



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



IQB

**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DAS FOLHAS E DO CAULE DA ESPÉCIE
Acacia langsdorfii Benth (LEGUMINOSACEAE).**

Natália Velasquez Oliveira

Orientador: Prof. Dr. **Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**

Maceió – Alagoas
Dezembro de 2009



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



**ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DAS FOLHAS E DO CAULE DA ESPÉCIE
Acacia langsdorfii Benth (LEGUMINOSACEAE).**

Natália Velasquez Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. **Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**

Maceió – Alagoas
Dezembro de 2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

O48e Oliveira, Natália Velasquez.
Estudo fitoquímico e da atividade biológica das folhas e do caule da espécie
Acacia langsdorfii Benth (Leguminosaceae) / Natália Velasquez Oliveira, 2009.
xii, 238 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. [221]-238.

1. *Acacia langsdorfii*. 2. Imunomoduladores. 3. Plasmodium falciparum
4. Fitoquímica. 5. Produtos naturais. I. Título.

CDU: 547.9




UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

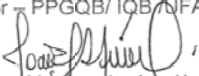



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax (82) 3214-1384
Email: cpgqb@qui.ufal.br


Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese de Doutorado de **Natália Velásquez Oliveira**, intitulada: "**Estudo Fitoquímico e da Atividade Biológica das Folhas e do Caule da Espécie *Acacia langsdorfii* Benth (Leguminosaceae)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 21 de dezembro de 2009, às 8h30min. na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

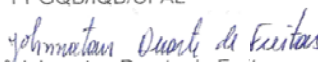
COMISSÃO JULGADORA


Prof.º Dr.º Antônio Euzébio Goulart Sat'Ana
Orientador - PPGQB/ IQB/UFAL


Prof.º Dr.º João Xavier de Araújo Júnior
EENFAR/PPGQB/UFAL


Prof.º Dr.º Charles dos Santos Estevam
DFS/CCBS//UFS


Prof.º Dr.º Edson de Souza Bento
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.º Dr.º Johnnatan Duarte de Freitas
IFAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pela orientação;

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Charles dos Santos Estevan, Prof. Dr. Edson de Souza Bento, Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior e Prof. Dr. Johnatan Duarte de Freitas pelo aceite.

Aos membros do exame de qualificação: Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Conserva, Prof. Dr. Edson de Souza Bento, Prof^ª. Dr^ª. Fabiane Caxico de Abreu e Prof. Dr. Johnatan Duarte de Freitas pelas sugestões.

Aos Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais e de Ressonância Magnética Nuclear do IQB da UFAL onde foram desenvolvidos os experimentos e análises;

Ao Centro de pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pelos resultados de algumas atividades biológicas;

Ao IMSEAR pelo material botânico concedido;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Abreviatura, Sigla e Símbolo.....	vi
Lista de Figura.....	vii
Lista de Tabela.....	x
Lista de Fluxograma.....	xi
Lista de Esquema.....	xii
Capítulo I. Introdução.....	1
I.1 – Breve histórico sobre a fitoterapia.....	2
I.2 – A importância da continuidade do estudo das plantas medicinais.....	5
I.3 – O elo entre o tema e a motivação a qual justificou o trabalho em questão.....	6
I.4 – Objetivos.....	8
I.4.1 – Gerais.....	8
I.4.2 – Específicos.....	8
I.5 – Considerações sobre a família Leguminosae, o gênero <i>Acacia</i> , a espécie <i>A. langsdorfii</i> e atividades biológicas.....	9
I.5.1 – A família Leguminosae.....	9
I.5.2 – O gênero <i>Acacia</i>	11
I.5.2.1 – A Atividades biológicas do gênero.....	12
I.5.2.1.1 – Compostos isolados em espécies do gênero <i>Acacia</i>	16
I.5.3 – A <i>Acacia langsdorfii</i> Benth.....	32
I.6 – Considerações sobre a Malária e as Imunopatologias.....	33
I.6.1 – A Malária.....	33
1.6.1.1. Agente etiológico: <i>Plasmodium SP</i>	34
1.6.1.2. Ciclo Biológico.....	35
1.6.1.3. Tratamento e perspectivas.....	36
I.6.2 – As imunopatologias.....	38
Capítulo II. Parte experimental.....	41
II.1 - Reagentes, solventes e equipamentos.....	42
II.2 - Composição Química dos reveladores.....	44
II.3 – Material Botânico.....	45
II.4 – Obtenção/Preparação dos extratos.....	45
II.4.1 – Extrato das folhas.....	45
II.4.2 – Extrato do caule.....	46
II.5 – Preparações das amostras para análises de RMN e IV.....	46
II.6 – Prospecção Fitoquímica.....	46
II.6.1 – Teste para fenóis e taninos.....	46
II.6.2 – Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	47
II.6.3 – Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e flavanonas.....	47
II.6.4 – Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	48
II.6.5 – Teste para esteróides e triterpenóides.....	48

II.6.6 – Teste para saponinas.....	48
II.6.7 – Teste para alcalóides.....	49
II.7 – Ensaios biológicos.....	50
II.7.1 – Avaliação da atividade Moluscicida.....	50
II.7.2 – Avaliação da atividade larvicida.....	50
II.7.3 – Avaliação da citotoxicidade , inibição de proliferação de <i>Plasmodium falciparum</i> , inibição da produção de óxido nítrico e da inibição de linfoproliferação.....	51
II.7.3.1 – Animais.....	51
II. 7.3.2 – Avaliação da citotoxicidade.....	51
II. 7.3.3 – Avaliação da inibição de proliferação de <i>P. falciparum</i>	52
II. 7.3.4 – Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico.....	53
II. 7.3.5 – Avaliação da inibição de linfoproliferação.....	54
II.8 – Isolamento dos Constituintes químicos da espécie <i>A.langsdorfii</i>	54
II.8.1 – Partição do extrato etanólico do caule.....	54
II.8.1.1 – Procedimento experimental efetuado com a fração hexano do caule.....	56
II.8.2 – Partição do extrato etanólico das folhas.....	68
II.8.2.1 – Procedimento experimental efetuado com a fração Hexano das folhas.....	70
Capítulo III. Resultados e Discussão.....	86
III.1 – Escolha das partes da planta selecionada.....	87
III.2 – Rendimento inicial do extrato bruto das folhas e caule e das suas frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica.....	87
III.3 – Escolha dos métodos de separação inicial do extrato bruto.....	88
III.4 – Prospecção fitoquímica.....	88
III.5 – Identificação estrutural das substâncias isoladas.....	91
III.5.1 – Identificação do esteróide.....	93
III.5.1.1 – Identificação da substância ALC-1.....	93
III.5.2 – Identificação dos triterpenos.....	109
III.5.2.1 – Triterpenos de esqueleto lupano.....	109
III.5.2.1.1 – Identificação do ALC-5.....	109
III.5.3 – Identificação dos diterpenos.....	120
III.5.3.1 – Identificação do ALCF-22.....	120
III.5.4 – Identificação dos flavonóides.....	133
III.5.4.1 – Identificação dos Flavan-3-óis.....	133
III.5.4.1.1 – Identificação do ALF-31.....	134
III.5.4.1.2 – Identificação do ALF-20.....	148
III.5.4.2 – Identificação da Flavanona.....	163
III.5.4.2.1 – Identificação do ALF-19.....	164
III.5.4.3 – Identificação do ALF-1.....	177
III.5.4.4 – Identificação do ALF-16.....	195
III.6 – Resultados dos Ensaios biológicos.....	206
III.6.1 – Avaliação da Atividade Moluscicida.....	206
III.6.2 – Avaliação da Atividade larvicida.....	206

III.6.3 – Resultados da citotoxicidade, inibição de proliferação de <i>P. falciparum</i> , produção de óxido nítrico e linfoproliferação.....	206
III.6.3.1 – Resultados da Avaliação da citotoxicidade.....	206
III.6.3.2 – Resultados da Avaliação da inibição de proliferação de <i>P. falciparum</i>	208
III.6.3.3 – Resultados da Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico.....	210
III.6.3.4 – Resultados da Avaliação da inibição de linfoproliferação.....	211
Capítulo IV. Conclusões.....	216
Capítulo V. Perspectivas.....	219
Capítulo VI. Referências Bibliográficas.....	221

RESUMO

A espécie *Acacia langsdorfii* Benth é uma árvore com distribuição geográfica escassa não ocorrendo registro na literatura quanto às suas propriedades fármaco-terapêuticas. O gênero *Acacia* é o segundo maior na família Leguminosae e é considerado um dos maiores nas Angiospermas, apresentando mais de 1.200 espécies apresentando caráter cosmopolita e típico de regiões quentes semi-áridas distribuídas em regiões quentes tropicais e temperadas de todo o mundo. O objetivo deste trabalho é contribuir para o conhecimento da composição química e da atividade biológica dos extratos oriundos da folha e do caule da espécie *Acacia langsdorfii* Benth, até então não estudada. Diversas espécies de *Acacia* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento das mais diferentes patologias. Porém, Não há registro na literatura quanto às propriedades fármaco-terapêuticas desta espécie, apenas sabe-se que seus extratos apresentaram atividade imunomoduladora e tripanocida. Da fração de hexano do caule foram isolados, por métodos cromatográficos, um esteróide e um triterpenóide, os quais foram identificados como sendo estigmasterol e lupeol, respectivamente. Também foi isolado e purificado uma mistura contendo triterpenóides da série lupano (onde um é o lupeol). Da fração hexânica das folhas foi isolado e purificado um diterpenóide e um triterpenóide, os quais foram identificados como sendo *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol e lupeol, respectivamente. Além disso, da fração acetato de etila das folhas foi isolado e purificado por cromatografia em coluna dois flavan-3-óis, uma flavanona e duas flavonas as quais foram identificadas por técnicas espectroscópicas como sendo catequina, epicatequina, naringenina, 4'-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona e morina 3-*O*-rutinosídeo respectivamente. A morina 3-*O*-rutinosídeo é o constituinte químico majoritário desta fração. As estruturas foram identificadas com o uso de técnicas espectroscópicas de IV, RMN 1D e 2D (H^1 , C^{13} , DEPT 90°, DEPT 135°, COSY, HSQC, HMBC e NOESY) e espectrométrica (EM), além de determinações do ponto de fusão, rotação óptica e comparações com dados da literatura. As substâncias *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol, morina 3-*O*-rutinosídeo, 4'-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona foram relatadas pela primeira vez no gênero. As frações oriundas do hexano, tanto do caule como em folhas, apresenta um alto índice (> 90%) de atividade inibidora da proliferação do *Plasmodium falciparum*. As frações obtidas da partição do extrato em etanol das folhas e caule da *A. langsdorfii* apresentaram uma alta inibição da linfoproliferação (>80%).

Palavras-chave: *Acacia langsdorfii*, fitoquímica, imunomoluladores, *Plasmodium falciparum*

ABSTRACT

The species *Acacia langsdorfii* Benth is a tree with scarce geographical distribution not happening report in the literature regarding pharmacotherapeutics properties. The genus *Acacia* is the largest second in the family Leguminosae and one of the largest is considered in Angiospermas, presenting more of 1.200 species presenting cosmopolitan and typical character of semi-arid hot areas distributed in tropical and temperate hot areas of everyone. The objective of this work is to contribute to the knowledge of chemical composition and biological activity of extracts derived from the leaf and stem of *Acacia langsdorfii* Benth, hitherto not studied. Several species of *Acacia* are used traditionally for the treatment of many different diseases. However, of this species, only known to their extracts show immunomodulatory activity and trypanocidal. From the hexane fraction of the stem, was isolated, by chromatographic methods, a steroid and a triterpenoid which were identified as stigmasterol and lupeol, respectively. It was isolated and purified a mixture of triterpenoid of the lupane series (where one is lupeol). The lupeol is the chemical constituent majority. From the Hexane fraction of leaves, was isolated and purified a diterpenoid and triterpenoid, which were identified as *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol and lupeol, respectively. The lupeol is the chemical constituent majority. In addition, from the ethyl acetate fraction of leaves was isolated and purified by column chromatography, two flavan-3-ols, one flavanone and two flavones which were identified by spectroscopic techniques such as catechin, epicatechin, naringenin, 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavone and morin-3-*O*-rutinoside, respectively. The morin-3-*O*-rutinoside is the chemical constituent majority of this fraction. The structures were identified using spectroscopic techniques of IR, MS, 1D and 2D NMR (^1H , ^{13}C , DEPT 90°, 135°, DEPT, COSY, HSQC, HMBC and NOESY), and determinations of the melting point, rotation optical and comparisons with literature data. Substances *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol, morin-3-*O*-rutinoside, 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavone were first reported in the genus. The hexane fractions derived from both the stem and leafs showed a high rate (> 90%) inhibits activity the proliferation of *Plasmodium falciparum*. The fractions derived from both the stem and leafs showed a high rate (> 80%) inhibits activity the linfoproliferation.

Keywords: *Acacia langsdorfii*, Phytochemistry, immunomodulatory, *Plasmodium falciparum*

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLA E SÍMBOLO

δ	Deslocamento químico
°C	Graus centígrados
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
COSY	Correlation Spectroscopy
cm	Centímetro
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
g	Gramma
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Simple Quantun Coherence
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m/z	Relação massa/carga
Me	Metila
MHz	Megahertz
mg	Miligramas
M^+	Pico do íon molecular
mL	Mililitros
m	Multiplete
μ L	Microlitros
μ Ci	
nm	Nanômetro
NOE	Nuclear overhauser effect
NOESY	Nuclear overhauser effect Spectroscopy
OMS	Organização Mundial de Saúde
PF	Ponto de fusão
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
ν	Frequência de Estiramento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Novas Entidades Químicas, classificadas de acordo com a fonte – período 1981-2002. Fonte: Newman (2003).	3
Figura 2 – Distribuição mundial da família Leguminosae em 4 diferentes tipos de biomas: Deserto, Savana, floresta tropical úmida, Temperado. (www.biogeoglegs.edu/annex2/map_28/04/2009).	9
Figura 3 – Distribuição do gênero <i>Acacia</i> no mundo (MASLIN <i>et al.</i> 2003).	11
Figura 4: A: Detalhe de um Ramo com Folhas, B: Detalhe da Casca do tronco da Árvore. (http://umbuzeiro.cnip.org.br/fotoweb/Grid.fwx?folderid=5000&search=(IPTC025%20contains%20(Acacia%20langsdorfii))) 26/10/2006	32
Figura 5: Ilustração das áreas de risco para malária no mundo. Fonte: WHO 2006	34
Figura 6: Antimaláricos isolados de fontes naturais	36
Figura 7: Substâncias isoladas do caule e das folhas da <i>A. langsdorfii</i> .	91
Figura 8: Espectro da substância ALC-1 na região do Infra-vermelho	93
Figura 9: Espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALC-1	94
Figura 10: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALC-1	94
Figura 11: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALC-1	95
Figura 12: Espectro de RMN ¹³ C em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-1	96
Figura 13: Expansão do espectro de RMN ¹³ C em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-1	96
Figura 14: Espectro DEPT 135° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-1	97
Figura 15: Expansão do espectro DEPT 135° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-1	97
Figura 16: Espectro DEPT 90° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-1	98
Figura 17: Expansão do espectro DEPT 90° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-1	98
Figura 18: Estigmasterol	99
Figura 19: Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-1	99
Figura 20: Expansão do mapa de contornos HSQC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-1	100
Figura 21: Mapa de contornos COSY em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, do composto ALC-1	101
Figura 22: Expansão do mapa de contornos COSY em ¹ H: 400 MHz, do ALC-1	101
Figura 23: Mapa de contornos HMBC em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-1	102
Figura 24: Expansão do mapa de contornos HMBC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-1	102
Figura 25: Expansão do mapa de contornos HMBC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-1	103
Figura 26: Expansão do mapa de contornos HMBC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-1	103
Figura 27: Expansão do mapa de contornos HMBC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-1	103
Figura 28: Mapa de contornos NOESY em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, do composto ALC-1	105
Figura 29: Estrutura do Estigmasterol (ALC-1)	105
Figura 30: Espectro de massas da substância ALC-1	106
Figura 31: Espectro da substância ALC-5 na região do Infra-vermelho	110
Figura 32: Espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALC-5	110
Figura 33: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALC-5	111
Figura 34: Espectro de C ¹³ em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-5	112
Figura 35: Expansão do espectro de C ¹³ em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-5	113
Figura 36: Espectro DEPT 135° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-5	113
Figura 37: Expansão do espectro DEPT 135° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-5	114
Figura 38: Espectro DEPT 90° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-5	114
Figura 39: Expansão do espectro DEPT 90° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALC-5	115
Figura 40: Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-5	116
Figura 41: Expansão do mapa de contornos HSQC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALC-5	116
Figura 42: Estrutura do Lupeol (ALC-5)	117
Figura 43: Espectro de massas da substância ALC-5	117
Figura 44: Espectro da substância ALCF-22 na região do Infra-vermelho	120
Figura 45: Espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALCF-22	121
Figura 46: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALCF-22	121
Figura 47: Espectro de RMN ¹³ C em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALCF-22	122
Figura 48: Expansão do espectro de RMN ¹³ C em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALCF-22	122

Figura 49: Espectro DEPT 135° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALCF-22	123
Figura 50: Espectro DEPT 135° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALCF-22	124
Figura 51: Espectro DEPT 90° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALCF-22	124
Figura 52: Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALCF-22	125
Figura 53: Mapa de contornos COSY em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, do composto ALCF-22	126
Figura 54: Expansão do mapa de contornos COSY ¹ H: 400 MHz, do ALCF-22	126
Figura 55: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALCF-22	127
Figura 56: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALCF-22	128
Figura 57: <i>ent</i> -atisan-7 α ,16 α -diol	128
Figura 58: Mapa de contornos NOESY em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, do composto ALCF-22	129
Figura 59: Espectro de massas da substância ALCF-22 por ionização química a 70eV	130
Figura 60: Espectro da substância ALF-31 na região do Infra-vermelho	134
Figura 61: Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ COCD ₃ , 400 MHz, do composto ALF-31	135
Figura 62: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ COCD ₃ , 400 MHz, do composto ALF-31	136
Figura 63: Espectro COSY em CD ₃ COCD ₃ , ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-31	136
Figura 64: Expansão do espectro COSY em CD ₃ COCD ₃ , ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-31	137
Figura 65: Espectro de RMN ¹³ C em CD ₃ COCD ₃ , 100 MHz, do composto ALF-31	138
Figura 66: Expansão do espectro de RMN ¹³ C em CD ₃ COCD ₃ , 100 MHz, do composto ALF-31	138
Figura 67: Espectro DEPT 135° em CD ₃ COCD ₃ , 100 MHz, do composto ALF-31	139
Figura 68: Expansão do espectro DEPT 135° em CD ₃ COCD ₃ , 100 MHz, do composto ALF-31	139
Figura 69: Espectro DEPT 90° em CD ₃ COCD ₃ , 100 MHz, do composto ALF-31	140
Figura 70: Expansão do espectro DEPT 90° em CD ₃ COCD ₃ , 100 MHz, do composto ALF-31	140
Figura 71: Mapa de contornos HSQC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-31	141
Figura 72: Expansão do mapa de contornos HSQC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-31	141
Figura 73: Catequina	142
Figura 74: Mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-31	
Figura 75: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-31	143
Figura 76: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-31	143
Figura 77: Mapa de contornos NOESY em CD ₃ COCD ₃ , ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-31	144
Figura 78: Expansão do mapa de contornos NOESY em CD ₃ COCD ₃ , ¹ H: 400 MHz, do ALF-31	144
Figura 79: Espectro de massas da substância ALF-31 por ionização química a 70eV	145
Figura 80: Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-20	148
Figura 81: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-20	149
Figura 82: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-20	150
Figura 83: Mapa de contornos COSY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-20	150
Figura 84: Expansão do mapa de contornos COSY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do ALF-20	151
Figura 85: Espectro de RMN ¹³ C em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-20	152
Figura 86: Expansão do espectro de RMN ¹³ C em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-20	152
Figura 87: Espectro DEPT 135° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-20	153
Figura 88: Expansão do espectro DEPT 135° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-20	153
Figura 89: Espectro DEPT 90° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-20	154
Figura 90: Expansão do espectro DEPT 90° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-20	154
Figura 91: Mapa de contornos HSQC em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-20	155
Figura 92: Expansão do mapa de contornos HSQC em ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-20	156
Figura 93: Epicatequina	156
Figura 94: Mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-20	157
Figura 95: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-20	157
Figura 96: Mapa de contornos NOESY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-20	158
Figura 97: Expansão do mapa de contornos NOESY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do ALF-20	158
Figura 98: Espectro de massas da substância ALF-20 por ionização química a 70eV	160
Figura 99: Espectro da substância ALF-19 na região do Infra-vermelho	165
Figura 100: Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-19	165
Figura 101: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-19	166
Figura 102: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-19	167

Figura 103: Espectro de RMN ¹³ C em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-19	168
Figura 104: Espectro DEPT 135° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-19	169
Figura 105: Espectro DEPT 90° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-19	169
Figura 106: Expansão do espectro DEPT 90° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-19	170
Figura 107: Naringenina	170
Figura 108: Mapa de contornos HSQC em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-19	171
Figura 109: Mapa de contornos COSY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-19	171
Figura 110: Mapa de contornos HMBC em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-19	172
Figura 111: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-19	172
Figura 112: Mapa de contornos NOESY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-19	173
Figura 113: Estrutura da Naringenina (ALF-19)	174
Figura 114: Espectro de massas da substância ALF-19 por ionização química a 70eV	174
Figura 115: Espectro da substância ALF-1 na região do Infra-vermelho	177
Figura 116: Espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-1	178
Figura 117: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-1	179
Figura 118: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-1	180
Figura 119: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-1	180
Figura 120: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CD ₃ OD, 400 MHz, do composto ALF-1	181
Figura 121: Espectro de RMN ¹³ C em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	182
Figura 122: Expansão do espectro de RMN ¹³ C em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	182
Figura 123: Espectro DEPT 90° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	183
Figura 124: Expansão do espectro DEPT 90° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	183
Figura 125: Expansão do espectro DEPT 90° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	184
Figura 126: Espectro DEPT 135° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	184
Figura 127: Expansão do espectro DEPT 135° em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	185
Figura 128: Mapa de contornos HSQC em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-1	186
Figura 129: Expansão do mapa de contornos HSQC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-1	186
Figura 130: Mapa de contornos COSY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-1	187
Figura 131: Expansão do espectro COSY em CD ₃ OD, 100 MHz, do composto ALF-1	187
Figura 132: Mapa de contornos HMBC em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-1	188
Figura 133: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-1	189
Figura 134: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-1	189
Figura 135: Mapa de contornos NOESY em CD ₃ OD, ¹ H: 400 MHz, do composto ALF-1	190
Figura 136: Morina 3- <i>O</i> -rutenosídeo	191
Figura 137: Espectro de massas da substância ALF-1 por ionização química a 70eV	191
Figura 138: Espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALF-16	195
Figura 139: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALF-16	196
Figura 140: Expansão do espectro de RMN ¹ H em CDCl ₃ , 400 MHz, do composto ALF-16	196
Figura 141: Espectro de RMN ¹³ C em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALF-16	197
Figura 142: Expansão do espectro de RMN ¹³ C em CDCl ₃ , 100 MHz, do ALF-16	197
Figura 143: Espectro DEPT 90° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALF-16	198
Figura 144: Espectro DEPT 135° em CDCl ₃ , 100 MHz, do composto ALF-16	198
Figura 145: Mapa de contornos HSQC em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-16	199
Figura 146: Mapa de contornos COSY em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, do ALF-16	200
Figura 147: Mapa de contornos HMBC em CDCl ₃ , ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-16	200
Figura 148: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-16	201
Figura 149: Expansão do mapa de contornos HMBC ¹ H: 400 MHz, ¹³ C: 100 MHz, do ALF-16	201
Figura 150: 4'-hidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona	202
Figura 151: Espectro de massas da substância ALF-16 por ionização química a 70eV	202

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas relatadas em espécies do gênero <i>Acacia</i>	13
Tabela 2. Compostos isolados em espécies do gênero <i>Acacia</i>	17
Tabela 3 – Filtração da fração C-1.1.2 proveniente da filtração da fração C -1.1	58
Tabela 4 – Cromatografia da fração C-1.2.2 proveniente da filtração da fração C-1.2	60
Tabela 5 – Cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2	62
Tabela 6 – Cromatografia da fração 7-8 proveniente da coluna da fração C-1.2.6	63
Tabela 7 – Cromatografia da fração 9 proveniente da coluna da fração C-1.2.6	64
Tabela 8 – Cromatografia da fração 10 proveniente da coluna da fração C-1.2.6	65
Tabela 9 – Cromatografia da fração C-1.2.7 proveniente da filtração da fração C-1.2	67
Tabela 10 – Cromatografia da fração F-1.2 proveniente da filtração da fração Hexano	71
Tabela 11 – Cromatografia da fração 3-5 proveniente da filtração da fração F-1.2	72
Tabela 12– Cromatografia da fração 6-8 proveniente da filtração da fração F-1.2	73
Tabela 13 – Cromatografia da fração F -1.6.2 proveniente da filtração da fração F-1.6	75
Tabela 14 – Cromatografia da fração F-3.1 proveniente da filtração da fração F-3	77
Tabela 15 – Cromatografia da fração F-3.2.5 proveniente da filtração da fração F -3.2	79
Tabela 16 – Cromatografia da subfração 58-82 proveniente da fração F-3.2.5	79
Tabela 17 – Cromatografia da fração F-3.8 proveniente da filtração da fração F-3	85
Tabela 18 – Rendimentos percentuais das frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica	87
Tabela 19. Compostos detectados no extrato e nas frações das folhas da <i>A. langsdorfii</i>	90
Tabela 20: RMN do composto ALC-1 em CDCl_3 , deslocamento em δ	108
Tabela 21: RMN do composto ALC-5 em CDCl_3 , deslocamento em δ	119
Tabela 22: RMN do composto ALCF-22 em CDCl_3 , deslocamento em δ	132
Tabela 23: RMN do composto ALF-31 em CD_3COCD_3 , deslocamento em δ	147
Tabela 24: Comparação entre ALF-20, ALF-31	161
Tabela 25: RMN do composto ALF-20 em MeOD, deslocamento em δ	162
Tabela 26: RMN do composto ALF-19 em MeOD, deslocamento em δ	176
Tabela 27: RMN do composto ALF-1 em MeOD, deslocamento em δ	194
Tabela 28: RMN do composto ALF-16 em CDCl_3 , deslocamento em δ	204
Tabela 29: Atividade citotóxica com resultado de ensaio de citotoxicidade a 0,1mg/mL	207
Tabela 30: Atividade da inibição de proliferação de <i>P. falciparum</i>	208
Tabela 31: Atividade da inibição de produção de óxido nítrico com resultado de ensaio somente apresentado a 0,1mg/mL	210
Tabela 32: Atividade da inibição da linfoproliferação com resultado de ensaio somente apresentado a 0,1 mg/mL	212

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Extração e partição do extrato etanólico do caule da <i>A. langsdorfii</i>	55
Fluxograma 2 - Filtração em gel de sílica da fração Hexano C -1	56
Fluxograma 3 - Filtração em gel de sílica da fração C-1.1	57
Fluxograma 4 - Filtração em gel de sílica da fração C-1.2	59
Fluxograma 5 – Extração e partição do extrato etanólico das folhas da <i>A. langsdorfii</i> .	69
Fluxograma 6 - Filtração em gel de sílica da fração hexano F -1	70
Fluxograma 7 - Filtração em gel de sílica da fração F -1.6	74
Fluxograma 8 - Filtração em gel de sílica da fração acetato de etila F-3	76
Fluxograma 9 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.2	78
Fluxograma 10 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.5	80
Fluxograma 11 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.5.5	81
Fluxograma 12 - Filtração em gel de sílica da fração F-3.6	82
Fluxograma 13 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.7	83

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Prováveis caminhos de fragmentação de ALC-1	107
Esquema 2: Prováveis caminhos de fragmentação de ALC-5	118
Esquema 3: Prováveis caminhos de fragmentação de ALCF-22	130
Esquema 4: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-31	146
Esquema 5: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-20	159
Esquema 6: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-19	175
Esquema 7: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-1	192
Esquema 8: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-16	203

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

Capítulo I. Introdução

I.1 – Breve histórico sobre a fitoterapia

O uso de plantas para suprir as necessidades humanas de medicamentos é provavelmente tão antigo quanto à própria humanidade. Encontram-se registros datados de 2500 a.C., assim como na Medicina Tradicional Chinesa, podendo ser considerada a primeira prática medicinal (DI STASI, 1995; MACIOCIA *et al*, 1996).

Desenvolvida no ocidente, a medicina hipocrática, tem sua origem em uma antiga tradição grega de cura, onde era considerada essencialmente um processo espiritual associado a muitas deidades. Uma das deidades mais antigas era Hygeia (saúde), filha de Asclépio (visco) e irmã de Panakeia (panacéia). Hygeia simbolizava a prevenção e a Panakeia o conhecimento dos remédios derivados das plantas ou da terra. Desde então, as enfermidades passaram a ser consideradas fenômenos naturais possíveis de serem estudados até sua associação definitiva com uma cura (CAPRA, 1982).

Na Bíblia consta: “não continueis a beber somente água; usa um pouco de vinho, por causa do teu estômago e das tuas frequentes enfermidades” (I Tm 5:23), relatando a busca e a necessidade da cura para as doenças, onde o homem tenta encontrar nas plantas medicinais, uma das principais fontes de alternativas terapêuticas para aliviar as enfermidades. E, no curso da história da humanidade, a utilização de plantas medicinais sempre se fez continuamente presente.

Com a carência de alternativas terapêuticas, em decorrência da deficiência da pesquisa científica, as plantas chegaram ao século XX como a principal fonte medicamentosa da época. Em suas farmacopéias, o conteúdo era predominado pelas monografias de drogas vegetais, envolvendo mais de 200 espécies destas (VERPOORTE, 1999).

O isolamento da morfina em 1806 deflagrou uma onda de pesquisas que, resultaram no isolamento e aplicação terapêutica de centenas de novas entidades químicas a partir de plantas mantendo os produtos naturais como a principal fonte de medicamentos (SEIDL, 2002). De acordo com NEWMAN (2003), 23% das 1.031 novas entidades químicas, introduzidas no mercado entre 1981-2002, vieram de fontes naturais, 20% foram substâncias sintetizadas a partir da observação de produtos naturais e 5% derivados de fontes naturais sem alterações, conforme mostrado na Figura 1.

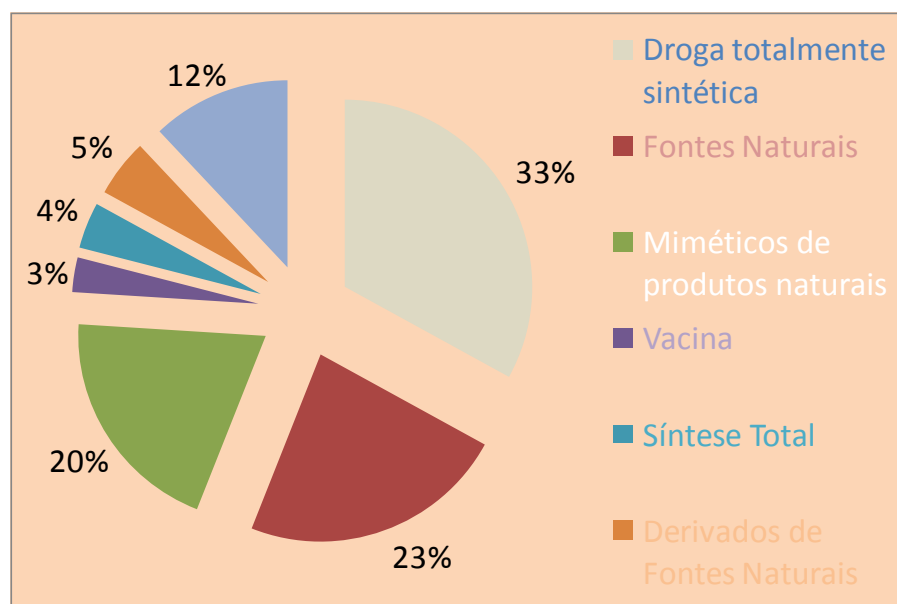


Figura 1: Novas Entidades Químicas, classificadas de acordo com a fonte – período 1981-2002. Fonte: Newman (2003).

No decorrer do século XX, o desenvolvimento da medicina científica nas áreas de farmacologia, fisiologia e química e a ascensão da indústria farmacêutica fizeram com que o uso das plantas medicinais ficasse restrito à obtenção de substâncias ativas purificadas ou seus derivados semi-sintéticos. O impulso tecnológico, gerado pelos investimentos estrangeiros durante a segunda guerra mundial, proporcionou o surgimento de novos medicamentos que superavam os fitoterápicos, particularmente nas patologias graves (DI STASI *et al.*, 2002).

Em torno das fantásticas descobertas dos medicamentos sintéticos, um mito era criado, onde a cura das doenças era uma questão de tempo porque cada nova substância elucidada superava a anterior. Acreditava-se que todos os problemas de doenças, anteriormente sem solução tinham chegado ao término. A descoberta dessas novas substâncias sintéticas praticamente eliminou o uso de plantas medicinais na terapêutica, limitando sua utilização às populações de poucos recursos financeiros ou alheios aos desenvolvimentos dos grandes centros (DREYFUS, *et al.*, 1994).

No Brasil, este momento foi marcado pela desnacionalização dos laboratórios farmacêuticos durante a década de 50. O interesse das multinacionais era de criar um mercado consumidor não só dos produtos acabados, mas também das matérias-primas sintéticas, produtos de química fina, importados e por elas produzidos (VALLE *et al.*, 1978).

Apesar das expectativas geradas, os fármacos sintéticos não corresponderam à garantia da terapia segura e eficaz que prometia. Logo, um descontentamento era observado entre os

usuários. Algumas doenças continuavam sem solução, e surgia também uma nova patologia: o efeito colateral, em paralelo ao alto custo desses medicamentos (BALANDRIN *et al.*, 1993).

No entanto, mesmo depois do avanço tecnológico da indústria farmacêutica ocorrido na década de 60, não foram feitos investimentos em pesquisas sobre extratos de plantas medicinais, porque estas eram consideradas ultrapassadas, não possuindo tecnologia agregada e posologia imprecisa (PINTO *et al.*, 2002).

Diante desses problemas, a OMS destacou na reunião de 1978 a contribuição das plantas medicinais na terapêutica, válidas para diversas patologias, recomendando, a nível mundial, a difusão dos conhecimentos necessários à sua prática (PINTO *et al.*, 2002).

A partir de então, percebe-se o ressurgimento da utilização de plantas medicinais, bem como o interesse da comunidade científica por produtos fitoterápicos e as discussões em termos de legislação a fim de atender as novas exigências da política de fitoterápicos e da sua regulamentação. Exigências essas que assegurem a qualidade total da transformação da matéria-prima vegetal em uma forma farmacêutica, envolvendo conhecimentos multidisciplinares (PINTO *et al.*, 2002).

No Brasil, a primeira menção do ponto de vista de legislação sobre o emprego de fitoterápicos como medicamento só aconteceu em 1967. No entanto, a abordagem de fitoterápico como “produto natural” permitiu a disseminação de um pensamento errôneo quanto ao uso destes que excluía a possibilidade de existir na planta uma substância ou um conjunto de substâncias tóxicas que podem provocar alergia, intoxicação ou outras reações adversas, que se estende até os dias de hoje. Enquanto isso, estes conceitos foram sendo levemente modificados quando a Alemanha, no final da década de 80, lançou alguns medicamentos à base de *Ginkgo biloba*, com ações benéficas importantes (CARVALHO *et al.*, 2008).

Nesta mesma década, os fitoterápicos no Brasil foram incluídos no sistema Oficial de Saúde, de maneira tímida, como terapias alternativas (BRASIL, 1988). A proibição do uso do confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações para uso interno e a comercialização do cambará (*Lantana sp.*), tanto *in natura* como sob todas as formas farmacêuticas e os relatórios de avaliações técnicas referentes à toxicidade, desencadearam um processo de regulamentação dos fitoterápicos como medicamentos, logo, a ideia de atoxicidade estava perdendo sua veracidade. Em consequência disto, o Ministério da Saúde estabeleceu a normatização sobre o controle de serviços, a produção, a armazenagem e a utilização de substâncias e produtos, elaborando a portaria número 123 de 19 de outubro de 1994 da secretaria de Vigilância

Sanitária (SVS) do Ministério da Saúde (BRASIL, 1995; CARVALHO *et al.*, 2007; MARQUES *et al.*, 2003).

A portaria número 123/ SVS foi submetida à consultoria pública, propondo a regulamentação do registro de produtos fitoterápicos, com um prazo para apresentação de sugestão por todos os setores da sociedade. Após avaliação da sugestão pública apresentada, definiu-se pelo formato final da norma e publicação da portaria número 6/ SVS de 31 de janeiro de 1995 (BRASIL, 1995).

Essa, por sua vez, relata que fitoterápico é um medicamento obtido de uma droga vegetal e, como tal, deve ser produzido segundo o rigor que todo medicamento exige, pois “é um produto tecnologicamente obtido, caracterizado pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade e pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso” (BRASIL, 1995).

A portaria 116/SVS, de 08 de agosto de 1996, aborda as especificações dos ensaios toxicológicos e da eficácia terapêutica (BRASIL, 1996). Outras portarias foram publicadas em complementação às anteriores.

Mais recentemente, a resolução da Agência Nacional da Vigilância Sanitária, RDC nº17, de 24 de fevereiro de 2000, tratou da revogação da portaria nº. 6/SVS e da regulamentação técnica, visando normatizar o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância (BRASIL, 2000).

I.2 – A importância da continuidade do estudo das plantas medicinais

Segundo GRÜNWALD (2004), o mercado mundial de fitoterápicos corresponde a cerca de 5% do mercado global de produtos farmacêuticos. No Brasil, a fatia desse mercado corresponde a 4%, sendo que a maioria dos nossos fitoterápicos está baseada na medicina popular, requerendo um maior desenvolvimento nas áreas tecnológicas e farmacológicas. De acordo com as perspectivas, há uma exigência natural deste mercado priorizando qualidade, segurança e eficácia terapêutica.

A organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que 80% da população dos países em desenvolvimento utiliza-se de práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde. Deste universo, 85% utilizam plantas ou preparados. (www.portal.saude.gov.br/saude/ 28/04/2009).

Estima-se que menos de 10% dos gastos globais em pesquisa em saúde são direcionados para doenças que representam cerca de 90% dos problemas de saúde globais. Esta deficiência no investimento tem contribuído para a limitada disponibilidade de drogas para o tratamento das doenças que acometem principalmente os indivíduos de países em

desenvolvimento, além disso, o setor privado investe quase que exclusivamente no desenvolvimento de drogas voltadas para o tratamento de patologias comuns em países desenvolvidos (MOREL, 2003).

No Brasil, 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (GUERRA *et al.*, 2001). Considera-se também que as vendas neste setor crescem 10% ao ano, com estimativa de terem alcançado a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (KNAPP, 2001). Os Estados Unidos e Alemanha estão entre os maiores consumidores dos produtos naturais brasileiros. Entre 1994 e 1998, importaram, respectivamente, 1.521 e 1.466 toneladas de plantas que seguem para esses países sob o rótulo genérico de “material vegetal do Brasil”, de acordo com o IBAMA.

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo, contando com um total de 55 mil espécies catalogadas que varia entre 250-500 mil espécies de plantas existentes na flora mundial, entretanto, apenas 8% desta flora foi estudada para as pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais, deixando claro o arsenal ainda inexplorado das plantas como fonte de novas drogas (GUERRA *et al.*, 2001).

A potencialidade do uso das plantas medicinais encontra-se longe de sua limitação. Afirmção endossada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico baseados nos recursos renováveis. Novos conhecimentos e soluções certamente serão encontrados no reino vegetal, por meio da descoberta e do desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica. A partir disso poder-se-á chegar à elucidação do mecanismo de ação das substâncias ativas, tornando a investigação destas plantas ainda mais relevante, especialmente na obtenção de seus derivados mais potentes e menos tóxicos. É importante lembrar que hoje essas plantas não são apenas matérias-primas de utilização direta, mas também, a base para os medicamentos padronizados.

I.3 – O elo entre o tema e a motivação a qual justificou o trabalho em questão

O semi-árido nordestino, com aproximadamente 1,0 milhão de km², conta com uma variedade de mais de 596 espécies arbustivas e arbóreas, 1.788 espécies herbáceas, sendo pelo menos 180 espécies endêmicas já catalogadas (ESTEVAM, 2006). Segundo registros literários, sua população é caracterizada por utilizar plantas nativas para fins medicinais desde a época da colonização (MENDES, 1997). Cultura a qual se prolonga até hoje, com o uso de plantas para estes fins ainda bastante ressaltado, principalmente nas populações de baixa

renda, para a qual é difícil o acesso aos grandes centros urbanos e a tradição cultural marcante torna o uso desta alternativa uma prática a ser mantida entre gerações.

Alguns exemplos de plantas locais, onde a maioria continua nomeada apenas com seu nome vulgar, como a faveleira, a jurema-preta, a aroeira, o angico, a baraúna, o marmeleiro, o mofumbo, a catingueira, a umburana, o joazeiro, o mororó e o pereiro, ainda são utilizadas em inflamações simples, cicatrização de ferimentos, contusões e, até, para o tratamento de doenças como tuberculose, infecções pulmonares, intestinais e diabetes (PEREIRA, 2005). No entanto, apesar da flora nordestina apresentar bom prestígio na medicina popular, até agora foi muito pouco estudada cientificamente.

Outro fator importante é o pouco incentivo governamental como também poucas instituições não governamentais interessadas neste desenvolvimento. O projeto IMSEAR investiga as espécies vegetais nativas ou endêmicas do semi-árido, partindo de um bom planejamento etnofarmacológico reduzindo tempo e custos de pesquisa. Em suma, envolve um trabalho integrado entre a etnobotânica, farmacologia e fitoquímica e envolve as instituições FIOCRUZ, UFBA, UFPB, UFAL, UEFS no estudo das plantas medicinais.

I.4 – Objetivos

I.4.1 – Gerais

Contribuir para o conhecimento da composição química e da atividade biológica dos extratos oriundos da folha e do caule da espécie *Acacia langsdorfii* Benth, até então, não estudada.

I.4.2 – Específicos

- Realizar isolamento e a caracterização química de seus constituintes;
- Relacionar resultados das atividades biológicas com os compostos isolados;
- Verificar a atividade moluscicida com o caramujo *Biomphalaria glabrata* e larvicida frente à larva do mosquito *Aedes aegypti* dos extratos brutos e particionados da folha e do caule;
- Contribuir com o projeto IMSEAR obtendo isolados passíveis de serem responsáveis por suas atividades detectadas*.

*O Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LaPqRN) faz parte do IMSEAR e dentre as plantas selecionadas para o estudo com base na atividade antimalárica, tripanocida e imunomoduladora no programa encontrava-se a *A. langsdorfii* Benth. Deste modo era essencial seu estudo fitoquímico na busca de seus princípios ativos.

I.5 – Considerações sobre a família Leguminosae, o gênero *Acacia*, a espécie *A. langsdorfii* e atividades biológicas

I.5.1 – A família Leguminosae

A família Leguminosae Juss. ou Fabaceae Lindl. (*sensu* APG II) pertence à divisão das Angiospermas, classe Dicotiledônea e da ordem das Rosales. Dentre as dicotiledôneas, a família Leguminosae (Fabaceae) é a terceira maior, sendo superada apenas por Asteraceae e Orchidaceae, e é a maior família dentro da ordem Rosales (DOYLE; LUCKOW, 2003). São plantas de hábito muito variado, desde árvores grandes das matas tropicais, a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e também muitas trepadeiras (**Figura 2**). Desenvolvem-se nos mais variados ambientes, em diferentes latitudes e altitudes (ARROYO, 1979; HEYWOOD, 1996).

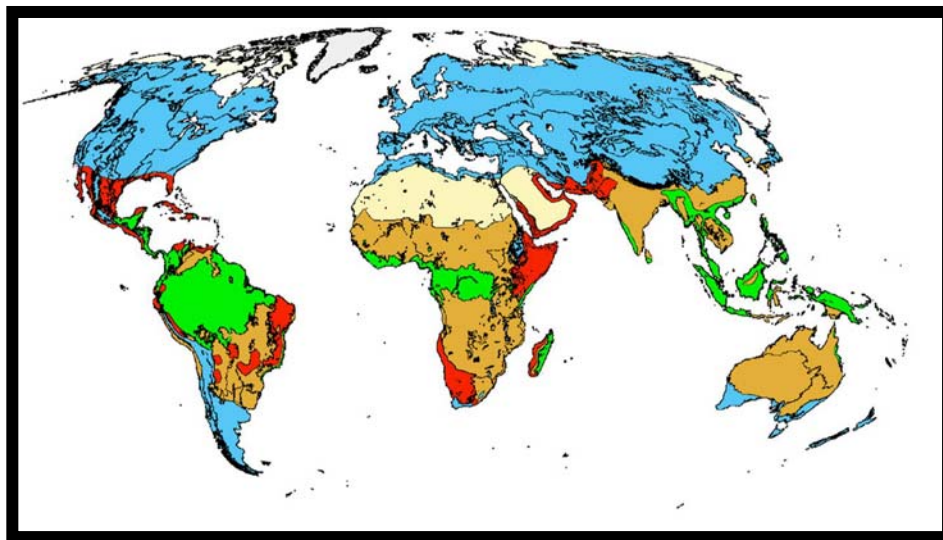


Figura 2 – Distribuição mundial da família Leguminosae em 4 diferentes tipos de biomas: Deserto, Savana, floresta tropical úmida, Temperado. (www.biogeoglegs.edu/annex2/map 28/04/2009).

Compreende cerca de 19000 espécies reunidas em mais de 900 gêneros distribuídos mundialmente, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (GIULIETTI *et al.*, 2006; LEWIS *et al.*, 2005; WINK *et al.*, 2003), sendo depois das Gramineae, a família de plantas mais úteis para o homem, por ser fonte de proteínas em suas sementes e folhas (LÉON, 1987).

Sabe-se que existem duas tendências principais sobre a taxonomia das leguminosas. A primeira de interpretação, mais conservadora, adotada por autores como BUKART e

ENGLER, citado por JOLY (1998) que prefere manter a unidade da família Leguminosae dividindo-a nas subfamílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Faboideae (Papilionoideae). Já a segunda vertente taxonômica, adotada por autores como CRONQUIST (1988), dispõe o conjunto das subfamílias englobados nas famílias Mimosoideae, Caesalpiniaceae e Fabaceae (Papilionaceae), elevando as três subfamílias ao status de família reunindo-as na Ordem Leguminales ou Fabales (MARCHIORI, 1997; LEWIS, 2005; APG II, 2003; SOLTIS *et al.*, 2005).

A subfamília Caesalpinioideae encontra-se distribuída em regiões tropicais (principalmente) e subtropicais, sendo extremamente diversa em morfologia, compartilhando algumas das características de Mimosoideae e Faboideae (POLHILL, 1981; TUCKER, 2003). Compreende 170 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies, com distribuição cosmopolita (DOYLE *et al.*, 2000; BRUNEAU *et al.*, 2001). Dentre as subfamílias, Caesalpinioideae é a menos estudada e entendida, tendo sido considerada por BURKART (1987) como a mais primitiva, da qual derivaram as subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae.

As espécies representantes da subfamília Faboideae (ou Papilionoideae) encontram-se preferencialmente em regiões temperadas, sendo, as herbáceas, difundidas nas regiões temperadas, ao passo que as espécies lenhosas são mais representadas nas regiões tropicais. É a maior, com 476 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies (LEWIS *et al.*, 2005). Essa subfamília cosmopolita abrange espécies com características consideradas mais avançadas dentro da Leguminosae (POLHILL, 1981; HARBORNE *et al.*, 1971).

A subfamília Mimosoideae é composta por árvores e arbustos, raramente ervas. Está distribuída em regiões tropicais (principalmente), subtropicais e cálido-temperadas (POLHILL, 1981). Encontram-se 77 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies, em sua maioria pertencente aos gêneros *Acacia*, *Mimosa* e *Inga* (DOYLE, 2003; ANDRADE, *et al.* 2003).

Do ponto de vista químico, a família Leguminosae apresenta amplo potencial. Produzem uma variedade de metabólitos secundários tais como, aminoácidos não proteicos, aminas, fenilpropanóides, antraquinonas, ácidos graxos, terpenóides, esteróides, gomas, resinas, taninos, alcalóides e flavonóides. Ressalta-se que os flavonóides são considerados como marcadores taxonômicos da família Leguminosae devido à frequência e diversidade de esqueletos com que são encontrados nas três subfamílias, ainda que outras classes contribuam para a classificação do grupo (WINK, 2003).

I.5.2 – O gênero *Acacia*

O gênero *Acacia* é o segundo maior na família Leguminosae (MASLIN *et. al.*, 2003) e é considerado um dos maiores nas Angiospermas (ENDRESS, 1994), apresentando mais de 1.200 espécies (ENDRESS, 1994; BARROSO, 1991). Encontram-se como árvores, arbustos ou trepadeiras lenhosas (BURKART, 1979).

Apresenta caráter cosmopolita e típico de regiões quentes semi-áridas (MASLIN *et. al.*, 2003; SEIGLER, 2003) distribuídas em regiões quentes tropicais e temperadas de todo o mundo, com a maior concentração de espécies na Austrália (cerca de 960), e também com um elevado número nas Américas (cerca de 190), África (144 espécies) e Ásia (89 espécies). É abundante nas savanas e matas, bem como em matas xerófitas, manifestando um extraordinário endemismo e proliferação evolutiva de espécies com filódios (BURKART, 1979) (**Figura 2**).



Figura 3 – Distribuição do gênero *Acacia* no mundo (MASLIN *et al.* 2003).

Muitas destas espécies apresentam considerável importância econômica e ecológica. São utilizadas como ornamentos, no fornecimento de madeira, na marcenaria, como lenha ou para obtenção de carvão, em curtumes devido à presença de taninos, para extração de gomas, pelas essências florais, na fixação de dunas, formação de cercas vivas, com as espécies aculeadas e todas apresentam flores melíferas (CORREA, 1984).

A identificação das espécies de Acácia ainda é bastante problemática, pois suas relações taxonômicas ainda mostram-se bastante controversas. Isso reflete no pouco grau de produtos isolados catalogados a partir destas espécies (LUCKOW *et al.*, 2000).

I.5.2.1 – A Atividades biológicas do gênero

Diversas espécies de *Acacia* são utilizadas tradicionalmente para o tratamento das mais diversas patologias. Assim, foi realizado um levantamento bibliográfico de diversas espécies do gênero relacionando às suas atividades biológicas (tabela 1). Este levantamento foi realizado nos dias 23-30 de março de 2007 em bancos de dados, como o *Chemical Abstracts*, *Biological Abstracts*, NAPRALERT, além do portal de periódicos da CAPES.

Tabela 1. Atividades biológicas relatadas em espécies do gênero *Acacia*.

Espécie	Atividades biológicas	Parte da planta	Extrato	Referências
<i>Acacia. albida</i>	Ação moluscicida contra <i>Bulinus truncatos</i> e <i>Biomphalaria pfeifferi</i>			AYOUB <i>et al.</i> , 1985a
<i>A. angustifolia</i>	Inibição do crescimento de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Candida albicans</i>			HOFFMANN <i>et al.</i> , 1993
<i>A. arabica</i>	Inibição do crescimento da <i>Entamoeba histolytica</i>			CHAKRABORTY <i>et al.</i> , 1989
<i>A. auriculiformis</i>	Atividades antihelmínticas		metanólico	GHOSH <i>et al.</i> , 1993, 1996; BABU <i>et al.</i> , 1997; SARKAR <i>et al.</i> , 1998
	Potencial efeito antidepressivo		Butanólico	SAHAI <i>et al.</i> , 1980
<i>A. catechu</i>	Ação moluscicida contra <i>Bulinus truncatos</i> e <i>Biomphalaria pfeifferi</i>			AYOUB <i>et al.</i> , 1985b
	Efeito hipotensor em cães e ratos	Galhos	aquoso	SHAM <i>et al.</i> , 1984
	Potente ação hepatoprotetora			JAYASEKHAR <i>et al.</i> , 1997
<i>A. concinna</i>	Tratamento de doenças da pele	Sementes		SEKINE <i>et al.</i> , 1997
	Atividades moluscicidas e cercaricidas			HYALIJ, 1999
<i>A. confusa</i>	Efeito antioxidante	Cascas		TZEN <i>et al.</i> , 2001
	Efeito alelopático			CHOU, 1980
<i>A. decurrens</i>	Atividades antitumorais		Aquoso	OLIVEIRA, 1972
<i>A. farnesiana</i>	Intensa atividade hipoglicêmica		etanólico	WASSEL <i>et al.</i> , 1992

<i>A. kirkii</i>	Tratamento do câncer			CHHABRA <i>et al.</i> , 1990
<i>A. koa</i>	Atividade contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			BUSHNELL <i>et al.</i> , 1950
<i>A. laeta</i>	Atividades antitumorais			NASSAR, 1999
<i>A. meianoxylon</i>	Inibição de proteínas quinase C			POLYA <i>et al.</i> , 1994
<i>A. mellifera</i>	Tratamento do câncer			CHHABRA <i>et al.</i> , 1990
<i>A. nilotica</i>	Inibição das cepas de <i>E. coli</i> e de <i>Staphylococcus aureus</i>		hexânico e metanólico	ALI <i>et al.</i> , 2001
	Significativa ação sobre bactérias Gram positivas e negativas			KAMBIZI <i>et al.</i> , 2001
	Atividade contra cocos Gram positivos e bacilos Gram negativos	Frutos	aquoso e etanólico	MUSTAFA <i>et al.</i> , 1999
	Atividade contra <i>Candida albicans</i>	Frutos	hexânico	MUSTAFA <i>et al.</i> , 1999
	Efeito antimicrobiano sobre <i>Clostridium perfringens</i>	Folhas	bruto	SOTOHOY <i>et al.</i> , 1995
	Atividade contra Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus e Klebsiella spp		aquoso e etanólico	CHANDEL <i>et al.</i> , 1993
	Bloqueio da agregação plaquetária mediada pelo ácido araquidônico	Frutos	metanólico	SHA <i>et al.</i> , 1997
	Atividades antipiréticas e antiinflamatórias			DAFALLAH <i>et al.</i> , 1996
	antihipertensiva, antiespasmódica			GILANI <i>et al.</i> , 1999
	Atuação considerável <i>in vitro</i> sobre areplicação viral do HIV-1			HUSSEIN <i>et al.</i> , 1999
	Contra <i>Plasmodium falciparum</i>			EL-TAHIR <i>et al.</i> , 1999
Propriedades tônicas, adstringentes e estimulantes			NABI <i>et al.</i> , 1992	

	Tratamento de doenças sexualmente transmitidas			KAMBIZI <i>et al.</i> , 2001
	Intensa atividade hipoglicêmica		etanólico	WASSEL <i>et al.</i> , 1992
	Atividade contra <i>Biomphalaria alexandrina</i>			ELSHEIKH <i>et al.</i> , 1990; NAZIF <i>et al.</i> , 2001
	Atividade contra <i>A. saligna</i>			AHMED <i>et al.</i> , 1999
<i>A. pennatuiia</i>	Atividades antitumorais			POPOCCA <i>et al.</i> , 1998
<i>A. pentagona</i>	Tratamento da amenorréia			CHHABRA <i>et al.</i> , 1990
<i>A. polycantha</i>	Tratamento de crises asmáticas			CHHABRA <i>et al.</i> , 1990
<i>A. riparia</i>	Inibição do crescimento de <i>T. cruzi</i> e Imunomoduladora	Caule/ Folhas	Clorofórmico e Acetanólico	COSTA, 2004
<i>A. robusta</i>	Atividade contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>			KHAN, <i>et al.</i> , 1980
	Tratamento da esquistossomose	Raiz		CHHABRA <i>et al.</i> , 1990
<i>A. rehmanniana</i>	Propriedades antiinflamatórias			GRAW <i>et al.</i> , 1997
<i>A. senegal</i>	Inibição do desenvolvimento de <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> e da levedura <i>Candida albicans</i>	Cascas	metanólico	KHAN <i>et al.</i> , 2000
	Inibição das cepas de <i>E. coli</i> e de <i>Staphylococcus aureus</i>		hexânico e metanólico	ALI <i>et al.</i> , 2001
<i>A. seval</i>	Ação moluscicida contra <i>Bulinus truncatos</i> e <i>Biomphalaria pfeifferi</i>			AYOUB <i>et al.</i> , 1985a
<i>A. tortilis</i>	Antiasmático	Goma		HAGOS <i>et al.</i> , 1988

I.5.2.1.1 – Compostos isolados em espécies do gênero *Acacia*

Cumarinas, taninos, alcalóides, esteróides e flavonóides foram verificados no gênero *Acacia*. No entanto pode-se observar que flavonóides predominam neste gênero sendo os responsáveis pela maior parte das atividades biológicas. Foi realizado um levantamento bibliográfico de diversas espécies do gênero relacionando aos compostos isolados (tabela 2). Este levantamento foi realizado nos bancos de dados: *Chemical Abstracts*, *Biological Abstracts*, NAPRALERT, e portal de periódicos da CAPES.

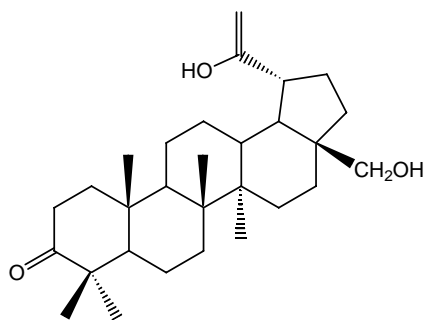
Tabela 2. Compostos isolados em espécies do gênero *Acacia*.

Espécie	Isolados	Extrato ou fração/parte da planta	Referências
<i>Acacia auriculiformis</i>	Flavan-3,-4-diol (teracacidina e análogos) (76)	Extrato metanólico/ lenho e casca	DREWES <i>et al.</i> , 1966
	Flavan-3,-4-diol (teracacidina e análogos) (76); Auriculosídeo (65) e auriculina (63)	Fração butanólica/ Casca do caule	SAHAI <i>et al.</i> , 1980
<i>A. aneura</i>	Apigenina (21); ramnetina (23) e fisetina (93)		SALEEM <i>et al.</i> , 1992
<i>A. caffra</i>	Análogos da teracacidina (76); oritin-4- α -ol (59); oritin-4- β -ol (60); epioritin-4- β -ol (58); epioritin-4- α -ol (57); <i>ent</i> -oritin-(4 β →5)-epioritin-4- β -ol (67) naringenina (22)	Fração hexano:acetato de etila (5:2)/ Casca do caule	MALAN, 1995
		Fração hexano:acetato de etila (5:2) / Casca do caule	MALAN <i>et al.</i> , 1997
	epioritin-(4 β →3)-epioritin-4- β -ol (40); epimesquistol-(4 β →4)-epioritin-4- β -ol (68)	Extrato metanólico/ Casca do caule	BENNIE <i>et al.</i> , 2000
<i>A. catechu</i>	(-)-epicatequina (28); catequina (18); campferol (30); quercetina (42); di-hidro campferol (30) Quercetina (42), quercetina-3- <i>O</i> - ramnosídeo (45), quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo (16), quercetina-3- <i>O</i> -arabinosídeo (15), farnesina (25) e di-hidro-quercetina (43)		PARIS, 1953; DESHPANDE <i>et al.</i> , 1981 SHARMA <i>et al.</i> , 1997; 1999
<i>A. confusa</i>	Miricetina (44), miricetina-3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -galoil)- α -ramnopiranosídeo 7-metil éter (38), miricetina-3- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> -galoil)- α -ramnopiranosídeo-7 metil-éter (37); miricetina-3- <i>O</i> -(2'',3''-di- <i>O</i> -galoil)- α -ramnopiranosídeo- 7-metil éter (39)	Extrato metanólico/ folhas	LEE <i>et al.</i> , 2000

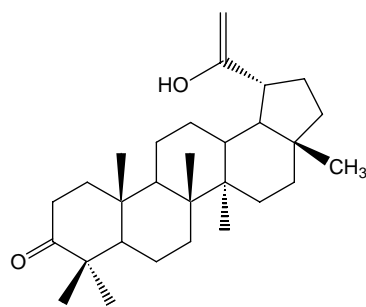
<i>A. cultriformis</i>	2,3-cis-3',4',7,8-tetrahidroxidiidroflavonol (47); 3',4',7,8-tetrahidroxidiidroflavanona (48); (+)-2,3-trans-flavan-3,4-cis-flavandiol (50); (±)-dihidroflavonol (51)	Extrato acetônico	DU PREZZ <i>et al.</i> , 1970
<i>A. dealbata</i>	Rutina (41), quercetina (42), robinetina (27), miricetina (44)	pólen	TAPPI <i>et al.</i> , 1955; SPADA <i>et al.</i> , 1956
	4,2',4',6'-tetrahydrochalcona-2'-[O-ramnosil-(1→4)- xilosida (88)	flores	IMPERATO, 1982 a
	Cianidina (82), delphinidina (81) e epicatequina (28)	Extrato butanólico	KIRILLOVA <i>et al.</i> , 1987
	Diosmetina (26) e farnesina (25)	folhas	SAHU <i>et al.</i> , 1998
<i>A. galpinii</i>	oritin-4- α -ol (59) ; oritin-4- β -ol (60); epioritin-4- α -ol (57); epioritin-4- β -ol (58); epioritin-(4 β →6)-epioritin-4- α -ol (69); epioritin-(4 β →6)-epioritin-4- β -ol (70)	Extrato metanólico/ Casca do caule	MALAN <i>et al.</i> , 1995; COETZEE <i>et al.</i> , 1998
<i>A. giraffae</i> e <i>A. galpinii</i>	(+)-catequina (18), teracacidina (56)	Fração acetona/ Casca do caule	MALAN <i>et al.</i> , 1975
<i>A. interdexta</i>	Teracacidina (56)	Extrato acetato de etila e aquoso	CLARK-LEWIS <i>et al.</i> , 1961 DREWES <i>et al.</i> , 1968
<i>A. ixiophylla</i>	Ramnetina (23), ramnitrina (85), quercitrina (86), quercetina (42) e epicatequina (28)	Extrato acetato de etila folhas	CLARK-LEWIS <i>et al.</i> , 1968
<i>A. leucophloea</i>	Luteolina (24)	vagens	KHAN <i>et al.</i> , 1990
	Miricetina (46), 3'-hidroxi-7-metoxiisoflavona (64), apigenina (21) e 8-C-glicosil-apigenina (77)	Extratos das flores	VALSAKUMARI <i>et al.</i> , 1991
<i>A. longifolia</i>	Quercetina (42), quercitrina (86), campferol (30) e rutina (41)	Extratos das flores	RAO <i>et al.</i> , 1991
	Naringenina (22)	Extrato aquoso	MARINI-BETTOLO <i>et al.</i> , 1951; KERBER <i>et al.</i> , 1993

	Naringenina (22), 5-D-galactosil-naringenina (35) e 5-D-glicosil-naringenina (36)	Fração acetato de etila/ flores	SILVA, 2001
	4-O-galactosil aureusidina (74), auriculosideo-dimetil-eter (66)	Fração acetato de etila/ flores	PEITZ, 2003
	Catequina (18) e (+)-galo-catequina (17)	folhas	TINDALE <i>et al.</i> , 1969
	5,2',5'-trihidroxi-6,7-dimetoxiflavanona (79)	raízes	ANAM, 1997
<i>A. mearnsii</i>	Ácido tânico (87) e catequina (18)		PANSERA, 2004
<i>A. melanoxylon</i>	3-D-galactosil-quercetina (89)	flores	FALCO <i>et al.</i> , 1964
	(-)-2,3- <i>cis</i> -3'4'7,8 tetrahidroxidihidroflavonol (47); 2,3 <i>cis</i> leucoantocianidina (94) e flavan-3,4-diol (76)	Extrato acetato de etila/ Casca do caule	FOO, 1987
<i>A. mellifera</i>	3-oxolupan-30-al (8), 28-hidroxi-lepen-30-ol-3-ona (9), 30-hidroxi-lup-20-(29)-en-3-ona (4), 30-hidroxi-lup-20-(29)-en-3 β -ol (10), ácido linoléico (14)		MUTAI, <i>et al.</i> , 2007
	28-hidroxi-3-oxo-lup-20-(29)-en-30-ol (1); 3-oxo-lup-20-(29)-en-30-ol (2); 3-hidroxi-lup-20-(29)-en-30-ol (3); betulina (13); lupeol (7); ácido betulínico (5), ácido betulônico (6)		MUTAI, <i>et al.</i> , 2004
	30-hidroxi-lup-20-(29)-en-3-ona (4); betulina (13); lupeol (7); ácido betulínico (5)	Casca do caule	MUTAI, <i>et al.</i> , 2008
	Fisetina (93)	Casca do caule	ROUX <i>et al.</i> , 1960
<i>A. myrtifolia</i>	Quercitrina (86)	folhas	EADE <i>et al.</i> , 1973
<i>A. neovernicosa</i>	2',4'-dihidroxichalcona (91); 4'-hidroxi-2'-metoxichalcona (61); 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (62); 2',4',4-trihidroxichalcona (90); 7-hidroxi-flavanona (32)	Extrato clorofórmico/ folhas e caules	WOLLENWEBER <i>et al.</i> , 1982
<i>A. nigrescens</i>	2,3- <i>cis</i> -3,4- <i>cis</i> [(-) melacacidina] (80); 2,3- <i>cis</i> -3,4- <i>trans</i> [(-)-	Fração acetato de etila:	FOURIER <i>et al.</i> , 1972

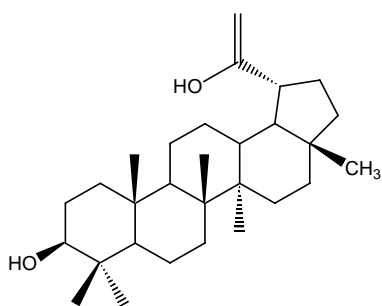
	isomelacacidina] (49); (+)-2,3- <i>trans</i> -flavan-3,4- <i>cis</i> -flavandiol (50); (±)-dihidroflavonol (51); 3, 3', 7, 8, 4'-pentahidroxiflavona (52); (±)- 7, 8, 3', 4'-tetrahidroxiflavanona (55); chalcona (54); 2-hidroxi-2-benzilcumaran-3-ona (53)	folhas	
	3', 4', 7, 8 tetrahidroxi-3 metoxiflavona (33); 4', 7, 8-trihidroxi 3, 3'-dimetoxiflavona (34)	Extrato acetônico folhas	MALAN, 1993
<i>A. nilotica</i>	Naringenina (22), catequina (18) epigallocatequina 5,7-digalato (73)	casca Extrato acetato de etila/ frutos e casca do caule	MALAN, 1991 KHALID <i>et al.</i> , 1986 AYOUB, 1985 a
<i>A. pennatula</i>	β -sitosterol (11), esqualeno (75), lupeol (7) e estigmasterol (12) Catequina (18), (-)-galato de epicatequina (71), (-)-galato de epigallocatequina (72)	Extrato acetônico folhas Extrato metanólico folhas	RIOS, 2005
<i>A. raddiana</i>	3- <i>O</i> -rutinosil-quercetina (41), 3- <i>D</i> -galactosil-quercetina (89), 3- <i>O</i> -glicosídeo de quercetina (92), 8- <i>O</i> -metil-7,8,4'-triidroxiflavona (31)	Extrato hidroetanólico/ folhas	EL MOUSALLAMY <i>et al.</i> , 1991
<i>A. saligna</i>	Sacarose (84), frutose (19), glicose (20), quercetina (42), miricetina (44), quercitrina (86), astragalina (78) e miricitrina (46) Naringenina (22), quercetina (42) e quercitrina (86)	Extrato etanólico/ folhas Extrato etanólico/ folhas	EL SISSI <i>et al.</i> , 1967 EL SHAF AE <i>et al.</i> , 1998
<i>A. saxatilis</i>	Flavan-3,-4-diol (teracacidina e análogos) (76)	Extrato hidroacetônico	FOURIER <i>et al.</i> , 1974



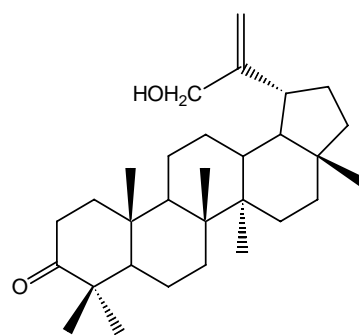
28-hidroxi-3-oxo-lup-20-(29)-en-30-ol (1)



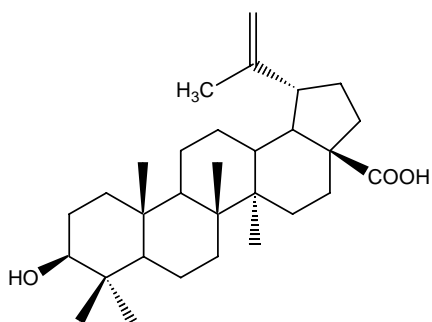
3-oxo-lup-20-(29)-en-30-ol (2)



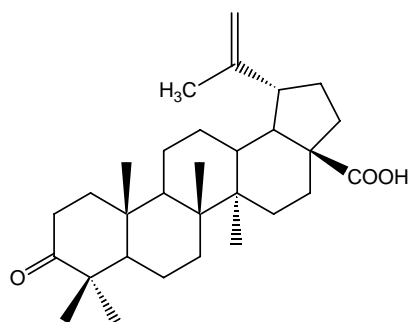
3-hidroxi-lup-20-(29)-en-30-ol (3)



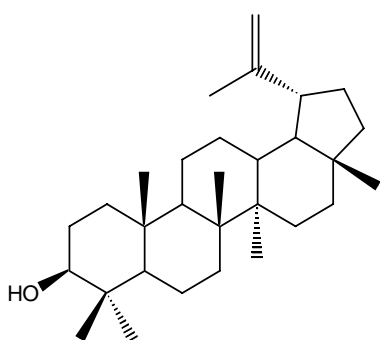
30-hidroxi-lup-20-(29)-en-3-ona (4)



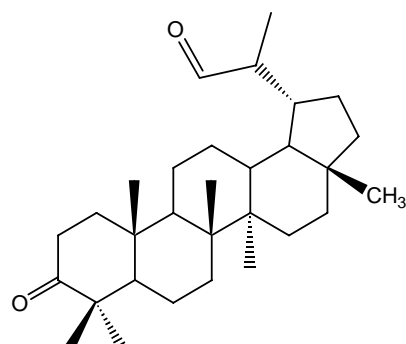
Ácido betulínico (5)



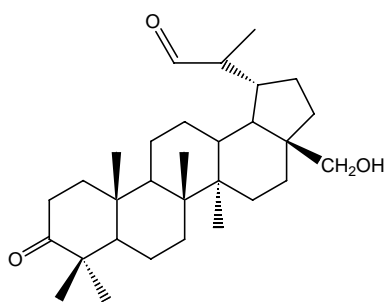
Ácido betulônico (6)



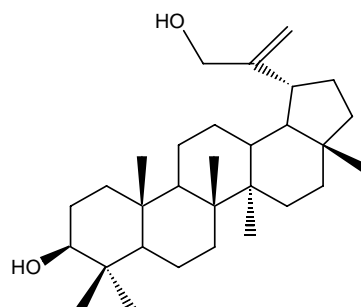
Lupeol (7)



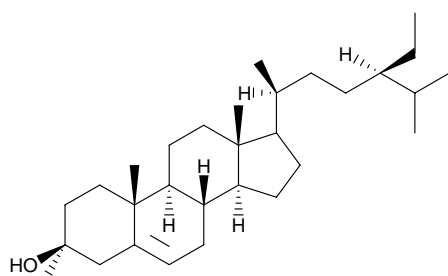
3-oxolupan-30-al (8)



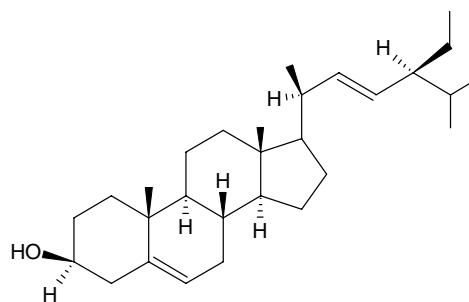
28-hidroxilepen-30-ol-3-ona (9)



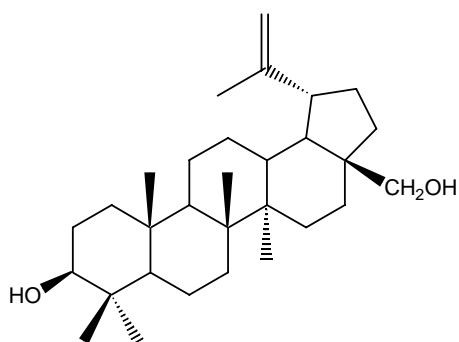
30-hidroxilup-20-(29)-en-3β-ol (10)



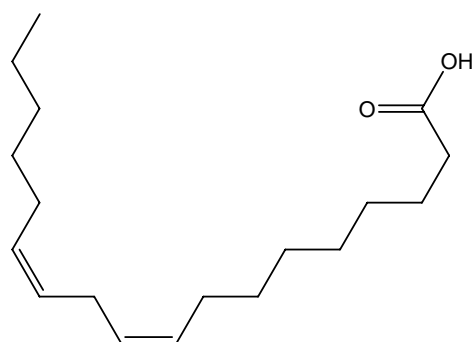
β-sitosterol (11)



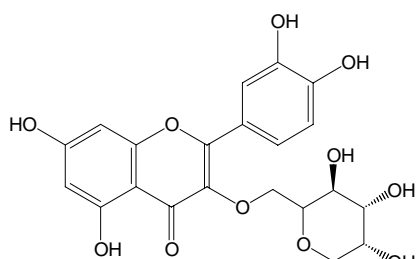
Estigmasterol (12)



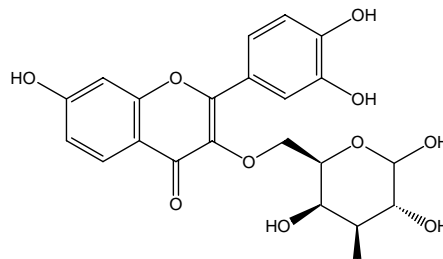
Betulina (13)



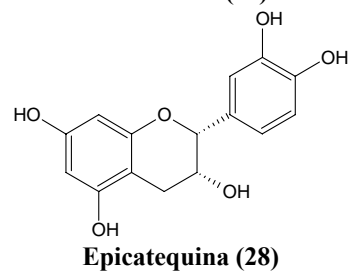
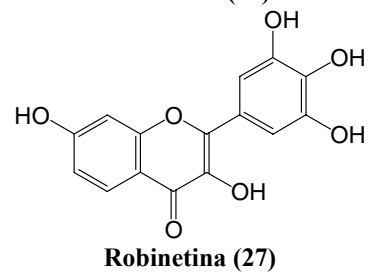
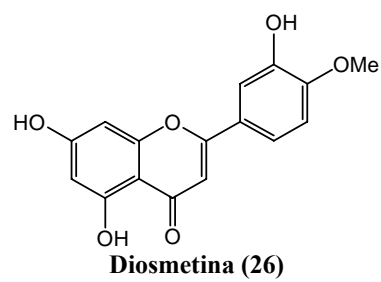
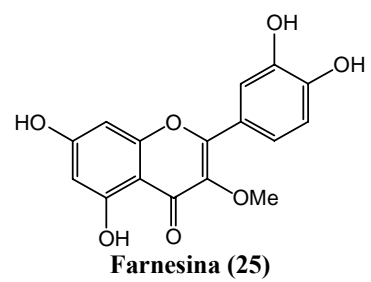
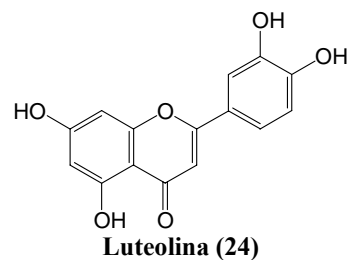
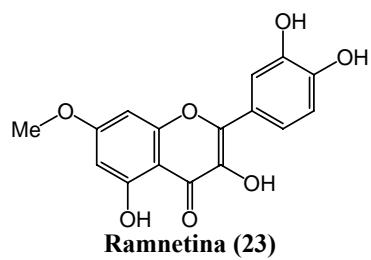
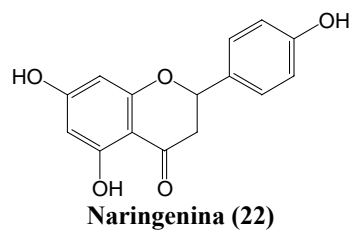
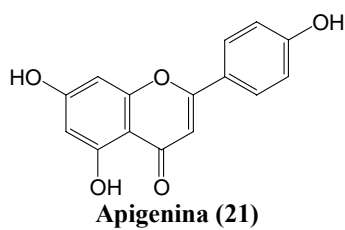
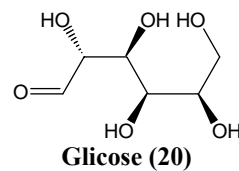
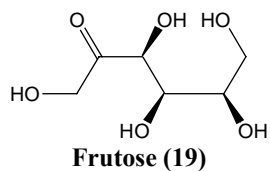
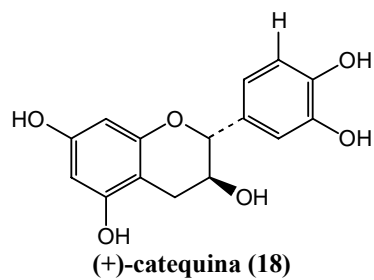
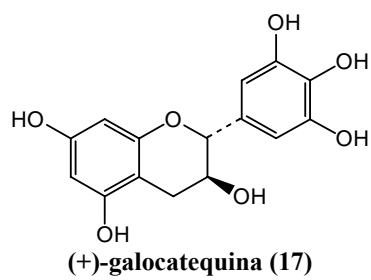
Ácido linoléico (14)

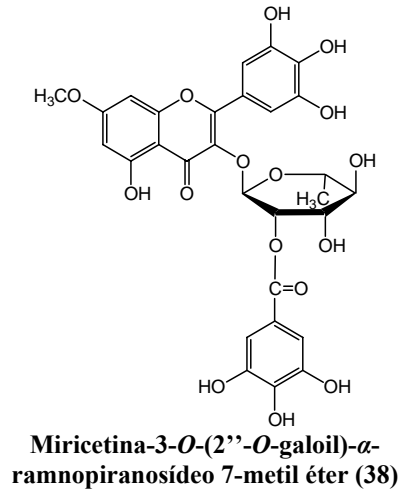
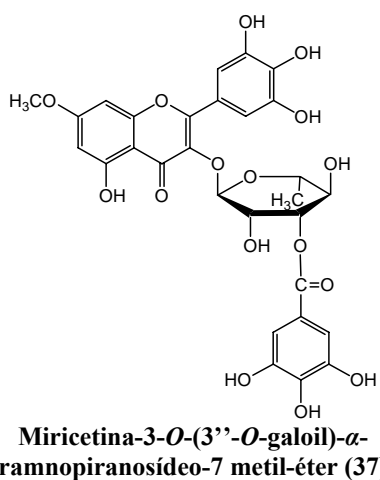
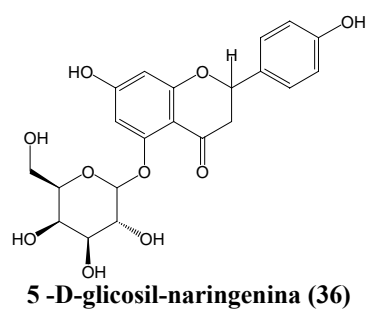
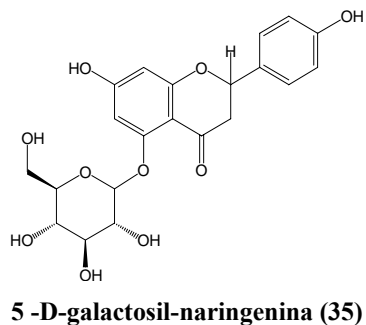
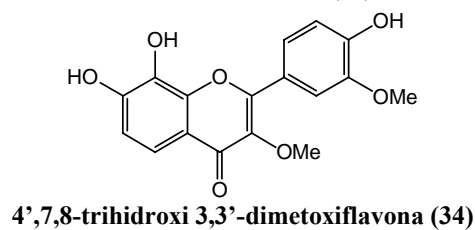
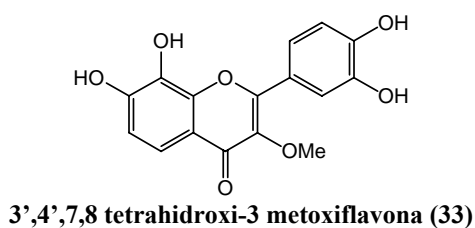
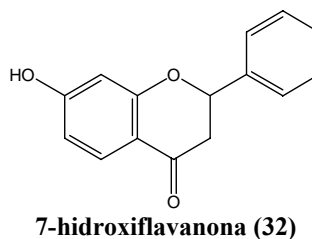
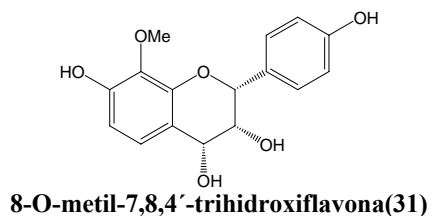
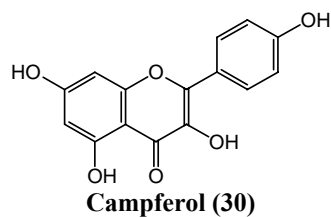
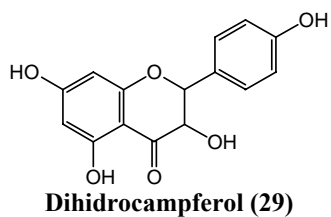


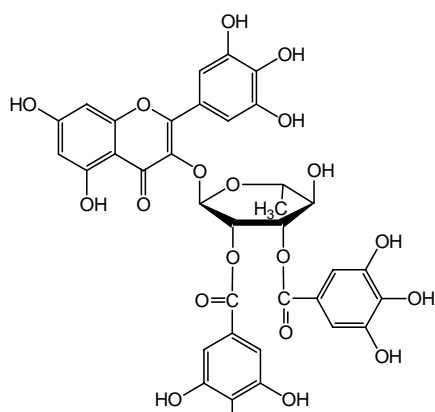
Quercetina-3-O-arabinosídeo (15)



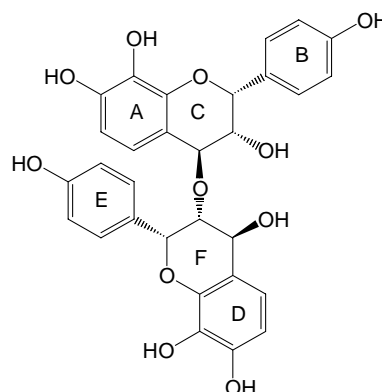
Quercetina-3-O-galactosídeo (16)



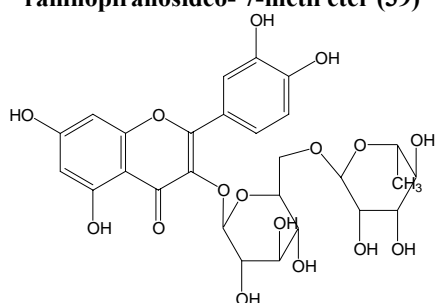




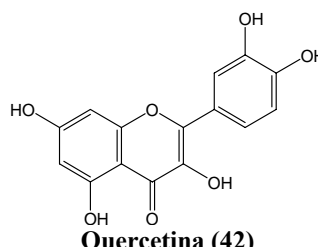
Miricetina-3-O-(2'',3''-di-O-galoil)- α -ramnopiranosídeo-7-metil éter (39)



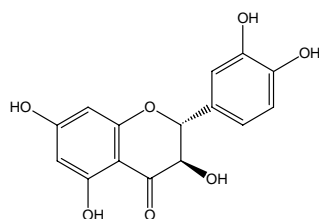
Epioritina-(4- β -(R)-3)-epioritina-4- β -ol (40)



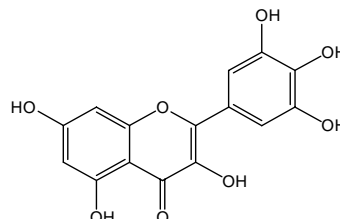
3-O-rutinosil-quercetina (41)



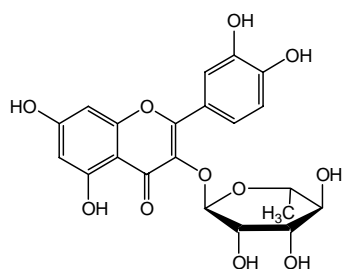
Quercetina (42)



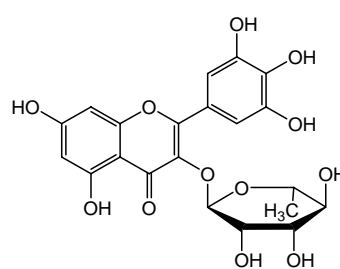
Di-hidro-quercetina (43)



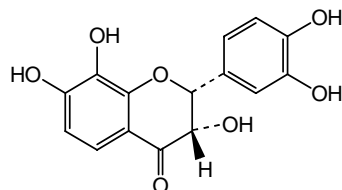
Miricetina (44)



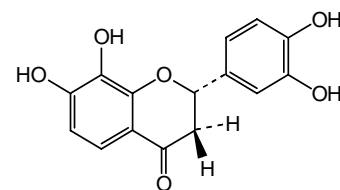
Quercetina-3-O-ramnosídeo (45)



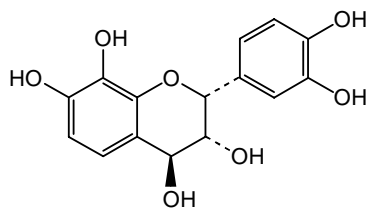
Miricitrina (46)



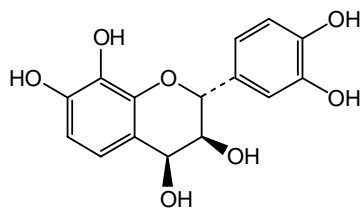
2,3-cis-3',4',7,8-tetrahidroxidiidroflavonol (47)



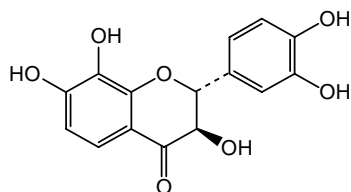
3',4',7,8-tetrahidroxidiidroflavanona (48)



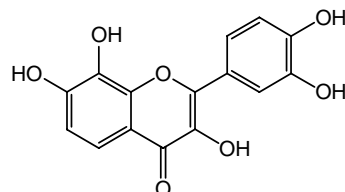
2,3-cis-3,4-trans[(-)-isomelacacidina] (49)



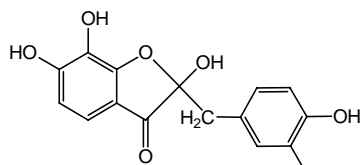
(+)-2,3-trans-flavan-3,4-cis-flavandioli (50)



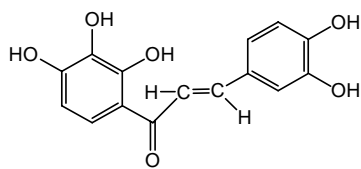
(±)-dihidroflavonol (51)



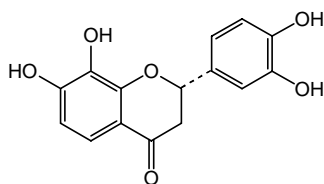
3, 3',7,8,4'-pentahidroxi flavona (52)



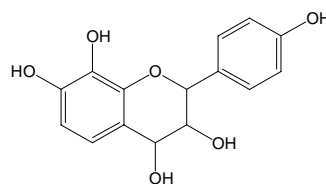
2-hidroxi-2-benzilcumaran-3-ona (53)



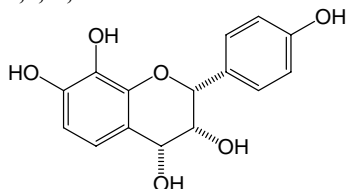
Chalcona (54)



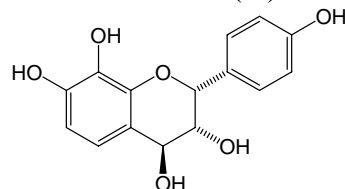
(±)- 7,8,3',4'-tetrahidroxi flavanona (55)



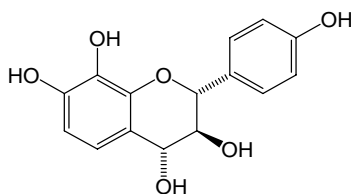
Teracacidina (56)



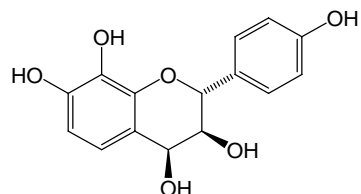
Epioritin-4-α-ol (57)



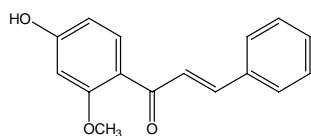
Epioritin-4-β-ol (58)



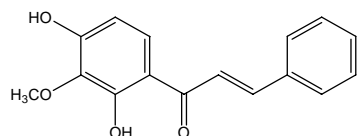
Oritin-4α-ol (59)



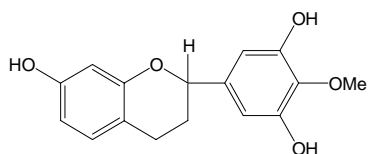
Oritin-4β-ol (60)



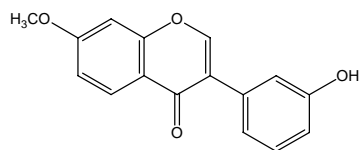
4'-hidroxi-2'-metoxichalcona (61)



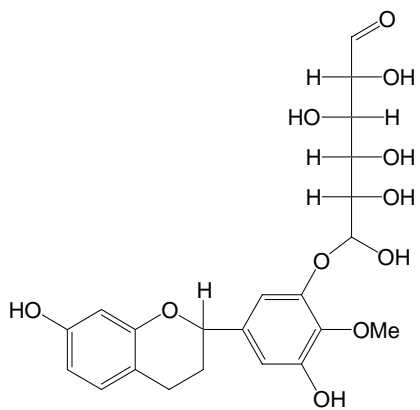
2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (62)



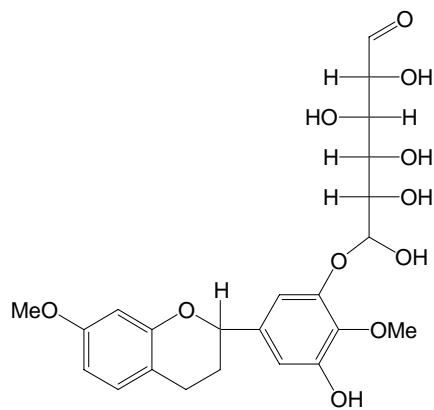
Auriculina (63)



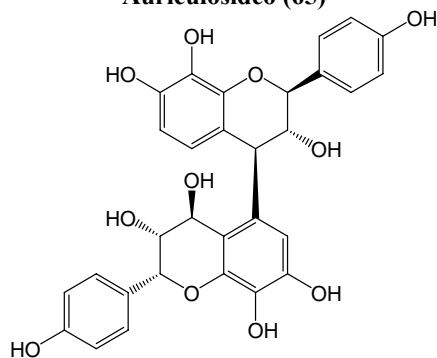
3'-hidroxi-7-metoxiisoflavona (64)



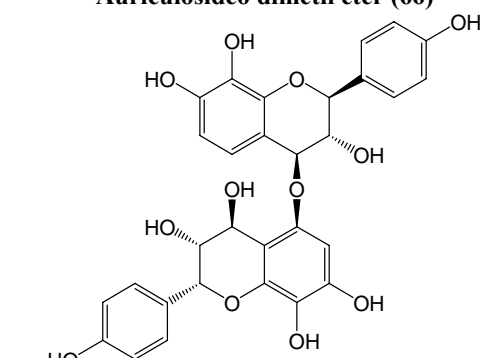
Auriculosideo (65)



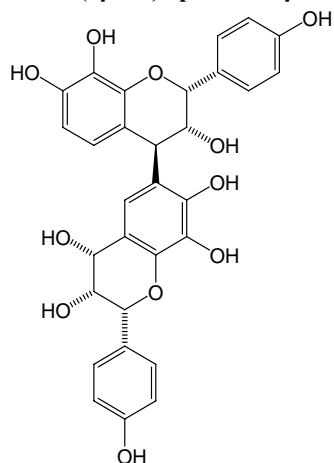
Auriculosideo dimetil éter (66)



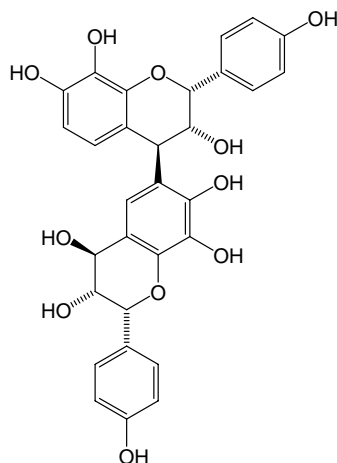
ent-oritin-(4 β →5) epioritin-4 β -ol (67)



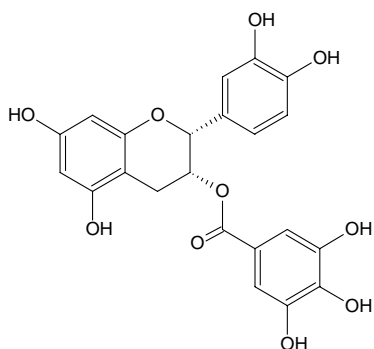
Epimiquistol-(4- β (R)-3) epioritina-4- β -ol (68)



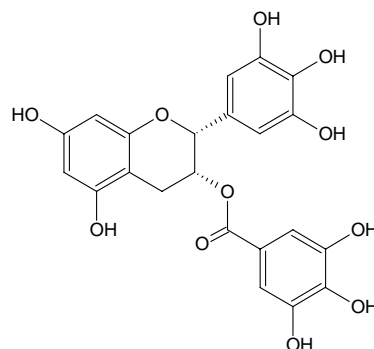
Epioritin-(4 β →6) epioritin-4 α -ol (69)



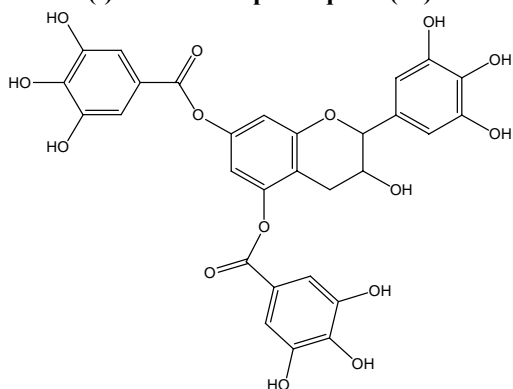
Epioritin-(4 β →6) epioritin-4 β -ol (70)



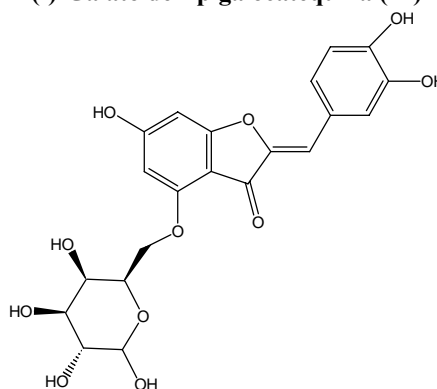
(-)-Galato de Epicatequina (71)



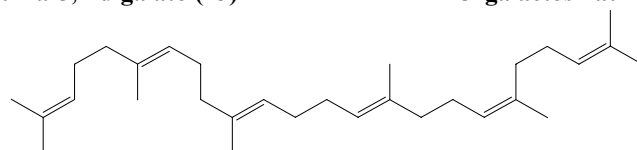
(-)-Galato de Epigalocatequina (72)



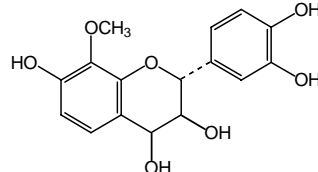
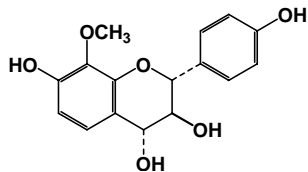
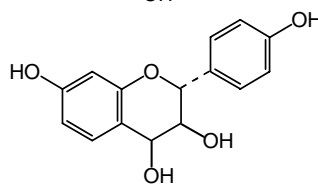
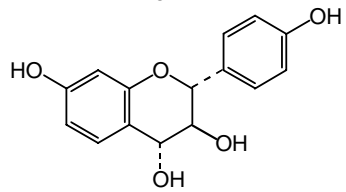
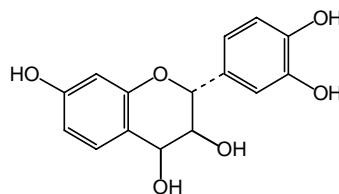
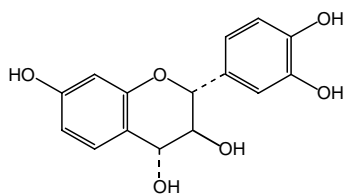
Epigalocatequina-5,7-digalato (73)



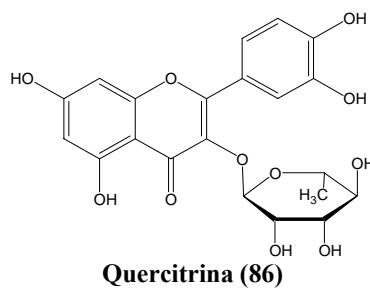
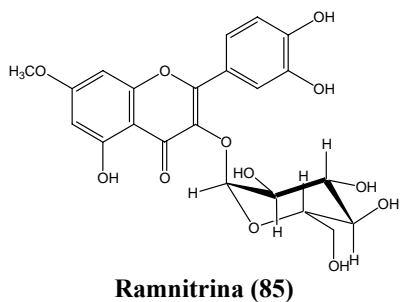
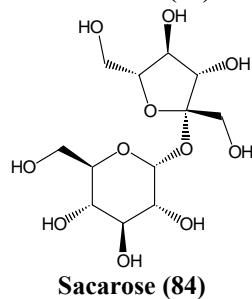
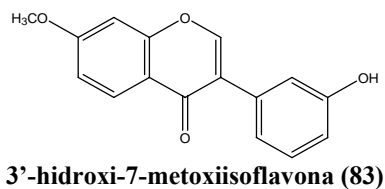
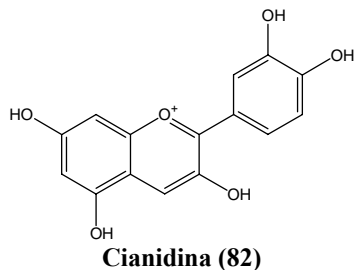
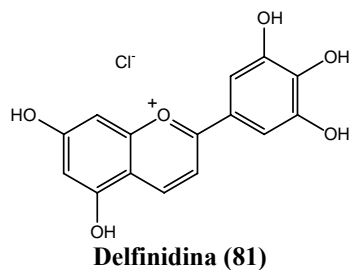
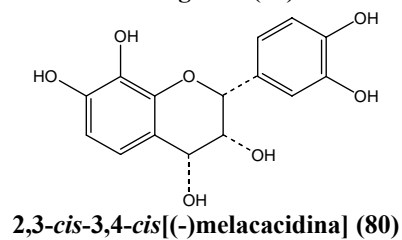
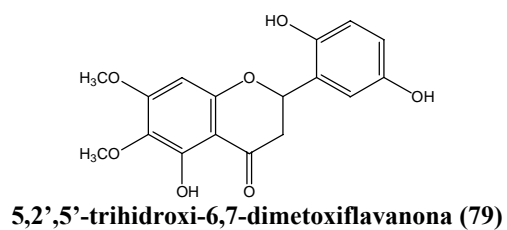
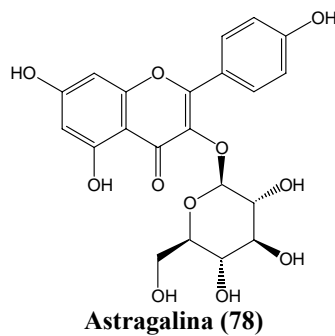
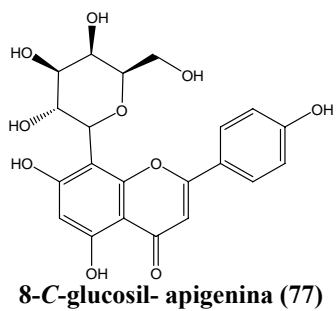
4-O-galactosil aureusidina (74)

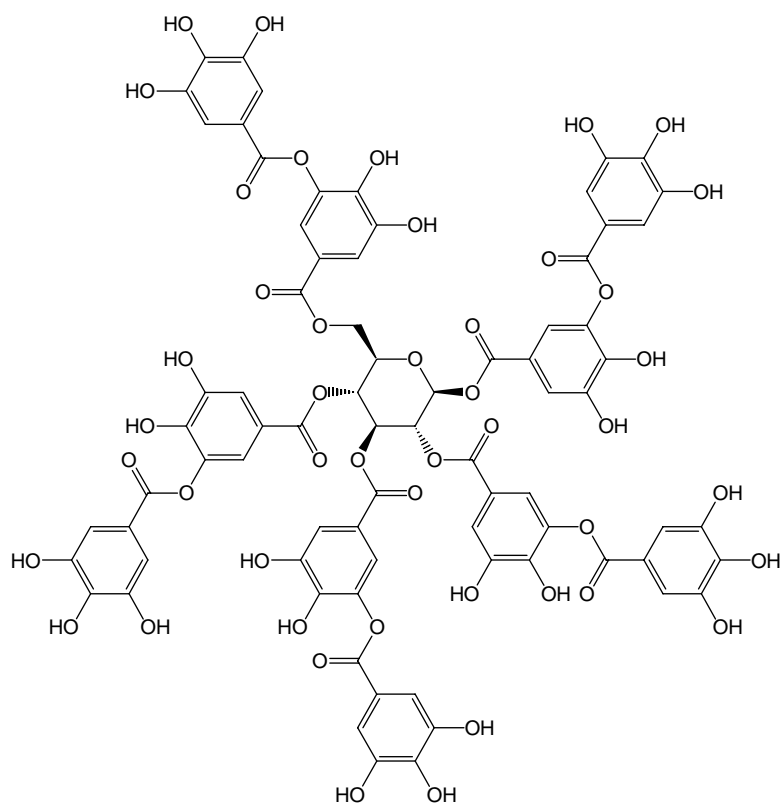


Esqualeno (75)

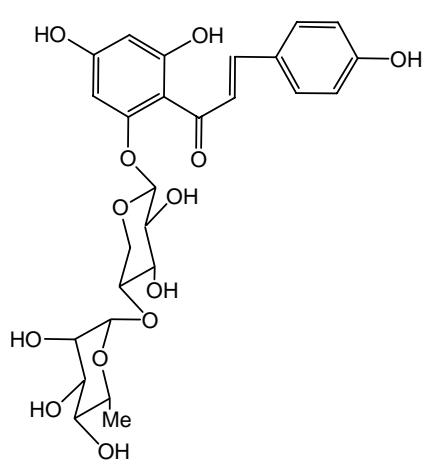


Flavan-3,-4-diol (Teracacidina e análogos) (76)

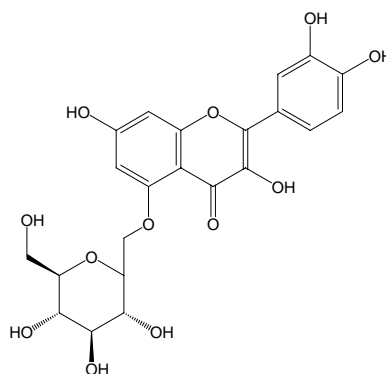




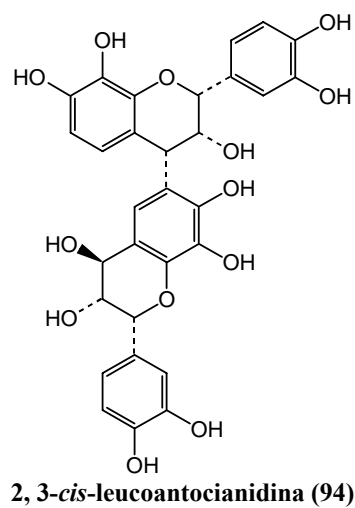
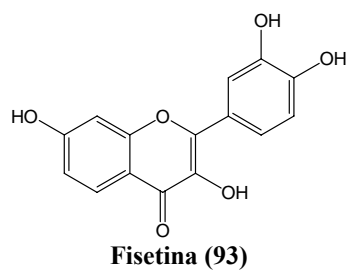
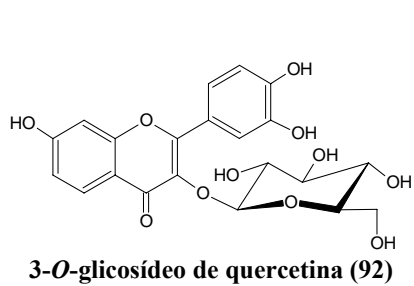
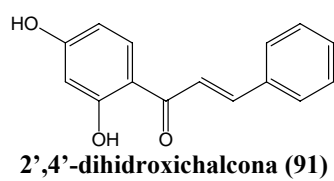
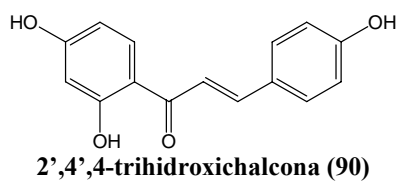
Acido tânico (87)



4,2',4',6'-tetrahydrochalcona-2'-[O-ramnosil-(1→4)-xilosida] (88)



3-D-galactosil-quercetina (89)



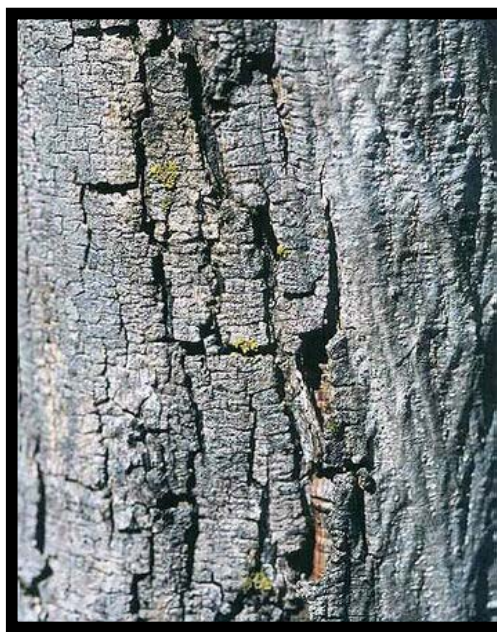
I.5.3 – A *Acacia langsdorfii* Benth

A espécie *A. langsdorfii* Benth é uma árvore com distribuição geográfica escassa, porém bastante encontrada nos estados de Pernambuco e Bahia (**Figura 4**). É conhecida popularmente como jurema-toiceira, espinheiro-preto, porém em outros locais, recebe o nome vulgar monjoleiro e angiquinho (OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLMOS *et al.*, 2005).

