

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

**Análise Fitoquímica e Ensaio Biológicos de
Didymopanax morototoni (Aubl.) Decne. &
Planch. (Araliaceae)**

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57.072-970 – Maceió-AL



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



Análise Fitoquímica e Ensaio Biológicos de *Didymopanax morototoni*(Aubl.) Decne. & Planch. (Araliaceaea)

Ana Lucila dos Santos Costa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia
Sub-área: Produtos Naturais

Orientador: Prof^o. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Co-orientação, Prof^a. Dr.^a Isis Martins Figueiredo

Maceió – Alagoas
Dezembro de 2011

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

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

- C837e Costa, Ana Lucila dos Santos.
Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Didymopanax morototoni*
(Araliaceae) / Ana Lucila dos Santos Costa. – 2011.
167 f. : il. tabs., graf.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
Co-orientadora: Isis Martins Figueiredo.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal
de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2011.
- Inclui bibliografia.
1. Atividade antitumoral. 2. Larvicida. 3. Moluscicida. 4. Triterpenos
glicosilados. I. Título.

CDU: 543.9:615.322



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
57072-670, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384
email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de **Ana Lucila dos Santos Costa**, intitulada: "**Estudo Fitoquímico e Ensaio Biológicos de *Didymopanax morototoni* (Araliaceae)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 14 de dezembro de 2013, às 14 horas, no Auditório Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar-Severinão/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Antônio Euzébio Coutinho Sant'Ana
Orientador - PPGQB/QB/UFAL

Prof.ª Dr.ª Érica Adélia Nogueira Ribeiro
EENFAR/UFAL

Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Salles Trevisan
UFCE

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

Prof. Dr. Edson de Souza Bento
PPGQB/QB/UFAL

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC) pelo cuidado com a excelência dos Cursos de pós-graduação *stricto sensu* e pelo acesso aos Periódicos da Capes;

Ao orientador, Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana pela oportunidade, incentivo, orientação e confiança durante o doutoramento;

A Co-orientação, Prof^a. Dr.^a Isis Martins Figueiredo

Ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas pelo Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, responsável minha qualificação profissional;

À Coordenação do Programa de Pós-graduação de Química e Biotecnologia pelo apoio;

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz, aos Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais e de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas e ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco onde foram desenvolvidos os experimentos e análises;

Aos Prof. Dennis Imbroisi e Sônia Salgueiro pelo apoio e amizade;

Aos Professores do Instituto de Química, pelos ensinamentos e apoio durante o doutorado;

A minha mãe Marluce Gouveia dos Santos e minhas tias Ana Maria e Reny, por ter sempre acreditado em mim;

Aos meus irmãos, ao meu amor e primos por sempre me incentivar nesta etapa de minha vida.

Aos técnicos Aldy Santos e Margarida Teodoro que sempre estiveram disponíveis e muito contribuíram para este trabalho

Aos amigos de laboratório: Amélia, Claudia, Karla, Isis, Emília, Érica, Elica, Dannielle, Cenira, Kirley, Luciana, Milena, Edjane, Mariana, Edilson, Daniel Silva, Daniel Lira, Pedro, Vanderson, Lúcio, toago, Benisio, Karlos Lisboa, João e demais colegas, pela amizade, pelas trocas de conhecimento e experiências durante nossa convivência;

As minhas amigas: Ana Paula, Brancilene, Carolina, Glauciene, Janaína, Rose, Valckicia.

Aos amigos e colegas da FASVIPA e FASETE: Andréa, Auriane, Albanete, Cecília, Carla Katarina, Carla Pinto, Daniela, Glaucia, Gleonice, Janaína, Marta, Noélia, Sibebe, Alexandre, Elcio, Carlos, Diógenes, Fabiano, Francisco, Frázio, Josemildo, Junior, Gilvan, Rafael, Wilson e demais colegas, pelas trocas de conhecimento e experiências;

Enfim, a todos que, de uma forma direta ou indireta, colaboraram com este projeto, os meus mais sinceros agradecimentos.

Dedico este trabalho: Aos meus irmãos Fábio, Fabiano e Fernando, que enquanto estiveram na terra fez-me privilegiada em receber todo carinho, amizade e ensinamentos, no qual usei para continuar seguindo em direção aos meus objetivos sejam eles acadêmicos, profissionais ou pessoais. E a minha avó Lucila Costa Lima também falecida que sempre me incentivou, acreditou e investiu em meus estudos.

RESUMO

A espécie *Didymopanax morototoni* (Araliaceae), conhecida como morototó, é utilizada na medicina popular de alguns países da América Latina e no Brasil é usado para regular o fluxo menstrual, no entanto, estudos de sua composição química não foram relatados. O presente trabalho avaliou o potencial dos extratos e frações de *D. morototoni* para o controle dos vetores de doenças tropicais, larvas de *Aedes aegypti*, do molusco *Biomphalaria glabrata*, inibição da transcriptase reversa, atividade antitumoral contra as células NCI-H292 e K562 e bem como a elucidação de seis dos princípios ativos. O material vegetal foi coletado no município de Pilar, Estado de Alagoas, e foi submetido a um estudo de fitoquímica guiado pelo bioensaio moluscicida. O extrato bruto da planta foi obtido pela extração com etanol 90% e submetido a fracionamento com solventes de polaridade crescente. A elucidação estrutural dos compostos foi feita com base na análise dos espectros no IV e de RMN, incluindo experimentos 1D e 2D. Foram isolados da fração clorofórmica da casca do caule os o ácido 3-O-β-D- xilopiranosil (1→3) β- glicopiranosil-oleano-12-en-28-oico (DMCC1), a mistura de 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol e 3-O-β-D-glicopiranosil-estigmasterol (DMCC2) e o ácido 3-O-β-D-glicopiranosil (1→2) β - arabinopiranosil (4→ 1) β- glicopiranosil- oleano-12-en-28-oico (DMCC3), e da fração hexânica da madeira a mistura dos esteróides estigmasterol e β-sitosterol (DMM1), ácido oleanólico (DMM2), ácido ursólico (DMM3). O extrato etanólico da folha de *D. morototoni* foi ativo frente às larvas de *Aedes aegypti* com CL_{50} 55,0264 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Os extratos etanólico da madeira, casca do caule e raiz apresentaram atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. O extrato etanólico da raiz exibiu maior atividade moluscicida com CL_{50} 5,336 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Dentre os compostos isolados os triterpenos glicosilados DMCC1 e DMCC3 apresentaram atividade moluscicida com CL_{50} 1,012 e 0,906 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente. Os extratos etanólico da folha e da casca da raiz inibiram a ação da enzima transcriptase reversa (TR) 100% e 51% respectivamente na concentração de 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Apesar do extrato da casca do caule não apresentar inibição significativa da TR a fração hexânica mostrou 79,62 % de atividade inibitória 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Todas as substâncias isoladas de *D. morototoni* inibiram a TR, a mistura de 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol e 3-O-β-D-glicopiranosil-estigmasterol apresentou maior potencial inibidor da TR com 70,41% a 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Para o ensaio da atividade antitumoral o melhor resultado foi para extrato etanólico da casca do caule com CI_{50} 3,44 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em K-562 e CI_{50} 8,01 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em NCI-H292. Desse extrato apenas a fração clorofórmica foi ativa com CI_{50} 13,32 e 7,97 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para as células NCI-H292 e K562 respectivamente. O extrato e frações oriundas da casca do caule exibiram atividade imunomodulatória com percentual variando de 64% a 99,25% 100 mg. mL^{-1} . Os resultados da atividade biológica e fitoquímica contribuem para propor a utilização dessa planta como agente moluscicida, antiviral e antitumoral.

Palavras-chave: *Didymopanax morototoni*, Araliaceae, moluscicida, antiviral, antitumoral.

ABSTRACT

The species *Didymopanax morototoni* (araliaceae), known as morototó is used in folk medicine in some countries of Latin America and Brazil is used to regulate menstrual flow, however, studies of its chemical composition were not reported. This study evaluated the potential of extracts and fractions of *D. morototoni* for the control of tropical disease vectors, *Aedes aegypti* larvae, the mollusk *Biomphalaria glabrata*, inhibition of reverse transcriptase, antitumor activity against the NCI-H292 cells and K562, and as well as the elucidation of the six active ingredients. The plant material was collected in the municipality of Pilar, Alagoas State, and was subjected to a phytochemical study led by the molluscicidal bioassay. The crude extract of the plant was obtained by extraction with 90% ethanol and subjected to fractionation with solvents of increasing polarity. The structural elucidation of compounds was based on the analysis of IR spectra and NMR, experiments including 1D and 2D. Were isolated from the chloroform fraction of the stem bark acid 3-O- β -D-xilopiranosil (1 \rightarrow 3) β -glucopyranosyl-olean-12-en-28-oic acid (DMCC1), the mixture of 3-O- β -D-glucopyranosyl-sitosterol and 3-O- β -D-glucopyranosyl-stigmasterol (DMCC2) and acid 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) β - arabinopiranosil (4 \rightarrow 1) β -glucopyranosyl-olean-12-en-28-oic acid (DMCC3), and the hexane fraction of the wood the mixture of steroids stigmasterol and β -sitosterol (DMM1), oleanolic acid (DMM2), ursolic acid (DMM3). The ethanolic leaf extract of *D. morototoni* was active against the larvae of *Aedes aegypti* with LC₅₀ 55.0264 mg. mL⁻¹. The ethanolic extract of the wood, stem bark and root have shown molluscicidal activity against the snail *Biomphalaria glabrata*. The ethanol extract of the root exhibited higher molluscicidal activity with LC₅₀ 5.336 mg. mL⁻¹. among the compounds isolated the triterpene glycosides and DMCC1 DMCC3 showed molluscicidal activity with LC₅₀ 1.012 and 0.906 mg. mL⁻¹ respectively. The ethanol extracts of leaf and root bark inhibited the action of the enzyme reverse transcriptase (RT) 100% and 51% respectively at a concentration of 50 mg. mL⁻¹. Although the stem bark extract did not show significant inhibition of TR to the hexane fraction showed 79.62% inhibitory activity of 50 mg. mL⁻¹. All substances isolated from *D. morototoni* inhibited RT, the mixture of 3-O- β -D-glucopyranosyl-sitosterol and 3-O- β -D-glucopyranosyl-stigmasterol showed the greatest potential inhibitor of TR with 70.41% at 10 mg. mL⁻¹. For testing the antitumor activity was the best result for the ethanolic extract of stem bark with IC₅₀ 3.44 mg. mL⁻¹ and K-562 IC₅₀ 8.01 mg. mL⁻¹ in NCI-H292. This extract only the chloroform fraction was active with IC₅₀ 7.97 and 13.32 mg. mL⁻¹ for NCI-H292 cells and K562 respectively. The extract and fractions derived from the stem bark showed activity imunomodulatória with a percentage ranging from 64% to 99.25% 100 mg. mL⁻¹. The results of phytochemical and biological activity contribute to propose the use of this plant molluscicide agent, antiviral and antitumor.

KEYWORDS: *Didymopanax morototoni*, Araliaceae, molluscicidal, antiviral, antitumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituintes químicos isolados de <i>S. abyssinica</i>	22
Figura 2. Constituintes químicos isolados de <i>S. arboricola</i> .	22
Figura 3. Constituintes químicos isolados de <i>S. bodinieri</i> .	23
Figura 4. Constituintes químicos isolados de <i>S. divaricata</i>	24
Figura 5. Constituintes químicos isolados de <i>S. heptaphylla</i>	24
Figura 6. Constituintes químicos isolados de <i>S. octophylla</i> .	24
Figura 7. Constituintes químicos isolados de <i>S. Umbellifera</i> .	25
Figura 8. Constituintes químicos isolados de <i>S. venulosa</i> .	25
Figura 9. Árvore de <i>Didymopanax morototoni</i> .	26
Figura 10. Substâncias utilizadas no controle da esquistossomose.	29
Figura 11. Substâncias utilizadas no tratamento das leishmanioses.	32
Figura 12. Substâncias utilizadas no tratamento da doença de Chagas.	33
Figura 13. Biossíntese da acetilcolina	36
Figura 14. Hidrólise da acetilcolina	36
Figura 15. Estruturas moleculares de alguns inibidores da acetilcolinesterase.	37
Figura 16. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da folha da espécie <i>D. morototoni</i>	44
Figura 17. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da casca do caule da espécie <i>D. morototoni</i> .	45
Figura 18. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da madeira do caule da espécie <i>D. morototoni</i>	46
Figura 19. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da raiz da espécie <i>D. morototoni</i> .	47
Figura 20. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da casca da raiz da espécie <i>D. morototoni</i>	48
Figura 21. Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração II em clorofórmio da casca do caule de <i>D. morototoni</i> .	50
Figura 22. Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração III em clorofórmio da casca do caule de <i>D. morototoni</i> .	52
Figura 23. Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração hexânica do caule de <i>D. morototoni</i> .	53
Figura 24. Espectro na região do infravermelho da substância codificada DMCC1 obtido através da técnica de ATR.	77
Figura 25. Espectro de RMN ¹ H da DMCC1, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2	78
Figura 26. Espectro de RMN ¹ H da DMCC1 com expansão, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	79
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C da DMCC1, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	80

Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C da DMCC1 com expansão, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	81
Figura 29. Espectro de DEPT 135 da DMCC1, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	82
Figura 30. Espectro de ¹³ C e DEPT 135 da DMCC1, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:	83
Figura 31. Espectro de HSQC da DMCC1, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	84
Figura 32. Espectro de HMBC da DMCC1, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	85
Figura 33. Espectro de COSY da DMCC1, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:	86
Figura 34. Estrutura química do triterpeno DMCC1 do tipo oleano isolado de <i>D. morototoni</i> .	89
Figura 35. Espectro na região do infravermelho das substâncias DMCC2 obtido através da técnica de ATR.	89
Figura 36. Espectro de RMN ¹ H da DMCC2, Solvente CDCl ₃ .	90
Figura 37. Espectro de RMN ¹³ C da DMCC2, Solvente CDCl ₃ .	91
Figura 38. Estrutura das substâncias DMCC2a e DMCC2b isoladas da casca do caule de <i>D. morototoni</i> .	93
Figura 39. Espectro na região do infravermelho da substância DMCC3.	93
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H da DMCC3, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	94
Figura 41. Espectro de RMN ¹ H da DMCC3 com expansão, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	95
Figura 42. Espectro de RMN ¹³ C da DMCC3, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2	96
Figura 43. Espectro de RMN ¹³ C da DMCC3, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2	97
Figura 44. Espectro de DEPT 135 da DMCC3 em expansão, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	98
Figura 45. Espectro de ¹³ C e DEPT 135 da DMCC3, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	99
Figura 46. Espectro de HSQC da DMCC3, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	100
Figura 47. Espectro de HMBC da DMCC3, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	101
Figura 48. Espectro de COSY da DMCC3, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:2.	102
Figura 49. Estrutura química do triterpeno DMCC3 do tipo oleano isolado de <i>D. morototoni</i> .	106
Figura 50. Espectro na região do infravermelho da mistura codificada como DMM1 obtido através da técnica de ATR.	106
Figura 51. Espectro de RMN ¹ H da DMM1, Solvente CDCl ₃ .	107
Figura 52. Espectro de RMN ¹ H da DMM1 com expansão, Solvente CDCl ₃ .	108
Figura 53. Espectro de RMN ¹³ C da DMM1, Solvente CDCl ₃ .	109
Figura 54. Espectro de RMN ¹³ C da DMM1 com expansão, Solvente CDCl ₃ .	110
Figura 55. Estruturas da mistura da substância DMM1 isoladas do caule de <i>D. morototoni</i> .	112
Figura 56. Espectro na região do infravermelho da substância DMM2 obtido através da técnica de ATR.	112
Figura 57. Espectro de RMN ¹ H da DMM2, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:1.	113
Figura 58. Espectro de RMN ¹ H da DMM2 com expansão, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:1	114
Figura 59. Espectro de RMN ¹³ C da DMM2, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:1.	115

Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C da DMM2 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	116
Figura 61. Espectro de DEPT 135 da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1	117
Figura 62. Espectro de ^{13}C e DEPT 135 da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	118
Figura 63. Espectro de HSQC da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	119
Figura 64. Espectro de HMBC da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	120
Figura 65. Espectro de COSY da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	121
Figura 66. Estrutura da substância DMM2 isolada do caule de <i>D. morototoni</i> .	124
Figura 67. Espectro na região do infravermelho da substância DMM3 obtido através da técnica de ATR.	124
Figura 68. Espectro de RMN ^1H da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1	125
Figura 69. Espectro de RMN ^1H da DMM3 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	126
Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	127
Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C da DMM3 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	128
Figura 72. Espectro de DEPT 135 da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1	129
Figura 73. Espectro de HSQC da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1..	130
Figura 74. Espectro de HMBC da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	131
Figura 75. Espectro COSY da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.	132
Figura 76. Estrutura da substância DMM3 isolada do caule de <i>D. morototoni</i> .	135
Figura 77. Redução do MTT (a) a formazana (b) por desidrogenases mitocondriais.	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição Química e Atividades Farmacológicas de Espécies do Gênero <i>Schefflera</i> .	21
Tabela 2. Fracionamento em gel de sílica da fração em CHCl ₃ da casca do caule	49
Tabela 3. Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, HSQC, COSY e HMBC para substância DMCC1. Valores de deslocamento químico em ppm, solvente CDCl ₃ :CD ₃ OD 1:2.	87
Tabela 4. Resultados experimentais de RMN (¹³ C: 100 MHz, ¹ H: 400 MHz CDCl ₃) das substâncias DMCC2a e DMCC2a comparados com a literatura (BORGES, 2006).	92
Tabela 5. Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, HSQC, COSY e HMBC para substância DMCC3. Valores de deslocamento químico em ppm, solvente CDCl ₃ :CD ₃ OD 1:2.)	103
Tabela 6. Resultados experimentais de RMN (¹³ C: 100 MHz, ¹ H: 400 MHz, CDCl ₃) da substância DMM1a e DMM1b comparados com a literatura (BORGES, 2006).	111
Tabela 7. Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, DEPT135°, HSQC, HMBC, COSY da substância DMM2. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:1.	122
Tabela 8. Dados de RMN ¹ H, ¹³ C, DEPT135°, HSQC, HMBC, COSY e NOESY da substância DMM3. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente CDCl ₃ /MeOD 1:1.	133
Tabela 9. Atividade larvicida do extrato etanólico da folha e casca do caule de <i>D. morototoni</i> sobre larvas do quarto estágio <i>A. aegypti</i> em µg.mL ⁻¹ .	146
Tabela 10. Atividade moluscicida de extratos, frações e isolados de <i>D. morototoni</i> sobre caramujos adultos de <i>B. glabrata</i> CL em µg. mL ⁻¹ .	147
Tabela 11. Atividade anticolinesterásica quantitativa do extrato e frações de <i>D. morototoni</i> .	165
Tabela 12. Extratos etanólico, frações e substâncias isoladas de <i>D. morototoni</i> que apresentam atividade inibitória da TR do HIV <i>in vitro</i> .	165
Tabela 13. Atividade citotóxica de extratos e frações de <i>D. morototoni</i> frente às células NCI -H292 e K562.	166
Tabela 14. Atividade imunomodulatória do extrato e frações da casca do caule de <i>D. morototoni</i> .	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
Acetil-CoA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio
But	Butanol
CHCl ₃	Clorofórmio
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
COSY	Correlation Spectroscopy
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CC	Cromatografia em Coluna
δ	Deslocamento Químico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<i>D</i>	Dupleto
<i>Dd</i>	Duplo Dupleto
EtOH	Etanol
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
n-C ₆ H ₁₄	Hexano
IV	Infravermelho
ACTI	Iodeto de acetilcolina
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol Deuterado
Mg	Microgramas
μ L	Microlitros
mL	Mililitros
M	Multipeto
Nm	Nanômetro
NOE	Nuclear Overhauser Effect
OC	Onda Contínua
OMS	Organização Mundial de Saúde
Rf	Rádio Frequência
RMN C ¹²	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN H ¹	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>S</i>	Simpleto
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TR	Transcriptase reversa
TF	Transformada de Fourier
T	Tripleto

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Considerações sobre a Família Araliaceae	19
3.2 Considerações sobre o gênero <i>Schefflera</i>	19
3.2.1 Atividades Biológicas realizadas com o gênero <i>Schefflera</i> descritas na literatura.	21
3.3 Considerações sobre a Espécie <i>Didymopanax morototoni</i> (Aubl.) Decne. & Planch	26
3.4 Utilizações de <i>D. morototoni</i> na Medicina Popular	26
3.5 Considerações Gerais sobre Doenças Negligenciadas	27
3.5.1 Considerações sobre a Esquistossomose Mansônica	27
3.5.2 Considerações sobre a Dengue	30
3.5.3 Considerações sobre Leishmaniose	30
3.5.4 Considerações sobre Doença de Chagas	32
3.6 Imunopatologias	34
3.7 Considerações sobre Doença de Alzheimer	37
3.8 Considerações sobre o câncer	37
3.9 Considerações sobre Infecções Virais	38
4 METODOLOGIA	41
4.1 Condições Experimentais: Reagentes, Solventes e Equipamentos	41
4.1.1 Análise cromatográfica	41
4.1.2 Solventes e Reagentes	41
4.1.3 Reveladores	41
4.1.4 Equipamentos	42
4.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal	43
4.3 Preparações dos Extratos de <i>D. morototoni</i>	43
4.4 Fracionamento e Purificação dos Constituintes Químicos de <i>D.morototoni</i>	48
4.4.1 Casca do caule	49
4.4.1.1 Fração em clorofórmio	49

4.4.2 Madeira do Caule	53
4.4.2.1 Fração em Hexano	53
5. REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO I	54
CAPÍTULO II - PRIMEIRO ARTIGO	64
CAPÍTULO III - SEGUNDO ARTIGO	136
CAPÍTULO IV - TERCEIRO ARTIGO	148
6. CONCLUSÃO GERAL	167

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A comunidade científica mundial está fortemente empenhada na descoberta de produtos naturais biologicamente ativos. Excelentes pesquisas demonstram que as plantas medicinais, na sua forma *in natura*, como tinturas ou extratos, apresentam potenciais terapêuticos para o desenvolvimento de novos produtos (KINGHORN; BALUNAS, 2005; NEWMAN; GRAGG, 2007). Neste sentido, grande parte da população do mundo confia no poder destas espécies como primeiro recurso para cuidar da saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 20002) visto que desde as mais antigas civilizações o homem tem utilizado plantas para fins medicinais e alimentares. É admirável que este conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios, aprofundando-se e diversificando sem nunca, porém, cair totalmente no esquecimento (SILVA; CARVALHO, 2004).

A grandeza da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão devido a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (DIAS, 1996; DI STASI *et al.*, 2002).

Historicamente, os produtos naturais são considerados como excelentes fornecedores de princípios ativos para o benefício da saúde, sendo que mais de 90% das classes terapêuticas derivam de protótipos naturais (NEWMAN; GRAGG, 2007). Isto se deve, em parte, não apenas ao grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos primários e secundários por elas sintetizados.

As indústrias farmacêuticas, motivadas por inúmeros fatores, como: necessidade de inovação e carência de novos fármacos para o tratamento de patologias que permanecem ainda sem tratamento adequado; pressão entre as próprias indústrias e, sobretudo, por vantagens competitivas e declínio de produtividade, vêm investindo soma considerável de recursos, visando o desenvolvimento de novos medicamentos (CALIXTO, 2001a).

Um dos grandes gargalos existente nessa tecnologia é a necessidade de validação através de pesquisas científicas que utilizem modelos adequados de experimentação para comprovação dos efeitos farmacológicos e, em seguida, o isolamento, purificação, caracterização de princípios ativos e mecanismo de ação para a formulação de fitoterápicos

seguros para uso humano e/ou animal. O estudo da dose, concentração e via de administração também são essenciais (RODRIGUES *et al.*, 2008).

Devido a estas necessidades têm se verificado um aumento nos estudos que comprovam alguns dos conhecimentos empíricos, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica (SILVA; CECHINEL, 2002). Tem ocorrido um grande avanço na química de produtos naturais visando à obtenção de novos compostos com propriedades farmacológicas e efetivas no controle de pragas (DI STASI *et al.*, 2002).

No Brasil, dentre as espécies vegetais têm-se a espécie *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch, nativa da América do Sul, pertencente à família taxonômica da Araliaceae, que pode ser encontrada no Brasil desde a floresta amazônica até as florestas nativas do Rio Grande do Sul. Por estar presente em tão vasta extensão ela é conhecida por diversos nomes como pau-caxeta, mandioqueiro, morototó ou yagrumo macho, sendo conhecida internacionalmente como “*matchwood*”, ou “madeira de fósforos”, por ser largamente utilizada na confecção de palitos de fósforo (REITZ *et al.*, 1988). Apesar de ser uma espécie com ampla distribuição geográfica no Brasil, não há estudos tratando de sua composição química.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar estudo fitoquímico e avaliar as atividades biológicas das folhas, casca e madeira do caule, raiz e casca da raiz da espécie *D. morototoni*, visando enriquecer e contribuir para o conhecimento da química desse gênero.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar as atividades biológicas com relação aos potenciais anticolinesterásico, antiviral, citotóxico contra linhagens de câncer, inibidora da proliferação de linfócitos, larvicida, leishmanicida moluscicida, proliferação de linfócitos e redutora do radical óxido nítrico,
- b) Elucidar a estrutura das substâncias isoladas com base em dados de IV e RMN de ^1H e ^{13}C unidimensional e bidimensional.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Considerações sobre a Família Araliaceae

Segundo Fiaschi e Pirani (2005) a família Araliaceae está incluída na ordem Apiales e compreende cerca de 40 gêneros e 1500 espécies no mundo. Seus principais centros de diversidade são sudeste da Ásia, ilhas do Pacífico e América Tropical, sendo pouco representada em regiões temperadas (FRODIN; GOVAERTS, 2003; LOWRY *et al.*, 2004). Esta família é composta por árvores, arvoretas, arbustos e raramente lianas lenhosas e ervas perenes (SOUZA; LORENZI, 2008). No Brasil, as araliáceas são representadas pelos seguintes gêneros nativos *Aralia*, *Dendropanax*, *Oreopanax*, e *Schefflera*, sendo esse último gênero o maior de todos, com 50 espécies (FIASCHI; PIRANI, 2008).

Muitas espécies dos gêneros *Hedera* L., *Aralia* L., *Polyscias* J. R. Forst. & G. Forst., *Fatsia* Decne & Planchon e *Schefflera* J. R. Forst. & G. Forst. são amplamente cultivadas para fins ornamentais em todo mundo (MENEZES *et al.*, 2007; SOUZA; LORENZI, 2008). Outras apresentam substâncias medicinais como o Panax ginseng CA Meyer (DI STASI; HIMURA-LIMA, 2002; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2005), cujas raízes têm sido utilizadas na medicina oriental há mais de 5000 anos (TOMMASI; PIZZA, 1997) e *Aralia* (BOECK, 2005). Também há espécies de valor econômico pelas qualidades da madeira como a *Schefflera morototoni* e *Aralia warmingiana* (March) J. Wen (RUSCHEL *et al.*, 2003).

Os metabólitos secundários característicos da família Araliaceae são os poliacetilenos (GUNZINGER *et al.*, 1986), derivados do ácido caféico (LI *et al.*, 2005) e triterpenos glicosilados que exibem várias atividades incluindo o aumento da eficiência mental, recuperação do equilíbrio físico e estimulação da função metabólica (TOMMASI; PIZZA, 1997).

3.2 Considerações sobre o gênero *Schefflera*

Schefflera J. R. Forst. & G. Forst. é o maior gênero de Araliaceae, com 650–900 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais, especialmente em formações montanhosas como os Andes, montanhas da Malásia e Indonésia Madagascar, ilhas da Melanésia e Planalto das Guianas (FRODIN 2004; PLUNKETT *et al.* 2005).

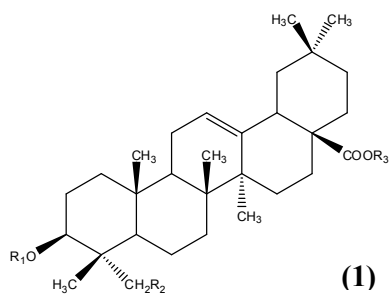
Em função das espécies do gênero apresentar hábitos, sistemas sexuais e caracteres morfológicos variáveis e ampla distribuição geográfica, pouco trabalhos propuseram sistemas de classificação infra-genérica universais para o gênero *Schefflera* (FIASCHI; PIRENI, 2007). Inicialmente, o gênero *Didymopanax* incluía a maioria das 50 espécies brasileiras de *Schefflera* e foi sinonimizado sob o último gênero devido, principalmente, à reconhecida inconstância do número de lóculos do ovário (FRODIN, 1995). *Schefflera* que constitui um grupo polifilético composto por 900 espécies agrupadas em cinco linhagens evolutivas independentes, referidas como os clados Asiático (200–300 spp.), Neotropical (ca. 300 spp.), Africano-Madagascar (ca. 50 spp.), Pacífico (ca. 45 spp.) e *Schefflera* sensu stricto (8 spp.) (LOWRY *et al.* 2004; PLUNKETT *et al.* 2005). Das 300 espécies neotropicais de *Schefflera*, estima-se que 60 ocorram no Brasil, o gênero encontra-se mais bem representado na Mata Atlântica do Sudeste nos Planaltos Central (principalmente ao longo da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais) e das Guianas (FRODIN, 1995; FIASCHI, 2004; FIASCHI; PIRANI 2005, 2007).

A revisão da literatura relacionada com o gênero *Schefflera* revelou que essas plantas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças reumáticas, artrite, fraturas, entorses, lombalgia e dor de estômago no sudoeste da China, Vietnã e Índia (LIAO, 1986). Os metabólitos secundários e as atividades características desta família estão representados na **tabela 1 e Figuras 1 a 8**.

3.2.1 Atividades Biológicas realizadas com o gênero *Schefflera* descritas na literatura.

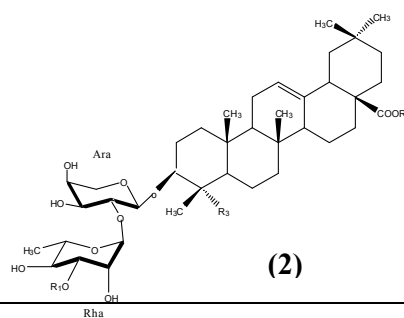
Tabela 1. Composição Química e Atividades Farmacológicas de Espécies do Gênero *Schefflera*.

Espécie	Parte da Planta	Atividade	Classes de substâncias	Referências		
<i>S. abyssinica</i>	Folha	Antitumoral	Triterpenos e Triterpenos glicosilado (1)	TAPONDJOU <i>et al.</i> , 2006		
<i>S. arboricola</i>	Madeira do caule, folha e raiz	Anti-reumática, sedativa, hipnótico, analgésico, anticonvulsivante, relaxante muscular	Triterpenos glicosilado (2)	GUO <i>et al.</i> , 2006; MELEK <i>et al.</i> , 2003		
<i>S. bodinieri</i>	Raiz	Receptores GABA e 5HT	Triterpenos glicosilado (3)	ZHU <i>et al.</i> , 1996		
<i>S. divaricata</i>	Folha e flor	anti-reumático e tônico	Triterpenos (4 e 5)	TOMMASI; PIZZA, 1997		
<i>S. heptaphylla</i>	Folha	Antipirético, anti-inflamatório, anti-reumático, antiviral, antiproliferativa	Compostos fenólicos derivados do ácido cafeoilquínico (6-8)	CHEN <i>et al.</i> , 2002; LI <i>et al.</i> , 2005, 2009		
<i>S. leucantha</i>	Folha	Antibacteriano, antiasmático, antioxidante, antitumoral, hipoglicemiante e repelente	*	PANTHONG <i>et al.</i> , 1986; SINCHAI SRI <i>et al.</i> , 1988; HIRANRAMDEJ, 1992; TAYLOR, 1994; POTDUANG <i>et al.</i> , 2007		
<i>S. octophylla</i>	Folha	Anti-reumático	Triterpenos (9 e 10)	SUNG, 1992		
<i>S. umbellifera</i>	Folha	Anti-reumático, antiulcerativo, antimalárico, diurético, antieméticos, antipirético	Cumarina (11), esteróides (12) e terpenos (13)	HUTCHINGS <i>et al.</i> , 1996; MTHEMBU <i>et al.</i> , 2010		
<i>S. venulosa</i>	Caule	Anti-reumático, antitumoral	triterpenos (14 e 15)	LIU <i>et al.</i> , 2005		
*Não	foram	encontrados	estudos	na	literatura	pesquisada



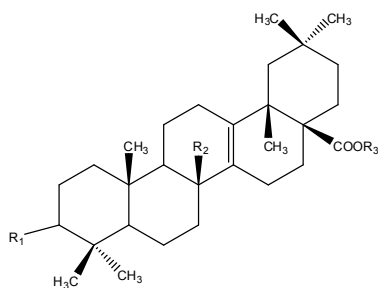
R₁	R₂	R₃
H	H	H
H	OH	H
	H	H
	OH	H

Figura 1. Constituintes químicos isolados de *S. abyssinica*



R₁	R₂	R₃
	H	CH ₃
	H	CH ₃
	H	CH ₂ OH
		CH ₃

Figura 2. Constituintes químicos isolados de *S. arboricola*.



(3)

R ₁	R ₂	R ₃
	H	
=O	H	
	H	
	CH ₃	

Figura 3. Constituintes químicos aislados de *S. bodinieri*.

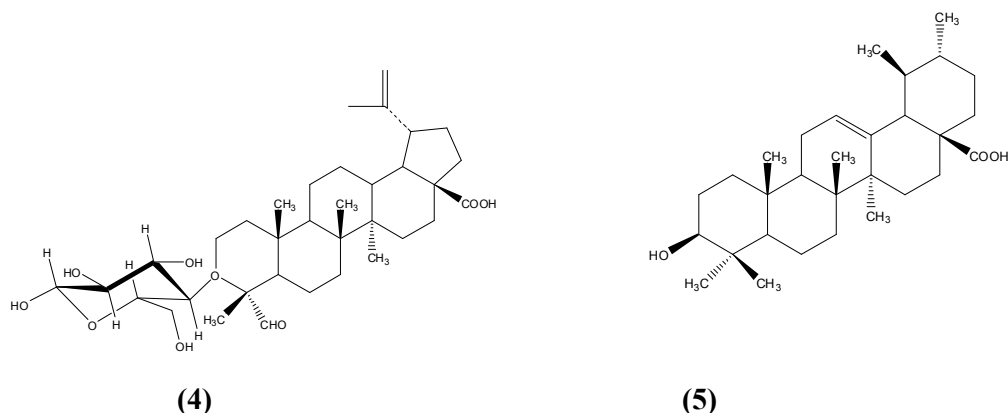


Figura 4. Constituintes químicos aislados de *S. divaricata*

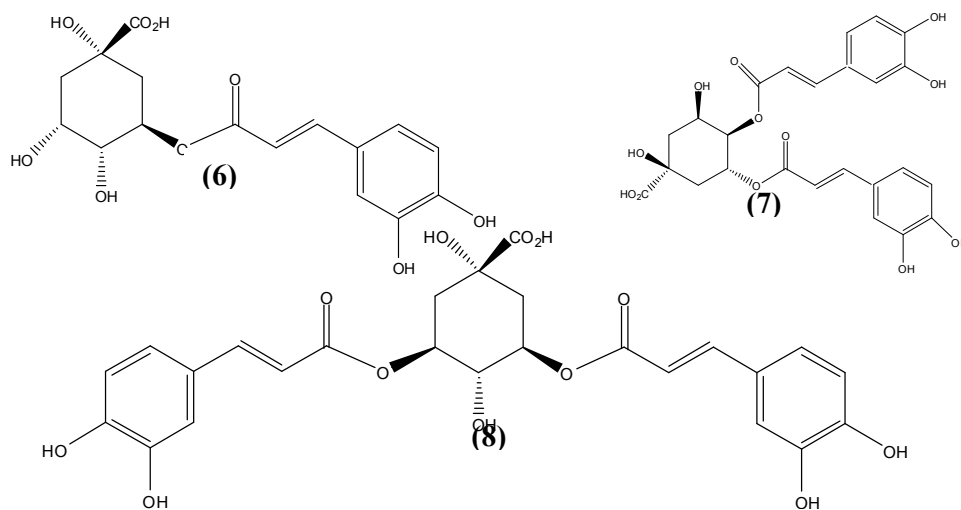


Figura 5. Constituintes químicos aislados de *S. heptaphylla*.

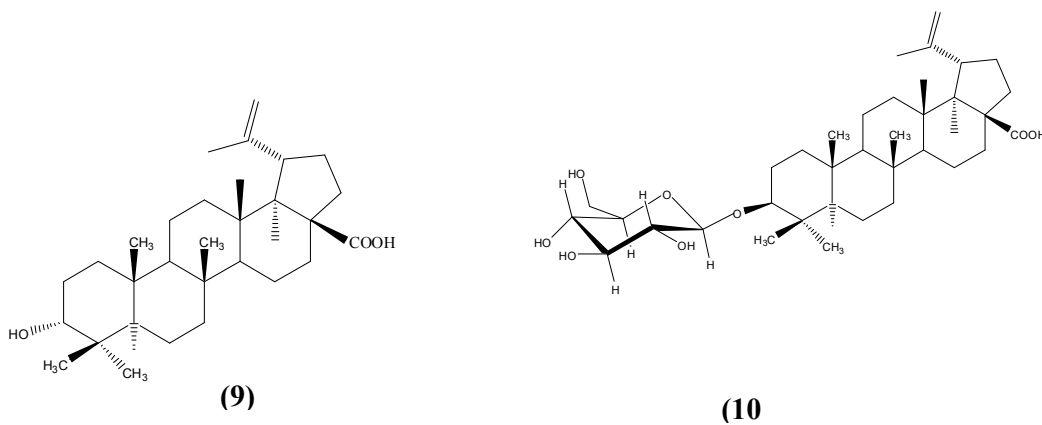


Figura 6. Constituintes químicos aislados de *S. octophylla*.

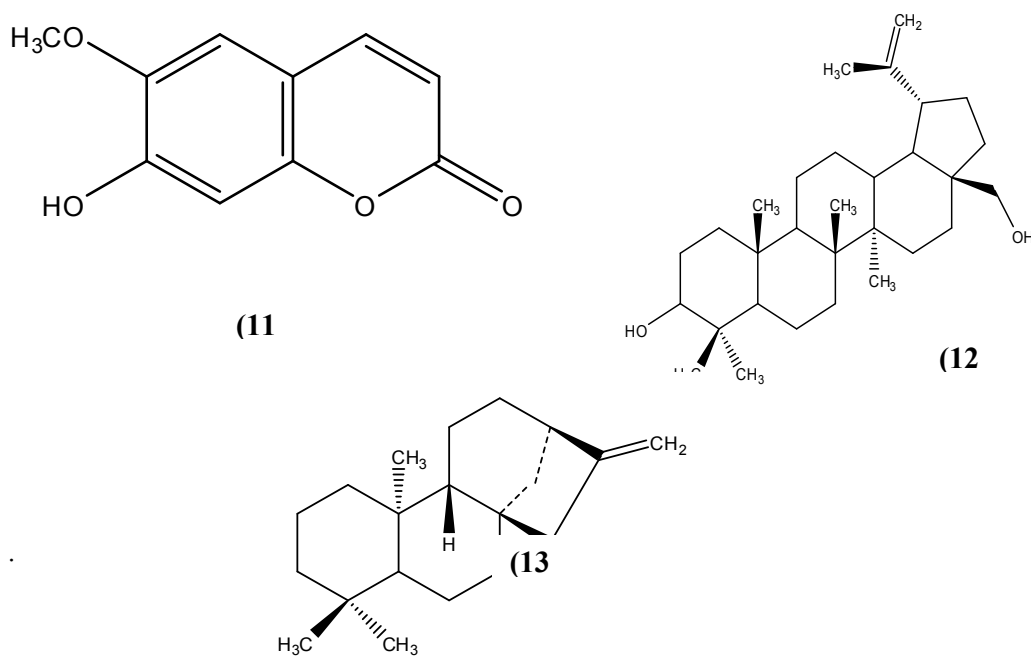


Figura 7. Constituintes químicos aislados de *S. Umbellifera*

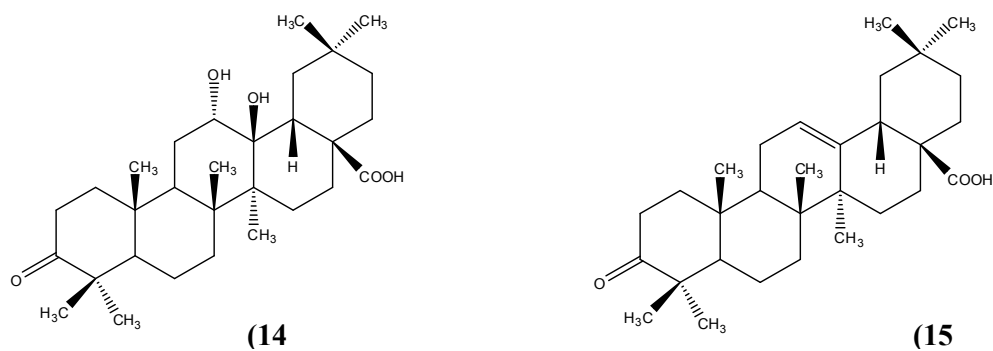


Figura 8. Constituintes químicos aislados de *S. venulosa*.

3.3 Considerações sobre a Espécie *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Decne. & Planch.

Didymopanax morototoni (Aubl.) Decne. & Planch. é uma árvore da família Araliaceae (MANTOVANI *et al.* 1999). No Brasil, é encontrada na Mata Atlântica e em formações florestais inseridas no domínio do Cerrado e na floresta Amazônica (FIASCHI; PIRANI, 2008) e em todos os estados brasileiros (FIASCHI; PIRANI, 2008).

É conhecida popularmente como caixeta, morototó, mandiocaí, pau-mandioca, mandiocão, marupá, marupaúba, mixixica, mandioqueira e louro-sambaqui (REITZ *et al.*, 1988; CARVALHO, 1994; DANIEL *et al.*, 1994).

