preparativas, foi utilizada coluna semi-preparativa C-18 (*Shimadzu*), e gradientes de MeOH-0,03 % TFA: H₂O-0,03 % TFA; MeOH: H₂O e MeCN: H₂O.

Condições de análise CLAE 1:

Utilizou-se coluna analítica ODS (4,6 mm x 250 mm d.i., 5 µm, *Shimadzu*), fluxo 0,8 ml/min.; FM (A) H₂O-TFA (0,03%): (B) MeOH-TFA (0,03%) em gradiente (0,01 a 40,0 min – 35% a 50% de B; 40,0 min a 45,0 min – 50% a 100% de B; 45,0 a 50,0 min – 100% de B; 50,0 a 53,0 min – 100% a 35% de B; 53,0 a 60,0 min – 35% de B).

Condições de análise CLAE 2:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS *Shimadzu* (20 x 250 mm, 5 µm), fluxo 8,0 ml/min. FM: MeOH em sistema de eluição isocrática.

Condições de análise CLAE 3:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS *Shimadzu* (20 x 250 mm, 5 µm), fluxo 8,0 ml/min. FM (A) H₂O-TFA (0,03%): (B) MeOH-TFA (0,03%) em gradiente (0,01 a 80 min. – 35% a 50% de B; 80 min. a 90 min. – 50% a 100% de B; 90 min. a 100 min. – 100% de B; 100 min a 106 min. – 100% a 35% de B; 106 min. a 120 min. – 35% de B.

Condições de análise CLAE 4:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS *Shimadzu* (20 x 250 mm, 5 µm), fluxo 8,0 ml/min. FM (A) H₂O-TFA (0,03%): (B) MeOH-TFA (0,03%) em gradiente (0,01 a 30 min. – 50% a 60,7% de B; 30 min. a 35 min. – 60,7% a 100% de B.

Condições de análise CLAE 5:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS *Shimadzu* (20 x 250 mm, 5 µm), fluxo 8,0 ml/min. FM (A) H₂O (B) MeOH em gradiente (0,01 a 80 min. – 30% a 60% de B; 80 min. a 90 min. – 60% a 100% de B; 90 min. a 100 min. – 100% a 30% de B; 100 min. a 110 min. – 30% de B.

Condições de análise CLAE 6:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS *Shimadzu* (20 x 250 mm, 5 µm), fluxo 9,0 ml/min. FM (A) H₂O (B) MeCN em gradiente (0,01 a 90 min. – 25% a 100% de B; 90 min. a 110 min. – 100% de B; 110 min. a 116 min. – 100% a 25% de B; 116 min. a 130 min. – 25% de B.

Condições de análise CLAE 7:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS *Shimadzu* (20 x 250 mm, 5 µm), fluxo 8,0 ml/min. FM (A) H₂O (B) MeOH em gradiente (0,01 a 45 min. – 35% a 65% de B; 45 min. a 47 min – 65% a 100% de B; 47 min a 50 min – 100% de B.

Condições de análise CLAE 8:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS *Shimadzu* (20 x 250 mm, 5 µm), fluxo 9,0 ml/min. FM (A) H₂O (B) MeCN em gradiente (0,01 a 20 min. – 20% de B; 20 min. a 25 min. – 20% a 100% de B; 25 min a 35 min – 100% de B).

Condições de análise CLAE 9:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS (20 x 250 mm), fluxo 8,0 ml/min.; FM (A) H₂O-TFA (0,03%): (B) MeOH-TFA (0,03%) em gradiente (0,01 a 80,0 min – 25% a 50% de B; 80,0 min a 90,0 min – 50% a 100% de B; 90,0 a 100,0 min – 100% de B; 100,0 a 106,0 min – 100% a 25% de B; 106,0 a 120,0 min – 25% de B).

Condições de análise CLAE 10:

Utilizou-se coluna semi-preparativa ODS (20 x 250 mm), fluxo 8 ml/min. FM (A) H₂O (B) MeOH em gradiente (0,01 a 100 min – 35% a 100% de B; 110 min a 114 min – 100% a 35% de B; 114 min a 120 min – 35% de B).

Espectrometria de Massas – Ionização por “Electrospray”

Utilizou-se esta técnica como auxílio na identificação de algumas substâncias. Foi realizada injeção direta no aparelho, após a solubilização da amostra em MeOH: H₂O, seguido de filtragem em membrana Millipore (0,45 µm).

Condições de análise: Utilizou-se bomba de infusão, fluxo 300 µl/h, e o modo de detecção negativo e positivo, dependendo das características químicas da amostra. O aparelho é de alta resolução, necessitando de calibração interna e externa antes de realizar as análises. Usou-se para calibração interna uma solução de Na-TFA a 10 mg/ml e na calibração externa uma solução de formiato de sódio, a 10 mM.

3.3.5. Avaliação da presença do aminoácido não proteico Indospicina

200 mg da fração hidro-alcoólica dos frutos de *I. truxillensis* foi extraída com MeOH- HCl 1 M (1:1). Esta fração proveniente desta extração acídica foi analisada por CCDC (FM: CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH: H₂O 40:40:15:5) e revelada com reagente de ninidrina (MILLER, SMITH, 1973). Indospicina, igualmente a alguns outros aminoácidos, revela-se com coloração púrpura com este reagente. A partir da reação positiva, realizou-se CCDP (FM:

CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH: H₂O 40:40:15:5), sendo coletada a região da placa que contém a substância que revelou com o reagente de ninidrina. Esta fração, juntamente com uma alíquota da fração previamente extraída com MeOH- HCl 1M (1:1), foram analisadas por Espectrometria de Massas, a fim de se avaliar a presença de íons referentes à indospicina.

3.3.6. Avaliação da presença de nitrocompostos alifáticos

Os extratos brutos das raízes, frutos, caule e folhas de *I. truxillensis* foram avaliados quanto a presença desta classe de compostos, por CCDC, e reveladas com *p*-nitroanilina diazotada (MAJAK, BOSE, 1974).

3.3.7. Avaliação da presença de alcaloides poli-hidroxiados em *Ipomoea chiliantha*

Em alíquotas de 50 mg das frações HA-MeOH e HA-H₂O de *I. chiliantha* foram adicionados 4 ml de diclorometano e 5 ml de ácido acético glacial – 2%, sendo agitados por 16 horas. Os sistemas foram então centrifugados, e as porções aquosas ácidas foram adicionadas em resina fortemente catiônica Dowex-50, seguido de agitação mecânica por 15 minutos, e então, removidas da resina. Com a finalidade de aumentar a eficiência da extração, as porções diclorometânicas foram novamente extraídas com 5 ml de ácido acético glacial - 2%, seguidos de agitação e centrifugação, e as porções aquosas ácidas novamente adicionadas à resina fortemente catiônica, seguido de nova agitação por 15 minutos, e então novamente removidas da resina. Esta foi então lavada com água destilada, e posteriormente adicionou-se 5 ml de solução de hidróxido de amônio 1M, sendo agitados por 15 minutos, e então centrifugados, e esta porção aquosa básica foi removida, e seca. A estes extratos foram adicionados 0,2 ml de piridina e 0,05 ml de [N,O-Bis(trimetilsililtrifluoroacetamida) (BSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS)] sendo as soluções aquecidas a 70 °C, por 30 minutos. Estes foram analisados em CG-EM, sob as Condições de análise CG 3, página 27, juntamente com o hidrocarboneto *n*-octadecano, utilizado para o cálculo do tempo de retenção relativo, a fim de ser comparado com os valores da literatura (SCHIMMING *et al* 1998, SCHIMMING *et al* 2005).

3.3.8. Avaliações das atividades biológicas

Dos extratos, frações e algumas substâncias isoladas foram avaliadas as atividades citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas MDAMB-435, HCT-8 e SF-295, antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Proteus mirabilis* (ATCC 29906), anti-alérgica utilizando as células RBL-2H3, e tripanocida; realizados em laboratórios especializados. As metodologias referentes a estes experimentos, encontram-se nos APÊNDICES 1-4 (páginas 207-215).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIOS FARMACOGNÓSTICOS

Os ensaios farmacognósticos foram realizados a fim de nortear frente às diversas plantas envolvidas neste estudo. Convém ressaltar que os resultados obtidos (**Tabela 5**) foram utilizados em conjunto com outras técnicas de identificação, tais como dados de ultravioleta obtidos em CLAE-UV-DAD, e dados de CG-EM, útil na identificação de esteroides e triterpenoides.

Tabela 5. Resultados dos ensaios farmacognósticos.

	<i>Ipomoea chiliantha</i>	<i>Crotalaria micans</i>	<i>Riedeliella graciliflora</i>	<i>Senna aculeata</i>	<i>Senna pendula</i>	<i>Senna splendida</i>
<i>Taninos</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Fenóis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Antocianinas</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Antocianidinas</i>						
<i>Flavonas</i>						
<i>Flavonóis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Xantonas</i>						
<i>Chalconas</i>						
<i>Auronas</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Flavanonóis</i>	-	-	-	-	+	-
<i>Leucoantocianidinas</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Catequinas</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Flavanonas</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Esteroides e triterpenoides</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Saponinas</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Cardenolídeos</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Heterosídeos antraquinônicos</i>	-	-	-	+	+	+
<i>Alcaloides</i>	-	+	-	-	-	-

(+) Resultado farmacognóstico positivo. (-) Resultado farmacognóstico negativo.

Apenas *C. micans* apresentou resultados positivos para alcaloides, quando utilizados os reativos de Mayer, Dragendorf, Bertrand e Bouchardat. Tal resultado já era esperado para essa espécie, tendo em vista que já foram encontrados alcaloides

pirrolizidínicos nas suas sementes e em outras espécies do gênero (PURI, SAWHNEY, ATAL, 1974; RASTOGI & RAJAGOPALAN, 1982; SETHI & ATAL, 1964). O resultado negativo para este teste, em *I. chiliantha*, não significou a ausência de alcaloides nesta espécie, tendo em vista a ocorrência de alcaloides poli-hidroxilados no gênero, muito polares, que são as calisteginas e a suainsonina. Conforme previamente mencionado (item 1.3, página 8), devido suas altas polaridades, não têm afinidade pela fase orgânica na marcha alcaloídica, e portanto, para a averiguação da presença destas substâncias, foi utilizado o método descrito no item 3.3.7 (página 30). Os resultados e discussão deste experimento encontram-se no item 4.3.4, página 43.

É importante justificar a execução do ensaio farmacognóstico para cardenólídeos, que embora não tenha grande ocorrência nas famílias das plantas em estudo, já foram encontrados no gênero *Crotalaria* (*C. retusa* e *C. juncea*) (YADAV, THAKUR, 1994; YADAVA, THAKUR, 1995).

4.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE – *Artemia salina*

Os extratos etanólicos brutos desse estudo apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra o microcrustáceo *Artemia salina* Lench. Foi observado comprometimento da motilidade, além de mortalidade dos microcrustáceos, entre as concentrações de 500 a 1000 µg/ml dos extratos etanólicos de *C. micans*, *S. splendida* e *I. truxillensis* (raiz e frutos) (Tabela 6).

Tabela 6. Número de sobreviventes de *Artemia salina* em ensaio dos extratos brutos.

µg/ml	<i>I. chiliantha</i>			<i>C. micans</i>			<i>R. graciliflora</i>			<i>S. aculeata</i>			<i>S. splendida</i>			<i>S. pendula</i>			<i>I. trux. raiz</i>			<i>I. trux. fruto</i>		
10	10	10	10	10	10	8	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10*	10*	10*
50	10	9	10	10	10	10	8	9	10	10	9	10	10	10	10	10	9	9	10	10	10	9*	9*	10*
100	10	10	10	10	10	10	10	10	9	8	10	9	9	10	10	9	10	8	10	10	10	10*	10*	10*
500	10	10	10	8*	6*	6*	10	9	8	9	9	10	10	10	8	10	10	9	9	9	8	5*	8*	9*
1000	6	8	9	6*	1*	1*	6	10	10	10	10	9	5*	8*	9*	10	10	10	8*	6*	6*	4*	4*	5*

**Número inicial de artemias = 10.

*Comprometimento da motilidade

4.3. ESTUDO QUÍMICO DE *Ipomoea chiliantha*

Embora o extrato etanólico não tenha apresentado atividade contra os microcrustáceos *A. salina*, após uma cautelosa análise dos cromatogramas e espectros de RMN de ^1H obtidos de *I. chiliantha*, e comparados àqueles obtidos das demais plantas deste estudo, observou-se tratar de extrato com mistura comparativamente menos complexa, e com maior possibilidade de êxito nos processos de isolamento. Tal fato justifica a escolha desta espécie para um estudo químico mais detalhado.

4.3.1. Fração Hexânica

A fração hexânica foi submetida à análise por CG-EM (Condições de análise CG 1, página 26). Esta análise evidenciou a presença de ácidos, alcoóis e ésteres graxos, os quais estão apresentados no cromatograma e tabela a seguir (**Figura 14, Tabela 7**). As substâncias foram elucidadas baseadas em seus índices de Kovats e similaridade com os espectros de massas das bibliotecas disponíveis.

Foram observados também picos com espectros de massas referentes a triterpenoides, porém, com áreas muito pequenas. Estes foram identificados como α -amirina, α -amirona, β -amirina, β -amirona e β -friedelanol. A identificação destas substâncias baseou-se nos tempos de retenção relativos ao 5- α -colestano, comparados com aqueles obtidos por padrões, além da similaridade com biblioteca de espectros de massas do banco de padrões do laboratório (Condições de análise CG 2, página 27).

Foram também encontrados picos com espectros de massas referentes aos derivados do ácido *p*-cumárico (**Figura 15-Figura 18**). Uma busca na literatura revelou a presença deste tipo de substâncias no gênero *Ipomoea* (SNOOK *et al*, 1994), em que o ácido *p*-cumárico apresenta-se esterificado com cadeias alquílicas de 16 a 18 carbonos. A substância **IC-11** apresentou íon molecular m/z 388, massa esta compatível com uma cadeia alquílica de 16 carbonos; a substância **IC-12** apresentou íon molecular m/z 416, massa esta compatível com uma cadeia alquílica de 18 carbonos; a substância **IC-13** apresentou íon molecular m/z 444, massa esta compatível com uma cadeia alquílica de 20 carbonos (**Figura 19**). A posição da hidroxilação do anel aromático foi identificada em *para* devido ao padrão das fragmentações obtidas para estas três substâncias, quando comparada ao padrão das

fragmentações das substâncias ácido 2-hidroxicinâmico, ácido 3-hidroxicinâmico e ácido 4-hidroxicinâmico, obtidos da biblioteca Willey (**Figura 18**). Outro aspecto importante a ser considerado é quanto às reações biossintéticas. Hidroxilações em *para* são muito mais comuns quando comparadas a hidroxilações em *orto*, presente principalmente em plantas produtoras de cumarinas. Hidroxilações em *meta* geralmente ocorrem após a hidroxilação em *para* já ter ocorrido, obtendo-se assim o padrão de substituição de aromáticos 3,4 di-hidroxilados (DEWICK, 2002).

Tabela 7. Substâncias identificadas na fração hexânica de *I. chiliantha*.

	Substância	Similaridade	IK (exp.)	IK (lit.)	Literatura
IC-1	Ácido dodecanoico	95	1557	1562	Maia <i>et al</i> , 2000
IC-2	Hexahidrofarnesilacetona	97	1838	1839	Oliveira <i>et al</i> , 2009
IC-3	1-hexadecanol	97	1878	1879	Adams, 1995
IC-4	Ácido hexadecanoico	94	1962	1963	Nogueira <i>et al</i> , 2001
IC-5	Hexadecanoato de etila	95	1991	1993	Oliveira <i>et al</i> , 2009
IC-6	1-octadecanol	98	2081	2084	Nogueira <i>et al</i> , 2001
IC-7	Ácido octadecanoico	93	2160	2170	Maia <i>et al</i> , 2000
IC-8	Octadecanoato de etila	90	2192	2194	Adams, 1995
IC-9	1-eicosanol	96	2285	2273	Nogueira <i>et al</i> , 2001
IC-10	Ácido eicosanoico	93	2380		
IC-11	<i>p</i> -cumarato de hexadecanoíla				Snook <i>et al</i> , 1994
IC-12	<i>p</i> -cumarato de octadecanoíla				Snook <i>et al</i> , 1994
IC-13	<i>p</i> -cumarato de eicosáíla				Snook <i>et al</i> , 1994
IC-14	β -amirona	94			
IC-15	β -amirina	91			
IC-16	α -amirona	94			
IC-17	α -amirina	90			
IC-18	friedelina	95			

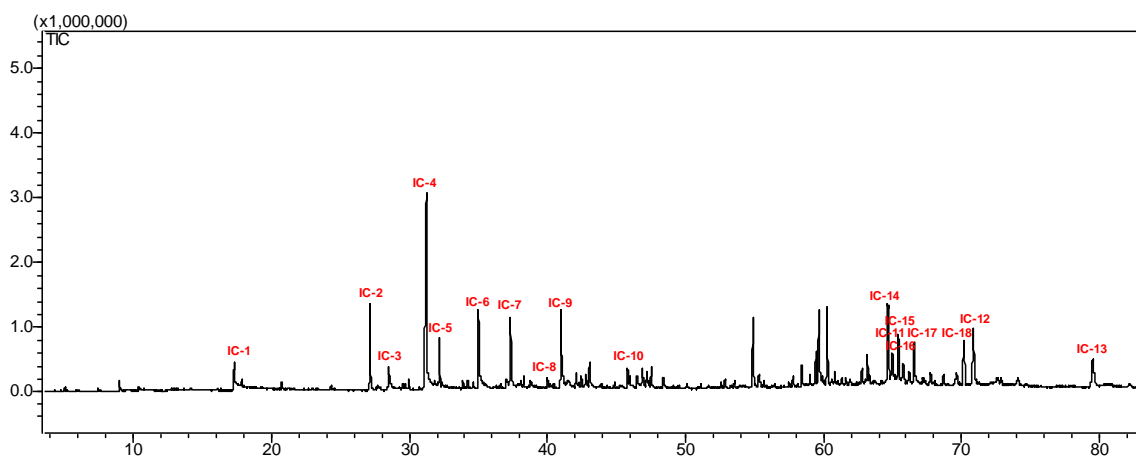


Figura 14. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de *I. chiliantha* - Condições de análise CG 1 (item 3.3.4)

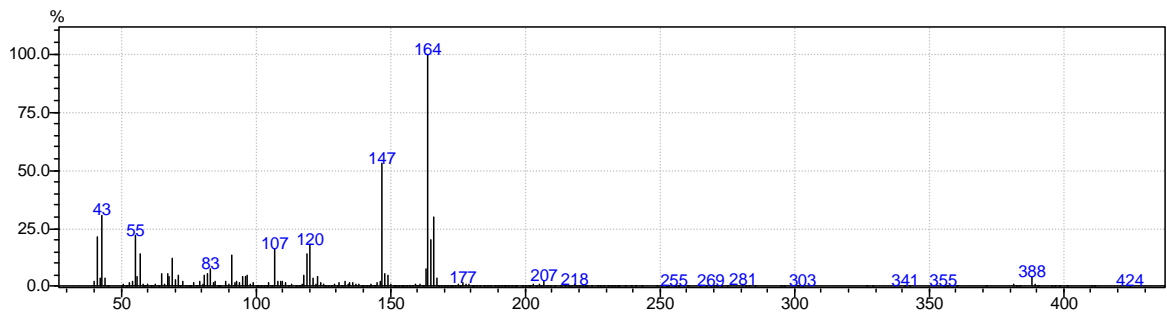


Figura 15. Espectro de massas (IE – 70 eV), da substância IC-11, obtido da análise por CG-EM, da fração hexânica de *I. chiliantha*.

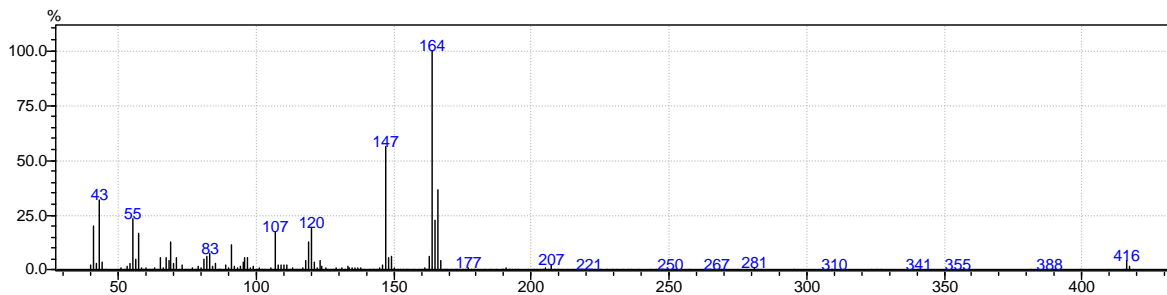


Figura 16. Espectro de massas (IE – 70 eV), da substância IC-12, obtido da análise por CG-EM, da fração hexânica de *I. chiliantha*.

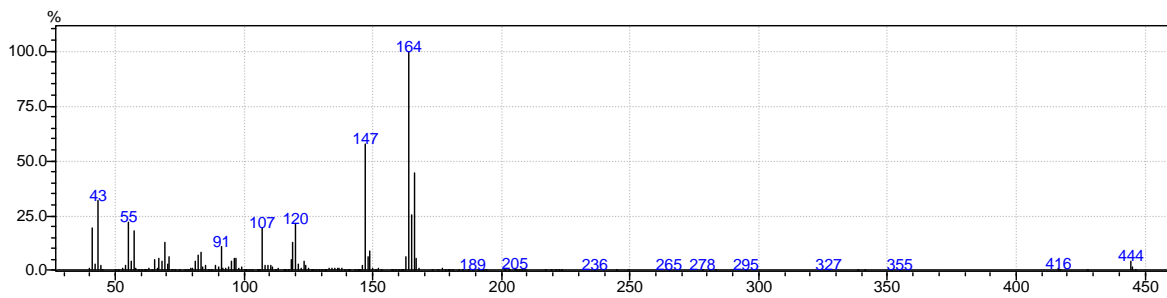


Figura 17. Espectro de massas (IE – 70 eV), da substância IC-13, obtido da análise por CG-EM, da fração hexânica de *I. chiliantha*.

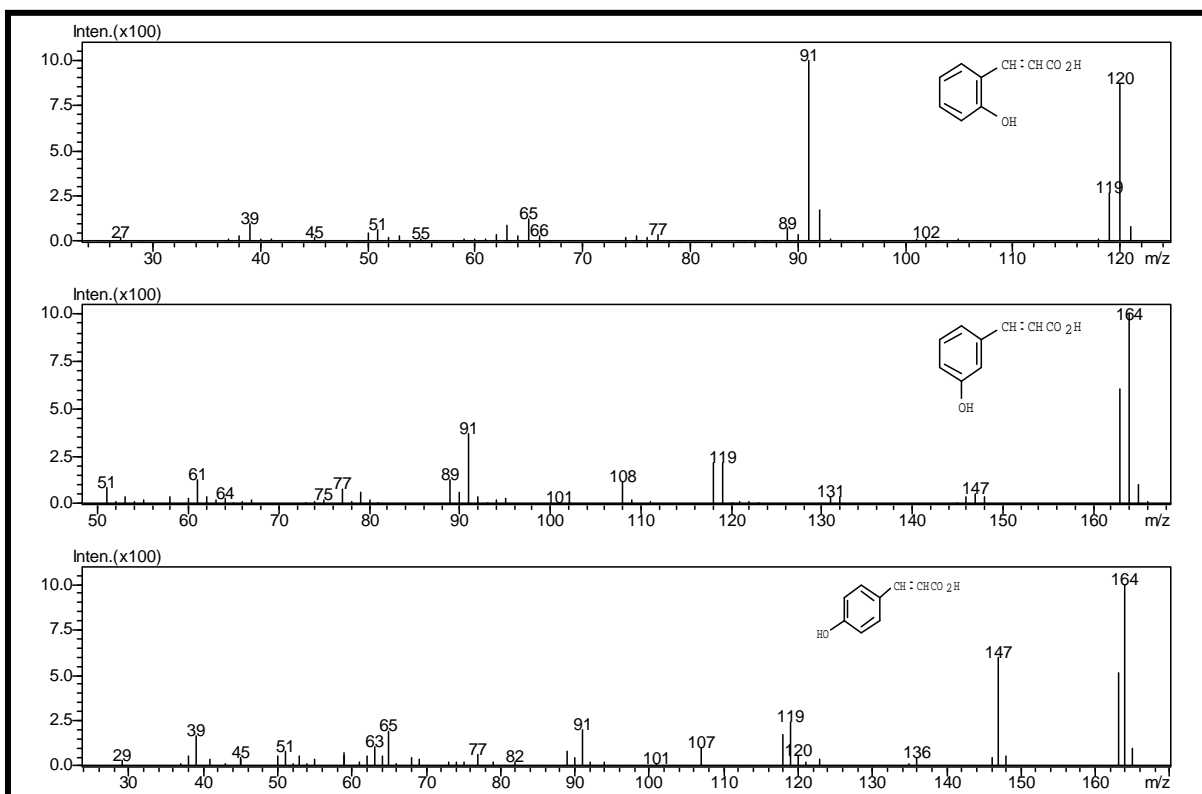


Figura 18. Espectro de Massas (IE) das substâncias ácido 2-hidroxicinâmico, ácido 3-hidroxicinâmico e ácido 4-hidroxicinâmico, obtidos da biblioteca Willey.

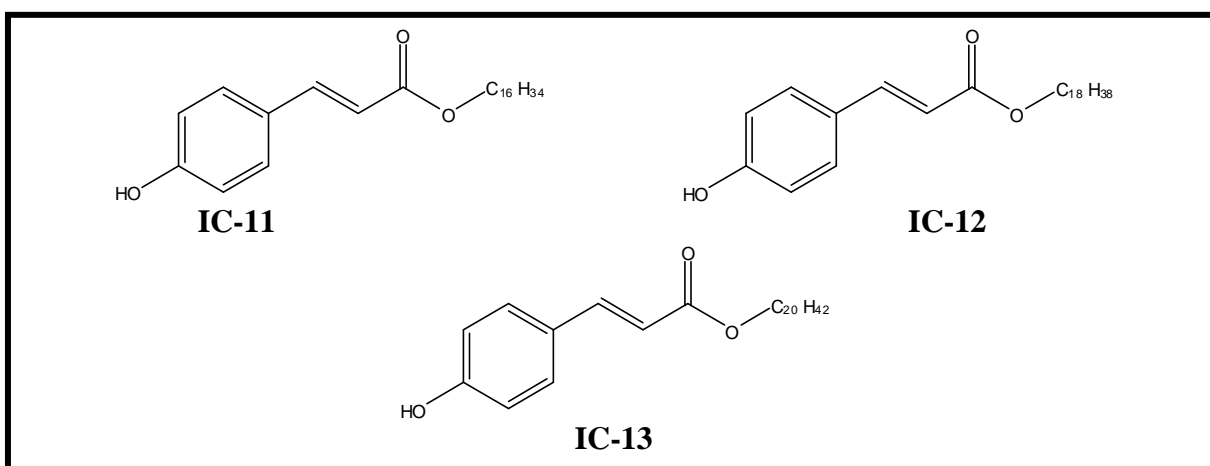


Figura 19. Ésteres graxos do ácido *p*-cumárico, identificados na fração hexânica de *I. chiliantha*.

4.3.2. Fração DCM

A fração DCM (2,5 g) foi fracionada em Sephadex LH-20, eluída com metanol, sendo obtidas 60 frações. Estas foram analisadas em CCDC (FM: metanol: diclorometano

5:95), e reveladas com os reagentes sulfato cérico, anisaldeído e Dragendorff, e UV 254 e 366 nm, sendo reunidas por similaridade, conforme apresentado na **Tabela 8**.

Tabela 8. Frações obtidas de CC da fração em DCM de *I. chiliantha*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-4	90,9	26	7,3
5-9	1415,2	27-29	14,3
10-12	190,6	30-38	29,8
13-15	153,5	39	15
16-19	134,5	40-46	6,3
20-24	108,0	47-56	1,9
25	11,8	57-60	1,2

A fração 5-9 foi submetida à cromatografia em coluna utilizando gel de sílica 60 como fase estacionária, eluída com misturas de hexano e acetato de etila em gradiente. A subfração 1-7 foi fracionada em coluna contendo gel de sílica 60 como fase estacionária, eluída com misturas de hexano e acetato de etila em gradiente. A fração 21-27 foi submetida à purificação em CLAE-UV-DAD (Condições de análise CLAE 2, página 28), obtendo-se a substância **IC-19** (**Figura 20**).

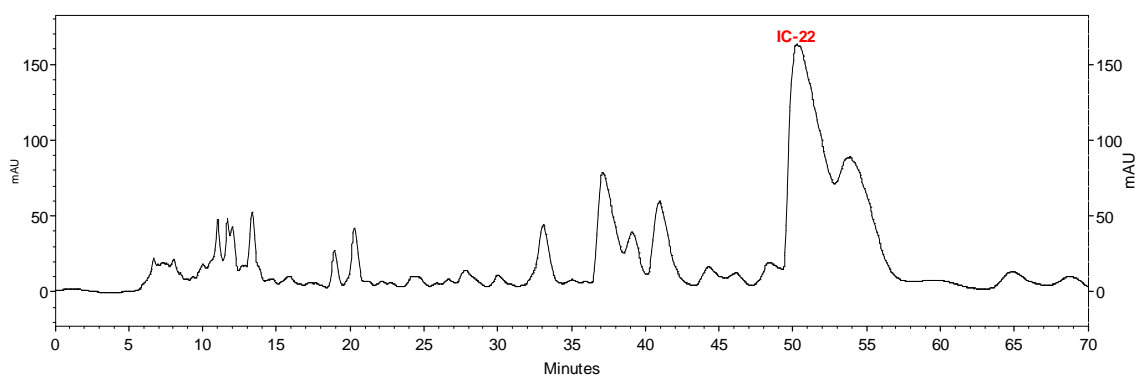


Figura 20. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (280 nm) da fração IC-DCM – 5-9[(1-7)-21-27)], obtido utilizando Condições de análise CLAE 2, página 28. O pico em 51,5 min. refere-se à substância **IC-19** (30,0 mg).

A fração 20-24 foi submetida à purificação por CCDC (FM metanol: diclorometânico 5:95), sendo obtida a substância **IC-20** (23,3 mg).

4.3.3. Fração AcOEt

A fração AcOEt (4,0 g) foi solubilizada em metanol, centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos, e submetida a fracionamento em coluna, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária, e metanol como eluente. Foram obtidas 96 frações, que foram analisadas por CCDC, eluídas com AcOEt: MeOH: Ác. Acético: Ác. Fórmico (100:27:11:11), reveladas com reagente Natural Products e UV 254 e 366 nm, e reunidas por similaridade, conforme apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 9. Frações obtidas de CC da fração em AcOEt de *I. chiliantha*.

<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>	<i>Frações</i>	<i>Massa (mg)</i>
<i>1-14</i>	54,6	<i>50</i>	98,1
<i>15-16</i>	20,4	<i>51-53</i>	447,3
<i>17-23</i>	151,2	<i>54</i>	95,2
<i>24-26</i>	111,1	<i>55-57</i>	199,6
<i>27-30</i>	103,9	<i>58-61</i>	116,7
<i>31-34</i>	58,5	<i>62-70</i>	268,0
<i>35-36</i>	31,9	<i>71-82</i>	220,9
<i>37-40</i>	82,1	<i>83-91</i>	175,9
<i>41-48</i>	312,1	<i>92-96</i>	2,4
<i>49</i>	72,3		

As frações reunidas foram analisadas em CLAE-UV-DAD (Condições de análise CLAE 1, página 27), para posterior otimização da separação cromatográfica das frações menos complexas, a fim destas serem submetidas à separação e isolamento em CLAE-UV-DAD utilizando coluna semi-preparativa C-18. As frações 37-40; 50; 58-61; 62-70; 71-82; 83-91 possibilitaram o isolamento e identificação das substâncias **IC-21** a **IC-30**, conforme apresentado desde a **Figura 21** até a **Figura 26**.

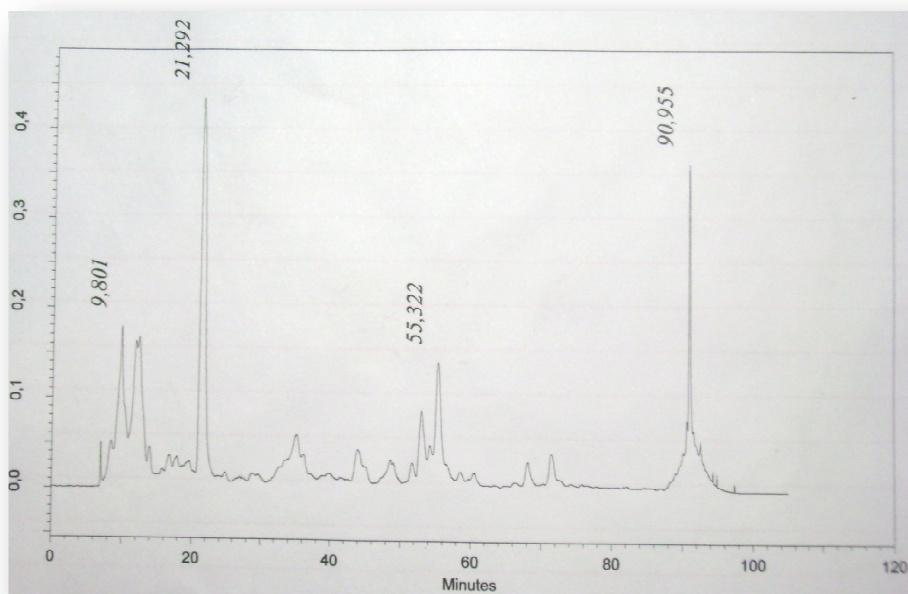


Figura 21. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 37-40, obtido utilizando Condições de análise CLAE 3, página 28. O pico em 21,293 min. refere-se à substância **IC-21** (9,0 mg).

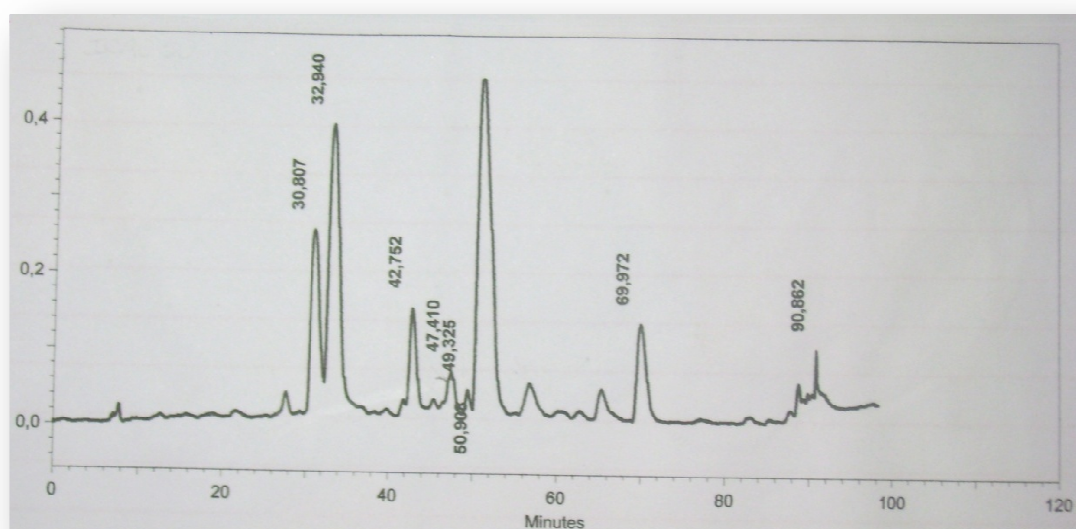


Figura 22. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 50, obtido utilizando Condições de análise CLAE 3, página 28. O pico em 42,752 min. refere-se à substância **IC-22** (3,5 mg), o pico em 50,902 min. refere-se à substância **IC-23** (20,9 mg), e o pico em 69,972 min. refere-se à substância **IC-24** (4,0 mg).

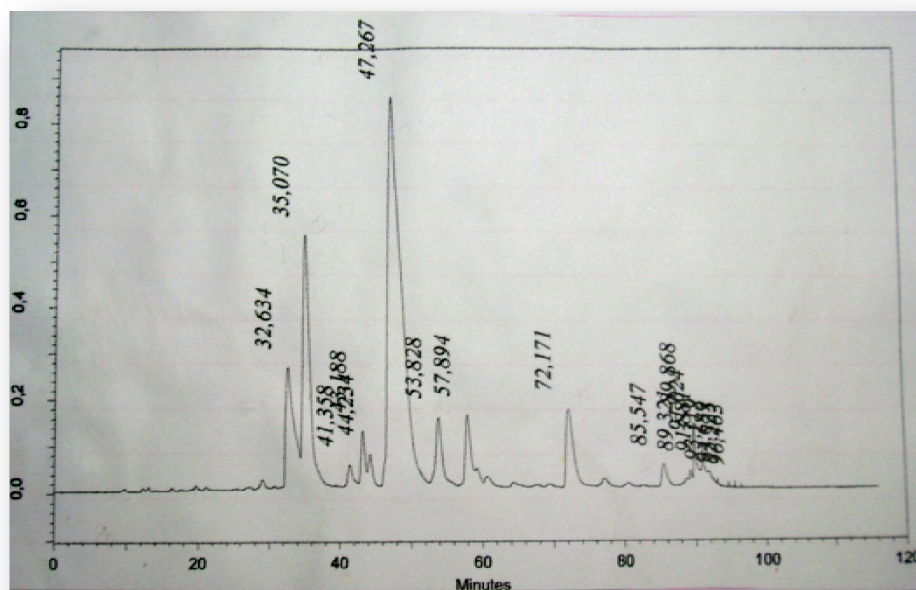


Figura 23. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 58-61, obtido utilizando Condições de análise CLAE 3, página 28. O pico em 35,070 min. refere-se à substância **IC-25** (17 mg), o pico em 47,267 min. refere-se à substância **IC-26** (30,7 mg).

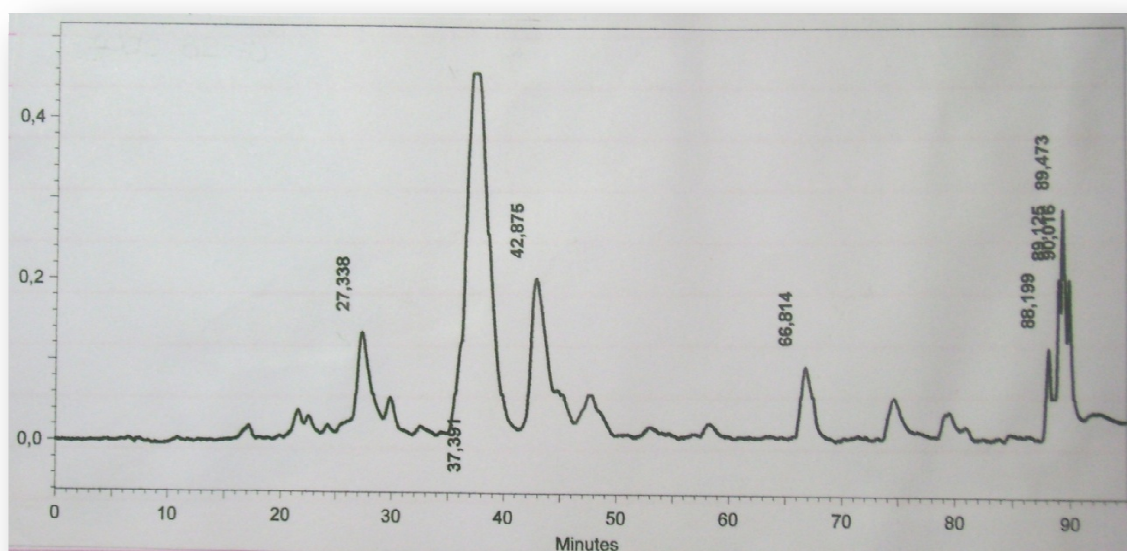


Figura 24. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 62-70, obtido utilizando Condições de análise CLAE 3, página 28. O pico em 37,391 min. refere-se à substância **IC-27** (85,1 mg).

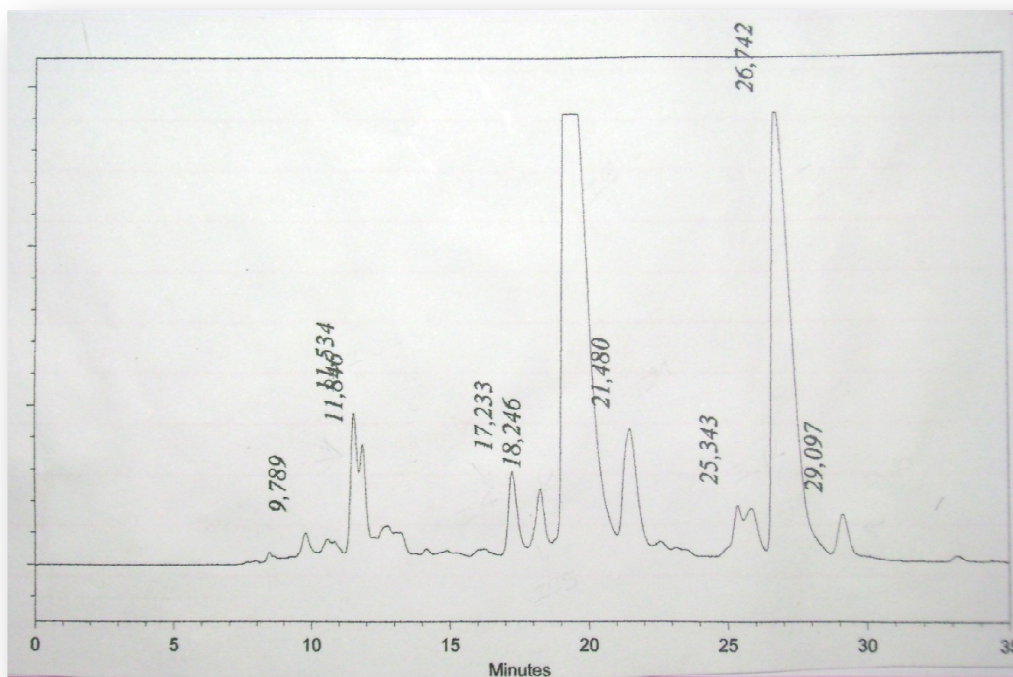


Figura 25. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 71-82, obtido utilizando Condições de análise CLAE 4, página 28. Os picos em 11,534 e 11,848 min. refere-se à substância **IC-27** (7,5 mg); 17,233 min. à substância **IC-30** (8 mg), 19,3 à substância **IC-28** (45 mg); 26,742 min. à substância **IC-29** (27 mg).

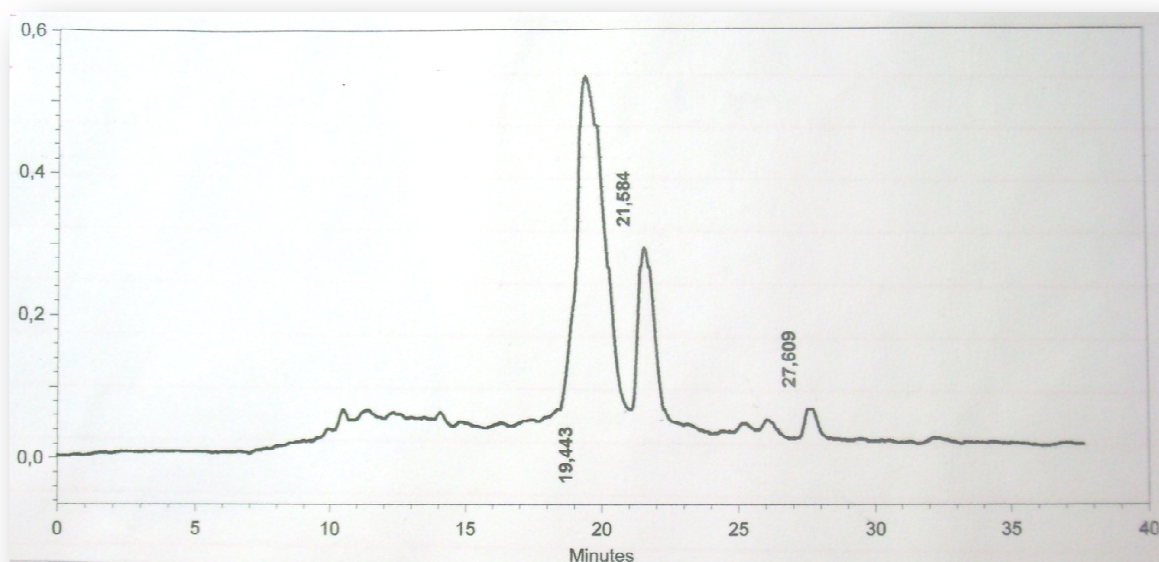


Figura 26. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração IC-AcOEt – 83-91, obtido utilizando Condições de análise CLAE 4, página 28. O pico em 19,443 min. refere-se à substância **IC-28** (44,3 mg).

4.3.4. Frações HA-MeOH e HA-H₂O

Estas frações foram analisadas segundo a metodologia apresentada no item 3.3.7, página 30, e os cromatogramas obtidos estão apresentados a seguir (**Figura 27** e **Figura 28**). Comparou-se os padrões de fragmentações e tempos de retenção relativos ao *n*-octadecano das substâncias que apresentaram espectros de massas similares aos das calisteginas, com aqueles obtidos na literatura (**Tabela 10**, **Figura 29**).

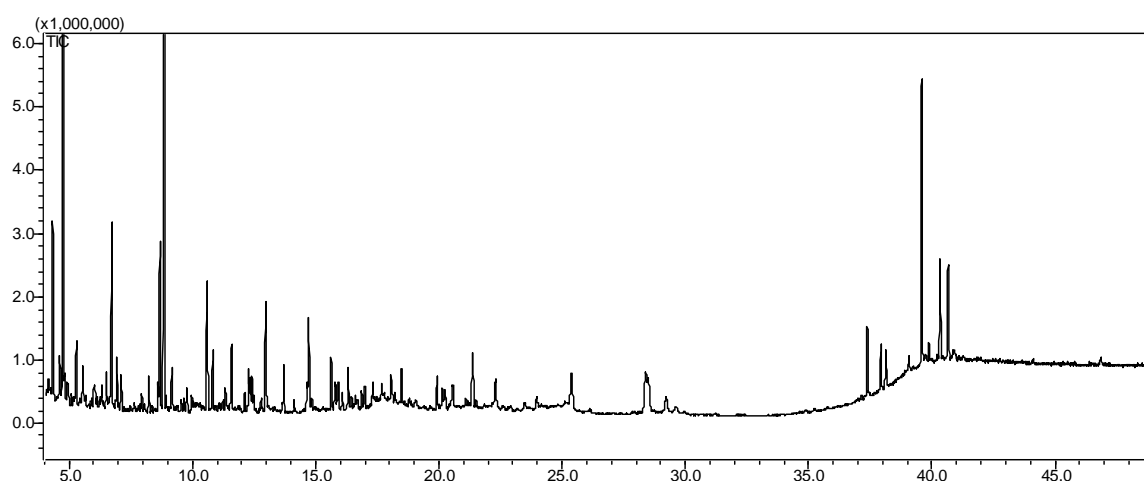


Figura 27. Cromatograma obtido em CG-EM da fração HA-H₂O de *I. chiliantha*, após purificação em resina Dowex-50 e sililação, utilizando *n*-octadecano como padrão interno e Condições de análise CG 3, página 27.

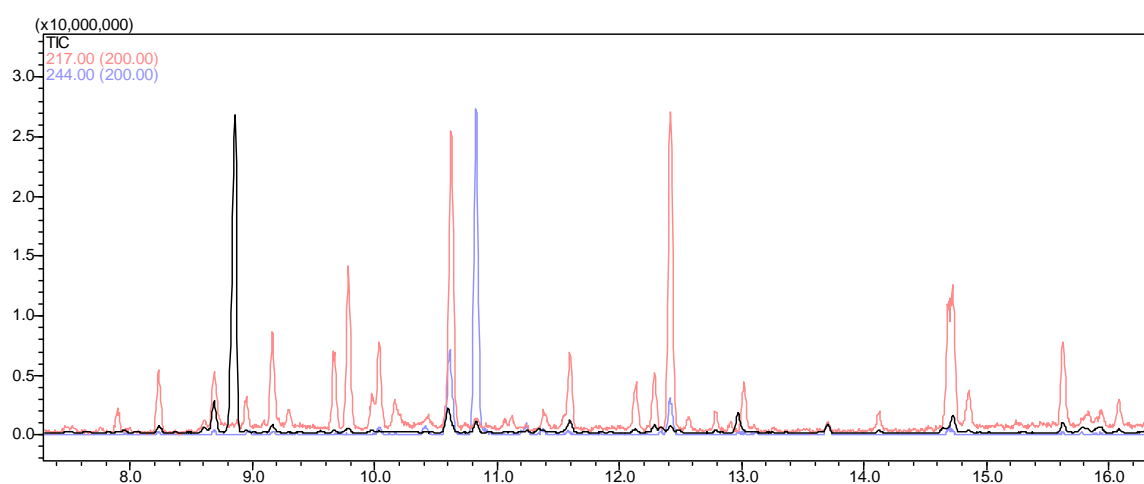


Figura 28. Expansão do cromatograma obtido em CG-EM da fração HA-H₂O de *I. chiliantha*, após purificação em resina Dowex-50 e sililação, utilizando *n*-octadecano como padrão interno, sendo os picos (—) e (—) referentes aos íons fragmentos m/z 217 e m/z 244, respectivamente, tendo suas intensidades multiplicadas por 200.

Tabela 10. Comparação entre os TRR e os fragmentos obtidos com os valores da literatura*.

Substância	T _{RR}	Fragmentos – Ionização por elétrons
Tetra-TMSi-calistegina	Lit**, 1,28	448 (1), 373 (6), 244 (50), 129 (51)
B1	Am*** 1,22	373 (9), 244 (50), 129 (52)
Tetra-TMSi-calistegina	Lit**, 1,16	448 (1), 373 (1), 284 (9), 259 (7), 244 (15), 217 (100) , 170 (9), 156 (12), 129 (5)
B4	Am*** 1,13	284 (7), 259 (6), 244 (12), 217 (100), 170 (8), 156 (8), 129 (3)

*Schimming *et al*, 1998 e Schimming *et al*, 2005. **Literatura. ***Amostra.

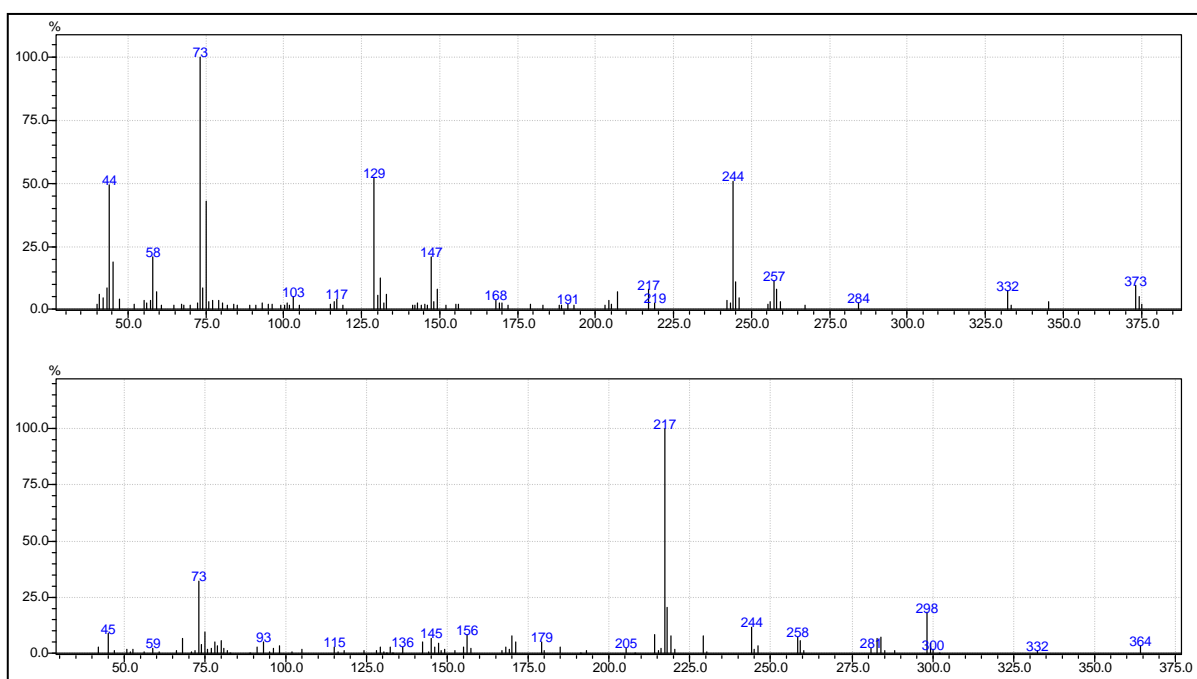


Figura 29. Espectros de Massas Espectro de massas (IE – 70 eV), das substâncias **IC-31** e **IC-32**, com tempos de retenção 10,825 min. e 10,035 min., obtido da análise por CG-EM, da fração HA-H₂O de *I. chiliantha*.

De acordo com o padrão de fragmentação e tempo de retenção relativo ao *n*-octadecano, identificou-se a presença da calistegina B1 (**IC-31**) e calistegina B4 (**IC-32**) (**Figura 30**). Não foi identificada a presença do alcaloide suainsonina.

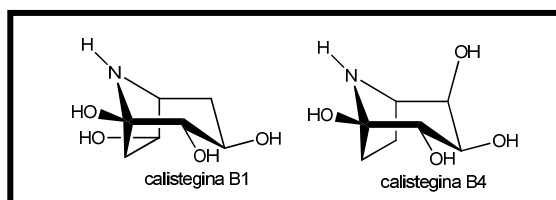
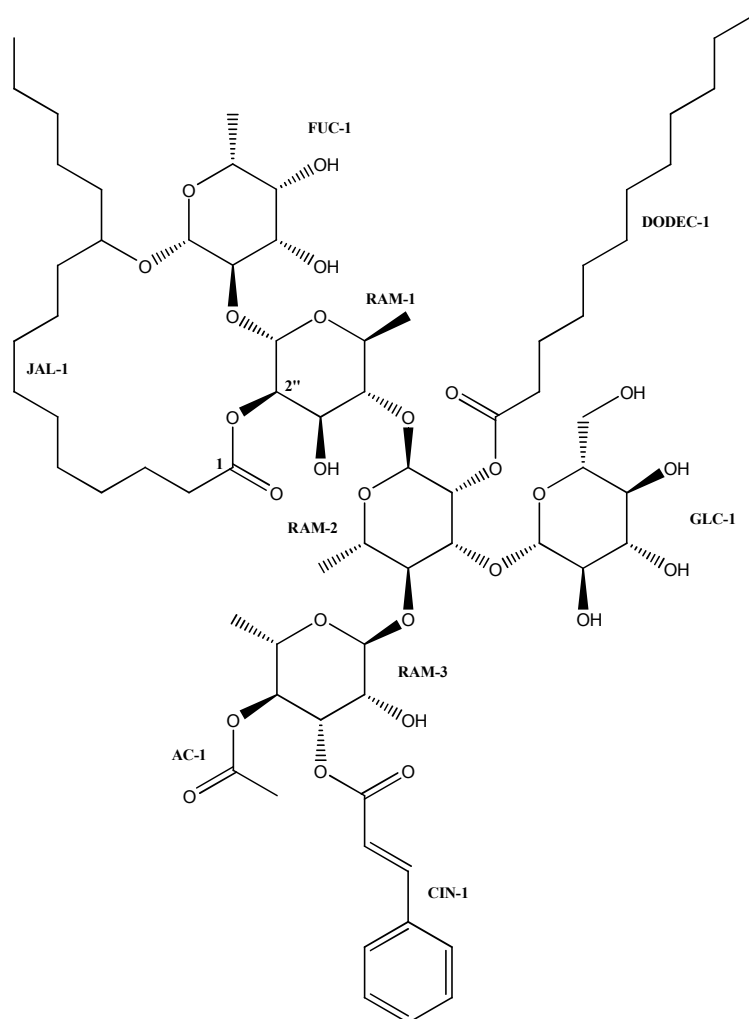


Figura 30. Estruturas das calisteginas B1 e B4, identificadas na fração hidro-alcoólica de *I. chiliantha*.

4.3.5. Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *I. chiliantha*.

Substância IC-19



Jalapinolato de 11-O-β-glucopiranosil-(1→3)-O-[3-O-trans-cinamoil-4-O-acetil-α-ramnopiranosil-(1→4)]-O-(2-O-n-dodecanoil)-α-ramnopiranosil-(1→4)-O-α-ramnopiranosil-(1→2)-β-fucopiranosido (éster intramolecular 1, 2'')

Tabela 11. Dados de RMN da substância **IC-19**.

Posição	δ H	δ C	HMBC (H→C)	$^1\text{H}-^1\text{H}$ - COSY
fuc-1	4,75, <i>d</i> (7,4)	104,5	70,9; 82,6	
2	4,17, <i>m</i> *	80,1		
3	4,09, <i>m</i> *	73,4	80,1	
4	4,01, <i>m</i> *	72,9		
5	3,78, <i>q</i> (6,5)	70,9	17,5; 72,9; 104,5	1,52
6	1,52, <i>d</i> (6,4)	17,5	70,9	3,78
ram-1	5,53; <i>sl</i>	98,6	69,1; 80,1	5,93
2	5,93, <i>m</i> *	73,8	173,2	5,03; 1,52
3	5,03, <i>dd</i> (9,7, 3,0)	69,1		4,15; 5,93
4	4,15, <i>m</i> *	82,5		5,03
5	4,79, <i>m</i> *	68,2		
6	1,67, <i>d</i> (6,0)	19,2	82,5	
ram-2	5,83; <i>d</i> (1,4)	100,3	68,6; 73,6; 80,0; 82,5	6,30
2	6,30, <i>m</i>	73,6		5,83; 4,80
3	4,80, <i>m</i> *	80,0		6,30
4	4,38, <i>m</i> *	78,9		
5	4,50, <i>m</i> *	68,6		1,67
6	1,67, <i>d</i> (6,0)	19,1	78,9; 68,6	4,50
ram-3	6,28, <i>sl</i>	103,2	73,3; 78,9; 68,3	5,24
2	5,24, <i>m</i> *	69,9	72,4; 166,5	6,28; 5,97
3	5,97, <i>dd</i> (10,0, 3,1)	73,3		5,24
4	6,06, <i>t</i> (9,7)	72,4	68,3, 73,3; 170,9; 17,9	4,38
5	4,38, <i>m</i> *	68,3		6,06; 1,44
6	1,44, <i>d</i> (6,1)	17,9	68,3; 72,4	4,38
glc-1	5,09, <i>d</i> (7,7)	105,6	80,0	3,98,
2	3,98, <i>m</i> *	75,2		5,09
3	4,10, <i>m</i> *	78,4		
4	3,94, <i>m</i> *	71,6		
5	3,83, <i>m</i> *	78,2		
6a	4,11, <i>m</i> *	62,9		
6b	4,37, <i>m</i> *			
jal-1		172,6		
2a	2,32, <i>m</i> *	34,0	172,6	
2b	2,51, <i>m</i>			
11	3,88, <i>m</i> *	82,6	104,5	1,9; 1,7
16	0,89, <i>t</i> (6,8)	14,4		
dodec-1		173,2		
2	2,36, <i>m</i> *			
12	0,89, <i>t</i> (6,8)	14,4		
Ac-1		170,3		
2	2,15, <i>s</i>	20,8	170,3	
Cin-1		166,8		
2	6,62, <i>d</i> (16,0)	118,6	134,4	
3	7,88, <i>d</i> (16,0)	145,6	166,8; 128,7	
1'		134,8		
2'/6'	7,43, <i>m</i>	128,7	145,6; 130,9	
3'/5'	7,36, <i>m</i> *	129,4		
4'	7,36, <i>m</i> *	130,9		

500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C NMR em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Os deslocamentos químicos (δ) estão em ppm relativos ao TMS. As constantes de acoplamento (J) estão em parênteses (Hz). Os deslocamentos químicos marcados com asterisco (*) indicam sinais sobrepostos. Abreviações: fuc = fucose; ram = rarnose; glc = glicose; jal = 11-hidroxihexadecanol; dodec = dodecanoil; Ac = acetil; Cin = *trans*-cinamoil.

A substância **IC-19** [$\alpha_D^{25} = -24,4^\circ$] (c 0,532, MeOH) foi obtida como um sólido amorfo. Os espectros de massas de alta resolução (**Figura 38** e **Figura 39**) estabeleceu sua fórmula molecular como $C_{69}H_{110}O_{26}$ [(modo negativo) m/z $[M - H]^-$ 1353,7296 (calcd. para $C_{69}H_{109}O_{26}$, 1353,7207, erro -6,5 ppm) e (modo positivo) m/z $[M+Na]^+$ 1377,7232 (calcd. para $C_{69}H_{110}O_{26}Na$, 1377,7183, erro -3,5 ppm)], de acordo com a estrutura proposta. No espectro de RMN de ^{13}C (**Tabela 11** e **Figura 34**), a presença de cinco sinais de carbonos anoméricos entre δ 98 – 105 indicaram o número de unidades de monossacarídeos formadoras da substância. O espectro de RMN de 1H apresentou 2 tripletos metílicos em δ 0,89 e muitos sinais de metilenos entre δ 1,6 – 2,1; um grupo *trans*-cinamoil, o qual foi confirmado pelo acoplamento *trans* dos hidrogênios olefínicos em δ 6,62 (d , 16,0 Hz) e 7,88 (d , 16,0 Hz) e hidrogênios aromáticos entre δ 7,36-7,43 (m , 5H); cinco hidrogênios anoméricos em δ 5,53; 5,83; 6,28; 4,75 e 5,09, juntamente com quatro grupos metílicos (δ 1,52, d , 6,4 Hz; δ 1,67, d , 6,0 Hz; δ 1,67, d , 6,0 Hz e δ 1,44, d , 6,1 Hz) sugerindo a presença de quatro unidades de metilpentoses; e quatro hidrogênios não anoméricos, desblindados paragneticamente em δ 5,93, 6,30, 5,97 e 6,07, sugerindo a presença de grupos esterificantes. Os valores das constantes de acoplamento para os hidrogênios anoméricos foram consistentes com três unidades de ramnose (δ 5,53, sl ; δ 5,83, d , 1,4 Hz; δ 6,28, sl), uma unidade de fucose (δ 4,75, d , 7,4 Hz) e uma unidade de glicose (δ 5,09, d , 7,7 Hz) (**Figura 33**). Extensivas análises dos dados dos espectros unidimensionais e bidimensionais confirmaram estas propostas (**Figura 35**, **Figura 36** e **Figura 37**). As configurações dos hidrogênios anoméricos das unidades de açúcar foram determinadas ser β para as unidades fucopiranosil e glicopiranosil, e α para as unidades ramnopiranosil, por comparação com valores relatados para os correspondentes resíduos nos oligossacarídeos (CASTAÑEDA-GOMEZ, PEREDA-MIRANDA, 2011). Atribuições detalhadas dos sinais de hidrogênios e carbonos foram sequencialmente atribuídas por combinação das técnicas bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC.

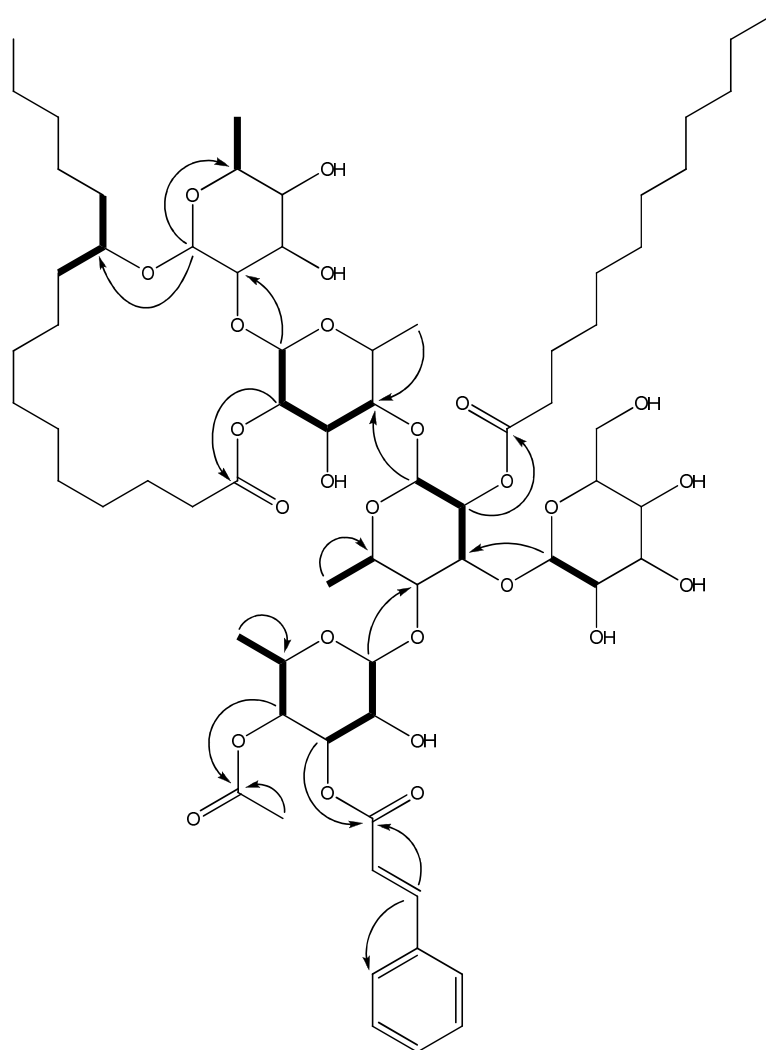


Figura 31. Principais correlações dos mapas de contorno do HMBC (\rightarrow) e ^1H - ^1H COSY (—) para a substância **IC-19**.

As conectividades interglicosídicas foram estabelecidas pelas correlações nos mapas de contorno do HMBC do H-1 da ramnose-1 (δ 5,53) com C-2 da fucose (δ 80,1); H-1 da ramnose-2 (δ 5,83) com C-4 da ramnose-1 (δ 82,5); H-1 da ramnose-3 (δ 6,28) com C-4 da ramnose-2 (δ 78,9), e H-1 da glicose (δ 5,09) com C-3 da ramnose-2 (δ 80,0) (**Figura 31**). A proposta da presença de grupos esterificantes foi comprovada pelos carbonos δ 172,6, 173,2, 170,3 e 166,8. As posições das esterificações foram estabelecidas pelas correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC. H-4 da ramnose-3 (δ 6,06) correlacionou com o carbono δ 170,3, e este carbono correlacionou com um grupo metílico em δ 2,15, singlete, indicando a presença de um grupo acetil nesta posição. H-3 da ramnose-3 (δ 5,97) correlacionou com o carbono δ 166,8, e este carbono quaternário correlacionou com o hidrogênio olefínico δ 7,88, *d*, 16,0 Hz, o qual pertence à porção *trans*-cinamoil. H-2 da ramnose-1 correlacionou com a carbonila em δ 172,6, e este carbono correlacionou com os

hidrogênios diastereotópicos em δ 2,51 e δ 2,32, indicando o sítio de lactonização do ácido jalapινόico devido a algumas restrições conformacionais deste resíduo de ácido graxo. A presença de ácido jalapινόico nas resinas glicosídicas já foi relatada em estudos prévios do gênero *Ipomoea*. Além disso, o espectro de RMN de ^{13}C apresentou um carbono metínico oxigenado adicional em δ 82,6, correspondente a um átomo de carbono conectado ao sinal em δ 3,88 nos mapas de contorno do HSQC. Este hidrogênio correlacionou com um carbono anomérico em δ 104,5, da porção fucopiranosil, nos mapas de contorno do HMBC, e com hidrogênios metilênicos entre δ 1,7-1,9 no espectro de COSY. Estes dados estão em acordo com a presença do ácido jalapινόico na estrutura, sendo sustentado pela observação do íon fragmento em m/z 417 no Espectro de Massas (ESIMS/MS - modo negativo) (**Figura 40** e **Figura 32**). Este íon diagnóstico (calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{O}_7$)⁻ foi formado pela ruptura da ligação glicosídica entre as unidades de fucose e ramnose-1, juntamente com a ruptura da ligação éster no sítio de lactonização. A configuração absoluta do grupo hidroxila do ácido jalapινόico não foi determinada, entretanto somente grupo hidroxila com configuração (*S*) nos ácidos graxos das resinas glicosídicas foram relatadas até o momento (PEREDAMIRANDA *et al*, 2010). Finalmente, H-2 da ramnose-2 correlacionou com um carbono em δ 173,2, e este carbono correlacionou com os hidrogênios metilênicos em δ 2,36. Esta posição esterificada representou a localização da ligação éster adicional para o grupo *n*-dodecanoil, como confirmado pelo íon fragmento em m/z 1172, o qual foi produzido pela clivagem deste éster lipofílico representado pela perda de 182 unidades de massa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}$)⁻ (**Figura 32**).

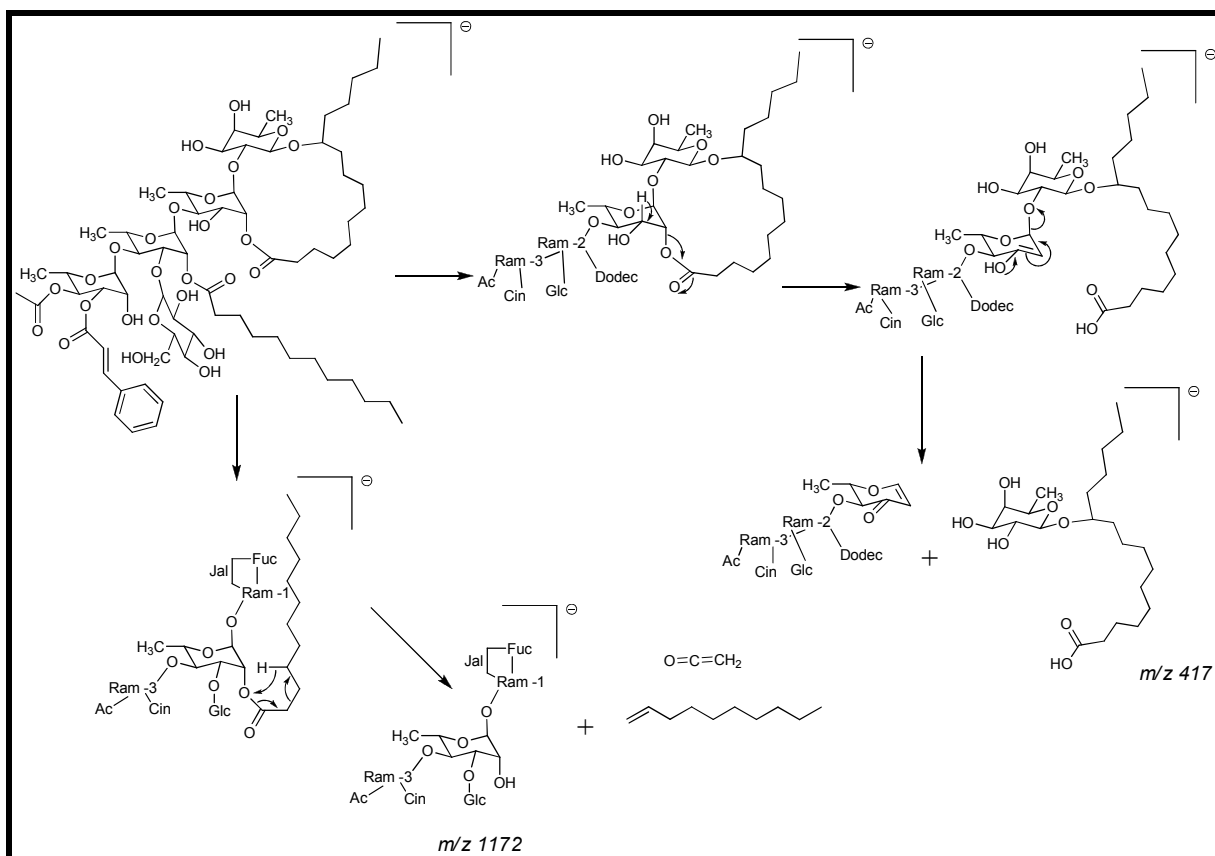


Figura 32. Proposta de fragmentação (ESI-MS/MS) da substância IC-19, para a formação dos íons m/z 417 e m/z 1172.

A substância IC-19 foi identificada como jalapinato de 11-O-β-glucopiranosil-(1→3)-O-[3-O-trans-cinamoil-4-O-acetil-α-ramnopiranosil-(1→4)]-O-(2-O-n-dodecanoil)-α-ramnopiranosil-(1→4)-O-α-ramnopiranosil-(1→2)-β-fucopiranosido (éster intramolecular 1, 2'').

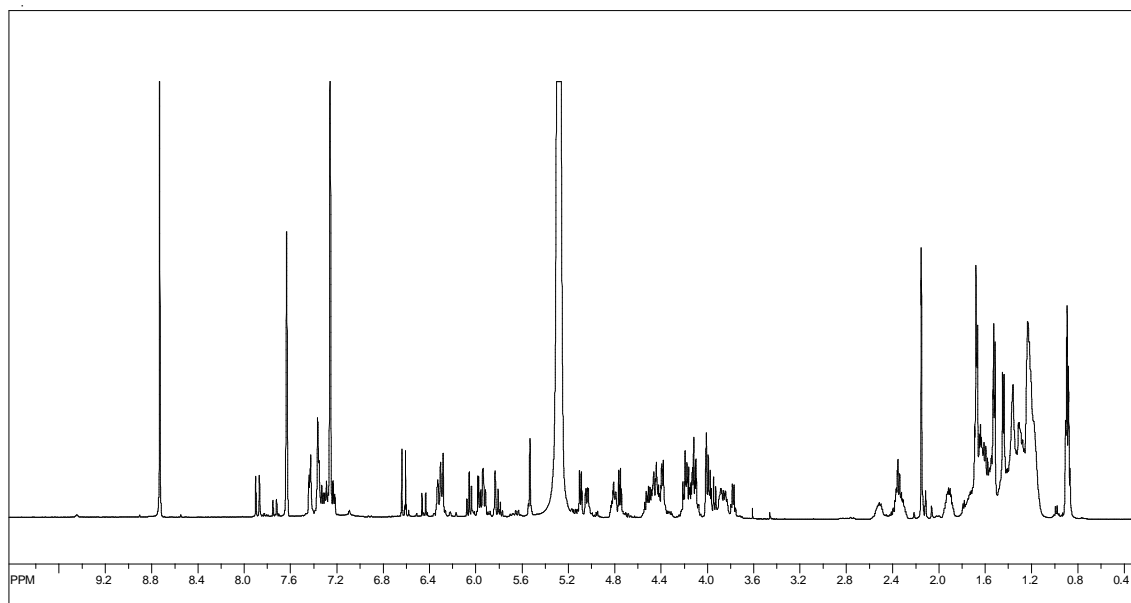


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ -TMS) da substância **IC-19**.