Não há registro na literatura quanto às propriedades fármaco-terapêuticas desta espécie. Sabe-se que as frações AcOEt e CHCl₃ do caule foram ativas para a atividade de inibição da proliferação de linfócitos e tripanocida e a fração AcOEt das folhas demonstraram atividade inibidora da proliferação de linfócitos e inibidora da produção de NO. Segundo trabalho realizado por UCHÔA em 2005, da fração CHCl₃ do caule foi isolado o lupeol e da fração AcOEt das folhas a quercetina.



A



B

Figura 4. A: Detalhe de um Ramo com Folhas, B: Detalhe da Casca do tronco da Árvore. ([http://umbuzeiro.cnip.org.br/fotoweb/Grid_fw?folderid=5000&search=\(IPTC025%20contains%20\(Acacia%20langsdorfii\)\)](http://umbuzeiro.cnip.org.br/fotoweb/Grid_fw?folderid=5000&search=(IPTC025%20contains%20(Acacia%20langsdorfii)))) Acesso em: 26/10/2006.)

I.6 – Considerações sobre a Malária e as Imunopatologias

I.6.1 – A Malária

A malária humana é a mais conhecida das doenças tropicais parasitárias infecciosas potencialmente graves, sendo também a mais distribuída, mais antiga e a mais prevalente na história da Humanidade. (AVERY *et al.*, 2002; SERRA, 2003).

Seu nome tem origem do latim *mal aria* (mau ar), ou paludismo, *palus* (região úmida, pantanosas) como também é popularmente conhecida como febre intermitente, febre palustre, maleita, paludismo ou impaludismo, pernicioso, sezão, sezonismo, acréscimo, bateadeira, tremedeira e carneirada (REY, 2001).

Segundo a OMS, hoje em dia a malária é considerada grave problema de Saúde Pública mundial, colocando em risco 40% da população de mais de 100 países (cerca de 2,4 bilhões de pessoas especialmente na África, Ásia e Américas Central e do Sul) ocorrendo cerca de 300 a 500 milhões de novos casos e entre 1,5 a 2,7 milhões morrem todos os anos (4% da mortalidade mundial) (**Figura 5**). É, de longe, a doença tropical e parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos dos mais sérios e complexos que a humanidade continua enfrentando no século XXI (FORATTINI, 2002; JORGE, 2001; BRASIL, 2002 e 2002b; FERREIRA, 2003; ALVES *et al.*, 2004; GUERRANTE & BLACKWOOD, 1999; WHO, 2006).

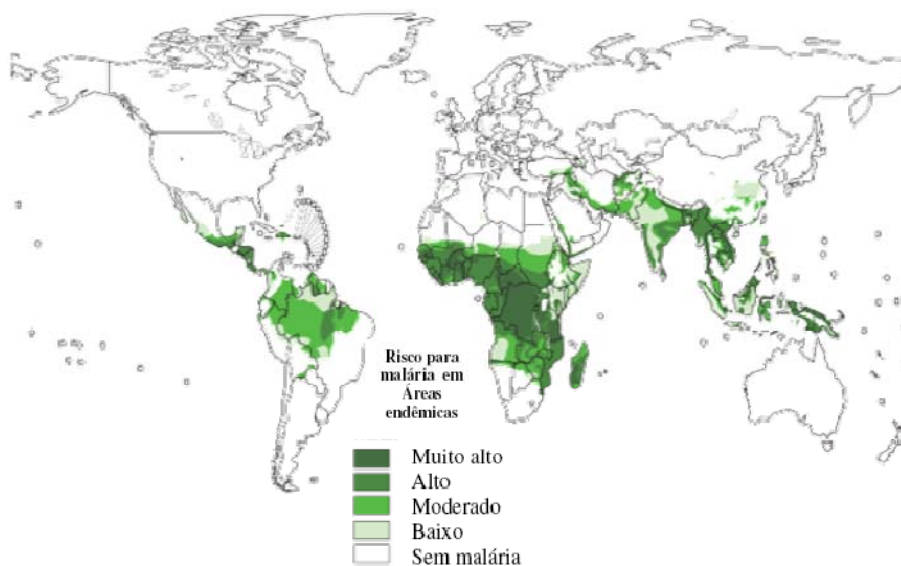


Figura 5. Ilustração das áreas de risco para malária no mundo. Fonte: WHO 2006.

Na década de 60-70, a malária no Brasil estava confinada à Região Amazônica, com cerca de 30 mil casos/ano. Porém, com a colonização e a migração desordenada da população da zona rural, houve um aumento do número de casos para cerca de 600 mil casos/ano (WHO, 1996; FERREIRA, 1982).

1.6.1.1. Agente etiológico: *Plasmodium sp*

Esta parasitose tem como agente etiológico protozoários do gênero *Plasmodium* transmitida pela picada da fêmea de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*, que se infecta ao sugar o sangue de um doente. Existem quatro principais espécies de parasitas da malária que infectam humanos, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* sendo, as três primeiras, as causadoras da doença no Brasil (FUNASA, 2002). Estes insetos possuem hábito crepuscular e noturno, e as fêmeas depositam seus ovos em ambientes naturais, em coleções de água de tamanho variado. (FRADIN, 2002; DUTRA, 2001).

As formas mais graves da doença e a maioria das mortes no Brasil são causadas pelo *P. falciparum* (AVERY *et al.*, 2002). Nessa forma, o parasito multiplica-se mais rapidamente e, conseqüentemente, invade e destrói mais hemácias que as outras espécies, causando, assim, um quadro de anemia mais imediato. Além disso, os glóbulos vermelhos parasitados pelo *P. falciparum* sofrem alterações em sua estrutura, que os tornam mais adesivos entre si e às paredes dos vasos sanguíneos, causando pequenos coágulos que podem gerar problemas cardíacos como trombozes e embolias. No caso de infecção por *P. falciparum*, também existe uma chance em dez de se desenvolver o que se chama de malária cerebral, responsável por cerca de 80% dos casos letais da doença.

1.6.1.2. Ciclo biológico

O conhecimento do ciclo biológico do parasito é da maior importância para o desenvolvimento de novas drogas eficazes para cada fase. Esta se apresenta em 3 fases, sendo uma no mosquito e duas no homem (uma hepática e outra intra-eritrocítica). A infecção pela malária começa quando o mosquito do gênero *Anopheles* contaminado inocula, no ser humano, o protozoário na sua forma esporozoíta. Após a inoculação das formas infectantes, passa-se um breve período em que os esporozoítas circulam livres pelo sangue. Neste curto período alguns deles são fagocitados, porém vários podem alcançar o fígado onde infectam hepatócitos e sofrem a primeira divisão assexuada (esquizontes). Decorrido alguns dias, as células do fígado se rompem com liberação de merozoítas. Após, esta fase inicial de replicação no fígado, o parasita sofre outra multiplicação assexuada em eritrócitos. As formas merozoítas liberadas infectam as hemácias onde se multiplicam em ciclos variáveis de 24 a 72 horas, produzindo novos merozoítas. Os parasitas do estágio eritrocítico são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença.

Alguns parasitas se diferenciam em gametócitos no estágio sexual eritrocítico. Os microgametócitos (macho) e os macrogametócitos (fêmea) são ingeridos pelo *Anopheles* durante uma picada. A multiplicação do parasita no mosquito é conhecida como ciclo esporogônico. Uma vez no estômago do mosquito, o microgameta penetra no macrogameta gerando zigotos. Os zigotos invadem a parede do intestino onde se desenvolvem para formar oocistos. Os oocistos crescem, rompem e liberam esporozoítas que migram até a

glândula salivar do mosquito. A inoculação dos esporozoítas em um novo ser humano perpetua o ciclo de vida da malária (GOODMAN e GILMAN, 2001; RANG *et al.*, 2003).

1.6.1.3. Tratamento e perspectivas

Muitos produtos naturais estão presentes no histórico de descobertas dos antimaláricos, seja como fonte primária (**Figura 6**) ou como substrato em novas sínteses (análogos).

A quinina, alcalóide isolado em 1820 da *Cinchona officinalis*, foi o primeiro medicamento utilizado para o tratamento da malária. Devido à resistência à quinina, outros antimaláricos foram obtidos por síntese. A cloroquina (1934), a mefloquina (1930), a primaquina (1924), e a mepacrina (1930) são exemplos destes análogos (REY, 1991; BJORKMAN, 2002). A cloroquina foi o antimalárico mais efetivo e com custo acessível, porém o uso indiscriminado, como monoterapia, levou logo ao surgimento de resistência principalmente frente ao *P. falciparum* (DUTRA, 2001).

Outros produtos naturais utilizados como antimaláricos foram a febrifugina, isolada de *Dichroa febrifuga* e a artemisinina, isolada de *Artemisia annua*. Esta já foi muito utilizada, entretanto, suas propriedades farmacocinéticas, inadequadas ao uso terapêutico, e sua baixa solubilidade fizeram surgir diversos análogos sintéticos modificados, como o artemeter (ROBERT e MEUNIER, 1998).

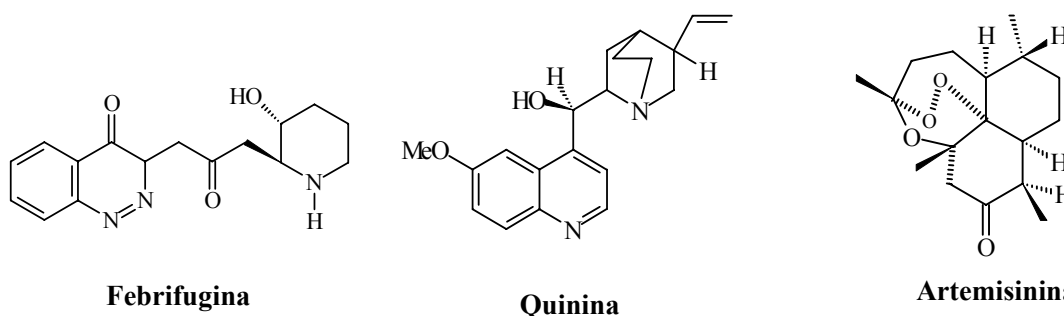


Figura 6. Antimaláricos isolados de fontes naturais (OLIVEIRA, 1995; PETERS, 1980; REY, 1991).

Pode-se perceber, que durante as décadas de 80 e 90, a resistência de cepas resistentes a algumas drogas, em especial do *P. falciparum*, foi um grande problema na terapêutica o qual permanece até hoje colocando a malária em contínua ascensão tornando o seu controle difícil (REYES 1981; WHO 2002).

A malária hoje é um dos maiores problemas brasileiros (principalmente na região Norte) e nos últimos anos vem sendo muito alta a velocidade de crescimento de sua taxa de incidência, acompanhando uma tendência mundial. (OMS, 2005; OLLIARO e TAYLOR, 2003; GARDINER *et al.*, 2004; BARNES e WHITE, 2005).

Os derivados semi-sintéticos da artemisinina (artesunato, artemeter) constituem uma classe de antimaláricos que aparentemente não induziu desenvolvimento de cepas de *P. falciparum* resistentes (GARDINER *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2003). Logo, em 2001, 40 países adotaram oficialmente a terapia com derivados de artemisinina como tratamento de malária por *P. falciparum* (NOEDL, 2005).

Ainda assim, o número de medicamentos viáveis atualmente para o tratamento da malária é baixo (MYINT *et al.*, 2003). Diante desta necessidade para controlar a disseminação, exige-se a busca alternativa de novas drogas e a adoção de associações medicamentosas. Dentro deste contexto, as plantas, devido ao seu histórico antimalárico e à sua grande biodiversidade inexplorada, continuarão sempre sendo fontes promissoras de novos compostos antimaláricos (GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002; FERREIRA, 1982).

I.6.2 – As imunopatologias

A imunopatologia é uma deficiência no mecanismo fisiológico de regulação da resposta imunológica podendo estar relacionadas a fatores genéticos, ambientais e terapêuticos favorecendo o estabelecimento de infecções. Assim, as drogas imunomoduladoras atuam estimulando ou suprimindo este sistema de forma a prezar por sua estabilidade. De forma geral, a imunoestimulação gera uma exarcebação da resposta de defesa, enquanto que a imunossupressão implica na diminuição da atividade imunológica.

Dentre as doenças autoimunes encontra-se a artrite reumatóide, o diabetes mellitus tipo I, o lúpus eritematoso sistêmico e a esclerose múltipla, além de reações alérgicas, como a asma. Essas doenças são um problema de saúde global, pois estão crescendo em proporções epidêmicas (KRENSKY *et al.*, 2001) e requerem rapidez na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. Além disto, estudos mostram que a incidência das imunopatologias tende a aumentar com o envelhecimento da população, tendo em vista o aumento da expectativa de vida do ser humano (ROEP, 2003).

Outro ponto interessante intimamente relacionado ao desenvolvimento de novos imunomoduladores é a terapêutica de transplante de órgãos como solução no tratamento de diversas patologias. Contudo, a rejeição aos aloenxertos permanece como o principal obstáculo responsável pela dificuldade da utilização deste procedimento fazendo com que o campo de investigação de novas drogas imunossupressoras seja urgente, uma vez que ainda não se atingiu o controle da rejeição alogênica nos transplantes.

Fármacos com ação moduladora da ativação de macrófagos e linfócitos, como os corticosteróides, têm sido amplamente utilizados para o controle de respostas imunoinflamatórias indesejadas (KRENSKY *et al.*, 2001). Os corticóides estão entre os medicamentos imunossupressores mais amplamente utilizados, porém eles têm a desvantagem de provocar vários efeitos colaterais. No caso dos corticóides, alguns dos efeitos colaterais observados são o retardo no crescimento, necrose avascular de medula, osteopenia, úlcera péptica, aumento do risco de contrair infecções, aparecimento de catarata, hiperglicemia e hipertensão, hiperlipidemia e também nefrotoxicidade (BURDMAN *et al.*, 2003; KRENSKY *et al.*, 2001).

Outra droga imunossupressora muito utilizada na rotina clínica é a ciclosporina (SCHREIBER & CRABTREE, 1992). No entanto, essa droga ocasiona diversos efeitos adversos, tais como tremores, hipertensão, hiperlipidemia, nefrotoxicidade, dentre outros (BURKE *et al.*, 1994). Modelos animais têm demonstrado que a administração de ciclosporina em camundongos no período de gestação aumenta o risco de desenvolvimento de doença autoimune nos recém nascidos (CLASSEN, 1998).

Os corticóides têm seu mecanismo de ação imunomodulador baseado na diminuição do número de linfócitos no sangue periférico, na regulação da transcrição de diversos genes e na indução de apoptose, sendo que este último efeito do aumento da concentração do I κ B, reduzindo a ativação do NF κ B, resulta no aumento da apoptose das células ativadas. É de importância central na ação dos esteróides a diminuição da produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, tais TNF- α , Il-1 e Il-6, diminuindo conseqüentemente a ação de macrófagos e linfócitos (KRENSKY *et al.*, 2001). A ciclosporina, droga inibidora da calcineurina tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da transdução de sinal, desencadeada pela ativação do receptor de linfócitos T, reduzindo a produção de linfocinas, incluindo a Il-2, como também a expressão de proteínas antiapoptóticas. O tacrolimus também inibe a ativação de células T através da inibição da calcineurina (KRENSKY *et al.*, 2001).

A ativação de macrófagos leva à produção de vários mediadores imunológicos solúveis, tais como citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e radicais livres de oxigênio e de nitrogênio. O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso, produzido por uma família de enzimas, incluindo a óxido nítrico sintase constitutiva e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em processos inflamatórios (ASLAN, 2002; BOGDAN, 2001; KAUFMANN & KABELITZ, 1998; COTRAN *et al.*, 2000). Sendo assim, substâncias capazes de inibir a ativação de macrófagos têm potencial utilização como imunomoduladores.

Além dos glicocorticóides, os inibidores de calcineurina e os agentes antiproliferativos/antimetabólicos também são bastante utilizados, tendo um alto grau de sucesso clínico na rejeição aguda a transplante de órgãos e doença autoimune severa. No entanto, tais terapias requerem o tratamento contínuo com fármacos imunossupressores ao longo da vida do paciente e causam supressão do sistema imune como um todo, expondo o

paciente a altos riscos de infecção. Em adição, essas terapias estão associadas a um risco potencial de morte e lesão irreversível de órgãos (SIMON, 2004).

Desta forma, têm surgido novas drogas, onde algumas atingiram inclusive aplicação clínica. Entretanto, com todo o avanço na área do controle da rejeição, as drogas existentes ainda não obtiveram sucesso total no controle desta. Por esse motivo, tem sido constante a busca por novas drogas com maior eficácia e menos efeitos colaterais. Neste sentido, têm-se estudado cada vez mais ações imunomoduladoras (RYAN & SHINITZKY, 1979, MARCUS, 1984 e HAKOMORI, 1990), tornando de grande relevância a descoberta de novas drogas imunomoduladoras.

Diante destas considerações, é de extrema relevância a identificação de novas drogas, que apresentem atividade contra doenças autoimunes, reações alérgicas e rejeição a transplantes, uma vez que tratamentos existentes para essas patologias dependem de drogas com uma grande variedade de efeitos colaterais e alto custo.

Recentes estudos ainda em fase de conclusão relatam que os GSLs (gangliosídeos) mostraram inibir a linfoproliferação e a produção de IL-2 de ratos "*in vitro*" (MONTERO *et al.*, 1994). Tem-se estudado também a ação imunomoduladora de um subtipo de GSL, que apresentam como característica a presença de um ou mais resíduos de ácido siálico em sua cadeia. Já foi demonstrada também a sua ação imunomoduladora sobre linfócitos de ratos "*in vitro*", não provocando alterações morfológicas no rim e intestino delgado quando usado subagudamente (MONTERO *et al.*, 2000).

Espécies vegetais podem ser uma excelente fonte de substâncias com atividade imunomoduladora apresentando maior eficácia e menos efeitos colaterais. Recentemente, foi demonstrado que substâncias químicas extraídas da espécie vegetal *Crotalaria pallida* inibem a produção de NO *in vitro* de forma concentração dependente (WENG *et al.*, 2003). Outros exemplos de moléculas com atividade imunomoduladora são as fisalinas, seco-esteróides purificadas da espécie *Physalis angulata* e que apresentam potente atividade inibidora da produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (SOARES *et al.*, 2003) e a espécie *Dendrobium nobile* da qual isolou-se um sesquiterpeno com atividade inibidora da proliferação de linfócitos (ZHAO *et al.*, 2001). Assim, o isolamento e identificação de novos imunomoduladores a partir de vegetais apresenta-se como um grande campo a ser explorado cientificamente (PHILLIPSON, 2003).

CAPÍTULO II
PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo II. Parte experimental

A parte experimental fitoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LaPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

II.1 - Reagentes, solventes e equipamentos

Os solventes utilizados para partições, filtrações e colunas cromatográficas foram previamente destilados a partir de solventes de grau comercial. Para recristalizações e lavagens de compostos semi-puros foram utilizados solventes de grau PA das marcas VETEC (Brasil), MERK (Alemanha) e ALDRICH (EUA) ou destilados mais de uma vez com posterior secagem com Na_2SO_4 por 24 h. Em relação à espectroscopia foram utilizados solventes deuterados das marcas ALDRICH e SIGMA. Para a preparação dos extratos brutos iniciais utilizou-se etanol 90 % comercial da marca HEIZOG (Brasil).

Em filtrações e separações cromatográficas, utilizou-se como adsorvente gel de sílica 60 G utilizando os diâmetros de 230-400 mesh e 70-230 mesh da marca MERC (Darmstadt-Alemanha) dependendo do critério da separação. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram conforme as quantidades das amostras e de sílica gel a serem utilizadas. A quantidade utilizada do adsorvente foi de aproximadamente 15 a 20 vezes a quantidade em massa da amostra.

As soluções de grande volume foram concentradas utilizando-se evaporador rotativo sob pressão reduzida da marca BÜCHI (modelo RE-114V). Soluções de pequeno volume (1-3 mL) foram concentradas em capela com exaustor a temperatura ambiente.

Nas análises utilizando a cromatografia em camada delgada utilizou-se para os extratos iniciais placas de vidro (6 x 9,5 cm) contendo uma camada de 0,25 ou 0,50 mm de gel de sílica GF254 da Merck.

A preparação das cromatoplasmas foi feita utilizando-se suspensão de gel de sílica (10g) em água destilada (22 mL), distribuídas sobre placas de vidro, através de espalhador mecânico e ativadas a 100 °C em estufa por 1 hora. Nas análises das frações após filtrações e colunas foram utilizadas placas de sílica pré-fabricadas (Sílica G TLC Plates w/UV 254) da marca TEDIA BRASIL.

O critério de pureza adotado foi à observação de uma única mancha em placa de camada delgada de sílica, variando-se a fase móvel e os reveladores como também pela nitidez da faixa do ponto de fusão (em aparelho MQAPF-301, da Microquímica).

As placas cromatográficas foram visualizadas em análises gerais por irradiação com luz na região do ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm (SPECTROLINE, modelo ENF-260 CIF), por imersão em cuba contendo vapores de Iodo, por borrifação com solução ácida de sulfato cérico, solução de anisaldeído 1% em ácido acético, solução de ácido fosfomolibídico 2,5% em etanol, reagente de Dragendorff, solução de AlCl_3 a 1% em etanol e reagente de LIEBERMANN-BURCHARD. Após borrifadas (exceto as borrifadas com solução de AlCl_3), as placas foram aquecidas em estufa a 100°C por 10 minutos.

As pesagens foram efetuadas em balança analítica eletrônica e semi-analítica. Nas solubilizações utilizou-se banho ultra sônico da marca UNIQUE (Ultra cleaner 1400) ou aquecimento em água quente.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Utilizou-se pastilhas de KBr contendo aproximadamente 1% da amostra sólida. A frequência de absorção foi medida em unidade de número de onda (cm^{-1}).

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrômetro da marca BRUKER AVANCE 400 MHz ^1H /100 MHz ^{13}C no Laboratório Ressonância Magnética Nuclear (LRMN) da UFAL realizadas pelo MsC. Marcos Sá sob coordenação do Prof. Dr. Edson de Souza Bento. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade δ e as constantes de acoplamento dadas em Hz. O tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência interno e como solventes foram utilizados CDCl_3 , CD_3OD e CD_3COCD_3 , como indicado em cada espectro. Os dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C foram coletados e processados no LRMN/UFAL, utilizando o programa TOPSPIN.

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A (Shimadzu - Kyoto - Japão). Foi utilizado He como gás de arraste e os espectros de massas foram obtidos por ionização química no modo positivo. As análises foram realizadas no LPqRN da UFAL pelo Prof. Dr. Johnnatan Duarte de Freitas.

A rotação óptica foi realizada na UFAL pelo MsC. Alan John Duarte de Freitas. Foi utilizado o polarímetro Rudolph Research Analytical (AUTOPOL IV, Automatic Polarimeter), em cubeta de 10 cm, comprimento de onda de 589 nm e temperatura de 25°C .

II.2 - Composição Química dos reveladores

Solução ácida de sulfato cérico – 0,7 g de sulfato de cério (IV) $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]$ foram dissolvidos em 20,0 mL de água destilada e depois adicionados a esta solução 7,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Em seguida completou-se o volume com água destilada para 100 mL de solução.

Solução de anisaldeído em ácido acético – 1,0 mL de anisaldeído ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$) foi dissolvido em 20,0 mL de ácido acético (CH_3COOH) e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Em seguida completou-se o volume com ácido acético para 100,0 mL de solução.

Solução de ácido fosfomolibídico em etanol – 2,5 g de ácido fosfomolibídico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 20,0 mL de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$). Em seguida completou-se o volume com etanol para 100,0 mL de solução.

Reagente de Dragendorff – 5,0 g de subnitrito de bismuto (BiONO_3) foram dissolvidos em 50,0 mL de água destilada, seguido da adição de 12,0 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado a 36% sob agitação. Em seguida, adicionou-se lentamente 25,0 g de Iodeto de Potássio (KI). Após a dissolução, o volume foi completado com água destilada para 100,0 mL de solução. A 25,0 mL desta solução foram adicionados 18,0 mL de Ácido acético (CH_3COOH) glacial, completando-se o volume final da solução com água destilada para 100,0 mL.

Reagente de Liebermann-Burchard

0,1 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) foram adicionados a 5,0 mL de ácido acético (CH_3COOH).

Solução de cloreto de alumínio

Solução de Cloreto de alumínio (AlCl_3) a 1% em etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$).

II.3 – Material Botânico

O material botânico foi coletado no município de Rio de Contas, estrada para Jussiape no estado da Bahia, no ano de 2003, pela equipe de botânicos do IMSEAR coordenado pela Prof^a Dr^a Ana Maria Giuletti da Universidade Estadual de Feira de Santana-BA. O material vegetal foi previamente desidratado e, após secagem, recebeu identificação botânica. As folhas (exsicata AMG 2014) e caule (exsicata AMG 1814) chegaram separados das outras partes da planta, estabilizadas e secas.

II.4 – Obtenção/preparação dos extratos

O grupo do LPqRN anteriormente havia realizado o estudo químico das folhas e do caule da *A. langsdorfii* Benth, devido às propriedades tripanocidas, inibidoras da linfoproliferação e geração de NO realizados pelo IMSEAR. O estudo fitoquímico do caule possibilitou o isolamento do lupeol da fração clorofórmio e das folhas a quercetina da fração acetato de etila (UCHÔA *et. al.*, 2005).

Parte da planta	Fração ativa	Atividade apresentada	Substância isolada
Folhas	AcOEt	Inibidora da linfoproliferação e da geração de NO	Quercetina
Caule	CHCl ₃	Inibidora da linfoproliferação e tripanocida	Lupeol
	AcOEt		-----

Todo o estudo químico das folhas desta tese seguiu em cima de nova preparação do extrato bruto. No entanto, o estudo químico do caule foi oriundo de frações de partição do estudo anterior devido à falta inicial do material botânico e também principalmente por haver interesse em continuar o trabalho do caule nestas outras frações não analisadas.

II.4.1 – Extrato das folhas

As folhas foram pulverizadas em moinho tipo forrageira da marca Nogueira (Itapira-SP), com tamanho de 2.5 mm apresentando peso total de 4,30 kg. O material depois de reduzido a pó foi submetido à extração a frio com quantidade de etanol a 90% suficiente para cobrir o material (20 L) em percolador de aço inoxidável à temperatura ambiente (25-27°C)

por 3 dias e filtrado. O resíduo foi extraído mais duas vezes da mesma maneira. A solução foi filtrada e o solvente removido por destilação a pressão reduzida em aparelho rotatório colocando o extrato em um frasco pesado. Foram obtidos 498,88 g (11,6%) de extrato etanólico bruto (EF) concentrado e homogêneo.

II.4.2 – Extrato do caule

O material do caule apresentava 10,3 kg e seu pó foi submetido à extração a frio com etanol a 90% em percolador à temperatura ambiente (25-27°C) por 3 dias e filtrado. O resíduo foi extraído mais duas vezes da mesma maneira. Após a evaporação do solvente por destilação a pressão reduzida em aparelho rotatório foram obtidos 451g (4,4%) de extrato etanólico bruto (EC) concentrado e homogêneo.

II.5 – Preparações das amostras para análises de RMN e IV

As amostras puras foram secas em pistola por 8 horas com vácuo realizado por um período de 10-15 minutos em intervalos de 1 hora. Após secas, essas foram mantidas em frasco com tampa hermeticamente fechada evitando entrada de umidade.

II.6 – Prospecção Fitoquímica

Tanto os extratos brutos do caule e da folha como os extratos pós partições seguiram procedimento conforme metodologia qualitativa abordada em MATOS, 1997.

Foram pesadas sete porções de 3 mg de cada extrato onde esses foram dissolvidos em 3-4 mL de etanol. Os extratos foram colocados em tubos de ensaio numerados de 1 a 7. Em cada tubo foi realizado os testes de acordo com a seqüência a seguir.

II.6.1 – Teste para fenóis e taninos

No tubo de ensaio de número 1, foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1 mol/L. Agitou-se bem e observou-se variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 .

A solução de cloreto férrico (FeCl_3) foi preparada adicionando-se 9 g deste reagente em 50 mL de água destilada contendo 2 mL de ácido clorídrico 3 mol/L. Em seguida completou-se o volume para 100 mL com etanol em um balão volumétrico. A solução de HCl 3 mol/L foi obtida através da adição de 33,3 mL do ácido concentrado em água destilada suficiente para 100 mL de solução, em um balão volumétrico.

II.6.2 – Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Tomaram-se os tubos numerados de 2, 3, e 4. O tubo de número 2 foi acidulado a pH 3 com a solução pré-preparada de HCl 3 mol/L.

Os tubos 3 e 4 foram alcalinizados com a solução de NaOH 1 mol/L preparada com 4g deste reagente concentrado num volume de 100 mL de água destilada de solução; respectivamente a pH 8,5 no tubo 3 e pH 11 no tubo 4.

A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado a seguir:

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido (pH 3)	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavanonóis	-	-	Vermelho Laranja

II.6.3 – Teste para Leucoantocianidinas, Catequinas e flavanonas

No tubo numerado 5 e 6, acidulou-se um deles por adição de HCl até pH 1-3 e alcalinizou-se o outro com NaOH até pH 11. Aqueceu durante 2-3 minutos, cuidadosamente. Observou-se qualquer modificação na cor por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior.

O aparecimento ou intensificação de cor indicou a presença ou ausência de constituintes especificado a seguir.

Constituintes	Cor em meio	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

II.6.4 – Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

No tubo de número 7, foram adicionados alguns miligramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da liberação de gás. Observou-se por comparação a mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7.

O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

II.6.5 – Teste para esteróides e triterpenóides

Adicionou-se 10 mL de uma solução etanólica de cada extrato em béqueres e deixou-se secar em banho-maria. Extrauiu-se o resíduo seco de cada béquer três vezes com porções de 1-2 mL de CHCl_3 . Separaram-se os extratos em tubos diferentes e colocaram-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionaram-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado. Agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores.

A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

II.6.6 – Teste para saponinas

Tomaram-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três minutos e observou-se a formação da espuma.

Uma espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

II.6.7 – Teste para alcalóides

No tubo de número 6, adicionaram-se três gotas do reagente de Dragendorff. Observou-se a formação de precipitado característico.

Precipitado floculoso, pesado e de coloração alaranjada é indicativo da presença de alcalóides.

Os extratos foram separados em tubos diferentes, solubilizados com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, a placa foi revelada com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcalóides.

Tomou-se 1/3 da solução aquosa obtida de 10 mL do extrato alcoólico filtrado em pH 4, juntou NH_4OH e adicionou-se gotas aos poucos até pH 11 e extraiu-se as bases orgânicas com 3 porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL da mistura éter clorofórmio (3:1), em um funil de separação. Retirou-se a solução éter-clorofórmio e secou-se com Na_2SO_4 anidro para eliminar o excesso de água. Separou-se o filtrado em 2 porções. Deixou-se secar uma delas para teste em cromatoplaça e re-extraiu-se as bases orgânicas da outra, com 3 pequenas porções sucessivas de HCl diluído (0,1mol/L). Rejeitou-se a solução éter-clorofórmica e repartiu a solução aquosa ácida obtida, em 3 tubos de ensaio. Adicionou-se a cada tubo, respectivamente, 3 gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides, Hager, Mayer, e Dragendorff. Observou-se a formação de precipitado:

- Precipitado floculoso, pesado em pelo menos dois tubos era indicativo de Alcalóides.
- Os alcalóides que precipitaram facilmente com o reagente de Hager foram separados como picratos a partir de extrato aquoso ácido.

O reagente de Hager ou solução saturada de ácido pícrico foi preparado dissolvendo 12 g de ácido pícrico em 100 mL de água quente. Deixou esfriar e filtrou-o. Este foi conservado em frasco de tampa esmerilhada.

II.7 – Ensaio biológicos

II.7.1 – Avaliação da atividade Moluscicida

O teste foi realizado com o caramujo *B. glabrata* na fase adulta e em massa de ovos, de acordo com o protocolo da (OMS, 1994). Os bioensaios foram realizados no laboratório de bioensaios da UFAL sob a supervisão da MsC. Cenira Monteiro de Carvalho.

O ensaio biológico para atividade moluscicida consistiu basicamente na imersão do caramujo ou sua desova em uma solução aquosa do extrato ou fração sob investigação, nas concentrações apropriadas. No bioensaio preliminar foram utilizados 5 caramujos e uma desova, com 0-24 h de idade, por concentração em duplicata. No bioensaio final, foram utilizados 10 caramujos, mantendo sempre a relação de 25 mL de solução por caramujo e, uma desova testada por concentração. Cada concentração foi testada em triplicata.

Os extratos e frações que apresentaram atividade moluscicida (mínima de 40% a 100 ppm foram utilizados em ensaios quantitativos. Da mesma forma que, apenas os extratos com atividade moluscicida significativa (que promoveram no mínimo 55% de mortalidade a 50 ppm) são testados frente à desova do *B. glabrata*.

Foram realizados, paralelamente, testes de controle com água desclorada, dimetil-sulfóxido a 0,1 % e o moluscicida sintético comercialmente disponível, niclosamida a 3 mg/mL.

Os dados, concentração x mortalidade dos organismos alvo, foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o programa Probit, para a determinação dos valores de Concentrações Letais (CL₉₀, CL₅₀ e CL₁₀).

II.7.2 – Avaliação da atividade larvicida

O experimento foi realizado no laboratório de bioensaios larvicida do IQB da UFAL sob a supervisão do MsC. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior.

Foram preparadas soluções com água destilada a 1 % de DMSO, para os testes preliminares na concentração inicial de 500 ppm para os extratos. Em seguida, foram colocadas em um aparelho de ultra-som para a solubilização.

Nos bioensaios preliminares foram utilizadas larvas de *A. aegypti* do quarto instar fazendo três repetições, cada parcela experimental constou de 10 larvas, que foram colocadas

em copos descartáveis de 200 mL contendo 20 mL de solução teste. Os extratos que tiveram um percentual de mortalidade igual ou superior a 50% tiveram prosseguimento nas análises. Nos ensaios quantitativos foram utilizadas 25 larvas em quatro repetições, suas concentrações foram delimitadas pelos resultados preliminares.

As larvas foram consideradas mortas quando não conseguiram atingir a superfície da solução quando o recipiente foi agitado. A contagem das larvas foi realizada a hora 0 (início do experimento), 24 h e 48 h. Como controle negativo foi utilizado uma solução a 1% de DMSO e como controle positivo foi usado a Rotenona.

Os dados, concentração x mortalidade dos organismos alvo, foram submetidos a tratamento estatístico utilizando o programa Probit, para a determinação dos valores de Concentrações Letais (CL_{90} , CL_{50} e CL_{10}).

II.7.3 – Avaliação da citotoxicidade, inibição de proliferação de *P. falciparum*, inibição da produção de óxido nítrico e da inibição de linfoproliferação

Em parceria com o IMSEAR, os bioensaios foram realizados por colaboradores do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia localizado no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz – Bahia. A metodologia descrita a seguir foi desenvolvida pelo grupo colaborador.

II.7.3.1 – Animais

Os camundongos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz – Bahia. Preferencialmente foram utilizados camundongos machos e fêmeas, com idade aproximada de oito semanas, da linhagem BALB/c, sendo as linhagens C57B1/6, CBA e Swiss Webster também utilizadas.

II.7.3.2 – Avaliação da citotoxicidade

Para a determinação da concentração atóxica para células de mamíferos, os extratos e frações foram avaliados em diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 mg/mL e eventualmente a 0,05 e 0,005 mg/mL). Para este ensaio, foram utilizadas células de baço (6 x

10⁵/poço) de camundongos isogênicos incubadas na presença das amostras e de timidina tritiada, durante 24 h. Cada concentração das drogas foi avaliada em triplicata em placa de 96 poços, em estufa úmida a 37 °C, com 5 % de CO₂. A cultura de células de baço foi feita em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo (suplementado com soro bovino fetal a 10 % e gentamicina a 50 µg/mL). As drogas foram diluídas em meio de cultura no dia da realização do experimento. A timidina tritiada foi adicionada de forma a obter uma concentração final de 1 µCi por poço.

Para este ensaio, dois controles foram feitos: um controle sem tratamento, no qual se incubou somente células e timidina tritiada, e um controle de células tratadas com saponina (concentração final de 0,05 %), substância com reconhecida atividade citotóxica. Após o período de incubação, as células foram coletadas em um filtro de fibra de vidro, utilizando-se um coletor de células (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, EUA). Os filtros foram secos à temperatura ambiente durante 24 horas e, posteriormente, lidos em contador de radiação beta (Beta Counter, Packard, Meriden, CT, EUA). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se os valores de radiação incorporados pelas células incubadas na presença dos extratos com os valores do controle não tratado. A concentração dos extratos e frações utilizada para os ensaios posteriores foi a mais elevada que apresentasse uma toxicidade de até 30 %.

II.7.3.3 – Avaliação da inibição de proliferação de *P. falciparum*

Foram usadas formas sanguíneas da cepa W2 de *P. falciparum* com 1-2% de parasitemia, sincronizadas, suspensas em RPMI completo com hematócrito de 2,5%, distribuídas em microplacas (96 poços) de poliestireno de fundo chato (Falcon), 200 µL por poço. Após 1 h de incubação a 37 °C acrescentou-se a cada poço 25 µL de meio contendo as diferentes concentrações das frações teste ou o controle com antimalárico de referência (mefloquina). Os controles usados foram hemácias infectadas (controle positivo) e hemácias não infectadas (controle negativo) do mesmo grupo sanguíneo e na mesma concentração. Após 24 horas de incubação a 37 °C em concentração ideal de O₂ as placas foram removidas e adicionados 25 µL da solução de [³H]-hipoxantina (1µCi/mmol), retornando por mais 18 horas de incubação. Após este segundo período de incubação, as microplacas foram colocadas a -70 °C por 6-18 horas para promover a lise das hemácias. As amostras foram então aspiradas pelo coletor de células (Cell Harvester 96 Skatron Instruments), os filtros secados (Filtermat

A 1250 ou 1450-421) em estufa de secagem (40 °C) por 1-2 horas foram colocados em sacos plásticos apropriados (sample bags 1250 ou 1450-432) onde se adicionou 4 mL do líquido de cintilação (Optphase “Supermix”). Depois de selados os filtros foram acoplados aos cassetes de leitura e lidos pelo Betaphase ou Microbeta reader (Wallac-Perkin Elmer) para medida da incorporação da [³H]-hipoxantina em CPM. A viabilidade do *P. falciparum* foi avaliada pela função da regressão não linear usando o programa NFIT (MicroCal software, Inc) usada para determinar as concentrações inibitórias 50% (IC₅₀).

II.7.3.4 – Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos e frações de vegetais quanto à inibição da produção de óxido nítrico, utilizaram-se macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos injetados, por via intraperitoneal, com tioglicolato a 3% em salina. A microextração peritoneal, com meio de cultura DMEM suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, foi feita após um período de 4-5 dias de injeção do tioglicolato. As células do exsudato peritoneal incubadas em placas de cultura de 96 poços (2x10⁵ células/poço) por um período de 2 horas, em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não-aderentes. As células aderentes foram estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN-γ (5 ng/mL), na presença ou não dos extratos ou frações, em meio DMEM completo. Após 24 horas, 50 µL do sobrenadante de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para a avaliação da quantidade de nitrito através do método de Griess.

A reação de Griess foi feita adicionando-se aos 50 µL do sobrenadante/poço igual volume do reagente do Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloreto naftiletileno diamina – NEED – 0,1% em H₃PO₄ a 0,3 mol/L). A leitura das placas foi feita imediatamente em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico de cada extrato ou fração avaliada foi determinada comparando-se os resultados obtidos com os resultados dos sobrenadantes de culturas de células não tratadas com drogas.

II. 7.3.5 – Avaliação da inibição de linfoproliferação

Para avaliar a atividade inibidora da linfoproliferação dos extratos e frações de vegetais, foram utilizadas células totais de baço de camundongos. As células (4×10^5 /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio DMEM completo, na presença ou não dos extratos ou frações e estimuladas com o mitógeno concavalina A (Con A; $1 \mu\text{g/mL}$; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), lectina de origem vegetal (*Canavalia ensiformis*) capaz de provocar ativação policlonal de linfócitos. Cada substância foi testada em triplicata.

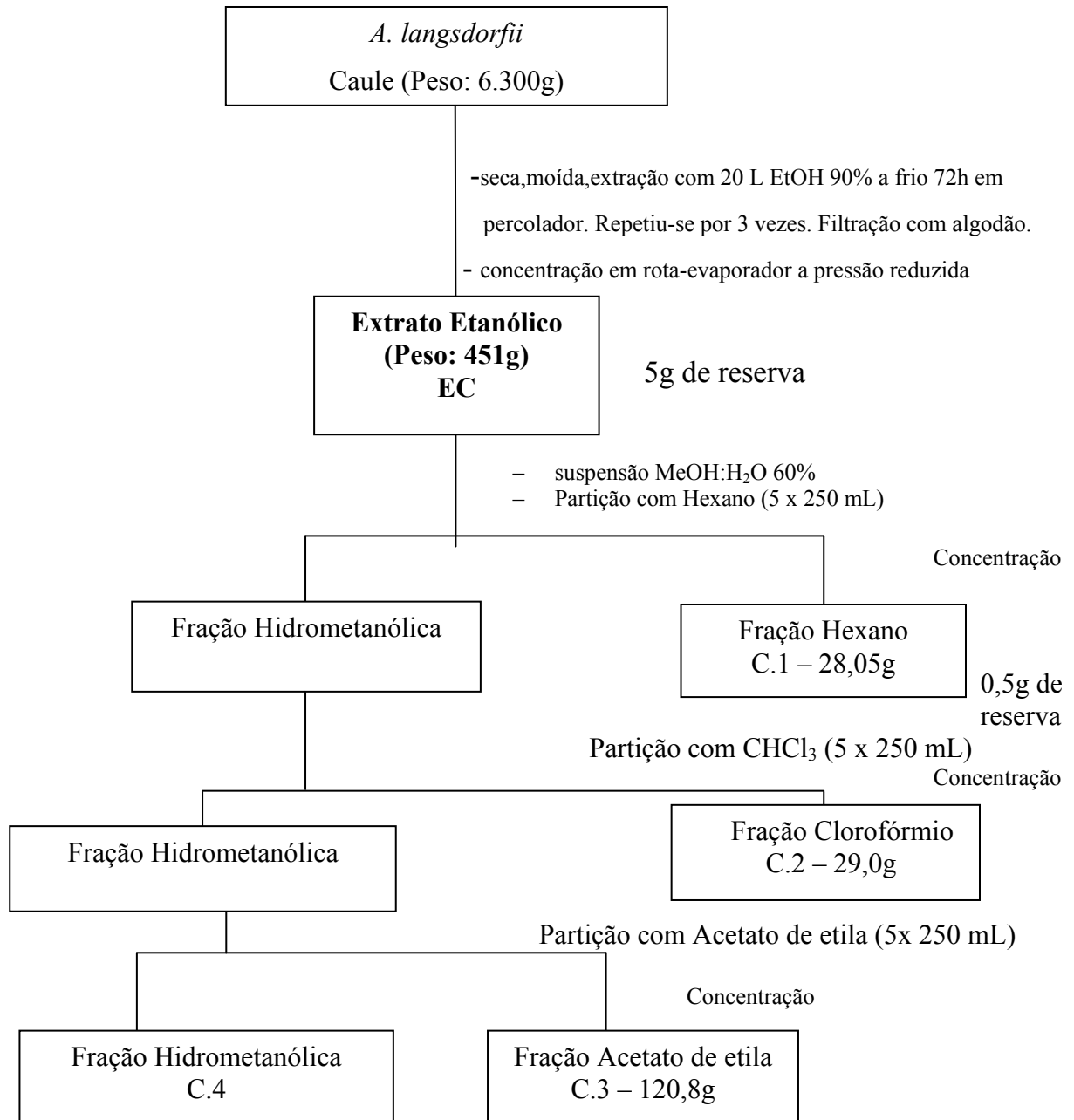
As células foram incubadas durante 48 horas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 . Após este período, adicionou-se timidina tritiada ($1 \mu\text{Ci/poço}$) e incubou-se novamente as células em estufa sob as mesmas condições, por um período de 12-48 horas. As células foram então coletadas para quantificação da radioatividade beta, conforme descrito através da comparação da incorporação da tiamina em culturas de células estimuladas com Con A somente ou em presença dos extratos e frações.

II.8 – Isolamento dos Constituintes químicos da espécie *A. langsdorffii*

II.8.1 – Partição do extrato etanólico do caule

O extrato do caule foi submetido a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. O extrato bruto (451 g) foi solubilizado em 400 mL de metanol e acrescentou-se 600 mL de água. Esta suspensão foi extraída sucessivamente com hexano (5x250 mL), clorofórmio (5x250 mL) e acetato de etila (5x250 mL). As frações hidrometanólica, em acetato de etila, em clorofórmio, e em hexano, foram concentradas em aparelho rotatório a baixa pressão. Ao final foram obtidas em hexano 28,05 g (6,65%), clorofórmio 29 g (6,43%) e acetato de etila 120,8 g (26,78%). (**Fluxograma 1**).

Partes das frações foram enviadas ao laboratório de ensaios de atividade biológica na FIOCRUZ em Salvador com a finalidade de triagem biológica e de confirmar a atividade.



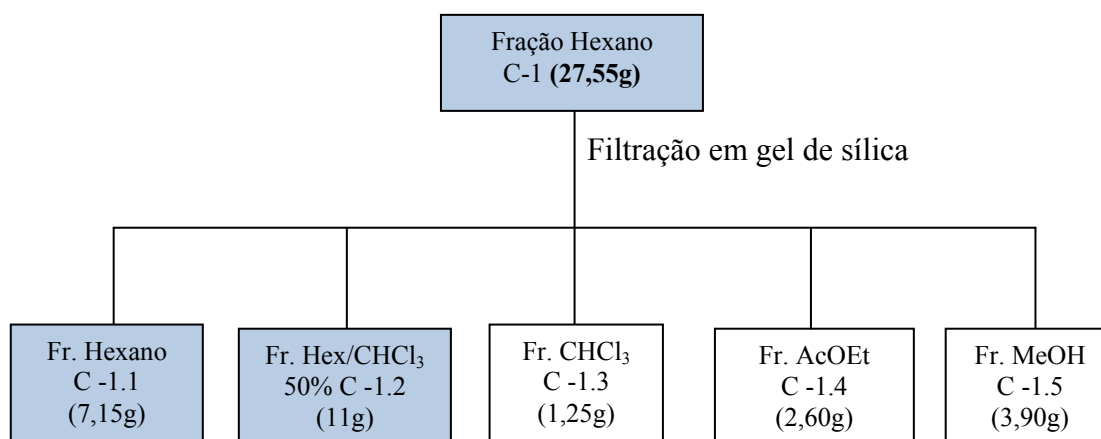
Fluxograma 1 - Extração e partição do extrato etanólico do caule da *A. langsdorfii*.

II.8.1.1 – Procedimento experimental efetuado com a fração Hexano do caule da *A. langsdorfii*

II.8.1.1.1 – Filtração em gel de sílica da Fração Hexano (C-1)

A fração hexano (C-1) 28,05 g, oriunda da partição do EC, foi submetida à filtração em funil de separação à pressão reduzida em gel de sílica ativada, utilizando-se Hexano, CHCl_3 , AcOEt, MeOH e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 2**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD. O rendimento foi de 92,35%.

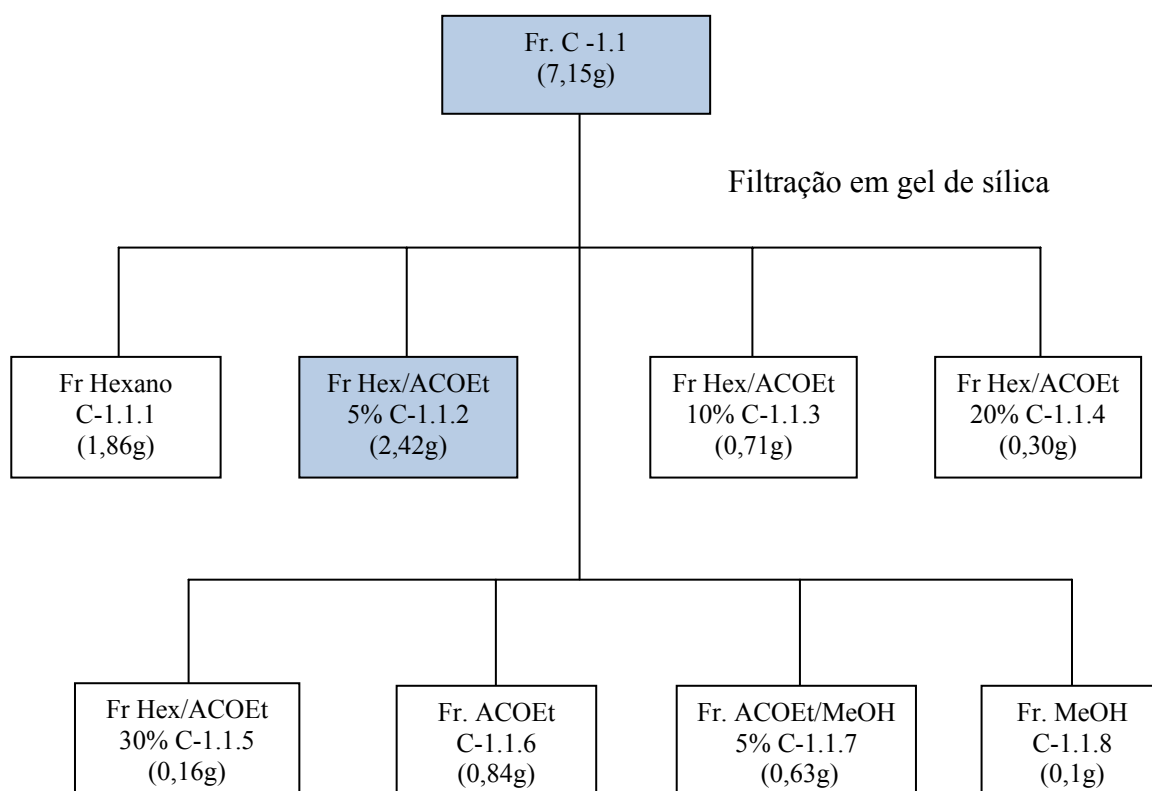
As frações oriundas da filtração foram enviadas ao laboratório de ensaios de atividade biológica na FIOCRUZ em Salvador com a finalidade de triagem biológica e de confirmar a atividade.



Fluxograma 2 - Filtração em gel de sílica da fração Hexano C-1

II.8.1.1.1.1 – Filtração em gel de sílica da fração C -1.1

A fração C 1.1 (Fr. Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano) (7,15 g) foi submetida à filtração em coluna de gel de sílica ativada, utilizando-se Hexano, ACOEt, MeOH e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 3**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD. Desta fração obteve-se sub-frações.



Fluxograma 3 - Filtração em gel de sílica da fração C-1.1

II.8.1.1.1.1.1 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração C-1.1.2 proveniente da filtração da fração C -1.1

A fração C-1.1.2 [Fr Hex/ACOEt 5% oriunda da filtração da Fração Hexano (C-1.1)] (2,42g) foi submetida à filtração em coluna de gel de sílica ativada, utilizando como fase móvel o sistema Hex:AcOEt em grau crescente de polaridade. Foram coletadas 101 frações de 50 mL que foram reunidas posteriormente em 15 frações após análise em CCD (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Filtração da fração C-1.1.2 proveniente da filtração da fração C -1.1

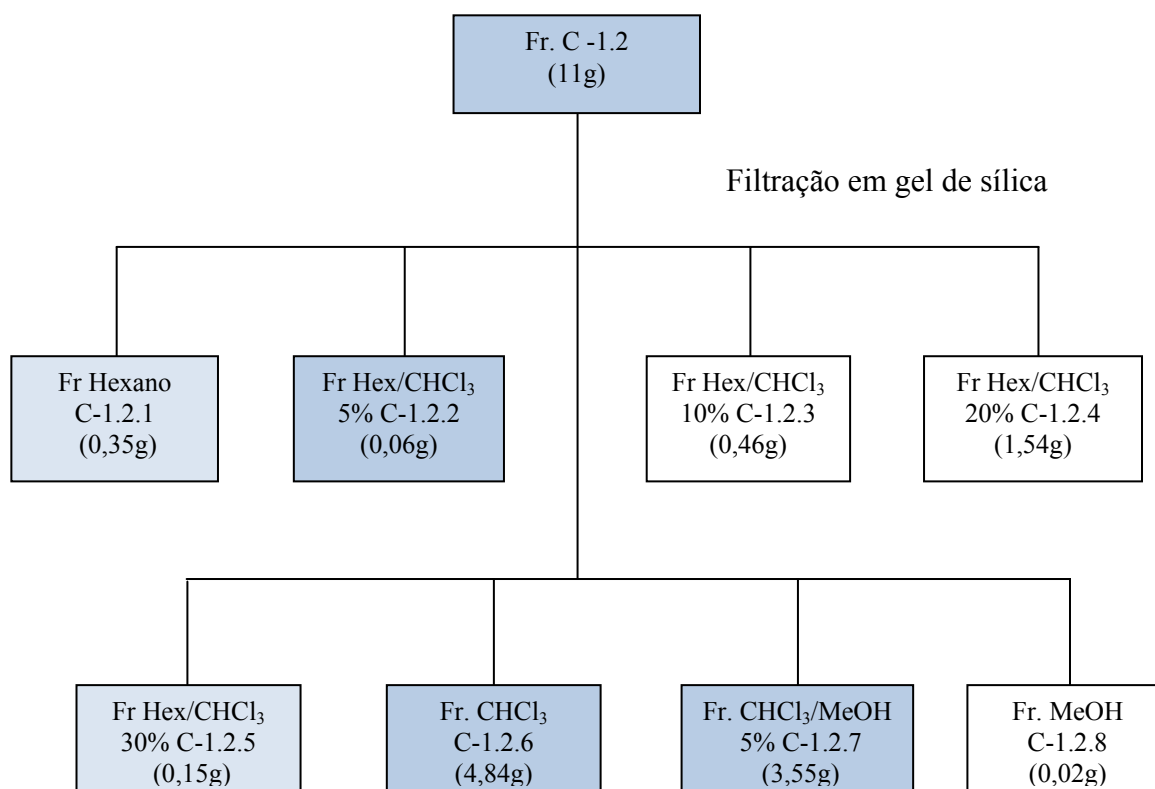
Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-19	0,01
Hex/AcOEt 9:1	20-21	3,40
Hex/AcOEt 9:1	22-23	0,38
Hex/AcOEt 9:1	24	0,11
Hex/AcOEt 9:1	25	0,19
Hex/AcOEt 8:2	26-30	1,67
Hex/AcOEt 8:2	31	1,16
Hex/AcOEt 8:2	32-35	2,84
Hex/AcOEt 8:2	36-46	3,19
Hex/AcOEt 7:3	47-56	0,89
Hex/AcOEt 7:3	57-61	0,62
Hex/AcOEt 6:4	62-74	2,84
Hex/AcOEt 1:1	75-84	1,65
4:6 e ACOEt	85-101	2,19

II.8.1.1.1.1.1 –Estudo da fração 36-46

A fração 36-46 (Hex/AcOEt 8:2 oriunda da filtração da fração C-1.1.2 proveniente da filtração da fração C -1.1) (3,19 g) apresentava cristais muito bem definidos. Devido à esse fato e a sua massa ela foi submetida a recristalização em MeOH. Assim foi obtido o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco cristalino em forma de agulhas, codificado de **ALC-1** (0,2g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza esteróide foi sugerida por apresentar coloração roxa em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard.

II.8.1.1.1.2 – Filtração em gel de sílica da fração C -1.2

A fração C-1.2 [Fr. Hex/ CHCl_3 50% oriunda da filtração da Fração Hexano (C-1)] (11 g) apresentou característica oleosa amarelo clara. Esta foi submetida à filtração em coluna de gel de sílica ativada, utilizando-se Hexano, CHCl_3 , MeOH e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 4**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD. Desta fração obteve-se várias sub-frações sólida de cor branca candidatas para análise minuciosa posterior.



Fluxograma 4 - Filtração em gel de sílica da fração C-1.2

II.8.1.1.1.2.1 – Estudo da fração C-1.2.1 proveniente da filtração da fração C -1.2

A fração C-1.2.1 [Fr. Hexano oriunda da filtração da fração Fr. Hex/ CHCl_3 50% (C-1.2) oriunda da filtração da Fração Hexano (C-1.1)] (0,35 g) apresentava cristais muito bem definidos. Quando comparada em CCD com o composto **ALC-1** revelavam certa similaridade, porém apresentava impurezas. Assim, a fração foi submetida a processos de lavagens utilizando como solvente o Hexano na tentativa de remover um óleo amarelado. Foi obtido o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação,

sendo um sólido branco cristalino em forma de agulhas, codificado de **ALCF-1** (0,015g). O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza esteróide foi sugerida por apresentar coloração roxa em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard.

Sabendo-se da pouca quantidade isolada tornando-se impossível levá-lo para identificação por RMN e que por outro lado o β -sitosterol é bastante comum em extratos de plantas (principalmente em frações Hexano), comparou-se o **ALCF-1** com uma amostra de β -sitosterol por CCDA, onde indicaram o mesmo rf. Nesse meio tempo a análise de RMN de ^1H do composto **ALC-1** indicava alguns diferenciais em relação ao **ALCF-1** fazendo com que esta permanecesse sob o código de **ALCF-1**.

II.8.1.1.1.2.2 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração C-1.2.2 proveniente da filtração da fração C -1.2

A fração C-1.2.2 [Fr Hex/ CHCl_3 5% oriunda da filtração da fração Fr. Hex/ CHCl_3 50% (C-1.2) oriunda da filtração da Fração Hexano (C-1.1)] (0,06 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 20 frações de volume aproximado de 5 mL cada uma, utilizando Hexano, CHCl_3 , MeOH e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Cromatografia da fração C-1.2.2 proveniente da filtração da fração C-1.2

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-5	0,001
Hex/ CHCl_3 3%	6-7	0,008
Hex/ CHCl_3 5%	8-9	0,010
Hex/ CHCl_3 10%	10-11	0,004
Hex/ CHCl_3 50%	12	0,020
CHCl_3	13-14	0,003
CHCl_3 /MeOH 10%	15-17	0,002
CHCl_3 /MeOH 50%	18-19	0,004
MeOH	20	0,006

A fração 12 (Hex/CHCl₃ 50% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.2 proveniente da filtração da fração C-1.2) (0,02 g) possibilitou o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALC-5**, a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenóide foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

II.8.1.1.1.2.3 – Estudo da fração C-1.2.5 proveniente da filtração da fração C -1.2

A fração C-1.2.5 [Fr Hex/CHCl₃ 30% oriunda da filtração da fração Fr. Hex/CHCl₃ 50% (C-1.2) oriunda da filtração da Fração Hexano (C-1.1)] (0,15g) foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALC-6** (0,06 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

Após a análise de RMN ¹H e ¹³C as substâncias codificadas como **ALC-6** e **ALC-5** foram consideradas as mesmas substâncias e então reunidas com a codificação final **ALC-5**.

II.8.1.1.1.2.4 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C -1.2

A fração C-1.2.6 [Fr. CHCl_3 oriunda da filtração da fração Fr. Hex/ CHCl_3 50% (C-1.2) oriunda da filtração da Fração Hexano (C-1.1)] (4,84g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 19 frações de volume aproximado de 250 mL cada uma, utilizando Hexano, CHCl_3 , MeOH e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hex/ CHCl_3 30%	1	0,06
Hex/ CHCl_3 30%	2-4	0,91
Hex/ CHCl_3 30%	5-6	0,52
Hex/ CHCl_3 50%	7-8	0,92
Hex/ CHCl_3 50%	9	0,54
Hex/ CHCl_3 50%	10	0,74
Hex/ CHCl_3 50%	11	0,27
Hex/ CHCl_3 50%	12-14	0,12
Hex/ CHCl_3 70%	15	0,04
CHCl_3	16-17	0,16
CHCl_3 /MeOH 50%	18	0,18
MeOH	19	0,14

II.8.1.1.1.2.4.1 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração 7-8 proveniente da coluna da fração C-1.2.6

A fração 7-8 (Hex/CHCl₃ 50% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2) (0,92 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 62 frações de volume aproximado de 5 mL cada uma, utilizando Hexano, AcOEt e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Cromatografia da fração 7-8 proveniente da coluna da fração C-1.2.6

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-14	0,03
Hex/AcOEt 5%	15-16	0,06
Hex/AcOEt 10%	17-39	0,54
Hex/AcOEt 15%	40-51	0,09
Hex/AcOEt 30%	52-61	0,17
AcOEt	62	0,18

A fração 17-39 (Hex/AcOEt 10% oriunda da cromatografia da fração 7-8 proveniente da coluna da fração C-1.2.6) (0,5 g) foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALCF-6** (0,10 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico. A princípio pensou-se que era igual ao **ALC-6** porem após RMN de ¹H constatou-se que eram diferentes.

II.8.1.1.1.2.4.2 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração 9 proveniente da coluna da fração C-1.2.6

A fração 9 (Hex/CHCl₃ 50% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2) (0,54g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 80 frações de volume aproximado de 5 mL cada uma, utilizando Hexano, AcOEt e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Cromatografia da fração 9 proveniente da coluna da fração C-1.2.6

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-30	0,09
Hex/AcOEt 5%	31-40	0,04
Hex/AcOEt 10%	41-60	0,17
Hex/AcOEt 20%	61-69	0,03
Hex/AcOEt 50%	70-79	0,05
AcOEt	80	0,09

A fração 41-60 (Hex/AcOEt 10% oriunda da cromatografia da fração 9 proveniente da coluna da fração C-1.2.6) (0,17 g) possibilitou o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALCFC-6**. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da cromatografia em camada delgada de sílica, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

Após a análise por CCD as substâncias codificadas como **ALCFC-6** e **ALCF-6** foram consideradas as mesmas substâncias e então reunidas.

II.8.1.1.1.2.4.3 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração 10 proveniente da coluna da fração C-1.2.6

A fração 10 (Hex/CHCl₃ 50% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2) (0,74 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 90 frações de volume aproximado de 18 mL cada uma, utilizando Hexano, AcOEt e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Cromatografia da fração 10 proveniente da coluna da fração C-1.2.6

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-29	0,08
Hex/AcOEt 2%	30-31	0,07
Hex/AcOEt 5%	32-38	0,09
Hex/AcOEt 10%	39-44	0,12
Hex/AcOEt 20%	45-51	0,26
Hex/AcOEt 30%	52-58	0,02
Hex/AcOEt 50%	59-77	0,01
AcOEt	78-90	0,06

A fração 45-51 (Hex/AcOEt 20% oriunda da cromatografia da fração 10 proveniente da coluna da fração C-1.2.6) (0,26 g) possibilitou o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALCF-6**. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da cromatografia em camada delgada de sílica, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

Após a análise por CCD as substâncias codificadas como **ALCF-6** e **ALCF-6** foram consideradas as mesmas substâncias e então reunidas com a codificação final **ALCF-6**.

II.8.1.1.1.2.4.4 – Estudo das frações 2-4, 5-6 e 16-17 provenientes da coluna da fração C-1.2.6

A análise comparativa das frações 2-4 (Hex/CHCl₃ 30% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2) (0,97 g) e 5-6 (Hex/CHCl₃ 30% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2) (0,52 g) por CCD permitiu reuni-las. Após, foram submetidas à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALC-4** (0,36 g). O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

Após a análise por CCD as substâncias codificadas como **ALC-4**, **ALC-5** e **ALC-6** foram consideradas as mesmas substâncias e então reunidas com a codificação final **ALC-5**.

II.8.1.1.1.2.5- Estudo da fração 16-17 proveniente da coluna da fração C-1.2.6

A fração 16-17 (Fração CHCl₃ 100% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.6 proveniente da filtração da fração C-1.2) de massa 0,16 g foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALC-8** (0,02 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenoídica foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

II.8.1.1.1.2.6- Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração C-1.2.7 proveniente da filtração da fração C-1.2

A fração C-1.2.7 [Fr. CHCl₃/MeOH 5% oriunda da filtração da fração Fr. Hex/CHCl₃ 50% (C-1.2) oriunda da filtração da Fração Hexano (C-1.1)] (3,55g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 20 frações de volume aproximado de 5 mL cada uma, utilizando CHCl₃, MeOH e mistura destes como solventes de

eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Cromatografia da fração C-1.2.7 proveniente da filtração da fração C-1.2

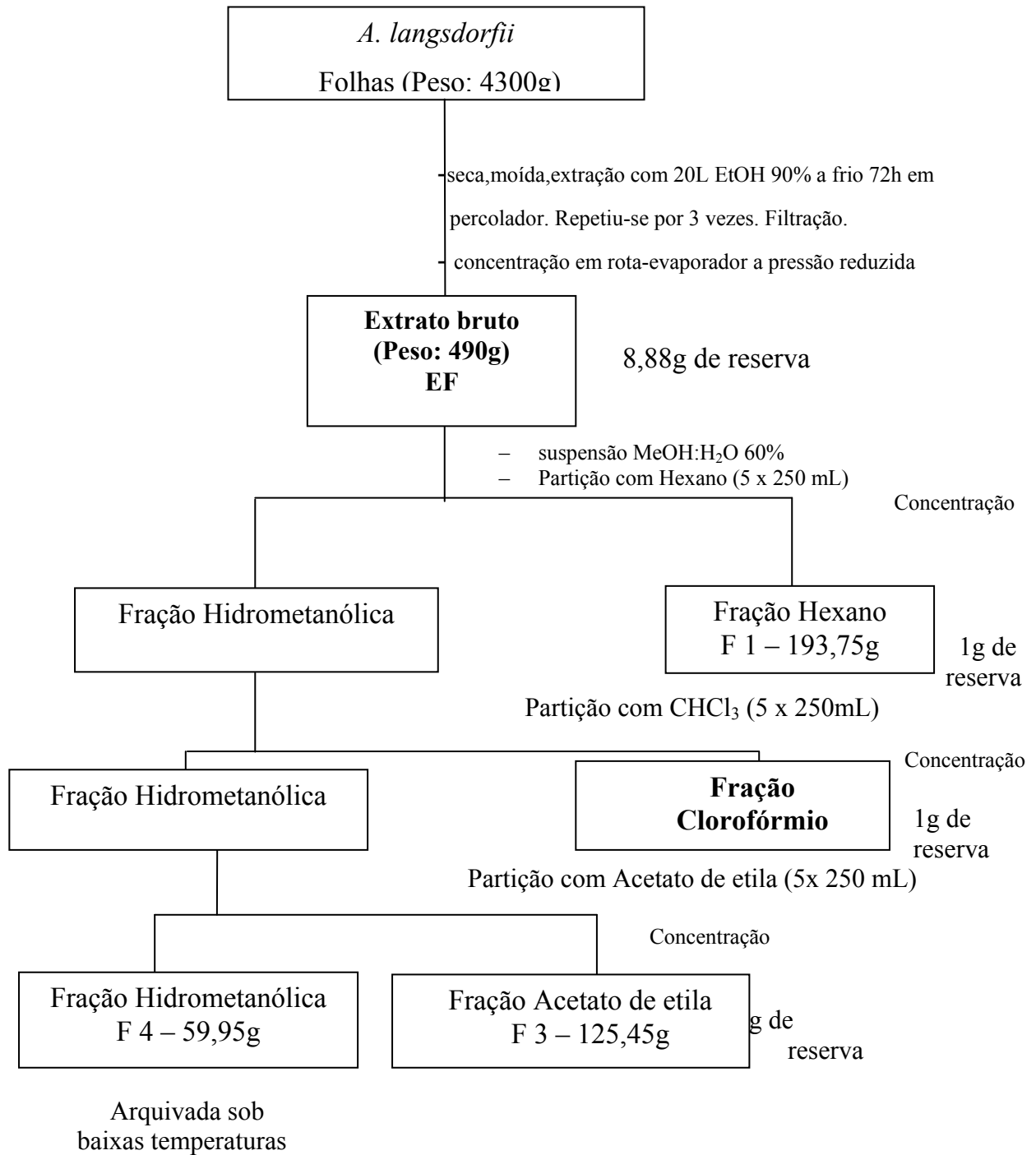
Eluentes	Frações	Massa (g)
CHCl ₃ 30%	1-5	0,10
CHCl ₃ /MeOH 1%	6-8	0,19
CHCl ₃ /MeOH 2%	9-11	0,37
CHCl ₃ /MeOH 3%	11-12	0,75
CHCl ₃ /MeOH 5%	13-14	0,63
CHCl ₃ /MeOH 10%	15-17	0,09
CHCl ₃ /MeOH 50%	18-19	0,29
MeOH	20	0,58

A fração 11-12 (Fração CHCl₃/MeOH 3% oriunda da cromatografia da fração C-1.2.7 proveniente da filtração da fração C-1.2) (0,75g) foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALC-2** (0,02g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenóide foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

II.8.2 – Partição do extrato etanólico das folhas

O extrato das folhas foi submetido a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Parte do extrato bruto (EF) 490 g foi solubilizado em 400 mL de metanol e acrescentou-se 600 mL de água. Esta suspensão foi extraída sucessivamente com hexano (5x250 mL), clorofórmio (5x250 mL) e acetato de etila (5x250 mL). As frações hidrometanólica, em acetato de etila, em clorofórmio, e em hexano, foram concentradas em aparelho rotatório a baixa pressão. Ao final foram obtidas 193,75 g em hexano (39,53%), 57,60 g em clorofórmio (11,75%), 125,45 g em acetato de etila (25,60%) e 59,95 g na hidrometanólica (12,23%) (**Fluxograma 5**).

Partes das frações foram enviadas ao laboratório de ensaios de atividade biológica na FIOCRUZ em Salvador com a finalidade de triagem biológica e de confirmar a atividade.



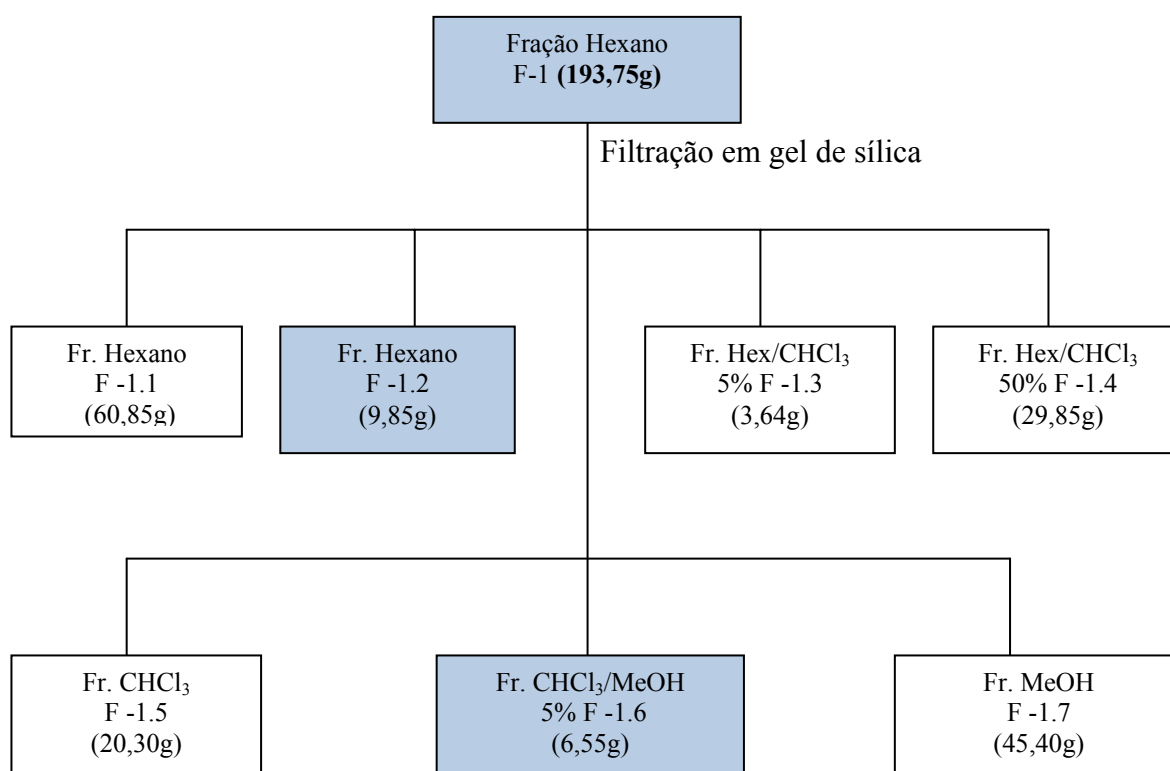
Fluxograma 5 – Extração e partição do extrato etanólico das folhas da *A. langsdorfii*.

II.8.2.1 – Procedimento experimental efetuado com a fração Hexano das folhas da *A. langsdorfii*

II.8.2.1.1 – Filtração em gel de sílica da Fração Hexano (F-1)

A fração hexano (F-1) 193,75g, oriunda da partição do EF, foi submetida à filtração em funil de separação à pressão reduzida em gel de sílica ativada, utilizando-se Hexano, CHCl_3 , MeOH e mistura destes como solventes de eluição em grau crescente de polaridade. Todas as frações obtidas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas em 7 grupos (**Fluxograma 6**). A filtração obteve um rendimento de 91%.

As frações oriundas da filtração foram enviadas ao laboratório de ensaios de atividade biológica na FIOCRUZ em Salvador com a finalidade de triagem biológica e de confirmar a atividade.



Fluxograma 6 - Filtração em gel de sílica da fração hexano F -1

II.8.2.1.1.1 – Filtração em gel de sílica da fração F -1.2

A fração F -1.2 (Fr. Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano) (9,85g), oriunda da filtração em gel de sílica da F-1, foi submetida à filtração em coluna à pressão reduzida, utilizando como adsorvente gel de sílica ativada. Foram coletadas 11 frações de volume aproximado de 250 mL cada, empregando-se na eluição Hexano, AcOEt e mistura destes em grau crescente de polaridade. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Cromatografia da fração F-1.2 proveniente da filtração da fração Hexano

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-2	1,85
Hex/ AcOEt 30%	3-5	3,10
Hex/ AcOEt 50%	6-8	1,75
AcOEt	9-11	3,13

II.8.2.1.1.1.1 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração 3-5 proveniente da filtração da fração F-1.2

A fração 3-5 (Hex/AcOEt 30% oriunda da cromatografia da fração F-1.2 proveniente da filtração da fração Hexano) (3,10g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 90 frações de volume aproximado de 15 mL cada uma, empregando-se na eluição Hexano, AcOEt e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Cromatografia da fração 3-5 proveniente da filtração da fração F-1.2

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-5	0,15
Hex/ AcOEt 5%	6-15	0,34
Hex/ AcOEt 10%	16-21	0,27
Hex/ AcOEt 15%	22-31	0,23
Hex/ AcOEt 20%	32-41	0,19
Hex/ AcOEt 30%	42-51	0,21
Hex/ AcOEt 40%	52-61	0,33
Hex/ AcOEt 50%	62-71	0,35
Hex/ AcOEt 80%	72-81	0,48
AcOEt	82-90	0,45

A fração 32-41 (Hex/AcOEt 20% oriunda da cromatografia da fração 3-5 proveniente da filtração da fração F-1.2) de massa 0,19g foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco cristalino em forma de agulhas, codificado de **ALCF-22** (0,09 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel.

II.8.2.1.1.1.2 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração 6-8 proveniente da filtração da fração F-1.2

A fração 6-8 (Hex/AcOEt 50% oriunda da cromatografia da fração F-1.2 proveniente da filtração da fração Hexano) (1,75g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 70 frações de volume aproximado de 5 mL cada uma, utilizando Hexano, AcOEt e mistura destes como solventes de eluição em grau crescente de polaridade. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 12**.

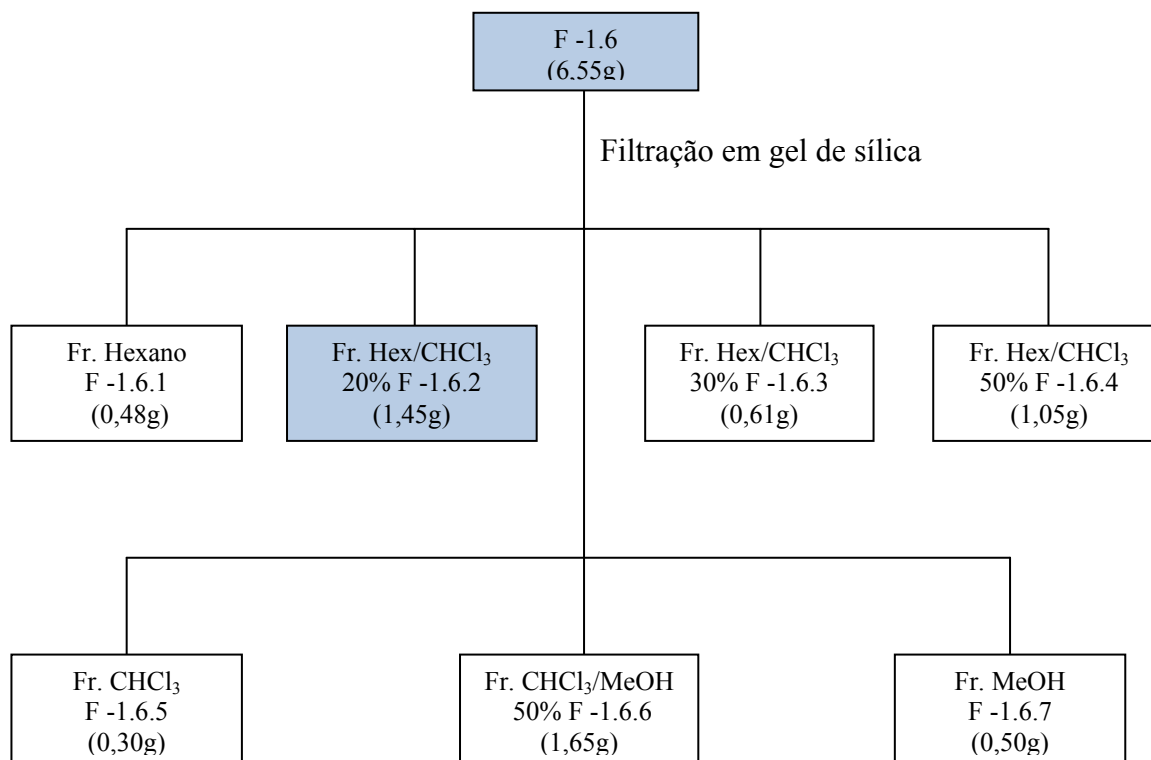
Tabela 12– Cromatografia da fração 6-8 proveniente da filtração da fração F-1.2

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-5	0,09
Hex/ AcOEt 5%	6-10	0,15
Hex/ AcOEt 10%	10-16	0,25
Hex/ AcOEt 20%	17-25	0,19
Hex/ AcOEt 30%	26-37	0,28
Hex/ AcOEt 50%	38-59	0,35
AcOEt	60-70	0,38

A fração 38-59 (Hex/AcOEt 50% oriunda da cromatografia da fração 6-8 proveniente da filtração da fração F-1.2) (0,35g) foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALC-5** (0,20 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenóide foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

II.8.2.1.1.2 – Filtração em gel de sílica da fração F -1.6

A fração F-1.6 (Fr. CHCl₃/MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano) (6,55g), oriunda da filtração em gel de sílica da fração F-1, foi submetida à uma nova filtração em coluna de gel de sílica ativada, utilizando-se Hexano, CHCl₃, MeOH e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 7**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD.



Fluxograma 7 - Filtração em gel de sílica da fração F -1.6

II.8.2.1.1.2.1 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração F -1.6.2 proveniente da filtração da fração F-1.6

A fração F -1.6.2 (Fr. Hex/CHCl₃ 20% oriunda da filtração da Fração F -1.6) (1,45g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica ativada. Foram coletadas 65 frações de volume aproximado de 10 mL cada uma, utilizando Hexano, AcOEt, MeOH e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Cromatografia da fração F -1.6.2 proveniente da filtração da fração F-1.6

Eluentes	Frações	Massa (g)
Hexano	1-7	0,07
Hex/ AcOEt 10%	8-13	0,18
Hex/ AcOEt 20%	14-21	0,24
Hex/ AcOEt 30%	22-27	0,13
Hex/ AcOEt 50%	28-30	0,10
AcOEt	31-40	0,26
AcOEt/MEOH	41-55	0,22
AcOEt/MEOH	56-60	0,02
AcOEt/MEOH	61-63	0,11
MeOH	64-65	0,09

A análise comparativa das frações 14-21 (fração Hex/AcOEt 20% oriunda da cromatografia da fração F -1.6.2 proveniente da filtração da fração F-1.6) e 22-27 (fração Hex/AcOEt 30% oriunda da cromatografia da fração F -1.6.2 proveniente da filtração da fração F-1.6) por CCD permitiu reuni-las. Após, foram submetidas à uma microextração utilizando como solvente o Hexano possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALC-3** (0,16 g). O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza triterpenóide foi sugerida por apresentar coloração rósea avermelhada em CCD frente ao reagente de Liebermann-Burchard e coloração violeta com solução ácida de sulfato cérico.

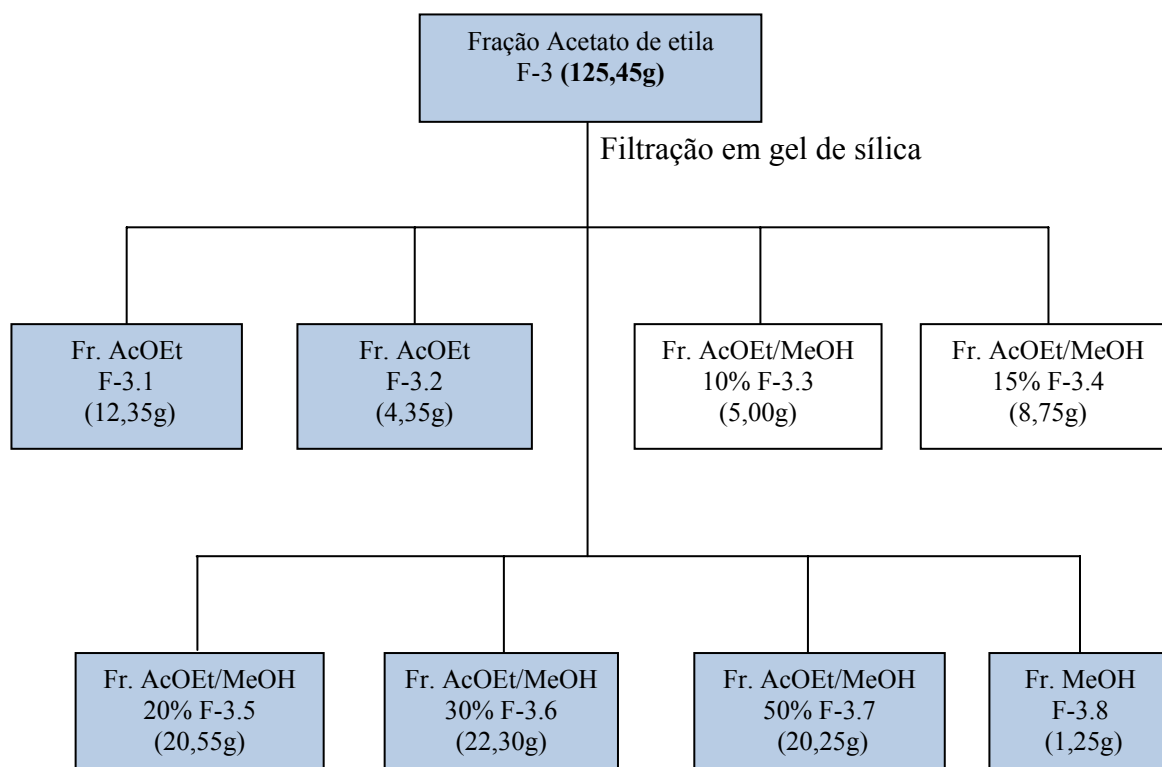
Após a análise por CCD as substâncias codificadas como **ALC-3** e **ALC-5** foram consideradas as mesmas substâncias e então reunidas com a codificação final **ALC-5**.