A caixeta como muitas espécies produtoras de madeira, tem despertado o interesse para o uso industrial, e ainda, pelo seu fuste cilíndrico e reto, com ramificações somente no ápice e crescimento rápido, a espécie apresenta grande potencial silvicultural (FRANCO; FERREIRA, 2002; ANASTÁCIO, 2010) e é empregada na fabricação de pasta celulósica e papel (OHASHI; LEÃO, 2005), além disto, a madeira é de fácil manuseio e acabamento sendo utilizada na produção de fósforo (YARED *et al.*, 1989).



Figura 9. Árvore de *Didymopanax morototoni*. **Fonte:** <<http://www.our-tree-garden.com/didymopanax-morototoni.htm>> Acessado em 11/11/2011.

3.4 Utilizações de *D. morototoni* na Medicina Popular

No Brasil a raiz, folha e madeira do caule de *D. morototoni* são utilizadas para regular o fluxo menstrual (CARNEIRO, 2009). A casca do caule é usada na Nova Guiana para o tratamento da picada de escorpião, úlceras e feridas. No Suriname a madeira do caule é

usada para o tratamento de abscessos e suas cascas e folhas são empregadas para o tratamento da malária.

Alguns guianos franceses atribuem às raízes as mesmas propriedades benéficas do *Panax ginseng* e testes químicos confirmam que as raízes contêm as mesmas atividades das saponinas do *Panax ginseng* (FILIPPS *et al.*, 2004).

3.5 Considerações Gerais sobre Doenças Negligenciadas

As doenças negligenciadas prevalecem em condições de pobreza e apresentam forte entrave ao desenvolvimento do país. Essas doenças constituem um grave problema de saúde pública, devido às manifestações que ocasionam à ampla distribuição, e por não possuírem tratamento eficaz e seguro. Além disso, não se pode esperar em um curto período de tempo, o desenvolvimento de vacinas (DENISE *et al.*, 1999), visto 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 (MOREL, 2003). Estima-se que 20-30 novos fármacos serão necessários para o controle prolongado das doenças tropicais (GELB; HOL, 2002).

O interesse na busca por agentes esquistossomicidas, larvicida, leishmanicida e tripanocida de origem natural é objetivo de estudo do nosso grupo de pesquisa (OMENA *et al.*, 2007). Estudos realizados com extratos brutos de *D. morotoni* demonstraram atividade anti-helmíntica, larvicida (OMENA *et al.*, 2007) e moluscicida (MELÉNDEZ; CAPRILES, 2002), servindo como um fator decisivo para a escolha desta planta para estudo frente às doenças negligenciadas.

3.5.1 Considerações sobre a Esquistossomose Mansônica

A esquistossomose mansônica é uma doença endêmica em 74 países tropicais, cujo agente etiológico é o trematódeo *Schistosoma mansoni*. Esta doença é adquirida pela penetração de cercárias na pele de hospedeiros suscetíveis, como o homem e animais silvestres. A cercária, ao penetrar a pele dos hospedeiros, dá origem ao esquistossômulo e, posteriormente, ao helminto adulto cujos ovos são eliminados nas fezes dos hospedeiros.

Estes ovos, ao entrarem em contato com a água, liberam miracídios, que são formas de vida livre, capazes de infectar caramujos suscetíveis, como *Biomphalaria glabrata* (OLIVEIRA, 2002). Através do estudo do ciclo de vida do *S. mansoni*, ficou evidenciado que a propagação da doença em uma região depende basicamente de três fatores: da presença de indivíduos eliminando ovos, da existência de hospedeiros intermediários e do contato de pessoas com águas naturais, infectadas de cercárias. Assim, no combate a essa doença há dois caminhos a seguir: o tratamento de indivíduos infectados e a profilaxia mediante a destruição das cercárias e dos caramujos, hospedeiros intermediários (PRATA, 1987). No Brasil, existem de cinco a seis milhões de pessoas infectadas, distribuídas desde o Maranhão até Minas Gerais (MARONE, 2006), com aproximadamente 26 milhões de pessoas em áreas endêmicas (FUNASA, 2003). Alagoas é endêmica em 60 % dos municípios e mais de dois milhões de indivíduos estão expostos à infecção (COUTO, 2005). Em 2006 foram registrados no Brasil 106.989 casos confirmados de esquistossomose, com 17.922 casos em Alagoas (SVS, 2007). Os compostos esquistossomicidas destroem os vermes parasitos ou são capazes de removê-los do hospedeiro.

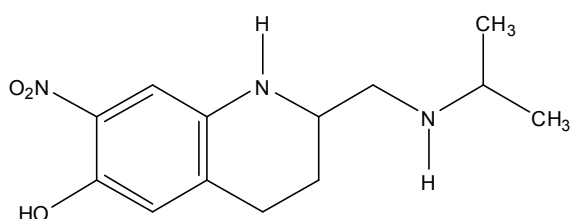
No entanto, ainda não se descobriu um esquistossomicida ideal, diversos tipos de fármacos com esta atividade vêm sendo utilizados isoladamente ou em combinações entre si. A oxamniquina (**16**) é o agente esquistossomicida de principal uso na terapêutica brasileira por ter a mesma eficácia e menor custo em relação ao fármaco alternativo, praziquantel (**17**) (XIAO *et al.*, 2000). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o método mais eficiente para o controle desta doença é associar a quimioterapia ao uso de moluscidas nas áreas de ocorrência dos hospedeiros intermediários. A substância sintética chamada niclosamida (Bayluscide[®]) (**18**) produzida pela Bayer é o moluscida padrão utilizada desde 1960 promove 100% de mortalidade sobre o caramujo, na concentração de 1,5 µg. mL⁻¹ em duas horas de exposição, reconhecido pela OMS por ter provado que é eficiente no controle dos caramujos e menos prejudicial ao meio ambiente e ao homem, no entanto, seu alto custo, facilidade de decompor-se sob ação da luz solar, surgimento da resistência dos caramujos vêm limitando seu uso nos locais de ocorrência, principalmente em países em desenvolvimento, os quais geralmente apresentam sérios problemas de saneamento básico (DELGADO *et al.* 2002).

Dessa forma, a busca por moluscidas a partir de plantas de ocorrência nas áreas endêmicas, que apresentem fácil propagação e ciclo evolutivo rápido, vem ganhando destaque no cenário mundial, visando obter produtos mais baratos, biodegradáveis, seguros, eficientes e

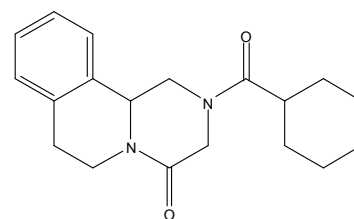
disponíveis para o controle das populações de caramujos (LUNA *et al.* 2005; RUIZ *et al.* 2005).

O interesse pelo uso de moluscidas de origem vegetal no controle da esquistossomose data da década de 30, quando foi sugerido o plantio de *Balanites aegyptiaca* L. emma (Balanitaceae), uma árvore típica do deserto, nas margens dos focos de transmissão, no Sudão. Seus frutos, ao caírem das árvores, inibiam a densidade populacional de caramujos (ARCHIBALD, 1933). No Brasil, os primeiros estudos sobre moluscidas de origem vegetal demonstraram a atividade de extratos aquosos de caules de *Serjania* spp. (cipó-timbó) e de frutos de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) (saboneteira, sabão) em *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). Essa ação foi atribuída às saponinas presentes nestes vegetais (PINTO; ALMEIDA, 1944). Mais de mil espécies vegetais foram testadas quanto à sua atividade moluscicida (FARNSWORTH *et al.*, 1987).

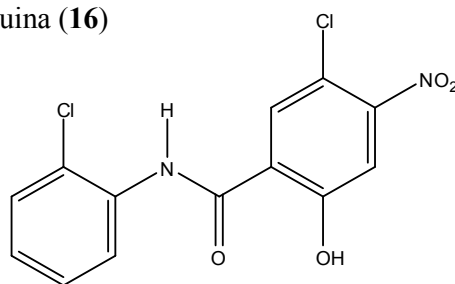
No Brasil, várias plantas medicinais, tóxicas e ornamentais foram testadas com a finalidade de verificar sua possível ação moluscicida (AMORIN; PESSOA, 1962; KLOOS; McCULLOUGH, 1982; MENDES *et al.*, 1984; MENDES *et al.*, 1999; ROUQUAYROL *et al.*, 1972; SILVA *et al.*, 2008). As atividades larvicidas de plantas medicinais sobre as formas infectantes de *S. mansoni* têm sido testadas com o objetivo de identificar formas alternativas de combate a essa parasitose.



Oxamnaquina (16)



Praziquantel (17)



Niclosamida (18)

Figura 10. Substâncias utilizadas no controle da esquistossomose.

3.5.2 Considerações sobre a Dengue

Mosquitos atuam como vetores de diversas doenças, causando sérios problemas à saúde do homem e em alguns casos levando ao desenvolvimento de epidemias de difícil controle. O uso contínuo e indiscriminado de inseticidas químicos no combate a mosquitos causadores em potencial de certas doenças infecciosas tem provocado danos à saúde do homem e ao meio ambiente, além de promover a seleção de resistência nestes aos inseticidas comerciais. Estes efeitos indesejáveis têm instigado pesquisadores a buscar medidas alternativas de erradicação de mosquitos. Desta forma, pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de descobrir inseticidas naturais, efetivos e seguros. Muitas plantas produzem metabólitos secundários que apresentam atividade inibitória de crescimento de insetos (CHARIANDY *et al.*, 1999), enquanto outras, agem como repelente (MOHAN; FIELDS, 2002). O uso destes constituintes de plantas como agentes de controle de insetos e como controle de larvas é uma interessante perspectiva.

O *Aedes aegypti* atua como vetor da febre amarela na América Central, na América do Sul e no Oeste da África. Este mosquito é também o vetor da dengue, que é endêmica no Sudoeste da Ásia, ilhas do Pacífico e Américas. A dengue é uma doença infecciosa causada por um arbovírus e transmitida de uma pessoa doente a uma pessoa sadia através da picada da fêmea contaminada (CICCIA *et al.*, 2000).

Para se evitar a doença fez-se necessário intensificar as ações de prevenção e combate ao vetor da dengue. Existem inúmeros trabalhos descrevendo o uso de produtos naturais (YANG *et al.*, 2002), inclusive de saponinas como agentes larvicidas (PELAH *et al.*, 2002). Tendo em vista a ocorrência desta classe de substâncias químicas nas espécies *D. morotoni* decidiu-se avaliar a atividade larvicida das saponinas isoladas a partir desta espécie vegetal.

3.5.3 Considerações sobre Leishmanioses

A leishmaniose é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem devido à ação hematófaga dos insetos fêmeas da família Psychodidae, conhecidos pelo nome de flebótomos, entretanto, existem outros meios que, apesar de serem raros e sem importância epidemiológica, podem

ocorrer, dentre eles a transmissão congênita, transfusão sanguínea e acidentes de laboratório (NEVES, 1991).

Essa zoonose compreende formas clínicas variadas e pode ser dividida em dois grupos: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) menos grave que ataca a pele e as mucosas e Leishmaniose Visceral (LV) que afeta órgãos internos, podendo levar a morte se não tratada. Essas manifestações clínicas são resultantes de complexas interações entre o parasito a resposta imune do indivíduo infectado (GREVELINK *et al.*, 1996). A organização mundial de saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas aos riscos e registrar aproximadamente dois milhões de casos novos (MS, 2007).

Há mais de 50 anos o tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), como o estibogluconato de sódio (Pentosam®) (19) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (20). O Pentosam® contém muitos complexos de antimônio com derivados de carboidratos, formados a partir de ácido glucônico, o Glucantime® é constituído por derivados da N-metilglucamina (CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUES, 2001). Esses antimoniais agem através da interferência nos processos bioenergéticos das formas amastigotas, eles ligam-se e inibem diferentes proteínas do parasita, particularmente enzimas envolvidas na glicólise e na oxidação de ácidos graxos, resultando na redução do ATP e GTP (BERMAN, 1998). Desde descoberta dos antimoniais pentavalentes pouco tem sido feito para a descoberta de novos tipos de compostos para o tratamento dessas patologias (PHILLIPSON; WRINGHT, 1991). Dessa forma, a busca de novas substâncias, efetivas e seguras, para o tratamento das leishmanioses torna-se prioritária.

Uma das alternativas na quimioterapia da leishmaniose é a utilização da anfotericina B (21), que age ligando-se ao ergosterol na membrana do parasito, aumentando a permeabilidade de pequenas moléculas (CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUES, 2001).

O uso de plantas para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar é uma prática antiga entre as populações de áreas endêmicas (MOREIRA *et al.*, 2002). Geralmente as preparações são utilizadas por via oral ou tópicas sobre as lesões (NETTO *et al.*, 1985). Porém, esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre a real eficácia, uma vez que na LTA pode ocorrer à cura espontânea das lesões (MARSDEN, 1994).

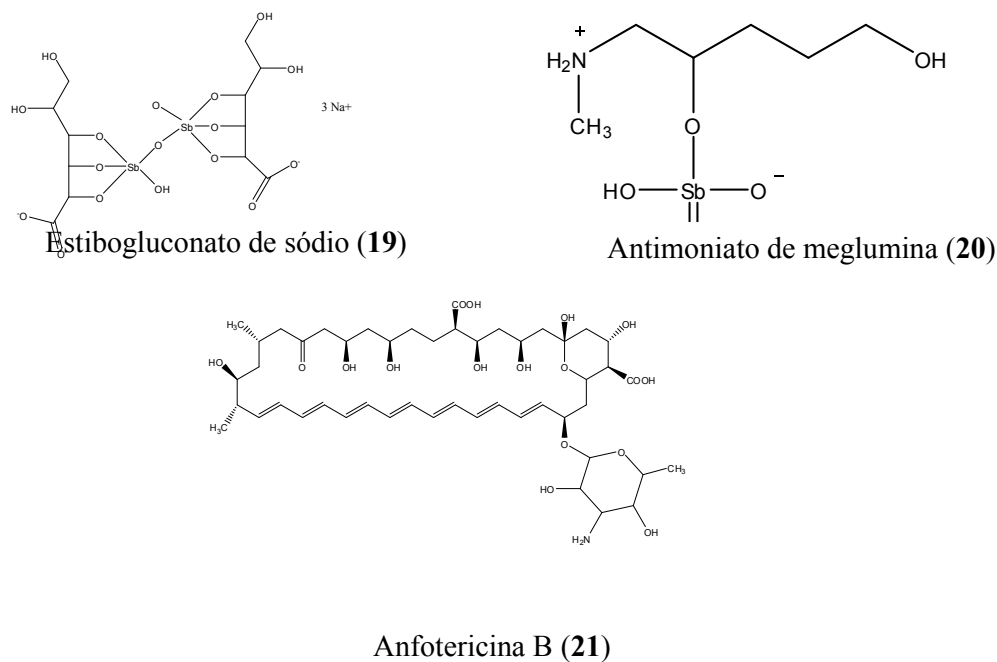


Figura 11. Substâncias utilizadas no tratamento das leishmanioses.

3.5.4 Considerações sobre Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma infecção generalizada, de natureza endêmica causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e transmitida originalmente ao homem através de triatomíneos (VERONESI, 1991). A maior parte dos casos de infecção em seres humanos ocorre através do contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos (triatomíneos) contaminados por *T. cruzi* (MS, 2005).

Este protozoário infecta quase 150 espécies de 24 famílias de mamíferos domésticos e selvagens, incluindo os seres humanos. De acordo com a OMS, a prevalência da doença de Chagas é de 13 milhões de casos. A incidência anual é de 200 mil casos, em quinze países latino-americanos. No Brasil, os dados disponíveis de 1995 indicavam que 4,2% da população rural e 1,3% da população brasileira estavam infectadas pelo *T. cruzi* (BRENER *et al.*, 2000). Por ser uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante, o custo econômico com tratamento é elevado, e, como a população acometida é habitualmente de baixo nível sócio-econômico, os gastos são cobertos pelo Estado.

Desde o final da década de 60 e início dos anos 70, dois fármacos tem sido usados para o tratamento específico dessa doença. O benzonidazol (**22**), um derivado do nitroimidazol (Rochagan[®], Roche) e o nifurtimox (**23**), um nitrofurano (Lampit[®], Bayer). Ambos são eficazes somente na forma aguda ou crônica recente da doença, e ainda podem induzir efeitos colaterais tóxicos ao paciente (URBINA *et al.*, 2003). Assim é de extrema relevância a busca de novas substâncias para o tratamento da doença de Chagas, que apresentem maior eficácia no tratamento de pacientes na fase crônica e menor toxicidade.

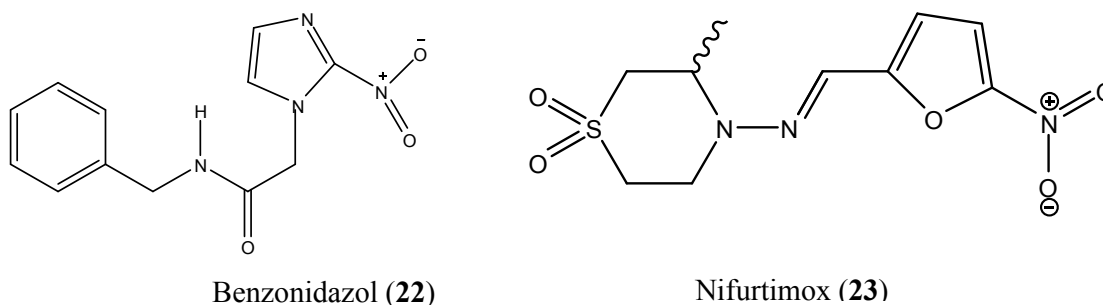


Figura 12. Substâncias utilizadas no tratamento da doença de Chagas.

O gênero *Schefflera* possui diversas atividades farmacológicas frente às doenças que são mediadas pelo sistema imune como artrite reumatóide (TAYLOR, 1994; CHEN *et al.*, 2002) e asma (SUNG, 1992; TAYLOR, 1994), apresenta atividade antiviral aos vírus da herpes simples (HSV-1) e influenza (LI *et al.*, 2005), além da atividade antiproliferativa para as linhagens celulares de mama, próstata, rim, cólon, melanoma, próstata e leucemia (MADJAROF, 2004). Algumas classes de substâncias são características de uma família botânica, de um gênero ou mesmo de uma única espécie, ou seja, se um produto natural apresentar atividades terapêuticas interessantes, será possível encontrar substâncias análogas em espécies do mesmo gênero ou da mesma família (HOSTETTMANN, 1995). O interesse em estudar as atividades imunomodulatória, antitumoral, antiviral e anticolinesterásica de *D. morototoni* é fundamentada nas razões acima descritas.

3.6 Imunopatologias

As doenças mediadas pelo sistema imune são problemas de saúde global, estão em crescimento em proporções epidêmicas (KRESNKY *et al.*, 2001) e demandam rapidez na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. Estas doenças incluem um amplo espectro de patologias, dentre elas a artrite reumatóide, a diabetes mellitus tipo I, o lupus eritematoso sistêmico, a esclerose múltipla, a asma e várias outras condições alérgicas. 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).

A capacidade de efetuar transplante bem sucedido de muitos órgãos criou, em particular, um forte ímpeto pelo desenvolvimento de esquemas imunossupressores seguros (WINKELSTEIN, 2000), objetivando a preservação do órgão transplantado com um mínimo de efeitos colaterais para o doente. Mais de 40 doenças decorrentes de respostas imunológicas são passíveis de tratamento com agentes inibidores da resposta imune (STITES *et al.*, 2000). É de grande relevância, portanto, a descoberta de novas drogas imunomoduladoras, tendo em vista a sua aplicabilidade em processos imunopatológicos.

A linfoproliferação está relacionada à imunomodulação, que é um mecanismo fisiológico de regulação da resposta imunológica, que pode claramente promover ou suprir as respostas do sistema imune (RUBEL, 2006). Esse mecanismo regulador assegura que as respostas sejam apropriadas tanto qualitativamente quanto quantitativamente (TIZARD, 1998), mostrando que o próprio sistema imune se autoregula através da liberação de substâncias imunomoduladoras (STITES; TERR, 1995; HOLLAND; VIZI, 2002). A imunoestimulação implica diretamente na estimulação do sistema imune e potencialização da resposta de defesa. Ao contrário, a imunossupressão implica principalmente no decréscimo da atividade do sistema imune, e ocorre devido a vários fatores genéticos, ambientais e terapêuticos, favorecendo o estabelecimento de infecções, mas sendo, porém, de suma importância no sucesso dos transplantes (PATWARDHAN *et al.*, 1990; MAKARE *et al.*, 2001).

Imunoestimulação e imunossupressão fazem parte de um equilíbrio homeostático do sistema imune que regula a condição do organismo frente às condições de perigo que ele se encontra, ao entrar em contato com um agente estranho (MAKARE *et al.*, 2001).

Um número cada vez maior de substâncias potenciais vem sendo examinado para o uso terapêutico em uma variedade de distúrbios, incluindo neoplasias, estados

imunodeficientes e doenças inflamatórias (HENNESSEY; BAAKER, 2000). Essas respostas imunes e inflamatórias podem ser modificadas por certas classes de fármacos. Os corticosteróides possuem ação moduladora da ativação de macrófagos; essa ativação 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, em processos inflamatórios (ASLAN, 2002). Desse modo, substâncias capazes de inibir a ativação de macrófagos e a proliferação de linfócitos (que suprimem as respostas imunes e reduzem a inflamação) têm potencial utilização como imunomoduladores (RUDNICK, 2003).

Considerando as necessidades de controle e equilíbrio entre as duas atividades (a imunestimulação e a imunossupressão) para o funcionamento imunológico normal, a busca por novos medicamentos com baixa toxicidade e mais eficazes no tratamento das imunopatologias, e o fato da grande diversidade vegetal do nosso planeta poder ser uma importante fonte de substâncias com atividade imunomoduladora, desde a década de 80 a identificação e caracterização de compostos naturais com atividade imunomodulatória tem se apresentado como área de interesse científico (PHILLIPSON, 2003; COSTA *et al.*, 2008). A linfoblastogênese, ou ensaio de proliferação de linfócitos, é um dos modelos *in vitro* empregados para avaliar o efeito desses compostos naturais sobre a proliferação celular (DEVI *et al.*, 2003).

Drogas-corticóides e ciclosporina, por exemplo, com ação moduladora da ativação de macrófagos e linfócitos têm sido amplamente utilizadas para o controle de respostas imunoinflamatórias indesejadas (KRESNKY *et al.*, 2001). No entanto alguns efeitos colaterais são graves correspondendo ao 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, sendo este último efeito presente na maioria dos pacientes tratados com a droga (KRENSKY *et al.*, 2001; BURDMAN *et al.*, 2003).

3.7 Considerações sobre Doença de Alzheimer

É uma doença mental complexa, multifatorial, heterogênea e irreversível relacionada à idade caracterizada pela perda gradual de memória, alterações no comportamento e na personalidade e também pelo declínio das habilidades intelectuais (ANEKONDA; REDDY, 2005; VIEGAS *et al.*, 2005).

A biossíntese da acetilcolina (ACh) se dá a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA) e colina por ação da enzima colina-acetiltransferase (**Figura 13**).

A acetilcolina é importante nas funções desempenhadas pelo SNC e tem sido associada com as funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (SCREMIN *et al.*, 1997).

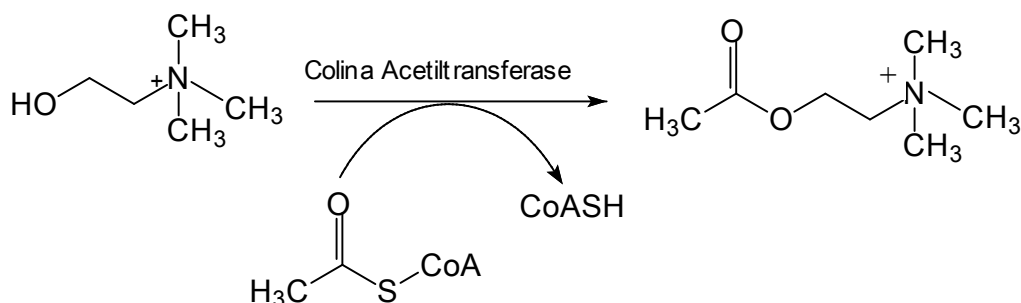


Figura 13. Biossíntese da acetilcolina

Depois de formada, a acetilcolina é liberada na fenda sináptica a qual pode ser acoplada a receptores muscarínico e nicotínico, o restante é degradada por uma serina hidrolase denominada acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica em colina e acetato, que são as bases de sua formação (**Figura 14**).

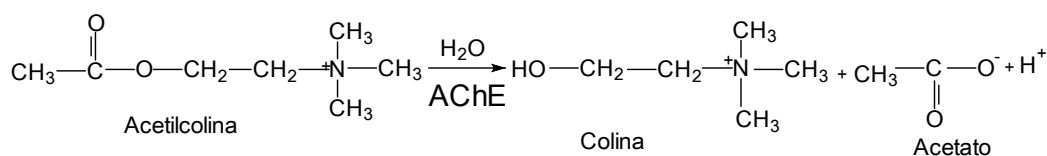


Figura 14. Hidrólise da acetilcolina

Tratamentos para a doença de Alzheimer sugerem que uma elevação no nível de acetilcolina promove uma melhora dos sintomas da doença. A terapia se baseia na restauração da função colinérgica e atualmente os inibidores de acetilcolinesterase mostraram um maior

efeito no tratamento clínico da doença (TREVISAN, 2006). A tacrina (Cognex®) (24), donepezil (Aricept®) (25) a rivastigmina (Exelon®) (26), a galantamina (Reminyl®) (27) são fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer.

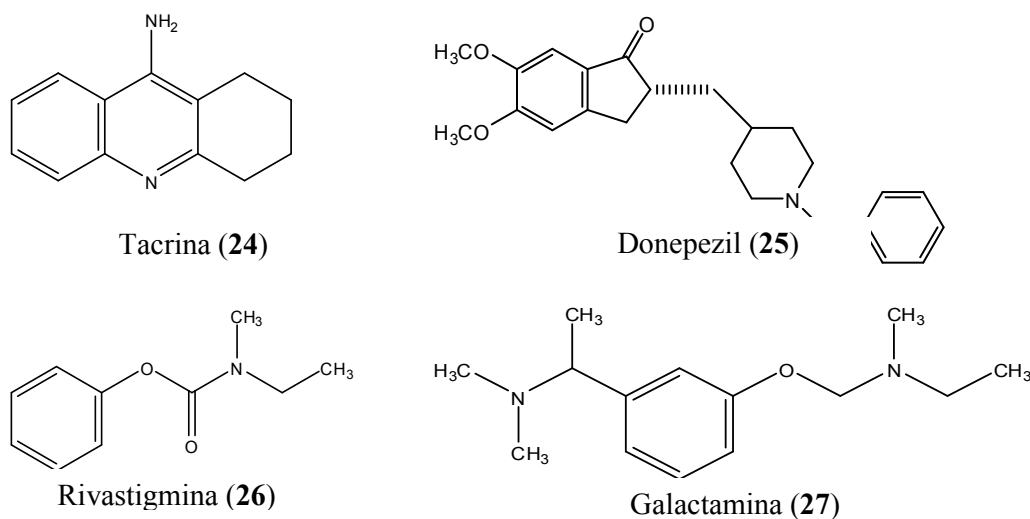


Figura 15. Estruturas moleculares de alguns inibidores da acetilcolinesterase.

3.8 Considerações sobre o câncer

As informações sobre o câncer crescem rapidamente, visto que não consiste numa só doença, e sim em um conjunto de mais de 200 doenças distintas, com multiplicidade de causas, história natural e diferentes formas de tratamento tornando-se um problema de saúde pública merecedor de maior atenção científica (LOVE, 1991). Em geral, o tumor é iniciado quando uma célula normal do organismo sofre alterações em genes relacionadas com o controle de proliferação celular (GOMES, 1997).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cada ano surgem dez milhões de novos casos e cinco milhões de pessoas vão a óbito em decorrência dessa doença. No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doenças, sendo a primeira representada pelas doenças cardiovasculares, acometendo cerca de cem mil indivíduos anualmente, com ligeira predominância do sexo masculino. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 1994, dos casos de óbitos relatados, 10,86% foram por câncer, 53,81% em homens e 46,05% em mulheres. A partir de 2020, 20 milhões de pacientes, a cada ano, serão vítimas dessa doença sendo que 70% da população residem em

países onde os recursos para o controle do câncer são insuficientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). De acordo com os especialistas, os óbitos por câncer deverão aumentar para cerca de 12 milhões em 2030 (SECOLI, 2005).

A maioria dos agentes utilizados na quimioterapia atua inibindo a síntese de DNA ou mecanismos de replicação celular, mas acabam por apresentar melhor atividade “antiproliferativa” do que “anticâncer” (CARVALHO *et al.*, 2003), entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico (MURAD; KATZ, 1996; SALMONM; KATZUNG, 1998).

Além disso, a toxicidade dessas drogas limita seu uso já que a maioria dos cânceres humanos são quimioresistentes e ainda, podem causar danos ao DNA de células normais induzindo a formação de uma segunda neoplasia (GARRETT; WORKMAN, 1999). Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo (CARVALHO *et al.*, 2003).

Conseqüentemente, torna-se evidente a necessidade de ensaios para a triagem de drogas menos tóxicas, mais seletivas e eficazes para o tratamento dessa doença (NAM; PARANG, 2003).

3.9 Considerações sobre Infecções Virais

As infecções virais são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e representam um importante problema de saúde tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos. Isso se torna particularmente sério quando se tem apenas uma alternativa terapêutica, ou quando há casos de resistência viral ao fármaco de escolha (KOTT *et al.*, 1999).

Embora a busca por novos fármacos antivirais seja intensa, os avanços são poucos, já que a maioria destes compostos possui aplicações limitadas, fazendo com que um baixo número deles seja aprovado pelas autoridades governamentais para uso clínico (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1998).

Segundo Snoeck (2000), o crescimento do número de pacientes imunocomprometidos e da sobrevivência dos mesmos tem aumentado o desenvolvimento de infecções virais nesses pacientes. Além disso, o intenso uso de medicamentos antivirais conduziu ao desenvolvimento de cepas resistentes.

A necessidade da busca por fármacos antivirais é fortemente embasada pela falta de vacinas eficazes contra uma ampla variedade de patógenos virais (DE CLERCQ, 2002). Além disso, os fármacos antivirais disponíveis apresentam muitas restrições de uso, pelo baixo espectro de ação e alta toxicidade (RICE; BADER, 1995).

Uma das principais razões das dificuldades no desenvolvimento de fármacos antivirais é a natureza intrínseca dos vírus, os quais possuem uma estrutura aparentemente simples e um sistema enzimático restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para sua replicação. Dessa maneira, agentes que inibem ou provocam a inativação viral, normalmente causam também toxicidade às células hospedeiras. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade são, portanto, indispensáveis para a seleção de novos agentes antivirais (WHITE; FENNER, 1994).

O atual arsenal quimioterápico para infecções virais consiste em 40 fármacos antivirais licenciados pelas autoridades governamentais. Sendo que 20 deles são utilizados para o tratamento da infecção pelo HIV (CLERCQ, 2005). Outro problema da quimioterapia antiviral relaciona-se à mutação dos genomas virais, pois cada célula infectada pode produzir milhares de cópias em poucas horas, e a maioria dessas cópias poderá sofrer mutação (STRAUSS *et al.*, 1996).

Os primeiros casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foram identificados no início da década de 1980 (ABBAS; LICHTTMAN, 2003). Na ocasião, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi isolado por cientistas do laboratório Pasteur na França, sendo denominado na época de vírus linfotrópico de células T humanas do tipo III (HTLV-III) ou vírus associado à linfadenopatia (LAV) (SNEADER, 2005; DE CLERCQ, 2007). A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus da imunodeficiência humana (HIV), um retrovírus pertencente à família Retroviridae, gênero *Lentivirus*. São vírus que contêm material genético constituído de RNA (ácido ribonucléico) e o processo de replicação do material genético é procedido por um processo de transcrição reversa, onde a partir do RNA é produzido a partir da molécula de DNA (GALLO; MONTAGNEIR, 1988). Conhecido há pouco mais de 27 anos, o HIV já

causou cerca de 25 milhões de mortes no mundo. Só no Brasil, desde 1990, o número de óbitos gira em torno de 11 mil por ano (MS, 2008).

Embora a maioria das pesquisas no desenvolvimento de agentes antivirais tenha sido direcionada para substâncias sintéticas (RICE; BADER, 1995), esforços vêm sendo realizados no sentido de avaliar a capacidade de produtos de origem natural, tais como plantas medicinais, microorganismos e produtos marinhos, em inibir a replicação viral, tratar infecções virais ou, ainda, servir de modelo para a obtenção de novas moléculas farmacologicamente ativas (HUDSON, 1990; CHE, 1991; CHU *et al.*, 1992; SENIOR, 1996; VLIETINCK *et al.*, 1997). Em particular as plantas representam uma ampla e potencial fonte de agentes antivirais. Cerca de 20-30% de plantas de origem tropical ou temperada têm demonstrado possuir tal atividade (ABOU-KARAM; SHIER, 1992).

4 METODOLOGIA

4.1 Condições Experimentais: Reagentes, Solventes e Equipamentos

4.1.1 Análise cromatográfica

Nas separações cromatográficas em coluna, utilizou-se como adsorvente gel de sílica 60 G (70-230 Mesh ASTM) da (Merck - Darmstad – Alemanha). A quantidade utilizada do adsorvente foi 20 a 30 vezes a quantidade em massa da amostra, foram utilizadas colunas de vidro diferenciando-se na altura e diâmetro, respeitando-se a quantidade da amostra.

As análises comparativas através da cromatografia em camada delgada (CCD) eluídas com clorofórmio (CHCl_3), mistura de clorofórmio e metanol CHCl_3 :MeOH.

O critério de pureza adotado foi a observação do ponto de fusão.

4.1.3 Solventes e Reagentes

O grau de pureza dos solventes utilizados (Hx:hexano, AcOEt: acetato de etila, CHCl_3 : clorofórmio, MeOH: metanol, But: butanol, e EtOH: etanol) variou de acordo com cada finalidade. Nas extrações, partições líquido/líquido dos extratos e sistemas cromatográficos básicos, foram utilizados solventes de grau comercial, os quais foram submetidos à destilação fracionada no próprio laboratório (Morais de Castro LTDA, Recife-PE). Os solventes deuterados CDCl_3 e CD_3OD foram utilizados para solubilização das substâncias destinadas a análise de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, adquiridos da Merk (Alemanha) e Aldrich (Estados Unidos).

4.1.3 Reveladores

Os perfis cromatográficos obtidos por CCD foram visualizadas com o uso de agente revelador com solução de solução ácida de sulfato cérico, reagente de Liebermann Burchard, vapores de cristais de I_2 e exposição dessas a irradiação com luz no UV(254 e 365 nm).

A solução ácida de Sulfato Cérico: 0,3 g de $Ce(SO_4)_2$ foram dissolvidas em 7 mL de H_2SO_4 concentrado, em seguida o volume foi completado para 100 mL com água destilada. Essa solução é utilizada para revelar compostos orgânicos em geral.

Reagente de Liebermann Burchard: 50,0 mL de anidrido acético e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa solução é utilizada para revelar esteróides.

4.1.4 Equipamentos

As partes da espécie *D. morotoni* foram trituradas em máquina forrageira (Nogueira S.A. Máquinas Agrícolas, Itapira, S. P., Brasil).

As soluções dos extratos e frações foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida. As soluções contendo pequeno volume foram concentradas em capela de exaustão.

Os espectros de infravermelho foram registrados em espectrofotômetro da marca Varian 660-IR/FT-IR, através da técnica de AT.

Os espectros de ressonância magnética molecular unidimensionais (H^1 , C^{13} e DEPT 135) e bidimensionais (HSQC, HMBC, COSY e NOESY) foram registrados utilizando-se espectrômetro da marca BRUKER AVANCE (400 MHz para H^1 e 100 MHz para C^{13}). Para obtenção destes espectros, todas as amostras foram dissolvidas em solventes deuterados da marca Aldrich. Os deslocamentos químicos dos sinais dos carbonos dos solventes deuterados utilizados foram expressos em escala de δ (delta).

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de Ponto de Fusão Microquímica-MQAPF-301.

As medidas de absorvância dos ensaios anticolinesterásico e inibição da enzima transcriptase reversa foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca Thermo Scientific – Multiskan Spectrum.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando espectrofotômetro BIO-RAD Modelo 3550.

Nos ensaios realizados na Fiocruz foi realizado utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA.

4.2 Coleta e Identificação do Material Vegetal

A planta utilizada neste estudo foi coletada no mês de junho de 2007 no município de Pilar no Estado de Alagoas. A confirmação da identificação botânica foi realizada pelo Prof. José Elias de Paula, e a exsicata se encontra depositada sob o N° JEP 3634 UB no Herbário do Departamento de Botânica do Campus da Universidade de Brasília – UNB.

4.3 Preparações dos Extratos de *D. morotoni*

Uma alíquota de 2.000 g de cascas do caule, 2.000 g de madeira do caule, 500 g de folhas, 300 g de raiz e 100 g de casca da raiz após secagem à temperatura ambiente e trituração em máquina forrageira da marca Nogueira (Itapira- SP) foram submetidos a percolação em solução etanólica 90 % em de aço inoxidável (Fabra - São Paulo). à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por três vezes, a cada 72 horas. As soluções extrativas obtidas foram filtradas, transferidas progressivamente para balões de fundo redondo e concentradas sob pressão reduzida com auxílio de evaporador rotativo e banho de aquecimento funcionando com temperatura de 60 ± 10 °C. Os extratos resultantes foram transferidos para frasco previamente pesados e as diferenças gravimétricas foram calculadas obtendo-se 300 g de caule (15 %), 225 g de madeira do caule (11,25 %), 60 g de folhas (12 %), 42 g de raiz (14%) e 18 g de casca da raiz (18%). Os extratos brutos da folha, casca do caule, madeira do caule, raiz e casca da raiz foram submetidos à partição líquido-líquido inicialmente com uma solução de metanol e água (3:1) e em seguida extraídos com 2.5 L de n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As soluções obtidas foram reunidas e concentradas por meio de evaporador rotativo. Ao final destas extrações, foram obtidas as frações em n-hexano (n-C₆H₁₄), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt), n-butanol (n-BuOH) (exceto a folha) e hidroalcoólica (**Figuras 16, 17, 18, 19 e 20**).