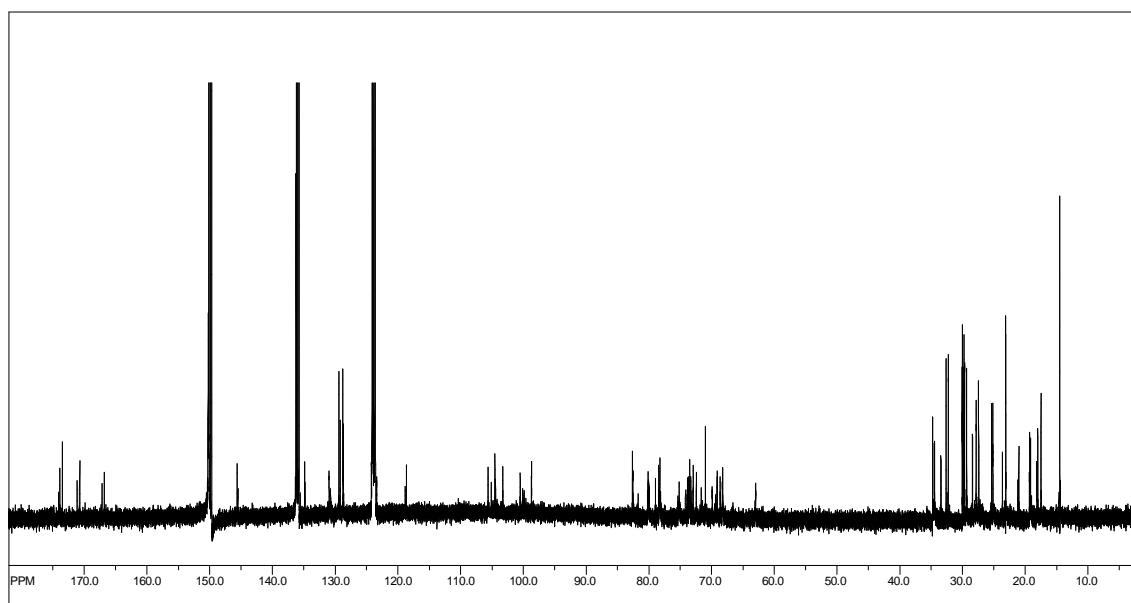


Figura 34. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ -TMS) da substância **IC-19**.

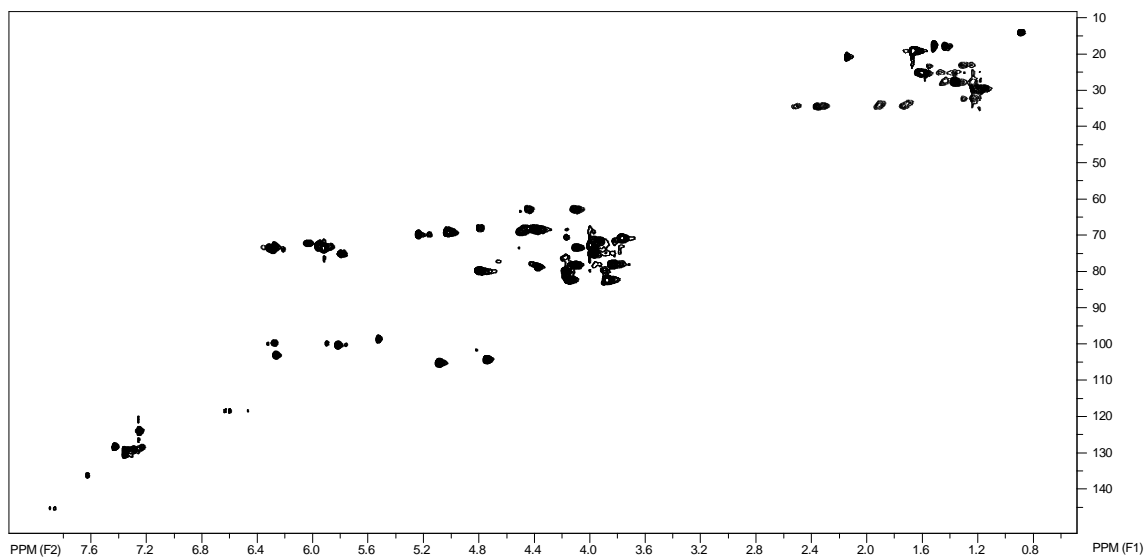


Figura 35. Mapa de contorno do HSQC (125 MHz/500 MHz; C_5D_5N - TMS) da substância IC-19.

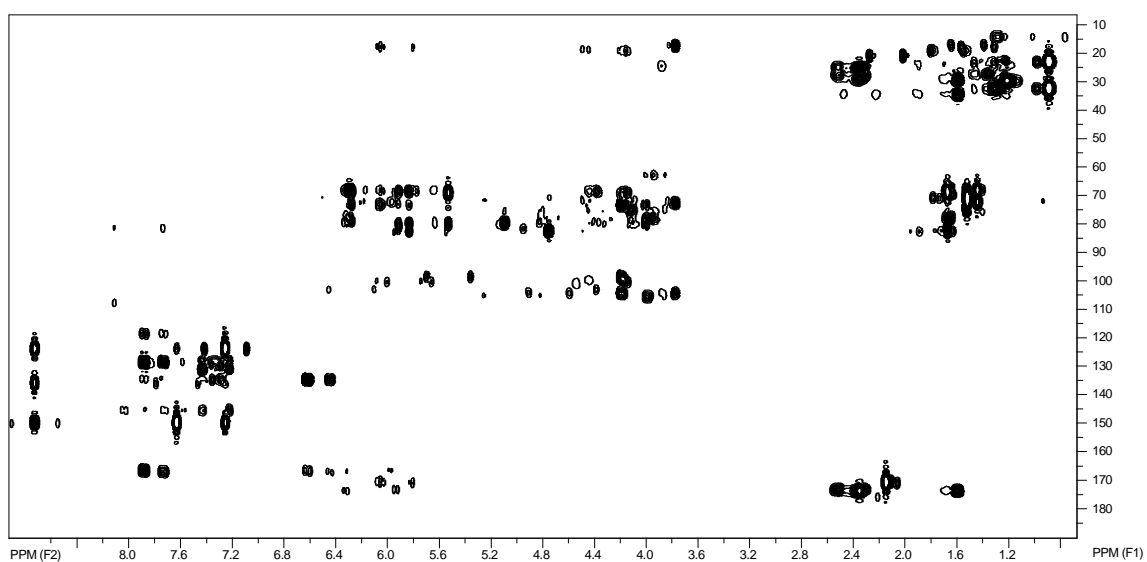


Figura 36. Mapa de contorno do HMBC (125 MHz/500 MHz; C_5D_5N - TMS) da substância IC-19.

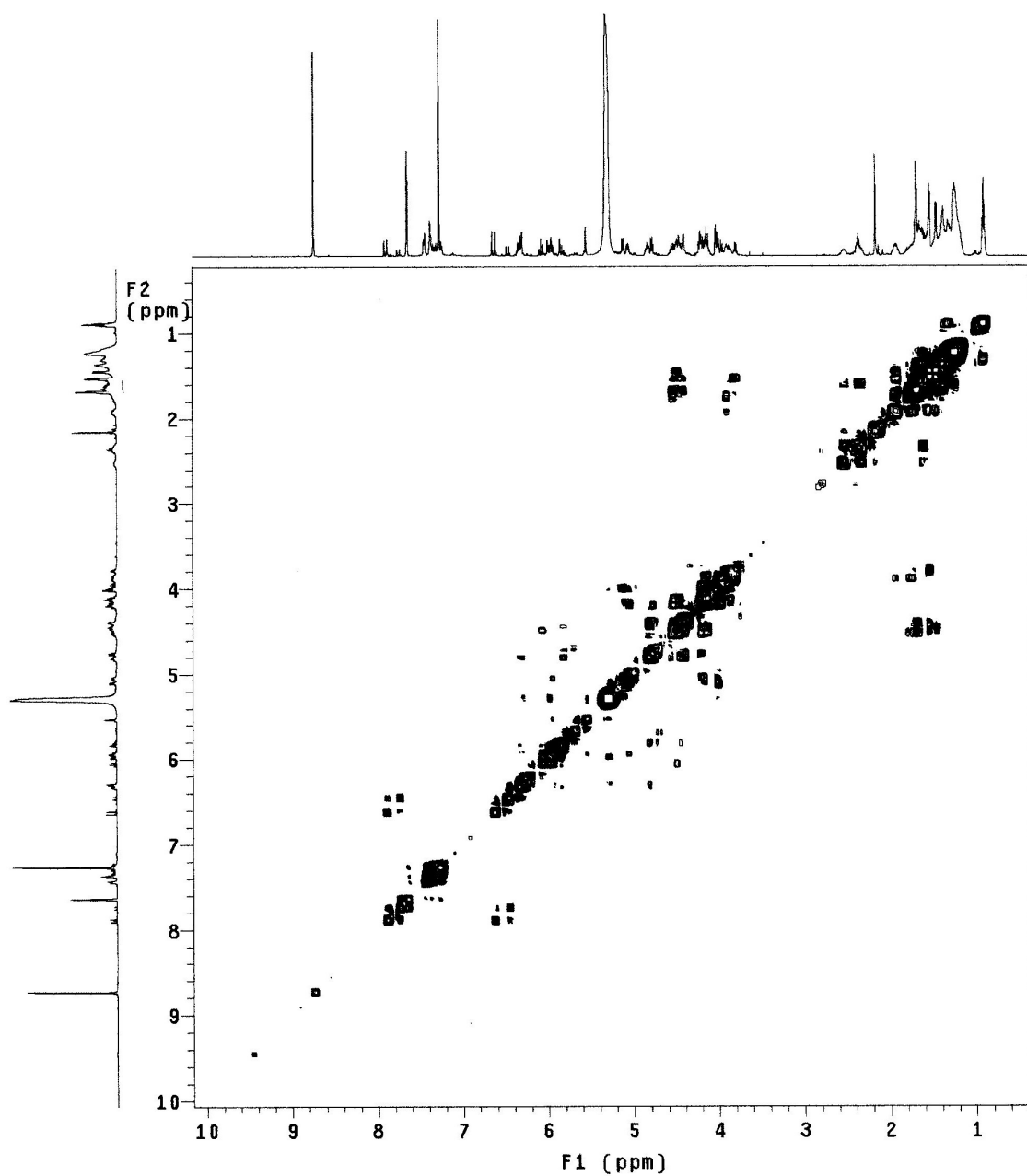


Figura 37. Espectro de RMN ¹H-¹H COSY (500 MHz, C₅D₅N) da substância **IC-19**.

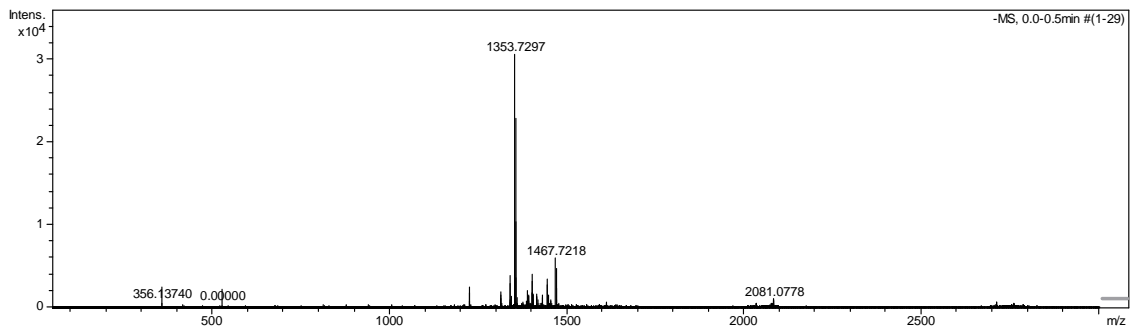


Figura 38. Espectro de massas de alta resolução da substância IC-19 (Ionização por “Electrospray” (modo negativo)).

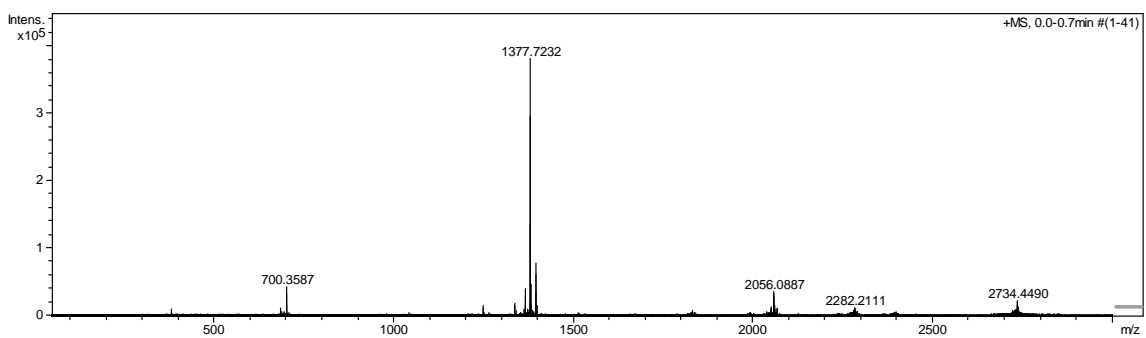


Figura 39. Espectro de massas de alta resolução da substância IC-19 (Ionização por “Electrospray” (modo positivo)).

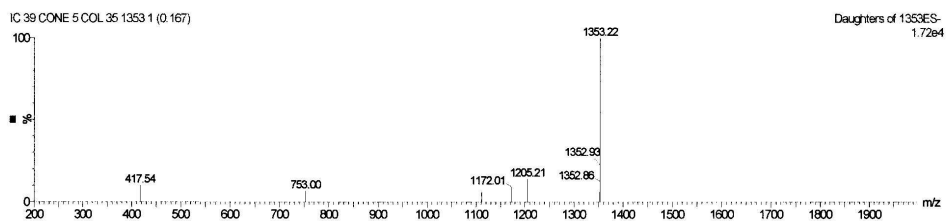
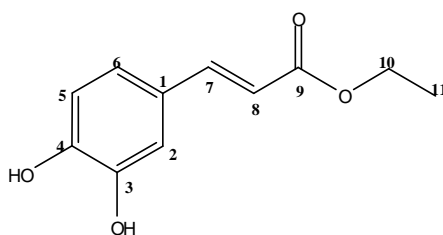


Figura 40. Espectro de massas da substância IC-19 (Ionização por “Electrospray”-MS/MS (modo negativo)).

Substância IC-20



Cafeoato de etila

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz) da substância IC-20, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	δ ^{13}C	HMBC	Literatura*
1		126,0		
2	7,04; d ; 1,8	115,5	C-4; C-6	7,03; d ; 2,0
3		146,8		
4		150,0		
5	6,75; d ; 8,1	116,8	C-1; C-3	6,75; d ; 8,0
6	6,99; dd ; 1,6; 8,1	122,3	C-2; C-4	6,98; dd ; 2,0; 8,0
7	7,46; d ; 15,9	146,0	C-2; C-6	7,46; d ; 16,0
8	6,25; d ; 15,9	114,5	C-1; C-9	6,24; d ; 16,0
9		167,6		
10	4,14; q ; 7,1	60,6	C-9; C-11	4,14; q ; 7,2
11	1,22; t ; 7,1	15,1	C-10	1,22; t ; 7,2

*SHI *et al.*, 2008.

O espectro de RMN de ^1H apresentou hidrogênios na região de aromáticos (δ 7,04; d ; 1,8 Hz; δ 6,75; d ; 8,1 Hz; δ 6,99; dd ; 1,6 e 8,1 Hz), hidrogênios de ligação dupla *trans* (δ 7,46; d ; 15,9 Hz e δ 6,25; d ; 15,9 Hz), além de uma porção $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ (δ 4,14; q ; 7,1 Hz - 2H; e δ 1,22; t ; 7,1 Hz - 3H), sendo esta ligada a grupo elétron-sacador, devido à desblindagem do CH_2 (Tabela 12).

Comparando-se aos dados da literatura, propôs-se tratar do cafeoato de etila, comumente encontrada nos vegetais. O espectro de RMN de ^{13}C , juntamente com espectros bidimensionais, e espectros de massas, confirmam a estrutura proposta (Figura 41-Figura 46).

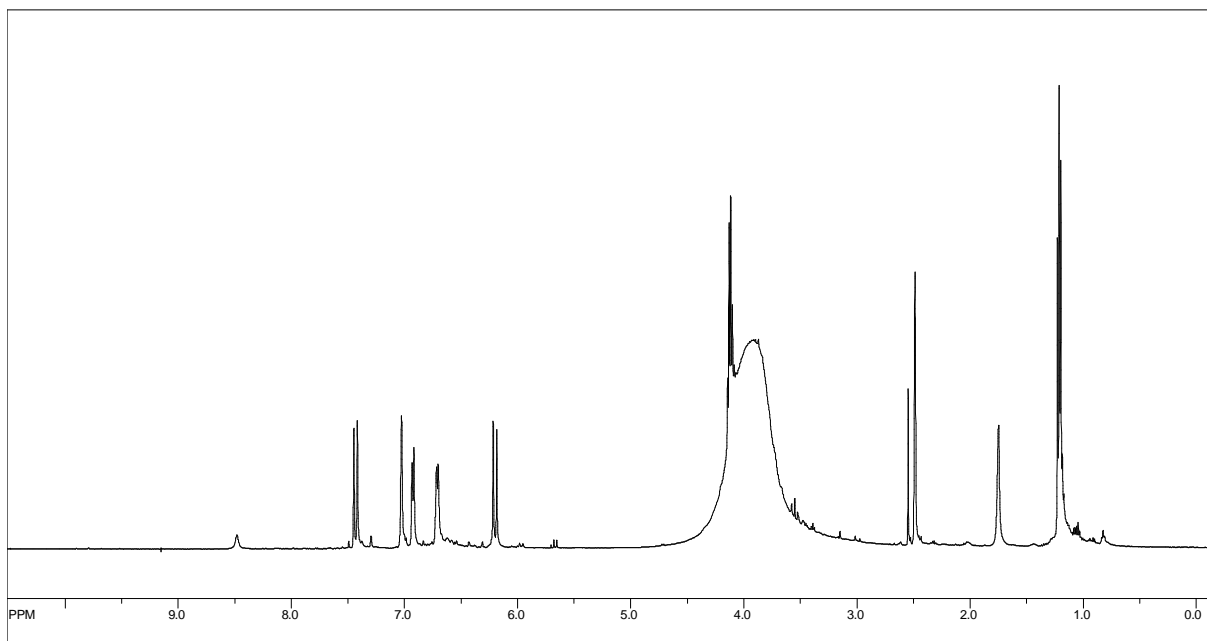


Figura 41. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz) da substância **IC-20**.

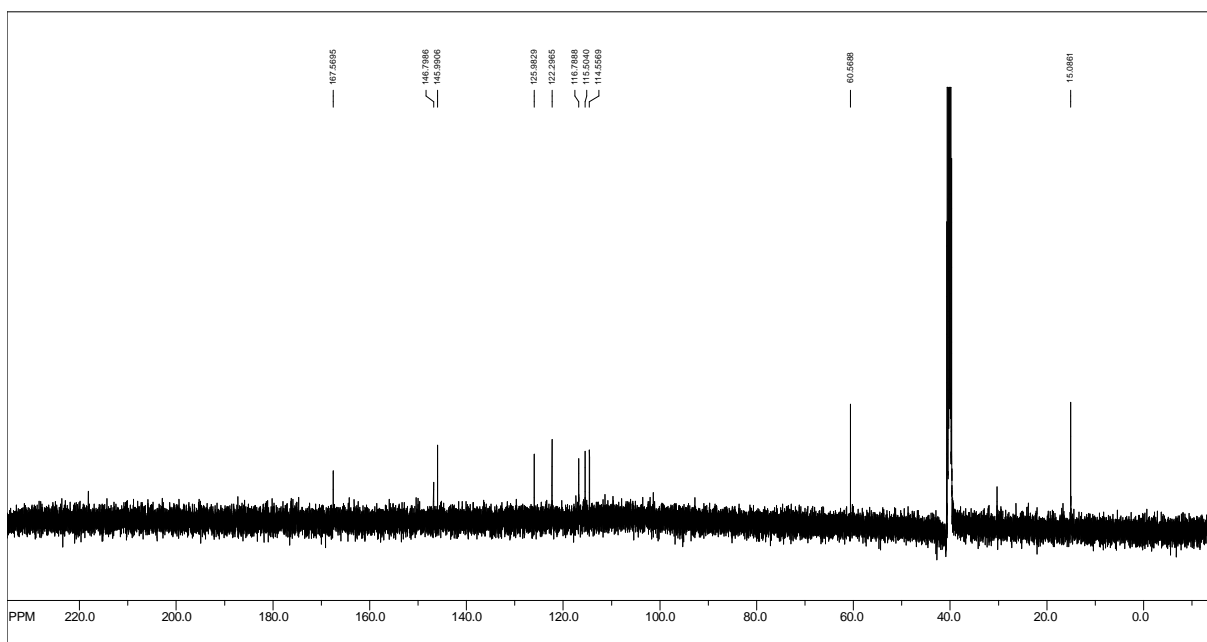


Figura 42. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **IC-20**. (DMSO- d_6 – 125 MHz).

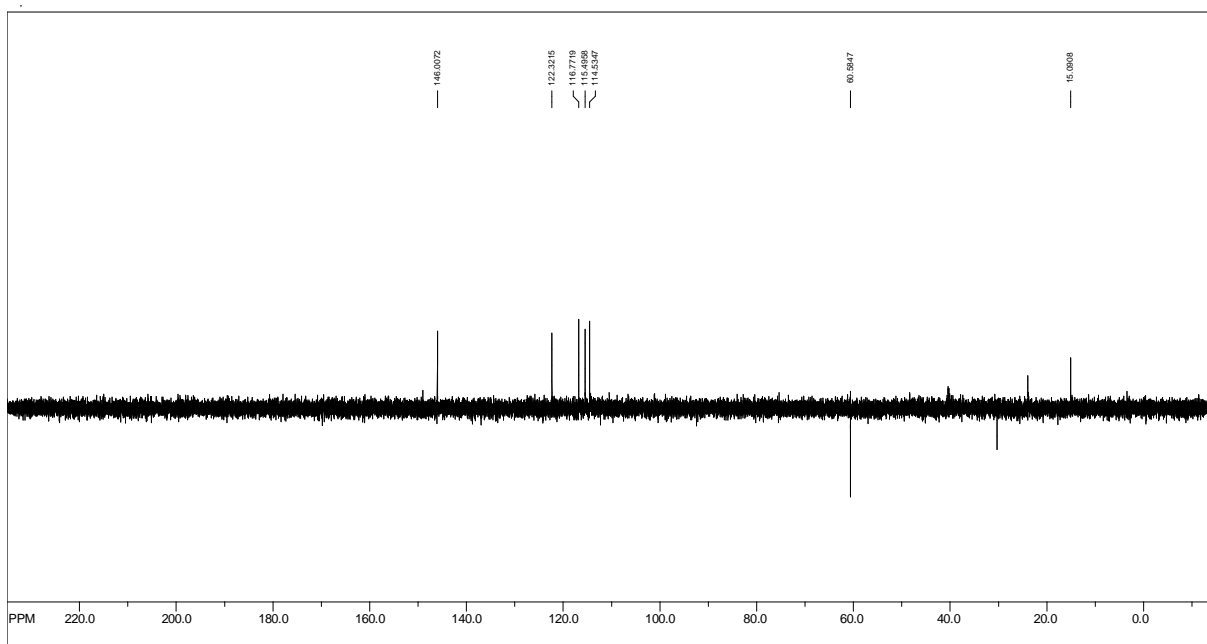


Figura 43. Dept 135° da substância **IC-20**. (DMSO-d₆ – 125 MHz).

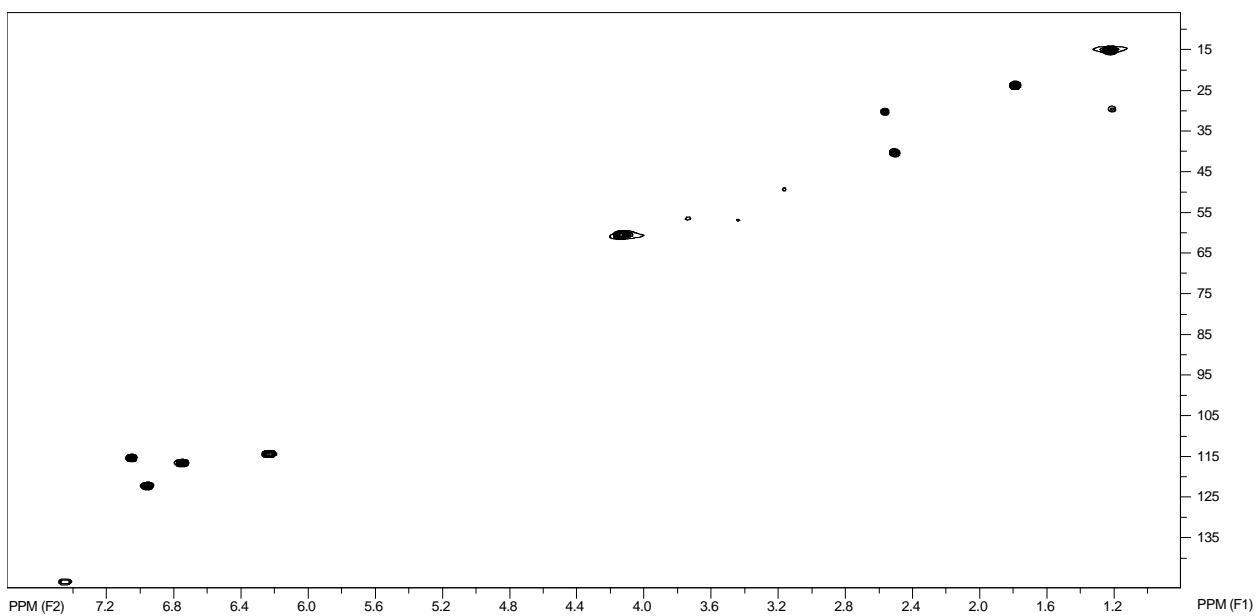


Figura 44. Mapa de contorno do HMQC da substância **IC-20**. (DMSO-d₆ – TMS – 500 e 125 MHz).

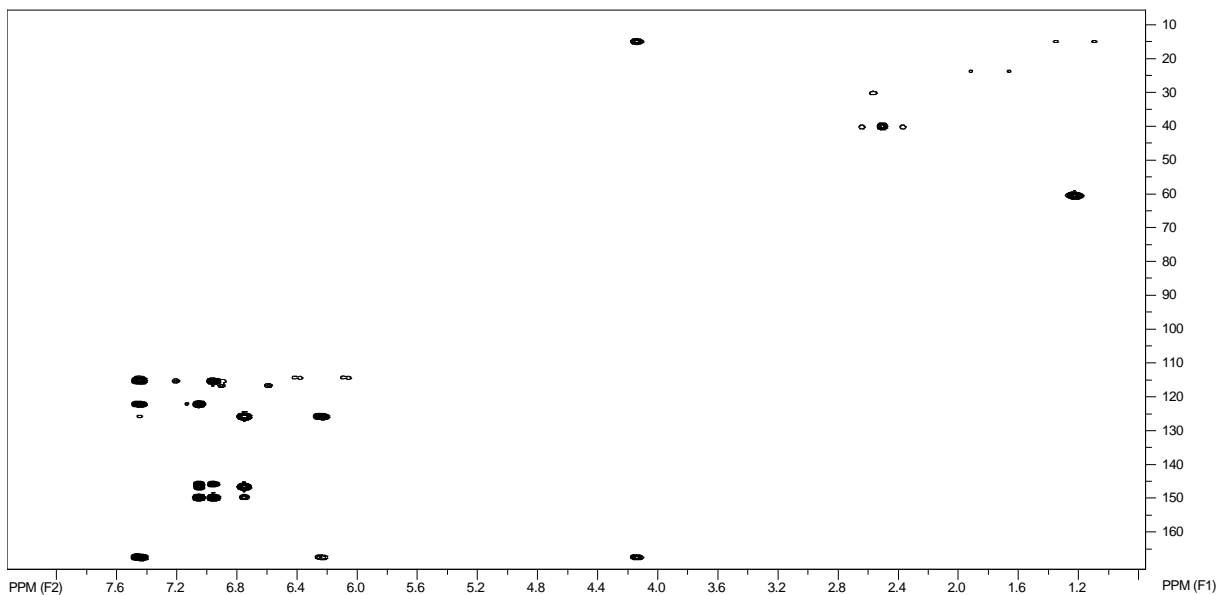


Figura 45. Mapa de contorno do HMBC da substância **IC-20**. (DMSO-d₆ – TMS – 500 e 125 MHz).

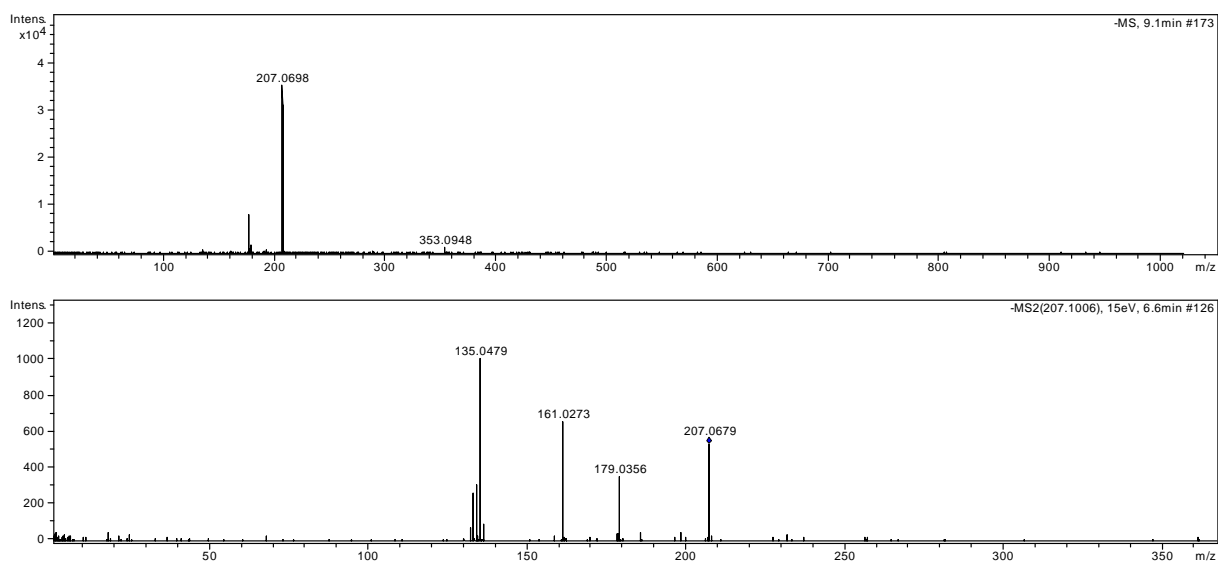


Figura 46. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-20** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 207 u (15 eV)).

Derivados cafeoilquínicos – Substâncias IC-21 a IC-29.

As substâncias isoladas IC-21 – IC-29, de *I. chiliantha*, são fenilpropanoides derivados do ácido quínico. A identificação estrutural foi realizada por análise dos espectros de RMN de ^1H , e por dados de espectrometria de massas. A esterificação do ácido quínico com a porção fenilpropanoídica pode ocorrer em R_1 , R_3 , R_4 ou R_5 , podendo haver derivados mono, di, tri, ou tetra substituídos (**Figura 47**). No espectro de RMN de ^1H , o número de esterificações é facilmente observado, tanto pelo número de hidrogênios na região de aromáticos (δ 6,5 – 7,5), quanto pelo número de hidrogênios da ligação dupla *trans* da porção fenilpropanoídica (δ 7,4-7,6; *d*; 16 Hz e δ 6,1-6,4; *d*; 16 Hz). Quanto ao padrão de substituição destes derivados, estes são atribuídos por comparação dos deslocamentos químicos dos hidrogênios das posições 3, 4 e 5 do ácido quínico, nos quais as esterificações promovem uma desblindagem para a região de δ 4,5 – 5,7. As posições das esterificações também são identificadas pelo padrão de fragmentação (ESI-MS-MS), conforme o esquema hierárquico proposto por Clifford e colaboradores, 2003, e revisado por Clifford e colaboradores, 2005. Outra observação importante referente a estas substâncias é em relação a possíveis metilações, as quais podem ocorrer em R (esterificação do ácido quínico) ou em R' (metoxilação da porção fenilpropanoídica). Dados de RMN de ^1H são eficientes para estas análises, devido às diferenças entre os deslocamentos químicos destes grupamentos metílicos (R = δ 3,7 e R' = δ 3,8-3,9). Também, em um recente estudo de fragmentações, por Espectrometria de Massas, de derivados ésteres metílicos dos ácidos cafeoilquínicos, também foi proposto como identificar e discriminar estes derivados (JAISWAL, KUHNERT, 2011). Todas as substâncias isoladas neste estudo que apresentaram sinal de metila no espectro de RMN de ^1H estavam esterificadas em R. Os dados referentes a estes derivados fenilpropanoides isolados estão apresentados nas tabelas e figuras a seguir.

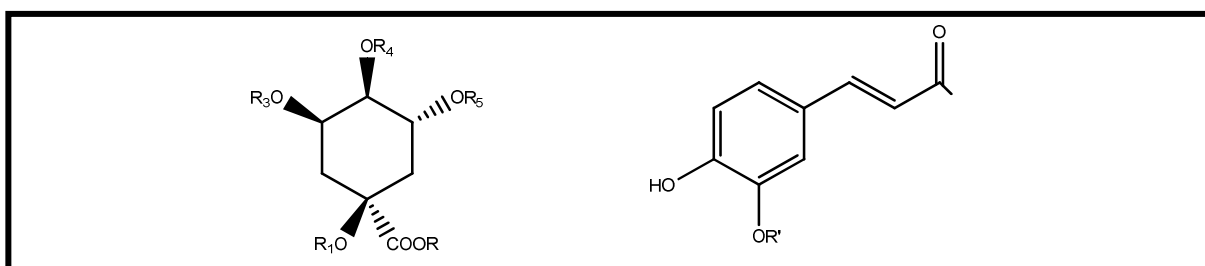
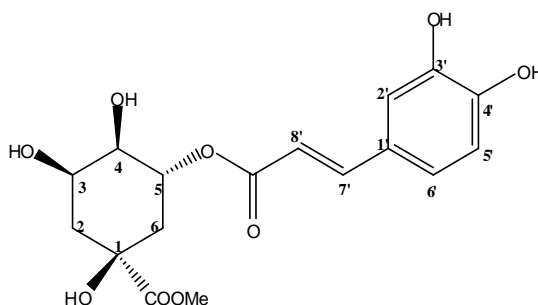


Figura 47. Estruturas do ácido quínico e da porção fenilpropanoide.

Substância IC-21



5-O-Cafeoilquinato de metila

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) da substância IC-21, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3-O- cafeoilquínico	Ácido 3-O- cafeoilquínico*	Ácido 4-O- cafeoilquínico*	Ácido 5-O- cafeoilquínico*
2	1,99-2,23; <i>m</i>	2,03-2,13, <i>m</i> 2,16-2,28, <i>m</i> , 2H	2,17; <i>m</i> 2,04; <i>m</i>	2,17; <i>m</i> 2,04; <i>m</i>	2,17; <i>m</i> 2,04; <i>m</i>
3	4,13; <i>m</i>	5,34; <i>m</i>	5,33; <i>td</i> ; 10,0; 4,8	4,29; <i>q</i> ; 3,8	4,09; <i>td</i> ; 10; 0; 4,8
4	3,73; <i>dd</i> ; 2,7; 7,4	3,73; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	3,80; <i>dd</i> ; 9,9; 3,2	4,89; <i>dd</i> ; 8,4; 3,0	3,75; <i>dd</i> ; 9,9; 3,2
5	5,27; <i>dd</i> ; 7,4; 11,8	4,17; <i>d</i> , 4,0	4,21; <i>sl q</i> ; 3,1	4,21; <i>sl q</i> ; 3,1	5,33; <i>td</i> ; 10; 4,8
6	1,99-2,23; <i>m</i>	2,03-2,13, <i>m</i>	2,17; <i>m</i> 2,04; <i>m</i>	2,17; <i>m</i> 2,04; <i>m</i>	2,17; <i>m</i> 2,04; <i>m</i>
2'	7,04; <i>d</i> ; 1,8	7,05; <i>d</i> , 2,0	7,15; <i>d</i> , 2,1	7,17; <i>d</i> ; 2,0	7,14; <i>d</i> ; 2,0
5'	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,87; <i>d</i> ; 8,4	6,87; <i>d</i> ; 8,4	6,89; <i>d</i> ; 8,4
6'	6,95; <i>d</i> ; 8,0	6,95; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	7,05; <i>dd</i> , 2,0; 8,4	7,08; <i>dd</i> ; 8,4; 2,0	7,05; <i>dd</i> ; 8,4; 2,0
7'	7,52; <i>d</i> ; 15,9	7,55; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 15,9	7,66; <i>d</i> ; 15,9	7,60; <i>d</i> ; 15,9
8'	6,21; <i>d</i> ; 15,9	6,26; <i>d</i> ; 16,0	6,36; <i>d</i> ; 15,9	6,44; <i>d</i> ; 15,9	6,41; <i>d</i> ; 15,9
MeO-	3,69; <i>s</i> ; 3H				

* IWAI *et al*, 2004.

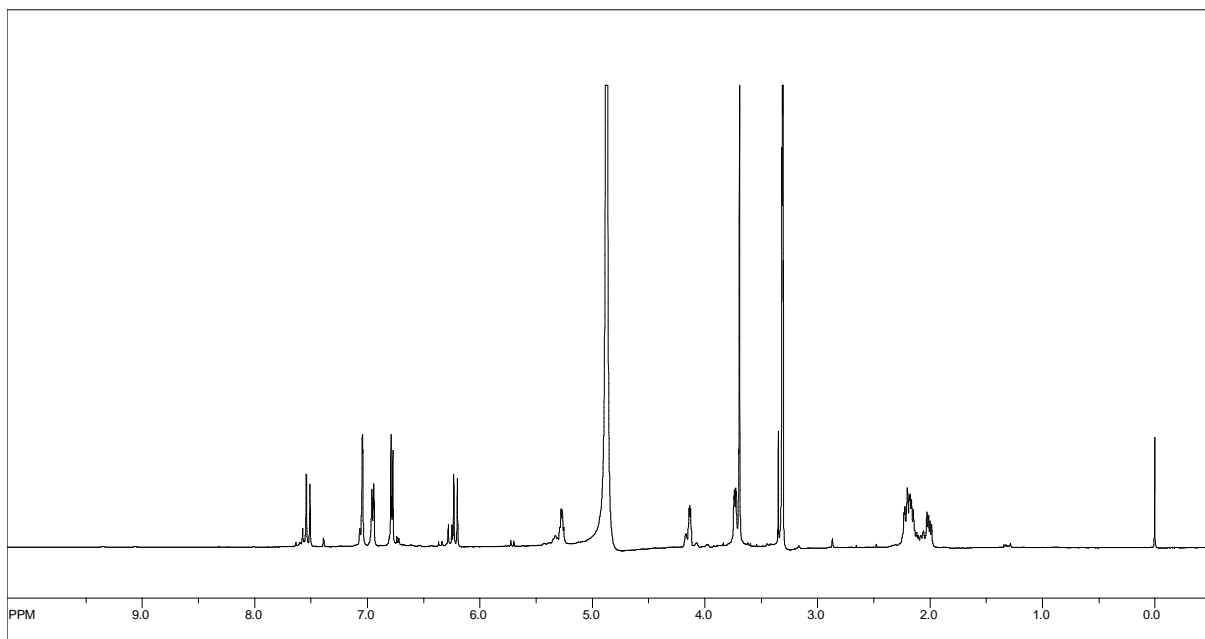


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-21** ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz).

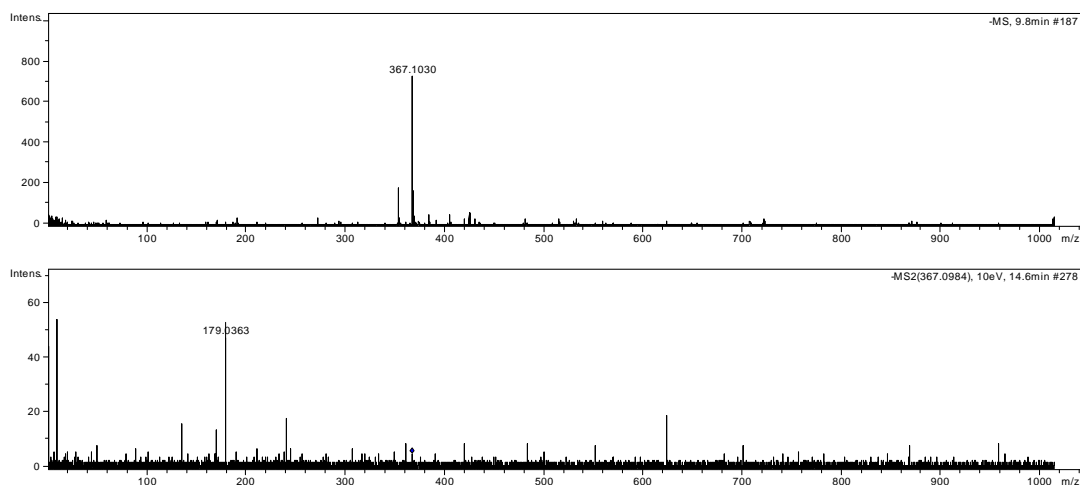
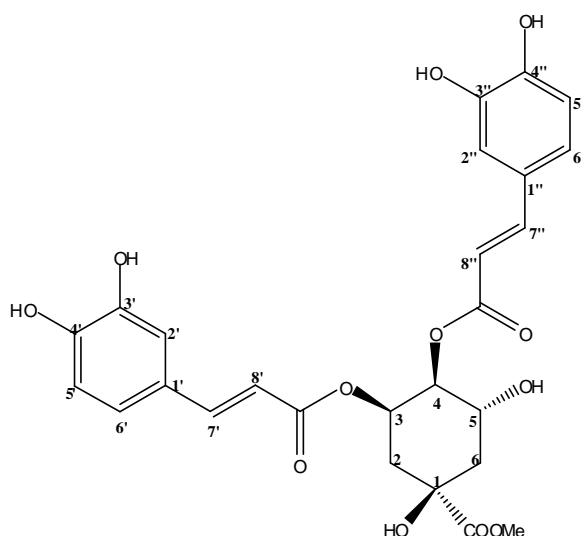


Figura 49. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-21** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 367 u (10 eV)).

Substância IC-22



3,4-O-dicafeoilquinato de metila

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz) da substância IC-22, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico*
2	1,90-2,20; <i>m</i>	2,20-2,35; <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
3	5,36; <i>m</i>	5,38; <i>m</i>	4,35; <i>m</i>	5,63; <i>m</i>
4	4,92; <i>m</i>	3,97; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,00; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,12; <i>d</i> ; 3,0
5	4,01; <i>m</i>	5,43; <i>sl</i> ;	5,63; <i>sl</i>	4,36; <i>sl</i>
6	1,90-2,20; <i>m</i>	2,20-2,35; <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
2'/2''	7,01; <i>sl</i> 6,99; <i>sl</i>	7,07; <i>sl</i>	7,01; <i>sl</i> 7,03; <i>sl</i>	7,00; <i>d</i> ; 2,0 7,03; <i>d</i> ; 2,0
5'/5''	6,71; <i>d</i> ; 8,1 (2H)	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,72; <i>d</i> ; 8,0 6,77; <i>d</i> ; 8,0	6,73; <i>d</i> ; 8,0 6,74; <i>d</i> ; 8,0
6'/6''	6,91; <i>d</i> ; 8,1 6,88; <i>d</i> ; 8,1	6,97; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,96; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,86; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,91; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,88; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,90; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0
7'/7''	7,42; <i>d</i> ; 16,0 7,38; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0 7,51; <i>d</i> ; 16,0	7,54; <i>d</i> ; 16,0 7,57; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0
8'/8''	6,23; <i>d</i> ; 16,0 6,16; <i>d</i> ; 16,0	6,36; <i>d</i> ; 16,0 6,26; <i>d</i> ; 16,0	6,25; <i>d</i> ; 16,0 6,28; <i>d</i> ; 16,0	6,27; <i>d</i> ; 16,0 6,18; <i>d</i> ; 16,0
MeO-	3,59; <i>s</i>			

*ISLAM *et al*; 2002, obtidos em CD_3OD .

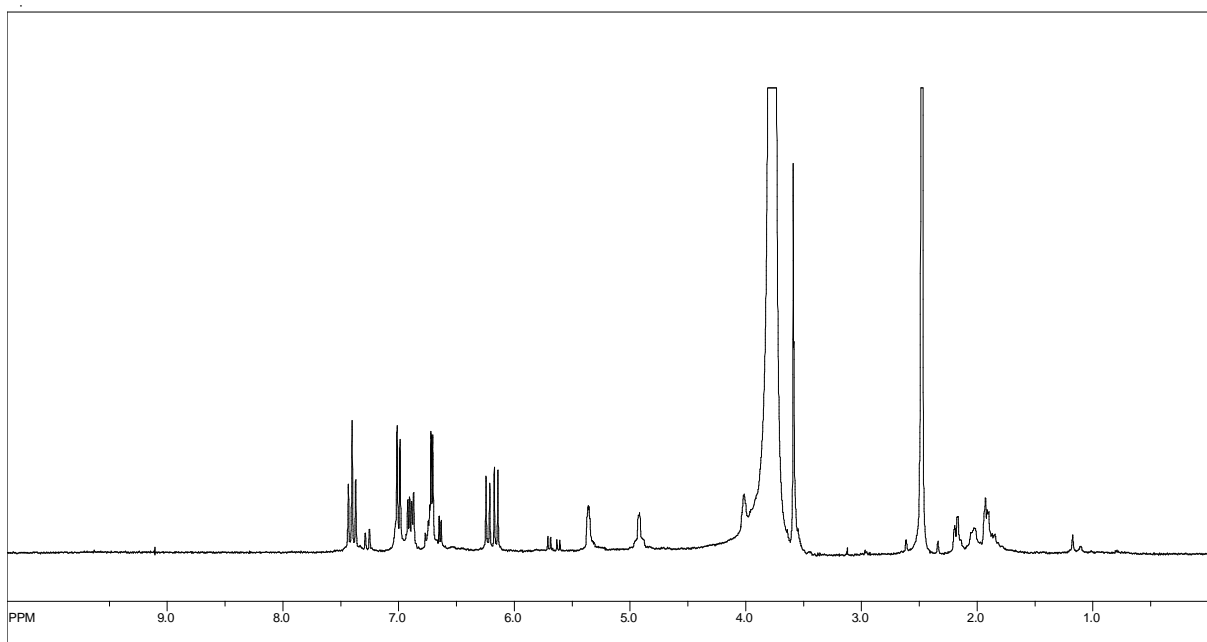


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-22**. (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz).

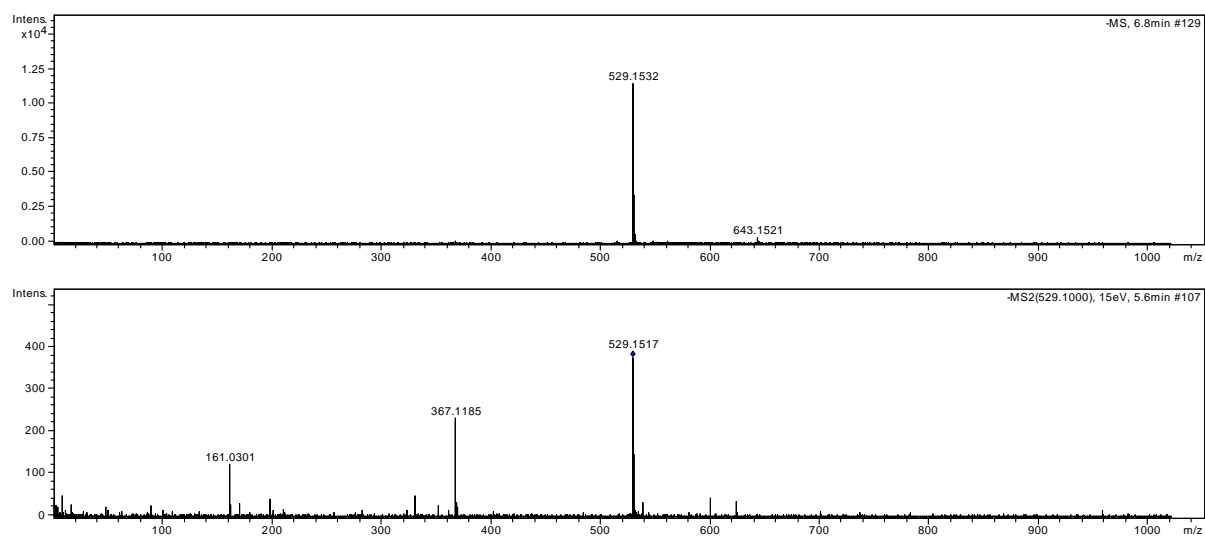
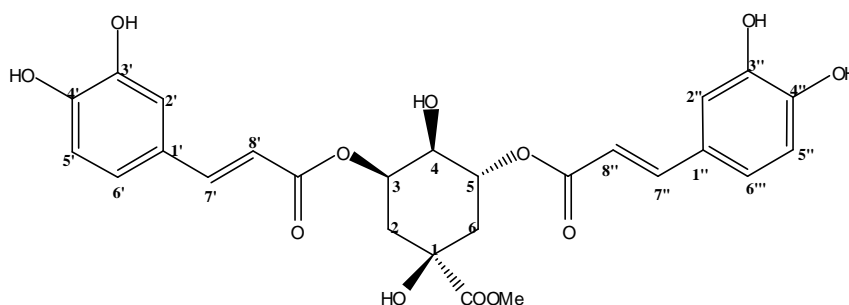


Figura 51. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-22** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 529 u (15 eV)).

Substância IC-23



3,5-O-dicafeoilquinato de metila

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz) da substância IC-23, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico*
2	1,9-2,2; <i>m</i>	2,20-2,35; <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
3	4,92; <i>m</i>	5,38; <i>m</i>	4,35; <i>m</i>	5,63; <i>m</i>
4	4,01; <i>m</i>	3,97; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,00; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,12; <i>d</i> ; 3,0
5	5,36; <i>m</i>	5,43; <i>sl</i> ;	5,63; <i>sl</i>	4,36; <i>sl</i>
6	1,9-2,2; <i>m</i>	2,20-2,35; <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
2'/2''	7,01; <i>sl</i>	7,07; <i>sl</i>	7,01; <i>sl</i>	7,00; <i>d</i> ; 2,0
	6,99; <i>sl</i>		7,03; <i>sl</i>	7,03; <i>d</i> ; 2,0
5'/5''	6,71; <i>d</i> ; 8,0 (2H)	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,72; <i>d</i> ; 8,0 6,77; <i>d</i> ; 8,0	6,73; <i>d</i> ; 8,0 6,74; <i>d</i> ; 8,0
6'/6''	6,91; <i>d</i> ; 8,0 6,88; <i>d</i> ; 8,0	6,97; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,96; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,86; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,91; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,88; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,90; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0
7'/7''	7,42; <i>d</i> ; 16,1 7,39; <i>d</i> ; 16,1	7,60; <i>d</i> ; 16,0 7,51; <i>d</i> ; 16,0	7,54; <i>d</i> ; 16,0 7,57; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0
8'/8''	6,23; <i>d</i> ; 16,1 6,16; <i>d</i> ; 16,1	6,36; <i>d</i> ; 16,0 6,26; <i>d</i> ; 16,0	6,25; <i>d</i> ; 16,0 6,28; <i>d</i> ; 16,0	6,27; <i>d</i> ; 16,0 6,18; <i>d</i> ; 16,0
MeO-	3,59; <i>s</i>			

*ISLAM *et al*; 2002, obtidos em CD₃OD.

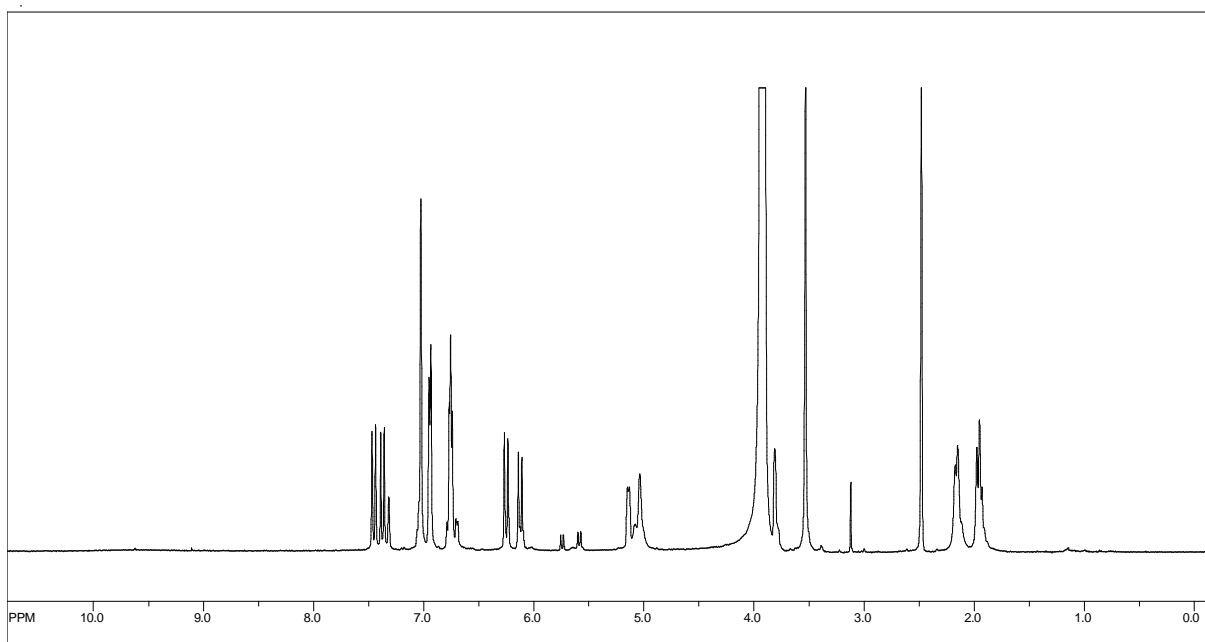


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-23** (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz).

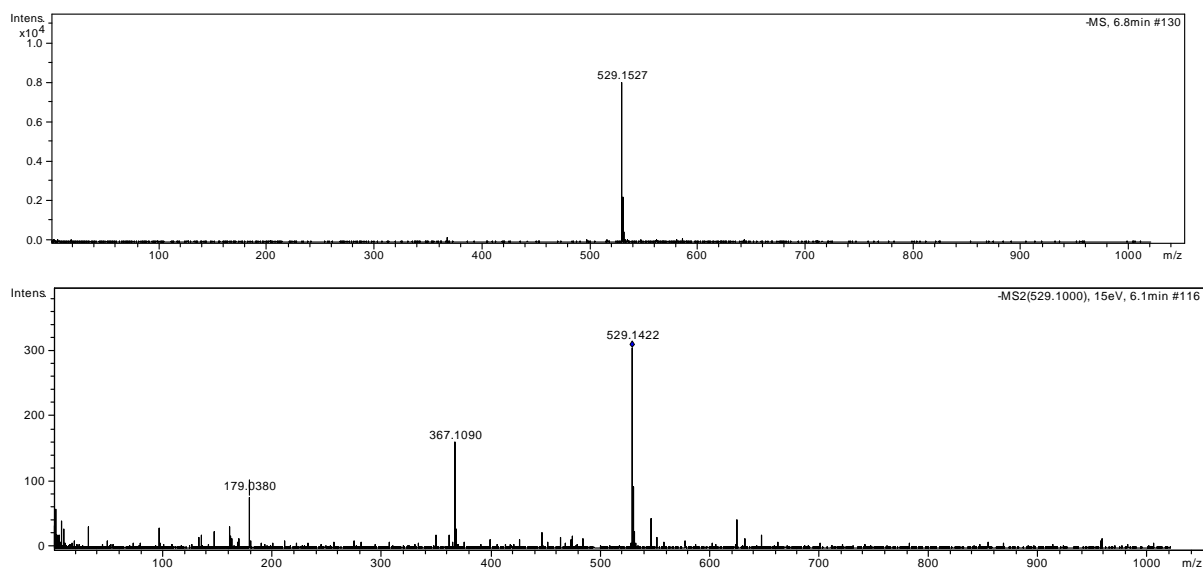
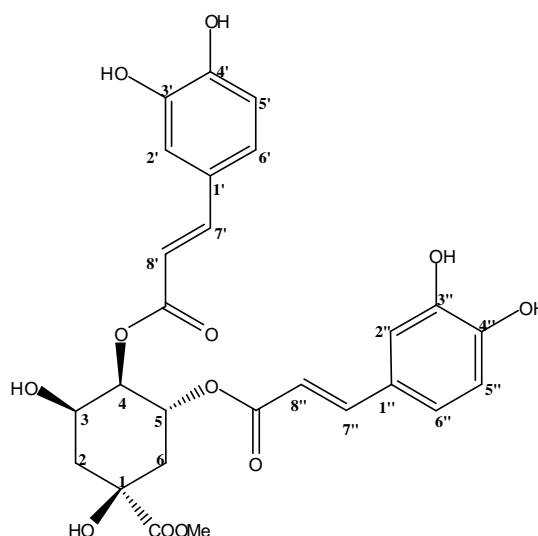


Figura 53. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-23** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 529 u (15 eV)).

Substância IC-24



4,5-O-dicafeoilquinato de metila

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz) da substância IC-24, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico*
2	1,83-2,20; <i>m</i>	2,20-2,35; <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
3	4,09; <i>m</i>	5,38; <i>m</i>	4,35; <i>m</i>	5,63; <i>m</i>
4	4,91; <i>dd</i> ; 3,1; 7,2	3,97; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,00; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,12; <i>d</i> ; 3,0
5	5,22; <i>m</i>	5,43; <i>sl</i> ;	5,63; <i>sl</i>	4,36; <i>sl</i>
6	1,83-2,20; <i>m</i>	2,20-2,35; <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
2'/2''	7,01; <i>sl</i> 6,99; <i>sl</i>	7,07; <i>sl</i>	7,01; <i>sl</i> 7,03; <i>sl</i>	7,00; <i>d</i> ; 2,0 7,03; <i>d</i> ; 2,0
5'/5''	6,73; <i>d</i> ; 8,1 (2H)	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,72; <i>d</i> ; 8,0 6,77; <i>d</i> ; 8,0	6,73; <i>d</i> ; 8,0 6,74; <i>d</i> ; 8,0
6'/6''	6,91; <i>d</i> ; 8,1 6,93; <i>d</i> ; 8,1	6,97; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,96; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,86; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,91; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,88; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,90; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0
7'/7''	7,45; <i>d</i> ; 16,0 7,35; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0 7,51; <i>d</i> ; 16,0	7,54; <i>d</i> ; 16,0 7,57; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0
8'/8''	6,11; <i>d</i> ; 16,0 6,25; <i>d</i> ; 16,0	6,36; <i>d</i> ; 16,0 6,26; <i>d</i> ; 16,0	6,25; <i>d</i> ; 16,0 6,28; <i>d</i> ; 16,0	6,27; <i>d</i> ; 16,0 6,18; <i>d</i> ; 16,0
MeO-	3,54; <i>s</i>			

*ISLAM *et al*; 2002, obtidos em CD₃OD.

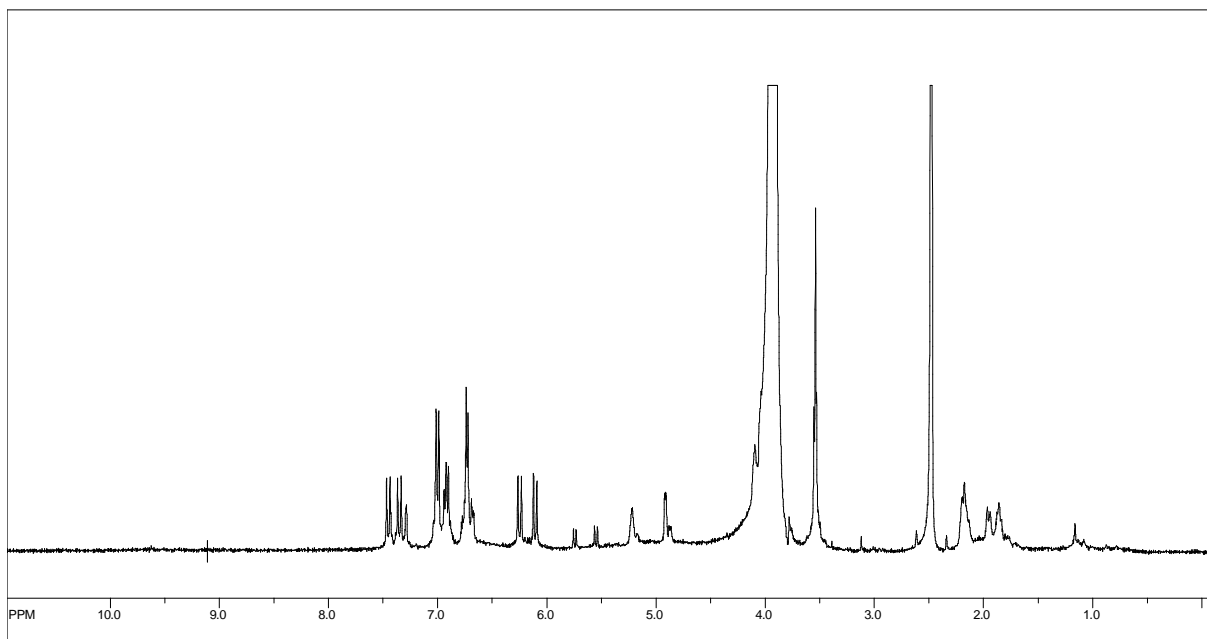


Figura 54. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-24** (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

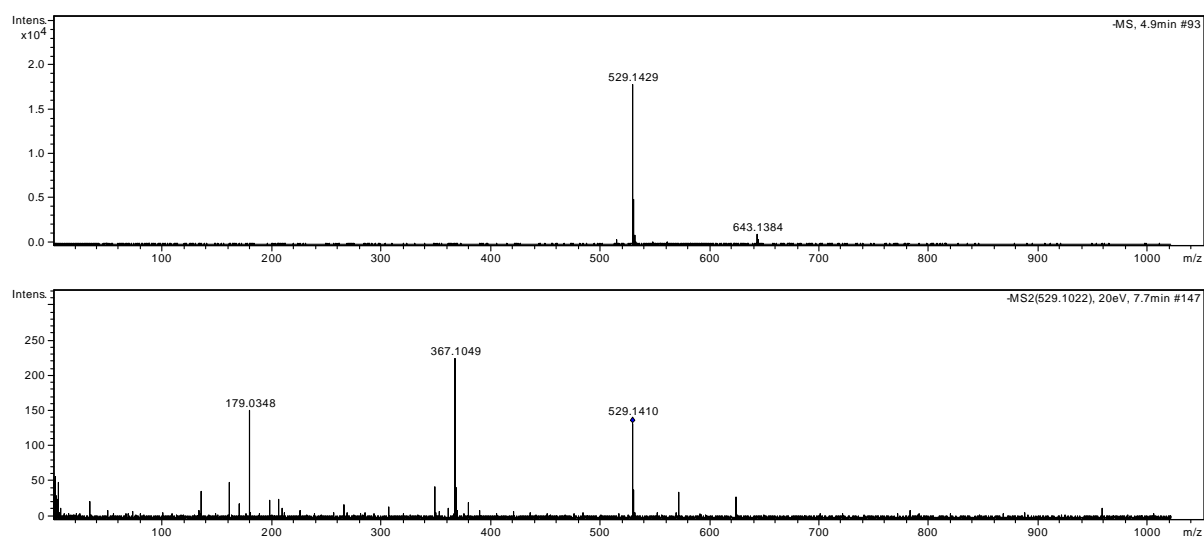
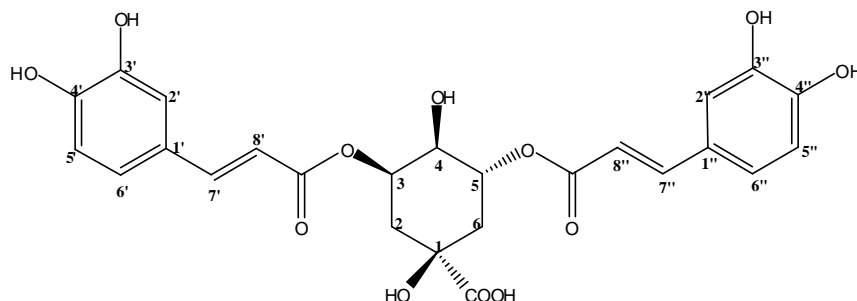


Figura 55. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-24** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 529 u (20 eV)).

Substância IC-25



Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) da substância IC-25, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico*	Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico*
2	2,15-2,34; <i>m</i>	2,20-2,35, <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
3	5,40; <i>m</i>	5,38; <i>m</i>	4,35; <i>m</i>	5,63; <i>m</i>
4	3,98; <i>dd</i> ; 2,8; 7,5	3,97; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,00; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,12; <i>d</i> ; 3,0
5	5,43; <i>m</i>	5,43; <i>sl</i> ;	5,63; <i>sl</i>	4,36; <i>sl</i>
6	2,15-2,34; <i>m</i>	2,20-2,35, <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
2'/2''	7,07; <i>sl</i>	7,07; <i>sl</i>	7,01; <i>sl</i> 7,03; <i>sl</i>	7,00; <i>d</i> ; 2,0 7,03; <i>d</i> ; 2,0
5'/5''	6,79; <i>d</i> ; 8,0 (2H)	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,72; <i>d</i> ; 8,0 6,77; <i>d</i> ; 8,0	6,73; <i>d</i> ; 8,0 6,74; <i>d</i> ; 8,0
6'/6''	6,98; <i>dd</i> ; 1,8; 8,0 6,97; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,97; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,96; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,86; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,91; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,88; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,90; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0
7'/7''	7,66; <i>d</i> ; 16,1 7,58; <i>d</i> ; 15,9	7,60; <i>d</i> ; 16,0 7,51; <i>d</i> ; 16,0	7,54; <i>d</i> ; 16,0 7,57; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0
8'/8''	6,36; <i>d</i> ; 16,1 6,27; <i>d</i> ; 15,9	6,36; <i>d</i> ; 16,0 6,26; <i>d</i> ; 16,0	6,25; <i>d</i> ; 16,0 6,28; <i>d</i> ; 16,0	6,27; <i>d</i> ; 16,0 6,18; <i>d</i> ; 16,0

*ISLAM *et al*; 2002, obtidos em CD_3OD .

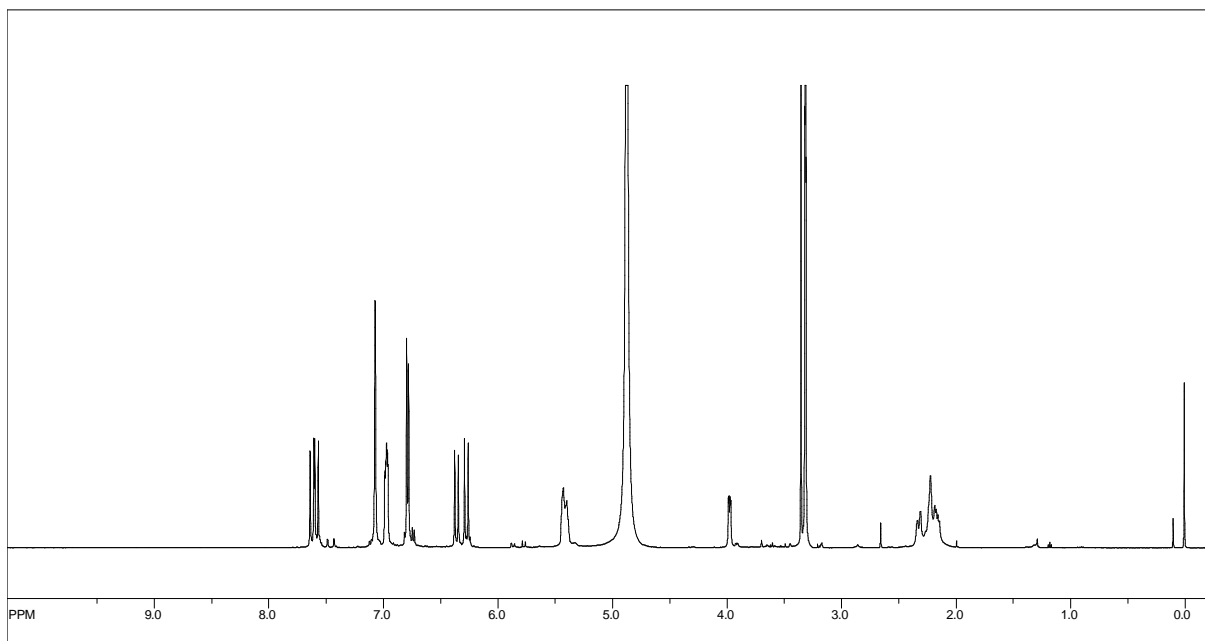


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-25** ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz).

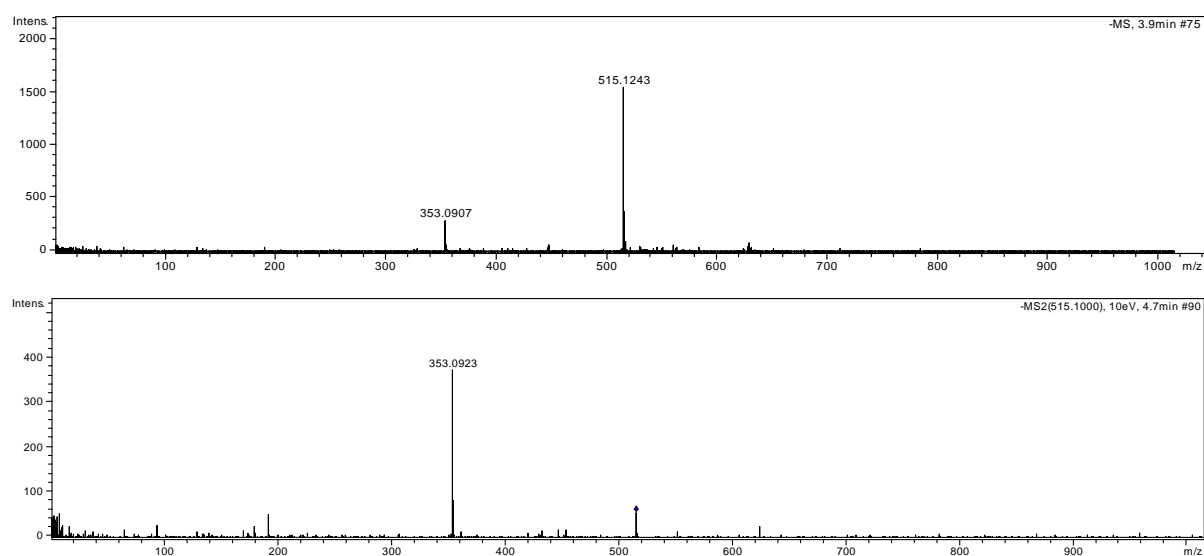
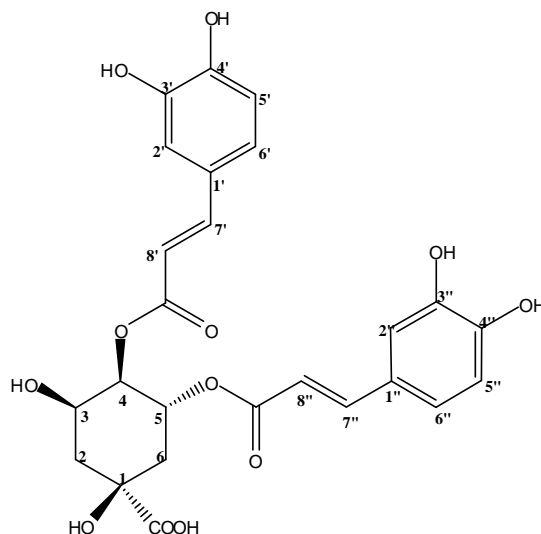


Figura 57. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-25** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 515 u (10 eV)).

Substância IC-26



Ácido 4-5-O-dicafeoilquínico

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) da substância IC-26, comparados com dados obtidos da literatura.

Posiçã o	Amostra	Ácido 1,3-O- dicafeoilquínico**	Ácido 3,5-O- dicafeoilquínico*	Ácido 4,5-O- dicafeoilquínico*	Ácido 3,4-O- dicafeoilquínico*
2	2,35-2,08; <i>m</i>	1,83-2,87; <i>m</i>	2,20-2,35, <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
3	4,39; <i>m</i>	5,36; <i>m</i>	5,38; <i>m</i>	4,35; <i>m</i>	5,63; <i>m</i>
4	5,14; <i>d</i> ; 6,7	3,61, <i>dd</i> , 3,6; 9,6	3,97; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,00; <i>dd</i> ; 3,0; 9,0	5,12; <i>d</i> ; 3,0
5	5,63; <i>sl</i>	4,22, <i>ddd</i> , 4,4; 9,6; 11,2	5,43; <i>s br</i> ;	5,63; <i>sl</i>	4,36; <i>sl</i>
6	2,35-2,08; <i>m</i>	1,83-2,87, <i>m</i>	2,20-2,35, <i>m</i>	2,12-2,37; <i>m</i>	2,11-2,29; <i>m</i>
2'/2''	7,03; <i>sl</i>	6,81; <i>d</i> ; 2,0	7,07; <i>sl</i>	7,01; <i>sl</i>	7,00; <i>d</i> ; 2,0
	7,01; <i>sl</i>	6,92; <i>d</i> ; 2,0		7,03; <i>sl</i>	7,03; <i>d</i> ; 2,0
5'/5''	6,92; <i>d</i> ; 8,0	6,50; <i>d</i> ; 8,2	6,78; <i>d</i> ; 8,0	6,72; <i>d</i> ; 8,0	6,73; <i>d</i> ; 8,0
	6,90; <i>d</i> ; 8,2	6,63; <i>d</i> ; 8,2		6,77; <i>d</i> ; 8,0	6,74; <i>d</i> ; 8,0
6'/6''	6,75; <i>m</i>	6,58; <i>dd</i> ; 2,0; 8,2 6,74; <i>dd</i> ; 2,0; 8,2	6,97; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,96; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,86; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,91; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	6,88; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0 6,90; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0
7'/7''	7,60; <i>d</i> ; 15,9 7,52; <i>d</i> ; 15,6	7,46; <i>d</i> ; 15,9 7,48; <i>d</i> ; 15,9	7,60; <i>d</i> ; 16,0 7,51; <i>d</i> ; 16,0	7,54; <i>d</i> ; 16,0 7,57; <i>d</i> ; 16,0	7,60; <i>d</i> ; 16,0
8'/8''	6,29; <i>d</i> ; 15,6 6,19; <i>d</i> ; 15,9	6,11; <i>d</i> ; 15,9 6,18; <i>d</i> ; 15,9	6,36; <i>d</i> ; 16,0 6,26; <i>d</i> ; 16,0	6,25; <i>d</i> ; 16,0 6,28; <i>d</i> ; 16,0	6,27; <i>d</i> ; 16,0 6,18; <i>d</i> ; 16,0

*ISLAM *et al*; 2002, obtidos em CD_3OD .