II.8.2.2 – Procedimento experimental efetuado com a fração Acetato de etila das folhas da *A. langsdorffii*

II.8.2.2.1 – Filtração em gel de sílica da Fração Acetato de etila (F-3)

A fração acetato de etila (F-3) 120,24g, oriunda da partição do EF, foi submetida à filtração em funil de separação à pressão reduzida em gel de sílica desativada com água a 10%, utilizando-se AcOEt, MeOH e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas em 8 grupos (**Fluxograma 8**). Obteve-se um rendimento de 80,8%.

As frações oriundas da filtração foram enviadas ao laboratório de ensaios de atividade biológica na FIOCRUZ em Salvador com a finalidade de triagem biológica e de confirmar a atividade.



Fluxograma 8 - Filtração em gel de sílica da fração acetato de etila F-3

II.8.2.2.1.1 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração F-3.1 proveniente da filtração da fração F-3

A fração F-3.1 [Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila (F-3)](12,35g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica desativada com água a 10%. Foram coletadas 40 frações de volume aproximado de 150 mL cada uma, utilizando AcOEt, MeOH e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 14**.

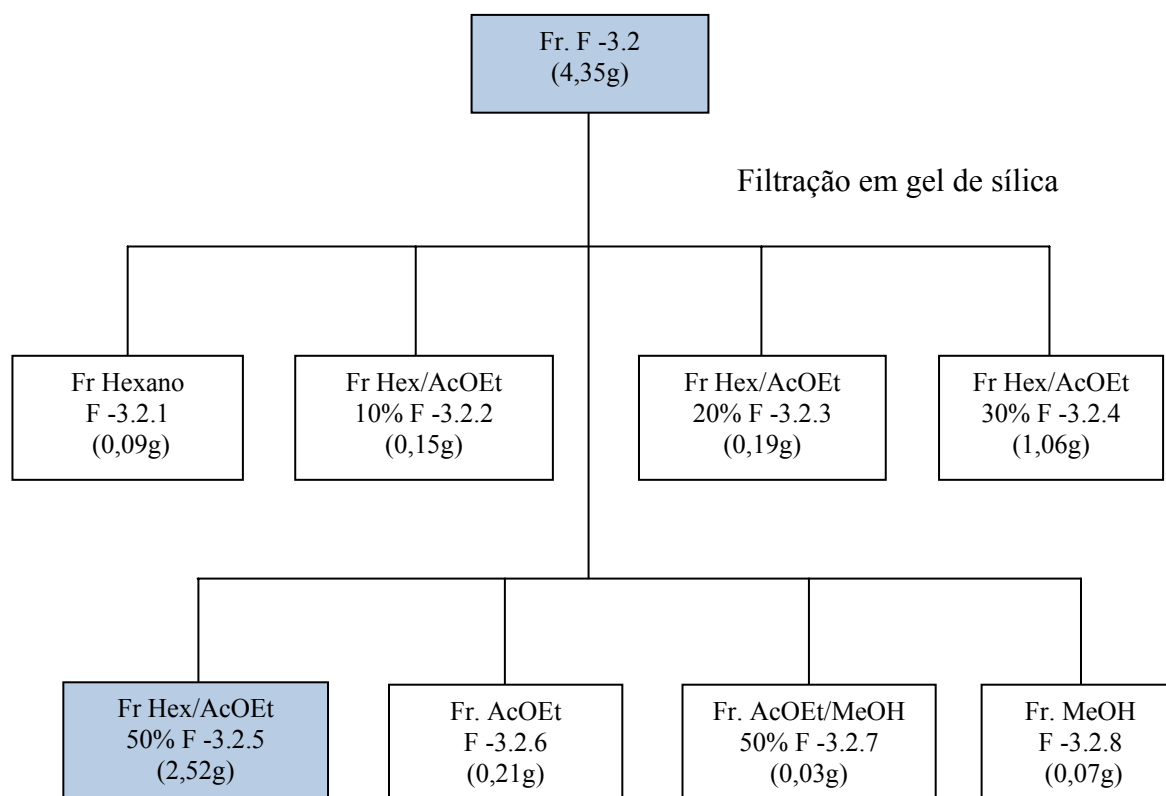
Tabela 14 – Cromatografia da fração F-3.1 proveniente da filtração da fração F-3

Eluentes	Frações	Massa (g)
AcOEt	1-7	2,76
AcOEt/MeOH 1%	8-9	0,15
AcOEt/MeOH 3%	10-11	0,02
AcOEt/MeOH 5%	12-15	0,06
AcOEt/MeOH 10%	16-20	0,36
AcOEt/MeOH 20%	21-25	0,46
AcOEt/MeOH 30%	26-31	3,55
AcOEt/MeOH 50%	32-38	3,10
MeOH	39-40	1,84

A fração 26-31 Fr. AcOEt/MeOH 30% oriunda da cromatografia da fração F-3.1 proveniente da filtração da fração F-3 (3,55g), foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o etanol possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido bege claro amorfo, codificado de **ALF-20** (0,06 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza fenólica foi sugerida por visualização de coloração característica em CCD após revelação com $AlCl_3$ sob luz U.V.

II.8.2.2.1.2 – Filtração em gel de sílica da fração F-3.2

A fração F-3.2 [Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila (F-3)] (4,35g), foi submetida à filtração em coluna de gel de sílica desativada com água a 10%, utilizando-se Hexano, AcOEt, MeOH, e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 9**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD.



Fluxograma 9 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.2

II.8.2.2.1.2.1 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da subfração F-3.2.5 proveniente da filtração da fração F -3.2

A fração F-3.2.5 (Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Filtração da Fração F-3.2) (2,52g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica desativada com água a 10%. Foram coletadas 101 frações de volume aproximado de 50 mL cada uma, utilizando Hexano, AcOEt, MeOH e mistura destes como solventes de eluição em grau crescente de polaridade. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Cromatografia da fração F-3.2.5 proveniente da filtração da fração F -3.2

Eluente	Frações	Massa (g)
Hexano	20-31	0,29
Hex:AcOEt 8:2	32-43	0,38 g
AcOEt	44-57	0,50 g
AcOEt:MeOH 1:1	58-82	0,95 g
MeOH	93-101	0,36 g

II.8.2.2.1.2.1.1 – Cromatografia em coluna em gel de sílica da subfração 58-82 proveniente da fração F-3.2.5

A subfração 58-82 (Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Cromatografia da fração F-3.2.5 proveniente da filtração da fração F -3.2) (0,95g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica desativada com água a 10%. Foram coletadas 81 frações, utilizando-se misturas de Hexano e AcOEt em proporções crescentes de polaridade. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Cromatografia da subfração 58-82 proveniente da fração F-3.2.5

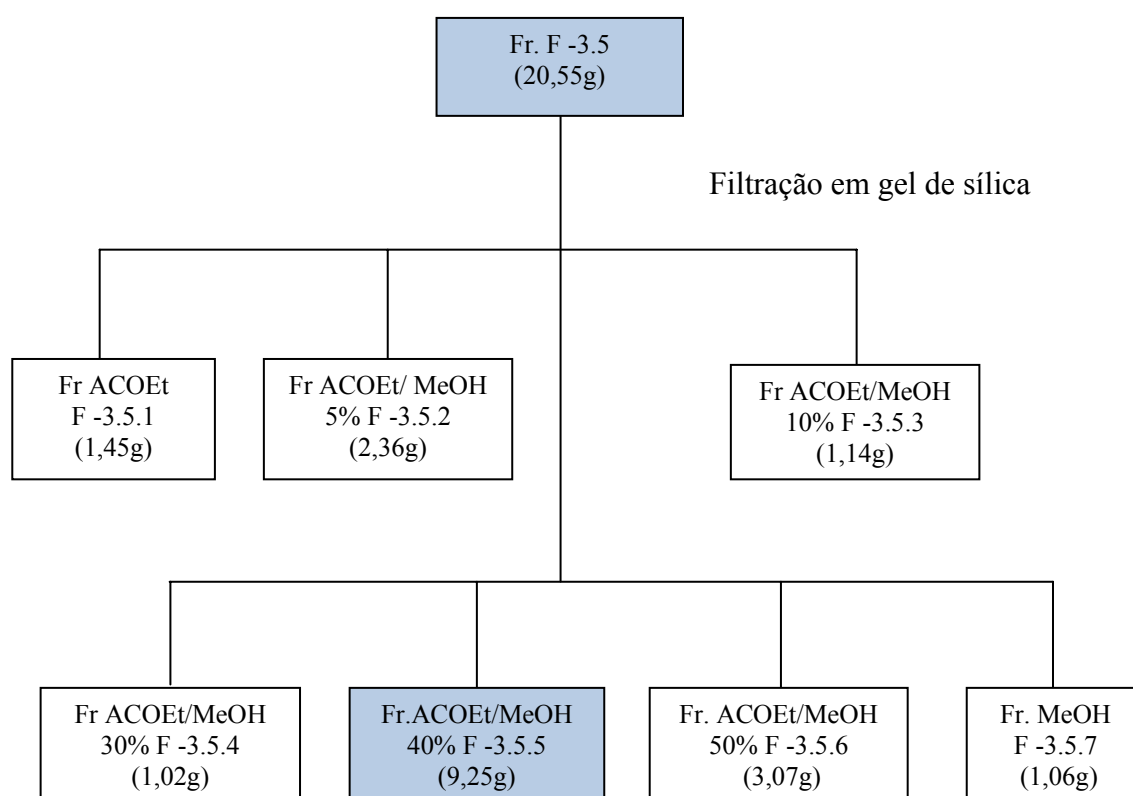
Eluente	Frações	Massa (g)
Hexano	10-31	0,19
Hex:AcOEt 8:2	32-42	0,25
Hex:AcOEt 1:1	43-72	0,32
AcOEt-	73-81	0,17

A fração 43-72 (Fr. Hex/AcOEt 50 % oriunda da cromatografia da subfração 58-82 proveniente da fração F-3.2.5) (0,32g), foi submetida à sucessivas recristalizações em metanol possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido branco amorfo, codificado de **ALF-16** (0,0032 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza

fenólica foi sugerida por visualização de coloração característica em CCD após revelação com $AlCl_3$ sob luz U.V.

II.8.2.2.1.3 – Filtração em gel de sílica da F-3.5

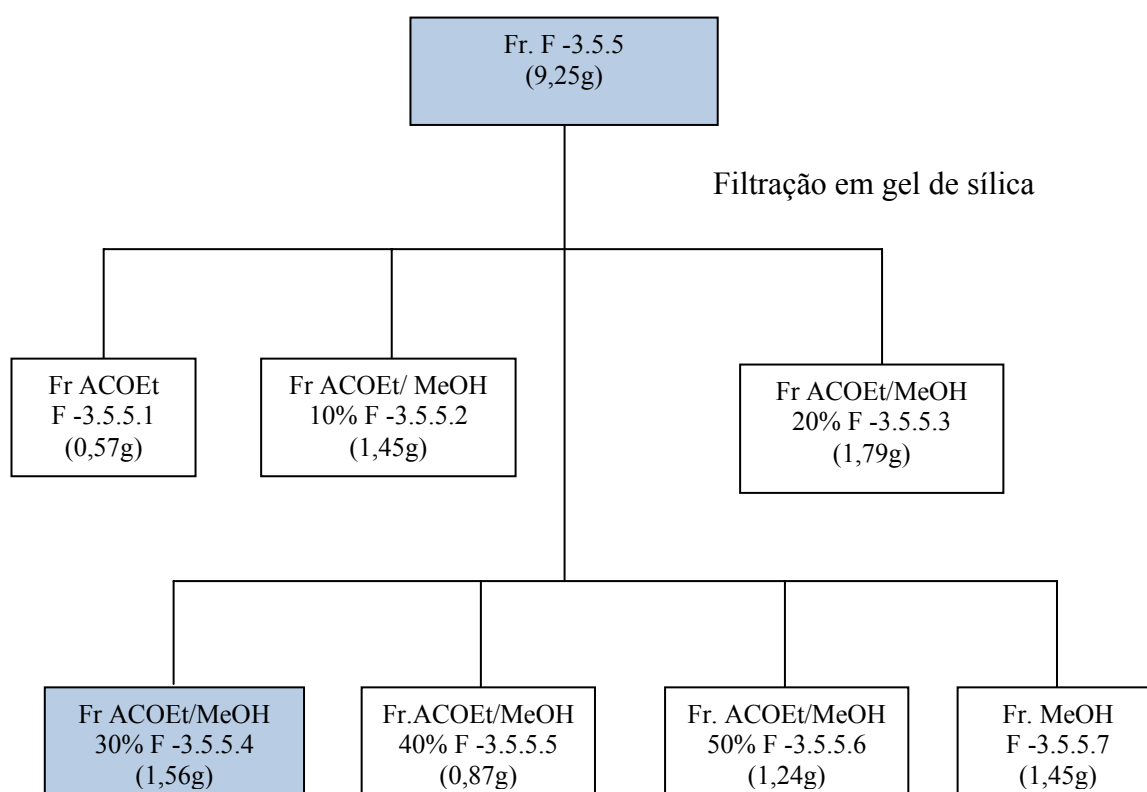
A fração F-3.5 [Fr. AcOEt/MeOH 20% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila (F-3)] (20,55g) de cor amarelo-amarronzado, foi submetida à filtração em funil de separação de gel de sílica desativada com água a 10%. Foram coletadas 7 frações com o volume médio de 250mL cada uma, empregando-se como eluentes AcOEt e MeOH e misturas destes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 10**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD.



Fluxograma 10 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.5

II.8.2.2.1.3 – Filtração em gel de sílica da F-3.5.5

A fração F-3.5.5 (Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Filtração da fração F-3.5) (9,25g) de cor amarelo escuro, foi submetida à filtração em coluna de gel de sílica desativada com água a 10%. Foram coletadas 7 frações com o volume médio de 150mL cada uma, empregando-se como eluentes AcOEt e MeOH e misturas destes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 11**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD.

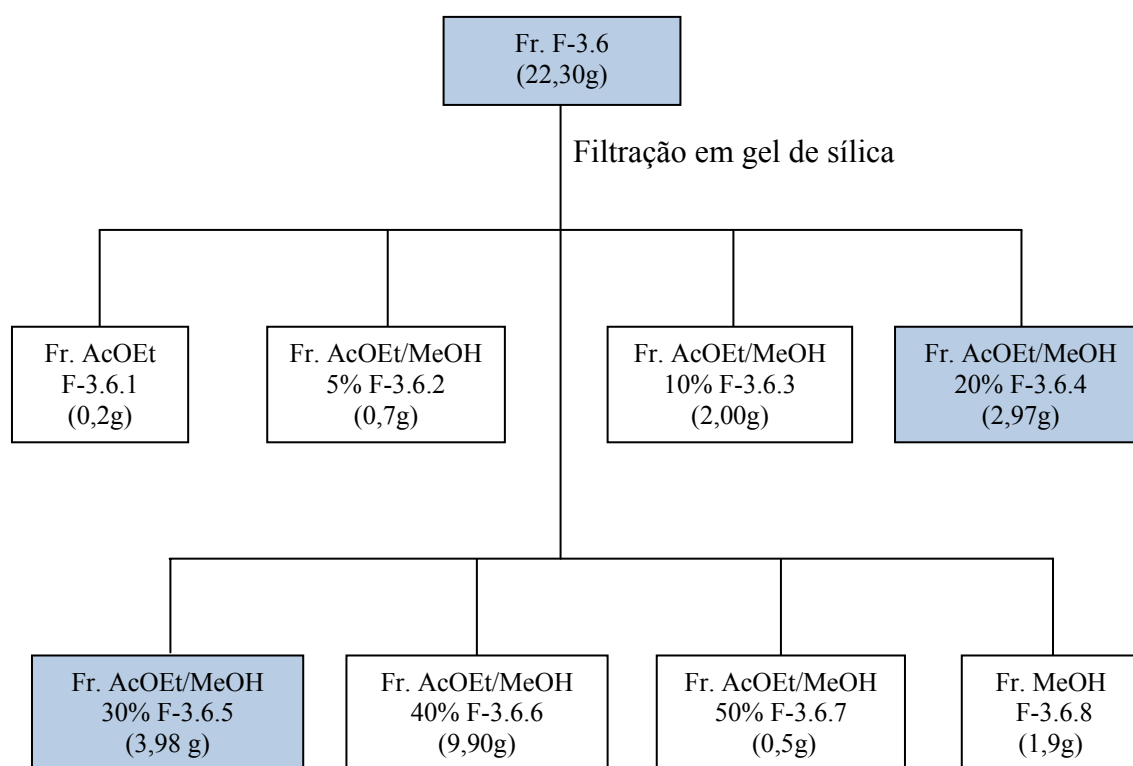


Fluxograma 11 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.5.5

A fração F.3.5.5.4 (Fr. AcOEt/MeOH 30% oriunda da Filtração da Fração F-3.5.5) (1,56g), foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o etanol possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido amorfo amarelo claro, codificado de **ALF-31** (0,06 g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza fenólica foi sugerida por visualização de coloração característica em CCD após revelação com $AlCl_3$ sob luz U.V.

II.8.2.2.1.4 – Filtração em gel de sílica da fração F-3.6

A fração F-3.6 [Fr. AcOEt/MeOH 30% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila (F-3)] (22,30g), foi submetida à filtração em funil de separação de gel de sílica desativada com água a 10%, utilizando-se AcOEt, MeOH, e mistura destes como eluentes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 12**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD.



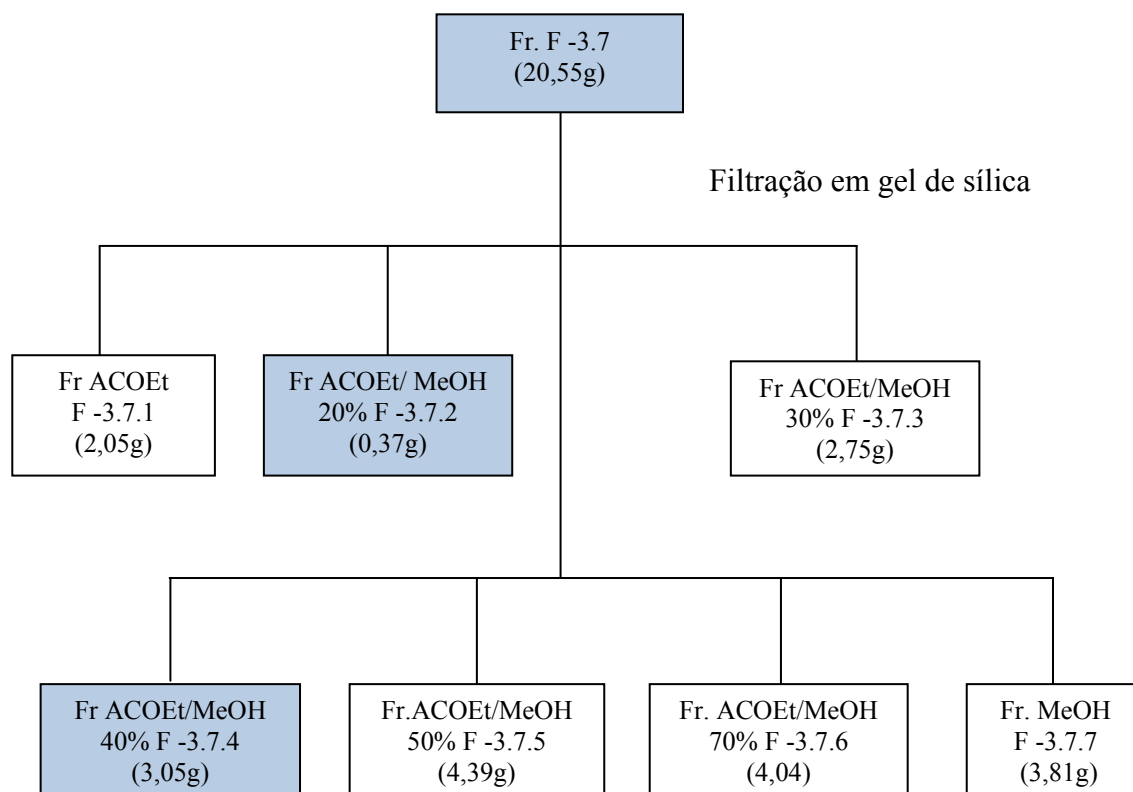
Fluxograma 12 - Filtração em gel de sílica da fração F-3.6

As frações F-3.6.5 e F-3.6.4 ambas sólidas de cor amarelo escuro foram submetidas à sucessivas recristalizações em etanol possibilitando o isolamento de duas substâncias com grau de pureza adequado para identificação, sendo ambas um sólido amorfo amarelado, codificado de **ALF-1** (1,70g) e **ALF-2** (2,0g), respectivamente, as quais foram submetidas a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza fenólica foi

sugerida por visualização de coloração característica em CCD após revelação com AlCl_3 sob luz U.V.

II.8.2.2.1.5 – Filtração em gel de sílica da F-3.7

A fração F-3.7 [Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila (F-3)] (20,25g) foi submetida à filtração em funil de separação de gel de sílica desativada com água a 10%. Foram coletadas 7 frações com o volume médio de 250mL cada uma, empregando-se como eluentes AcOEt e MeOH e misturas destes em grau crescente de polaridade (**Fluxograma 13**). Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD.



Fluxograma 13 - Filtração em gel de sílica da fração F -3.7

II.8.2.2.1.5.1 – Estudo da fração F -3.7.2 proveniente Filtração em gel de sílica da F-3.7

A fração F -3.7.2 (0,37g), foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o etanol possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido amorfo amarelado, codificado de **ALF-19** (0,03g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza fenólica foi sugerida por visualização de coloração característica em CCD após revelação com AlCl_3 sob luz U.V.

II.8.2.2.1.5.2 – Estudo da fração F -3.7.4 proveniente Filtração em gel de sílica da F-3.7

A fração 3.7.4 (3,05g) sólida de cor amarelo escuro foi submetida à sucessivas recristalizações em etanol possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, um sólido amorfo amarelado, codificado de **ALF-3** (1,20g), a qual foi submetida a métodos espectroscópicos para identificação. O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza fenólica foi sugerida por visualização de coloração característica em CCD após revelação com AlCl_3 sob luz U.V.

Após a análise de RMN ^1H e ^{13}C as substâncias codificadas como **ALF-1**, **ALF-2** e **ALF-3** foram consideradas as mesmas substâncias e então reunidas com a codificação final **ALF-1**.

II.8.2.2.1.6 – Cromatografia em coluna de gel de sílica da fração F-3.8 proveniente da filtração da fração F-3

A fração F-3.8 [Fr. MeOH oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila (F-3)] (1,25g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica desativada com água a 10%. Foram coletadas 60 frações de volume aproximado de 8 mL cada uma, utilizando AcOEt, MeOH e mistura destes como solventes de eluição. Todas as frações obtidas foram analisadas através de CCD e reunidas conforme disposto na **Tabela 17**.

Tabela 17 – Cromatografia da fração F-3.8 proveniente da filtração da fração F-3

Eluentes	Frações	Massa (g)
AcOEt	1-7	0,15
AcOEt/MeOH 1%	8-12	0,13
AcOEt/MeOH 3%	13-15	0,09
AcOEt/MeOH 5%	16-18	0,14
AcOEt/MeOH 10%	19-23	0,17
AcOEt/MeOH 20%	24-48	0,06
AcOEt/MeOH 30%	49-52	0,19
AcOEt/MeOH 50%	53-57	0,17
MeOH	58-60	0,10

A fração 24-48 (0,06g), foi submetida à uma microextração utilizando como solvente o etanol possibilitando o isolamento de uma substância com grau de pureza adequado para identificação, sendo um sólido sólido amorfo amarelado, codificado de **ALF-18** (0,02 g). O critério de pureza adotado foi à observação de uma mancha única através da CCD, variando-se a fase móvel. Sua natureza fenólica foi sugerida por visualização de coloração característica em CCD após revelação com AlCl_3 sob luz U.V.

Após a análise por CCD as substâncias codificadas como **ALF-18** e **ALF-19** foram consideradas as mesmas substâncias e então reunidas com a codificação final **ALF-19**.

CAPÍTULO III
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capítulo III. Resultados e Discussão

III.1 – Escolha das partes da planta selecionada

Com o objetivo de dar continuidade ao estudo do isolamento dos princípios ativos dos ensaios realizados pelo IMSEAR, caule e folhas foram escolhidas da planta *A. langsdorfii*, devido às propriedades tripanocidas, inibidoras da linfoproliferação e geração de NO.

III.2 – Rendimento inicial do extrato bruto das folhas e caule e das suas frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica

A partir de 10,3 kg do pó do caule seco foram obtidos 451 g de extrato bruto seco correspondendo a um rendimento de 4,4 % do total do pó macerado. A partir de 4,3 kg do pó das folhas secas foram obtidos 498,88 g de extrato bruto seco o que equivale a 11,6 % do macerado inicial.

Os rendimentos percentuais das frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica oriundas da partição líquido-líquido das folhas e do caule estão na **Tabela 18**.

Tabela 18 – Rendimentos percentuais das frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica

Frações	Folha (%)	Caule (%)
Hexano	39,53	6,22
Clorofórmio	11,75	6,43
Acetato de Etila	25,60	26,78
Hidrometanólica	12,23	40,00

III.3 – Escolha dos métodos de separação do extrato bruto

Como sabemos a cromatografia, em suas várias modalidades, é uma ferramenta crítica para a separação e o isolamento de substâncias. Técnicas como a partição utilizando-se carvão ativo ou a simples partição líquido-líquido permitem o fracionamento do extrato bruto em misturas menos complexas fornecendo frações de fácil manuseio, o que torna o trabalho do pesquisador fitoquímico mais fácil e de certo modo mais racional. Daí seguem outras etapas pós partições como análise das frações por testes químicos, seguido por cromatografias com suportes mais específicos, cristalizações e separações por cromatoplasmas.

Sabe-se que todo processo cromatográfico possui hoje em dia um grau de refinamento que se apresenta como uma prática extremamente seletiva e eficiente, capaz de separar moléculas estreitamente relacionadas em uma mistura altamente complexa.

No caso do extrato bruto das folhas o método de partição líquido-líquido realizado com solventes de polaridade crescente apresentou bom rendimento. Todas as frações foram analisadas por CCD utilizando como sistema eluente: CHCl_3 :EtOH (9:1) e como revelador anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100°C. Com base nas frações selecionadas para o trabalho a visualização em CCD indicou tratar-se de um material heterogêneo. O resultado foi bom em todas as frações pós partição.

A sílica-gel é o adsorvente mais utilizado nos laboratórios de análises de produtos naturais. Vantagens para sua utilização advêm da facilidade de uso, permitir ótima separação cromatográfica e é de fácil aquisição comercial em relação a outras fases estacionárias, além da sílica provocar menos reações secundárias nos componentes da mistura em relação a outros adsorventes (MATOS, 1997).

III.4 – Prospecção fitoquímica

O estudo fitoquímico é um processo de seleção preliminar que visa identificar qualitativamente classes de metabólitos secundários presentes no extrato, sendo de grande importância quando não se dispõe de referências sobre a espécie sob investigação como é o caso da *A. langsdorffii*.

Em alguns estudos onde há referências de classes químicas e atividade biológica em determinado gênero o objetivo pode voltar-se para um grupo específico de metabólitos, onde

a análise segue a direção para o isolamento e elucidação estrutural da classe específica de forma planejada.

A metodologia descrita por Matos (1997) não é conclusiva podendo fornecer falso-positivos. No entanto, em seu favor o método mostra-se rápido, simples, bastante informativo, seu custo é barato, e pode ser aplicado a qualquer planta.

A prospecção fitoquímica preliminar do extrato etanólico bruto da folha e do caule da espécie *A. langsdorfii* mostra testes positivos para as seguintes classes de substâncias: catequinas, esteróides, fenóis, taninos, flavonóides, saponinas e triterpenóides.

Conforme justificado no item II.4 (p.45), colegas do grupo já haviam trabalhado com o extrato do caule da planta resultando em algumas frações (fração em hexano e aquosa) para prosseguir. Isto fez com que este trabalho realizasse a prospecção frente apenas as frações referentes à folha.

Foi observado no Teste de Identificação para Saponinas com resultado positivo para as frações hidrometanólica e acetato de etila provenientes da folha. A literatura não mostra correlação de saponinas com as atividades biológicas do trabalho.

Foi observado no Teste de Identificação para Esteróides e Triterpenoides (LIEBERMAN-BURCHARD) resultado positivo para as frações de acetato de etila, clorofórmio e hexano. Os Triterpenoides pentacíclicos são relatados na literatura por apresentar atividade tripanocida (LEITE *et. al.*, 2001) e imunomoduladoras (KATO *et. al.*, 1997; SCHUHLY *et. al.*, 1999).

Os testes feitos para a Identificação de Alcalóides com as frações da folha não foram positivos com o reativo de Dragendorff.

No Teste para identificação de Fenóis e Taninos, resultado positivo foi apresentado para fenóis, taninos condensados nas frações hidroalcoólica e acetato de etila, pois a precipitação apresentou-se de coloração verde.

No Teste para identificação de Flavonóis, Flavononas, Flavanonóis e Xantonas foi detectado alteração de coloração em equilíbrio ácido-base para as frações de acetato de etila, clorofórmio e hidrometanólica, com coloração avermelhada confirmando a presença de flavonóis, flavononas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos. No Teste para identificação de Antocianinas, Antocianidinas e Flavonóides, houve alteração para uma cor amarelada no equilíbrio ácido-base nas frações de acetato de etila, clorofórmio e hidrometanólica.

A prospecção fitoquímica com extratos brutos e suas partições constam na **Tabela 19**.

Tabela 19. Compostos detectados no extrato e nas frações das folhas da *A. langsdorfii*.

<i>Constituintes químicos</i>	Frações					
	EC	EF	F-1	F-2	F-3	F-4
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Antocianidinas	+	+	-	+	+	+
Antocianinas	+	+	-	+	+	+
Ácidos fixos	+	+	-	+	+	+
Auronas	+	+	-	+	+	+
Catequinas	+	+	-	+	+	+
Chalconas	+	+	-	+	+	+
Flavonois	+	+	-	+	+	+
Flavononois	+	+	-	+	+	+
Flavonóides	+	+	-	+	+	+
Fenóis	+	+	-	+	+	+
Heterosídeos	+	+	-	+	+	+
cianogênicos						
Leucoantocianidinas	+	+	-	+	+	+
Quinonas	+	+	-	+	+	+
Resinas	+	+	-	+	+	+
Saponinas	+	+	-	-	+	+
Taninos	+	+	-	+	+	+
Triterpenos	+	+	+	+	+	+
Xantonas	+	+	-	+	+	+

* Extrato etanólico bruto do caule (EC), Extrato etanólico bruto da folha (EF); Fração hexano folha (F-1); Fração clorofórmico folha (F-2); Fração acetato de etila folha (F-3) e Fração hidrometanólica folha (F-4). + = resultado positivo, - = resultado negativo.

III.5 – Identificação estrutural das substâncias isoladas

O estudo químico dos extratos e frações do caule e das folhas da *A. langsdorfii* permitiu o isolamento de 12 compostos: ALC-1, ALCF-1, ALCF-6, ALC-8 e ALC-2 do caule e ALCF-22, ALF-1, ALF-16, ALF-19, ALF-20 e ALF-31 das folhas. O composto ALC-5 foi isolado do caule e das folhas. Para facilitar a descrição estrutural dos metabólitos, eles foram organizados nesta seção por classe química, sendo um esteróide, dois terpenos e cinco flavonóides (**Figura 7**).

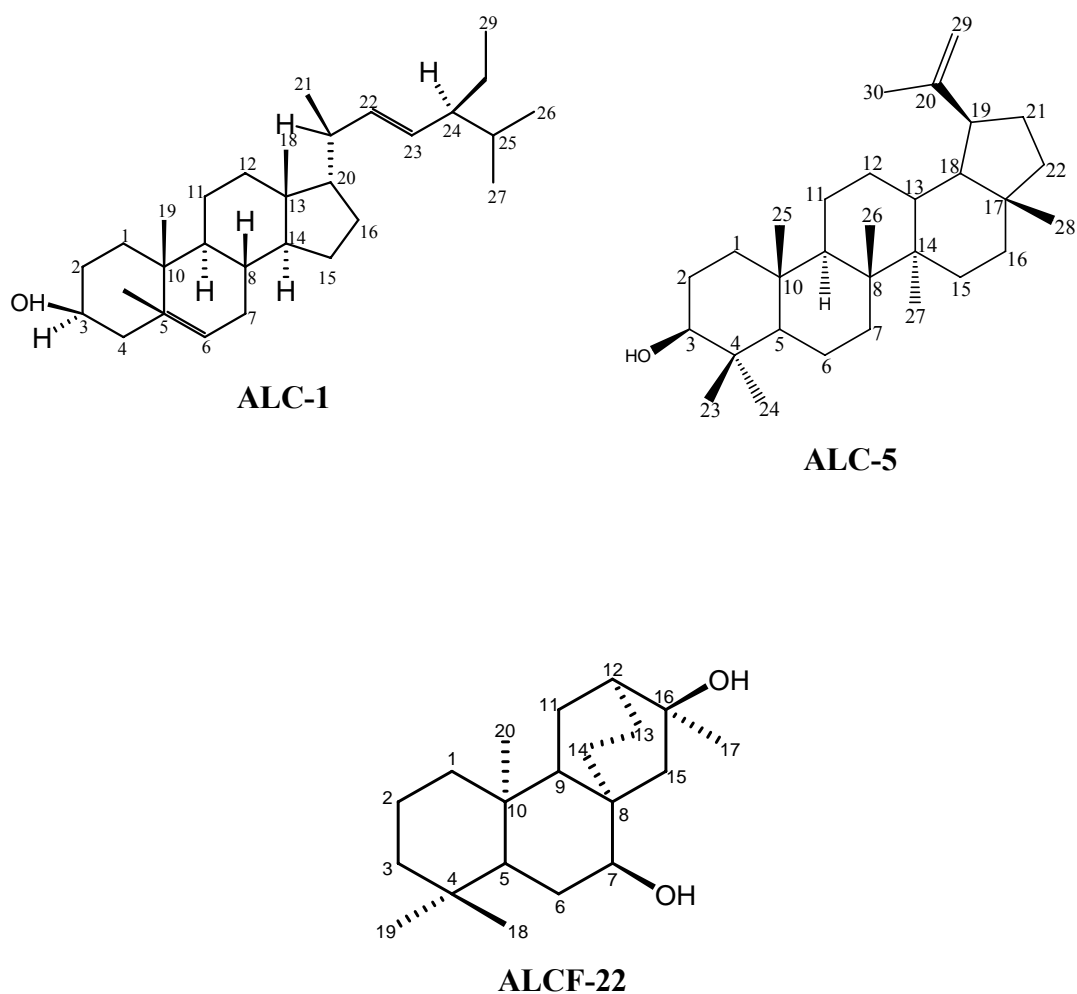


Figura 7: Substâncias isoladas do caule e das folhas da *A. langsdorfii*.

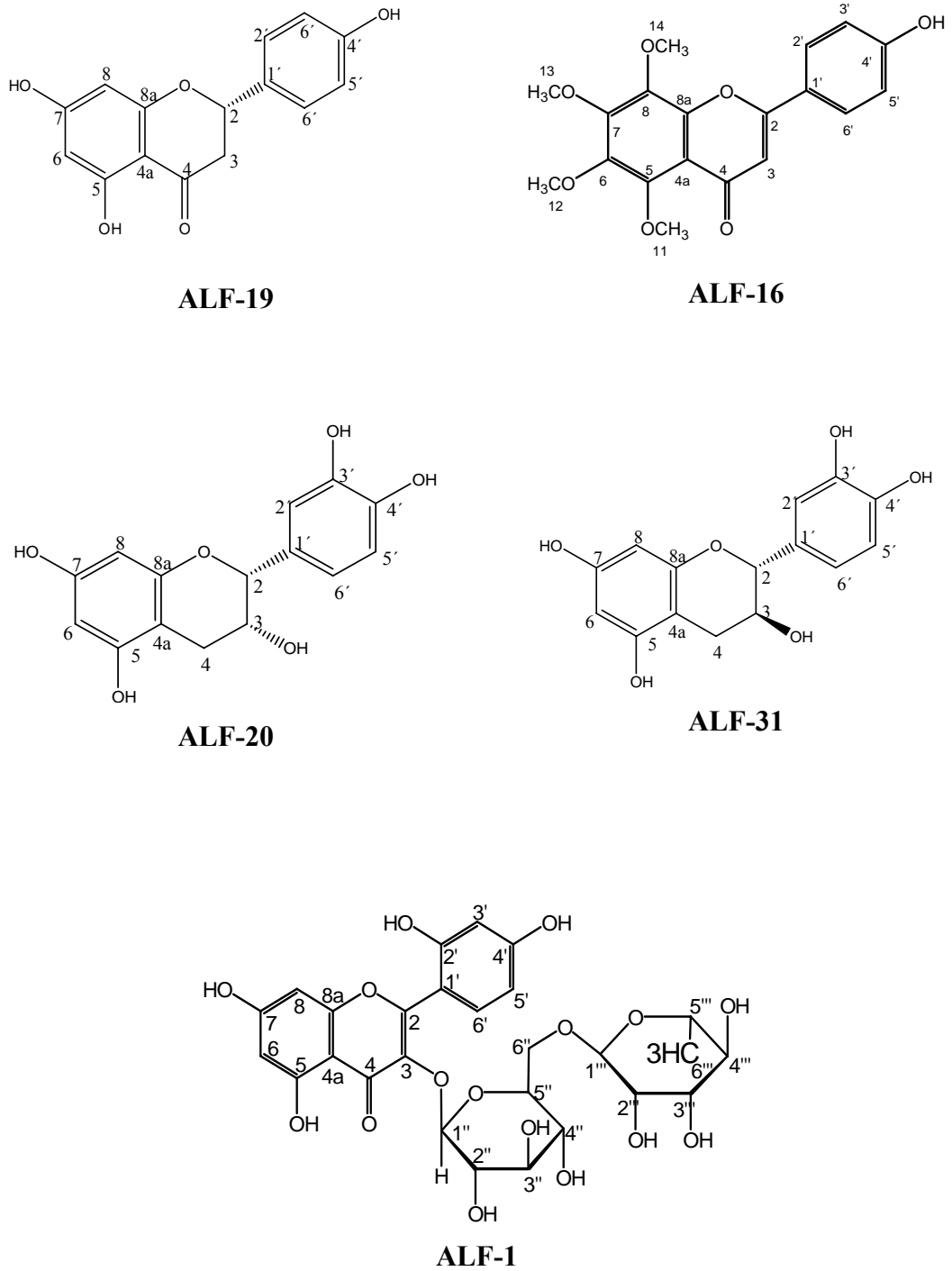


Figura 7 (Cont.): Substâncias isoladas do caule e das folhas da *A. langsdorfii*.

III.5.1 – Identificação do esteróide

III.5.1.1 – Identificação da substância ALC-1

A substância ALC-1 foi obtida na forma de um sólido branco cristalino em forma de agulhas apresentando ponto de fusão 176-177°C.

O espectro de absorção (de luz) na região do IV, obtido em pastilha de KBr (**Figura 8**), revelou a presença de bandas de absorção de estiramento e deformação para grupos hidroxila (3354 e 1054 cm^{-1}), de ligação dupla (1640 cm^{-1}) e sistema alifático (2936 , 2880 , 1456 e 1381 cm^{-1}), (sugerindo a presença destes grupos).

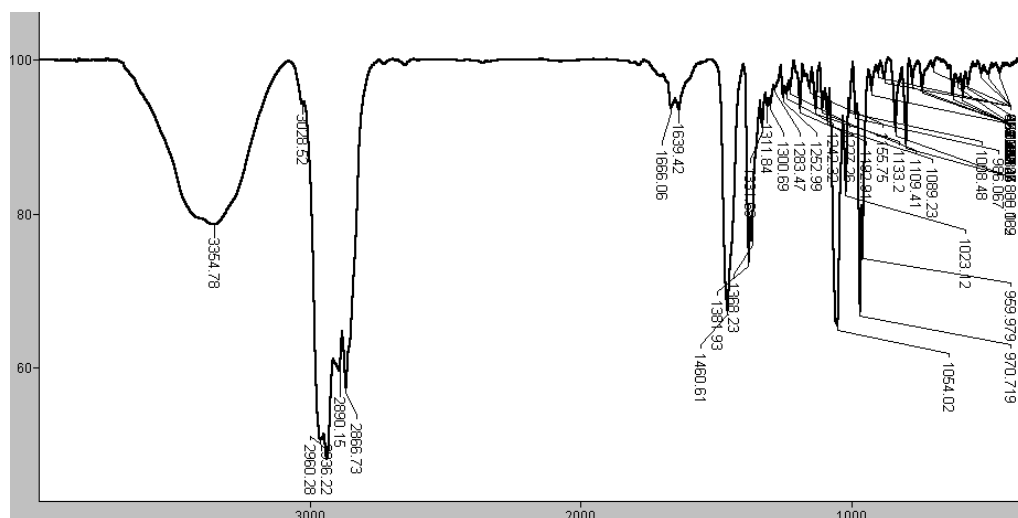


Figura 8: Espectro da substância ALC-1 na região do Infra-vermelho

Na análise do espectro de RMN de ^1H os sinais em δ 3,5 na forma de multipletto (m, H-3) é sugestivo de um hidrogênio carbinólico em um anel esteroidal, o dupletto (d) em δ 5,35 ($J=5,24$ Hz) e duplos dupletos (dd) referentes à ligação olefínica δ 5,17 ($J=8,59$ e $15,19\text{Hz}$) e em δ 5,04 ($J=8,7$ e $15,14\text{Hz}$) e sinais simpletos (s) entre δ 0,67 e 1,00 correspondentes a hidrogênios de grupos metilas (**Figuras 9-11**).

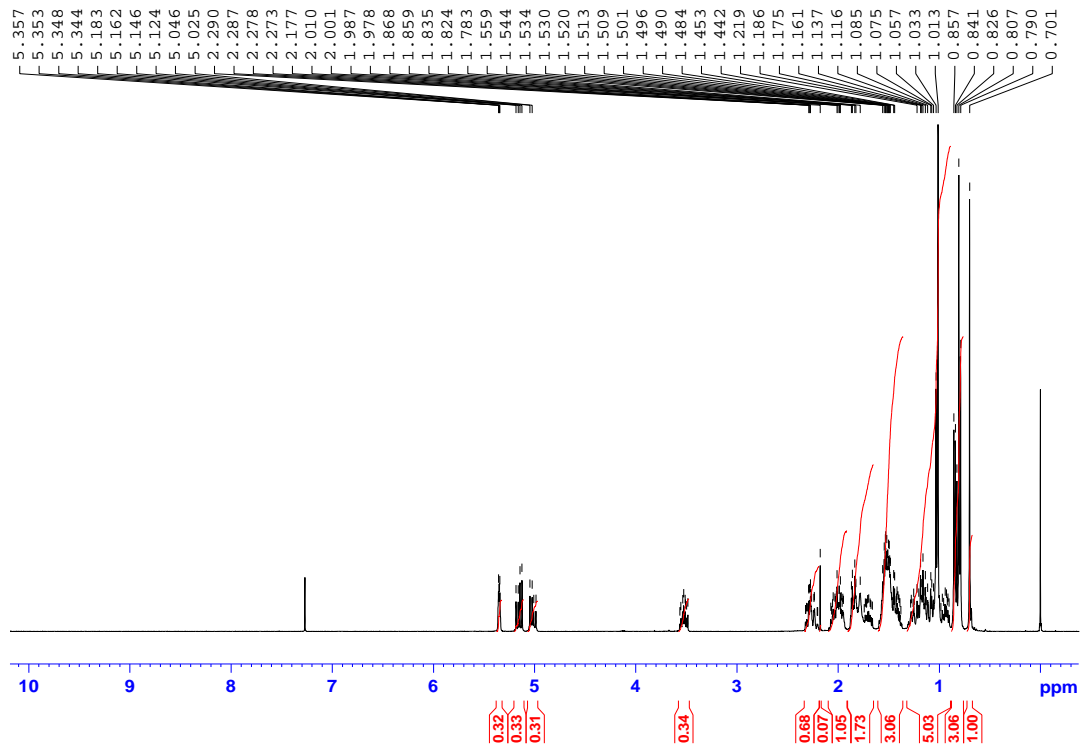


Figura 9: Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALC-1

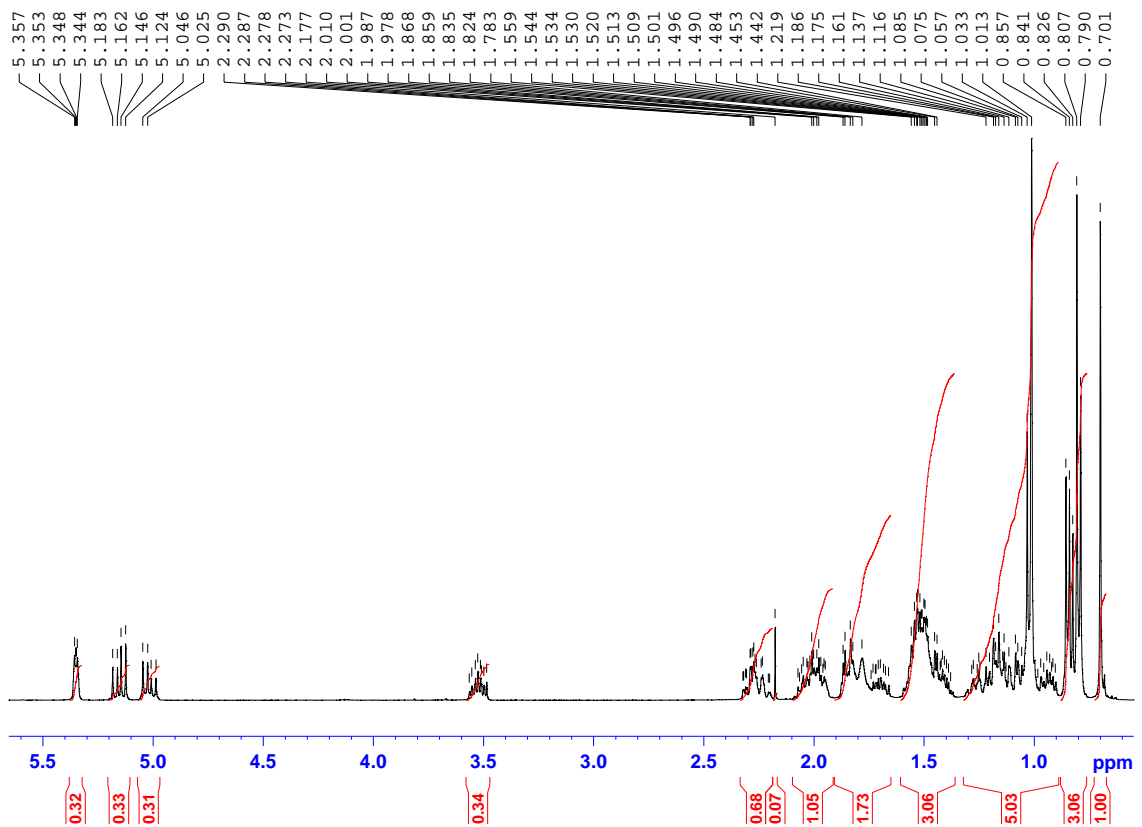


Figura 10: Expansão do espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALC-1

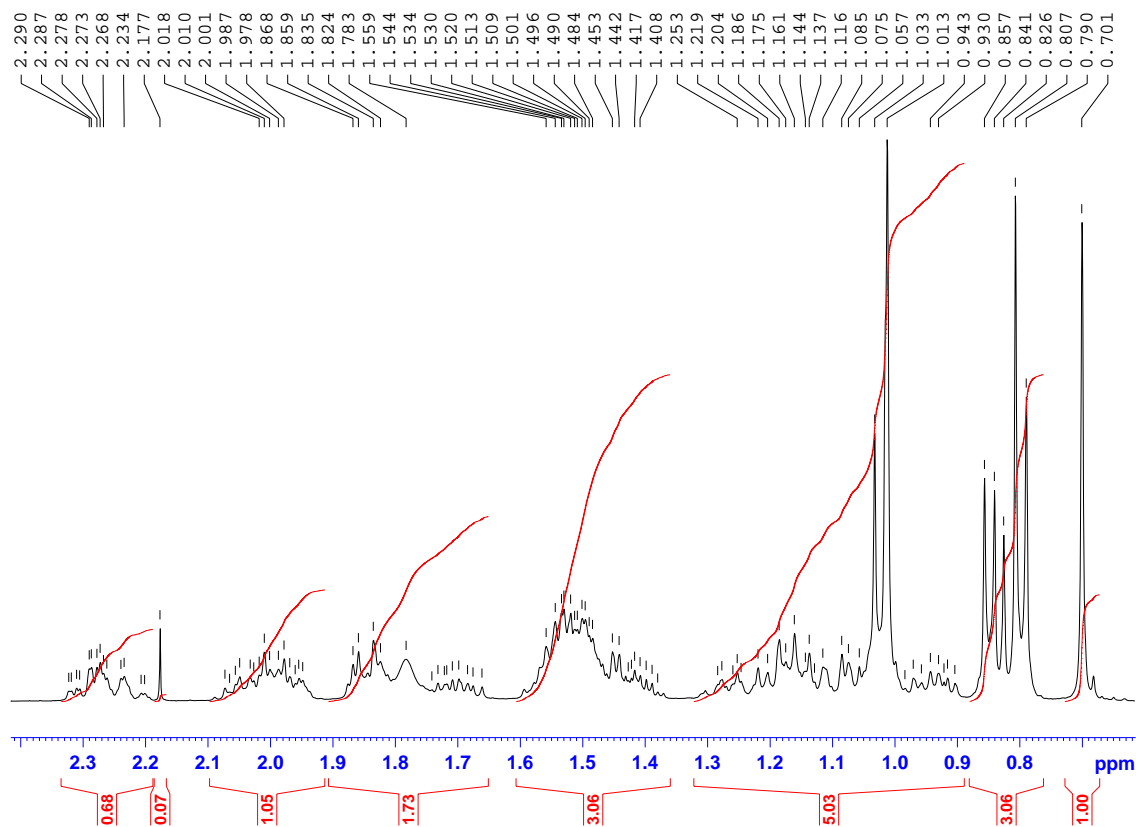


Figura 11: Expansão do espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALC-1

A análise do espectro de RMN de ^{13}C , evidenciou a presença de 29 carbonos, sendo três sinais sobrepostos, com deslocamentos químicos em 32,1 ppm, e 21,29 ppm. Os sinais registrados mais relevantes foram na região dos C sp^2 , onde foi possível observar a presença dos sinais em δ 140,96 e δ 121,90 sugerindo o grupo $-\text{C}=\text{CH}-$, além dos sinais em δ 138,55 e 129,46 relativos à dupla em C-22 e C-23. Além do sinal do carbono carbinólico em δ 72,03 (Figuras 12-13).

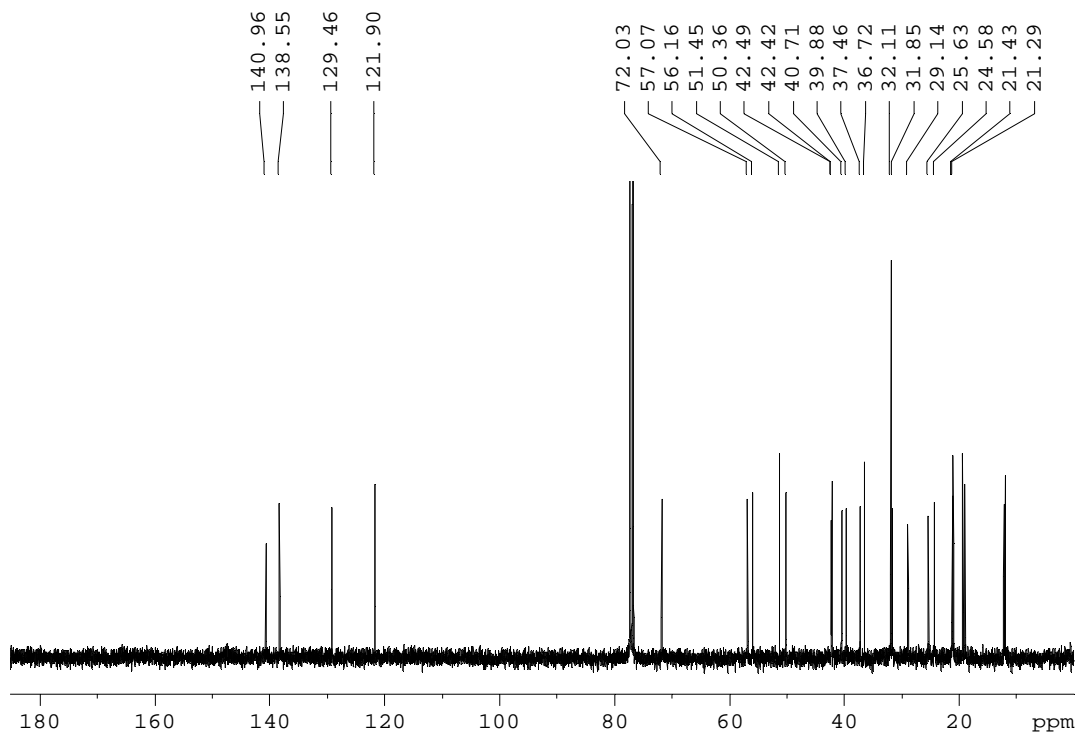


Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-1

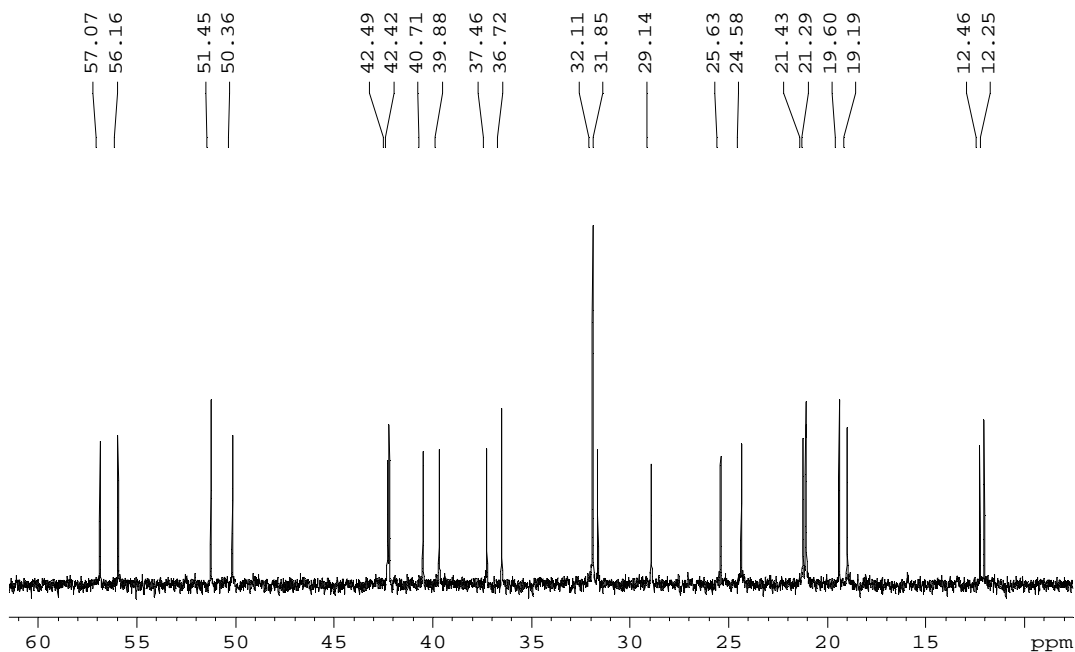


Figura 13: Expansão do espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-1

A análise conjunta dos espectros DEPT 90° e 135° (**Figuras 14-17**) possibilitaram a identificação de onze sinais referentes a carbonos metínicos (CH), seis sinais referentes a carbonos metílicos (CH_3) e nove sinais referente a carbonos metilênicos (CH_2), sugerindo desta maneira que o metabólito possua três carbonos quaternários, pois estes não aparecem nos espectros.

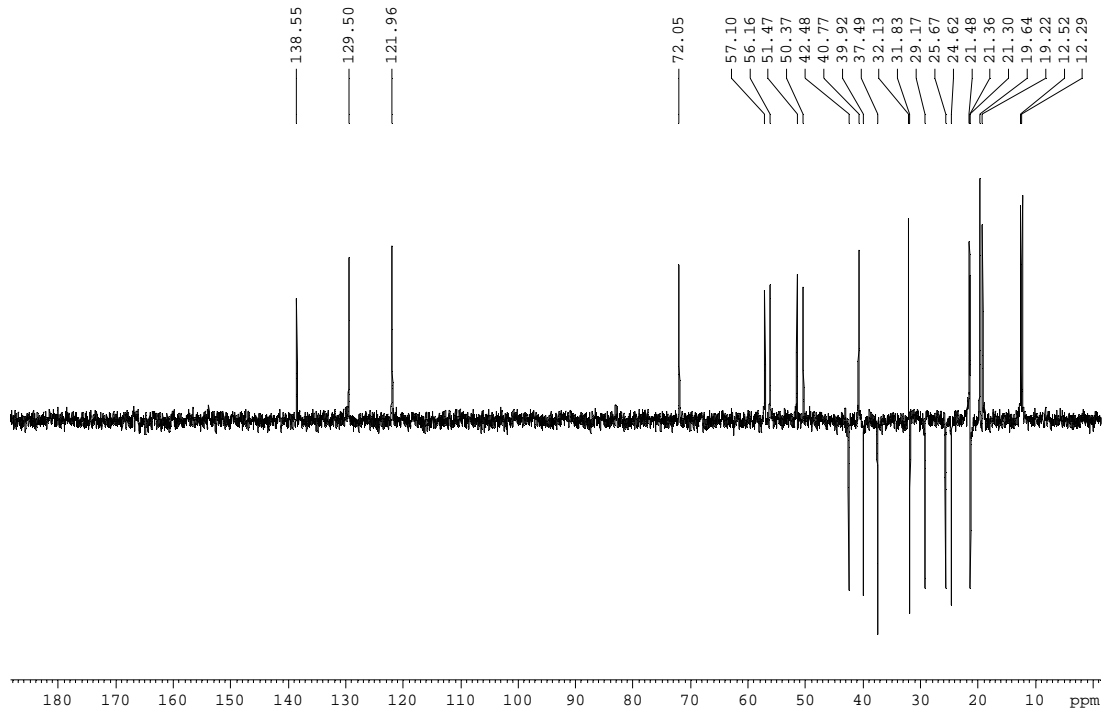


Figura 14: Espectro DEPT 135° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-1

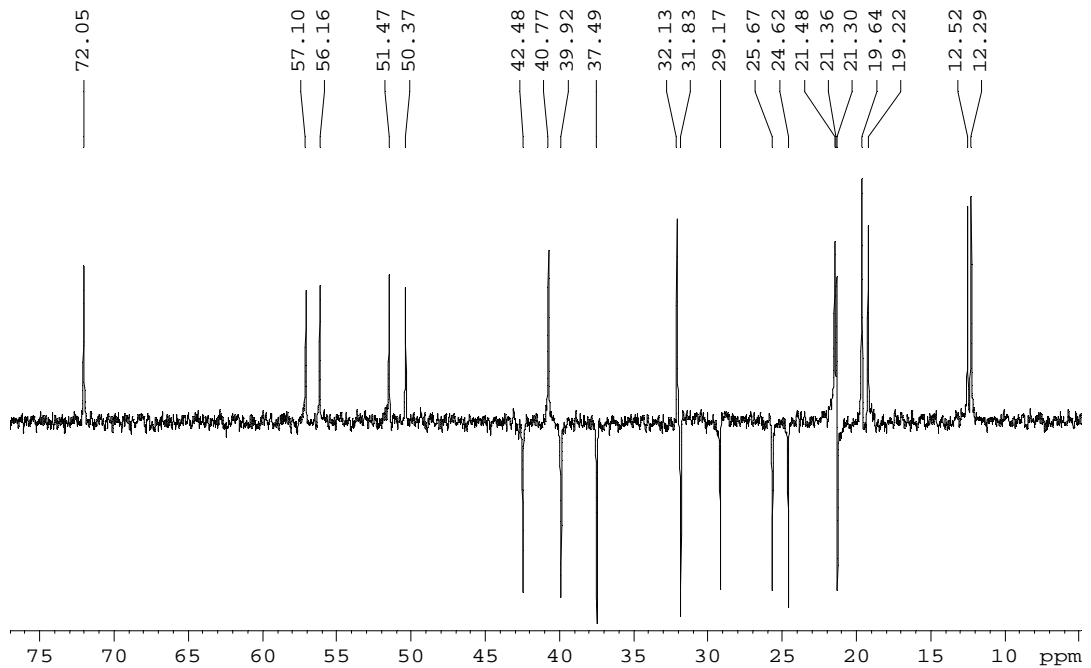


Figura 15: Expansão do espectro DEPT 135° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-1

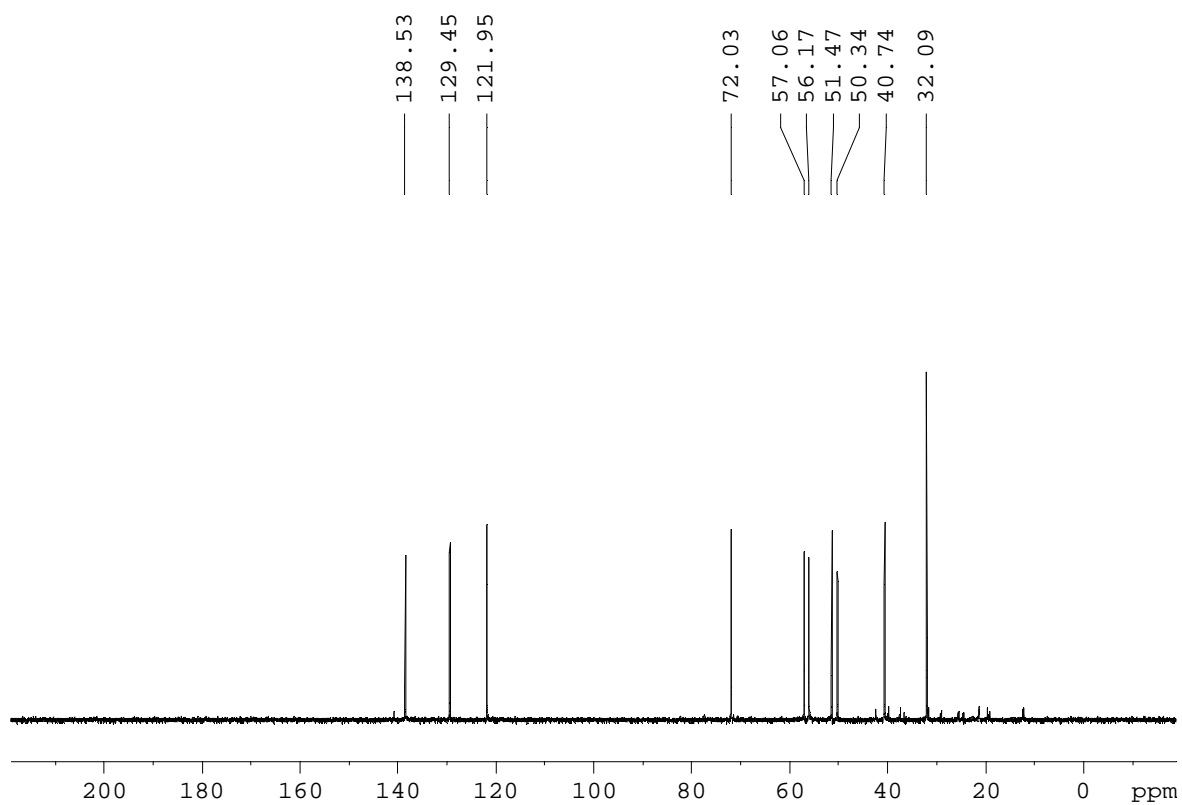


Figura 16: Espectro DEPT 90° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-1

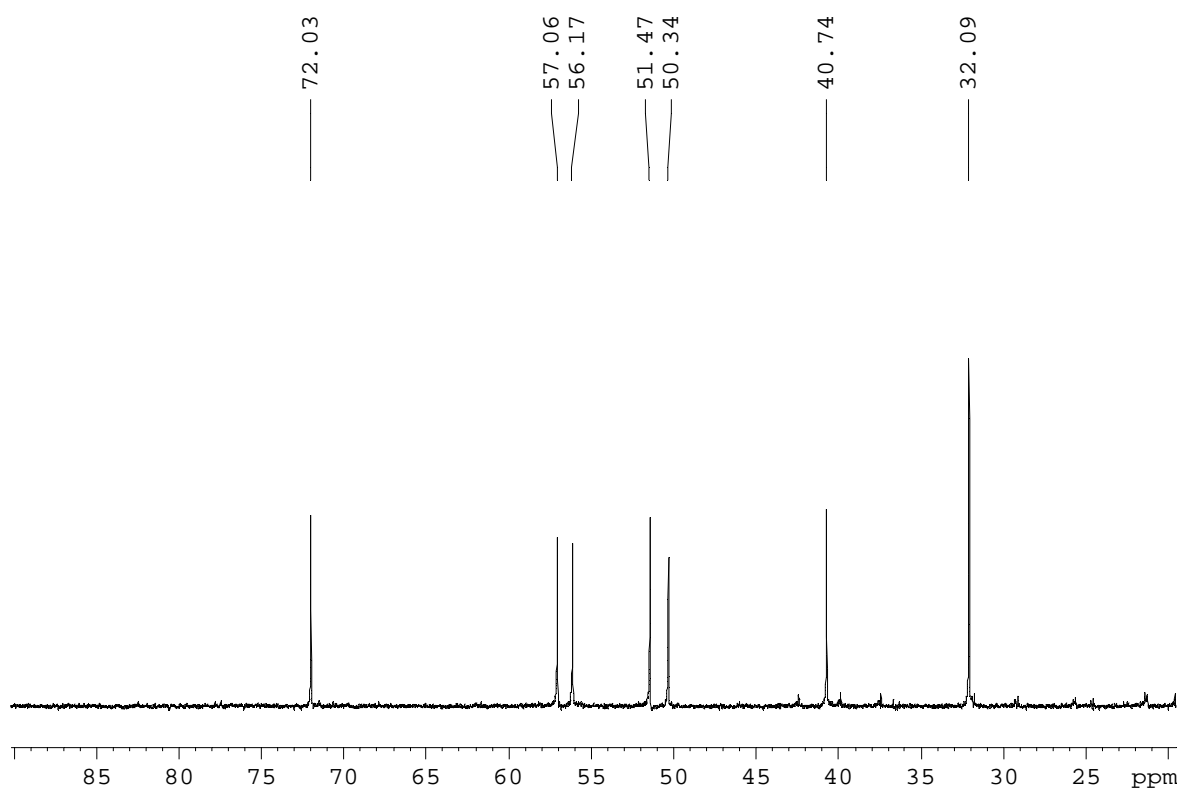


Figura 17: Expansão do espectro DEPT 90° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-1

Após análises espectrais de RMN 1D (^1H , ^{13}C e DEPT's), sugeriu-se que a substância ALC-1 tratava-se de um fitoesterol bastante conhecido e presente em diferentes plantas, estigmasterol mais comumente junto ao β -sitosterol (Figura 18).

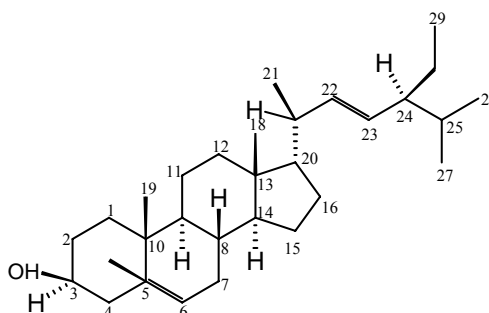


Figura 18: Estigmasterol

Para confirmar a estrutura foram interpretados os espectros de RMN 2D (HSQC, COSY, HMBC e NOESY).

Após a verificação da correlação direta C-H via HSQC (**Figuras 19-20**) foi possível enumerar os sinais dos carbonos. Seus resultados estão na **tabela 20**.

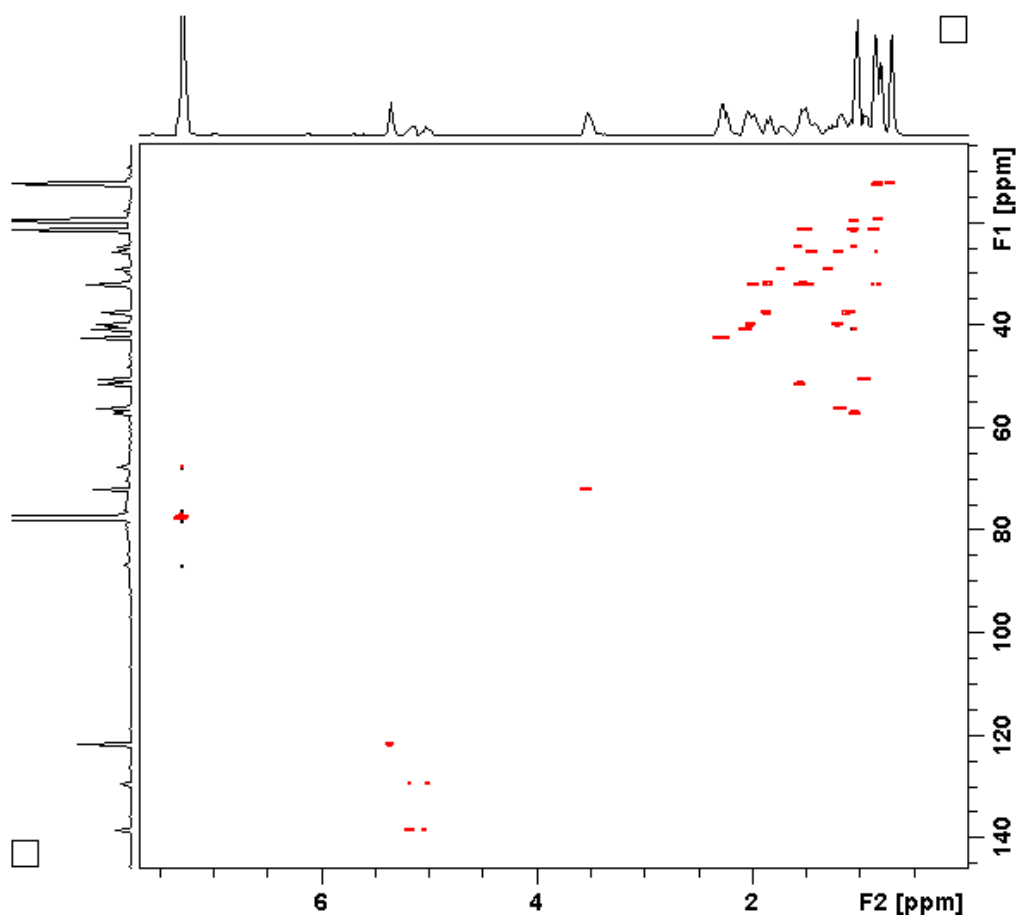


Figura 19: Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-1

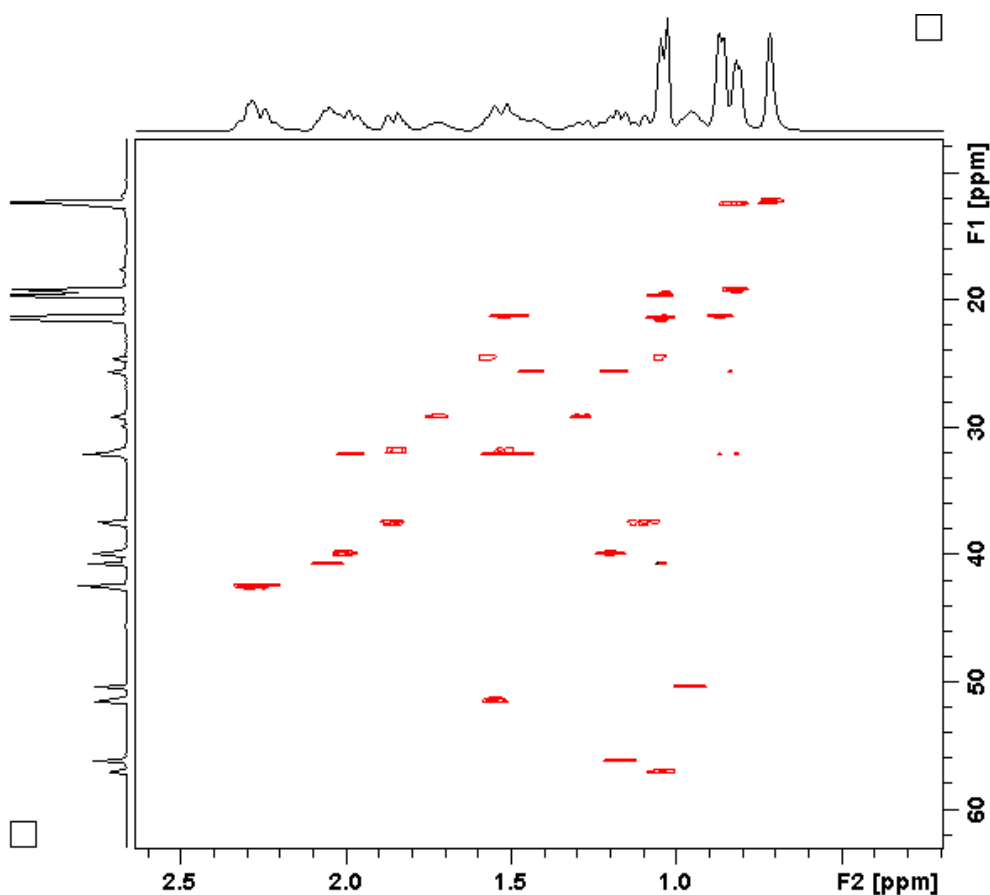


Figura 20: Expansão do mapa de contornos HSQC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-1

A visualização da interação via espectro de RMN COSY (**figuras 21-22**) correlacionou os hidrogênios acoplados por $^{2-3}J_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais). Seus resultados estão na **tabela 20**.

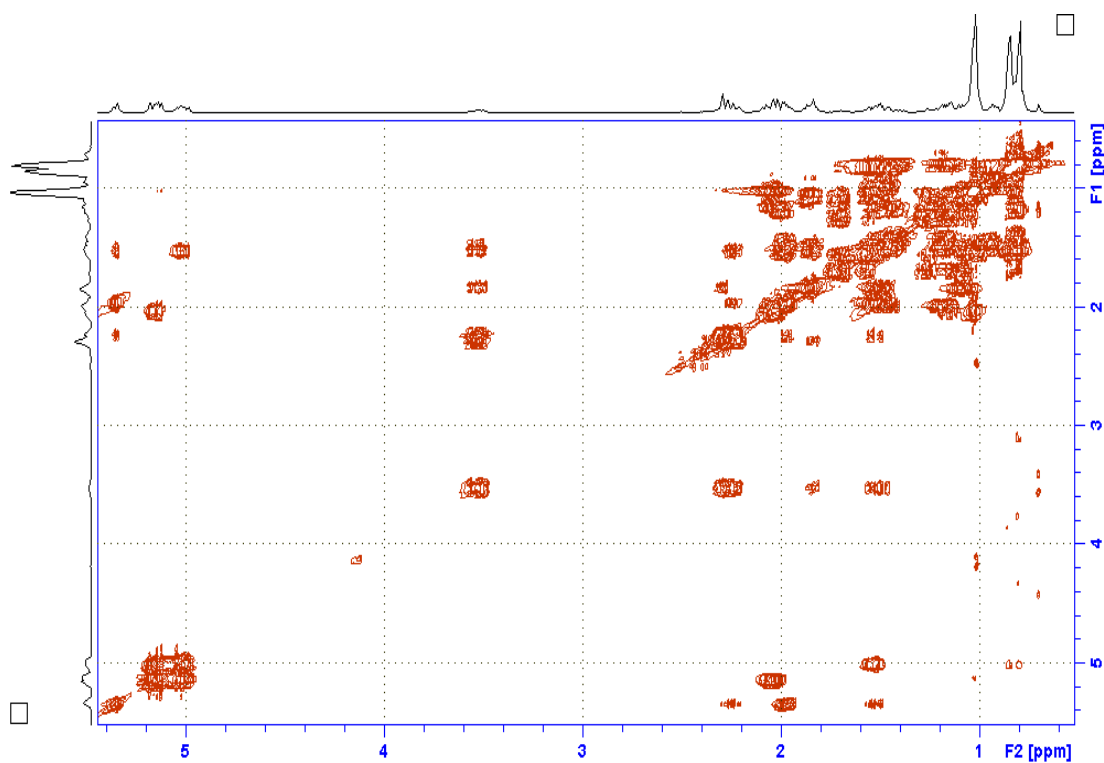


Figura 21: Mapa de contornos COSY em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALC-1

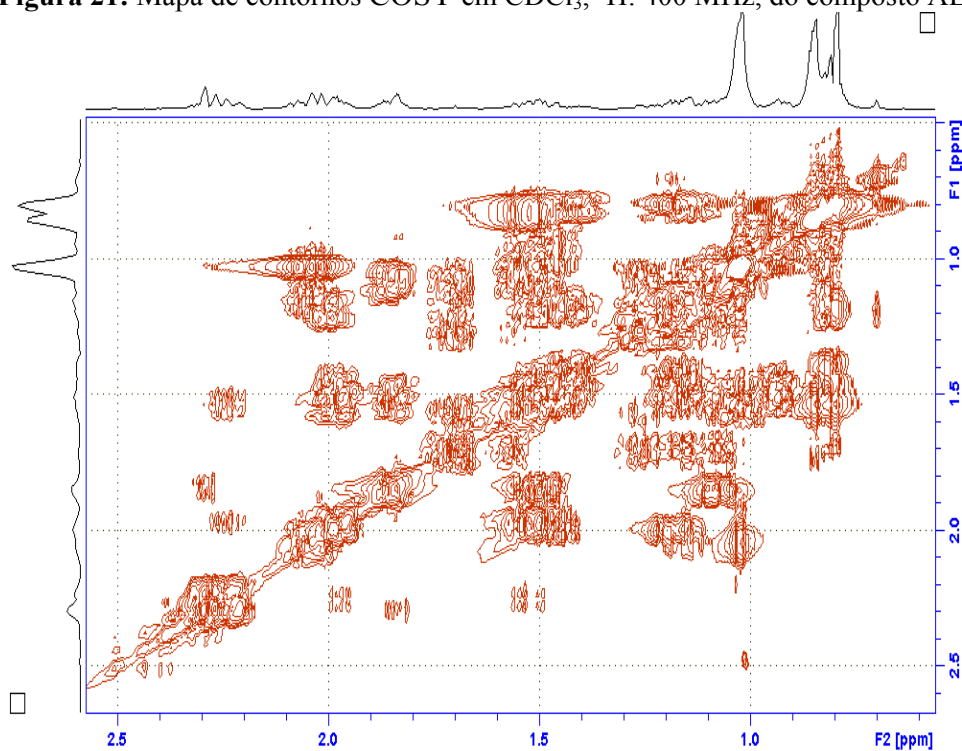


Figura 22: Expansão do mapa de contornos COSY em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALC-1

Deste ponto, pode-se fazer uma montagem dos microfragmentos para então analisar o espectro HMBC (figuras 23-27) fazendo-se assim a união destes microfragmentos. Seus resultados estão na tabela 20.

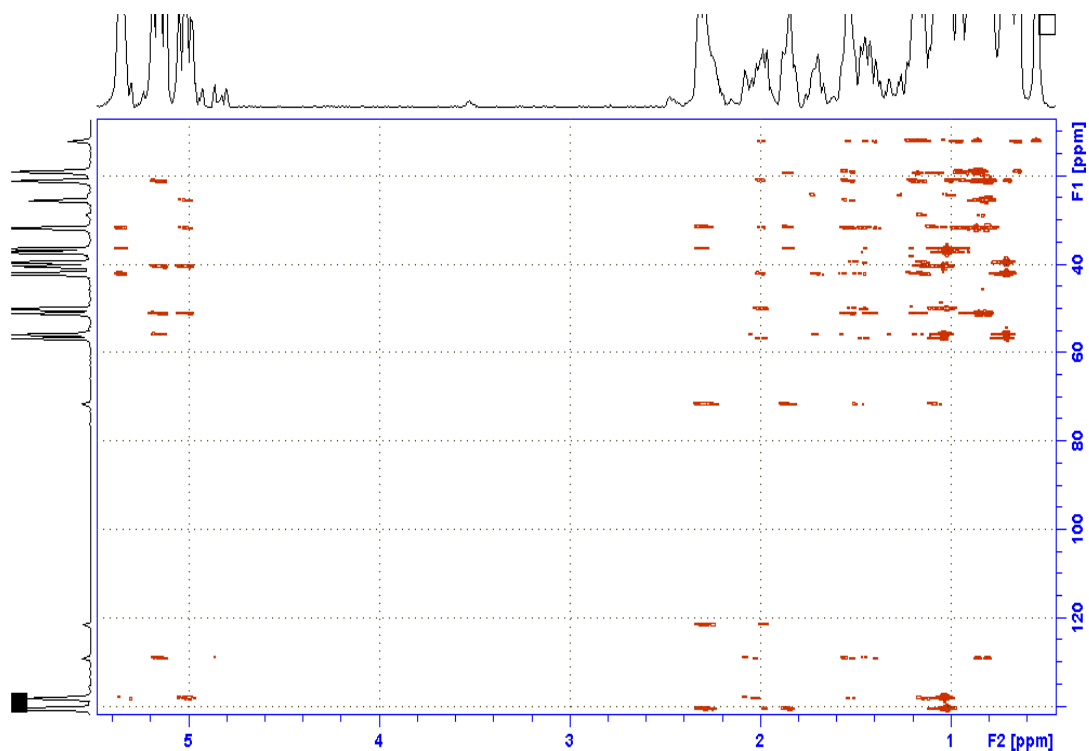


Figura 23: Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-1

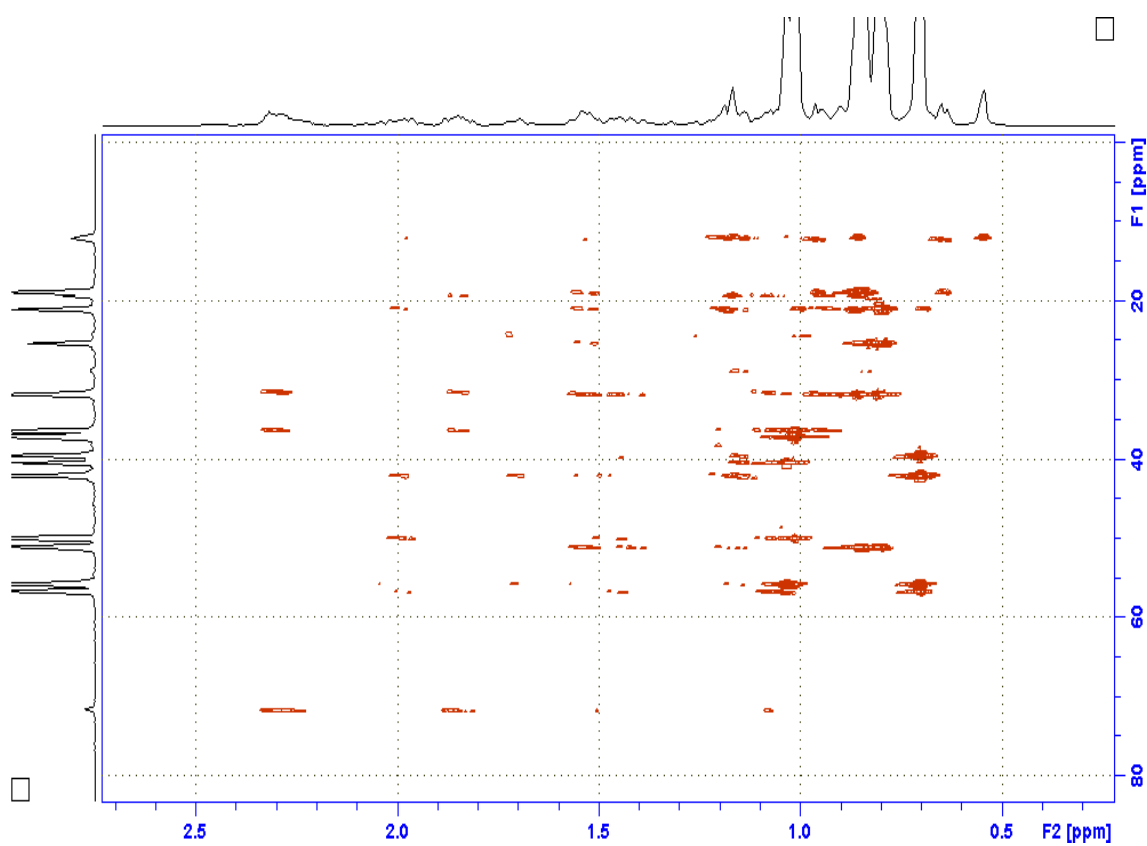


Figura 24: Expansão do mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-1

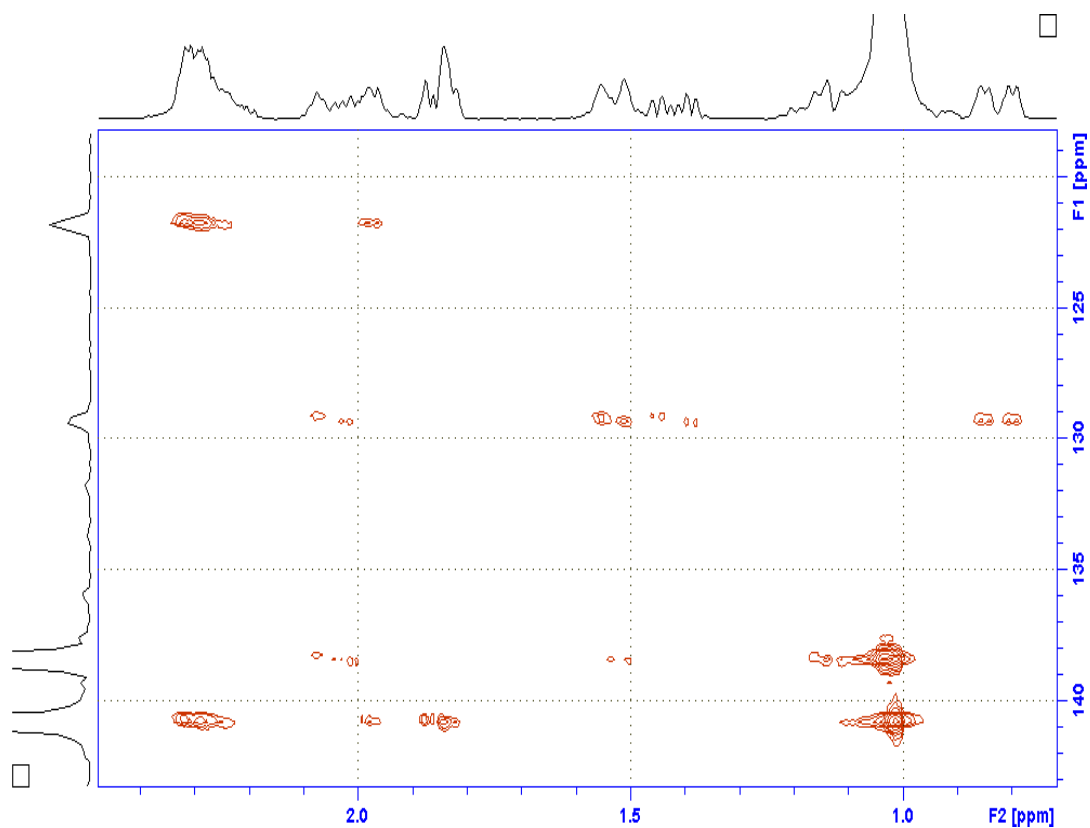


Figura 25: Expansão do mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-1

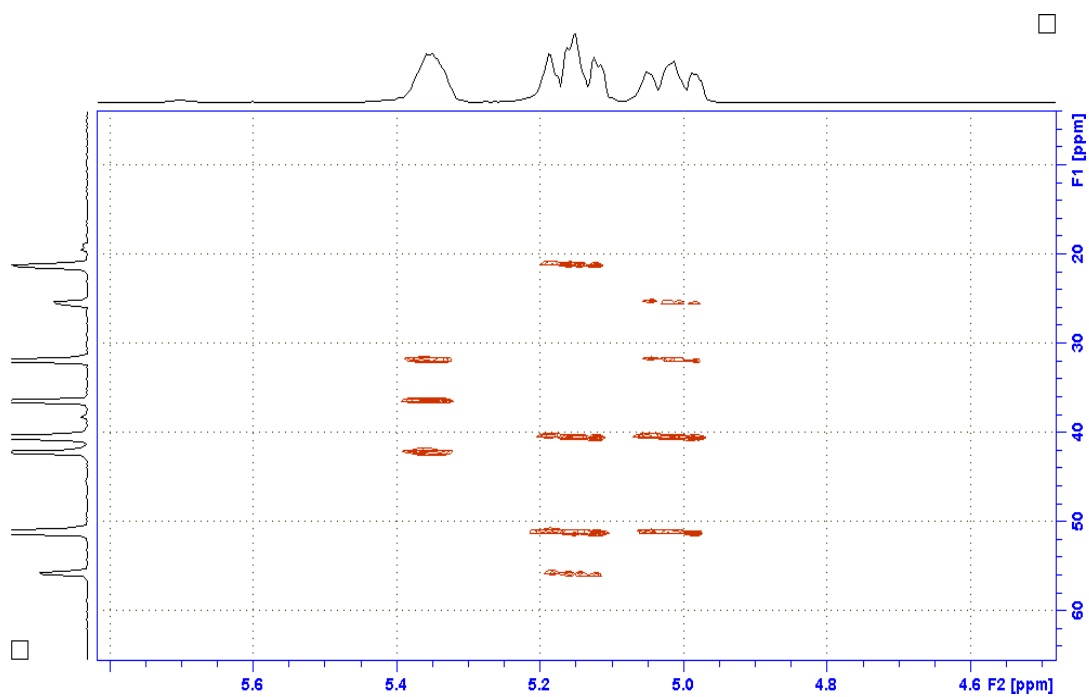


Figura 26: Expansão do mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-1

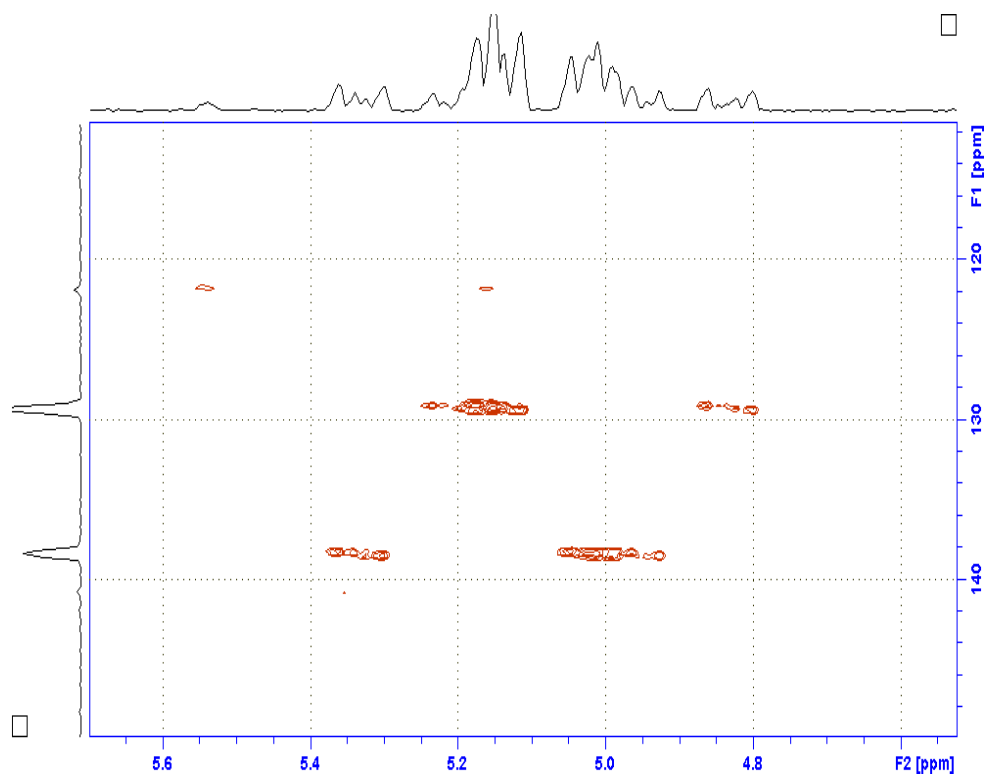


Figura 27: Expansão do mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-1

Evidenciou-se os valores de deslocamentos químicos referentes aos $\text{C } sp^2$ C-5 (δ 140,75) e C-6 (δ 121,7), do carbono C-22 (δ 138,31) e C-23 (δ 129,26), e o deslocamento do carbono sp^3 oxigenado C-3 (δ 71,79).

A análise do espectro NOESY (**Figura 28**) forneceu informações relacionadas com a estereoquímica da molécula. Seus resultados estão na **tabela 20**.