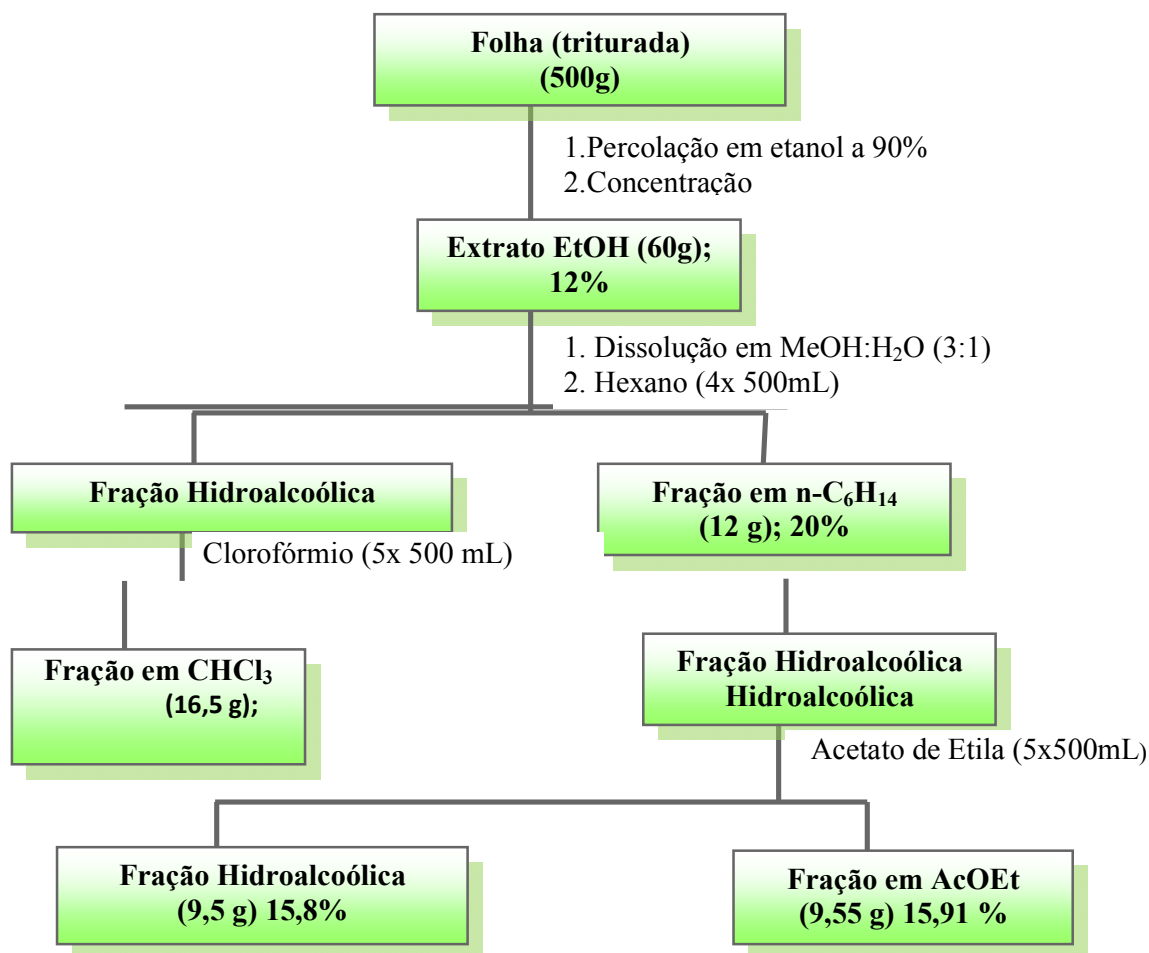


Figura 16. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da folha da espécie *D. morotoni*

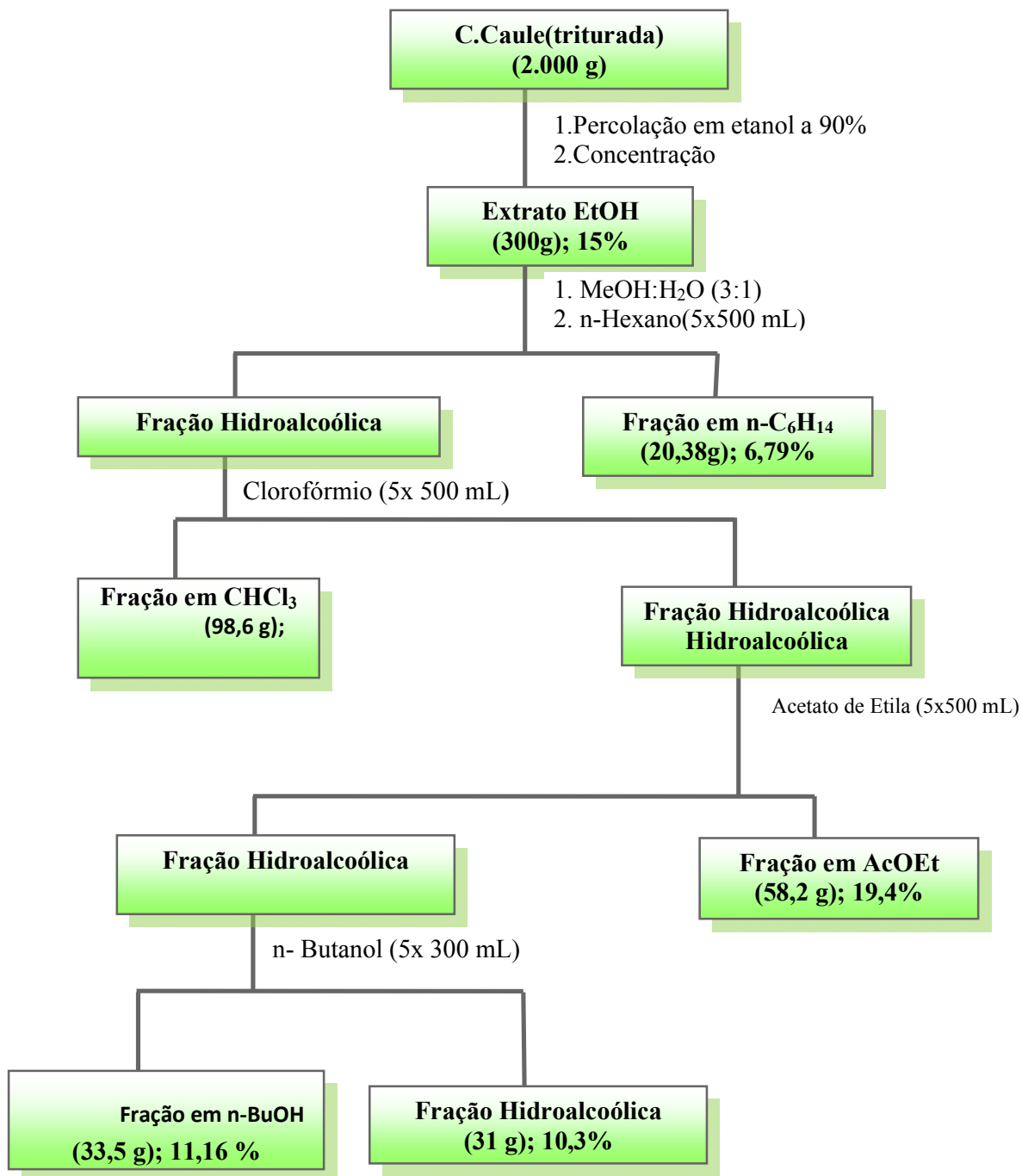


Figura 17. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da casca do caule da espécie *D. morotoni*.

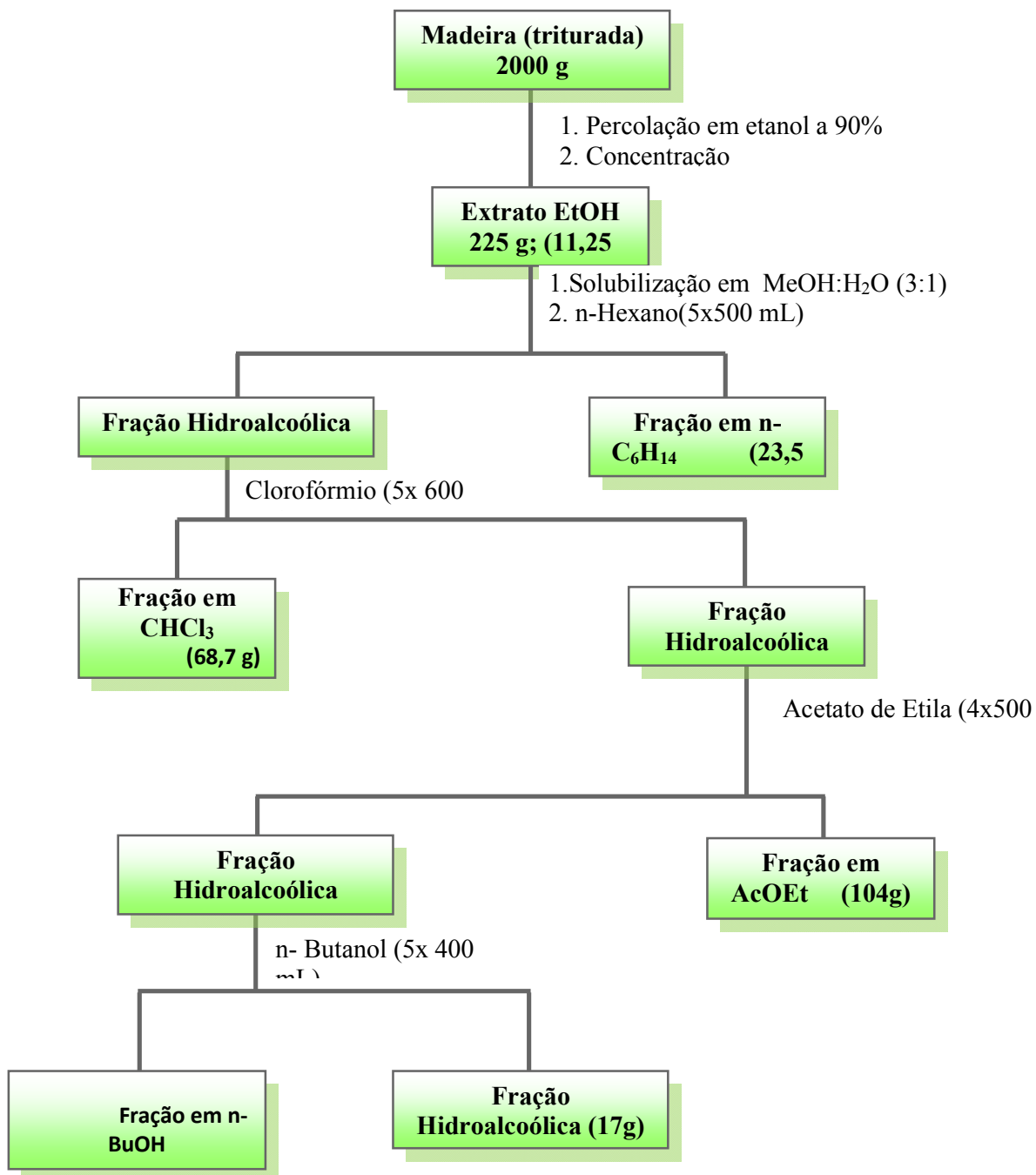


Figura 18. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da madeira do caule da espécie *D. morotoni*.

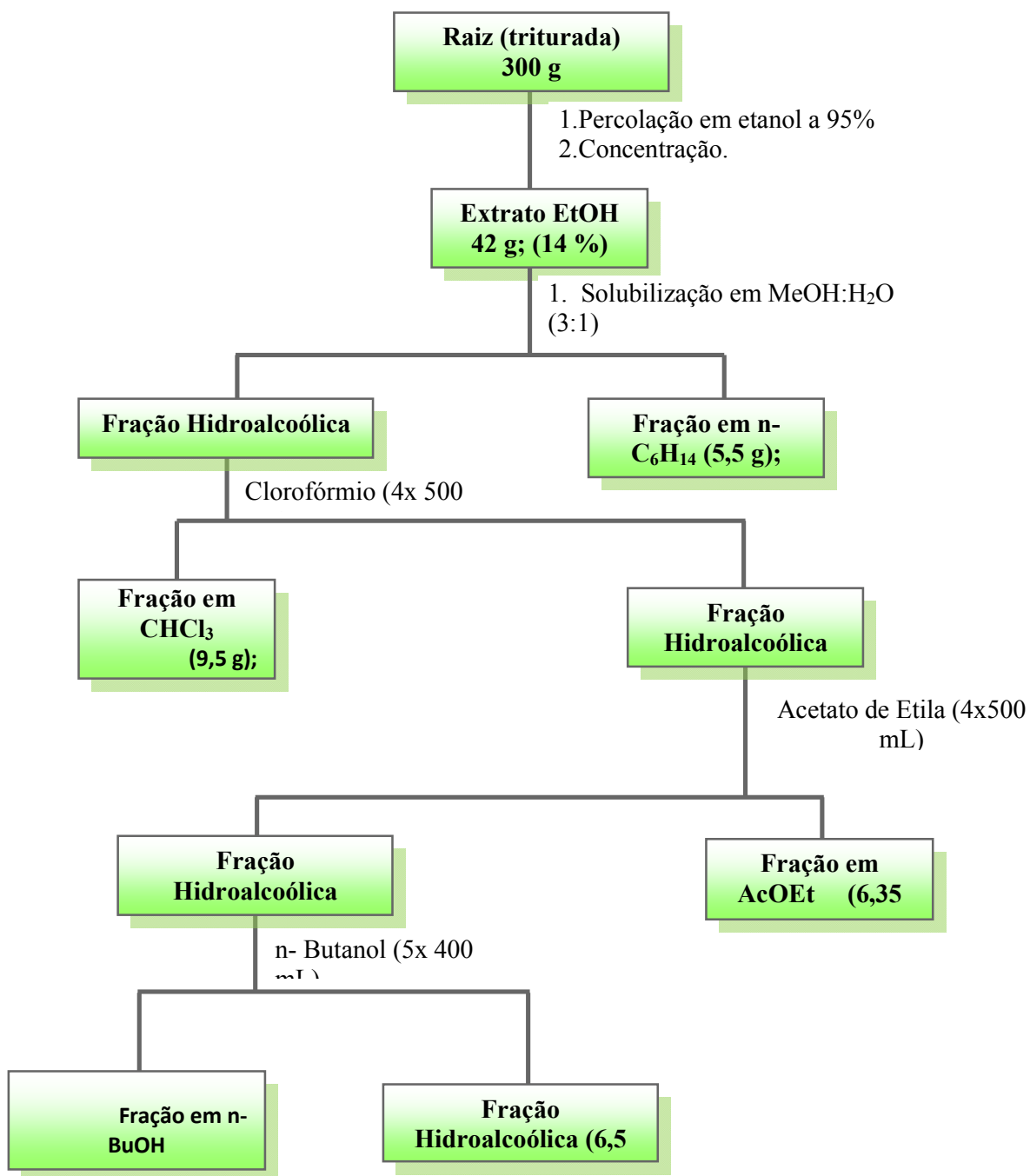


Figura 19. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da raiz da espécie *D. morotoni*.

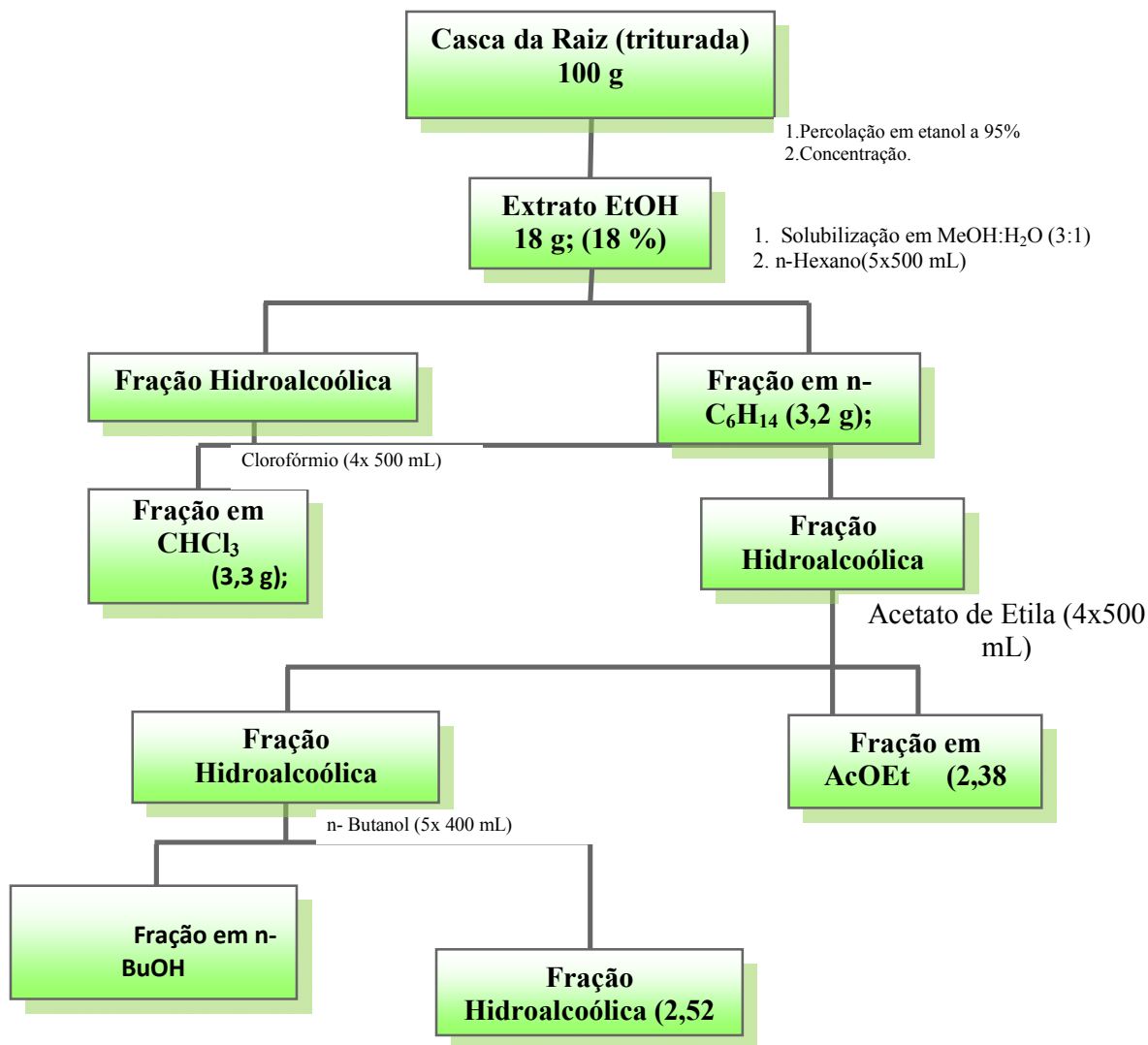


Figura 20. Fluxograma de obtenção do extrato etanólico bruto e frações da casca da raiz da espécie *D. morotoni*.

4.4 Fracionamento e Purificação dos Constituintes Químicos de *D.morotoni*

O fracionamento foi efetuado por cromatografia em coluna de gel de sílica utilizando-se uma razão de uma parte do extrato para 20 vezes o peso do gel de sílica. Os solventes utilizados como eluentes foram destilados priori ao uso e o volume das frações recolhidas dependiam da quantidade de material sob estudo. O solvente foi removido por destilação a baixa pressão (30 mmHg) em aparelho rotativo. Ao final da cromatografia em coluna as frações eram comparadas entre si por cromatografia em cama delgada em gel de sílica e

eluída com solvente apropriado e revelado com solução ácida de sulfato cérico, luz no ultravioleta e Iodo molecular.

4.4.1 Casca do caule

A fração em CHCl_3 proveniente da partição líquido-líquido do extrato bruto da casca do caule foi submetida aos processos de isolamento e purificação. Para as separações por Cromatografia em Colunas (CC) foi utilizado gel de sílica.

4.4.1.1 Fração em clorofórmio

Após solubilização em clorofórmio, a fração em clorofórmio (CHCl_3) da casca do caule de *D. morotoni* (98,6 g) foi incorporada em gel de sílica e submetida à fracionamento a vácuo em gel de sílica (2000 g) utilizando como fase móvel os solventes: hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$), clorofórmio (CHCl_3), metanol (MeOH) e mistura dos mesmos, fornecendo quatro frações **Tabela 2**. A eluição em hexano não forneceu nenhuma fração.

Tabela 2. Fracionamento em gel de sílica da fração em CHCl_3 da casca do caule.

Frações	Eluição	Massa; Rendimento em percentual
I	CHCl_3 : MeOH 5%	4,10 g; 4,15%
II	CHCl_3 : MeOH 30%	12,35; 12,52%
III	CHCl_3 : MeOH 50%	25,05; 25,40,%
IV	MeOH 100%	33,95; 34,43%

Parte da fração II (9 g) foi solubilizada em clorofórmio, sendo o restante da fração utilizada para futuros bioensaios, incorporada em gel de sílica e submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (180 g) utilizando-se como eluentes $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , MeOH e mistura destes em grau crescente de polaridade. Foram coletadas 110 frações as quais foram agrupadas após análise por CCD eluídas com clorofórmio e mistura de clorofórmio e metanol em 8 grupos. Essas frações foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com sulfato cérico e/ou vapores de Iodo. O grupo 51-72 (4 g; 44,44 %) foi

submetido a quatro processos de separação por cromatografias em coluna de gel de sílica onde foi obtido uma fração de cor branca, codificada como DMC1 (80 mg) (**Figura 21**).

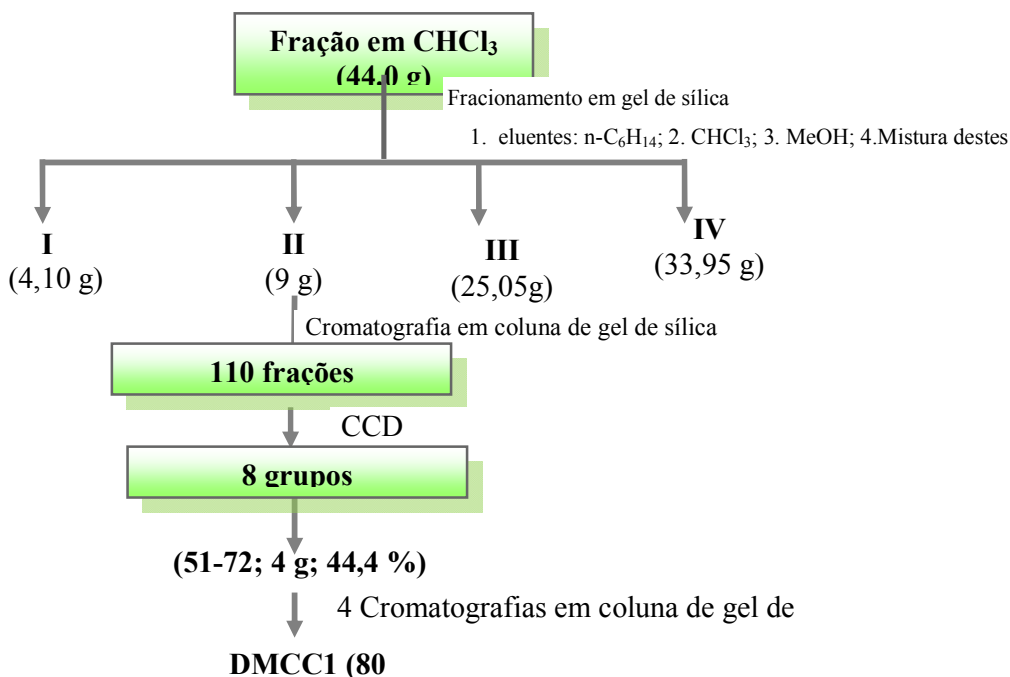


Figura 21. Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração II em clorofórmio da casca do caule de *D. morotoni*.

Parte da fração III (18 g) foi solubilizada em metanol, sendo o restante da fração utilizada para futuros bioensaios, incorporada em gel de sílica e submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (180 g) utilizando-se como eluentes CHCl_3 , MeOH e mistura destes em grau crescente de polaridade, foram coletadas 69 subfrações. Essas subfrações foram submetidas à análise comparativa através de cromatografia em camada delgada e reveladas com sulfato cérico e/ou vapores de iodo. Após análise comparativa em CCD usando-se como eluentes CHCl_3 , CHCl_3 :MeOH 5 a 25% e MeOH e revelação essa 7 subfrações foram reunidas de 1-14(2,5g); 15-23 (1,17 g); 24-30(2,33 g); 31-34 (2,76 g); 35 (3 g); 36-51(2,29 g);52-69(1,36 g).

A subfração 15-23 (1,17 g; 6,5 %) foi solubilizada em metanol incorporada em gel de sílica e submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (24 g) utilizando como solventes: $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , MeOH e mistura dos mesmos obtendo-se uma fração de cor branca codificada como DMC2 (60 mg) (**Figura 22**).

A subfração 31-34 (2,76 g; 11,11%) obtida da fração III foi solubilizada em metanol incorporada em gel de sílica e submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (24 g) utilizando como solventes: $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$, CHCl_3 , MeOH e mistura destes em grau crescente de polaridade, foram coletadas 37 frações. Essas frações foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com sulfato cérico e/ou vapores de iodo e reunidas em 14 grupos 1 ; 2-3; 4-8; 9-10; 11-16; 17-18; 19-20; 21-24; 25; 26-28; 29-30; 35-36; 37. O grupo de 26-28 de cor branca foi codificada como DMC3 (120 mg). O grupo (17-18; 0,80 g; 40%) foi submetido a três processos de separação por cromatografias em coluna de gel de sílica até obtenção de uma fração de cor branca, codificada como DMC1 (40 mg) (**Figura 22**).

A subfração 35 (3,0g; 16,66%) obtida da fração III foi solubilizada em metanol incorporada em gel de sílica e submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (60 g) utilizando como solventes: CHCl_3 , MeOH e mistura destes em grau crescente de polaridade, foram coletadas 20 frações. Essas frações foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com sulfato cérico e/ou vapores de Iodo e reunidas em 9 grupos 1 ; 2; 3; 4-8; 9-14; 15; 16-18;19-20. O grupo 9-14 (0,59 g; 19,66%) foi submetido a cromatografia em coluna de gel de sílica e forneceu uma fração de cor branca, codificada como DMC3 (95 mg) (**Figura 22**).

A subfração 36-51 (1,29 g; 7,16 %) obtida da fração III foi solubilizada em acetato de etila incorporada em gel de sílica e submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (26 g) utilizando como solventes: CHCl_3 e MeOH e mistura destes em grau crescente de polaridade, foram coletadas 21 subfrações. Essas subfrações foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com sulfato cérico e/ou vapores de iodo e reunidas em 14 grupos 1-2; 3-4; 5; 6-7;8; 9; 10; 11; 12; 13-16; 17; 18; 19-20; 21. O grupo 11 de cor branca foi codificada como DMCC3 (38 mg) (**Figura 22**).

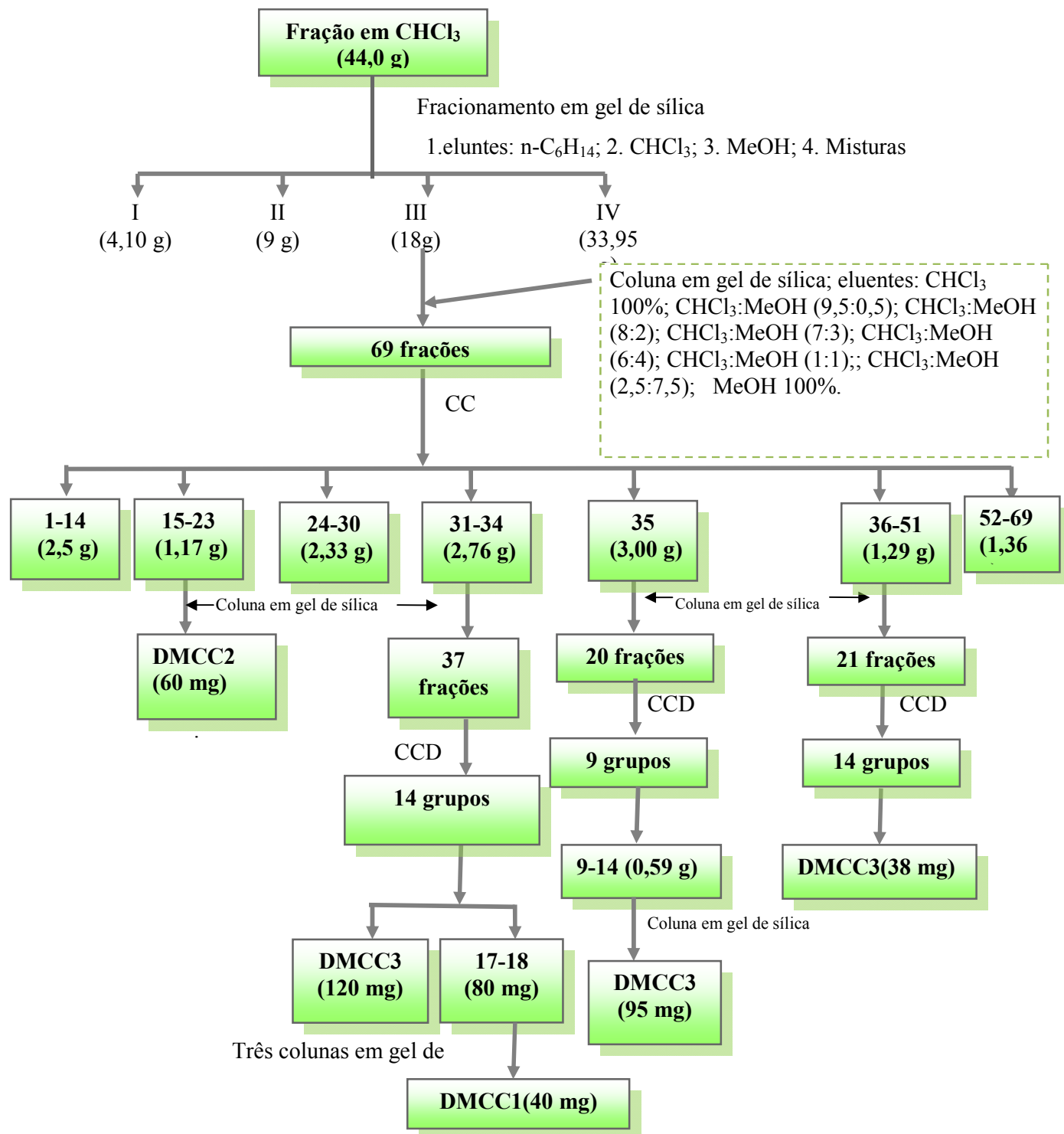


Figura 22. Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração III em clorofórmio da casca do caule de *D. morotoni*.

4.4.2 Madeira do Caule

Parte da fração em $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ (11,80 g) proveniente da partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico da madeira do caule foi submetida aos processos de purificação. Para as separações por Cromatografia em Colunas (CC) foi utilizado gel de sílica.

4.4.2.1 Fração em Hexano

Após solubilização em clorofórmio, a fração em hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$) da madeira do caule de *D. morototoni* (11,8 g) foi incorporada em gel de sílica e submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica (260 g) utilizando como fase móvel os solventes: hexano ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$), clorofórmio (CHCl_3), metanol (MeOH) e mistura dos mesmos, fornecendo sessenta e seis frações, essas frações foram submetidas à análise comparativa através de CCD e reveladas com sulfato cérico e vapores de iodo e reunidas em 8 grupos 1-8 (0,85 g); 9-13 (0,12 g); 14-24 (1,3 g); 25-31 (0,6 g); 32-37 (0,9 g); 38-46 (1,12 g); 47-57 (0,82 g); 58-66 (0,95 g).

O grupo 14-24 (1,3g; 11%); foi submetido à separação por cromatografia em coluna de gel de sílica até obtenção de uma fração de cor branca na forma de cristais codificada como DMM1 (200 mg) (Figura 23). O grupo 38-46 (1,12 g) foi submetida a cinco colunas de gel de sílica até a obtenção de duas frações branca codificadas como DMM2 e DMM3. Essas frações demonstraram em CCD apenas um ponto na placa, e apesar da semelhança entre si receberam códigos diferentes e foram levadas para análise de RMN.

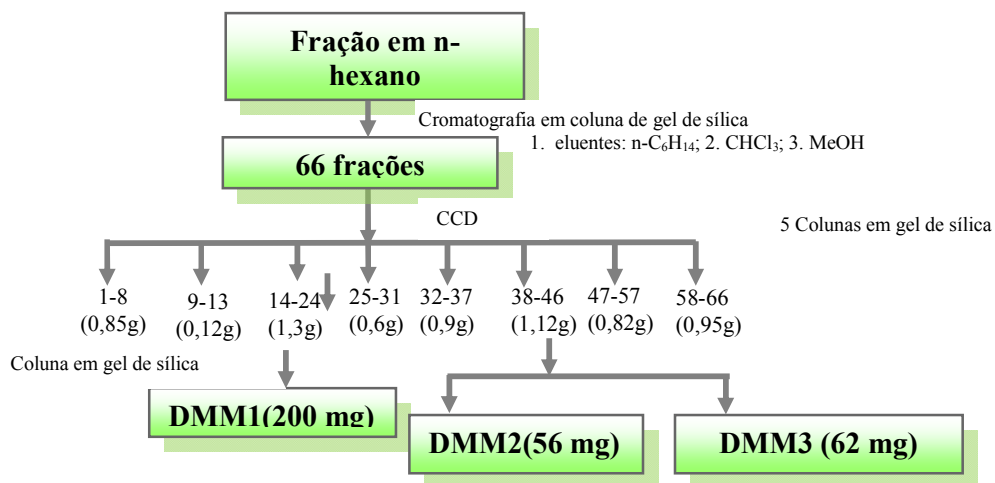


Figura 23. Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos da fração hexânica do caule de *D. morototoni*.

5. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K., LICHTTMAN, A. H., POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Revinter, Rio de Janeiro, 2003.
- ABOU-KARAM, M., SHIER, T.W. Isolation and Characterization of an antiviral flavonoid from *W. Fragarioides*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 10, p. 1525-1527, 1992.
- AMORIN, J. P., PESSOA, S. B. Experiência de alguns vegetais como moluscicida. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 14, p. 254-260, 1962.
- ANASTÁCIO, M. R. **Estágio de maturação dos frutos, tratamentos pré-germinativos e variabilidade de emergência de plântulas de morototó (*Schefflera morototoni*)**. Urbelândia, 2010. Dissertação de (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, universidade Federal de Urbelândia.
- ANEKONDA, T. S., REDDY, P.H. Can herbs provide a new generation of drugs for treating Alzheimer's disease? **Brain Res Rev** .v.50, p. 361-376, 2005
- ARCHIBALD, R. G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptica* in the control of schistosomiasis in the Sudan. **Trans. Royal Soc. of Trop. Med. And Hyg.**, v. XXVII, n. 2, p. 297-210, 1993.
- ASLAN, M. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. **Imunological Research**, v.26, p. 107-118, 2002.
- BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Plants and their active constituents from South, Central, and Nort America wiyh hypoglycemic. *Revista Brasileira de farmacognosia Brazilian of Pharmacognosiy*, João Pessoa, v. 15, n.4, p.392-413, 2005.
- BERMAN, J. D. "Chemotherapy for leishmaniais:biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies". **Rev.Infect.Dis**, v. 10, n.3, p. 560-586, 1998.
- BOECK, P. Obtenção de moléculas bioativas a partir de substâncias naturais e sintéticas, 2005.253f. Tese (doutorado em química)-universidade Federal de santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Boletim Epidemiológico - AIDS e DST, 2008, disponível em <http://www.aids.gov.br>, acessada em janeiro 2010.
- BRENER, Z., ANDRADE, ZA., BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- BURDMANN, E. A. *et al.* Cyclosporine nephrotoxicity. **Seminars in Nephrology**, v. 23, n. 5, p. 465-476, 2003.
- CALIXTO, J, B. **Estudo farmacológico pré-clínico de plantas Mediciniais**. In:YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas Mediciniais: sob ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Agros, p. 5000, 2001.

CARNEIRO, M. R. B. **A flora medicinal no centro oeste do brasil: um estudo de caso com abordagem etnobotânica em campo limpo de Goiás**. Anápolis, 2009. Dissertação de (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente do Centro Universitário de Anápolis, UniEVANGÉLICA.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Colombo: CNPF – EMBRAPA. p. 640, 1994.

CARVALHO, P. *et al.* Surfing on microtubule ends. **Trends Cell. Biol**, v. 5, p. 229, 2003.

CHAN-BACAB, M. J., PENA-RODRIGUES, L. M. Plant natural products with leishmanial activity. **The royal society of chemistry**, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHARIANDY, C. M., SEAFORTH, C. E., PHELPS, R. H., POLLARD, G.V., KAMBAY B .P. S. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **Journal Ethnopharmacology**, v. 64, p. 265-270, 1999.

CHE, C. T. Plants as a source of potential antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N.R. (eds.) **Economic and Medicinal Plants Research**, v. 5. London: Academic, p. 167- 251, 1991.

CHEN, L., ZHU, Q.H., LIN, R.C. Chemical constituents and biological activity of *Schefflera* plant. **Journal Chinese Medicine Mater**, v. 25, p. 363–366, 2002.

CHU. K., CUTLER, H.G. **Natural products as antiviral agents**. Plenum Press. New York and London, p. 279, 1992.

CICCIA, G., COUSSIO, J. E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 72, p. 185-189, 2000.

COSTA, J. F. O., DAVID J. P.L., DAVID, J. M., GIULIETTI, A. M., QUEIROZ, L.P., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., SOARES, M. B. P. Immunomodulatory activity of extracts from *Cordia superba* Cham. and *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae), plant species native from Brazilian Semi-arid. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 11-15, 2008.

COUTO, J. L. A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38(4), p.301-304, 2005.

DANIEL, O., COSTA, L. G. S., OHASHI, S. T. **Morototó - *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne et Planch**. Belém: EMBRAPA. CPATU. p.15, 1994.

DE CLERCQ, E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, p. 552–560, 2005.

De CLERCQ E. The design of drugs of HIV and HCV. **Nature Reviews Drug Discovery** v.6, n. 12, p. 1001-1018, 2007.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 13-25, 2002.

DELGADO, V.S., SUÁREZ, D.P., CESARIS, I.M. & ICANI, R.N. **Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniqué**. *Parasitologia Res.*, v.7, p. 648-654, 2002.

DENISE, H., MATTHEWS, K., LINDERGARD, G., CROFT, S. BARRETT, M. P. "Trypanosomiasis and leishmaniasis: between the idea and the reality of control". *Parasitologia*. *Today*, v. 15, n. 2, p. 43-45, 1999.

DEVI, K. P., RAM, M. S., SREEPRIYA, M., ILAVAZHAGAN, G., DEVAKI, T. Immunomodulatory effects of *Premna tomentosa* extract against Cr (VI) induced toxicity in splenic lymphocytes - an in vitro study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 57, p. 105-108, 2003.

DIAS, B. F. S. A. **Implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, p. 10, 1996.

DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2 ed. São Paulo: Unesp, p.605, 2002.

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, n. 1, p.69-91, 2002.

FARNSWORTH, N.R. (eds.) **Economic and Medicinal Plants Research**, v. 5. London: Academic, p. 167- 251, 1991.

FIASCHI, P., PIRANI, J. R. Estudo taxonômico *Schefflera J. R. & forst.* (Araliaceae) na região sudeste do Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 95-142, 2007.

FIASCHI, P., PIRANI, J. R. Flora da Serra do Cipó. *Boletim Botânico Universitário*, v. 23, n. 2, p. 78- 81, 2005.

FIASCHI, P., PIRANI, J. R. Padrões de distribuição geográfica das espécies de *Schefflera J. R. Forst. & G. Forst.* (Araliaceae) do Brasil extra-amazônico. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 31, n. 4, p. 633-644, 2008.

FIASCHI, P. *Schefflera ayrata*, a new species of araliaceae from Southern Bahia (Brazil) *Brittonia*, Bronx, v. 56, n. 4, p. 357-360, 2004.

FILIPPS, R., MAINA, S. L., CREPIN, J. **Medicinal Plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)**. Department of Botany National Museum of Natural History, Smithsonian Institution Washington, 2004.

FRANCO, E. T. H., FERREIRA, A. G. *Ciência Florestal*, v. 12, n. 1, 2002.

FRODIN, D. G. Araliaceae. *In* Flowering plants of the Neotropics (N. SMITH, S.A. MORI, A. HENDERSON, D.W. STEVENSON & S.V. HEALD, eds.). Princeton University Press, **Princeton**, p. 28-31, 2004.

FRODIN, D.G. **Neotropical Montane Araliaceae: an overview.** *In Biodiversity and conservation of Neotropical Montane Forests (S.P. Churchill, H. Baslev, E. Forero & J.L. Luteyn, eds.)*. New York Botanical Garden, New York, p. 421-430, 1995.

FUNASA – Guia de Vigilância Epidemiológico. < www.funasa.gov.br/pub/GVE/GVE05108.htm>. Data de acesso: dezembro 2007.

GALLO, R.C., MONTAGNEIR, L. Pharmacological strategies for antiHIV therapy. **Scient, Am**, v.259, n.41, p.10-16, 1998.

GARRETT, M. D., WORKMAN, P. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium. **Eur. Journ. of Cancer**, v. 99, p. 280-284, 1999.

GELB, M. H., HOL, W. G. J. Parasitology-“Drugs to combat tropical protozoan parasites”. **Science**, v.297, n. 5580, p. 343-344, 2002.

GOMES, R. Câncer da mama. In: **Oncologia Básica**. GOMES, R. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 1997.

GREVELINK, S. A., LERNER, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy Dermatology**, v.34, p.257-272, 1996.

GUNZINGER, J., MSONTHI, J .D., HOSTETTMANN, K. Moluscicidal saponins from *Cussonia spicata*. **Phytochemistry**, v. 25, p. 2501–2503, 1986

GUO, F. *et al.* Triterpenoid Saponins from *Schefflera arboricola*. **Helvetica Chimica Acta**, v.89, 2006.

HENNESSEY, L. R., BAKER, J. R. JR. Imunomoduladores. In: STITES, D. P., TERR, A. I., PARSLow, T. G. **Imunologia Médica**. 9ª Ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p. 649-660, 2000.

HIRANRAMDEJ, S. P. Handbook of Thai Folklore Medicine for Health. **Bangkok**, p. 230, 1992.

HOLLAND, S. M., VIZI, E. S. Immunomodulation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p.425- 427, 2002.

HOSTETTMANN, K., MARSTON, A. chemistry and pharmacology of natural products: Saponins. **Cambridge**:University Press, 1995.

HUDSON, J. B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press., p. 200,1990.

HUTCHINGS, A. *et al.* **Medicinal plants. An inventory**. In University of Natal Press, p. 221–222, 1996.

KLOOS, H., McCULLOUGH, F. S. Plant molluscicides. **Planta Medica**, v. 46, p. 195-209, 1982.

KINGHORN, A. D., BALUNAS, M. J. Drug Discovery from medicinal plants. **Life Science**, v. 28, p. 431 - 441, 2005.

KOTT, V. *et al.* Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 64, p. 79-84, 1999.

KRESNKY, A. M., STROM, T. B., BLUESTONE, J. A. **The pharmacological basis of therapeutics**. Drugs used for immunomodulation. In: GOODMAN e GILMAN'S, 2001 e GILMAN'S. 20ª ed., New York: McGraw Hill Companies, 2001.

LÉON, A. T. *et al.* Triterpene saponinas from *Schefflera abyssinica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.34, p.887 e 889, 2006.

LIU, R., GU, Q., CUI, C., CAI, B., LIU, H., WANG, L., GUAN, H. 12 α ,13-Dihydroxyolean-3-oxo-28-oic acid, a New Triterpene, and the Known Oleanonic Acid as a New Cell Cycle Inhibitor from *Schefflera venulosa*. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 23, p. 242-244, 2005.

LI, Y., BUT, P. P. H., OOI, V. E. C. Antiviral activity and the mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.). **Antiviral Research**, v. 68, p.1-9, 2005.
LI, Y. *et al.* Chemical Composition and Antiproliferative Activity of Essential Oil from the Leaves of a Medicinal Herb, *Schefflera heptaphylla*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p.140-142, 2009.

LIAO, N. **In Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica**; CHANG, H. M., BUT, P. P. H. World Scientific Press:Singapore, v.1, p. 6-8, 1986.

LOVE, R. R. **Manual de Oncologia Clínica**. 5. Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, p. 147-161, 1991.

LOWRY II, P. P., PLUNKETT, G. M., WEN, J. Generic relationships in Araliaceae: looking into the crystal ball. **South African Journal of Botany**, v.70, p. 382-392, 2004.

LUNA, J. S., SANTOS A. F., LIMA M. R. F., OMENA, M.C, MENDONÇA F. A. C., BIEBER L. W., SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.

MADJAROF, C. **Atividade Antitumoral dos Extratos e Frações Obtidos de *Didymopanax vinosum* (Araliaceae)**. Tese de (Doutorado)-Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural. Campinas, 2004.

MAKARE, N., BODHANKAR, S., RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.

MANTOVANI, NILTON C.; FRANCO, E. T. H. Respostas morfo genéticas em explantes foliares de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) DCNE. et planch. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, n.3, p. 269-272, 2000.