** ZHU, ZHANG, LO, 2004.

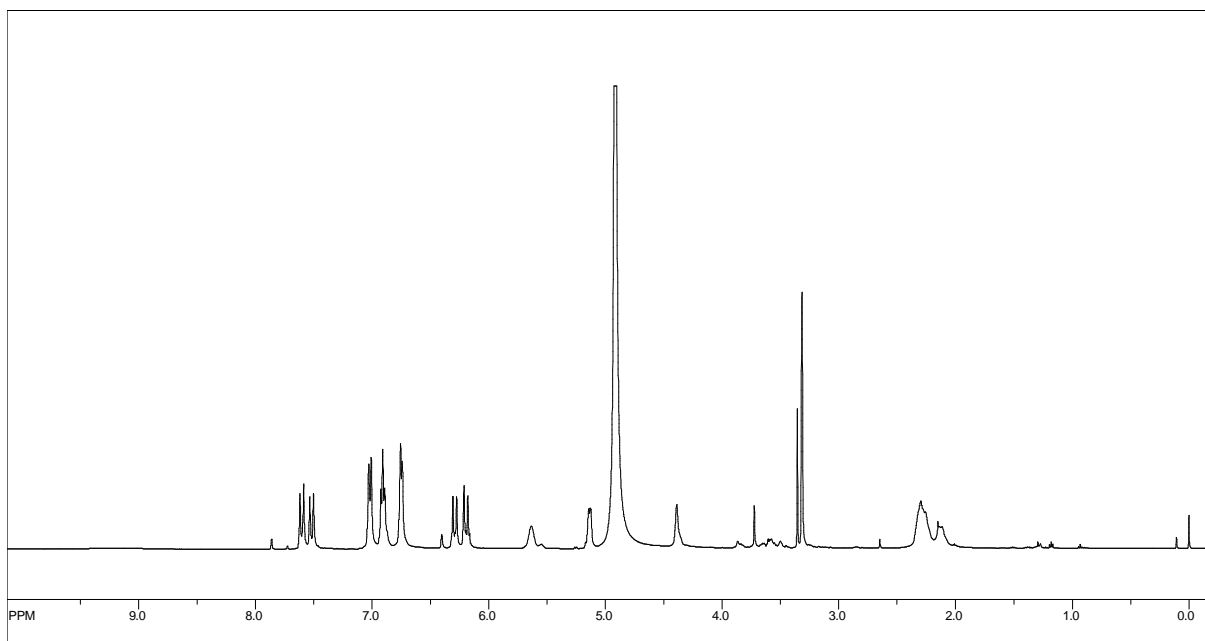


Figura 58. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-26** ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz).

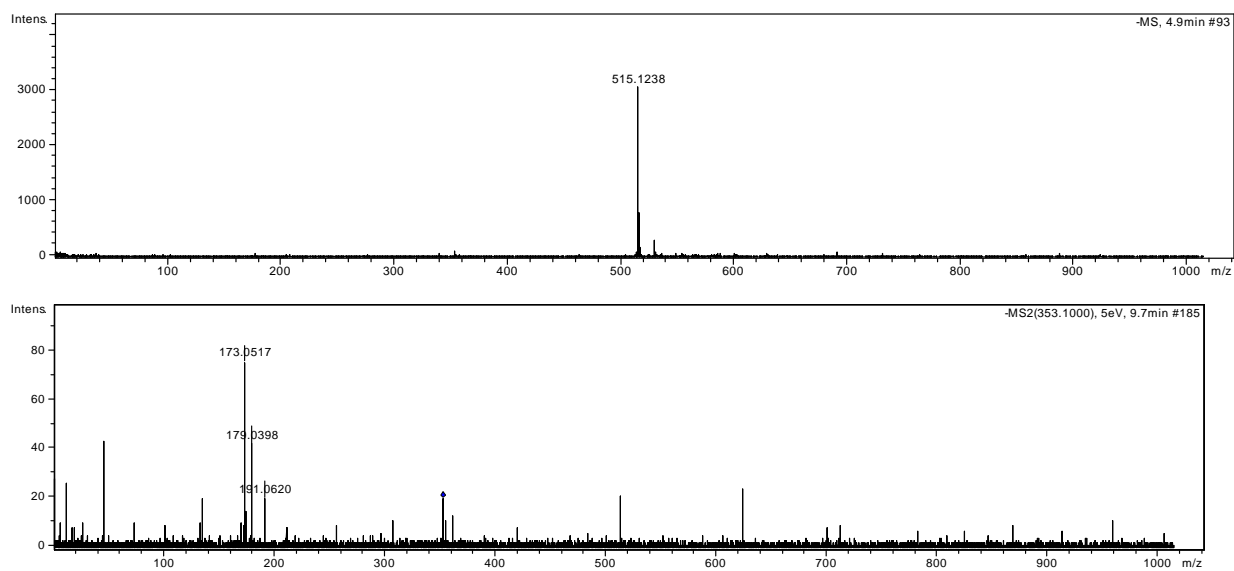
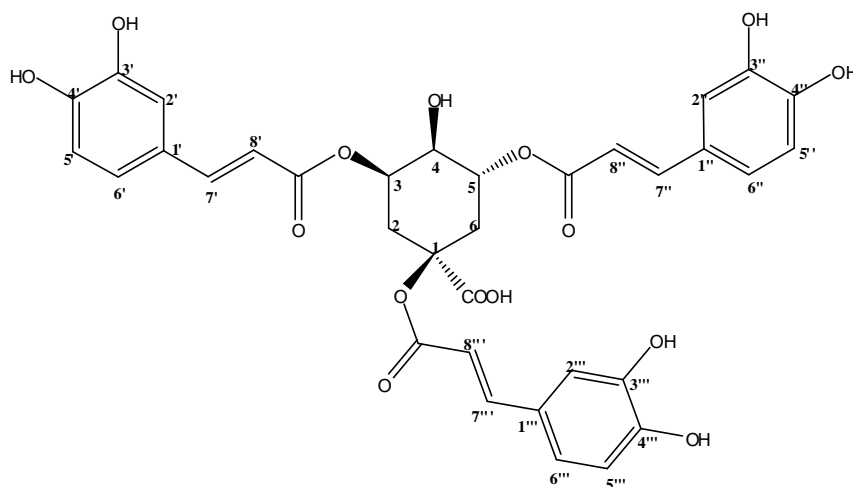


Figura 59. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-26** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 353 u (5 eV)).

Substância IC-27



Ácido 1,3,5-O-tricafeoilquínico

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) da substância IC-27, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,4,5-O-tricafeoilquínico**	Ácido 1,3,5-O-tricafeoilquínico*	Ácido 1,4,5-O-tricafeoilquínico**
2	2,42; <i>d</i> ; 15,5	2,673; <i>dd</i>	2,41; <i>dd</i> ; 3,0; 16,0	2,6-2,775; <i>m</i>
	2,93; <i>d</i> ; 15,8	2,588; <i>dd</i>	2,92; <i>d</i> ; 16	2,517; <i>dd</i>
3	5,46; <i>d</i> ; 2,1	5,676; <i>m</i>	5,46; <i>m</i>	4,511; <i>m</i>
4	3,99; <i>dd</i> ; 3,0; 9,5	5,303; <i>dd</i>	3,99; <i>dd</i> ; 3,0; 8,0	5,224; <i>dd</i> ;
5	5,59; <i>td</i> ; 3,8; 10,0	5,710; <i>m</i>	5,58; <i>m</i>	5,731; <i>t</i> ;
6	2,67; <i>d</i> ; 12,2	2,846; <i>dd</i>	2,00; <i>dd</i> ; 10,0; 13,0	2,600- 2,775; <i>m</i>
	1,99; <i>t</i> ; 12,1	2,146; <i>dd</i>	2,67; <i>dd</i> ; 3,0; 13,0	2,223; <i>m</i>
2'/2''/2'''	7,07; <i>sl</i> / 6,97; <i>sl</i> / 6,85; <i>sl</i>	7,133; <i>d</i> ; 7,003; <i>d</i> ; 6,998; <i>d</i>	6,84; 6,95; 7,07; <i>d</i> ; 2,0	7,115; <i>d</i> ; 7,042; <i>d</i> ; 7,042; <i>d</i>
5'/5''/5'''	6,54; <i>d</i> ; 8,0/ 6,79; <i>d</i> ; 7,8/ 6,65; <i>d</i> ; 8,0	6,805; <i>d</i> ; 6,742; <i>d</i> ; 6,726; <i>d</i>	6,55; 6,65; 6,79; <i>d</i> ; 8,0	6,821; <i>d</i> ; 6,771; <i>d</i> ; 6,762; <i>d</i>
6'/6''/6'''	6,78; <i>d</i> ; 8,4/ 6,64; <i>d</i> ; 8,3/ 6,97; <i>m</i>	7,040; <i>d</i> ; 6,907; <i>d</i> ; 6,907; <i>d</i>	6,64; 6,78; 6,95; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	7,002; <i>dd</i> ; 6,925; <i>dd</i> ; 6,925; <i>dd</i>
7'/7''/7'''	7,64; <i>d</i> ; 16,0/ 7,55; <i>d</i> ; 16,3/ 7,51; <i>d</i> ; 16,1	7,639; <i>d</i> ; 7,552; <i>d</i> ; 3,536; <i>d</i>	7,51; 7,55; 7,63; <i>d</i> ; 16,0	7,648; <i>d</i> ; 7,640; <i>d</i> ; 7,565; <i>d</i>
8'/8''/8'''	6,34; <i>d</i> ; 15,8/ 6,25; <i>d</i> ; 16,1; 6,18; <i>d</i> ; 15,8	6,422; <i>d</i> ; 6,217; <i>d</i> ; 6,156; <i>d</i>	6,17; 6,22; 6,32; <i>d</i> ; 16,0	6,379; <i>d</i> ; 6,326; <i>d</i> ; 6,230; <i>d</i>
MeO-		3,642		

*TIMMERMANN *et al.*, 1983.

**MERFORT, 1992

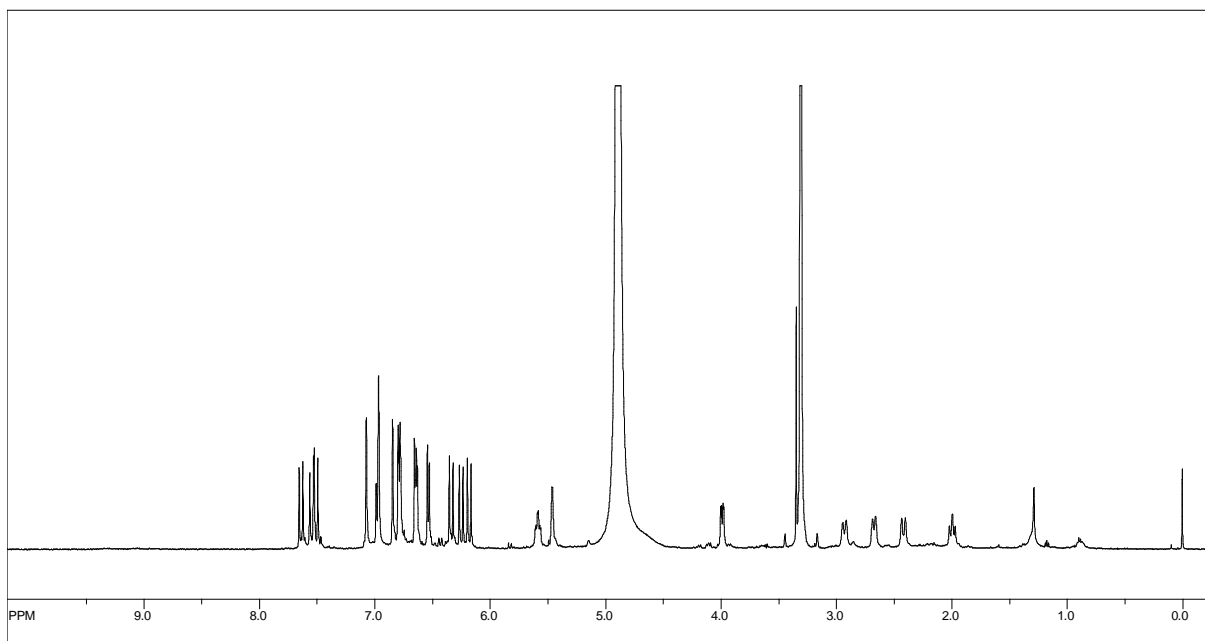


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-27** ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz).

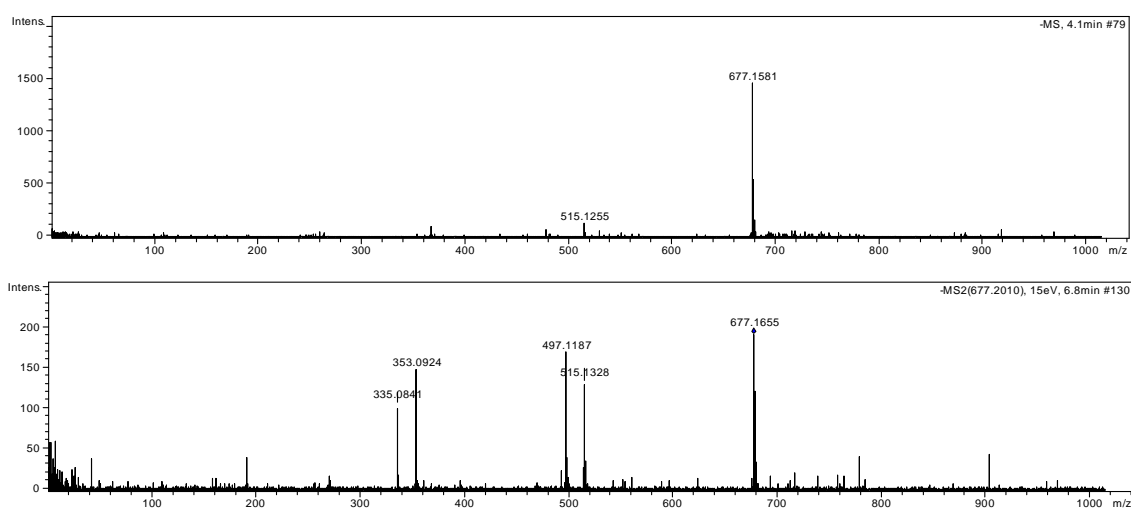
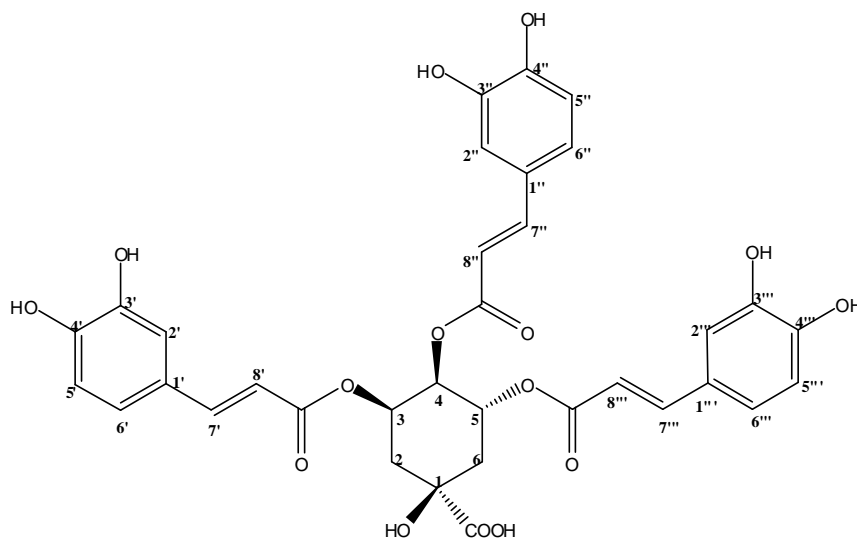


Figura 61. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-27** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 677 u (15 eV)).

Substância IC-28



Ácido 3,4,5-O-tricafeoilquínico

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) da substância IC-28, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,4,5-O-tricafeoilquínico**	Ácido 1,3,5-O-tricafeoilquínico*	Ácido 1,4,5-O-tricafeoilquínico* *
2	2,31; <i>m</i>	2,673; <i>dd</i>	2,41; <i>dd</i> ; 3,0; 16,0	2,6-2,775; <i>m</i>
	2,47; <i>dd</i> ; 3,0; 14,4	2,588; <i>dd</i>	2,92; <i>d</i> ; 16	2,517; <i>dd</i>
3	5,67; <i>m</i>	5,676; <i>m</i>	5,46; <i>m</i>	4,511; <i>m</i>
4	5,35; <i>dd</i> ; 3,0; 8,2	5,303; <i>dd</i>	3,99; <i>dd</i> ; 3,0; 8,0	5,224; <i>dd</i> ;
5	5,69; <i>m</i>	5,710; <i>m</i>	5,58; <i>m</i>	5,731; <i>t</i> ;
6	2,38; <i>m</i>	2,846; <i>dd</i>	2,00; <i>dd</i> ; 10,0; 13,0	2,600- 2,775; <i>m</i>
	2,21; <i>dd</i> ; 14,0; 5,3	2,146; <i>dd</i>	2,67; <i>dd</i> ; 3,0; 13,0	2,223; <i>m</i>
2'/2''/2'''	7,08; <i>sl</i> / 7,04; <i>sl</i> / 7,01; <i>sl</i>	7,133; <i>d</i> ; 7,003; <i>d</i> ;	6,84; 6,95; 7,07; <i>d</i> ;	7,115; <i>d</i> ; 7,042; <i>d</i> ;
		6,998; <i>d</i>	2,0	7,042; <i>d</i>
5'/5''/5'''	6,78; <i>d</i> ; 8,8/ 6,76; <i>d</i> ; 9,3/ 6,72; <i>d</i> ; 8,0	6,805; <i>d</i> ; 6,742; <i>d</i> ;	6,55; 6,65; 6,79; <i>d</i> ;	6,821; <i>d</i> ; 6,771; <i>d</i> ;
		6,726; <i>d</i>	8,0	6,762; <i>d</i>
6'/6''/6'''	6,95; <i>d</i> ; 7,7/ 6,93; <i>d</i> ; 6,5/ 6,85; <i>d</i> ; 8,0	7,040; <i>d</i> ; 6,907; <i>d</i> ;	6,64; 6,78; 6,95; <i>dd</i> ;	7,002; <i>dd</i> ; 6,925; <i>dd</i> ;
		6,907; <i>d</i>	2,0; 8,0	6,925; <i>dd</i>
7'/7''/7'''	7,61; <i>d</i> ; 16,1/ 7,55; <i>d</i> ; 15,8/ 7,53; <i>d</i> ; 15,5	7,639; <i>d</i> ; 7,552; <i>d</i> ;	7,51; 7,55; 7,63; <i>d</i> ;	7,648; <i>d</i> ; 7,640; <i>d</i> ;
		3,536; <i>d</i>	16,0	7,565; <i>d</i>
8'/8''/8'''	6,33; <i>d</i> ; 15,8/ 6,23; <i>d</i> ; 15,8/ 6,23; <i>d</i> ; 16,1	6,422; <i>d</i> ; 6,217; <i>d</i> ;	6,17; 6,22; 6,32; <i>d</i> ;	6,379; <i>d</i> ; 6,326; <i>d</i> ;
		6,156; <i>d</i>	16,0	6,230; <i>d</i>
MeO-		3,642		

*TIMMERMANN *et al.*, 1983.

**MERFORT, 1992

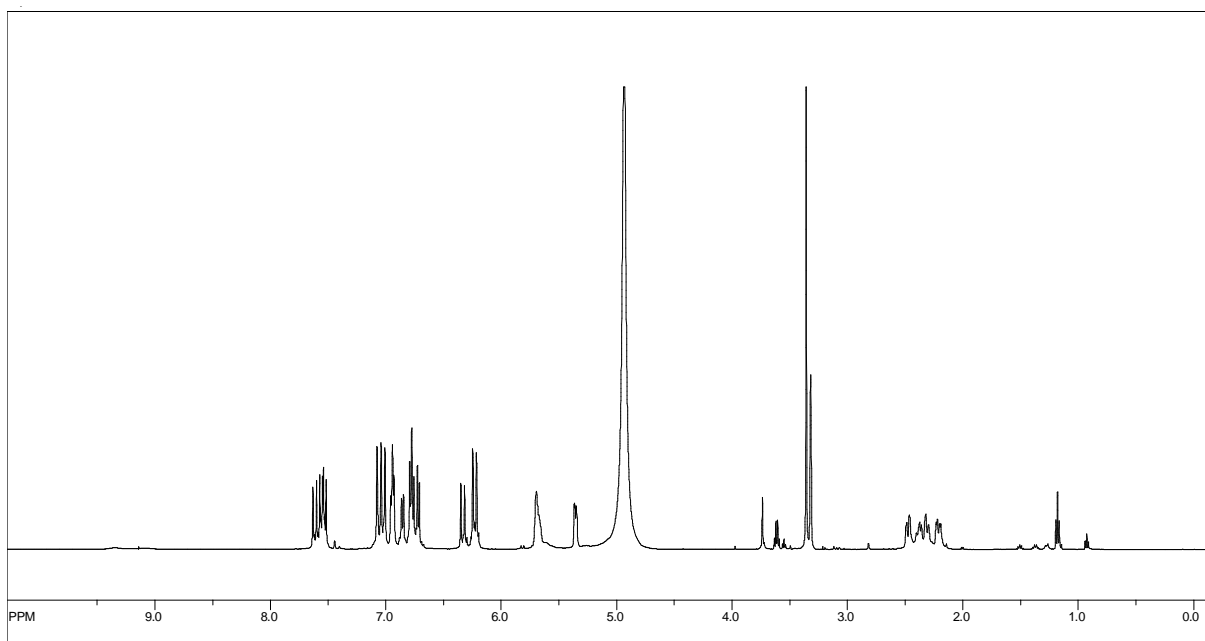


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-28** ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz).

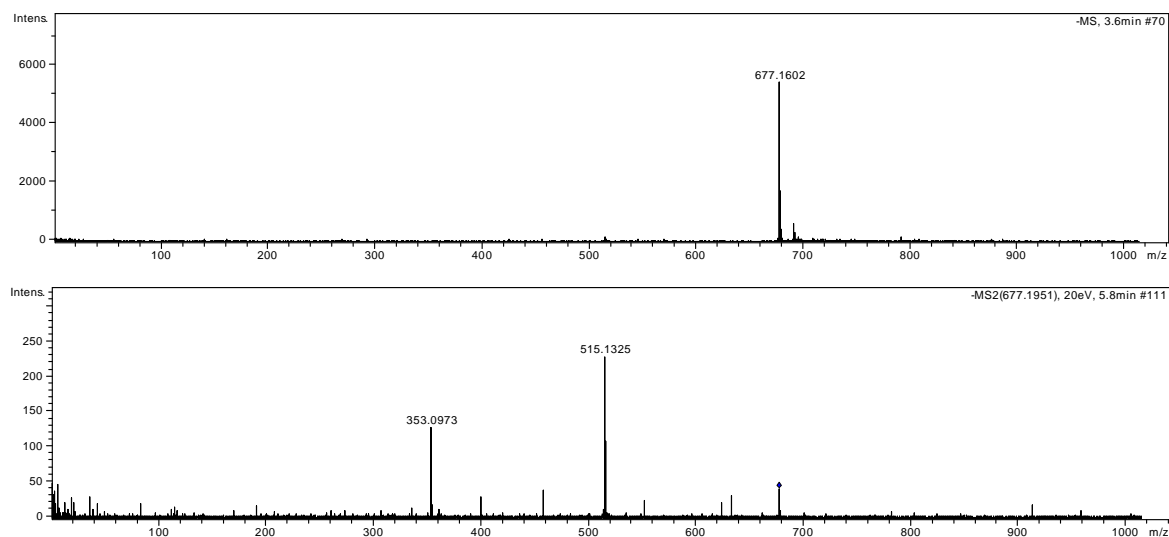
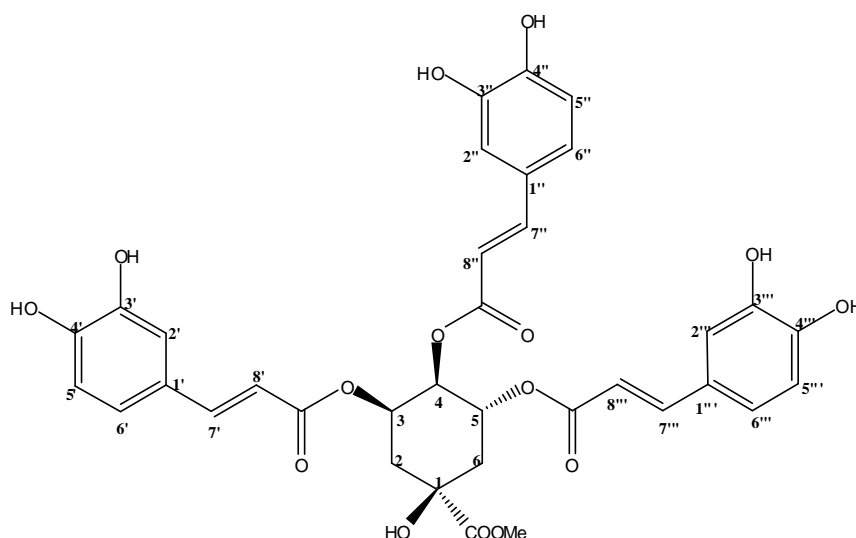


Figura 63. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-28** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 677 u (20 eV)).

Substância IC-29



3,4,5-O-tricafeoilquinato de metila

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) da substância IC-29, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Amostra	Ácido 3,4,5-O-tricafeoilquínico**	Ácido 1,3,5-O-tricafeoilquínico*	Ácido 1,4,5-O-tricafeoilquínico* *
2	2,25; <i>dd</i> ; 2,8; 13,8	2,673; <i>dd</i>	2,41; <i>dd</i> ; 3,0; 16,0	2,6-2,775; <i>m</i>
	2,45; <i>dd</i> ; 3,4; 13,8	2,588; <i>dd</i>	2,92; <i>d</i> ; 16,0	2,517; <i>dd</i>
3	5,59; <i>m</i>	5,676; <i>m</i>	5,46; <i>m</i>	4,511; <i>m</i>
4	5,34; <i>dd</i> ; 3,1; 7,5	5,303; <i>dd</i>	3,99; <i>dd</i> ; 3,0; 8,0	5,224; <i>dd</i> ;
5	5,66; <i>m</i>	5,710; <i>m</i>	5,58; <i>m</i>	5,731; <i>t</i> ;
6	2,39; <i>dd</i> ; 7,9; 10,8	2,846; <i>dd</i>	2,00; <i>dd</i> ; 10,0; 13,0	2,600- 2,775; <i>m</i>
	2,19; <i>dd</i> ; 7,0; 14,0	2,146; <i>dd</i>	2,67; <i>dd</i> ; 3,0; 13,0	2,223; <i>m</i>
2'/2''/2'''	7,06; <i>d</i> ; 1,8/ 7,03; <i>d</i> ; 1,5/ 7,01; <i>d</i> ; 1,5	7,133; <i>d</i> ; 7,003; <i>d</i> ; 6,998; <i>d</i>	6,84; 6,95; 7,07; <i>d</i> ; 2,0	7,115; <i>d</i> ; 7,042; <i>d</i> ; 7,042, <i>d</i>
	5'/5''/5'''	6,77; <i>d</i> ; 8,1 (2H)/ 6,72; <i>d</i> ; 8,3	6,805; <i>d</i> ; 6,742, <i>d</i> ; 6,726, <i>d</i>	6,55; 6,65; 6,79; <i>d</i> ; 8,0
6'/6''/6'''	6,93; <i>d</i> ; 8,1 (2H)/ 6,87; <i>d</i> ; 8,3	7,040, <i>d</i> ; 6,907, <i>d</i> ; 6,907, <i>d</i>	6,64; 6,78; 6,95; <i>dd</i> ; 2,0; 8,0	7,002; <i>dd</i> ; 6,925; <i>dd</i> ; 6,925, <i>dd</i>
	7'/7''/7'''	7,59; <i>d</i> ; 15,8/ 7,54; <i>d</i> ; 15,8 (2H)	7,639, <i>d</i> ; 7,552; <i>d</i> ; 3,536; <i>d</i>	7,51; 7,55; 7,63; <i>d</i> ; 16,0
8'/8''/8'''	6,58; <i>d</i> ; 15,8/ 6,23; <i>d</i> ; 17,3/ 6,20; <i>d</i> ; 16,1	6,422; <i>d</i> ; 6,217; <i>d</i> ; 6,156, <i>d</i>	6,17; 6,22; 6,32; <i>d</i> ; 16,0	6,379, <i>d</i> ; 6,326; <i>d</i> ; 6,230; <i>d</i>
	MeO-	3,73; <i>s</i> (3H)	3,642	

*TIMMERMANN *et al.*, 1983.

**MERFORT, 1992.

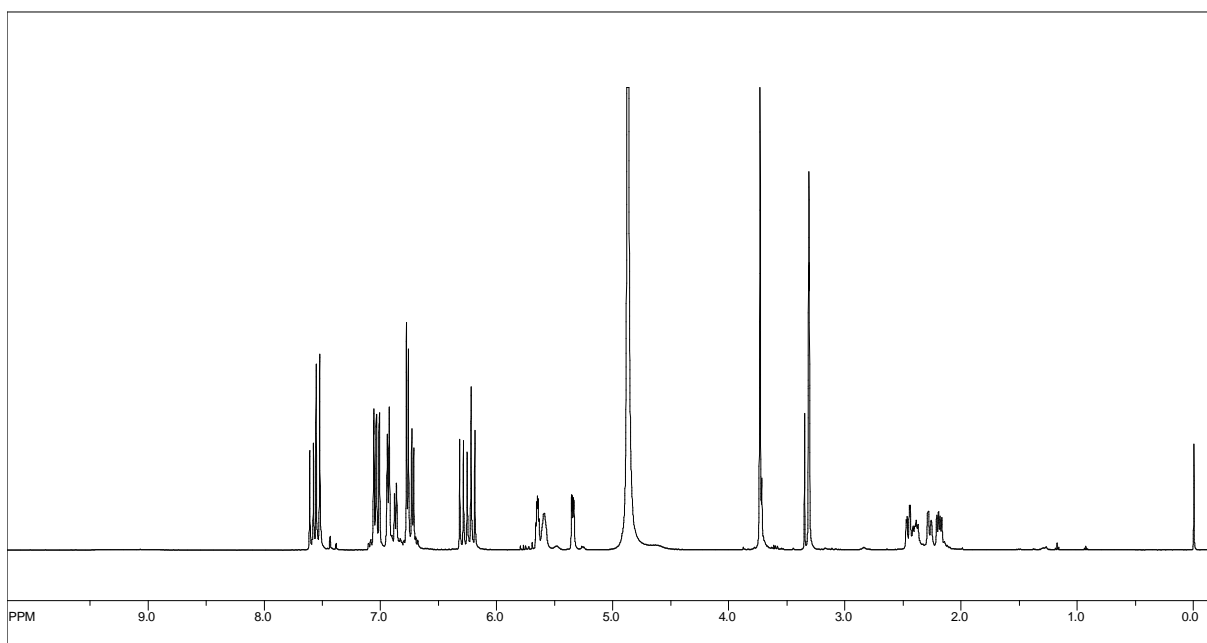


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-29** ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz).

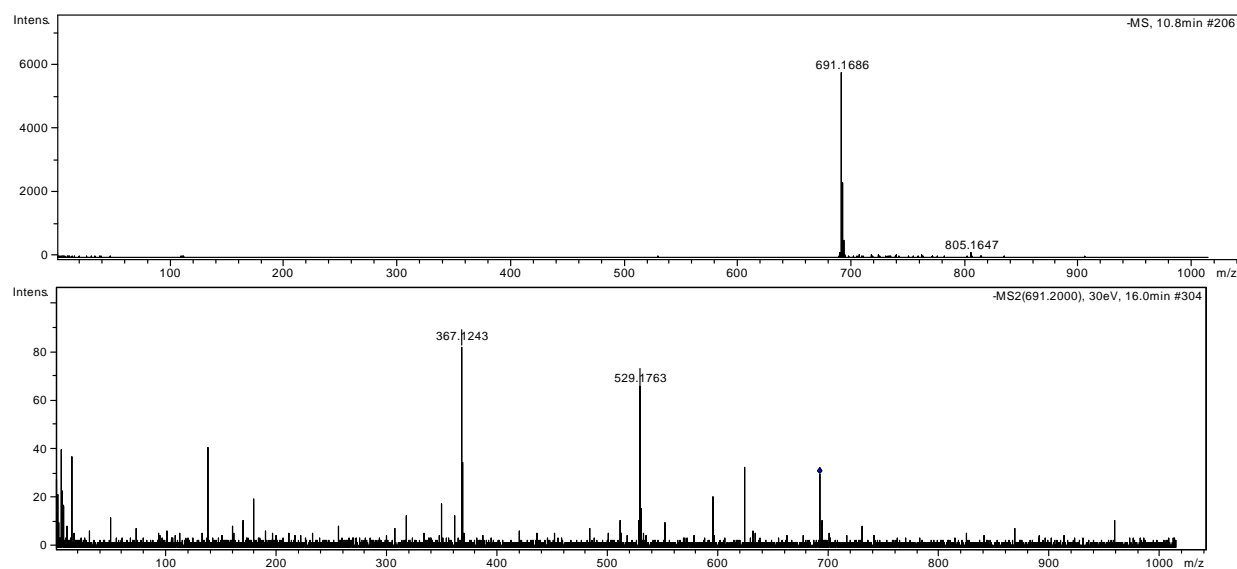
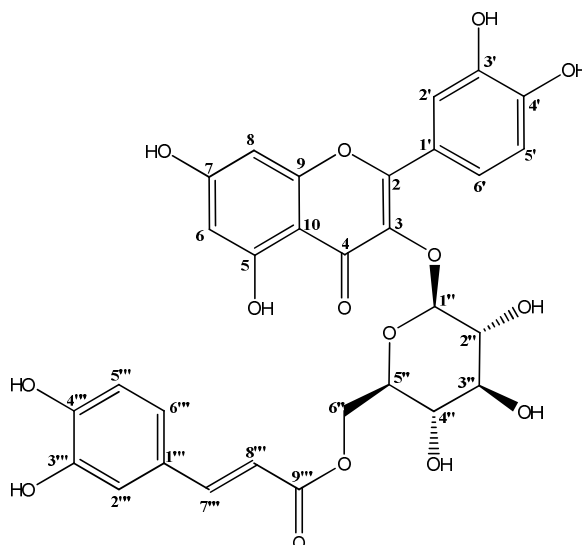


Figura 65. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **IC-29** (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 691 u (30 eV)).

Substância IC-30

*Quercetina 3-O-(6''-O-E-caffeoyl)-β-glicopiranosídeo***Tabela 22.** Dados de RMN de ^1H ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **IC-30**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J-Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Literatura*
2	-	158,5		159,1
3	-	134,2		135,2
4	-	?**		179,3
5	-	161,9		162,9
6	6,14; d; 2,1	98,9	C-8; C-10; C-5, C-7	100,5
7	-	164,9		167,4
8	6,31; d; 2,1	93,7	C-6; C-10; C-9, C-7	95,2
9	-	157,7		158,5
10	-	104,7		105,2
1'	-	?**		123,3
2'	7,60; d; 2,1	116,4	C-6'; C-3'	114,6
3'	-	144,8		149,8
4'	-	148,9		149,6
5'	6,8-6,7; m	115,5	C-6'; C-3'	117,3
6'	7,57; dd; 2,1; 8,5	122,3	C-2'; C-4'; C-2	123,2
1''	5,24; d; 7,7	102,9		104,0
2''	3,3-3,5; m	74		75,8
3''	3,3-3,5; m	77,0		78,1
4''	3,3-3,5; m	70,6		71,7
5''	3,3-3,5; m	74		75,7
6''	4,29; dd; 1,8; 11,1 4,21; dd; 6,3; 11,1	63,3	C-9''' C-9'''	64,3 64,3
1'''	-	126,9		127,7
2'''	6,97; d; 1,5	114,2	C-6'''; C-7'''; C-4'''	115,1
3'''	-	146,1		145,9
4'''	-	148,7		146,7
5'''	6,8-6,7; m	114,9		116,5
6'''	6,8-6,7; m	122,1		123,3
7'''	7,34; d; 16,0	145,9	C-2'''; C-9'''	146,9
8'''	6,05; d; 16,0	113,7	C-1'''; C-9'''	115,9
9'''	-	168,1		168,9

*CALZADA, CEDILLO-RIVERA, MATA, 2001.

** Sinais não observados nos espectros obtidos por RMN.

O espectro de RMN de ^1H apresentou hidrogênios na região de aromáticos (δ 6,5 – 7,5), além do hidrogênio anomérico em δ 5,24; d ; 7,7 Hz, que aliado aos hidrogênios oximetínicos entre δ 4,3 – 3,3 foi atribuído a presença de açúcar. Comparações com dados da literatura possibilitaram identificar o açúcar como sendo a glicose (CALZADA, CEDILLO-RIVERA, MATA, 2001).

Os hidrogênios em δ 7,57; dd ; 2,1 e 8,5 Hz; δ 7,60; d ; 2,1 Hz; δ 6,14; d ; 2,1 Hz; δ 6,31; d ; 2,0 Hz foram atribuídos à aglicona do flavonoide quercetina. A presença dos hidrogênios δ 7,34; d ; 16,0 Hz e δ 6,05; d ; 16,0 Hz, além dos hidrogênios aromáticos δ 6,97; d ; 1,5 Hz; δ 6,8 – 6,7, infere na possibilidade de haver na estrutura a esterificação com o ácido cafeico, devido à ligação dupla *trans*. Portanto, a estrutura compõe-se das porções flavonoide (quercetina), açúcar e ácido cafeico.

Observou-se que a esterificação ocorre no carbono 6 do açúcar, pois os hidrogênios desta posição (δ 4,29 e 4,21), estão desblindados quando comparados ao deslocamento químico de hidrogênios da posição C-6 de glicose não esterificada.

A posição da glicosilação foi determinada pela observação, nos mapas de contorno do HMBC, da correlação entre o hidrogênio anomérico δ 5,24 e o carbono-3 da aglicona (δ 134,2). Os Espectros de Massas (ESI-MS e ESI-MS/MS - **Figura 70**) e comparação dos dados espectrais com a literatura confirmam a estrutura proposta (CALZADA, CEDILLO-RIVERA, MATA, 2001).

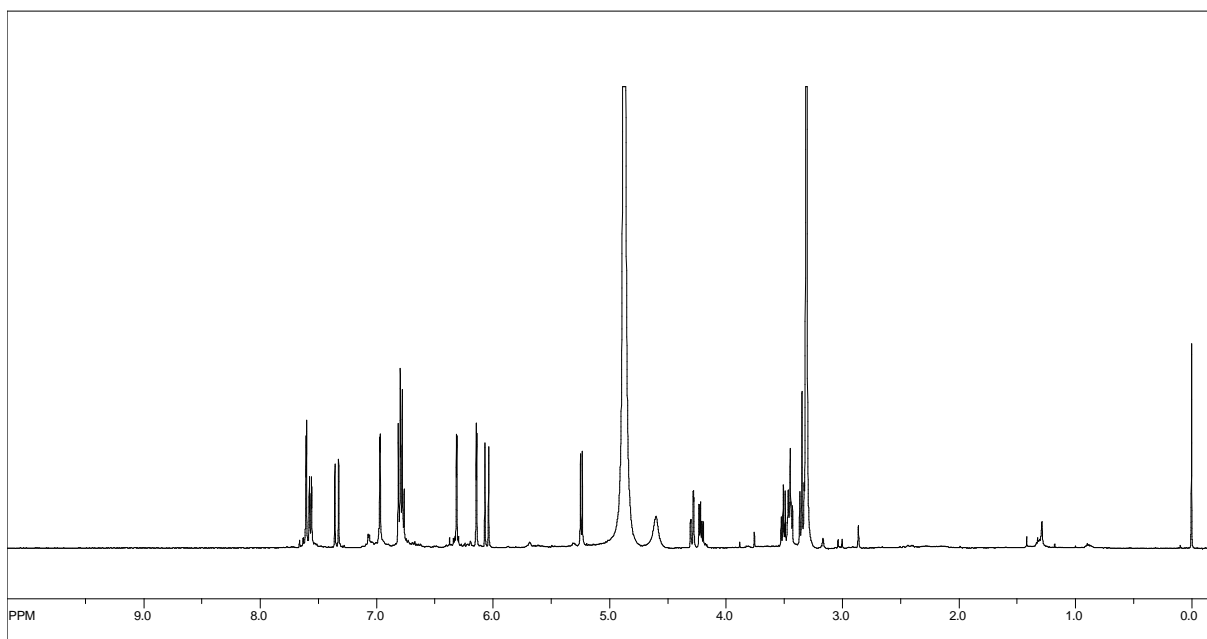


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H da substância **IC-30** ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz).

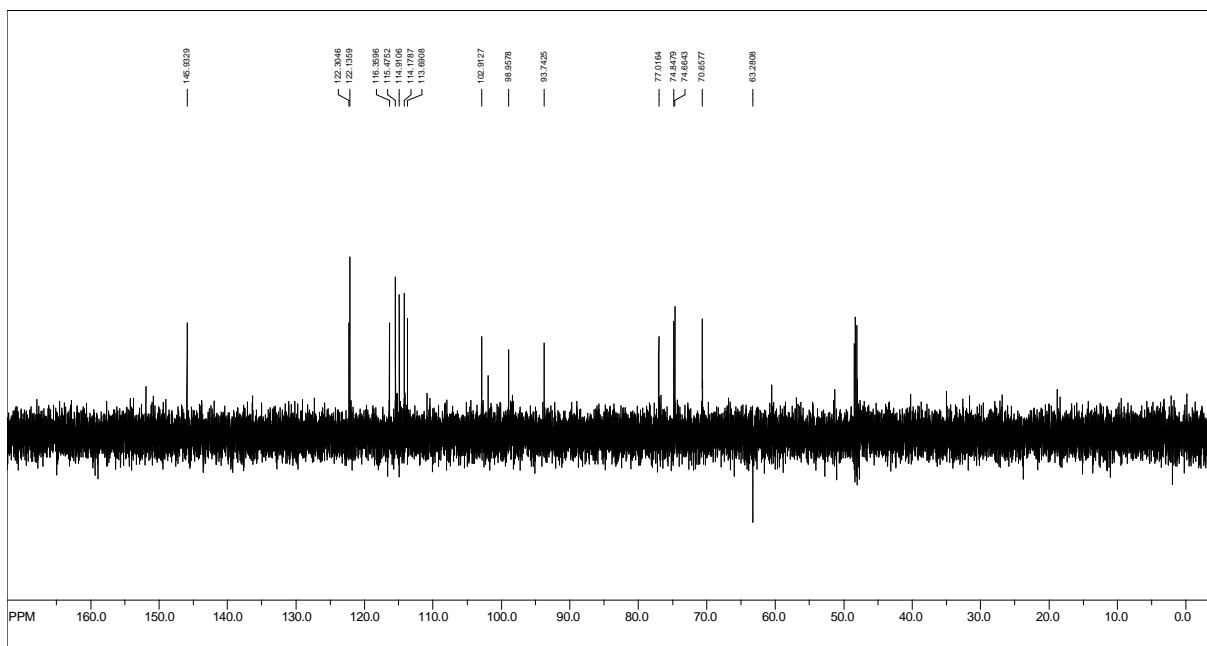


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da substância IC-30. ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 125 MHz).

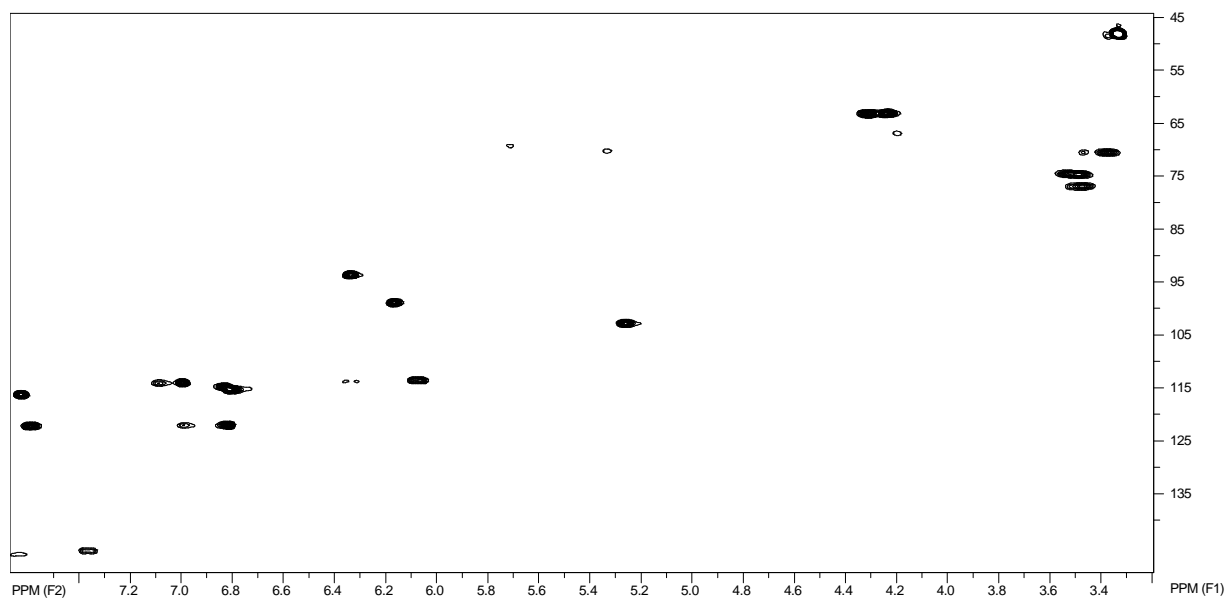


Figura 68. Mapa de contorno do HMQC da substância IC-30. ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 e 125 MHz).

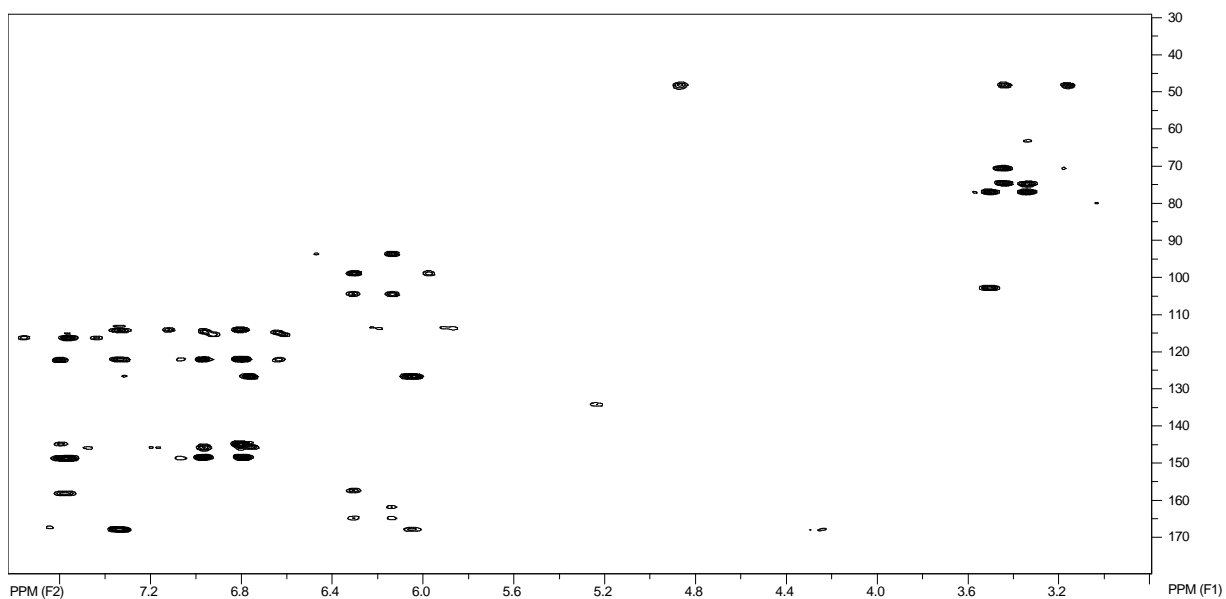


Figura 69. Mapa de contorno do HMBC da substância IC-30. (CD₃OD-TMS, 500 e 125 MHz).

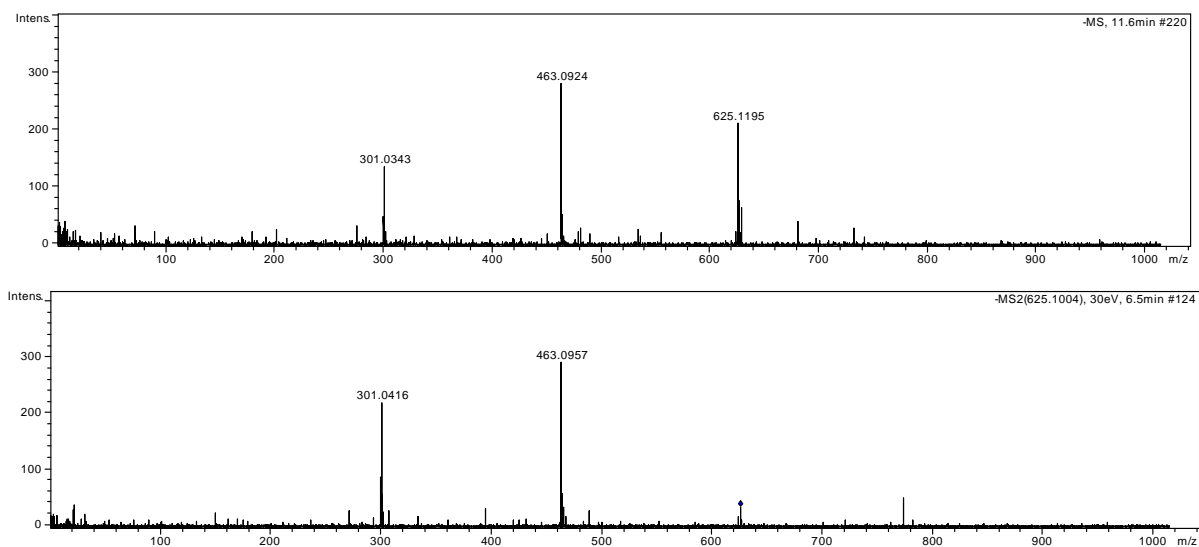


Figura 70. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância IC-30.

4.3.6. Considerações sobre o estudo químico de *I. chiliantha*

Derivados fenilpropanoides têm sido muito encontrados no gênero *Ipomoea*. Foi realizado um levantamento bibliográfico das substâncias identificadas nas partes aéreas de *I. chiliantha* para verificar a presença destas no gênero em questão. Tal levantamento está discriminado a seguir.

- ✓ A resina glicosídica jalapinolato de 11-*O*- β -glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[3-*O*-*trans*-cinamoil-4-*O*-acetil- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(2-*O*-*n*-dodecanoil)- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -fucopiranosido (éster intramolecular 1, 2''), ainda não havia sido descrita na literatura. Conforme descrito anteriormente, esta classe de substâncias têm apresentado variadas atividades farmacológicas (antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, anti-serotoninérgica, além da atividade catártica drástica). Embora não haja, na literatura, estudos que evidenciem a atividade tóxica para o gado devido a presença destas substâncias, é possível que as mesmas estejam contribuindo para esta toxicidade no gênero.
- ✓ Cafeoato de etila foi isolado de *I. subincana* e *I. batatas* (MEIRA *et al*, 2008; YIN, KONG, 2008).
- ✓ 4,5-di-*O*-cafeoilquinato de metila, e 3,4-di-*O*-cafeoilquinato de metila foram isolados de *I. batatas* e *I. pes-caprae* (KIM, JIN, LEE, 2007; TERAMACHI, *et al*, 2005).
- ✓ 3,5-di-*O*-cafeoilquinato de metila foi isolado de *I. subincana*, *I. batatas* e *I. pes-caprae*. (MEIRA *et al*, 2008; KIM, JIN, LEE, 2007; TERAMACHI *et al*, 2005).
- ✓ Ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico foi isolado de *I. cairica*, *I. pes-caprae*, *I. fistulosa* e *I. batatas*. (FERREIRA *et al*, 2006; TERAMACHI *et al*, 2005; SATTAR, GALA, RASHWAN, 1995; KIM, JIN, LEE, 2007).
- ✓ Ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico foi isolado de *I. cairica*, *I. pes-caprae*, e *I. batatas* (FERREIRA *et al*, 2006; TERAMACHI *et al*, 2005; ISLAM *et al*, 2002).
- ✓ Ácido 3,4,5-tri-*O*-cafeoilquínico foi isolado de *I. batatas* (ISLAM *et al*, 2002).
- ✓ 3,4,5-tri-*O*-cafeoilquinato de metila; ácido 1,3,5-tri-*O*-cafeoilquínico; 5-*O*-cafeoilquinato de metila ainda não haviam sido encontrados em *Ipomoea*.
- ✓ O flavonoide quercetina 3-*O*-(6''-*O*-*E*-cafeoil)- β -glicopiranosídeo não foi encontrado no gênero. Deve-se ressaltar a relativamente recente descoberta da atividade de uma substância com estrutura similar, cuja única diferença é a troca dos açúcares (galactose pela glicose) em inibir α -glicosidase (YOSHIDA *et al*, 2008). Muitas espécies de *Ipomoea*

são consideradas tóxicas devido à capacidade de inibição de glicosidases, atribuída à presença de alcaloides tropânicos e indolizidínicos. Talvez, a presença destes flavonoides possa estar contribuindo para esta atividade.

- ✓ Calistegina B1 já foi identificada em *I. alba*, *I. aquatica*, *I. batatas*, *I. carnea*, *I. chiriquiensis*, *I. hederifolia*, *I. lobata*, *I. obscura*, *I. setifera*, *I. squamosa*, *I. trifida*, *I. violacea* e *I. wightii*, sendo a calistegina mais encontrada no gênero, enquanto que a calistegina B4 já foi identificada em *I. aquatica*, *I. carnea*, e *I. obscura* (SCHIMMING *et al*, 1998 e .SCHIMMING *et al*, 2005).
- ✓ Não foi identificado o alcaloide suainsonina, o qual tem demonstrado maior atividade inibidora de glicosidases que as calisteginas, e portanto, possui maior significância para a toxicidade.

Convém ressaltar que não há relatos de toxicidade ao gado relacionada a esta espécie em estudo, havendo apenas proposta de ser tóxica, por pertencer a um gênero com exemplares tóxicos. Compete ao presente trabalho comparar a química de *I. chiliantha* com a química do gênero, e então sugerir sua potencial toxicidade. A presença de substâncias tóxicas ou potencialmente tóxicas não é suficiente para afirmar sua toxicidade, tendo em vista que vários fatores devem ser considerados, tais como a concentração destas substâncias no vegetal, e a possível ocorrência de sinergismo ou antagonismo, efeitos os quais são frequentemente observados em estudos biológicos de produtos naturais.

4.4. ESTUDO QUÍMICO DE *Riedeliella graciliflora*

O extrato desta planta foi escolhido para um estudo químico mais detalhado devido suas análises cromatográficas, as quais apresentaram perfis cromatográficos promissores para possíveis isolamentos, aliado ao fato de tratar-se de uma planta comprovadamente tóxica para o gado, sendo desconhecida a substância, ou mistura de substâncias responsáveis por esta toxicidade.

4.4.1. Fração hexânica

A fração hexânica foi submetida à análise por CG-EM (Condições de análise CG 1, página 26), evidenciando a presença de ácidos e ésteres graxos, terpenos de cadeia aberta, tocoferol, triterpenos e esteroides (**Tabela 23** e **Figura 71**). Triterpenos e esteroides foram identificados baseados nos tempos de retenção relativos ao 5- α -colestano, comparados com aqueles obtidos por padrões, além da similaridade com biblioteca de espectros de massas do banco de padrões do laboratório (Condições de análise CG 2, página 27). As substâncias alifáticas foram identificadas baseadas em seus índices de Kovats e similaridade com os espectros de massas das bibliotecas disponíveis.

Tabela 23. Substâncias identificadas na fração hexânica de *R. graciliflora*.

	Substância	Similaridade	IK (exp.)	IK (lit.)	Literatura
RG-1	Neofitadieno	95	1835	1838	Rădulescu <i>et al</i> , 2010
RG -2	Ácido hexadecanoico	94	1959	1960	Maia <i>et al</i> , 2000
RG -3	Fitol	97	2104	2106	Miyazawa <i>et al</i> ,2005
RG -4	Ácido 9,12-octadecadienoico	93	2127	2123	Miyazawa <i>et al</i> ,2004
RG -5	Ácido octadecanoico	93	2160	2170	Maia <i>et al</i> , 2000
RG -6	Esqualeno	94	2805	2808	da Camara <i>et al</i> , 2002
RG -7	α -tocoferol	93			
RG -8	Estigmasterol	91			
RG -9	β -sitosterol	92			
RG -10	Lupeol	95			
RG -11	Friedelina	90			

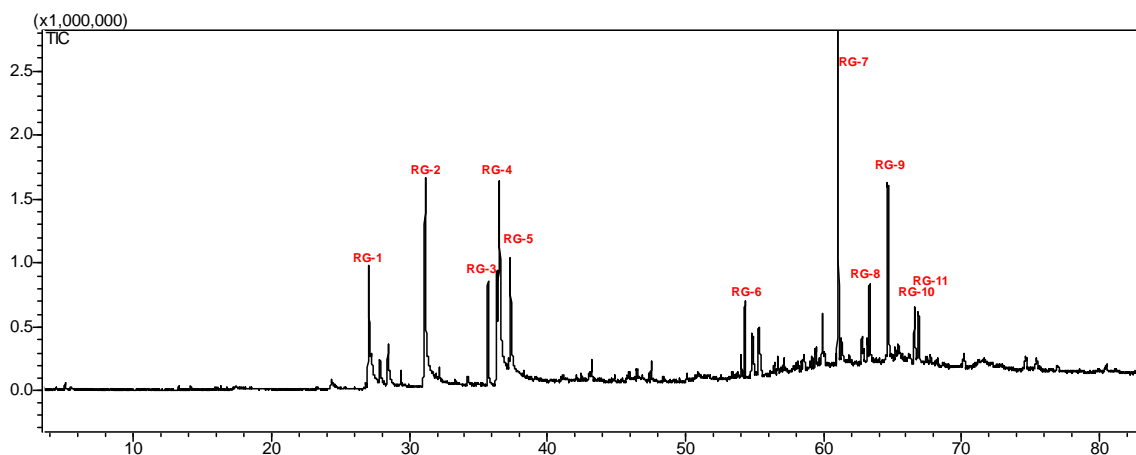


Figura 71. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de *R. graciliflora* - Condições de análise CG 1, página 26).

4.4.2. Fração DCM

A fração DCM foi submetida a fracionamento em coluna, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como eluente, após “clean-up” descrito no item 3.3.4. Foram obtidas 60 frações, que foram analisadas por CCDC, eluídas com (FM DCM:MeOH 95:5 e HEX-AcOEt 3:7), reveladas com reagente Natural Products, analisado e UV 254 e 366 nm, e reunidas por similaridade, conforme mostrado na **Tabela 24** a seguir.

Tabela 24. Frações obtidas de CC da fração em DCM de *R. graciliflora*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-11	623,3	32-35	41,6
12-14	206,6	36-39	29,7
15-17	87,4	40-42	32,1
18-22	117,4	43-49	8,4
23-25	24,1	50-60	13,3
26-31	88,2		

As frações RGDCM 26-31 e RGDCM 32-35 foram submetidas a purificação em CLAE-UV-DAD (**Figura 72** e **Figura 73**). Alguns destes picos foram selecionados, de acordo com a massa obtida, para análise por RMN de ^1H , sendo identificados os isoflavanóis **RG-12**, **RG-13**, **RG-14**, e **RG-15**.

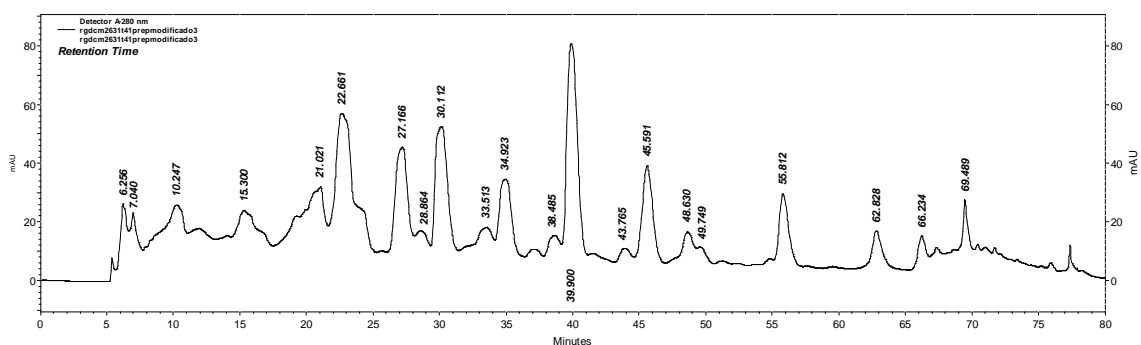


Figura 72. Cromatograma obtido em CLAE-UV (280 nm) da fração RGDCM 26-31, obtido utilizando Condições de análise CLAE 5, página 28. O pico com $t_R = 30,11$ min. refere-se à substância **RG-12**, o pico com $t_R = 27,16$ min. refere-se à substância **RG-13**, o, o pico com $t_R = 39,90$ min. refere-se à substância **RG-14**.

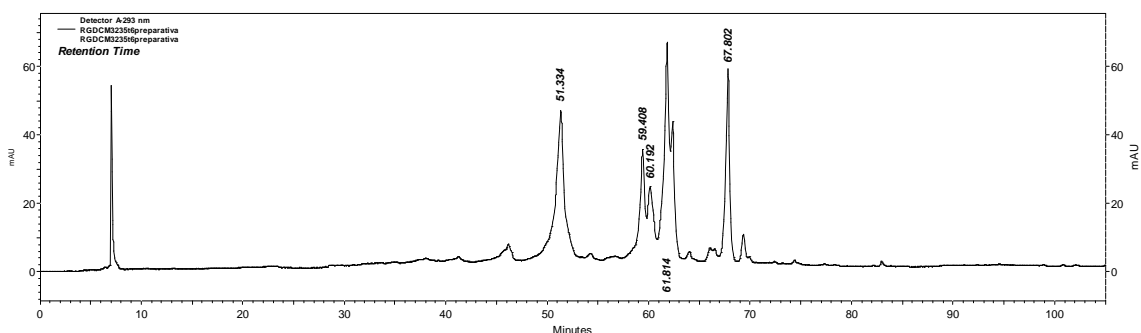


Figura 73. Cromatograma obtido em CLAE-UV (293 nm) da fração RG DCM 32-35, obtido utilizando Condições de análise CLAE 6, página 28. O pico com $t_R = 67,8$ min. refere-se à substância **RG-15** e o pico com $t_R = 59,3$ min. refere-se à substância **RG-14**.

4.4.3. Fração AcOEt

A fração AcOEt (3,5 g) foi submetida a fracionamento em coluna, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como eluente, após “clean-up”, descrito no item 3.3.4. Foram obtidas 115 frações, que foram analisadas por CCDC, eluídas com AcOEt: MeOH: ác. acético: ác. fórmico (100:27:11:11), reveladas com reagente Natural Products, anisaldeído e UV 254 e 366 nm, e reunidas por similaridade, conforme mostrado na **Tabela 25**.

Tabela 25. Frações obtidas de CC da fração em AcOEt de *R. graciliflora*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-12	257,8	33-39	161,7
13-15	194,2	40-48	230,7
16-19	465,6	49-52	74,1
20-21	189,1	53-60	137,7
22-24	392,8	61-70	142,7
25-28	411,6	71-82	117,6
29-32	197,4	83-115	219,8

A fração RGAcOEt 40-48 foi submetida a separação em CLAE (**Figura 74**), sendo identificados o benzenoide ácido protocatecuico (**RG-16**) e o flavonol rutina (**RG-17**).

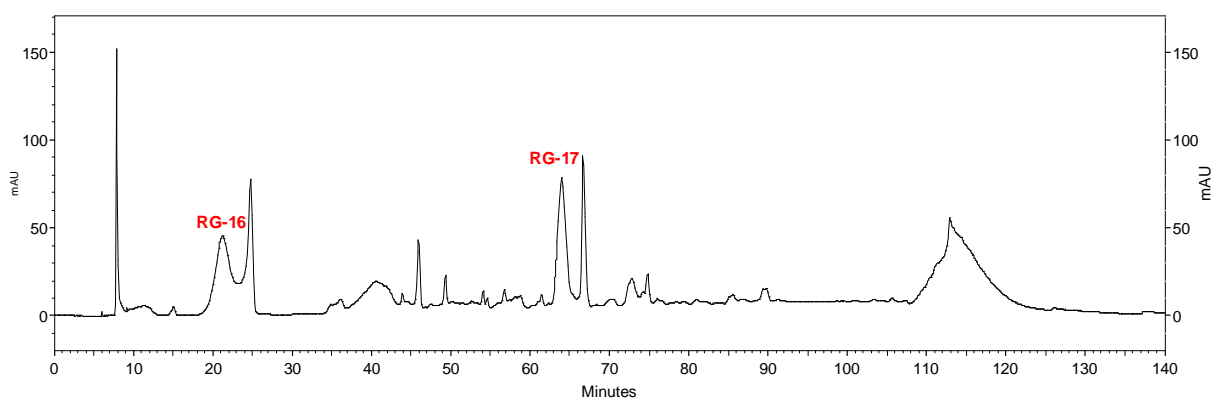


Figura 74. Cromatograma obtido em CLAE-UV (257 nm) da fração RG AcOEt 40-48, obtido utilizando Condições de análise CLAE 7, página 28. O pico com $t_R = 21,0$ min. refere-se à substância **RG-16** e o pico com $t_R = 64,0$ min. refere-se à substância **RG-17**.

A fração RGAcOEt 53-60 também foi submetida a separação em CLAE (**Figura 75**). Foram identificados os flavonoides C-glicosídeos **RG-18** e **RG-19**.

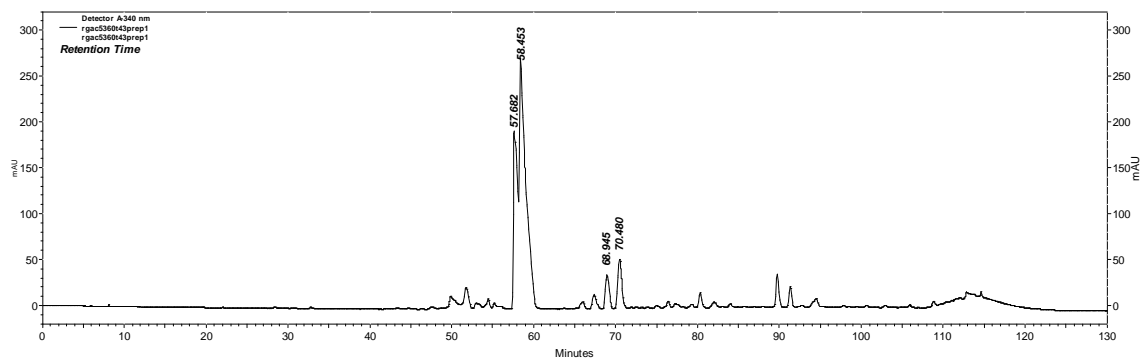
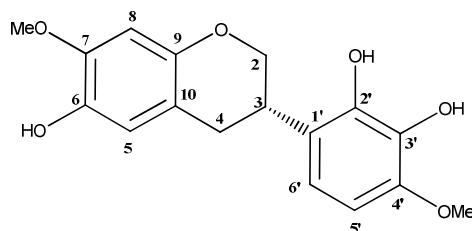
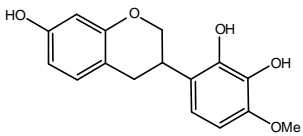


Figura 75. Cromatograma obtido em CLAE-UV (340 nm) da fração RG AcOEt 50-53, obtido utilizando Condições de análise CLAE 7, página 28. O pico com $t_R = 57,6$ min. refere-se à substância **RG-18** e o pico com $t_R = 58,3$ min. refere-se à substância **RG-19**.

4.4.4. Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *R. graciliflora*.

Substância RG-12

(3*S*) 6,2',3'-triidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavana**Tabela 26.** Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-12**, comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura*.

Posição	^1H (δ ; mult; <i>J</i> -Hz)	δ ^{13}C	HMBC	
2a	3,92; <i>t</i> ; 10,0	70,2	C-9; C-3; C-4	71,4
2b	4,22; <i>d</i> ; 10,0			
3	3,34; <i>m</i>	32,3		33,0
4a	2,92; <i>dd</i> ; 10,6 e 16,0	30,9	C-9; C-2; C-3; C-10; C-5	31,6
4b	2,77; <i>dd</i> ; 4,5 e 16,0			
5	6,48; <i>s</i>	119,1	C-9; C-7; C-4	130,8
6		135,4		109,3
7		147,2		157,4
8	6,47; <i>s</i>	105,8	C-10; C-6	104,2
9		143,7		156,1
10		116,8		113,7
1'		121,8		128,3
2'		144,7		144,3
3'		134,7		135,1
4'		148,1		147,8
5'	6,41; <i>d</i> ; 8,7	104,0	C-1'; C-3'; C-4'	103,6
6'	6,52; <i>d</i> ; 8,7	117,3	C-4'; C-2'; C-3	117,6
OMe-7	3,71; <i>s</i>	56,9	C-7	
OMe-4'	3,73; <i>s</i>	56,7	C-4'	56,0

*LOTTI *et al.*, 2010.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região de aromáticos, referentes a quatro hidrogênios, além de hidrogênios entre 2,7 – 4,2 ppm (**Tabela 26**).

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 17 sinais, sendo estes referentes a duas metoxilas (δ_{CH_3} 56,7 e 56,9), dois carbonos metilênicos sp^3 (δ_{CH_2} 70,2 e 30,9), cinco carbonos metínicos, dos quais um deles é sp^3 com deslocamento químico em δ_{CH} 32,3; e os outros quatro carbonos são sp^2 com deslocamentos químicos em δ_{CH} 119,1; 105,8; 104,0 e 117,3; além de oito carbonos quaternários em δ_{C} 135,4; 147,2; 143,7; 116,8; 121,8; 144,7; 134,7; 148,1. Tais considerações levam a propor tratar-se de uma estrutura com um esqueleto de 15 carbonos, possuindo duas posições metoxiladas. O fato de haver muitos sinais na região de aromáticos, aliado aos 15 carbonos da estrutura, faz pensar tratar-se de um flavonoide. A presença de três carbonos sp^3 (δ_{CH} 32,3 e δ_{CH_2} 70,2 e 30,9) e ausência de carbono na região δ_{C} 173 – 180, torna possível propor um anel C do esqueleto do flavonoide com ausência da dupla ligação entre os carbonos das posições 2 e 3 e sem a carbonila na posição 4.

A região do sinal do carbono metilênico δ_{CH_2} 70,2 leva a pensar em uma estrutura com este carbono ligado a oxigênio, devido à sua desblindagem. Portanto, propõe-se tratar de um isoflavonoide, conforme está apresentado na figura abaixo.



Figura 76. Esqueletos bases de um flavonoide (1) e um isoflavonoide (2). Nota-se em (1) a presença de um carbono metínico ligado ao oxigênio, e em (2) a presença de um carbono metilênico ligado ao oxigênio.

Quanto ao padrão de substituição

O padrão de substituição foi baseado em análises nos mapas de contorno do HMQC e do HMBC, aliado às multiplicidades dos sinais de hidrogênios aromáticos. Há seis posições oxigenadas devido à presença de seis carbonos quaternários oxigenados, a saber: δ_{C} 134,7; 135,4; 143,7; 144,7; 147,2 e 148,1, sendo os carbonos δ_{C} 147,2 e 148,1; metoxilados devido suas correlações nos mapas de contorno do HMBC com os hidrogênios metílicos δ_{H} 3,71 e δ_{H} 3,73. O carbono δ_{C} 143,7 foi posicionado em 9, baseado na correlação no mapa de contorno do HMBC com os hidrogênios da posição 2 ($\delta_{\text{H-2a}}$ 3,92; *t*; 10,0 e $\delta_{\text{H-2b}}$ 4,22; *d*; 10,0).

Quanto às multiplicidades dos sinais dos hidrogênios na região de aromáticos, observou-se a presença de dois dubletos com constante de acoplamento 8,7 Hz, e portanto, acoplamento *orto*, e dois singletos, portanto, hidrogênios próximos a carbonos substituídos. Tais informações sugerem que os anéis A e B possuem dois hidrogênios cada. A correlação entre o sinal δ_{H} 6,52; *d*; 8,7 Hz com o sinal do carbono C-3 em δ_{CH} 32,3, no mapa de contorno do HMBC, tornou possível posicionar os hidrogênios δ_{H} 6,41; *d*; 8,7 Hz e δ_{H} 6,52; *d*; 8,7 Hz nas posições 5' e 6' do anel B, respectivamente, e conseqüentemente, substituir as demais posições deste anel com oxigenações. As correlações nos mapas de contorno do HMBC dos sinais dos hidrogênios δ_{H} 6,47; *s* e δ_{H} 6,48; *s*; com os carbonos quaternários C-10 e C-9 (δ_{C} 116,8 e δ_{C} 143,7) aliado às correlações entre os hidrogênios da posição 4 (δ_{H} 2,92 e 2,77) com o carbono metínico δ_{CH} 119,1, e os hidrogênios deste carbono com o carbono metoxilado δ_{C} 147,2, colocam estes hidrogênios aromáticos δ_{H} 6,48; *s* e δ_{H} 6,47; *s*; nas posições 5 e 8, respectivamente. As principais correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC estão apresentadas na **Figura 77**.

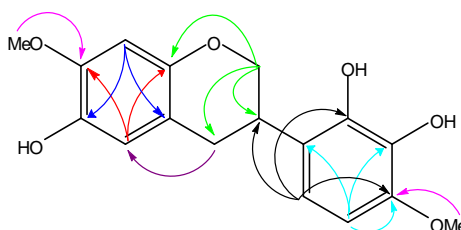


Figura 77. Principais correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC para a substância **RG-12** (H→C).

Quanto ao estudo conformacional referente à posição 3

A substituição da posição 3 foi proposta estar em *equatorial* baseado nas constantes de acoplamento apresentadas pelos sinais dos hidrogênios H-2a ($\delta_{\text{H-2a}}$ 3,92; *t*; 10,0) e H-4a ($\delta_{\text{H-4a}}$ 2,92; *dd*; 10,6 e 16,0). Ambos hidrogênios apresentaram acoplamento geminal ($\text{H}_{2\text{-a}} - \text{H}_{2\text{-b}} = 10,0$ Hz e $\text{H}_{4\text{-a}} - \text{H}_{4\text{-b}} = 16,0$ Hz) e acoplamento *axial-axial* ($\text{H}_{2\text{-a}} - \text{H}_3 = 10,0$ Hz e $\text{H}_{4\text{-a}} - \text{H}_3 = 10,6$ Hz), indicando a presença do hidrogênio H-3 em *axial* (**Figura 78**). Tal conformero é realmente o esperado, na temperatura em que foram realizados os experimentos. As moléculas são termodinamicamente favorecidas quando substituintes de maior peso molecular estão em equatorial.

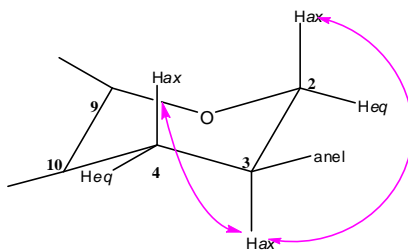


Figura 78. Acoplamentos observados entre H-2a e H-3 e H-4a e H-3.

Quanto ao estudo da estereoquímica absoluta

O centro estereogênico no carbono-3 foi determinado ser (*S*), por dicroísmo circular (DC). Esta técnica é muito útil na determinação da estereoquímica absoluta de flavonoides. Para isoflavanos, a qual possui apenas um centro estereogênico, é observado o efeito de Cotton na região de absorção (260 – 300 nm). Efeito de Cotton (EC) negativo nesta região de absorção indica tratar-se do enantiômero (*S*), enquanto que efeito de Cotton positivo nesta região de absorção indica tratar-se do enantiômero (*R*) (SLADE, FERREIRA, MARAIS, 2005).

Substância RG-12: $[\alpha]_D^{25}$ -28 (*c* 0,20; MeOH); DC (MeOH, $\Delta\epsilon$) λ_{\max} 260 (+402229) 270 (-590836), 300,5 (-100876) nm; ESI-MS: *m/z* 317,1053 (calcd para C₁₇H₁₇O₆, 317,1025).