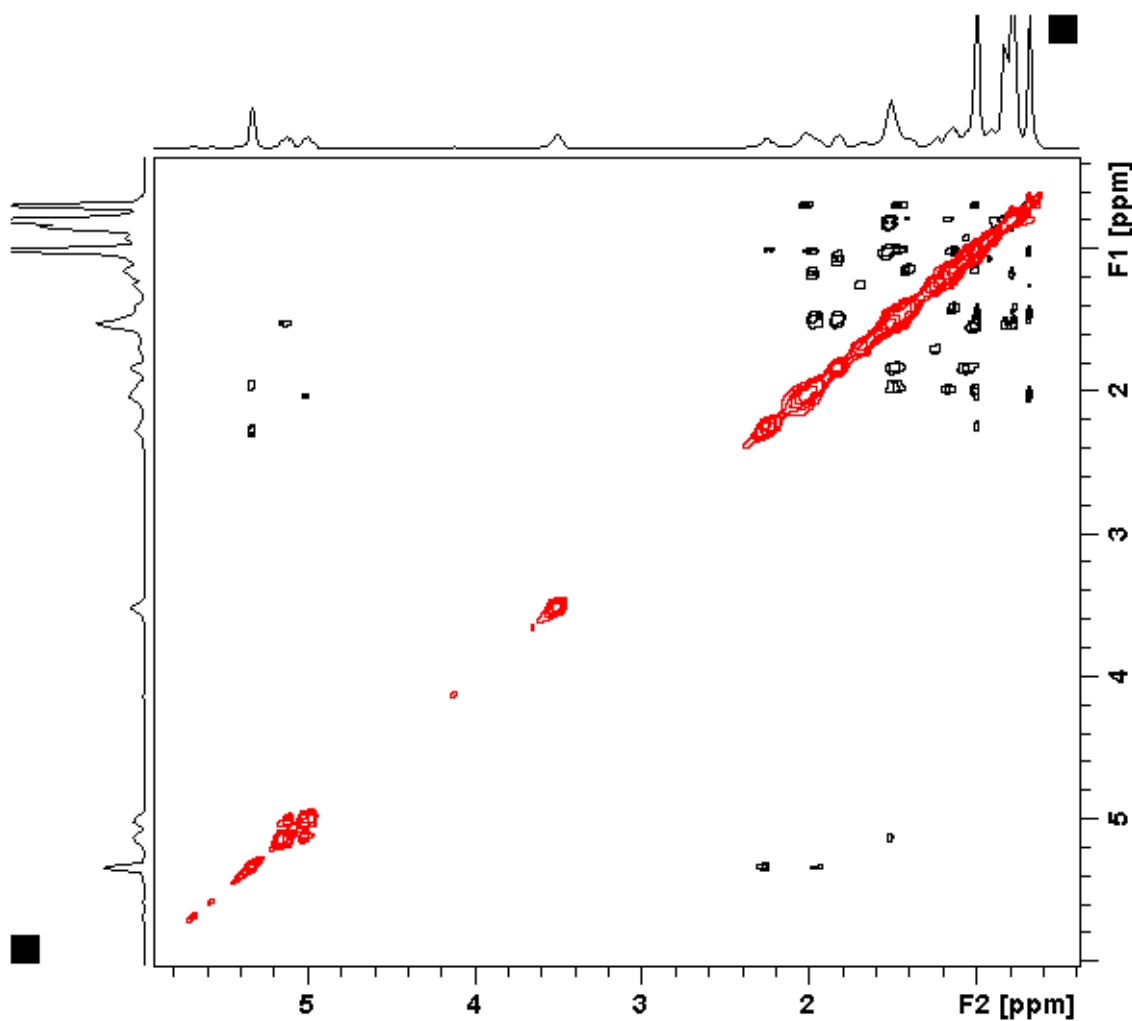


Figura 28: Mapa de contornos NOESY em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALC-1

Os dados obtidos nos mapas de contorno COSY e NOESY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$); e HSQC e HMBC ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) e o sinal + apresentado na medida de rotação específica $[\alpha]_D^{25} = +90^\circ$, CHCl_3 , confirmam as atribuições feitas para o ALC-1, identificada como sendo um fitosterol bastante conhecido como estigmasterol (5,22-stigmastadien-3 β -ol) (**Figura 29**).

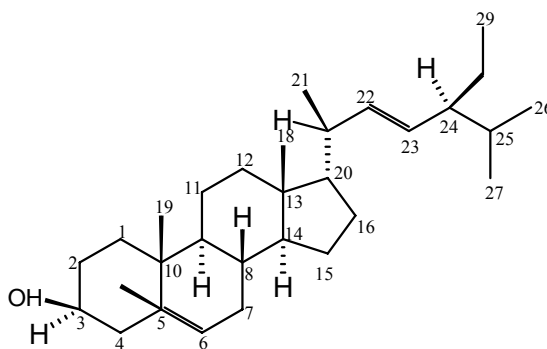


Figura 29. Estrutura do Estigmasterol (ALC-1)

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 30**) indicou a massa molecular 412 u, com a fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ sugerindo tratar-se do estigmasterol, apresentando também os fragmentos em m/z 139, 255 e 395 respectivamente, em conformidade com outras técnicas de identificação.

O espectro de massa (**Esquema 1**) apresentou pico base em m/z 395 sugerindo perda de uma molécula de água, confirmando a presença de uma hidroxila no carbono alifático C-3. Outro pico importante em m/z 139 mostra fragmentação RDA. O pico em m/z 255 se refere à perda de água a partir do fragmento em m/z 273, proveniente da quebra anterior (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

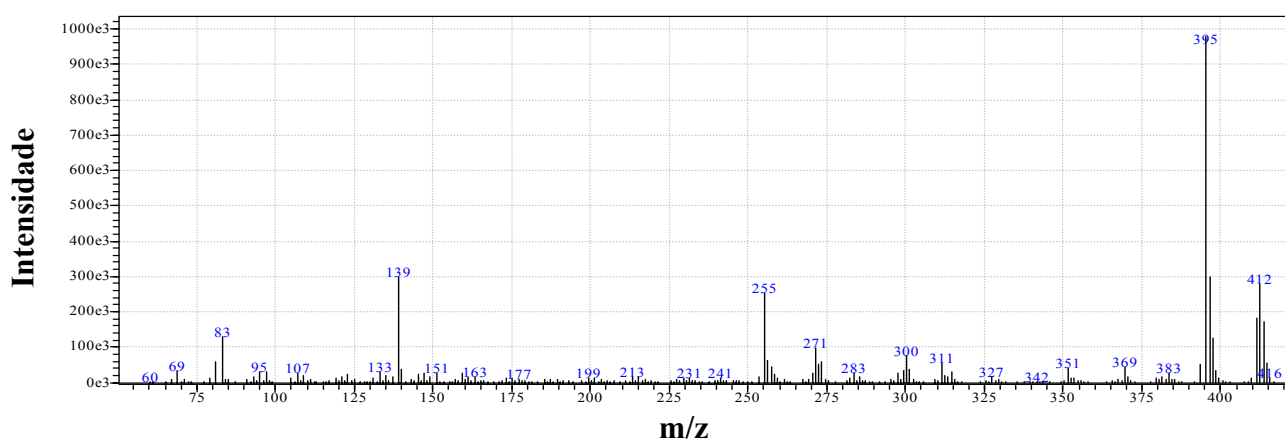
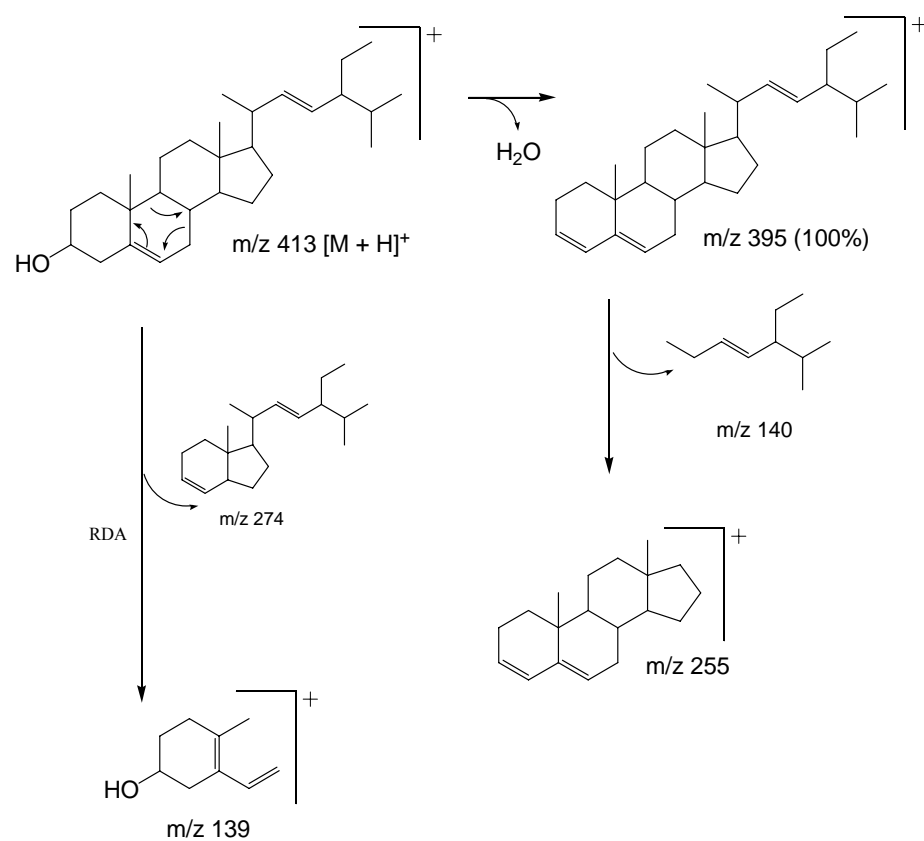


Figura 30: Espectro de massas da substância ALC-1.



Esquema 1: Prováveis caminhos de fragmentação de ALC-1

Tabela 20: RMN do composto ALC-1 em CDCl₃, deslocamento em δ .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	37,46 CH ₂	1,1; 1,8 m			5,35	
2	31,85 CH ₂	1,5; 1,8 m		3,5	2,3	
3	72,03 CH	3,5 m		2,2 e 2,3; 1,5 e 1,8	2,3; 1,8; 1,1; 2,8	
4	42,49 CH ₂	2,2; 2,3 m		3,5; 5,35	5,35	1,05
5	140,96 C	-----			2,3; 1,05; 1,8	
6	121,9 CH	5,35 d	5,24	1,5; 1,9; 2,2 e 2,3	2,3	2,27; 2,0
7	32,11 CH ₂	1,5; 1,9 m		5,35	5,35; 1,5	
8	32,11 CH	1,5 m			5,35; 1,5	
9	50,36 CH	0,95 m			1,5; 1,0	
10	36,72 C	-----			2,3	
11	21,29 CH ₂	1,4 m			1,04; 0,7; 0,95	
12	39,88 CH ₂	1,9; 1,1 m			5,16; 5,03; 1,03; 0,7	
13	42,42 C	-----			0,7	
14	57,07 CH	1,03 m			0,7; 1,05	
15	24,58 CH ₂	1,0; 1,5 m				
16	29,14 CH ₂	1,7; 1,2 m				
17	56,16 CH	1,15 m			0,7; 1,0	1,87-1,80
18	12,25 CH ₃	0,71s			1,9; 1,1; 1,2; 1,7	1,47
19	19,6 CH ₃	1,04s			1,1	
20	40,71 CH	1,9 m			1,02; 0,7	1,05; 0,71
21	21,29 CH ₃	1,02s			5,17	
22	138,55 CH	5,17 dd	8,59 e 15,19		1,0	1,55
23	129,46 CH	5,04 dd	8,7 e 15,14		5,16; 1,5	2,0; 1,55; 0,83
24	51,45 CH	1,54 m			0,8; 5,16; 5,03	0,71
25	32,11 CH	1,6 m			1,5	1,19-1,16
26	21,43 CH ₃	0,81s			0,8; 0,81	
27	19,19 CH ₃	0,80s			0,8; 0,81; 1,18	
28	25,63 CH ₂	1,18-1,43 m			0,8; 0,81	1,87-1,80
29	12,46 CH ₃	0,81s			0,8; 0,81; 1,18	

Dados de RMN ¹H 400 MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

m=multiplete
dd=duplo duplete
d= duplete
s=simpleto

III.5.2 – Identificação dos triterpenos

III.5.2.1 – Triterpenos de esqueleto Lupano

Os triterpenos de esqueleto lupano fazem parte de uma classe muito comum de triterpenos pentacíclicos. Todos os triterpenos pertencentes a essa classe revelam positivamente com reagente de Liberman-Burchard. Os lupanos apresentam alguns dados de RMN ^1H em comum destacando-se a presença de dois hidrogênios olefínicos em δ 4,69 e δ 4,57 como dupletos com constante de acoplamento de hidrogênios geminados ($J= 2,1$ Hz) e a presença de 7 metilas todas como simpleto sendo uma delas bem característica, um simpleto em δ 1,68, ligada a C sp^2 .

As características do espectro de RMN ^{13}C dessa classe de triterpeno são os sinais dos C sp^2 : δ 150,9 (carbono sp^2 não hidrogenado) e um C sp^2 metilênico em aproximadamente δ 109,4, bastante característicos da dupla ligação do lupano. A metila ligada a C sp^2 com deslocamento em aproximadamente δ 19,3 também é característica desse tipo de esqueleto (MAHATO e KUNDU, 1994). Outra característica dos triterpenos em geral é a presença de oxidação no C-3. Este carbono quando apresenta uma hidroxila tem deslocamento de aproximadamente δ 78,9.

III.5.2.1.1 – Identificação do ALC-5

A substância ALC-5 foi obtida na forma de um sólido branco amorfo apresentando ponto de fusão 134-136°C.

O espectro de absorção (de luz) na região do IV, obtido em pastilha de KBr (**Figura 31**), revelou a presença de bandas de absorção de estiramento e deformação para grupos hidroxila (3377, 1039 e 1015 cm^{-1}), ligação dupla do tipo metileno terminal (1640 e 881 cm^{-1}) e sistema alifático (2944, 2870, 1456 e 1382 cm^{-1}), (sugerindo a presença destes grupos).

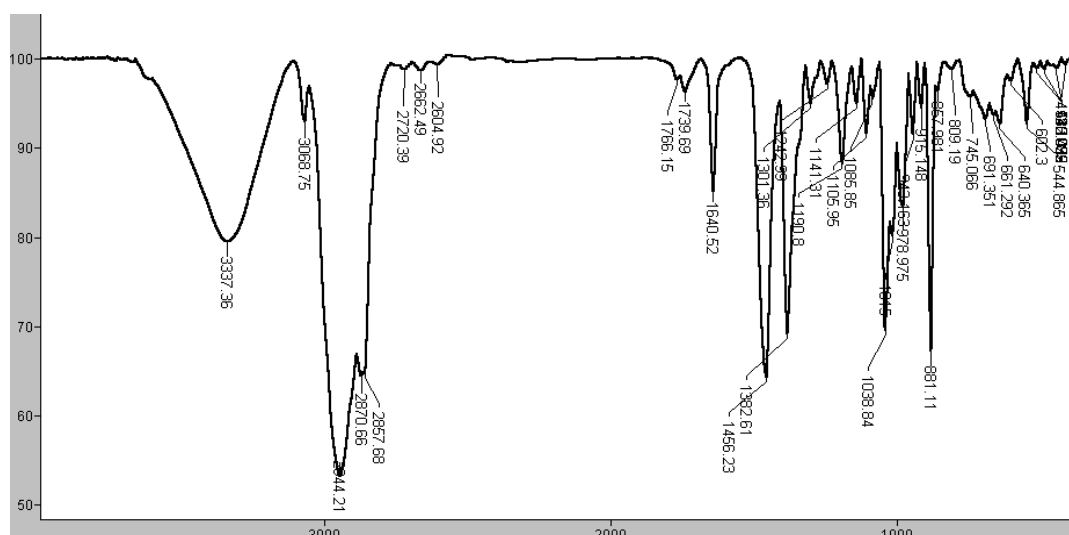


Figura 31: Espectro da substância ALC-5 na região do Infra-vermelho

O espectro de RMN de ^1H (**Figura 32**) de ALC-5 é característico de compostos triterpênicos.

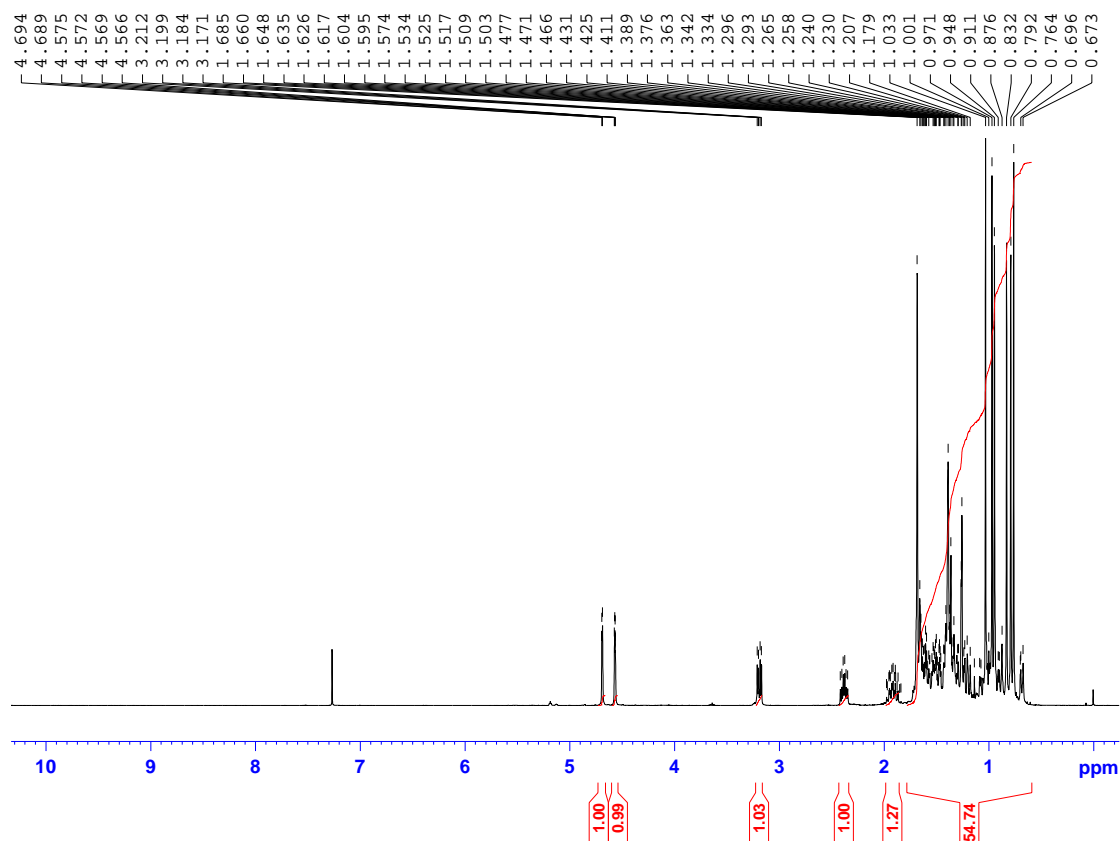


Figura 32: Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALC-5

Na região entre 0,70 e 1,80 ppm observa-se claramente seis simpletos referentes a grupos metilas terciários (em 0,76, 0,79, 0,83, 0,94, 0,97, e 1,03 ppm) e um simpleto relativo à metila ligada a carbono insaturado, em 1,68 ppm (**Figura 33**).

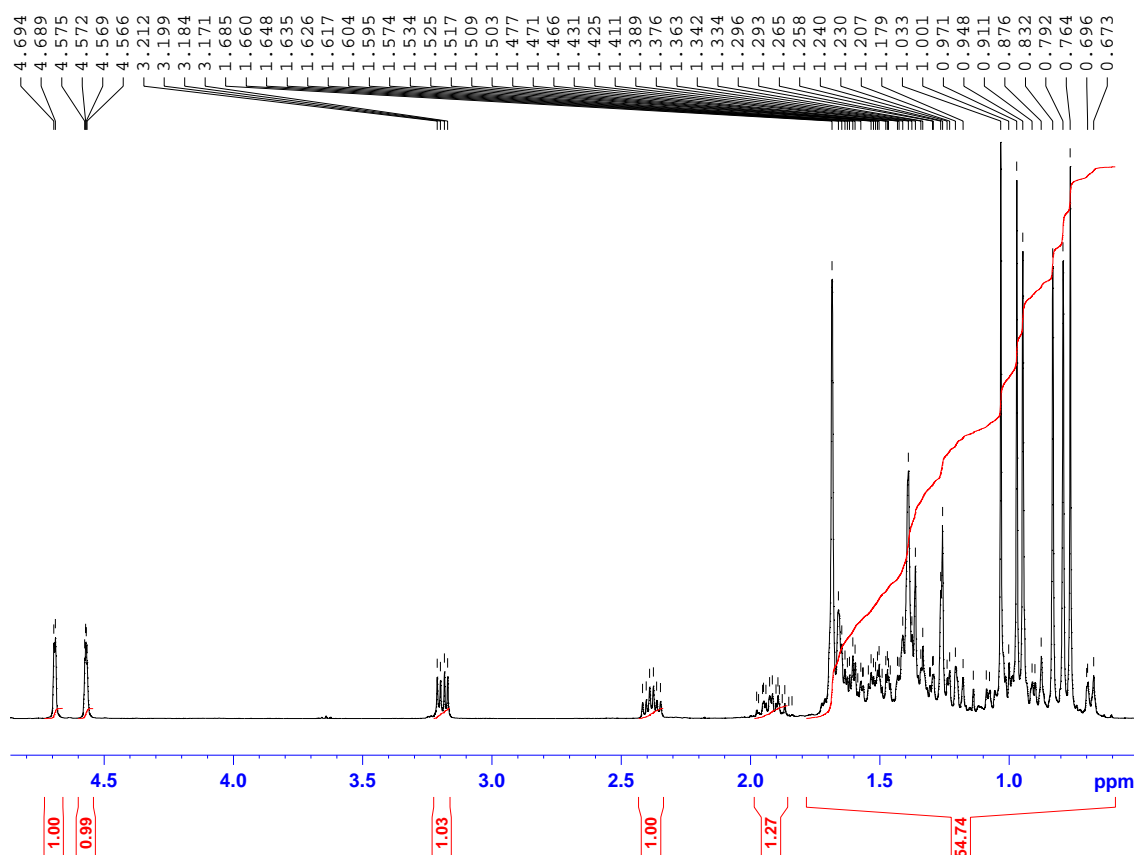


Figura 33: Expansão do espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALC-5

Os hidrogênios H-29 da ligação dupla terminal de ALC-5 são identificados pelos sinais de hidrogênios vinílicos em δ 4,57 (*dd*; $J=2,3$ e 1,3 Hz) e δ 4,69 (*d*; $J=2,4$ Hz), que são característicos dos triterpenos com esqueleto lupânico. Os sinais δ 1,68, 3H (s), δ 4,69 (*d*; $J=2,4$ Hz) e 4,57 (*dd*; $J=2,3$ e 1,3 Hz) confirmam uma unidade isopropilidênica. O hidrogênio carbinólico ligado ao átomo do carbono quiral (C-3), tem um deslocamento químico de 3,18 ppm e aparece na forma de um duplo duplete (1H, $J=5,4$ e 10,8 Hz), pois acopla com os hidrogênios diastereotópicos em C-2, indicando a presença de β -configuração, e os sinais em δ 0,76 a δ 1,68 são referentes aos grupos metilas (**Figura 33**).

As correlações entre os hidrogênios vinílicos foram confirmadas através do mapa de contornos COSY (**Tabela 21**). Este experimento mostra também a correlação entre o duplo duplete em δ 4,57 (H-29) e o metila em δ 1,68 (H-30). O ddd em δ 2,37 (H-19) está correlacionado com o sinal em δ 1,35 (Ha-21), que correlaciona - se com o sinal em δ 1,91 (Hb-21).

Cap. III. Resultados e Discussão

Analisando-se o espectro de carbono (^{13}C), verifica-se a presença de 29 carbonos, sendo um sinal sobreposto, confirmando a presença dos trinta carbonos (**Figuras 34 e 35**).

Os espectros DEPT 90° e 135° (**Figuras 36 e 39**) possibilitaram a identificação de treze sinais referentes a carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3), onze sinais referente a carbonos metilênicos (CH_2), indicando desta maneira que o metabólito possua seis carbonos não hidrogenados, pois estes não aparecem no espectro DEPT 135° .

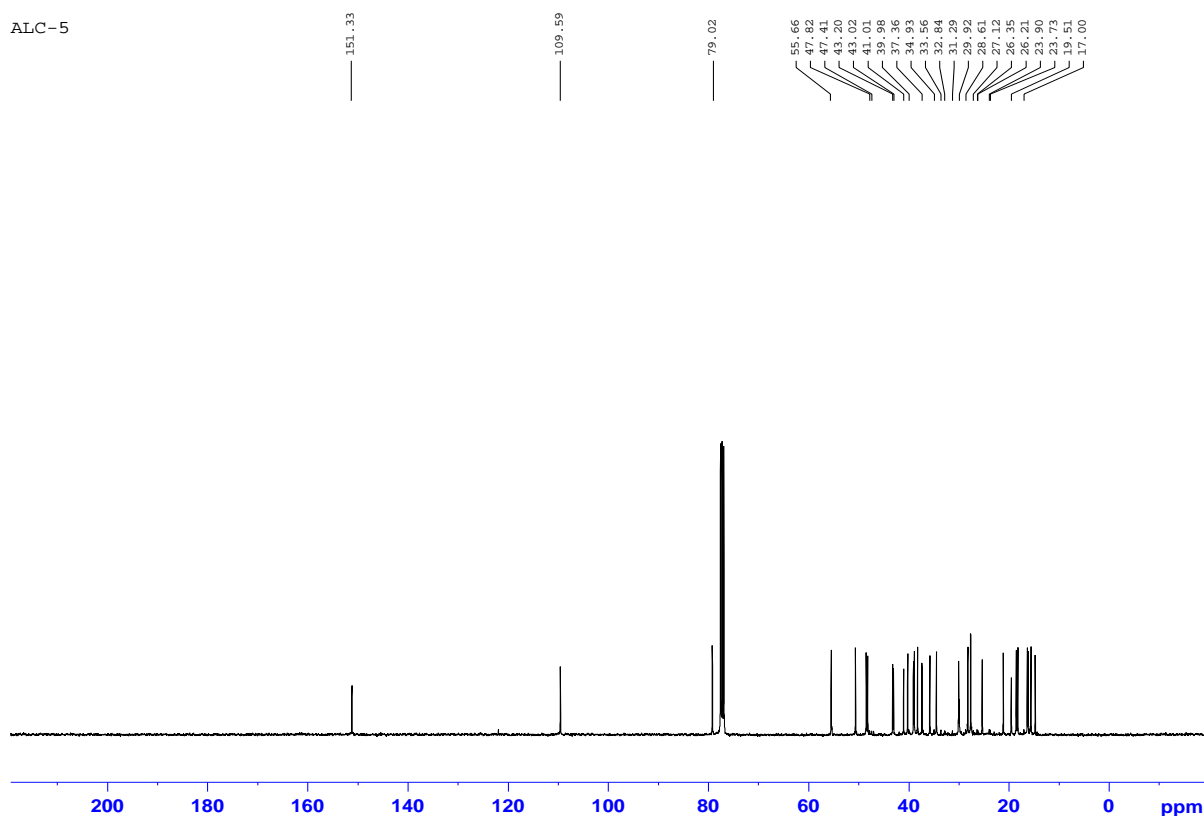


Figura 34: Espectro de C^{13} em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-5

Cap. III. Resultados e Discussão

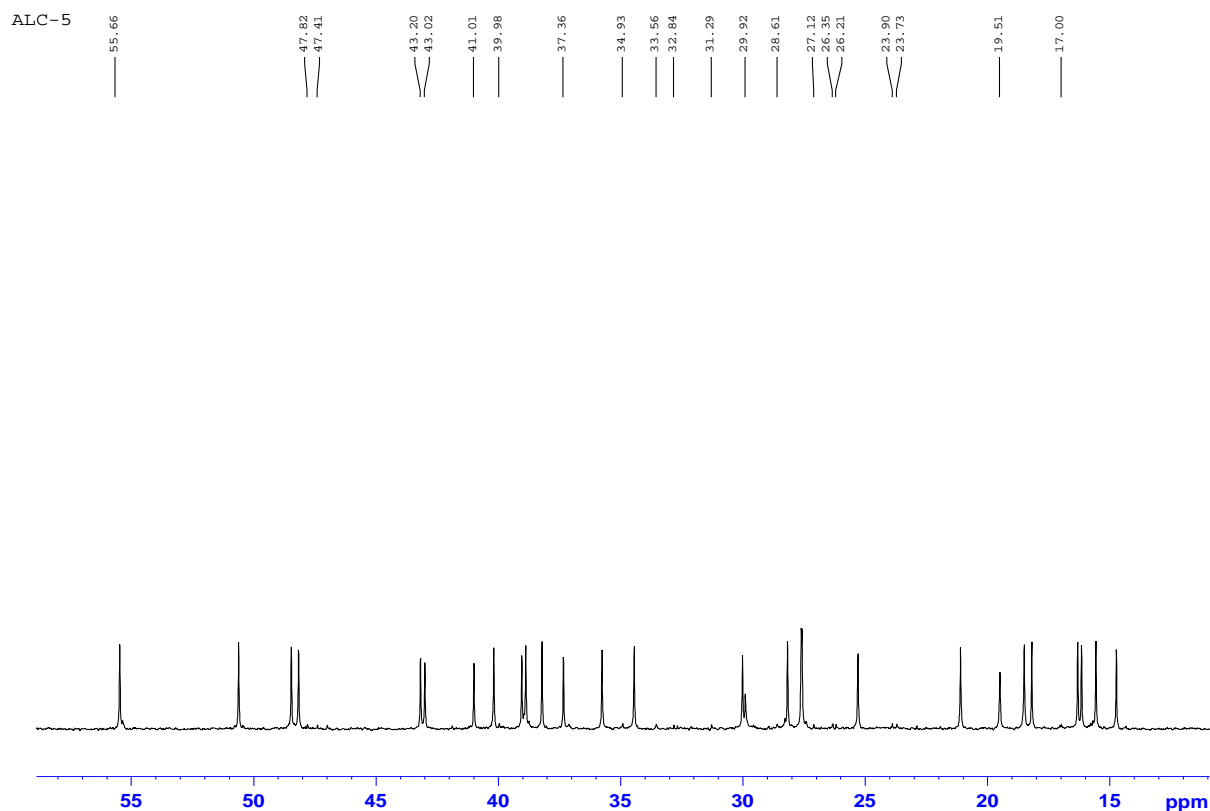


Figura 35: Expansão do espectro de C^{13} em $CDCl_3$, 100 MHz, do composto ALC-5

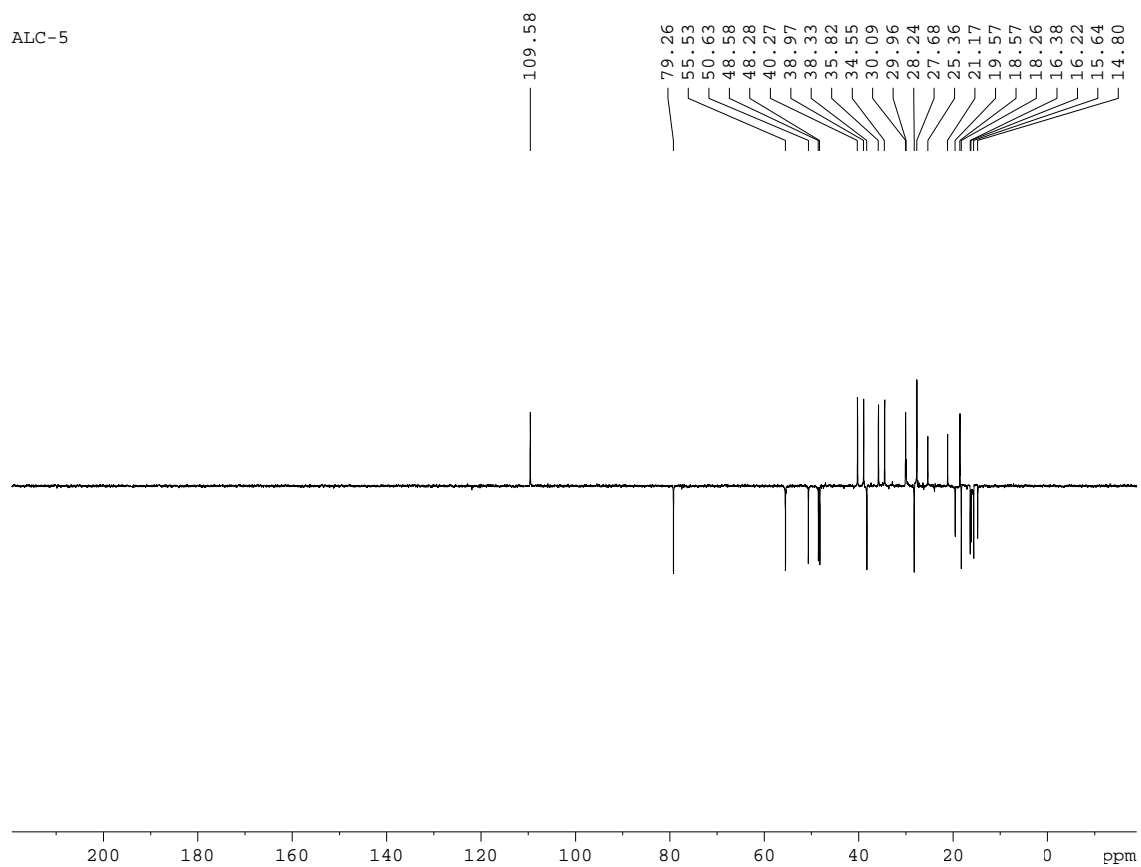


Figura 36: Espectro DEPT 135° em $CDCl_3$, 100 MHz, do composto ALC-5

Cap. III. Resultados e Discussão

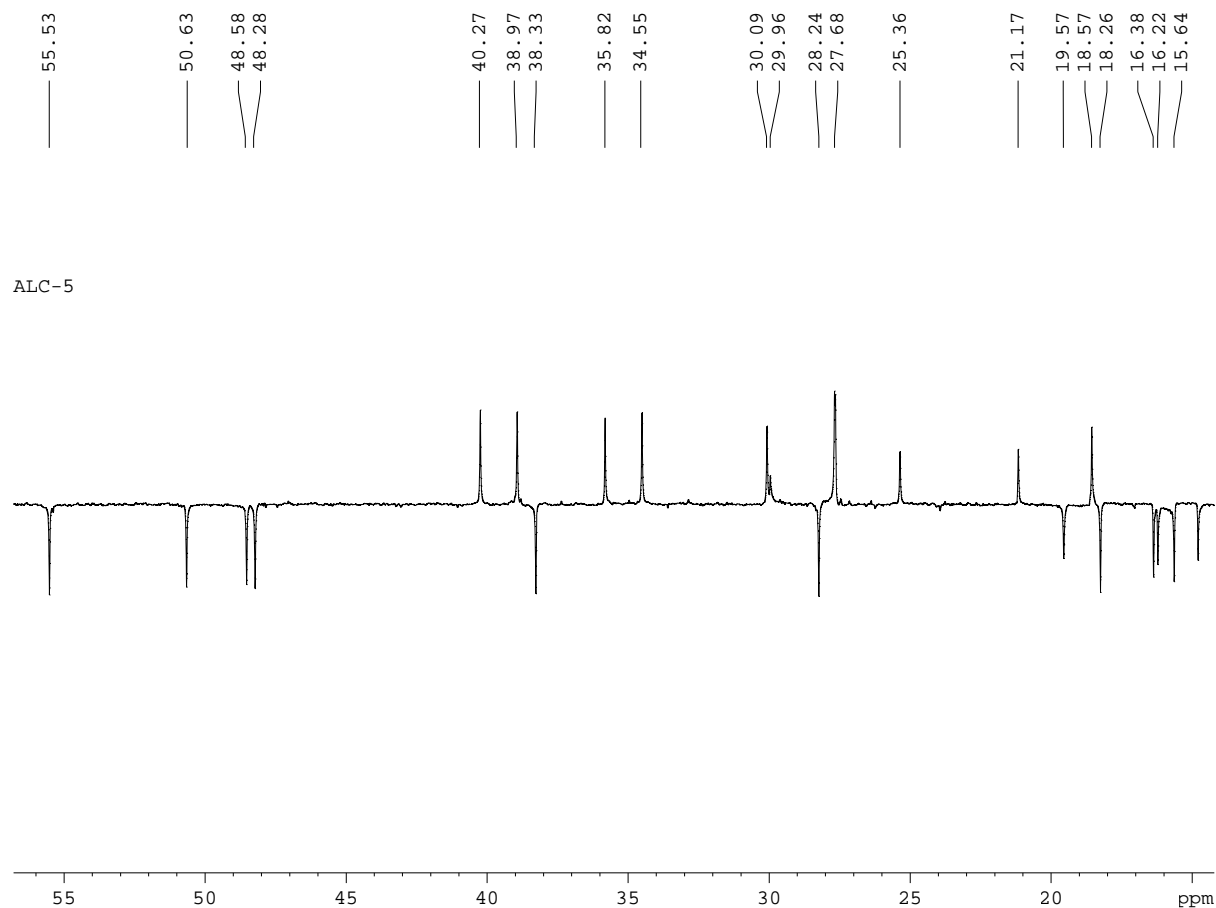


Figura 37: Expansão do espectro DEPT 135° em CDCl₃, 100 MHz, do composto ALC-5

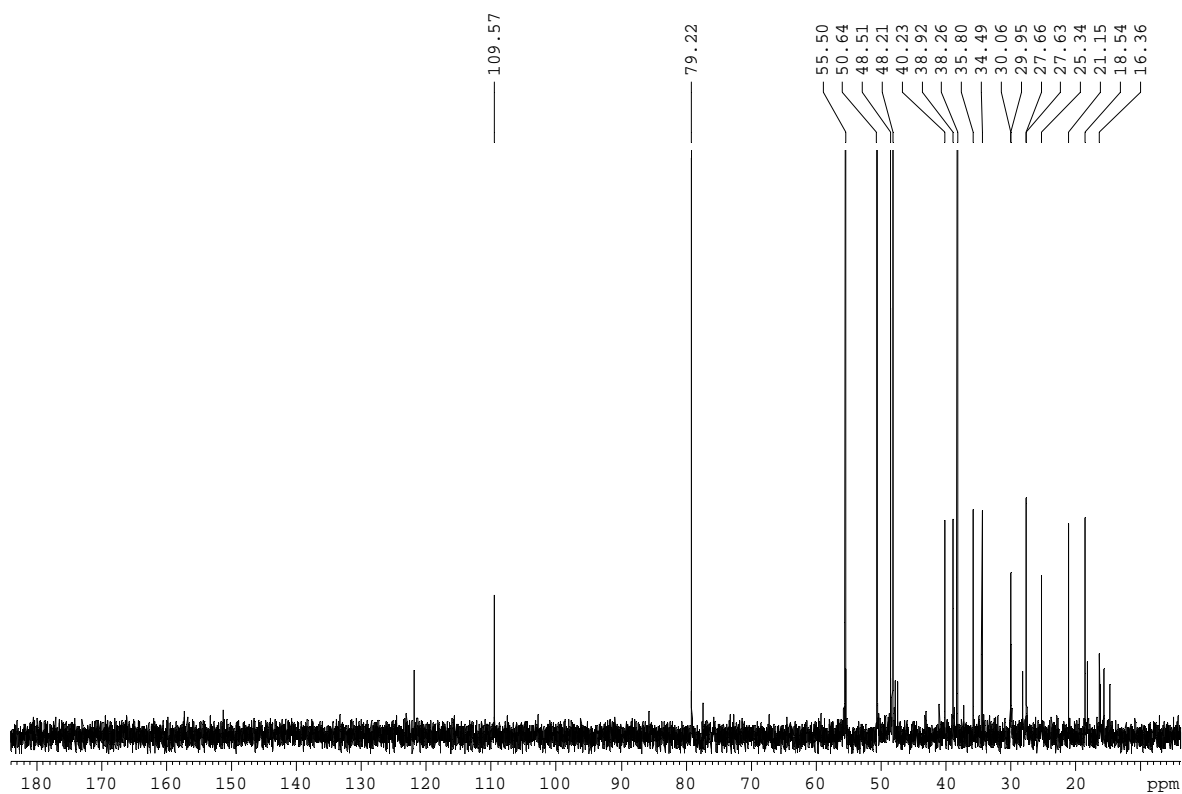


Figura 38: Espectro DEPT 90° em CDCl₃, 100 MHz, do composto ALC-5

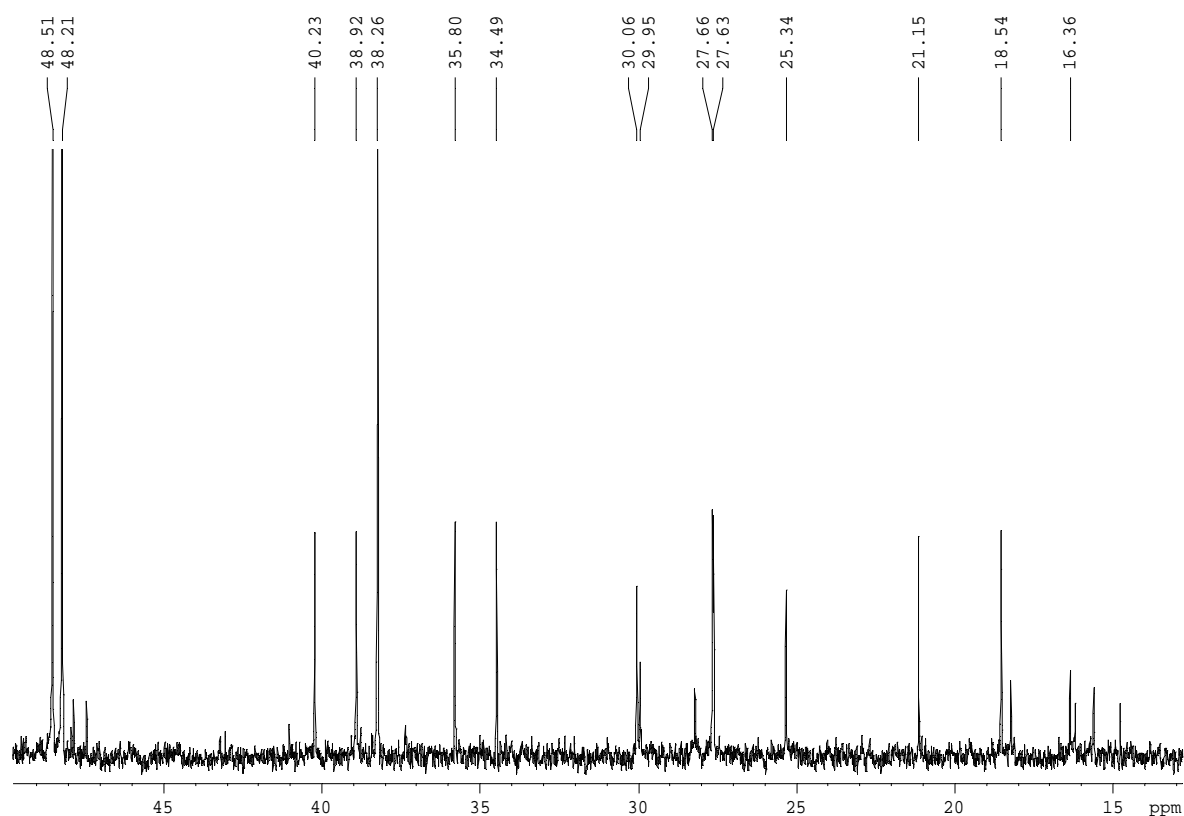


Figura 39: Expansão do espectro DEPT 90° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALC-5

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 90° e 135° MHz (**Figura 34-39; Tabela 21**) permitiram reconhecer um total de trinta átomos de carbono, dentre estes destacam-se as absorções em δ 150,94(C) e em δ 109,31 (CH_2) atribuídas a uma ligação dupla metileno terminal, confirmando a unidade isopropilidênica. Observa-se um sinal para carbono monoidrogenado carbinólico δ 78,99 (CH), cujo valor de deslocamento químico sugere a presença de um grupo hidroxila em C-3 de triterpeno pentacíclico da série lupano, e os sinais da região de δ 14,4 a 29,9, são atribuídos aos C-23 a C-28 e C-30.

O HSQC (**Figuras 40-41**) mostra a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ 4,57 e δ 4,69 com o sinal de carbono em δ 109,3. O sinal de carbono em δ 38,6 está correlacionado com os sinais em δ 0,88 e 1,65 e o duplo duplete em δ 3,18 correlaciona-se com o sinal em δ 79,0. Os sinais em δ 27,8, 15,2, 16,0, 15,8, 14,4, 17,8 e 19,2 estão correlacionados com os simpletos em δ 0,97, 0,76, 0,83, 1,03, 0,94, 0,79 e 1,68, respectivamente. Os dados obtidos nos mapas de contorno COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$) e HSQC ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$), confirmam as principais atribuições de ALC-5.

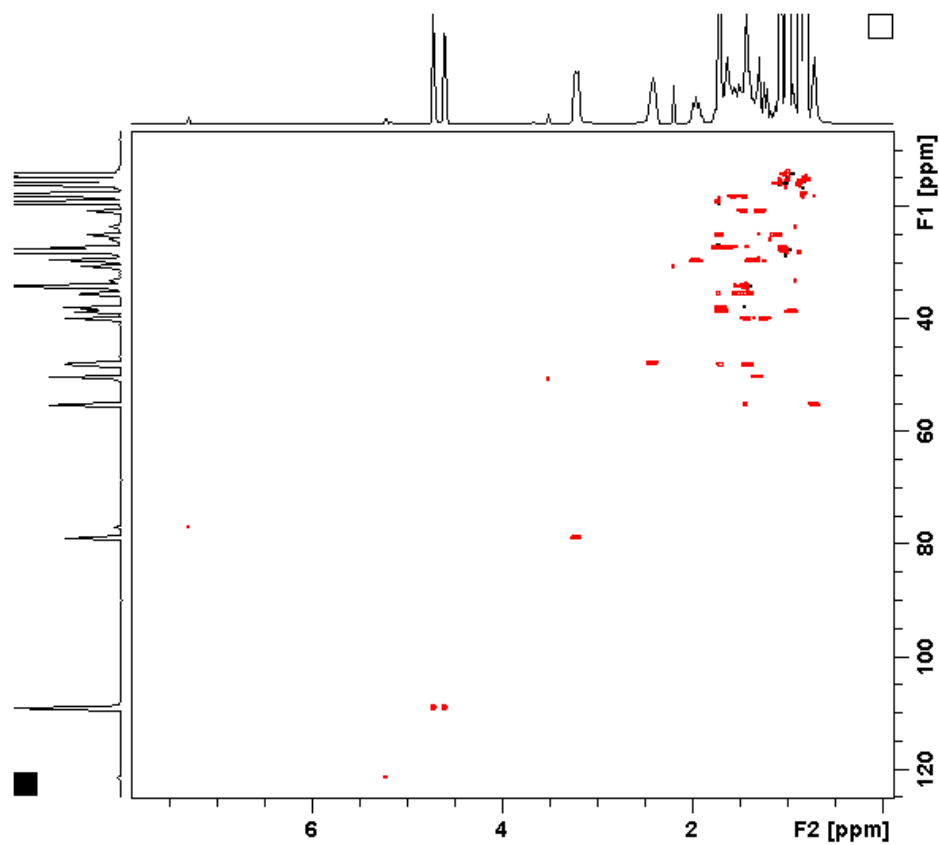


Figura 40: Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-5

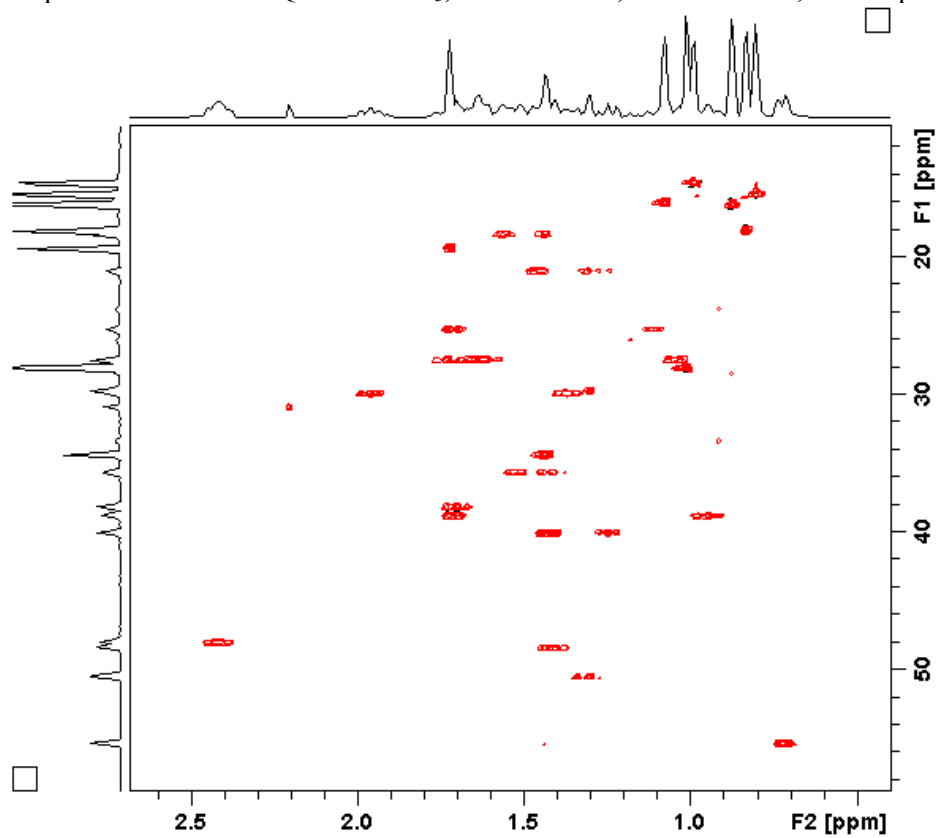


Figura 41: Expansão do mapa de contornos HSQC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALC-5

Os dados obtidos nos mapas de contorno COSY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$), HSQC ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) e o sinal negativo apresentado na medida de rotação específica $[\alpha]_D^{25} = -210^\circ$, CHCl_3 , confirmam as atribuições feitas para o ALC-5, identificada como sendo um triterpeno da série dos lupanos, o lupeol (lup-20(29)-en-3 β -ol). Todas as correlações RMN 1D e 2D estão sumarizadas na **Tabela 21**.

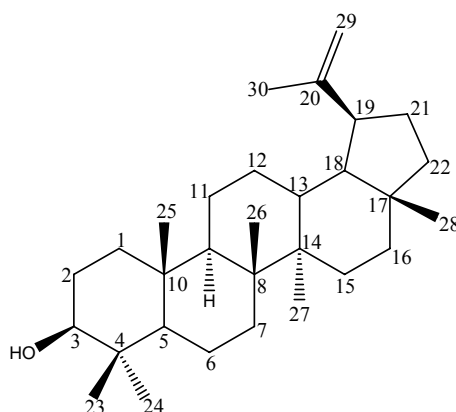


Figura 42. Estrutura do Lupeol (ALC-5)

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 43**) indicou a massa molecular 426 u, com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ sugerindo tratar-se do lupeol, apresentando também os fragmentos em m/z 191, 218 e 409 respectivamente, em conformidade com outras técnicas de identificação. O espectro de massa forneceu o íon molecular m/z 427 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e o pico base m/z 409 (**Esquema 2**) (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

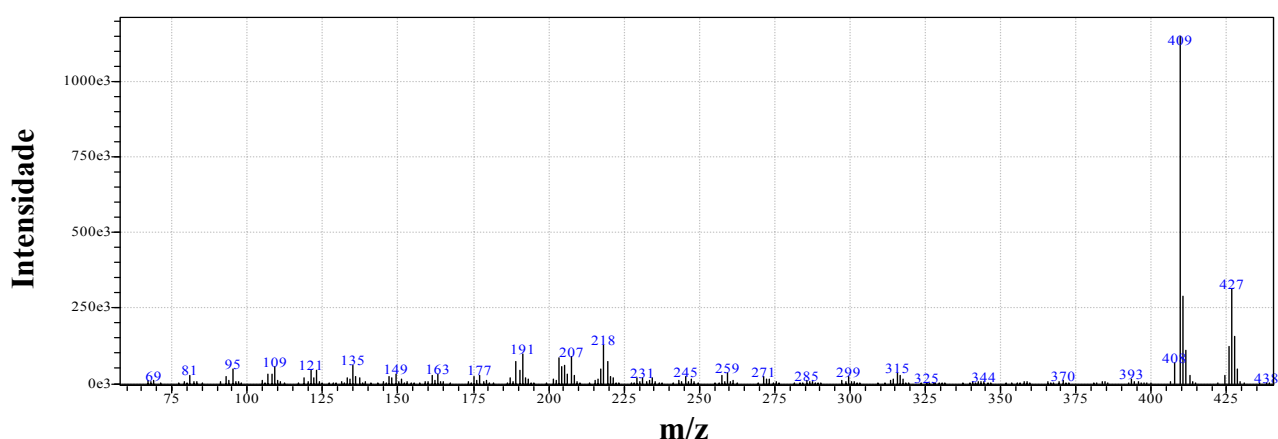
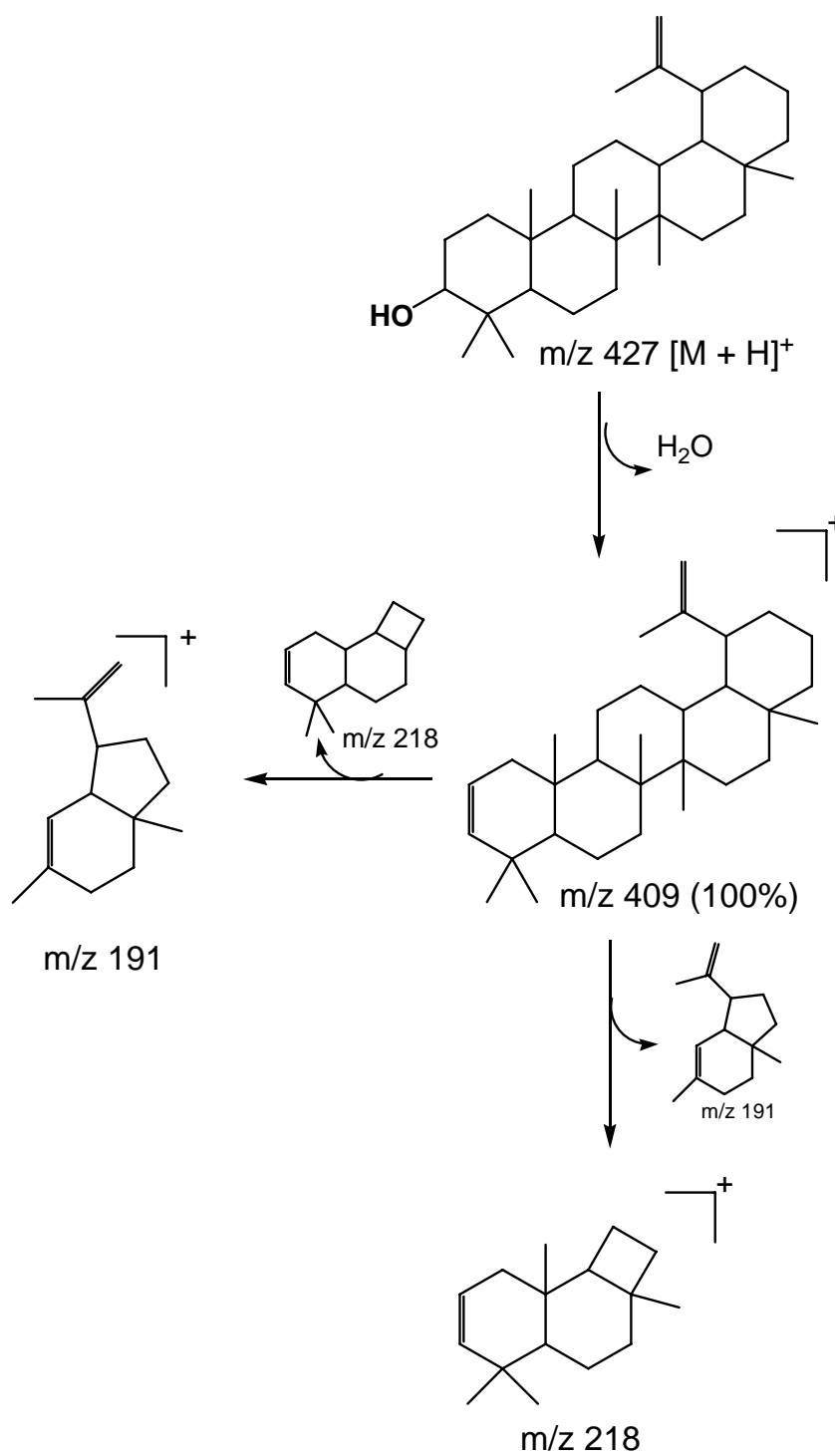


Figura 43: Espectro de massas da substância ALC-5.



Esquema 2: Prováveis caminhos de fragmentação de ALC-5

Tabela 21: RMN do composto ALC-5 em CDCl₃, deslocamento em δ .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	COSY
1	38,98 CH ₂	0,88 m; 1,65 m		
2	28,12 CH ₂	1,54 m		3,19
3	79,02 CH	3,19 dd	5,4 e 10,8	1,54
4	39,01 C			
5	55,66 CH	0,70 m		
6	18,52 CH ₂			
7	34,45 CH ₂	1,41 m		
8	41,01 C			
9	50,80 CH	1,28 m		
10	37,36 C			
11	21,12 CH ₂	1,20 m; 1,38d	1,5	
12	25,19 CH ₂	1,07 m; 1,62 m		
13	38,01 CH	1,66 t	3,0	
14	43,02 C			
15	27,82 CH ₂	0,99 d; 1,88 t	2,1 e 2,4	
16	35,90 CH ₂	1,49 m		
17	43,20 C			
18	47,82 CH	1,36 m		
19	47,41 CH	2,37 ddd		1,35
20	151,33 C			
21	30,02 CH ₂	1,35 m; 1,91 m		1,91; 1,35
22	40,03 CH ₂	1,20 m; 1,41 m		
23	29,92 CH ₃	0,97 s		
24	15,58 CH ₃	0,76 s		
25	16,32 CH ₃	0,83 s		
26	16,17 CH ₃	1,03 s		
27	14,74 CH ₃	0,94 s		
28	18,20 CH ₃	0,79 s		
29	109,59 CH ₂	4,69d; 4,57dd	2,4; 2,3 e 1,3	4,57; 4,69
30	19,51 CH ₃	1,68 s		4,57

Dados de RMN ¹H 400 MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

m=multiplete
t = tripleto
dd=duplo duplete
d= duplete
s=simpleto

III.5.3 – Identificação dos diterpenos

III.5.3.1 – Identificação do ALCF-22

A substância ALCF-22 foi obtida na forma de um sólido branco cristalino em forma de agulhas apresentando ponto de fusão 108-111°C.

O espectro de absorção (de luz) na região do IV, obtido em pastilha de KBr (**Figura 44**), revelou a presença de bandas de absorção de estiramento e deformação para grupos hidroxila ($3509, 1060\text{ cm}^{-1}$) e de natureza alifática C-H ($2945, 2829, 1446\text{ e }1374\text{ cm}^{-1}$), (sugerindo a presença destes grupos).

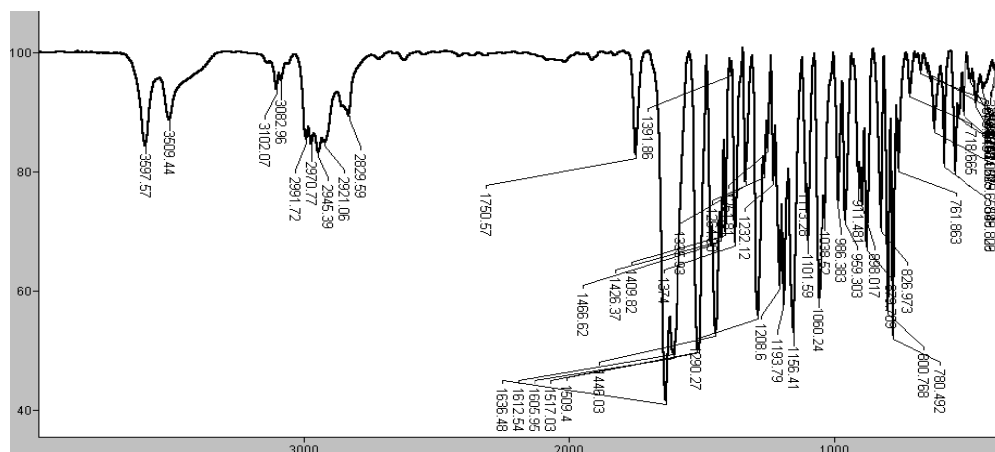


Figura 44: Espectro da substância ALCF-22 na região do Infra-vermelho

O espectro de ^1H dessa substância (**Figura 45**) revelou a presença de sinais característicos de diterpenoides.

Pode-se destacar os sinais a δ 3,43 tripleto (H-7) sugestivo de hidrogênio carbinólico, e quatro sinais na forma de simpletos (s) entre δ 0,8 e 1,4 correspondentes a hidrogênios de grupos metilas terciárias (em 0,86, 0,89, 0,99, e 1,34 ppm) (**Figura 46**).

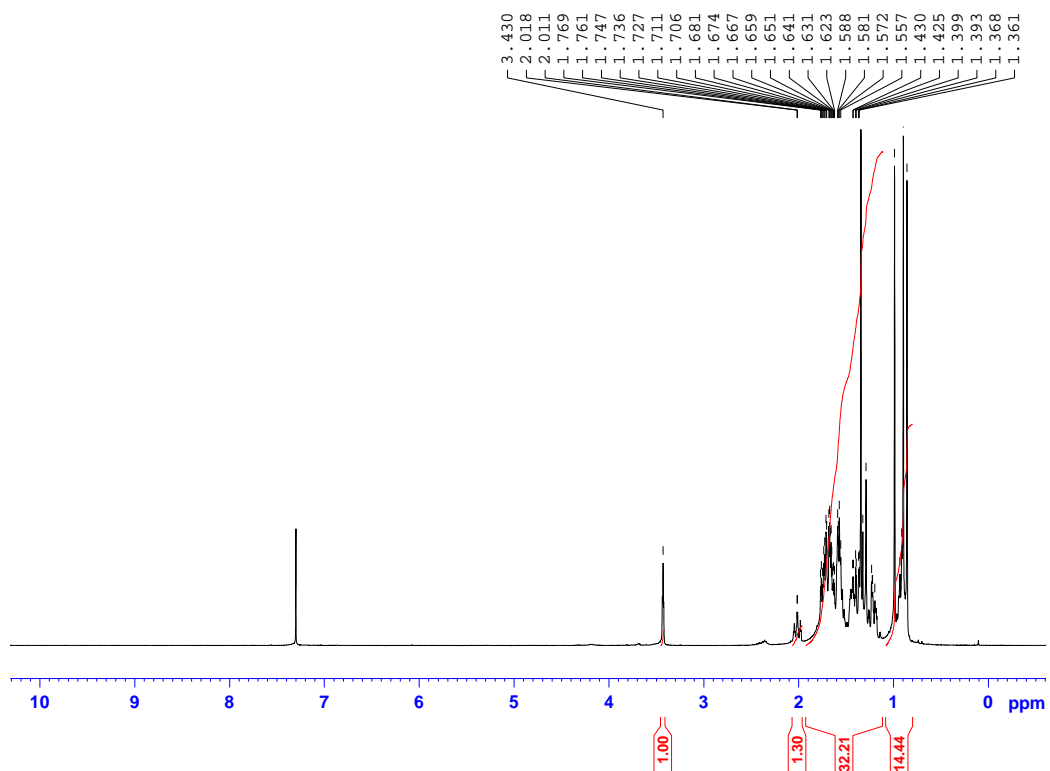


Figura 45: Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALCF-22

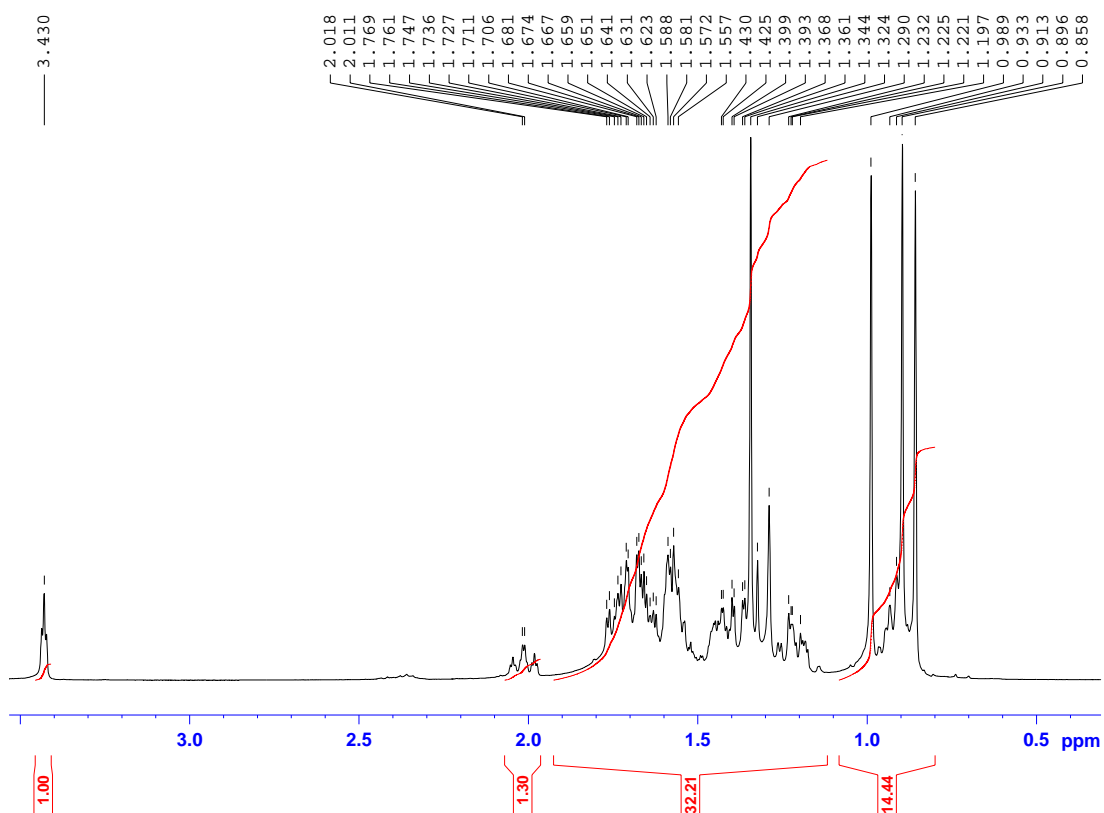


Figura 46: Expansão do espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALCF-22

Analisando-se o espectro de carbono ^{13}C , evidencia-se a presença de 20 carbonos. (Figuras 47-48).

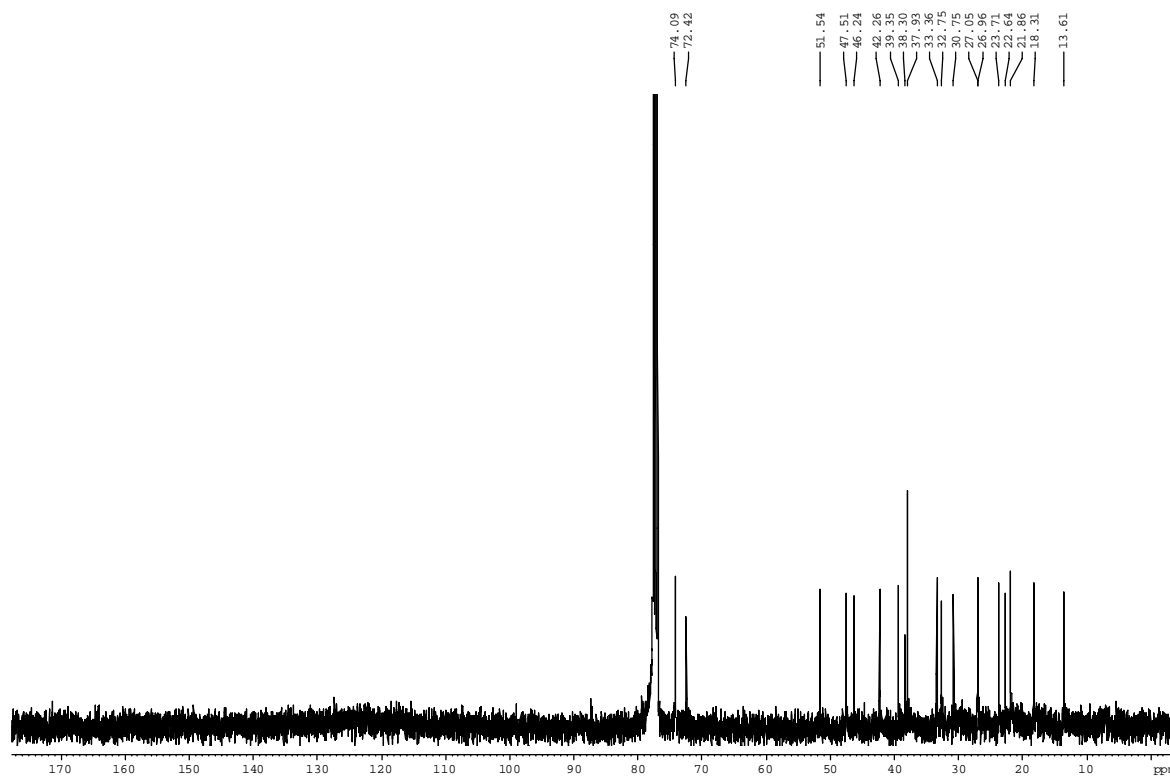


Figura 47: Espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALCF-22

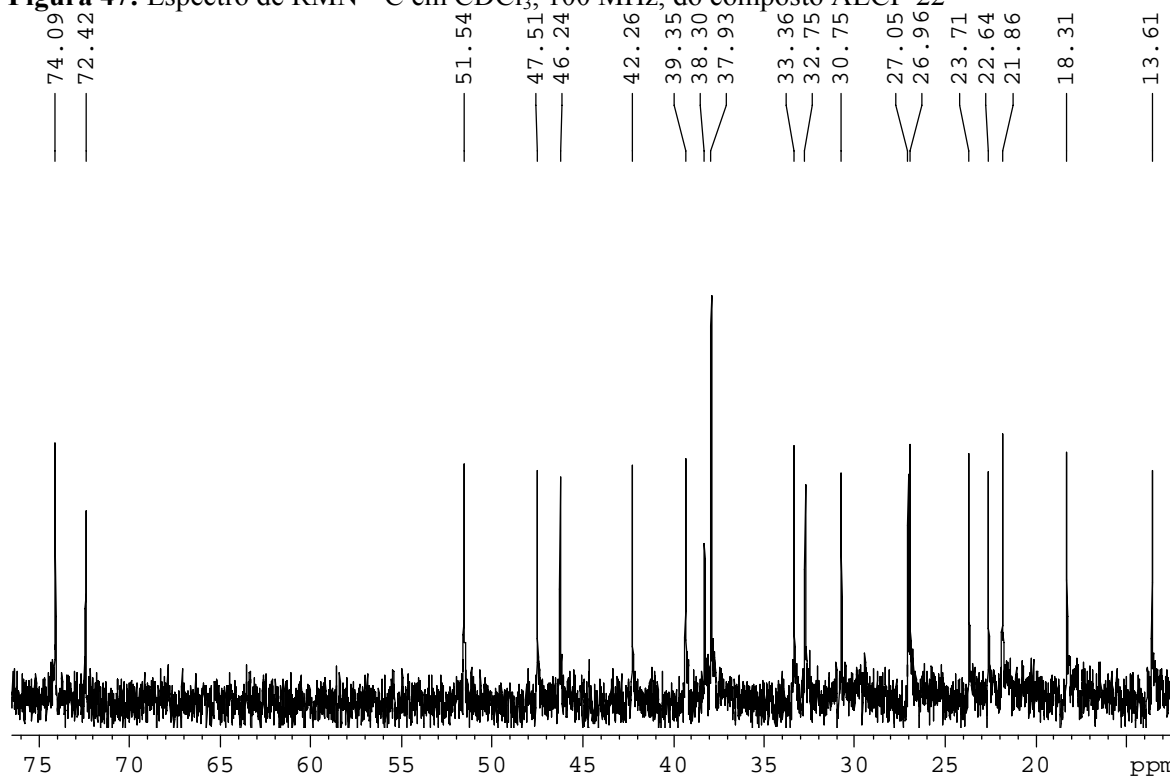


Figura 48: Expansão do espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALCF-22

Os espectros DEPT's 90° e 135° possibilitaram a identificação de quatro sinais referentes a carbonos metínicos (CH) e quatro carbonos metílicos (CH₃) com, oito sinais referente a carbonos metilênicos (CH₂), sugerindo desta maneira que o metabólito possua quatro carbonos não hidrogenados, pois estes não aparecem no espectro DEPT 135°. O número de átomos e a natureza desses carbonos sugerem o esqueleto de um diterpeno (**Figuras 49-51**).

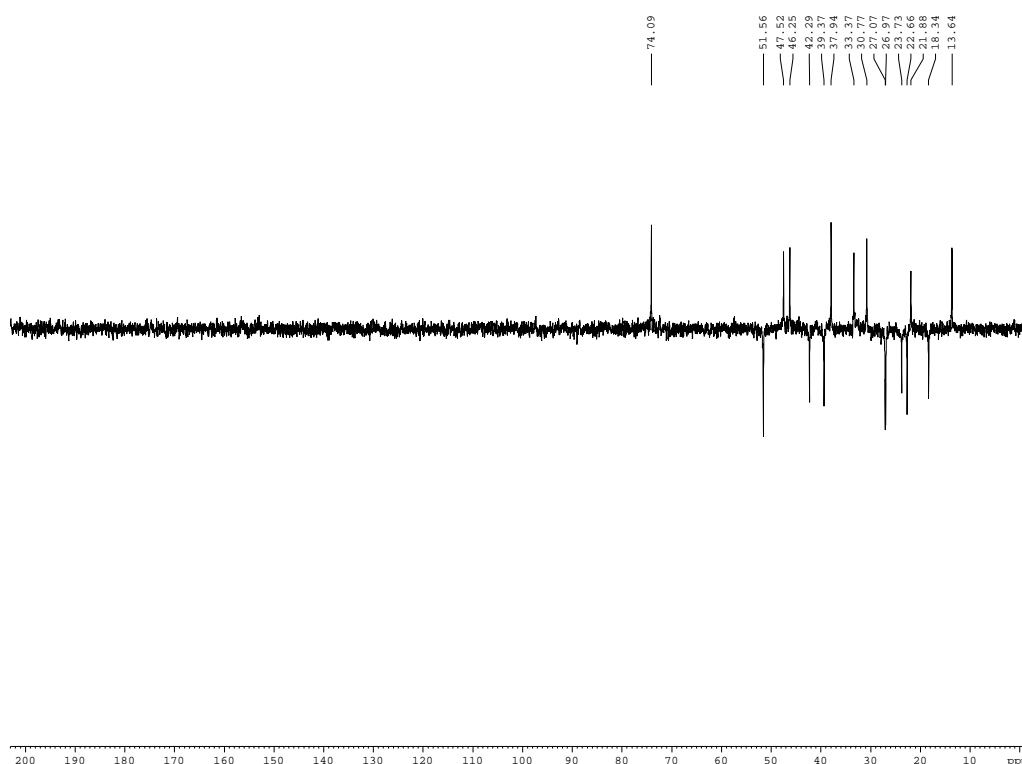


Figura 49: Espectro DEPT 135° em CDCl₃, 100 MHz, do composto ALCF-22

Cap. III. Resultados e Discussão

ALCF 22

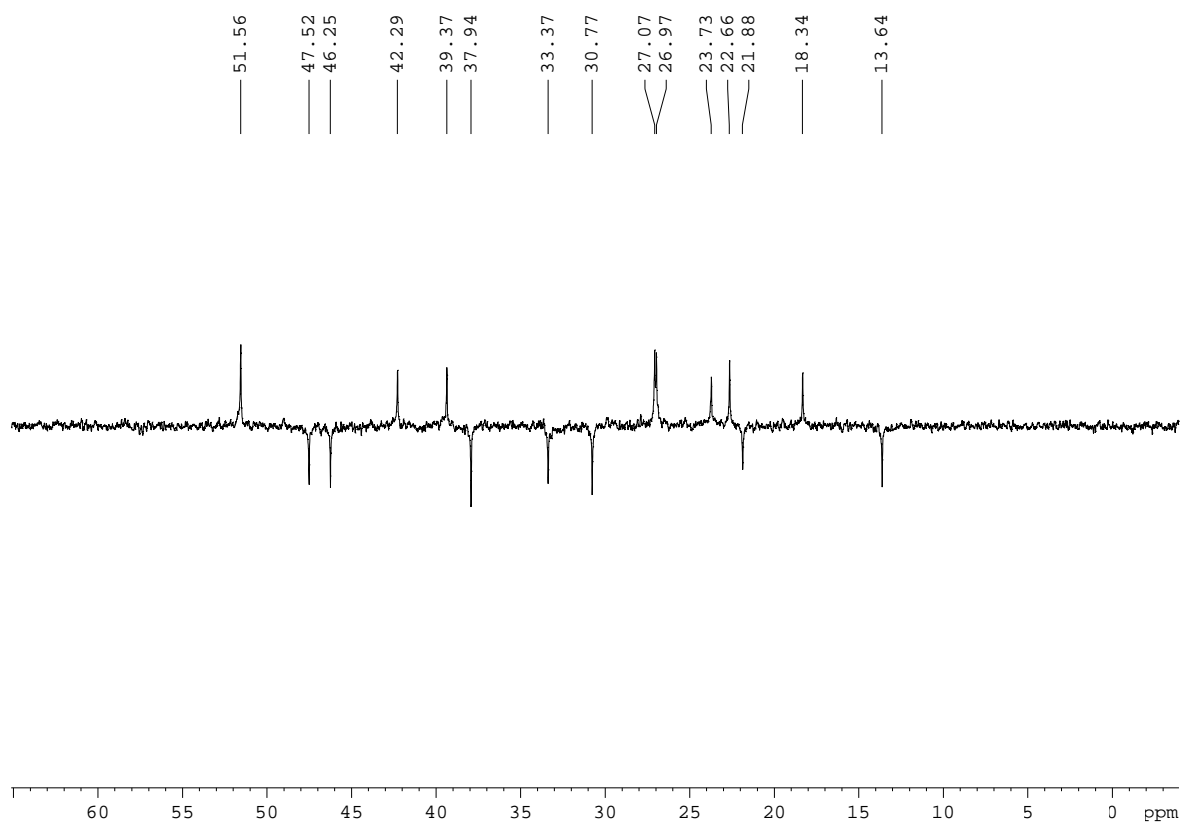


Figura 50: Espectro DEPT 135° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALCF-22

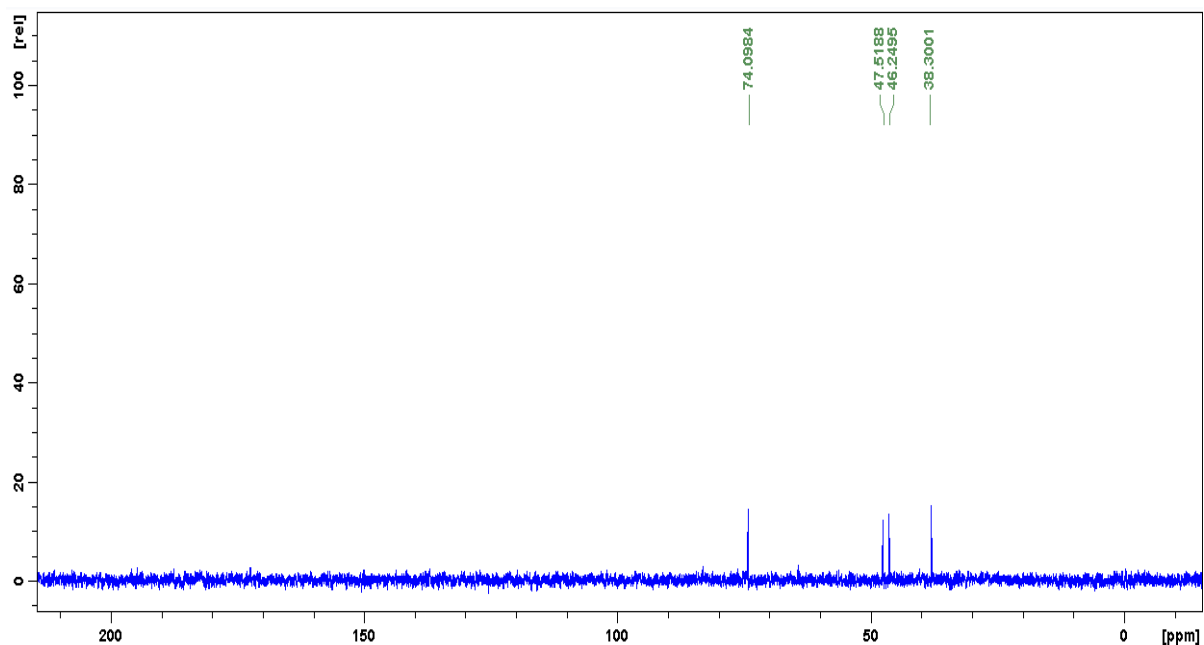


Figura 51: Espectro DEPT 90° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALCF-22

Através do espectro HSQC observaram-se as correlações do hidrogênio carbinólico (δ 3,43) com o carbono δ 74,09; e dos hidrogênios metílicos (δ 0,86, 0,89, 0,99, e 1,34) com os seus respectivos carbonos (δ 21,86, 33,36, 13,61 e 30,75) (Figura 52).

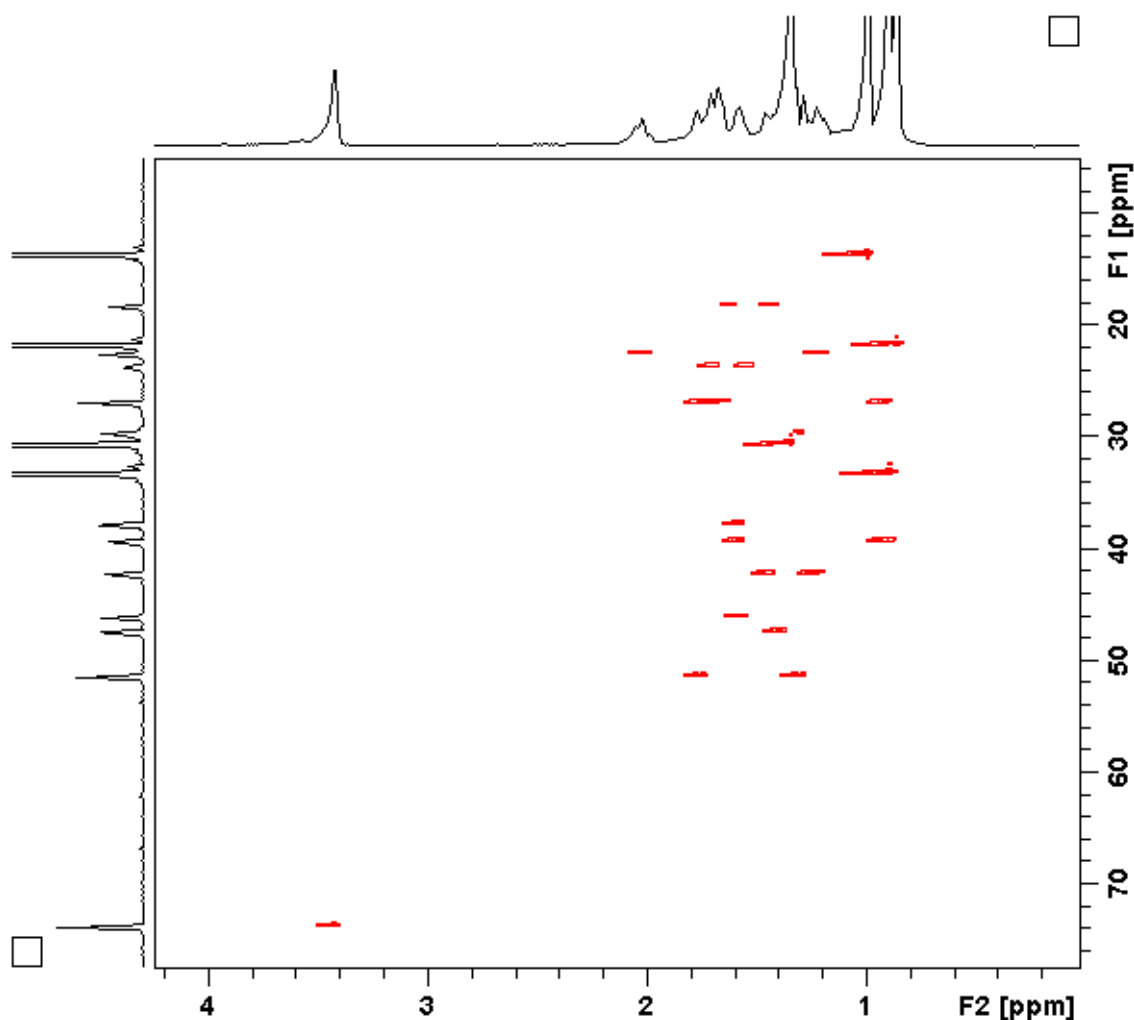


Figura 52: Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALCF-22

O espectro de RMN COSY (Figuras 53-54) mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^2\text{-}^3J_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais), permitindo assim a montagem dos microfragmentos da estrutura (Tabela 22).

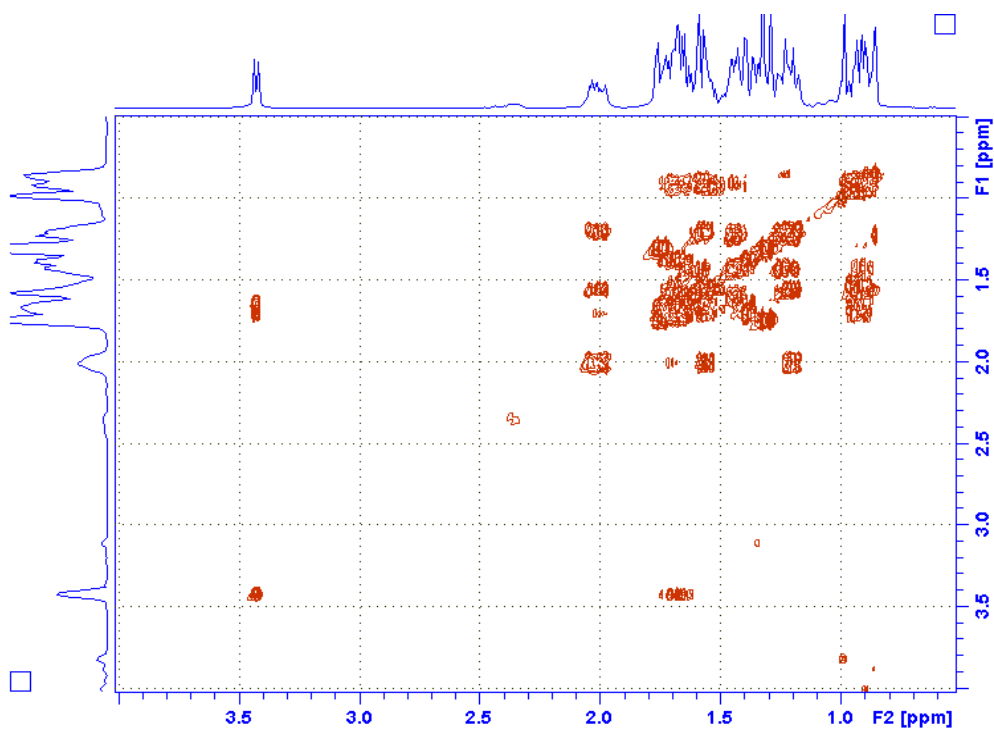


Figura 53: Mapa de contornos COSY em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALCF-22

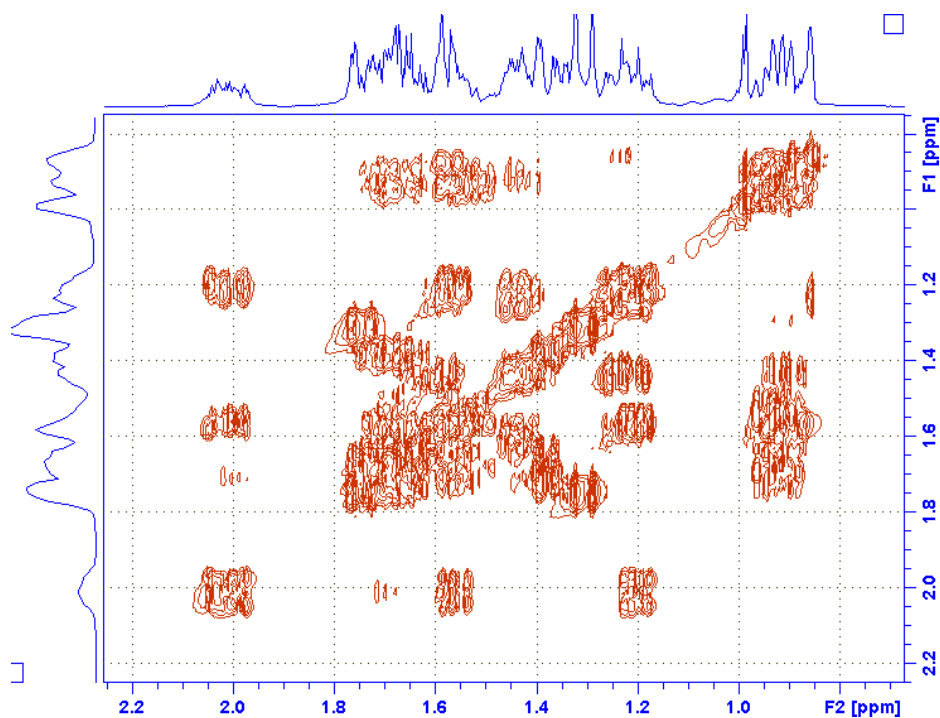


Figura 54: Expansão do mapa de contornos COSY em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALCF-22

A complementação da identificação dos diterpenos de diferentes classes seja kaurano, abietano, clerodano (bicíclico), abietano (tricíclico), traquilobano está na análise dos dados do espectro HMBC (**Figuras 55-56**).

A presença de quatro grupos metilas, 8 grupos metilenos, 4 grupos metínicos e 4 carbonos não hidrogenados foram comprovadas pela análise do espectro HMBC. A comparação dos dados de RMN deste composto com os de estruturas similares da literatura permite concluir que se tratava de um diterpeno da classe *ent*-atisano.

A localização dos grupos hidroxilas em C-7 e C-16 foi comprovada por HMBC. Correlações entre os hidrogênios em 1,43 (H-5), 1,58 (H-9) e 1,7 (H-15), e o carbono oxigenado em 74,09 sugeriram a localização de uma hidroxila no C-7. O outro grupo hidroxila foi localizado em C-16 devido às correlações entre 1,7 (H-11), 1,30 (H-15), e carbono em 72,42.

Comparando os dados de RMN ^{13}C de ALCF-22 com diterpenos atisano isolados de outras espécies percebeu-se que os carbonos C-5, C-9 e C-15 sofriam um efeito de proteção. Portanto a hidroxila estava localizada em C-7, pois nessa posição os carbonos C-5, C-9 e C-15 sofrem um efeito gama. Essa hipótese foi confirmada pela análise do espectro HMBC (Tabela 22).

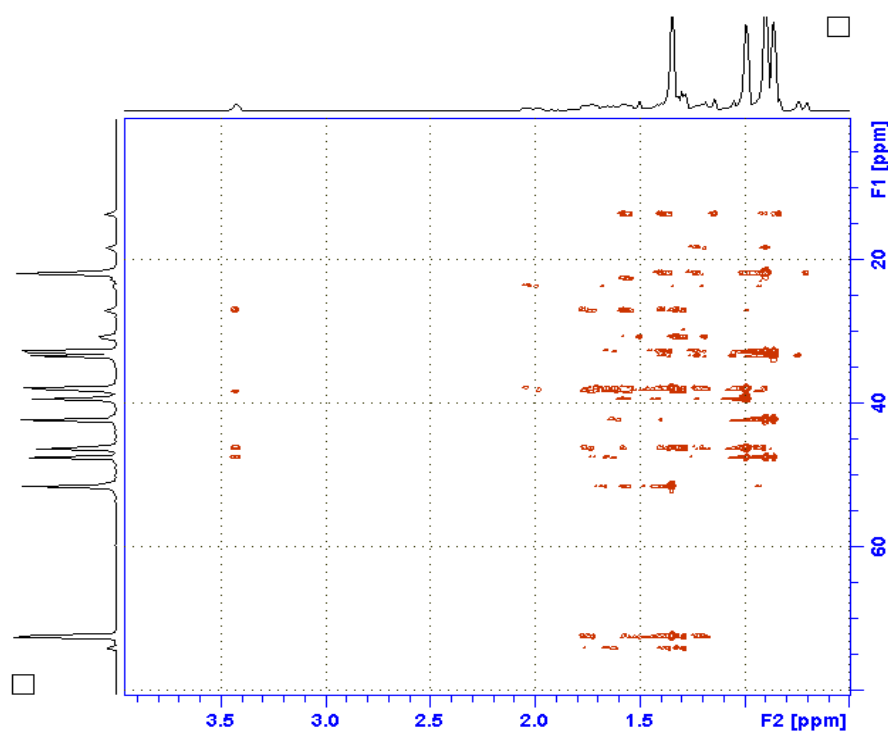


Figura 55: Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALCF-22

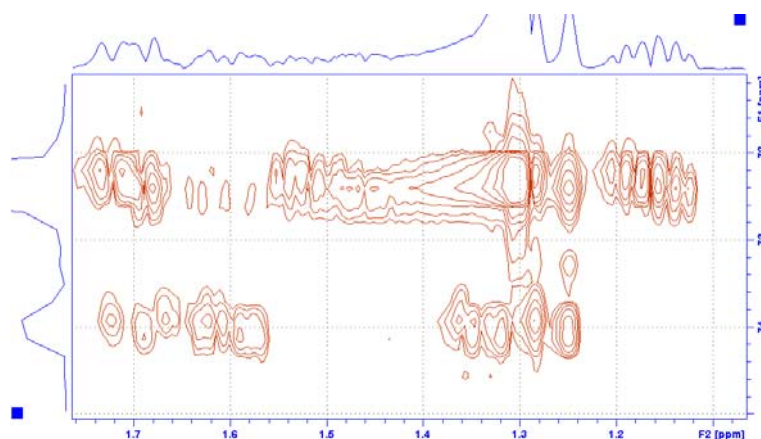


Figura 56: Expansão do mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALCF-22

A análise do espectro NOESY (**Figura 58**) e a medida de rotação óptica específica $[\alpha]_D^{25} = +40^\circ$, CHCl_3 foram também usadas para estabelecer a estereoquímica relativa da molécula.

Os dados de RMN 1D e 2D estão na **tabela 22**. A molécula está representada com orientação α para os grupos hidroxilas no C-7 e C-16 sendo proposta como um *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol (**Figura 57**).