MANTOVANI, N. C., FRANCO, E. T. H., GUERRA, M. P., HOPPE, J. M. Micropropagação de caixeta, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) DCNE. et Planch. **Ciência Florestal**, v. 9, n. 1, 1999.

- MARONE, L. de C. 2006. Cinética do comprometimento do sistema citocromo P-450 microsomal hepático na equistossomose mansônica murina. 98f. Dissertação (Mestrado em Patologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.
- MARSDEN, P. D. Personal experience whit diagnostic and therapeutic aspects of *Leishmania(Viannia) braziliensis* in Três Bracços. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 485-487, 1994.
- MELÉNDEZ, P. A., CAPRILES, V. A. Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. **Annals of Tropical Medicine Eparasitology**, v.96, n. 2, p. 209-218, 2002
- MENDES, N. M. *et al.* Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 411-412, 1999.
- MENDES, N. M. *et al.* Ensaios preliminares em laboratório para verificar a ação moluscicida de algumas espécies da fora brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, p. 348-354, 1984.
- MENEZES, C. *et al.* Competição entre abelhas durante forrageamento enm *Schefflera arboricola* (Hayata) Merr. **Bioscience journal**, Uberlândia, v.23, Suppl.1. p. 63-69, 20007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. (Online). Disponível: <http://inca.org.br/epidemiologi/estimativa2010> (19 de outubro de 2010).
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância Epidemiológica. 6ª edição. Série A. Normas e manuais técnicos. Brasília: SVS/MS, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª edição. Série A. Normas e manuais técnicos. Brasília: SVS/MS, 2007.
- MOHAN, S., FELDS, P. G. A simples technique to assess compounds that are reppelent or attractive to storedproducts insects. **Journal of Stored Products Research**, v. 38, p. 23-31, 2002.
- MOREIRA, R. C. R., REBÊLO, J. M. M., GAMA, M. E. A., COSTA, J. M. L. Nível de conhecimento sobre leishmaniose tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, p. 187-195, 2002.
- MOREL C. M. Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. **Embo Reports**. v. 4, n. 1, p. 35-38, 2003.
- MTHEMBU, X.S., VAN HEERDEN, F.R., FOUCHÉ G. Antimalarial compounds from *Schefflera umbellifera*. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 82-85, 2010.
- MURAD, A. M., KATZ, A. **Oncologia: Bases Clínicas do Tratamento**. Ed. Guanabara Koogan S.A.; Rio de Janeiro, 41. 1996.
- NAM, N.H., PARANG, K. Current targets for anticancer drug discovery. **Curr. DrugTarget**, v.4, p.159-79, 2003.

NETTO, E. M., TADA, M. S. GOLIGHT, K. D. C., LAGO, E., BARRETO, A.C., MARSDEN, P. Conceitos de uma população local a respeito da leishmaniose mucocutânea em uma área endêmica. **Revista da Sociedade de medicina Tropical**, v.18, p. 33-37, 1985.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu Editora, 8ª Ed., p.28-72, 1991.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, p.461-477, 2007.

OMENA, M. C. *et al.* Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-p2556, 2007.

OHASHI, S. T., LEÃO, N. V. M. Morototó *Schefflera morototni* (Aubl.) Maguire, Steyerf. & frodin. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia, n. 12, 2005. Disponível em: <<http://www.rsa.ufam.edu.br.8080/sementes/especies/pdf/doc12.pdf>> Acesso em 11 setembro de 2009.

OLIVEIRA, R. B., GODOY S.A. P., COSTA, F. B. **Família Euphorbiaceae. In: Plantas Tóxicas (Conhecimento e Prevenção de Acidentes)**. Holos. São Paulo, 2002.

PANTHONG, A., KANJANAPOTHI, D., TAYLOR, W.C. Ethnobotanical review of medicinal plants from Thai traditional books. Part I. Plants with anti-inflammatory, anti-asthmatic and antihypertensive properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 213-228, 1986.

PATWARDHAN, B., KALBAG, D., PATKI, P. S., NAGSAMPAGI, B. A. Search of immunomodulatory agents: a review. **Indian Drugs**, v. 28, p. 348-358, 1990.

PELAH, D., ABRAMOVICH, Z., WIESMAN, M. K. The use of commercial saponin from *Quillaga saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 81, p. 407-409, 2002.

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.

PHILLIPSON, J. D., WRIGHT, C.W. Medicinal plants in tropical medicine: Medicinal plants against protozoal diseases. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 18-2, 1991.

PINTO, C., ALMEIDA, A. F. Um novo método para a profilaxia da esquistossomose mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 40, p. 291-311, 1944.

PLUNKETT, G. M. *et al.* Phylogeny and geography of *Schefflera*: pervasive polyphyly in the largest genus of Araliaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Washington, v. 92, n.2, p. 202-224, 2005.

POTDUANG, B. *et al.* BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *SCHEFFLERA LEUCANTHA*. **African Journal. Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, n. 2, p.157-164, 2007.

- PRATA, A. **Esquistossomose mansoni. Em Doenças Infecciosas e Parasitárias.** 7ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. 920p.
- REITZ, R., KLEIN, R. M., REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Companhia Riograndense de Artes Gráficas, p. 525, 1988.
- RICE, W. G., BADER, J. P. Discovery and in vitro development of AIDS antiviral drugs as biopharmaceuticals. **Advances in pharmacology.** v. 33, p. 389-438, 1995.
- RODRIGUES, P. A., MORAIS, S. M., MARQUES, M. M. M., AGUIAR, L.A., NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Atividade antioxidante e gastro-protetora de produtos naturais em animais experimentais. **Revista Brasileira de Botucatu**, v. 10, n. 2, p. 116-123, 2008.
- ROEP, B.O. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, v. 46, n. 3, p. 305-321, 2003.
- ROUQUAYROL, M. Z., SOUZA, M. P., SILVA, M. J. M. Atividade moluscicida de plantas do nordeste brasileiro (III). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 53, n. 5, p. 215-220, 1972.
- RUBEL, Rosália. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica.** Curitiba, 2006. 191p. Tese (Doutorado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- RUDNICK, G. **Farmacologia Clínica: Série Incrivelmente Fácil.** 1. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Guanabara Koogan S. A., 2003.
- RUSCHEL, A. R. *et al.* Evolução do uso e valorização das espécies madeiráveis da floresta estacional do alto-uruguaí, SC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n.1, p. 153-166, 2003.
- SALMONM, S. E., KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica.** ed. Guanabara Koogan S.A.; Rio de Janeiro, 629-655, 1998.
- SCREMIN, O.U. *et al.* Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. **Brain Research Bulletin**, v.42, p.59-70, 1997.
- SECOLI, S. R. **Âmbito Hosp.**v. 12, p. 59-62, 2005.
- SENIOR, K. Pharmaceuticals from plants: promises and progress, **Molecular Medicine Today**. v. 2, p. 60-64, 1996.
- SILVA, K., CECHINEL, V. Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.449-454, 2002.
- SILVA, M. C., CARVALHO, J. C. T. **Plantas medicinais** In: CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações. Ribeirão Preto, Sp-Tecmedd, p. 40-41, 2004.
- SILVA, N. F. S., COGO, J., WIEPIESKI, C. C. P., LAVERDE, JR. Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências Veterinária e Zoologia.** Unipar, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 179-181, jul./dez, 2008.

SINCHAISRI, N., ROONGSOOK, D., AREEKUL, S. Botanical repellent against the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. **The Kasetsart Journal**, v. 22, p. 71–74, 1988.

SNEADER, W. **Drug discovery: a history**. England: John Wiley and Sons, 2005.

SNOECK, R. Antiviral therapy of herpes simplex. **Int. J. of Antimic. Agents**, v. 16, p. 157-159, 2000.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fenerógramas nativas e exóticas no Brasil, baseado e APII, 2 ed. Nova odessa: Instituto plantarum, p2008. 703p.

STITES, D. P., TERR, A. I., PARSOLW, T. C. **Imunologia Médica**. 1. ed. Rio de Janeiro - RJ, Ed. Guanabara Koogan S. A., 2000.

STITES, D. P., TERR, A. I. **Basic and Clinical Immunology**, Appleton & Lange, 7nd. Edition, New York, p. 870, 1995.

STRAUSS, E. G., STRAUSS, J. H., LEVINE, A. J. **Virus evolution**. In: Fundamental Virology. Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.). Lippincott-Raven Press: Philadelphia, p. 141-159, 1996.

SUNG, T. V. An acetylated bidesmosidic saponin from *schefflera octophylla*. **Journal of Natural Products**, v. 55. n. 4, p. 503-505, 1992.

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde – Balanço dengue janeiro a setembro de 2007 <<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area>> Data de acesso: dezembro de 2007.

TAYLOR, W.C. Constituents of some Asian medicinal plants. **Pure & Appl. Chern.**, v. 66, n 10/11, p. 2375-2378, 1994.

TIZARD, I R. **Imunologia básica – uma introdução**. Roca Ltda, São Paulo, 5ª edição, p. 147-159, 1998.

TOMMASI, N., PIZZA, C. Triterpenoid Saponins from *Schefflera divaricata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 663-668, 1997.

TREVISAN, M. T. S. *et al.* ATIVIDADES LARVICIDA E ANTICOLINESTERÁSICA DE PLANTAS DO GÊNERO *Kalanchoe*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p.415-418, 2006.

URBINA, J. A. *et al.* Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *T cruzi* and *L. mexicana*. **Molecular nd Biochemical Parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 35-45, 2002.

VERONESI, R. **Doenças Infeciosas e parasitárias**. Rio de janeiro, Guanabara Koogan, 8ª Ed.,p. 674-717, 1991.

VIEGAS, C., BOLZANI, V. D., BARREIRO, E. J., FRAGA, CAM. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: The role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.5, p.915-926, 2005.

- VLIETINCK, A. J., VANDEN BERGHE, D. A. Leads for Antivirals from traditional medicines. In: PREBDERGASTM, H.D.V.; ETKIN, N.L.; HARRIS, D.R.; HOUGHTON, P.J. (Ed.). **Plants for Food and Medicine**. London: Royal Botanic Gardens, p. 333-344, 1998.
- VLIETINCK, A. J., DE BRUYNE, T., VANDEN BERGUE, D. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 307-344, 1997.
- WHITE, D.O., FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4.ed. San Diego: Academic, p.603, 1994.
- WINKELSTEIN, A. Terapia Imunosupressora. In: STITES, D., TERR, A. I., PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9ª Ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, p. 634-648, 2000.
- YANG, Y. C., LEE, S. G., LEE, H. K., KIM, M. K., LEE, S. H., LEE, H. S. A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity against *Aedes aegypti* mosquito larvae. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50: p.3765-3767, 2002.
- YARED, J. A. G. Determinação da variabilidade populacional de cordial goeldiana *Berholletia excels* e *Didymopanax morototoni*. Belém: Embrapa-CPATU, 1989. 22p.
- ZHU, M., YANG, S., PHILLIPSON, J. D., BOWERY, N. G., GREENGRASS, P. M., BOWEN, D. V. **Journal Natural Products**, n. 59, p. 1043.1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional and alternative, Fact Scheet**, Geneva, 2002. 271p.
- XIAO, S. H., BOOTH, M., TANNER, M. The prophylactic effects of artemether against *Schistosoma japonicum* infections. **Parasitology Today**, v.16, p.122-126, 2000.

CAPÍTULO II

Compostos isolados de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Decne. & Planch.

Ana Lucila dos Santos COSTA¹, Isis Martins Figueiredo¹, Edson de Souza Bento¹ & Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^{*1}

¹ Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoa, Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, Campos A.C.Simões s/n Cidade Universitária– Maceió – AL, Brasil. CEP: 50050-900.

RESUMO

Esse trabalho descreve o estudo químico da espécie vegetal *D.morototoni* amplamente distribuída no Brasil. Considerando-se a escassa literatura sobre seu conhecimento quimiotaxonômico buscou-se isolar e caracterizar seus metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico da madeira e casca do caule. Os extratos foram submetidos à fitoquímica clássica e as substâncias isoladas foram identificadas utilizando técnicas de IV e RMN 1D (¹H, ¹³C, DEPT 90°, DEPT 135°) e 2D (COSY, HSQC, HMBC e NOESY) e comparação com dados da literatura. O estudo químico da madeira levou ao isolamento e identificação do ácido 3-O-β-D- glicopiranosil (1→2) β - arabinopiranosil (4→ 1) β -glicopiranosil- oleano-12-en-28 oico, ácido 3-O-β-D- xilopiranosil (1→3) β- glicopiranosil-oleano-12-en-28-oico e a mistura de 3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol e 3-O-β-D-glicopiranosil-estigmasterol. Da fração hexânica da madeira foram isolados os ácido ursólico, ácido oleanólico, a mistura dos esteróides estigmasterol e β-sitosterol. Todos os compostos foram relatados pela primeira vez na espécie *D. morototoni*.

ABSTRACT

This study describes the chemical *D.morototoni* of plant species widely distributed in Brazil. Given the sparse literature on their knowledge chemotaxonomy sought to isolate and characterize their secondary metabolites present in ethanolic extracts of wood and stem bark. The extracts were submitted to classical and phytochemical substances isolated were identified using IR and NMR techniques 1D (¹H, ¹³C, DEPT 90°, DEPT 135°) and 2D (COSY, HSQC, HMBC and NOESY) and comparison with literature data. The chemical study of wood led to the isolation and identification of the acid 3-O-β-D-glucopyranosyl (1→ 2) β - arabinopiranosil (1 → 4)-β-glucopyranosyl olean-12-en-28 oic, acid 3-O-β-D-xilopiranosil (1 → 3) β-glucopyranosyl-olean-12-en-28-oic and the mixture of 3-O-β-D-glucopyranosyl-sitosterol and 3-O-β-D-glucopyranosyl-stigmasterol. The hexane fraction of the wood were isolated ursolic acid, oleanolic acid, the mixture of steroids stigmasterol and β-sitosterol. All compounds were first reported in the species *D. morototoni*.

INTRODUÇÃO

A família Araliaceae distribui-se em todo o território brasileiro, com 40 gêneros e 1500 espécies distribuídos no mundo (HUANG, 2008). O gênero *Schefflera* é considerado o maior da família Araliaceae, com 600–900 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais do mundo (FRODIN, 1995, 2004; FRODIN & GOVAERTS 2003; PLUNKETT *et*

al. 2005). No Brasil cerca de 50 espécies de *Schefflera* pertencente ao grupo “*Didymopanax*”, que, embora tenha sido considerado durante muito tempo como um gênero à parte, consta como sinônimo do primeiro (FRODIN, 1995).

Didymopanax morototoni conhecido popularmente como mandiocão, é uma árvore de porte médio chegando a 30 m de altura. Possui fuste reto, cilíndrico, cuja madeira é usada para carpintaria, marcenaria, construção em geral, palitos de fósforo e caixotaria (CORREA, 1978). Essa espécie é de grande interesse para renovação dos recursos florestais da Amazônia devido a seu rápido crescimento e capacidade de regeneração (DUBOIS, 1986). A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e nenhum dado da constituição química de *D. morototoni*.

A madeira de *D. morototoni* é utilizada no Brasil para o controle do fluxo menstrual (CARNEIRO, 2009). No Suriname a madeira é usada para o tratamento de abscessos e a casca do caule é usada na Nova Guiana para o tratamento da picada de escorpião, úlceras e feridas (FILIPPS *et al.*, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Métodos gerais

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho Microquímica-MQAPF-301. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro da marca Varian 660-IR/FT-IR Spectrometer, através da técnica de ATR. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C) unidimensional e bidimensionais foram obtidos em aparelho Bruker Avance 400. Para as separações cromatográficas em coluna, foi utilizada gel de sílica 60 (70 - 230 e 230-400 Mesh-ASTM, Merck) e nas análises cromatográficas em camada delgada, utilizaram-se placas da Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ (0,25 mm de gel de sílica com indicador de fluorescência UV254).

Material botânico

A espécie *Didymopanax morototoni* foi coletada no mês de junho de 2007 no município de Pilar no Estado de Alagoas. A confirmação da identificação botânica foi realizada pelo Prof. José Elias de Paula, e uma exsicata se encontra depositada sob o N° JEB3634UB no Herbário do Departamento de Botânica do Campus da Universidade de Brasília – UnB.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

Casca do caule e madeira foram secas a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) e triturados em máquina forrageira (Nogueira S.A. Máquinas Agrícolas, Itapira, S. P., Brasil). O pó da madeira do caule (2000 g) e casca do caule (2000 g), foram submetidos à percolação com álcool etílico a 90%, por três vezes, consecutivas por 72 horas. O álcool etílico foi removido em aparelho rotatório a 50 °C e pressão de 30 mmHg. Foram obtidos 300 g (15%) de extrato bruto etanólico da casca do caule e 225 (11,25%) de extrato bruto etanólico da madeira do caule, estes foram isoladamente solubilizados em MeOH:H₂O (3:1) (1L) e extraídos sucessivamente com solventes em ordem crescente de polaridade *n*-C₆H₁₄, CHCl₃, AcOEt, gel BuOH . A fração CHCl₃ oriunda da partição líquido/líquido da casca do caule (98,6 g) (32,85%) foi submetida a sucessivos fracionamento cromatográficos em coluna de gel de sílica tendo como fase móvel *n*-C₆H₁₄, CHCl₃, MeOH e mistura dos mesmos. As frações obtidas foram comparadas por cromatografia em camada delgada de gel de sílica e usando como revelador solução ácida de sulfato cérico, reunindo-se as semelhantes. Parte da fração eluída com CHCl₃:MeOH 30% (9g) (9,12%) e CHCl₃:MeOH 50% (25,05 g) (25,4%) após sucessivos fracionamentos cromatográficos em coluna de gel sílica, das frações m,l CHCl₃:MeOH 30% e CHCl₃:MeOH 50% resultou no isolamento do DMCC1 (40 mg) (1) da fração CHCl₃:MeOH 50% o DMCC2 (60 mg) (2) e DMCC3 (153 mg) (3). A fração hexânica (23,5 g) (10,44%) obtida do extrato do bruto da madeira de *D. morotoni* após sucessivos fracionamentos resultou no isolamento de DMM1 (200 mg) (4), DMM2 (56 mg) (5) e DMM3 (62 mg) (6).

(DMCC1). Aspectos físicos: sólido amorfo branco, IV (AT) cm⁻¹: 1700; 3400. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD). δ 3,16 (1H, dd, *J*= 11,67 e 4,39 Hz, H-3); 5,24 (1H, *J*=7,30, H-12); 4,28 (H-1'); 44,53 (H-1'). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃:CD₃OD 1:2): δ 90,61 (C-3); 123,67 (C-12); 145,29 (C-13), 107,11 (C-1'); 105,42(C-1').

(DMCC2): Aspectos físicos: sólido amorfo branco, IV (AT) cm⁻¹: 1047, 1376, 1462, 1663, 2940, 3430, RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,74 (1H, *m*, H-3); 5,52 (1H, *sl*, *J*=5,13, Hz, H-6); δ 5,33 (1H, dd, *J*= 8,72 e 16,5 Hz, H-22) ; 5,15 (1H, dd, *J*= 8,55 e 16,1 Hz, H-23), 4,55 (H-1', d, *J*= 7,86 Hz). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 79 (C-3); 141,21 (C-5); 123 (C-6), 139,53 (C-22); 130,13 (C-23); 102, 01(C-1'); 62,48 (C-6').

(DMCC3). Aspectos físicos: sólido amorfo branco, IV (AT) cm⁻¹: 1692, 3400. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃:CD₃OD 1:2): δ 3,18 (1H, dd, H-3); 5,26 (1H, t, H-12); 4,44 (d, *J*=7,27, H-1'); 4,72 (d, *J*=7,27, H-1'). 4,59 (d, *J*=7,55, H-1'1'); RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃:CD₃OD 1:2): δ

91,42 (C-3); 123,41(C-12); 145,06 (C-13); 182,13 (C-28), 105,80 (C-1'); 104,3 (C-1''); 104,80(C-1''').

(**DMM1**): Aspectos físicos: cristais branco, IV (AT) cm^{-1} : 1047, 1376, 1462, 1663, 2937, 3426 RMN^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 3,53 (1H, *m*, H-3); 5,35 (1H, *sl*, H-6); 5,15 (1H, *dd*, $J=8,3$ e $15,5$ Hz, H-22); 5,01 (1H, *dd*, $J=8,4$ e $15,6$ Hz, H-23). RMN^1C (100 MHz, CDCl_3): δ 71,9 (C-3); 140,94 (C-5); 121,85 (C-6), 138,52 (C-22); 129,44 (C-23).

(**DMM2**): Aspectos físicos: sólido amorfo branco, IV (AT) cm^{-1} : 1692, 3442. RMN^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): δ 3,19 (1H, *dd*, $J=7,20$ Hz e $13,20$ Hz, H-3); ;5,26 (1H, *t*, $J=3,55$ Hz, H-12); 2,85 (1H, *dd*, $J=4,18$ Hz e $J=3,64$ Hz, H-18); 0,91 (3H, *s*, H-29); 0,94 (3H, *s*, H-30). RMN^1C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): δ 79,30 (C-3); 123,14 (C-12); 144,66 (C-13), 181,57 (C-28)

(**DMM3**): Aspectos físicos: sólido amorfo branco, IV (AT) cm^{-1} : 1690, 3434. RMN^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): δ 2,86 (1H, *dd*, $J=5,38$ Hz e $10,8$ Hz, H-3); 4,91(1H, *t*, $J=3,4$ Hz, H-12); 1,87 (1H, *d*, $J=12,0$ Hz, H-18), 0,55(3H, *d*, $J=7,3$ Hz, H-29); 0,64 (3H, *d*, $J=7,7$ Hz, H-30). RMN^1C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1): δ 78,32 (C-3); 125,23 (C-12); 137,92 (C-13), 180,38 (C-28).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A substância DMCC1 apresentou, em seu espectro no IV absorção em 1700 cm^{-1} de grupamento carboxílico e 3400 cm^{-1} de grupo hidroxila (**Figura 24**) (MAHATO; KUNDU, 1994).

A análise do espectro de RMN^1H obtido em $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 a 400 MHz da substância DMCC1 (**Figuras 25 - 26**) apresentou seis sinais na região mais protegida; todos simples (s) atribuídos a hidrogênios de sete metilas do núcleo triterpênico ligados a carbonos não hidrogenados: 5 sinais para (3H) (δ 0,80;0,84; 0,90; 1,03; 1,15) e um sinal em δ 0,93 para 6H; um sinal como duploduplete em δ 3,14 relativo ao hidrogênio carbinólico (H-3); um sinal na forma de tripleto em δ 5,24 relativo ao hidrogênio olefínico (H-12) e 2 sinais referentes a hidrogênios de carbonos anoméricos em δ 4,27 (*d*, $J=7,38$), e 4,53 (*d*, $J=7,37$) (**Tabela 3**).

A análise dos espectros de RMN^{13}C da substância DMCC1 (**Figuras 27 - 28**) mostrou deslocamento químico referente a seis carbonos quaternários (δ 31, 71; 42,80; 40,30; 40,62; 47,16) sendo um carbono olefínico em δ 145,29 (C-13) e um carbono saturado ramificado (δ 40,30). O espectro do DEPT 135 (**Figuras 29 - 30**) revelou um total de 12 carbonos metilênicos.

O espectro de HSQC da substância DMCC1 (**Figura 31**) confirmou as correlações do hidrogênio em δ 3,14 (H-3) com o carbono carbinólico em δ 90,61; do hidrogênio vinílico em δ 5,23 (H-12) com o carbono δ 123,67 (C-12).

Pelo experimento de HMBC (**Figuras 32**) foi possível observar a correlação em δ 90,61 (C-3) com os hidrogênios das duas metilas H₂₃ (δ 1,05) e H₂₄ (δ 0,84), as quais estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY) e com o C₄ (δ 40,30), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono C₄ (δ 40,40). O C₅ (δ 57,10) mostra correlações com os hidrogênios das metilas H₂₃ (δ 1,05), H₂₄ (δ 0,84) e H₂₅ (δ 0,93). O C₁₀ (δ 37,90) está ligado aos hidrogênios da metila H₂₅ (δ 0,93) fechamento do primeiro anel.

No segundo anel que o foi observado que o C₉ (δ 48,93) mostra correlação com os hidrogênios das duas metilas H₂₅ (δ 0,93) e H₂₆ (δ 0,80) e que o C₁₀ (δ 37,90) mostra correlação com os hidrogênios da H₂₅ fechando o segundo anel.

Considerando o terceiro anel, o C₁₃ (δ 145,29) altamente desprotegido, devido à ligação dupla correlaciona-se com os hidrogênios do H₂₇ (δ 1,15) e o C₁₄ (δ 42,96) correlaciona-se com os hidrogênios da metila em H₂₆ (δ 0,80) e H₂₇ (δ 1,15) ligando o segundo anel ao terceiro anel.

Foram observadas no espectro de COSY (**Figuras 33**) as correlações entre em δ 1,59 (H-1) com o hidrogênio em δ 0,93 (H-25). O hidrogênio em δ 3,16 (H-3) com o H-2 em δ 1,67. O hidrogênio em δ 2,84 (H-18) está correlacionado com o hidrogênio em δ 1,67 (H-19), além das correlações dos hidrogênios das duas metilas em δ 1,05 (H-23) e δ 0,84 (H-24).

A substância DMCC1 foi caracterizada como o Ácido 3-O- β -D- xilopiranosil (1 \rightarrow 3) β - glicopiranosil-oleano-12-en-28-oico (**Figura 34**).

O espectro de infravermelho da substância DMCC2 obtidos na região de comprimento de onda revelou a presença de bandas de estiramento para grupos hidroxila em 3430 cm⁻¹, sistema alifático 2940 cm⁻¹, ligação olefínica em 1663 cm⁻¹, estiramento C-O em 1047 cm⁻¹, além de banda de deformação do esqueleto carbônico olefínico em 1462 e 1376 cm⁻¹ (**Figura 35**) (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

Os espectro de RMN ¹H obtido em CDCl₃ a 400MHz da substância DMCC2 (**Figura 36**) apresentou um multiplete em δ 3,76 atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3; um simpleto largo referente a um hidrogênio em δ 5,52 atribuído ao hidrogênio olefínico (H-6) dos dois compostos, um duplo duplete em δ 5,33 (J_{22-23} = 16,5 e J_{22-20} = 8,72 e Hz) atribuído ao H-22; um duplo duplete em δ 5,15 (J_{23-22} = 16,5 e J_{23-24} = 8,72 Hz) atribuído ao H-23. Os sinais dos demais hidrogênios- metínicos, metilênicos e metílicos- apareceram na região entre δ 0,87 a 2,34.

Além dos deslocamentos anteriormente citados, são observados ainda sinais que caracterizam a presença de uma unidade de carboidrato. Observa-se um sinal referente ao

hidrogênio anomérico em δ 4,55 ($J=7,86$ Hz, d, H-1'), um sinal em δ 3,86 ($J=4,95$ Hz) e um duplo duplete em δ 4,01 ($J=8$ Hz e 2,47 Hz), atribuídos a H-6'a e H-6'b, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C de DMCC2 (**Figura 37**) apresentaram deslocamentos químicos em δ 141,21 e 123, típicos do sistema olefínico entre C-5 e C-6 e sinais em δ 139,53 e 130,13, característico do sistema olefínico entre C-22 e C-23 e um sinal em δ 79, referente ao carbono carbinólico C-3. Foi possível observar no um sinal intenso em δ 102, 01 de carbono anomérico, e sinais correspondentes a outros cinco CH em δ 74,50 (CH-2'), 77,50 (CH-3'), 71,17 (CH-4'), 77,08 (CH-5'), (CH-6') além do sinal em δ 62,48 (CH₂-6'). Pelo experimento de COSY o sinal referente ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico em δ 4,55 ($J=7,86$ Hz, d, H-1') foi correlacionado com os sinais em δ 3,35 ($J=8,18$ Hz, t, H-2') e 3,75 ($J=7,86$ Hz, m, H-3). Pelo experimento de HMBC foi possível correlacionar com o hidrogênios δ 3,42 (H-5') com os hidrogênios do carbono metilênico em δ 3,86 (H-5a') e 4,01 (H-5b') (**Tabela 4**). Por comparação dos dados de RMN de ^{13}C obtidos para DMCC2 com aqueles descritos na literatura (BORGES, 2006), foi possível a identificação da mistura de 3-*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-estigmasterol em DMCC2 (**Figura 38**).

Na análise do espectro na região de IV da substância DMCC3 foram observados, dentre outras, banda em $1692,82\text{ cm}^{-1}$ compatíveis com carbonila de ácido carboxílico e 3400 cm^{-1} de grupo hidroxila (**Figura 39**) (MAHATO & KUNDU, 1994).

A análise do espectro de RMN ^1H obtido em $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2 a 400 MHz da substância DMCC3 (**Figuras 40 - 41**) apresentou seis sinais na região mais protegida; todos simpletos atribuídos a hidrogênios de sete metilas do núcleo triterpênico ligados a carbonos não hidrogenados: 5 sinais para (3H) (δ 0,81 a 1,16) e 1 sinal para 6H (δ 0,94,), um sinal na multiplete em δ 3,18 relativo ao hidrogênio carbinólico (H-3); um sinal na forma de tripleto em δ 5,26 relativo ao hidrogênio olefínico (H-12) e 3 sinais referentes a hidrogênios de carbonos anoméricos em δ 4,72 (d, $J=7,27$), 4,59 (d, $J=7,55$) e 4,44 (d, $J=7,27$) (**Tabela 5**).

A análise dos espectros de RMN ^{13}C da substância DMCC3 (**Figuras 42 - 43**) mostrou deslocamento químico referente a oito carbonos quaternário seis da junção dos anéis (δ 37,79; 40,40; 40,41; 47,53; 42,77) sendo um carbono olefínico em δ 145,06 (C-13) e um carbono carbonílico em δ 182,13 (C-28) e um carbono saturado ramificado (δ 40,40). O espectro do DEPT 135 (**Figuras 44 - 45**) revelou um total de 13 carbonos metilênicos sendo três das unidades de carboidratos.

O HSQC da substância DMCC3 (**Figura 46**) confirmou as correlações do hidrogênio em δ 3,18 (H-3) com o carbono carbinólico em δ 91,42; do hidrogênio vinílico em δ 5,26 (H-

12) com o carbono δ 123,41 (C-12) e dos hidrogênios metílicos (δ 0,81; δ 0,87; 0,92; 0,94; 1,07; 1,16) com os seus respectivos carbonos (δ 17,71; 16,80; 33,45; 16,01 e 24,12; 28,37; 26,57).

Pelo experimento de HMBC (**Figura 47**) foi possível observar a correlação do em δ 91,42 (C-3) está correlacionado com os hidrogênios das duas metilas H₂₃ (δ 1,07) e H₂₄ (δ 0,87), as quais estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY) e com o C₄ (δ 40,40), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono C₄ (δ 40,40) e que este carbono está ligado ao C₃ (δ 91,42); o C₅ (δ 56,89) mostra correlações com os hidrogênios das metilas H₂₃ (δ 1,07) e H₂₄ (δ 0,87) e H₂₅ (δ 0,94) e os hidrogênios H₂₅ (δ 0,94) mostram correlação com o C₁₀ (δ 37,79) e com o C₁ (δ 39,75). Isto confirma que o primeiro anel está ligado através do C₃ (δ 91,42) ao C₄ (δ 40,40), que por sua vez está ligado às metilas H₂₃ (δ 1,07) e H₂₄ (δ 0,87) e ao C₅ (δ 56,89), o qual está ligado ao C₁₀ (δ 37,79), que está ligado a metila H₂₅ (δ 0,94) e ao C₁ (δ 39,75), determinando o fechamento do primeiro anel.

Observando-se no segundo anel que o C₉ (δ 48,81) mostra correlação com os hidrogênios das duas metilas H₂₅ (δ 0,94) e H₂₆ (δ 0,81) e os hidrogênios H₂₄ mostra correlação com o C₈ (δ 40,41) e C₁₀ (δ 37,79), fechando o segundo anel.

Considerando o terceiro anel, o C₁₃ (δ 144,66) altamente desprotegido, devido à ligação dupla, e o C₁₄ (δ 42,77) correlacionam-se com os hidrogênios do H₂₇ (δ 0,16) o carbono C₁₄ (δ 42,77) correlaciona ainda com os hidrogênios da metila em H₂₆ (δ 0,81) ligando o segundo ciclo ao terceiro anel.

Os sinais úteis para a identificação do esqueleto do açúcar foram principalmente os referentes às metilas presente na região mais blindada. O espectro de RMN de ¹³C mostrou três sinais de carbonos anoméricos em δ 104,31; 104,80 e 105,80 correlacionados (segundo o mapa de correlação HSQC) com 3 sinais referentes a hidrogênios de carbonos anoméricos, em δ 4,7 (d, J=7,27), 4,59 (d, J=7,55) e 4,44 (d, J=7,27). O sinal em δ 91,42 referente ao C3 da aglicona mostrou correlação no mapa de contorno HMBC com o H anomérico em δ 4,44 (dd, J=7,27) confirmando a presença de uma unidade glicosídica no C-3 da aglicona.

Partindo-se do primeiro açúcar observa-se pelo mapa de contorno HMBC que o C1' (δ 105,80) está correlacionado com o hidrogênio oximetínico do H3 (δ 3,18) e com os hidrogênios metilênicos H5' (δ 3,56 e 3,90) e H2' (δ 4,00) que estão correlacionados entre si pelo COSY (**Figura 48**). O C4' (δ 83) tem correlação com o H1'' (δ 4,59) ligado ao carbono anomérico do terceiro resíduo de açúcar. A OH no C4' (δ 83) é axial e o H (δ H 4,07, sl) é equatorial. O C2' (δ 76,86) mostrou correlação pelo HMBC com o hidrogênio anomérico

H1'' (δ 4,72) do segundo resíduo de açúcar, ligando o primeiro açúcar ao segundo, o H2' (δ 4,00) está correlacionado com H1' (δ 4,44), H3' (δ 3,84) e H4' (δ 4,07) pelo COSY. O H4' (δ 4,07) está correlacionado via COSY com os hidrogênios H5' (δ 3,56 e 3,90).

No segundo resíduo de açúcar observa-se que o C1'' (δ 104,3) está correlacionado com o H2'' (δ 3,50). O C2'' (δ 73,2) mostra correlação com H3'' (δ 3,83) e H4'' (δ 3,48). O C3'' (δ 70,16) está correlacionado com H4'' (δ 3,48).

O carbono anomérico do terceiro resíduo de açúcar C1''' (δ 104,80) mostra correlação com H4' (δ 4,07) e H-2''' (δ 3,33) e o H1''' (δ 4,59) está correlacionado via COSY e NOESY com os H-2''' (δ 3,33) e H-6''' (δ 3,83). O C2''' (δ 74,92) mostra correlação com o H3''' (δ 3,38) e o H3''' mostra correlação pelo COSY com o H1''' (δ 4,59). O C3''' (δ 77,77) está correlacionado com o H2''' (δ 3,33) e H4''' (δ 3,36). O C4''' (δ 70,87) mostra correlação com H3''' (δ 3,38), o C5''' (δ 77,64) mostra correlação com H4''' (δ 3,36), os hidrogênios metilênicos H6''' (δ 3,73 e 3,83) mostram correlação geminal (**Tabela 5**).

A substância DMCC3 é o Ácido 3-O- β -D- glicopiranosil (1 \rightarrow 2) β - arabinopiranosil (4 \rightarrow 1) β -glicopiranosil- oleano-12-en-28 oico (oleanólico). (**Figura 49**).

A substância DMM1 revelou em seu espectro obtido na região de comprimento de onda do infravermelho bandas de estiramento para grupos hidroxila em 3426 cm⁻¹, sistema alifático 2937 cm⁻¹, ligação olefínica em 1663 cm⁻¹, estiramento C-O em 1047 cm⁻¹, além de banda de deformação do esqueleto carbônico olefínico em 1462 e 1376 cm⁻¹ (**Figura 50**) (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

No seu espectro de hidrogênio em CHCl₃ a 400 MHz (**Figuras 51 - 52**) apresentou um multiplete em δ 3,53 atribuídos aos hidrogênios carbinólicos H-3, um sinal largo em δ 5,35 atribuído aos hidrogênios olefínicos (H-6), um duplo duplete em δ 5,15 (J_{22-23} = 15,5 e J_{22-04} = 8,3 Hz) atribuído ao H-22; em um duplo simpleto em δ 5,01 (J_{23-22} = 15,5 e J_{23-24} = 8,3 Hz) atribuído ao H-23, os sinais em δ 5,01 e 5,15. Os sinais dos demais- metílicos, metilênicos e metínicos – aparecem em δ 0,7 a 2,3.

O espectro de RMN ¹³C obtido em CHCl₃ de DMM1 (**Figura 53 - 54**) 100MHz apresentaram deslocamento químicos em δ 140,94 e 121,85 típico de sistema olefínico entre C-5 e C-6, em δ 138,52 e 129,44, característico do sistema olefínico entre C-22 e C-23, e em δ 71,9 referente ao carbono carbinólico C-3 (**Tabela 6**).

A análise comparativa dos dados espectrais com aqueles relativos na literatura (GALOTTA, 2005) permitiu identificar a substância DMM1 como uma mistura de

fitosteróides conhecidos como sitosterol (estimasta-5-en-3 β -ol) e estigmasterol (5,22-estimastadien-3 β -ol) (**Figura 55**).

O espectro da substância DMM2 obtido na região de comprimento de onda do infravermelho apresentou bandas de estiramento para carbonila carboxílica (1692,82 cm⁻¹) e o grupo hidroxila (3442,69 cm⁻¹) (**Figura 56**) (MAHATO e KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

Na análise do espectro de RMN H¹ obtido em CDCl₃/MeOD 1:1 a 400 MHz da substância DMM2 (**Figuras 57 - 58**) foi observado 7 sinais na região mais blindada entre δ 0,78 e 1,17; todos simpletos atribuídos a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados, um sinal em δ 3,19 na forma de um duplo duplete (dd) com constante de acoplamento ($J= 7,20$ Hz e $J = 13,20$ Hz) característico de hidrogênio carbinólico H-3; um sinal em δ 5,26 na forma de tripleto (t) com $J= 3,55$ Hz, característico de hidrogênio olefínico H-12 (ARAÚJO e CHAVES, 2005). Foi identificado ainda dois sinais relativos a hidrogênio metínicos: δ 0,73 (d, $J=10,7$ Hz) e δ 2,85 (dd, $J=4,18$ Hz e $J=3,64$ Hz)

Analisando o espectro de ¹³C (**Figuras 59 - 60**) e subespectro de DEPTs 135° (**Figuras 61 - 62**) da substância DMM2 obtidos em CDCl₃/MeOD 1:1, apresentaram deslocamentos químicos em δ 123,14 e 144,66 indicam a existência na molécula de uma ligação dupla do tipo trissubstituída, relativos a carbonos olefínicos C-12 e C-13, além de sinais em 79,30 e 181,57 atribuídos aos carbonos carbinólico (C-3) e carboxílico (C-28) respectivamente.

O espectro de HSQC da substância DMM2 (**Figura 63**) confirmou as correlações do hidrogênio em δ 3,19 (H-3) com o carbono carbinólico em δ 79,30; do hidrogênio vinílico em δ 5,26 (H-12) com o carbono δ 123,14 (C-12) e dos hidrogênios metílicos (δ 0,78; δ 0,80; 0,91; 0,93; 0,94; 0,98; 1,17) com os seus respectivos carbonos (δ 16,09; 17,40; 33,43; 15,73; 23,87; 28,50; 26,32).

Pelo experimento de HMBC (**Figura 64**) foi possível observar a correlação em δ 90,30 (C-3) com os hidrogênios das duas metilas H₂₃ (δ 0,98) e H₂₄ (δ 0,78), as quais estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY) e com o C₄ (δ 39,43), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono C₄ (δ 40,40) e que este carbono está ligado ao C₃ (δ 90,30); o C₅ (δ 56,9) mostra correlações com os hidrogênios das metilas H₂₃ (δ 0,98), H₂₄ (δ 0,78), e H₂₅(δ 0,93). O C₁₃ (δ 144,66) está correlacionado com os hidrogênios do H₉ (δ 1,55), H₁₁ (δ 1,88) H₁₂ (δ 5,26), H₂₆ (δ 0,80) e H₂₇(δ 1,17).

Foram observadas no espectro de COSY (**Figura 65**) as correlações entre o hidrogênio carbinólico em δ 3,19 (H-3) com os hidrogênios em δ 1,03 (H-1); 1,61 (H-1); 1,57(H-2); 0,93 (H-23). O hidrogênio olefínico em 5,26 (H-12) está correlacionado com os hidrogênios em δ 1,55 (H-9); 1,88 (H-11); 2,85 (H-18); 1,69 (H-19). Os hidrogênios das duas metilas exibiram correlações em δ 0,98 (H-23) e δ 0,78 (H-24). Todas as correlações de HSQC, HMBC e COSY estão representadas na **Tabela 7**. Em adição aos dados espectroscópicos descritos na literatura, permitiram constatar que a substância é o ácido oleanólico (**Figura 66**).

A substância DMM3 apresentou no espectro obtido na região de comprimento de onda do infravermelho bandas de estiramento para carbonila carboxílica ($1690,79\text{ cm}^{-1}$) e para grupo hidroxila ($3434,39\text{ cm}^{-1}$) (**Figura 67**) (MAHATO e KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

Na análise do espectro de RMN ^1H obtido em $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1 substância DMM3 (**Figuras 68 – 69**), foram observados sinais característicos de hidrogênios metílicos entre δ 0,45 e 0,78; sendo 5 simpletos (s) atribuídos a hidrogênios de grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados e 2 dupletos (d) relativos a hidrogênios de metilas ligadas a carbonos monohidrogenados. Foi observado um sinal em δ 2,86 na forma de um duplo duplete (dd) com constantes de acoplamento (J) (5,38 Hz e 10,8 Hz), característico de hidrogênio carbinólico em triterpenos $3\beta\text{-OH}$; um sinal em δ 4,91 (1H, t, $J = 3,4\text{Hz}$) característico de hidrogênio olefínico H-12.