Proposta de fragmentação por ESI (modo negativo)

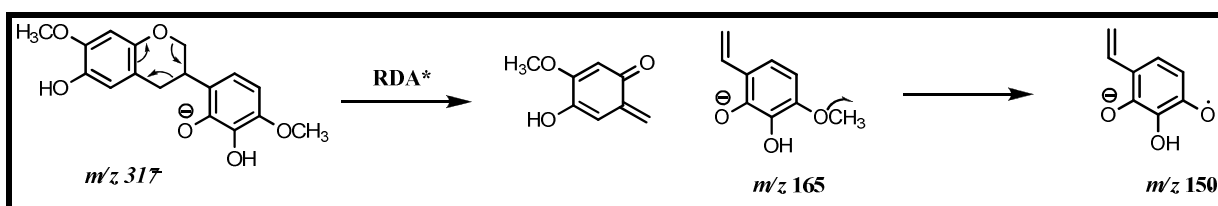


Figura 79. Proposta de fragmentação para a isoflavana **RG-12**.

*RDA = Reação de Retro Diels-Alder.

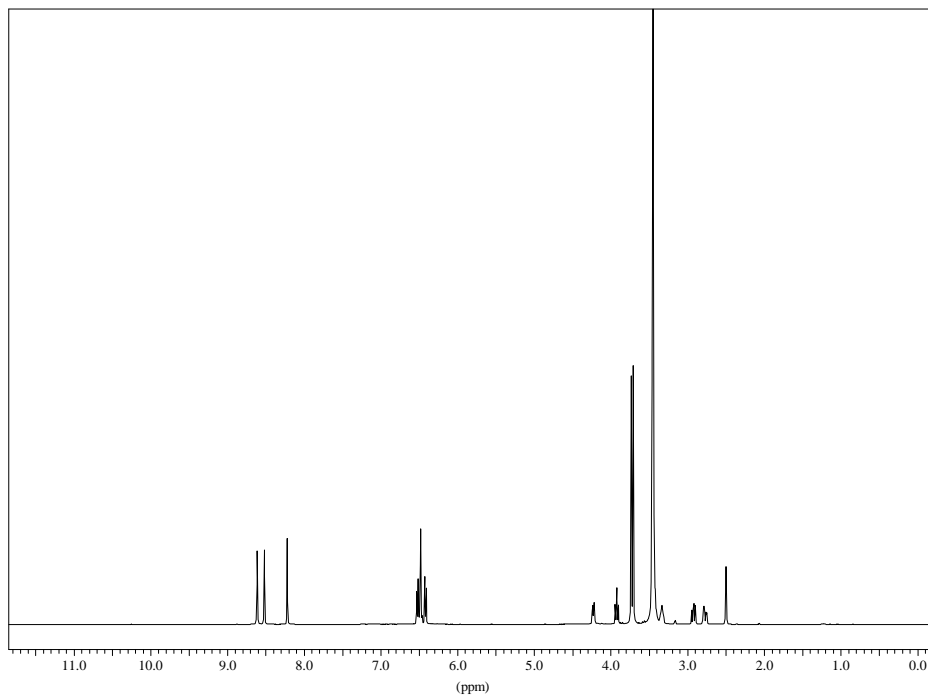


Figura 80. Espectro de RMN de ^1H da substância **RG-12**. (DMSO- d_6 -TMS; 500 MHz).

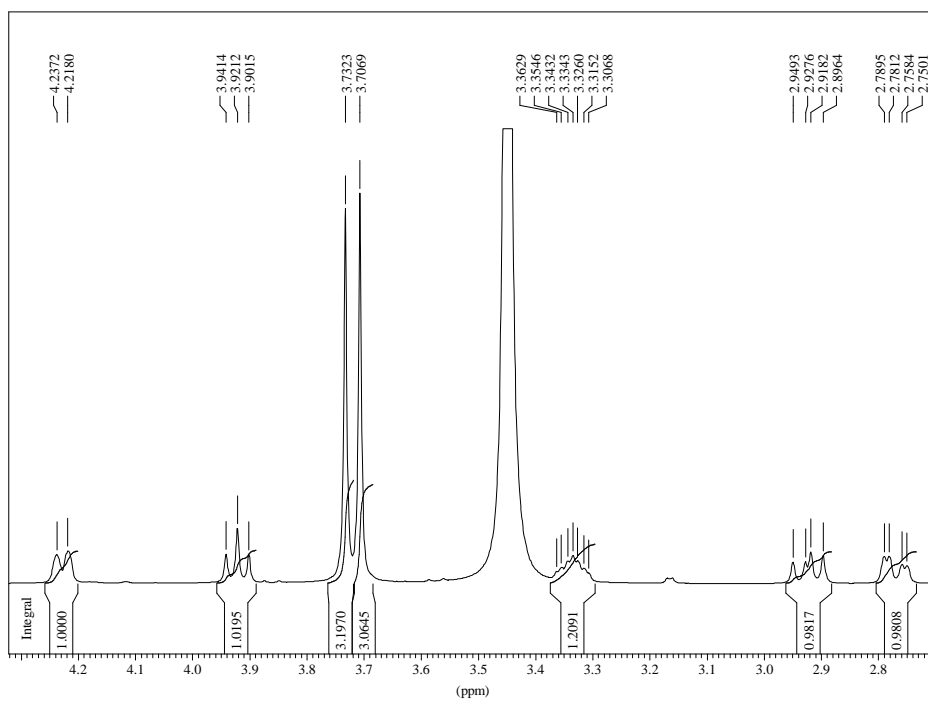


Figura 81. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-12**. (DMSO- d_6 -TMS; 500 MHz).

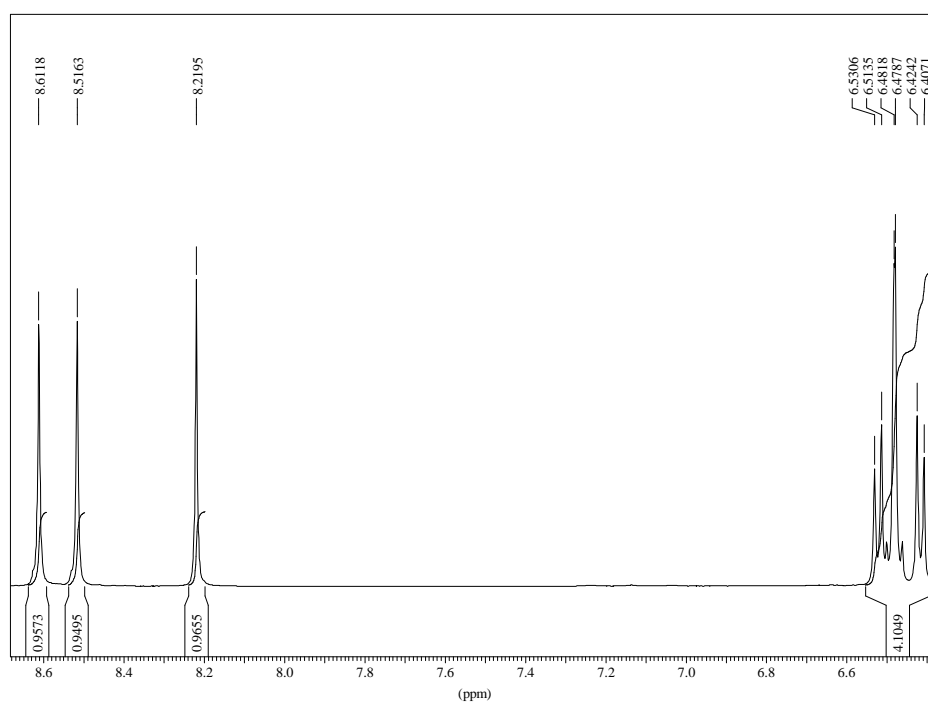


Figura 82. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-12**. (DMSO- d_6 -TMS; 500 MHz).

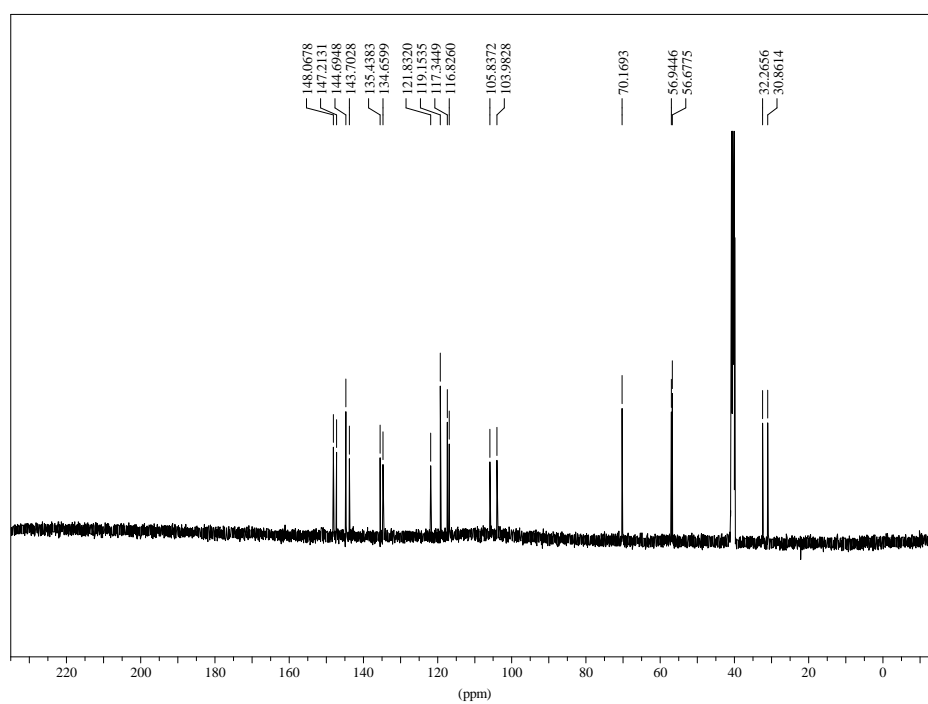


Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **RG-12**. (DMSO- d_6 -TMS, 125 MHz).

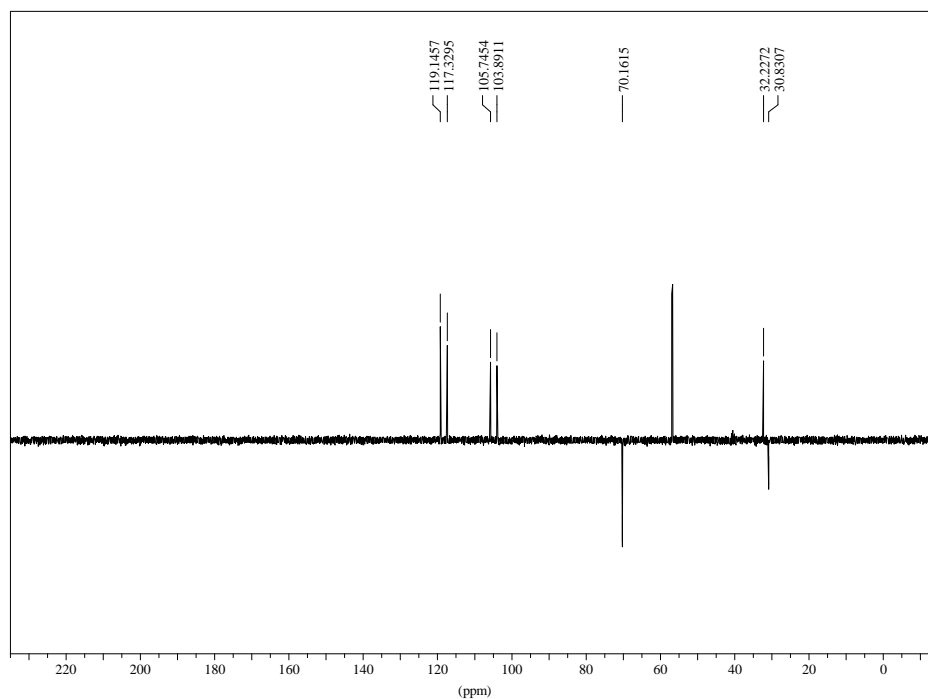


Figura 84. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da substância **RG-12**. (DMSO- d_6 -TMS, 125 MHz).

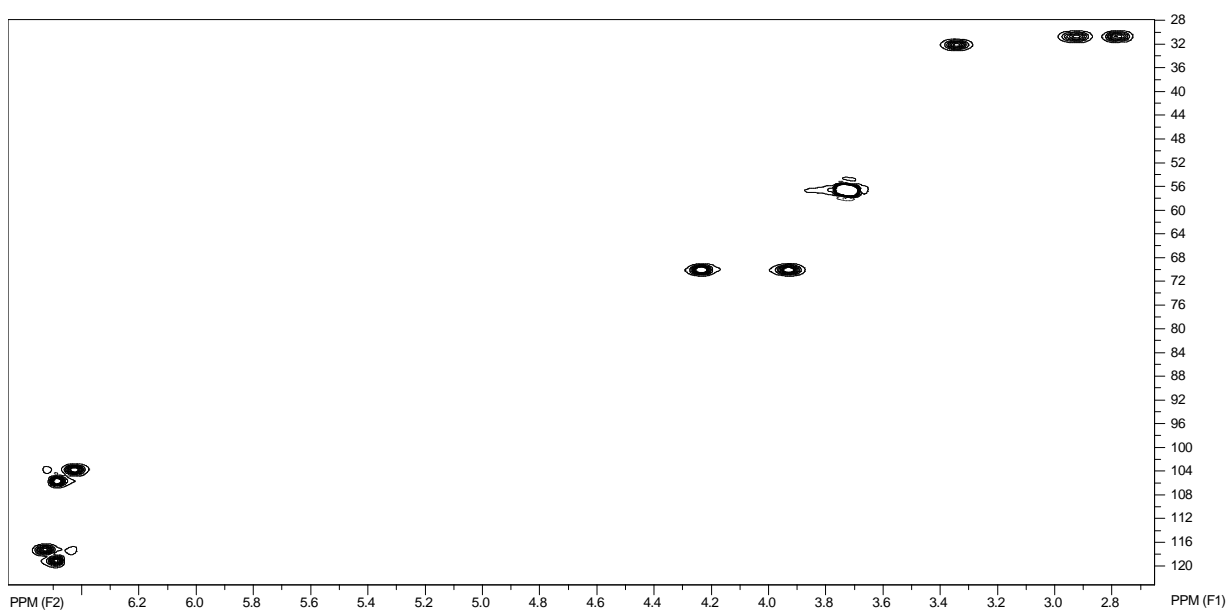


Figura 85. Mapa do contorno do HMQC da substância **RG-12**. (DMSO- d_6 -TMS; 125 e 500 MHz).

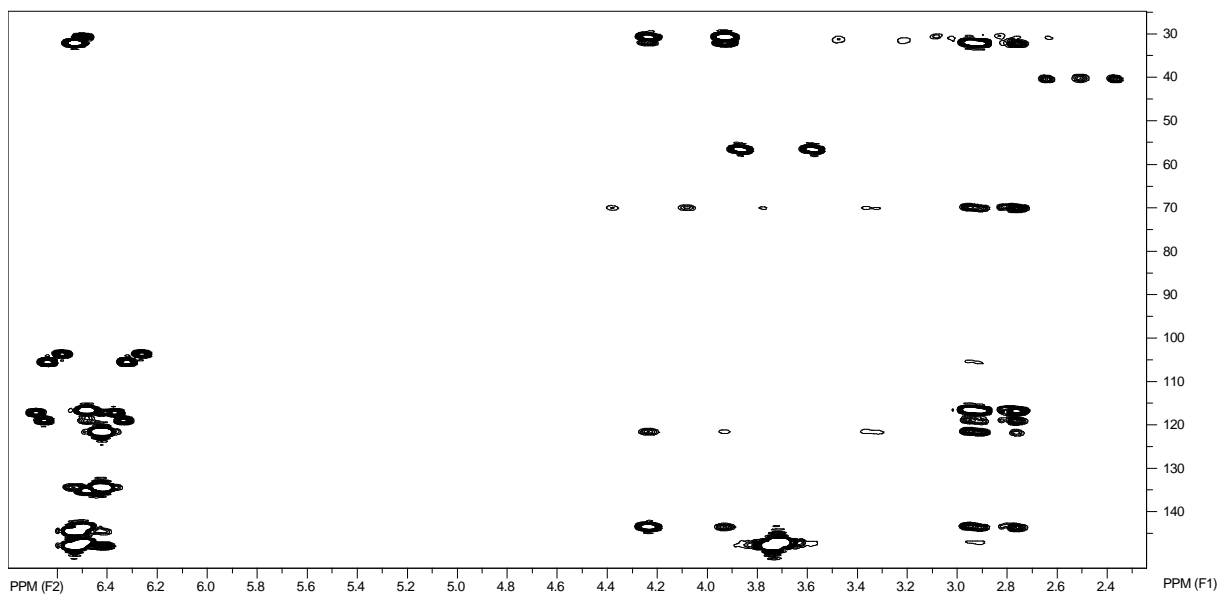


Figura 86. Mapa do contorno do HMBC da substância **RG-12**. (DMSO-d₆-TMS; 125 e 500 MHz).

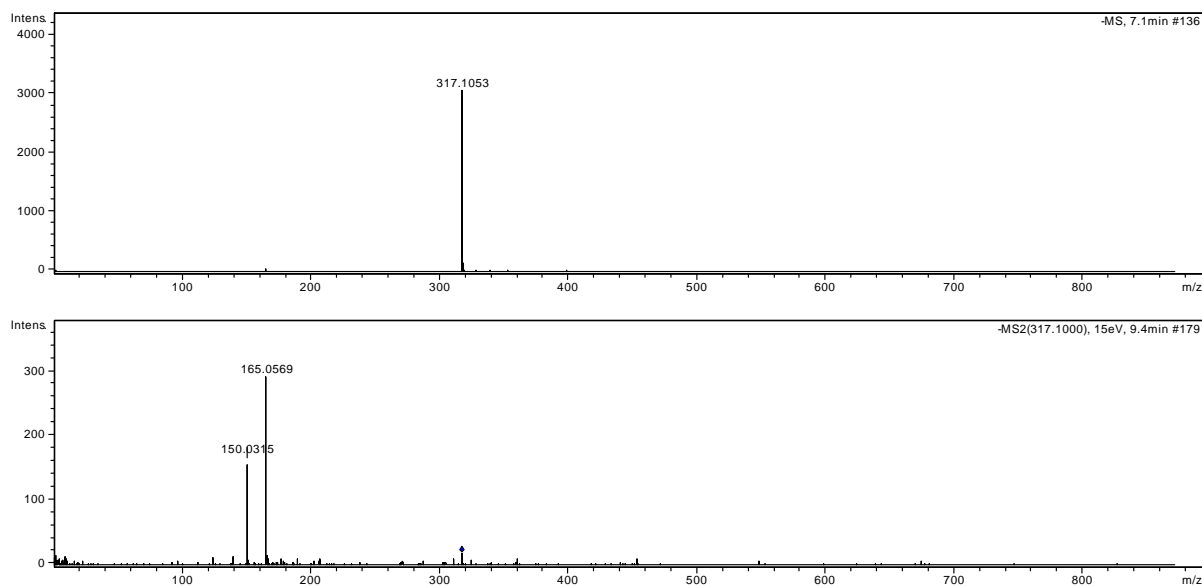
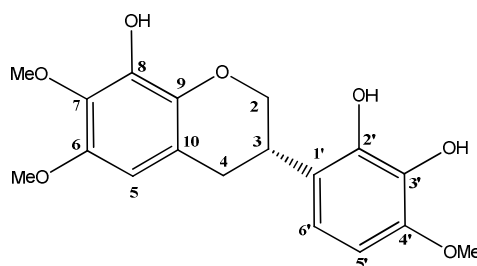
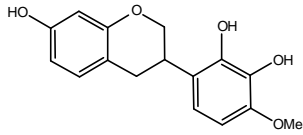


Figura 87. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **RG-12**. (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 317 u (15 eV)).

Substância RG-13

(3*S*) 8,2',3'-trihidroxi-6,7,4'-trimetoxiisoflavana**Tabela 27.** Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-13**, comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura*.

Posição	^1H (δ ; mult; <i>J</i> -Hz)	δ ^{13}C	HMBC	
2a	4,08; <i>d</i> ; 10,3	69,9	C-4; C-9	71,4
2b	3,78; <i>tl</i> ; 10,0			
3	3,24; <i>m</i>	32,4		33,0
4a	2,81; <i>dd</i> ; 16,2; 10,7	31,2	C-1'; C-9; C-10; C-3	31,6
4b	2,65; <i>dd</i> ; 16,2; 4,6			
5	6,10; <i>s</i>	103,4	C-4; C-6; C-7; C-9	130,8
6		147,3		109,3
7		136,4		157,4
8		139,9		104,2
9		138,3		156,1
10		117,5		113,7
1'		121,9		128,3
2'		144,7		144,3
3'		134,7		135,1
4'		148,1		147,8
5'	6,32; <i>d</i> ; 8,5	104,0	C-1'; C-3'	103,6
6'	6,42; <i>d</i> ; 8,5	117,3	C-3; C-2'; C-4'	117,6
OMe-6	3,57; <i>s</i>	56,8**	C-6	
OMe-7	3,53; <i>s</i>	60,9	C-7	
OMe-4'	3,63; <i>s</i>	56,7**	C-4'	56,0

**LOTTI *et al.*, 2010.

*podem ser trocados.

A elucidação estrutural desta substância foi realizada de maneira bastante similar àquela descrita anteriormente. A presença de 18 carbonos, sendo estes três metoxilas, infere em uma estrutura com esqueleto base de 15 carbonos, sendo três posições metoxiladas. A semelhança dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes aos anéis B e C em

relação a estrutura anterior, propõe tratar de uma isoflavana com padrão de substituição destes anéis, ou seja, uma isoflavana com as posições 2' e 3' hidroxiladas e a posição 4' metoxilada. Estas proposições foram posteriormente confirmadas baseadas nos mapas de contorno do HMBC. Então as diferenças estruturais estão no anel A (**Tabela 27**).

A presença de apenas mais um sinal de hidrogênio na região de aromáticos, no espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,10; *s*) indica que existem três posições no anel A substituídas, sendo uma destas hidroxilada (δ_{C} 139,9) e duas metoxiladas (δ_{C} 136,4 e 147,3), devido às correlações destes carbonos com os hidrogênios metílicos δ_{H} 3,53; *s* e δ_{H} 3,57; *s*, nos mapas de contorno do HMQC. A posição não substituída do anel A foi atribuída ser a posição 5 devido a correlação observada no mapa de contorno do HMBC entre este hidrogênio aromático (δ_{H} 6,10; *s*) e o carbono da posição 4 (δ_{CH_2} 31,2). As correlações observadas no mapa de contorno do HMBC entre H-5 e ambos os carbonos metoxilados, torna possível propor as posições das metoxilações em C-6 e C-7, tendo em vista que H-5 não se correlacionaria com C-8 nos mapas de contorno do HMBC.

A partir desta análise, propõe-se tratar da substância **RG-13**. Novamente, a estereoquímica do carbono-3 foi determinada ser (*S*), obtida por dicroísmo circular.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -192 (*c* 0,10, MeOH); DC (MeOH, $\Delta\epsilon$) λ_{max} 271 (-416071), 301.5 (-213874) nm; ESI-MS *m/z* 347,1142 (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_7$, 347,1131).

Proposta de fragmentação por ESI (modo negativo)

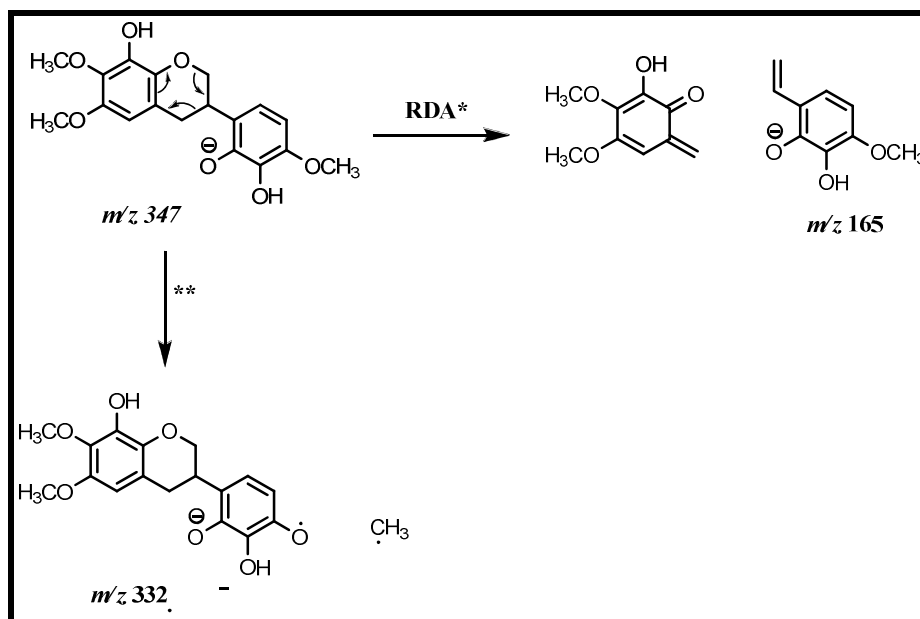


Figura 88. Proposta de fragmentação para a isoflavana **RG-13**.

*RDA = Reação de Retro Diels-Alder.

** Esta perda de metila radicalar pode ocorrer nas posições 6, 7 ou 4'.

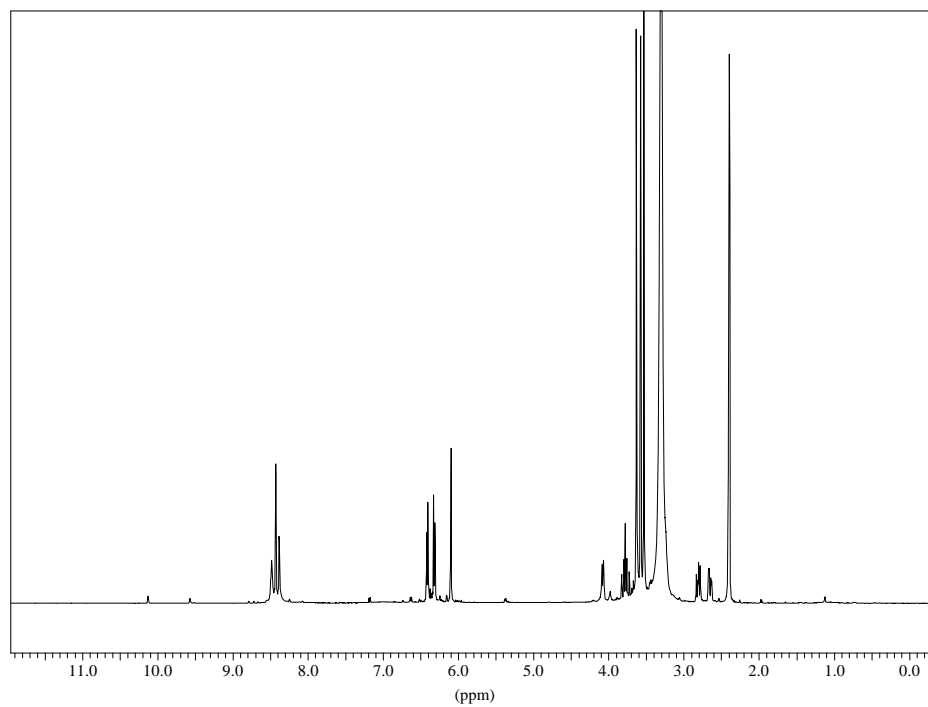


Figura 89. Espectro de RMN de ^1H da substância **RG-13**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

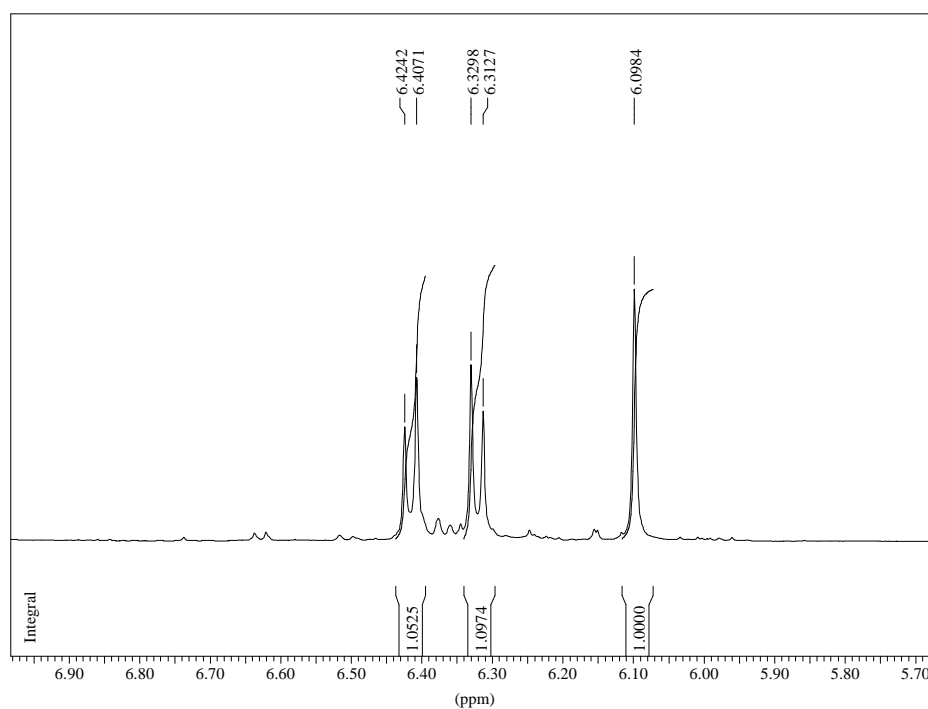


Figura 90. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-13**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

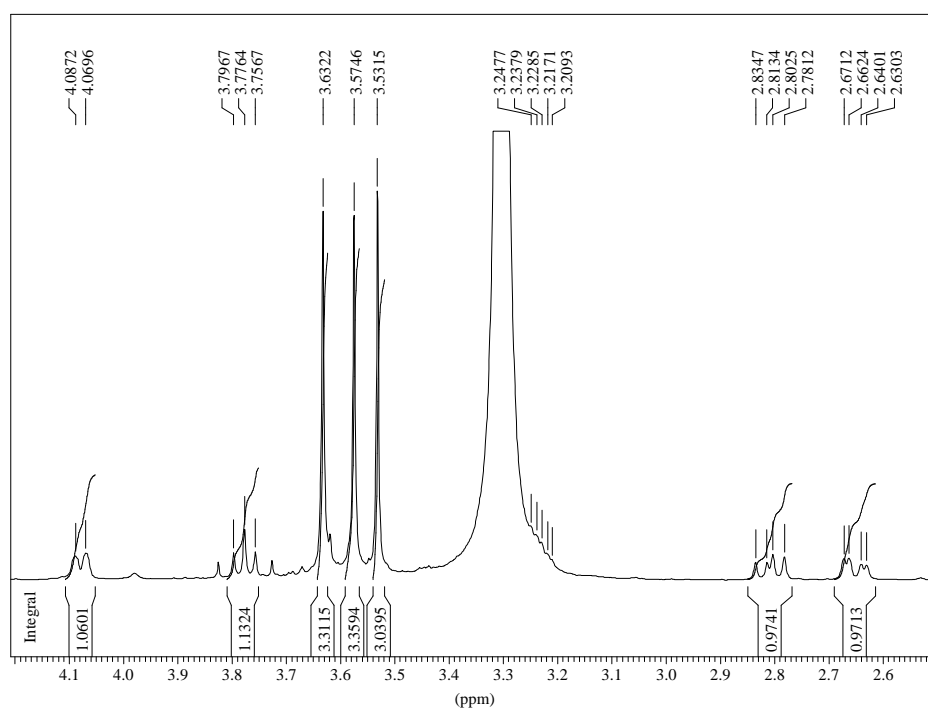


Figura 91. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-13**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

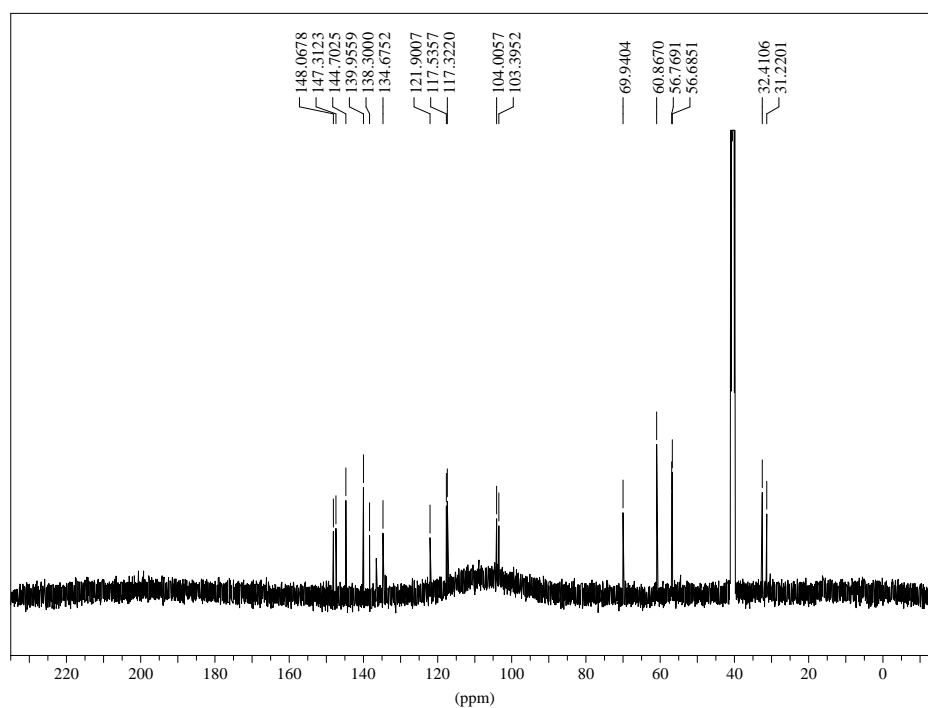


Figura 92. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **RG-13**. (DMSO- d_6 – TMS, 125 MHz).

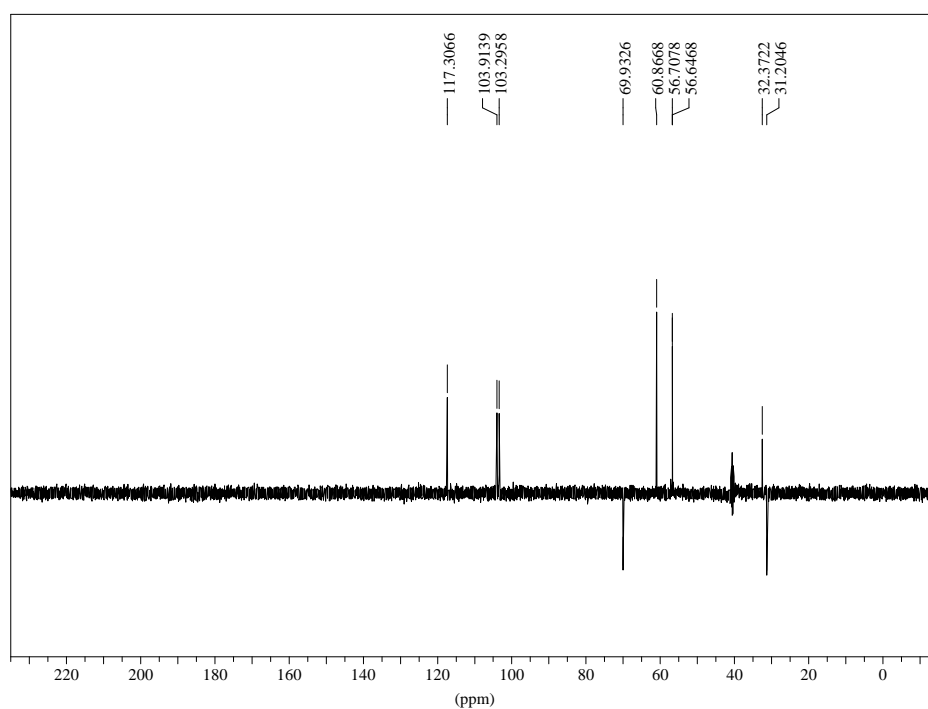


Figura 93. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da substância **RG-13**. (DMSO- d_6 – TMS, 125 MHz).

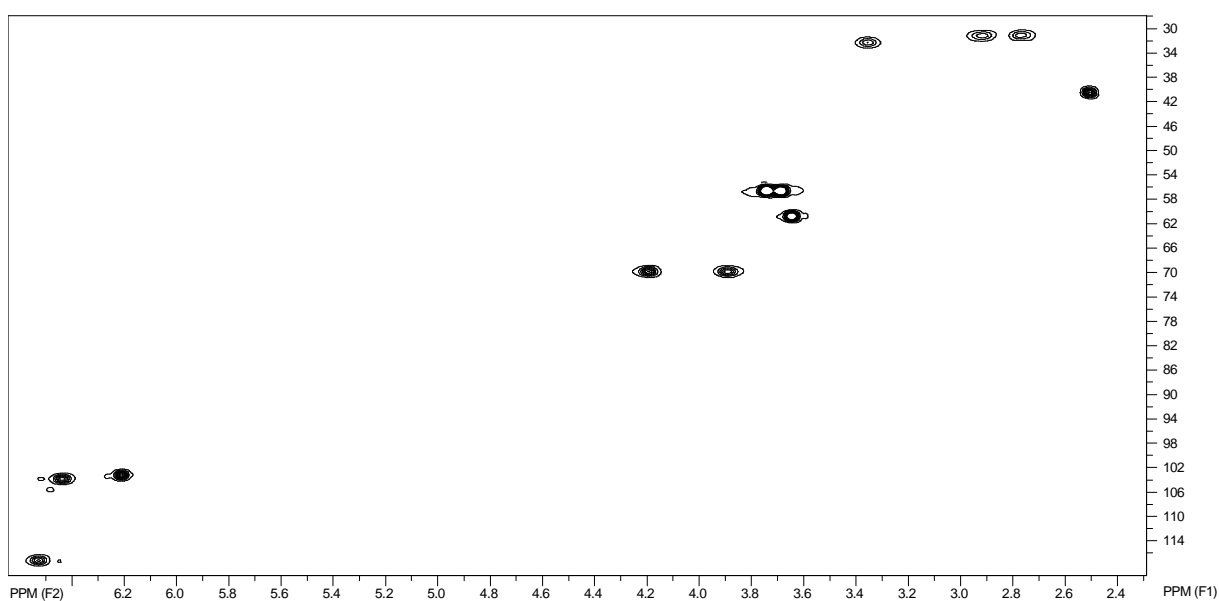


Figura 94. Mapa de contorno do HMQC da substância **RG-13**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).

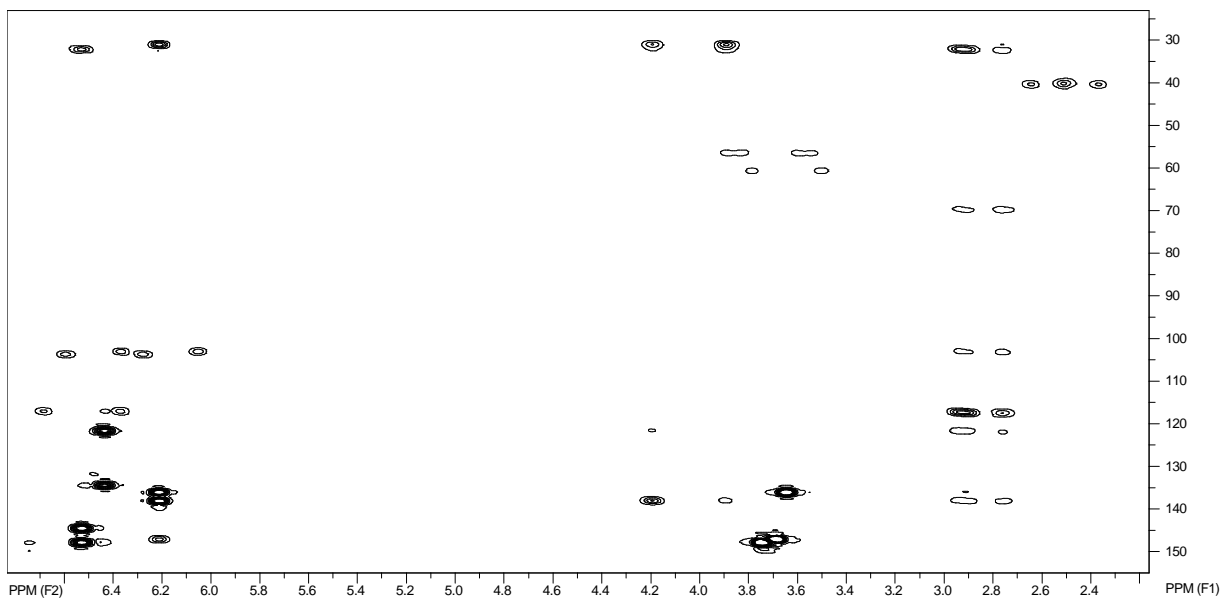


Figura 95. Mapa de contorno do HMBC da substância **RG-13**. (DMSO-d₆ – TMS, 500 e 125 MHz).

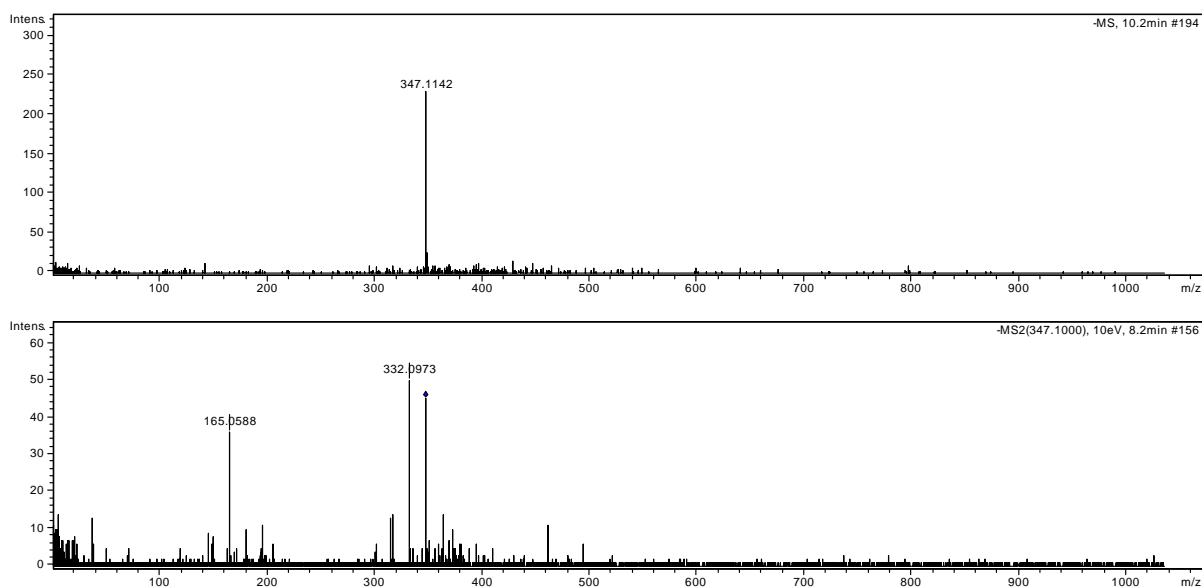


Figura 96. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **RG-13**. (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 317 u (10 eV)).

Substância RG-14

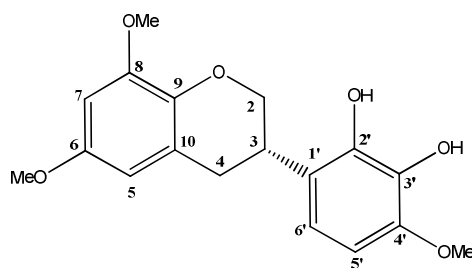
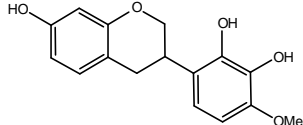
(3*S*)-2',3'-diidroxi-6,8,4'-trimetoxiisoflavana

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-14**, comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura*.

Posição	^1H (δ ; mult; <i>J</i> -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	
2a	4,32; <i>d</i> ; 10,1	70,0	C-3; C-4; C-9	71,4
2b	4,07; <i>t</i> ; 10,1			
3	3,57; <i>m</i>	32,6		33,0
4a	3,02; <i>dd</i> ; 10,0 e 15,5	30,8	C-2; C-3; C-5; C-1'; C-9	31,6
4b	2,92; <i>dd</i> ; 5,3 e 16,2			
5	6,59; <i>s</i>	113,1	C-4; C-7; C-6; C-9	130,8
6		143,6		109,3
7	6,45; <i>s</i>	101,2	C-5; C-6	157,4
8		148,9		104,2
9		148,8		156,1
10		113,2		113,7
1'		121,6		128,3
2'		142,5		144,3
3'		132,7		135,1
4'		146,1		147,8
5'	6,45; <i>d</i> ; 8,5	103,1	C-1'; C-3'; C-4'	103,6
6'	6,62; <i>d</i> ; 8,5	118,1	C-3; C-5'; C-2'; C-4'	117,6
OMe-6	3,88; <i>s</i>	56,3**	C-6	
OMe-8	3,84; <i>s</i>	56,5**	C-8	
OMe-4'	3,87; <i>s</i>	56,9	C-4'	56,0

**LOTTI *et al.*, 2010.

*podem ser trocados.

Novamente, a elucidação estrutural desta substância foi realizada de maneira bastante similar às últimas duas estruturas descritas anteriormente. A presença de 18 carbonos, sendo destes, três metoxilas, infere em uma estrutura com esqueleto base de 15 carbonos, sendo três posições metoxiladas. A semelhança dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes aos anéis B e C em relação às estruturas anteriores, propõe tratar-se de

uma isoflavana com padrão de substituição destes anéis semelhantes aos das estruturas anteriores, ou seja, novamente uma isoflavana com as posições 2' e 3' hidroxiladas e a posição 4' metoxilada. Estas proposições foram posteriormente confirmadas baseadas nos mapas de contorno do HMBC. Então, novamente, as diferenças estruturais estão no anel A (**Tabela 28**).

Os sinais de hidrogênios referentes a este anel são dois singletos largos com deslocamentos químicos em δ 6,45 e 6,59. As correlações observadas nos mapas de contorno do HMBC entre δ 6,45 e o carbono metínico δ_{CH} 113,1 e δ 6,59 e o carbono metínico δ_{CH} 101,2 indica que estes hidrogênios estão em *meta* um em relação ao outro, porém, a resolução do espectro de RMN de 1H não permitiu medir esta constante de acoplamento. A partir deste dado, é possível propor as seguintes estruturas (**Figura 97**).

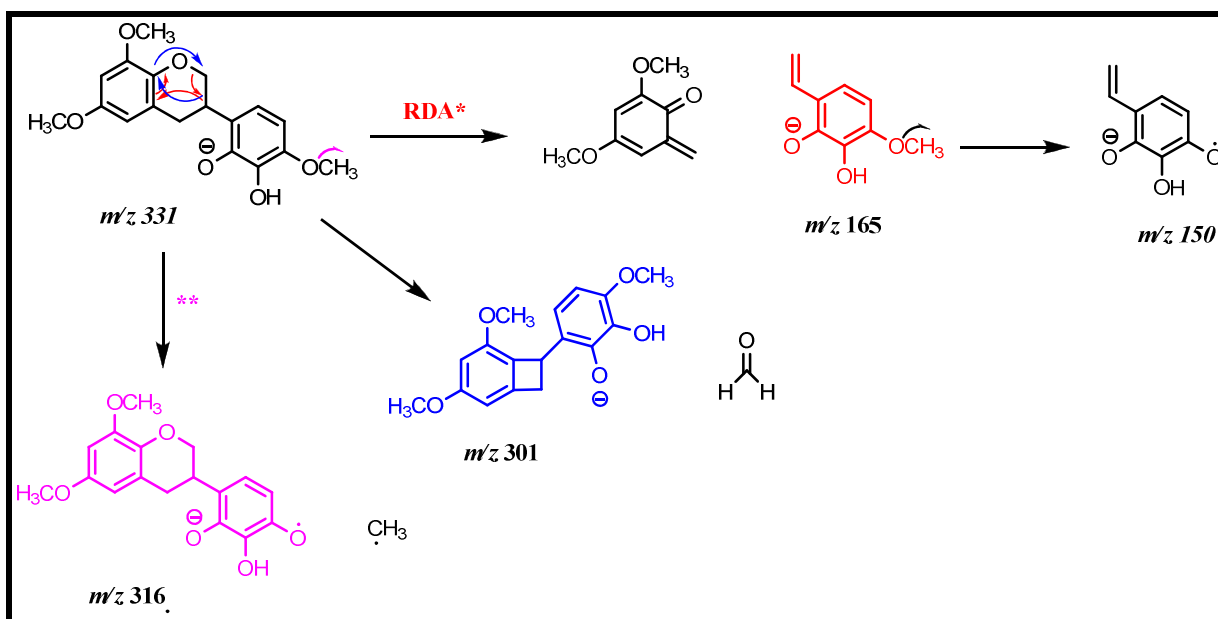


Figura 97. Propostas 1 e 2 para o padrão de substituição do anel A da substância **RG-14**. As setas indicam correlação H→C no mapa de contorno do HMBC.

Analisando o espectro dos mapas de contorno do HMBC, foi possível observar correlações entre ambos os sinais dos hidrogênios H-4 (δ 3,02 e 2,92) com o carbono δ_C 113,1, e, portanto, posicionado em 5. Tal dado descarta a proposta **2**. A estereoquímica do carbono-3 foi determinada ser (*S*), obtida por dicroísmo circular.

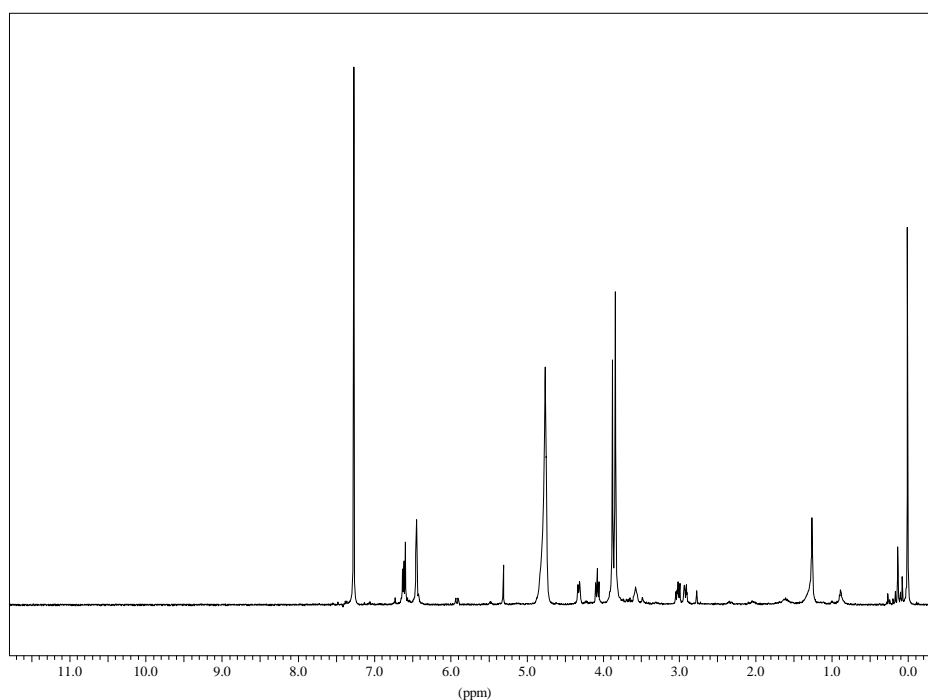
$[\alpha_D^{25}]$ -30 (*c* 0,18, MeOH); CD (MeOH, $\Delta\epsilon$) λ_{max} 290 (-274346), ESIMS *m/z* 331,1182 (calculado para $C_{18}H_{19}O_6$, 331,1182).

Proposta de fragmentação por ESI (modo negativo)

**Figura 98.** Proposta de fragmentação para a isoflavana **RG-14**.

*RDA = Reação de Retro Diels-Alder.

** Esta perda de metila radicalar pode ocorrer nas posições 6, 8 ou 4'.

**Figura 99.** Espectro de RMN de ^1H da substância **RG-14**. (CDCl_3 – TMS, 500 MHz).

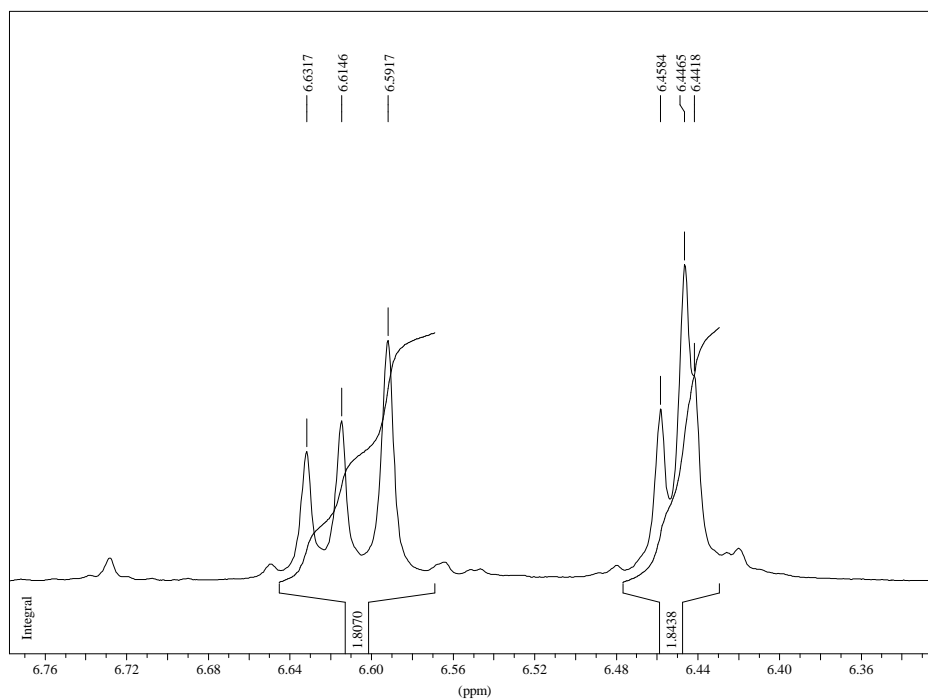


Figura 100. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-14**. (CDCl_3 – TMS, 500 MHz).

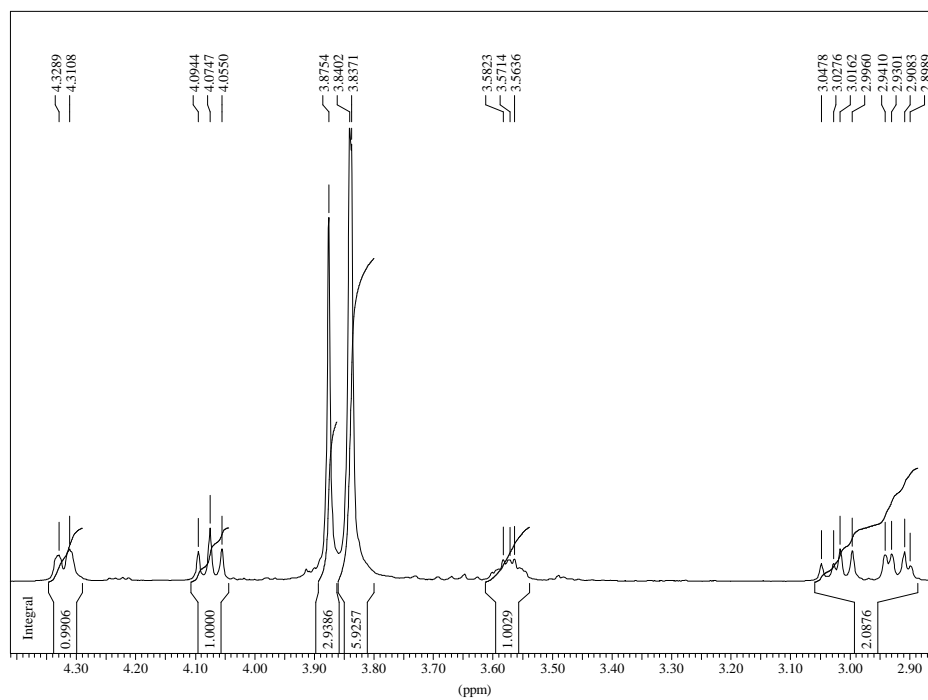


Figura 101. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-14**. (CDCl_3 – TMS, 500 MHz).

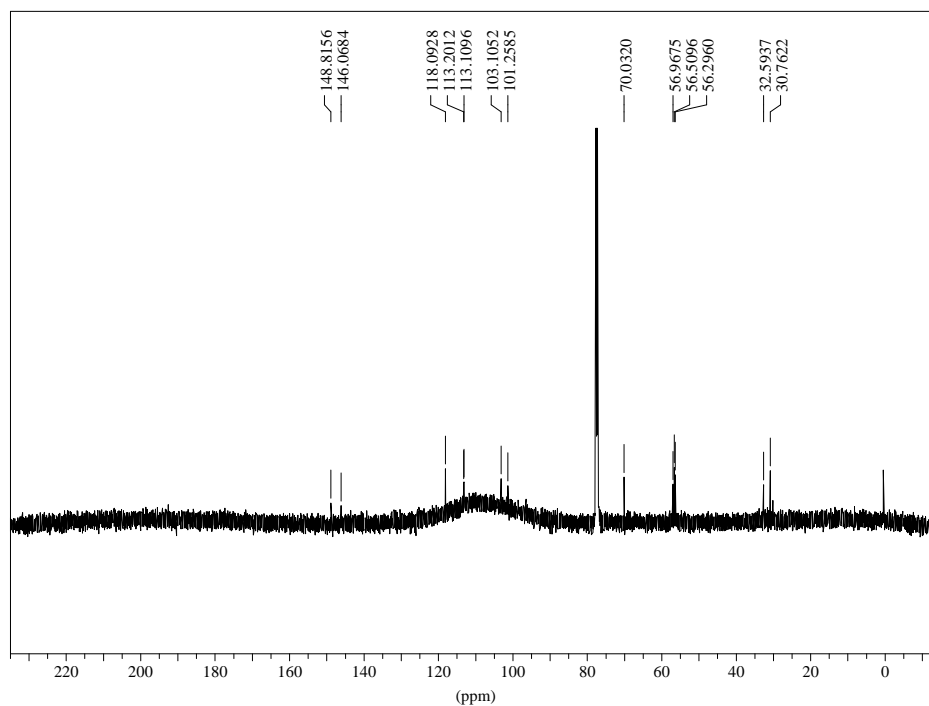


Figura 102. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **RG-14**. (CDCl_3 – TMS, 125 MHz).

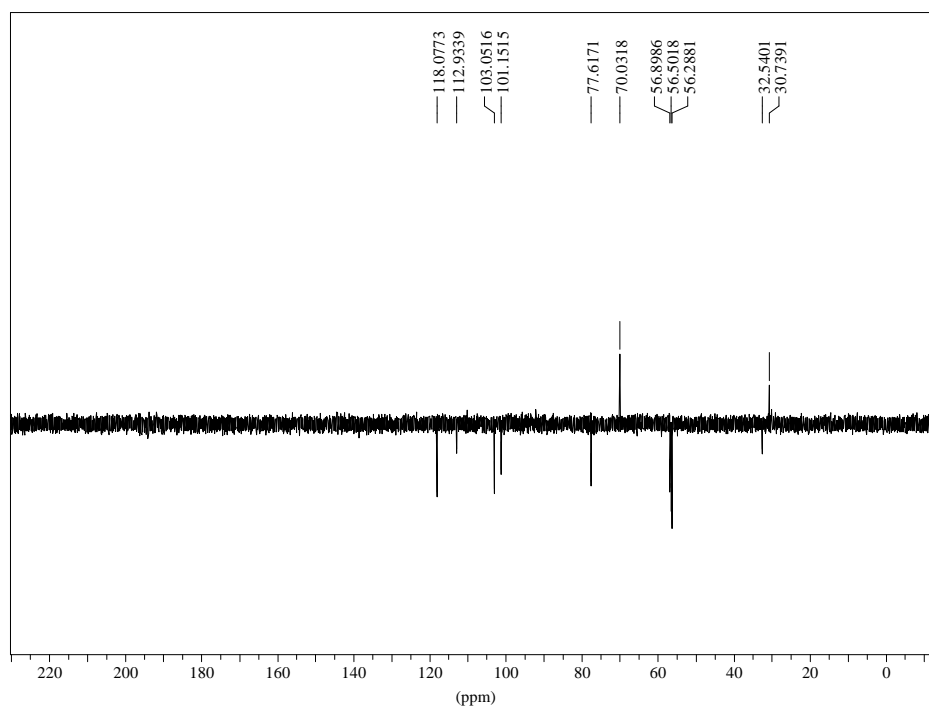


Figura 103. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° , da substância **RG-14**. (CDCl_3 – TMS, 125 MHz).

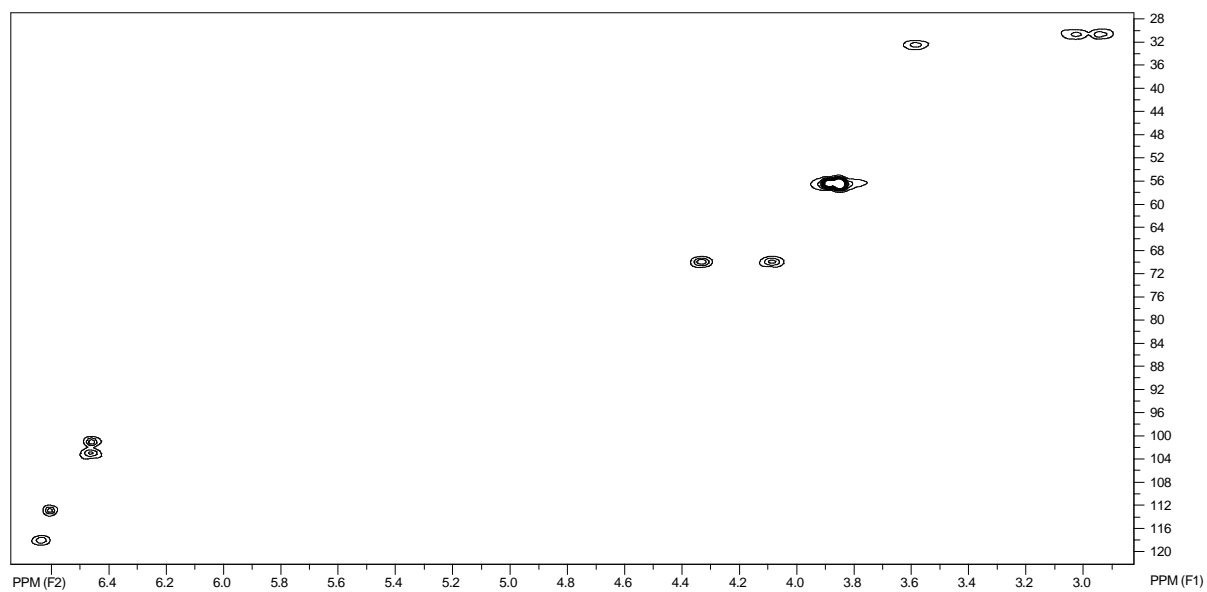


Figura 104. Mapa de contorno do HMQC da substância **RG-14**. (CDCl_3 – TMS, 500 e 125 MHz).

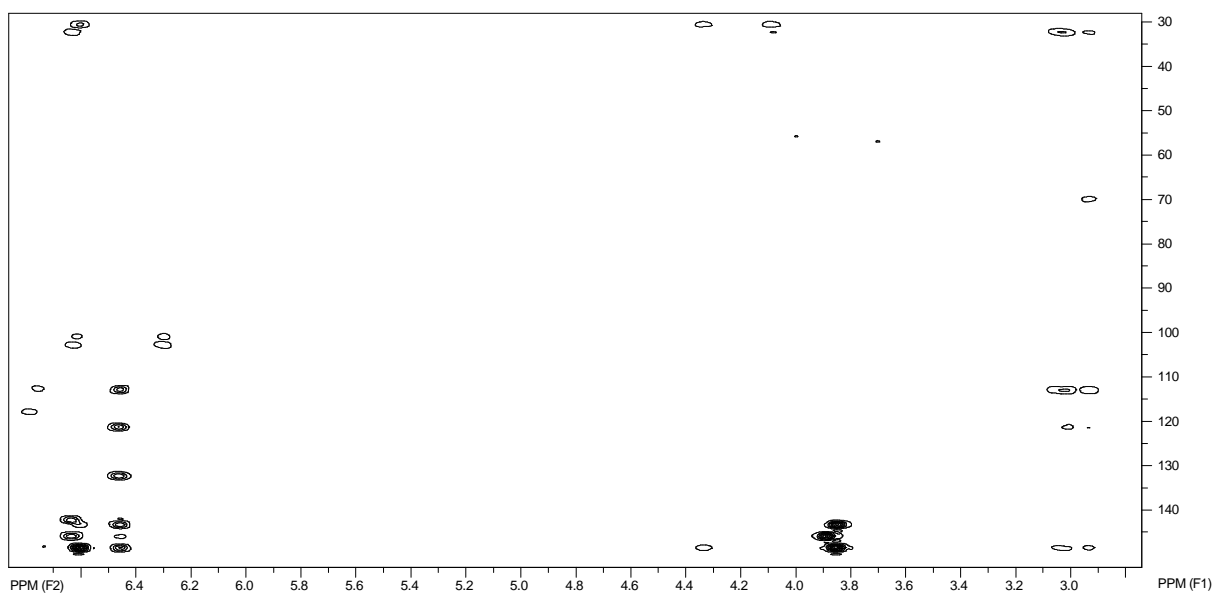


Figura 105. Mapa de contorno do HMBC da substância **RG-14**. (CDCl_3 – TMS, 500 e 125 MHz).

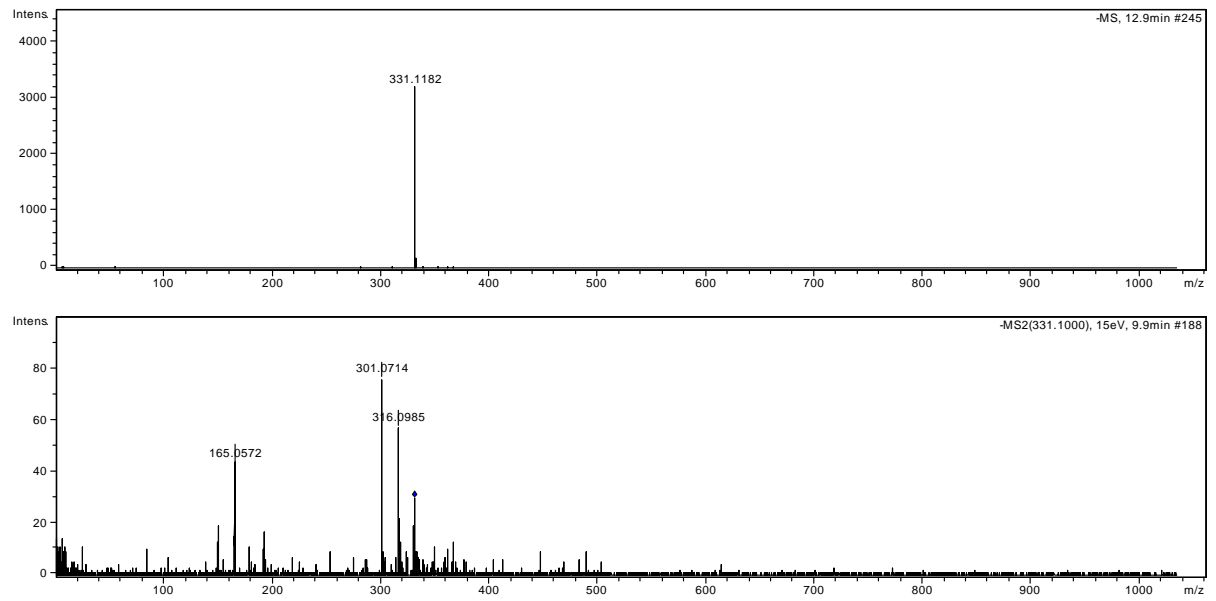
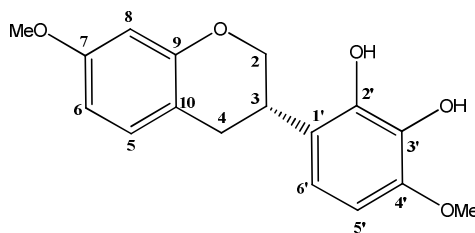


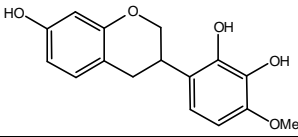
Figura 106. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **RG-14**. (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 331 u (15 eV)).

Substância RG-15



2',3'-diidroxi-7,4'-dimetoxiisoflavana

Tabela 29. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-15**, comparados com dados de estrutura relacionada obtidos da literatura**.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	
2a	4,09; <i>t</i> ; 10,1	70,2	C-4; C-9	71,4
2b	4,36; <i>d</i> ; 10,1			
3	3,57; <i>m</i>	32,5	C-4	33,0
4a	3,03; <i>dd</i> ; 10,5 e 16,0	30,6	C-2; C-3; C-10	31,6
4b	2,93; <i>dd</i> ; 5,0 e 16,0			
5	6,99; <i>d</i> ; 8,2	130,6	C-4; C-9; C-7	130,8
6	6,48; <i>dd</i> ; 2,5 e 8,2	107,6	C-8; C-10	109,3
7		159,4		157,4
8	6,43; <i>d</i> ; 2,5	101,8	C-6; C-9; C-7	104,2
9		155,6		156,1
10		114,9		113,7
1'		121,4		128,3
2'		142,5		144,3
3'		132,5		135,1
4'		146,1		147,8
5'	6,62; <i>d</i> ; 8,6	103,1	C-1'; C-3'; C-4'; C-6'	103,6
6'	6,45; <i>d</i> ; 8,6	118,1	C-3; C-5'; C-2'; C-4'	117,6
OMe-7	3,78; <i>s</i>	55,7	C-7	
OMe-4'	3,87; <i>s</i>	56,5	C-4'	56,0

**LOTTI *et al*, 2010.

Novamente, a elucidação estrutural desta substância foi realizada de maneira bastante similar àquelas últimas descritas anteriormente. A presença de 17 carbonos, sendo estes duas metoxilas, infere em uma estrutura com esqueleto base de 15 carbonos, sendo duas posições metoxiladas. Mais uma vez, a semelhança dos sinais nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C referentes aos anéis B e C em relação à estrutura descrita anteriormente, propõe tratar-se de uma isoflavana com padrão de substituição destes anéis, semelhantes, ou seja, uma isoflavana com as posições 2' e 3' hidroxiladas e a posição 4' metoxilada. Estas proposições

foram posteriormente confirmadas baseadas nos mapas de contorno do HMBC. Então, as diferenças estruturais concentram-se no anel A (**Tabela 29**).

As multiplicidades e constantes de acoplamento dos demais sinais de hidrogênios aromáticos, referentes ao anel A (δ 6,99; *d*; 8,2 Hz; δ 6,48; *dd*; 2,5 e 8,2 Hz; δ 6,43; *d*; 2,5 Hz) indicam duas possíveis propostas, apresentadas na figura a seguir.

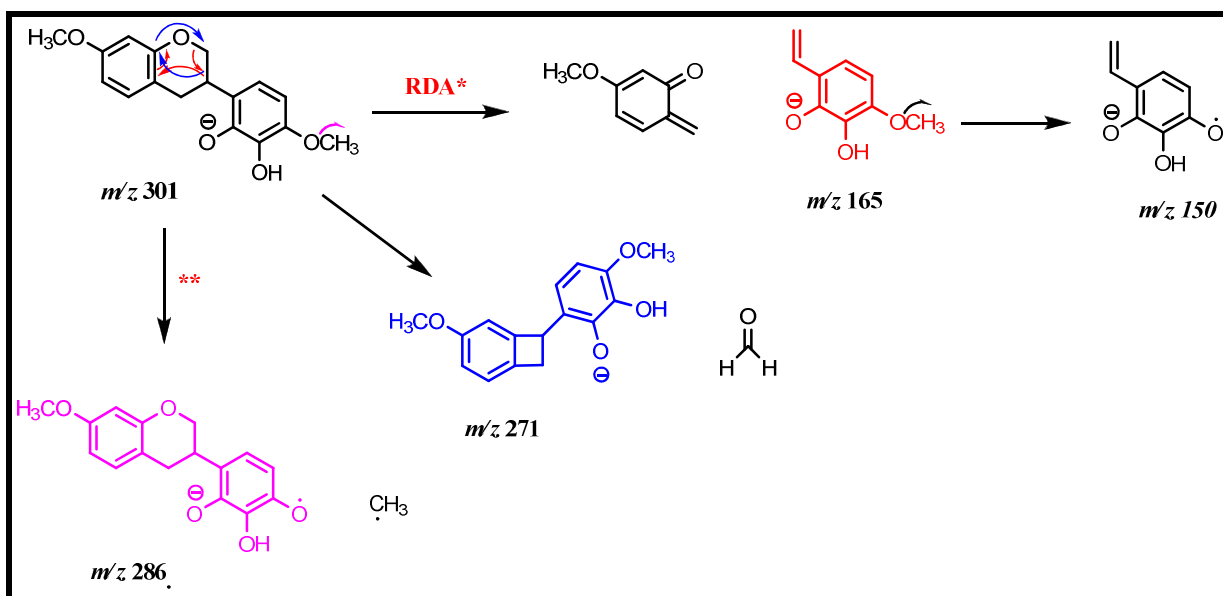


Figura 107. Propostas 1 e 2 para o padrão de substituição do anel A da substância **RG-15**.

A correlação observada entre o sinal do hidrogênio em δ 6,48; *dd*; 2,5 e 8,2 Hz com C-10 (δ_C 114,9) descarta a proposta **2**, tendo em vista que o hidrogênio da posição 7 do esqueleto do flavonoide não se correlacionaria com o carbono da posição 10, nos mapas de contorno do HMBC.

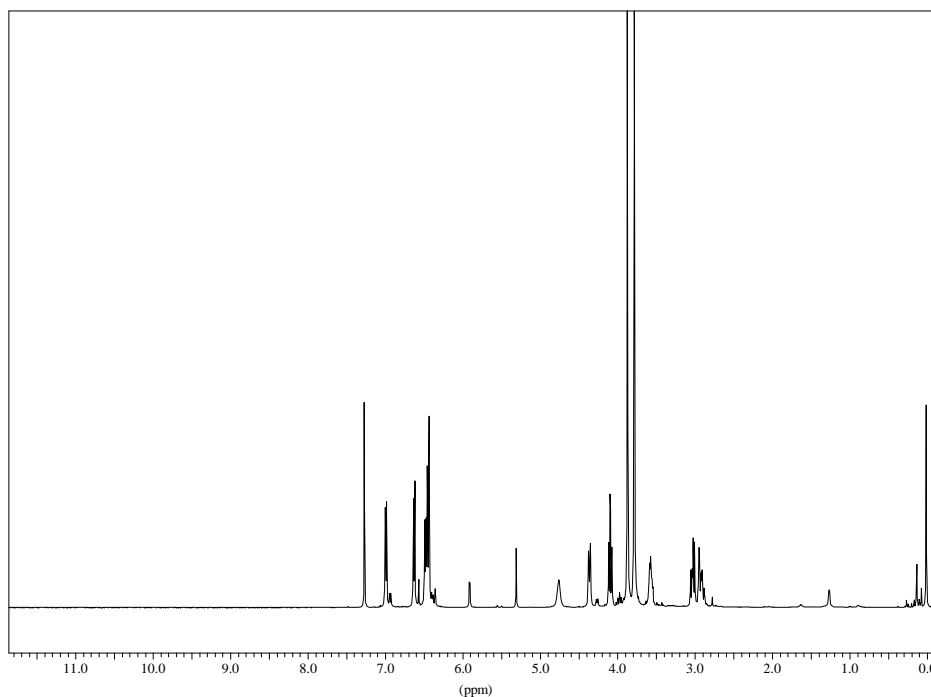
$[\alpha_D^{25}]$ -168 (*c* 0,19, CH₃OH); DC (MeOH, $\Delta\epsilon$) λ_{\max} 283 (+438776), 305 (-200411), nm; ESIMS *m/z* 301,1081 (calculado para C₁₇H₁₇O₅, 301,1076).