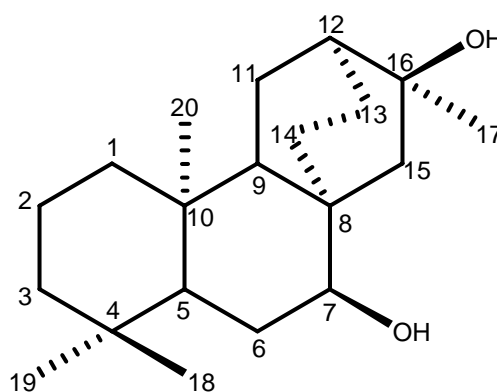


Figura 57: *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol

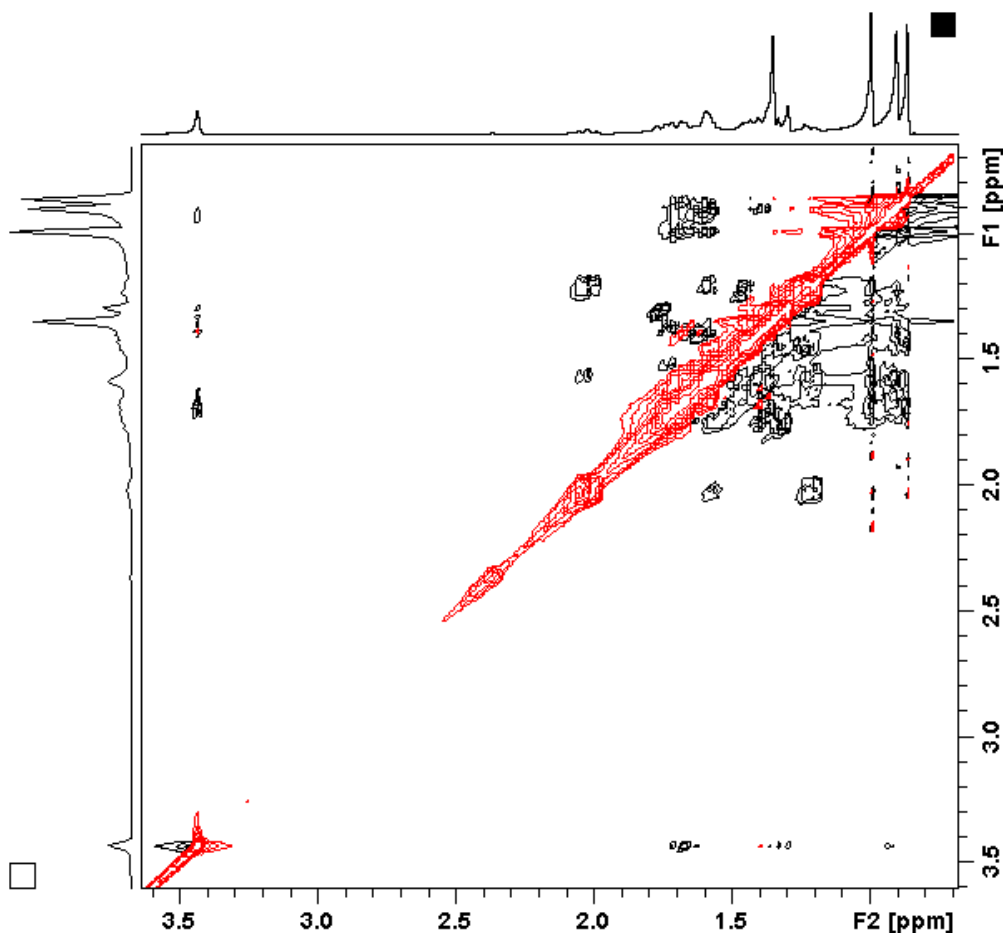


Figura 58: Mapa de contornos NOESY em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALCF-22

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 59**) indicou a massa molecular 306 u, com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$ sugerindo tratar-se de um diterpeno *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol (apresentando também os fragmentos em m/z 271, 230, 164, 123 respectivamente, em conformidade com outras técnicas de identificação).

O espectro de massa (**Esquema 3**) apresentou pico base em m/z 271 e picos característicos de sua classe em m/z 271, 230, 164, 123 com massa molecular de M^+ 306 (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

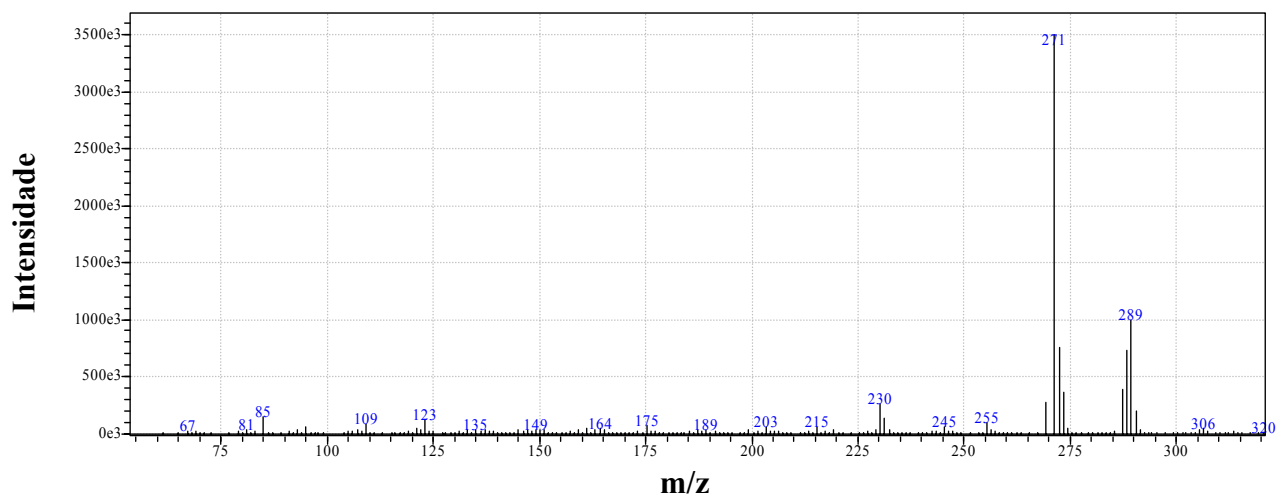
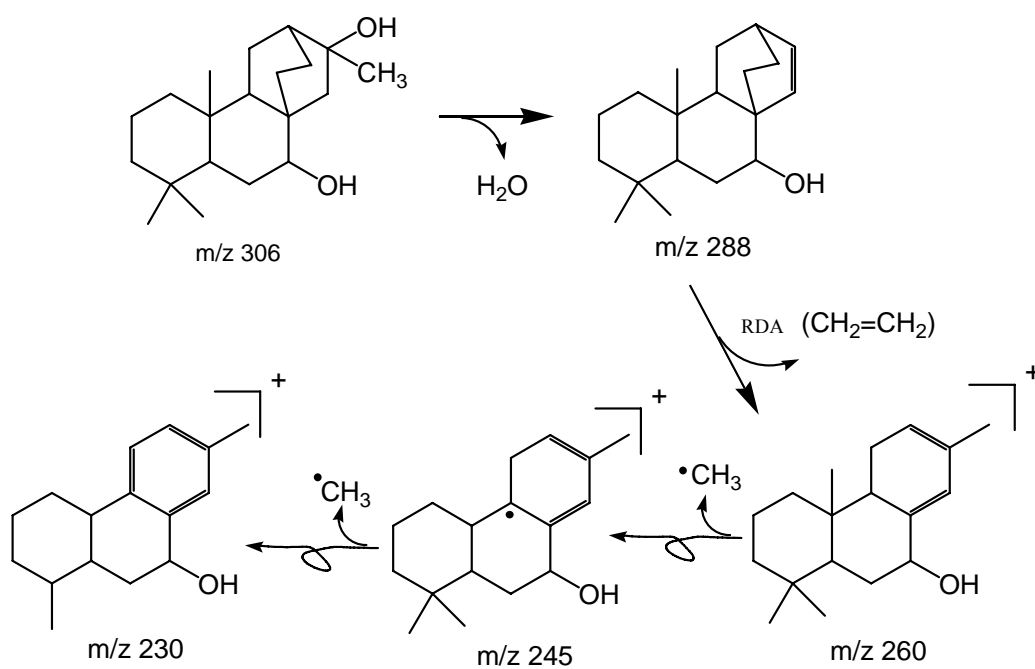
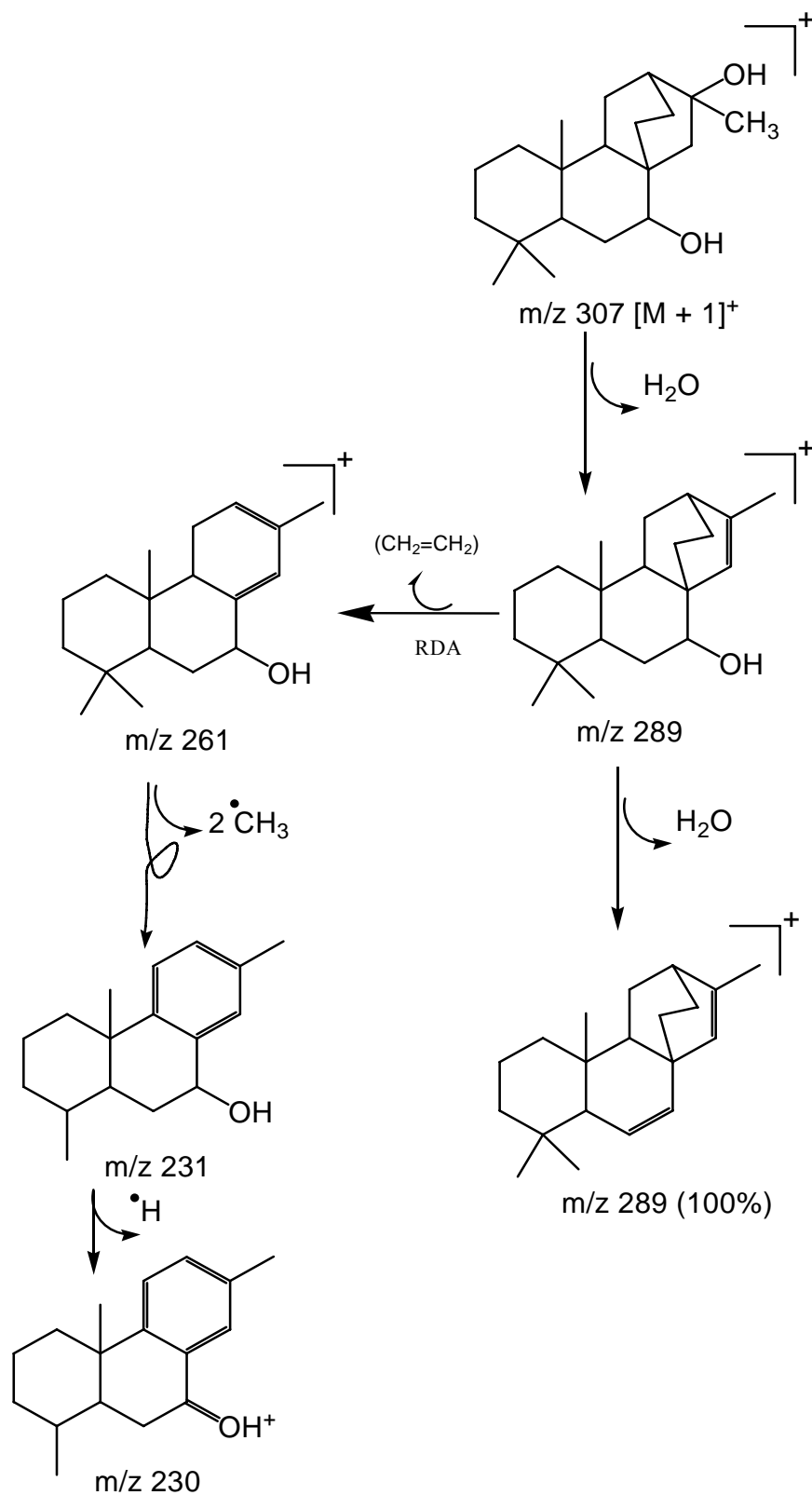


Figura 59: Espectro de massas da substância ALCF-22.



Esquema 3: Prováveis caminhos de fragmentação de ALCF-22



Esquema 3 (Cont.): Prováveis caminhos de fragmentação de ALCF-22

Tabela 22: RMN do composto ALCF-22 em CDCl₃, deslocamento em δ .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	COSY	HMBC	NOESY
1	42.26 CH ₂	1.43; 1.23 m	H-2		
2	18.31 CH ₂	1.43; 1.67 m	H-1, H-3		
3	39.35 CH ₂	1.65; 0.93 m	H-2		
4	37.93 C	----			
5	47.51 CH	1.43 m	H-6	H-1	
6	27.05 CH ₂	1.71; 1.76 m	H-5, H-7	H-7	
7	74.09 CH	3.43 t	H-6	H-5; H-9; H-15	H-14
8	32.75 C	----			
9	46.24 CH	1.58 m	H-11	H-13; H-11	
10	37.93 C	----			
11	22.64 CH ₂	1.2; 2.1 m	H-9, H-12		
12	38.30 CH ₃	1.67 m	H-11, H-13	H-13; H-11	
13	23.71 CH ₂	1,7; 1.5 m	H-14, H-12		
14	26.96 CH ₂	1,71; 0.99 m	H-13		
15	51.54 CH ₂	1,7; 1,3 m		H-14	
16	72.42 C	----		H-15	
17	30.75 CH ₃	1.34 s			H-7
18	33.36 CH ₃	0.89 s			
19	21.86 CH ₃	0.86 s			
20	13.61 CH ₃	0.99 s		H-5	

Dados de RMN ¹H 400 MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

m=multiplero

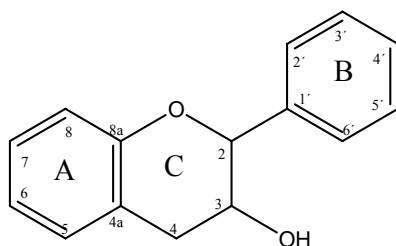
t = triplero

s=simplero

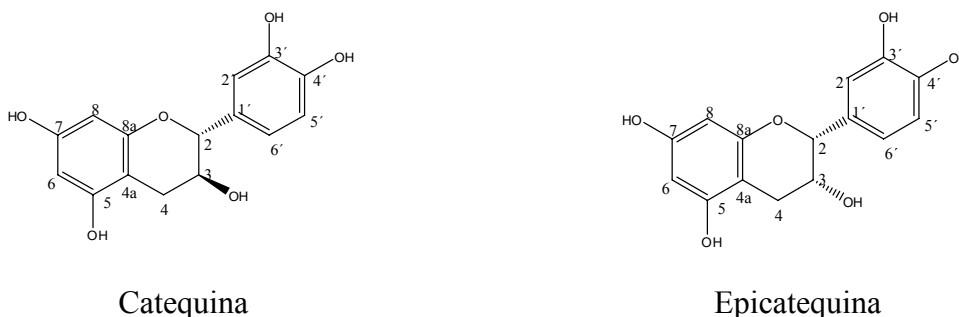
III.5.4 – Identificação dos flavonóides

III.5.4.1 – Identificação dos Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis, também denominados de catequinas, pertencem à classe dos flavanóides, que não possuem o grupo carbonila em C-4 e também a conjugação entre os anéis A e B:



Os espectros de RMN ^1H dos flavan-3-óis são caracterizados pelos hidrogênios alifáticos presentes no anel C, sendo o deslocamento químico destes hidrogênios dependente da estereoquímica e da conformação deste anel. Os dados espectrais das substâncias catequina e epicatequina, por se tratarem de epímeros, são muito semelhantes:



De modo geral, o hidrogênio oximetínico H-2 encontra-se mais desprotegido tanto na epicatequina que possui OH axial em C-3, quanto na catequina que possui OH equatorial em C-3, devido à desproteção adicional do anel B. O H-3eq da epicatequina encontra-se mais desprotegido que o H-3ax da catequina. Os hidrogênios metilênicos benzílicos H-4ax e H-4eq encontram-se mais protegidos em ambas, sendo ligeiramente mais protegidos na catequina. Os demais deslocamentos de hidrogênio dos anéis A e B aromáticos pouco diferem dos demais flavonóides, sendo difícil distinguir algumas vezes entre H-6 e H-8 (MARKAN, 1994). Isto até aparecer as novas técnicas de 2D RMN.

Da mesma forma como nos flavonóides em geral, os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN ^{13}C dos flavan-3-óis podem ser divididos em duas regiões

bem distintas, os C-sp³ C-2, C-3 e C-4 do anel C são registrados em δ abaixo de 90 e os C-sp² em δ acima de 90. Os valores de deslocamento dos C-sp² dependerão da hidroxilação e substituição nos anéis A e B. Já os valores de deslocamento dos C-sp³ dependerão da substituição e funcionalização, assim como da estereoquímica do anel C. A conformação mais estável é geralmente aquela em que o anel B encontra-se em posição equatorial, porém a introdução de um substituinte volumoso em C-3 força o anel B para posição axial. Nos flavan-3-óis a conformação adotada é a de meia-cadeira e o anel B é quase exclusivamente equatorial. Portanto, na epicatequina a 3-OH será axial e na catequina a 3-OH será equatorial. Os deslocamentos de carbono serão então controlados pela orientação do grupo 3-OH. O C-2 oximetínico apresenta deslocamento cerca de 12-15 ppm mais desprotegido que C-3 oximetínico devido ao efeito de desproteção do anel B. (AGRAWAL, 1989).

III.5.4.1.1 – Identificação da substância ALF-31

A substância ALF-31 foi obtida na forma de um sólido amarelo claro amorfo apresentando ponto de fusão 178,2 - 180,6 °C.

O espectro de absorção (de luz) na região do IV, obtido em pastilha de KBr (**Figura 60**), revelou a presença de bandas de absorção de estiramento e deformação para grupos hidroxila (3505 e 3458 cm⁻¹) e de sistema aromático (1626, 1521, 1469, 1441 e 1389 cm⁻¹), (sugerindo a presença destes grupos).

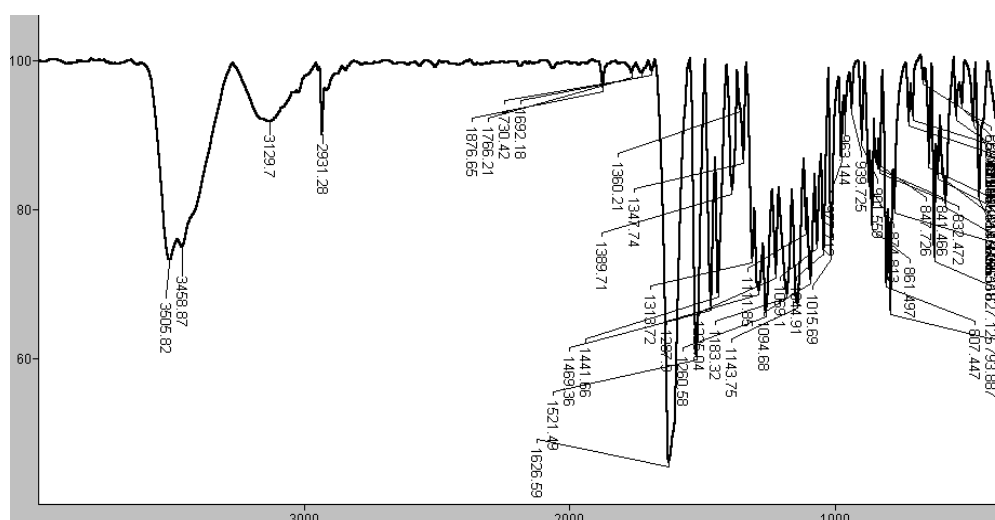


Figura 60: Espectro da substância ALF-31 na região do Infra-vermelho

Em uma primeira visualização geral o espectro de RMN de ^1H dessa substância (**Figuras 61-62**) revelou a presença de sinais característicos de flavan-3-óis:

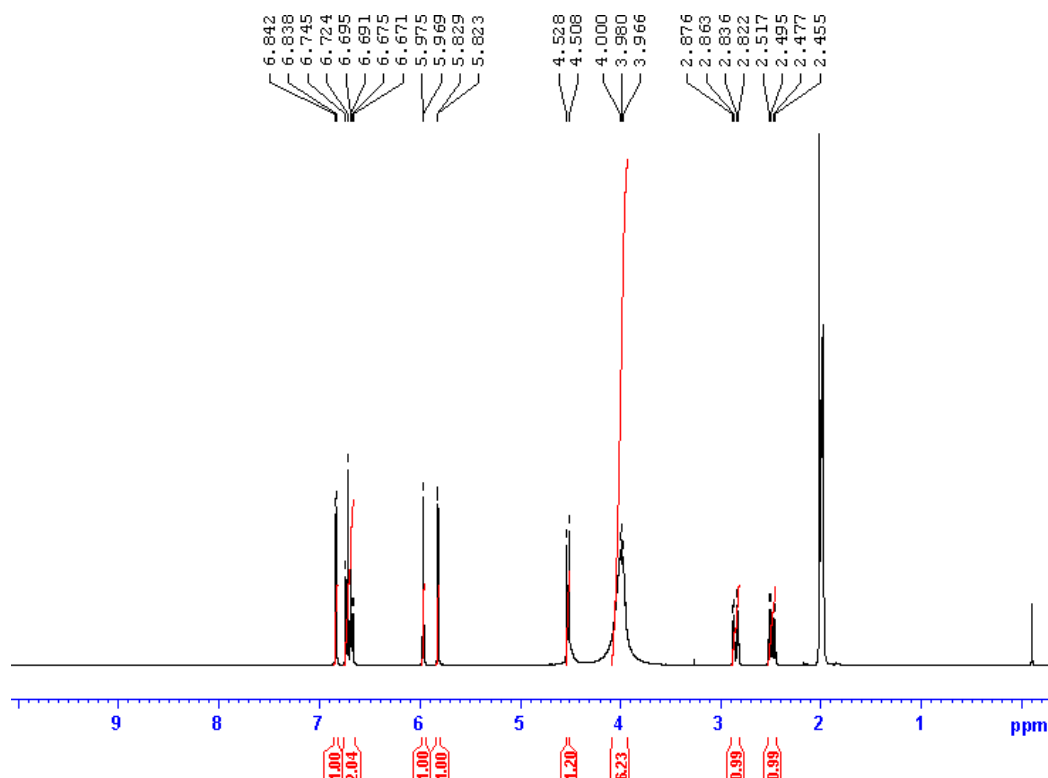


Figura 61: Espectro de RMN ^1H em CD_3COCD_3 , 400 MHz, do composto ALF-31

Na análise do espectro de RMN ^1H do ALF-31 observaram-se quatro sinais na região de hidrogênios alifáticos: dois duplos dupletos integrado para um hidrogênio cada, em δ 2,48 ($J = 8,45$ e $16,27\text{Hz}$) e $2,85$ ($J = 5,64$ e $16,03\text{Hz}$), característicos de hidrogênios de grupo metilênico benzílico ligado a carbono oximetínico; um multipletto em δ 3,98, atribuído a um hidrogênio ligado a carbono oximetínico e um dupletto, integrado para um hidrogênio, em δ 4,52 (d ; $J = 7,5$ Hz), característico de hidrogênio oximetínico-benzílico. Esse conjunto de sinais é típico do anel C de flavan-3-ol (**Figura 62**).

Na região de hidrogênios em anel aromáticos, observaram-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em δ 6,84 (d , $J = 1,8$ Hz, 1H), 6,8 (dd , $J = 8,1$ e $1,8$ Hz, 1H) e 6,74 (d , $J = 8,1$ Hz, 1H), atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios 2', 6' e 5' do anel B de um flavan-3-ol, bem como dois dupletos *meta* relacionados ($J = 2,2$ Hz, 1H cada) em δ 5,96 e 5,82, atribuídos aos hidrogênios 6 e 8 do anel A (**Figura 62**).

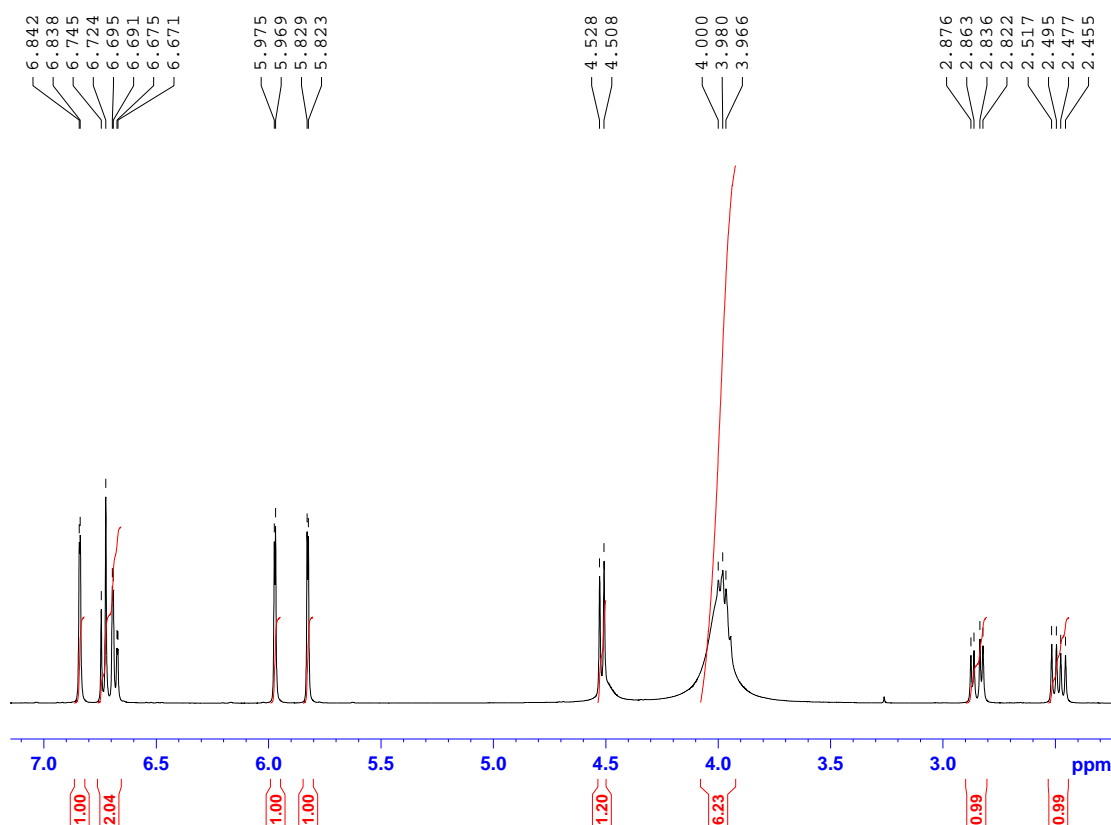


Figura 62: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3COCD_3 , 400 MHz, do composto ALF-31

Estes acoplamentos foram todos confirmados através da análise do espectro COSY ^1H x ^1H (Figuras 63-64).

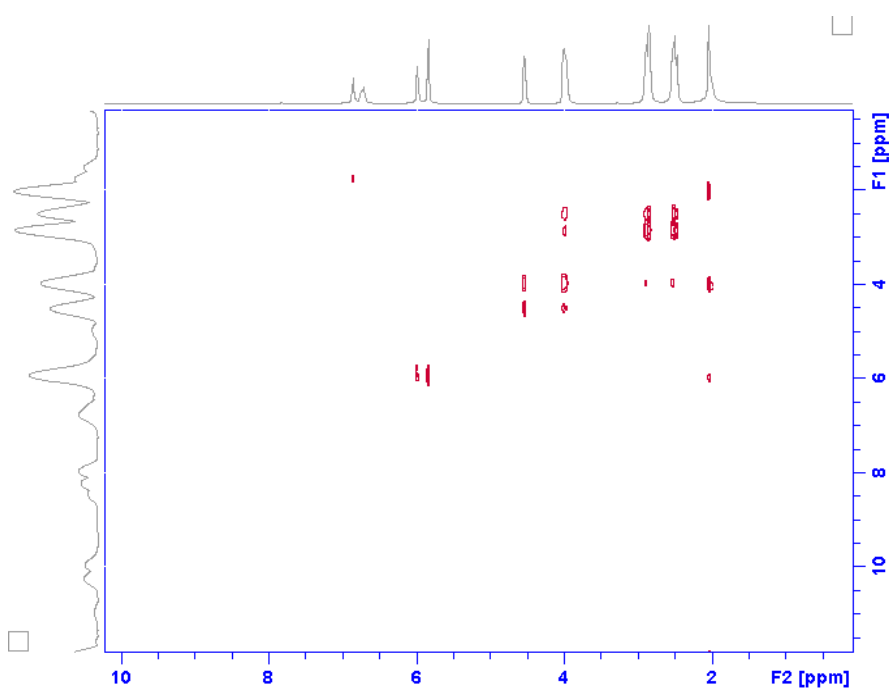


Figura 63: Espectro COSY em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-31

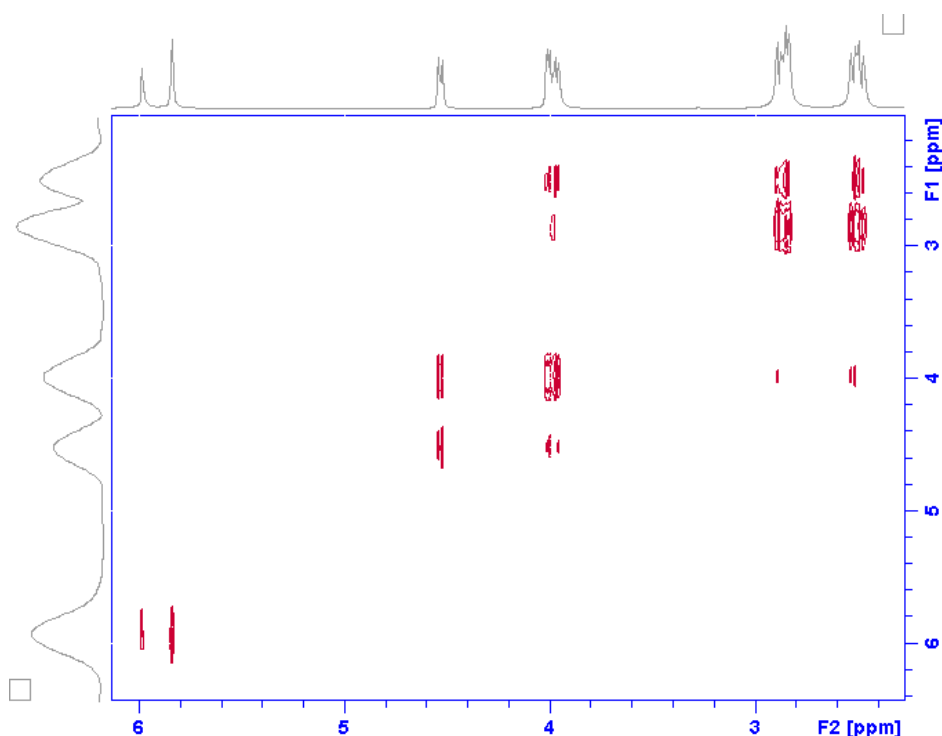


Figura 64: Expansão do espectro COSY em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-31

A análise dos espectros de RMN ^{13}C , DEPT's 90° e 135° do ALF-31, em conjunto com o espectro HSQC, bem como os demais bidimensionais, permitiu atribuir os 15 sinais observados aos quinze carbonos da estrutura da catequina, em destaque para o sinal em δ 82,3, que é atribuído ao carbono oximetínico-benzílico C-2, sendo este um dos sinais mais importantes para distinguir a catequina do seu epímero em C-3, a epicatequina, que exibe para C-2 um sinal em aproximadamente δ 79,1 no mesmo solvente (**Figuras 65-70**).

Esta diferença epimérica está relacionada ao controle dos deslocamentos de carbono pela orientação do grupo 3-OH, onde na epicatequina a 3-OH encontra-se em axial e na catequina a 3-OH encontra-se em equatorial. Lembrando que nos flavan-3-óis a conformação adotada é a de meia-cadeira e o anel B estará quase exclusivamente equatorial.

Cap. III. Resultados e Discussão

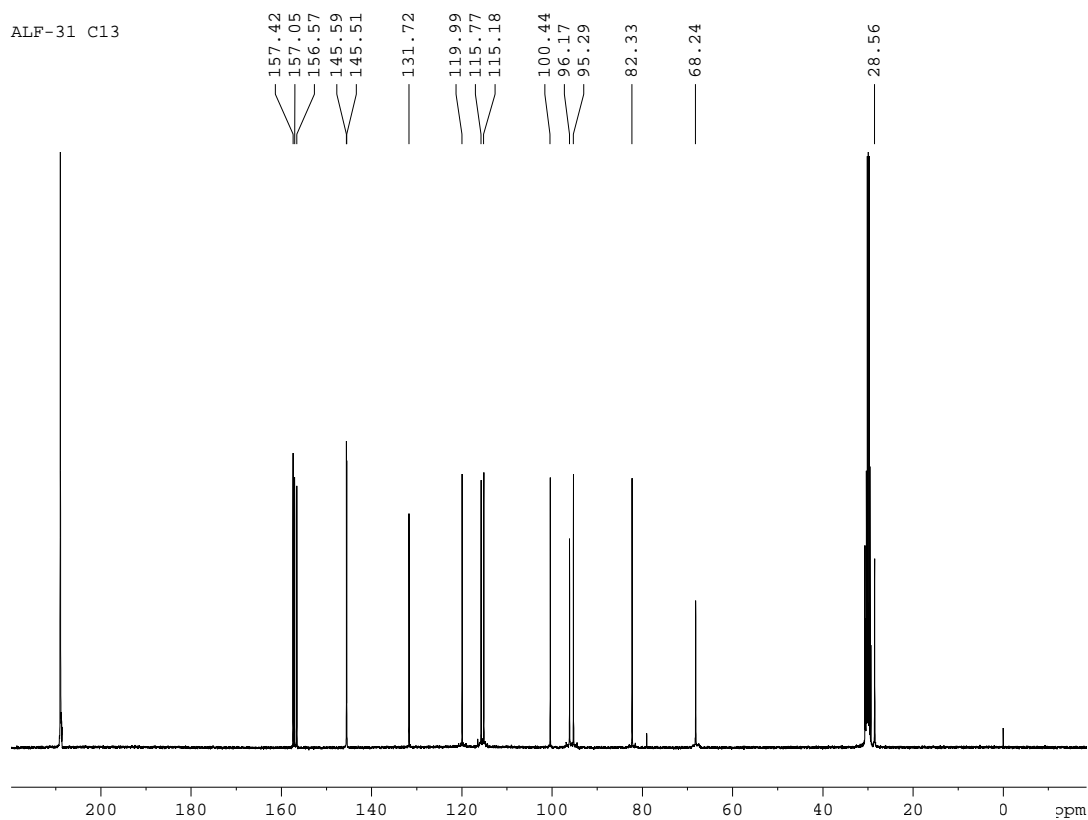


Figura 65: Espectro de RMN ^{13}C em CD_3COCD_3 , 100 MHz, do composto ALF-31

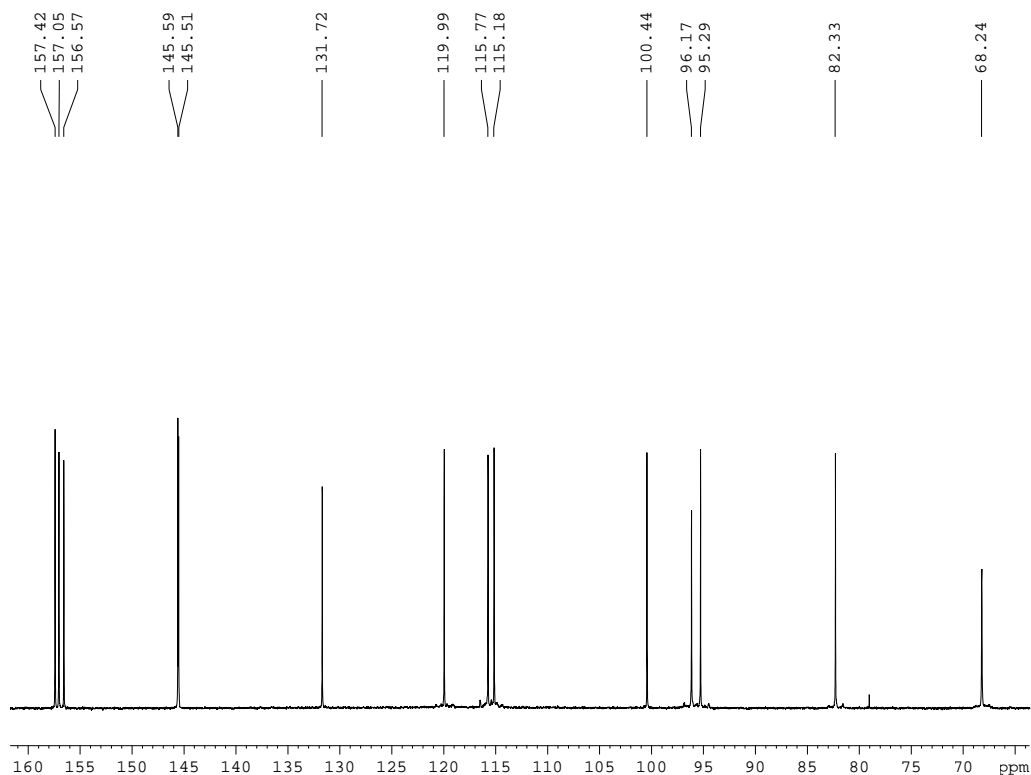


Figura 66: Expansão do espectro de RMN ^{13}C em CD_3COCD_3 , 100 MHz, do composto ALF-31

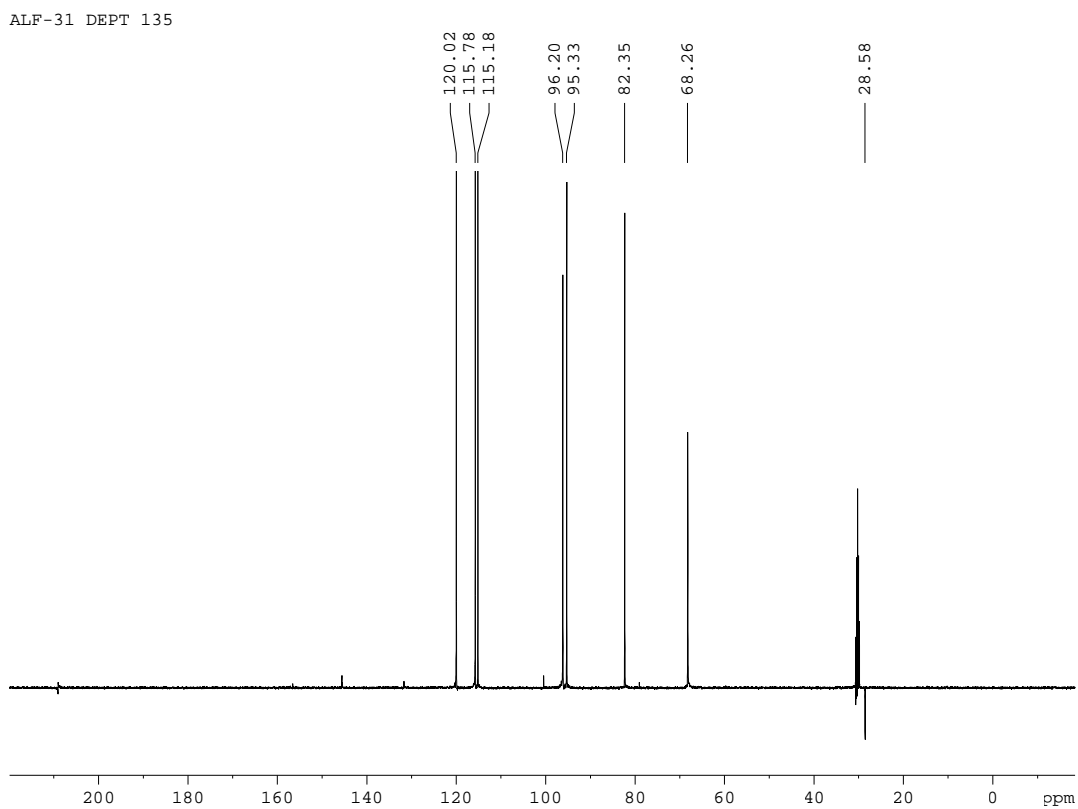


Figura 67: Espectro DEPT 135° em CD_3COCD_3 , 100 MHz, do composto ALF-31

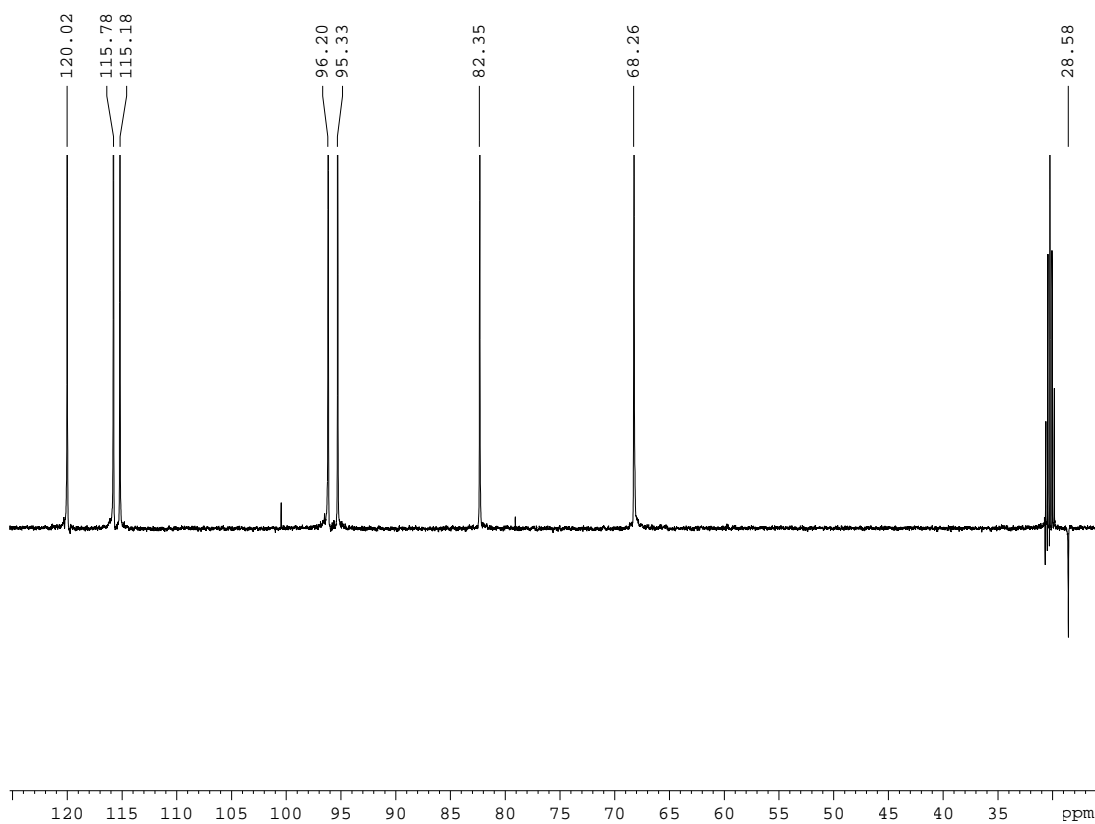


Figura 68: Expansão do espectro DEPT 135° em CD_3COCD_3 , 100 MHz, do composto ALF-31

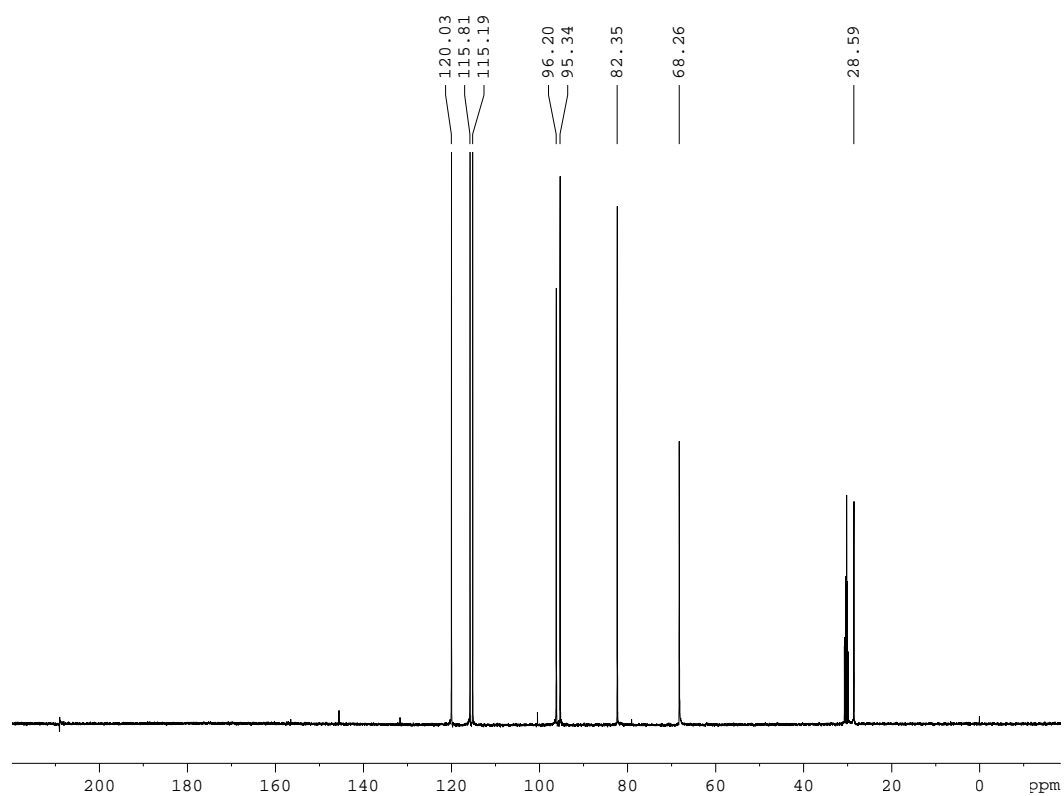


Figura 69: Espectro DEPT 90° em CD₃COCD₃, 100 MHz, do composto ALF-31

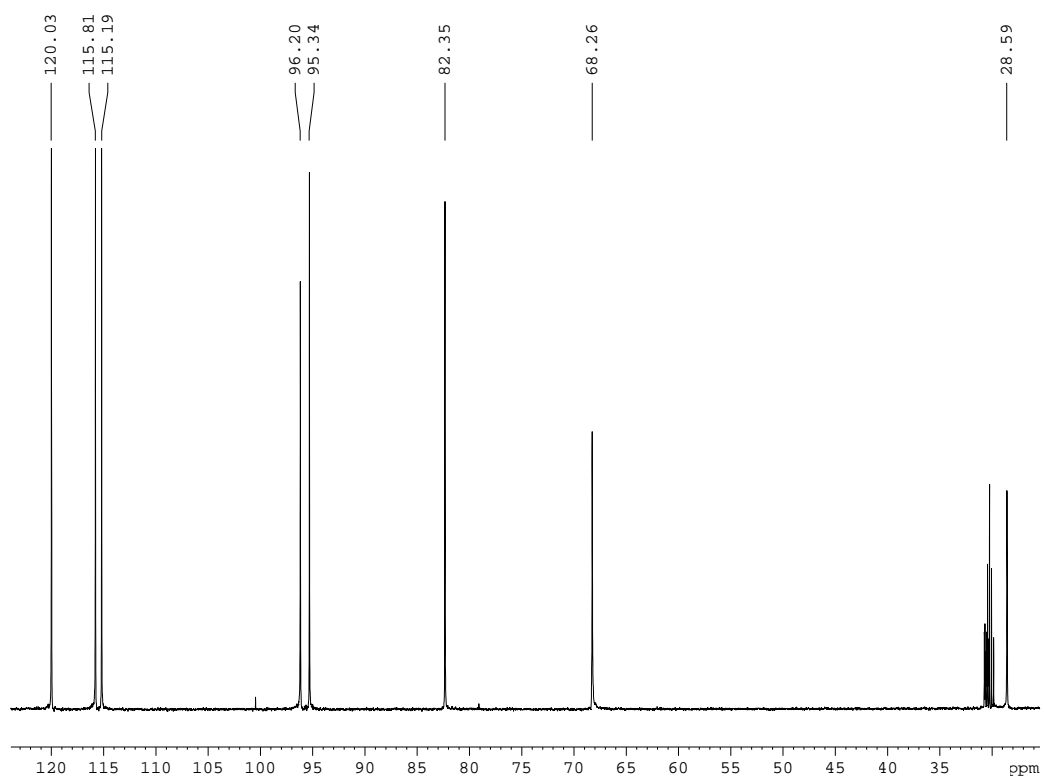


Figura 70: Expansão do espectro DEPT 90° em CD₃COCD₃, 100 MHz, do composto ALF-31

A análise do espectro HSQC do composto ALF-31 também foi importante para atribuir, com precisão, os sinais em δ 115,7 e 115,2 aos carbonos C-5' e C-2', respectivamente, visto que mostraram correlações 1J com os sinais em δ 6,74 e 6,83, os quais haviam sido atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-5' e H-2'. As demais correlações diretas dos sinais dos prótons com os seus respectivos carbonos também foram observadas (Figuras 71-72).

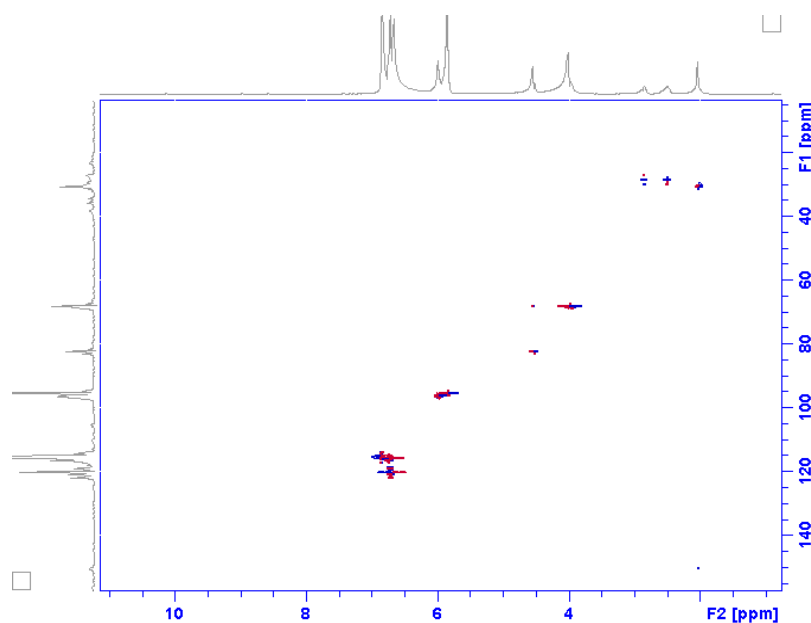


Figura 71: Mapa de contornos HSQC em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-31

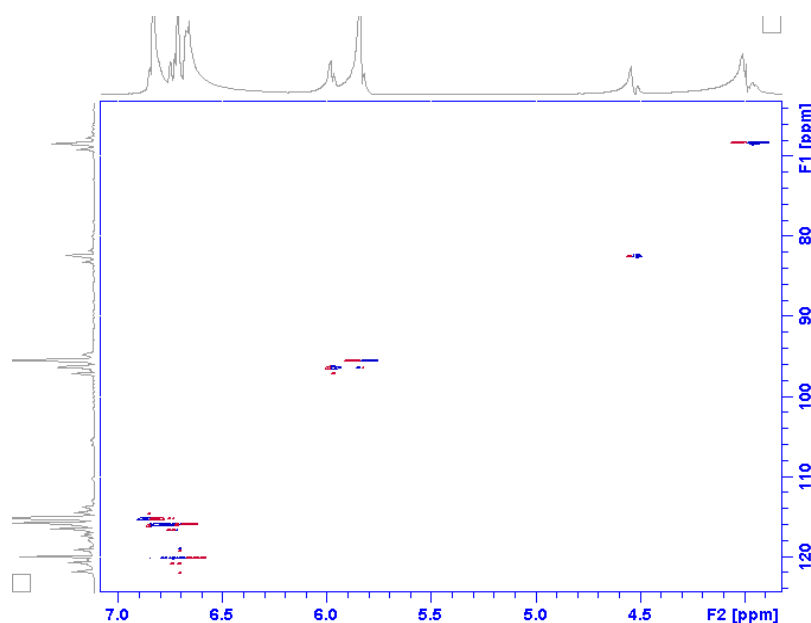


Figura 72: Expansão do mapa de contornos HSQC em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-31

As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 74**) entre o carbono em δ 82,35 (C-2) e os hidrogênios em δ 6,84 (H-2') e δ 6,80 (H-6'), entre o carbono aromático em δ 100,34 (C-4a) e os hidrogênios em δ 5,96 (H-6); 3,98 (H-3); 2,85 (H-4) e 2,48 (H-4) e ainda entre o carbono aromático em δ 157,05 (C-8a) e os hidrogênios em δ 5,82 (H-8); 2,85 (H-4) e 2,48 (H-4) estão de acordo com a estrutura proposta para ALF-31 (**Figuras 73-78, Tabela 23**):

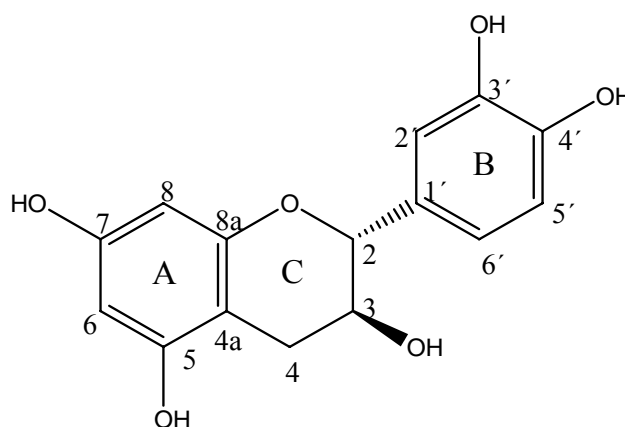


Figura 73: Catequina

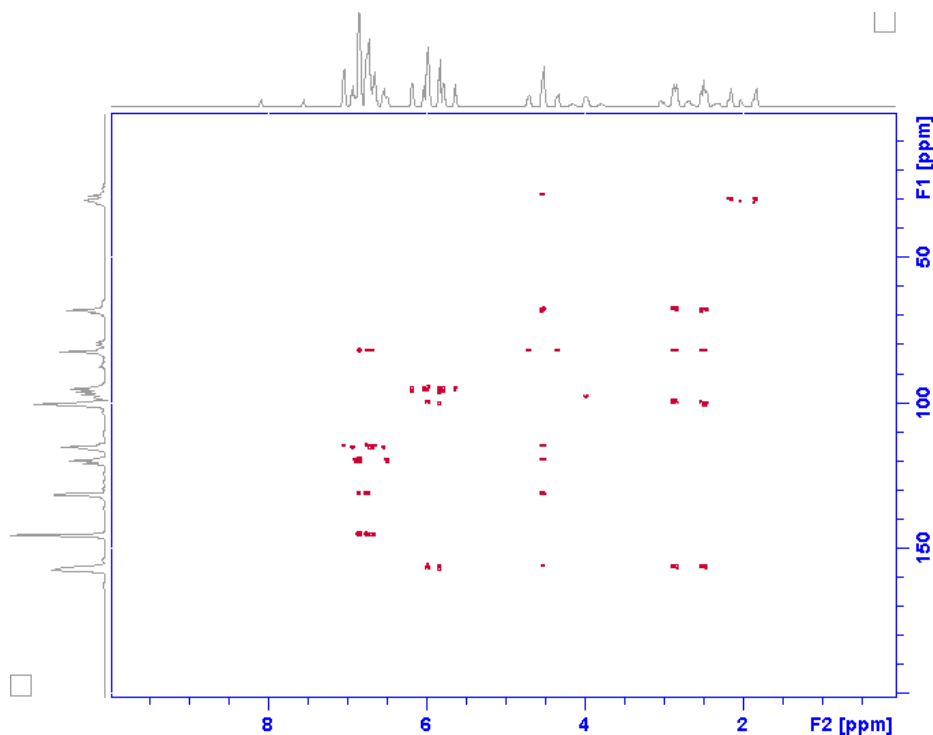


Figura 74: Mapa de contornos HMBC em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-31

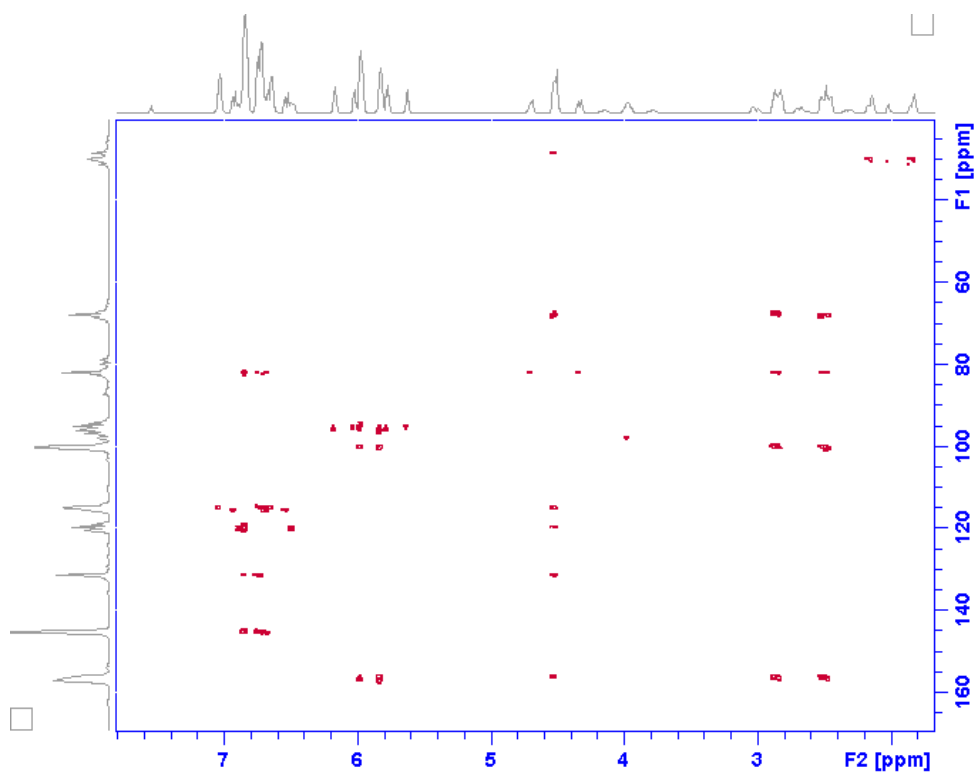


Figura 75: Expansão do mapa de contornos HMBC em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-31

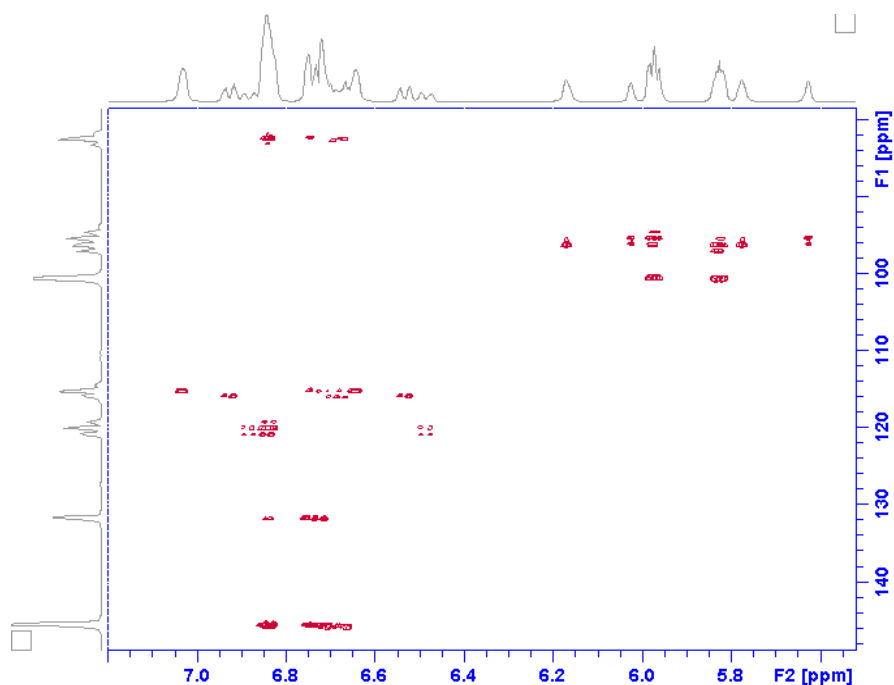


Figura 76: Expansão do mapa de contornos HMBC em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-31

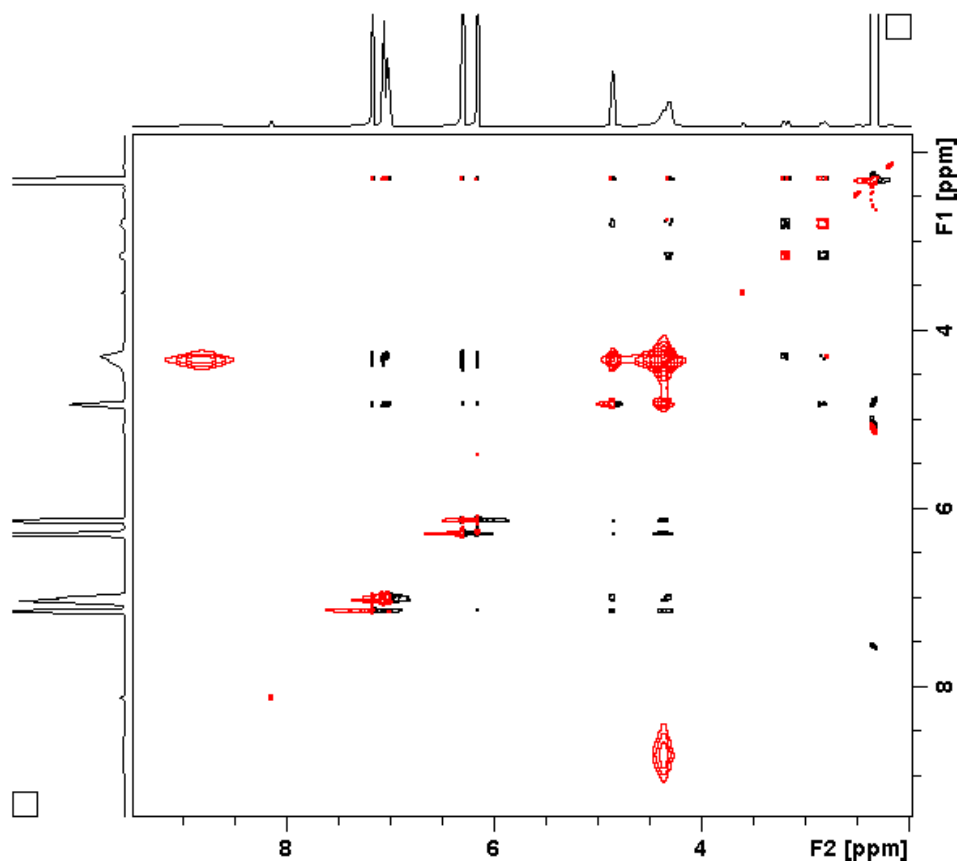


Figura 77: Mapa de contornos NOESY em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-31

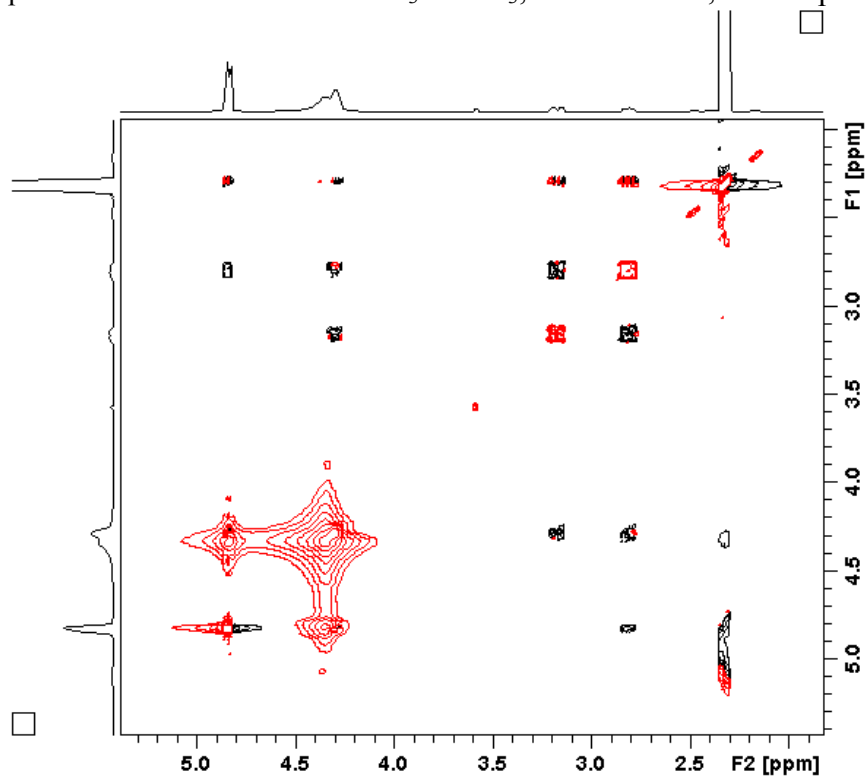


Figura 78: Expansão do mapa de contornos NOESY em CD_3COCD_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-31

O sinal positivo do $[\alpha]_D^{25}=+15,0^\circ$, MeOH confirmou a estereoquímica como sendo *2R,3S*, tratando-se portanto da (+)-catequina.

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 79**) indicou a massa molecular 290 u, com a fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_6$ sugerindo tratar-se da catequina, em conformidade com outras técnicas de identificação.

O fragmento m/z 139 sugere a presença de dois grupos hidroxila no anel **A**, como também o pico em m/z 139 sugere uma clivagem β ao anel **A** com a perda do fragmento m/z 152 (**Esquema 4**).

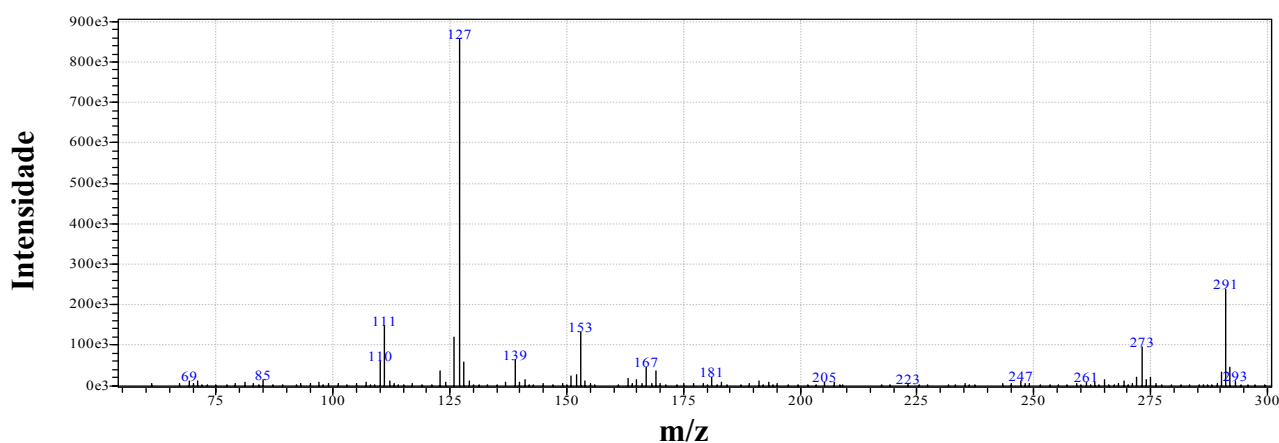
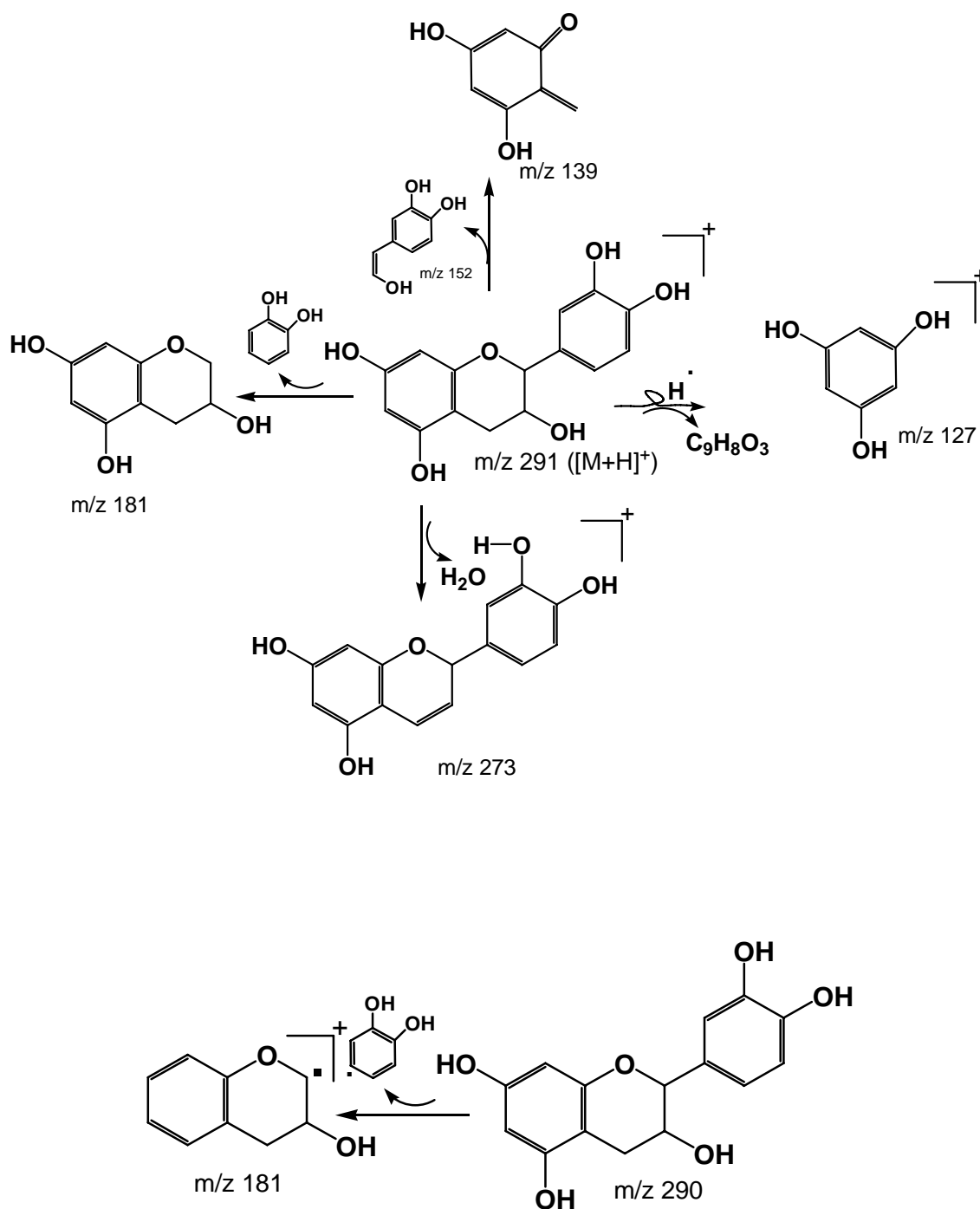


Figura 79: Espectro de massas da substância ALF-31.



Esquema 4: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-31

Tabela 23: RMN do composto ALF-31 em CD₃COCD₃, deslocamento em δ .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	82,35 CH	4,52 d	7,5	3,98	6,8; 6,84	2,48; 3,98; 6,8; 6,84
3	68,26 CH	3,98 m	-	2,48; 2,85; 4,52	2,48; 2,85	2,48; 4,52; 6,8; 6,84
4	28,59 CH ₂	2,85 dd 2,48 dd	5,64; 16,03 8,45; 16,27	2,48; 3,98 2,85; 3,98	4,52	2,48; 3,98; 4,52 2,85
4a	100,34 C	-	-	-	2,48; 2,85; 3,98; 5,96	-
5	156,57 C	-	-	-	2,48; 2,85; 5,96	-
6	96,20 CH	5,96d	2,2	-	5,82	-
7	157,42 C	-	-	-	5,82; 5,96	-
8	95,34 CH	5,82d	2,2	-	5,96	-
8a	157,05 C	-	-	-	2,48; 2,85; 5,82	-
1'	131,72 C	-	-	-	6,74; 6,84	-
2'	115,19 CH	6,84 d	1,8	-	4,52; 6,8	3,98; 4,52
3'	145,59 C	-	-	-	6,74; 6,84	-
4'	145,51 C	-	-	-	6,74; 6,84	-
5'	115,81 CH	6,74 d	8,1	6,8	6,8	-
6'	120,03 CH	6,8 dd	1,64; 8,14	6,74	4,52; 6,84	3,98; 4,52

Dados de RMN ¹H 400 MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

m=multipleteo
dd=duplo dupleteo
d= dupleteo
s=simpleto

III.5.4.1.2 – Identificação da substância ALF-20

A substância ALF-20 foi obtida na forma de um sólido bege claro amorfo apresentando ponto de fusão 139- 140 °C

O espectro de absorção na região do IV, obtido em solução de KBr, revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila (3505 e 3458 cm^{-1}) e bandas características de sistema aromático (1626, 1521, 1469, 1441 e 1389 cm^{-1}).

Em uma primeira visualização geral o espectro de RMN de ^1H dessa substância (**Figura 80**) revelou a presença de sinais característicos de flavan-3-óis:

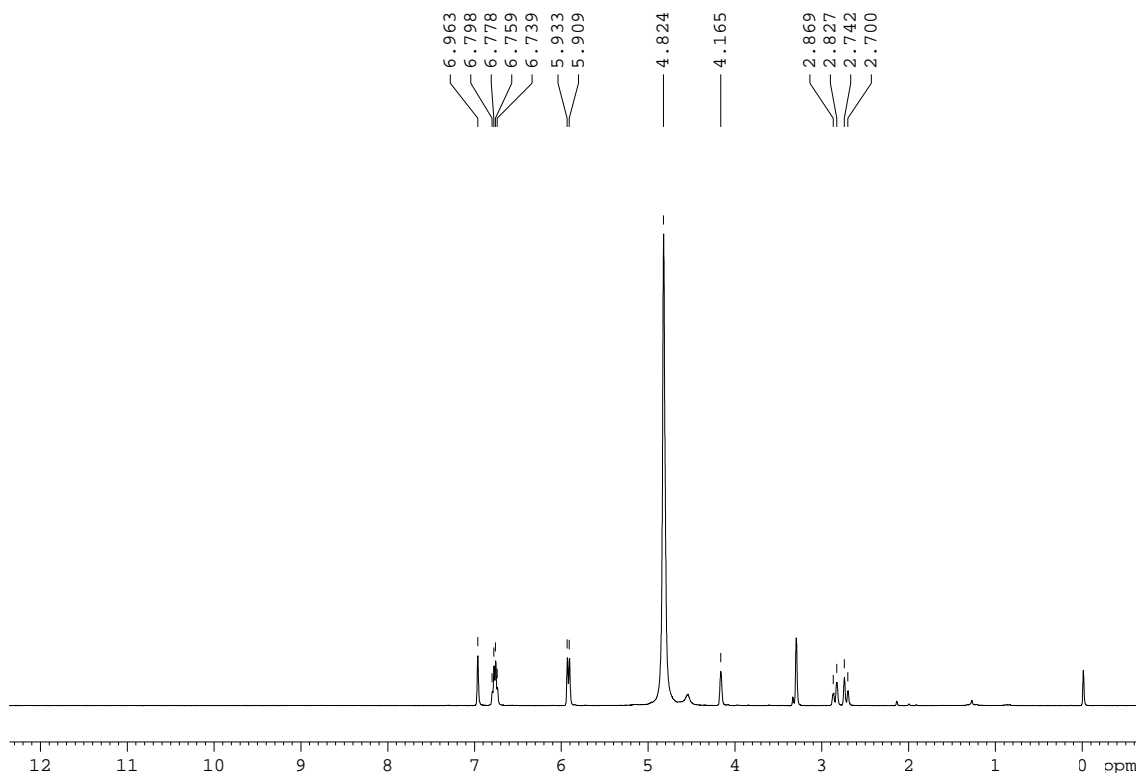


Figura 80: Espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-20

Na análise do espectro de RMN ^1H do ALF-20 observaram-se quatro sinais na região de hidrogênios alifáticos: dois duplos dupletos integrado para um hidrogênio cada, em δ 2,85 ($J = 4,5$ e 16,66Hz) e 2,71 ($J = 2,4$ e 16,42Hz), característicos de hidrogênios de grupo metilênico ligado a carbono oximetínico e benzílicos; um simpleto em δ 4,16, atribuído a um hidrogênio ligado a carbono oximetínico e um simpleto, integrado para um hidrogênio, em δ

4,82, característico de hidrogênio oximetínico-benzílico. Esse conjunto de sinais é típico do anel C de flavan-3-ol.

Na região de hidrogênios em anel aromáticos, observaram-se três sinais que caracterizam um sistema de acoplamento AMX em δ 6,96 (*d*, $J = 1,2$ Hz, 1H), 6,76 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H) e 6,79 (*dd*, $J = 8,1$ e $1,2$ Hz, 1H), atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios 2', 5' e 6' do anel B de um flavan-3-ol, bem como dois dupletos *meta* relacionados ($J = 1,8$ Hz, 1H cada) em δ 5,93 e 5,91, atribuídos aos hidrogênios 6 e 8 do anel A (**Figuras 81-82**).

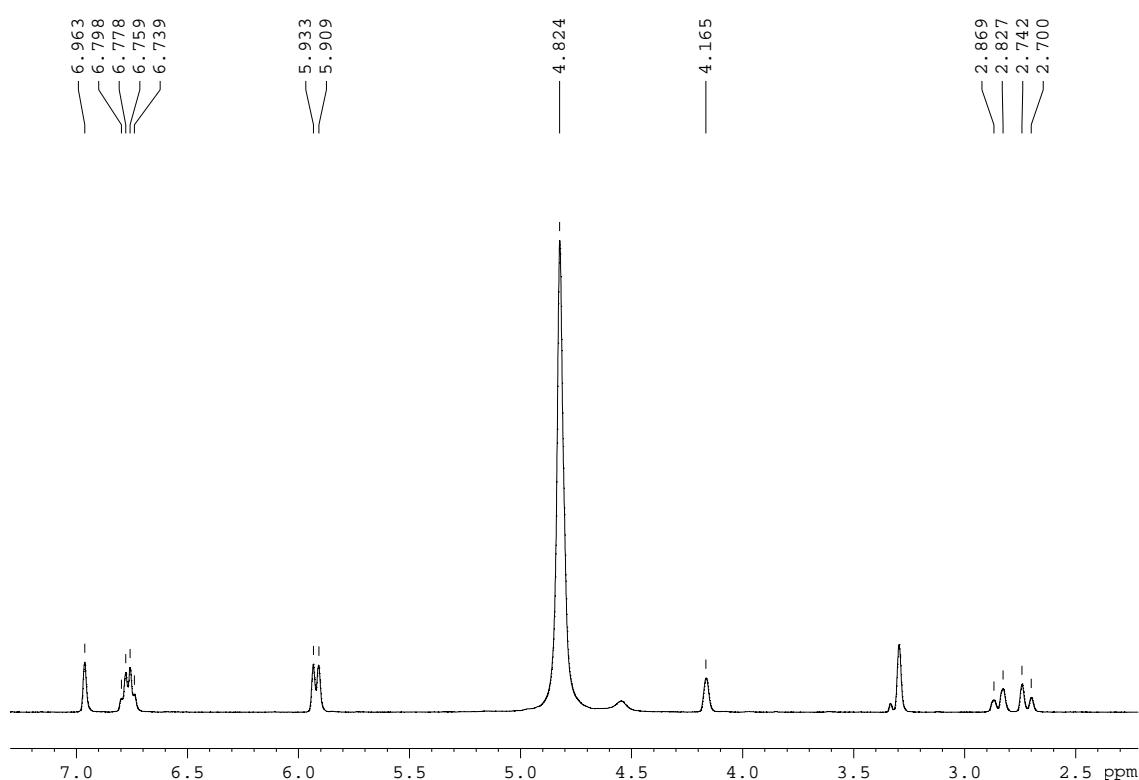


Figura 81: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-20

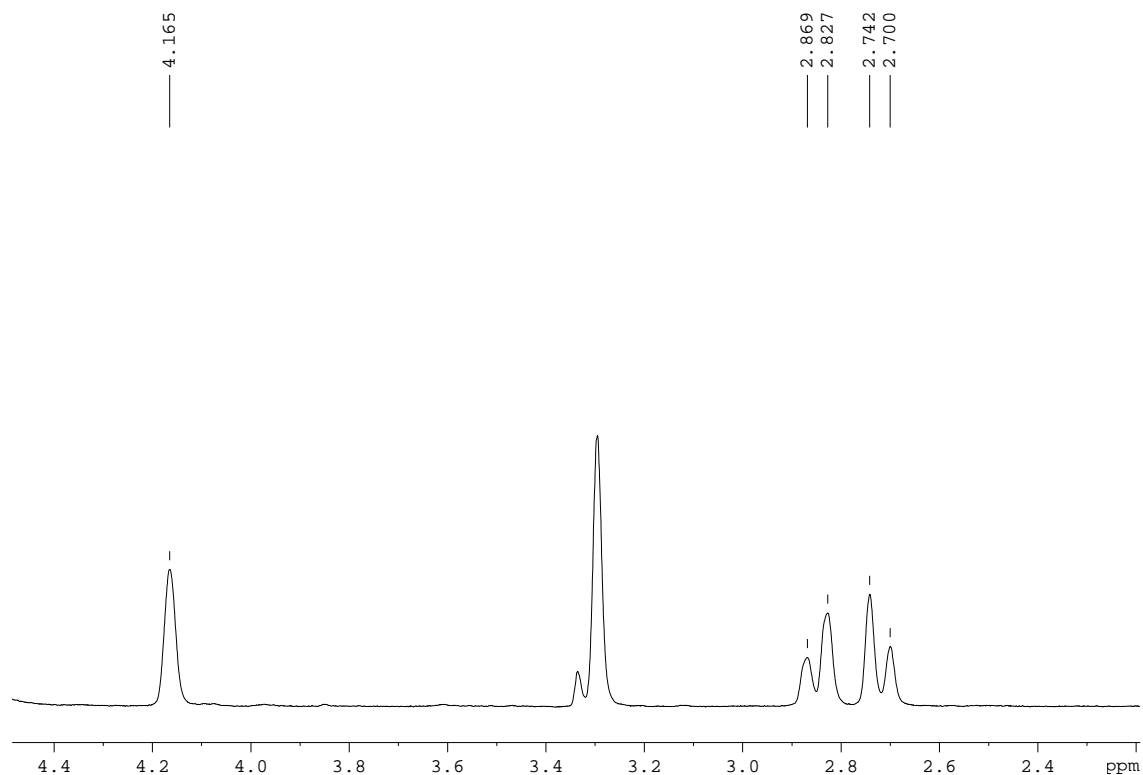


Figura 82: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-20

Estes acoplamentos foram todos confirmados através da análise do espectro COSY ^1H x ^1H (Figuras 83-84).

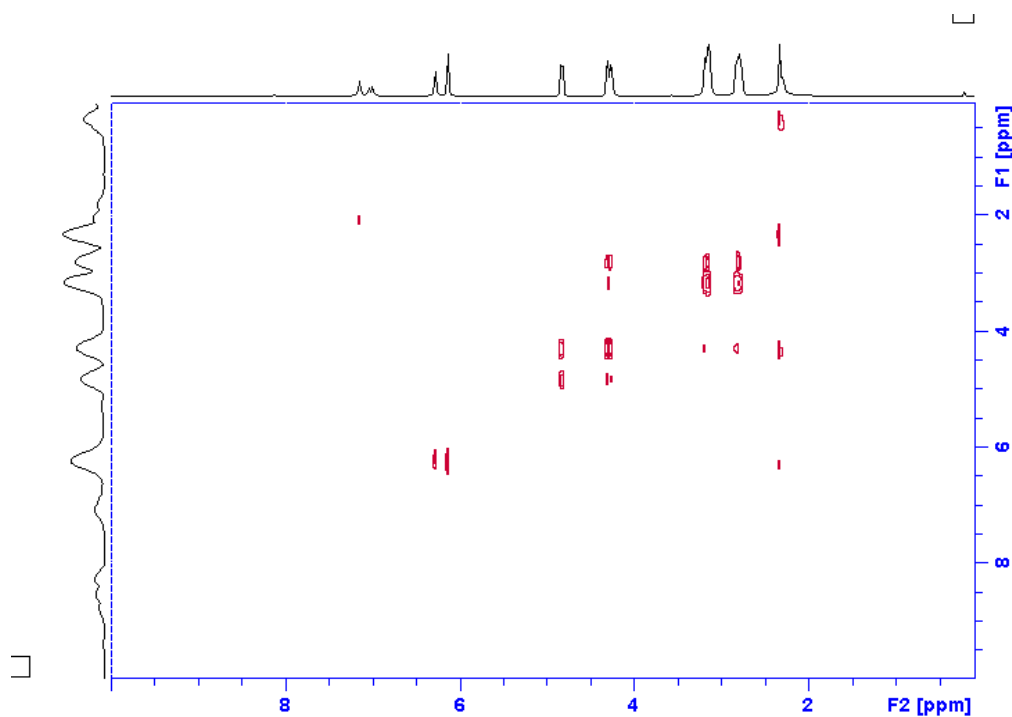


Figura 83: Mapa de contornos COSY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-20

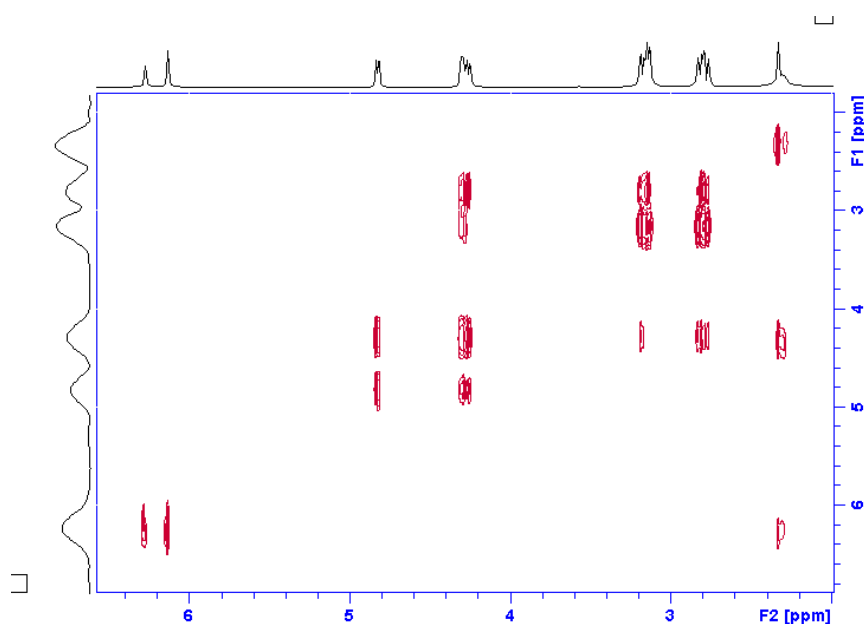


Figura 84: Expansão do mapa de contornos COSY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-20

A análise do espectro de RMN ^{13}C e DEPT 90° e 135° do ALF-20, em conjunto com o espectro HSQC, bem como os demais espectros bidimensionais, permitiu atribuir os 15 sinais observados aos quinze carbonos da estrutura da epicatequina, em destaque para o sinal em δ 79,3, que é atribuído ao carbono oximetínico-benzílico C-2, sendo este um dos sinais mais importantes para distinguir a catequina do seu epímero em C-3, a epicatequina, que exibe para C-2 um sinal em aproximadamente δ 82,1, no mesmo solvente (**Figuras 85-90**).

Os dados bidimensionais do mapa de contornos COSY (**Figura 83-84**) indicam um acoplamento entre os sinais dos hidrogênios metilênicos e entre esses e o sinal do hidrogênio em δ 4,16 (ligado ao carbono oxigenado em δ 66,90). Esse último correlaciona ainda com o hidrogênio em δ 4,82 (ligado ao carbono oxigenado em δ 79,30).