Esses dados em conjunto com a análise do espectro de RMN ^{13}C (**Figuras 70 - 71**) e subespectro de DEPTs 135° (**Figura 72**) da substância DMM3 obtidos em $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1 evidenciou uma molécula com um total de 30 átomos de carbonos: sendo 7 carbonos metílicos 9 carbonos metilênicos, 7 carbonos metínicos e 7 carbonos não hidrogenados (δ), sendo um deles um grupo carbonila, segundo o espectro ^{13}C por diferença de 135° . Foram identificados sinais em δ 78,32 e 180,38 atribuídos aos carbonos carbinólico (C-3) e carboxílico (C-28), e em adição aos dados espectroscópicos descritos na literatura, além dos sinais em δ 125,23 e δ 137,92 indicam a existência na molécula de uma ligação dupla do tipo trissubstituída, relativos a carbonos olefínicos C-12 e C-13.

O espectro de HSQC da substância DMM3 (**Figura 73**) confirmou as correlações do hidrogênio em δ 2,86(H-3) com o carbono carbinólico em δ 78,32; o hidrogênio vinílico em δ 4,91t(H-12) com o carbono δ 125,23 (C-12) e dos hidrogênios metílicos ligados a carbono quaternário (δ 0,45; 0,53; 0,62; 0,65; 0,78) com os seus respectivos carbonos (δ 15,15; 16,45; 14,91; 23,06) e dos hidrogênios metílicos (δ 0,55; $J = 7,3\text{ Hz}$ e δ 0,64; $J = 7,7\text{ Hz}$) ligados a carbono monohidrogenado (δ 16,52; 20,56).

Pelo experimento de HMBC (**Figura 74**) foi possível observar a correlação em do carbono em δ 78,32 (C-3) com os hidrogênios das duas metilas do H₂₃ (δ 0,65) e H₂₄ (δ 0,45), as quais estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY) e com o C₄ (δ 38,30), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono. O C₅ (δ 55,03) mostra correlações com os hidrogênios das metilas H₂₃ (δ 0,65) e H₂₄ (δ 0,45). O C₈ (δ 39,16) mostra correlações com os hidrogênios em H₉ (δ 1,20), H₂₆ (δ 0,53) e H₂₇ (δ 0,78). O C₁₃ (δ 137,92) está correlacionado com os hidrogênios do H₁₅ (1,58; 1,65), H₁₈ (δ 1,87), e H₂₇ (δ 0,78). Foram observadas ainda a correlação da metila em H₂₃ (δ 0,65) com os hidrogênios da metila em H₂₄ (δ 0,45). O carbono em C₂₈ (δ 180,32) com hidrogênios do H₁₆ (δ 1,32; 1,69).

Foram observadas no espectro de COSY (**Figura 75**) as correlações entre o hidrogênio carbinólico em δ 2,86 (H-3) com os hidrogênios em δ 1,34 (H-1); 1,32 (H-2); 1,25 (H-2). O hidrogênio olefínico em 4,91 (H-12) e está correlacionado com os hidrogenios em δ 1,58 (H-15); 1,65(H-15); 1,87 (H-18). Os hidrogênios das duas metilas exibiram correlações em δ 0,65(H-23) e δ 0,45 (H-24). Todas as correlações de HSQC, HMBC e COSY estão representadas na **Tabela 8**. Em adição aos dados espectroscópicos descritos na literatura, permitiram constatar que a substância é o ácido ursólico (**Figura 76**).

CONCLUSÃO

O estudo químico da casca do caule de *D. morotoni* permitiu o isolamento de: DMCC1 uma saponina triterpênica (ácido 3-O- β -D- xilopiranosil (1 \rightarrow 3) β - glicopiranosil-oleano-12-en-28-oico), DMCC2 (mistura de β -sitosterol glicosilado e estigmasterol glicosilado) e DMCC3 uma saponina triterpênica (ácido 3-O- β -D- glicopiranosil (1 \rightarrow 2) β - arabinopiranosil (4 \rightarrow 1) β -glicopiranosil- oleano-12-en-28 oico). Os compostos isolados da madeira: DMM1 (mistura de sitosterol e estigmasterol), DMM2 (ácido oleanólico) e DMM3 (ácido ursólico).

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. S., CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 996-999, 2005.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa, Ed. UFV, 2007, 189 p.
- BORGES, Endler Marcel. **Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae – Eupatorieae)**. Ribeirão Preto, 2006. 98p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade de São Paulo.

CARNEIRO, M. R. B. **A flora medicinal no centro oeste do Brasil: um estudo de caso com abordagem etnobotânica em campo limpo de Goiás**. Anápolis, 2009. Dissertação de (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente do Centro Universitário de Anápolis, UniEVANGÉLICA.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, v. 1,3,5, 1978.

DUBOIS, J. A. Recursos genéticos florestais: espécies nativas da Amazônia. **Boletim FBCN**, Rio de Janeiro, v. 21, p.45-71, 1986.

FILIPPS, R.; MAINA, S. L.; CREPIN, J. **Medicinal Plants of the Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana)**. Department of Botany National Museum of Natural History, Smithsonian Institution Washington, 2004.

FRODIN, D. G. Araliaceae. In: SMITH, N. *et al.*, (Ed). **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2004. p. 28-31.

FRODIN, D.G., GOVAERTS, R. World checklist and bibliography of Araliaceae. **The Royal Botanic Gardens**, p.444, 2003.

FRODIN, D.G. **Neotropical Montane Araliaceae: an overview**. *In Biodiversity and conservation of Neotropical Montane Forests* (S.P. Churchill, H. Baslev, E. Forero & J.L. Luteyn, eds.). New York Botanical Garden, New York, p.421-430, 1995.

HUANG, H. *et al.* Triterpenoidal saponinas 364 from *Hydrocotyle sibthorpioides*. **Phytochem**, v. 69, p.1597–1603, 2008.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

LU, J. *et al.* **Biochem. Pharmacol**, v. 74, p. 1078, 2007.

MAHATO, S. B., KUNDU, A. P. ¹³C RMN spectra of pentacyclic triterpenoids a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

PLUNKETT, G. M., WEN, J., LOWRY II, P. P. Intrafamilial classifications and characters in Araliaceae: Insights from the phylogenetic analysis of nuclear (ITS) and plastid (*trnL-trnF*) sequence data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 245, p.1-39. 2004.

SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. **Planta Med**. v. 63, p. 487, 1997.

SILVERSTEIN, R. M. *et al.* **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Trad. de Ricardo Bicca de Alencastro. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 1994.

SOMOVA, L. I., SHODE, F. O., RAMNANAN, P., NADAR, A. Anthypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activities of triterpenoids isolated from *Olea cupaea* subspecies of *Africana* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 84, p. 299-305, 2003.

SÜLEYMAN, H., MSHVILDADZE, V., GEPIREMEN, A., ELIAS, R. Acute and chronic anti-inflammatory prolife of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats. **Phytomedicine**, v.10, p. 370-374, 2003.

WANG, H., NG, T. B. Natural products whit hypoglycemic, hipotensive, hypocholesterolemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities. **Life Sciences**, v.65, p. 2663-2677, 1999.

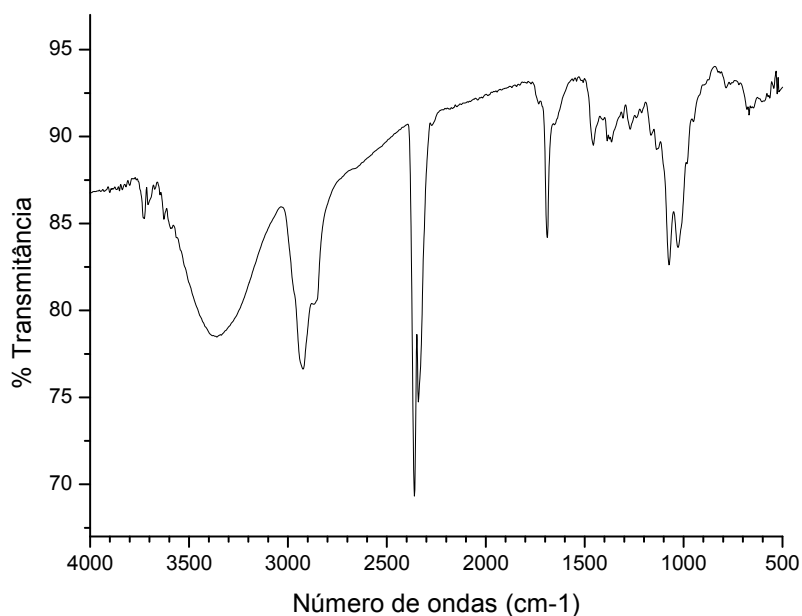


Figura 24. Espectro na região do infravermelho da substância codificada DMCC1 obtido através da técnica de ATR.

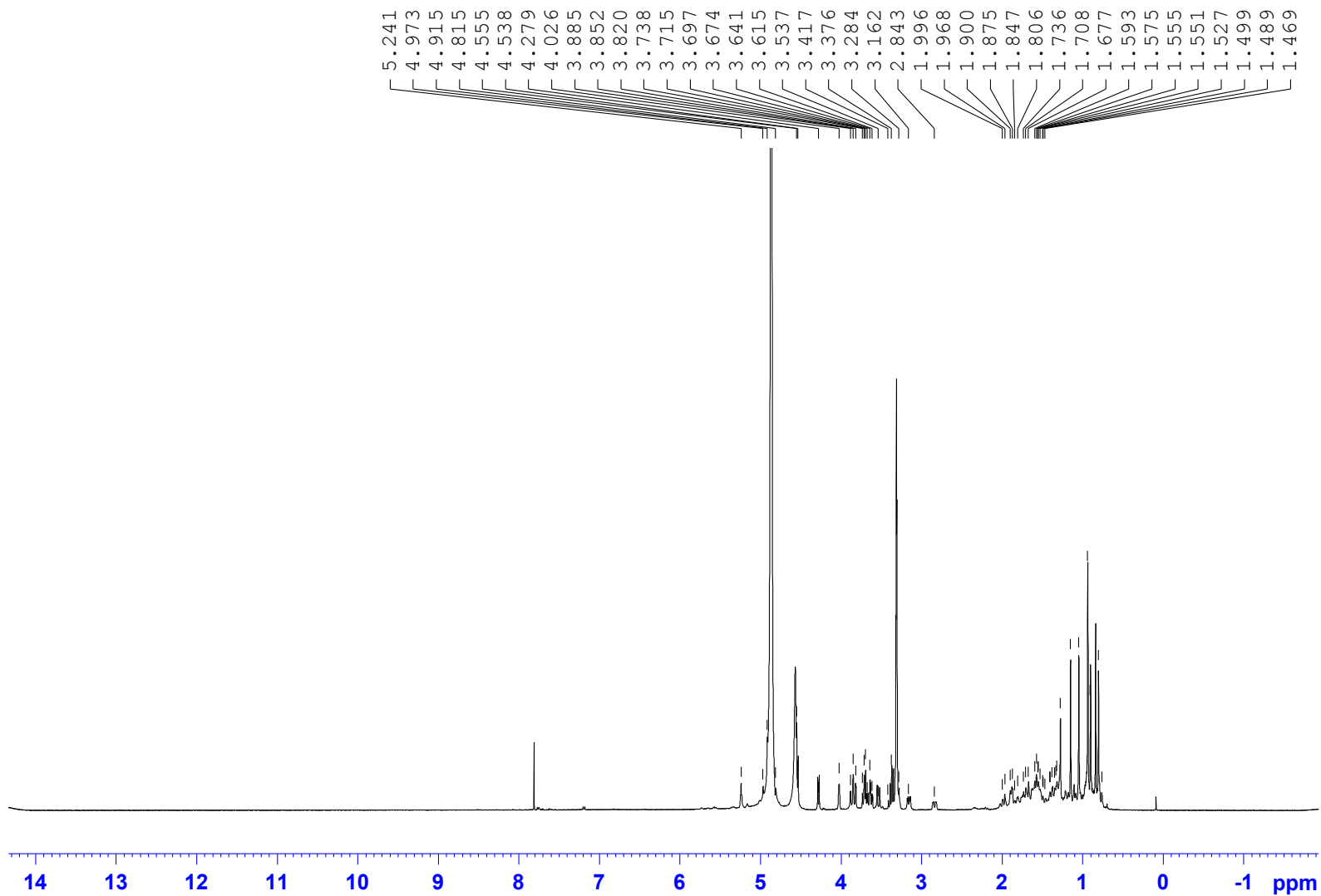


Figura 25. Espectro de RMN ^1H da DMCC1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

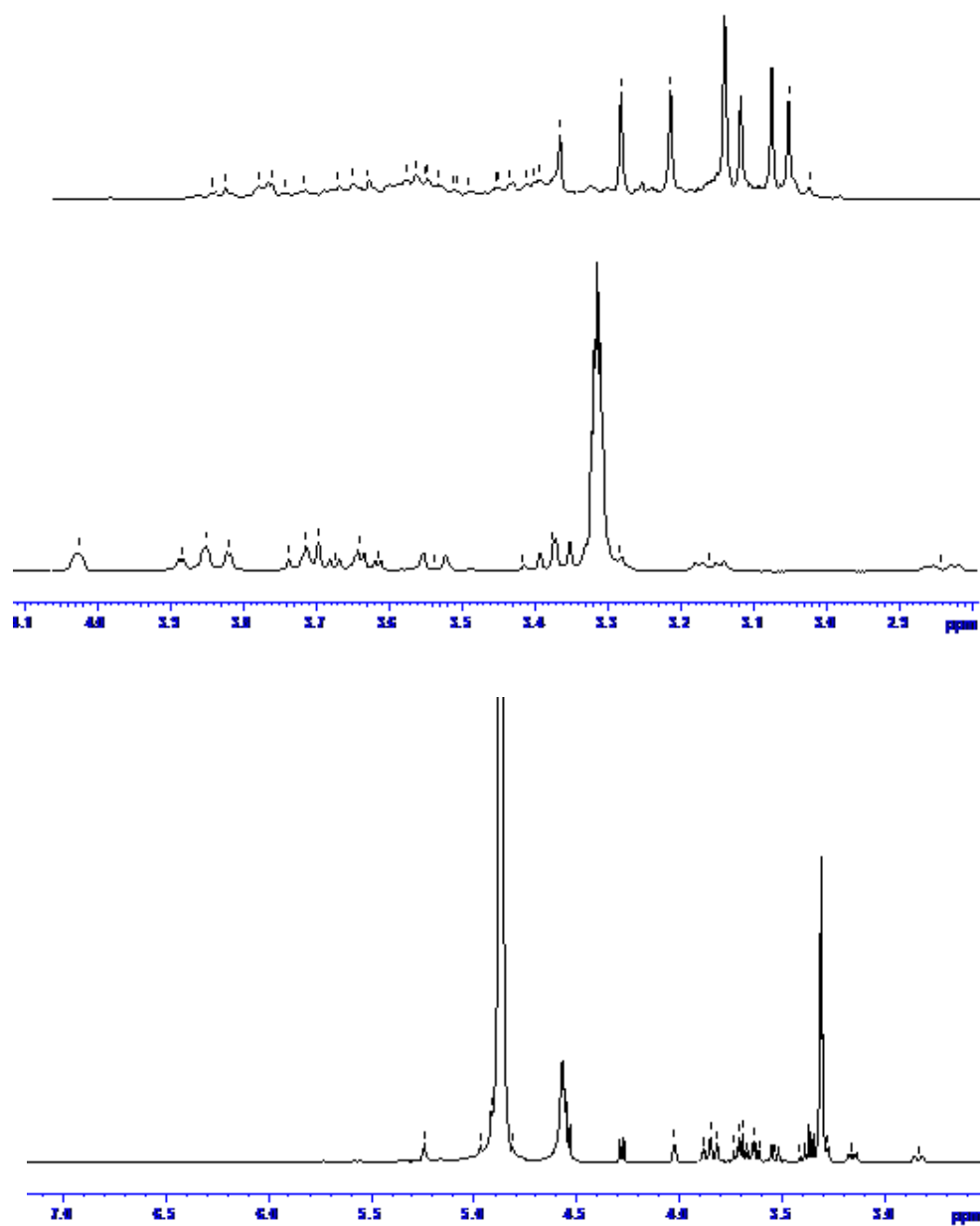


Figura 26. Espectro de RMN ^1H da DMCC1 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

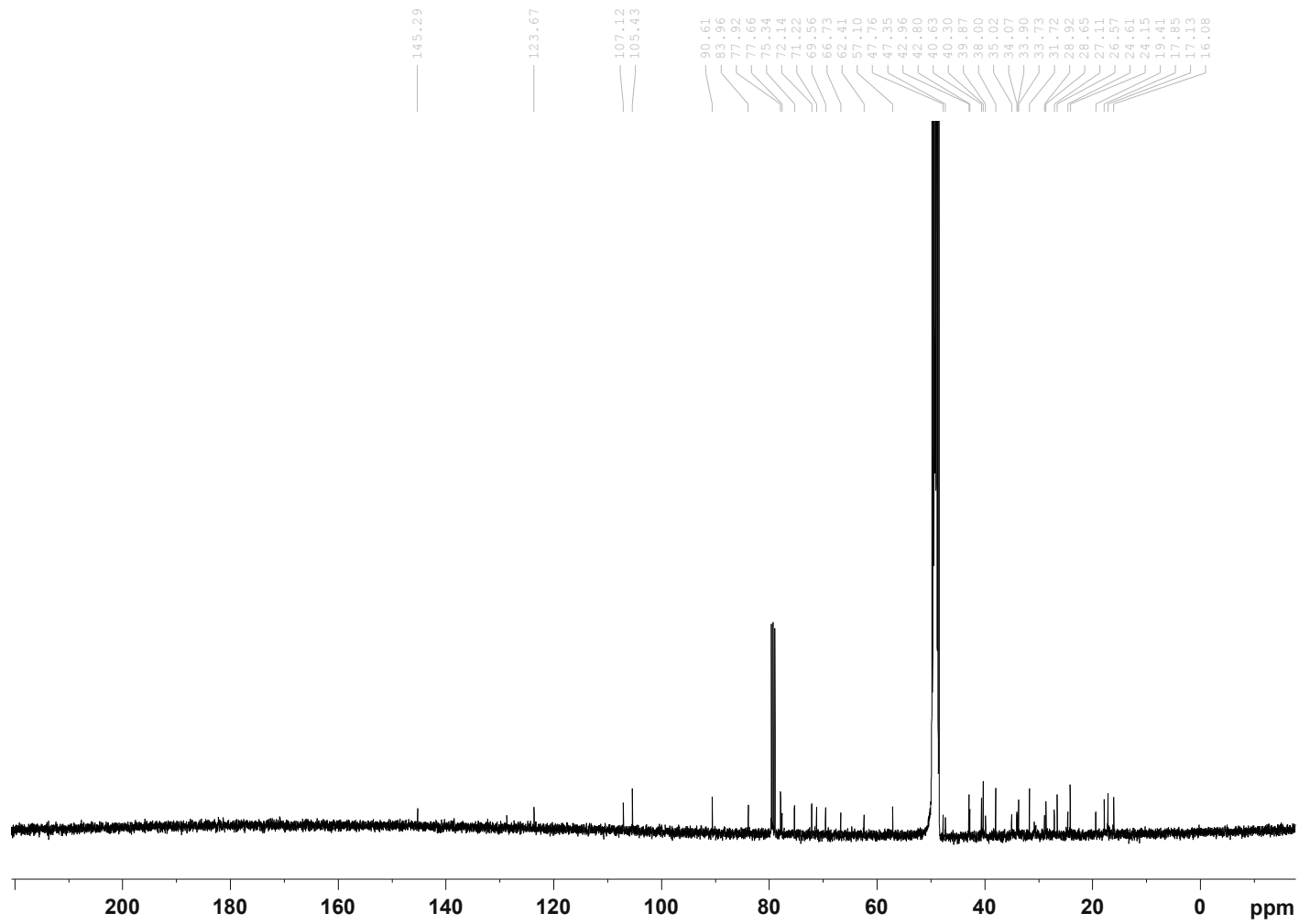


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C da DMCC1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

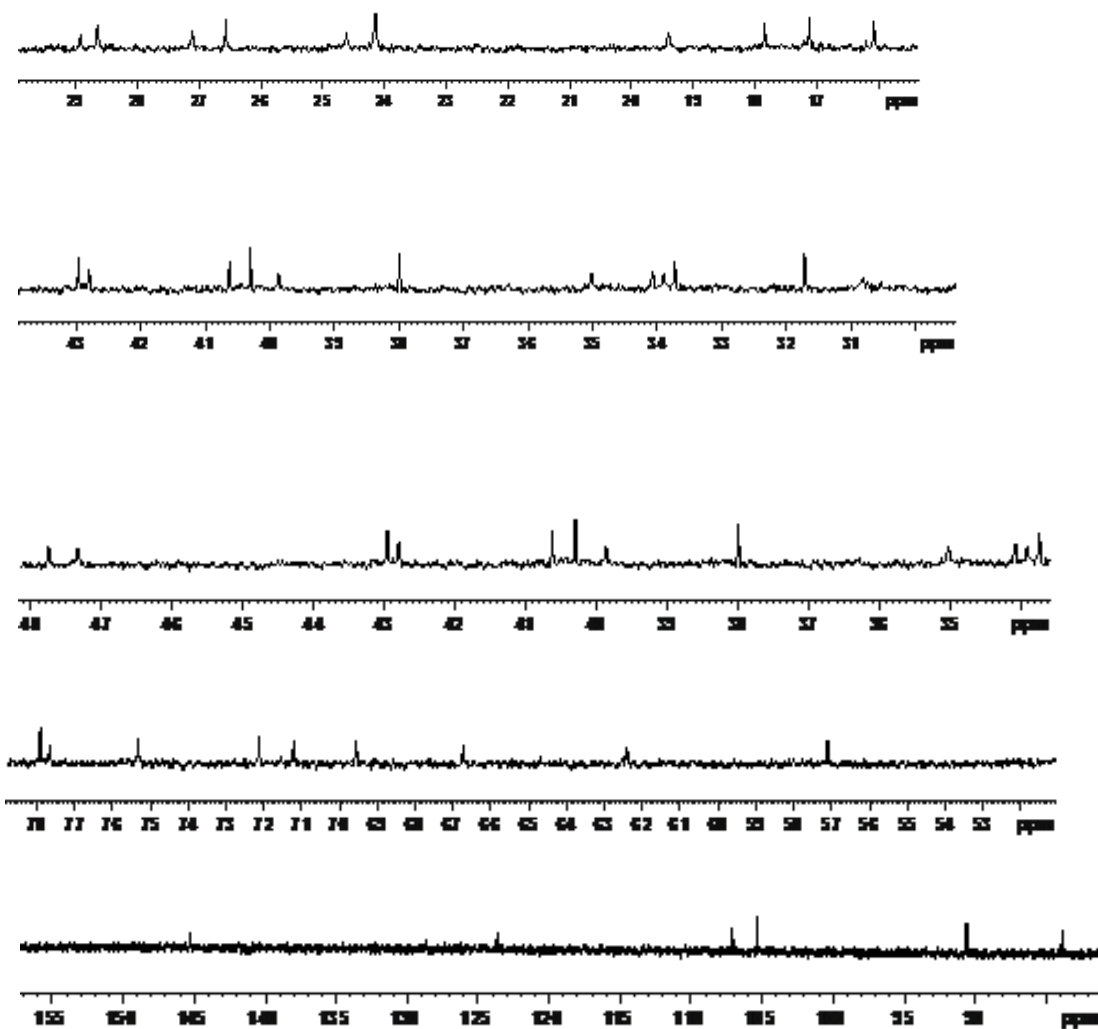


Figura 28. Espectro de RMN ^{13}C da DMCC1 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

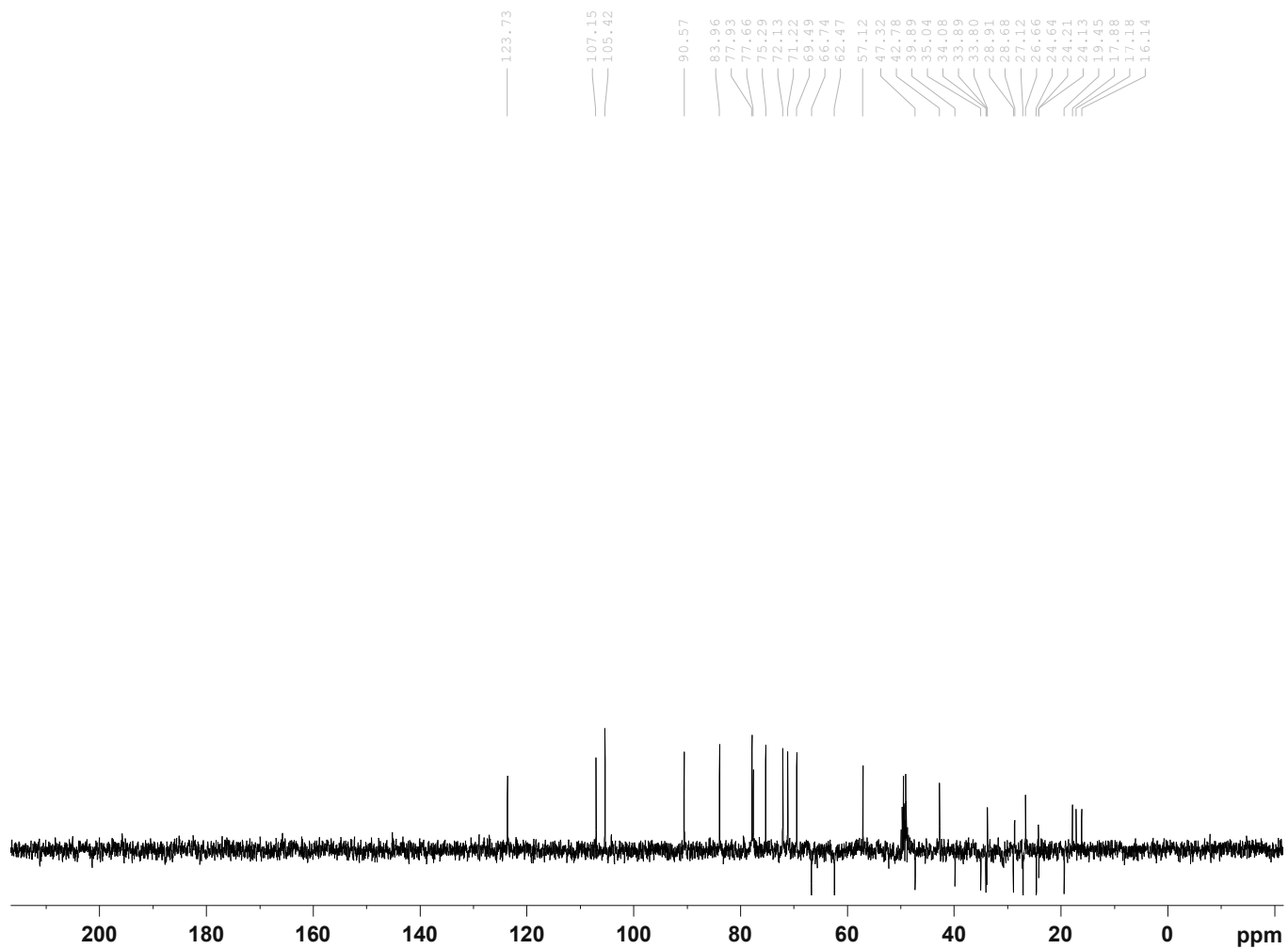


Figura 29. Espectro de DEPT 135 da DMCC1, Solvente CDCl₃/MeOD 1:2.

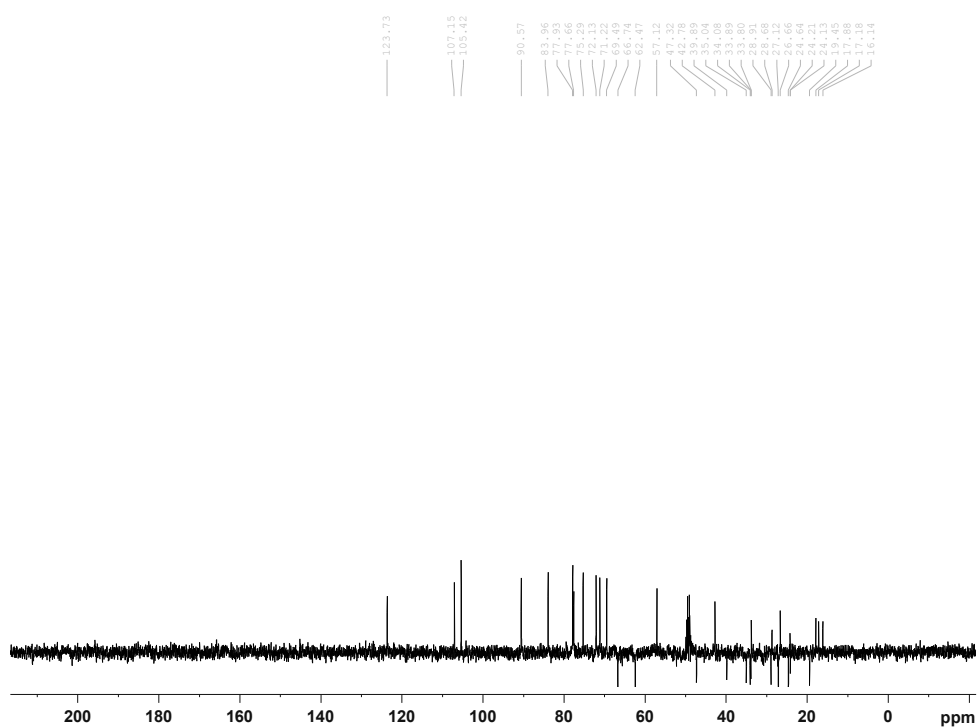
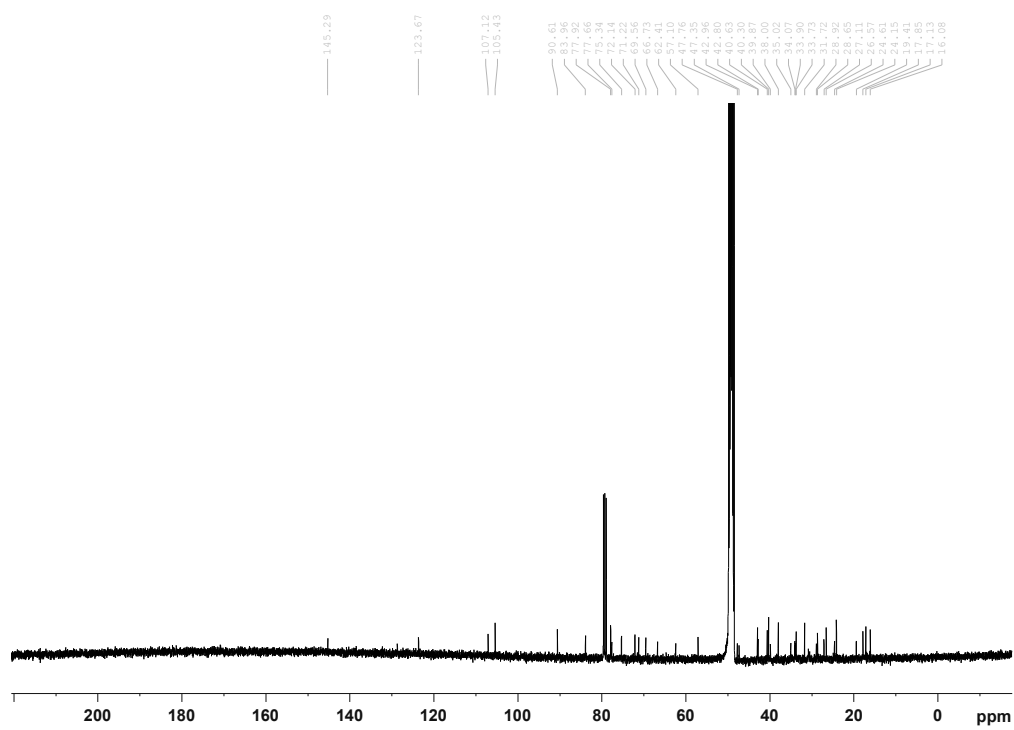


Figura 30. Espectro de ^{13}C e DEPT 135 da DMCC1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

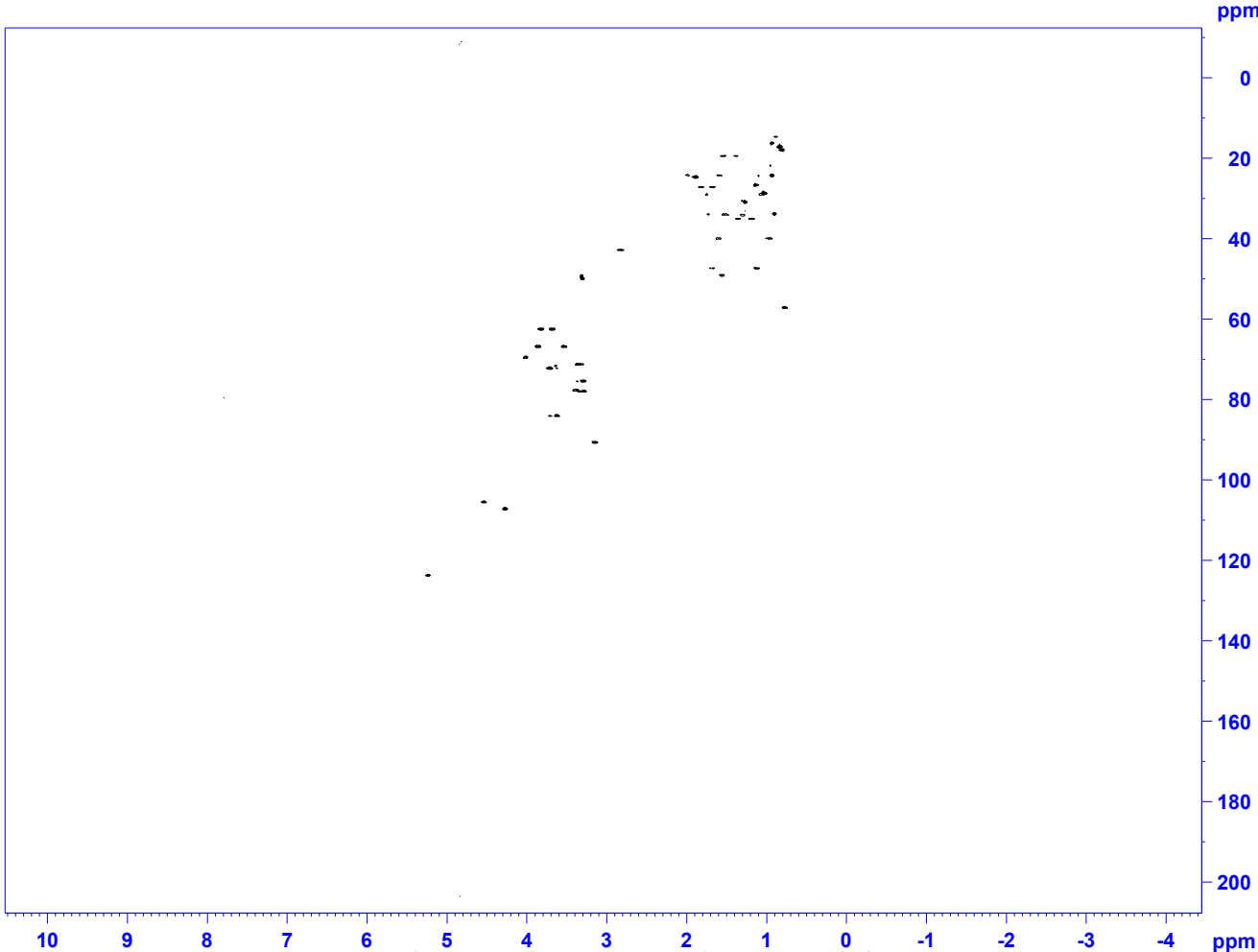


Figura 31. Espectro de HSQC da DMCC1, Solvente CDCl₃/MeOD 1:2.

1

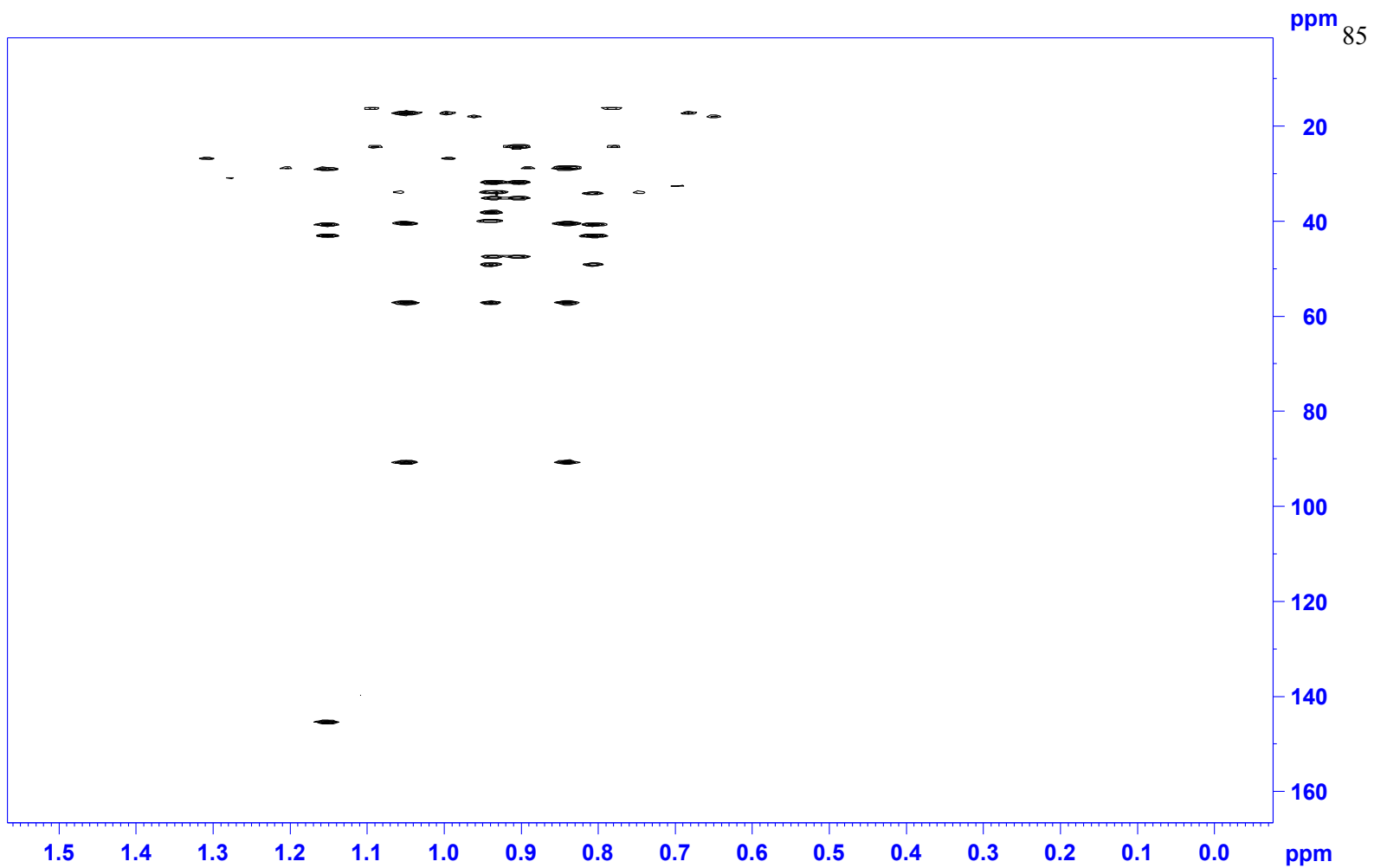


Figura 32. Espectro de HMBC da DMCC1, Solvente CDCl₃/MeOD 1:2.

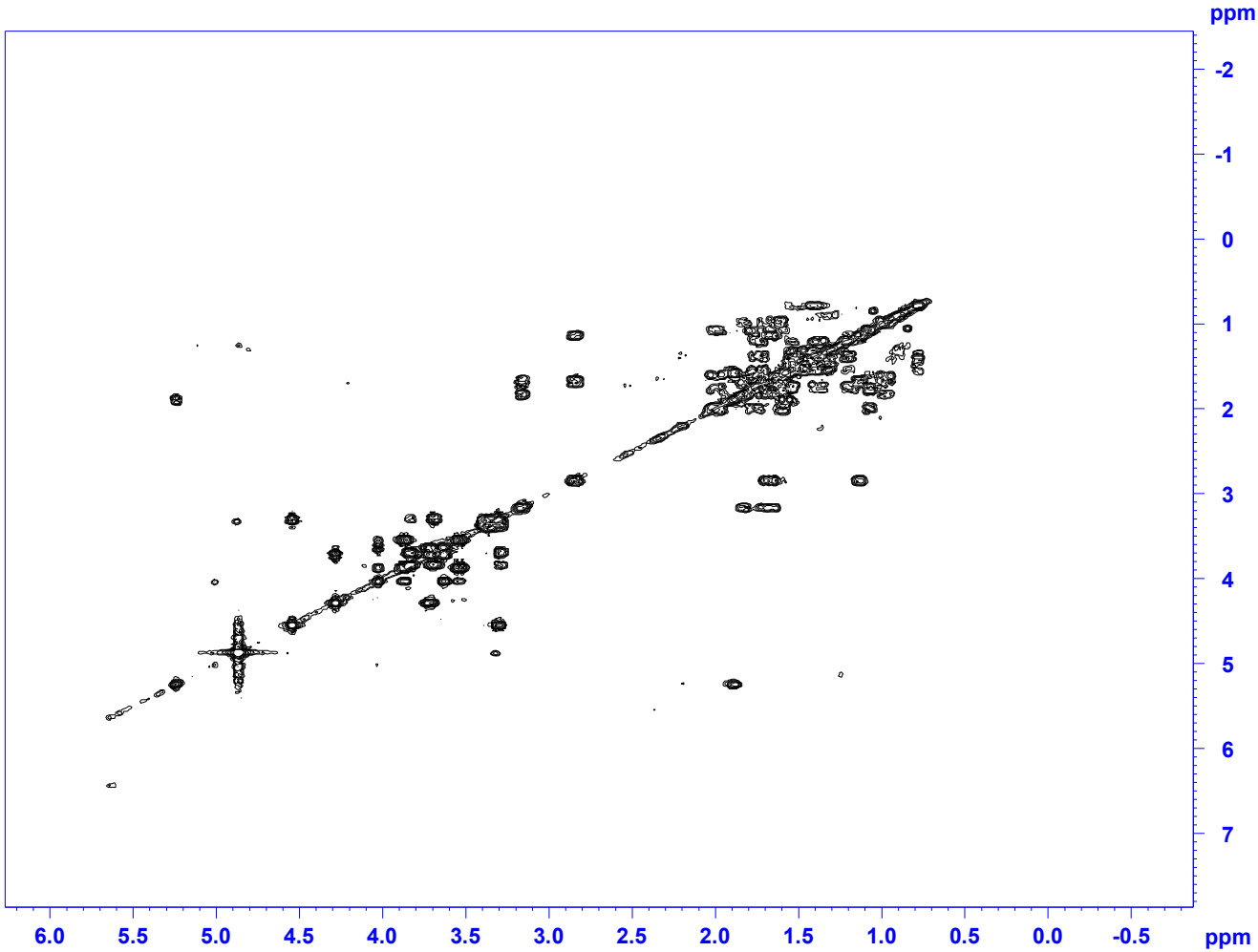


Figura 33. Espectro de COSY da DMCC1, Solvente CDCl₃/MeOD 1:

Tabela 3. Dados de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC para substância DMCC1. Valores de deslocamento químico em ppm, solvente $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2.