Proposta de fragmentação por ESI (modo negativo)

**Figura 108.** Proposta de fragmentação para a isoflavana **RG-14**.

*RDA = Reação de Retro Diels-Alder.

** Esta perda de metila radicalar pode ocorrer nas posições 7 ou 4'.

**Figura 109.** Espectro de RMN de ^1H da substância **RG-15**. (CDCl_3 -TMS, 500 MHz).

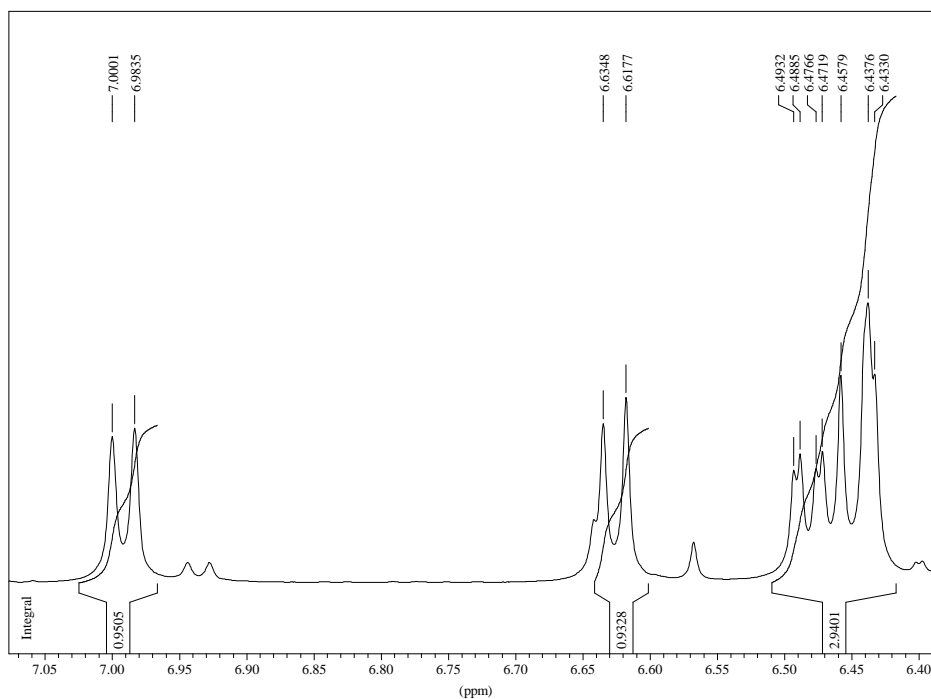


Figura 110. Expansão I do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-15**. (CDCl_3 -TMS, 500 MHz).

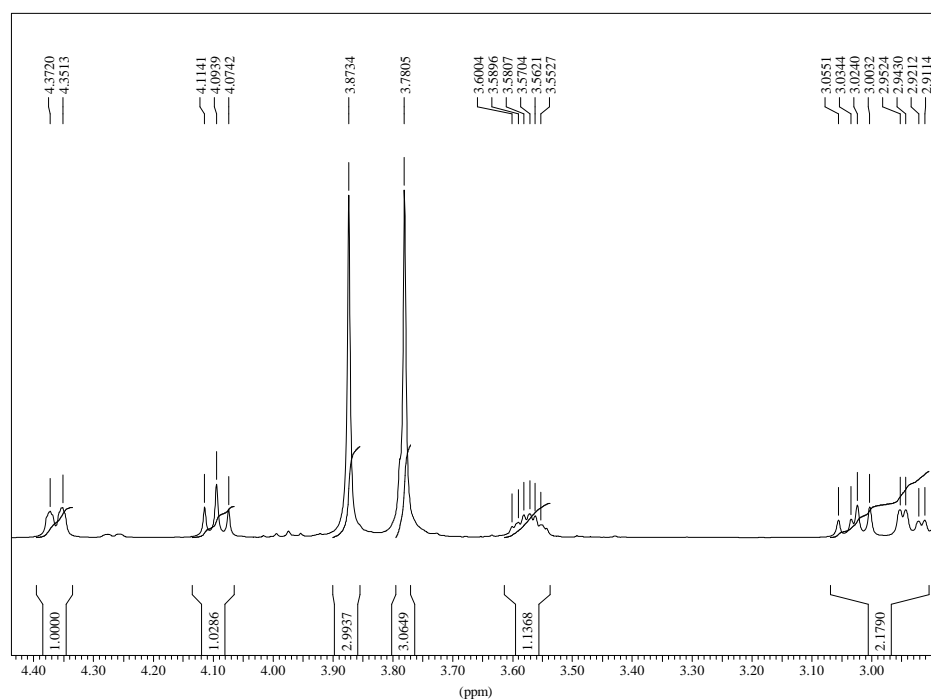


Figura 111. Expansão II do espectro de RMN de ^1H da substância **RG-15**. (CDCl_3 -TMS, 500 MHz).

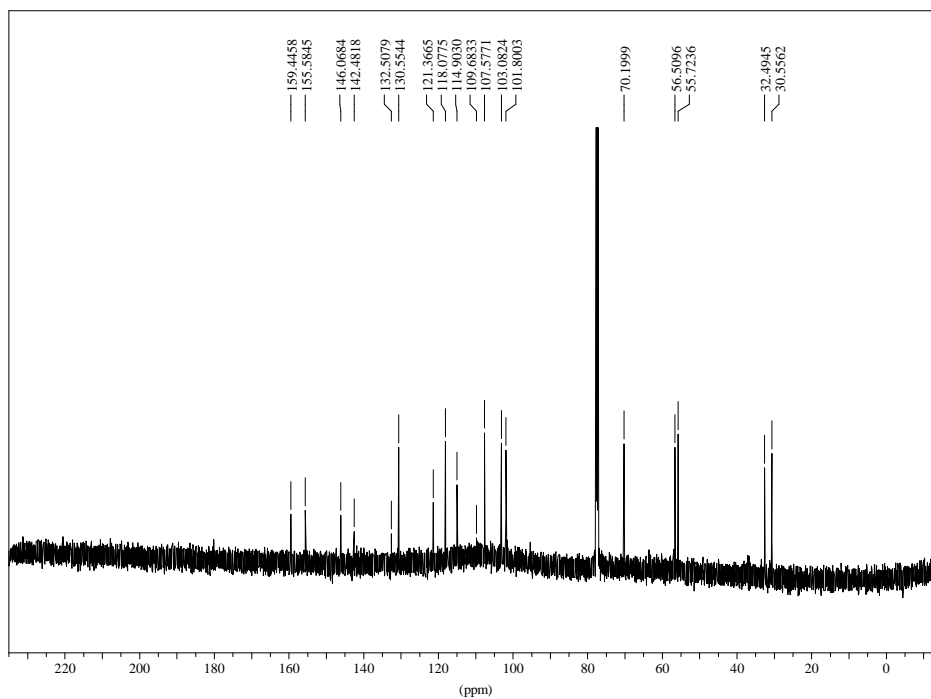


Figura 112. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **RG-15**. (CDCl_3 -TMS, 125 MHz).

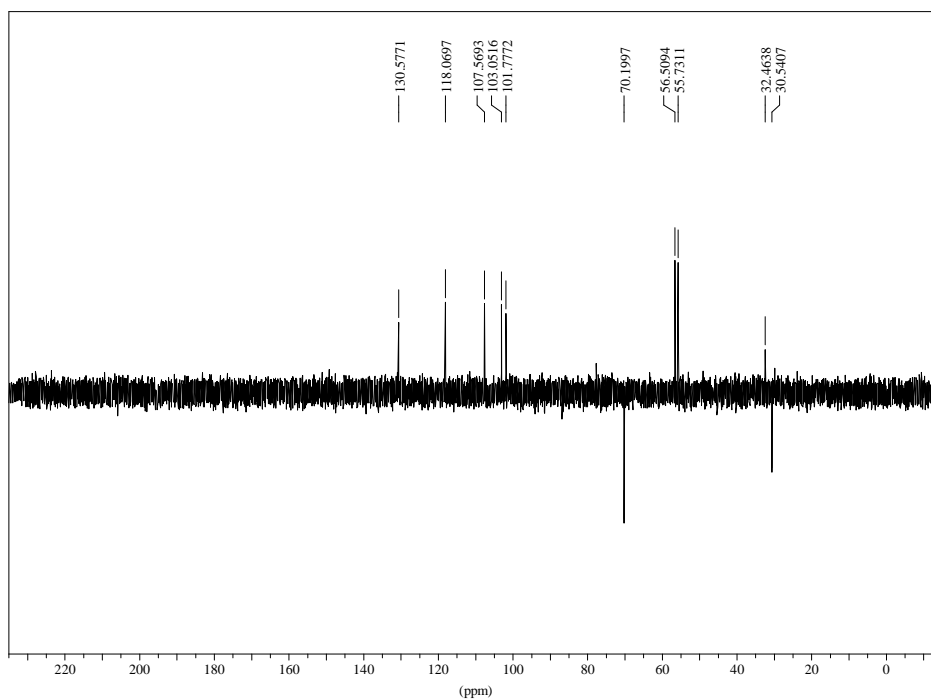


Figura 113. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da substância **RG-15**. (CDCl_3 -TMS, 125 MHz).

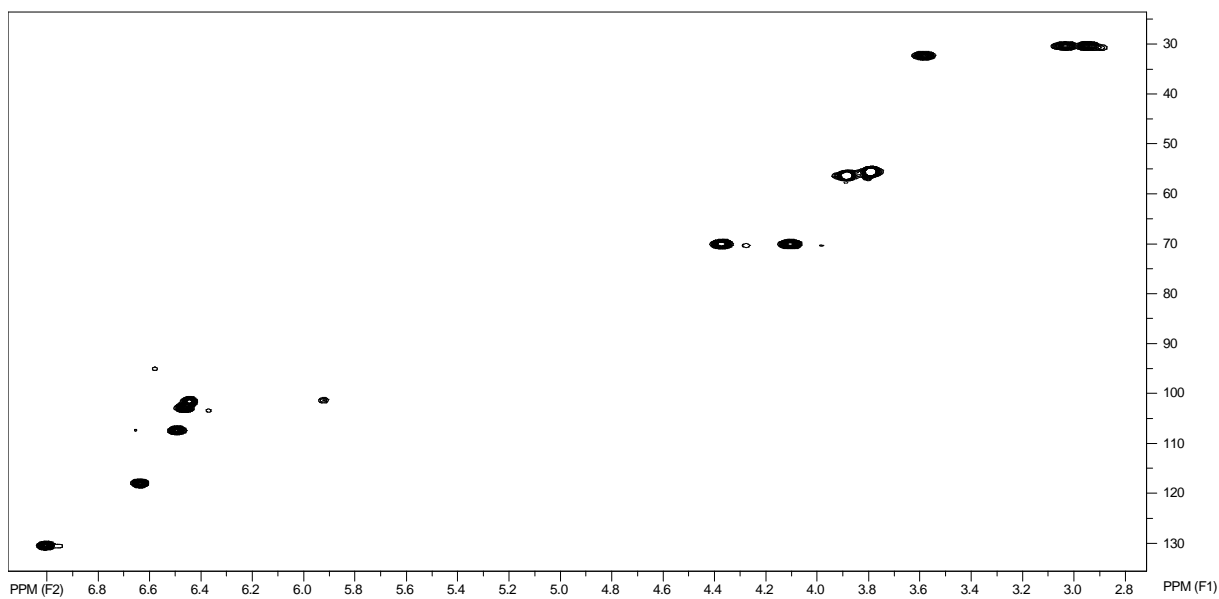


Figura 114. Mapa de contorno do HMQC da substância **RG-15**. (CDCl_3 - TMS, 500 e 125 MHz).

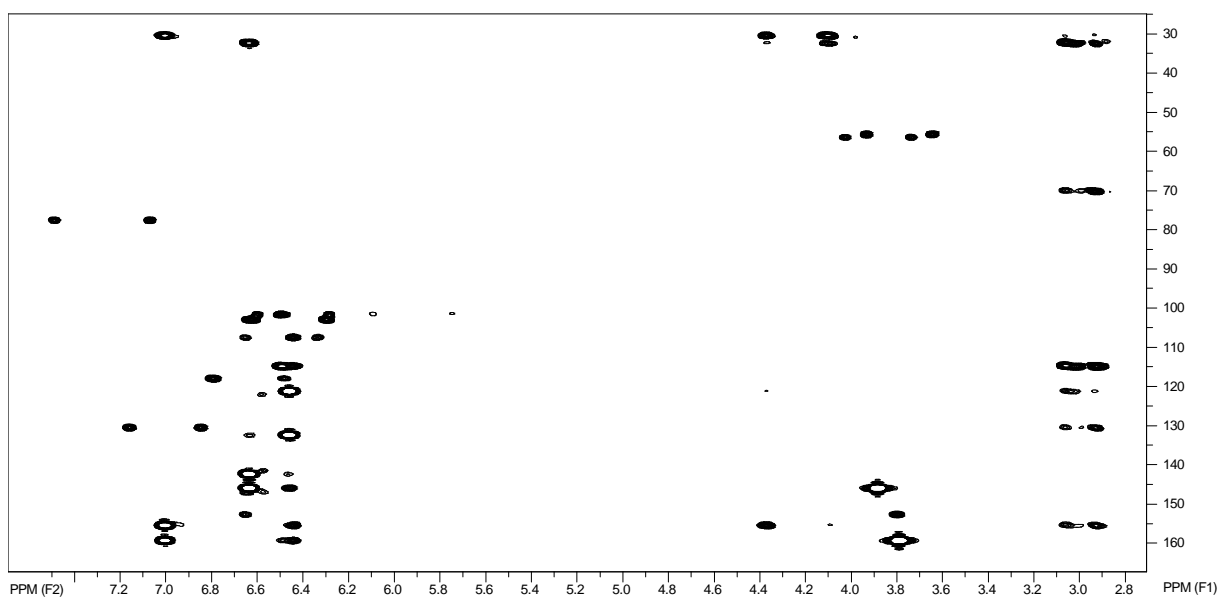


Figura 115. Mapa de contorno do HMBC da substância **RG-15**. (CDCl_3 - TMS, 500 e 125 MHz).

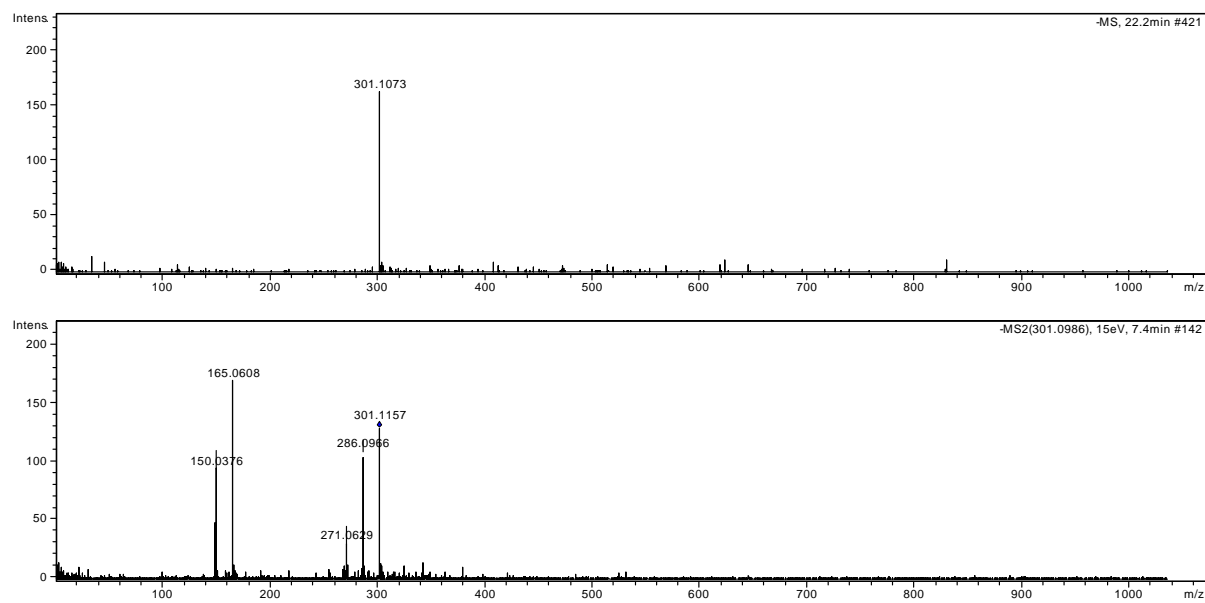


Figura 116. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo, da substância **RG-15**. (ESI-MS e ESI-MS/MS do íon 301 u (15 eV)).

Considerações sobre as propostas de fragmentação das isoflavanas isoladas de *R. graciliflora* (ESI-MS/MS)

Conforme pode ser observado na figura abaixo, as principais rotas de fragmentação das isoflavanas deste estudo consistem: (i) perda de metila radicalar; (ii) clivagem por reação de Retro Diels-Alder, podendo posteriormente perder metila radicalar; (iii) contração do anel C, com perda de CH₂O neutro. Estas rotas de fragmentação são competitivas.

Os anéis B e C de todas as isoflavanas avaliadas possuem o mesmo padrão de substituição, portanto, as diferenças nas fragmentações são devido aos diferentes substituintes no anel A.

A formação dos íons fragmentos m/z 165 e m/z 150 é observada em todas as isoflavanas deste estudo, e, portanto, as reações de fragmentações ocorrem nos anéis B e C. Ainda, isto também é um indicativo que a desprotonação das moléculas [M-H]⁻ para estas fragmentações ocorre nestes mesmos anéis. A presença de duas hidroxilas adjacentes, nas posições 2' e 3' do anel B, estabilizam a carga negativa referente à formação da molécula desprotonada, e portanto, foi proposto que a desprotonação ocorre em uma destas hidroxilas. A perda de metila radicalar, formando o íon [M-H-·CH₃]⁻ pode ocorrer em qualquer metoxila da molécula, sendo necessários estudos mais aprofundados, para a determinação pontual de qual metila radicalar é perdida, em cada uma das moléculas.

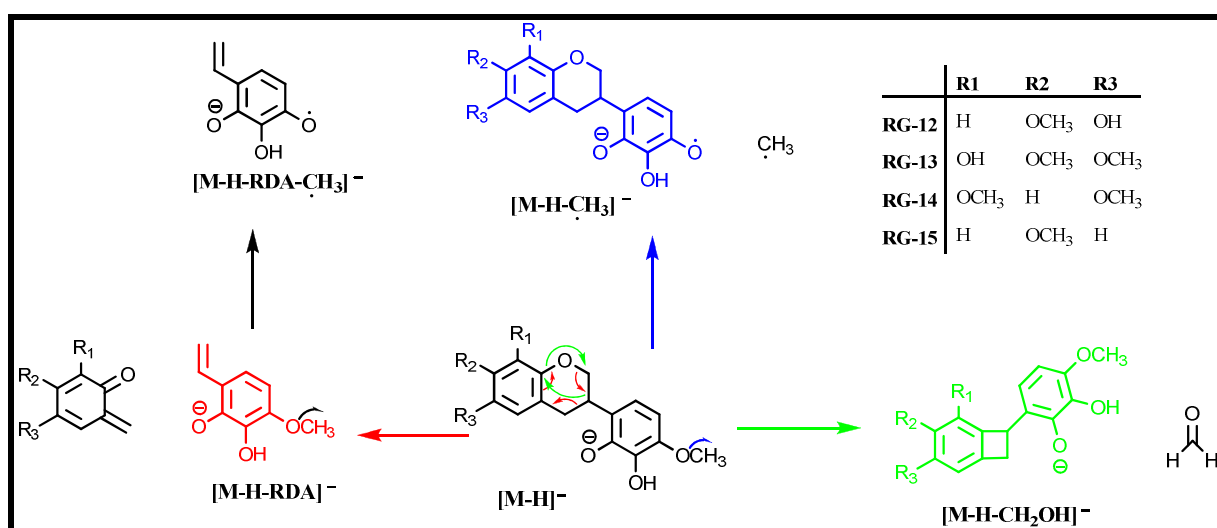


Figura 117. Proposta de fragmentações das isoflavanas isoladas de *R. graciliflora* por ESI-MS.

Mistura das substâncias RG-16 e RG-17

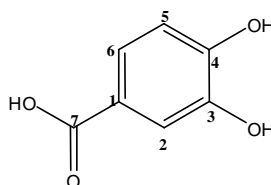
O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região de aromáticos, além de sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos, característicos de açúcares. Ressalta-se a presença de dois sinais que se apresentaram com deslocamentos químicos referentes a hidrogênios anoméricos (δ 5,11; *d*; 7,5 e δ 4,53; *s*), e, portanto, indicam a presença de duas unidades de açúcar.

Os sinais δ 7,44; *s*; δ 6,80; *d*; 8,1 Hz; δ 7,43; *dd*; 2,0 e 8,1 Hz integraram em uma relação 1:2 em relação aos demais sinais do espectro, indicando tratar-se de uma mistura de duas substâncias, estando esta mistura nesta mesma proporção.

Desta mistura foram obtidos os espectros de RMN de ^{13}C , DEPT 135°; HMQC e HMBC.

Experimentos posteriores permitiram o isolamento de **RG-16**, obtendo-se os espectros de RMN de ^1H . A seguir, estão apresentadas as elucidações estruturais das mesmas, separadamente, sendo estas iniciadas pelo constituinte da mistura em menor proporção.

Substância RG-16



Ácido protocatecuico

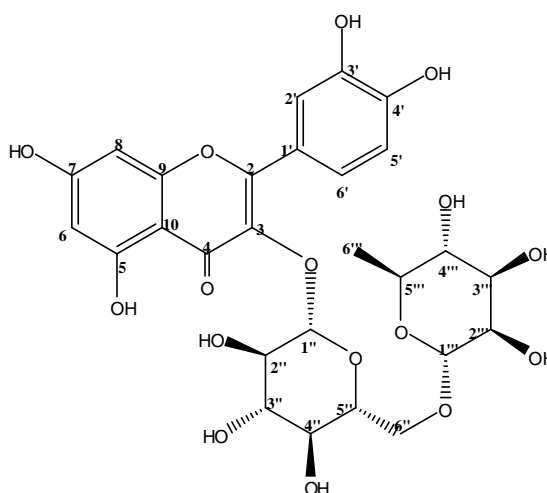
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-16**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; <i>J</i> -Hz)	δ ^{13}C	HMBC	Literatura**
1		122,1		123,0
2	7,44; <i>s</i>	116,8	C-6; C-3; C-4. C-7	115,8
3		144,9		146,0
4		150,4		151,5
5	6,80; <i>d</i> ; 8,1	115,0		117,7
6	7,43; <i>dd</i> ; 2,0 e 8,1	123,1	C-2; C-4; C-7	123,9
7		169,7		170,3

**FLAMINI, ANTOGNOLI, MORELLI, 2001.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais integrando para 3 hidrogênios, na região de aromáticos (δ 7,44; *s*; δ 6,80; *d*; 8,1 Hz; δ 7,43; *dd*; 2,0 e 8,1 Hz). As multiplicidades destes sinais indicam a presença de um anel aromático trissubstituído (**Figura 118**). As correlações destes sinais com carbonos δ_{C} 144,9 e 150,4 nos mapas de contorno do HMBC indicam duas posições hidroxiladas. Além destas, as correlações destes hidrogênios com o carbono δ_{C} 169,7, indicam a presença de carbonila em outra posição do aromático (**Figura 121 - Figura 124**). Comparações com a literatura dos deslocamentos químicos de carbono-13 indicam tratar-se do ácido protocatecuico (**Tabela 30**).

Substância RG-17



Rutina

Continuando a elucidação estrutural da mistura de componentes, segue a discussão referente ao constituinte em maior proporção.

Conforme descrito anteriormente, o espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região de aromáticos, além de sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos, característicos de açúcares (**Tabela 31**). Ressalta-se a presença de dois sinais (δ 5,11; *d*; 7,5 e δ 4,53; *s*) que se apresentaram com deslocamentos químicos referentes a hidrogênios anoméricos e portanto, indicam a presença de duas unidades de açúcar. O sinal em δ 1,12; *d*; 6,2 Hz, 3H, é um indicativo de que uma destas duas unidades de açúcar seja uma ramnose. A outra unidade de açúcar foi identificada como glicose, devido às comparações de seus dados de RMN de ^{13}C com dados da literatura (BECK, HÄBERLEIN, 1999).

Tabela 31. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-17**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	δ ^{13}C	HMBC	Literatura***
2		158,4		158,5
3		134,5		135,6
4		178,3		179,4
5		161,5		162,9
6	6,21	99,1	C-8; C-10; C-5; C-7	99,9
7		164,7		166,0
8	6,40	94,2	C-6; C-10; C-9; C-7	94,9
9		157,3		159,3
10		104,6		105,6
1'		122,1		123,1*
2'	7,68;s	116,8	C-3'; C-4'; C-2; C-6'	116,0
3'		144,6		145,8
4'		148,6		149,8
5'	6,88; d ; 8,4	115,3	C-3'; C-4'; C-1'	117,7
6'	7,63; d ; 8,4	122,7	C-4'; C-2'; C-2	123,5*
1''	5,11; d ; 7,5	103,4	C-3	104,7
2''		74,5	C-3''; C-1''	75,5
3''		76,9	C-4''	78,2
4''		70,2		71,3**
5''		75,9		77,1
6''a	3,79; d ; 10,6	67,6	C-5''; C-1'''	68,5
6''b				
1'''	4,53; s	101,3	C-3'''; C-5'''	102,4
2'''		70,9	C-3'''; C-4'''	72,0
3'''		71,1	C-4'''	72,2**
4'''		72,8		73,9
5'''		68,8		69,7
6'''	1,22; d ; 6,2	16,9		17,9

***BECK, HÄBERLEIN, 1999.

Os deslocamentos químicos dos 15 demais sinais no espectro de RMN de ^{13}C , dos quais 9 são carbonos quaternários, sendo um deles, sinal referente a uma carbonila (δ_{C} 178,3), juntamente com os sinais de hidrogênios na região de aromáticos, no espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,21; s ; δ 6,40; s ; δ_{H} 7,68; s ; δ 6,88; d ; 8,4 Hz; δ_{H} 7,63; d ; 8,4 Hz), foram suficientes para concluir tratar-se de um flavonol com padrão de substituição da quercetina. A posição da *O*-glicosilação foi atribuída ser em C-3, baseado na correlação nos mapas de contorno do HMBC entre o hidrogênio anomérico da glicose (δ 5,11; d ; 7,5 Hz) e o carbono da posição 3 da aglicona (δ_{C} 134,5). A ramnose foi atribuída estar ligada no carbono C-6'' da glicose, devido a correlação, nos mapas de contorno do HMBC, entre o hidrogênio da posição 6'' da glicose (δ_{H} 3,79; d ; 10,6 Hz) e o carbono anomérico da ramnose (δ_{CH} 101,3).

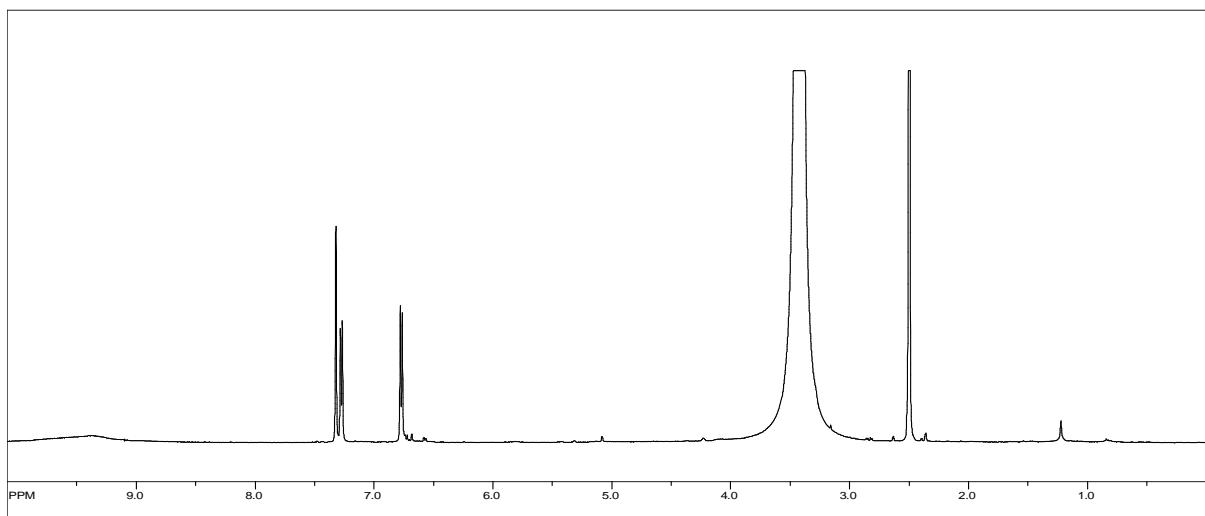


Figura 118. Espectro de RMN de ^1H da substância **RG-16**. (DMSO- d_6 – TMS; 500 MHz).

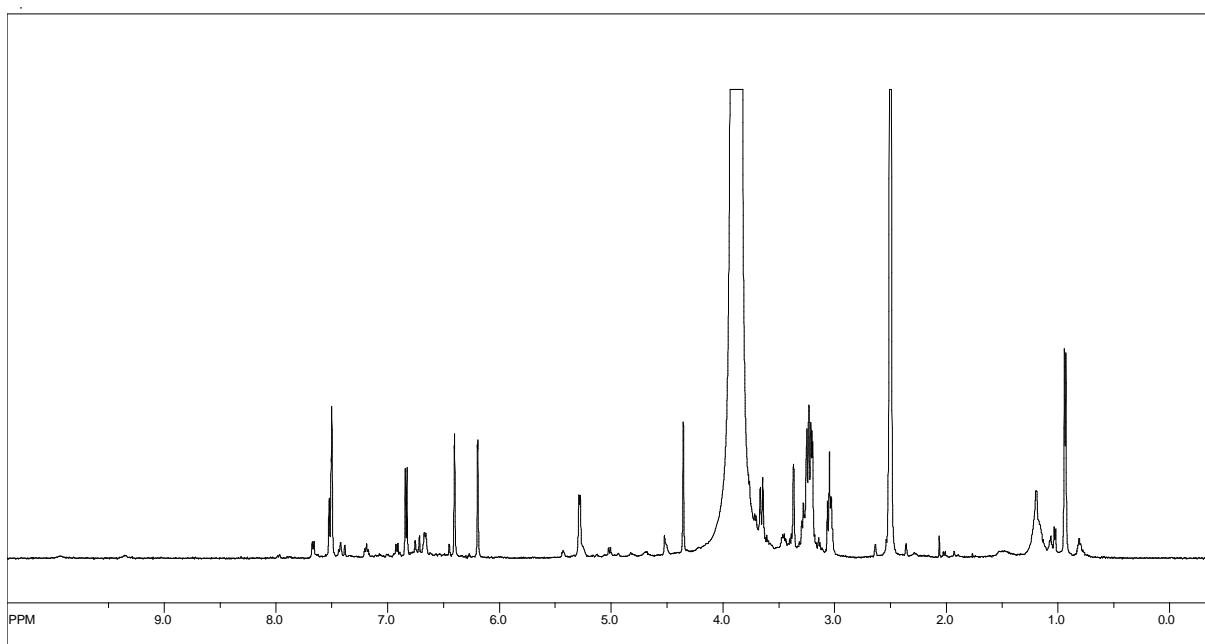


Figura 119. Espectro de RMN de ^1H da substância **RG-17**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

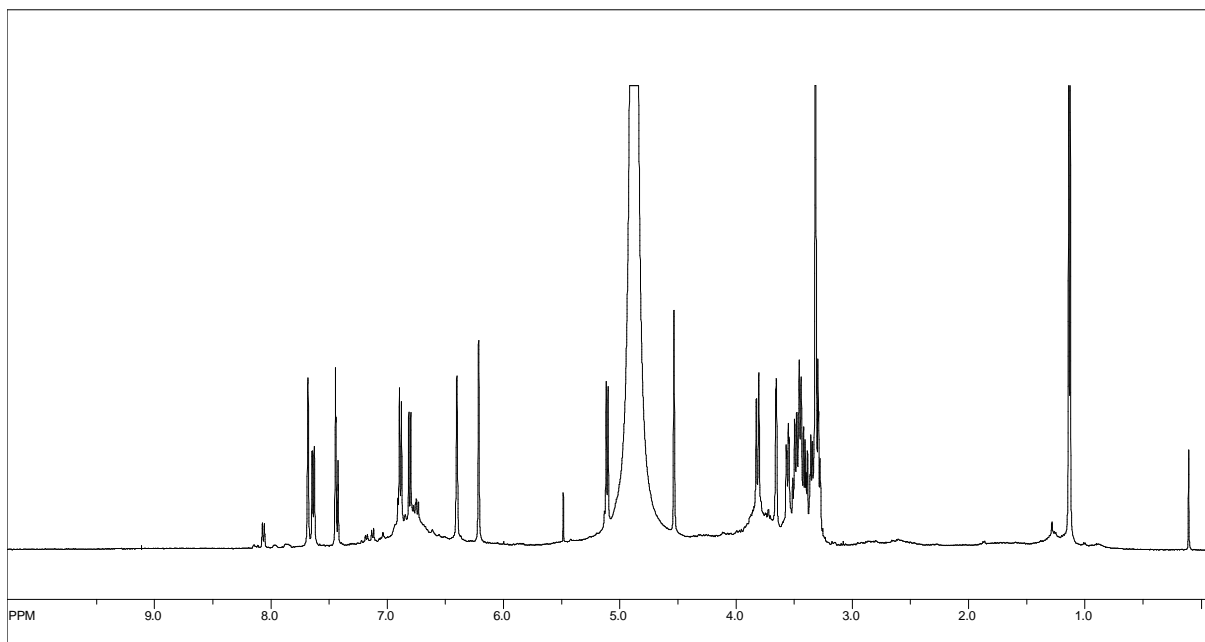


Figura 120. Espectro de RMN de ^1H da mistura das substâncias **RG-16** e **RG-17**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

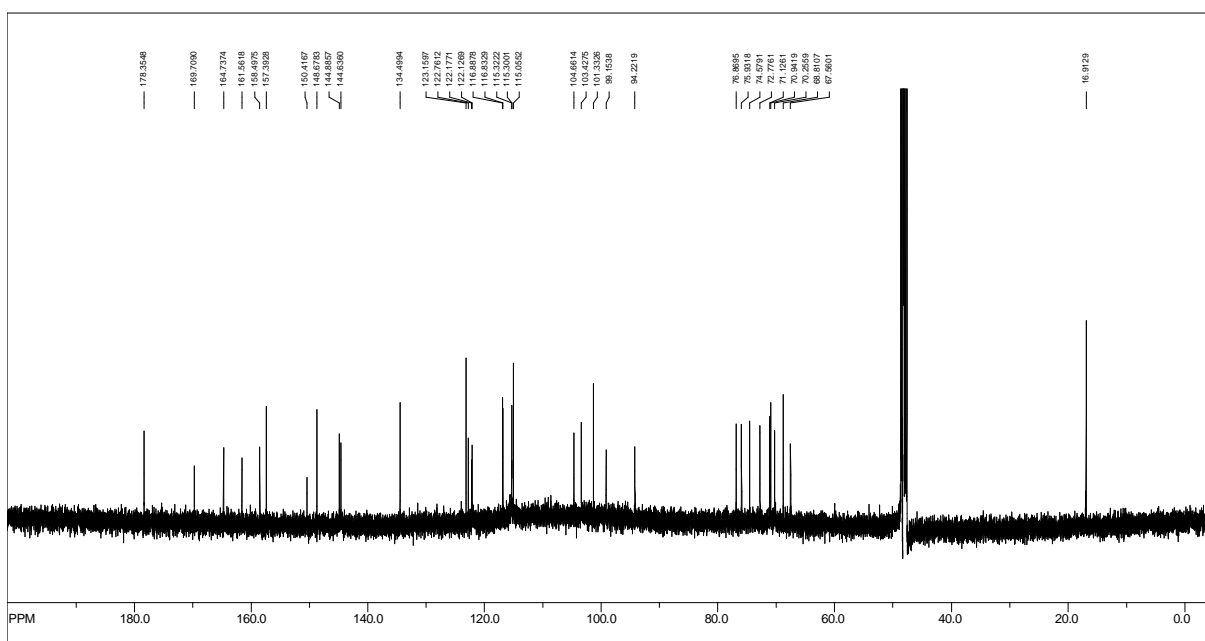


Figura 121. Espectro de RMN de ^{13}C da mistura das substâncias **RG-16** e **RG-17**. (DMSO- d_6 – TMS, 125 MHz).

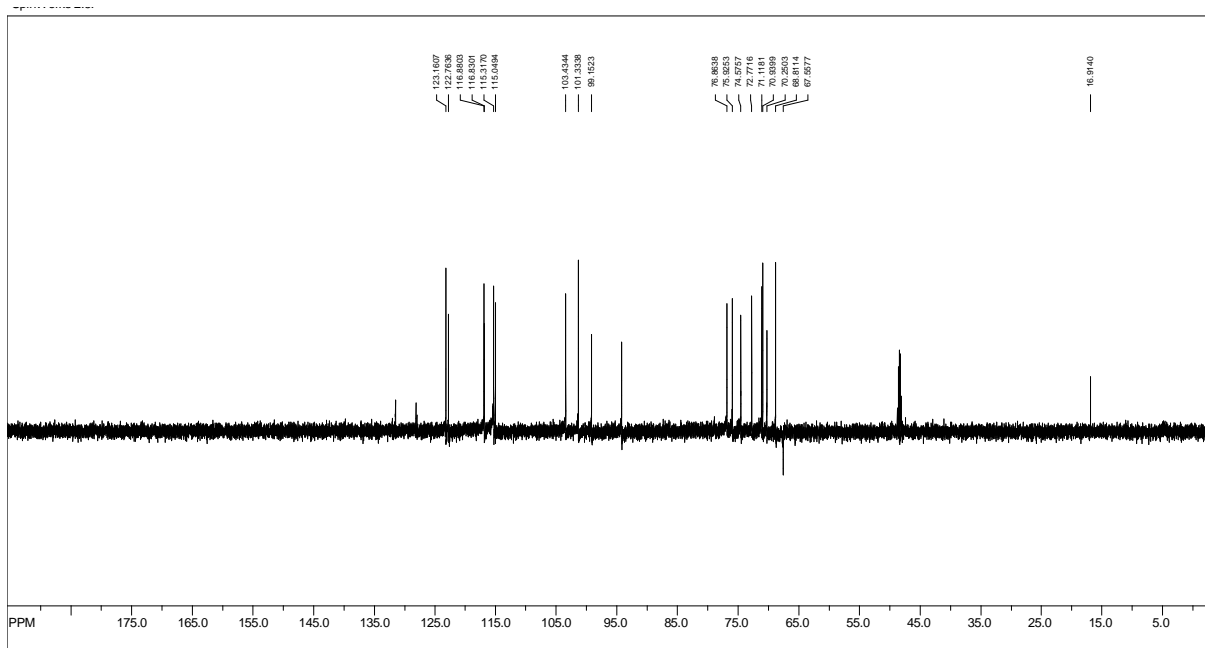


Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C – DEPT 135° da mistura das substâncias **RG-16** e **RG-17**. (DMSO- d_6 – TMS, 125 MHz).

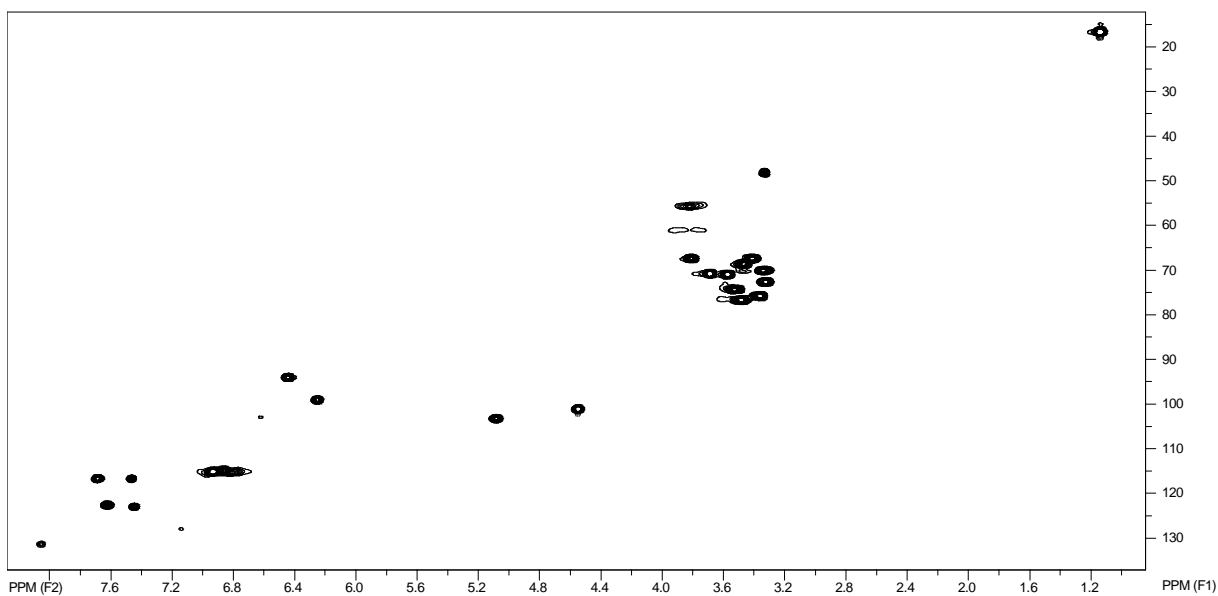


Figura 123. Mapa de contorno do HMQC da mistura das substâncias **RG-16** e **RG-17**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).

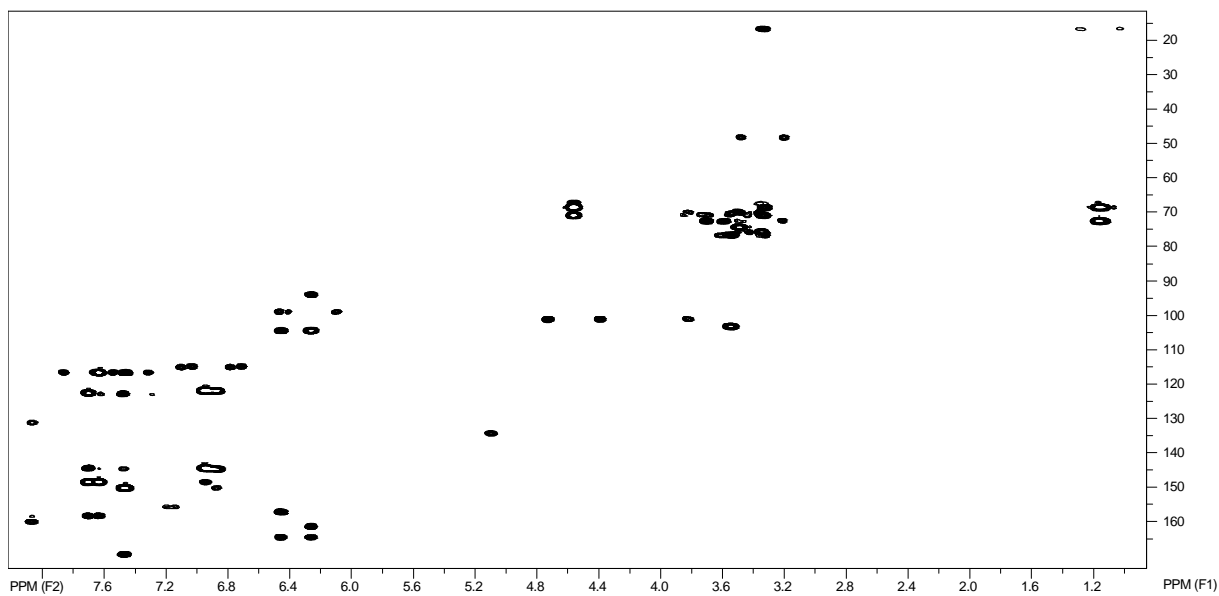


Figura 124. Expansão I do mapa de contorno do HMBC da mistura das substâncias **RG-16** e **RG-17**. (DMSO- d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).

Substância RG-18

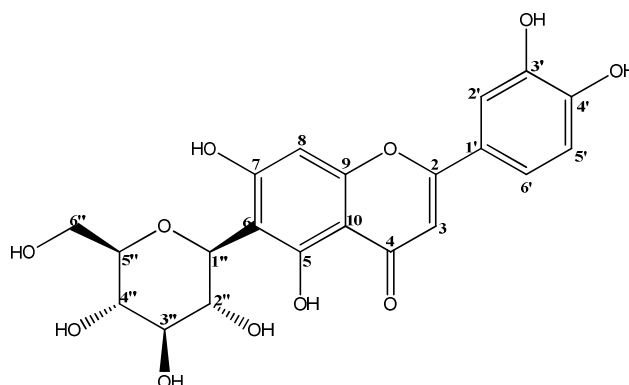
*Luteolina 6-O-β-glicopiranosídeo*

Tabela 32. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-18**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Literatura*
2		164,5		163,71
3	6,64; <i>s</i>	103,7	C-2; C-4; C-10	102,87
4		182,7		181,93
5		161,1		160,76
6		109,5		108,95
7		164,1		163,35
8	6,49; <i>s</i>	94,4	C-10; C-6; C-9; C-7	93,57
9		157,2		156,26
10		104,1		103,46
1'		122,3		121,49
2'	7,36; <i>d</i> ; 1,6	113,9	C-6'; C-4'	113,38
3'		146,3		145,82
4'		150,4		149,78
5'	7,38; <i>dd</i> ; 8,3 e 1,6	116,9		116,12
6'	6,89; <i>d</i> ; 8,3	119,9	C-2'; C-4'; C-2; C-5'	119,04
1''	4,55; <i>d</i> ; 9,9	73,8	C-6; C-5; C-7; C-2''	73,12
2''	4,02; <i>t</i> ; 9,5	70,8		70,27
3''	3,19; <i>t</i> ; 8,7	79,5	C-4''	79,02
4''	3,11; <i>t</i> ; 9,2	71,2	C-3''; C-5''	70,70
5''	3,15; <i>m</i>	82,2		81,65
6''a	3,65; <i>d</i> ; 11,3	62,1		61,57
6''b	3,39; <i>dd</i> ; 12,1 e 5,8			

*RAYYAN *et al.*, 2005.

O espectro de RMN de ^1H apresentou cinco sinais na região de aromáticos (δ_{H} 6,64; *s*; δ_{H} 6,49; *s*; δ_{H} 6,89; *d*; 8,3 Hz; δ_{H} 7,36; *d*; 1,6 Hz; δ_{H} 7,38; *dd*; 8,3 e 1,6 Hz) e sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos (δ_{H} 3,1 – 4,6). Destaca-se o sinal do hidrogênio δ_{H} 4,55; *d*; 9,9 Hz, que devido a sua desblindagem em relação aos demais hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos, deve tratar-se de um hidrogênio anomérico, e

portanto, sugere-se a presença de uma unidade de açúcar. Este hidrogênio correlacionou, nos mapas de contorno do HMQC, com o carbono δ_{CH} 73,8, indicando tratar-se de um C-heterosídeo, tendo em vista que O-heterosídeos possuem carbonos anoméricos mais desblindados por estes estarem ligados a dois átomos de oxigênio. Análises nos mapas de contorno do HMQC e HMBC permitiram observar a presença de 21 carbonos, sendo 6 carbonos com deslocamentos químicos entre δ_{C} 62 – 83, o que confirma a presença de uma unidade de açúcar. Comparação dos deslocamentos químicos destes carbonos do açúcar com dados da literatura permitiu inferir tratar-se de uma unidade de glicose (RAYYAN *et al*, 2005). O valor da constante de acoplamento do sinal do hidrogênio anomérico (9,9 Hz), indica tratar-se de uma glicose com configuração β (Tabela 32).

Os 15 carbonos restantes, com deslocamentos químicos entre δ_{C} 94 – 183, pertencem ao esqueleto do flavonoide.

O anel B do esqueleto do flavonoide apresenta hidroxilações nas posições 3' e 4', devido a presença dos sinais dos hidrogênios $\delta_{\text{H-5'}}$ 6,89; *d*; 8,3 Hz; $\delta_{\text{H-2'}}$ 7,36; *s*; $\delta_{\text{H-6'}}$ 7,38; *dd*; 8,3 e 1,6 Hz, e às correlações nos mapas de contorno do HMBC destes hidrogênios, com os carbonos aromáticos oxigenados δ_{C} 146,3 e 150,4.

A correlação entre H-6' com o carbono δ_{C} 165,1, nos mapas de contorno do HMBC, posicionam este carbono no anel C, em C-2. Além disso, o hidrogênio δ_{H} 6,64; *s*; correlacionou com C-2, sendo então, posicionado em C-3, indicando tratar-se de uma flavona.

O sinal δ_{H} 6,49; *s*, o qual correlacionou com o carbono δ_{CH} 94,4 no mapa de contorno do HMQC, é condizente com os deslocamentos químicos das posições 6 ou 8 do anel A, tendo em vista que as demais posições (5 e 7), são mais desprotegidas, devido a presença da carbonila na posição 4. As correlações nos mapas de contorno do HMBC com os carbonos $\delta_{\text{C-10}}$ 104,1; $\delta_{\text{C-7}}$ 164,1; $\delta_{\text{C-9}}$ 157,2 e $\delta_{\text{C-6}}$ 109,5, posicionaram este hidrogênio em 8. A C-glicosilação foi proposta ocorrer no carbono 6, devido a correlação no mapa de contorno do HMBC entre o hidrogênio anomérico (δ_{H} 4,55; *d*; 9,9 Hz) com os carbonos $\delta_{\text{C-6}}$ 109,5, $\delta_{\text{C-5}}$ 161,1 e $\delta_{\text{C-7}}$ 164,1.

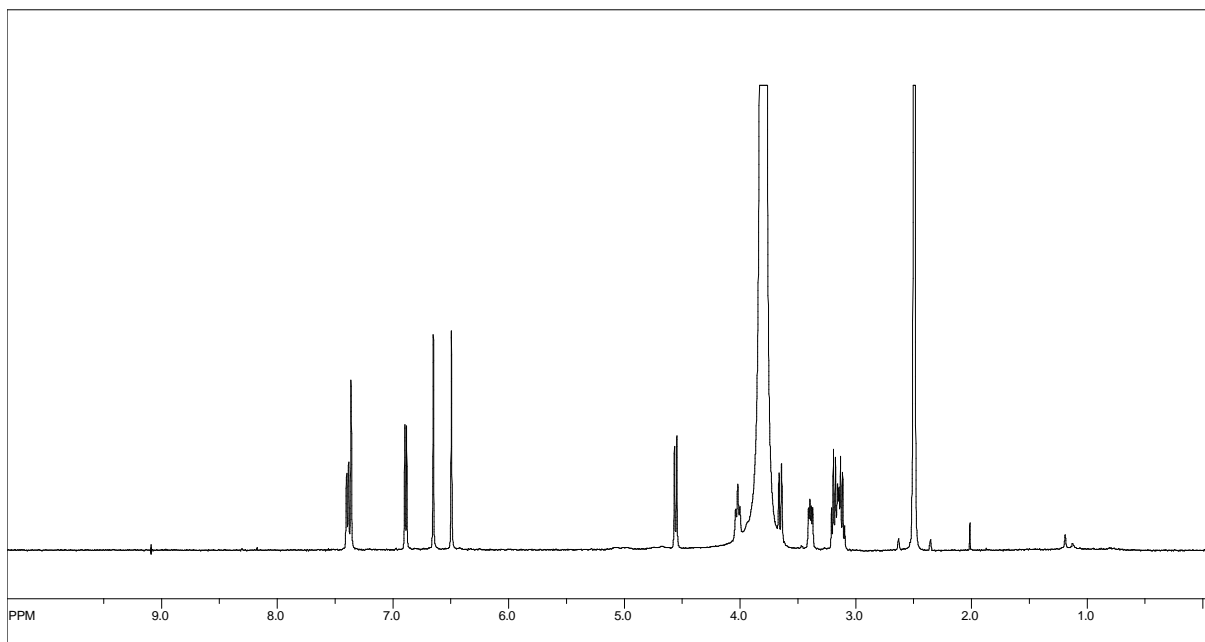


Figura 125. Espectro de RMN de ^1H da substância **RG-18**. (DMSO- d_6 – TMS; 500 MHz).

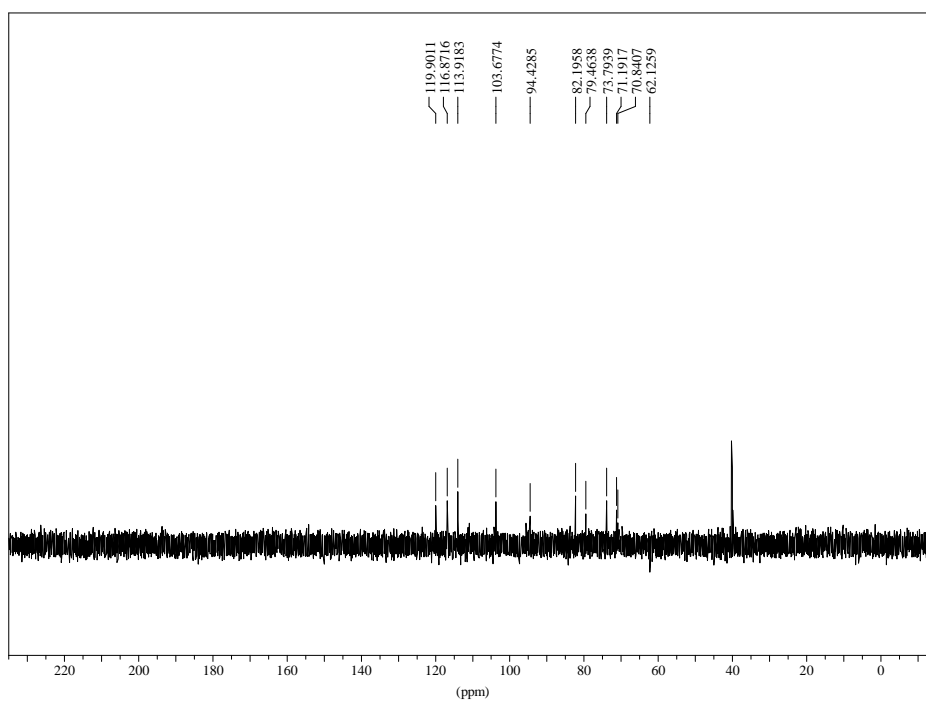


Figura 126. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **RG-18**. (DMSO- d_6 – TMS; 125 MHz).

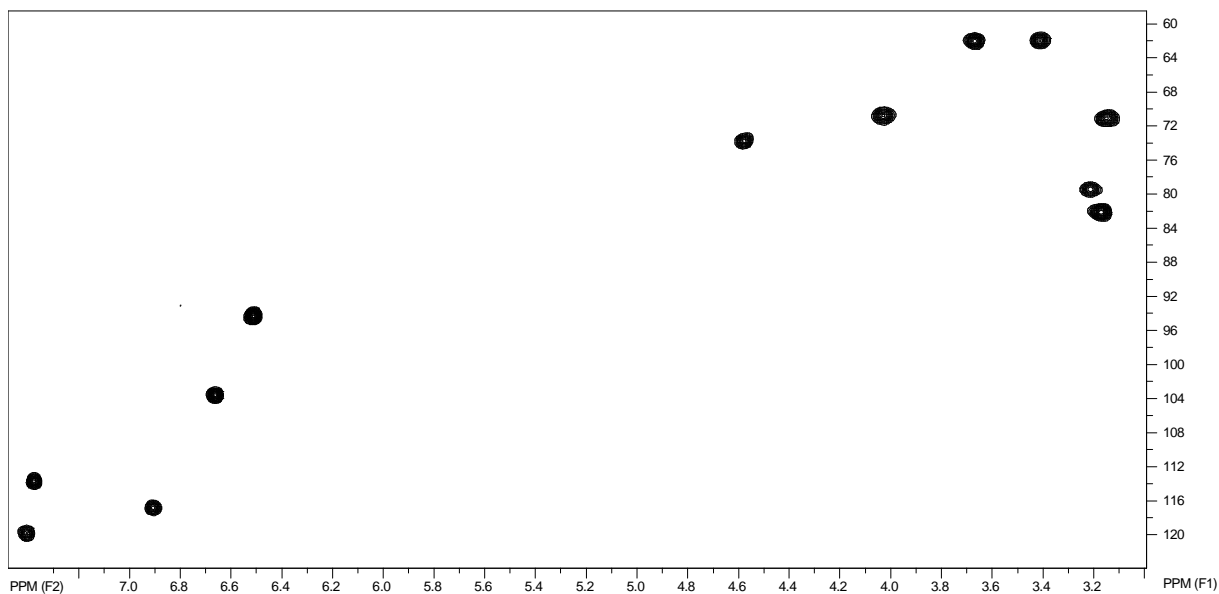


Figura 127. Mapa de contorno do HMQC da substância **RG-18**. (DMSO-d₆ – TMS; 500 e 125 MHz).

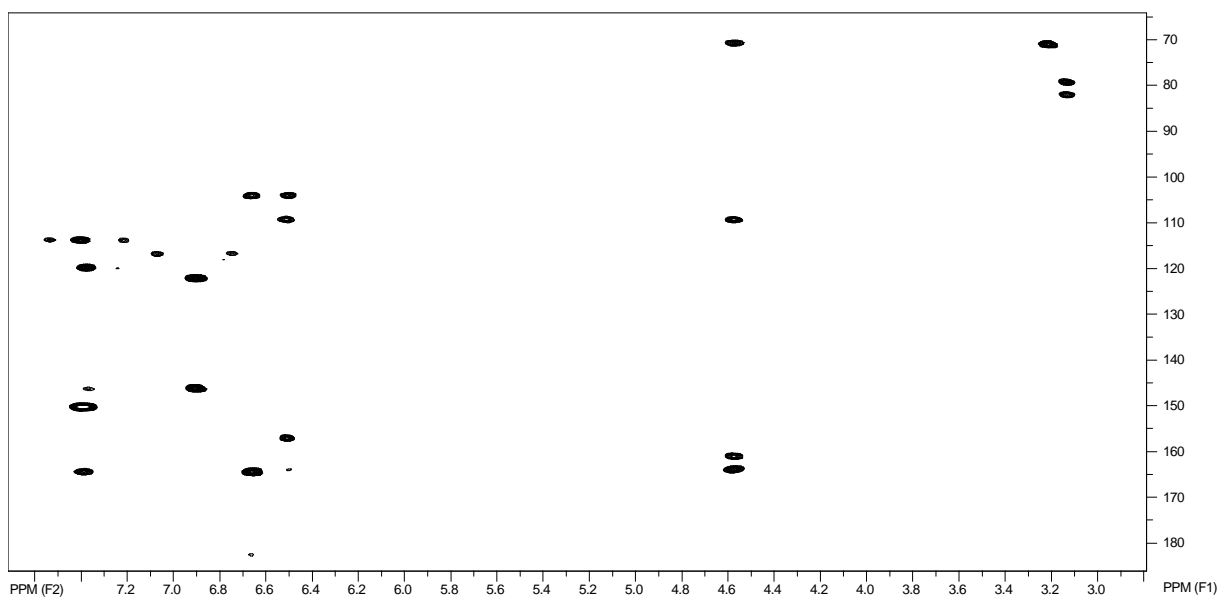


Figura 128. Mapa de contorno do HMBC da substância **RG-18**. (DMSO-d₆ – TMS; 500 e 125 MHz).

Substância RG-19

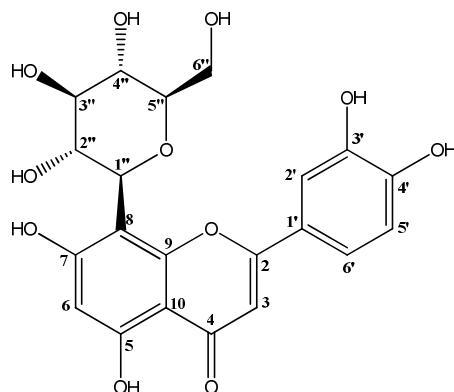
Luteolina 8-O- β -glicopiranosídeo

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **RG-19**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	δ $^{13}\text{C}^{**}$	HMBC	Literatura***
2		165,1		166,70
3	6,62; <i>s</i>	103,4	C-10; C-2	103,68
4		183,0		184,16
5		161,0		162,66
6	6,25; <i>s</i>	99,0	C-10; C-8; C-5	99,37
7		163,4		164,57
8		105,4		105,78
9		157,1		158,11
10		104,7		105,15
1'		123,0		124,07
2'	7,42; <i>s</i>	114,7	C-6'; C-3'; C-4'; C-2	114,99
3'		146,6		147,07
4'		150,5		150,95
5'	6,86; <i>d</i> ; 8,5	116,6	C-1'; C-3'	116,73
6'	7,49; <i>d</i> ; 8,5	120,5	C-2'; C-4'; C-2	120,92
1''	4,65; <i>d</i> ; 9,9	74,3	C-2''; C-3''; C-5''; C-8; C-9; C-7	75,36
2''	3,80; <i>m</i> *	71,7	C-1''; C-3''	72,85
3''	3,34; <i>m</i>	79,5		80,33
4''	3,25; <i>m</i>	71,5		72,30
5''	3,25; <i>m</i>	82,7	C-4''	82,93
6''a	3,50; <i>dd</i> ; 12,0 e 6,3	62,5		63,23
6''b	3,76; <i>m</i>			

*sinal encoberto pelos hidrogênios da água em DMSO- d_6

** Deslocamentos obtidos pelos mapas de contorno do HMBC e HMQC

***RAYYAN *et al.*, 2005.

O espectro de RMN de ^1H apresentou-se muito similar ao da estrutura descrita anteriormente, sendo que a diferença mais relevante foi observada no sinal δ_{H} 6,25; *s* deste espectro, o qual apresentou uma blindagem de 0,24 ppm em relação ao anterior. Comparando com o flavonoide anterior, este sinal refere-se ao hidrogênio do anel A, e portanto indica que a diferença destas duas substâncias consiste na posição da C-glicosilação. A correlação nos

mapas de contorno do HMQC para este hidrogênio foi o carbono δ_{CH} 99,0, o que novamente indica estar ligado ao carbono da posição 6 ou 8, devido a maior desblindagem das outras posições deste anel. A correlação entre o hidrogênio δ_H 6,25 com o carbono δ_{C-5} 161,0 nos mapas de contorno do HMBC, posiciona este hidrogênio em C-6, pois C-8 está em *para* em relação à posição 5. A C-glicosilação foi posicionada em C-8, devido às correlações nos mapas de contorno do HMBC entre o hidrogênio anomérico δ_H 4,65 com os carbonos δ_{C-8} 105,4; δ_{C-9} 157,1 e δ_{C-7} 163,4 (**Tabela 33**).

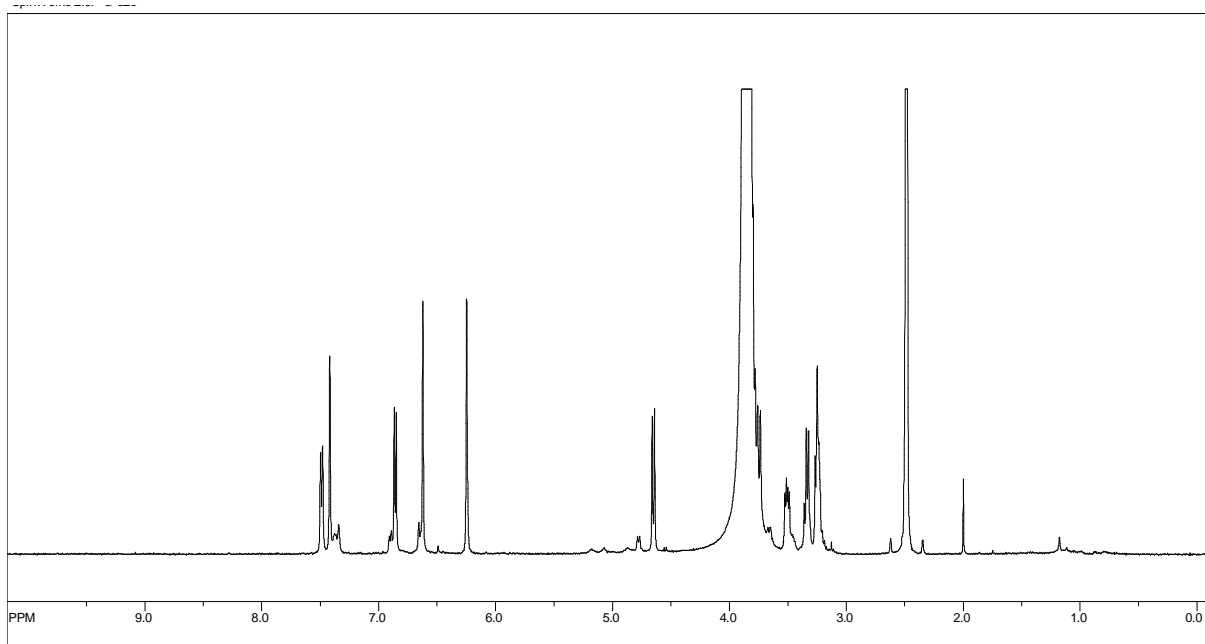


Figura 129. Espectro de RMN de 1H da substância **RG-19**. (DMSO- d_6 – TMS; 500 MHz).

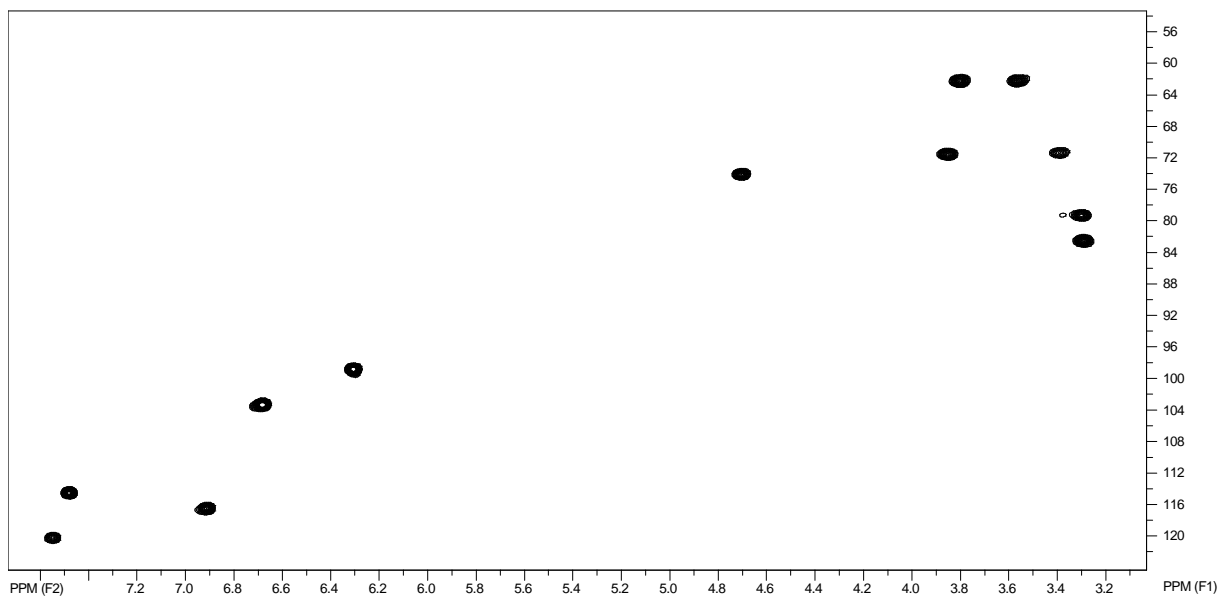


Figura 130. Mapa de contorno do HMQC da substância **RG-19**. (DMSO-d₆ – TMS; 500 e 125 MHz).

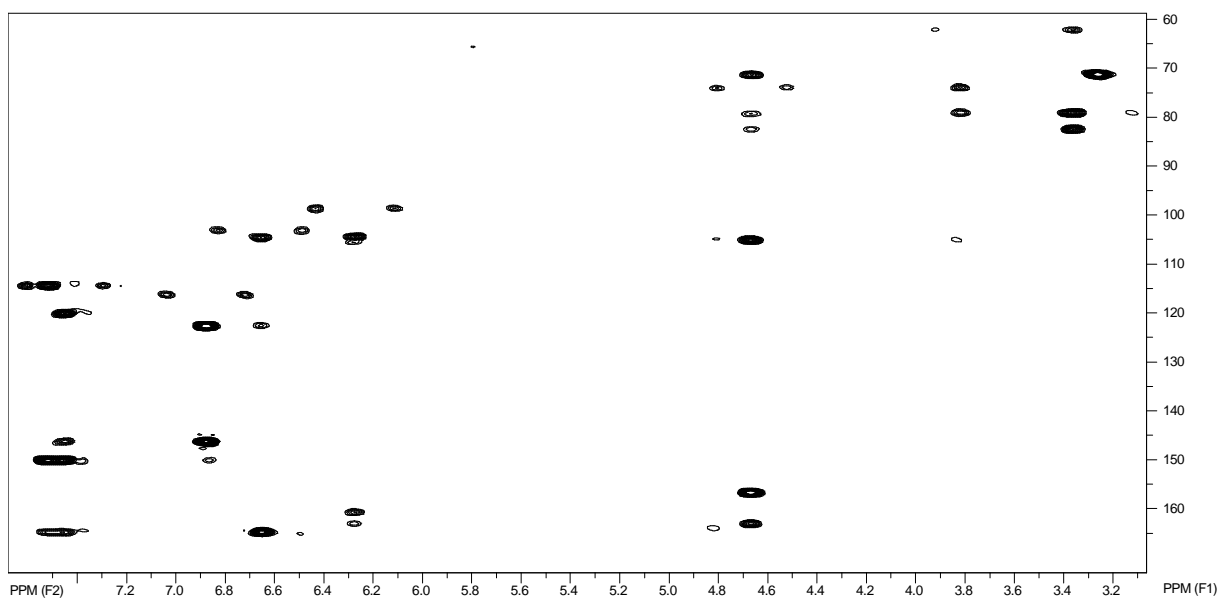


Figura 131. Mapa de contorno do HMBC da substância **RG-19**. (DMSO-d₆ – TMS; 500 e 125 MHz).

4.4.5. Considerações sobre o estudo químico de *R. graciliflora*

As quatro isoflavanos identificadas, inéditas como produtos naturais, representam uma importante classe química em se tratando de atividades biológicas. Esta classe é encontrada na família Leguminosae, porém devem ser mencionadas as poucas referências encontradas para estes isoflavonoides, quando comparados a outros esqueletos de flavonoides. Dentre as diversas atividades atribuídas a estas substâncias, estão as citotóxicas para diversas linhagens de células (SONGSIANG *et al*, 2009; DEESAMER *et al*, 2007), a inibição da recaptação de serotonina (OFIR *et al*, 2003), atividade estrogênica (MESSINA, 2010), atividade antifúngica e antibacteriana (SATO *et al*, 2004), atividades tripanocidas e leishmanicidas (GANAPATY *et al*, 2008; SAIRAFIANPOUR *et al*, 2002) e atividade antiplasmodial (*Plasmodium falciparum*) (SONGSIANG *et al*, 2009). Ressalta-se também a presença desta classe de substância em espécies dos gêneros *Astragalus* e *Oxytropis*, leguminosas tóxicas para bovinos (CHEN, WANG, SHI, 2010; SUBARNAS, OSHIMA, HIKINO, 1991). Porém, a toxicidade destes gêneros de plantas tem sido atribuída à presença de alcaloides indolizidínicos (suainsonina), assim como a capacidade de algumas espécies de *Astragalus* em acumular selênio (TOKARNIA, DÖBEREINER, PEIXOTO, 2000).

A soja é uma Leguminosa extremamente conhecida pelas suas atividades estrogênicas devido a sua capacidade de biossintetizar isoflavonas. Porém, o equol, uma isoflavana, a qual é produto do metabolismo das isoflavonas por bactérias intestinais, se tem mostrado altamente ativa, sendo atribuída a esta última o principal responsável pela atividade estrogênica (MESSINA, 2010).

De acordo com o exposto, pode-se sugerir que estas substâncias estejam contribuindo significativamente para a elevada atividade citotóxica encontrada na fração diclorometânica de *R. graciliflora*.

4.5. ESTUDO QUÍMICO DE *Indigofera truxillensis*

Os extratos etanólicos dos frutos e raízes desta espécie apresentaram atividades contra os microcrustáceos *A. salina*, quando comparado aos demais extratos etanólicos. Também, esta espécie é comprovadamente tóxica para ruminantes, não sendo conhecido seu princípio tóxico. Tais fatos, aliado às análises dos seus cromatogramas e espectros de RMN de ^1H , foram suficientes para considerá-los promissores para o isolamento de seus componentes, o que justifica a escolha desta espécie para um estudo químico mais detalhado.

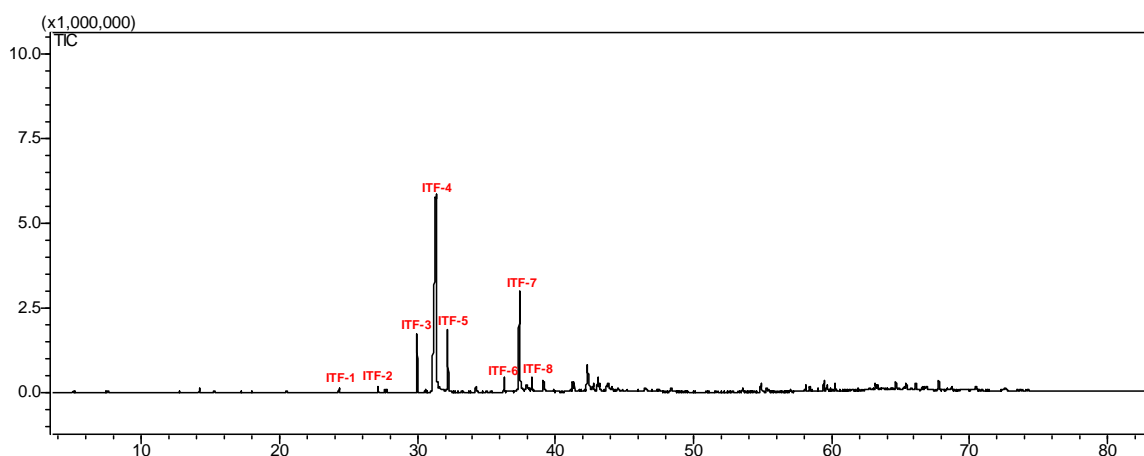
Em um primeiro momento optou-se pelo estudo químico dos frutos e raízes. O estudo dos frutos se deve aos relatos da presença de indospicina, um aminoácido não proteico, tóxico, no gênero *Indigofera*, nas sementes do vegetal (HEGARTY, POUND, 1968; MILLER, SMITH, 1973), além de relatos de acúmulos de substâncias tóxicas nos frutos de Leguminosas. Porém, como os frutos de *I. truxillensis* possuem pequenas dimensões, tornou-se inviável o estudo apenas das sementes. Quanto aos estudos das raízes desta espécie, este se deve à capacidade de plantas deste gênero em acumular os derivados do ácido 3-nitropropiónico principalmente nas raízes, considerados tóxicos por inibir irreversivelmente a succinato desidrogenase, uma enzima da cadeia respiratória (ALSTON *et al*, 1977).

4.5.1. Frutos – Fração hexânica

A fração hexânica proveniente do extrato etanólico dos frutos de *I. truxillensis* foi analisada por CG-EM (Condições de análise CG 1, página 26). As substâncias identificadas, e a comparação da similaridade dos espectros de massas com os das bibliotecas e bancos de padrões disponíveis no laboratório, além dos cálculos dos índices de retenção de Kovats, bem como comparação destes com aqueles obtidos na literatura estão apresentados na **Tabela 34** e **Figura 132**.