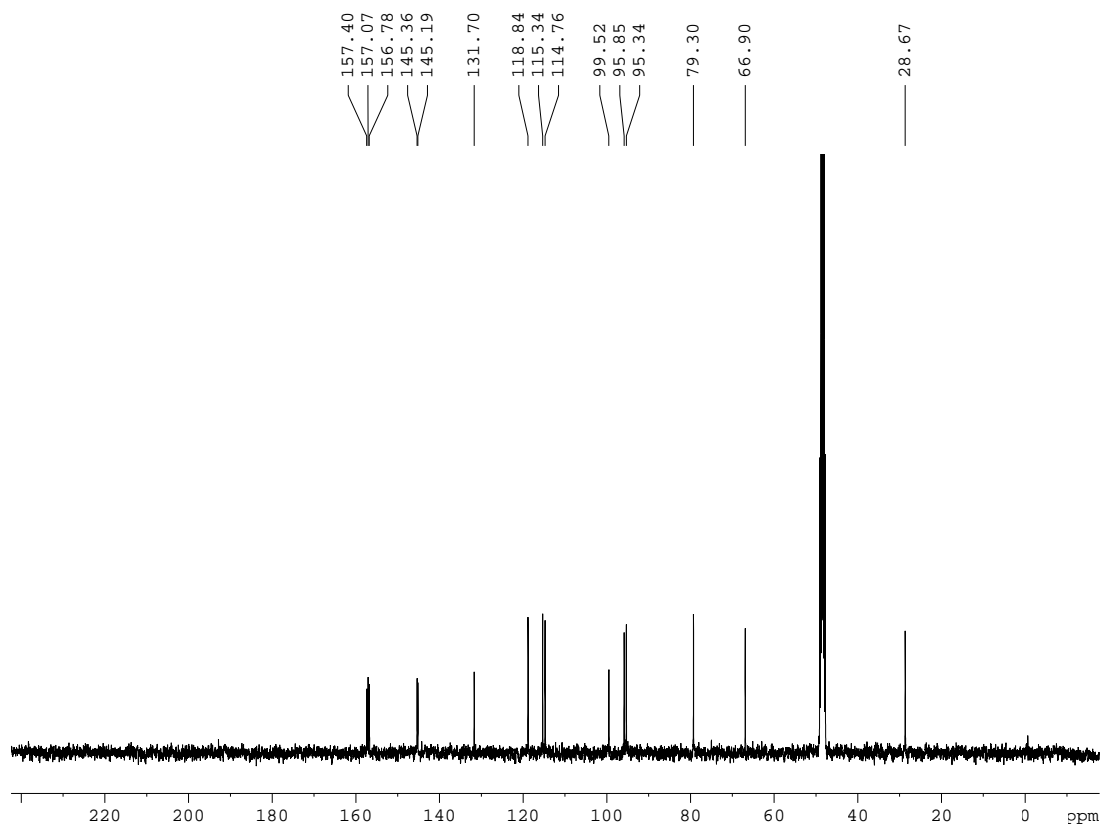


Figura 85: Espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD , 100 MHz, do composto ALF-20

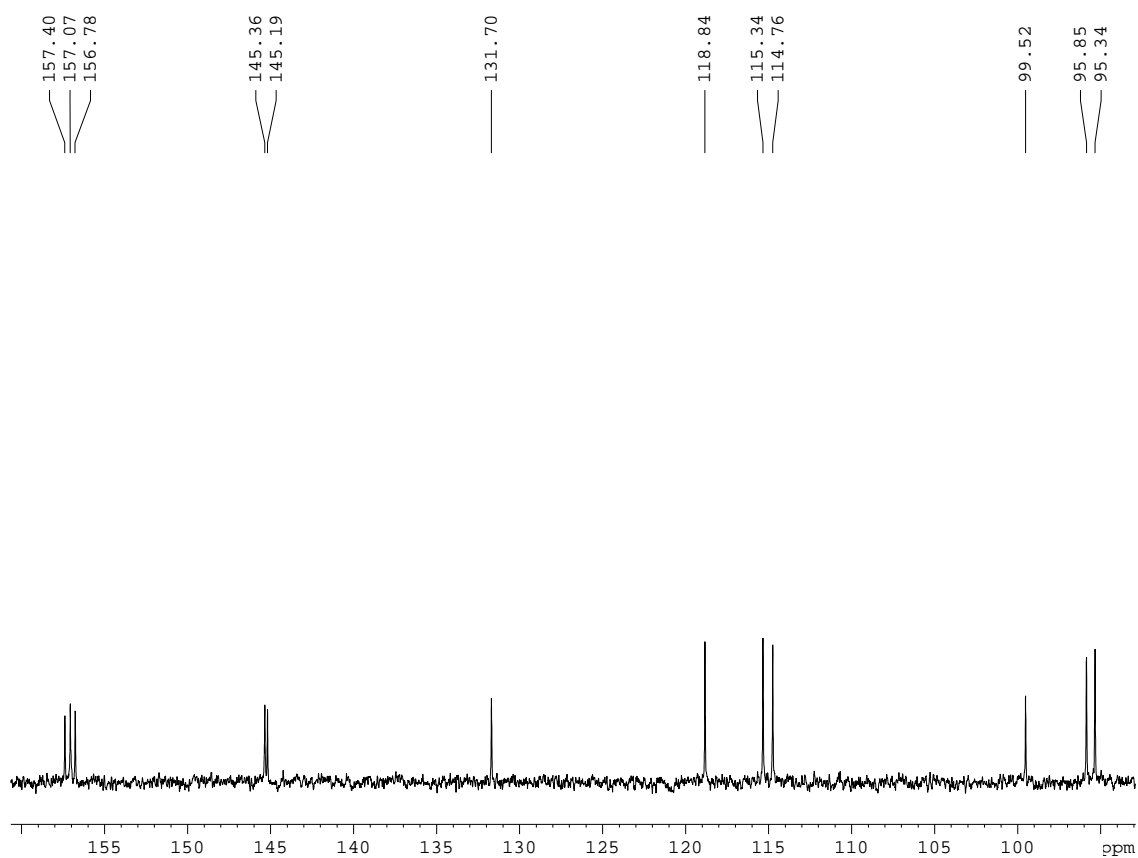


Figura 86: Expansão do espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD , 100 MHz, do composto ALF-20

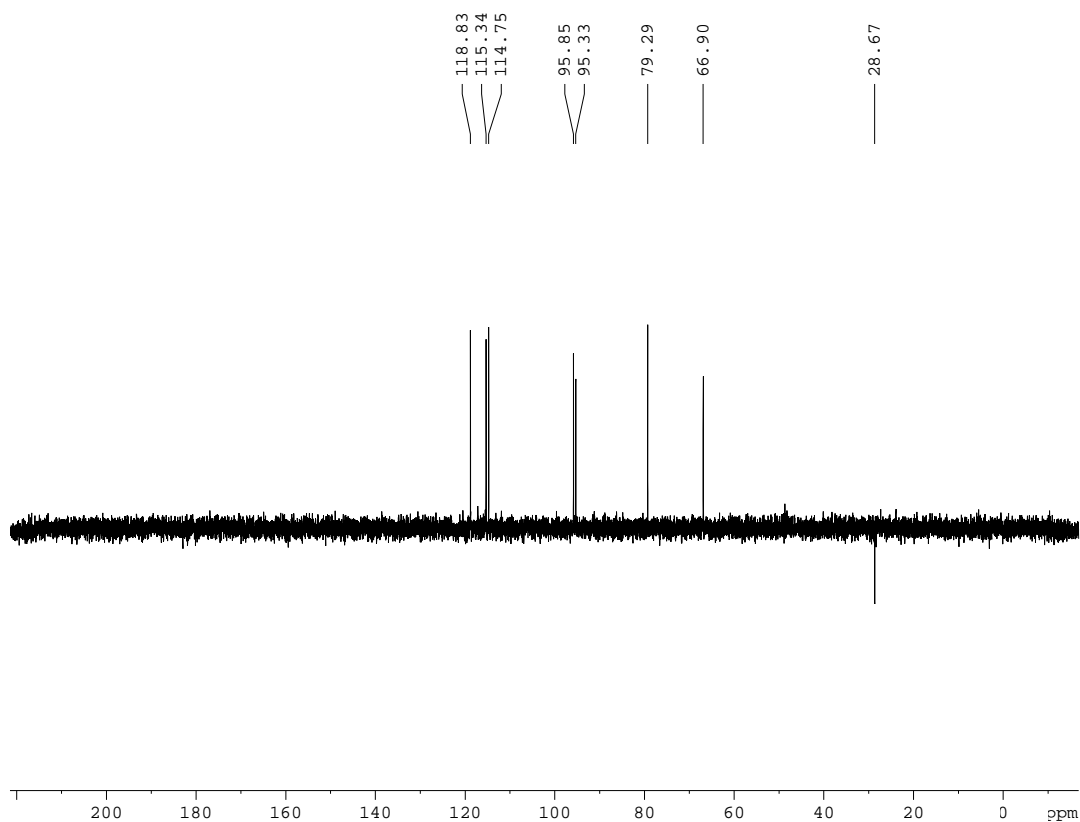


Figura 87: Espectro DEPT 135° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-20

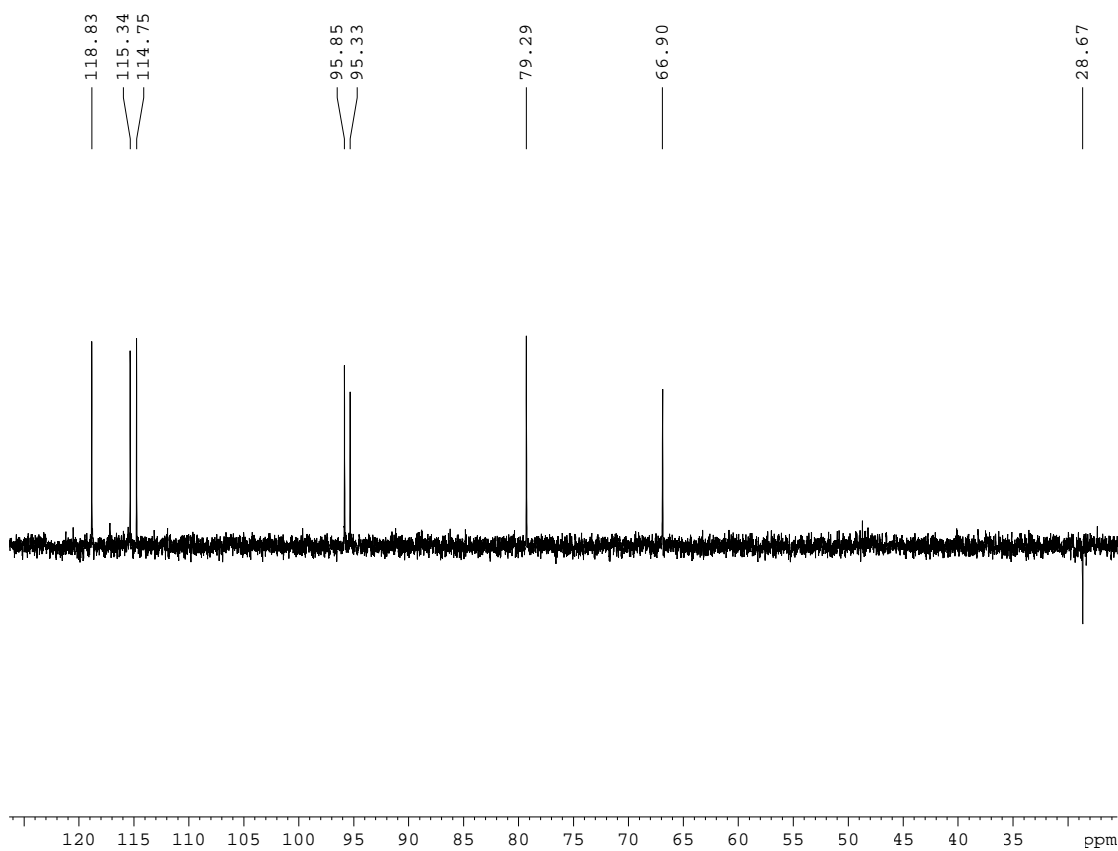


Figura 88: Expansão do espectro DEPT 135° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-20

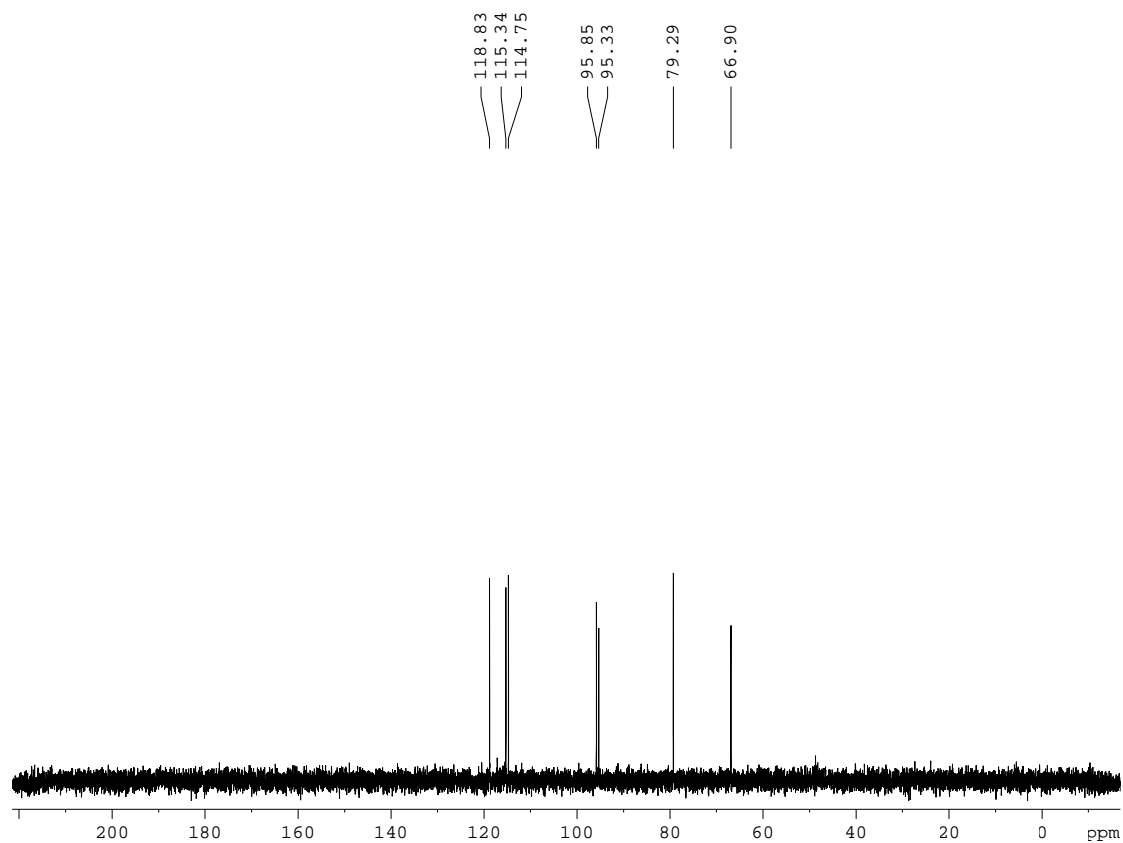


Figura 89: Espectro DEPT 90° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-20

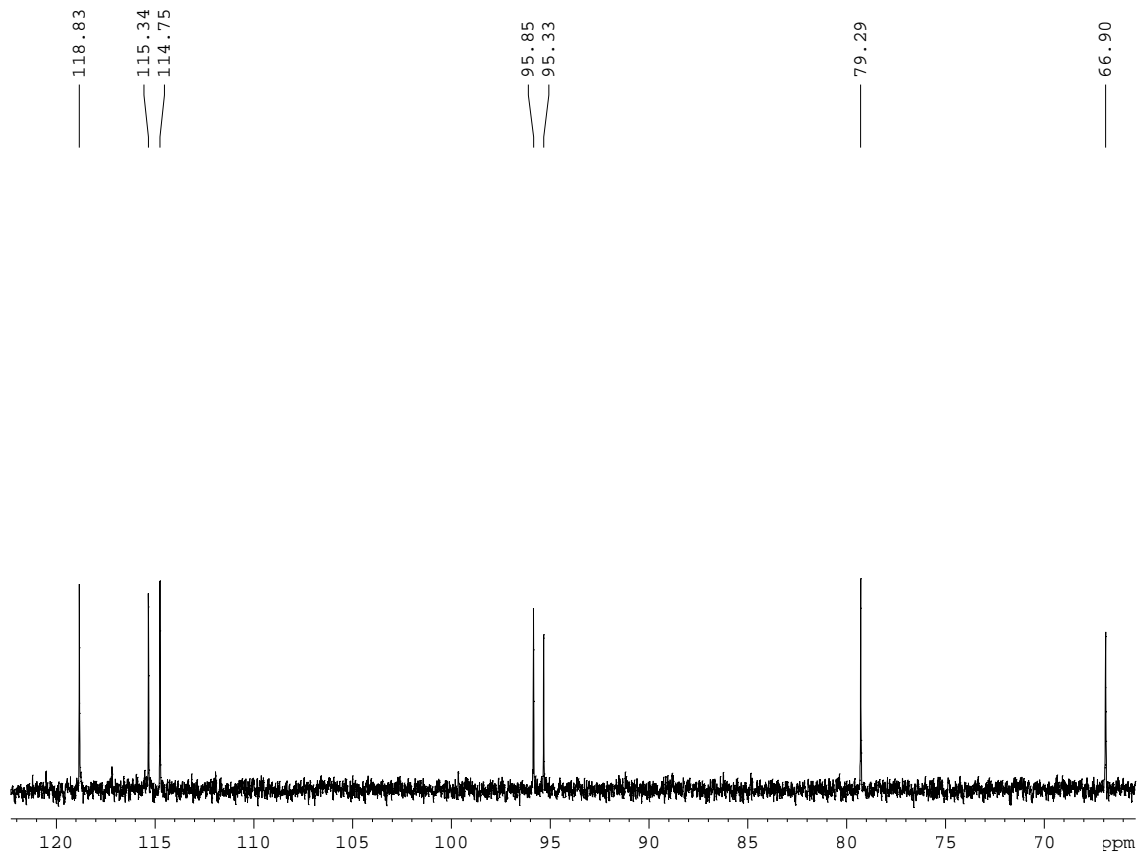


Figura 90: Expansão do espectro DEPT 90° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-20

A análise do espectro HSQC do composto ALF-20 também foi importante para atribuir, com precisão, os sinais em δ 115,3 e 114,7 aos carbonos C-5' e C-2', respectivamente, visto que mostraram correlações 1J com os sinais em δ 6,76 e 6,96, os quais haviam sido atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-5' e H-2'. Demais correlações diretas dos sinais dos prótons com os seus respectivos carbonos também foram observadas (Figuras 91-92).

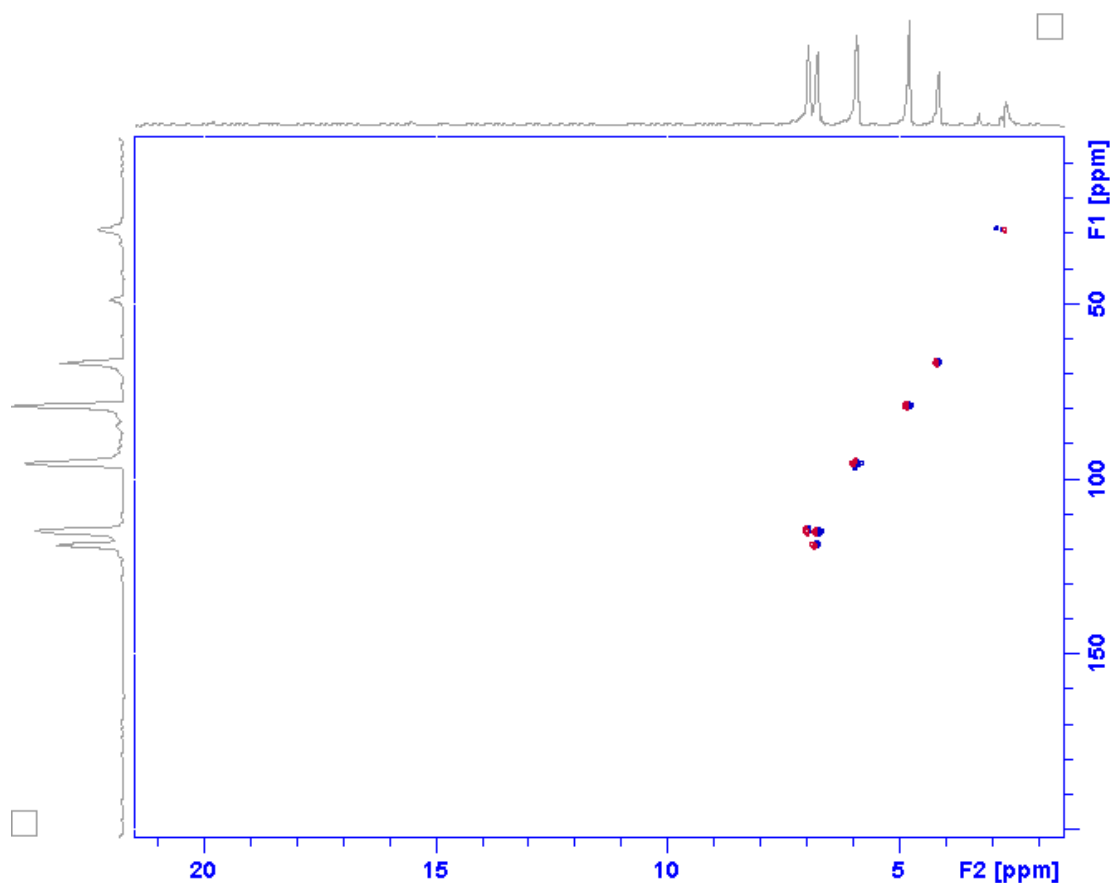


Figura 91: Mapa de contornos HSQC em CD₃OD, ¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz, do composto ALF-20

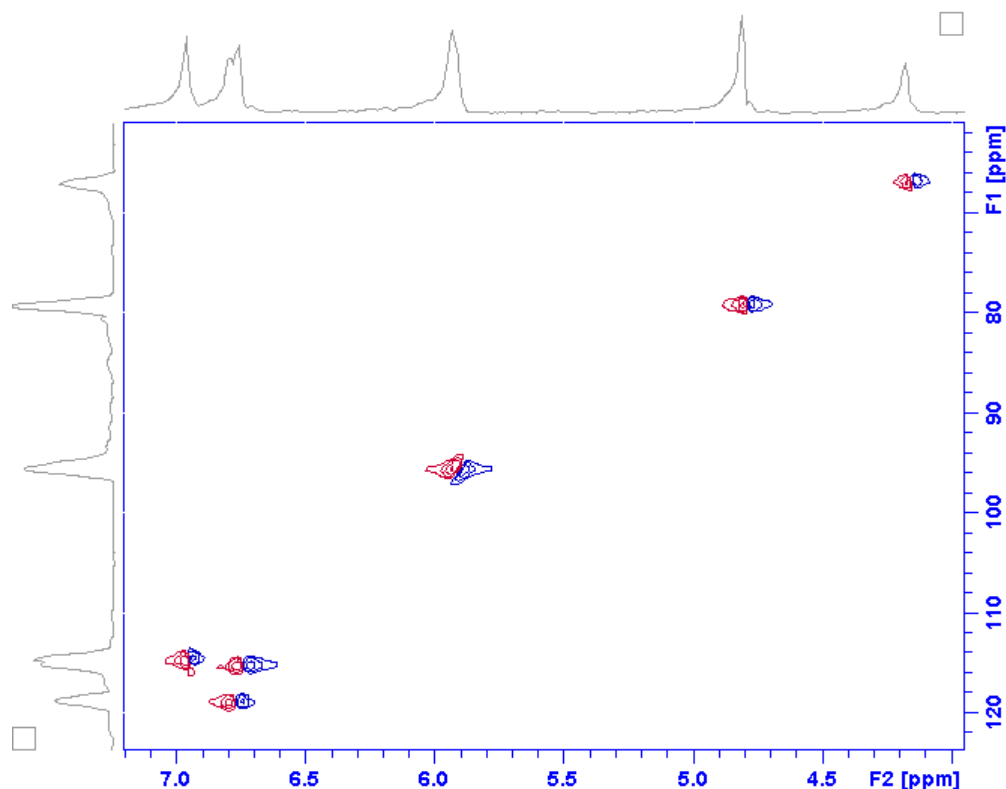


Figura 92: Expansão do mapa de contornos HSQC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-20

As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figuras 94-95, Tabela 25**) entre o carbono em δ 79,3 (C-2) e os hidrogênios em δ 6,96 (H-2') e δ 6,79 (H-6'), entre o carbono aromático em δ 99,52 (C-4a) e os hidrogênios em δ 5,93 (H-6); 4,16 (H-3); 2,85 (H-4) e 2,71 (H-4) e ainda entre o entre o carbono aromático em δ 157,07 (C-8a) e os hidrogênios em δ 5,91 (H-8); 2,85 (H-4) e 2,71 (H-4) estão de acordo com a estrutura proposta para o ALF-20:

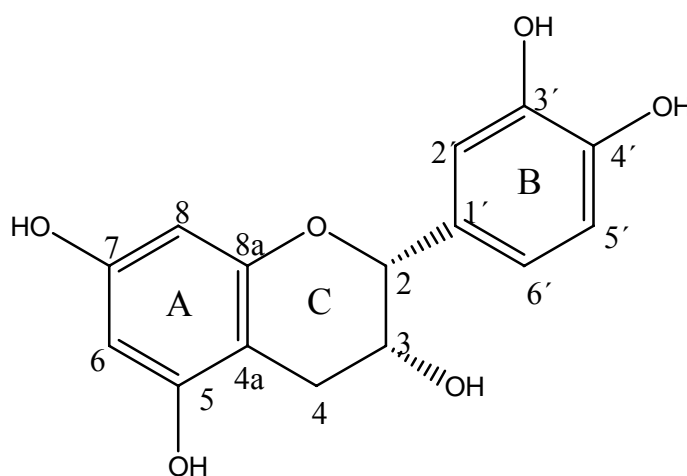


Figura 93: Epicatequina

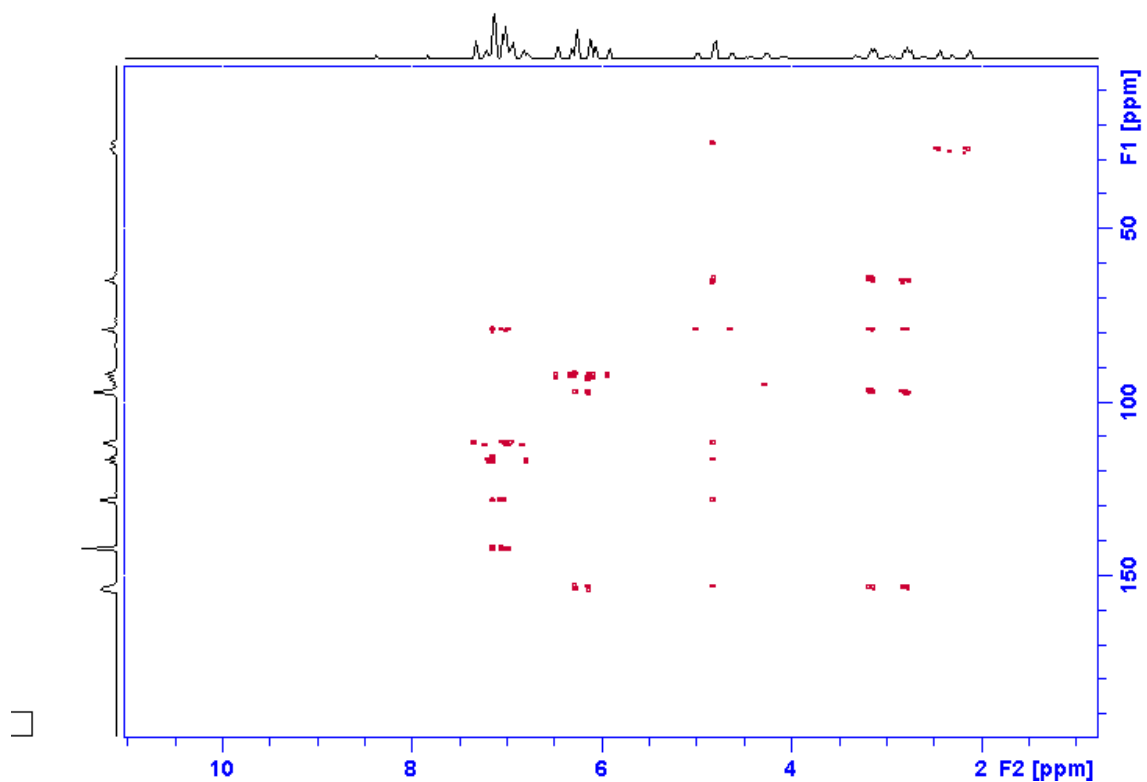


Figura 94: Mapa de contornos HMBC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-20

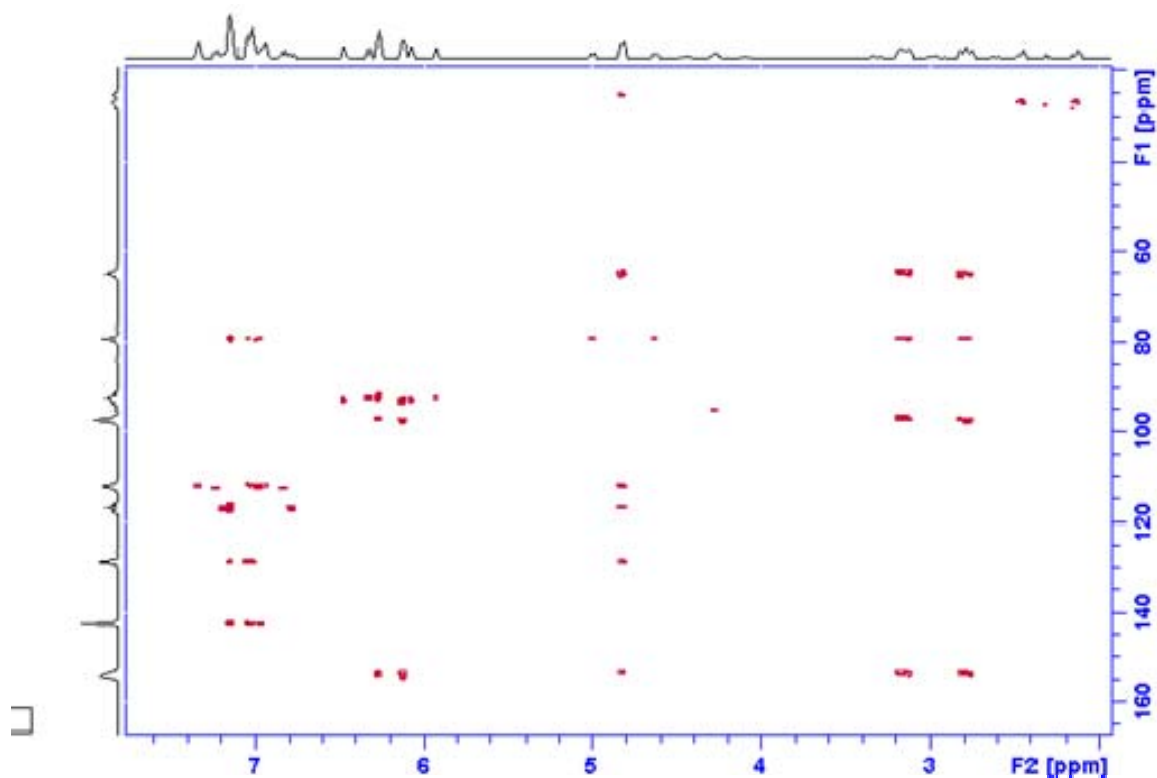


Figura 95: Expansão do mapa de contornos HMBC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-20

O mapa de contornos NOESY (**Figuras 96-97**) mostra um acoplamento entre os hidrogênios em δ 4,82 (H-2) e δ 4,16 (H-3) confirmando que eles se encontram do mesmo lado da molécula. O sinal negativo do $[\alpha]_D^{25} = -16,0^\circ$, MeOH confirmou a estereoquímica como sendo *2R,3R*, tratando-se portanto da (-)-epicatequina.

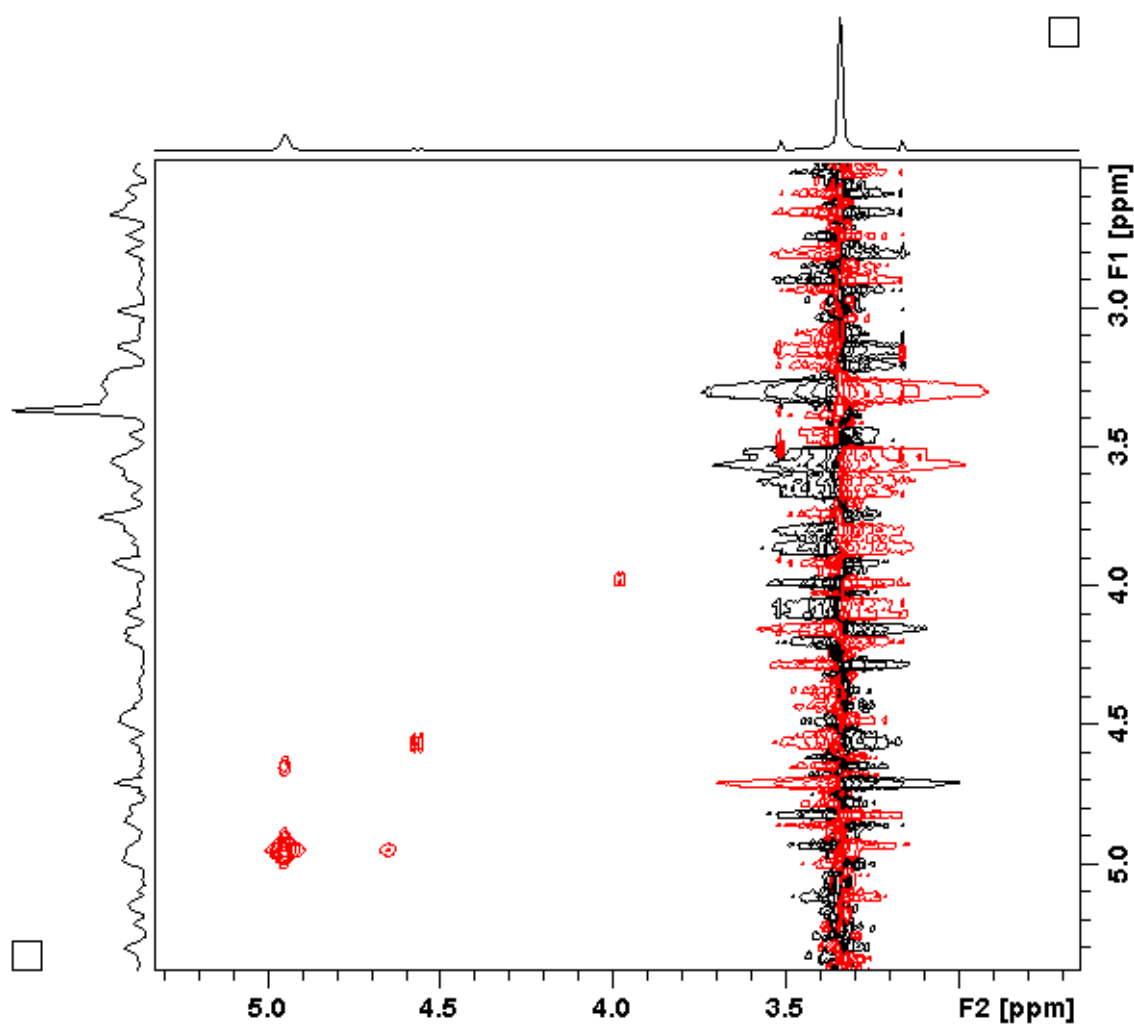


Figura 96: Mapa de contornos NOESY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-20

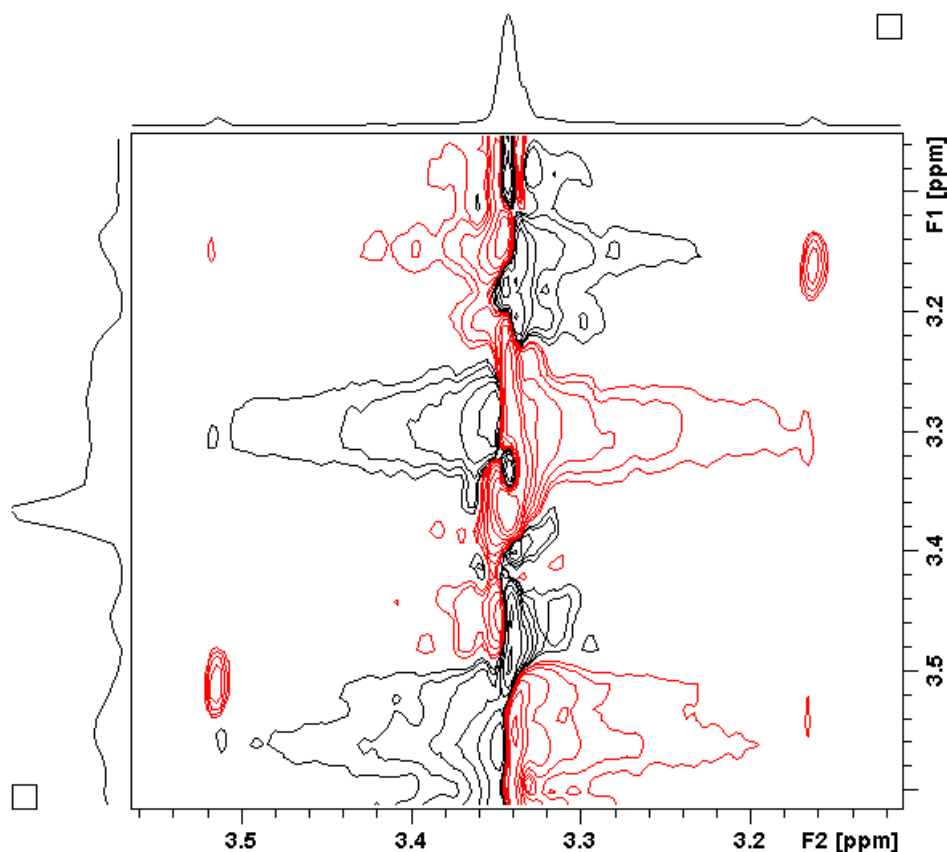
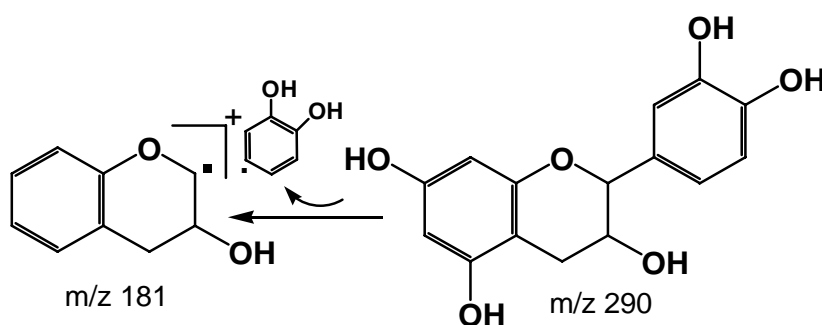


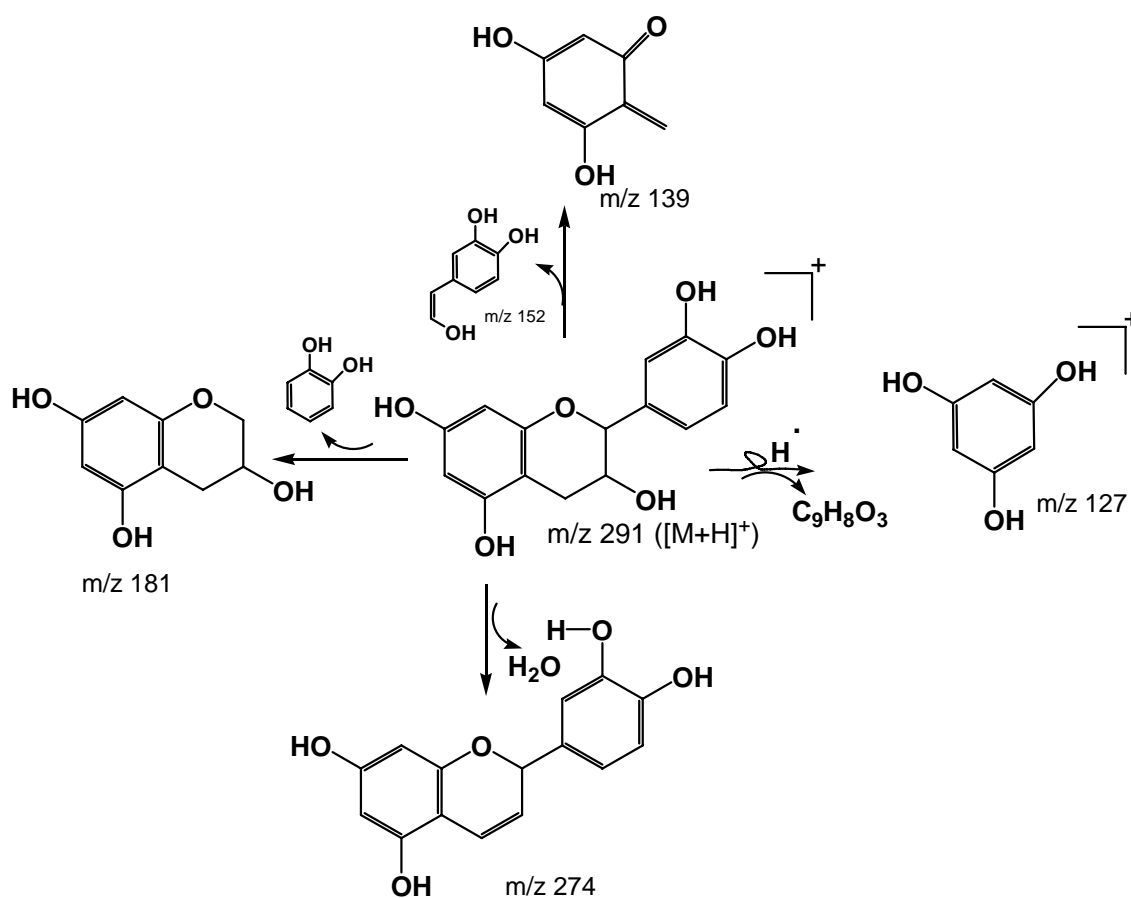
Figura 97: Mapa de contornos NOESY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-20

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 98**) indicou a massa molecular 290 u, com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ sugerindo tratar-se da Epicatequina, em conformidade com outras técnicas de identificação.

O fragmento m/z 139 sugere a presença de dois grupos hidroxila no anel A, como também o pico em m/z 139 sugere uma clivagem β ao anel A com a perda do fragmento m/z 152 (**Esquema 5**).



Esquema 5: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-20



Esquema 5 (Cont.): Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-20

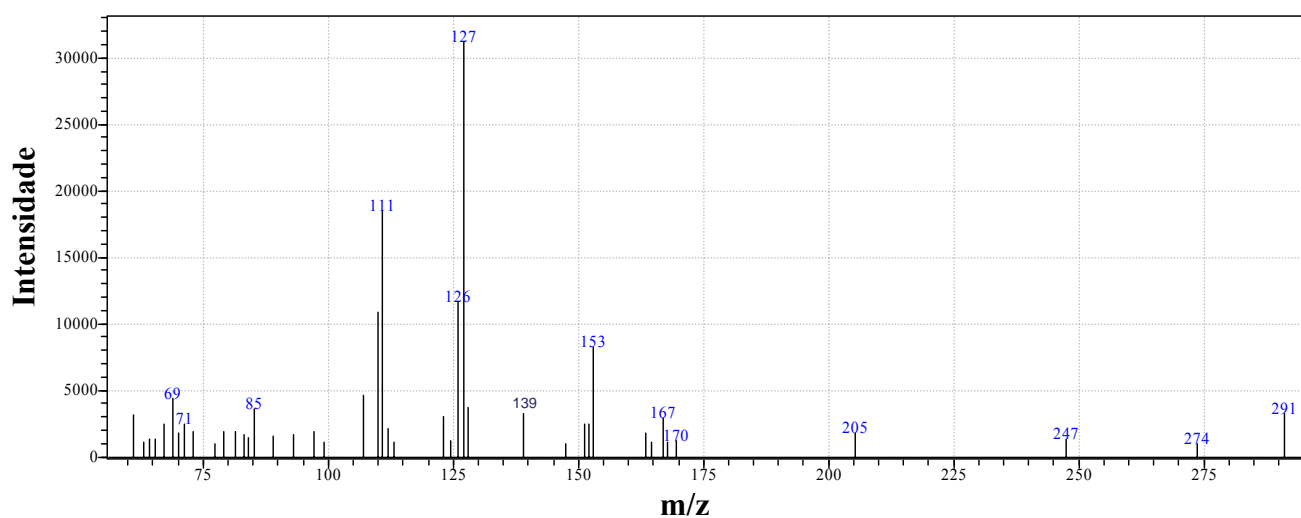
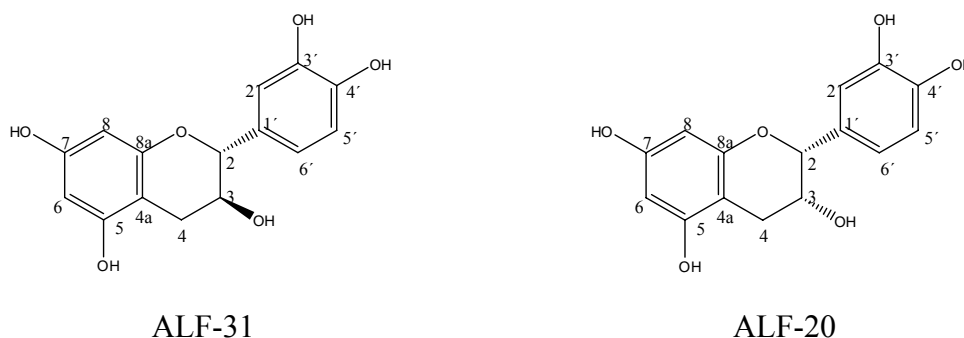


Figura 98: Espectro de massas da substância ALF-20.

Os dados de RMN ^1H do ALF-20 são similares aos do ALF-31, destacando-se apenas pequenas diferenças no deslocamento químico e no padrão de acoplamento, principalmente com relação aos hidrogênios alifáticos: o composto ALF-20, H-2 e H-3 exibem simpletos largos em δ 4,82 e 4,16, respectivamente, e H-4b um duplo duplete em δ 2,72 com J 16,8 e 2,4 Hz, em consequência da mudança estereoquímica do carbono C-3 (OH) para na epicatequina conforme descrito no item introdutório.

Os dados de RMN ^{13}C do ALF-20 também são semelhantes aos do ALF-31, destacando-se como diferença apenas os sinais atribuídos aos carbonos C-2 (δ 79,3) e C-3 (δ 66,9), caracterizando a estereoquímica diferenciada da epicatequina em relação a catequina, ou seja, epicatequina tem estereoquímica relativa 3-OH- α , tratando-se portanto de um epímero da catequina.

Com base nos resultados apresentados os compostos ALF-31 e ALF-20 foram identificados como sendo a catequina e a epicatequina respectivamente.



A **tabela 24** sintetiza as principais diferenças discutidas para compostos ALF-31 e ALF-20 abordando seus deslocamentos com o disposto em algumas literaturas (AGRAWAL, 1989 e MARKAN, 1970).

Tabela 24: Comparação entre ALF-20, ALF-31.

	catequina	epicatequina	ALF-31	ALF-20
H-2	4,57d	4,82s	4,52d	4,82s
H-3	3,97m	4,17s	3,98m	4,16s
H-4b	2,51dd	2,72dd	2,48dd	2,72dd
C-2	82,4	79,1	82,3	79,3
C-3	68,0	66,6	68,26	66,9

Deve-se salientar que foi levada em consideração a diferença de deslocamentos químicos entre os solventes empregados nos dados espectroscópicos obtidos por RMN ^1H e ^{13}C nesta análise e expostos na **tabela 24** quando comparados com referências bibliográficas (AGRAWAL, 1989 e MARKAN, 1970).

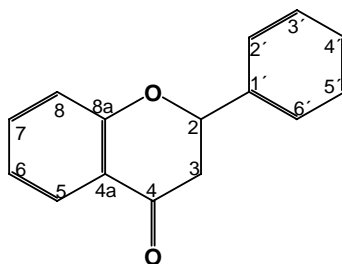
Tabela 25: RMN do composto ALF-20 em MeOD, deslocamento em δ .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	79,30 CH	4,82s	-	4,16	6,79; 6,96	2,71; 4,16; 6,79; 6,96
3	66,90 CH	4,16s	-	2,71; 2,85; 4,82	2,71; 2,85	2,71; 4,82; 6,79; 6,96
4	28,67 CH ₂	2,85 dd 2,71 dd	16,66; 4,5 16,42; 2,4	2,71; 4,16 2,85; 4,16	4,82	2,71; 4,16; 4,82 2,85
4a	99,52 C	-	-	-	2,71; 2,85; 4,16; 5,93	-
5	157,40 C	-	-	-	2,71; 2,85; 5,93	-
6	96,20 CH	5,93d	1,8	-	5,91	-
7	156,78 C	-	-	-	5,91; 5,93	-
8	95,34 CH	5,91d	1,8	-	5,93	-
8a	157,07 C	-	-	-	2,71; 2,85; 5,91	-
1'	131,70 C	-	-	-	6,76; 6,96	-
2'	115,19 CH	6,96 d	1,2	-	4,82; 6,79	4,16; 4,82
3'	145,19 C	-	-	-	6,76; 6,96	-
4'	145,36 C	-	-	-	6,76; 6,96	-
5'	115,81 CH	6,76 d	8,1	6,79	6,79	-
6'	120,03 CH	6,79 dd	8,1; 1,2	6,76	4,82; 6,96	4,16; 4,82

Dados de RMN ^1H 400 MHz, ^{13}C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

m=multiplato
dd=duplo dupleto
d=dupleto
s=simpleto

III.5.4.2 – Identificação de Flavanona



As flavanonas ou 2-fenil-benzopirano-4-onas são uma classe de flavonóides que possuem como esqueleto o núcleo 2-fenilcromanona, tendo como características a carbonila cetônica na posição 4 e a ausência de insaturação no anel C. (HARBORNE, 1967).

A classe das flavanonas é facilmente identificada por RMN ^1H devido aos deslocamentos característicos do anel C num sistema de *spins* do tipo AMX. O H-2 encontra-se em conformação *pseudo*-axial e apresenta-se como um duplo duplete (*dd*) entre δ 5,0-5,7, com constantes de acoplamento características J_{eq} (3,0 Hz) e J_{ax} (13,0 Hz). O H-3 axial ocorre como um *dd* entre δ 3,1-3,4 ppm, com constantes de acoplamento J_{ax} (13,0 Hz) e J_{gem} (17,0 Hz), enquanto que o H-3 equatorial ocorre como um *dd* entre δ = 2,6-2,9, com constantes de acoplamento J_{eq} (3,0 Hz) e J_{gem} (17,0 Hz). Para as flavanonas que apresentam 5-OH e 7-OH os hidrogênios H-6 e H-8 do anel A podem não ser distinguíveis, pois podem apresentar-se como um simpleto, ou como dois dupletos muito próximos com constante de acoplamento J_{meta} (2,0 Hz). No anel B os hidrogênios H-2' e H-6' encontram-se mais protegidos do que nas flavonas por cerca de 0,6 ppm, enquanto H-3' e H-5' não são afetados, (MARKHAM, 1994).

O espectro de RMN ^{13}C apresenta deslocamentos do carbono oximetínico C-2 entre δ 71,3-80,5, do carbono metilênico C-3 entre δ 39,5-46,4 e da carbonila na região de δ 186,4-198,5. O valor de deslocamento para C-2 está intrinsecamente relacionado a presença de substituição em C-2' e C-6'. Na ausência de substituição nestas posições o sinal de C-2 é registrado em $\delta = 79,0 \pm 1,5$, enquanto que a substituição por um grupo oxigenado em C-2' ou C-6' protege C-2 para $\delta = 75,6 \pm 1,6$. Grupos oxigenados em C-2' e C-6' protegem C-2 ainda mais, podendo o deslocamento químico chegar a $\delta = 71,3$. O valor de deslocamento da carbonila em C-4 está relacionado com a presença ou não de hidroxilação em C-5. Na ausência de 5-OH, o deslocamento químico da carbonila encontra-se na faixa de δ 189,7-191,7, enquanto que na presença de 5-OH, C-4 é registrado em δ 195,6-198,5 devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular. No caso da presença de grupos metoxílicos ou glicosídicos no C-5, o sinal do C-4 retorna para campo de proteção. O deslocamento de C-3 não é afetado pela substituição nos anéis A e B, porém, sofre efeito de desproteção de 1-2 ppm devido à ligação de hidrogênio entre a carbonila e 5-OH (AGRAWAL, 1989).

III.5.4.2.1 – Identificação da substância ALF-19

A substância ALF-19 foi obtida na forma de um sólido amorfo amarelado apresentando ponto de fusão 253-254 °C.

O espectro de absorção (de luz) na região do IV, obtido em pastilha de KBr (**Figura 99**), revelou a presença de bandas de absorção de estiramento e deformação para grupos hidroxila (3298 cm^{-1}), carbonila ($1628,82\text{ cm}^{-1}$) e de sistema aromático (1156 e 1650 cm^{-1}), (sugerindo a presença destes grupos).

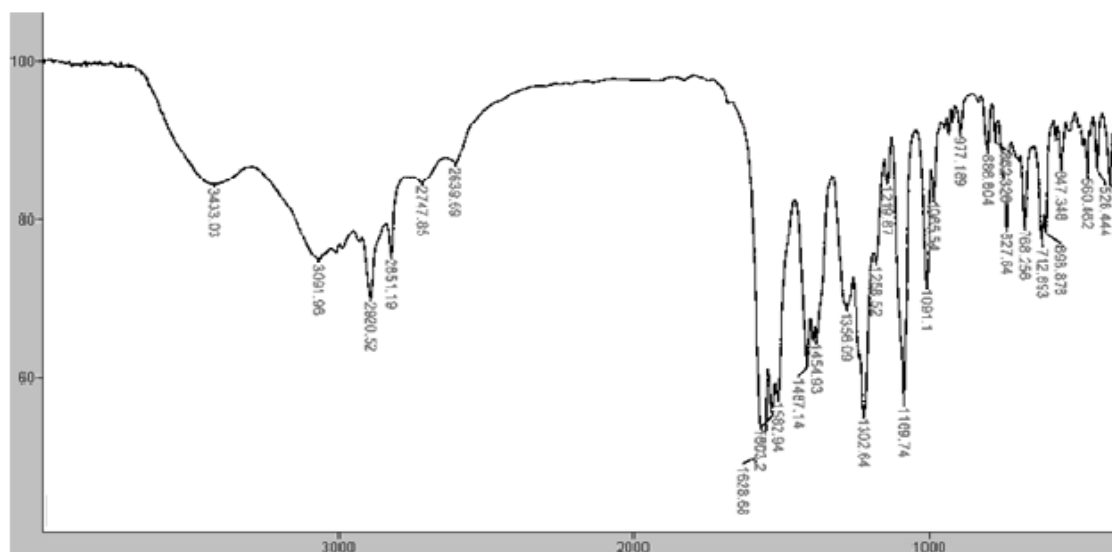


Figura 99: Espectro da substância ALF-19 na região do Infra-vermelho

Em uma primeira visualização geral o espectro de RMN de ^1H dessa substância (**Figura 100**) revelou a presença de sinais característicos de flavanonas.

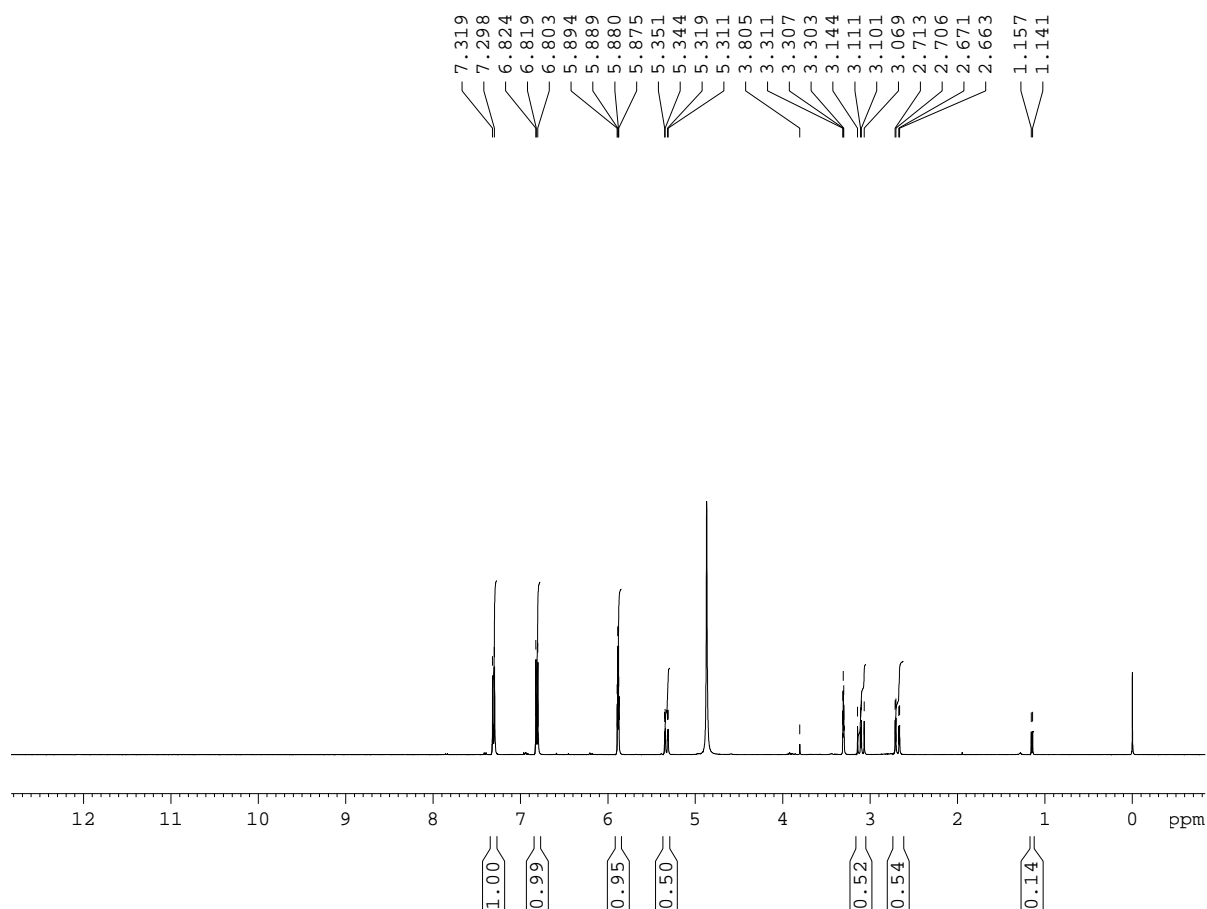


Figura 100: Espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-19

Em análise detalhada podemos destacar um duplo duplete em δ 5,33 relativo ao H-2 ($J = 12,9$ e $2,9\text{Hz}$) e dois duplos dupletos (dd) referentes ao H-3 em δ 3,1 ($J = 17,0$ e $13,0\text{Hz}$, H-3a) e em δ 2,69 ($J = 17,0$ e $3,0\text{Hz}$, H-3b). Dois dupletos muito próximos um em δ 5,89 ($J = 2,2\text{Hz}$) e outro em 5,87 ($J = 2,19\text{Hz}$) referente aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A. Estes não sendo distinguíveis revelam ser típico de flavanonas as quais apresentam 5-OH e 7-OH. Dois dupletos em 7,30 ($J = 8,5$ Hz) e em 6,82 ($J = 8,63$. Hz) típicos de quatro hidrogênios aromáticos substituídos em H - 2', H - 6' e H - 3', H - 5', respectivamente, indicativa de anel aromático *p*-substituído (Anel B) (**Figuras 101-102**).

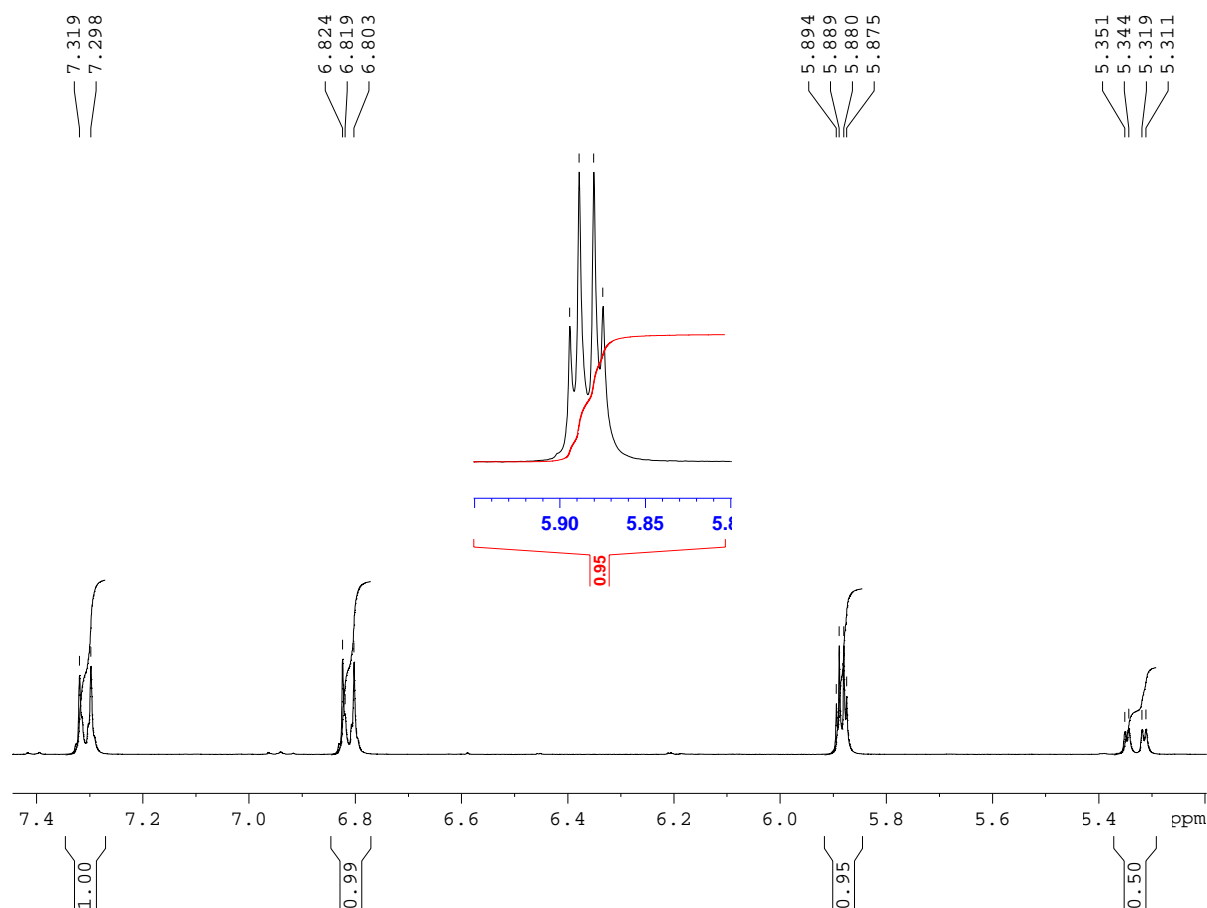


Figura 101: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-19

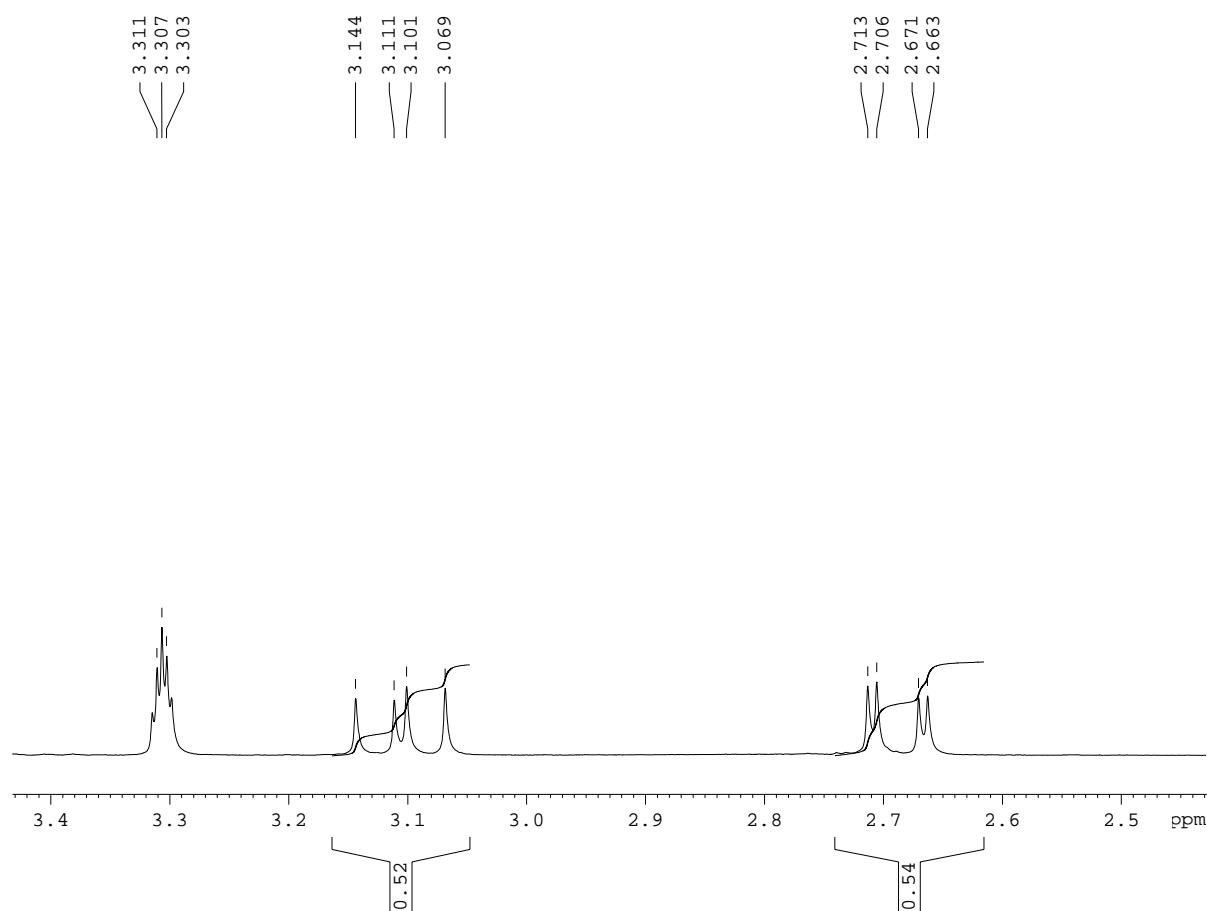


Figura 102: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-19

Na análise do espectro de espectro de RMN ^{13}C , verifica-se a presença de sinais atribuídos a 15 átomos de carbono, sendo dois sinais equivalentes, os carbonos 2' e 6' com deslocamento químico em 129,18 ppm, e para os carbonos 3' e 5' em 116,48 ppm, confirmando a presença dos quinze carbonos.

Os sinais registrados mais relevantes foram os deslocamentos do carbono oximetínico C-2 em δ 80,63 (valor que indica ausência de substituição nas posições C-2' e C-6'), do carbono metilênico C-3 em δ 44,19 e da carbonila em δ 197,92 indicando a presença de hidroxilação em 5-OH devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular.

Apesar da ligação de hidrogênio entre a carbonila e o substituinte 5-OH, o deslocamento de C-3 não foi afetado encontrando-se dentro da faixa normal de deslocamento entre δ 39,5-46,4 (**Figura 103**).

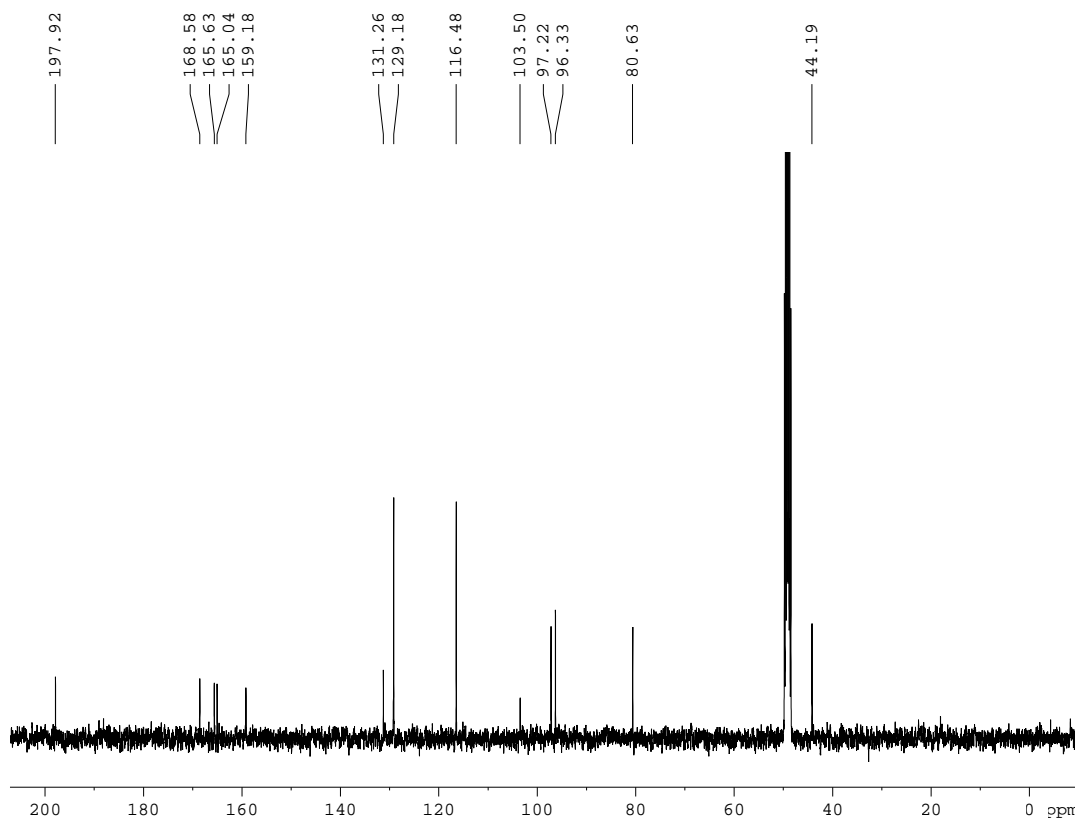


Figura 103: Espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD , 100 MHz, do composto ALF-19

A análise conjunta dos espectros DEPT 90° e 135° (**Figuras 104-106**) possibilitaram a identificação de sete sinais referentes a carbonos metínicos (CH), um sinal referente a carbono metilênico (CH_2), sugerindo desta maneira que o metabólito possui sete carbonos não hidrogenados, pois estes não aparecem nos espectros DEPT 135° e 90° .

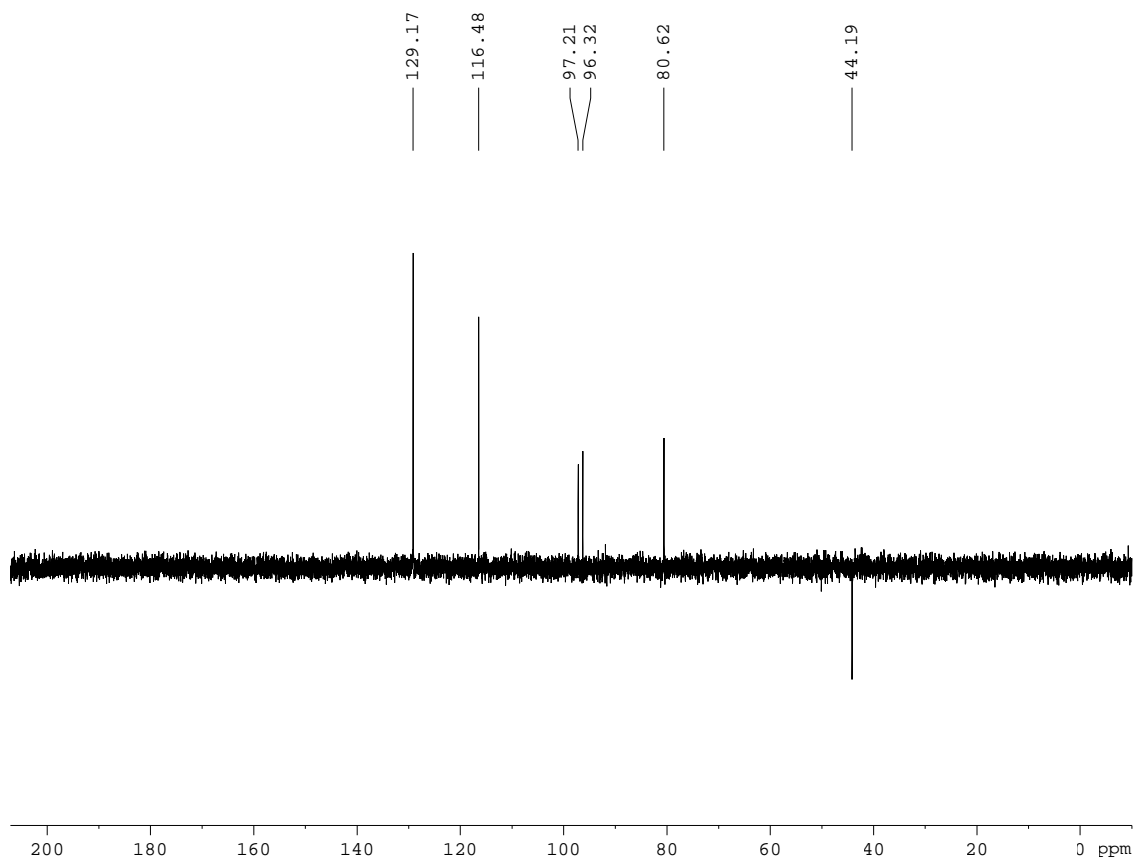


Figura 104: Espectro DEPT 135° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-19

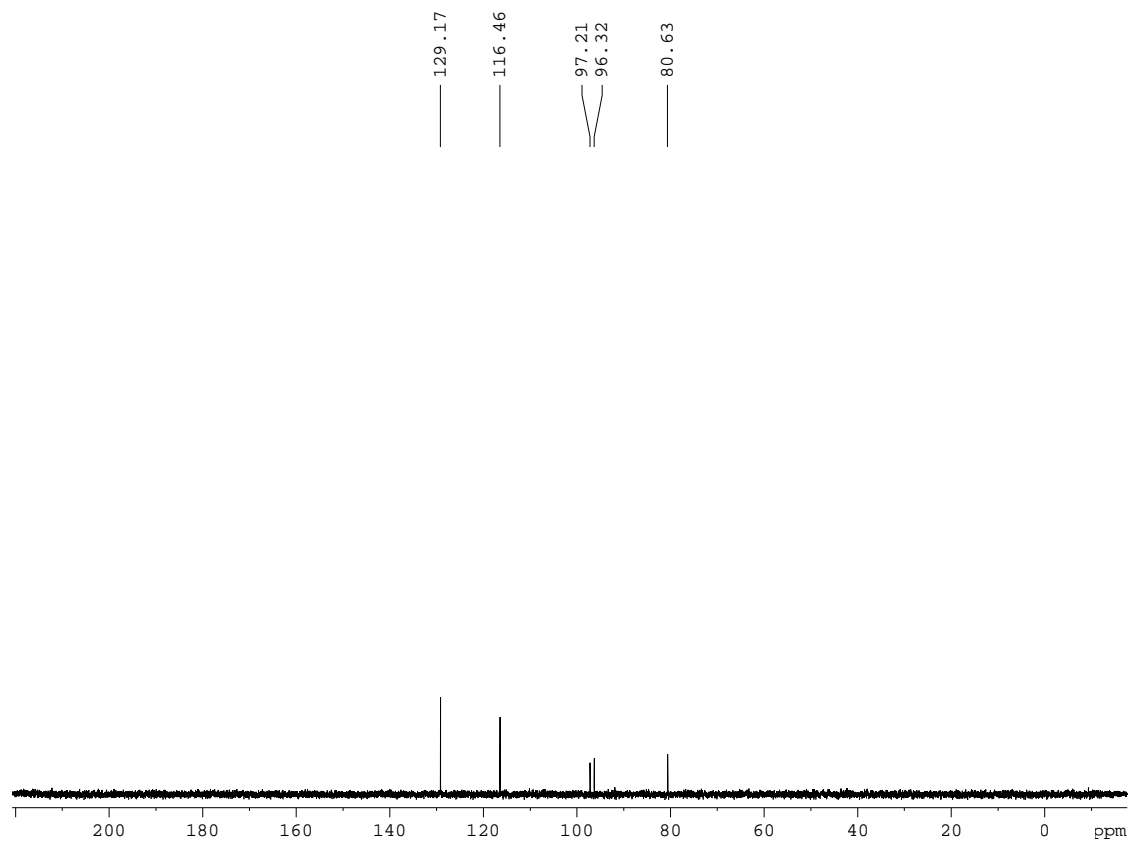


Figura 105: Espectro DEPT 90° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-19

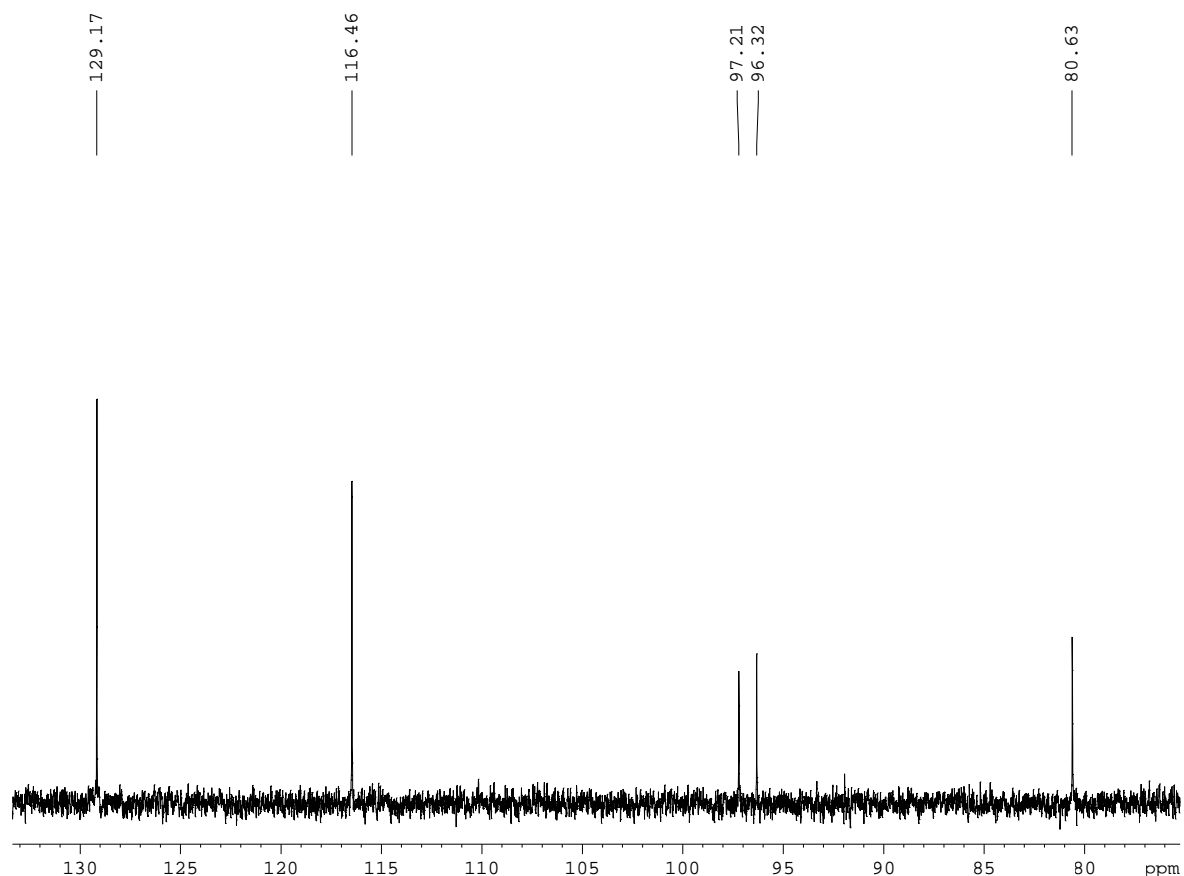


Figura 106: Expansão do espectro DEPT 90° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-19

Após análises espectrais de RMN 1D (¹H, ¹³C e DEPT's), sugeriu-se que a substância ALF-19 tratava-se de uma flavanona bastante conhecida e presente em diferentes plantas, a Naringenina (Figura 107).

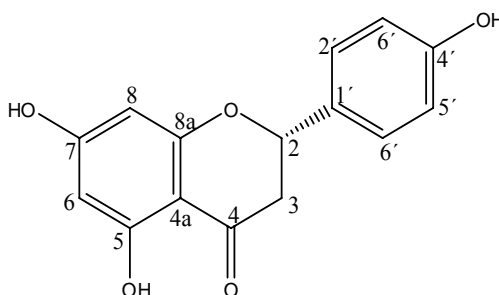


Figura 107: Naringenina

Para confirmar a estrutura foram interpretados os espectros de RMN 2D (HSQC, COSY, HMBC e NOESY).

Após a verificação da correlação direta C-H via HSQC (**Figura 108**) foi possível enumerar os sinais dos prótons. Seus resultados estão na **tabela 26**.

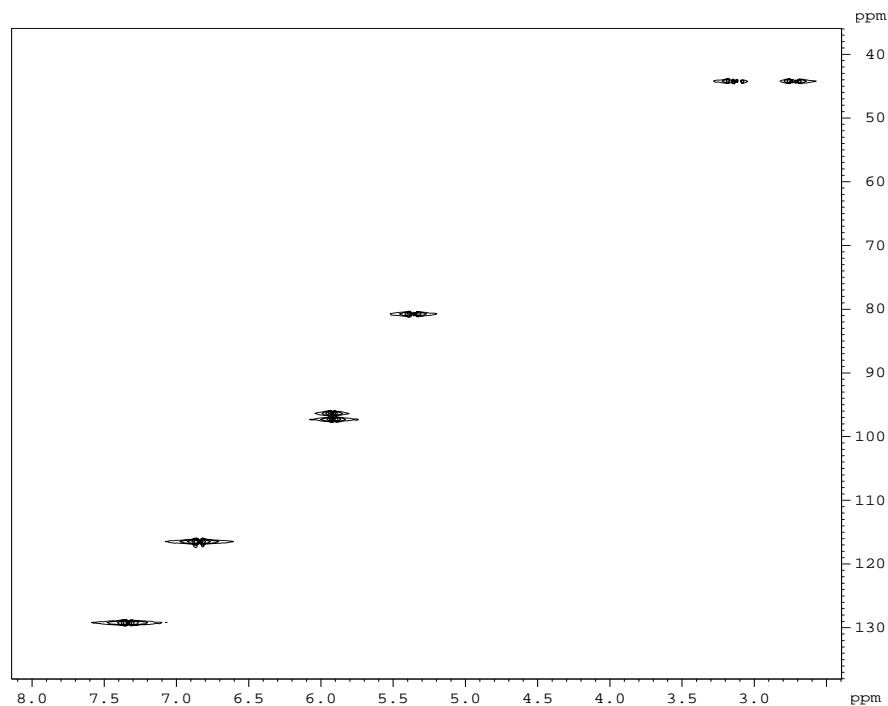


Figura 108: Mapa de contornos HSQC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-19

A visualização da interação via espectro de RMN COSY correlacionou os hidrogênios acoplados por $^{2-3}J_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais). Os acoplamentos atribuídos no estudo do RMN ^1H foram todos confirmados através da análise do espectro COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (**Figuras 109**). Seus resultados estão na **tabela 26**.

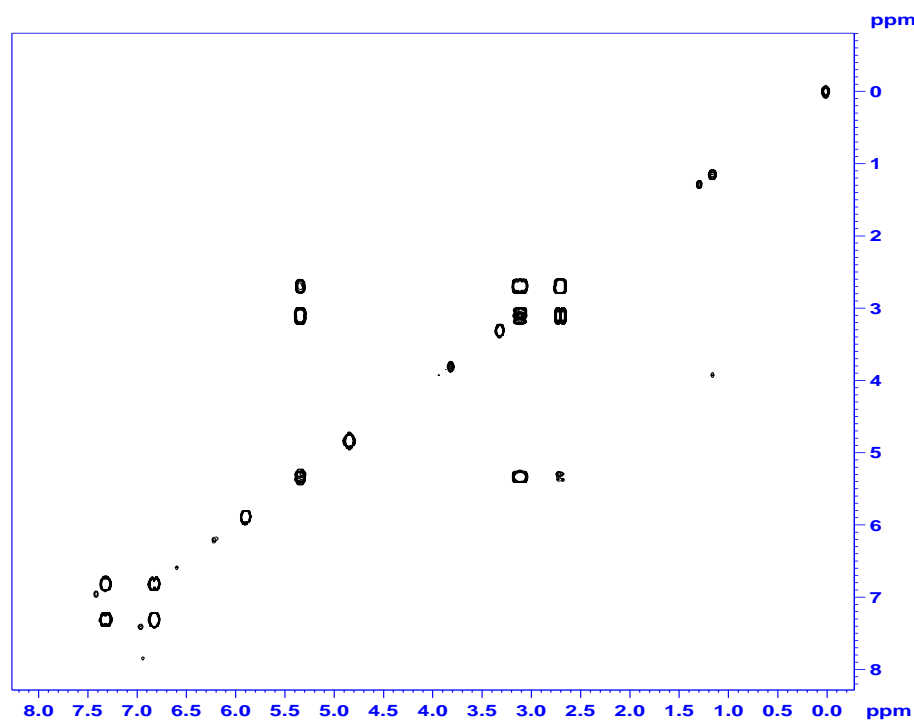


Figura 109: Mapa de contornos COSY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-19

Deste ponto, pode-se fazer uma montagem dos microfragmentos para então analisar o HMBC (**figuras 110-111**) fazendo-se assim a união destes microfragmentos. Seus resultados estão na **tabela 26**.

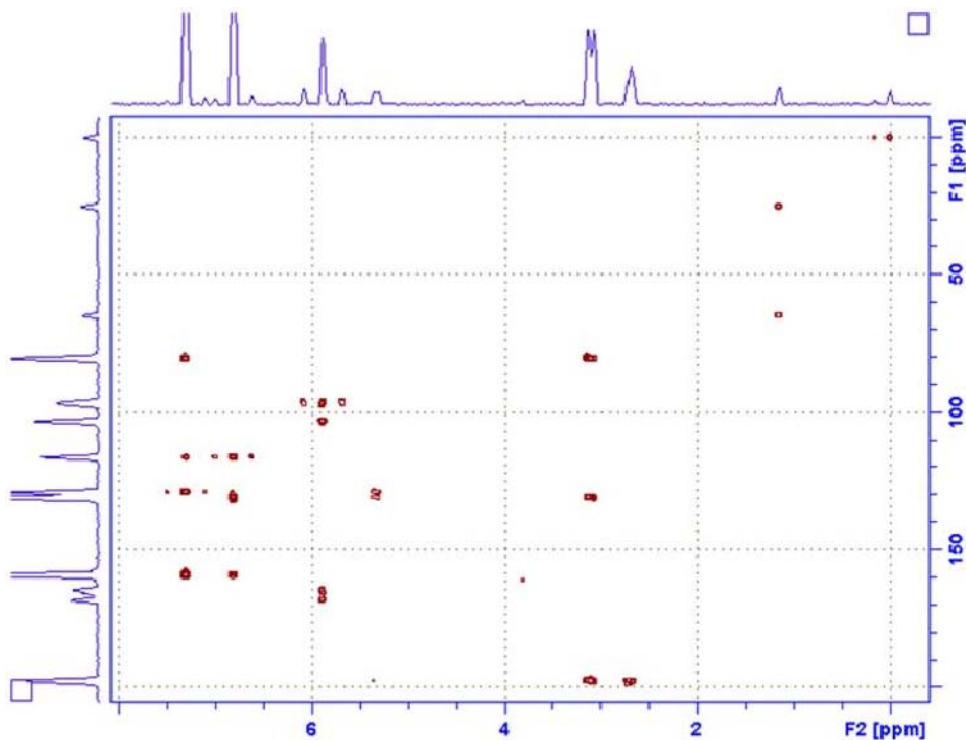


Figura 110: Mapa de contornos HMBC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz.

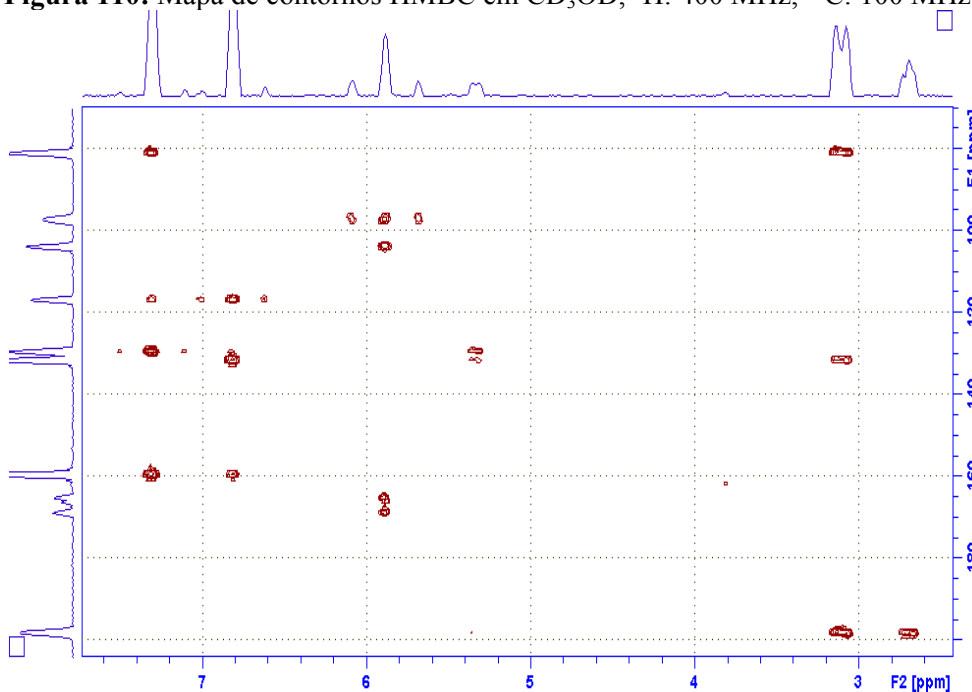


Figura 111: Expansão do mapa de contornos HMBC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-19

A análise do espectro NOESY (Figura 112) forneceu informações relacionadas com a estereoquímica da molécula, estabelecendo as suas configurações relativas e conformações. Seus resultados estão na **tabela 26**.

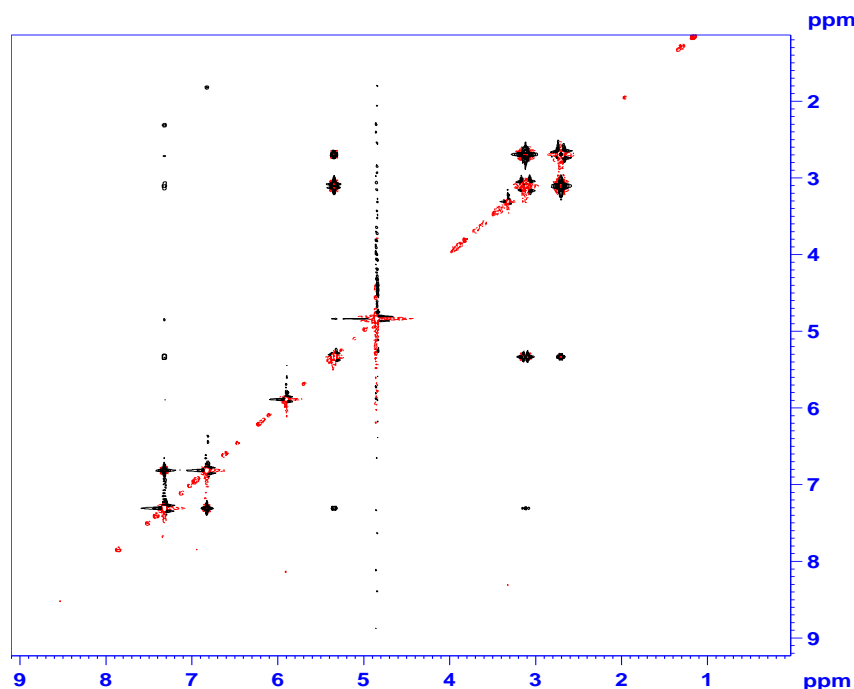


Figura 112: Mapa de contornos NOESY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-19

De uma forma geral, as flavanonas apresentam conformação mais estável com o anel B em *pseudo*-equatorial. O carbono C-2 é assimétrico, logo as flavanonas exibem atividade óptica. A medida de rotação óptica específica da ALF-19 foi de $[\alpha]_D^{25} = -16,6^\circ$, MeOH.

Segundo MARKHAN, de uma forma geral as (-)-flavanonas possuem configuração 2*S*, enquanto que as (+)-flavanonas possuem configuração 2*R*. Na natureza elas são comumente encontradas na forma *S*, caso em que se confere a ALF-19.

O sinal de RMN ^1H em δ 5,8 *d* integrando para 2H sugeriu dois hidrogênios aromáticos em posição *meta*, com mesmo deslocamento químico, o que confirma a substituição em C-5 e C-7 no anel A. Estes dados em conjunto com bidimensionais COSY e NOESY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$); e HSQC e HMBC ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) confirmam as atribuições feitas para o ALF-19 tratando-se da 5,7,4'-trihidroxiflavanona (naringenina) que foi isolada pela primeira vez de *A. langsdorfii* e que possui ocorrência frequente registrada em outras espécies do gênero *Acacia* (Figura 113)

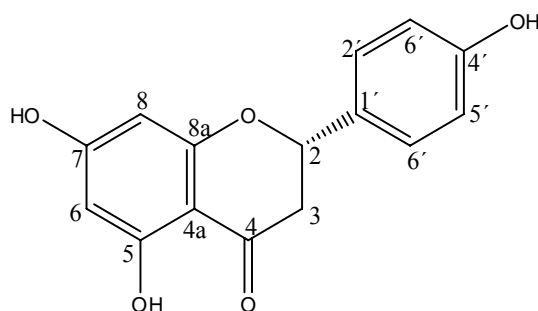


Figura 113. Estrutura da Naringina (ALF-19)

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 114**) indicou a massa molecular 272 u, com a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_5$ sugerindo tratar-se da naringina, em conformidade com outras técnicas de identificação.

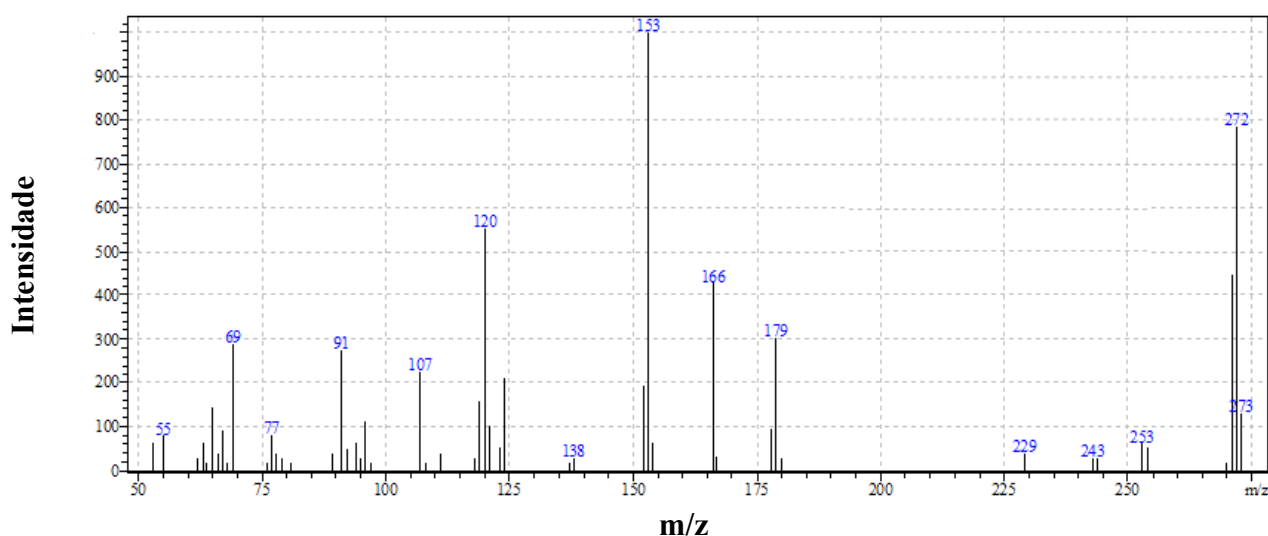
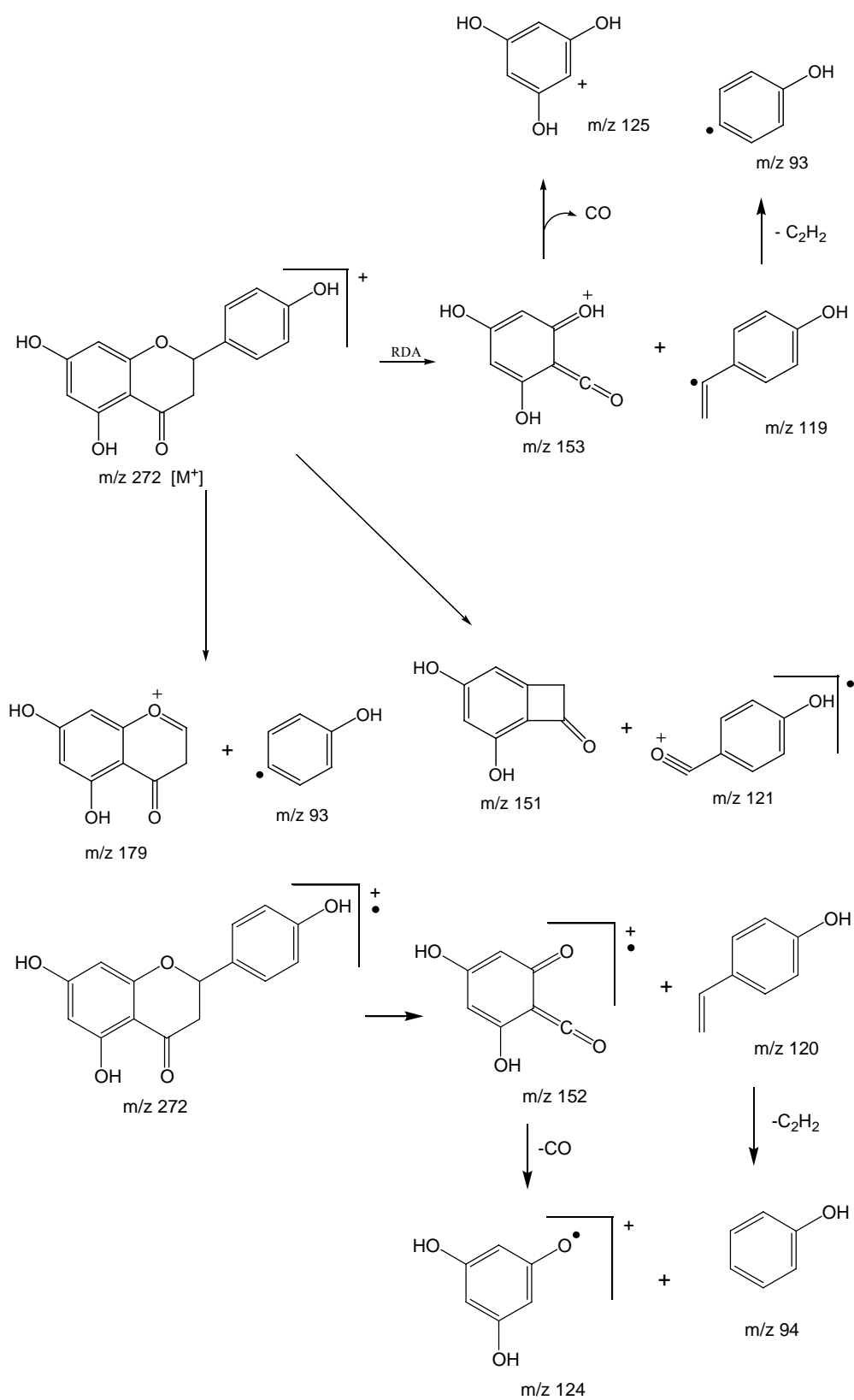


Figura 114: Espectro de massas da substância ALF-19.

O fragmentograma apresentou massa molecular 272 e pico base em m/z 153. Também é possível observar outras quebras características da classe em m/z 119, 121, 179 (**Esquema 6**).