	C^{13}		H^1	HMBC	COSY
	Carbono	δC^{13}	δH^1	δH^1	δH
1	CH_2	39,86	0,95; 1,59	0,93 (H-25)	1,67 (H-2): [3,16 (H-3)]
2	CH_2	27,11	1,67; 1,08	-	
3	CH	90,61	3,16 (dd, $J=11,67$ e 4,39Hz)	0,84 (H-24); 1,05 (H-23); 4,29 (H- 1')	3,16 (H-3): [1,67 (H-2)]
4	C	40,30	-	0,84 (H-24); 1,05 (H-23)	
5	CH	57,10	0,77	0,84 (H-24); 0,93 (H-25); 1,05 (H- 23)	0,77(H-5): 1,37 (H-6)]
6	CH_2	19,40	1,37; 1,52	-	1,37 (H-6) [0,77(H-5)]
7	CH_2	34,07	1,29	0,80(H-26);	
8	C	40,62	-	0,80(H-26); 1,15 (H-27)	
9	CH	48,93	1,53	0,80(H-26); 1,15 (H-27)	
10	C	37,90	-	0,77 (H-5); 0,93 (H-25); 1,59 (H- 1)	
11	CH_2	24,61	1,89	-	
12	CH	123,67	5,24 (d, $J=7,30$)	-	5,24 (H-12): [1,89 (H-11)]
13	C	145,29	-	1,15(H-27)	
14	C	42,96	-	0,80(H-26); 1,15 (H-27)	
15	CH_2	24,14	1,09; 1,59	-	
16	CH_2	28,92	1,04; 1,74	1,15(H-27)	
17	C	47,16	-	0,90 (H-29); 0,93 (H-30)	
18	CH	42,80	2,84 (dd, $J=13,66$ e 4,55Hz)	0,80(H-26); 1,15 (H-27)	2,84 (18) : [1,67 (H-19)]
19	CH_2	47,34	1,18; 1,67	0,90 (H-29); 0,93 (H-30)	
20	C	31,71	-	0,90 (H-29); 0,93 (H-30)	
21	CH_2	35,05	1,15; 1,34	0,90 (H-29); 0,93 (H-30)	
22	CH_2	33,90	1,52; 1,70	0,93 (H-30)	
23	CH_3	28,67	1,05	0,84 (H-24)	

24	CH ₃	17,12	0,84	1,05 (H-23)	
25	CH ₃	16,08	0,93	0,77 (H-5)	
26	CH ₃	17,85	0,80	0,94 (H-25)	
27	CH ₃	26,59	1,15		
28	C	-	-		
29	CH ₃	33,73	0,90	0,93 (H-30)	
30	CH ₃	24,27	0,93	0,90 (H-29)	
1'	CH	107,11	4,28	3,53 (H-5'); 3,70 (H-2'); 3,50 (H-5')	4,28 (H-1'): [4,01 (H-4')]
2'	CH	72,13	3,70	3,62 (H-3')	
3'	CH	83,96	3,62	3,70 (H-2'); 4,53 (H-1'')	
4'	CH	69,56	4,01	3,62 (H-3')	4,01 (H-4') : [3,85 (H-5a')]
5'	CH ₂	66,73	3,85 e 3,53	-	3,85 (H-5a') : [3,53 (H-5'b); 4,01 (H-4')]
1''	CH	105,42	4,53	-	3,53: (H-5'b) : [3,85 (H-5a') ; 4,01 (H-4')]
					4,53 (H-1'') : [3,28 (H-3''); 3,29 (H-3'')]
2''	CH	75,34	3,29	-	-
3''	CH	77,91	3,28	3,35 (H-5'')	-
4''	CH	71,21-	3,63	-	-
5''	CH	77,66	3,35	-	-
6''	CH ₂	62,41	3,80 e 3,67	-	3,67 (H-6''); [3,28 (H-3'')]

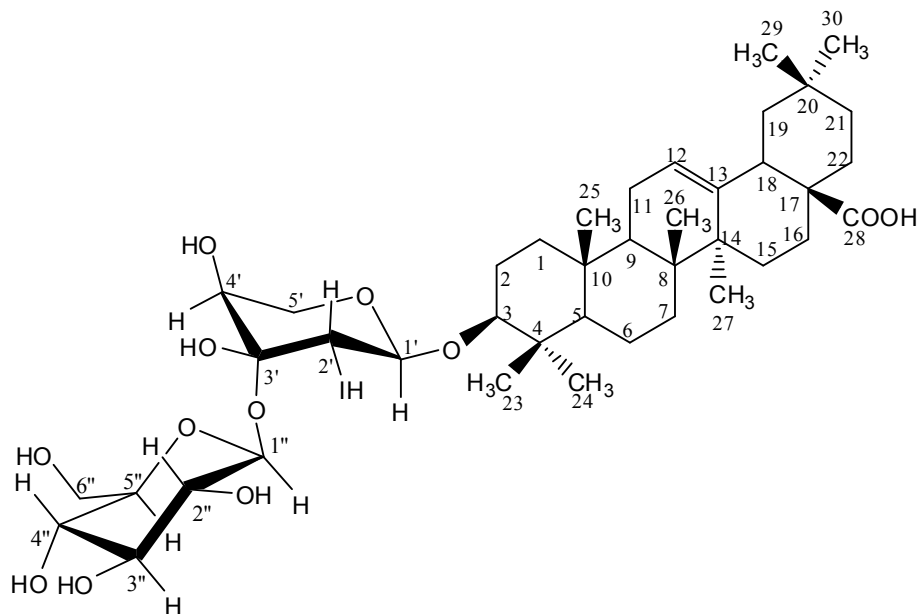


Figura 34. Estrutura química do triterpene DMCC1 do tipo oleano isolado de *D. morototoni*.

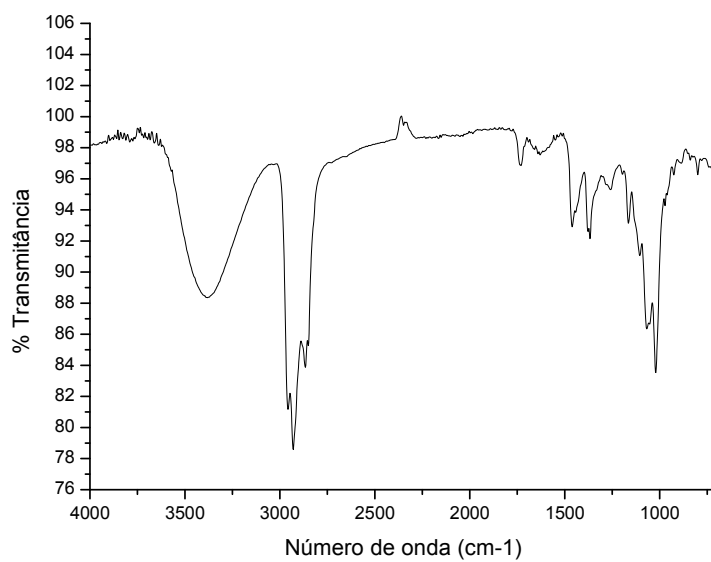


Figura 35. Espectro na região do infravermelho das substâncias DMCC2 obtido através da técnica de ATR.

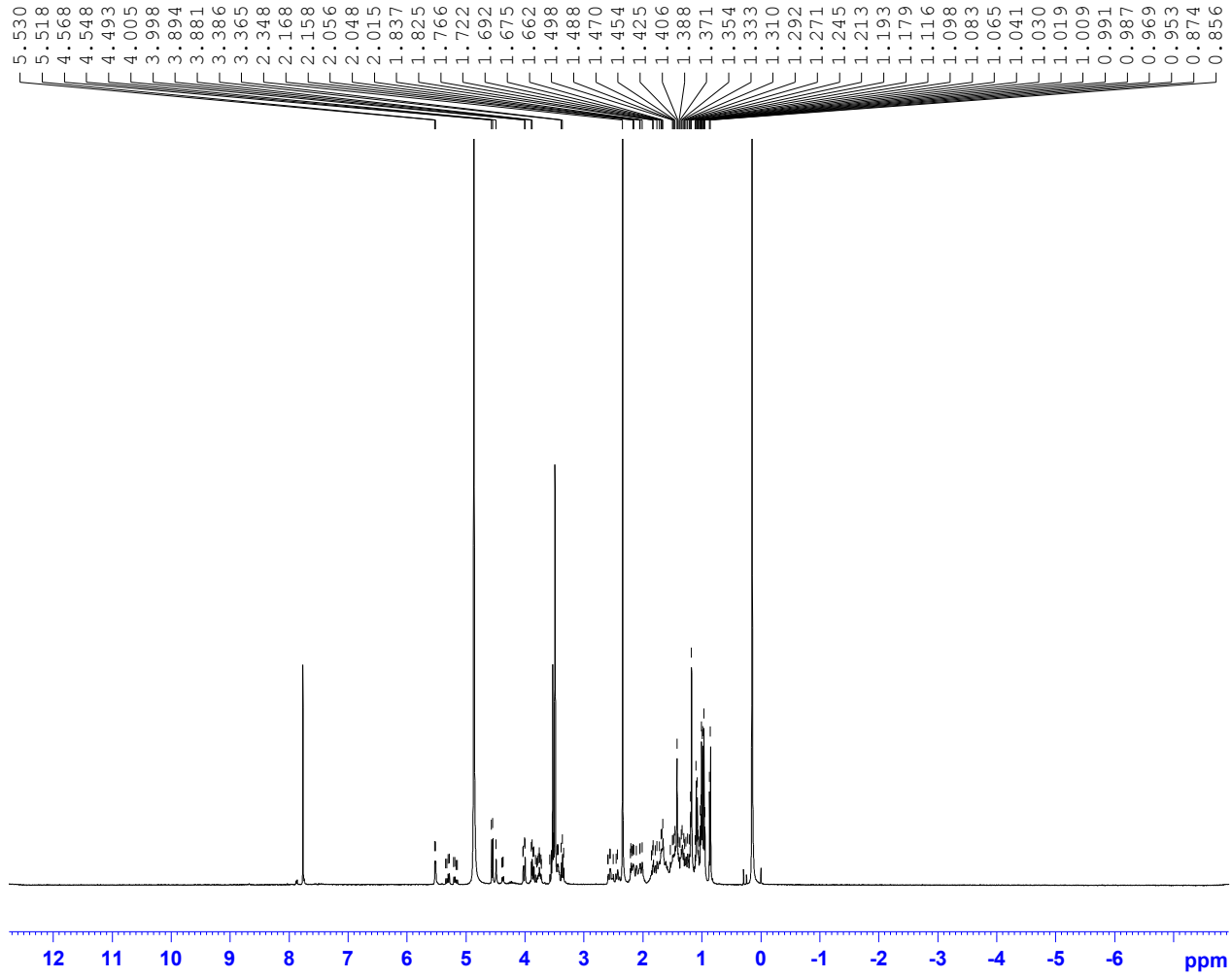


Figura36. Espectro de RMN ¹H da DMCC2, Solvente CDCl₃.

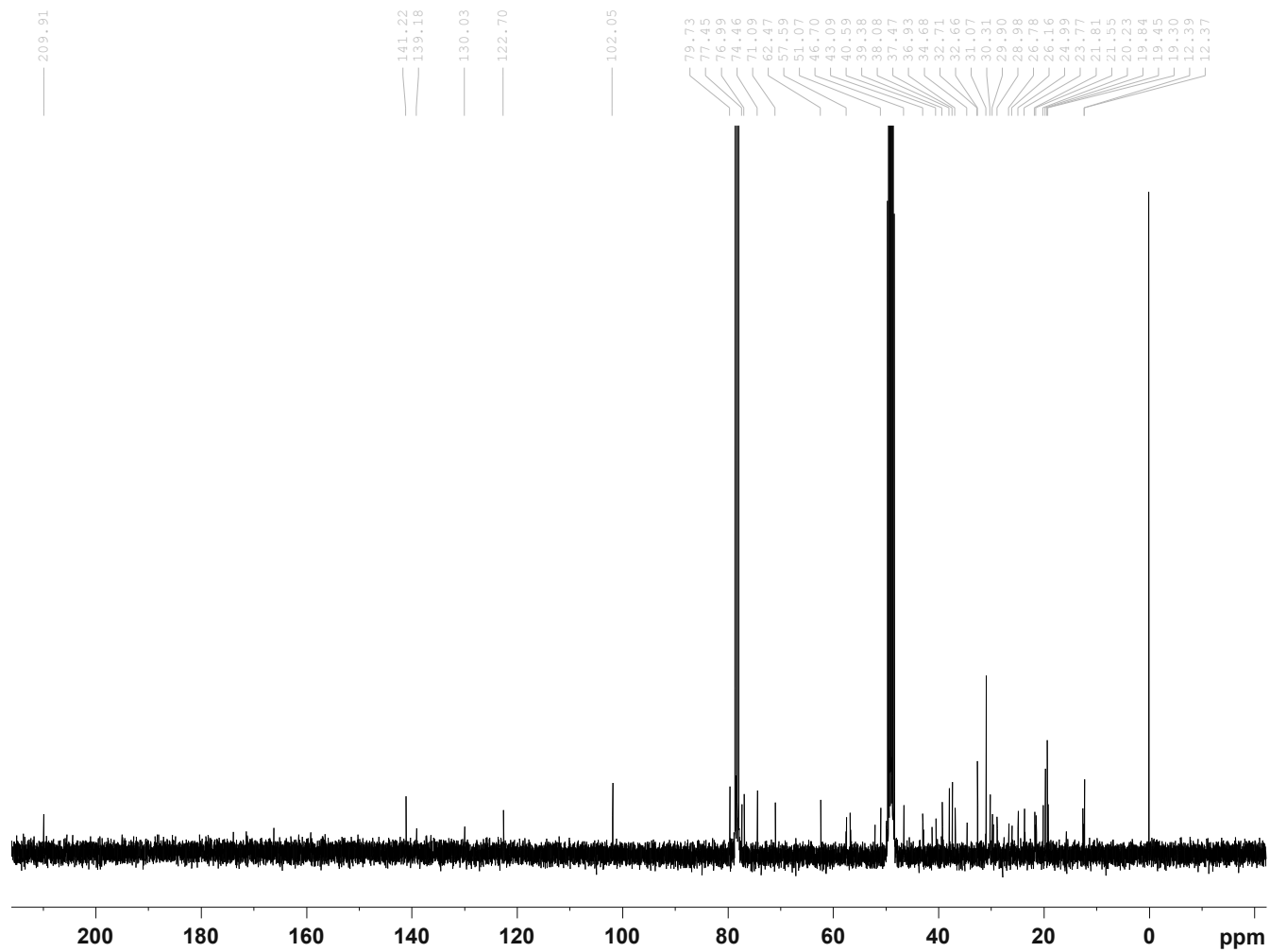


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C da DMCC2, Solvente CDCl_3 .

Tabela 4. Resultados experimentais de RMN (^{13}C : 100 MHz, ^1H : 400 MHz CDCl_3) das substâncias DMCC2a e DMCC2b comparados com a literatura (BORGES, 2006).

C	Experimental CDCl_3		Literatura CDCl_3			
	DMCC2a δC	DMCC2a δH	DMCC2b δC	DMCC2b δH	β -Sitosterol δC	Estigmasterol Δc
1	38,10		38,10		37,2	37,2
2	31,08		31,08		31,6	31,6
3	79	3,74m	79	3,74m	71,8	71,8
4	41,37		41,37		42,3	42,3
5	141,21		141,21		140,7	140,7
6	123	5,52 d $J = 5,13$	123	5,52 d $J = 5,13$	121,7	121,7
7	31,08		31,08		31,9	31,9
8	30,31		30,31		31,9	31,9
9	50		50		50,1	50,1
10	36,92		36,92		36,6	36,6
11	21,57		21,57		21,1	21,1
12	40,55		40,55		39,9	39,7
13	41,33		41,33		42,3	42,2
14	56,96		56,96		56,6	56,6
15	24,99		24,71		24,3	24,4
16	29,71		29,08		28,8	28,9
17	56,85		56,85		56,0	55,9
18	12,36	0,87 s	12,36	0,87 s	11,9	12,0
19	19,54	0,96 s	19,54	0,96 s	19,4	19,4
20	37,02		37,02		36,1	30,5
21	19,29	1,08 s	19,29	1,08	18,8	21,2
22	34,71		139,53	5,33 (dd $J = 8,72$ e 16,5 Hz)	33,9	138,3
23	26,15		130,13	5,15 dd $J = 8,55$ e 16,1 Hz)	26,6	129,2
24	46,078		51,16		45,5	51,2
25	29,33		32,09		29,1	31,9
26	19,94	1,17 d	21,72	1,18d	19,9	21,1
27	20,33	0,99 sl	20,33	0,99 sl	19,0	19,0
28	23,77		25,07		23,0	25,4
29	12,39	0,85 sl	12,39	0,85 sl	12,0	12,3
1'	102,01	4,55 (d, $J = 7,86$ Hz)				
2'	74,50	3,36				
3'	77,50	3,53				
4'	71,17	3,46				
5'	77,08	3,42				
6'	62,48	3,86; 4,01				

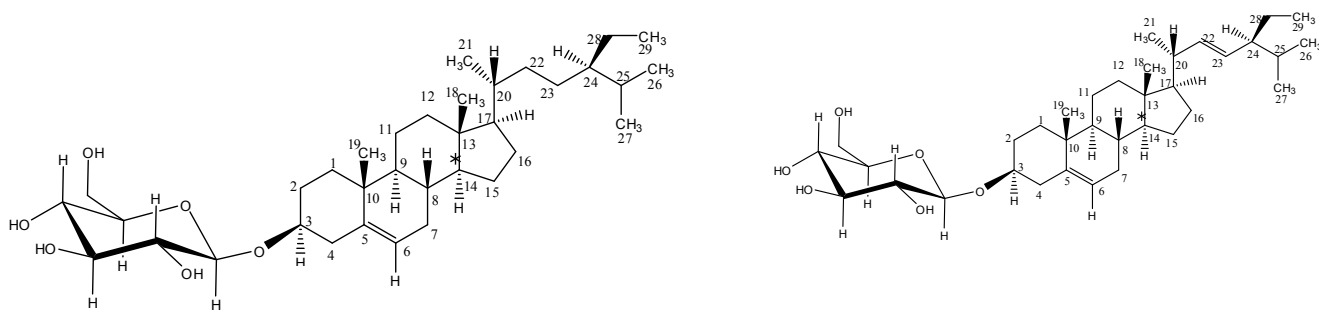


Figura 38. Estrutura das substâncias DMCC2a e DMCC2b isoladas da casca do caule de *D. morototi*.

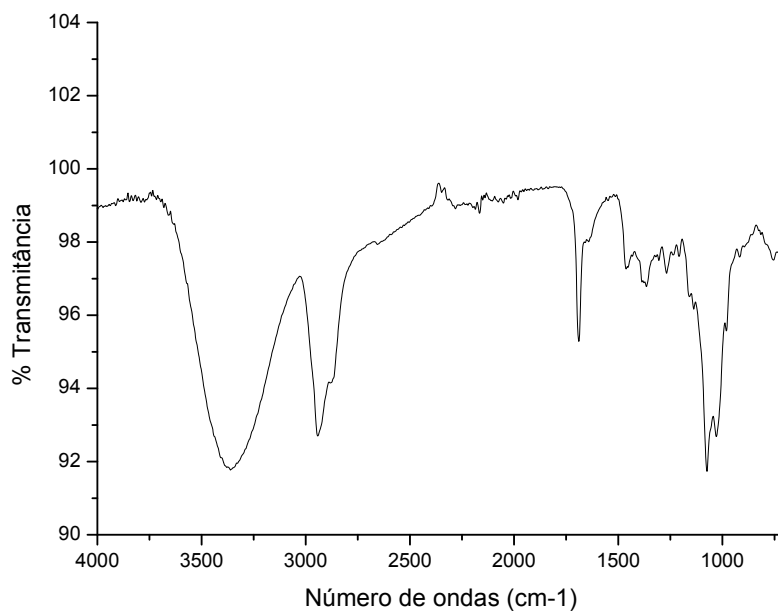


Figura 39. Espectro na região do infravermelho da substância DMCC3.

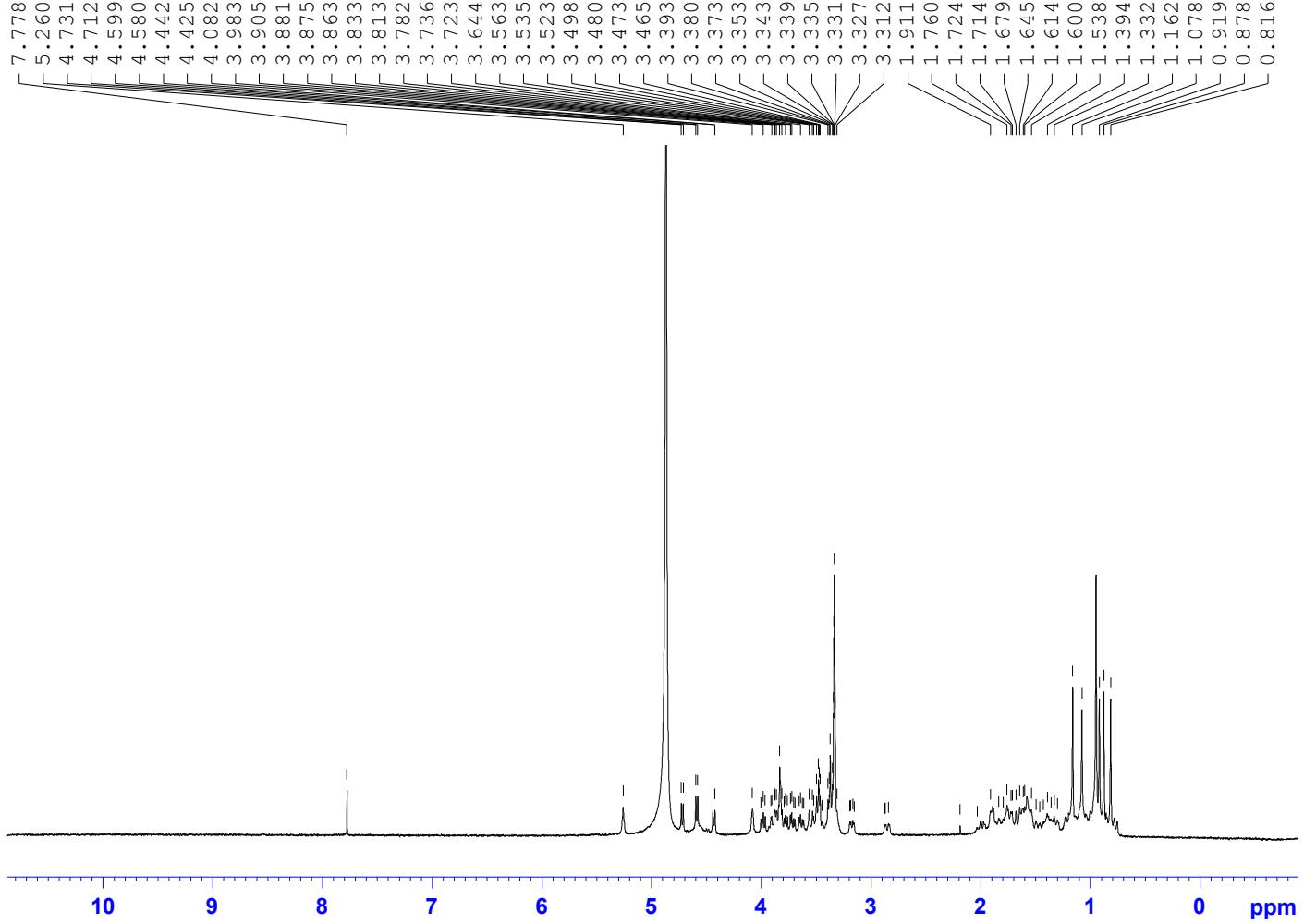


Figura 40. Espectro de RMN ¹H da DMCC3, Solvente CDCl₃/MeOD 1:2.

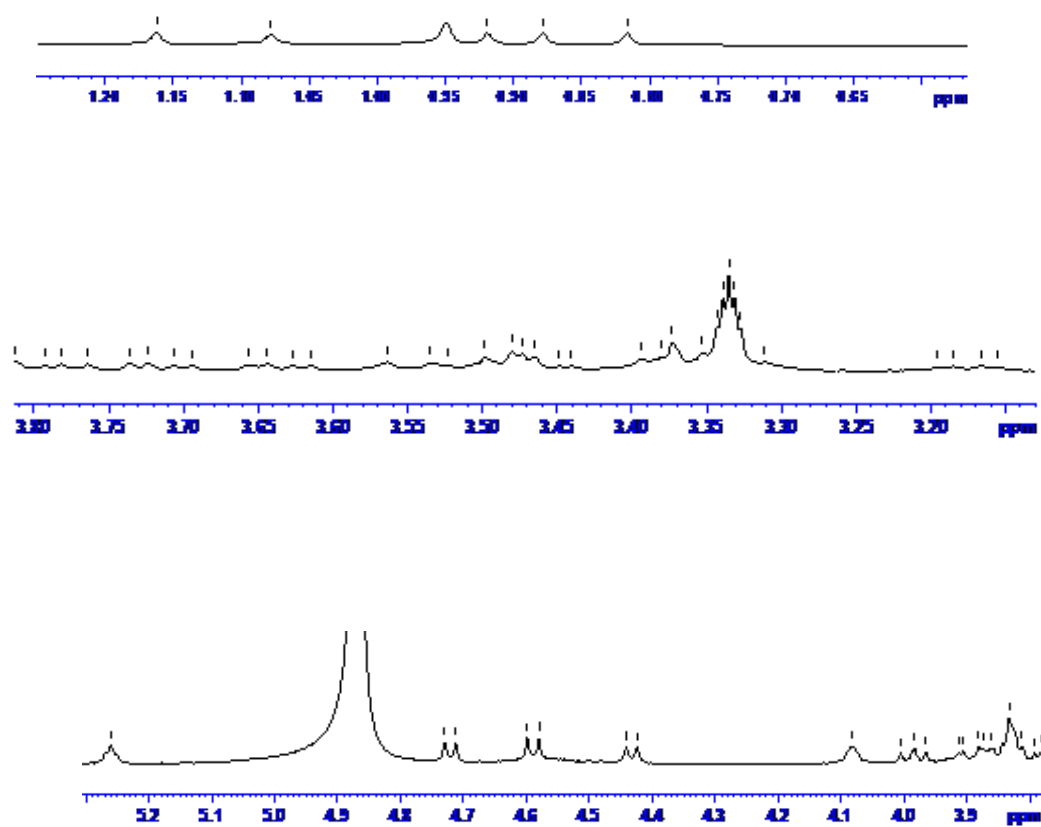


Figura 41. Espectro de RMN ^1H da DMCC3 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

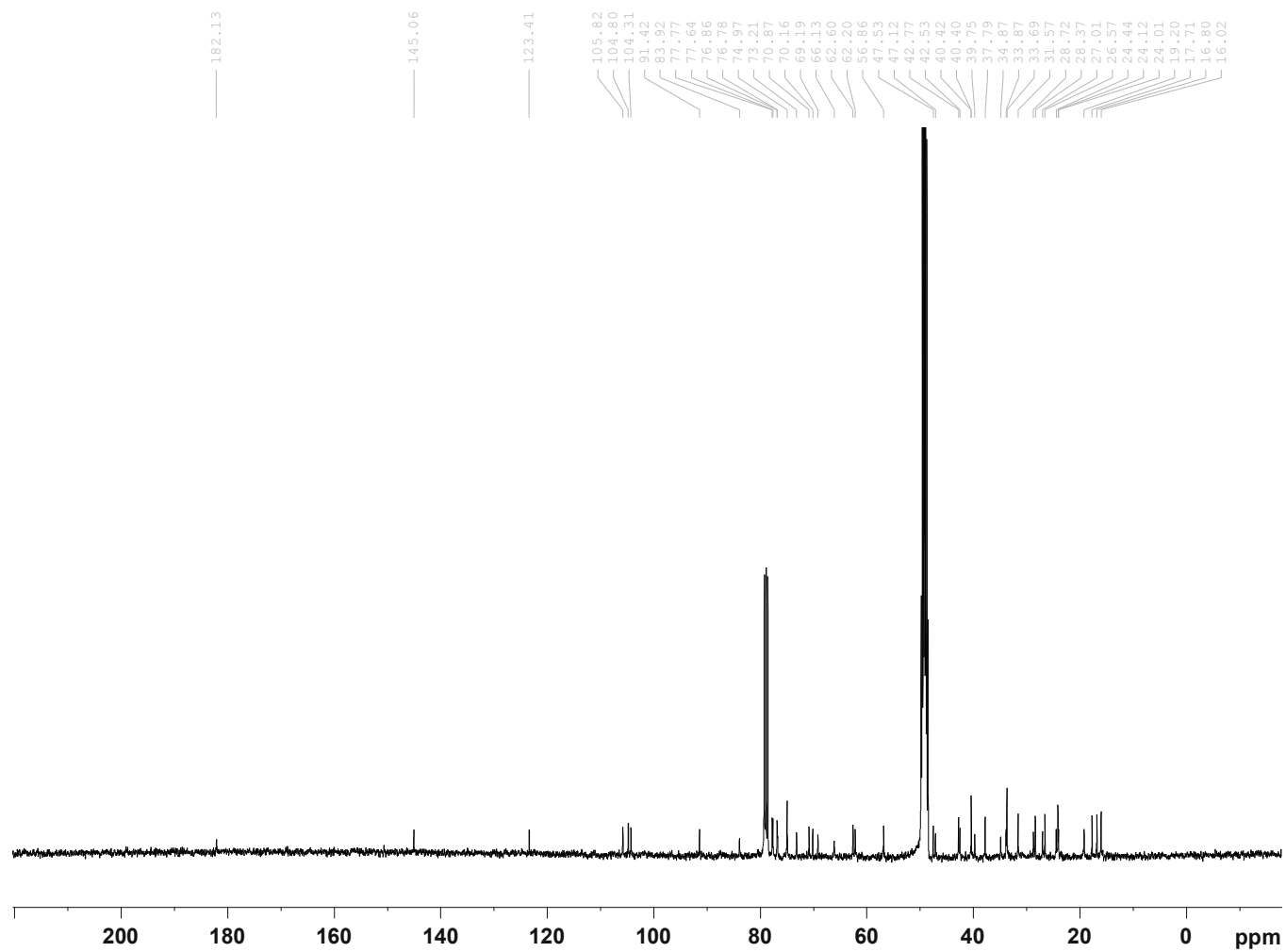


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C da DMCC3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

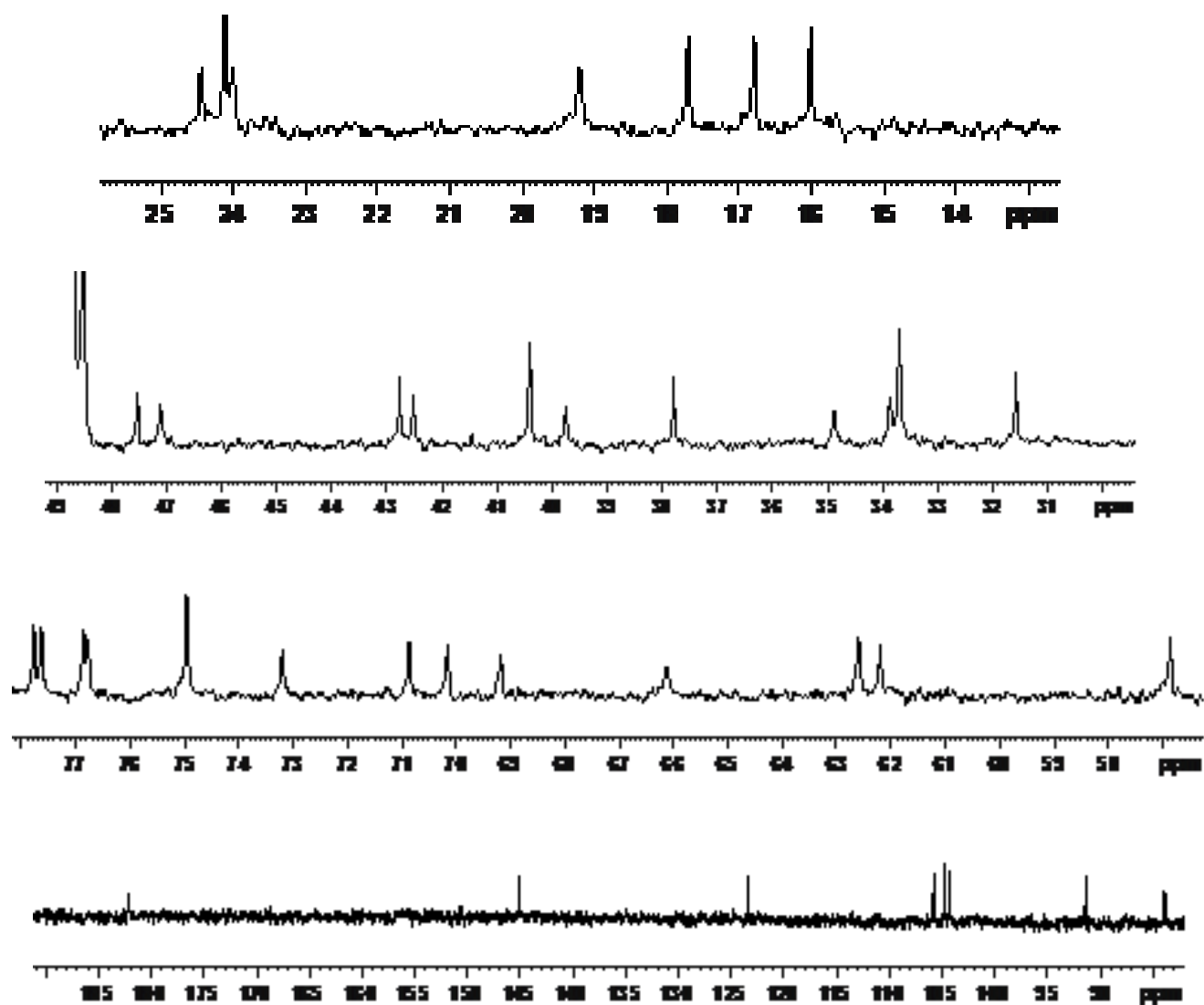


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C da DMCC3 em expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

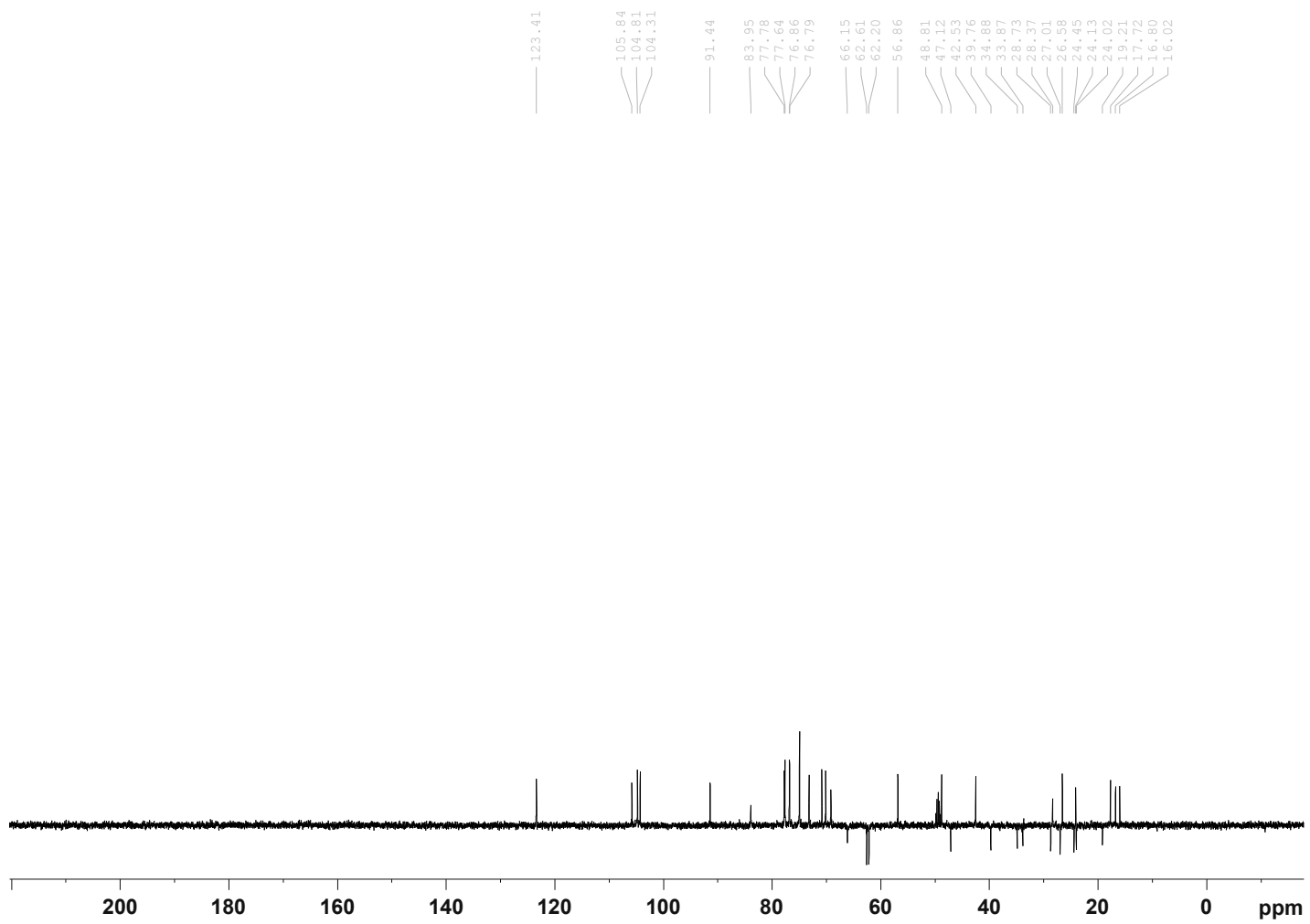


Figura 44. Espectro de DEPT 135 da DMCC3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

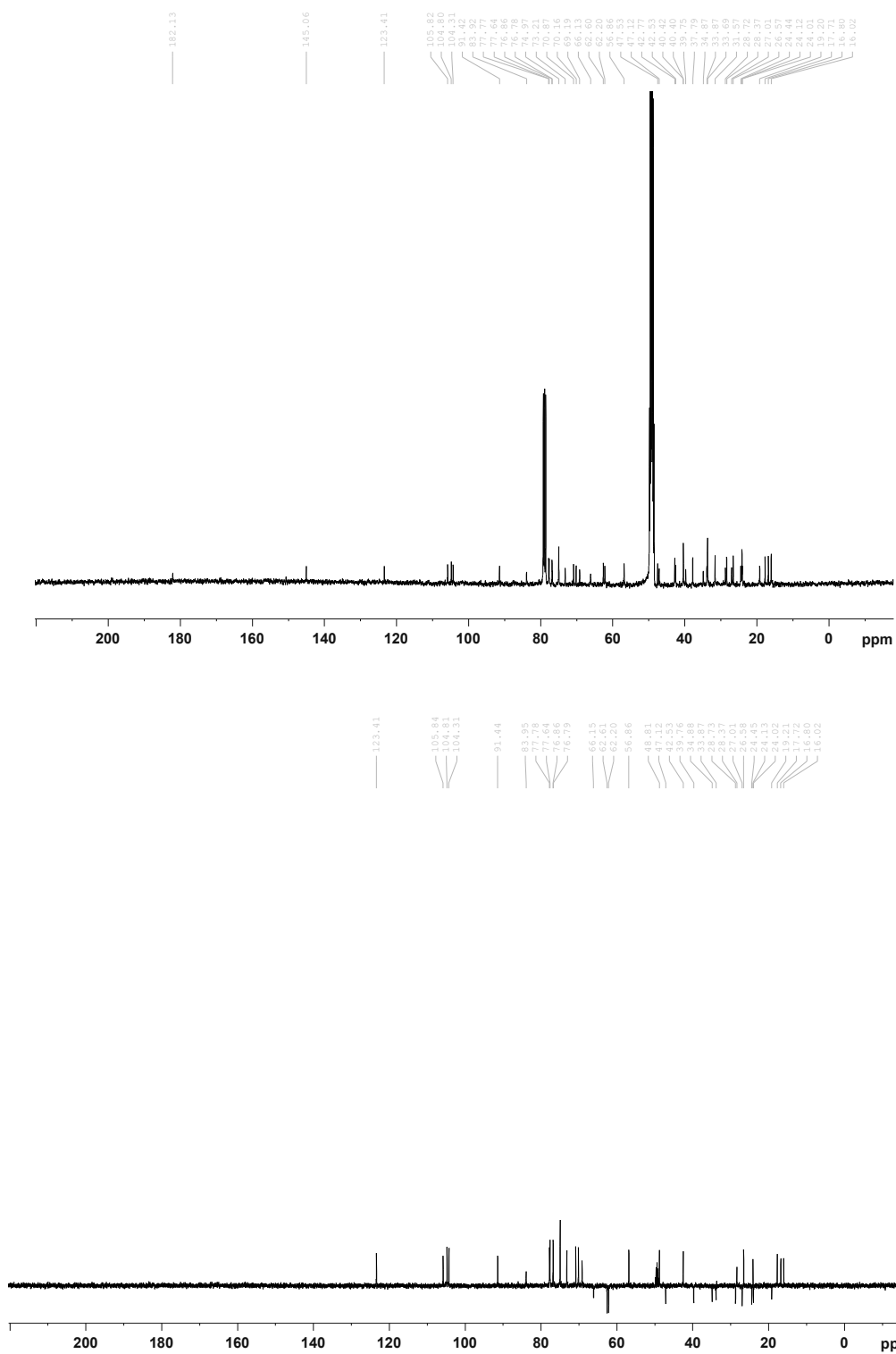


Figura 45. Espectro de ^{13}C e DEPT 135 da DMCC3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:2.