Tabela 34. Substâncias identificadas na fração hexânica dos frutos de *I. truxillensis*.

Substância	Similaridade	IK (exp.)	IK (lit.)	Literatura	
ITF-1	Ácido tetradecanoico	92	1756	1761	Maia <i>et al</i> , 2000
ITF -2	Hexahidroxifarnesil acetona	94	1839	1839	Oliveira <i>et al</i> , 2009
ITF -3	Hexadecanoato de metila	96	1923	1927	Adams, 1995
ITF -4	Ácido hexadecanoico	94	1966	1963	Nogueira <i>et al</i> , 2001
ITF -5	Hexadecanoato de etila	95	1992	1993	Oliveira <i>et al</i> , 2009
ITF -6	Octadecanoato de metila	96	2131	2128	Adams, 1995
ITF -7	Ácido octadecanoico	94	2169	2170	Maia <i>et al</i> , 2000
ITF -8	Octadecanoato de etila	91	2199	2194	Adams, 1995

**Figura 132.** Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica dos frutos de *I. truxillensis* (Condições de análise CG 1, página 26).

4.5.2. Frutos – Fração AcOEt

A fração AcOEt foi submetida a fracionamento utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como eluente. Foram obtidas 79 frações, as quais foram reunidas por similaridade química através do perfil químico obtido por CCDC. As frações reunidas estão apresentadas na **Tabela 35** abaixo.

Tabela 35. Frações reunidas da fração AcOEt dos frutos de *Indigofera truxillensis*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-6	15,8	20-28	119,9
7-9	19,5	29-34	55,6
10-12	38,9	35-41	117,2
13-14	50,7	42-79	
15-19	95,0		

A fração ItF_{AcOEt}-20-28 foi submetida à purificação em CLAE-UV-DAD, utilizando as Condições de análise CLAE 7, página 28, sendo isoladas e identificadas as substâncias **ItF-9**, **ItF-10** e **ItF-11**.

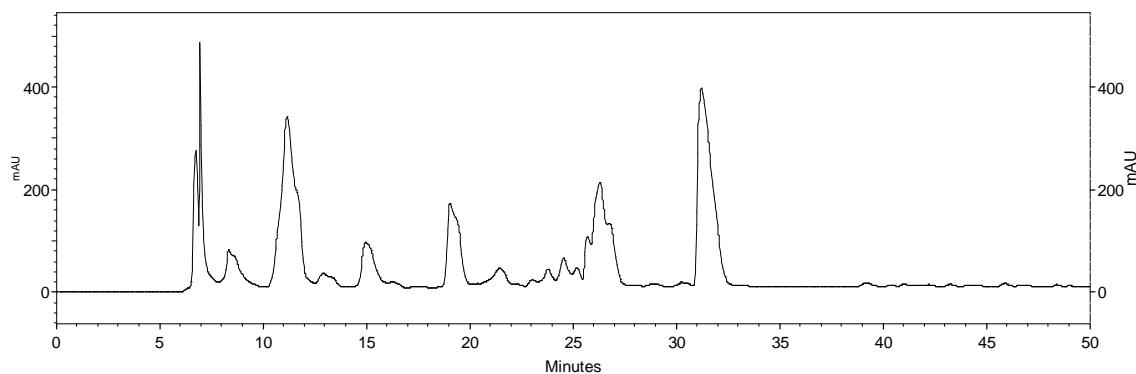


Figura 133. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (270 nm) da fração ItF-AcOEt – 20-28, obtido utilizando as Condições de análise CLAE 7, página 28. O pico em 8,5 min. refere-se à substância **ItF-9** (1 mg), o pico em 11,6 min. refere-se à substância **ItF-10** (6,8 mg), o pico em 19,2 min. refere-se à substância **ItF-11** (3,7 mg).

4.5.3. Fração hidro-alcoólica

Esta fração foi avaliada quanto à presença de indospicina, conforme a metodologia descrita no item 3.3.5 (página 29), sendo utilizada reagente de ninidrina. Indospicina, igualmente a alguns outros aminoácidos, revela-se com coloração púrpura com este reagente. Tendo sido esta reação positiva, realizou-se CCDP (FM: CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH: H₂O 40:40:15:5), sendo coletada a região da placa que contém a substância que revelou com este reagente. Esta fração, juntamente com uma alíquota da fração hidro-alcoólica extraída com MeOH-HCl 1M 1:1, foram analisadas por Espectrometria de Massas, a fim de se avaliar a presença de íons referentes à indospicina ($[M + H]^+$ (m/z 174,1242); $[M + Na]^+$ (m/z 196,1062) . Nesta análise não foram detectados íons com m/z que pudessem ser atribuídas à presença deste aminoácido (**Figura 134**).

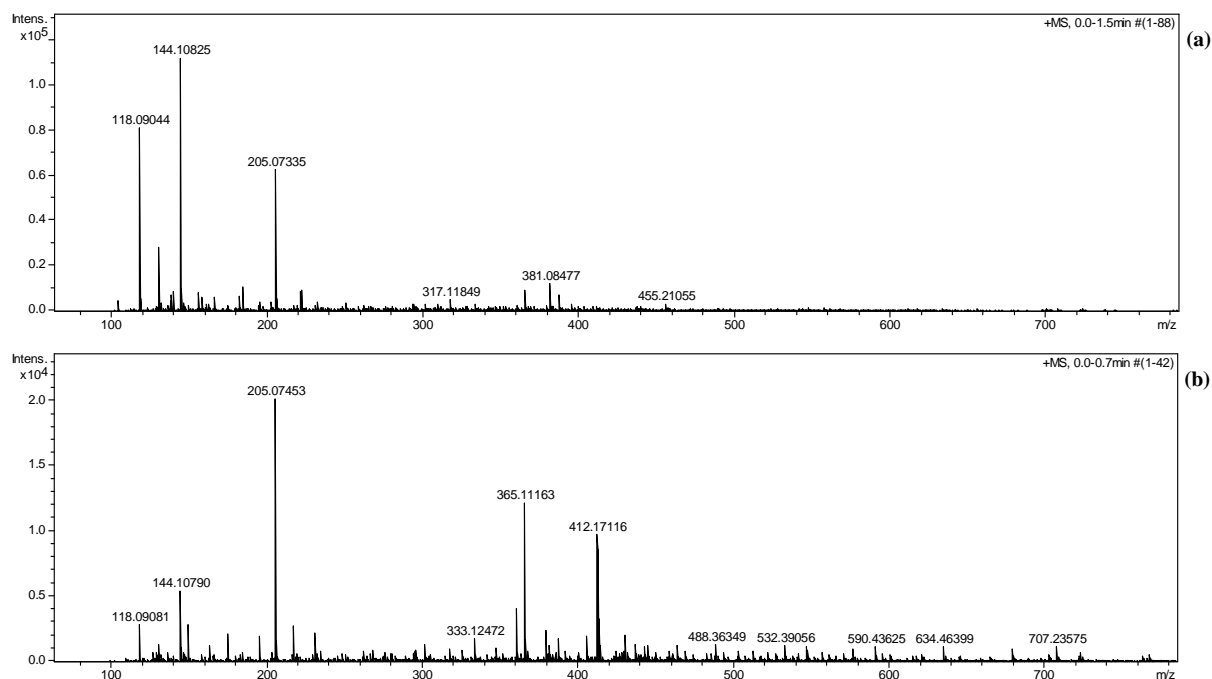


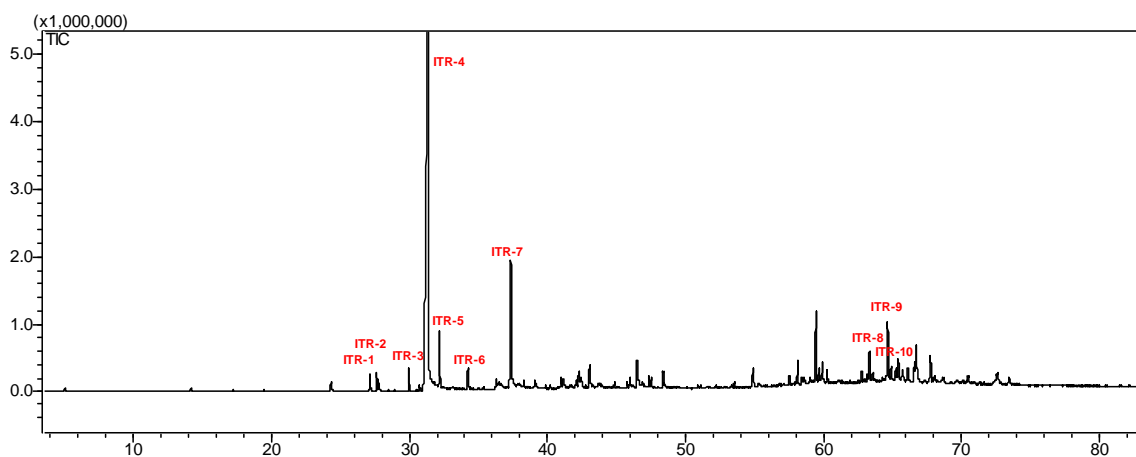
Figura 134. Espectros de Massas obtidos das frações (a) hidro-alcoólica ácida do caule de *I. truxillensis* e (b) obtida por CCDP da fração hidro-alcoólica do caule de *I. truxillensis*, a qual revelou com o reagente de ninidrina.

4.5.4. Raízes – Fração hexânica

Assim como realizado para a fração hexânica proveniente do extrato etanólico dos frutos de *I. truxillensis*, a fração hexânica proveniente do extrato etanólico das raízes de *I. truxillensis* foi analisada por CG-EM (Condições de análise CG 1, página 26). As substâncias identificadas, e a comparação da similaridade dos espectros de massas com os das bibliotecas e bancos de padrões disponíveis no laboratório, além dos cálculos dos índices de retenção de Kovats, bem como comparação destes com aqueles obtidos na literatura estão apresentados na **Tabela 36** e **Figura 135**.

Tabela 36. Substâncias identificadas na fração hexânica das raízes de *I. truxillensis*.

Substância	Similaridade	IK (exp.)	IK (lit.)	Literatura	
ITR-1	Hexahidrofarnesil acetona	94	1839	1839	Oliveira <i>et al</i> , 2009
ITR-2	Ácido pentadecanoico	94	1856	1851	Berdague <i>et al</i> , 1991
ITR-3	Hexadecanoato de metila	96	1923	1927	Adams, 1995
ITR-4	Ácido hexadecanoico	94	1966	1963	Nogueira <i>et al</i> , 2001
ITR-5	Hexadecanoato de etila	95	1991	1993	Oliveira <i>et al</i> , 2009
ITR-6	Ácido heptadecanoico	95	2058	2065	Palmeira <i>et al</i> , 2001
ITR-7	Ácido octadecanoico	94	2161	2170	Maia <i>et al</i> , 2000
ITR-8	Estigmasterol	91			
ITR-9	β -Sitosterol	90			
ITR-10	β -amirina	91			

**Figura 135.** Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica das raízes de *I. truxillensis* Condições de análise CG 1, página 26.

4.5.5. Raízes – Fração AcOEt

A fração AcOEt foi submetida a fracionamento utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como eluente. Foram obtidas 79 frações, as quais foram reunidas por similaridade química através do perfil químico obtido por CCDC. As frações reunidas estão apresentadas na **Tabela 37**.

Tabela 37. Frações reunidas da fração AcOEt das raízes de *Indigofera truxillensis*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-6	20,4	20-24	51,3
7-13	370,4	25-30	11,6
14-19	447,7	31-45	40,4

A fração ItRAcOEt-20-24 foi apresentada formação de cristais, com MeOH, sendo estes separados, e lavados com MeOH gelado, fornecendo a substância **ItR-11**.

A fração ItRAcOEt-25-30 foi submetida à purificação em CLAE-UV-DAD, utilizando as Condições de análise CLAE 7, página 28, sendo isoladas e identificadas as substâncias **ItR-11** e **ItR-12**.

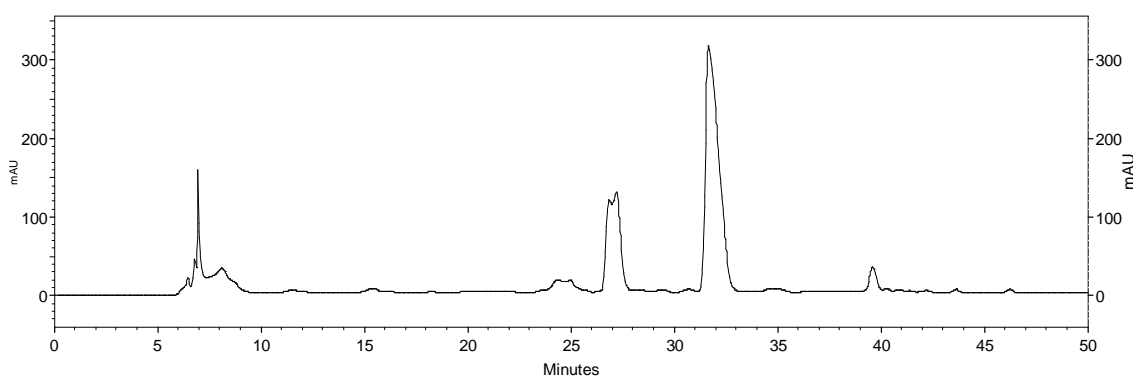


Figura 136. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (260 nm) da fração ItR-AcOEt – 25-30, obtido utilizando as Condições de análise CLAE 7, página 28. O pico em 27,0 min. refere-se à substância **ItR-11** (1 mg), o pico em 31,6 min. refere-se à substância **ItR-12** (4 mg).

4.5.6. Caule

Na averiguação da presença de metabólitos tóxicos nos frutos e raízes, utilizando testes químicos específicos além de métodos fitoquímicos clássicos, não foi observada a presença destas substâncias. Neste momento, julgou-se necessária a investigação de nitrocompostos alifáticos em outros órgãos do vegetal, os quais são caule e folhas, utilizando reagente para detecção desta classe de substâncias. Desta maneira, foi extraída uma alíquota do pó das folhas e do pó do caule em metanol, sendo analisada por CCDC e revelada com *p*-nitroanilina diazotada. Observou-se reação intensa, com coloração vermelho-alaranjada, apenas no extrato metanólico do caule, fazendo-se necessária sua extração para o isolamento e caracterização química desta substância, conforme descrito no item 3.3.3. Após o particionamento, foi realizada CCDC, revelada com *p*-nitroanilina diazotada, para se obter a informação de qual das frações provenientes das partições revelavam com este reagente. Apenas a fração em AcOEt apresentou resultado positivo. Então, foi realizado seu fracionamento em coluna, utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como eluente (**Tabela 38**). Foram obtidas 6 frações, as quais foram monitoradas com reagente de *p*-nitroanilina diazotada. A fração 2 apresentaram substância que se revelou vermelho-alaranjada, sendo reunidas e submetidas à separação por CLA-UV-DAD (Condições de

análise CLAE 8, **Figura 137**). Deste procedimento obteve-se a substância ItC-1, a qual revelou-se vermelho-alaranjada com o reagente *p*-nitroanilina diazotada, sugerindo-se tratar de nitrocomposto alifático. Porém, após a obtenção dos dados espectroscópicos e espectrométricos, concluiu-se tratar do alcaloide indicana, o que demonstrou resultado falso-positivo para derivados do ácido 3-nitropropiónico (**Figura 138**).

Tabela 38. Frações obtidas do fracionamento da fração AcOEt do caule de *Indigofera truxillensis*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1	74,7	4	36,2
2	668,0	5	53,1
3	86,5	6	276,9

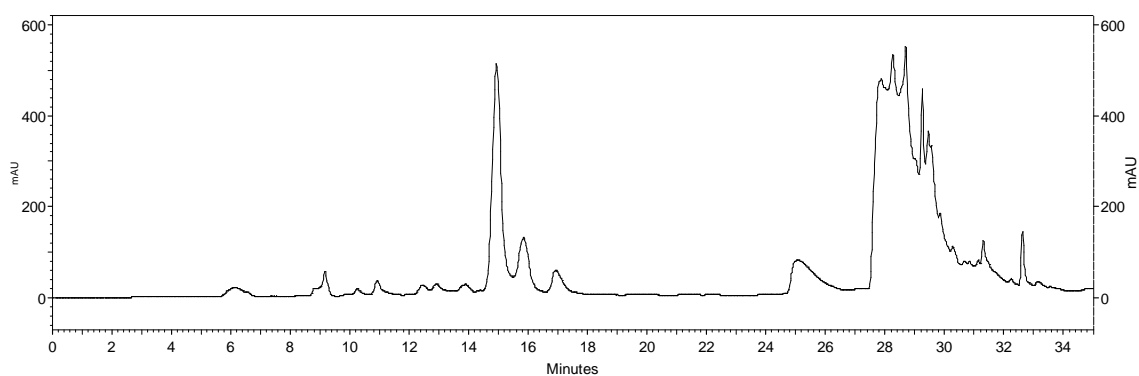


Figura 137. Cromatograma obtido em CLAE-UV-DAD (214 nm) da fração ItC-AcOEt-2, obtido utilizando as Condições de análise CLAE 8, página 29. O pico em 14,9 min. refere-se à substância **ItC-1** (7,1 mg).

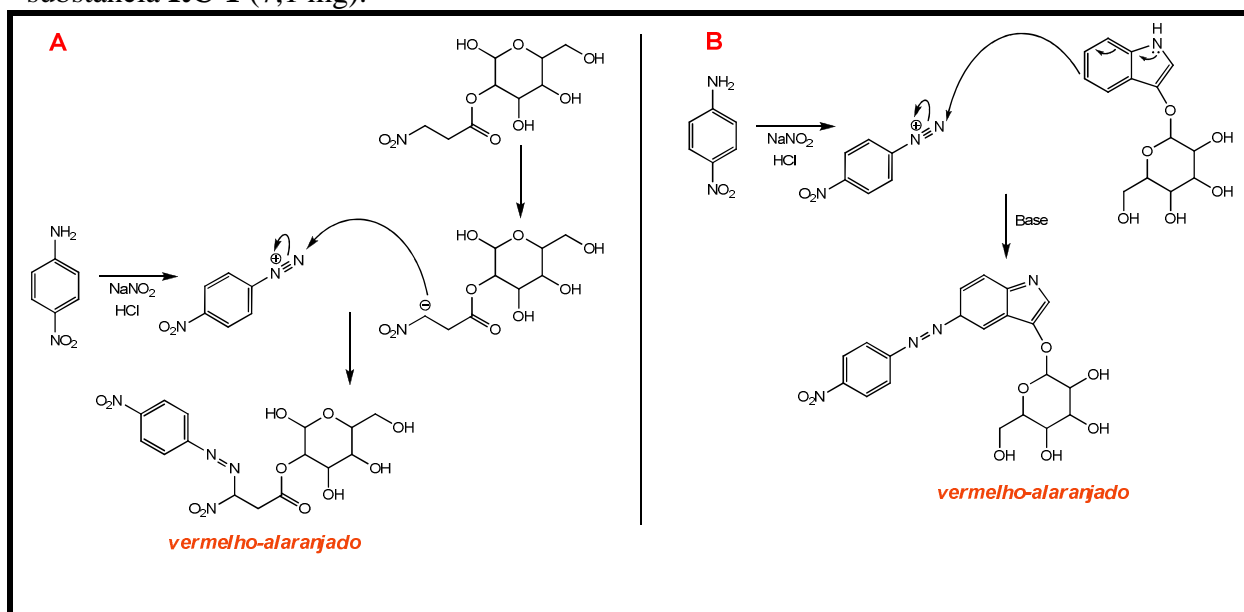
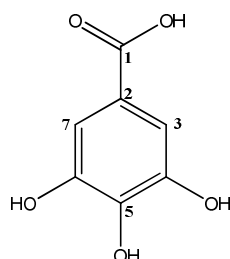


Figura 138. Esquemas das reações de *p*-nitroanilina diazotada com derivado do ácido 3-nitropropiónico (**A**) e com isatana (**B**).

4.5.7. Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *I. truxillensis*

Substância ItF-9



Ácido 3,4,5-triidroxibenzoico

Tabela 39. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **ItF-9**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J-Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Literatura*
1		170,5		167,63
2		121,7		120,65
3	7,10; s	109,6	C-1; C-2; C-4; C-5; C-7	108,87
4		144,7		145,53
5		137,9		138,16
6		144,7		145,53
7	7,10; s	109,6	C-1; C-2; C-3; C-5; C-6	108,87

* WEI *et al.*, 2005.

O espectro de RMN de ^1H apresentou apenas um sinal, o qual possui deslocamento químico na região de aromáticos (δ 7,10; s). O espectro de RMN de ^{13}C e mapas de contorno do HMBC indicaram a presença de 5 carbonos com deslocamentos químicos diferentes, sendo quatro aromáticos (δ 121,7; 109,6; 144,7; 137,9) e um carbono mais desblindado, referente à carbonila de ácido carboxílico (δ 170,5). Por ser observada a presença de apenas quatro carbonos aromáticos, foi proposta uma molécula com plano de simetria. A partir destes dados, e comparação com dados da literatura, concluiu-se tratar do ácido 3,4,5-triidroxibenzoico (**Tabela 39**).

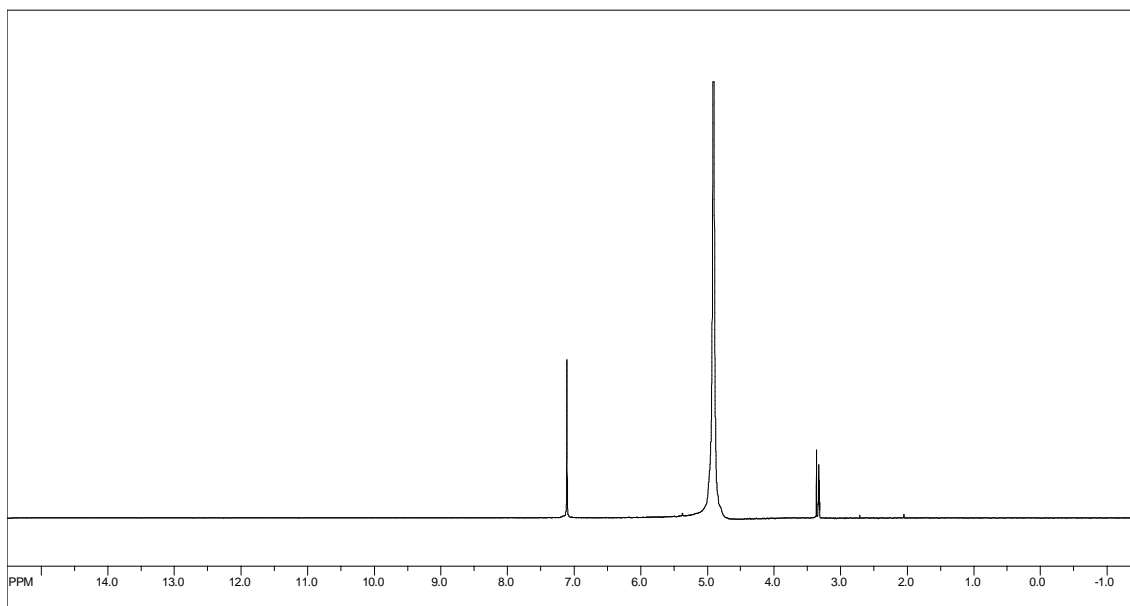


Figura 139. Espectro de RMN de ^1H da substância **ItF-9**. (CD_3OD - TMS; 300 MHz).

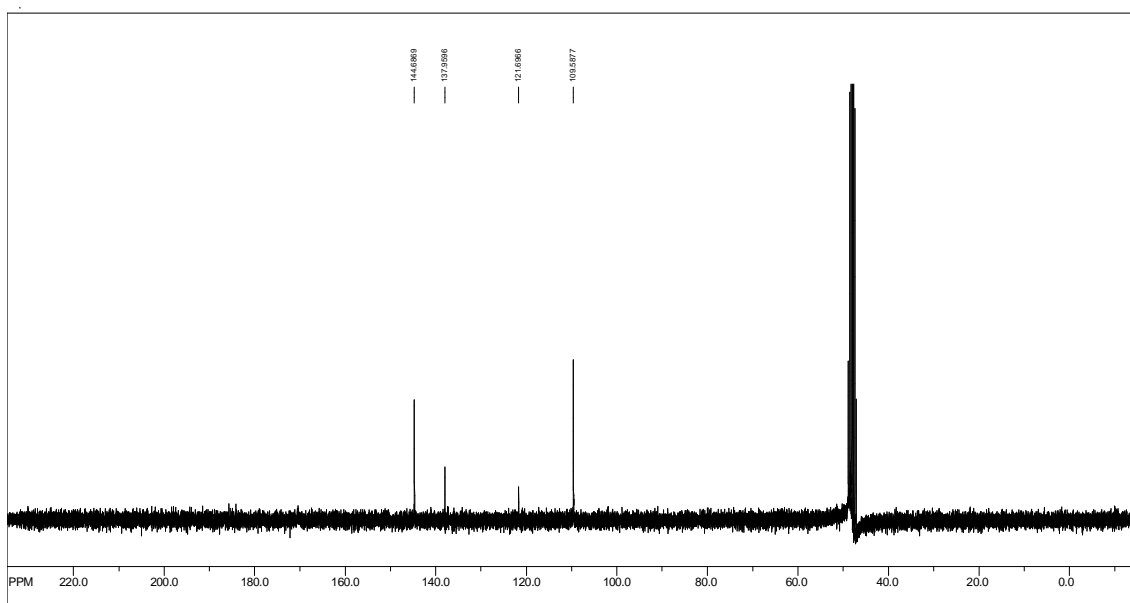


Figura 140. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **ItF-9**. (CD_3OD - TMS; 75 MHz).

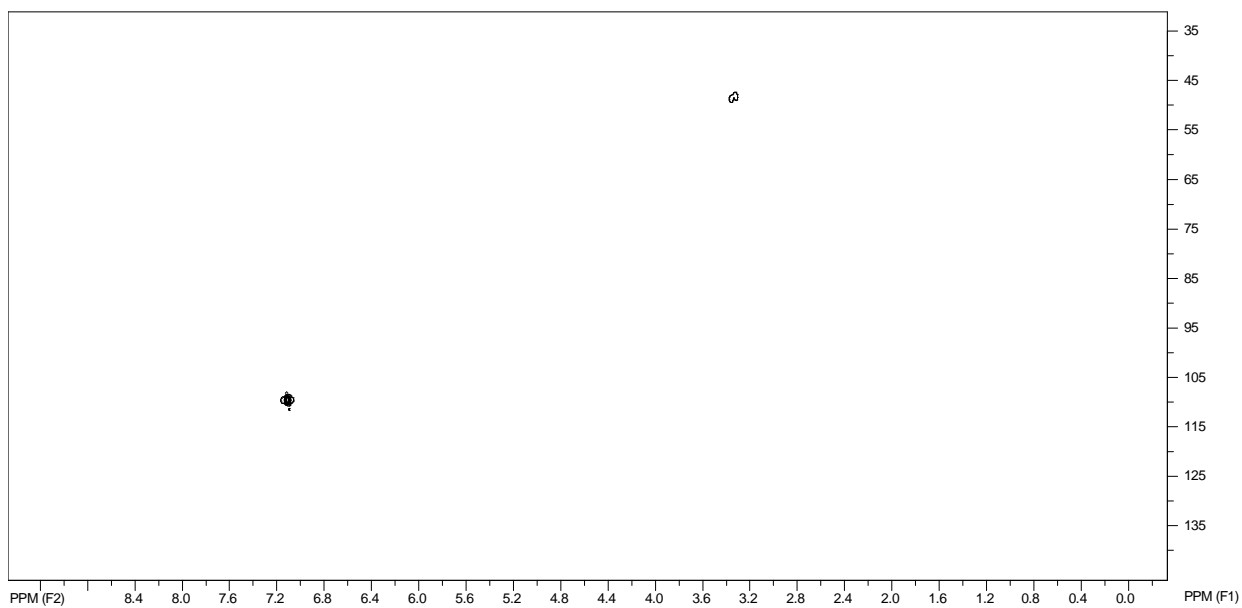


Figura 141. Mapas de contorno do HMBC da substância **ItF-9**. (CD₃OD - TMS; 300 e 75 MHz).

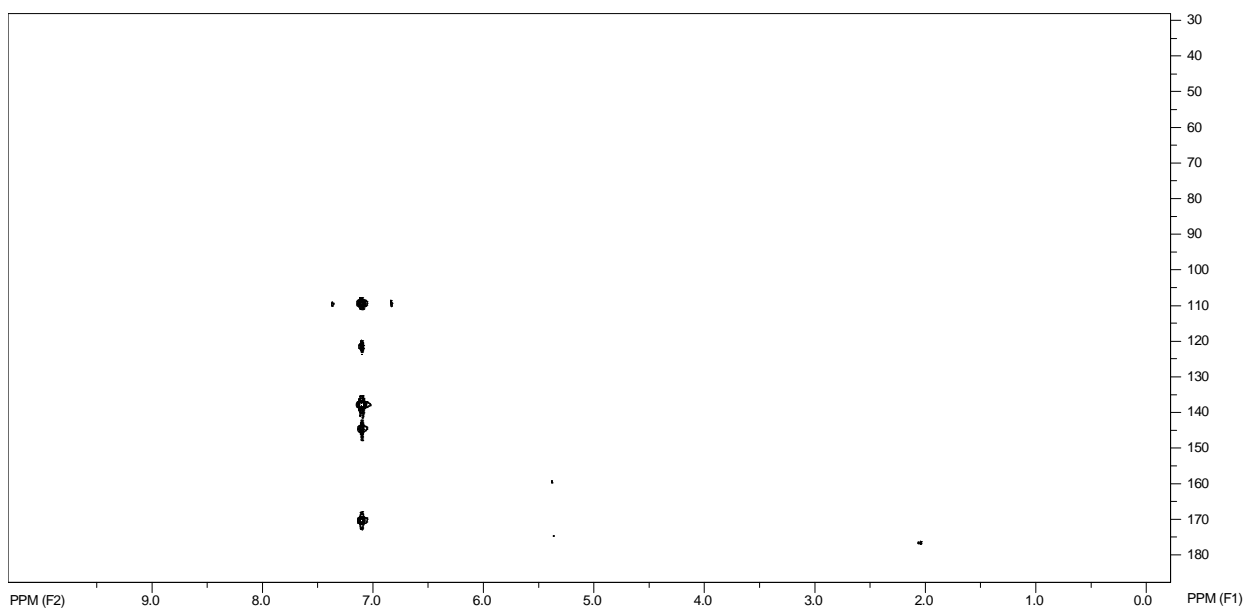
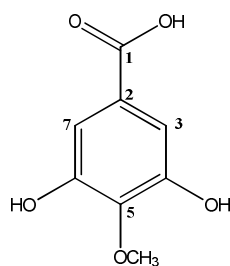


Figura 142. Mapas de contorno do HMBC da substância **ItF-9**. (CD₃OD - TMS; 300 e 75 MHz).

Substância ItF-10



Ácido 3,5-diidroxi-4-metoxibenzoico

Tabela 40. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **ItF-10**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J-Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Literatura*
1		169,1		170,6
2		126,0		127,7
3	7,08; s	109,3	C-1; C-2; C-4; C-5; C-7	111,2
4		144,9		152,1
5		139,7		141,7
6		144,9		152,1
7	7,08; s	109,3	C-1; C-2; C-4; C-5; C-7	111,2
OMe	3,86; s	59,8	C-5	61,5

*HATTORI *et al.*, 1989.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C desta substância apresentaram-se bastante similares ao da estrutura **ItF-9**, com um sinal adicional (δ_{H} 3,86; s; 3H e δ_{C} 59,8), indicando uma metila (**Tabela 40**). Foi observado, nos mapas de contorno do HMBC, a correlação deste sinal de hidrogênio metílico com o carbono oxigenado δ 139,7, o que corrobora com a estrutura proposta.

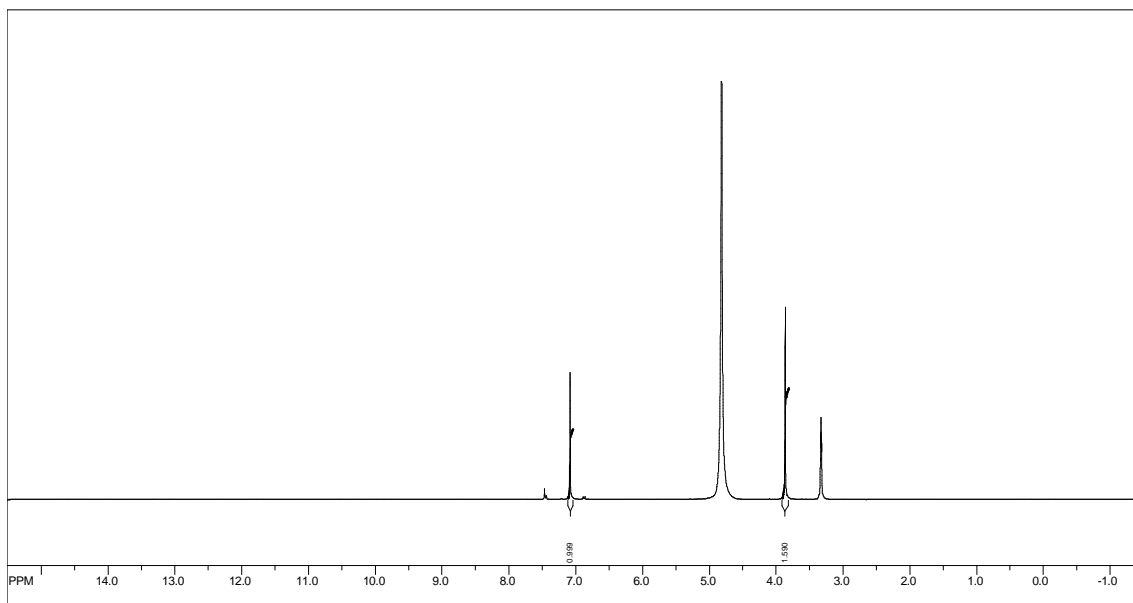


Figura 143. Espectro de RMN de ^1H da substância **ItF-10**. (CD_3OD - TMS; 300 MHz).

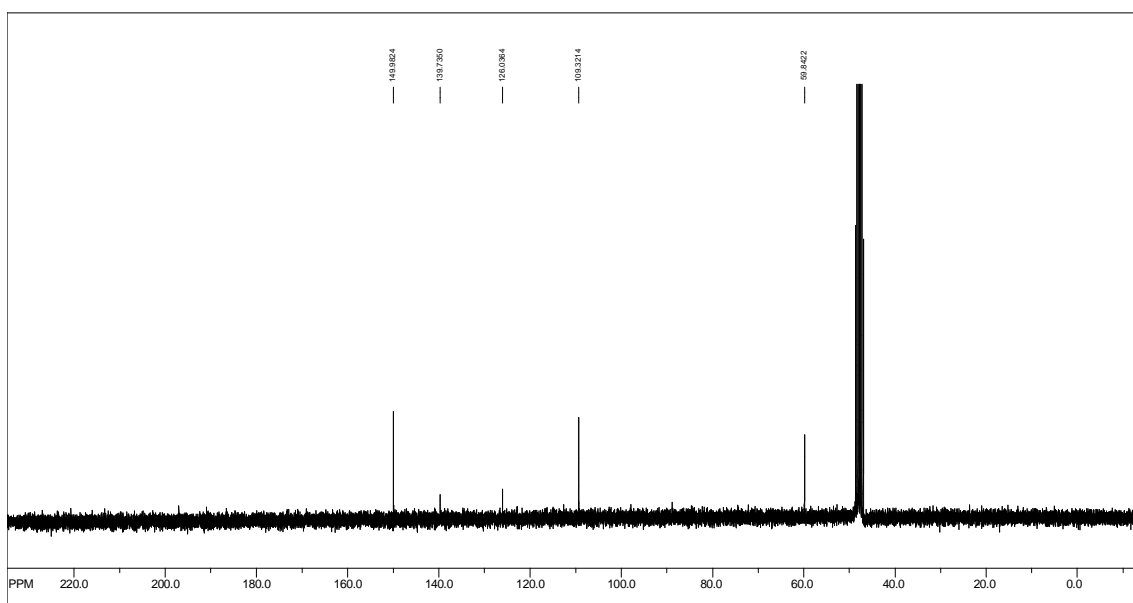


Figura 144. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **ItF-10**. (CD_3OD - TMS; 75 MHz).

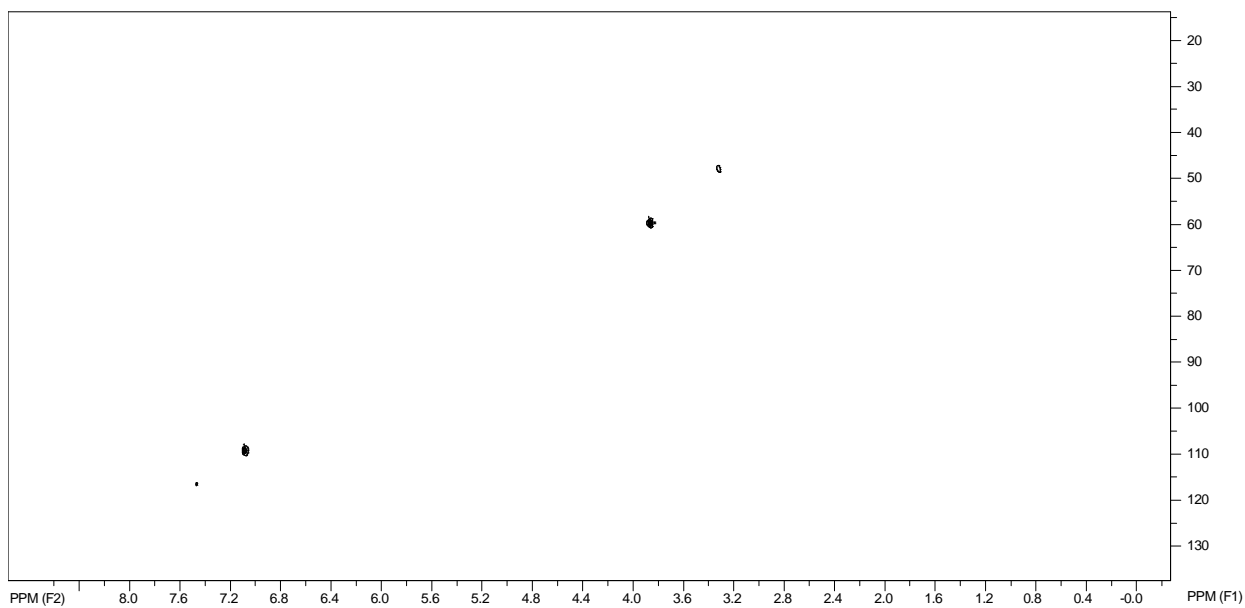


Figura 145. Mapas de contorno do HMQC da substância **ItF-10**. (CD₃OD - TMS; 300 e 75 MHz).

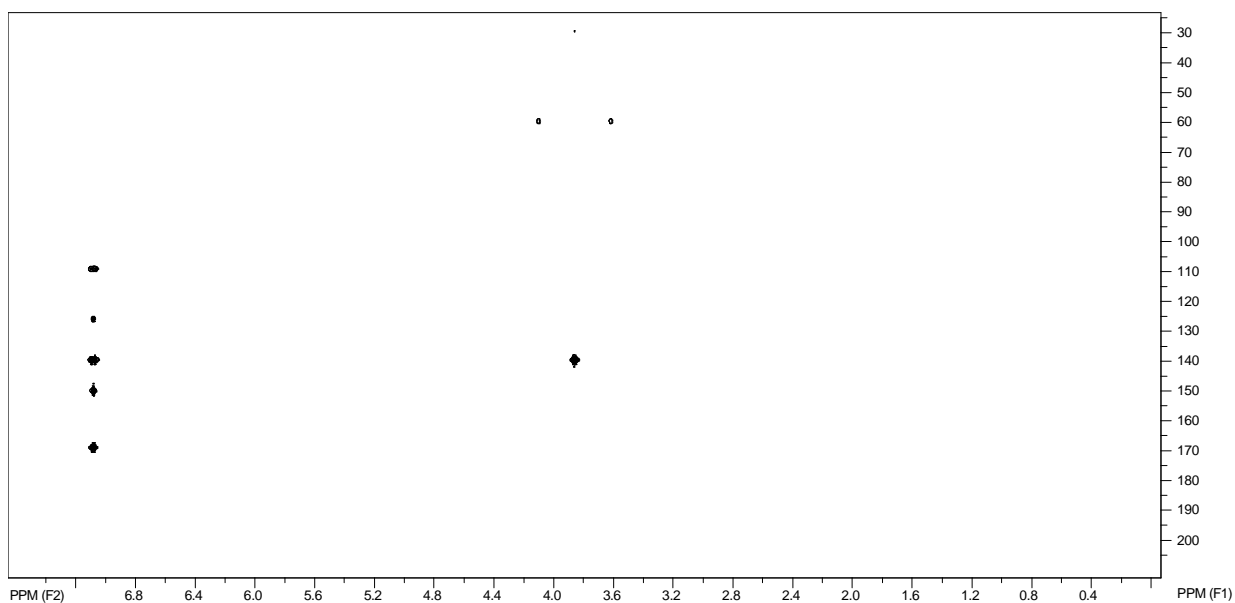
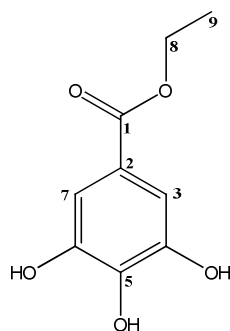


Figura 146. Mapas de contorno do HMBC da substância **ItF-10**. (CD₃OD - TMS; 300 e 75 MHz).

Substância ItF-11



3,4,5-triidroxibenzoato de etila

Tabela 41. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **ItF-11**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J-Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Literatura*
1		167,3		168,6
2		120,3		121,8
3	7,08; s	108,8	C-1; C-2; C-4; C-5; C-7	110,0
4		145,2		146,5
5		138,5		139,7
6		145,2		146,5
7	7,08; s	108,8	C-1; C-2; C-4; C-5; C-7	110,0
8	4,38; q; 7,1 (2H)	60,4	C-1; C-9	61,7
9	1,45; t; 7,1 (3H)	13,4	C-8	14,6

* TAKAOKA *et al.*, 2009.

Novamente, os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C desta substância apresentaram-se bastante similares ao da estrutura **ItF-9**, com dois sinais adicionais (δ_{H} 4,38; q; 7,1; 2H; δ_{H} 1,45; t; 7,1; 3H e δ_{C} 60,4; δ_{C} 13,4), indicando uma etila (**Tabela 41**). Foi observado, nos mapas de contorno do HMBC, a correlação do sinal de hidrogênio δ 4,38 com o carbono carbonílico δ 167,3, indicando uma esterificação, em acordo com a estrutura proposta.

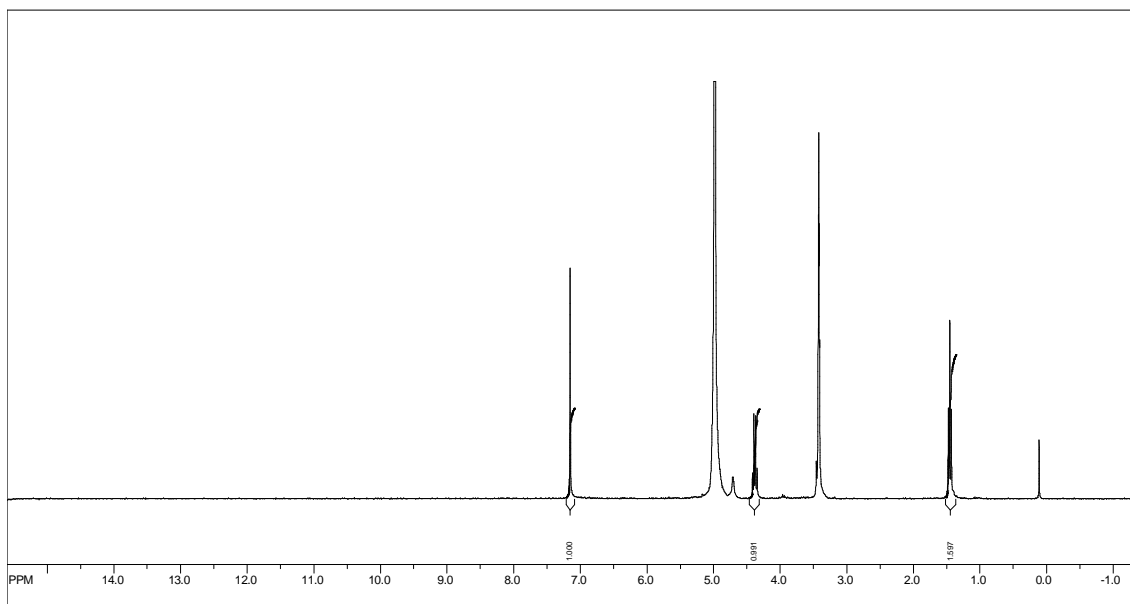


Figura 147. Espectro de RMN de ^1H da substância **ItF-11**. (CD_3OD - TMS; 300 MHz).

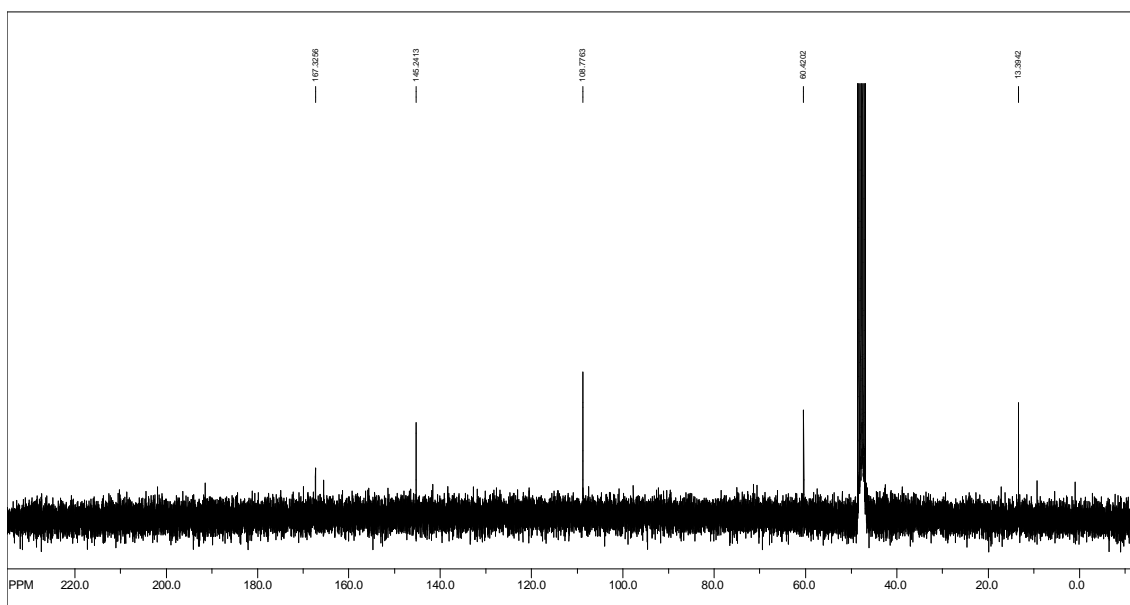


Figura 148. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **ItF-11**. (CD_3OD - TMS; 75 MHz).

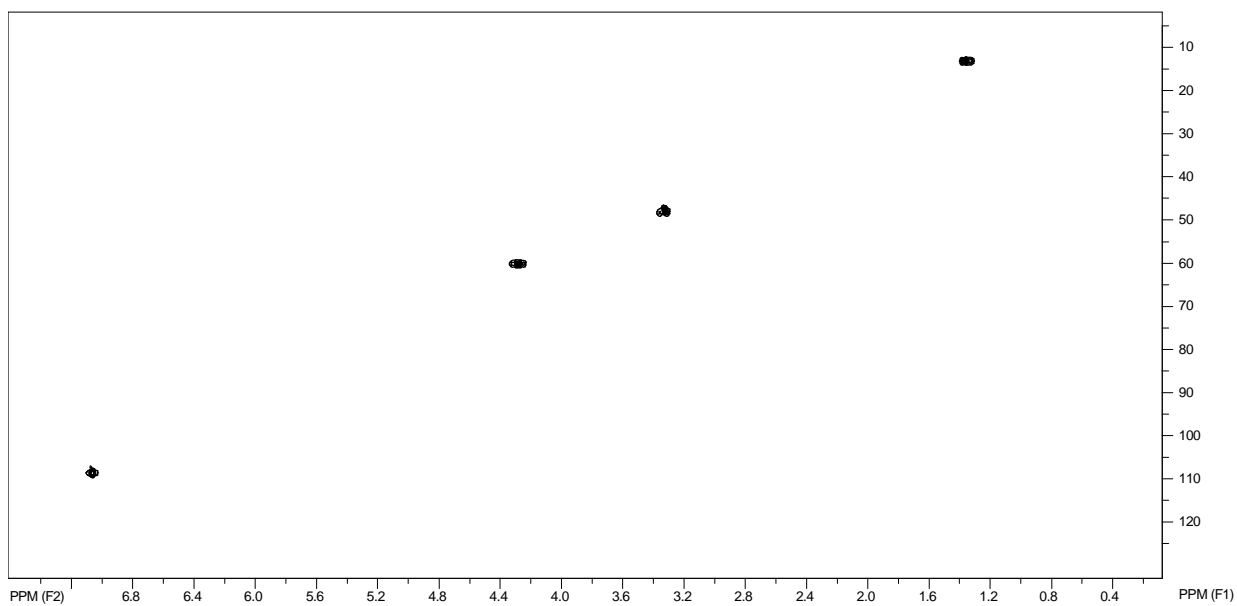


Figura 149. Mapas de contorno do HMQC da substância **ItF-11**. (CD₃OD - TMS; 300 e 75 MHz).

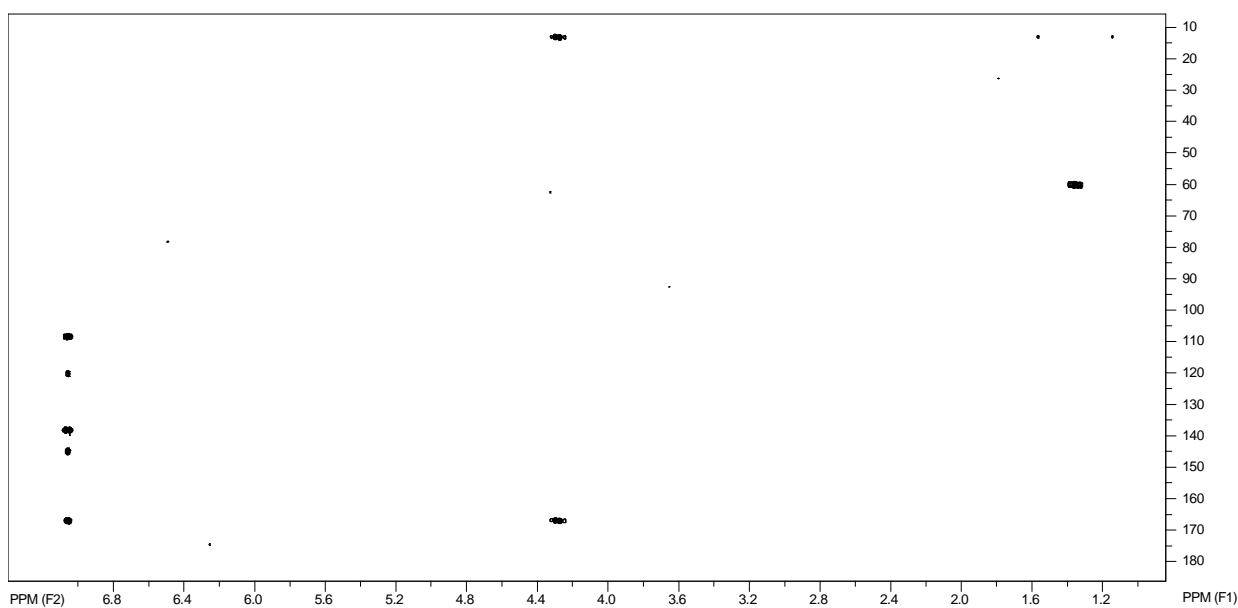


Figura 150. Mapas de contorno do HMBC da substância **ItF-11**. (CD₃OD - TMS; 300 e 75 MHz).

Substância ItR-11

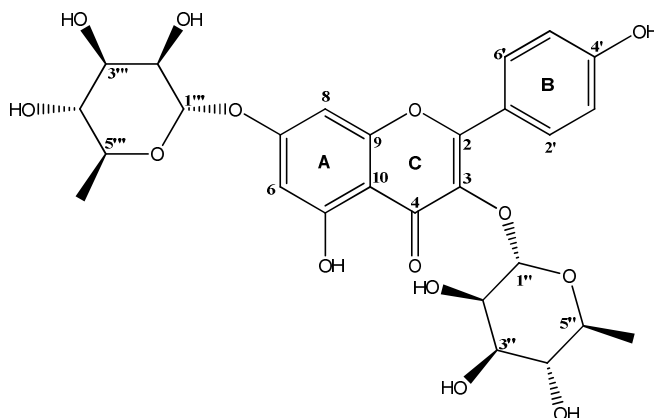
Caempferol-3,7-di-O- α -ramnosilpiranosídeo

Tabela 42. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **ItR-11**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	δ $^{13}\text{C}^*$	HMBC	Literatura**
2		158,3		158,3
3		135,0		135
4		178,1		178
5		161,2		161,5
6	6,45; d ; 2,1	99,2	C-8; C-10; C-5; C-7; C-4	100
7		162,1		162,3
8	6,71; d ; 2,1	94,1	C-6; C-10; C-9; C-7; C-4	95
9		156,3		156,6
10		106,2		106,3
1'		120,9		121
2'	7,77; d ; 8,8	130,6	C-3'; C-6'; C-2; C-4'	131,2
3'	6,93; d ; 8,8	115,2	C-5'; C-1'; C-2'; C-4'	116
4'		160,5		160,7
5'	6,93; d ; 8,8	115,2	C-3'; C-1'; C-6'; C-4'	116
6'	7,77; d ; 8,8	130,6	C-5'; C-2'; C-2; C-4'	131,2
1''	5,39; d ; 1,7	102,0	C-3	102,4
2''	4,35; dd ; 1,7; 3,4			70,9
3''	3,96; dd ; 3,4; 9,4			70,6
4''	3,46; m			72,2
5''	3,85; m			71,5
6''	0,93; d ; 5,6 (3H)	16,4		18,0
1'''	5,56; d ; 1,4	98,4	C-7	99,03
2'''	4,15; dd ; 1,4; 3,5			70,8
3'''	3,96; dd ; 9,4; 3,5			70,6
4'''	3,61; dd ; 9,4; 9,4			71,2
5'''	3,7; m			70,3
6'''	1,26; d ; 6,1 (3H)	16,7		18,5

* Deslocamentos obtidos pelos mapas de contorno do HMBC, não sendo possível determinar os deslocamentos químicos dos carbonos hidroxilados das unidades de ramosa devido ao "overlapped" de sinais na região entre δ 70-72.

** MARZOUK *et al.*, 2009.

O espectro de RMN de ^1H apresentou os sinais δ 6,45; *d*; 2,1; δ 6,71; *d*; 2,1; δ 7,77; *d*; 8,8 (2H) e δ 6,93; *d*; 8,8 (2H), além dos sinais referentes a hidrogênios oximetínicos entre δ 3,0 – 4,5, dos hidrogênios anoméricos δ 5,39; *d*; 1,7 e δ 5,56; *d*; 1,4 e das metilas δ 0,93; *d*; 5,6 (3H) e δ 1,26; *d*; 6,1 (3H) (**Tabela 42**). Tais dados espectrais são condizentes com a estrutura de um heterosídeo de um flavonoide cuja aglicona é o caempferol. As constantes de acoplamento dos hidrogênios anoméricos, aliado à presença de das duas metilas, são indicativos de que as duas unidades de açúcares são ramnosos. As posições das glicosilações foram atribuídas em 3 e 7 do esqueleto do flavonoide, devido as correlações nos mapas de contorno do HMBC, entre os hidrogênios anoméricos δ 5,39 e δ 5,56 com os carbonos δ 135,0 e 161,7, respectivamente.

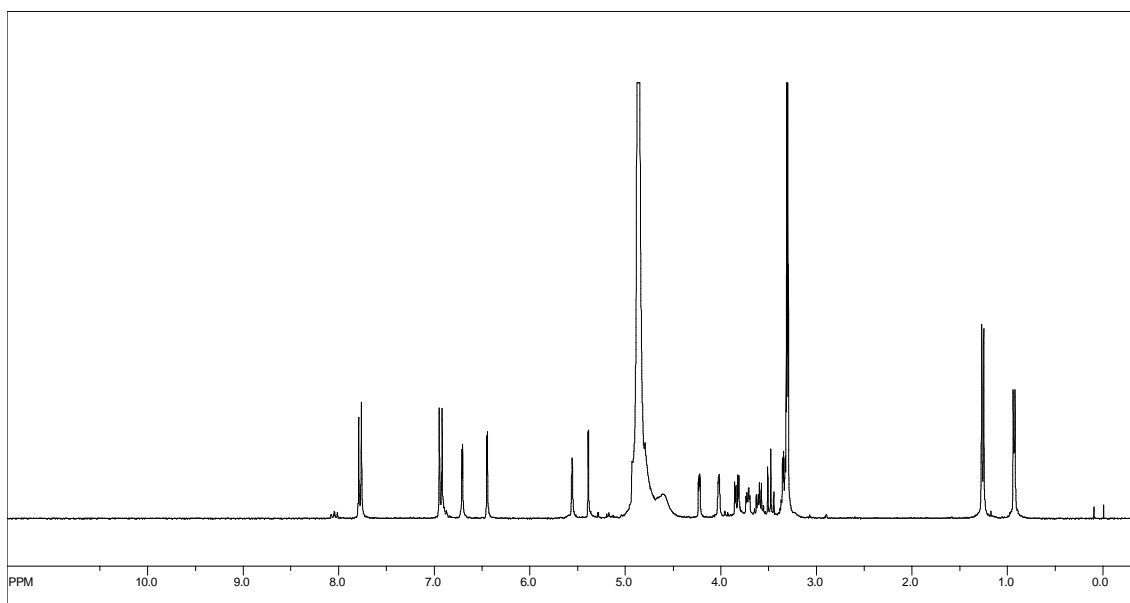


Figura 151. Espectro de RMN de ^1H da substância **ItR-11**. (CD_3OD - TMS; 300 MHz).

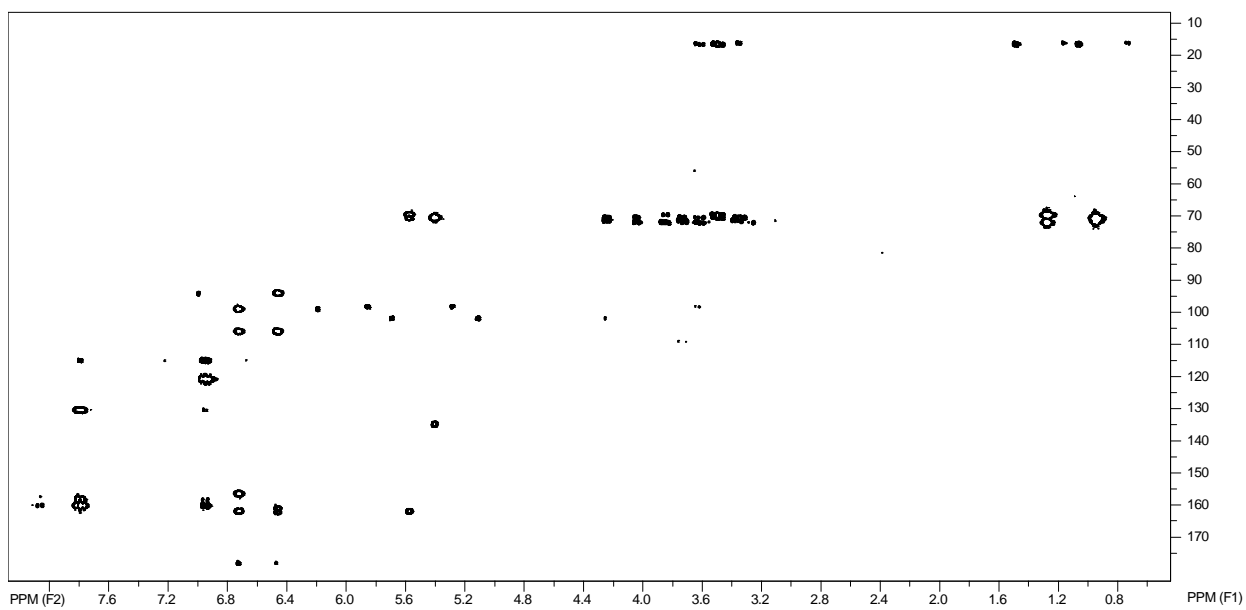
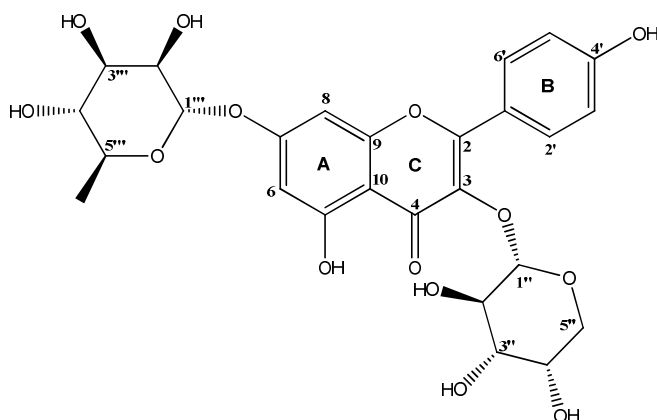


Figura 152. Mapas de contorno do HMBC da substância **ItR-11**. (CD₃OD - TMS; 300 e 75 MHz).

Substância ItR-12

Caempferol-3-O- α -arabinopiranosídeo-7-O- α -ramnopiranosídeo**Tabela 43.** Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **ItR-12**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	$\delta^{13}\text{C}^*$	HMBC	Literatura**
2		158,1		157,9
3		134,3		135,9
4		?		179,0
5		?		162,5
6	6,48; <i>d</i> ; 2,1	99,3	C-8; C-10; C-7	100,4
7		162,2		162,8
8	6,77; <i>d</i> ; 2,1	94,2	C-6; C-10; C-9; C-7	94,8
9		156,6		157,0
10		105,9		106,9
1'		121,1		121,6
2'	8,10; <i>d</i> ; 8,8	131,1	C-6'; C-2; C-4'	132,0
3'	6,90; <i>d</i> ; 8,8	115,1	C-5'; C-1'; C-4'	116,4
4'		160,4		162,2
5'	6,90; <i>d</i> ; 8,8	115,1	C-3'; C-1'; C-4'	116,4
6'	8,10; <i>d</i> ; 8,8	131,1	C-2'; C-2; C-4'	132,0
1''	5,21; <i>d</i> ; 6,2	102,7	C-3	103,8
2''	3,90; <i>dd</i> ; 6,2; 8,1	63,5		72,7
3''	3,64; <i>dd</i> ; 2,9; 8,1	72,5		73,9
4''	3,79; <i>sl</i>	67,4		68,1
5a''	3,78; <i>m</i>	65,3		66,3
5b''	3,42; <i>dl</i> ; 10,4			
1'''	5,56; <i>d</i> ; 1,6	98,4	C-7	100,0
2'''	4,01; <i>dd</i> ; 1,6; 3,6	70,3		71,6
3'''	3,83; <i>dd</i> ; 3,6; 9,5	70,6		72,4
4'''	3,47; <i>dd</i> ; 9,5; 9,5	72,2		73,6
5'''	3,58; <i>m</i>	69,9		71,5
6'''	1,25; <i>d</i> ; 6,2 (3H)	16,7		18,6

* Deslocamentos obtidos pelos mapas de contorno do HMQC e do HMBC, não sendo possível determinar os deslocamentos químicos dos carbonos das posições 4 e 5.

** YOSHIMITSU *et al*, 2007.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais bastante similares àqueles da **ItR-11**, com os sinais δ 6,48; *d*; 2,1; δ 6,77; *d*; 2,1; δ 8,10; *d*; 8,8 (2H) e δ 6,90; *d*; 8,8 (2H), referentes ao aglicona caempferol, os sinais entre δ 3,0 – 4,5 referentes a hidrogênios oximetínicos das unidades de açúcar, dois hidrogênios anoméricos δ 5,21; *d*; 6,2 e δ 5,56; *d*; 1,6 e apenas uma metila δ 1,25; *d*; 6,1 (3H) (**Tabela 43**). Como pode ser observado, as constantes de acoplamento dos hidrogênios anoméricos δ 5,21 e δ 5,56, e a presença de apenas uma metila δ 1,25, indica a presença de uma unidade de ramnose, e outra unidade de açúcar a qual não se trata de ramnose. Análise dos mapas de contorno do HMQC permitiu atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos dos açúcares, e por comparação com dados da literatura (YOSHIMITSU *et al*, 2007), foi proposto a outra unidade de açúcar tratar-se de uma arabinose. As posições das glicosilações foram atribuídas em 3 e 7 do esqueleto do flavonoide, devido as correlações, nos mapas de contorno do HMBC, entre os hidrogênios anoméricos δ 5,21 e δ 5,56 com os carbonos δ 134,3 e 162,2, respectivamente.

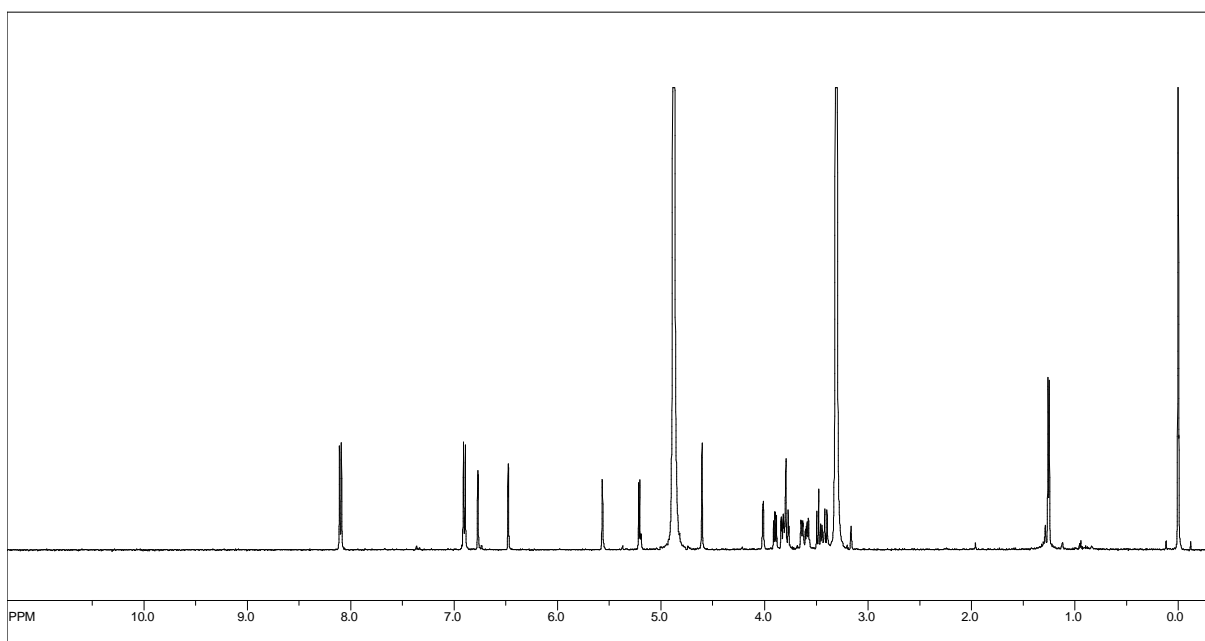


Figura 153. Espectro de RMN de ^1H da substância **ItR-12**. (CD_3OD - TMS; 500 MHz).

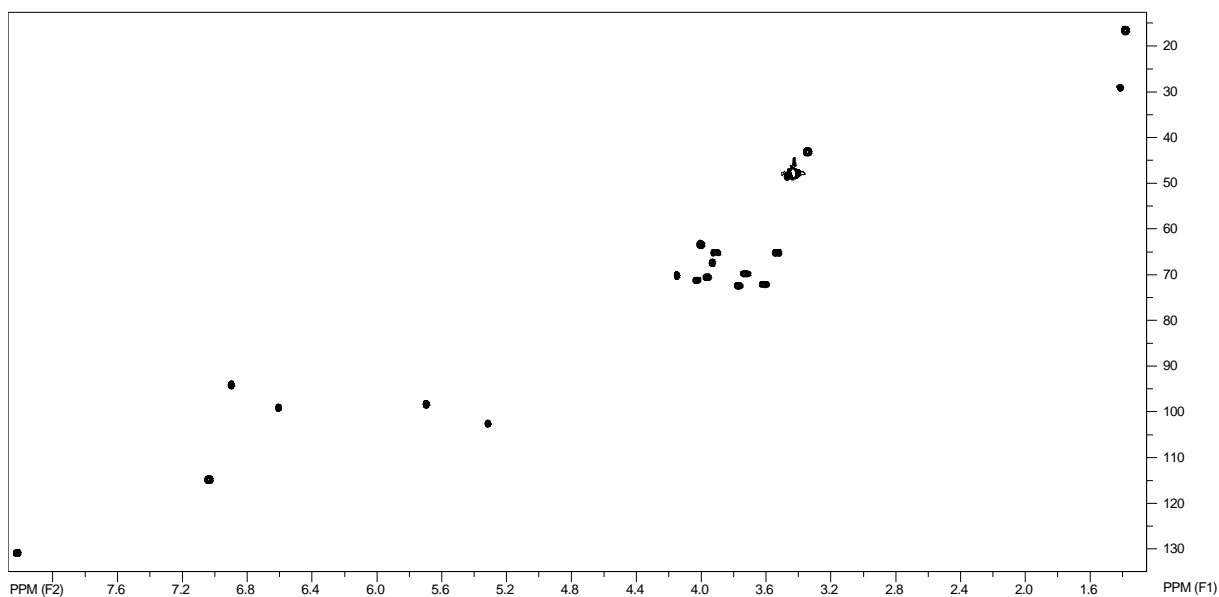


Figura 154. Mapas de contorno do HMQC da substância **ItR-12**. (CD₃OD - TMS; 500 e 125 MHz).

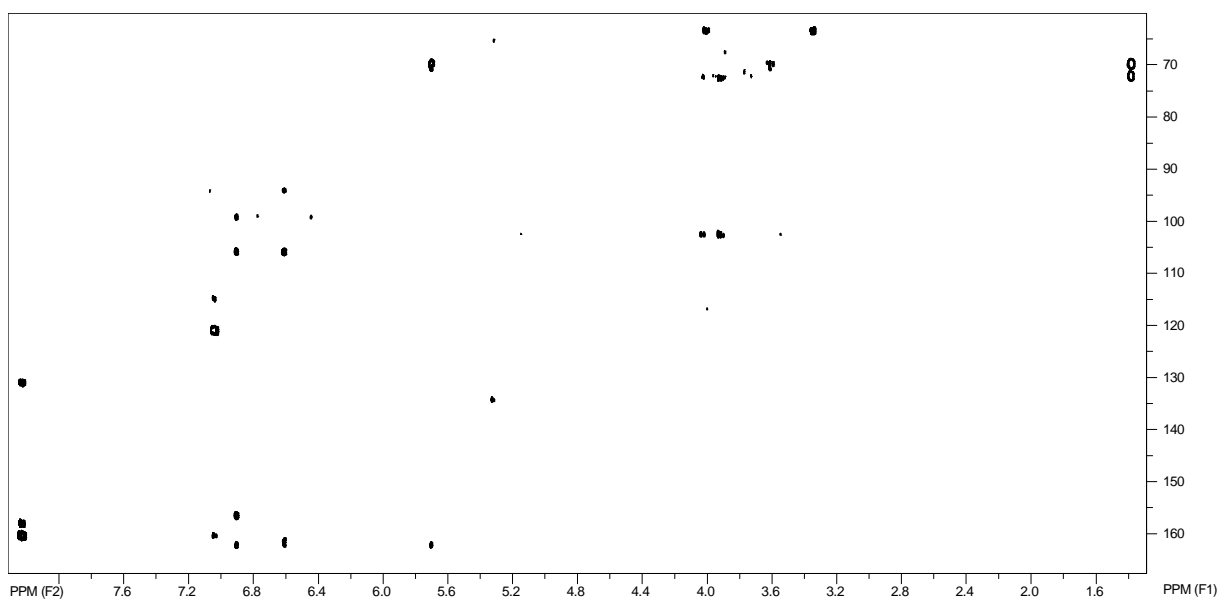


Figura 155. Mapas de contorno do HMBC da substância **ItR-12**. (CD₃OD - TMS; 500 e 125 MHz).

Substância ItC-1

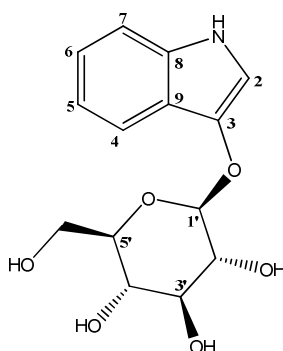
Indoxil- β -glicopiranosídeo

Tabela 44. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **ItC-1**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Literatura*
2	7,10; <i>s</i>	112,2	C-3; C-8; C-9	112,2
3		138,9		138,8
4	7,70; <i>ddd</i> ; 0,8; 1,0; 7,9	118,6	C-3; C-6; C-8	118,5
5	6,99; <i>ddd</i> ; ; 7,9; 7,0; 1,0	119,5	C-7; C-9	119,5
6	7,09; <i>ddd</i> ; 8,0; 7,0; 1,0	122,8	C-7; C-5; C-8	122,8
7	7,29; <i>ddd</i> ; 0,8; 1,0; 8,0	112,3	C-5	112,3
8		135,2		135,1
9		121,3		121,2
1'	4,75; <i>d</i> ; 7,6	105,7	C-3	105,6
2'	3,53; <i>m</i>	75,0	C-1'; C-3'	75,0
3'	3,38; <i>m</i>	78,1	C-2'; C-4'	77,9
4'	3,43; <i>m</i>	71,5		71,4
5'	3,48; <i>m</i>	78,0		77,9
6'	3,74; <i>dd</i> ; 12,0; 5,6	62,6	C-5'	62,5
	3,93; <i>dd</i> ; 2,3; 12,0		C-4'	

*XIA, ZENK, 1992.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região de aromáticos (δ 7,70; 6,99; 7,10; 7,09 e 7,29) e na região de açúcares, sendo o sinal δ 4,75, *d*, 7,6 Hz referente ao hidrogênio anomérico, e os sinais entre δ 3,38 – 3,93 referentes aos demais hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos do açúcar. Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C corroboram com estes dados, sendo os carbonos δ 105,7; 78,01; 78,0; 75,0; 71,5 e 62,6 condizentes com uma unidade de glicose (XIA, ZENK, 1992). As multiplicidades e as

constantes de acoplamento dos sinais dos hidrogênios aromáticos δ 7,70; 6,99; 7,09 e 7,29 indicam a presença de anel dissustituído, sendo que as duas substituições estão em carbonos adjacentes. No espectro de RMN de ^1H ainda há a presença de outro hidrogênio aromático δ 7,10, sendo este um singlete, podendo tratar-se de um hidrogênio metínico próximo a carbonos sem hidrogênios ou a heteroátomos (**Tabela 44**).

O espectro de massas (ESI - modo positivo) apresentou os íons m/z 318,09696 e m/z 613,20398, que representam $[\text{M} + \text{Na}]^+$, e $[2\text{M} + \text{Na}]^+$, indicando a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ (**Figura 159**).