**Esquema 6:** Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-19**Tabela 26:** RMN do composto ALF-19 em MeOD, deslocamento em δ .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	80,63 CH	5,33dd	12,9 e 2,9	3,10; 2,69	7,30; 3,10	2,69; 3,10
3	44,19 CH ₂	3,10 dd 2,69 dd	17,0 e 13,0 17,0 e 3,0	2,69; 5,33 5,33; 3,10		2,69; 5,33 3,10; 5,33
4	197,92 C				3,10; 2,69	
8a	165,63 C				5,8	
5	165,04 C				5,8	
6	97,22 CH	5,88d	2,2			
7	168,58 C				5,8	
8	96,33 CH	5,88d	2,2		5,8	
4a	103,5 C				5,8	
1'	131,26 C				3,10; 6,82	
2'	129,18 CH	7,30d	8,5	6,82	5,33; 6,82; 7,30	6,82
3'	116,48 CH	6,82d	8,63	7,30	7,30; 6,82	7,30
4'	159,18 C				7,30; 6,82	
5'	116,48 CH	6,82d	8,63	7,30	7,30; 6,82	7,30
6'	129,18 CH	7,30d	8,5	6,82	5,33; 6,82; 7,30	6,82

Dados de RMN ¹H 400 MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

dd=duplo dupleteo

d= dupleteo

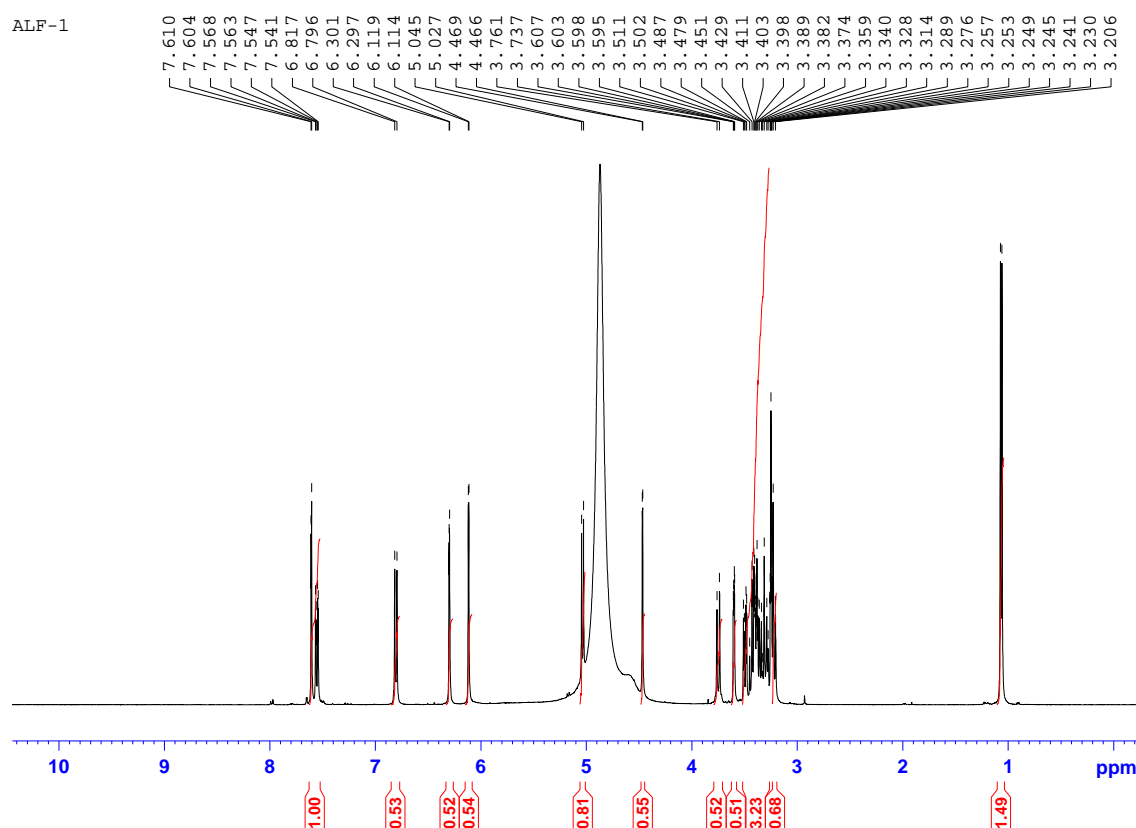


Figura 116: Espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-1

Em análise detalhada (**Figuras 117-120**) podemos observar a presença de sinais em 5,00 d ($d, J = 7,43$ Hz) e em 4,46 d ($d, J = 1,23$ Hz) atribuídos aos hidrogênios anoméricos H-1'' e H-1''', respectivamente de duas unidades piranosídicas. O deslocamento químico em 1,06 d ($d, J = 6,14$ Hz) sugere que seja os hidrogênios do grupo metila da ramnose. Observou-se no espectro um envelope de sinais em 3,76 – 3,20, relativo aos acoplamentos dos hidrogênios de duas unidades de açúcar. Os sinais na forma de dupletos em 6,11 ($d, J = 1,97$ Hz, H-6) e 6,29 ($d, J = 1,92$ Hz, H-8) nos sugerem que o anel A do flavonóide seja 5,7-dioxigenado. Os dupletos na região espectral de 7,6 ($d, J = 2,16$ Hz) e 6,8 ($d, J = 8,45$ Hz) e o duplo duplete em 7,54 ($dd, J = 8,47$ e $2,09$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos H-3' ou H-2', H-6' ou H-5' e H-5' ou H-6'' do anel B do flavonóide, sugerindo que o composto ALF-1 apresente uma estrutura do tipo 2',4' dioxigenados ou 3',4'-dioxigenados:

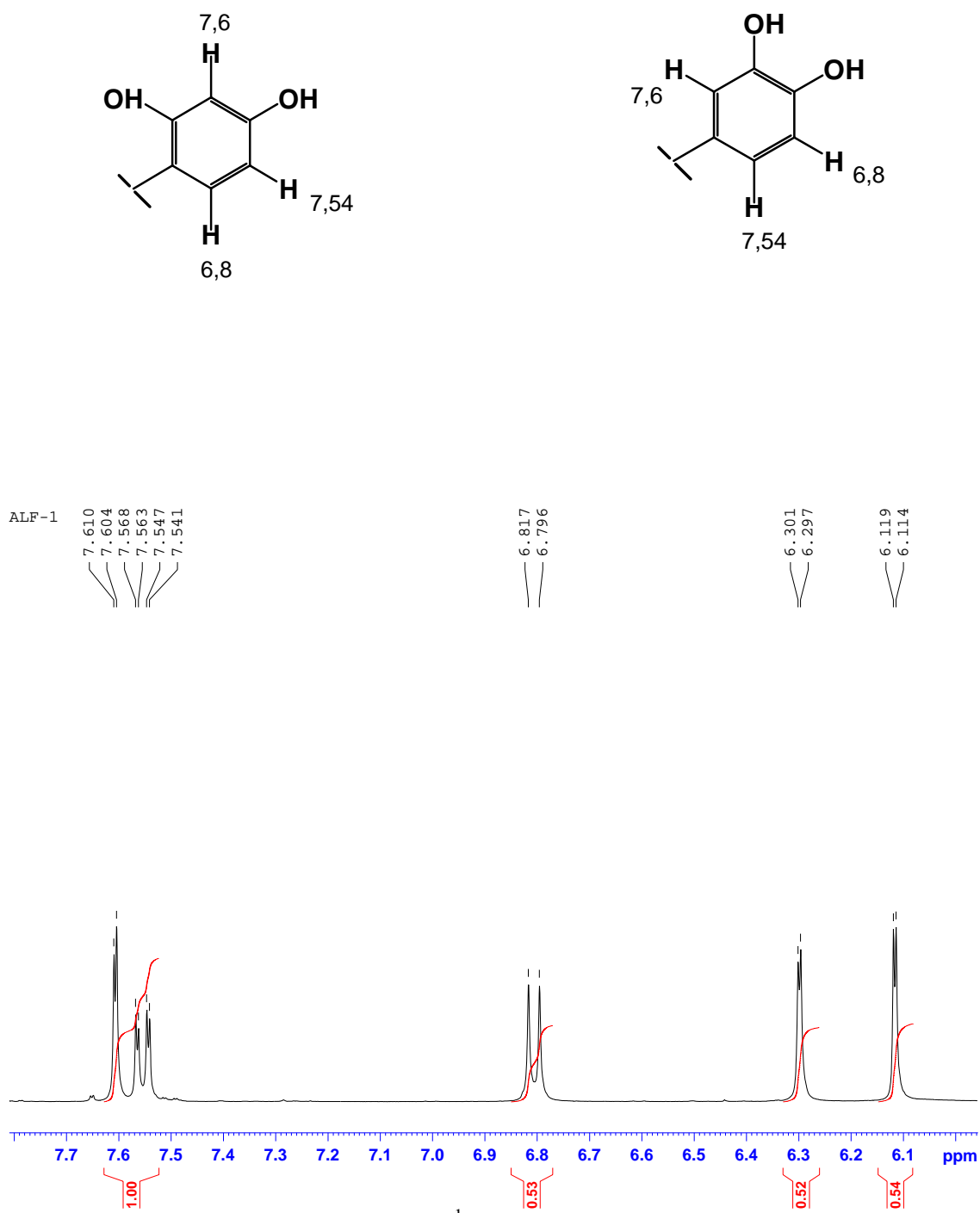


Figura 117: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-1

Cap. III. Resultados e Discussão

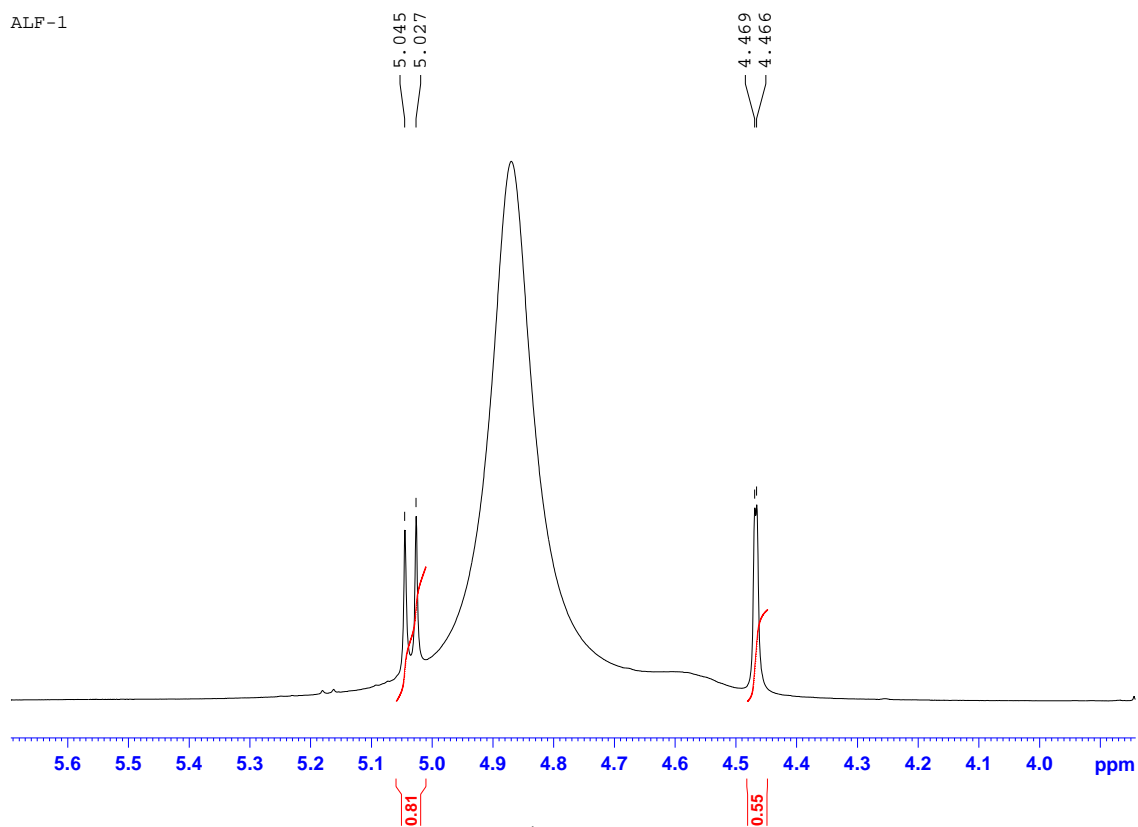


Figura 118: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-1

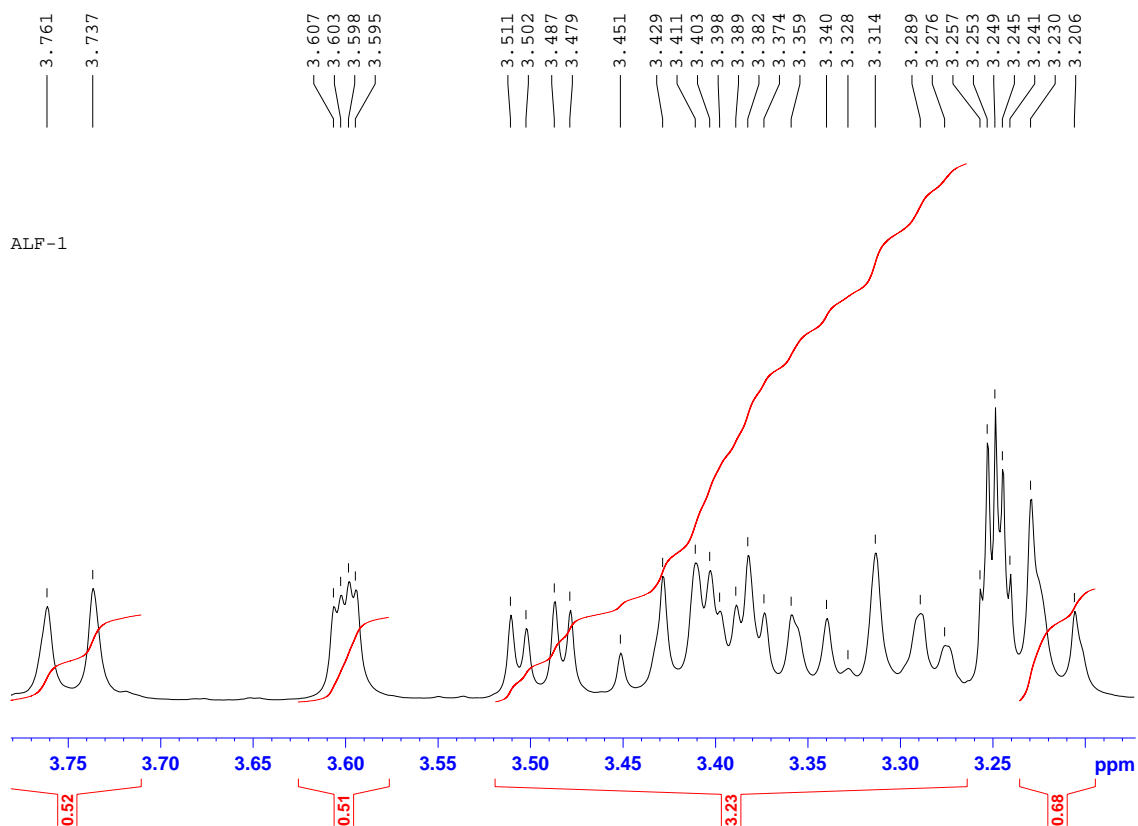


Figura 119: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-1

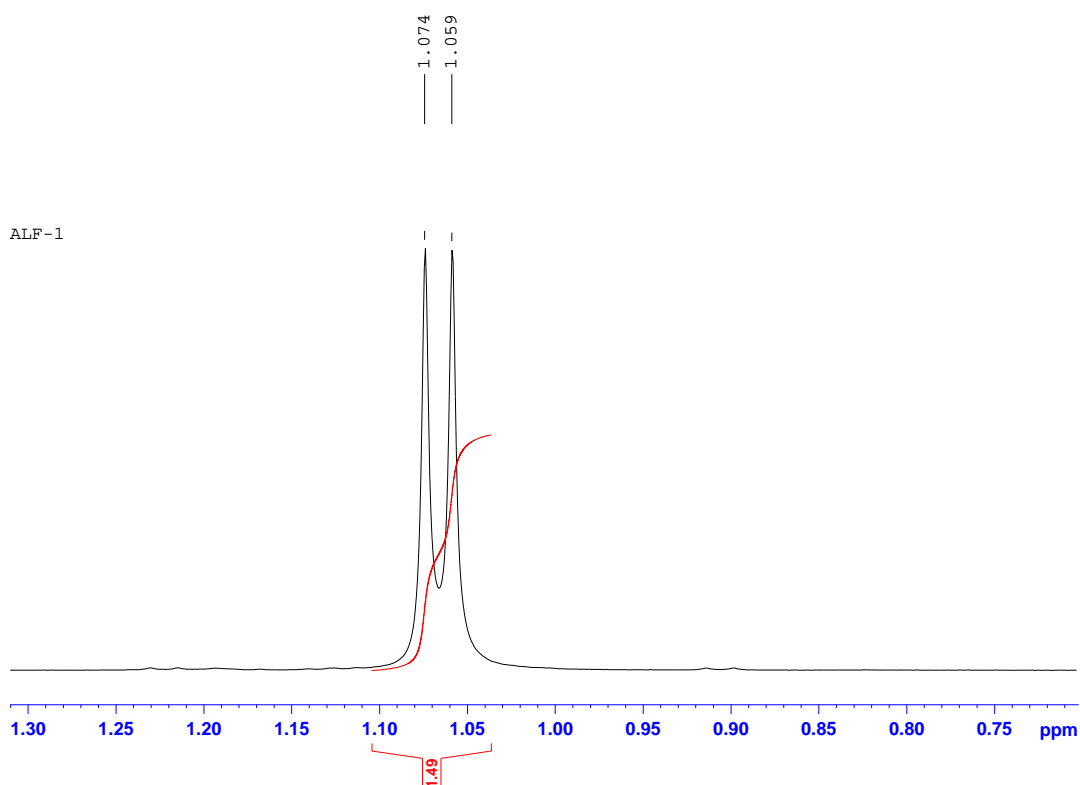


Figura 120: Expansão do espectro de RMN ^1H em CD_3OD , 400 MHz, do composto ALF-1

Em análise detalhada dos espectros de RMN ^{13}C -DEPT 90° e 135° (**Figuras 121-127**) podemos observar a presença de deslocamentos químicos que nos sugerem que o composto ALF-1 apresente 2 unidades de açúcar na sua estrutura química, em virtude da ligação ($1'''\rightarrow 6''$) e $\text{CH}_2 - 6''$ da glicose ser registrado em campo mais desprotegido do espectro, δ 68,65. O deslocamento químico em δ 18,01 nos sugeriu que esteja relacionado ao grupo metila da ramnose.

A ligação da unidade ramnopiranosose pelo átomo de oxigênio ligado ao carbono C-3 da aglicona baseou-se no sinal em δ 135,74. Os deslocamentos químicos em δ 145,85 e δ 135,74 foram atribuídos aos C-2 e C-3 respectivamente. Os deslocamentos químicos dos carbonos quaternários C-1' (123,17), C-2' (149,87) e C - 4' (159,40) e metínicos CH-3' (116,25), CH-5' (123,71) e CH-6' (117,93) concordam com a estrutura química das flavonas glicosídicas.

Cap. III. Resultados e Discussão

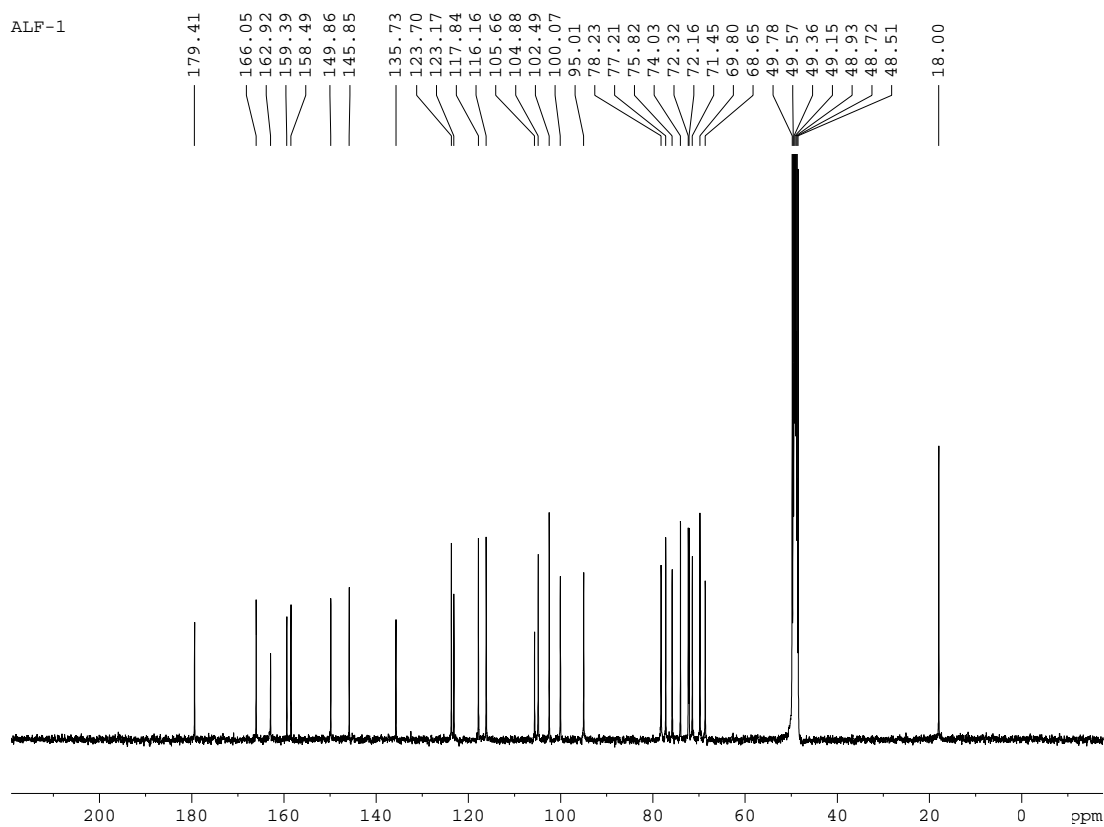


Figura 121: Espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD , 100 MHz, do composto ALF-1

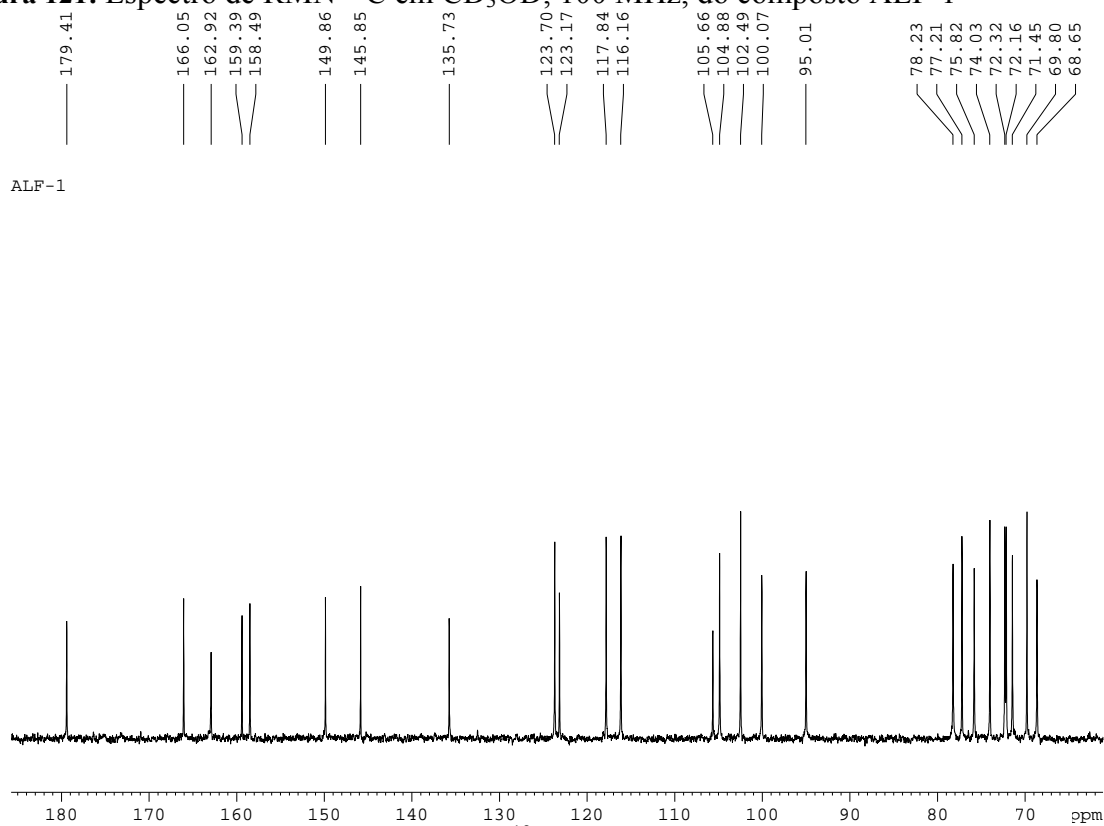


Figura 122: Expansão do espectro de RMN ^{13}C em CD_3OD , 100 MHz, do composto ALF-1

Cap. III. Resultados e Discussão

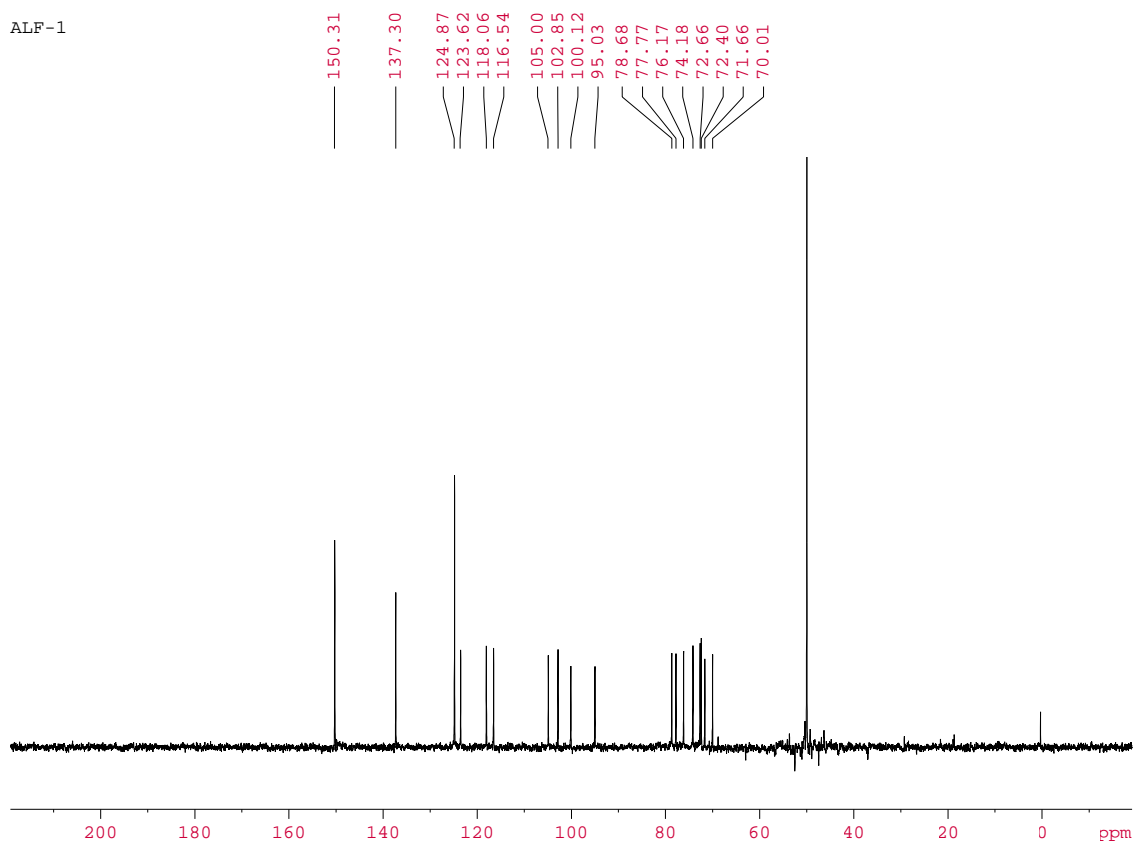


Figura 123: Espectro DEPT 90° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-1

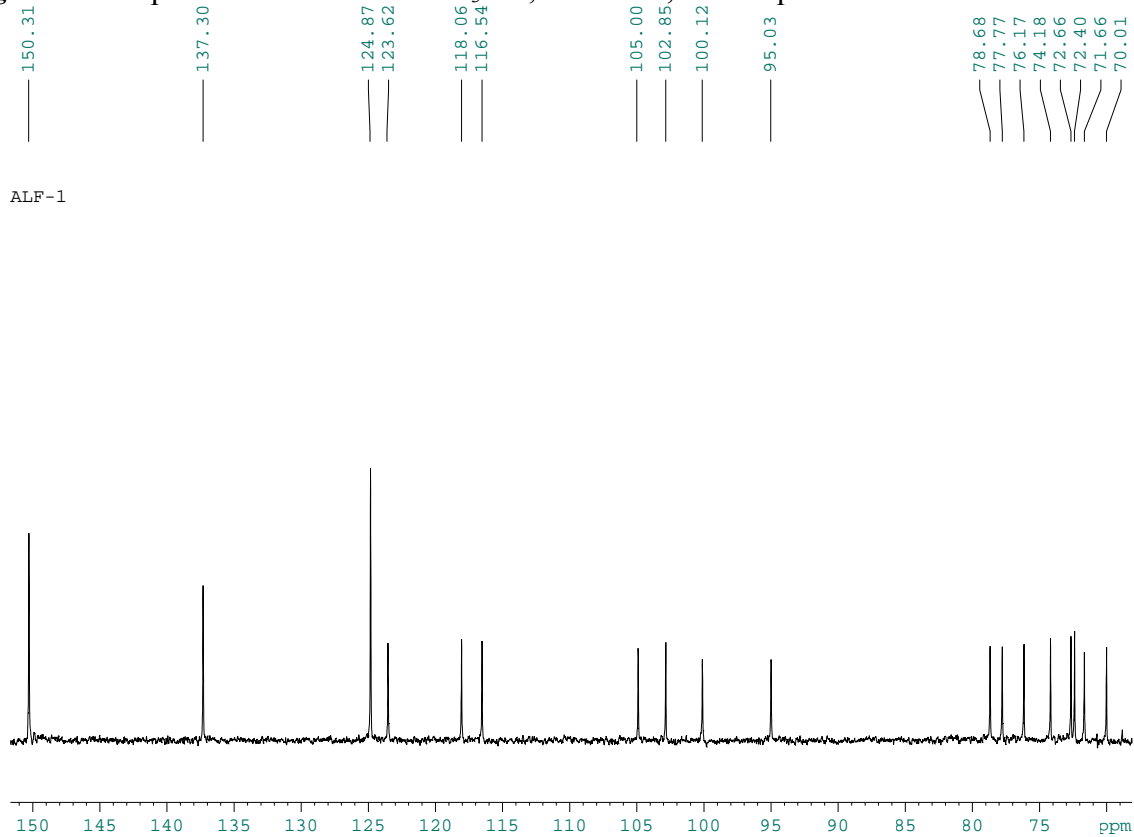


Figura 124: Expansão do espectro DEPT 90° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-1

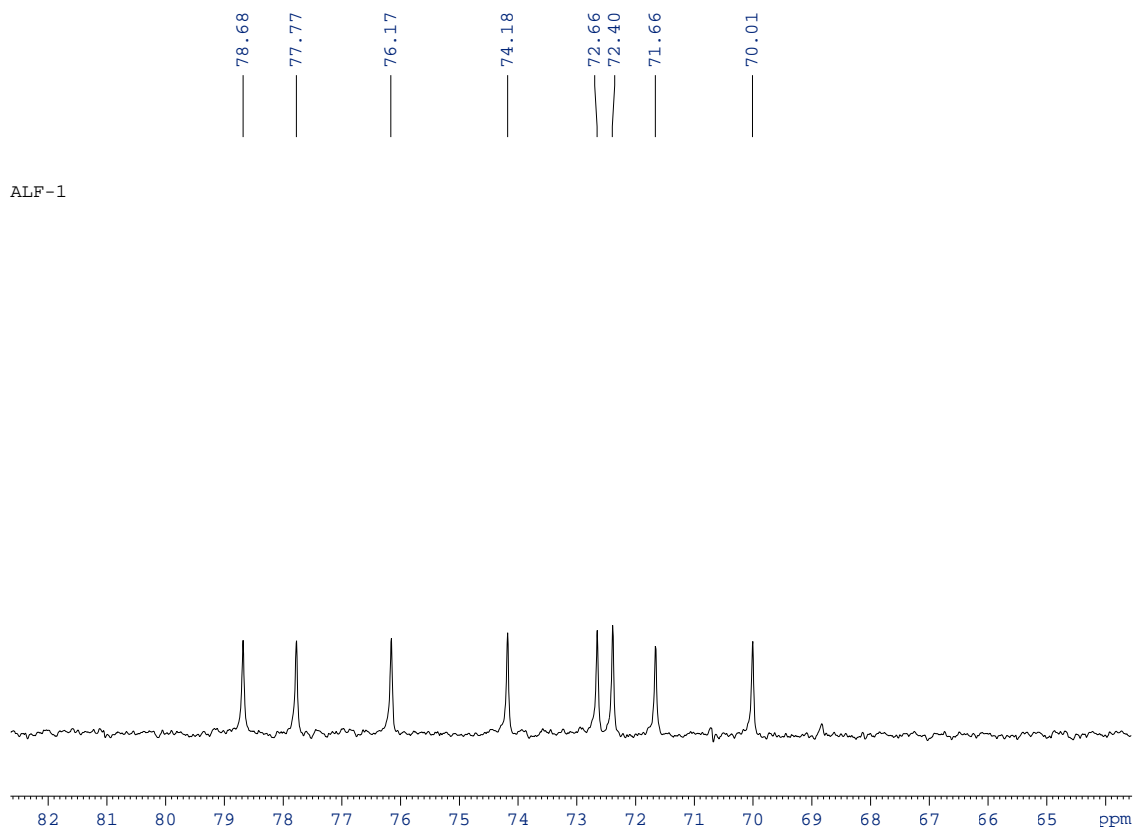


Figura 125: Expansão do espectro DEPT 90° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-1

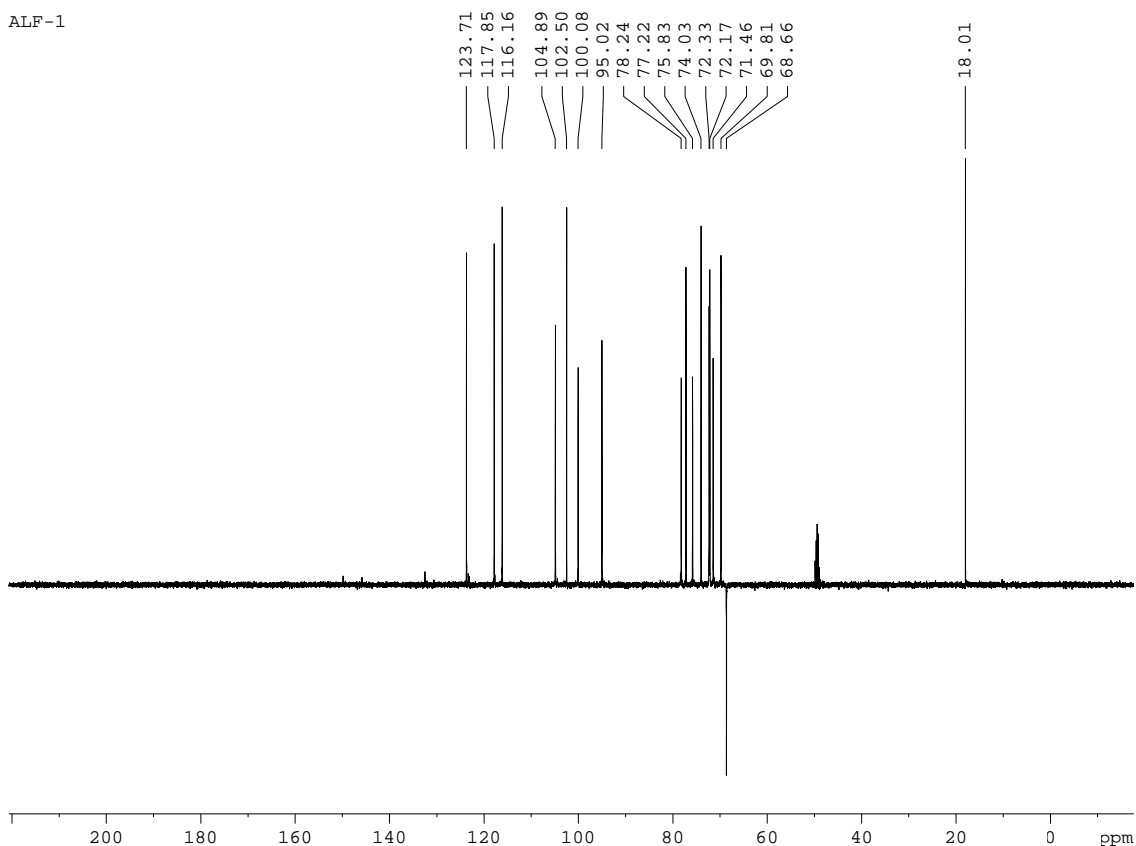


Figura 126: Espectro DEPT 135° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-1

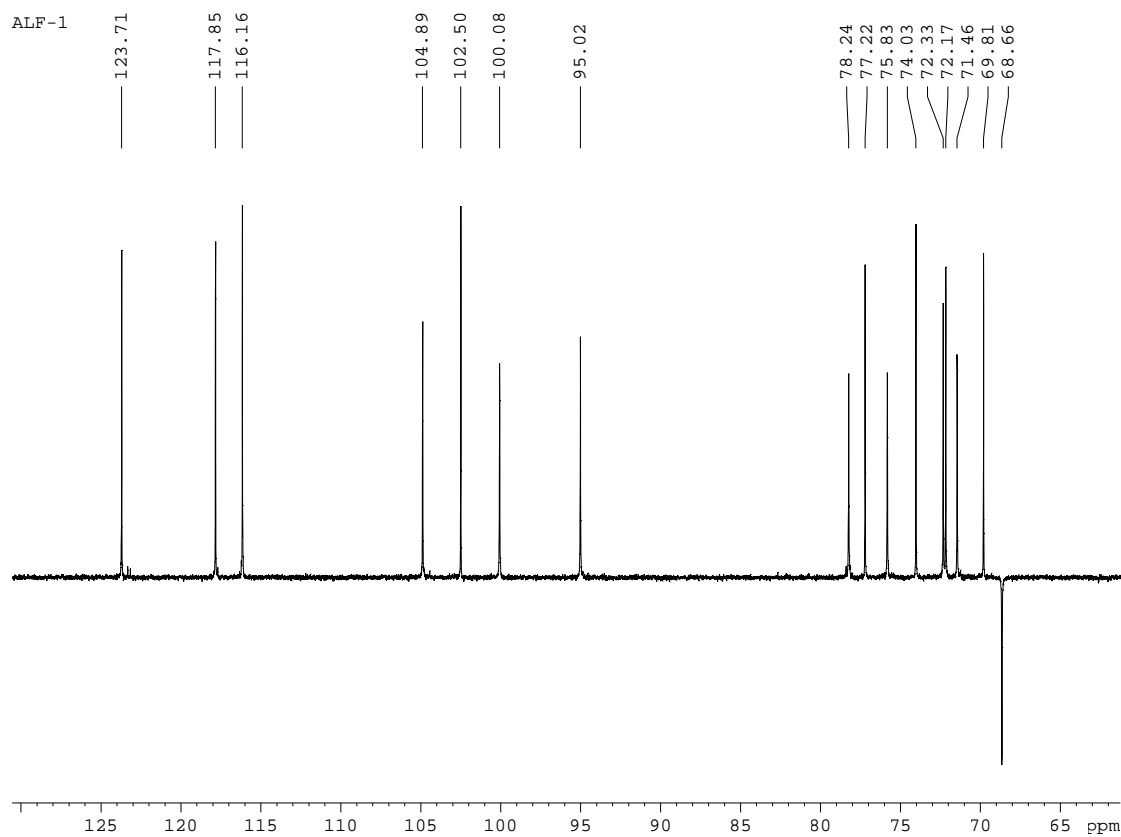


Figura 127: Expansão do espectro DEPT 135° em CD₃OD, 100 MHz, do composto ALF-1

O espectro HSQC confirma a correlação direta dos hidrogênios anoméricos em δ 5,00 e δ 4,46 aos carbonos anoméricos δ 104,88 e δ 102,48, respectivamente (**Figuras 128-129**).

Demais correlações importantes como δ_{H} 7,6/ δ_{C} 117,93; δ_{H} 7,5/ δ_{C} 123,7; δ_{H} 6,8/ δ_{C} 116,25; δ_{H} 6,1/ δ_{C} 100,07; δ_{H} 6,3/ δ_{C} 95,02 e δ_{H} 1,06/ δ_{C} 18,01 também foram observadas.

O espectro COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ mostra relação entre os sinais δ 7,6 (H-3'), δ 6,8 (H-3') e 7,54 (H-5') que constituem um sistema isolado. Como também confirma a correlação escalar δ 6,3 (H-8) e δ 6,1 (H-6) (**Figuras 130-131**).

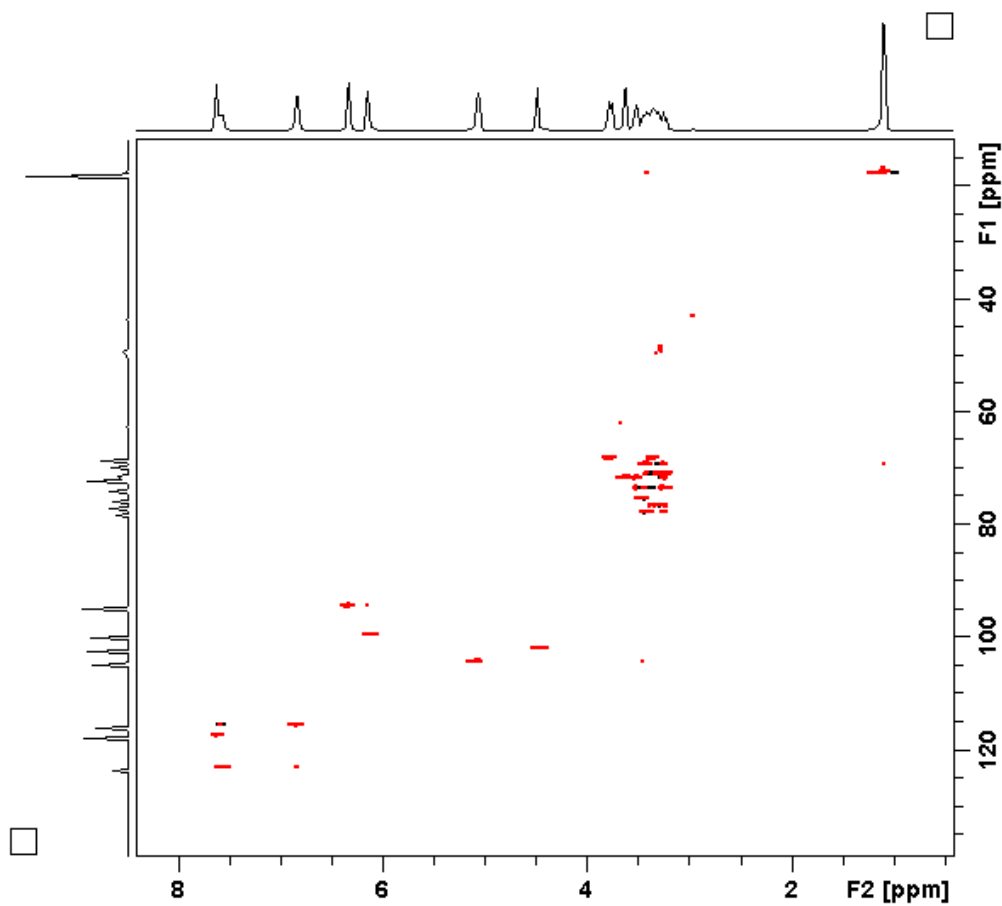


Figura 128: Mapa de contornos HSQC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do ALF-1

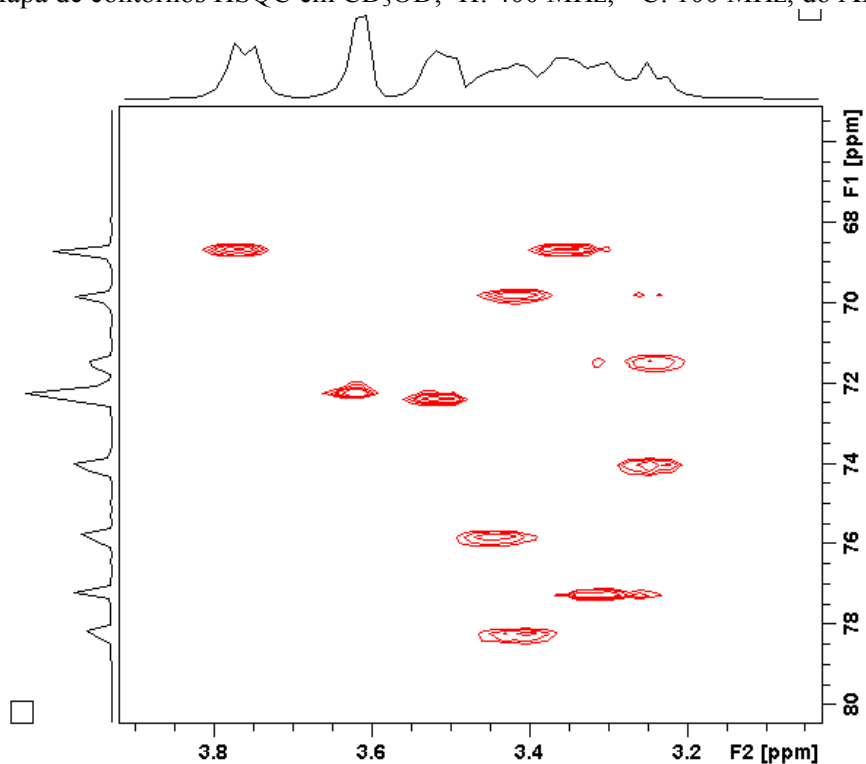


Figura 129: Expansão do mapa de contornos HSQC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-1

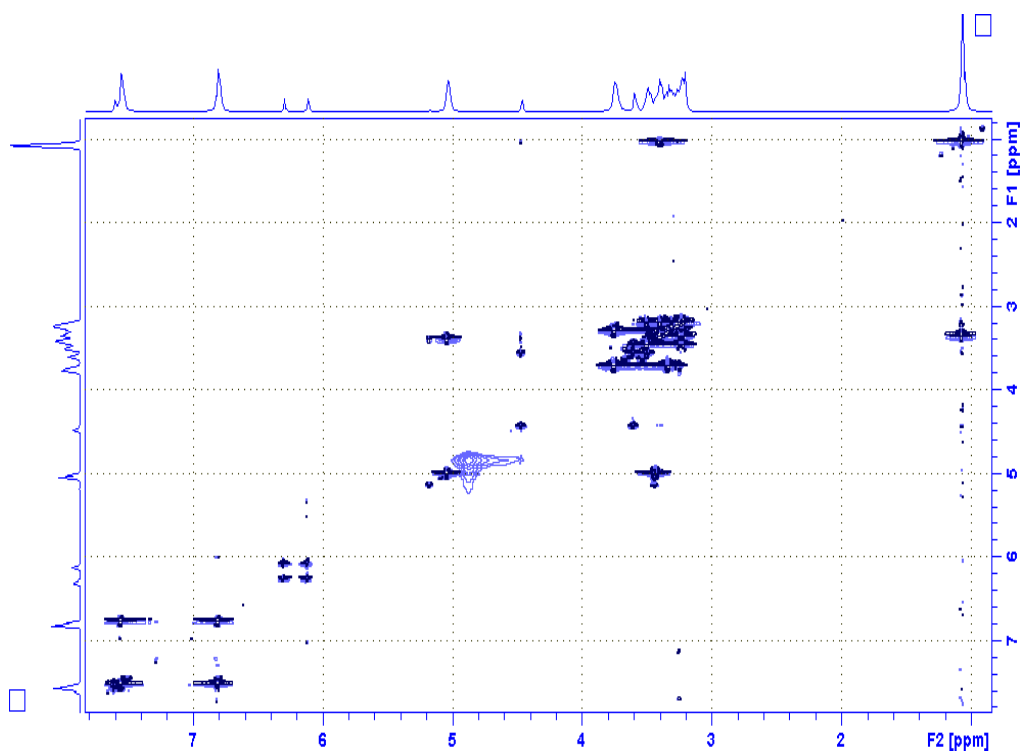


Figura 130: Mapa de contornos COSY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-1

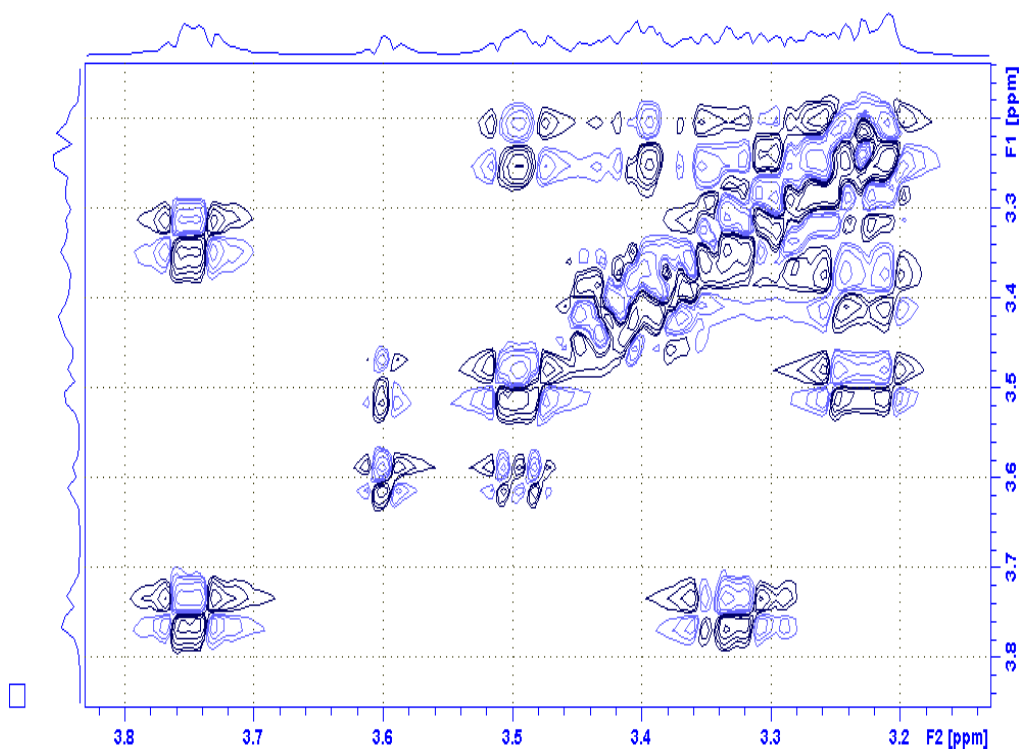


Figura 131: Expansão do Mapa de contornos COSY em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-1

O espectro HMBC (**Figuras 132-134**) revelou a correlação do hidrogênio anomérico H¹-1 (δ 5,0) com o C-3 (135,74) confirmando a posição do dissacarídeo no C-3, como também através da observação da correlação ($^2J_{CH}$) do H-6 (δ_H 6,1) com o C-7 (δ_C 166,06) e do mesmo H-6 (δ_H 6,1) com o C-5 (δ_C 162,92) foi possível afirmar que os carbonos C-5 e C-7 contêm hidroxila. A correlação do H-6' (δ_H 6,8) com o C-2 (δ_C 145,85) sugeriu que o anel B possui um padrão de oxigenação nas posições 2' e 4'.

Outra informação relevante extraída do HMBC consiste na seguinte observação: sabendo que a região dos prótons anoméricos está na faixa de 5.4 – 4.2 e que nesta região (de acordo com os δ observados nos espectros de 1H e HSQC) apenas revelam dois sinais δ 5.0 e δ 4.46, nenhuma outra correlação foi observada no HMBC destes com demais carbonos da aglicona. Isto confirma ainda mais a hipótese de que há a presença realmente de um dissacarídeo e não de 2 monossacarídeos em posições diferentes no núcleo flavonoidídico.

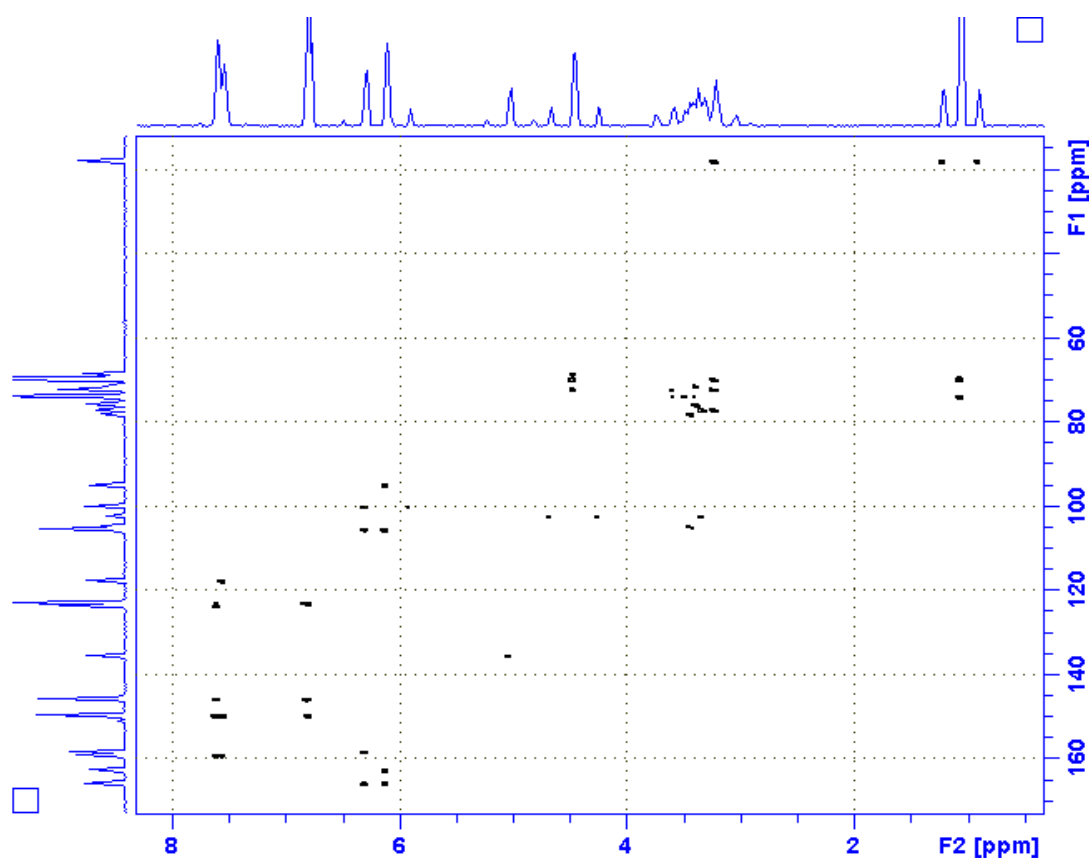


Figura 132: Mapa de contornos HMBC em CD₃OD, 1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-1

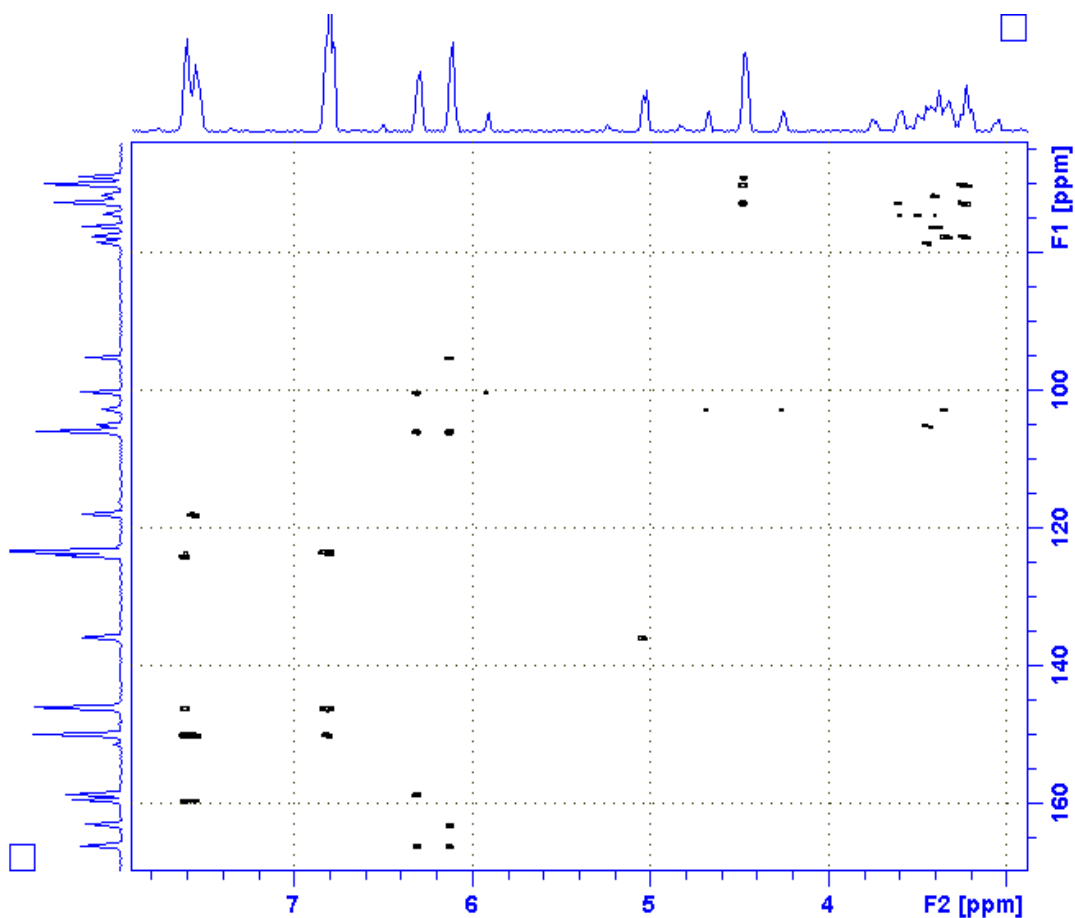


Figura 133: Expansão do mapa de contornos HMBC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-1

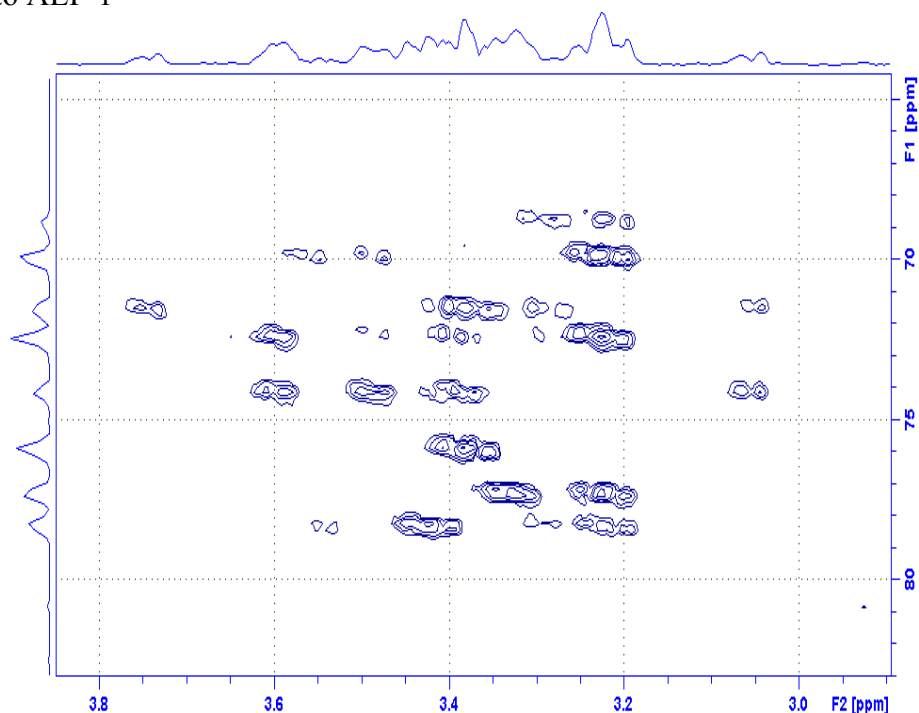


Figura 134: Expansão do mapa de contornos HMBC em CD_3OD , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-1

Após análise do HMBC não resta dúvida da confirmação da natureza glicosídica destas substâncias anteriormente observadas pelos espectros 2D de correlação homonuclear (COSY) e heteronuclear (^1H - ^{13}C -HSQC).

Neste ponto podemos caracterizar e determinar a localização da unidade diglicosídica no átomo de oxigênio do carbono C-3 com base fundamentada nas seguintes observações: a) o deslocamento químico do átomo de carbono C-2 (δ_{C} 145,85) revelado pelo espectro de RMN ^{13}C sugeriu a presença de glicosídeo em C-3; b) a correlação a longa distância entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 5,00, d, $J = 7,43$ Hz, hidrogênio da glicose em posição axial) e o carbono C-3 (δ_{C} 135,74, $^3J_{\text{CH}}$), observada no espectro HMBC, permitiu definir a ligação 3-*O*-rutinosídeo; c) o deslocamento químico do átomo de carbono metilênico da glicose CH $_2$ -6'' (δ_{C} 68,65) permitiu a localização da unidade ramnose restante neste átomo de carbono, já que o sinal de grupo hidroximetilênico livre de uma unidade glicopiranosila aparece em torno de δ_{C} 62,12 (AGRAWAL, 1992; PIZZOLATTI *et al.*, 2003); d) o espectro HMBC revelou a interação heteronuclear do hidrogênio anomérico H-1''' (δ_{H} 4,46, d, $J = 1,23$ Hz, hidrogênio da ramnose em posição equatorial) com o carbono CH $_2$ -6'' (δ_{C} 68,65) da glicose.

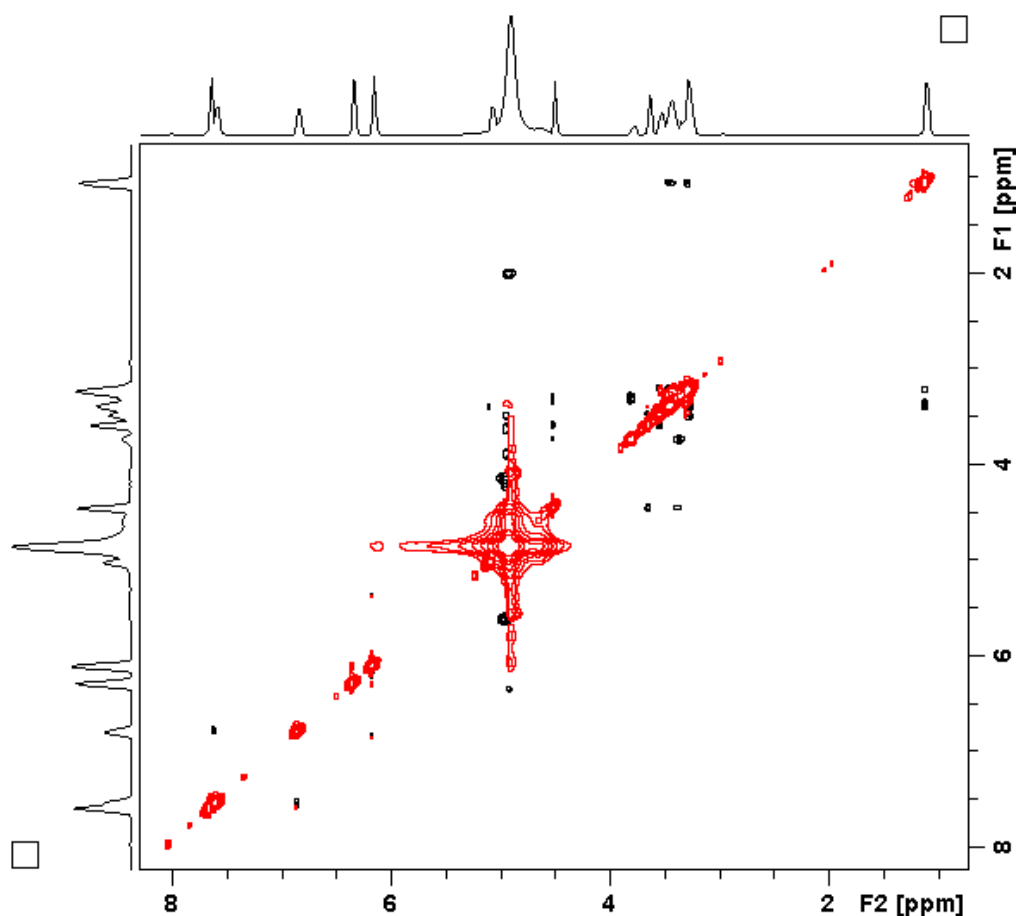


Figura 135: Mapa de contornos NOESY em CD $_3$ OD, ^1H : 400 MHz, do composto ALF-1

Os dados obtidos nos mapas de contorno COSY e NOESY ($^1\text{H} \times ^1\text{H}$); e HSQC e HMBC ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$), confirmam as atribuições de ALF-1 (**Figuras 135-136, Tabela 27**). A análise do espectro NOESY e a medida de rotação óptica específica $[\alpha]_D^{25} = +26,0^\circ$, MeOH proporcionaram as informações relacionadas com a estereoquímica da molécula. A análise dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D (**Tabela 27**) e a comparação com valores encontrados na literatura (RASTRELLI, *et al.*, 1995) permitiram identificar a substância ALF-1 como o flavonóide glicosilado morina-3-*O*-rutinosídeo, sendo o primeiro relatado no gênero *Acacia*.

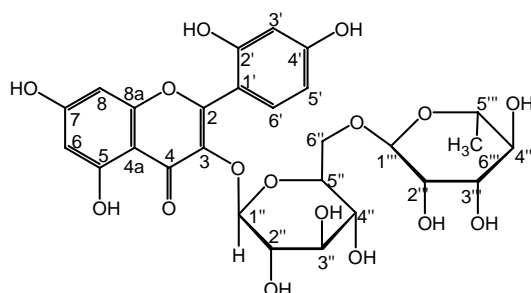


Figura 136: Morina 3-*O*-rutenosídeo

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 137**) indicou a massa molecular 610 u, com a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ sugerindo tratar-se da Morina 3-*O*-rutenosídeo, em conformidade com outras técnicas de identificação.

Pode-se observar que no esquema 7 o pico M^+ é relativamente baixo indicando uma possível liberação do rutenosídeo, deixando a morina livre. Picos característicos da morina em m/z 303, pico base, m/z 287 e m/z 271 confirma a liberação do rutenosídeo e várias quebras da morina. A literatura sugere uma possível Retro Diels Alder com picos em m/z 149 e 137, porem estes não são representativos no espectro de massa. O grupo rutenosídeo é representado pelas massas em m/z 308, 190, 162 e 118. (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

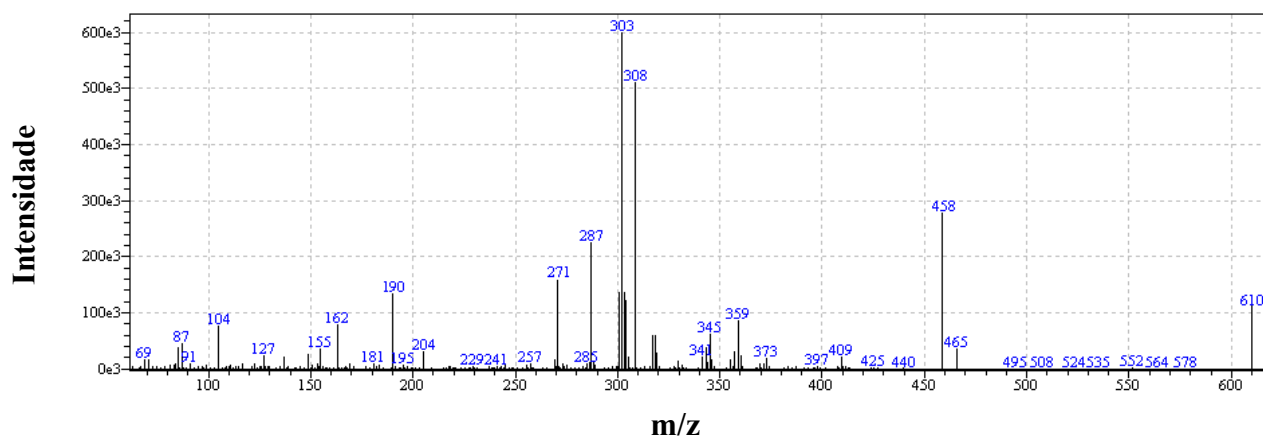
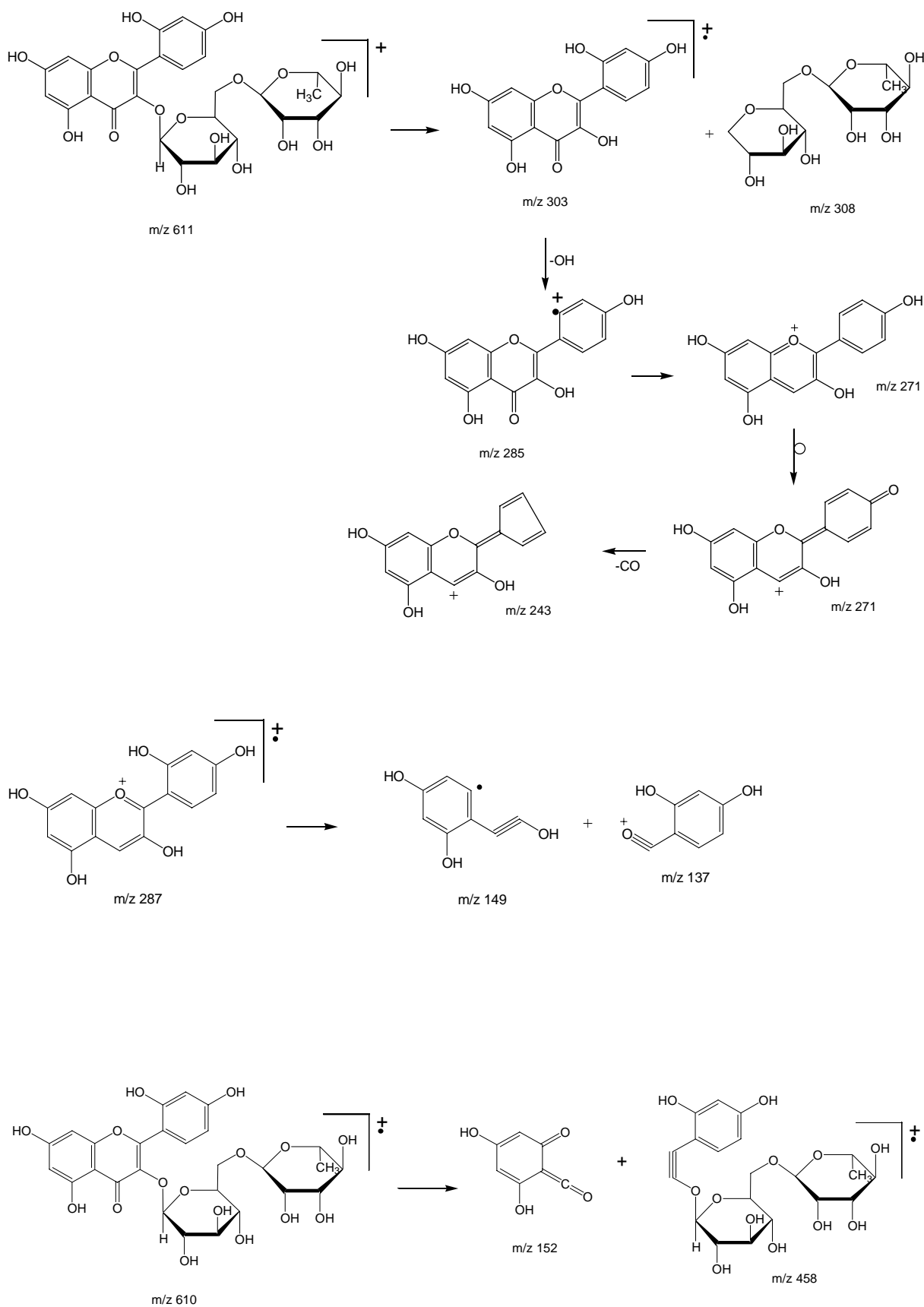
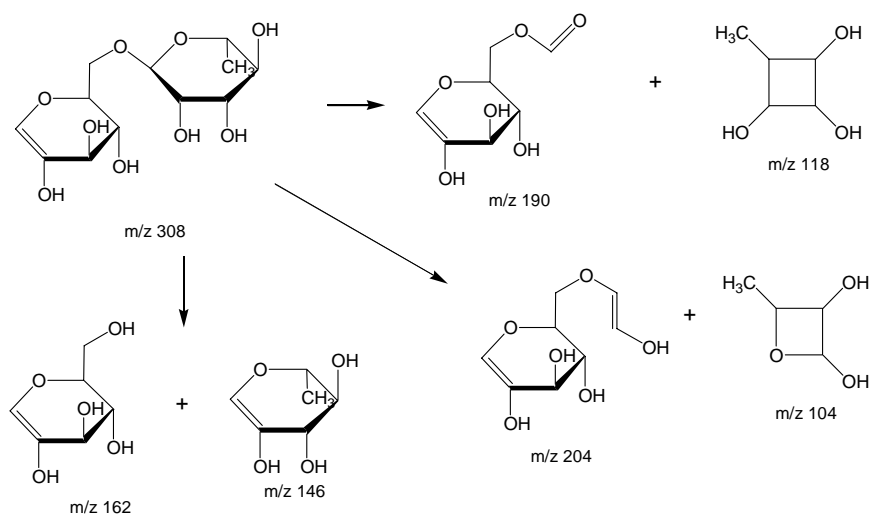
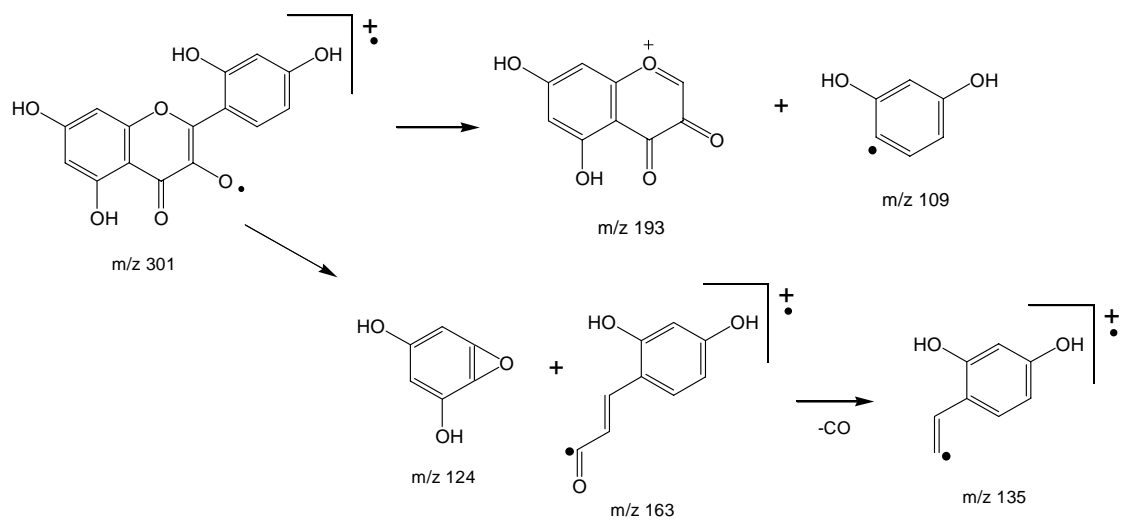


Figura 137: Espectro de massas da substância ALF-1.



Esquema 7: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-1



Esquema 7 (Cont.): Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-1

Tabela 27: RMN do composto ALF-1 em MeOD, deslocamento em δ .

C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	COSY	HMBC	NOESY
2	145,85 C				7,6; 6,8	
3	135,74 C				5,0	
4	179,41 C					
5	162,92 C				6,1	
6	100,07 CH	6,1 d	1,97	6,3	6,3	
7	166,06 C				6,3; 6,1	
8	95,02 CH	6,3 d	1,92	6,1	6,1	5,0
8a	158,50 C				6,3	
4a	105,66 C				6,3; 6,1; 3,4	
1'	123,17 C				6,8; 7,6	
2'	149,87 C				7,6; 6,8	
3'	117,93 CH	7,6 d	2,16		7,54	
4'	159,40 C				7,6	
5'	123,71 CH	7,54 dd	8,47 e 2,09	6,8	7,6	6,8; 3,4
6'	116,25 CH	6,8 d	8,45	7,54		7,56; 6,3; 6,1
1''	104,88 CH	5,00 d	7,43		3,45	3,5; 3,6; 4,46
2''	75,81 CH	3,38 m			3,28	
3''	78,24 CH	3,35 m			3,22; 3,42	
4''	71,44 CH	3,2-3,4 m			3,74; 3,38; 3,3; 3,05	
5''	77,22 CH	3,23 m			3,22; 3,32	
6''	68,65 CH ₂	3,75 d			4,46; 3,31; 3,22	
1'''	102,48 CH	4,46 d	1,23		3,34	3,6; 3,31
2'''	72,31 CH	3,49 dd			4,46; 3,22; 3,29; 3,49; 3,59; 3,4	
3'''	72,16 CH	3,6 m				
4'''	74,03 CH	3,5 d			1,06; 3,05; 3,38; 3,48; 3,59	
5'''	69,80 CH	3,3-3,4 m			1,06; 4,46; 3,23; 3,47; 3,5	
6'''	18,01 CH ₃	1,06 d	6,14			3,4; 3,2

Dados de RMN ^1H 400 MHz, ^{13}C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

m=multipeto
dd=duplo dupeto
d= dupeto
S=simpleto

III.5.4.4 – Identificação do ALF-16

A substância ALF-16 foi obtida na forma de um sólido amorfo branco apresentando ponto de fusão 173-175 °C

Em uma primeira visualização geral o espectro de RMN de ^1H dessa substância (**Figura 138**) revelou a presença de sinais característicos de uma flavona metoxilada devido à observação de sinais característicos na região de hidrogênios de metoxilas aromáticas (3,7-4,1).

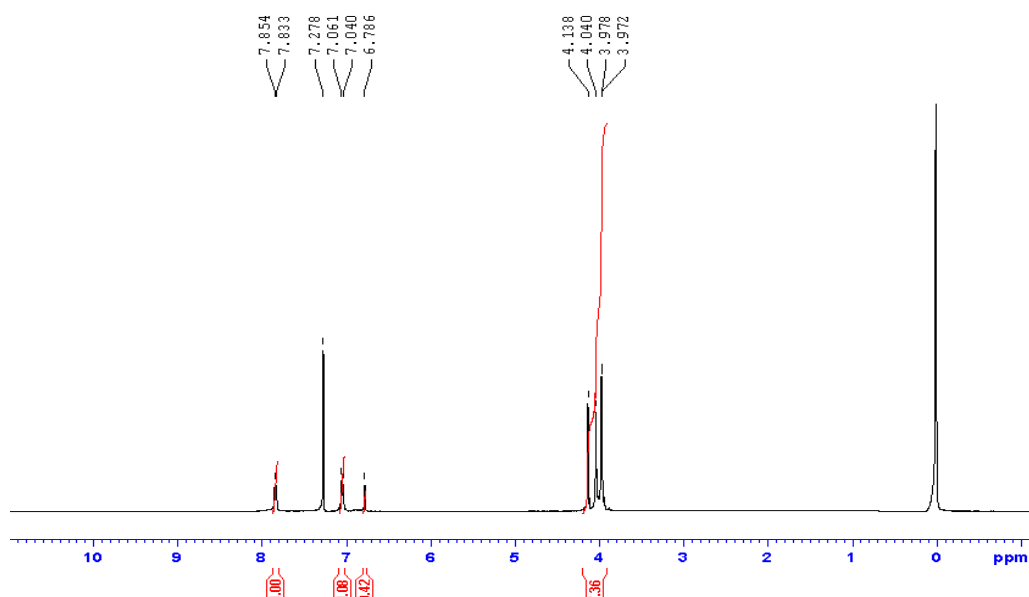


Figura 138: Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALF-16

Em análise detalhada podemos observar a presença dos sinais dupletos em δ 7,05 ($J = 8,2$ Hz) e em 7,84 ($J = 8,2$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-3', H-5' e H-2', H-6', respectivamente, na região de hidrogênios aromáticos do anel B presentes em flavonóides. O deslocamento químico em δ 6,78 (s) sugere que seja o hidrogênio H-3 do anel C da flavona. Analisando a região de hidrogênios de metoxilas aromáticas fica sugestivo que a presença dos sinais desses hidrogênios em δ 3,97 s, δ 3,98 s, δ 4,04 s, δ 4,14 s (**Figuras 139-140**).

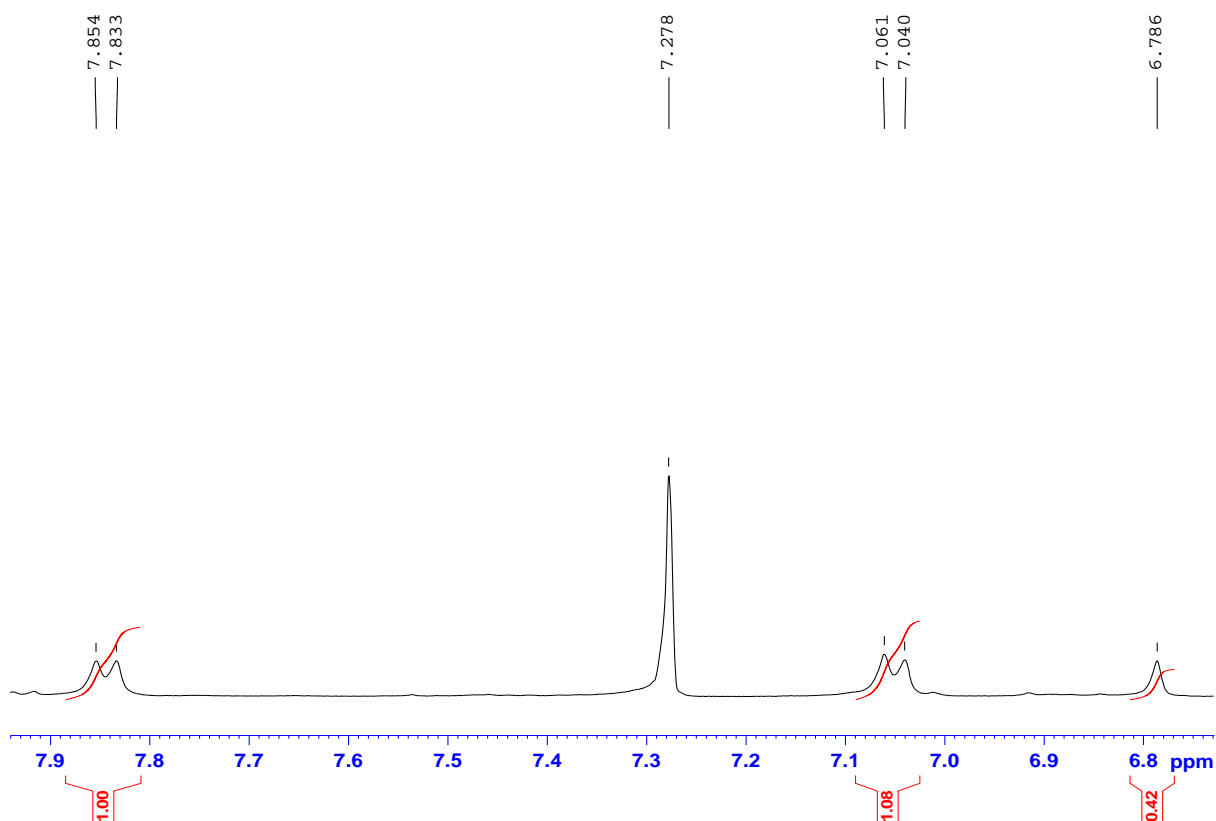


Figura 139: Expansão do espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALF-16

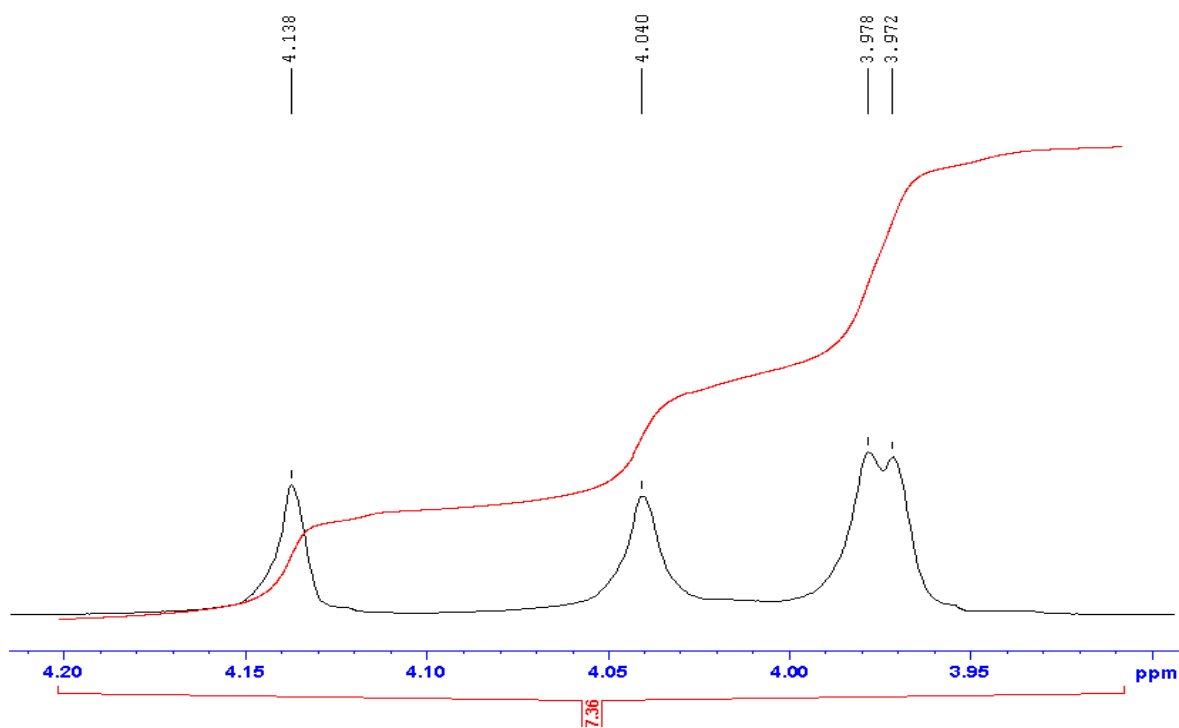


Figura 140: Expansão do espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , 400 MHz, do composto ALF-16

Na análise dos espectros RMN ^{13}C , verifica-se a presença inicial de 17 sinais. Porém dois sinais são equivalentes, os carbonos 2' e 6' com deslocamento químico em δ 128,21, e os carbonos 3' e 5' em δ 116,50, sugerindo um total de 19 átomos. Sendo que após análise conjunta dos espectros de RMN $^{13}\text{C}/\text{DEPT } 90^\circ$ e 135° possibilitaram a identificação de quatro carbonos metílicos (CH_3), cinco carbonos metínicos (CH), e dez carbonos não hidrogenados confirmando a presença de dezenove carbonos (**Figuras 141-144**).

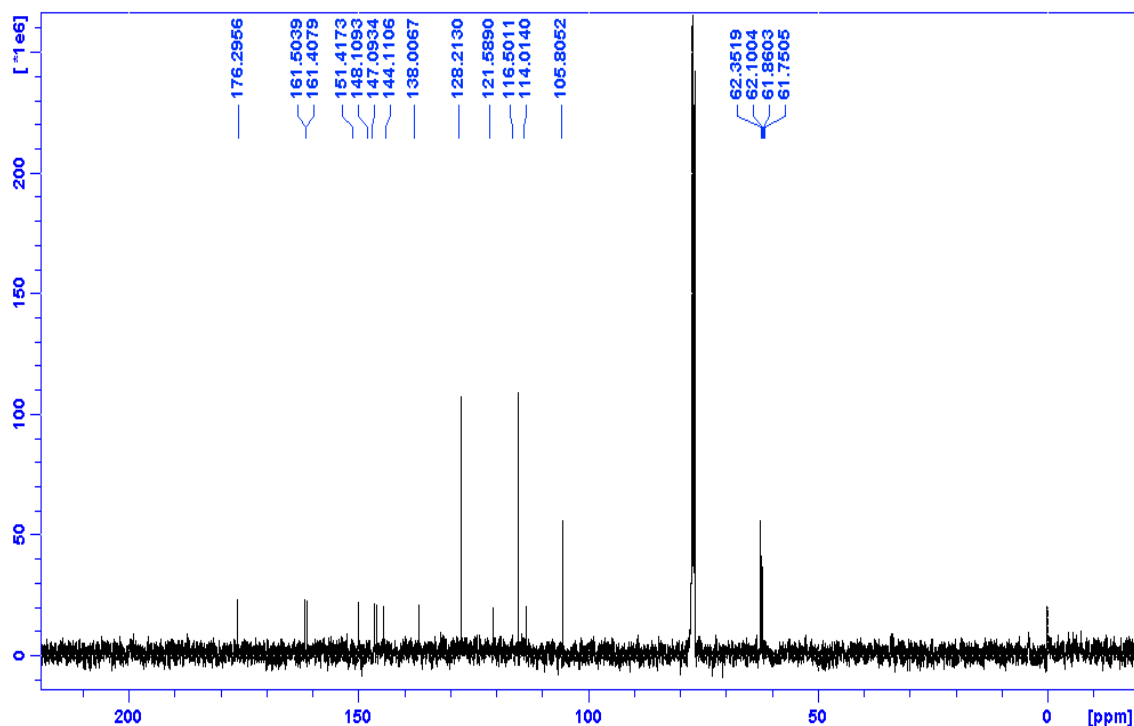


Figura 141: Espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALF-16

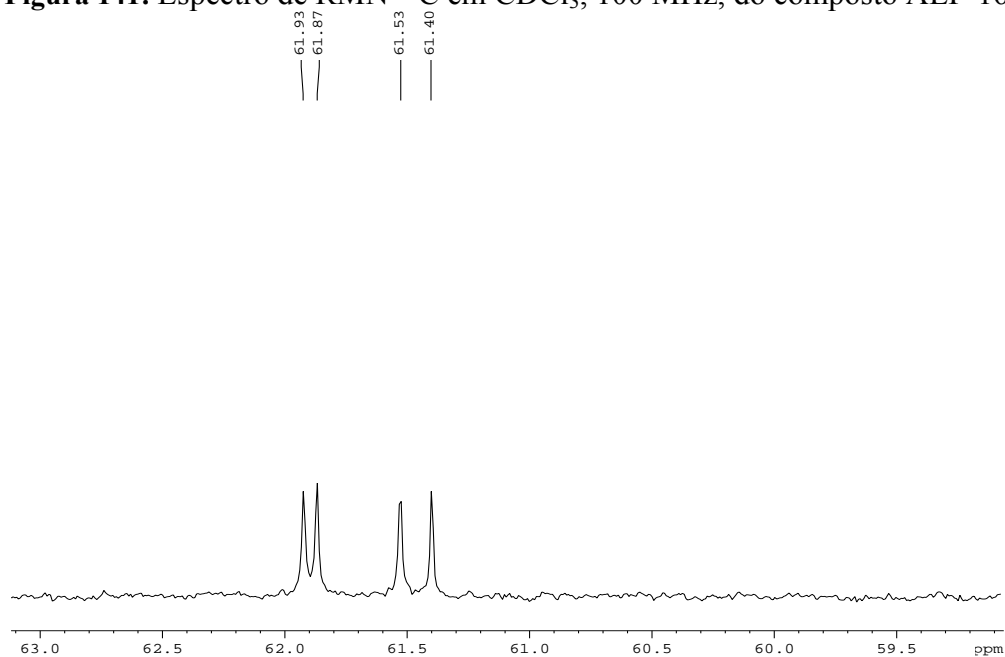


Figura 142: Expansão do espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , 100 MHz, do ALF-16

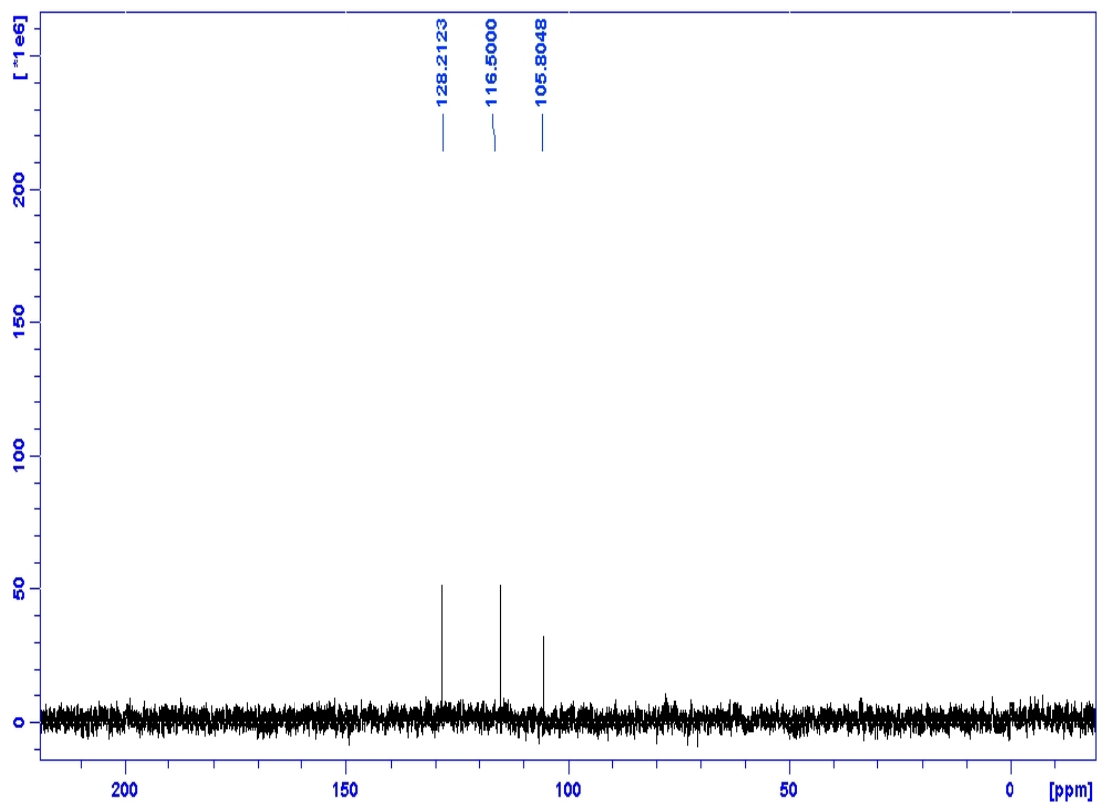


Figura 143: Espectro DEPT 90° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALF-16

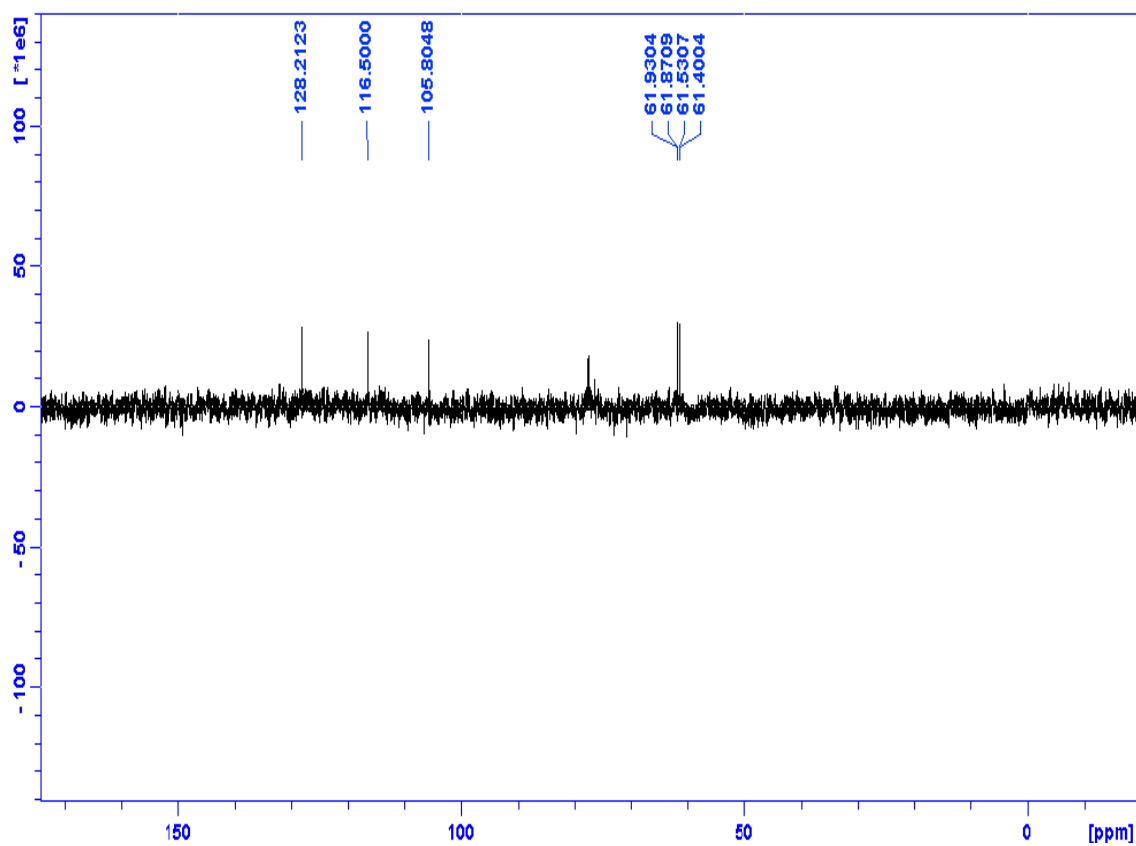


Figura 144: Espectro DEPT 135° em CDCl_3 , 100 MHz, do composto ALF-16

Em conformidade com as análises de RMN de ^1H os espectros de ^{13}C também se mostram condizentes com a presença de esqueletos de flavonas com o anel A dos tipos 5,6,7,8-tetrassubstituídos e anéis B dos tipos 1,4-dissubstituídos. Dentre esses carbonos, foram identificados valores de deslocamentos químicos referentes a um grupo carbonila conjugado δ 176,29 (C, C-4) e para quatro grupos metoxilas relacionados: δ 62,35 no C-7; δ 62,10 no C-8; δ 61,86 no C-6 e δ 61,75 no C-5. Estas informações, associadas à presença de sinais atribuídos ao C-2 (δ 161,50) e ao C-3 (δ 105,80) sugeriram para a estrutura de flavona. Os 8 carbonos não hidrogenados sugerem de acordo com o HSQC as seguintes posições: δ 147,09 (C-5), δ 144,11 (C-6), δ 151,41 (C-7), δ 138,0 (C-8), δ 148,10 (C-8a), δ 114,01 (C-4a), δ 121,58 (C-1'), δ 161,40 (C-4') (Figura 145).