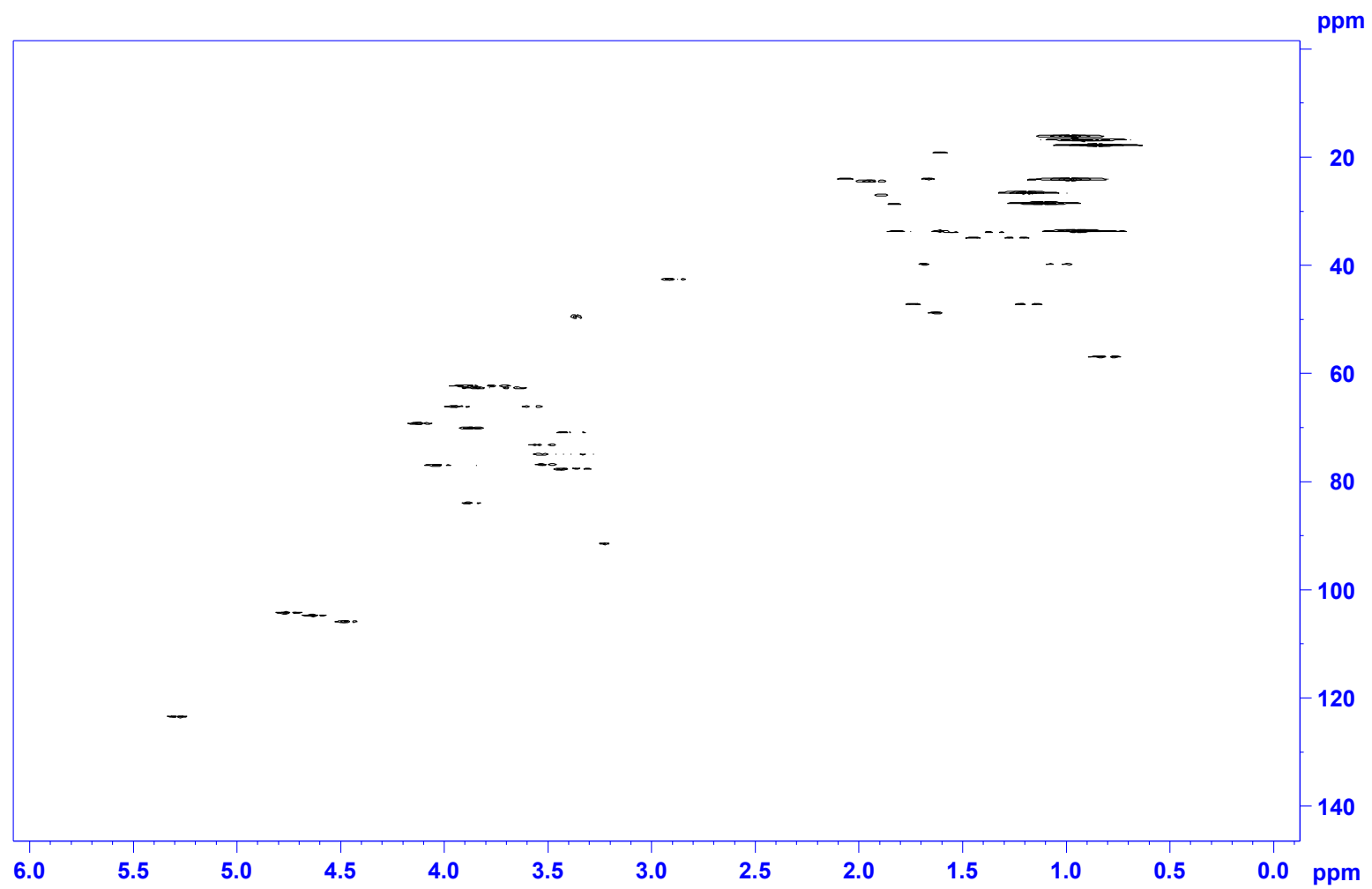


Figura 46. Espectro de HSQC da DMCC3, Solvente CDCl₃/MeOD 1:2

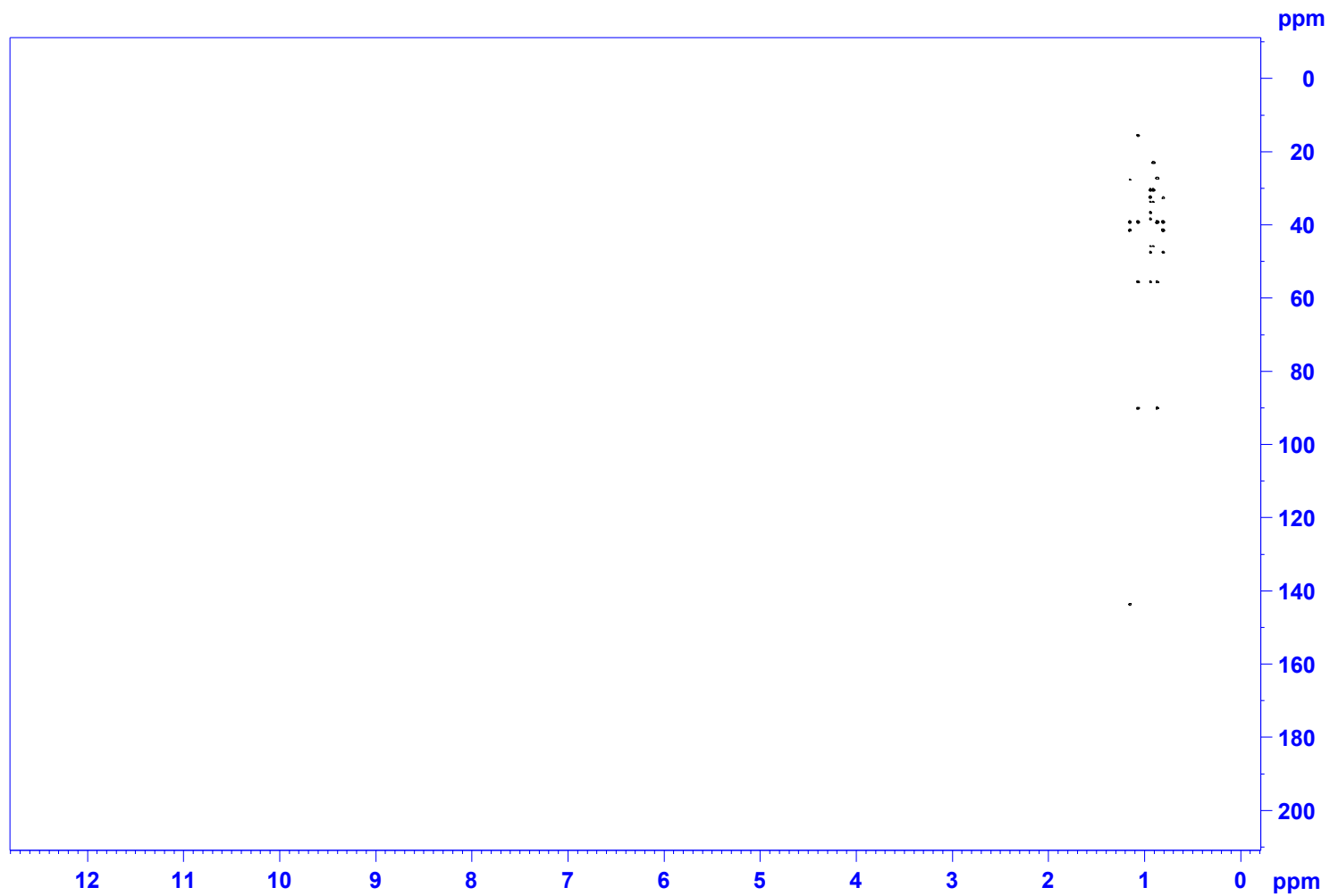


Figura 47. Espectro de HMBC da DMCC3, Solvente CDCl₃/MeOD 1:2.

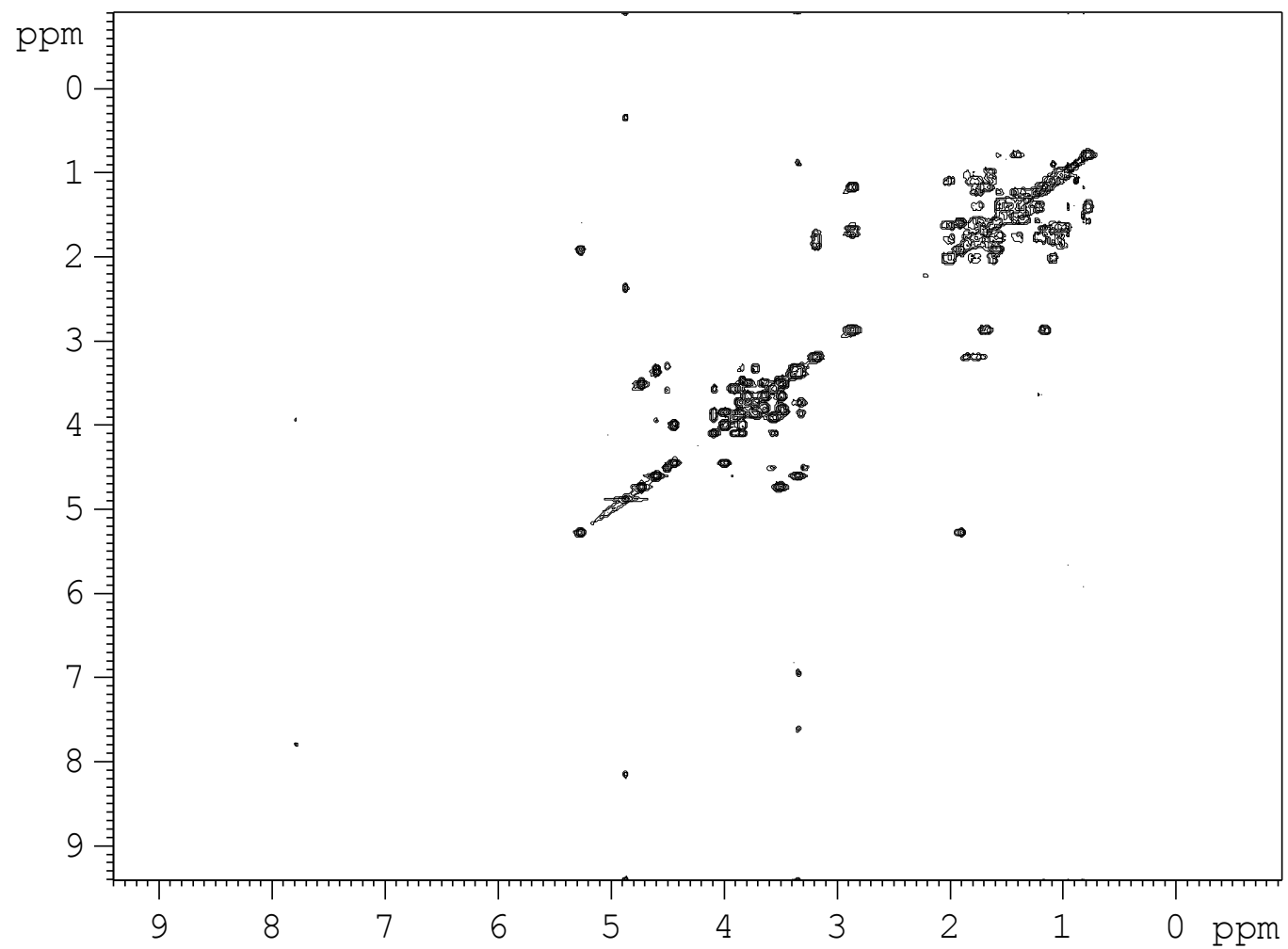


Figura 48. Espectro de COSY da DMCC3, Solvente CDCl₃/MeOD 1:2.

Tabela 5. Dados de RMN ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY e HMBC para substância DMCC3. Valores de deslocamento químico em ppm, solvente $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2.)

	C^{13}		H^1	HMBC	COSY		TOCSY	NOESY
	Carbo no	δC^{13}	δH^1	δH^1	δHa	δHb	δHb	
1	CH_2	39,75	1,03;1,64	0,94 (H-25)	1,03 (H-1) ;[1,64 (H-1)]	1,03 (H-1);[1,64(H-1) 3,18(H-3)];1,64 (H-1);[1,64(H-1) ;1,03 (H-1);[3,18(H-3)];	1,03 (H-1);[3,18(H-3)];1,64 (H-1);[3,18(H-3)];	
2	CH_2	27,01	1,75;1,84		1,75(H-2)	1,75(H-2) [;3,18(H-3)];1,84 [;3,18(H-3)];	1,75(H-2) [;3,18(H-3)];1,84 [;3,18(H-3)];	
3	CH	91,42	3,18dd	1,07(H-23); 0,87(H-24); 4,44(H-1')	3,18(H-3)	3,18 (H-3);[1,03 (H-1);1,64 (H-1); 1,75(H-2)1,84 (H-2);4,44(H1')	3,18 (H-3);[1,03 (H-1);1,64 (H-1); 1,75(H-2)1,84 (H-2)	3,18(H-3);[0,78(H-5)];
4	C	40,40		1,07(H-23); 0,87(H-24)				
5	CH	56,89	0,78d	1,07(H-23); 0,87(H-24);0,94 (H-25)	0,78 (H-5)	1,39 (H-6); 1,57(H-6)]	1,57(H-6)	0,78 (H-5);[1,57(H-6)]
6	CH_2	19,20	1,39; 1,57		1,39 (H-6);[; 1,57(H-6)]	1,39 (H-6) [0,78 (H-5)];1,57 (H-6) [0,78 (H-5)];	1,57 (H-6) [0,78 (H-5); 1,23(H-7); 0,88(H-24)];	
7	CH_2	34,87	1,14;1,23		1,14(H-7);1,23(H-7)	1,14(H-7)[1,23(H-7)]; 1,23(H-7);[1,14(H-7)]	1,23(H-7);[1,57(H-6)]	1,23(H-7);[1,39(H-6)]
8	C	40,41		0,81 (H-26);1,16 (H-27)				
9	CH	48,81	1,58	0,94 (H-25);0,81 (H-26);5,26(H-12); 0,94 (H-25)	1,58(H-9)	1,91(H-11);	1,91(H-11);5,26 (H-12)	
10	C	37,79						
11	CH_2	24,44	1,91(t,J=13 e 6,16)		1,91(H-11)	1,58(H-9);5,26(H-12)	1,58(H-9);5,26(H-12)	1,91(H-11);[(5,26 (H-12)
12	CH	123,41	5,26t		5,26t (H-12)	1,58(H-9);1,91(H-11);2,87(H-18)	1,58(H-9);1,91(H-11)	5,26 (H-12);[1,91(H-11); 2,87(H-18)]
13	C	145,06		1,16 (H-27)				
14	C	42,77		0,81 (H-26);1,16 (H-27)				
15	CH_2	24,01	1,62; 2,01		1,62(H-15);[2,01(H-15)]	1,62(H-15);[2,01(H-15);1,16(H-26)];2,01(H-15)[1,62(H-15);1,1(H-16)]	2,01(H-15);[(1,1(H-16)]	
16	CH_2	28,72	1,1; 1,18		1,16 (H-26)	1,1(H-16);[1,18(H-16)];	1,1(H-16);[2,01(H-15)]	
17	C	47,53		1,76(H-21)				
18	CH	42,52	2,87	5,26(H-12);	2,87(H-18)	5,26(H-12);1,18(H-16);1,17(H-19);1,69(H-19)	1,69(H-19)]	2,87(H-18);[5,26(H-12)]

19	CH ₂	47,12	1,17; 1,69	0,92 (H-29); 0,94(H-30)	1,17(H-19);[1,69(H-19)]	1,17(H-19);[2,87(H-18)];1,69(H-19)[2,87(H-18)];	1,69(H-19)[2,87(H-18)];	
20	C	31,57		0,92 (H-29); 0,94(H-30)				
21	CH ₂	33,86	1,57; 1,76	0,94 (H-29);	1,57(H-21);[1,76(H-21)]	1,57(H-21);[1,76(H-21)];1,76(H- 21)[1,57(H-21)]		
22	CH ₂	33,69						
23	CH ₃	28,37	1,07	3,18(H-3); 0,87(H- 24)		0,87(H-23)		
24	CH ₃	16,80	0,87	3,18(H-3); 0,78(H- 5);1,07(H-23)			1,57(H-6)	
25	CH ₃	16,01	0,94s	1,03 (H-1); 1,58(H-9)				0,94;[1,91(H-9); 1,75(H-2)]
26	CH ₃	17,71	0,81s	1,58(H-9); 0,94(H-25)				
27	CH ₃	26,57	1,16s					1,16(H- 26);[2,01(H- 14);1,62(H-14)]
28	C	182,13		2,01(H-16)				
29	CH ₃	33,69	0,92s					
30	CH ₃	24,12	0,94s	0,92 (H-29)			3,84(H-3); 4,0 (H-2'); 4,07(H- 4)	
1'	CH	105,80	4,44(d,J=7, 27)	3,18 (H-3); 4,0 (H-2'); 3,56 (H5a'); 3,9 (H5b')	3,18(H-3); 4,0(H-2'); 3,56 (H5a'); 3,9(H5b')		3,84(H-3); 4,0 (H-2'); 4,07(H- 4)	
2'	CH	76,86	4	4,72 (H-1'')		4,44(H-1); 3,84(H-3)	4,44(H-1);	
3'	CH	69,18	3,84	--		4,07 (H-4); 4 (H-2')	4,44(H-1);	
4'	CH	83,92	4,07	4,59 (H-1''')	3,56 (H5a'); 3,84 (H-3'); 3,90(H5b')		3,90(H-1);,44(H-1);3,84(H- 3'); 3,56(H5a'); 3,9(H5b')-4,07(H-4'); 3,48(H-4''); 3,80(H-6b'')	
5'	CH ₂	66,13	3,56; 3,90	-----	3,56-4,07;3,90; 3,90-4,07; 3,56		3,56(H5a');-4,07(H-4'); 3,9(H5b')-4,07(H-4'); 3,48(H-4''); 3,80(H-6b'')	
1''	CH	104,3	4,72(d J=7,27)	3,50 (H-2'')	3,50 (H-2'')		3,48(H-4''); 3,80(H-6b'')	
2''	CH	73,2	3,5	3,83(H-3''); 3,48(H-4'')	4,72(H-1'')		-----	
3''	CH	70,16	3,83	3,48(H-4'')	-----		-----	
4''	CH	76,78	3,48	3,8(H-6b'')	3,8(H-6b'')		3,8(H-6b''); 3,66(H-6a''); 4,72(H-1'');	
5''	CH	74,9	3,38	-----				

6''	CH ₂	69,60	3,8; 3,66	-----	3,8-3,48(H-4'');3,66(H-6a''); 3,66-3,8(H-6b'');	3,8-4,72 (H-1'');3,663,66(H-6a''); 3,66-3,8; 3,48
1'''	CH	104,80	4,59(d, J=7,55)	4,07 (H-4')	3,33(H-2''')	3,38(H-3'''); 3,36(H-4'''); 3,31(H-5''')
2'''	CH	74,97	3,33	3,38(H-3''')	4,59 (H-1''')	-----
3'''	CH	77,77	3, 38	3,33(H-2''')	-----	3,36(H-4'''); 3,83(H-6b''')
4'''	CH	70,87	3,36	3,38(H-3''')	-----	4,59 (H-1'''); 3,83(H-6b''')
5'''	CH	77,64	3,31	3,36(H-4''')	3,73 (H-6a'''); 3,83(H-6b''');	4,59(H-1'''); 3,73(H-6a''')
6'''	CH ₂	62,20	3,83; 3,73	-----	3,83-3,73(H-6a'''); 3,73-3,83(H-6b''');	3,83-3,31(H-5'''); 3,383,38(H-3''');3,73-3,31(H-5''')

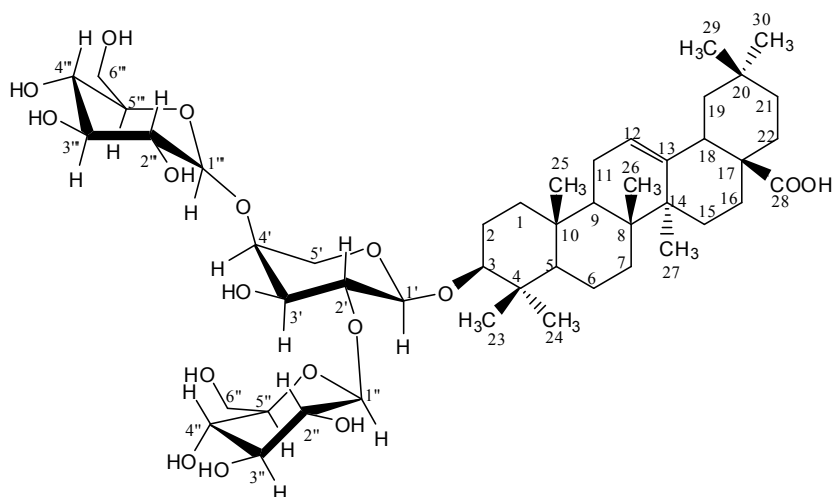


Figura 49. Estrutura química do triterpeneo DMCC3 do tipo oleano isolado de *D. morotoni*.

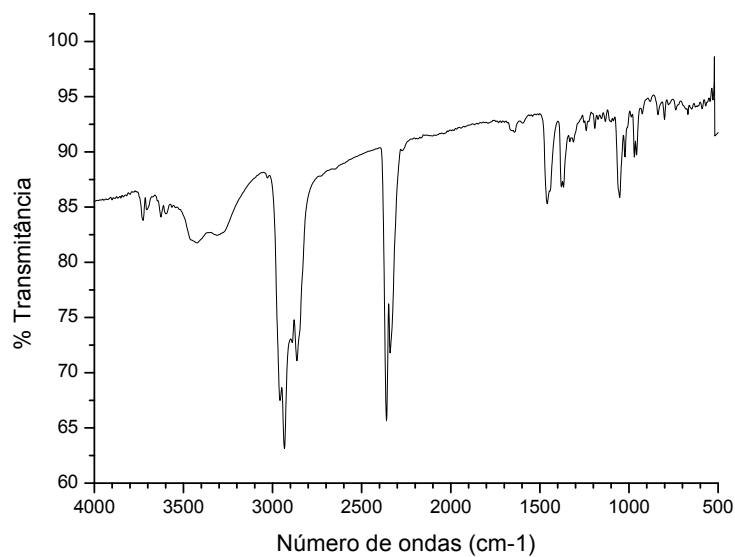


Figura 50. Espectro na região do infravermelho da mistura codificada como DMM1 obtido através da técnica de ATR.

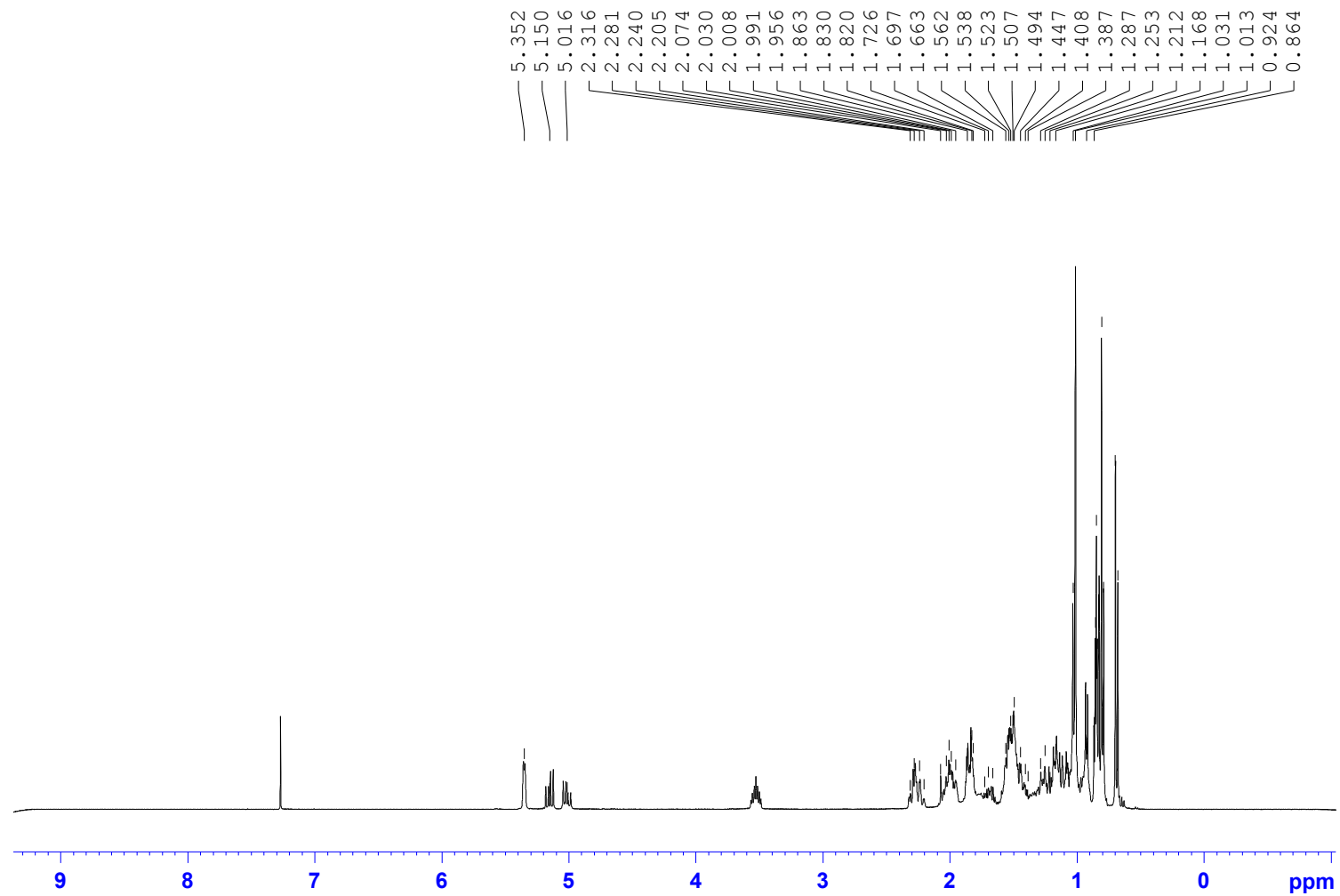


Figura 51. Espectro de RMN ^1H da DMM1, Solvente CDCl_3 .

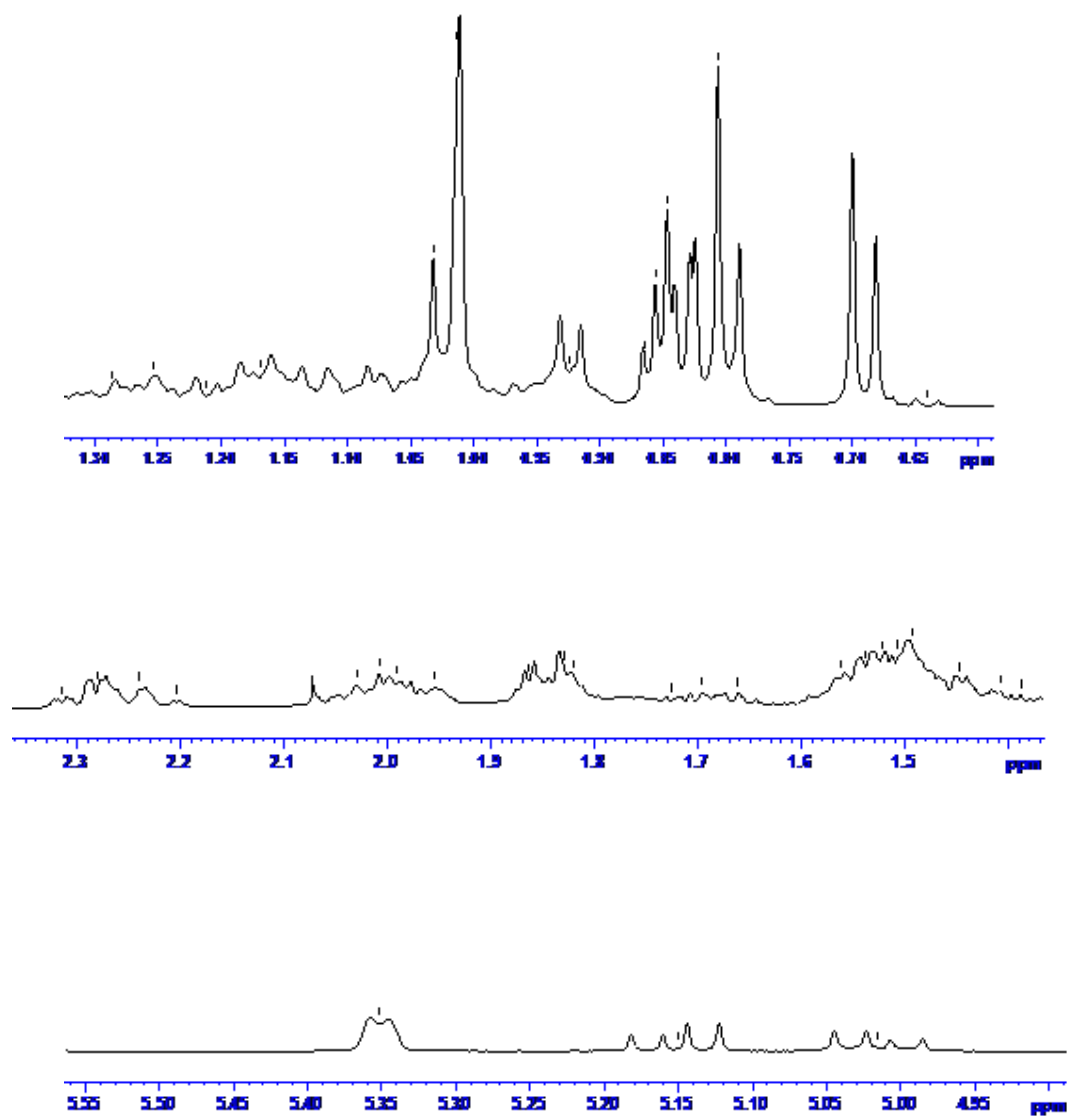
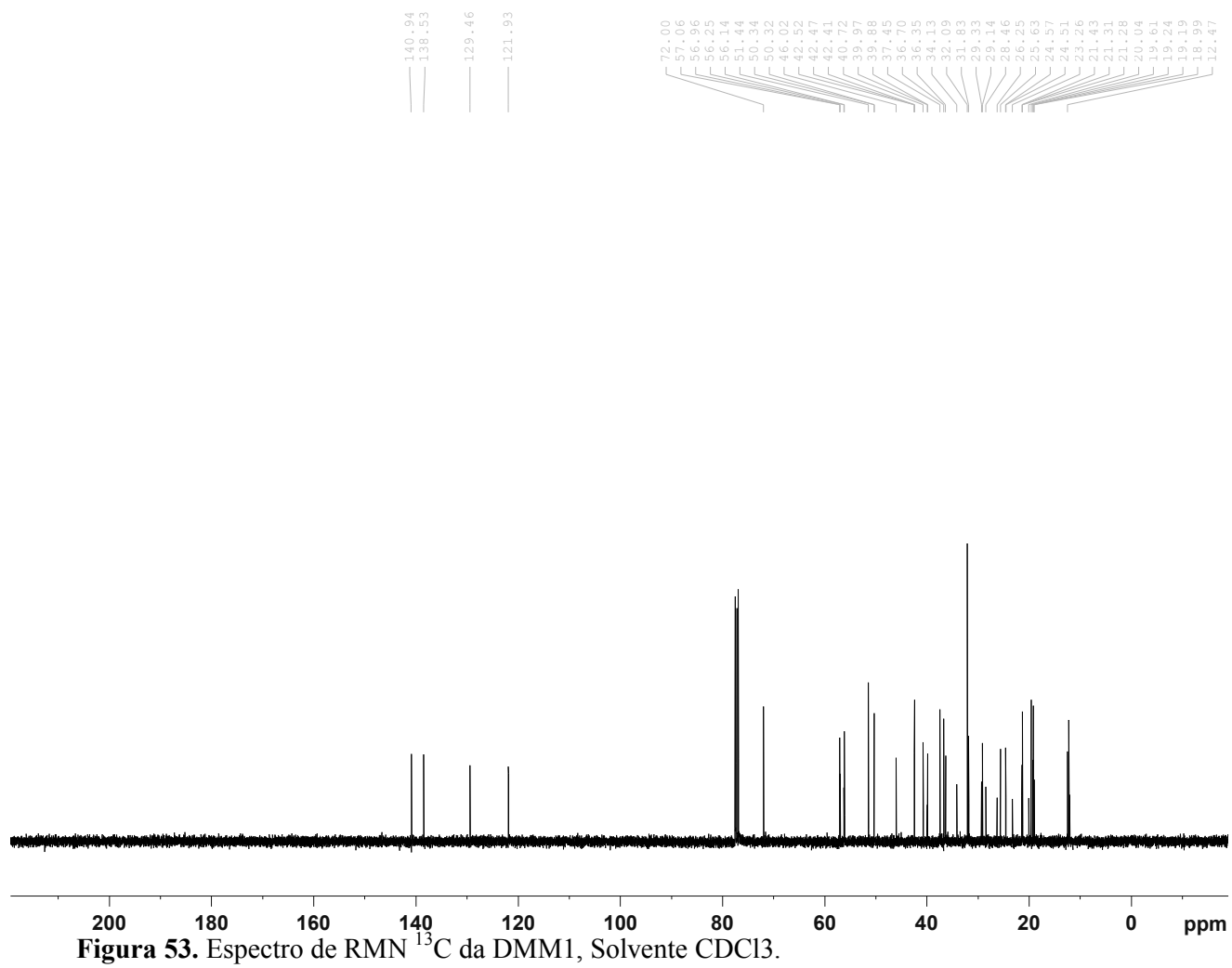


Figura 52. Espectro de RMN ^1H da DMM1 com expansão, Solvente CDCl_3 .



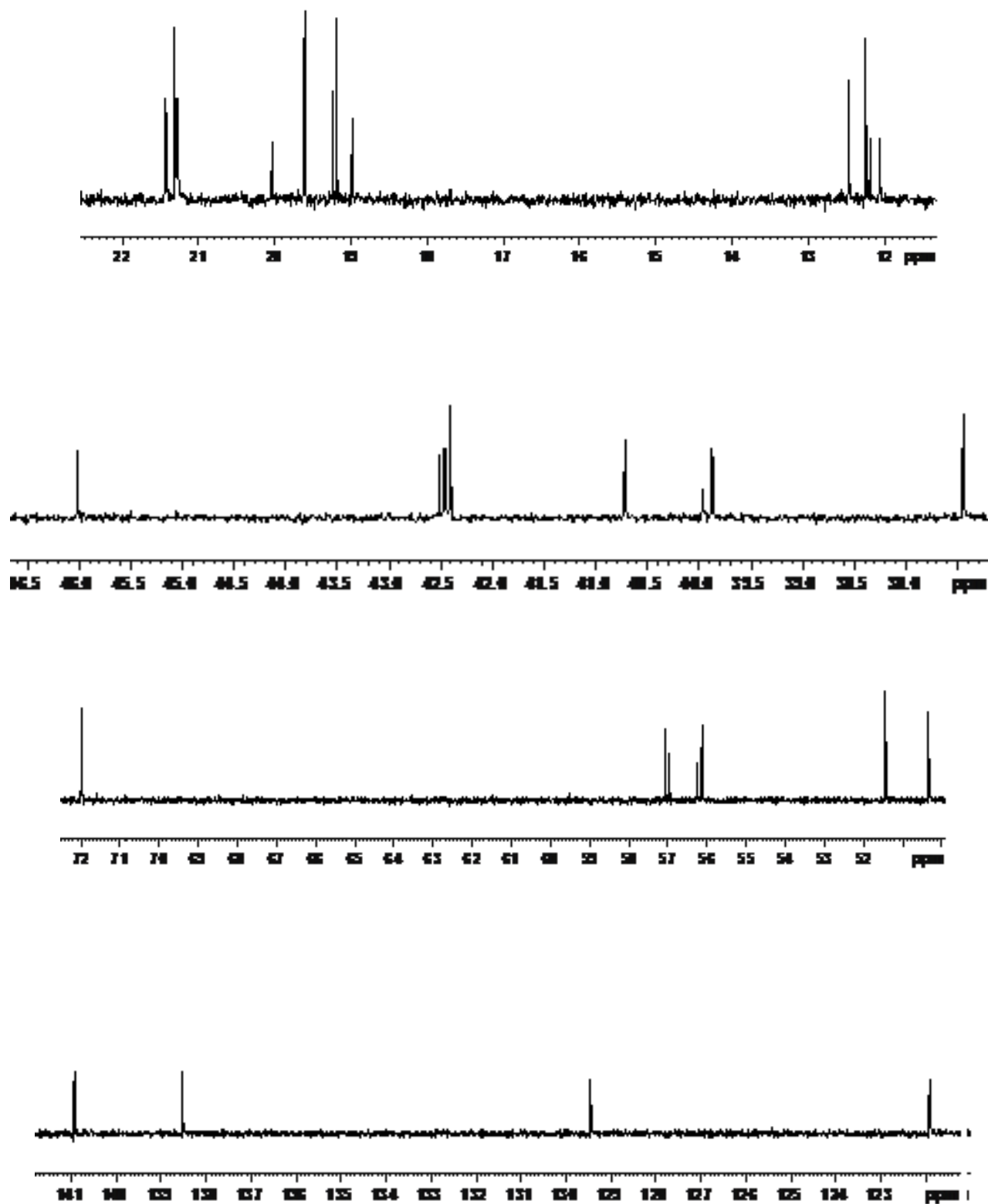


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C da DMM1 com expansão, Solvente CDCl_3 .

Tabela 6. Resultados experimentais de RMN (^{13}C : 100 MHz, ^1H : 400 MHz, CDCl_3) da substância DMM1a e DMM1b comparados com a literatura (BORGES, 2006).

C	Experimental CDCl_3		Literatura CDCl_3			
	DMM1a δC	Δh	DMM1b δC	δH	β -Sitosterol δC	Estigmasterol δC
1	37,45		37,45		37,2	37,2
2	31,82		31,82		31,6	31,6
3	72	3,53m	72	3,53 m	71,8	71,8
4	42,47		42,47		42,3	42,3
5	140,93		140,93		140,7	140,7
6	121,92	5,35 d $J = 5,32$	121,92	5,35 d $J = 5,32$	121,7	121,7
7	31,82		31,82		31,9	31,9
8	31,82		31,82		31,9	31,9
9	50,32		50,32		50,1	50,1
10	36,70		36,70		36,6	36,6
11	21,27		21,27		21,1	21,1
12	39,96		39,96		39,9	39,7
13	42,41		42,41		42,3	42,2
14	56,96		56,96		56,6	56,6
15	24,57		24,57		24,3	24,4
16	28,46		28,46		28,8	28,9
17	56,24		56,24		56,0	55,9
18	12,06	0,68 s	12,06	0,68 s	11,9	12,0
19	19,24	0,81 s	19,24	0,81 s	19,4	19,4
20	36,35		36,35		36,1	30,5
21	18,98		18,98		18,8	21,2
22	32,09		138,53	5,15 (dd $J = 8,3$ e 15,5 Hz)	33,9	138,3
23	29,33		129,46	5,01 dd $J = 8,4$ e 15,6 Hz)	26,6	129,2
24	46,01		51,44		45,5	51,2
25	29,33		32,09		29,1	31,9
26	19,61	0,82 d	21,17	0,83 d	19,9	21,1
27	19,18	0,80 sl	19,18	0,81 sl	19,0	19,0
28	23,25		25,62		23,0	25,4
29	12,19	0,849 sl	12,19	0,849 sl	12,0	12,3

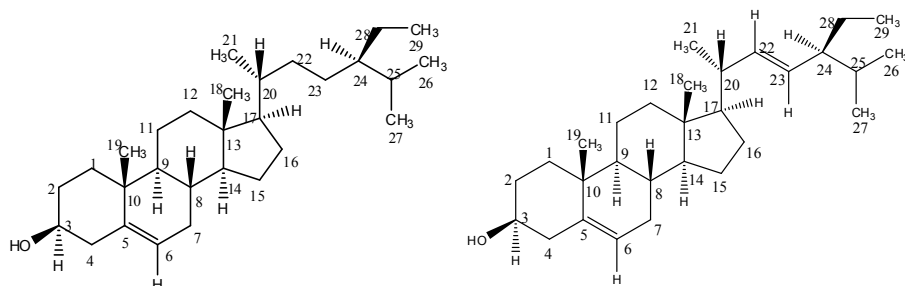


Figura 55. Estruturas da mistura da substância DMM1 isoladas do caule de *D. morototoni*.