A partir destas informações, as quais foram aliadas a uma análise detalhada dos espectros bidimensionais (HMQC e HMBC), foi possível identificar a substância **ItC-1** como o indoxil- β -glicopiranosídeo.

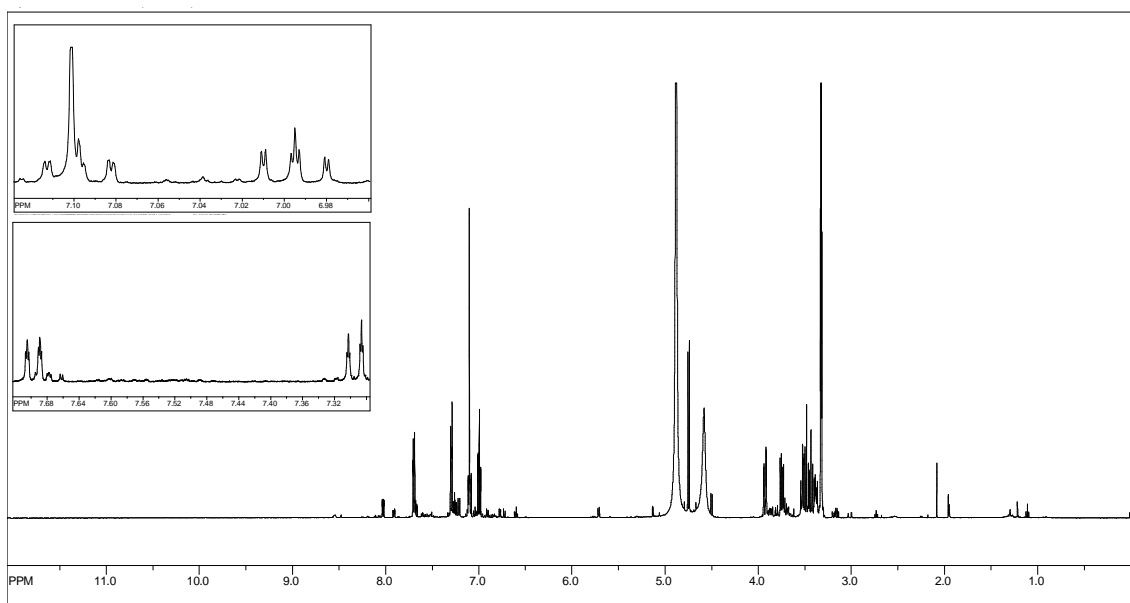


Figura 156. Espectro de RMN de ^1H da substância **ItC-1**. (CD_3OD - TMS; 500 MHz).

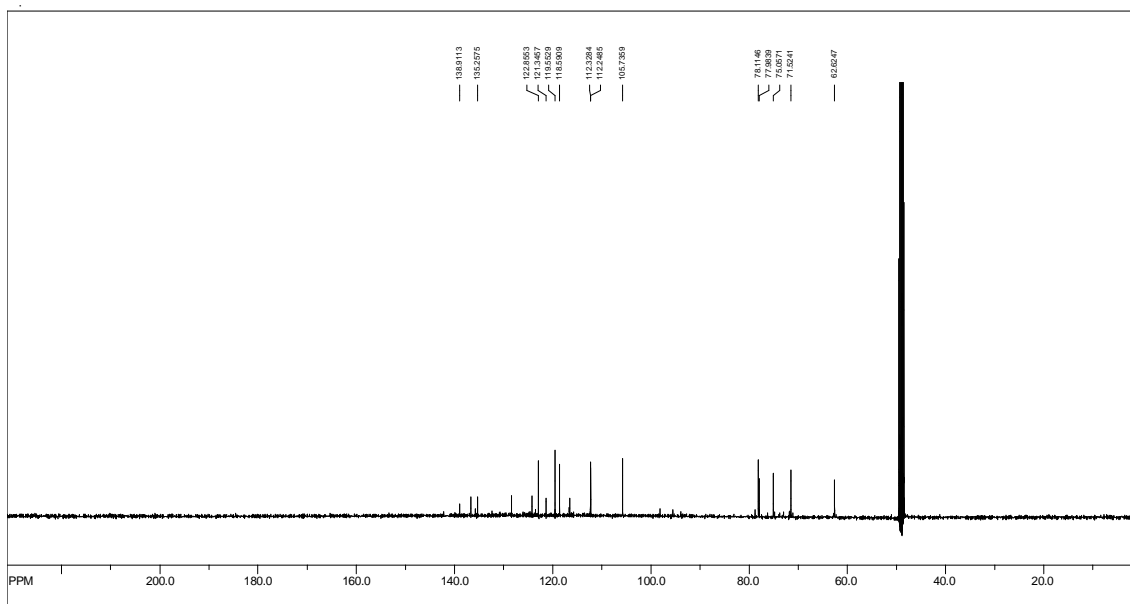


Figura 157. Espectro de RMN de ^{13}C da substância **ItC-1**. (CD_3OD - TMS; 125 MHz).

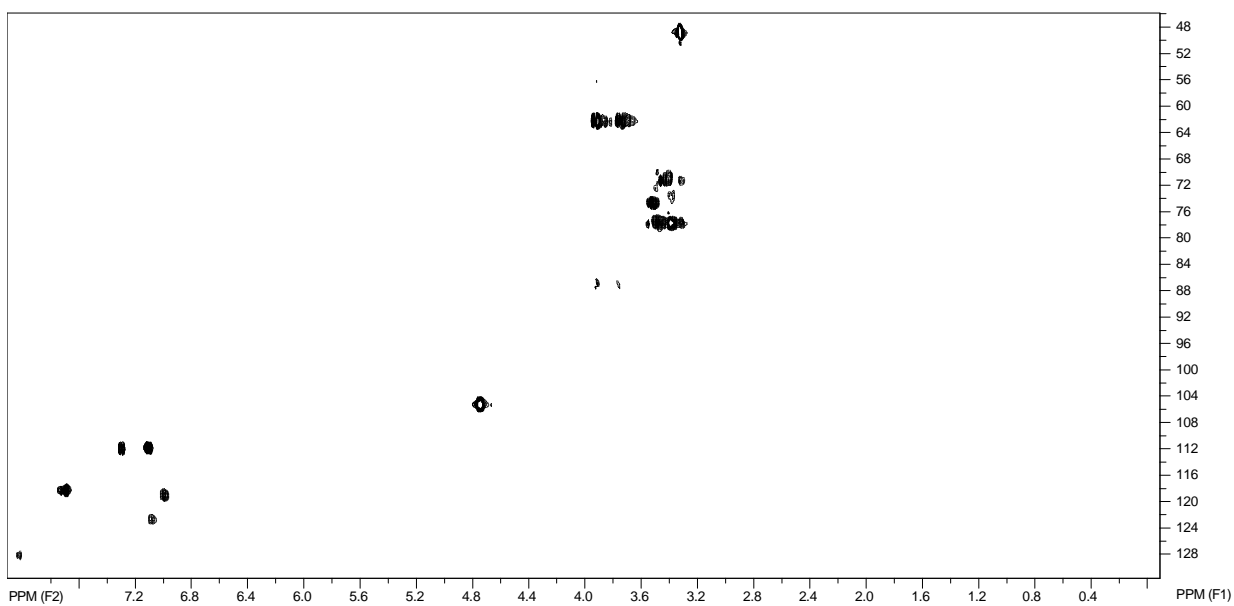


Figura 158. Mapas de contorno do HMQC da substância **ItC-1**. (CD_3OD - TMS; 500 e 125 MHz).

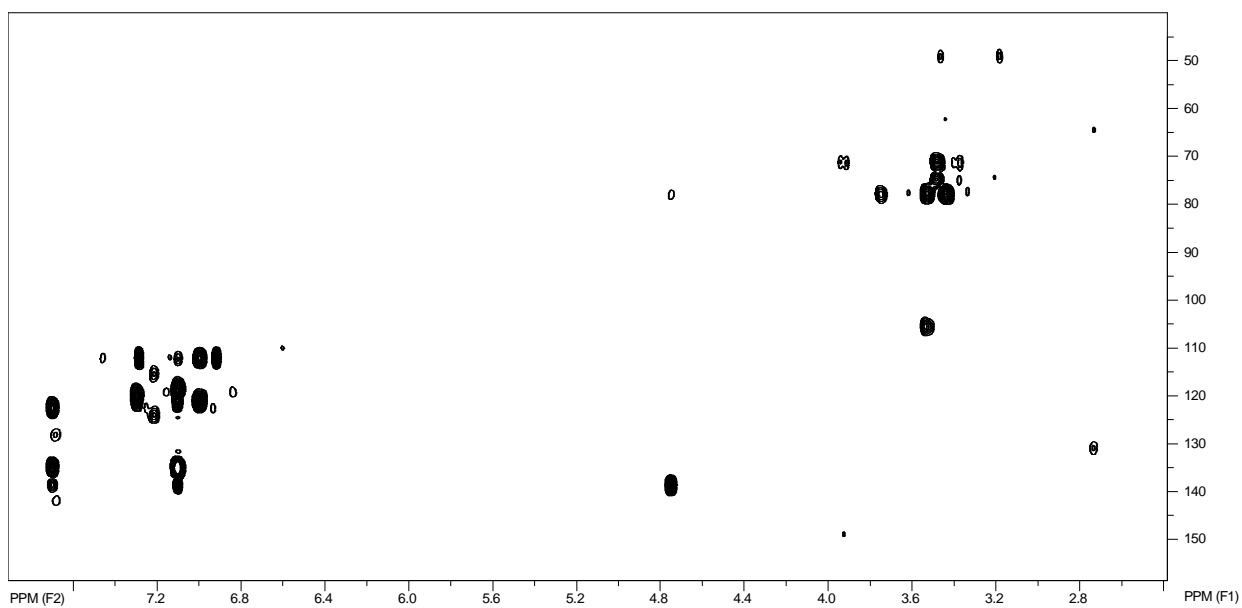


Figura 159. Mapas de contorno do HMBC da substância **ItC-1**. (CD_3OD - TMS; 500 e 125 MHz).

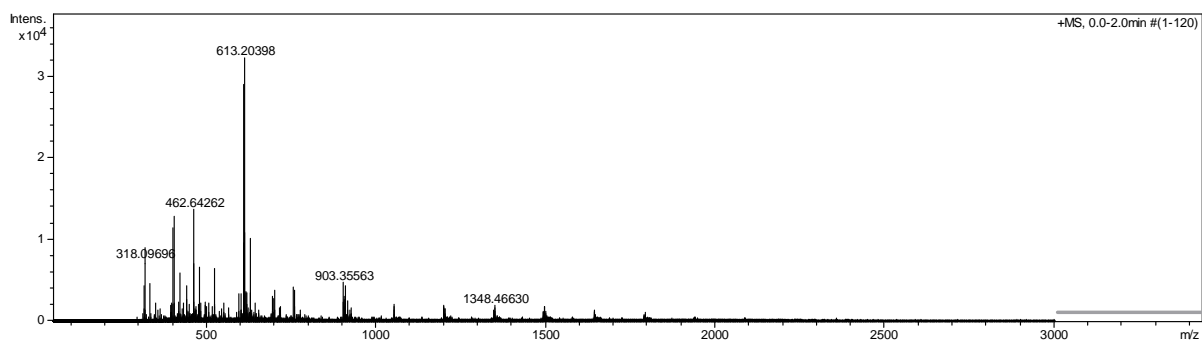


Figura 160. Espectro de Massas – Ionização por “Electrospray” – Modo positivo, da substância **ItC-1**.

4.5.8. Considerações sobre o estudo químico de *Indigofera truxillensis*

Vários são os relatos na literatura a respeito da toxicidade de várias espécies de *Indigofera*, conforme mencionado no item 1.3, página 12, sendo esta toxicidade atribuída à presença de indospicina e derivados do ácido 3-nitropropiónico. Neste estudo, não foram encontrados estes metabólitos na espécie investigada, porém resultados negativos não indicam ausência destas substâncias, as quais podem estar presentes em concentrações menores do que as detectadas pela metodologia empregada.

Deve ser destacado o isolamento de indicana (indoxil- β -glicopiranosídeo), do caule de *I. truxillensis*. Hou e colaboradores, 2008, investigaram a absorção e biotransformação deste metabólito em ratos, comprovando sua absorção intestinal, como glicosídeo, e posterior biotransformação no fígado a indoxil (3-hidroindol) sulfato, a qual é uma toxina urêmica. De acordo com os sintomas apresentados pelos animais que ingeriram plantas desta espécie, os quais são: presença de líquido vermelho-escuro na bexiga, alteração dos rins, com presença de proteínas, taquicardia, fígado aumentado de volume, edemas pulmonares; a presença de indicana nesta espécie parece ter um importante papel em sua toxicidade.

Quanto às demais substâncias isoladas neste estudo:

- ✓ Ácido 3,4,5-triidroxibenzoico já foi identificado no gênero (BAKASSO *et al*, 2008), porém seus derivados ácido 3,5-diidroxibenzóico e 3,4,5-triidroxibenzoato de etila ainda não haviam sido isolados.
- ✓ Caempferol-3,7-di-*O*- α -ramnopiranosídeo foi isolado de *Indigofera arrecta* (DADSON, OPOKU, 1992) e das partes aéreas de *I. truxillensis* (CALVO, 2007).
- ✓ Caempferol-3-*O*- α -arabinopiranosídeo, 7-*O*- α -ramnopiranosídeo foi isolado de *Indigofera hebepetala* (HASAN *et al*, 1996) e das partes aéreas de *I. truxillensis* (CALVO, 2007).

4.6. GÊNERO *Senna*

Em uma análise comparativa entre os cromatogramas das espécies de *Senna* envolvidas neste estudo, foi observada maior diversidade estrutural nos extratos etanólicos de *S. splendida* e *S. pendula*, tendo em vista que o extrato etanólico de *S. aculeata* apresentou apenas um pico majoritário na análise por CLAE-UV-DAD. A partir desta análise, optou-se pelos estudos químicos de *S. splendida* e *S. pendula*.

4.6.1. Estudo químico de *Senna splendida*

4.6.1.1. Fração hexânica

A fração hexânica proveniente do extrato etanólico das partes aéreas de *S. splendida* foi analisada por CG-EM (Condições de análise CG 1, página 26). As substâncias identificadas, e a comparação da similaridade dos espectros de massas com os das bibliotecas e bancos de padrões disponíveis no laboratório, além dos cálculos dos índices de retenção de Kovats, bem como comparação destes com aqueles obtidos na literatura estão apresentados na **Tabela 45** e **Figura 161**.

Tabela 45. Substâncias identificadas na fração hexânica de *S. splendida*.

	Substância	Similaridade	IK (exp.)	IK (lit.)	Literatura
SS-1	Ácido tetradecanoico	91	1756	1761	Maia <i>et al</i> , 2000
SS -2	Neofitadieno	96	1835	1838	Rădulescu <i>et al</i> , 2010
SS -3	Hexadecanoato de metila	93	1923	1927	Adams, 1995
SS -4	Ácido hexadecanoico	93	1963	1963	Nogueira <i>et al</i> , 2001
SS -5	Hexadecanoato de etila	95	1992	1993	Oliveira <i>et al</i> , 2009
SS -6	Fitol	97	2105	2106	Miyazawa <i>et al</i> , 2005
SS -7	Ácido 9,12-octadecadienoico	92	2129	2123	Miyazawa <i>et al</i> , 2004
SS -8	γ -tocoferol	92	3029		
SS -9	α -tocoferol	94	3110		
SS -10	Estigmasterol	93			
SS -11	β -sitosterol	90			
SS -12	Lupeol	96			

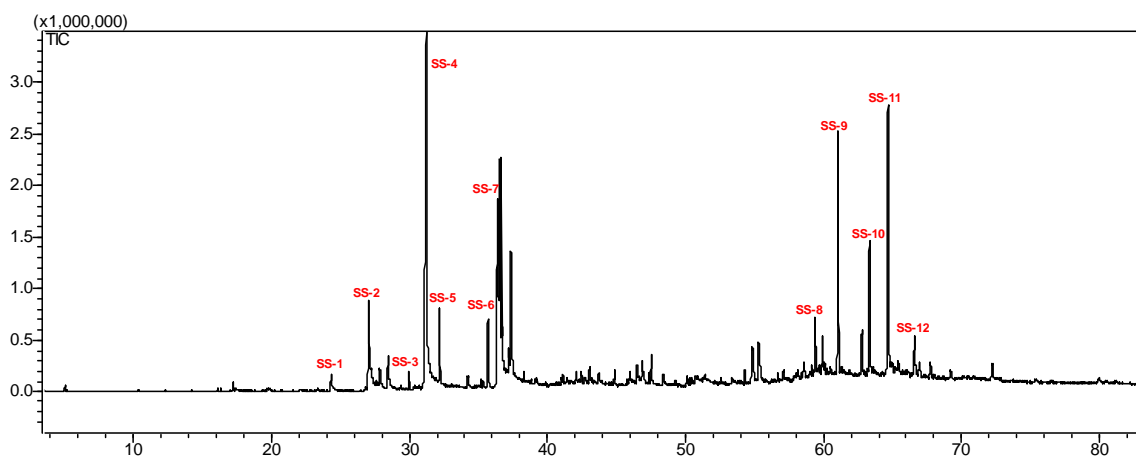


Figura 161. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de *S. splendida* – (Condições de análise CG 1, página 26).

4.6.1.2. Fração DCM

A fração DCM (1 g) foi fracionada em Sephadex LH-20, eluída com metanol, sendo obtidas 63 frações, as quais foram reunidas baseadas nos perfis obtidos em CCDC (**Tabela 46**).

As frações 42-44; 45-47 e 50-53, foram enviadas para RMN de ^1H , sendo possível identificar as substâncias **SS-13**, **SS-14** e **SS-15**, em cada fração, respectivamente. A fração 45-47 apresentou uma mistura das substâncias **SS-13** e **SS-14**.

Tabela 46. Frações obtidas de CC da fração em DCM de *S. splendida*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-7	122,2	35-38	10,5
8-11	342,7	39-41	7,5
12-16	348,0	42-44	6,6
17-20	171,2	45-47	5,5
21-23	104,9	48-49	4,1
24-26	34,8	50-53	6,2
27-29	51,4	54-61	6,2
30-34	25,9	62-63	13,6

4.6.1.3. Fração HA-MeOH

Parte da fração SS HA-MeOH (700 mg) foi submetida a separação em Sephadex LH-20, eluída com metanol. Foram obtidas 30 frações, sendo estas, então, reunidas em 9 frações, baseadas no perfil químico apresentado nas placas cromatográficas (CCDC – FM: AcOEt:MeOH:ácido acético:ácido fórmico 100:27:11:11), conforme apresentado na **Tabela 47**.

Tabela 47. Frações obtidas de CC da fração em HA-MeOH de *S. splendida*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-6	83,8	17-19	76,1
7-8	79,3	20-21	17,1
9-10	93,5	22-28	29,5
11-12	94,4	29-30	
13-16	133,0		

A fração 13-16 foi submetida a separação em CLAE-UV-DAD (**Figura 162**), sendo isolado e identificado o flavonol **SS-16**.

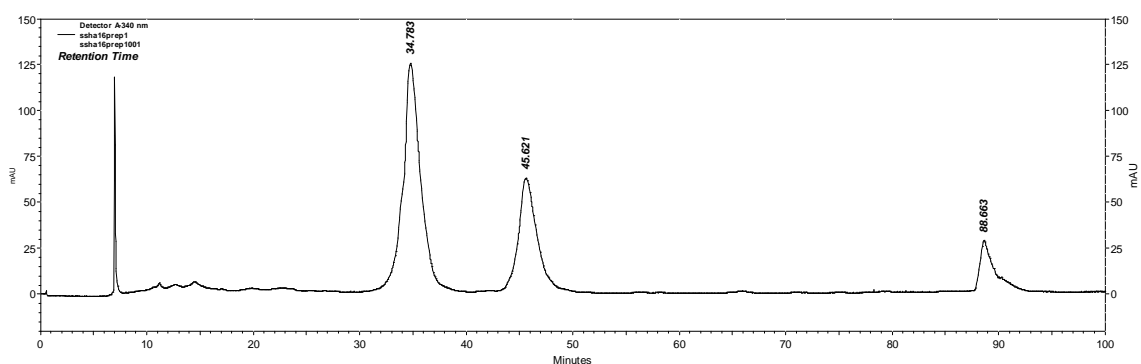
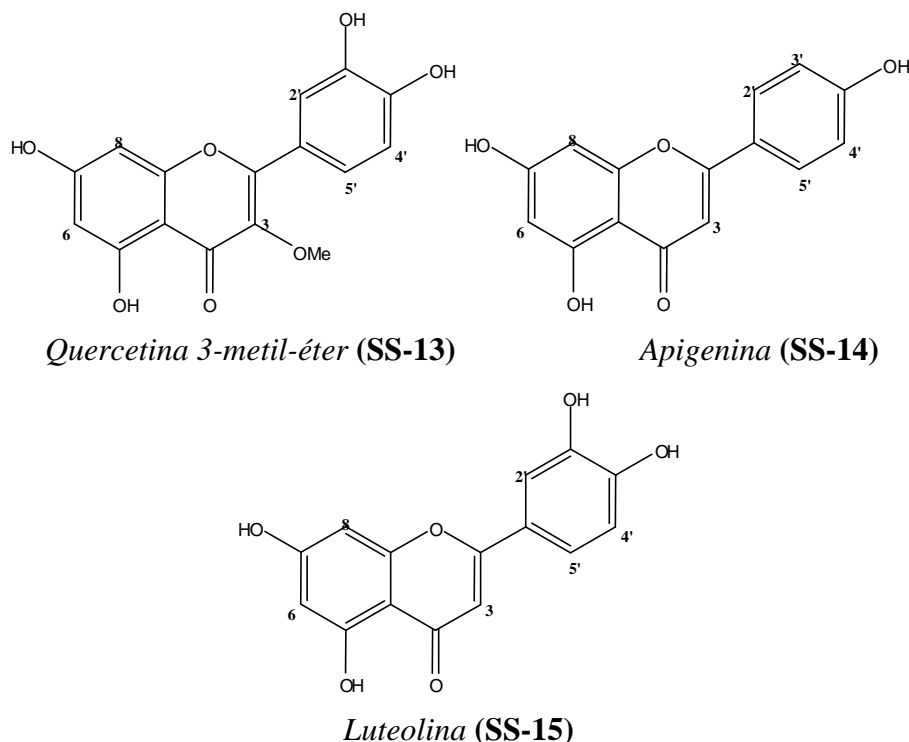


Figura 162. Cromatograma obtido em CLAE-UV (315 nm) da fração SS HA-MeOH 13-16, obtido utilizando Condições de análise CLAE 9, página 29. O pico com $t_R = 34,7$ min. refere-se à substância **SS-16**.

4.6.1.4. Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *S. splendida*.

Substâncias SS-13, SS-14 e SS-15



Os espectros de RMN de ^1H apresentaram sinais tipicamente encontrados em flavonoides. Na elucidação estrutural, 4 aspectos foram considerados, descritos a seguir.

1) Quanto ao padrão de substituição do anel A

Foi observada a presença dos sinais δ 6,1; *d*; 2 Hz e δ 6,4; *d*; 2 Hz, atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, quando H-7 e H-5 estão hidroxilados. Todos os três espectros apresentaram estes sinais.

2) Quanto ao padrão de substituição do anel B

Observou-se a presença dos sinais com valores próximos a δ 7,4; *d*; 2 Hz; δ 6,9; *d*; 8 Hz; δ 7,4; *dd*; 2 e 8 Hz, referentes aos hidrogênios 2'; 5' e 6', respectivamente, quando H-3' e H-4' encontram-se hidroxilados. Os espectros referentes às substâncias **SS-13** e **SS-15** apresentaram estes sinais. Observou-se também a presença dos sinais δ 7,9; *d*, 9 Hz (2H) e δ 6,9; *d*; 9 Hz (2H), referentes aos hidrogênios H-2'; H-6' e H-3'; H-4', respectivamente,

quando apenas a posição 3' encontra-se hidroxilada. O espectro referente à substância **SS-14** apresentou estes sinais.

3) Quanto à presença de H-3

Foi observada a presença do sinal em δ 6,7; *s*, referente ao hidrogênio da posição H-3. A presença deste sinal indica tratar-se de uma flavona, enquanto a ausência deste, a tratar-se de um flavonol. Os espectros referentes às substâncias **SS-14** e **SS-15** apresentaram este sinal.

4) Quanto à metoxilação

A presença de sinal em δ 3,7; *s* (3H); indica metoxilação. O espectro referente à substância **SS-13** apresentou este sinal. A posição desta metoxilação foi atribuída por comparação aos deslocamentos químicos dos demais hidrogênios com valores da literatura.

Os dados espectrais, assim como a comparação destes com a literatura estão apresentados na **Tabela 48**.

Tabela 48. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 300 MHz) das substâncias **SS-13**, **SS-14** e **SS-15**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Substância SS-13	Quercetina 3- metil éter *	Substância SS-14	Apigenina **	Substância SS-15	Luteolina ***
3	-		6,76; <i>s</i>	6,68; <i>s</i>	6,65; <i>s</i>	6,69; <i>s</i> ;
6	6,16; <i>d</i> ; 1,9	6,09; <i>d</i> ; 1,8	6,17; <i>d</i> ; 2,0	6,20; <i>d</i> ; 2,0	6,17; <i>d</i> ; 2,0	6,22; <i>d</i> ; 2,1
8	6,39; <i>d</i> ; 1,9	6,29; <i>d</i> ; 1,8	6,47; <i>d</i> ; 2,0	6,44; <i>d</i> ; 2,0	6,43; <i>d</i> ; 2,0	6,47; <i>d</i> ; 2,1
2'	7,52; <i>d</i> ; 2,1	7,52; <i>d</i> ; 2,0	7,91; <i>d</i> ; 8,9	7,92; <i>d</i> ; 9,0	7,38; <i>sl</i>	7,43; <i>d</i> ; 2,1
3'	-	-	6,91; <i>d</i> ; 8,9	6,90; <i>d</i> ; 9,0	-	-
5'	6,88; <i>d</i> ; 8,4	6,79; <i>d</i> ; 8,5	6,91; <i>d</i> ; 8,9	6,90; <i>d</i> ; 9,0	6,87; <i>d</i> ; 8,2	6,92; <i>d</i> ; 9,0
6'	7,43; <i>dd</i> ; 2,1; 8,4	7,43; <i>dd</i> ; 8,5; 2,0	7,91; <i>d</i> ; 8,9	7,92; <i>d</i> ; 9,0	7,39; <i>dd</i> ; 1,9; 8,2	7,44; <i>dd</i> ; 2,1; 9,0
OMe	3,75; <i>s</i> (3H)	3,68; <i>s</i>	-	-	-	-

* LEE, *et al*, 2003.

** MIYAZAWA & HISAMA, 2003.

*** HARBORNE, 1994.

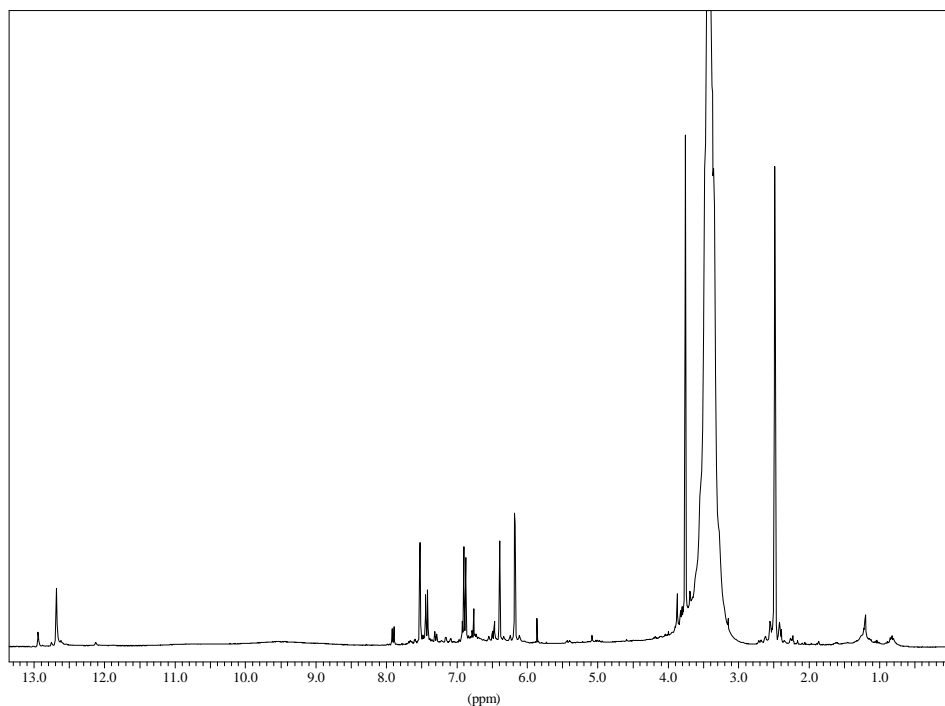


Figura 163. Espectro de RMN de ^1H da substância **SS-13** (DMSO- d_6 -TMS, 300 MHz).

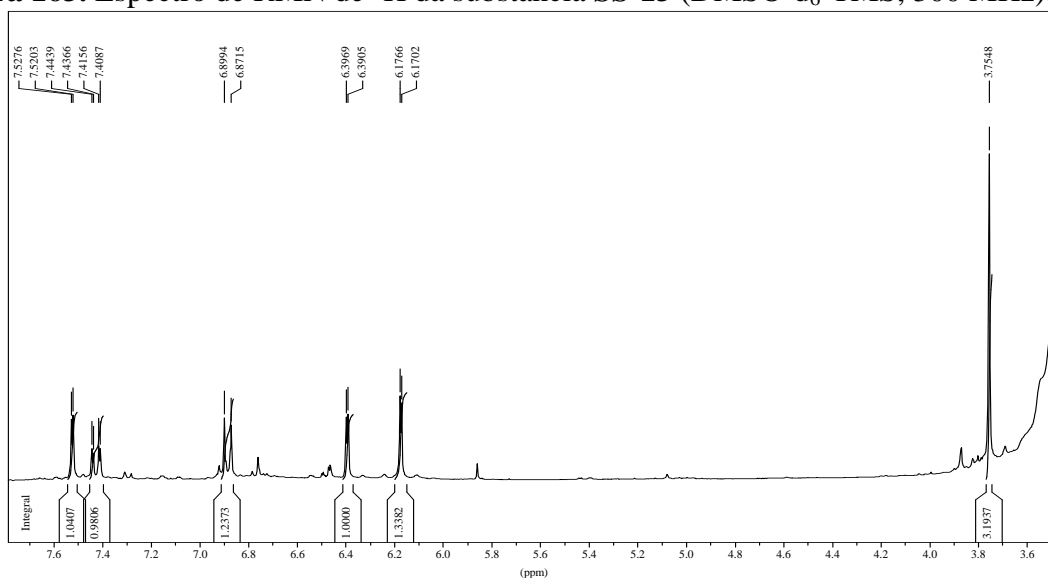


Figura 164. Expansão do Espectro de RMN de ^1H da substância **SS-13** (DMSO- d_6 -TMS, 300 MHz).

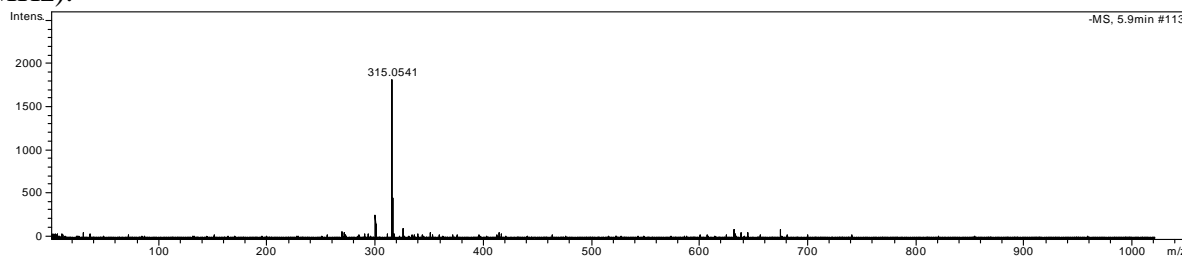


Figura 165. Espectro de Massas da substância **SS-13** – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo.

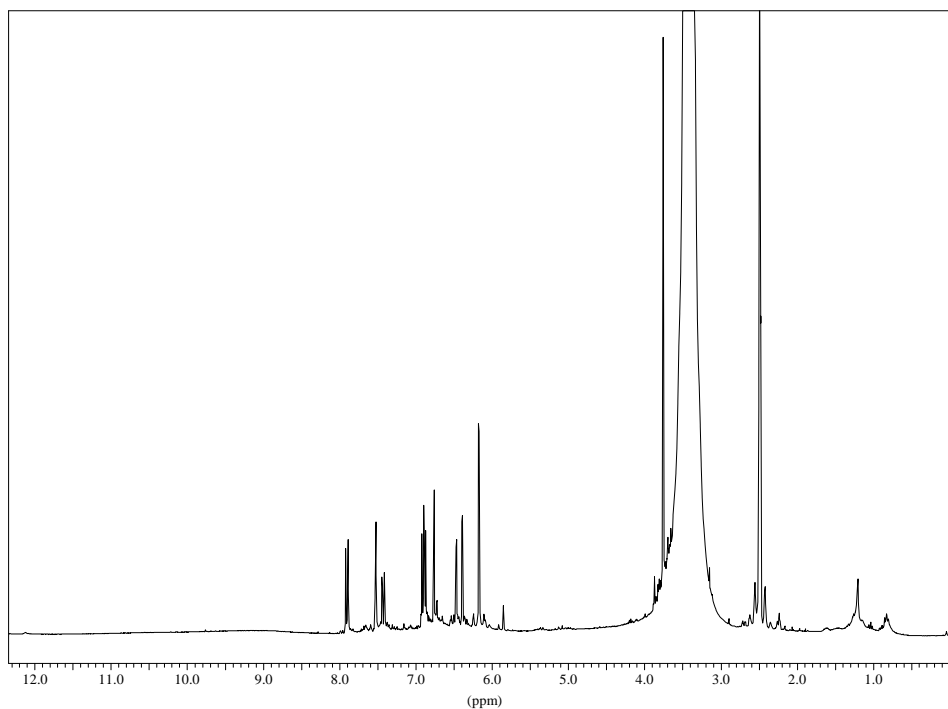


Figura 166. Espectro de RMN de ^1H da substância **SS-14** (DMSO- d_6 -TMS, 300 MHz).

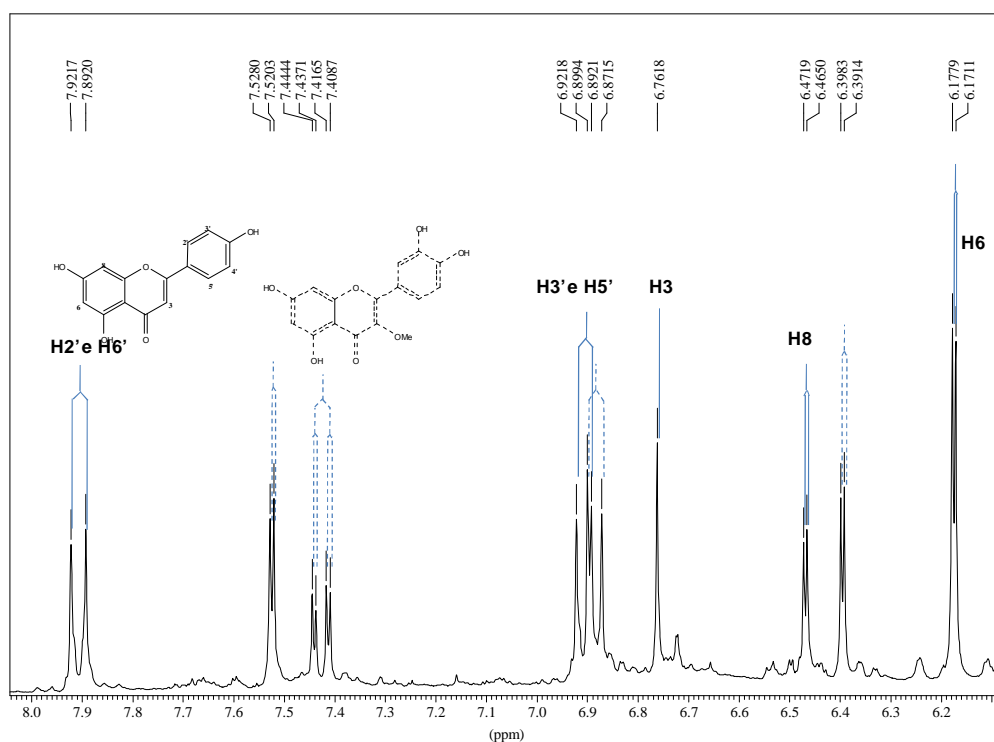


Figura 167. Expansão do Espectro de RMN de ^1H da substância **SS-14** (DMSO- d_6 -TMS, 300 MHz).

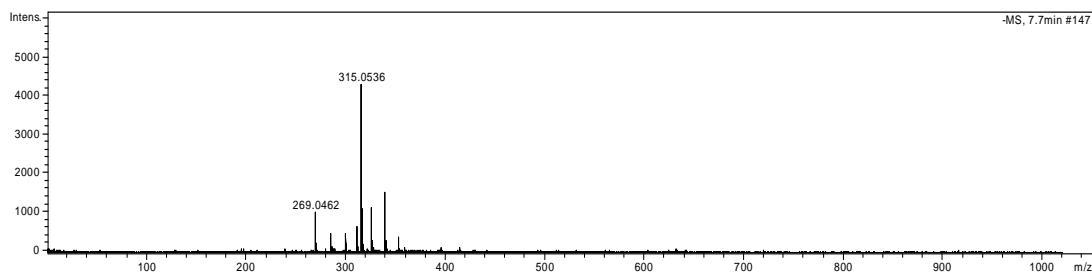


Figura 168. Espectro de Massas da substância **SS-14** – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo.

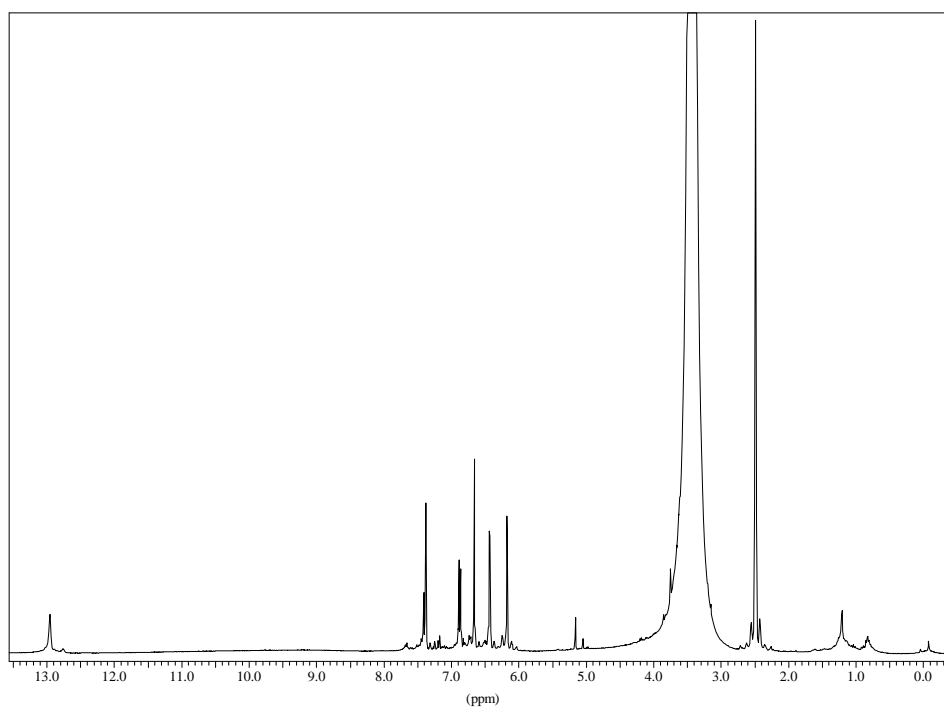


Figura 169. Espectro de RMN de ¹H da substância **SS-15** (DMSO-d₆-TMS, 300 MHz).

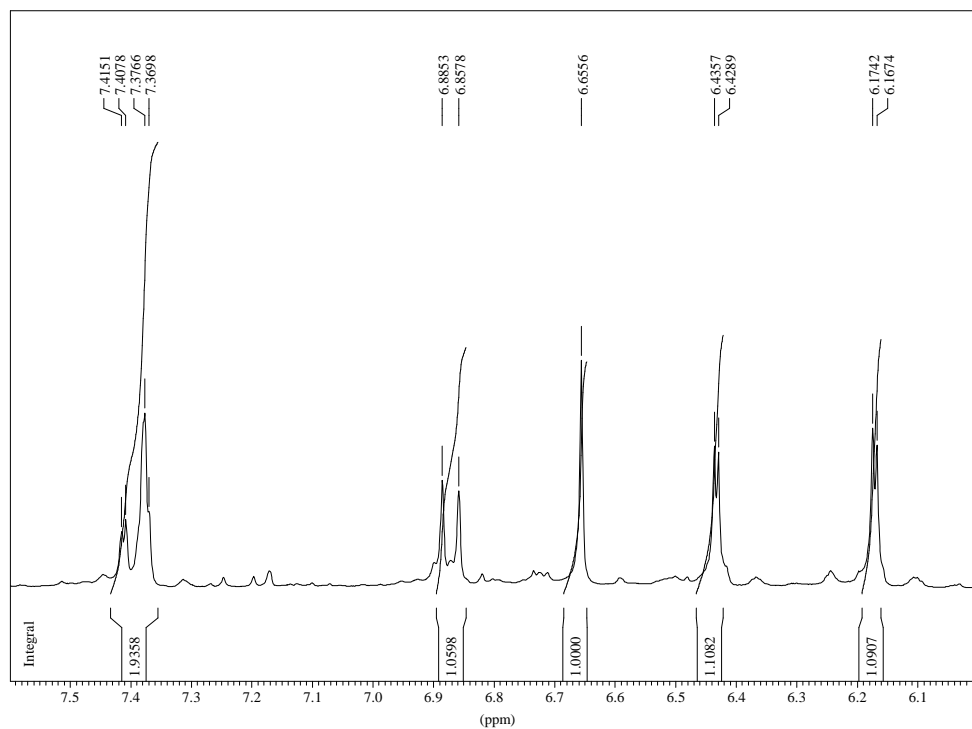


Figura 170. Expansão do Espectro de RMN de ^1H da substância SS-15 (DMSO- d_6 -TMS, 300 MHz).

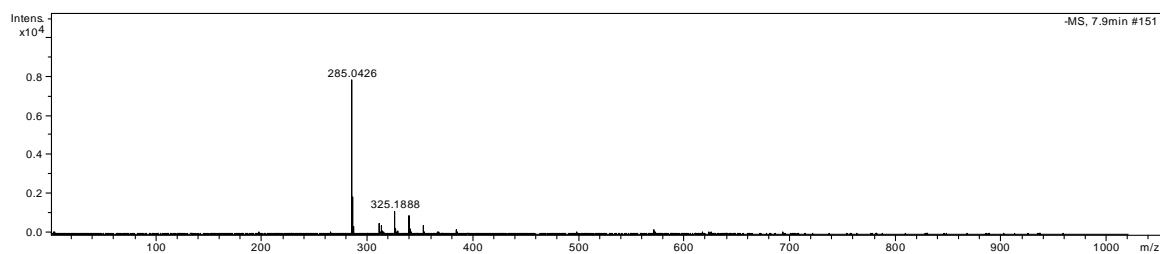
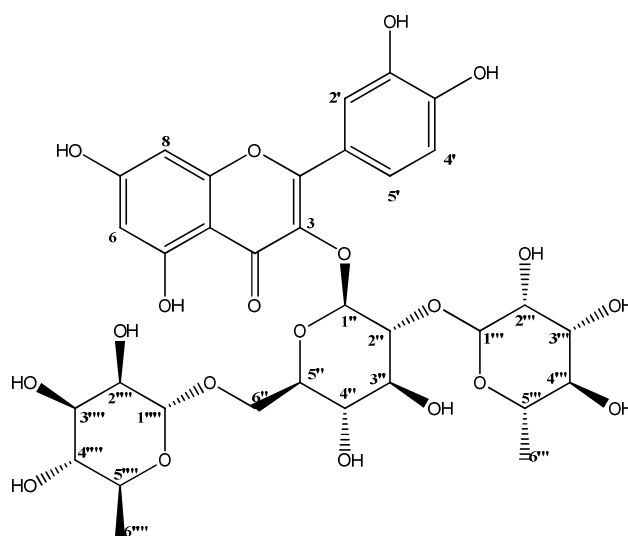


Figura 171. Espectro de Massas da substância SS-15 – Ionização por “Electrospray” – Modo Negativo.

Substância SS-16



Quercetina 3-O-(2'',6''-di-O- α -ramnosil)- β -glicosídeo

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região de aromáticos, além de sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos oximetínicos, característicos de açúcares. Os sinais δ_{H} 5,48; *d*; 7,7; δ_{H} 5,00; *s* e δ_{H} 4,31; *s*; apresentaram-se com deslocamentos químicos referentes a hidrogênios anoméricos, e portanto, indicam a presença de três unidades de açúcar. Já os sinais em δ_{H} 0,91; *d*; 6,1 Hz, 3H, δ_{H} 0,75; *d*; 6,2 Hz, 3H, é um indicativo de duas unidades de ramnose. A outra unidade de açúcar foi determinada ser glicose, devido a comparações de seus dados de RMN de ^{13}C com a literatura (KAZUMA *et al*, 2003).

Os deslocamentos químicos dos demais sinais no espectro de RMN de ^1H (δ_{H} 6,21; *s*; δ 6,40; *s*; δ_{H} 7,68; *s*; δ 6,88; *d*; 8,4 Hz; δ_{H} 7,63; *d*; 8,4 Hz), foram suficientes para concluir tratar-se de um flavonol com padrão de substituição da aglicona quercetina. A posição da *O*-glicosilação foi atribuída estar em C-3, baseado nos deslocamentos químicos dos carbonos-13 da aglicona, e comparação destes com a literatura (KAZUMA *et al*, 2003). Quanto às demais unidades de açúcar, uma das ramnososes foi atribuída estar ligada na posição 2'' da glicose, devido a observação da correlação nos mapas de contorno do HMBC entre o hidrogênio anomérico da ramnose ($\delta_{\text{H-1''}}$ 5,00; *s*) e o carbono C2'' da glicose ($\delta_{\text{C}} 78,2$). A outra unidade de ramnose foi atribuída estar ligada na posição 6'' da glicose, devido à desblindagem de aproximadamente 6 ppm apresentada por este carbono ($\delta_{\text{C-6''}}$ 68,0).

A partir destas análises, e comparação detalhada dos demais dados espectrais com a literatura (**Tabela 49**), foi possível propor a identidade estrutural da substância **SS-16**.

Tabela 49. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 -TMS, 500 e 125 MHz) e de espectros bidimensionais (HMQC e HMBC) da substância **SS-16**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC	Literatura*
2		157,6		158,94
3				134,45
4				179,29
5		161,8		163,15
6	6,17; <i>d</i> ; 1,7	99,5	C8; C10; C5; C7	99,74
7		164,7		165,58
8	6,37; <i>d</i> ; 1,7	94,5	C6; C10; C9; C7	94,69
9		157,1		158,44
10		104,8		105,93
1'		122,1		123,45
2'	7,45; <i>d</i> ; 1,9	116,9	C4'; C3'; C2	117,43
3'		145,5		145,91
4'		148,8		149,54
5'	6,82; <i>d</i> ; 8,4	115,9	C3'; C4'	116,06
6'	7,50; <i>dd</i> ; 8,6 e 1,9	122,6	C5'; C4'; C2	123,55
1''	5,48; <i>d</i> ; 7,7	99,4		100,55
2''	3,42; <i>m</i>	78,2		80,06
3''	3,36; <i>m</i>	77,7		78,93
4''	3,04; <i>m</i>	71,0		71,89
5''	3,23; <i>m</i>	76,5		77,10
6''	3,64; <i>m</i>	68,0		68,30
	3,24; <i>m</i>			
1'''	5,00; <i>s</i>	101,4	C2''; C5'''	102,64
2'''	3,71; <i>m</i>	71,3		72,41
3'''	3,44; <i>m</i>	71,3		72,31
4'''	3,10; <i>m</i>	72,6		74,07
5'''	3,71; <i>m</i>	69,1		69,96
6'''	0,91; <i>d</i> ; 6,1	18,5		17,51
1''''	4,31; <i>s</i>	101,6	C2''''; C5''''	102,26
2''''	3,32; <i>m</i>	71,2		72,15
3''''	3,21; <i>m</i>	71,3		72,28
4''''	3,01; <i>m</i>	72,6		73,88
5''''	3,20; <i>m</i>	69,1		69,71
6''''	0,75; <i>d</i> ; 6,2	18,0		17,81

*KAZUMA *et al.*, 2003

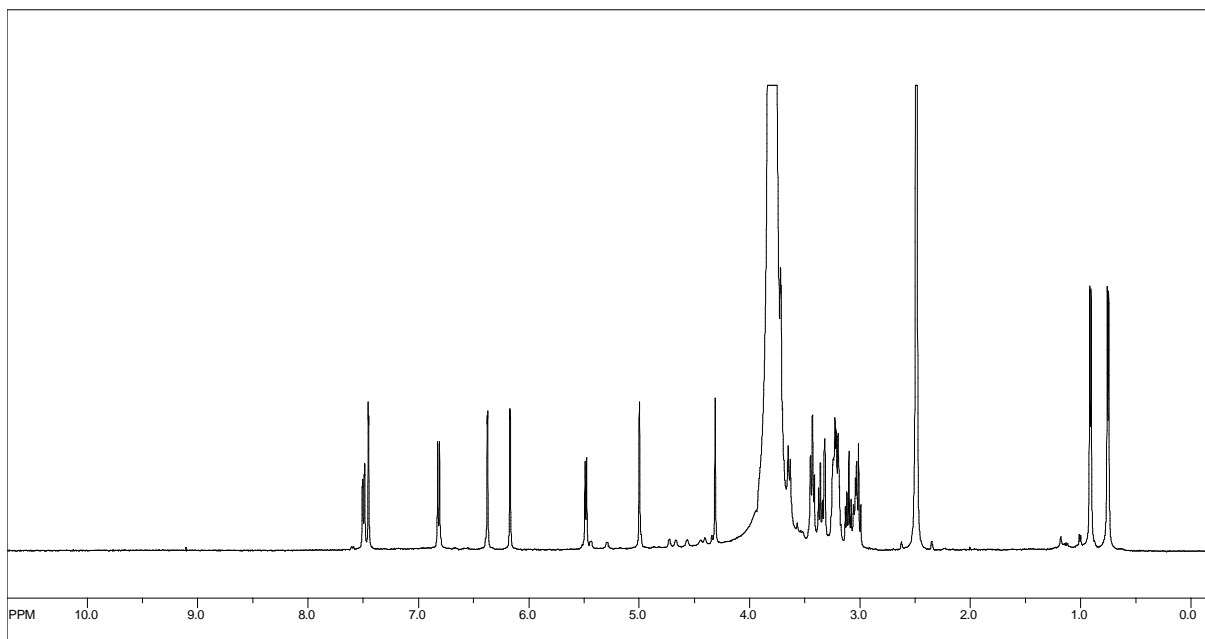


Figura 172. Espectro de RMN de ^1H da substância **SS-16** (DMSO-d_6 – TMS, 500 MHz).

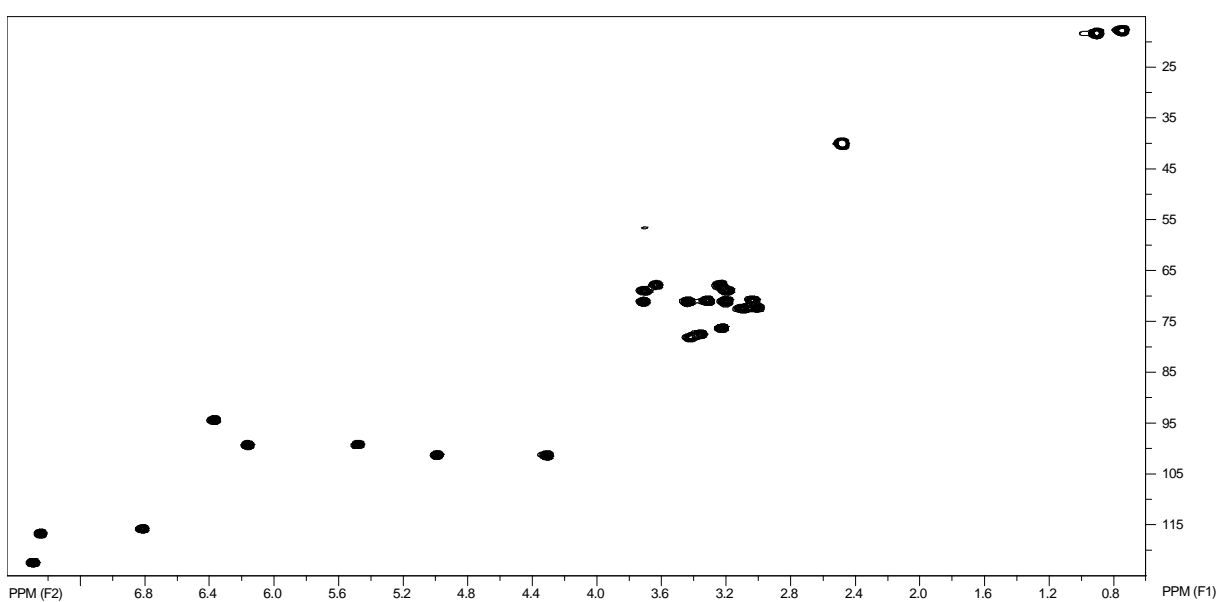


Figura 173. Mapa de contorno do HMQC da substância **SS-16** (DMSO-d_6 – TMS, 500 e 125 MHz).

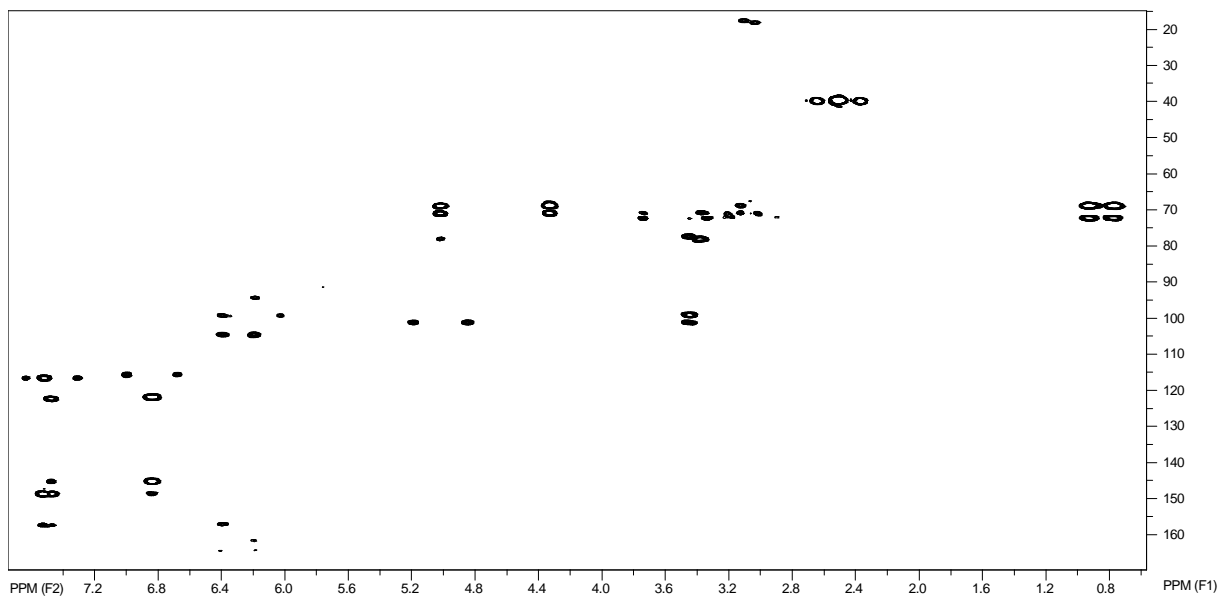


Figura 174. Mapa de contorno do HMBC da substância **SS-16** (DMSO-d₆ – TMS, 500 e 125 MHz).

4.6.2. Estudo químico de *Senna pendula*

4.6.2.1. Fração hexânica

A fração hexânica proveniente do extrato etanólico das partes aéreas de *S. pendula* foi analisada por CG-EM (Condições de análise CG 1, página 26). As substâncias identificadas, e a comparação da similaridade dos espectros de massas com os das bibliotecas e bancos de padrões disponíveis no laboratório, além dos cálculos dos índices de retenção de Kovats, bem como comparação destes com aqueles obtidos na literatura estão apresentados na **Tabela 50** e na **Figura 175**.

Tabela 50. Substâncias identificadas na fração hexânica de *S. pendula*.

	Substância	Similaridade	IK (exp.)	IK (lit.)	Literatura
SP-1	Neofitadieno	95	1835	1838	Rădulescu <i>et al</i> , 2010
SP -2	Hexadecanoato de metila	95	1923	1927	Adams, 1995
SP -3	Ácido hexadecanoico	94	1963	1963	Nogueira <i>et al</i> , 2001
SP -4	Hexadecanoato de etila	95	1992	1993	Oliveira <i>et al</i> , 2009
SP -5	9,12-octadecadienoato de metila	93	2088	2092	Tellez <i>et al</i> , 2002
SP -6	9,12,15-octadecatrienoato de metila	93	2093	2098	Tellez <i>et al</i> , 2002
SP -7	Fitol	97	2104	2106	Miyazawa <i>et al</i> , 2005
SP -8	Ácido 9,12-octadecadienoico	90	2130	2123	Miyazawa <i>et al</i> , 2004
SP -9	Linoleato de etila	94	2156	2156	Oliveira <i>et al</i> , 2009
SP -10	Octadecanoato de etila	92	2192	2194	Adams, 1995
SP -11	Nonacosane	96	2899	2900	Yusuf, Bewaji, 2011
SP -12	γ -tocoferol	91	3032		
SP -13	α -tocoferol	93	3110		
SP -14	Estigmasterol	93			
SP -15	β -Sitosterol	92			

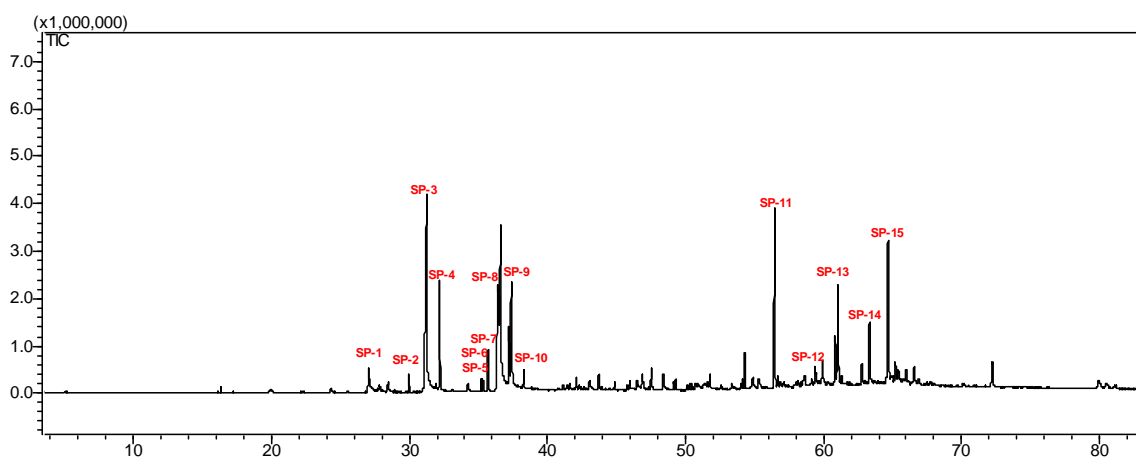


Figura 175. Cromatograma obtido por CG-EM da fração hexânica de *S. pendula* (Condições de análise CG 1, página 26).

4.6.2.2. Fração DCM

Foi realizado fracionamento em Sephadex LH-20, eluída com metanol, sendo obtidas 55 frações, as quais foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico apresentado por CCDC (FM: DCM:MeOH 95:5) (**Tabela 51**).

Tabela 51. Frações obtidas de CC da fração DCM de *S. pendula*.

Frações	Massa (mg)	Frações	Massa (mg)
1-3	68,0	28-33	24,3
4-6	126,1	34-38	18,8
7-10	288,3	39-43	22,0
11-15	367,2	44-48	24,9
16-20	156,3	49-55	12,8
21-27	59,1		

A fração SPDCM 34-38 foi submetida a separação em CLAE (**Figura 176**).

Foram identificados a antraquinona emodina (**SP-16**) e os flavonoides **SP-17**, **SP-18** e **SP-19**.

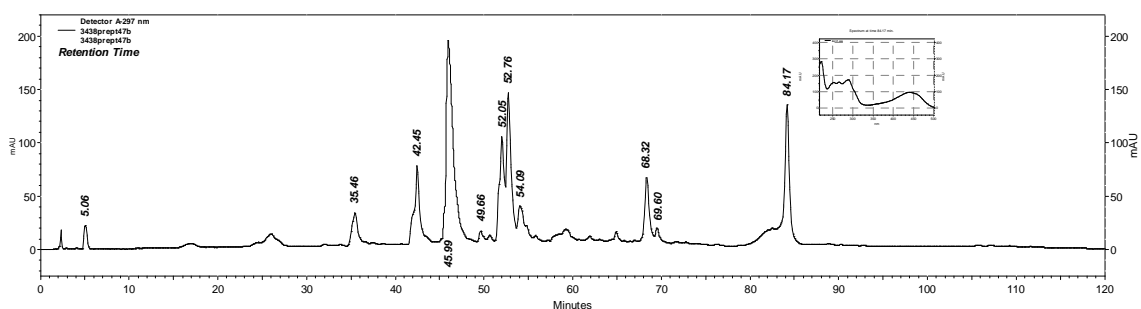
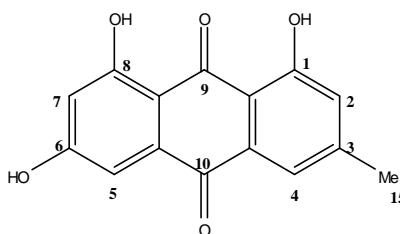


Figura 176. Cromatograma obtido em CLAE-UV (297 nm) da fração SP-DCM 3438 (Condições de análise CLAE 10, página 29). O pico com $t_R = 84,17$ min. refere-se à substância **SP-16**, o pico com $t_R = 45,99$ min. refere-se à substância **SP-17**, o pico com $t_R = 52,0$ min. refere-se à substância **SP-18**, e pico com $t_R = 52,76$ min. refere-se à substância **SP-19**.

4.6.2.3. Elucidação estrutural das substâncias isoladas de *S. pendula*

Substância SP-16

*Emodina***Tabela 52.** Dados de RMN de ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD-TMS}$, 500 MHz) da substância **SP-16**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	^1H (δ ; mult; J -Hz)	Literatura*
2	7,19; <i>d</i> ; 2,4	7,09; <i>d</i> ; 2,4
4	7,55; <i>sl</i>	7,40; <i>d</i> ; 2,4
5	7,03; <i>sl</i>	7,05; <i>d</i> ; 2,3
7	6,58; <i>d</i> ; 2,4	6,55; <i>d</i> ; 2,3
15	2,40; <i>s</i> (3H)	2,38; <i>s</i> (3H)

*NA *et al*, 2008.

A substância apresentou espectro na região do ultravioleta com máximos de absorção em 222; 253; 266; 288 e 441 nm, o que é condizente com transmissões apresentadas por antraquinonas. A presença de quatro sinais, no espectro de RMN de ^1H , na região de aromáticos, mostra tratar-se de uma antraquinona tetrassubstituída. A presença de um sinal em δ 2,40; *s*; 3H, indica a presença de uma metila não oxigenada. A ausência de constantes de acoplamento *orto* indica que as substituições estão em carbonos não adjacentes (**Tabela 52**). A substância foi determinada ser a emodina, devido a comparação dos dados espectrais de RMN de ^1H , aliado a sua ampla distribuição no gênero *Senna*.

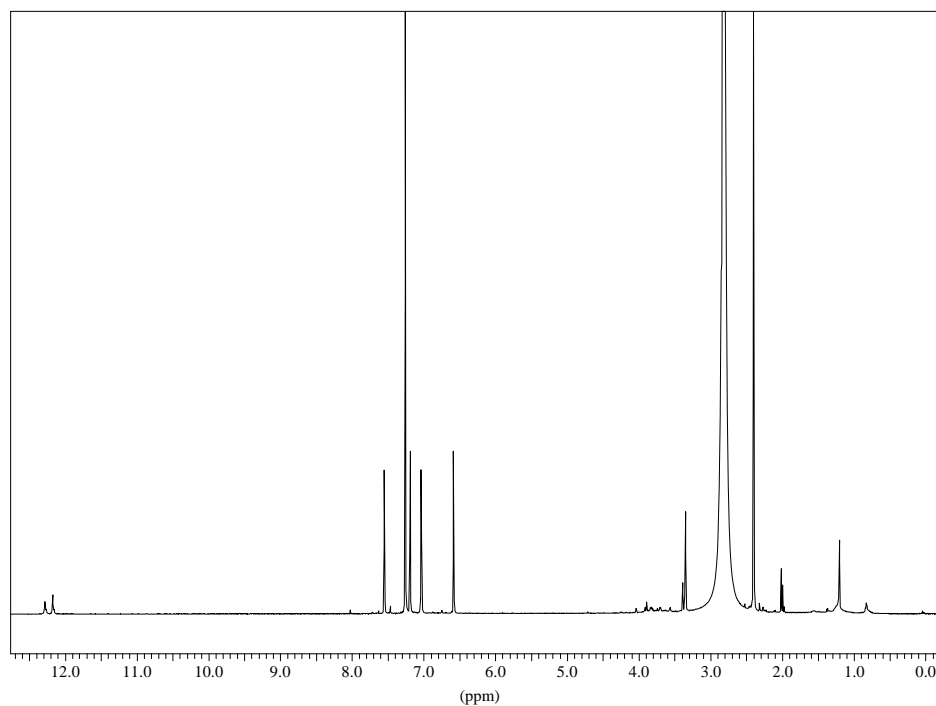


Figura 177. Espectro de RMN de ^1H da substância **SP-16** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ – TMS, 500 MHz).

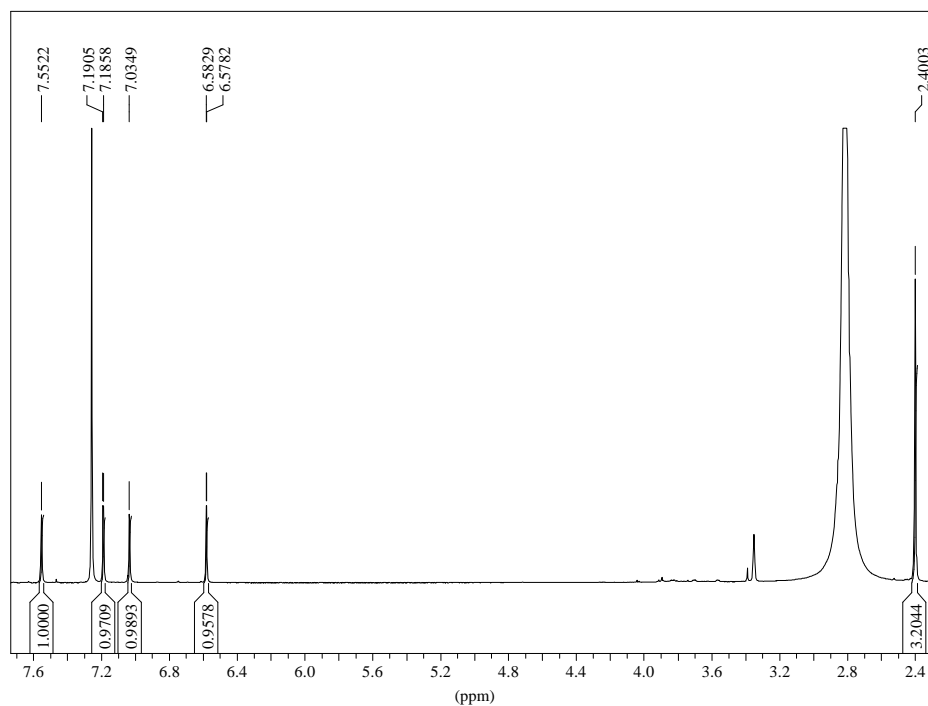
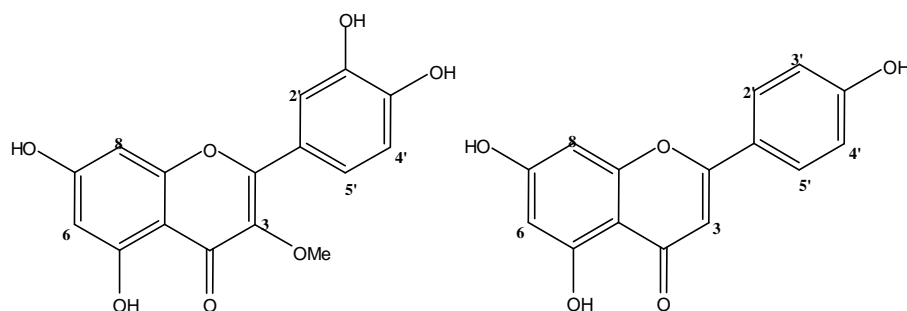


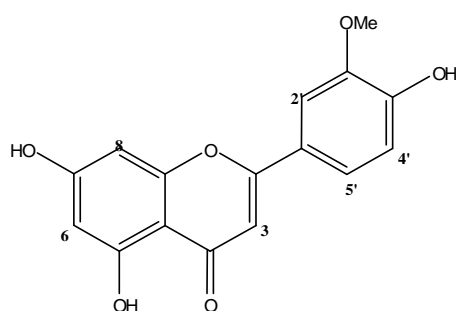
Figura 178. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **SP-16** ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ – TMS, 500 MHz).

Substâncias SP-17, SP-18 e SP-19



Quercetina 3-metil-éter (SP-17)

Apigenina (SP-18)



Crisoeriol (SP-19)

Os espectros de RMN de ^1H das substâncias **SP-17** e **SP-18** apresentaram sinais semelhantes àqueles apresentados para as substâncias de **SS-13** e **SS-14**, isolados de *Senna splendida*, e identificados respectivamente como quercetina 3-metil éter e apigenina.

Quanto à substância **SP-19**, foi observada a presença dos sinais δ 6,17; *d*; 2 Hz e δ 6,49; *d*; 2 Hz, atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, pertencentes ao anel A, quando H-7 e H-5 estão hidroxilados. Também foi observada a presença do sinal em δ 6,87; *s*, referente ao hidrogênio da posição H-3 (anel C). A presença deste sinal indica tratar-se de uma flavona.

Quanto ao anel B do esqueleto do flavonoide, observou-se a presença dos sinais δ 7,53; *sl*; δ 6,91; *d*; 8,5 Hz; δ 7,55; *m*, referentes aos hidrogênios 2'; 5' e 6', respectivamente, quando H-3' e H-4' encontram-se hidroxilados.

A presença do sinal em δ 3,86; *s* (3H); indica metoxilação, sendo sua posição atribuída por comparação dos deslocamentos químicos dos demais hidrogênios com valores da literatura (**Tabela 53**). Esta foi então posicionada em 3', permitindo identificar a substância como sendo crisoeriol.

Tabela 53. Dados de RMN de ^1H (DMSO- d_6 -TMS, 500 MHz) das substâncias **SP-17**, **SP-18** e **SP-19**, comparados com dados obtidos da literatura.

Posição	Substância SP-17	Quercetina 3- metil éter *	Substância SP-18	Apigenina **	Substância SP-19	Crisoeriol***
3	-		6,76; s	6,68; s	6,87; s	6,88; s
6	6,16; d; 1,9	6,09; d; 1,8	6,17; d; 2,0	6,20; d; 2,0	6,17; d; 2,0	6,19; d; 2,0
8	6,39; d; 1,9	6,29; d; 1,8	6,47; d; 2,0	6,44; d; 2,0	6,49; d; 2,0	6,50; d; 2,0
2'	7,52; d; 2,2	7,52; d; 2,0	7,91; d; 8,8	7,92; d; 9,0	7,53; sl	7,54; m
3'	-	-	6,91; d; 8,8	6,90; d; 9,0	-	
5'	6,88; d; 8,5	6,79; d; 8,5	6,91; d; 8,9	6,90; d; 9,0	6,91; d; 8,5	6,93; d; 8,9
6'	7,42; dd; 2,2; 8,5	7,43; dd; 8,5; 2,0	7,91; d; 8,9	7,92; d; 9,0	7,55; m	7,57; dd; 2,0; 8,9
OMe	3,75; s (3H)	3,68; s	-	-	3,86; s (3H)	3,89; s

*LEE, *et al*, 2003.