Em análise do COSY podemos observar as seguintes correlações: entre o duplete em δ 7,84 (H-2' e H-6') e o duplete em δ 7,05 (H-3' e H-5') (Figura 146).

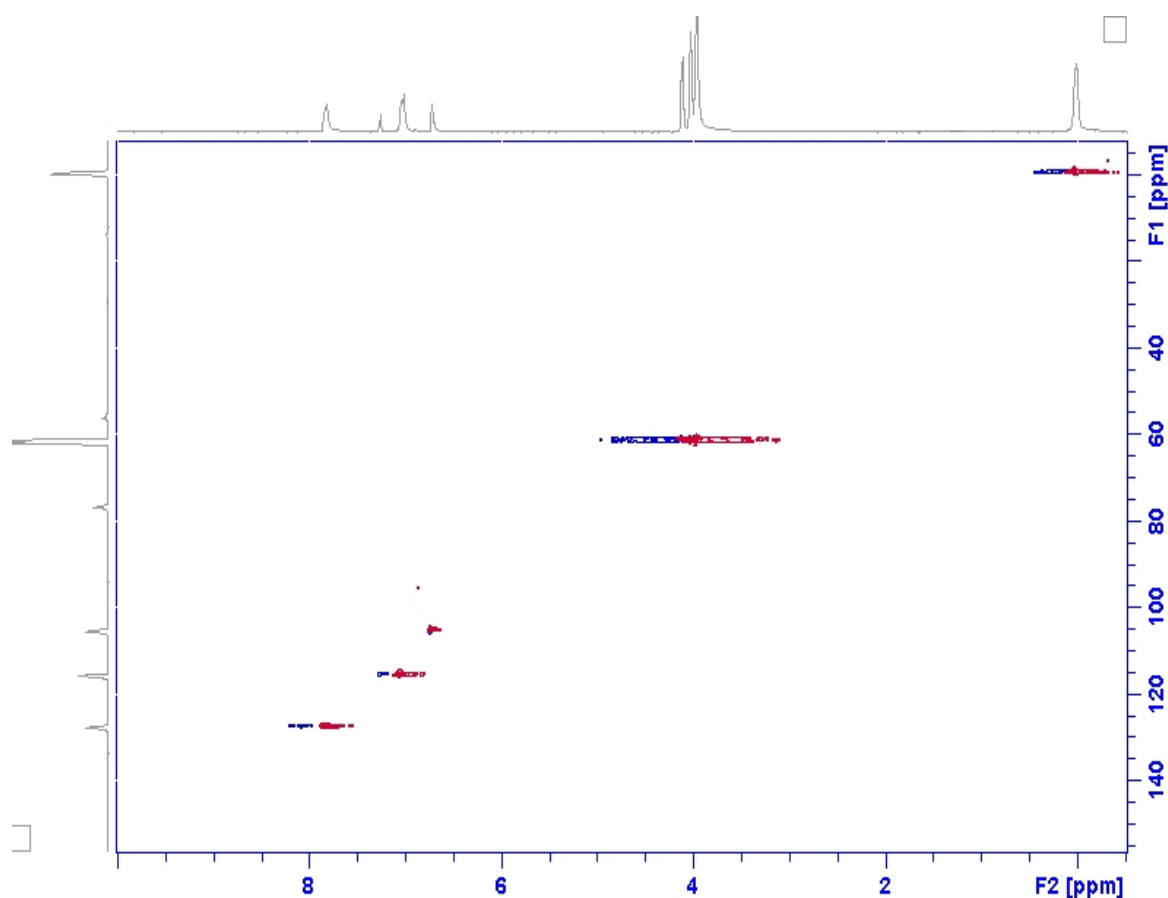


Figura 145: Mapa de contornos HSQC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do composto ALF-16

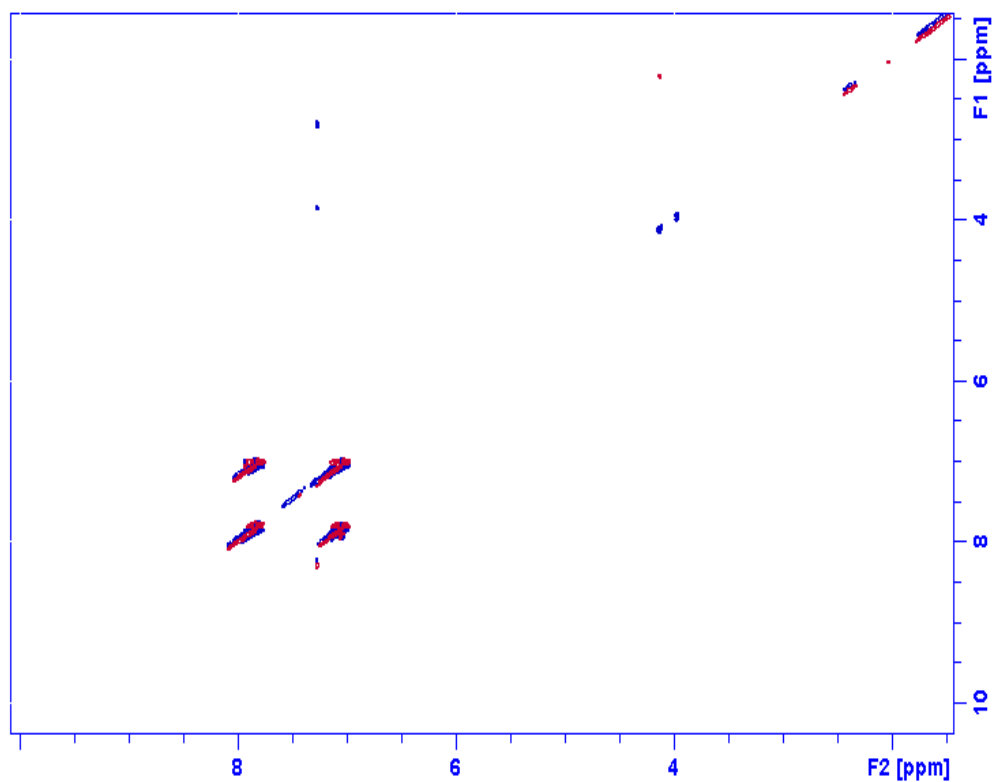


Figura 146: Mapa de contornos COSY em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, do composto ALF-16

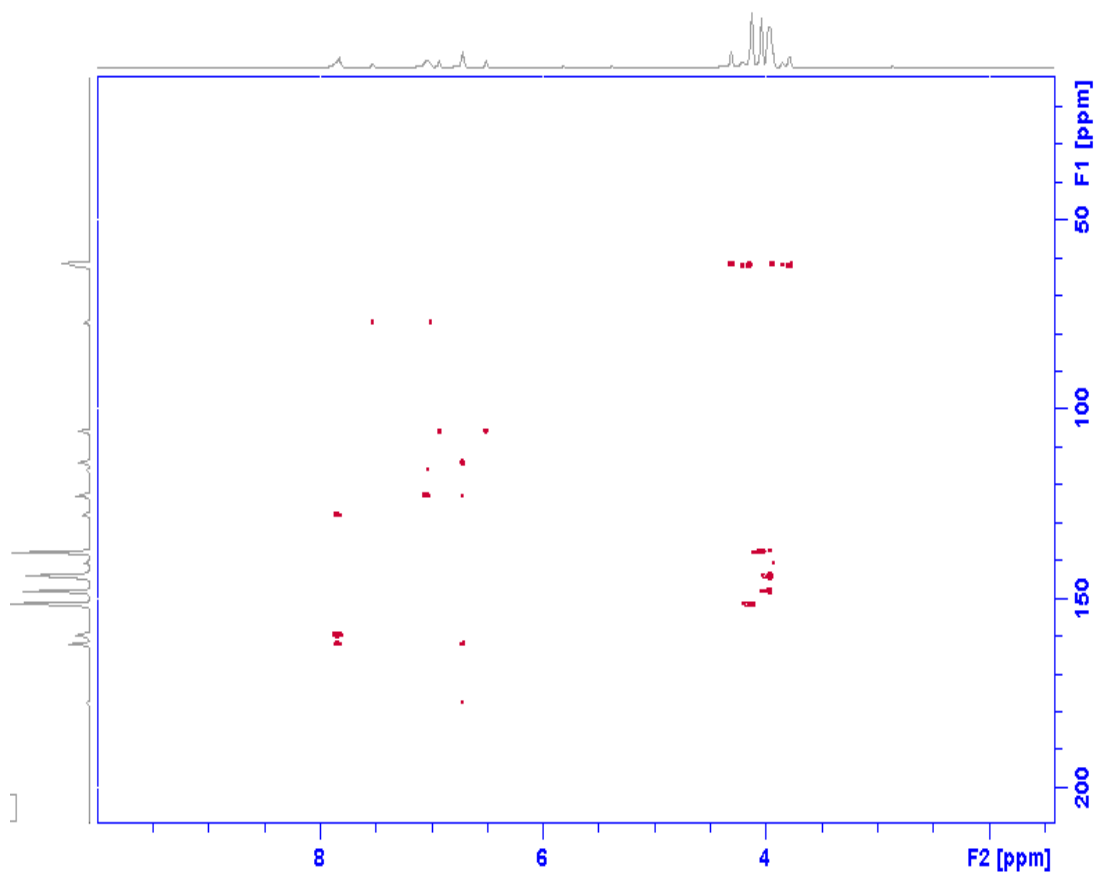


Figura 147: Mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do ALF-16

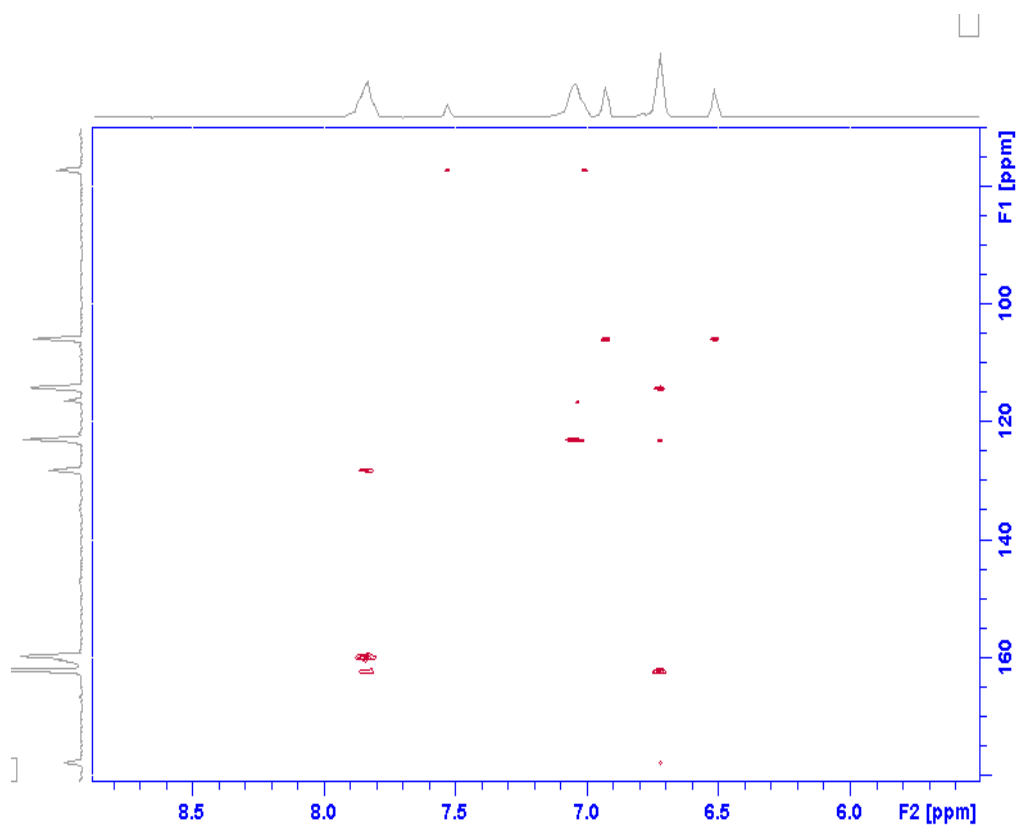


Figura 148: Expansão do mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do ALF-16

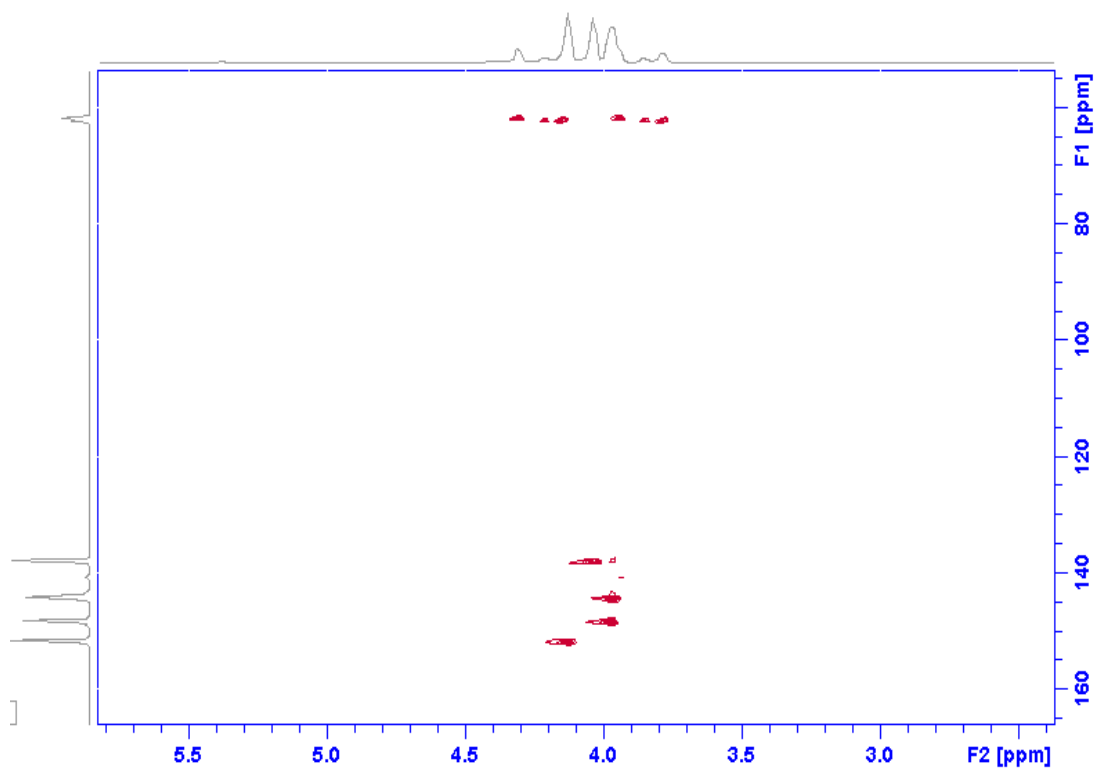


Figura 149: Expansão do mapa de contornos HMBC em CDCl_3 , ^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz, do ALF-16

Estas informações juntamente com as correlações observadas nos mapas de contorno dos respectivos espectros HSQC e HMBC (**Figuras 147-149, Tabela 28**) permitiram propor a seguinte estrutura para o composto ALF-16 (**Figura 150**).

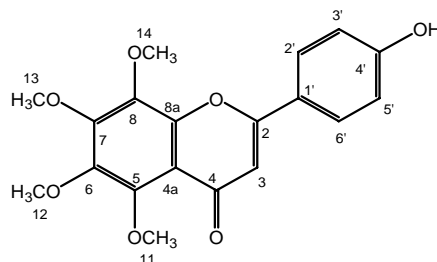


Figura 150: 4'-hidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona

A EM foi realizada por finalidade conclusiva. Logo, o perfil do espectro de massa obtido por ionização química no modo positivo (**Figura 151**) indicou a massa molecular 358 u, com a fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_7$ sugerindo tratar-se da 4'-hidroxi-5,6,7,8-tetrametoxiflavona, em conformidade com outras técnicas de identificação.

O fragmentograma mostra picos característicos de perda de metila e metoxila em m/z 343, 327, 312. Os picos em m/z 240 e 118 mostra uma RDA seguida de perda de CO em m/z 212. A hidroxila no anel B é confirmada pelo fragmento em m/z 93. As posições das metoxilas no anel A é confirmada pelo fragmento em m/z 196 (**Esquema 8**).

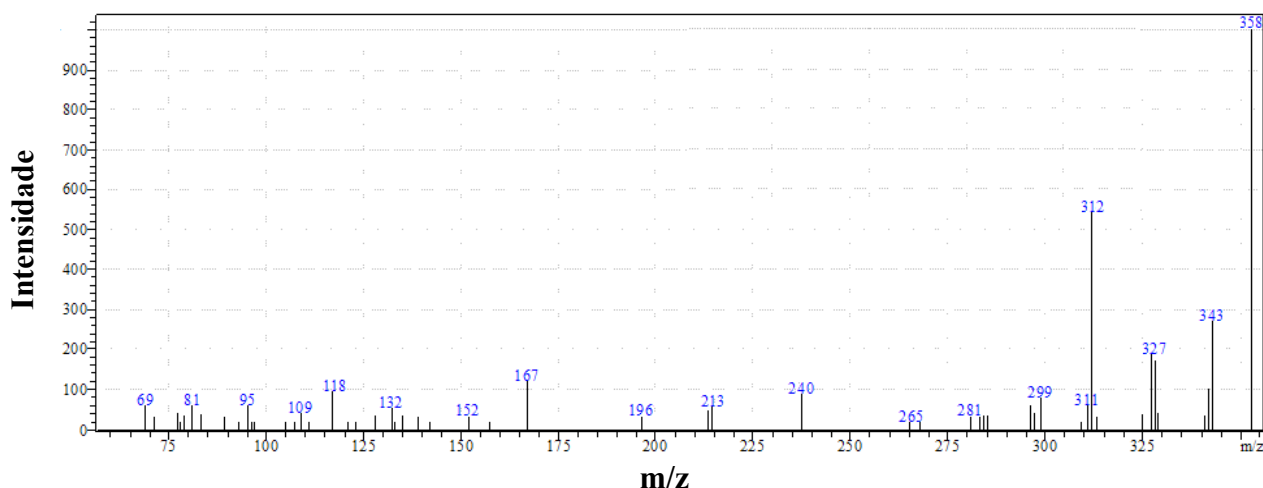
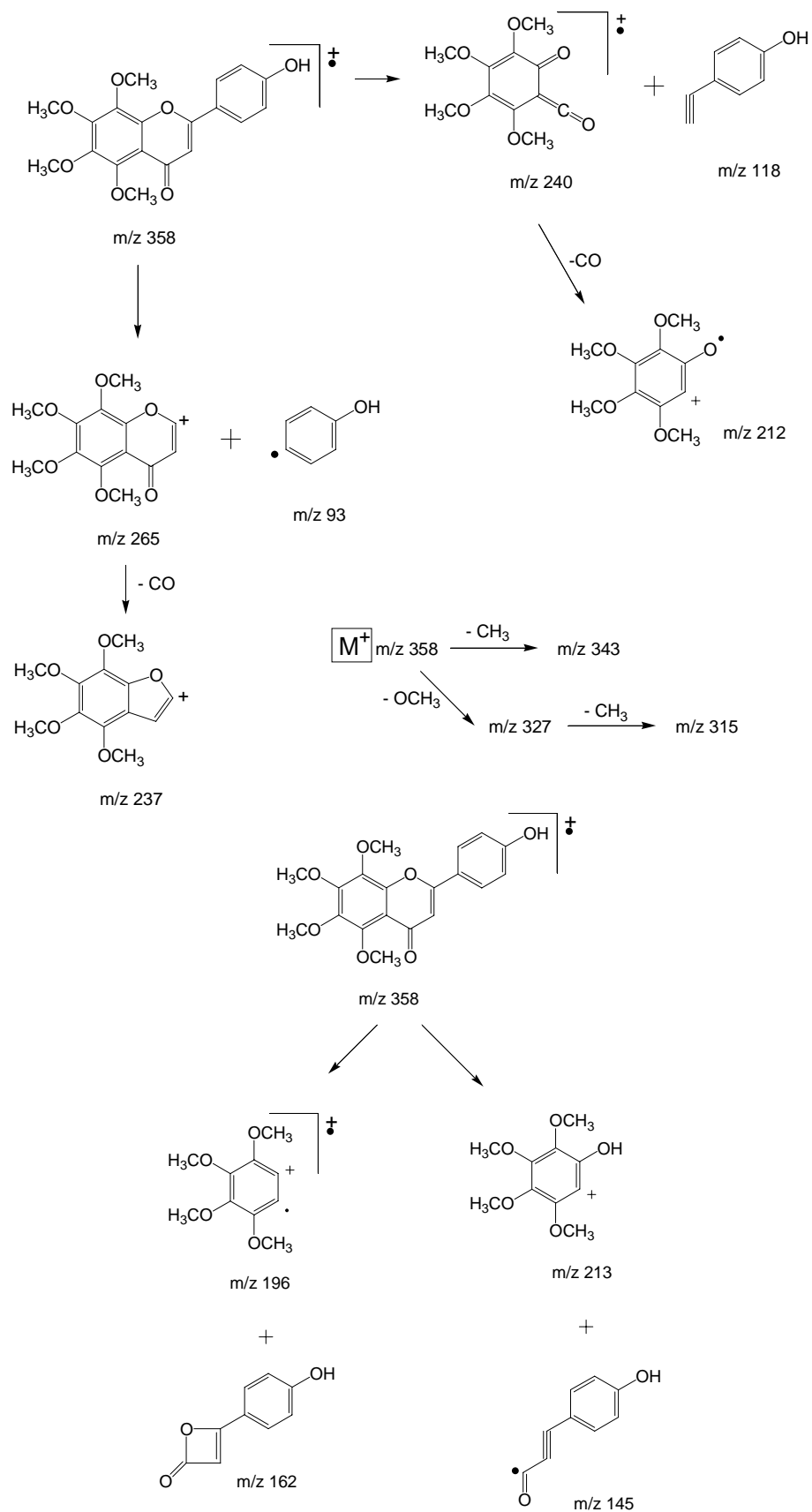


Figura 151: Espectro de massas da substância ALF-16.



Esquema 8: Prováveis caminhos de fragmentação de ALF-16

Tabela 28: RMN do composto ALF-16 em CDCl₃, deslocamento em δ .

	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	J (Hz)	COSY	HMBC
C-2	161,50 C				
C-3	105,80 CH	6,78 s			C-2; C-4; C-4a; C-1'
C-4	176,30 C				
C-5	147,09 C				
C-6	144,11 C				
C-7	151,41 C				
C-8	138,00 C				
C-8a	148,10 C				
C-4a	114,01 C				
MeO-5	61,75 CH ₃	3,97 s			
MeO-6	61,86 CH ₃	3,98 s			C-6
MeO-7	62,35 CH ₃	4,14 s			
MeO-8	62,10 CH ₃	4,04 s			C-8
C-1'	121,58 C				
C-2'	116,50 CH	7,84 d	8,2	7,05	C-2; C-4'
C-3'	128,21 CH	7,05 d	8,2	7,84	C-1'; C-4'
C-4'	161,40 C				
C-5'	128,21 CH	7,05 d	8,2	7,84	C-1'; C-4'
C-6'	116,50 CH	7,84 d	8,2	7,05	C-2; C-4'

Dados de RMN ¹H 400 MHz, ¹³C obtido a 100 MHz, padrão interno TMS.

d= duplete
S=simpleto

Do estudo fitoquímico realizado com as folhas e o caule da *A. langsdorfii* Benth foram isoladas 12 compostos e identificadas oito substâncias por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (IV, EM, RMN 1D e 2D).

Por procedimentos cromatográficos foi isolado e purificado da fração hexano do caule um esteróide, e um triterpenóide, os quais foram identificados por técnicas espectroscópicas como sendo o estigmasterol e o lupeol, respectivamente. Também foi isolada e purificada da fração C.1.2 (fração Hex/CHCl₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano proveniente da partição do extrato bruto do caule) uma mistura de triterpenos lupanos contendo lupeol (apresentando-se como o constituinte químico majoritário), acetato do ácido betulínico e os compostos sob código ALC-2 e ALC-8 ainda não identificados devido a pouca quantidade.

Da fração hexano das folhas foi isolado e purificado um diterpenóide e um triterpenóide, os quais foram identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas como sendo o *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol e o lupeol, respectivamente. O lupeol foi proveniente de duas subfrações, sendo este apresentado como constituinte químico majoritário também.

Da fração acetato de etila das folhas foi isolado e purificado por cromatografia em coluna dois flavan-3-óis, uma flavanona e duas flavonas as quais foram identificadas por técnicas espectroscópicas como sendo catequina, epicatequina, naringenina, 4'-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona e morina 3-*O*-rutinosídeo respectivamente. A morina 3-*O*-rutinosídeo é o constituinte químico majoritário desta fração.

Dessa forma, um dos objetivos deste trabalho foi alcançado, pois através do mesmo, o potencial químico da *A. langsdorfii* foi avaliado podendo servir para estudos futuros. As substâncias ALCF-22, ALF-1, ALF-16 foram isoladas pela primeira vez no gênero.

III.6 – Resultados dos Ensaio biológicos

III.6.1 – Avaliação da Atividade Moluscicida

Os extratos etanólicos e frações obtidas das partições foram testadas quanto à atividade frente ao caramujo *B. grablata* não foram ativos na concentração de 100 ppm.

III.6.2 – Avaliação da Atividade Larvicida

Os extratos e frações testadas quanto à atividade frente às larvas do mosquito *A. aegypti* não apresentaram atividades significativas.

III.6.3 – Resultados da avaliação da citotoxicidade, inibição de proliferação de *P. falciparum*, inibição da produção de óxido nítrico e da inibição de linfoproliferação

III.6.3.1 – Resultados da Avaliação da citotoxicidade

Na busca de compostos naturais mais ativos e menos tóxicos ou com mínimo um risco/benefício menor que as drogas disponíveis no mercado farmacêutico atual, o ensaio citotóxico, utilizando células de baço de camundongos isogênicos faz-se necessário para racionalizar a pesquisa de fitofármacos, direcionada.

De modo geral, os extratos e frações da *A. langsdorfii* apresentaram atividade citotóxica relevante. Na avaliação da citotoxicidade a concentração utilizada foi de 0,1 mg/mL. Estes resultados estão mostrados na **tabela 29**.

Da fração F.1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) (53,58%), foi isolado o lupeol e um diterpeno atisano. Diterpenos atisanos são relatados na literatura por serem citotóxicos (SHI *et al*, 2005). Entretanto o lupeol é referendado por ser pouco tóxico (SOARES *et al*, 2009) e atualmente um derivado do lupeol encontra-se sob últimos ensaios para a sua liberação como medicamento antitumoral. (Fonte: Patent application title: LUPEOL ANTI-TUMOR AGENT AND USES THEREOF Read more: <http://www.faqs.org/patents/app/20080227762> acessado em 04/10/2009).

Tabela 29. Atividade citotóxica com resultado de ensaio de citotoxicidade a 0,1mg/mL.

Fração	% de Citotoxicidade (mg/mL)	CL ₅₀ (mg/mL)
Fração hexano do caule	66,11	Não calculada
Fração Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule	72,98	Não calculada
Fração CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração hexano do caule	84,26	0,01963
Fração AcOEt oriunda da filtração da fração hexano do caule	68,21	Não calculada
Fração MeOH oriunda da filtração da fração hexano do caule	<u>9,77</u>	Não calculada
Fração Hex/CHCl ₃ 20% oriunda da filtração da fração clorofórmio do caule	39,12	Não calculada
Fração hidrometanólica do caule	<u>15,75</u>	Não calculada
Extrato bruto das folhas	86,95	0,01646
Fração Hexano das folhas	63,02	Não calculada
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	43,75	Não calculada
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	53,58	Não calculada
Fr. Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	41,42	Não calculada
Fr. CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	54,11	Não calculada
Fr. CHCl ₃ /MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	34,71	Não calculada
Fr. MeOH oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	73,19	Não calculada
Fração clorofórmio das folhas	<u>18,34</u>	Não calculada
Fração Acetato de etila das folhas	<u>29,81</u>	Não calculada
Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	50,02	Não calculada
Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	<u>27,17</u>	Não calculada
Fr. AcOEt/MeOH 20% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	40,35	Não calculada
Fr. AcOEt/MeOH 30% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	15,42	Não calculada
Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	<u>0,00</u>	Não calculada
Fr. MeOH oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	<u>9,23</u>	Não calculada
Fração hidrometanólica das folhas	<u>19,98</u>	Não calculada

Ensaio com as substâncias puras tornam-se necessários, não permitindo assim qualquer conclusão relacionada entre frações e compostos obtidos destas haja vista que os resultados foram bastante distintos se comparados com algumas atividades já bem conhecidas dos compostos isolados deste trabalho (lupeol, catequina, epicatequina, estigmasterol e naringenina).

III.6.3.2 – Resultados da Avaliação da inibição de proliferação de *P. falciparum*

A busca por novos agentes antimaláricos através do extrato de plantas é bastante explorada desde a descoberta de compostos vegetais com alta atividade antimalárica como a quinina a partir da *Cinchona* sp e da artemisinina oriunda da *Artemisia annua*. Esta busca torna-se ainda mais incessante nos dias de hoje devido à corrida contra a resistência dos medicamentos atuais frente ao *P. falciparum* (KINGHORN *et al.*, 2005).

A tabela 30 mostra os resultados dos ensaios *in vitro* apresentado a 0,1mg/mL das frações do caule e das folhas da *A. langsdorffii* frente a atividade da inibição de proliferação de *P. falciparum*.

Tabela 30: Atividade da inibição de proliferação de *P. falciparum*

Fração	[mg/ml]	% atividade antimalárica	Atividade antimalárica CI ₅₀ (µg/ml)
Extrato bruto do caule	0,1	45,92	
Fração Hexano do caule	0,1	95,6	15,22
Fração Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule	0,1	97,27	10,07
Fração CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração hexano do caule	0,1	96,73	9,19
Fração AcOEt oriunda da filtração da fração hexano do caule	0,1	94,5	11,11
Fração MeOH oriunda da filtração da fração hexano do caule	0,1	68,93	
Fração Hex/CHCl ₃ 20% oriunda da filtração da fração clorofórmio do caule	0,1	91,56	13,81
Fração hidrometanólica do caule	0,1	Não apresenta	
Extrato bruto das folhas	0,1	96,84	9,7
Fração Hexano das folhas	0,1	95,21	11,53
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	0,1	91,08	37,21
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	0,1	91,64	19,37
Fr. Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	0,1	96,98	4,9
Fr. CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	0,1	96,2	9,47
Fr. CHCl ₃ /MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	0,1	92,73	12,29
Fr. MeOH oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	0,1	94,1	14,26
Fração clorofórmio das folhas	0,1	95,16	
Fração Acetato de etila das folhas	0,1	19	
Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	0,1	Não apresenta	
Fr. AcOEt/MeOH 20% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	0,1	62,33	
Fr. AcOEt/MeOH 30% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	0,1	8,06	
Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	0,1	24,92	
Fração hidrometanólica das folhas	0,1	0	

Como demonstrado na tabela 32 observa-se que dos extratos brutos do caule e da folha (EC e EF, respectivamente), o EF (96,84%) exibiu expressiva atividade antimalárica (> 95%) inibindo a proliferação do *P. falciparum*, enquanto que o EC não apresentou atividade significativa (< 50%).

Dentre as frações oriundas de partições testadas, as frações hexano (> 95%) e clorofórmio (> 90%) tanto no caule quanto na folha exibiram significativa atividade antimalárica, enquanto que as frações acetato de etila (nas folhas) e hidrometanólica não apresentaram atividade.

Das subfrações hexano tanto no caule quanto na folha, todas exceto a fração C-1.5 (Fração MeOH oriunda da filtração da fração hexano do caule) apresentaram atividade acima de 90% , ou seja, exibiram significativa atividade.

Das subfrações clorofórmio, apenas uma foi para teste, a C-2.2 (Fração Hex/CHCl₃ 20% oriunda da filtração da fração clorofórmio do caule) exibindo atividade superior a 90%. As demais não foram testadas.

Compostos triterpênicos lupânicos, mais precisamente o lupeol e o ácido betulínico, tem sido bastante estudados na atividade frente ao *P. falciparum* apresentando bons resultados principalmente os seus derivados com ênfase nos acetatos (SOARES *et al*, 2009; ZIEGLER *et al*, 2004; SUKSAMRARN *et al*, 2003; FOTIE *et al*, 2006; BRINGMANN *et al*, 1997; FREIRE, 2004; STEELE *et al*, 1999; DE ALMEIDA ALVES *et al*, 1997; ZIEGLER *et al*, 2002; KHALID *et al*, 1986; FACUNDO *et al*, 2005).

No estudo fitoquímico, o composto lupeol foi isolado da fração F 1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas), fração F 1.6 (Fr. CHCl₃/MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) e C.1.2 (Fração Hex/CHCl₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule). Uma mistura de triterpenos lupoanos contendo lupeol e acetato do ácido betulínico foi isolada da C.1.2 (Fração Hex/CHCl₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule).

De acordo com a **tabela 30** as frações F 1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas), F 1.6 (Fr. CHCl₃/MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) e C.1.2 (Fração Hex/CHCl₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule) apresentaram atividade inibidora da proliferação de *P. falciparum* de 91,64%, 92,73% e 97,27%, respectivamente.

Sugere-se que as substâncias responsáveis pela atividade antimalárica nas subfrações hexano do caule e folha sejam o lupeol, o acetato do ácido betulínico (foi identificado em

mistura com o lupeol) e demais compostos lupanos presentes nestas subfrações. Lembrando que compostos triterpenicos ALC-2 e ALC-8 ainda não identificados devido a pouca quantidade isolada são oriundos da fração C.1.2 (Fração Hex/CHCl₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule). Pode-se sugerir um efeito sinérgico.

Supõe-se que em ensaios posteriores com as subfrações clorofórmio do caule e folhas também apresente atividade antimalárica, visto que triterpenóides são bastante encontrados em extratos vegetais de diferentes plantas, principalmente advindos de frações clorofórmicas.

No entanto, a fração hexano da folhas e do caule, deverá ser futuramente mais estudada, para purificação e isolamento de novas substâncias guiadas pela atividade antimalárica.

III.6.3.3 – Resultados da Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico

A **tabela 31** apresenta os resultados dos extratos e frações do caule e folha da *A. langsdorfii* frente à atividade da inibição de produção de óxido nítrico. O valor referencial é $\geq 70\%$ de atividade inibitória. Os resultados foram obtidos por dosagem de valores do controle estimulado e cultivado na ausência de droga.

Tabela 31. Atividade da inibição de produção de óxido nítrico com resultado de ensaio somente apresentado a 0,1mg/mL.

Fração	% de Inibição NO (≥ 70)
Fração hexano do caule	71,18
Fração Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule	57,57
Fração CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração hexano do caule	64,39
Fração AcOEt oriunda da filtração da fração hexano do caule	58,86
Fração MeOH oriunda da filtração da fração hexano do caule	17,40
Fração Hex/CHCl ₃ 20% oriunda da filtração da fração clorofórmio do caule	70,54
Fração hidrometanólica do caule	16,89
Extrato bruto das folhas	69,26
Fração Hexano das folhas	63,29
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	49,57
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	71,03
Fr. Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	42,30
Fr. CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	46,82
Fr. CHCl ₃ /MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	60,40
Fr. MeOH oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	38,40
Fração clorofórmio das folhas	34,84
Fração Acetato de etila das folhas	47,58
Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	0,00
Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	52,29
Fr. AcOEt/MeOH 20% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	6,50
Fr. AcOEt/MeOH 30% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	7,86
Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	18,00
Fr. MeOH oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	38,30
Fração hidrometanólica das folhas	56,23

Os resultados das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidrometanólica tanto para o caule como para as folhas apresentaram-se divergentes.

Apenas três frações apresentaram atividade acima de 70%: C-1 (Fração hexano do caule) com 71,18, C 2.2 (Fração Hex/CHCl₃ 20% oriunda da filtração da fração clorofórmio do caule) com 70,54 e F.1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) com 71,03% de inibição.

Da fração F.1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) (71,03%), foi isolado o lupeol em grande quantidade, como já mencionado anteriormente. Sua ação como agente imunomodulador na inflamação já é bastante discutida na literatura (BANI *et al*, 2006; SALEEM *et al*, 2001, 2004, 2009; HERAS *et al*, 2003; NOLDIN *et al*, 2003; SUNITHA *et al*, 2001; VASCONCELOS *et al*, 2008, GEETHA *et al*, 2001).

Levando em consideração que a ação inibitória do NO está diretamente relacionada com a cascata da inflamação (GOODMANN & GILMANN, 2008) pode-se sugerir que o lupeol seja possivelmente o agente responsável pela atividade inibitória do NO, haja vista que nas frações C.1.2 (Fração Hex/CHCl₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule) (57,57%) e F 1.6 (Fr. CHCl₃/MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) (60,40%) onde o lupeol também foi isolado, os resultados inibitórios foram intermediários, porém, próximos a 70%.

O mecanismo de ação do lupeol no bloqueio da inflamação já está bem estabelecido onde este reduz a produção da prostaglandina E2 (PGE2) a partir da estimulação de macrófagos A23187. Em suma sua ação é específica inibindo a produção de alguns pró-mediadores específicos da inflamação (HERAS *et al*, 2001).

III.6.3.4 – Resultados da Avaliação da inibição de linfoproliferação

A **tabela 32** apresenta os resultados dos extratos e frações do caule e folha da *A. langsdorfii* frente à atividade da inibição da linfoproliferação. O valor referencial é $\geq 80\%$ de atividade inibitória.

Tabela 32. Atividade da inibição da linfoproliferação com resultado de ensaio somente apresentado a 0,1 mg/mL.

Fração	% Inib. Linfo com A (≥ 70)	CI₅₀(mg/mL)
Fração hexano do caule	60,21	Não calculada
Fração Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule	<u>81,44</u>	0,01511
Fração CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração hexano do caule	<u>73,86</u>	Não calculada
Fração AcOEt oriunda da filtração da fração hexano do caule	<u>76,45</u>	Não calculada
Fração MeOH oriunda da filtração da fração hexano do caule	<u>71,12</u>	Não calculada
Fração Hex/CHCl ₃ 20% oriunda da filtração da fração clorofórmio do caule	<u>75,68</u>	Não calculada
Fração hidrometanólica do caule	21,61	Não calculada
Extrato bruto das folhas	54,26	Não calculada
Fração Hexano das folhas	<u>84,19</u>	0,03185
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	<u>92,76</u>	0,03102
Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	<u>94,27</u>	0,02741
Fr. Hex/CHCl ₃ 50% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	<u>87,65</u>	0,00351
Fr. CHCl ₃ oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	<u>87,83</u>	0,00676
Fr. CHCl ₃ /MeOH 5% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	<u>78,93</u>	Não calculada
Fr. MeOH oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas	<u>70,26</u>	Não calculada
Fração clorofórmio das folhas	<u>86,24</u>	0,03489
Fração Acetato de etila das folhas	<u>83,75</u>	0,04270
Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	<u>81,59</u>	0,04326
Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	34,73	Não calculada
Fr. AcOEt/MeOH 20% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	49,16	Não calculada
Fr. AcOEt/MeOH 30% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	50,99	Não calculada
Fr. AcOEt/MeOH 50% oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	39,59	Não calculada
Fr. MeOH oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila	<u>94,02</u>	0,00835
Fração hidrometanólica das folhas	43,74	Não calculada

Nos ensaios para avaliação da inibição da proliferação de linfócitos, as subfrações C.1.2 (Fração Hex/ CHCl_3 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule), F-1.1 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas), F.1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas), F-1.4 (Fr. Hex/ CHCl_3 50% oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas), F-1.5 (Fr. CHCl_3 oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas), F-3.1 (Fr. AcOEt oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila), F-3.8 (Fr. MeOH oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila) apresentaram atividade inibitória acima de 80%, demonstrando que esta espécie possui de fato uma excelente atividade imunossupressora.

As frações F.1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas), F-1.1 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) e F-3.8 (Fr. MeOH oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila) foram as que apresentaram maior atividade inibitória nos ensaios realizados neste estudo (maior que 90%).

Da fração F-3.8 (Fr. MeOH oriunda da Filtração da Fração Acetato de etila) das folhas de *A. langsdorfii* foi isolado o composto ALF-19 a naringenina. Esta já foi estudada por suas propriedades antiinflamatórias (AMARO *et al* 2009).

Da fração C-1.1 (Fr. Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano) foi isolado o estigmasterol. Este, ainda não havia sido relatado para a *A. langsdorfii* conforme levantamento bibliográfico. Este fitoesterol é relativamente comum em plantas, principalmente nas sementes da família das leguminosas (EVANS, 1996). Alguns estudos sugeriram ao estigmasterol atividade anti-hepatotóxica, antiinflamatória, antinociceptiva, preventivo de vários tipos de câncer, sedativo e hipocolesterolêmico.

Das frações F.1.2 (Fração Hexano oriunda da filtração da Fração Hexano das folhas) e C.1.2 (Fração Hex/ CHCl_3 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule), foi isolado o lupeol em grande quantidade, como já mencionado anteriormente como também várias referências a sua atividade imunomoduladora.

Estudos demonstram que muitas plantas com atividade antiproliferativa contêm o triterpeno lupeol como um de seus principais constituintes (MILES e KOKOPOL, 1976), (SALEEM *et al.*, 2001). Desta forma, levando-se em consideração que esta substância foi isolada tanto no caule como nas folhas de *A. langsdorfii* e que ambos os extratos brutos e principalmente a fração hexano das folhas mostraram capacidade inibidora da linfoproliferação, pode-se esperar que o resultado seja atribuído à presença desta substância,

necessitando-se de mais estudos para avaliação de resultados. E, ainda, o lupeol é reportado na literatura como possuidor de várias propriedades farmacológicas como antiinflamatória, antiartrítica, antimutagênica (GEETHA *et al.*, 1998). Assim, torna-se necessário dar continuidade aos estudos quanto à atividade farmacológica de *A. langsdorfii*.

Drogas utilizadas atualmente para doenças do sistema imunológico têm custo relativamente elevado e alto índice de reações adversas. Os antiinflamatórios não esteroidais podem causar síndrome nefrótica nos pacientes (HUANG *et al.*, 2004). De fato, este extrato pode inibir a proliferação de linfócitos. É provável que uma molécula com baixa toxicidade apresente menor risco de reações adversas. Os resultados sugerem que a partir do extrato de *A. langsdorfii* pode-se chegar à molécula ativa, provavelmente o lupeol, e esta já é uma candidata em potencial a uma nova droga imunomoduladora.

A atividade antitumoral de vários derivados triterpenoides do tipo lupano já é bastante conhecida há bastante tempo (OGURA *et al.*, 1997; SANBERG *et al.*, 1987). É sabido que também que o ácido betulínico é o que mais apresenta propriedades antiproliferativas da série dos lupoanos (RYU *et al.*, 1994). Muitos estudos relacionam a atividade antitumoral à topoisomerase I (TABATA *et al.*, 2001) e em 2002 foi analisado que o ácido betulínico é um potente inibidor da topoisomerase I em células eucarióticas. (CHOWDHURY, *et al.*, 2002).

É também conhecido que a citotoxicidade dos isoprenoides derivados do ácido carboxílico está relacionada com a presença do grupo carbonila na molécula. Em um estudo da relação estrutura-atividade dos triterpenos lupoanos na indução da diferenciação e apoptose das células B16 e 2F2, foi demonstrado que a função “Keto” no C-3 contribui bastante para as atividades de indução e diferenciação (HATA *et al.*, 2003), e o grupo carbonila em C-17 tem um papel importante na indução da apoptose de células de melanoma (HATA *et al.*, 2002). Segundo MUTAI (2004) a atividade citotóxica do lupeol numa CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) foi de aproximadamente 30 $\mu\text{g/mL}$.

Uma vez verificada a inocuidade do lupeol e aprofundado o estudo de seus mecanismos de ação, testes clínicos já poderiam ser realizados. Muitos anos são necessários para o cumprimento de todas as etapas necessárias para o lançamento de um novo medicamento. O presente trabalho é o início deste caminho.

Um ponto de alta importância que não deve deixar de mencionar aqui é a conclusão das atividades imunomodulatórias de várias plantas as quais tem em seus extratos os compostos triterpenos principalmente os lupoanos, oleananos e ursânicos que são os mais encontrados.

Costa em 2004 estudou 69 espécies vegetais do semi-árido brasileiro pertencente a diferentes famílias botânicas (total de 34). Dos 174 extratos não citotóxicos com potencial imunomodulador e antiparasitário, 52% foram extratos clorofórmicos e 45% foram extratos acetato de etila. Destes extratos ativos, 25% apresentaram atividade imunomoduladora (inibição da produção de NO e da linfoproliferação), 9% apresentaram atividade inibidora da produção de NO igual ou superior a 70% e 27% apresentaram atividade inibidora da linfoproliferação igual ou superior a 80%.

Costa ainda questionou para o caso específico da linfoproliferação, o elevado número de extratos e frações ativas e leva em consideração que existe a possibilidade de uma ação inespecífica de substâncias presentes nestes extratos e frações.

A presença dos triterpenóides ácido betulínico, lupeol e ácido ursólico provenientes de frações CH₂Cl₂ do *Ziziphus joazeiro* também já foi relatada. A fração CH₂Cl₂ apresentou uma alta inibição da linfoproliferação: 94,78% na concentração de 0,01 mg/mL. (KATO *et. al.*, 1997; SCHUHLY *et. al.*, 1999).

Em estudos realizados por colegas do LPqRN com as espécies ativas *Zeyheria tuberculosa* e *Mansoa hirsuta* com potencial imunomodulador e antiparasitário segundo dados do IMSEAR foram isolados os ácidos oleanólico e ursólico da fração cloroformica da *Z. tuberculosa* e o lupeol (fração cloroformica) e ácido ursólico (fração acetato de etila) da *M. hirsuta*.

São vários os trabalhos publicados relacionando triterpenos com a atividade antiinflamatória. Substâncias triterpênicas como o lupeol, ácido betulínico, ácido ursólico e ácido oleanólico já são muito conhecidas por suas propriedades antiinflamatórias (asma, artrite, câncer). Sabe-se também que estes mesmos triterpenóides são bastante encontrados em extratos vegetais de diferentes plantas, principalmente advindos de frações clorofórmicas.

Diante deste argumento no caso específico da atividade imunomodulatória, pode-se relacionar a ação destas substâncias triterpênicas como as responsáveis pelas atividades imunomodulatórias presentes em diferentes espécies vegetais oriundas de diferentes famílias. Pode-se sugerir tanto um efeito sinérgico representativo da atividade imunomodulatória em diferentes espécies como também sua ação inespecífica na cascata da inflamação.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÕES

Capítulo IV. Conclusões

Os estudos fitoquímicos e biológico realizados com as folhas e o caule da *Acacia langsdorfii* Benth permitiram concluir que:

→ Estudo Fitoquímico:

– por procedimentos cromatográficos foi isolado e purificado da fração hexânica do caule um esteróide e um triterpenóide, os quais foram identificados como sendo estigmasterol e lupeol, respectivamente. Também foi isolado e purificado uma mistura contendo triterpenóides da série lupano (onde um é o lupeol). O lupeol é o constituinte químico majoritário;

– da fração hexânica das folhas foi isolado e purificado um diterpenóide e um triterpenóide, os quais foram identificados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (IV, EM, RMN 1D e 2D) como sendo *ent*-atisan-7 α , 16 α -diol e lupeol, respectivamente. O lupeol é o constituinte químico majoritário;

– da fração acetato de etila das folhas foi isolado e purificado por cromatografia em coluna dois flavan-3-óis, uma flavanona e duas flavonas as quais foram identificadas por técnicas espectroscópicas como sendo catequina, epicatequina, naringenina, 4'-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona e morina 3-*O*-rutinosídeo respectivamente. A morina 3-*O*-rutinosídeo é o constituinte químico majoritário desta fração;

– As substâncias *ent*-atisan-7 α , 16 α -diol, morina 3-*O*-rutinosídeo, 4'-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona foram isoladas pela primeira vez no gênero *Acacia*.

→ Atividade biológica:

– Os extratos e frações testadas quanto à atividade frente ao caramujo *B. grablata* e às larvas do mosquito *A. aegypti* não apresentaram atividades nas concentrações testadas através da metodologia empregada;

– Dos extratos e frações testadas quanto a Avaliação da citotoxicidade apenas oito apresentaram valores não tóxicos. Porém, a fração F.1.2 (fração hexano oriunda da filtração da fração hexano das folhas) apresentou 53,58%, onde desta foi isolada o *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol, pertencente à classe diterpeno bastante relatada na literatura por sua citotoxicidade;

– As frações da *A. langsdorfii* exibiram pronunciada atividade Antimalárica, inibindo a proliferação do *Plasmodium falciparum*, sendo as mais ativas (> 90%) as hexânicas (caule e folhas);

- Sugere-se que a atividade antimalárica da fração hexano deve-se ao lupeol e seus derivados;
- Em relação à inibição da produção de óxido nítrico a fração F.1.2 (fração hexano oriunda da filtração da fração hexano das folhas) apresentou 71,03% de atividade. Desta, foi isolada o lupeol em grande quantidade, e sua ação como agente imunomodulador na inflamação já é bastante discutida na literatura;
- As frações obtidas da partição do extrato em etanol das folhas e caule da *A. langsdorfii* apresentaram uma alta inibição da linfoproliferação (>80%), apresentando destaque as frações F.1.2 (fração hexano oriunda da filtração da fração hexano das folhas), F-1.1 (fração hexano oriunda da filtração da fração hexano das folhas) e F-3.8 (Fr. MeOH oriunda da filtração da fração Acetato de etila) (> 90%);
- Da fração F-3.8 (Fr. MeOH oriunda da filtração da fração Acetato de etila) foi isolada a naringenina e das frações F.1.2 (fração hexano oriunda da filtração da fração hexano das folhas) e C-1.2 (Fração Hex/CHCl₃ 50% oriunda da filtração da fração hexano do caule), foi isolado o lupeol. Supõe-se que o lupeol e a naringenina sejam os principais compostos bioativos

CAPÍTULO V
PERSPECTIVAS

Capítulo V. Perspectivas

Em virtude das observações a respeito do estudo realizado, seguem-se algumas sugestões para trabalhos futuros:

- A fração Hexano da folhas e do caule deverá ser futuramente mais estudada, para purificação e isolamento de novas substâncias guiadas pela atividade antimalárica;
- Realização de ensaios antimaláricos e imunomoduladores com o Lupeol isolado;
- Realização de ensaios imunomoduladores com a Naringenina isolada;
- Verificar o grau de citotoxicidade do composto puro *ent*-atisan-7 α ,16 α -diol;
- Quantificação do Lupeol no Extrato Semi-Bruto (Fração Hexano da Partição) do Caule de *A. langsdorfii* pelo Método de RMN ^1H ;
- Quantificação do Lupeol no Extrato Semi-Bruto (Fração Hexano da Partição) das Folhas de *A. langsdorfii* pelo Método de RMN ^1H ;
- Quantificação da Naringenina no Extrato Semi-Bruto (Fração Acetato de Etila da Partição) das Folhas de *A. langsdorfii* pelo Método de RMN ^1H .

CAPÍTULO VI
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 6. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, P. K. Studies in organic chemistry. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Elsevier Science Publishers B. V., v. 39, p.20 Amsterdam, 1989.

AMARO, M. I.; ROCHA, J.; VILA-REAL, H.; EDUARDO-FIGUEIRA, M.; MOTA-FILIFE, H.; SEPODES, B.; RIBEIRO, M. H. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. **Food Research International**. v. 42, p. 1010-1017, 2009.

ANAM, E. M. A. Flavanone from the roots of *Acacia longifolia* (Leguminosae). **Indian Journal Heterocycle Chemistry**. v. 7, p. 63-66, 1997.

ANDRADE, C. A.; PEITZ C, SILVA V. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G; KERBER, V. A. Revisão do gênero *Acacia* - atividades biológicas e presença de fenóis derivados do núcleo flavânico. **Visão Acadêmica**. v. 4, p. 47-56, 2003.

ALI, M.S.; AZHAR, I.; AHMAD, F.; AHMAD, V.U.; USMANGHANI, K. Antimicrobial Screening of Mimosaceous Plants. **Pharmaceutical Biology**. v. 39, p. 43-46, 2001.

ALVES, M. J. C. P.; MAYO, R. C.; DONALÍSIO, M. R. História, epidemiologia e controle da malária na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil, 1980 a 2000. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, p. 41 – 45, 2004.

ARROYO, M. T. K. Comments on breeding systems in Neotropical forests. LARSEN, K.; HOHLMNIELSEN, L. B. **Tropical Botany**. Academic Press. London, p. 371-380, 1979.

ASLAN, M. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. **Immunological Research**. v. 26, p. 107-118, 2002.

AVERY, M. A.; ALVIM-GASTON, M.; VROMAN, J. A.; BAOGEN, W.; AGER A.; PETERS W.; ROBINSON B. L.; CHARMAN W. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. Direct modification of (+)-artemisinin *in vivo* antimalarial screening of new, potential preclinical antimalarial candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 4321-4335, 2002.

AYOUB, S. M. H.; YANKOV, L. K. Flavanol molluscicides from Sudan *Acacia*. **International Journal of Crude Drug Research**. v. 23, p. 87-90, 1985.

AYOUB, S. M. H.; YANKOV, L. K. On the molluscicidal activity of the plant phenolics. **Fitoterapia**. v. 56, p. 225-226, 1985.

BABU, S. P. S.; SARKAR, D.; GHOSH, N.K.; SAHA, A.; SUKUL, N.C.; BHATTACHARYA, S. Enhancement of membrane damage by saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 74, p. 451-454, 1997.

BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Human Medicinal Agents from Plants: **American Chemical Society**, 1993. p.2

BANI, S.; KAUL, A.; KHAN, B.; AHMAD, S. F.; SURI, K. A.; GUPTA, B. D.; SATTI, N. K.; QAZI, G. N. Suppression of T Lymphocyte Activity by Lupeol Isolated from *Crataeva religiosa*. **Phytotherapy Research**. v. 20, p. 279–287, 2006.

BARNES, K. I.; WHITE, N. J. Population biology and antimalarial resistance: the transmission of antimalarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*. **Acta Tropica**, v. 94, p. 230-240, 2005.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa da Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p. 15-70, 1991.

BENNIE, L.; MALAN, E.; COETZEE, J.; FERREIRA, D. Structure and synthesis of ether-linked proteracacinidin and promelacacinidin proanthocyanidins from *Acacia caffra*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 785-793, 2000.

BJÖRKMAN, A. Malaria associated anaemia, drug resistance and antimalarial combination therapy. **International Journal for Parasitology**. v. 32, p. 1637- 1643, 2002.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, p. 907-915, 2001.

BRASIL, Constituição Federal de 1988. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, acessado em: 05 out. 1988.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária**. Brasília: Funasa, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Políticas de Saúde**. Fundação Nacional de Saúde. Ações de controle de endemias: malária: manual para agentes comunitários de saúde e agentes de controle de endemias. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância Sanitária**. Portaria nº 6 de 31.01.1995. Regulamenta o registro de fitoterápicos. Diário Oficial da União, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância Sanitária**. Portaria nº 116 de 08.08.1996. Aborda as especificações dos ensaios toxicológicos e da eficácia terapêutica. Diário Oficial da União, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC nº 17, 24.02.2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, 2000.

BRINGMANN, G.; SAEB, W.; ASSI, L.A.; FRANÇOIS, G.; SANKARA NARAYANAN, A.S.; PETERS, K.; PETERS, E.M. Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. **Planta Medica**. v. 63, p. 255-257, 1997.

BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P. S.; KLITGAARD, B. B.; LEWIS, G. P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinoideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. **Systematic Botany**. v. 26, p. 487-514, 2001.

BURDMANN, E. A.; ANDOH, T. F.; YU, L.; BENNETT, W. M. Cyclosporine nephrotoxicity. **Seminars in Nephrology**. v. 23, p. 465-476, 2003

BURKART, A. Leguminosas – Mimosóideas. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Prêmio Raulino Reitz. v. 1, p. 17-48, 1979.

BURKART, A.; BURKART, N. S. T.; BACIGALUPO, N. M. Flora ilustrada de Entre Rios (Argentina). Buenos Aires. **Leguminosae**. v. 6, p. 695-704, 1987.

BURKE, J. F., Jr.; PIRSCH, J. D.; RAMOS, E. L.; SALOMON, D. R.; STABLEIN, D. M.; VAN BUREN, D. H.; WEST, J. C. Long-term efficacy and safety of cyclosporine in renal-transplant recipients. **New England Journal of Medicine**. v. 331, p. 358-63, 1994.

BUSHNELL, O. A.; FUKUDA, M.; TAKASHY, M. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. **Pacific Science**. v. 4, p. 167-183, 1950.

CAPRA F. **O ponto de mutação: a ciência, a sociedade e a cultura emergente**. São Paulo; Editora Cultix, p.2, 1982.

CARVALHO, A. C. B.; Balbino, E. E.; Maciel, A.; Perfeito, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**. Ano V, nº 11, 2007.

CHAKRABORTY, C; DAS, S.R. *In vitro* and *in vivo* effects of some natural products against experimental amoebiasis caused by *Entamoeba histolytica*. **Agricultural and Biological Research**. v. 5, p. 29-36, 1989.

CHANDEL, B. S; SHAN, N. M; TRIPATHI, R. M. *In vitro* antibacterial activity of *Acacia arabica* Bark. **Indian Journal of Indigenous Medicines**. v. 9, p. 77-79, 1993.

CHANG, S.T.; WU, J.H.; WANG, S.Y.; KANG, P.L.; YANG, N.S.; SHYUR, L.F. Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3420-3424, 2001.

CHHABRA, S. C; UISO, F. C. A survey of medicine plants of eastern tanzânia for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. **Fitoterapia**. v. 4, p. 307-316, 1990.

CHOU, C. H. Allelopathic researches in the subtropical vegetation in Taiwan. **Comparative Physiology and Ecology**. v. 5, p. 222-234, 1980.

CLARKE-LEWIS, J. W; KATEKAR, G.F; MORTIMER, P.I. Flavan derivatives IV: teracacidin, a new leucoanthocianidin from *Acacia intertexta*. **Journal of the Chemical Society**. p. 499-503, 1961.

CLARKE-LEWIS, J. W; NAIR, V. S. Flavan derivatives XX. A new glucoside and others extractives from *Acacia ixiophylla*. **Australian Journal of Chemistry**. v. 21, p. 425-437, 1968.

CLASSEN, J. B. Cyclosporine induced autoimmunity in newborns prevented by early immunization. **Autoimmunity**. v. 27, p. 135-9, 1998.

COETZEE, J; MALAN, E; FERREIRA, D. Oligomeric flavonoids. Part 29. Structure and synthesis of novel ether-linked [4-O-4] bis-teracacinidins. **Tetrahedron**. v. 54, p. 9153-9160, 1998.

CORREA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e Exógenas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. v. 1, p. 16-18 e 310, 1984.

COSTA, J. F. O. Investigação de atividades anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora de extratos de plantas do semi-árido brasileiro. Salvador-Bahia, **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Medicina, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade da Bahia. P. 79, 2004.

COTRAN, R. S.; VINAY, K.; TUCKER, C. **Patologia Estrutural e Funcional** – Robbins. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 30, 2000.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: Botanical Garden, p.45 1988.

DAFALLASH, A; MUSTAFA, Z. Investigation of anti-inflammatory activity of *Acacia nilotica* and *hibiscus sabdariffa*. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 24, p. 263-269, 1996.

DE ALMEIDA ALVES, T.M., Nagem, T.J., De Carvalho, L.H., Krettli, A.U., Zani, C.L. Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliana*. **Planta Medica**. v. 63, p. 554–555, 1997.

DESHPANDE, V.N; PATIL, A.D. Flavonoid of *Acacia catechu*, heartwood. **Journal of the Indian Chemical Society B**. v. 20B, p. 628, 1981.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**. v.73, p.69-91, 2002.

DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar**. Editora da Universidade Estadual Paulista. São Paulo, p.230, 1995.

DOYLE, J. J.; CHAPPILL, J. A.; BAILEY, D. C.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. **Advances in Legume Systematics**. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 1–20, 2000.

DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.S. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**. v. 131, p. 900-910, 2003.

DREWES, S.E; ROUX, D.G. A new flavan 3,4-diol from *Acacia auriculiformis* by paper ionophoresis. **Biochemical Journal Cambridge**. v. 18, p. 483-500, 1966.

DREWES, S. E; ISLEY, A. H. Isolation of 3-methoxy-fisetin from *Acacia meamsii*. **Chemistry in the Community**. v. 20, p. 1246-1247, 1968.

DREYFUS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of Fungi in the Discovery of Novel, Low-Molecular Weight Pharmaceuticals. In: **GULLO, V. P.** The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential; Butterworth-Heinemann: Boston, p. 49, 1994.

DUTRA, R. A. Malária – Informações para profissionais da saúde. SUCEN/SP – Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo, 2001. Disponível em: http://www.sucen.sp.gov/doencas/malaria/texto_malaria.pro.htm. Acesso em: 24 mai. 2007

DU PREZZ, I. C; ROUX, D. G. Novel flavan 3,4-diols from *Acacia cultriformis*. **Journal of the Chemical Society**. v. 13, p. 1800-1804, 1970.

EADE, R. A; McDONALD, F.J; SIMFS, J. J. H. Extratives of Australian timbers: XIV, triterpene glycosides of *Acacia myrtifolia*. **Australian Journal of Chemistry**. v. 26, p. 839-844, 1973.

ELSHEIKH, S. H.; BASHIR, A.K.; SULIMAN, S.M.; EL WASSILA, M. Toxicity of certain Sudanese plant extracts to cercariae and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Pharmaceutical Biology**. v. 28, p. 241-245, 1990.

EL-MOUSALLAMY, A. M. D.; BARAKAT, H.H.; SOULEMAN, A.M.A.; AWADALLAH, S. Polyphenols of *Acacia raddiana*. **Phytochemistry**. v. 30, p. 3767-3768, 1991.

EL-SHAFAE, A. M.; EL-DOMIATY, M. Flavonoidal Constituents of the Flowers of *Acacia saligna*. *Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 7, p. 48-53, 1998.

EL-SISSI, H. I; EL-SHERBEINY, A. E. A. The flavonoid components of the leaves of *Acacia saligna*. *Plant Foods for Human Nutrition*. v. 14, p. 257-266, 1967.

EL-TAHIR, A; SATTI, G. M. H; KHALID, S. A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Acacia nilotica*. **Phytotherapy Research**. v. 13, n. 6, p. 474-478, 1999.

ENDRESS, Peter K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 284, 1994.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed., Great Britain: The Bath Press, 1996.

ESTEVAN, Charles dos Santos. Estudo fitoquímico biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). Maceió-AL, 2006. 192p. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.

FACUNDO, V. A.; SILVEIRA, A. S. P.; FILHO, R. B.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Constituintes químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN. **Química Nova**. v. 28, p. 224-225, 2005

FALCO, M. R.; VRIES, J. X. Isolation of hiperosid from the flowers of *Acacia melanoxylon*. **Naturwissenschaften**, v. 51, p. 462-263, 1964.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Malária. Diagnóstico Laboratorial**. São Paulo: Guanabara Koogan, cp.18, p.157-164; 1996.

FERREIRA, E. I. **Malária, Aspectos Gerais e Quimioterapia**. Editora Ateneu São Paulo/SP, p.21, 1982.

FERREIRA, P. **Malária. Revista de Manguinhos/FIOCRUZ**, nº 3. Rio de Janeiro, p.16, 2003.

FOTIE, J., BOHLE, D. S., LEIMANIS, M. L.; GEORGES, E.; RUKUNGA, G.; NKENGFAK, A. E. Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*. **Journal of Natural Products**. v. 69, p. 62-67, 2006.

FOO, L. Y. Configuration and conformation of dihydroflavonois from *Acacia melanoxylon*. **Phytochemistry**. v. 26, p. 813-817, 1987.

FORATTINI, O. P. Identificação, biologia, epidemiologia. **Culicidologia Médica**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo. v. 2, p.48 2002.

FOURIER, T. G; FERREIRA, D; ROUX, D. G. 8-O-Methyl and the first 3-O-methyl-flavan-3, 4-diol from *Acacia saxatilis*. **Phytochemistry**. v. 13, p. 2573-2581, 1974.

FOURIER, T. G; DU PREEZ, I. C; ROUX, D. G. 3',4',7,8-Tetrahydroflavonoids from the heartwood of *Acacia nigrescens* and their conversion products. **Phytochemistry**. v. 11, p. 1763-1770, 1972.

FRADIN, M. S.; DAY, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. **New England Journal of Medicine**. v. 347, p. 13-18, 2002.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE-FNS. **Dados para avaliação epidemiológica da malária, segundo local de diagnóstico**. Brasil, p.19, 2002.

GARDINER, D. L.; MCCARTHY, J. S.; TRENHOLME, K. R. Malaria in the post- genomics era: light at the end of the tunnel or just another train? **Medical Journal**. v. 81, p. 505-509, 2004.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. **Fitoterapia**. v. 69, p. 13–19, 1998.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal Ethnopharmacology**. v. 76, p. 77-80, 2001.

GHOSH, M.; BABU, S.P.; SUKUL, N.C.; MAATO, S.B. Antifilarial effect of two triterpenoid saponins isolated from *Acacia auriculiformis*. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, p. 604-606, 1993.

GHOSH, N.K.; BABU, S.P.; SUKUL, N.C.; ITO, A. Cestocidal activity of *Acacia auriculiformis*. **Journal of Helminthology**. v. 70, p. 171-172, 1996.

GILANI, A. H.; SHAHEEN, F.; ZAMAN, M.; JANBAZ, K. H.; SHAH, B. H.; AKHTAR, M. S. Studies on antihypertensive and antispasmodic activities of methanol extract of *Acacia nilotica* pods. **Phytotherapy Research**. v.13, p. 665-669, 1999.

GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. **Plantas da caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. Recife. v. 4, p. 261, 2006.

GOODMAN e GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.94, 2001.

GRAW, Mc. L. J.; JAGER, A. K.; STANDEN, J.V. Prostaglandin Synthesis Inhibitory Activity in Zulu, Xhosa and Sotho Medicinal Plants. **Phytotherapy Research**. v. 11, p. 113-117, 1997.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, p. 670-672, 2002.

GRÜNWARD, J. – The European phytotherapeutics market: figures, trends, analysis. **Drugs made in Germany**. v. 39, p. 6-11, 2004.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª ed., Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.15, 2001.

GUERRANT, R. L., BLACKWOOD, B. L. Threats to global health and survival: the growing crises of tropical infectious disease – our “unfinished agenda”. **Clinical and Infective Diseases**. v. 28, p. 966-986, 1999.

HAGOS, M; SAMUELSSON, G. Quantitative determination of Quacol A, b and (+)-fisetinidol in bark and gum of *Acacia tortilis*. **Acta Pharmaceutica Suecica**. v. 25, p. 321-324, 1988.

HARBORNE, J. B., BOULTER, D.; TURNER, B. L. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. London. Academic Press. p.43, 1971.

HAKAMORI, S. Bifunctional role of Glycosphingolipids. **Journal Biological Chemistry**. v. 265, p. 18713-6, 1990.

HATA, K.; HORI, K.; TAKAHASHI, S. Differentiation- and apoptosis-inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. **Journal Natural Products**. v. 65, p. 645-648, 2002.

HATA, K.; HORI, K.; OGASAWARA, H.; TAKAHASHI, S. Anti-leukemia activities of lup-28-al-20(29)-en-3-one, a lupine triterpene. **Toxicology Letters**. v. 143, p. 1-7, 2003.

HERAS, B. DE LAS; RODRÍGUEZ, B.; BOSCA, L.; VILLAR, A. M. Terpenoids: Sources, Structure Elucidation and Therapeutic Potential in Inflammation. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 3, p. 171-185, 2003.

HERAS, B. DE LAS.; ABAD, M. J.; SILVAN, A. M.; PASCUAL, R.; BERMEJO, P.; RODRIGUEZ, B.; VILLAR, A. M. Effects of Six Diterpenes on Macrophage Eicosanoid Synthesis. **Life Sciences**. v. 70, p. 269-278, 2001.

HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. **Advances in Legume Systematics 9**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, p. 1-20, 2000.

HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the World**. London: Batsford Ltd. Ed. p. 335, 1996.

HOFFMANN J. J.; TIMMERMANN B. N.; MCLAUGHLIN S. P.; PUNNAPAYAK H. Potential antimicrobial activity of plants from the southwestern United States. **International Journal of Pharmacognosy**. v. 31, p. 101-115, 1993.

HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. **Phytotherapy Research**. v. 13, p. 31-36, 1999.

HYALIJ, M. T. Effect of molluscicides and cercaricides on some freshwater snails and cercariae. **Geobios**. v. 26, p.211-213, 1999.

IMPERATO, F. A chalcone glycoside from *Acacia dealbata*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 480-481, 1982.

JAYASEKHAR, P; MOHANAN, P. V; RATHINAM, K. Hepatoprotective activity of ethyl acetate extract of *Acacia catechu*. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 29, p. 426-428, 1997.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12^a ed. São Paulo: Nacional, p.86, 1998.

JORGE, M. H. P. M.; GOTLIEB, S. L. D.; LAURENTI, R. **A saúde no Brasil: análise do período 1996 a 1999**. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde; 2001.

KAMBIZI, L; AFOLAYAN, A. J. Na ethnobotanical study of plants for the treatment of sexually transmitted disease (njovera) in Guruve District, Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 5-9, 2001.

KATO, EDNA TOMIKO MYIAKE; ALVARENGA, MARDEN ANTONIO. Estudo químico das cascas do caule de *Ziziphus joazeiro* Martius. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**. v. 33, p. 47-51, 1997.

KAUFMANN, H. E. S.; KABELITZ, D. **Immunology of infectiom methods in microbiology**. San Diego: Academic Press, v. 25, p.28, 1998.

KERBER, V. A; SILVA, G. A. A. B. Flavonoids of *Acacia longifolia* (Andr.) Willd Leguminosae-Mimosoidae. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 74, p. 16-18, 1993.

KHALID, S. A.; FAROUK, A.; GEARY, T.G.; JENSEN, J.B. Potential antimalarial candidates from African plants: and *in vitro* approach using *Plasmodium falciparum*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 15, p. 201-209, 1986.

KHAN, M. R.; NDAALIO, G.; NKUNYA, M. H.; WEVERS, H.; SAWHNEY, A. N. Studies on African plants: 1-preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. **Planta Medica**, Suplemento, p. 91-7, 1980.

KHAN, M. R.; NDAALIO, G.; NKUNYA, M. H.; WEVERS, H.; SAWHNEY, A. N. Chemical investigation of the pods of *Acacia leucopholea* Roxb. **Indian Drugs**. v. 28, p. 97-98, 1990.

KHAN, M. R.; NDAALIO, G.; NKUNYA, M. H.; WEVERS, H.; SAWHNEY, A. N. Antimicrobial activity of Tanzanian chewing sticks against oral pathogenic microbes. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 235-240, 2000.

KINGHORN, A, D. AND BALUNAS, M. J. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v. 78, p.431-441, 2005.

KIRILLOVA, G. M; KONDZHARIYA, A. T. Characterization of tannins in some subtropical plants. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**. v. 4, p. 602-603, 1987.

KRESNKY, A. M.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. Drugs used for immunomodulation. In: **GOODMAN e GILMAN'S**. The pharmacological basis of therapeutics. 20^a ed., New York: McGraw Hill Companies, p.94, 2001.

LEE, T.H.; QIU, F.; WALLER, G.R.; CHOU, C.H. Three new flavonol galloylglucosides from leaves of *Acacia confusa*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 710-712, 2000.

LEITE, J. P. V.; LOMBARDI, J. A.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceaea), o ácido ursólico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 77-87, 2001.

LÉON, J. **Botanica de los Cultivos Tropicales**. 2^a ed. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, p. 445 1987.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the Word**. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577 p.

LUCKOW, M., WHITE, P.J., BRUNEAU, A. Relationships among the basal genera of Mimosoid legumes. In: **HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A.** Advances in Legume Systematics, vol. **9**. Royal Botanic Gardens, Kew, London, p. 165-179, 2000.

LUPEOL ANTI-TUMOR AGENT AND USES THEREOF. Disponível em: <<http://www.faqs.org/patents/app/20080227762> acessado em 04/10/2009>. Acesso em: 04 out.2009.

MACIOCIA, G. **Os fundamentos da medicina chinesa: um texto abrangente para acupunturistas e fisioterapeutas**. Trad. M.D. Farber. São Paulo: Roca, p. 18, 1996.

MALAN, E.; ROUX, D. G. Flavonoids and tannins of *Acacia* species. **Phytochemistry**. v. 14, p. 1835-1841, 1975.

MALAN, E. 7,8,4-trihydroxy-3,3'-dimethoxy flavone from the heartwood of *Acacia nigrescens*. **Phytochemistry**. v. 33, p. 733-734, 1993.

MALAN, E. A (4 β →5)-linked *proteracacidin dimer* from the *heartwood of Acacia caffra*. **Phytochemistry**. v. 40, p. 1519-1521, 1995.

MALAN, E.; SIREEPARSAD, A. The structure and synthesis of the first dimeric proteracacinidins from *Acacia galpinii*. **Phytochemistry**. v. 38, p. 237-239, 1995.

MALAN, E.; SIREEPARSAD, A.; SWINNY, E.; FERREIRA, D. The structure and synthesis of a 7,8,4'-trihydroxyflavan-epioritin dimer from *Acacia caffra*. **Phytochemistry**. v. 44, p. 529-531, 1997.

MALAN, E. Derivatives of (+)-catechin-5-gallate from the bark of *Acacia nilotica*. **Phytochemistry**. vol. 30, p. 2737-2739, 1991.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das Angiospermas: Leguminosas**. Santa Maria: Ed. UFSM, p. 191, 1997.

MARCUS, D. M. A review of immunogenic and immunomodulatory properties of glycosphingolipids. **Molecular Immunology**. v. 21, p. 1083-91, 1984.

MARINI-BETTOLO, G. B.; FALCO, M. R. Ricerche sui pigmenti delle mimosacee Del Sud América: Naringenine de uma *Acacia longifolia* Del Rio de la Plata. **Annali di Chimica**. v. 41, p. 221-226, 1951.

MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoid Identification**. ed. London: Academic Press., p.40, 1982.

MARKHAN, K. R.; MABRY, T. J.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, p.70, 1970.

MARQUES, L. C. Normatização da produção e comercialização de fitoterápicos no Brasil. In: **SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.** Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª ed., Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.35, 2001.

MASLIN, B. R.; MILLER, J. T.; SEIGLER, D. S. Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae:Mimosoideae). **Australian Systematic Botany**. v. 16, p. 1-18, 2003.

MATOS, F. J. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, editora Adjunto, Fortaleza p.34, 1997.

MENDES, B. V. **Biodiversidade e Desenvolvimento Sustentável do Semi-árido**. Fortaleza: SEMACE, p.108, 1997.

MILES, D. H.; KOKOPOL, U. Tumor inhibitors II: Constituents and antitumor activity of *Sarracenia flava*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 65, p. 284-285, 1976.

MONTERO, E. F. S.; BARBIERI, C. L.; GIORGIO, S.; GARCEZ-SILVA, M. H.; SATO, H.; GOLDENBERG, S.; STRAUS, A. H.; TAKAHASHI, H. K.; KOH, I. H. J. Immunomodulatory effects of Glycosphingolipids on lymphoproliferation and IL-2 production in rodents. **Transplantation Proceedings**. v. 26, p. 1597-8, 1994.

MONTERO, E. F. S.; VON KOSSEL, K; CASTRO, L. C.; FERREIRA R; MARINHO L. C.; NIGRO, A. J. T. Kidney and small intestine morphologic aspects following systemic use of gangliosides. **Transplantation Proceedings**. v. 32, p.1322-3, 2000.

MOREL, C. M. Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. **Embo Reports**. v. 4, p. 35-38, 2003.

MUSTAFA, N. K.; TANIRA, M. O. M.; NSANZE, H. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* subsp. *nilotica* fruit extracts. **Pharmacy and Pharmacology Communications**. v. 5, p. 583-586, 1999.

MUTAI, C.; ABATIS, D.; VAGIAS, C.; MOREAU, D.; ROUSSAKIS, C.; ROUSSIS, V. Cytotoxic Lupane-type Triterpenoids from *Acacia Mellifera*. **Phytochemistry**. v. 65, p. 1159-1164, 2004.

MUTAI, C.; ABATIS, D.; VAGIAS, C.; MOREAU, D.; ROUSSAKIS, C.; ROUSSIS, V. Lupine Triterpenoids from *Acacia Mellifera* with Cytotoxic Activity. **Molecules**. v. 12, p. 1035-1044, 2007.

MUTAI, C.; RUKUNGA, G.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. *In vivo* screening of antimalarial activity of *Acacia mellifera* Benth (leguminosae) on *Plasmodium berghei* in mice. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**. v. 5, p. 46-50, 2008.

MYINT, H. Y.; TIPMANEE, P.; NOSTEN, F.; DAY, N.P.J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. A systematic overview of published antimalarial drug trials. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 98, p. 73-81, 2004.

NASSAR, M. I. Apigenin-C-glycoside from de Leaves of *Acacia laeta* and their Anticancer Activity Evaluation. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, p. 73-77, 1999.

NABI, A.; REISINGER, E.C.; REINTHALER, F.F.; STILL, F.; EIBEL, U.; KREJS, G.J. Antimicrobial activity of *Acacia nilotica* (L) Willd ex Del var. *nilotica* (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 77-79, 1992.

NEWMAN, D. Natural products as sources of new drugs over the period 1981- 2002. **Journal of Natural Products**. v. 66, 2003.

NOEDL, H. Artemisinin resistance: how can we find it? **Trends in Parasitology**. v. 21, p. 404-405, set. 2005.

OGURA, M.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R. Potential anticancer agents IV. Constituents of *Jacaranda causana* Pittier (Bignoniaceae). **Lloydia**. v. 40, p. 157-168, 1977.

OLIVEIRA, A. C. A. X.; DA-MATA, A. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. *Plasmodium berghei* (ANKA): Infections induces CYP2A5 and 2E1 while depressing other CYP isoforms in the mouse liver. **Experimental Parasitology**, n. 113, p. 256-261, 2006.

OLIVEIRA, F. X.; ANDRADE, L. A.; FELIX, L. P. Comparações florísticas e estruturais entre comunidades de Floresta Ombrófila Aberta com diferentes idades, no Município de Areia, PB, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, p. 861-873, 2006.

DE OLIVEIRA, M. M.; SAMPAIO, M.R.P.; SIMON, F.; GILBERT, B.; MORS, W.B. Antitumor activity of condensed flavonols. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 44, p. 41-44, 1972.

OLLIARO, P. L.; TAYLOR, W. R. J. Antimalarial compounds: from bench to bedside. **The Journal of Experimental Biology**. v. 206, p. 3753-3759, 2003.

OLMOS, F.; GIRÃO e SILVA, W. A.; ALBANO, C. G. Aves em oito áreas de caatinga no sul do Ceará e oeste de Pernambuco, nordeste do Brasil: composição, riqueza e similaridade. **Papéis Avulsos de Zoologia**, S. Paulo. v. 45, p. 179-199, 2005.

Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) Malária. 126^a. **Sessão do Comitê Executivo**, tema 4.11 da Agenda Provisória. Washington, D. C.: OPAS/OMS, 2005.

PANSERA, M. R.; IOB, G. A.; ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; ATTI-SERAFINI, L.; CASSEL, E. Extraction of tannin by acacia mearnsii with supercritical fluids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. vol. 47, p. 995-998, 2004.

PARIS, R. Les pigments flavonoiques de diverses espèces d'*Acacia*. **Bulletin de la Société de Chimie Biologique**, v. 35, p.655-660, 1953.

PEITZ, C. Estudo Fitoquímico, Alolopático e Microbiano de *Acacia longifolia* Andr. (Willd.). **Dissertação de Mestrado em Farmácia** – Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003. 79 p.

PEREIRA, D. D. **Plantas em Prosa e Poesia do Semi-árido**. EDUFCEG, p. 219, 2005.

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

PETER, W. Chemotherapy of malaria. In: **Malaria Epidemiology, Chemotherapy, Morphology and Metabolism**. Academic press Inc., New York. 1980.

PETROVICK P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: **SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.** Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed., Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.371-400, 2003.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491-495, 2003.

PINTO, A. C. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. vol. 25, p. 45-61, 2002.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Evolution and Systematics of the Leguminosae. In: **POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.** Advances in Legumes Systematics. Kew: Royal Botanic Gardens, pt.1, p. 1-26, 1981.

POLHILL, R. M.; VIDAL, J. E. Caesalpinieae. In: **POLHILL, R.M.; RAVEN, P.V.** Advances in Legume Systematics 1. London: Royal Botanic Gardens, Kew. p. 81-95, 1981.

POLYA, G. M.; FOO, L. Y. Inhibition on eukaryote signal-regulated protein kinases by plant-derived catechin-related compounds. **Phytochemistry**, v. 35, p. 1399-1405, 1994.

POPOCA, J.; AGUILAR, A.; ALONSO, D.; VILLARREAL, M. L. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican tradicional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 59, nº 3, p. 173-177, 1998.

RAO, J.R.; AHAMED, M.A.; SUBRAMANYAM, G.; SAHIB, P.E. Chemical investigation of *Acacia leucophloea* flowers. **Indian Journal of Natural Products**. v. 7, p. 20-21, 1991.

RANG, H. P.; DALE M. M.; RITTER J. M. **Farmacologia**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

RASTRELLI, L.; SATURNINO, P.; SCHETTINO, O.; DINI, A. Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañihua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 43, p. 2020-2024, 1995.

REY, L. **Parasitologia**. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p. 286-326, 2001.

REY, L. **Parasitologia – Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2ª edição, São Paulo: Editora Guanabara Koogan S/A, p. 599 621,1991.

REYES, S. *Infecções maláricas* por *Plasmodium falciparum* resistente ao tratamento com cloroquina. Situação no Brasil (1960-1981). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 33, p. 109-130, 1981.

RIOS, M. Y. Terpenes, coumarins and flavones from *Acacia pennatula*. *Chemistry of natural compounds*, v. 41, p. 297-298, 2005.

ROBERT, A; MEUNIER, B. Alkylating properties of antimalarial artemisinin derivatives and synthetic trioxanes when activated by a reduced heme model. *Chemistry - A European Journal*. v. 4, p. 1287–1296, 1998.

ROBERT, A; MEUNIER B. Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin? *Chemical Society Reviews*. v .27, p. 273–279, 1998.

ROEP, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, v. 46, p. 305-321, 2003.

ROUX, D. G.; PAULUS, E. Condensed tannins 6: Biochemical and stereochemical interrelations of (+)-fustin from black wattle heartwood (*Acacia molissima*). *Biochemistry Journal*. v. 77, p. 315-320, 1960.

RYAN J. L.; SHINITZKY, M. Possible role for glycosphingolipids in the control of immune responses. *European Journal of Immunology*. v. 9, p. 171-5, 1979.

SA, M. S.; COSTA J. F ; KRETTLI, A. U. ; ZALIS, M. G.; MAIA, G. L. A.; SETTE, I. M. F.; CAMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GIULIETTI, A. M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* in *P. berghei*-infected mice. *Parasitology Research*. v. 104, p. 1432-1455, 2009.

SAHAI, R.; AGARWAL, S. K.; RASTOGI, R. P. Auriculoside, a new flavan glycoside from *Acacia auriculiformis*. *Phytochemistry*, v. 19, p. 1560-1562, 1980.

SAHU, N.P.; ACHARI, B.; BANERJEE, S. 7,3'-dihydroxid-4'-methoxyflavone from seeds of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry*, v. 49, n.5, p. 1425-1426, 1998.

SALEEM, M.; AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Lupeol modulates NF-kappa B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. *Oncogene*. v. 23, p. 5203–5214, 2004.

SALEEM, M.; MURTAZA, I.; TARAPORE, R.S.; SUH, Y.; ADHAMI, V.M.; JOHNSON, J.J.; SIDDIQUI, I.A.; KHAN, N.; ASIM, M.; HAFEEZ, B.B.; SHEKHANI, M.T.; LI, B.; MUKHTAR, H. Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting β -catenin signaling. *Carcinogenesis*. v. 30, p. 808– 817, 2009.

SALEEM, M.; ARIFIN, S.; SHAH, M. S.; AHMED, B.; SULTANA, S. “Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin.” *Pharmacological Research*. v. 43, p. 128-133, 2001.

SANDBERG, F.; DUCHEVSKA, K.; KHRISTOV, V.; SPASOV, S. *Spondianthus preussii* var. *grabber* Engler. Pharmacological screening and occurrence of triterpenes. **Acta Pharmaceutica Suecica**. v. 24, p. 253-256, 1987.

SARKAR, P.; BABU, S. P. S.; SUKUL, N. C. Antifilarial Effect of a Combination of Botanicals from *Acacia auriculiformis* and *Centella asiatica* on Canine Dirofilariasis. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, p. 107-110, 1998.

SCHREIBER, S. L.; CRABTREE, G. R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. **Immunol Today**, v. 13, p. 136-42, 1992

SCHUHLY, W; HEILMANN, J; CALIS, I; STICHER. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Medica**. v. 65, p. 740-743, 1999.

SEIDL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v. 74, n. 1, 2002.

SEKINE, T; FUKASAWA, N.; IKEGAMI, F.; SAITO K.; FUJII, Y.; MURAKOSHI, I. Structure and synthesis of a new monoterpenoidal carboxiamide from the seeds of the Thaimedicinal plant *Acacia concinna*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, p. 148-151, 1997.

SERRA, I. Rotas do paludismo. RIHECOB – Red de Intercâmbios para la Historia e La Epistemologia de las Ciencias Químicas e Biológicas. Lisboa, 2003. Disponível em: http://www.triplov.com/cictsul/isabel_serra.html. Acesso em: 19 jan. 2006.

SHAH, B. H.; SAFDAR, B.; VIRANI, S. S.; NAWAZ, Z.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. The antiplatelet aggregatory activity of *Acacia nilotica* is due to blockade of calcium influx through membrane calcium channels. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, p. 251-255, 1997.

SHAM, J. S. K.; CHIU, K. W.; PANG, P. K. T. Hipotensive action of *Acacia catechu*. **Planta Médica**. V. 50, p. 177-180, 1984.

SHARMA, P.; DAYAL, R.; AYYAR, K. S. Chemical constituentes of *Acacia catechu* leaves. **Journal of Indian Chemistry Society**. v. 74, p.60, 1997.

SHARMA, P.; DAYAL, R.; AYYAR, K. S. Acylglucosterols from *Acacia catechu*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 21, n° 4, p. 1002-1005, 1999.

SHI, H. M.; WILLIAMS. I. D.; SUNG, H. H.; ZHU, H. X.; IP N. Y.; MIN, Z. D. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. **Planta Medical**. v. 71, p. 349-54, 2005.

SILVA, V. C. Análise dos Flavonóides da Acácia longifolia (ANDR.) Willd. Leguminosae – Mimosoideae. Curitiba. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas** – Setor de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Paraná. p. 81, 2001.

SIMON, L. S. The treatment of rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. v. 18, p. 507-38. 2004.

SOARES, M. B. P.; BELLINTANI, M. C.; RIBEIRO I. M.; TOMASSINI, T. C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, p. 107-112, 2003.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; ENDRESS, P. K.; CHASE, M. W. **Phylogeny and Evolution of Angiosperms**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts U.S.A, p. 370, 2005.

SOTOHY, S. A.; ISMAIL, A. A.; MUELLER, W. Further studies on the antimicrobial properties of some plant materials in relation to their tannin content. **Proceedings of the Third Scientific Congress Egyptian Society for Cattle Diseases**, v. 1, n.1-3, 1995.

SPADA, A.; CAMERONI, R. Flavonic pigments of the pollen of *Acacia dealbata*. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 86, p. 965-979, 1956.

STEELE, J. C. P.; WARHURST, D. C.; KIRBY, G. C.; SIMMONDS, M. S. J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytotherapy Research**. v. 3, p. 115–119, 1999.

SUKSAMRAM, A., Tanachatchairatana, T., Kanokmedhakul, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 88, p 275–277, 2003.

SUNITHA, S.; NAGARAJ M.; VARALAKSHMI, P. Hepatoprotective effect of lupeol and linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. **Fitoterapia**, v. 72, p. 516–523, 2001.

TAPPI, G.; SPADA, A.; CAMERONI, R. Flavone pigments of the pollen of *Acacia dealbata*. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 85, p. 703-713, 1995.

TINDALE, M. D.; ROUX, D. G. A Phytochemical survey of the Australian species of *Acacia*. **Phytochemistry**, v. 8, p. 1713-1727, 1969.

TUCKER, S. C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**. v. 131, p. 911- 926, 2003.

UCHÔA, VALDILÉIA TEIXEIRA; SANT'ANA, ANTÔNIO EUZÉBIO G; CARVALHO, J. M.; SILVA, S. A. S. Substâncias isoladas das fases ativas de *Acacia langsdorfii* Benth e *Ziziphus juazeiro* Mart. **XXVIII Reunião Nordestina de Botânica Diversidade Vegetal do Nordeste: Formações Nativas e Ecotonais**, 2005.

VALSAKUMARI, M. K.; SULOCHANA, N. Chemical examination of *Acacia leucophloea*. **Journal of the Indian Chemical Society**. v. 68, p. 673-674, 1991.

VALLE, J. R.; **A Farmacologia no Brasil, Antecedentes e Perspectivas**. Academia de Ciências do Estado de São Paulo: São Paulo, p.24, 1978.

VASCONCELOS, J. F.; TEIXEIRA M. M.; BARBOSA-FILHO J. M.; LÚCIO A. S.; ALMEIDA JR.; QUEIROZ, L. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P. The triterpenoid lupeol attenuates allergic airway inflammation in a murine model. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1216-1221, 2008.

VERPOORTE, R. Chemodiversity and the biological role of secondary metabolites, some thoughts for select plant material for drug development. In: **BOHLIN, L.; BRUHN, J. G.** Bioassay Methods in Natural Products Research and Drug Development. London. Kluwer. p.11-23, 1999.

WASSEL, G. M; EL-WAHAB, S.M.A.; AMMAR, N.M.; AFIFI, M.S. Phytochemical examination and biological studies of *Acacia nilotica* L. Willd and *Acacia farnesiana* L. Willd Growing in Egypt. **Egyptian Journal of Pharmaceutica Sciences**. v. 33, p. 327-340, 1992.

WENG, J. R.; TSAO, L. T.; YEN, M. H.; WANG, J. P.; LIN, C. N. Anti-inflammatory constituents and new pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*. **Journal of Natural Products**. v. 66, p. 404-407, 2003.

WINK, M.; MOHAMED, G. I. A. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the rbcL gene. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p. 897–917, 2003.

WOLLENWEBER, ECKARD, SEIGLER, DAVID S. Flavonoids from the exsudate of *Acacia neovernicosa*. **Phytochemistry**. v. 21, p. 1063-1066, 1982.

WHO. **O Controle da Esquistossomose**. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, p.18, 1994.

WHO. **Regional Office of Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila: Who, p.4, 2007.

WHO –World Health Organization. Roll Back Malaria. Disponível em: <http://www.rmb.who.int>. Acesso em: 05 jan. 2006.

ZHAO, W.; YE, Q.; TAN, X.; JIANG, H.; LI, X.; CHEN, K.; KINGHORN, A. D. Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. **Journal of Natural Products**. v. 64, p. 1196-2000, 2001.

ZIEGLER, H.L.; FRANZYK, H.; SAIRAFIANPOUR, M.; TABATABAI, M.; TEHRANI, M. D.; BAGHERZADEH, K.; HAGERSTRAND, H.; STAERK, D.; JAROSZEWSKI, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure–activity relationships for betulinic acid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 12, 119-127, 2004.

ZIEGLER, H.L., STAERK, D., CHRISTENSEN, J., HVIID, L., HAGERSTRAND, H., JAROSZEWSKI, J.W. *In vitro Plasmodium falciparum* drug sensitivity assay: inhibition of parasite growth by incorporation of stomatocytogenic amphiphiles into the erythrocyte membrane. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, p. 1441–1446, 2002.