** MIYAZAWA & HISAMA, 2003.

*** PARK, *et al*, 2007.

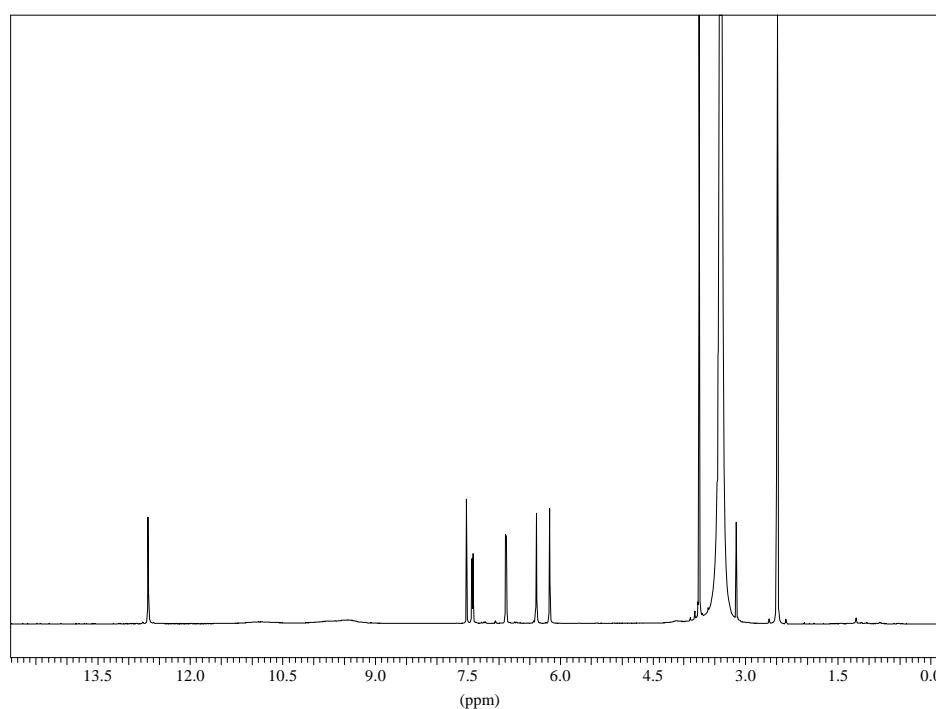


Figura 179. Espectro de RMN de ^1H da substância **SP-17** (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

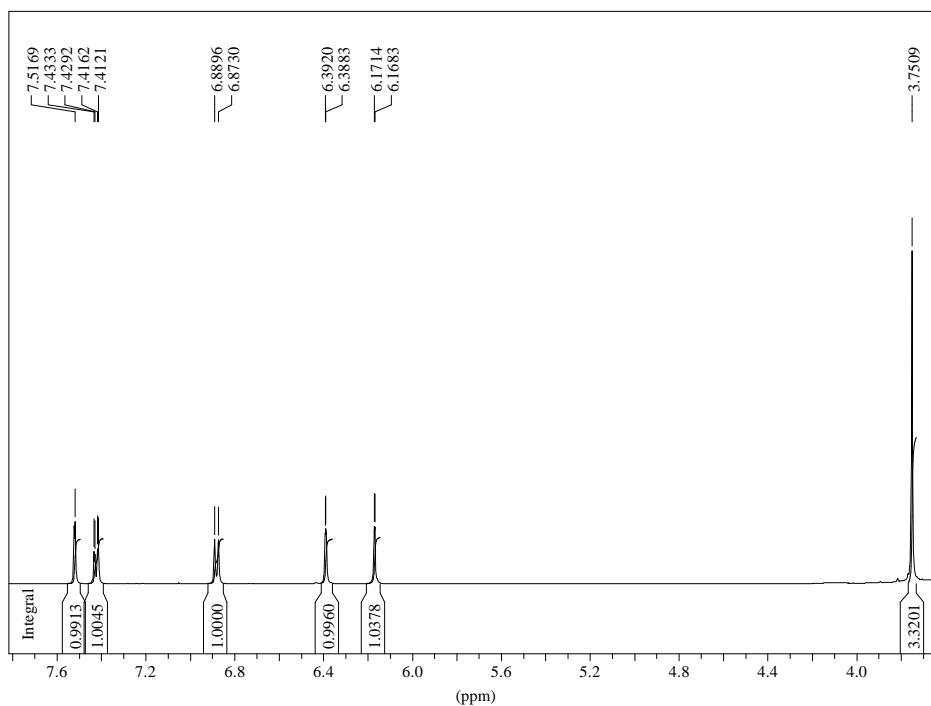


Figura 180. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **SP-17** (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

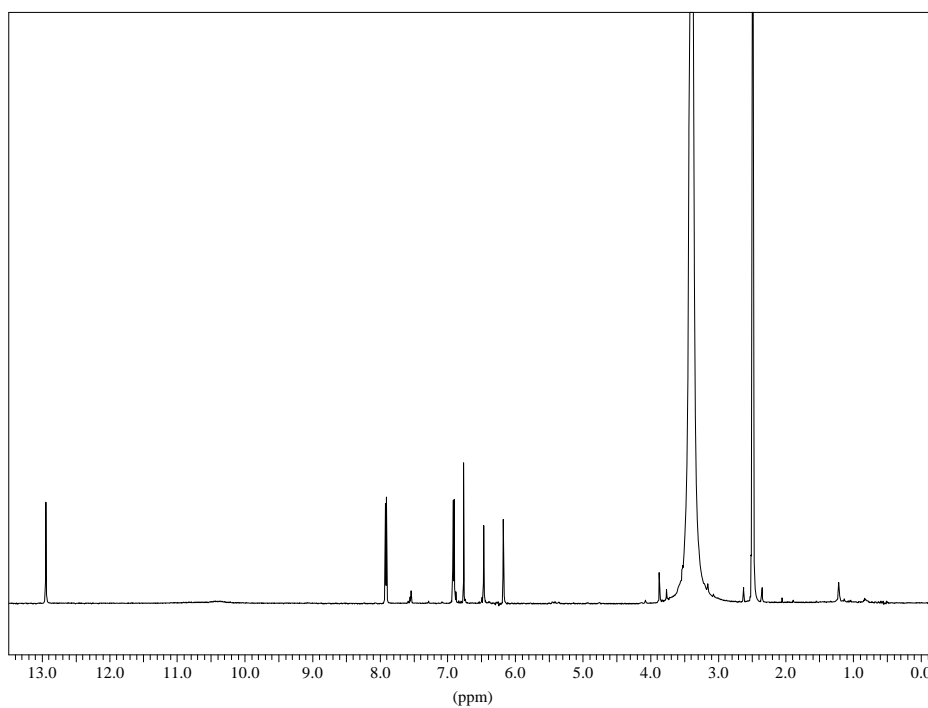


Figura 181. Espectro de RMN de ^1H da substância **SP-18** (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

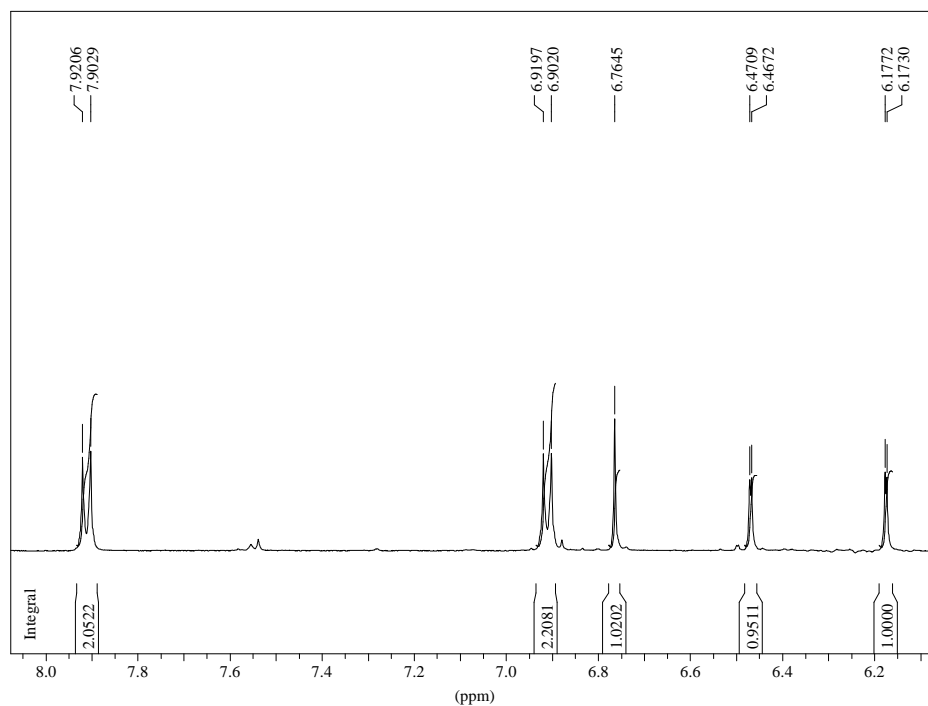


Figura 182. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **SP-18** (DMSO-d_6 – TMS, 500 MHz).

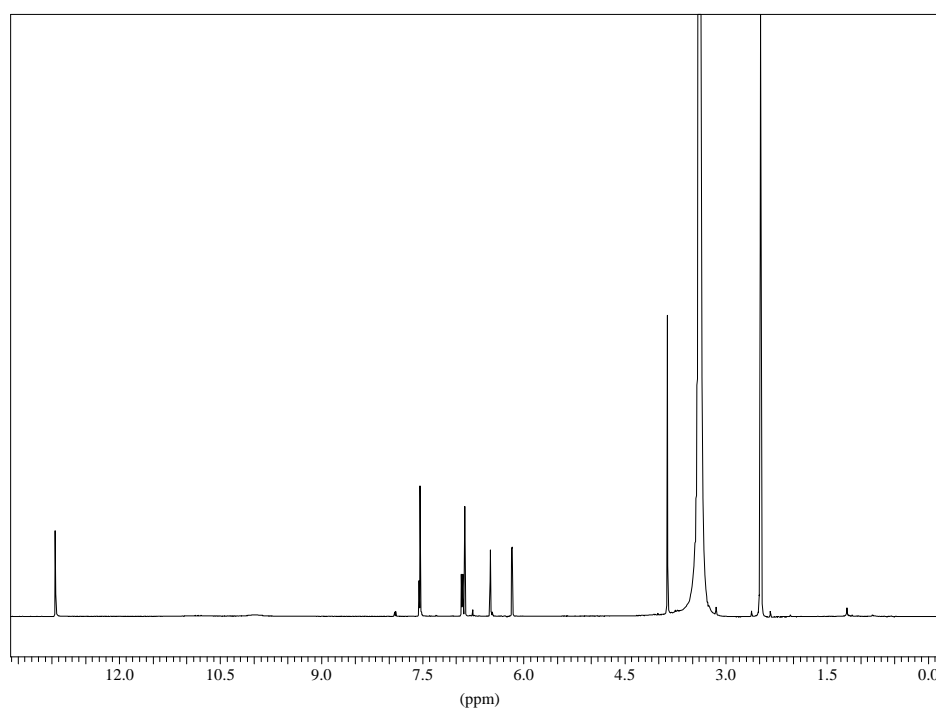


Figura 183. Espectro de RMN de ^1H da substância **SP-19** (DMSO-d_6 – TMS, 500 MHz).

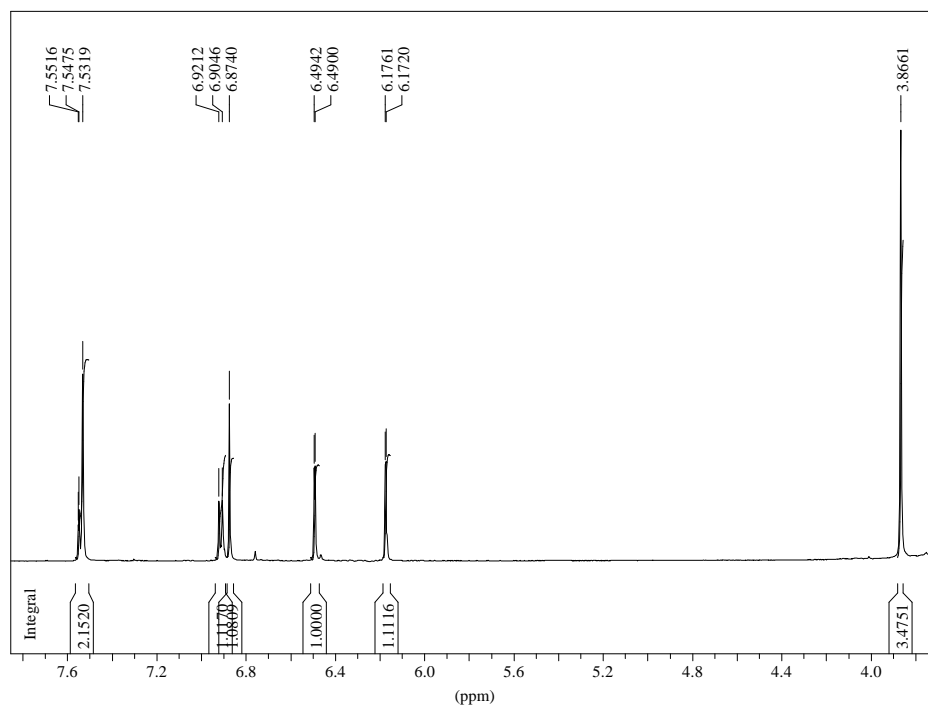


Figura 184. Expansão do espectro de RMN de ^1H da substância **SP-19** (DMSO- d_6 – TMS, 500 MHz).

4.6.3. Considerações sobre o estudo químico do gênero *Senna*

- ✓ Quercetina 3-*O*-(2'',6''-di-*O*- α -ramnosil)- β -glicosídeo ainda não havia sido identificada no gênero.
- ✓ Emodina é amplamente distribuída neste gênero.
- ✓ Quercetina 3-*O*-metil éter já havia sido isolada de *S. lindheimeriana* (BARBA, DÍAZ, HERZ, 1992).
- ✓ Crisoeriol foi isolada de *S. alata* e *S. torosa* (LIU *et al*, 2009; KITANAKA, TAKIDO, 1994).
- ✓ Apigenina e luteolina são amplamente distribuídas neste gênero.

Nenhuma das substâncias encontradas têm relatos de toxicidade.

5. AVALIAÇÕES DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.1. Avaliações das atividades citotóxicas frente às linhagens de células tumorais HCT-8, SF-295 e MDAMB-435 dos extratos e frações

Os extratos brutos das plantas testadas não apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem celular MDA-MB-435. O extrato de *C. micans* apresentou as maiores atividades citotóxicas contra as linhagens celulares testadas, sendo que para a linhagem SP-295, apresentou atividade moderada (**Tabela 54**).

A fração diclorometânica de *R. graciliflora* apresentou-se muito ativa frente a todas as linhagens celulares testadas, sendo que para duas destas linhagens (HCT-8 e SP-295), apresentou maiores inibições do crescimento celular que o controle positivo doxorrubicina. Isto provavelmente se deve a maior concentração das substâncias ativas nesta fração quando comparado às concentrações destas substâncias no extrato bruto, tendo em vista que o extrato bruto desta planta apresentou percentuais de inibição celular muito baixos (**Tabela 55**).

Tabela 54. Percentual de inibição do crescimento celular dos extratos etanólicos brutos das plantas frente às linhagens de células tumorais humanas MDAMB-435, HCT-8 e SF-295

<i>Extratos brutos</i>	LINHAGEM CELULAR		
	<i>MDA-MB-435</i>	<i>HCT-8</i>	<i>SF-295</i>
<i>I. chiliantha</i>	SA	21,68 % (PA)	34,62 % (PA)
<i>R. graciliflora</i>	SA	4,62 % (PA)	11,54 % (PA)
<i>S. splendida</i>	SA	15,49 % (PA)	39,91 % (PA)
<i>S. pendula</i>	SA	24,38 % (PA)	35,79 % (PA)
<i>S. aculeata</i>	SA	24,02 % (PA)	41,14 % (PA)
<i>C. micans</i>	24,20 % (PA)	31,70 % (PA)	53,40 % (MO)
<i>I. truxillensis Fruto</i>	SA	17,34 % (PA)	23,97 % (PA)
<i>I. truxillensis Raiz</i>	SA	0,50 % (PA)	23,41 % (PA)
<i>Doxorrubicina</i>	97,30 % (MA)	96,94 % (MA)	87,67 % (MA)

SA – sem atividade; PA – pouco ativo; MO – atividade moderada; MA – muito ativo.

Tabela 55. Percentual de inibição do crescimento celular das frações provenientes das partições dos extratos etanólicos brutos das plantas frente às linhagens de células tumorais humanas MDAMB-435, HCT-8 e SF-295

<i>Frações provenientes das partições</i>	<i>LINHAGEM CELULAR</i>		
	<i>MDA-MB-435</i>	<i>HCT-8</i>	<i>SF-295</i>
<i>I. chiliantha HA MeOH</i>	SA	12,15 % (PA)	17,22 % (PA)
<i>I. chiliantha AcOEt</i>	SA	SA	12,21 % (PA)
<i>I. chiliantha DCM</i>	6,80 % (PA)	19,90 % (PA)	22,63 % (PA)
<i>I. chiliantha Hex</i>	8,23 % (PA)	32,55 % (PA)	38,52 % (PA)
<i>R. graciliflora HA MeOH</i>	SA	SA	34,89 % (PA)
<i>R. graciliflora AcOEt</i>	SA	SA	SA
<i>R. graciliflora DCM</i>	81,71 % (MA)	100,00 % (MA)	94,31 % (MA)
<i>R. graciliflora Hex</i>	4,21 % (PA)	38,73 % (PA)	39,24 % (PA)
<i>S. splendida AcOEt</i>	SA	23,38 % (PA)	27,70 % (PA)
<i>S. splendida DCM</i>	SA	25,16 % (PA)	36,79 % (PA)
<i>S. splendida Hex</i>	SA	SA	8,64 % (PA)
<i>S. pendula HA MeOH</i>	10,74 % (PA)	21,75 % (PA)	22,74 % (PA)
<i>S. pendula AcOEt</i>	SA	6,75 % (PA)	SA
<i>S. pendula DCM</i>	10,81 % (PA)	28,57 % (PA)	23,02 % (PA)
<i>S. pendula Hex</i>	SA	SA	SA
<i>Doxorrubicina</i>	97,30 % (MA)	96,94 % (MA)	87,67 % (MA)

SA – sem atividade; PA – pouco ativo; MO – atividade moderada; MA – muito ativo.

5.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações

Quase todos os extratos brutos não apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas dos microrganismos testados. *R. graciliflora* apresentou uma inibição de *Enterococcus faecalis*/19433 (CIM 200 µg/ml), e os extratos brutos de *I. chiliantha* e dos frutos de *I. truxillensis* apresentaram pequena inibição desta mesma bactéria gram-positiva (CIM 400 µg/ml). Nenhum dos extratos brutos das plantas testadas apresentou atividade contra as bactérias gram-negativas testadas (**Tabela 56**).

Quanto à atividade antimicrobiana das frações provenientes das partições dos extratos brutos, *S. splendida* apresentou atividade contra *Klebsiela pneumoniae*/13883 em todas as frações testadas (100 – 200 µg/ml). A fração em AcOEt dos frutos de *I. truxillensis* também apresentou atividade contra esta bactéria gram-negativa (200 µg/ml). *S. splendida* também apresentou atividade contra *Proteus mirabilis*/29906 (100 µg/ml) (**Tabela 57**).

Quanto a atividade contra gram-positivas, as frações de *S. splendida* também se apresentaram ativas para as duas bactérias testadas (200 µg/ml). A fração hexânica de *R. graciliflora* também apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*/6538 (200 µg/ml) (**Tabela 57**).

De maneira geral, são consideradas frações promissoras para a atividade antimicrobiana, aquelas que apresentam CIM menores ou iguais a 100 µg/ml. Portanto, as frações provenientes do extrato bruto de *S. splendida* apresentaram atividades interessantes frente às bactérias gram-negativas testadas.

É importante mencionar a possibilidade ou de estar ocorrendo interações antagônicas entre os constituintes químicos do extrato de *S. splendida*, ou o particionamento tenha aumentado a concentração de substâncias ativas nas frações, tendo em vista que o extrato bruto desta planta não apresentou atividade contra estas bactérias.

Tabela 56. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos.

Microrganismos/ATCC	Extratos brutos	CIM µg/ml	CBM µg/ml	Controle
<i>Klebsiela pneumoniae/13883</i>	<i>I. chiliantha</i>	> 400	> 400	Estrep. 0,7375µg/ml
// //	<i>R. graciliflora</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. splendida</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. pendula</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. aculeata</i>	> 400	> 400	
// //	<i>C. micans</i>	> 400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - fruto	> 400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - raiz	> 400	> 400	
<i>Proteus mirabilis/29906</i>	<i>I. chiliantha</i>	> 400	> 400	Estrep. 18,437µg/ml
// //	<i>R. graciliflora</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. splendida</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. pendula</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. aculeata</i>	> 400	> 400	
// //	<i>C. micans</i>	> 400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - fruto	> 400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - raiz	> 400	> 400	
<i>Staphylococcus aureus/6538</i>	<i>I. chiliantha</i>	> 400	> 400	Pn. 0,0028 µg/ml
// //	<i>R. graciliflora</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. splendida</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. pendula</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. aculeata</i>	> 400	> 400	
// //	<i>C. micans</i>	> 400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - fruto	> 400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - raiz	> 400	> 400	
<i>E. faecalis/19433</i>	<i>I. chiliantha</i>	400	> 400	Pn. 2,95 µg/ml
// //	<i>R. graciliflora</i>	200	> 400	
// //	<i>S. splendida</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. pendula</i>	> 400	> 400	
// //	<i>S. aculeata</i>	> 400	> 400	
// //	<i>C. micans</i>	> 400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - fruto	400	> 400	
// //	<i>I. truxillensis</i> - raiz	> 400	> 400	

Concentrações dos extratos/substância testada = 0,195 a 400 µg/ml (Diluição seriada)

Concentrações do controle positivo testados = 0,00009 a 295 µg/ml

Obs: Estrep. = Estreptomicina, Pn. = Penicilina

Tabela 57. Atividade antimicrobiana das frações provenientes das partições dos extratos brutos.

<i>Microrganismos/ATCC</i>	<i>Frações</i>	<i>CIM*</i> <i>µg/ml</i>	<i>CBM**</i> <i>µg/ml</i>	<i>Controle</i>
<i>Klebsiela pneumoniae/13883</i>	ICHX	> 400	> 400	Estrep. 0,7375µg/ml
// //	ICDCM	> 400	> 400	
// //	ICAcOEt	> 400	> 400	
// //	ICMeOH	> 400	> 400	
// //	ICH ₂ O	> 400	> 400	
// //	RGHX	> 400	> 400	
// //	RGDCM	> 400	> 400	
// //	RGMeOH	> 400	> 400	
// //	RGAcOEt	> 400	> 400	
// //	SSHX	100	200	
// //	SSDCM	100	200	
// //	SSAcOEt	100	100	
// //	SSMeOH	100	100	
// //	SSH ₂ O	200	200	
// //	SPHX	> 400	> 400	
// //	SPDCM	> 400	> 400	
// //	SPAcOEt	> 400	> 400	
// //	SPMeOH	> 400	> 400	
// //	SPH ₂ O	> 400	> 400	
// //	ITHXFruto	> 400	> 400	
// //	ITDCMFruto	> 400	> 400	
// //	ITAcOEtFruto	200	200	
// //	ITHAFruto	> 400	> 400	
// //	ITHXRaiz	> 400	> 400	
// //	ITDCMRaiz	> 400	> 400	
// //	ITAcOEtRaiz	> 400	> 400	
// //	ITHARaiz	> 400	> 400	
<i>Proteus mirabilis/29906</i>	ICHX	> 400	> 400	Estrep. 18,437µg/ml
// //	ICDCM	> 400	> 400	
// //	ICAcOEt	> 400	> 400	
// //	ICMeOH	> 400	> 400	
// //	ICH ₂ O	> 400	> 400	
// //	RGHX	> 400	> 400	
// //	RGDCM	> 400	> 400	
// //	RGMeOH	> 400	> 400	
// //	RGAcOEt	> 400	> 400	
// //	SSHX	100	100	
// //	SSDCM	100	100	
// //	SSAcOEt	100	100	
// //	SSMeOH	100	100	
// //	SSH ₂ O	100	100	

Continua

Continuação

<i>Microrganismos/ATCC</i>		<i>Frações</i>	<i>CIM</i> <i>µg/ml</i>	<i>CBM</i> <i>µg/ml</i>	<i>Controle</i>
//	//	SPHX	> 400	> 400	
//	//	SPDCM	> 400	> 400	
//	//	SPAcOEt	> 400	> 400	
//	//	SPMeOH	> 400	> 400	
//	//	SPH ₂ O	> 400	> 400	
//	//	ITHXFruto	> 400	> 400	
//	//	ITDCMFruto	> 400	> 400	
//	//	ITAcOEtFruto	> 400	> 400	
//	//	ITHAFruto	> 400	> 400	
//	//	ITHXRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITDCMRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITAcOEtRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITHARaiz	> 400	> 400	
<i>Staphylococcus aureus/6538</i>		ICHX	> 400	> 400	Pn. 0,0028 µg/ml
//	//	ICDCM	> 400	> 400	
//	//	ICAcOEt	> 400	> 400	
//	//	ICMeOH	> 400	> 400	
//	//	ICH ₂ O	> 400	> 400	
//	//	RGHX	200	200	
//	//	RGDCM	> 400	> 400	
//	//	RGMeOH	> 400	> 400	
//	//	RGAcOEt	> 400	> 400	
//	//	SSHX	200	200	
//	//	SSDCM	200	200	
//	//	SSAcOEt	200	200	
//	//	SSMeOH	200	200	
//	//	SSH ₂ O	200	400	
//	//	SPHX	400	400	
//	//	SPDCM	> 400	> 400	
//	//	SPAcOEt	> 400	> 400	
//	//	SPMeOH	> 400	> 400	
//	//	SPH ₂ O	> 400	> 400	
//	//	ITHXFruto	400	400	
//	//	ITDCMFruto	> 400	> 400	
//	//	ITAcOEtFruto	> 400	> 400	
//	//	ITHAFruto	> 400	> 400	
//	//	ITHXRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITDCMRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITAcOEtRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITHARaiz	> 400	> 400	
<i>E. faecalis/19433</i>		ICHX	> 400	> 400	Pn. 2,95 µg/ml
//	//	ICDCM	> 400	> 400	

Continua

Continuação

<i>Microrganismos/ATCC</i>		<i>Frações</i>	<i>CIM</i> <i>µg/ml</i>	<i>CBM</i> <i>µg/ml</i>	<i>Controle</i>
//	//	ICAcOEt	> 400	> 400	
//	//	ICMeOH	> 400	> 400	
//	//	ICH ₂ O	> 400	> 400	
//	//	RGHX	400	400	
//	//	RGDCM	> 400	> 400	
//	//	RGM ₂ OH	400	> 400	
//	//	RGAcOEt	400	> 400	
//	//	SSHX	200	200	
//	//	SSDCM	200	200	
//	//	SSAcOEt	200	200	
//	//	SSMeOH	200	200	
//	//	SSH ₂ O	200	200	
//	//	SPHX	> 400	> 400	
//	//	SPDCM	> 400	> 400	
//	//	SPAcOEt	> 400	> 400	
//	//	SPMeOH	> 400	> 400	
//	//	SPH ₂ O	> 400	> 400	
//	//	ITHXFruto	> 400	> 400	
//	//	ITDCMFruto	> 400	> 400	
//	//	ITAcOEtFruto	> 400	> 400	
//	//	ITHAFruto	> 400	> 400	
//	//	ITHXRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITDCMRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITAcOEtRaiz	> 400	> 400	
//	//	ITHARaiz	> 400	> 400	

Concentrações dos extratos/substância testada = 0,195 a 400 µg/ml (Diluição seriada)

Concentrações do controle positivo testados = 0,00009 a 295 µg/ml

Obs: Estrep. = Estreptomicina, Pn. = Penicilina

* Concentração inibitória mínima

** Concentração bacteriostática mínima

5.3. Avaliação da atividade anti-alérgica dos derivados fenilpropanoides isolados de *I. chiliantha*

Entre os derivados fenilpropanoides testados, a substância cafeoato de etila estimulou a degranulação mastocitária, tendo um perfil semelhante a um alérgeno. Enquanto os derivados dicafeoilquínicos ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico e os derivados tricafeoilquínicos ácido 1,3,5-*O*-tricafeoilquínico e ácido 3,4,5-*O*-tricafeoilquínico apresentaram-se ativos, os derivados esterificados na posição 1 do ácido quínico, 3,5-*O*-dicafeoilquinato de metila e 3,4,5-*O*-tricafeoilquinato de metila, não apresentaram atividade, o que pode-se inferir na importância da função ácido na posição 1, a qual foi fundamental para a inibição da liberação da enzima β -hexosaminidase em mastócitos estimulados, ou para a inibição da atividade desta enzima. Tal fato não foi observado para o derivado do ácido quínico mono substituído, a substância 5-*O*-cafeoilquinato de metila, a qual foi ativa, mesmo esta se apresentando esterificada.

A **Tabela 58** resume as atividades dos derivados fenilpropanoides encontradas.

Tabela 58. Valores de IC₅₀ obtidos para as substâncias estudadas.

	<i>Substância</i>	<i>Atividade dos mastócitos</i>	<i>IC₅₀ (μM)</i>
1	<i>cafeoato de etila</i>	Estimulou	-
2	<i>5-O-cafeoilquinato de metila</i>	Inibiu	92 ± 6
3	<i>Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico</i>	Inibiu	98 ± 2
4	<i>3,5-O-dicafeoilquinato de metila</i>	Não apresentou atividade	-
5	<i>Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico</i>	Inibiu	99 ± 4
6	<i>Ácido 1,3,5-O-tricafeoilquínico</i>	Inibiu	141 ± 7
7	<i>Ácido 3,4,5-O-tricafeoilquínico</i>	Inibiu	172 ± 23
8	<i>3,4,5-O-tricafeoilquinato de metila</i>	Não apresentou atividade	-
9	<i>Fumarato de cetotifeno</i>	Inibiu	154 ± 6

Avaliação da viabilidade celular dos mastócitos na presença das substâncias naturais e do fármaco padrão

Somente as substâncias naturais que inibiram a degranulação mastocitária e o fármaco de referência (fumarato de cetotifeno) foram submetidas ao ensaio do MTT para verificar a toxicidade para as células RBL-2H3. Assim, foram submetidas a este ensaio as seguintes substâncias: 5-*O*-cafeoilquinato de metila, ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico, ácido 3,4,5-*O*-tricafeoilquínico e ácido 1,3,5-*O*-tricafeoilquínico. Os resultados estão apresentados na **Tabela 59**.

Tabela 59. Porcentagem da viabilidade celular (% VC) nas concentrações do IC₅₀ e de 400 μM.

<i>Substância</i>	<i>IC₅₀</i>	<i>% VC (IC₅₀)</i>	<i>% VC (400 μM)</i>
<i>5-O-cafeoilquinato de metila</i>	92 ± 6	100	50
<i>ácido 3,5-O-dicafeoilquínico</i>	98 ± 2	95	70
<i>ácido 4,5-O-dicafeoilquínico</i>	99 ± 4	90	75
<i>ácido 3,4,5-O-tricafeoilquínico</i>	172 ± 23	40	33
<i>ácido 1,3,5-O-tricafeoilquínico</i>	141 ± 7	90	72
<i>fumarato de cetotifeno</i>	154 ± 6	30	10

Quando comparado ao fármaco de referência, todas as substâncias testadas apresentaram toxicidade inferior. Porém, a substância ácido 3,4,5-*O*-tricafeoilquínico apresentou toxicidade elevada em seu IC₅₀, na qual a viabilidade celular foi de apenas 40%. Tal fato, aliado a baixa atividade quando comparado ao fármaco de referência, inviabilizaram sua pesquisa.

As substâncias ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico e ácido 1,3,5-*O*-tricafeoilquínico apresentaram baixa toxicidade nos seus respectivos IC₅₀, não apresentando toxicidade relevante na concentração de 400 μM, concentração esta aproximadamente 4 vezes maior que seus IC₅₀. Já a substância 5-cafeoilquinato de metila apresentou-se tóxica na concentração 400 μM, porém não apresentou toxicidade na concentração de seu IC₅₀.

Avaliação da inibição da atividade enzimática da β-hexosaminidase pelas substâncias naturais

Todas as substâncias submetidas ao ensaio do MTT, exceto o ácido 3,4,5-*O*-tricafeoilquínico, foram submetidas a este estudo, uma vez que não apresentaram relevante toxicidade para a linhagem RBL-2H3.

Nenhuma substância analisada inibiu significativamente a atividade da enzima β-hexosaminidase. Tal fato indica que a atividade constatada se deve à inibição da degranulação mastocitária. Confirmada a atividade, as substâncias selecionadas foram submetidas a ensaios para verificação de seu mecanismo de ação.

Influência das substâncias naturais na ligação do anticorpo (IgE) aos receptores FcεRI

Para todas as substâncias analisadas não foi observada redução significativa da % de β-hexosaminidase, como verificado para o controle positivo fumarato de cetotifeno.

Portanto, estas substâncias não inibem a ligação do anticorpo (IgE) ao receptor FcεRI, não influenciando na sensibilização dos mastócitos.

Influência das substâncias naturais na mobilização de cálcio intracelular

As substâncias 5-*O*-cafeoilquinato de metila, ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico e ácido 1,3,5-*O*-tricafeoilquínico não inibiram a mobilização de cálcio intracelular, o que indica que a atividade destes compostos se deve a outro mecanismo de ação.

A substância ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico inibiu em 33% a mobilização de cálcio intracelular, indicando que parte da atividade na inibição da degranulação mastocitária se deve a este mecanismo de ação. Porém, por este composto apresentar-se mais ativo que o fármaco de referência (sua concentração inibitória foi menor que do fumarato de cetotifeno), e sua capacidade de inibir a mobilização de cálcio intracelular foi menor do que a apresentada pelo fármaco em questão, pode-se sugerir que outros mecanismos de ação estejam envolvidos na capacidade de degranulação mastocitária deste derivado fenilpropanoide.

Tabela 60. Porcentagem de inibição da mobilização de Ca^{2+} na concentração do IC_{50} .

<i>Substância</i>	<i>IC₅₀ (μM)</i>	<i>% inibição da mobilização de Ca²⁺</i>
<i>5-O-cafeoilquinato de metila</i>	92 ± 6	0
<i>ácido 3,5-O-dicafeoilquínico</i>	98 ± 2	0
<i>ácido 4,5-O-dicafeoilquínico</i>	99 ± 4	33
<i>ácido 1,3,5-O-tricafeoilquínico</i>	141 ± 7	0
<i>fumarato de cetotifeno</i>	154 ± 6	67

5.4. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos e frações

De acordo com a **Tabela 61**, apenas o extrato etanólico bruto de *R. graciliflora* apresentou atividade contra *T. cruzi* (CI₅₀ 17,8 µg/ml). Porém, suas frações provenientes das partições não se apresentaram ativas (**Tabela 62**), indicando duas possibilidades: (i) a atividade observada do extrato etanólico bruto de *R. graciliflora* pode ser devido a um sinergismo entre as substâncias das diferentes frações; (ii) a atividade observada do extrato etanólico bruto de *R. graciliflora* pode ser devido às substâncias presentes na fração aquosa, não avaliada neste estudo.

Também foi observada atividade da fração AcOEt de *S. splendida* (CI₅₀ 8,2 µg/ml, **Tabela 62**), não sendo porém observada atividade de seu extrato bruto.

Tabela 61. Atividade tripanocida dos extratos etanólicos brutos das plantas deste estudo.

Extrato etanólico bruto	CI ₅₀ (µg/ml)
<i>I. chiliantha</i>	70,9
<i>R. graciliflora</i>	17,8
<i>S. splendida</i>	50,32
<i>S. pendula</i>	42,4
<i>S. aculeata</i>	72,3
<i>C. micans</i>	48,0
<i>I. truxillensis</i> Fruto	49,0
<i>I. truxillensis</i> Raiz	52,2

Tabela 62. Atividade tripanocida de frações provenientes dos extratos etanólicos brutos de algumas plantas deste estudo.

Extrato etanólico bruto	CI ₅₀ (µg/ml)
<i>I. chiliantha</i> - hexânica	122,7
<i>I. chiliantha</i> - DCM	190,9
<i>I. chiliantha</i> - AcOEt	59,9
<i>R. graciliflora</i> - hexânica	88,5
<i>R. graciliflora</i> - DCM	61,4
<i>R. graciliflora</i> - AcOEt	70,3
<i>S. splendida</i> - hexânica	75,1
<i>S. splendida</i> - DCM	62,8
<i>S. splendida</i> - AcOEt	8,2
<i>S. pendula</i> - hexânica	65,3
<i>S. pendula</i> - DCM	52,7
<i>S. pendula</i> - AcOEt	77,5

6. CONCLUSÕES

Quanto aos ensaios de citotoxicidade dos extratos para *Artemia salina*, apesar dos extratos não apresentarem-se muito ativos, observou-se maior toxicidade de *Crotalaria micans*, *Senna splendida* e *Indigofera truxillensis*, nas quais todos os microcrustáceos apresentaram comprometimento da motilidade ou morte nas concentrações 500 e 1000 µg/ml.

O “screening” químico realizado permitiu selecionar as plantas para um estudo químico mais aprofundado, bem como direcionar o estudo para a utilização de metodologias adequadas para cada espécie.

No estudo químico de *I. chiliantha* foram identificados triterpenos, alcoóis, ácidos e ésteres graxos, derivados fenilpropanoides, flavonoide esterificado com fenilpropanoide, além de calisteginas, as quais são derivados nortropânicos, e uma resina glicosídica ainda não descrita na literatura. As calisteginas são inibidoras de glicosidases, sendo tal atividade atribuída à toxicidade apresentada pelas espécies do gênero *Ipomoea*, ao gado. Já as resinas glicosídicas têm apresentado efeito catártico drástico, além de citotoxicidade, podendo contribuir para a toxicidade das espécies do gênero.

No estudo químico de *R. graciliflora*, foram identificados triterpenos, esteroides, ácidos graxos, tocoferol, flavonoides C-glicosídeos e O-glicosídeos, benzenoide, além de quatro isoflavanos, sendo três inéditas na literatura e a outra inédito como produto natural. A fração diclorometânica de *R. graciliflora*, a partir da qual foram isolados os isoflavanois descritos, apresentou-se muito ativa contra todas as linhagens celulares tumorais testadas. Dentre as diversas atividades atribuídas às isoflavanos está a citotóxica para diversas linhagens de células. De acordo com o exposto, pode-se sugerir que estas substâncias estejam contribuindo para a elevada atividade citotóxica encontrada nesta fração, para as linhagens celulares avaliadas.

No estudo químico de *I. truxillensis*, foram identificados triterpeno, esteroides, ácidos e ésteres graxos, benzenoides, flavonoides O-glicosídeos, e o alcaloide indoxil-β-glicopiranosídeo. A este último têm sido atribuída toxicidade urêmica, em ratos, devido ao seu produto de biotransformação, indoxil (3-hidroindol) sulfato, ser uma toxina urêmica. Devido os sintomas de intoxicação apresentados pelo gado que ingeriram esta planta estarem relacionados à toxicidade nos rins, a presença deste alcaloide parece ter um importante papel em sua toxicidade.

No estudo químico de *S. splendida* e *S. pendula*, foram identificados ácidos e ésteres graxos, tocoferóis, triterpeno, esteroides, flavonóis e antraquinona. Nenhuma destas substâncias parece estar relacionada à toxicidade ao gado.

Quanto aos ensaios de atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais, o extrato bruto de *C. micans* apresentou atividade moderada frente a linhagem celular SF-295.

Quanto aos ensaios antimicrobianos, nenhum dos extratos brutos apresentou atividade em concentração igual ou inferior a 100 µg/ml, considerada esta uma atividade promissora. Porém, as frações de *S. splendida* provenientes das partições apresentaram atividade contra as bactérias gram-negativas testadas.

Quanto aos ensaios para avaliação da atividade anti-alérgica, os derivados fenilpropanoides, isolados de *I. chiliantha* apresentaram atividades interessantes.

Quanto aos ensaios para avaliação da atividade tripanocida, apresentaram atividade o extrato etanólico bruto de *R. graciliflora* e a fração em acetato de etila de *S. splendida*.

Competiu ao presente trabalho comparar a química das espécies vegetais deste estudo com a química dos seus respectivos gêneros, e verificar na literatura se há relatos de toxicidade das substâncias identificadas em cada espécie, e então sugerir sua potencial toxicidade. Porém, a presença de substâncias tóxicas ou potencialmente tóxicas não é suficiente para afirmar a toxicidade da espécie, tendo em vista que vários fatores devem ser considerados, tais como a concentração destas substâncias no vegetal, e à possível ocorrência de sinergismo ou antagonismo, efeitos os quais são frequentemente observados em estudos biológicos de produtos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. In *Identification of Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL. 1995.

AGUAYO, L. G.; GUZMAN, L.; PEREZ, C.; AGUAYO, L. J.; SILVA, M.; BECERRA, J.; FUENTEALBA, J. Historical and current perspectives of neuroactive compounds derived from Latin America. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*. 6:997-1008, 2006.

ALSTON, T. A.; MELA, L.; BRIGHT, H. J. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Biochemistry*. 74(9): 3767-3771, 1977.

ASANO, N.; KATO, A.; MATSUI, K.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; MOLYNEUX, R. J.; HACKETT, L.; TOPPING, J.; WINCHESTER, B. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosides. *Glycobiology*. 7(8):1085-1088, 1997.

ASANO, N.; YOKOYAMA, K.; SAKURAI, M.; IKEDA, K.; KIZU, H.; KATO, A.; ARISAWA, M.; HÖKE, D.; DRÄGER, B.; WATSON, A. A.; NASH, R. J. Didihydroxynortropane alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry*. 57:721-726, 2001.

BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUNÓZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *Journal of Ethnopharmacology*. 73(1-2):271-275, 2000.

BAKASSO, S.; LAMIEN-MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; KIENDREBEOGO, M.; MILLOGO, J.; OUEDRAOGO, A. G.; NACOULMA, O. G. Polyphenol contents and antioxidant activities of five *Indigofera* species (Fabaceae) from Burkina Faso. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(11), 1429-1435, 2008.

BALOGH, K. I. M.; DIMANDE, A. P.; LUGT, J. J.; MOLYNEUX, R. J.; NAUDÉ, T. W.; WELMAN, W. G. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *Journal of Vet. Diagn. Invest.* 11:266-273, 1999.

BARBA, B.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. Anthraquinones and other constituents of two *Senna* species. *Phytochemistry*. 31(12):4374-4375, 1992.

BARBOSA, R. B.; FILHO, M. R. R.; SILVA, I. P.; SOTO-BLANCO, B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. *Acta Veterinaria Brasileira*. 1(1):1-7, 2007.

BARRI, M. E. S.; ADAM, S.E.I. The toxicity of *Crotalaria saltiana* to calves. *J. Comp. Path.* 91:621-627, 1981.

BARROS, G. M. C. C.; TEIXEIRA, S. P. Estudo farmacobotânico de duas espécies de anileira (*Indigofera suffruticosa* e *Indigofera truxillensis*, Leguminosae) com propriedades farmacológicas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(2):287-294, 2008.

BECK, M.; HÄBERLEIN, H. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica*. *Phytochemistry*. 50:329-332, 1999.

BERDAGUÉ, J.; DENOYER, C.; QUÉRÉ, J. L.; SEMON, E. Volatile components of dry-cured Ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1001(39): 1257-1261, 1991.

BIASTOFF, S.; DRAGER, B. *Calystegines*. In: The alkaloids, v. 64, Ed. Elsevier, 2007.

BISSET, N.G. One man's poison, another man's medicine? *Journal of Ethnopharmacology*. 32:71-81, 1991.

BOGHOSSIAN, M. R.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (Fabaceae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 27(4):149-156, 2007.

CALVO, T. R. Uso sustentável da biodiversidade brasileira – prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2007.

CALZADA, F.; CEDILLO-RIVERA, R.; MATA, R.; Antiprotozoal activity of the constituents of *Conyza filaginoides*. *Journal of Natural Products*. 64(5):671-673, 2001.

CASTAÑEDA-GOMEZ, J.; PEREDA-MIRANDA, R. Resin glycosides from the herbal drug jalap (*Ipomoea purga*). *Journal of Natural Products*. 74:1148-1153, 2011.

CHEN, W.; WANG, R.; SHI, Y. Flavonoids in the Poisonous Plant *Oxytropis falcate*.

Journal of Natural Products. 73(8):1398-1403, 2010.

CHOLICH, L. A.; GIMENO, E. J.; TEIBLER, P. G.; JORGE, N. L.; PÉREZ, O. C. A. The guinea pig as an animal model for *Ipomoea carnea* induced α -mannosidosis. *Toxicon*. 54:276-282, 2009.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTIN, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:2900-2911, 2003.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:3821-3832, 2005.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. *Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination*. 2 ed. Ed Taylor & Francis Group, 2008.

DA CAMARA, C. A. G.; SHEPHERD, S. L. K.; JOAQUIM Análise química da cultura de tecidos do híbrido *Clusia paralicola* X *Clusia weddelliana*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 12:26-28, 2002.

DADSON, B. A.; OPOKU-BOAHEN, Y. Chemical constituents of the aqueous extract of *Indigofera arrecta* Hochst ex A. Rich I. *Ghana Journal of Chemistry*. 1(6):293-299, 1992. (Informação obtida do resumo).

DEESAMER, S.; KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; DOUILLARD, S.; PEYROT, V.; VIDAL, N.; COMBES, S.; FINET, J. Synthesis and biological evaluation of isoflavone analogues from *Dalbergia oliveri*. *Tetrahedron*. 63(52), 12986-12993, 2007.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*. 2^a ed. Ed. John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DRÄGER, B. Chemistry and biology of calystegines. *Natural Product Report*. 21:211-223, 2004.

EICH, E. *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008.

FERREIRA, A. A.; AMARAL, F. A.; DUARTE, I. D. G., OLIVEIRA, P. M.; ALVES, R. B.; SILVEIRA, D.; AZEVEDO, A. O.; RASLAN, D. S.; CASTRO, M. S. A. Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 105(1-2):148-153, 2006.

FLAMINI, G.; ANTOGNOLI, E.; MORELLI, I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*. 57:559-564, 2001.

GANAPATY, S.; PANNAKAL, S. T.; SRILAKSHMI, G. V. K.; LAKSHMI, P.; WATERMAN, P. G.; BRUN, R. Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochemistry Letters*. 1(4):175-178, 2008.

GILANI, A. H.; ATTA-UR-RAHMAN. Trends in pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:43-49, 2005.

HABERMEHL, G.G. Poisonous plants of Brazil. *Toxicon*. 32(2):143-156, 1994.

HARAGUCHI, M. NOBRE, D.; GUIMARÃES, R. D. B.; MARIA, H.S. Occurrence of procyanidin in the toxic fraction from *Riedeliella graciliflora*. *Revista Latinoamericana de Química*. 23(1):34-36, 1992.

HARAGUCHI, M.; GORNIK, S. L.; IKEDA, K.; MINAMI, Y.; KATO, A.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; MOLLYNEUX, R. J.; ASANO, N. Alkaloidal components in the poisonous plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51:4995-5000, 2003.

HARBORNE, J.B. ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of flavonoids and their glycosides in Hexadeutero-Dimethylsulphoxide. In: *The Flavonoids: advances in research since 1986*. Ed. Chapman & Hall, Londres, 441-473, 1994.

HASAN, A.; AHMAD, I.; KHAN, M. A.; CHUDHARY, I. Two flavonol triglycosides from flowers of *Indigofera hebeptala*. *Phytochemistry*. 43(5), 1115-1118, 1996.

HATTORI, M.; SHU, Y.; TOMIMORI, T.; KOBASHI, K.; NAMBA, T. A bacterial cleavage of the C-glucosyl bond of mangiferin and bergenin. *Phytochemistry*. 28(4):128-129, 1989.

HEGARTY, M. P.; POUND, A. W.. Indospicine, a new hepatotoxic amino acid from *Indigofera spicata*. *Nature*. 217(5126):354-355, 1968.

HOU, Y.; TSAI, S.; CHAN, S.; YANG, S.; CHAO, P. L. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, is biotransformed from indoxyl- β -D-glucoside (indicant) in rats. *Toxicon*. 52: 440-444, 2008.

ISLAM, M. S.; YOSHIMOTO, M.; YAHARA, S.; OKUNO, S.; ISHIGURO, K.; YAMAKAWA, O. Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:3718-3722, 2002.

IWAI, K.; KISHIMOTO, N.; KAKINO, Y.; MOCHIDA, K.; FUJITA, T. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydrocinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:4893-4898, 2004.

JAISWAL, R. KUHNERT, N. How to identify and discriminate between the methyl quinates of chlorogenic acids by liquid chromatography-tandemmass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. 46, 269-281, 2011.

JUNIOR, C. V.; REZENDE, A. SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Química Nova*. 29(6): 1279-1286, 2006.

KAZUMA, K.; NODA, M.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry*. 62:229-237, 2003.

KIM, H. J.; JIN, C.; LEE, Y. Isolation and antioxidative activities of caffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glycosides from leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Journal of Applied Pharmacology*. 15(1):46-51, 2007.

KITANAKA, S.; TAKIDO, M. Bitetrahydroanthracenes from flowers of *Cassia torosa* Cav. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 42(12), 2588-2590, 1994.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63:3030-3041, 2006.

LANGMAN, L. J.; KAPUR, B. M. Toxicology: then and now. *Clinical Biochemistry*. 39, 498-510, 2006.

LEE, E. H.; KIM, H. J.; SONG, Y. S.; JIN, C.; LEE, K.; CHO, J.; LEE, Y. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Archives of Pharmacological Research*. 26(12):1018-1023, 2003.

LIMA, H. C.; VAZ, A. M. S. F. Revisão taxonômica do gênero *Riedeliella* Harms (Leguminosae – Faboideae). *Rodiguésia*. 36(58):9-16, 1984.

LIU, A.; XU, L.; ZOU, Z.; YANG, S. Studies on chemical constituents from leaves of *Cassia alata*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. 34(7):861-863, 2009.

LOTTI, C.; FERNANDEZ, M. C.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I. M.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red mexican própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:2209-2213, 2010.

MACLEOD, J. K.; WARD, A. Structural investigation of resin glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *Journal of Natural Products*. 60:467-471, 1997.

MAJAK, W.; BOSE, R. J. Chromatographic methods for the isolation of miserotoxin and detection of aliphatic nitro compounds. *Phytochemistry*. 1005:1010, 1974.

MARZOUK, M. M.; KAWASHTY, S. A.; SALEH, N. A. M.; AL-NOWAIHI, A. S. M. A new kaempeferol trioside from *Farsetia aegyptia*. *Chemistry of Natural Compounds*. 45(4): 483-486, 2009.

MATOS, F. A. J. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza, Ed. UFC, 1988.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B. Volatile constifutens of the leaves, fruits and flowers of cashew (*Anacardium occidentale* L.) *Journal of Food Composition and Analysis*. 13:227-232, 2000.

MEIRA, M.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; ARAUJO, S. V.; REGIS, T. L.; GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. Chemical constituents of *Ipomoea subincana* Meisn. (Convolvulaceae). *Quimica Nova*. 31(4):751-754, 2008.

MERFORT, I. Caffeoilquinic acids from flowers of *Arnica Montana* and *Arnica chamissonis*. *Phytochemistry*. 31(6):2111-2113, 1992.

MESSINA, M. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *Journal of Nutrition*. 140(7S-1):1350S-1354S, 2010.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R. PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCKAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*. 45(1): 31-34; 1982.

MILLER, R. E.; MCDONALD, J. A.; MANOS, P. S. Systematics of *Ipomoea* subgenus *Quamoclit* (Convolvulaceae) based on its sequence data and a bayesian phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*. 91(8): 1208-1218, 2004.

MILLER, R. W.; SMITH, C. R. Seeds of *Indigofera* species: their content of amino acids that be deleterious. *J. Agr. Food Chem*. 21(5): 909-912, 1973.

MIYAZAWA, M.; FUHITA, T.; YAMAFUJI, C.; MATSUI, M.; KASAHARA, N.; TAKAGI, Y.; ISHIKAWA, Y. Chemical composition of volatile oil from the roots of *Periploca sepium*. **J. Oleo Sci.** 53(10): 511-513, 2004.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.** 67(10):2091-2099, 2003.

MIYAZAWA, M.; NISHIGUCHI, T.; YAMAFUJI, C. Volatile components of the leaves of *Brassica rapa L. var. perviridis* Bailey. **Flavour Fragr. J.** 20:158-160, 2005.

MOLYNEUX, R. J., LEE, S. T.; GARDNER, D. R.; PANTER, K. E.; JAMES, L. F. Phytochemicals: The good, the bad and the ugly? **Phytochemistry.** 68:2973-2985, 2007.

MOLYNEUX, R. J.; MACKENZIE, R. A.; O'SULLIVAN, B. M.; ELBEIN, A. D. identification of the glycosidase inhibitors swainsonine and calystegine B, in weir vine (*Ipomoea* sp. q6 [aff. *calobra*]) and correlation with toxicity. **Journal of Natural Products.** 58(6):878-886, 1995.

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

MUSA, A.; HARUNA, A. K.; ILYAS, M.; AHMADU, A.; GIBBONS, S.; RAHMAN, M. M. Dihydrostilbenes from *Indigofera pulchra*. **Natural Product Communications** 3(5), 805-808, 2008.

NAAL, R. M. Z. G.; TABB, J.; HOLOWKA, D.; BAIRD, B. In situ measurement of degranulation as a biosensor based on RBL-2h3 mast cells. **Biosensors and Bioelectronics.** 20:791-796, 2004.

NA, M.; YI-JIN, W.; MIN, B. S.; AHN, J. S.; BAE, K. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of anthaquinones and stilbenes. **Natural Product Sciences.** 14(2):143-146, 2008.

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition.* NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NOGUEIRA, P. C. L.; BITTRICH, V.; SHEPHERD, G. J.; LOPES, A. V.; MARSAIOLI, A. J. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry.** 56:443-452, 2001.

OFIR, R.; TAMIR, S.; KHATIB, S.; VAYA, J. Inhibition of serotonin re-uptake by licorice constituents. *Journal of Molecular Neuroscience*. 20(2):135-140, 2003.

OLIVEIRA, A. L. L.; SILVA, D. B.; TURATTI, I. C. C.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. Volatile constituents of Brazilian *Bostrychia* species (Rhodomelaceae) from mangrove and rocky shore. *Biochemical Systematics and Ecology*. 37:761-765, 2009.

PALMEIRA, S. F.; CONSERVA, L. M.; ANDRADE, E. H. A.; GUILHON, G. M. S. P. Analysis by GC-MS of the hexane extract of the aerial parts of *Aristolochia acutifolia* Duchtr. *Flavour and Fragrance Journal*. 16:85-88, 2001.

PANTER, K.E.; GARDNER, D.R.; LEE, S.T.; PFISTER, J.A.; RALPHS, M.H.; STEGELMEIER, B.L.; JAMES, L.F. Important poisonous plants of the United States. In:___ GUPTA, R.C. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, ed. Elsevier, 2007, cap.66, p.825-872.

PANTER, K. E.; JAMES, L. F. Natural plant toxicants in milk: a review. *Journal of Animal Science*. 68:892-904, 1990.

PARK, Y.; MOON, B.; YANG, H.; LEE, Y.; LEE, E.; LIM, Y. Spectral assignments and reference data. Complete assignments of NMR data of 13 hydroxymethoxyflavones. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 45:1072-1075, 2007.

PEREDA-MIRANDA, R.; ROSAS-RAMÍREZ, D.; CASTAÑEDA-GÓMEZ, J. Resin glycosides from the Morning Glory Family. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 92:77-153, 2010.

PHILIPPE, G.; ANGENOT, L. Recent developments in the field of arrow and dart poison. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:85-91, 2005.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. 56:237-243, 2001.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*. 68:2960-2972, 2007.

POTT, A.; AFONSO, E. Plantas tóxicas para bovinos em Mato Grosso do Sul. *Embrapa*, 2000. Disponível em <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicações/divulga/GCD44.html>. Acesso em maio de 2008.

POTT, A.; POTT, V. J. In:___*Plantas do Pantanal*, 1ª ed, Brasil, 1994.

POTT, A.; POTT, V. J.; SOUZA, T. W. In: __ *Plantas daninhas de pastagem na região de cerrados*. 1ª ed, Brasil, 2006.

PURI, S. C.; SAWHNEY, R. S.; ATAL, C. K. Genus *Crotalaria*. XVI. Pyrrolizidine alkaloids of *Crotalaria leioloba*, *C. stipularia*, and *C. tetragona*. *Journal of the Indian Chemical Society*. 51(6):628, 1974.

RĂDULESCU, V.; POPESCU, M. L.; ILIEȘ, D. C. Chemical composition of the volatile oil from different plant parts of *Anethum graveolens* L. (Umbelliferae) cultivated in Romania. *Farmacia*. 58(5), 594-600, 2010.

RASTOGI, R. RAJAGOPALAN, T. R. Alkaloid contents of the seeds of *Crotalaria anagyroides* H.B.& K. *Pharmazie*. 37(1):75-76, 1982.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 39:603-613, 2001.

RAYYAN, S.; FOSSEN, T.; NATELAND, H. S.; ANDERSEN, O. M. Isolation and identification of flavonoids, including flavones rotamers, from the herbal drug "Crataegi folium cum flore" (Hawthorn). *Phytochemical Analysis*. 16:334-341, 2005.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(1):38-42, 2001.

SAIRAFIANPOUR, M.; KAYSER, O.; CHRISTENSEN, J.; ASFA, M.; WITT, M.; STRK, D.; JARZEWSKI, J. W. Leishmanicidal and antiplasmodial activity of constituents of *Smirnowia iranica*. *Journal of Natural Products*. 65(12):754-1758, 2002.

SALVADOR, I. S.; MEDEIROS, R. M. T.; PESSOA, C. R. M.; OLIVEIRA, D. M.; DUARTE, A. L. A.; FIGHERA, R. A.; RIET-CORREA, F. Experimental poisoning of guinea pig (*Cavia porcellus*) with *Indigofera suffruticosa*. *Toxicon* 57:927-931, 2011.

SATO, M.; TANAKA, H.; OH-UCHI, T.; FUKAI, T.; ETOH, H.; YAMAGUCHI, R. Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Erythrina zeyheri* against vancomycin-resistant enterococci and their combinations with vancomycin. *Phytotherapy Research*. 18(11):906-910, 2004.

SATTAR, E. A.; GALA, A.; RASHWAN, O. Caffeoyl derivatives from the seeds of *Ipomoea fistulosa*. *International Journal of Pharmacognosy*. 33(2):155-158, 1995.

SCHWARZ, A.; HOSOMI, R. Z.; HENRIQUE, B. S.; HUEZA, I.; GARDNER, D.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Identificação de

princípios ativos presentes na *Ipomoea carnea* brasileira. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 40(2):181-187, 2004.

SETHI, M. L.; ATAL, C. K. Phytochemical studies on the genus *Crotalaria*. IV. A phytochemical investigation of the seeds of *C. anagyroides*. *Planta Medica*. 12:173-176, 1964.

SHI, S.; ZHAO, Y.; ZHOU, H.; ZHANG, Y.; JIANG, X.; HUANG, K. Identification of antioxidants from *Taraxacum mongolicum* by high-performance liquid chromatography-diode array detection-radical-scavenging detection-electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments. *Journal of Chromatography A*. 1209:145-152; 2008.

SHIMMING, T.; TOFERN, B.; MANN, P.; RICHTER, A.; JENETT-SIEMS, K.; DRAEGER, B.; ASANO, N.; GUPTA, M. P.; CORREA, M. D.; EICH, E. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*. 49(7):1989-1995, 1998.

SHIMMING, T.; JENETT-SIEMS, K.; MANN, P.; TOFERN-REBLIN, B.; MILSON, J.; JOHNSON, R. W.; DEROIN, T.; AUSTIN, D. F.; EICH, E. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*. 66:469-480, 2005.

SIMÕES, C. M. O. S.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*, Rio Grande do Sul, Brasil, Editora da UFSC, 5ª ed., 2004.

SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry*. 66: 2177–2215, 2005.

SNOOK, M. Characterization and quantification of hexadecyl, octadecyl, and eicosyl esters of *p*-coumaric acid in the vine and root latex of sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42:2589-2595, 1994.

SONGSIANG, U.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, S.; NETSOPA, S.; UANPORN, K.; YENJAI, C. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora* *Fitoterapia*. 80(7):427-431, 2009.

STEFANOVIC, S. A.; AUSTIN, D. F.; OLMSTEAD, R. G. Classification of Convolvulaceae: A phylogenetic approach. *Systematic Botany*. 28(4): 791-806, 2003.

SUBARNAS, A.; OSHIMA, Y.; HIKINO, H. Isoflavans and a pterocarpan from *Astragalus mongolicus*. *Phytochemistry*. 30(8):2777-2780, 1991.

SURI, K. SURI, O. P.; DHAR, K. L.; ATAL, C. K. Chemical components of *Lapulla glochidiata* and *Crotalaria anagyroides*. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*. 16B(1), 78, 1978.

SU, Y. L.; CHUNZHENG, G. Y.; DI, L.; ZHANG, X.; GUO, D. Acryloylated glucose 3-nitropropanoates from *Indigofera kirilowi*. *Journal of Natural Products*. 68(12):1785-1786, 2005.

SUBRAMANIAN, S. S. NAGARAJAN, S. Flavonoids of three *Crotalaria* species. *Phytochemistry*. 9(12):2581-2582, 1970.

SUBRAMANIAN, S. S.; NAGARAJAN, S. Isovitexin from the seeds of *Crotalaria anagyroids*. *Current Science*. 36(15): 403, 1967.

TAKAOKA, S.; TAKAOKA, N.; MINISHIMA, Y.; HUANG, J.; KUBO, M.; HARADA, K.; HIOKI, H.; FUKUYAMA, Y. Isolation, synthesis, and neurite outgrowth-promoting activity of illicin A from the flowers of *Illicium anisatum*. *Tetrahedron*. 65: 8354-8361, 2009.

TELLEZ, M. R.; KHAN, I. A.; KOBALSY, M.; SCHRADER, K. K.; DAYAN, F. E.; OSBRINK, W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry*. 61:149-155, 2002.

TERAMACHI, F.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKORN, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; ISHIBASHI, M. Collagenase inhibitory quinic acid esters from *Ipomoea pes-caprae*. *Journal of Natural Products*. 68(5):794-796, 2005.

TIMMERMANN, B. N.; HOFFMANN, J. J. Constituents of *Chrysothamnus paniculatus* 3: 3,4,5-tricaffeoylquinic acid (a new shikimate prearomatic) and 3,4-, 3,5-, and 4,5-dicaffeoylquinic acids. *Journal of Natural Products*. 46(3):365-368, 1983.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. *Plantas tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro, Brasil, Ed. Helianthus, 2000.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. *Toxicon*. 40:1635-1660, 2002.

VEGA, C.; ROLON, M.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A. R.; ESCARIO, J. A.; GOMEZ-BARRIO, A. A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. *Parasitology research*. 95(4): 296-298, 2005.

XIA, Z.; ZENK, M. H. H. Biosynthesis of índigo precursors in higher plants. *Phytochemistry*. 31(8): 2695-2691, 1992.

WAGNER, H.; ZGAINSKI, E. M. *Plant Drug Analysis*. Editora Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Alemanha, 1984.

WATELET, J.; GILLARD, M.; BENEDETTI, M. S.; LELIÉVRE, B.; DIQUET, B. Therapeutic management of allergic diseases. *Drug Metabolism reviews*. 41(3):301-343; 2009.

WEI, W.; PAN, Y.; CHEN, Y.; LIN, C.; WEI, T.; ZHAO, S. Carboxylic acids from *Phyllanthus urinaria*. *Chemistry of Natural Compounds*. 41(1): 17-21, 2005.

YADAVA, R. N.; THAKUR, V. A novel cardenolide from the seeds of *Crotalaria retusa*. *Fitoterapia*. 66(2):147-148, 1995.

YADAV, R. N.; THAKUR, V. A cardenolide cardiogenin 3-O- β -D-xylopyranoside from the seeds of *Crotalaria juncea*. *Phytochemistry*. 35(5):1375-1377, 1994.

YIN, Y.; KONG, L. Chemical constituents from the tubers of *Ipomoea batatas*. *Zhongguo Tianran Yaowu*. 6(1):33-36, 2008.

YOSHIDA, K.; HISHIDA, A.; IIDA, O.; HOSAKAWA, K.; KAWABATA, J. Flavonol Caffeoylglycosides as α -Glucosidase Inhibitors from *Spiraea cantoniensis* Flower. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(12):4367-4371, 2008.

YOSHIMITSU, H.; NISHIDA, M.; HASHIMOTO, F.; TANAKA, M.; SAKATA, Y.; OKAWA, M.; NOHARA, T. Chromone and flavonol glycosides from *Delphinium hybridum* cv. "Belladonna Casablanca". *Journal of Natural Medicines*. 61:334-338, 2007.

YUSUF, O. K.; BEWAJI, C. O. GC-MS of volatile components of fermented wheat germ extract. *Journal of Cereals and Oilseeds*. 2(3):38-42, 2011.

ZANELLA, D. F. P.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; HAMERSKI, L.; BARBOSA, C. S.; SILVA, J. C. C.; ABOT, A. R. Estudo químico de *Riedeliella graciliflora* – Uma planta tóxica para o gado. *Resumo – Sociedade Brasileira de química, 2007*. Disponível em <https://sec.sbq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T1547-1.pdf>. Acesso em maio de 2008.

ZHU, X.; ZHANG, H.; LO, R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(24):7272-7278, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Avaliações das atividades citotóxicas frente às linhagens de células tumorais HCT-8, SF-295 e MDAMB-435 dos extratos e frações

Os experimentos para a avaliação da atividade antitumoral foram realizados no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará, sob responsabilidade da Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

A citotoxicidade das amostras foi avaliada pelo método do MTT (MOSMAN, 1983). As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades nas seguintes densidades: $0,7 \times 10^5$ (HCT-8), $0,6 \times 10^5$ (SF-295) e $0,1 \times 10^6$ (MDAMB-435). As amostras foram solubilizadas e diluídas com DMSO estéril na concentração estoque de 2 mg/ml para substância pura e 20 mg/ml para frações e extratos. Foram em seguida adicionadas às placas, e posteriormente foram incubadas por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. As amostras foram testadas em uma única concentração (50 µg/ml para extratos e frações). As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa a 595 nm. Doxorrubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas, sendo esta: amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA, inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (MO, inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (MA, inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

APÊNDICE 2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações

Os experimentos para a avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Niece Araçari Jacometti Cardoso Furtado.

Para a determinação da concentração inibitória mínima, utilizou-se o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS, 2003), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações.

Foram preparadas soluções das amostras em DMSO, sendo posteriormente diluídas em caldo Mueller Hinton.

Microrganismos utilizados

Utilizaram-se as cepas padrão provenientes da *American Type Culture Collection* de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e de bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Proteus mirabilis* (ATCC 29906).

Preparo do inóculo

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 horas dos microrganismos indicadores, desenvolvidas no ágar Mueller Hinton foram transferidas para tubos contendo 5 ml de solução salina esterilizada. Padronizaram-se estas suspensões comparando-as com o tubo 0,5 da escala de McFarland (0,1 ml de cloreto de bário a 1,0 % + 9,9 ml de ácido sulfúrico a 1,0 %). Em seguida, transferiu-se 1 ml desta solução para um novo tubo contendo 9 ml de solução salina. Após este procedimento, transferiu-se 2 ml desta para um tubo contendo 10 ml de Caldo Mueller Hinton de modo a fornecer o inóculo de 5×10^5 UFC/ml.

Preparo dos antibióticos utilizados como controles positivos

Preparo do antibiótico padrão estreptomicina

Pesou-se 1 mg do antibiótico padrão e diluiu-se em 10 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 mol/l, pH= 7,9 (16,73 g de fosfato de potássio dibásico, 0,523 g de fosfato de potássio monobásico, q.s.p. 1000 ml). Transferiu-se 1 ml desta solução para tubo de ensaio contendo 4 ml de caldo Mueller Hinton. Utilizou-se 59 µl desta última solução no primeiro orifício da placa de 96 poços.

Preparo do antibiótico padrão Penicilina

Pesou-se 1 mg do antibiótico padrão e diluiu-se em 10 ml de tampão fosfato de potássio a 1%, pH= 6,0 (2,0 g de fosfato de potássio dibásico, 8,0 g de fosfato de potássio monobásico, qsp 1000 ml). Transferiu-se 1 ml desta solução para tubo de ensaio contendo 4 ml de caldo Mueller Hinton. Utilizou-se 59 µl desta última solução no primeiro orifício da placa de 96 poços.

Preparo da solução reveladora

Preparou-se solução aquosa esterilizada de cloreto de trifeniltetrazólio na concentração de 0,1%. Adicionou-se 40 µl desta solução em cada orifício da placa de 96 poços.

Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios foram depositados um total de 100 µl da mistura do caldo Mueller Hinton, das soluções das amostras e das suspensões dos microrganismos. As amostras foram avaliadas em uma faixa de concentração de 0,19 µg/ml a 400 µg/ml de caldo Mueller Hinton. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas utilizando-se o método de microdiluição em microplaca (NCCLS, 2003).

Em um dos orifícios de cada placa foi feito o controle da cultura, a qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano. Em outro orifício foi feito o controle de esterilidade do caldo Mueller Hinton e em outro o controle do sistema solvente utilizado na solubilização das amostras (DMSO). Penicilina e estreptomicina foram utilizadas como controles positivos nos ensaios realizados com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 40 µl de solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio. A verificação da cor vermelha nos orifícios é interpretada como presença de crescimento

microbiano, enquanto que a ausência de coloração pode ser interpretada como inibição do crescimento do microrganismo testado (microrganismo sensível à amostra avaliada).

Determinação da concentração bactericida mínima

As amostras foram avaliadas em uma faixa de concentração de 0,19 µg/ml a 400 µg/ml de caldo Mueller Hinton.

A concentração bactericida mínima (CBM) é definida como a menor concentração da amostra na qual não houve crescimento bacteriano.

APÊNDICE 3. Avaliação da atividade anti-alérgica dos derivados fenilpropanoides isolados de *I. chiliantha*

Os experimentos para a avaliação da atividade anti-alérgica foram realizados no Laboratório de Química Analítica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pela aluna Natália Salotti Guardabaxo, em seu projeto de Iniciação Científica, sob a orientação da Profa. Dra. Rose Mary Zumstein G. Naal, pesquisadora responsável pelo ensaio em questão.

A atividade anti-alérgica foi avaliada por meio da quantificação da enzima β -hexosaminidase. Esta enzima é liberada dos mastócitos numa situação alérgica.

A metodologia descrita a seguir foi extraída do relatório de iniciação científica apresentada pela aluna.

“Ensaio direto para a quantificação da β -hexosaminidase

O ensaio foi conduzido baseado no método descrito por Naal e colaboradores (NAAL *et al*, 2004). As células RBL-2H3, sensibilizadas pelo anti-DNP-IgE e aderidas em compartimentos de microplacas, foram lavadas duas vezes com tampão de Tyrode/BSA à temperatura ambiente. As células foram estimuladas pela adição de 100 μ l do antígeno (DNP-BSA na concentração final de 0,1 μ g/ml) na presença, ou ausência, de 100 μ l da substância natural (soluções preparadas em tampão de Tyrode/BSA nas concentrações de 10 μ M a 800 μ M, a fim de que as concentrações finais das substâncias fossem de 5 μ M a 400 μ M) e incubadas por 1 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após esse tempo, a placa foi colocada sobre o gelo para a finalização da degranulação dos mastócitos. Em seguida foram adicionados 100 μ L do substrato fluorimétrico para β -hexosaminidase (4-metil-umbeliferil-N-acetil- β -D-glucosaminida) e as amostras foram incubadas por 30 min. a 37 °C e 5% de CO₂. A liberação espontânea (controle) e a liberação total da β -hexosaminidase (100%), foram determinadas para as células em tampão de Tyrode/BSA e em 0,1% Triton X-100, respectivamente. A atividade da enzima β -hexosaminidase no sobrenadante foi quantificada por fluorescência em um leitor de fluorescência para microplacas com comprimentos de onda de excitação e emissão iguais a 360 nm e 450 nm, respectivamente. A β -hexosaminidase liberada foi expressa como uma porcentagem da β -hexosaminidase total (Equação 1), determinada pelas células destruídas com Triton X-100.

$$\% \beta\text{-hexosaminidase} = \left(\frac{S - N}{T - N} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

S: Amostra - DNP-BSA (+); ausência e presença da substância natural.

N: Normal - DNP-BSA (-); amostra teste (-), ausência de células.

T: Total - DNP-BSA (+); amostra teste (-); em Triton-X-100

A liberação espontânea (controle) de β -hexosaminidase foi medida para eliminar componentes não-específicos da degranulação. A reação enzimática foi realizada na presença da solução Tyrode/BSA para eliminar as interferências causadas pela fluorescência do mesmo. A contribuição da amostra teste para a fluorescência foi avaliada separadamente e subtraída caso necessário. Os valores de IC_{50} (concentração da substância natural necessária para inibir 50% da degranulação) foram determinados por simulação das curvas de % β -hexosaminidase *versus* concentração da amostra teste pelo programa Origin 8.0, e comparados com o composto de referência fumarato de cetotifeno ($154 \pm 6 \mu\text{M}$). As substâncias naturais que apresentaram valores de IC_{50} próximos ou menores do que o IC_{50} do composto de referência foram selecionadas e submetidas aos demais ensaios.

Avaliação da viabilidade celular dos mastócitos na presença das substâncias naturais e do fármaco padrão

A avaliação da viabilidade dos mastócitos foi realizada pelo ensaio colorimétrico de MTT (MOSMANN, 1983).

Avaliação da inibição da atividade enzimática da β -hexosaminidase pelas substâncias naturais

A atividade da enzima β -hexosaminidase foi avaliada na presença das substâncias naturais selecionadas com a finalidade de investigar se a atividade observada ocorreu devido à inibição da liberação da β -hexosaminidase (degranulação) ou devido à inibição da enzima. Para isso, a β -hexosaminidase foi quantificada na presença das substâncias naturais, novamente, por meio da medida da intensidade de fluorescência do produto metilumbeliferona, obtendo curvas de % β -hexosaminidase *versus* concentração da substância natural.

Influência das substâncias naturais na ligação do anticorpo (IgE) aos receptores FcεRI

Para a investigação do potencial das substâncias testadas em inibir a ligação do anticorpo ao receptor, a qual seria uma outra via de inibição dos processos alérgicos, as células foram colocadas em contato com as substâncias naturais (diferentes concentrações), antes da sensibilização, com posterior adição do anticorpo e incubação. As células foram, então, lavadas e estimuladas pelo antígeno DNP-BSA, seguindo-se a quantificação da enzima β -hexosaminidase por meio da fluorescência da metilumbeliferona produzida.

O resultado positivo para a inibição da ligação do anticorpo (IgE) ao receptor FcεRI foi observado pela redução da porcentagem de β -hexosaminidase liberada. O fármaco fumarato de cetotifeno foi utilizado como controle positivo deste ensaio.

Influência das substâncias naturais na mobilização de cálcio intracelular

A mobilização de cálcio intracelular é uma das etapas fundamentais para a ocorrência da degranulação mastocitária. Portanto, o bloqueio da liberação de cálcio no citoplasma, assim como do influxo de cálcio de fora para dentro da célula, leva à inibição da liberação de β -hexosaminidase e dos mediadores químicos que levam às alergias. Assim, este estudo foi conduzido a fim de verificar se as substâncias naturais selecionadas comprometem a mobilização de cálcio. Para isso, foi utilizada a sonda para Ca^{2+} , Fluo 4-AM, a qual é um éster e se comporta como uma molécula hidrofóbica, conseguindo atravessar normalmente a membrana plasmática das células. No interior dessas, a sonda é hidrolisada pela ação de esterases específicas e adquire carga negativa. Nesta forma, a sonda perde a capacidade de atravessar a membrana e se complexa com o Ca^{2+} presente no interior celular, adquirindo propriedades fluorescentes. Foi empregada também a substância sulfinpirazona, visto que esta atua nos canais de cálcio na membrana celular e previne o extravasamento da sonda do interior das células.

Na cubeta do controle, as células sensibilizadas e carregadas com a sonda Fluo 4-AM foram estimuladas pelo antígeno DNP-BSA, levando à mobilização do Ca^{2+} intracelular e aumento da fluorescência, uma vez que mais Ca^{2+} estava disponível para se complexar com a sonda. Para verificar se as substâncias naturais atuavam impedindo a mobilização do Ca^{2+} , as células foram estimuladas na presença da substância natural de interesse na concentração correspondente ao IC_{50} (cubeta da amostra). Para cada substância obteve-se uma curva de fluorescência *versus* tempo, a partir das quais foi determinada a % de inibição da mobilização de cálcio. Os resultados obtidos foram comparados com o fármaco referência fumarato de

cetotifeno, visto que este atua, predominantemente, como estabilizador de mastócitos através da inibição da mobilização de Ca^{2+} (WATELET *et al.*, 2009).”

APÊNDICE 4 – Avaliação da atividade tripanocida dos extratos e frações

Os experimentos para a avaliação da atividade tripanocida foram realizados no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Formas tripomastigotas da cepa CL B5 foram obtidas do sobrenadante de cultivo celular do parasito. Então, o sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 suplementado e as formas tripomastigotas purificadas submetidas à contagem em hemocitômetro de Neubauer, para ajustar as quantidades de parasitas utilizadas nos procedimentos experimentais.

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Vega *et al*, 2005, na qual as formas do parasito foram mantidas em contato com várias concentrações das amostras, a partir de diluições de uma solução a 2 mg/ ml, em microplaca de 96 poços, a 4°C, durante 24 horas. Após este período, 50 µl da solução de CPRG (*chlorophenol red β -D-galactopyranoside*, 400 µM em 0.3% Triton X-100, pH 7,4) foi adicionado e a microplaca incubada a 37° C por 6 horas. A absorvância foi obtida em comprimento de onda de 570 nm.

Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (% AE) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% AE = \frac{AE - AEB}{AC - ACB} \times 100\%$$

Onde:

AE = absorvância dos poços tratados;

AEB = absorvância dos poços contendo meio e amostra;

AC = absorvância dos poços contendo controle negativo;

ACB = absorvância dos poços contendo meio de cultura.