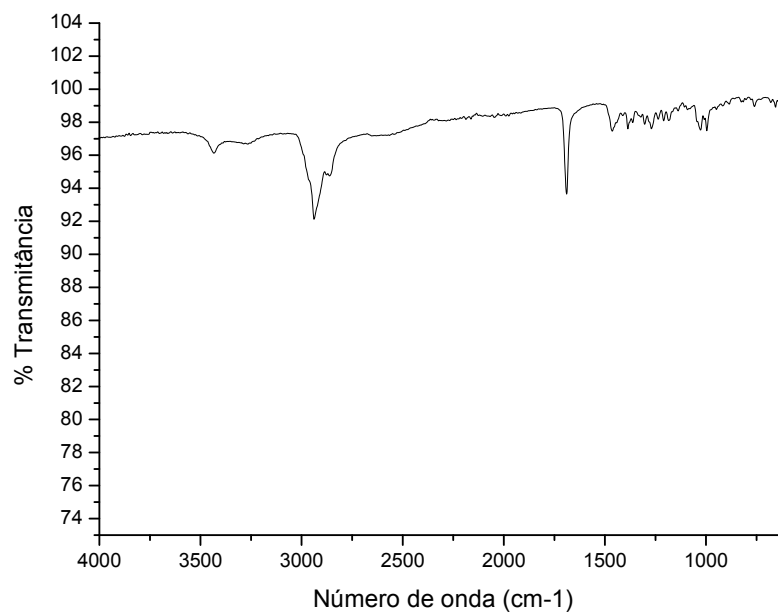


Figura 56. Espectro na região do infravermelho da substância DMM2 obtido através da técnica de ATR.

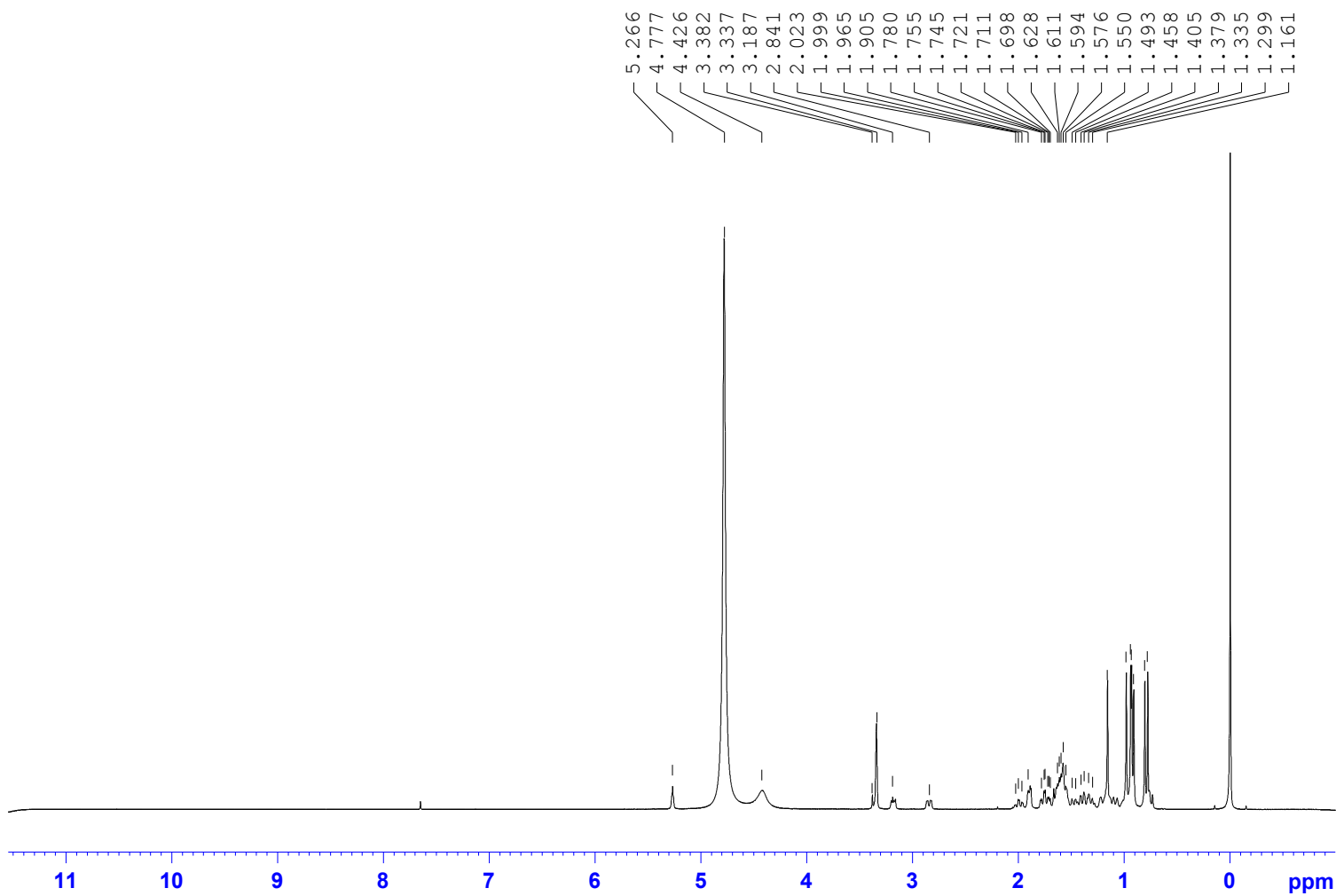


Figura 57. Espectro de RMN ^1H da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

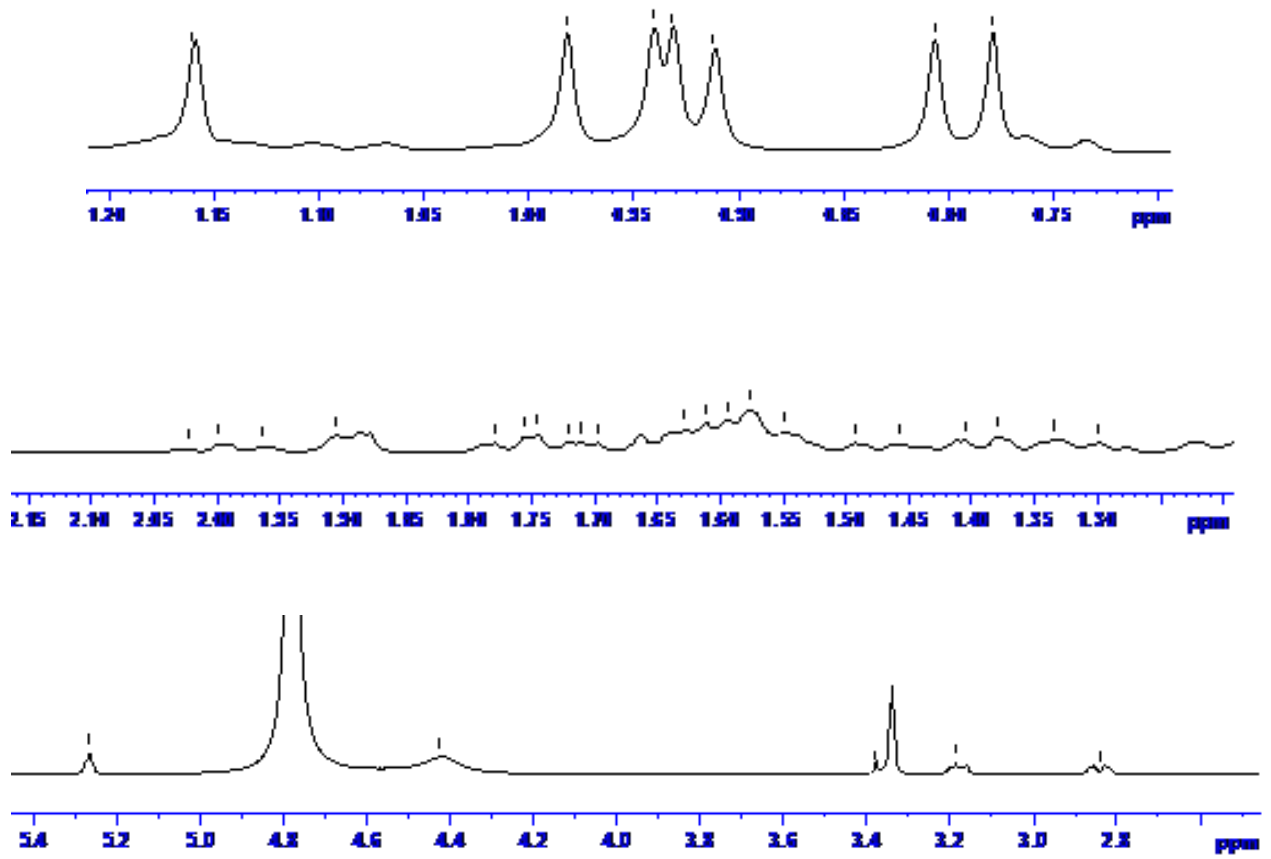


Figura 58. Espectro de RMN ^1H da DMM2 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

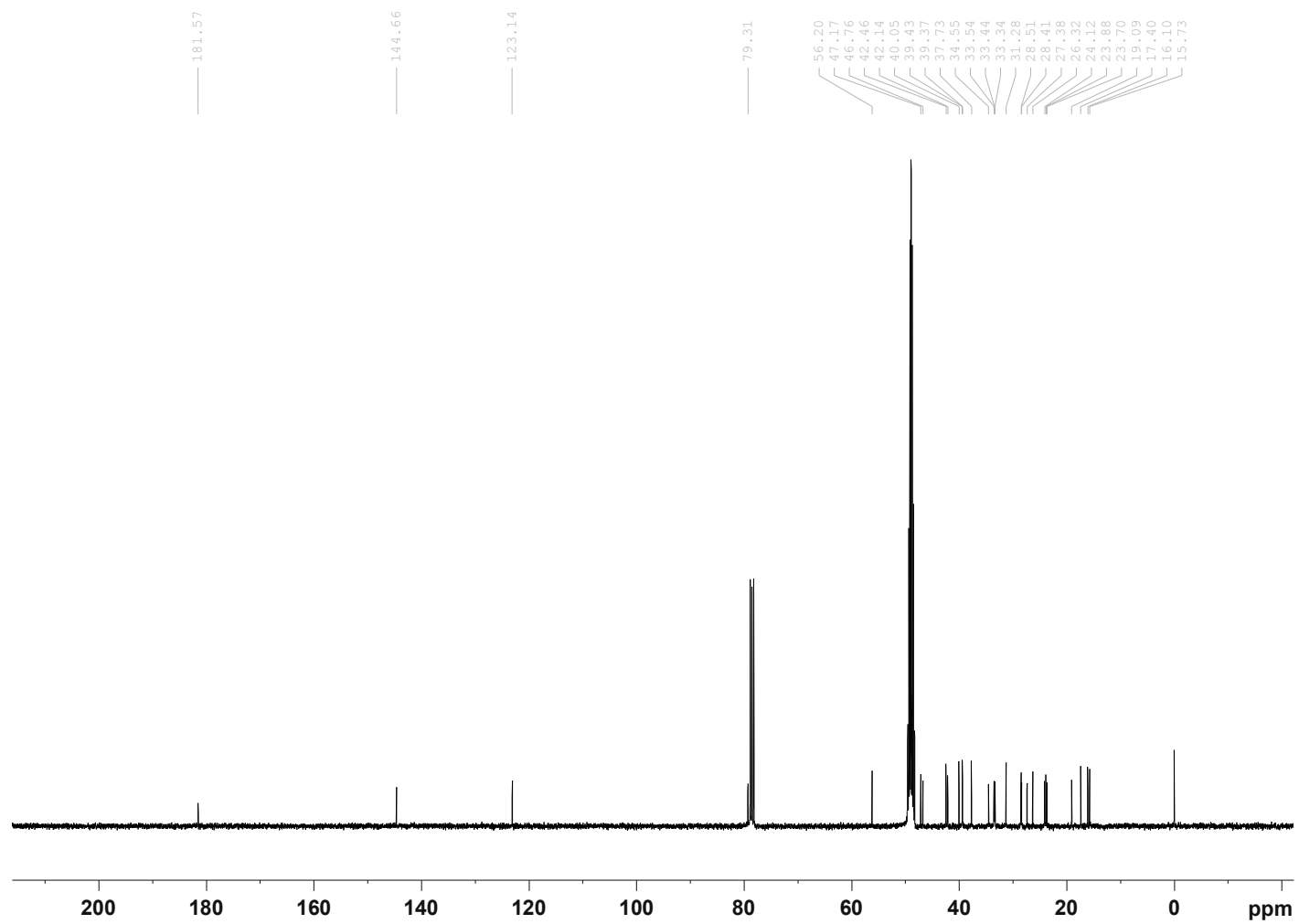


Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

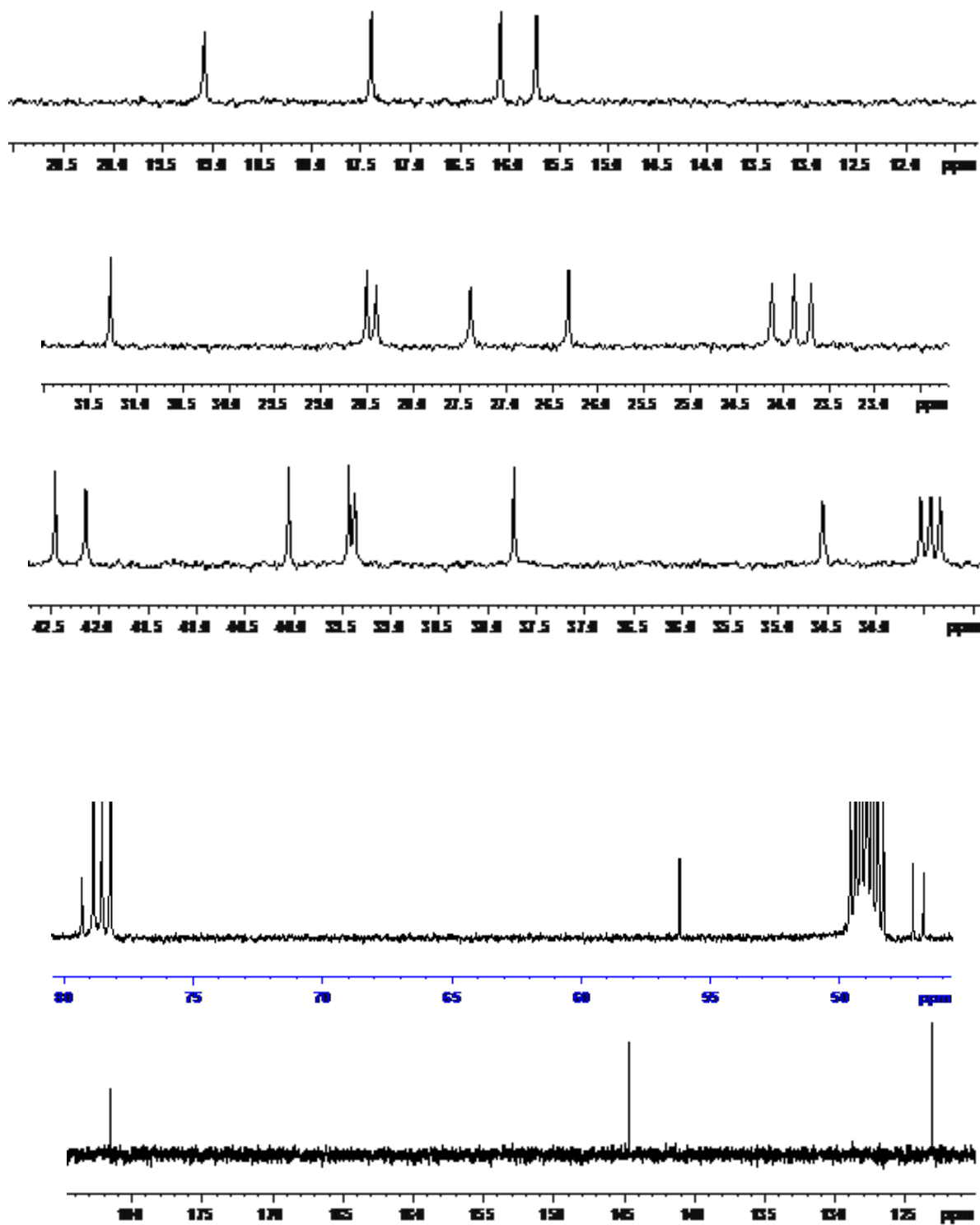


Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C da DMM2 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

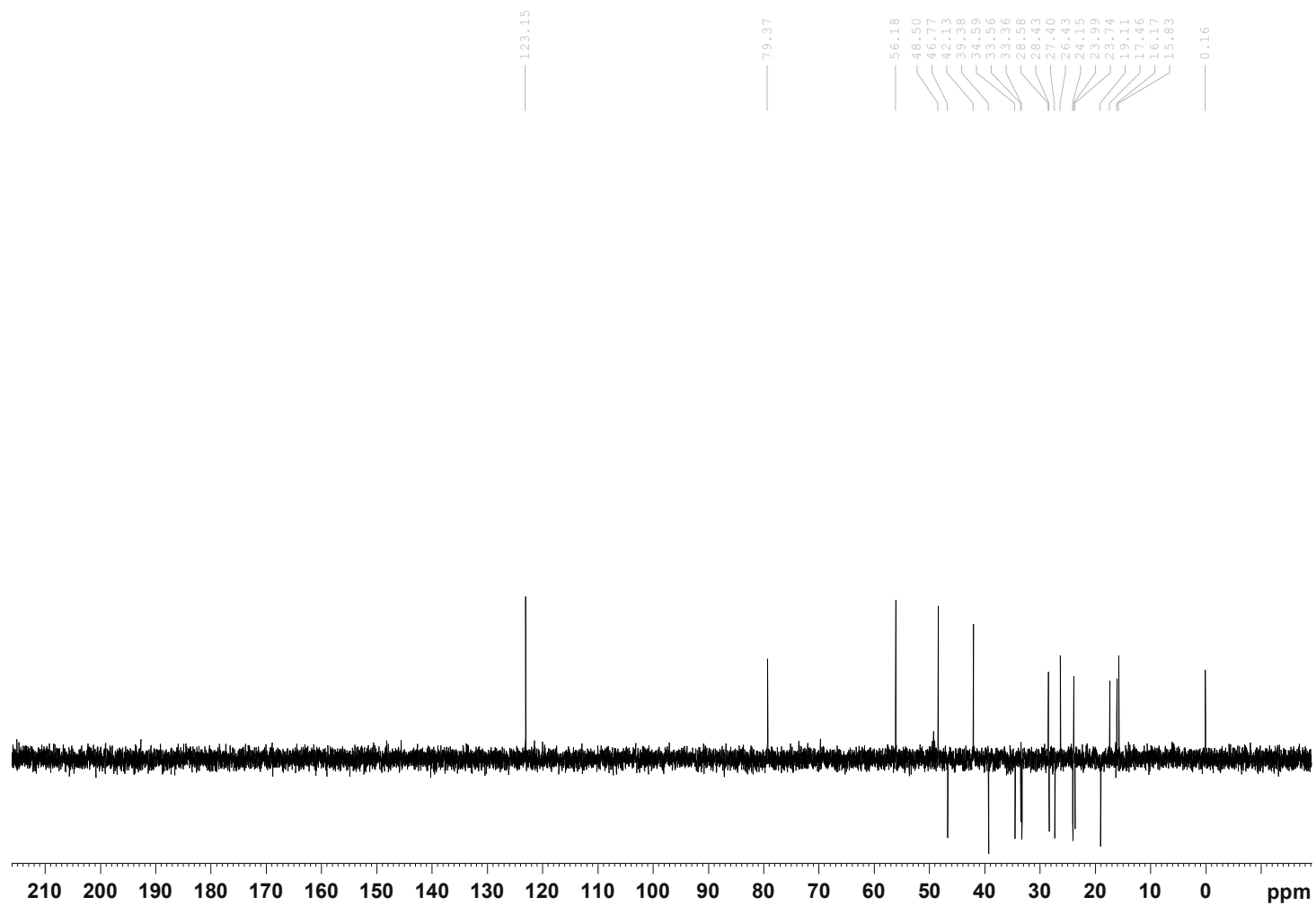


Figura 61. Espectro de DEPT 135 da DMM2, Solvente CDCl₃/MeOD 1:1.

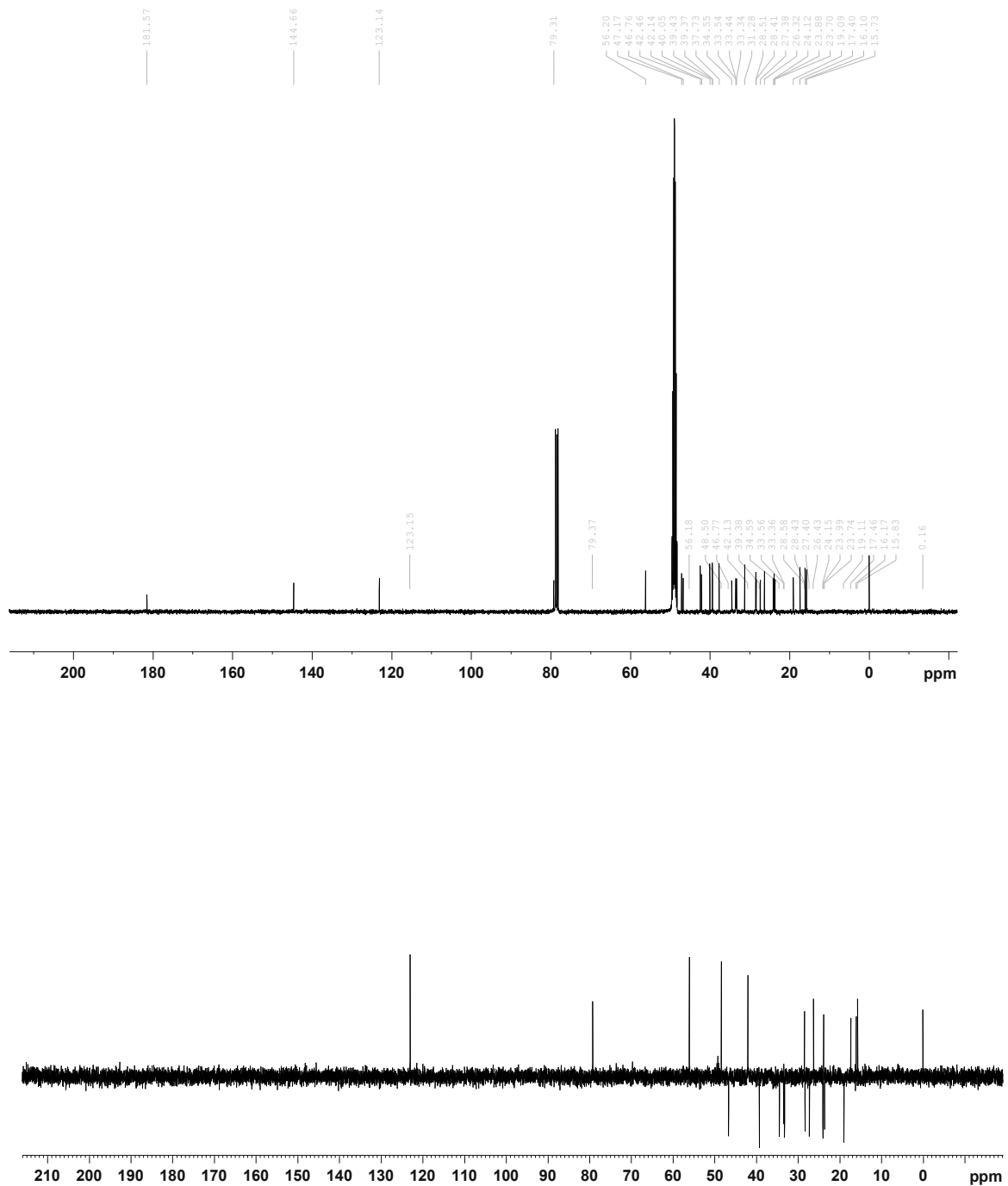


Figura 62. Espectro de ^{13}C e DEPT 135 da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

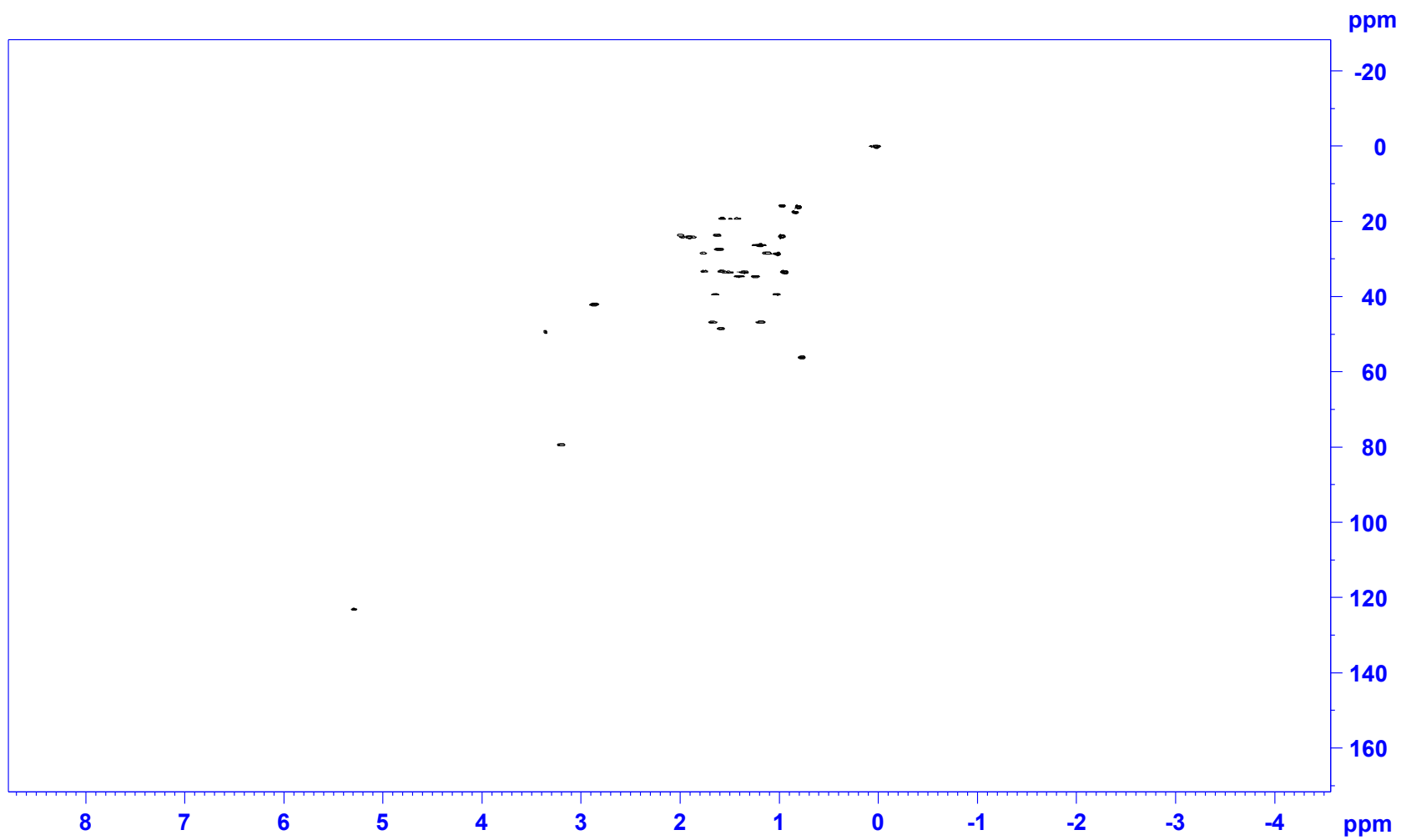


Figura 63. Espectro de HSQC da DMM2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

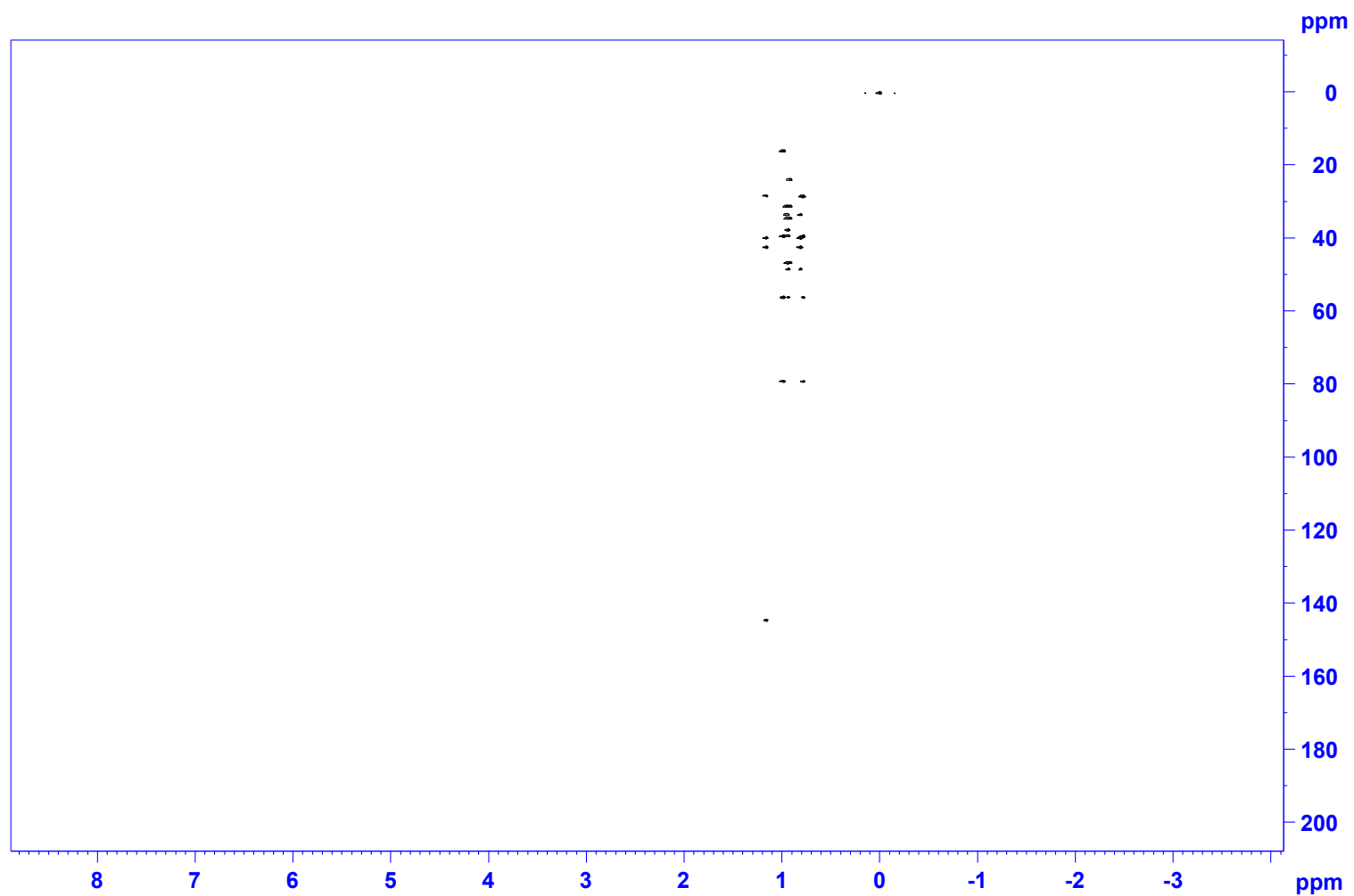


Figura 64. Espectro de HMBC da DMM2, Solvente CDCl₃/MeOD 1:1.

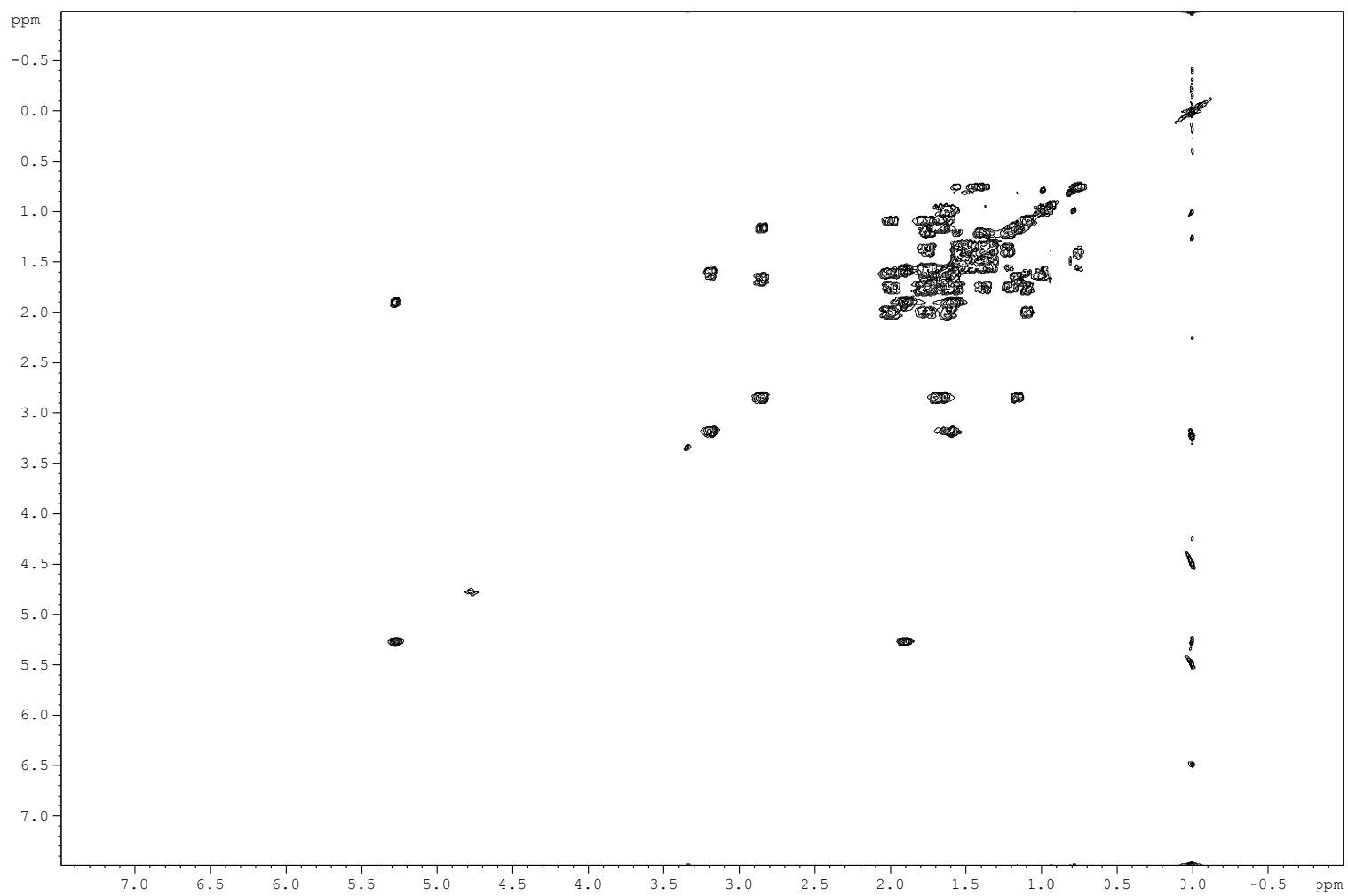


Figura 65. Espectro de COSY da DMM2, Solvente CDCl₃/MeOD 1:1.

Tabela 7. Dados de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT135°, HSQC, HMBC, COSY da substância DMM2. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

	C^{13}		H^1	HMBC	δHa	COSY
	Carbono	δC^{13}	δH^1	δH^1		δHb
1	CH_2	39,37	1,03;1,61	0,93 (H-25)	1,03 (H-1); [1,61 (H-1)]	1,03 (H-1); [3,19(H-3)]; 1,61 (H-1) [1,57(H-2); 3,19(H-3)];
2	CH_2	27,38	1,57		1,57(H-2)	1,57(H-2) [3,19(H-3); 1,61 (H-1)]
3	CH	79,30	3,19d	0,98(H-23); 0,78(H-24)	3,19(H-3)	3,19 (H-3); [1,03 (H-1); 1,61 (H-1); 1,57(H-2); 0,93(H-23)]
4	C	39,43		0,98(H-23); 0,78(H-24)		
5	CH	56,9	0,73d	0,98(H-23); 0,78(H-24); 0,93 (H-25)	0,73 (H-5)	1,35 (H-6); 1,59(H-6)]
6	CH_2	19,08	1,35; 1,59		1,35 (H-6); [1,59(H-6)]	1,35 (H-6) [0,73 (H-5)]; 1,69 (H-6) [0,73 (H-5)];
7	CH_2	33,54	1,33; 1,49	1,59 (H-6); 0,80 (H-26)		
8	C	40,05		0,80 (H-26); 1,15(H-27); 1,55(H-9)		
9	CH	48,49	1,55	5,26(H-12); 0,93 (H-25); 0,80 (H-26);	1,55(H-9)	1,88(H-11);
10	C	37,73		1,61 (H-1); 0,73 (H-5); 0,93 (H-25)		
11	CH_2	24,11	1,88		1,88(H-11)	1,55(H-9);
12	CH	12,3,14	5,26t	1,88(H-11);	5,26t (H-12)	1,55(H-9); 1,88(H-11); 2,85(H-18); 1,69(H-19)
13	C	14,4,66		1,88(H-11); 20,85(H-18); 1,15(H-27)		
14	C	42,45		1,55(H-9); 5,26(H-12); 0,80 (H-26); 1,15(H-27)		
15	CH_2	23,69	1,61; 1,62			
16	CH_2	28,40	1,07; 1,75	1,15(H-19)	1,07(H-16); [1,75(H-16)]	1,07(H-16); [1,75(H-16)]; 1,75(H-16); [1,07(H-16)];
17	C	47,		1,07(H-16;)		

18	CH	16 42, 14	2,85		2,85(H-18)	1,55(H-9); 5,26(H-12);1,69(H-19);1,88(H-11)
19	CH ₂	46, 75	1,15; 1,69	0,94 (H-29); 2,85(H-18)	1,15(H-19);[1,69(H-19)]	1,15(H-19);[2,85(H-18)];1,69(H-19)[2,85(H-18)];
20	C	31, 28		0,91 (H-28);1,69(H-19)		
21	CH ₂	34, 44	1,19; 1,22	1,77(H-22); 0,94 (H-29);		
22	CH ₂	33, 34	1,59;1, ,77		1,59;(H-22);[1,77 (H-22)]	1,59;(H-22);[1,77 (H-22)]; 1,77;(H-22);[1,59 (H-22)]
23	CH ₃	28, 50	0,98s	0,78(H-24)	0,98(H-23)	0,78(H-24)
24	CH ₃	16, 09	0,78s	0,98(H-23);	0,78(H-24)	0,98(H-23)
25	CH ₃	15, 73	0,93s	1,61 (H-1); 0,73(H-5)		
26	CH ₃	17, 40	0,80s	1,55 (H-9)		
27	CH ₃	26, 32	1,17s			
28	C	18 1,5 7		1,77(H-22);		
29	CH ₃	33, 43	0,91s	0,94 (H-30)		
30	CH ₃	23, 87	0,94s	0,91 (H-28);1,69(H-19)		

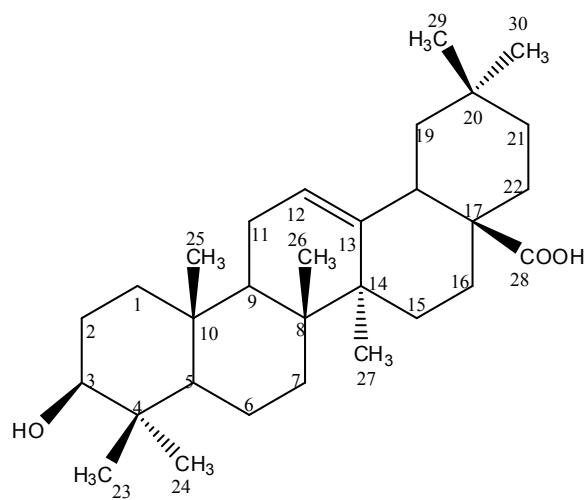


Figura 66. Estrutura da substância DMM2 isolada do caule de *D. morotoni*.

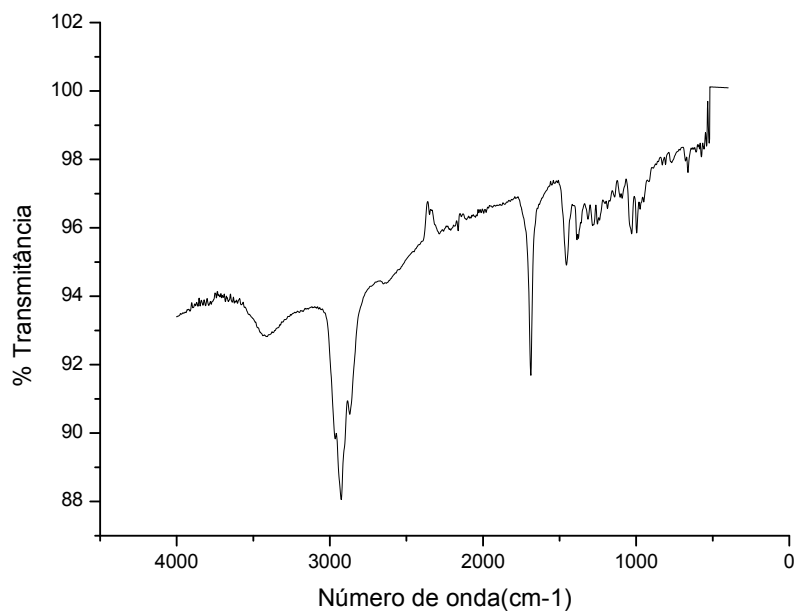
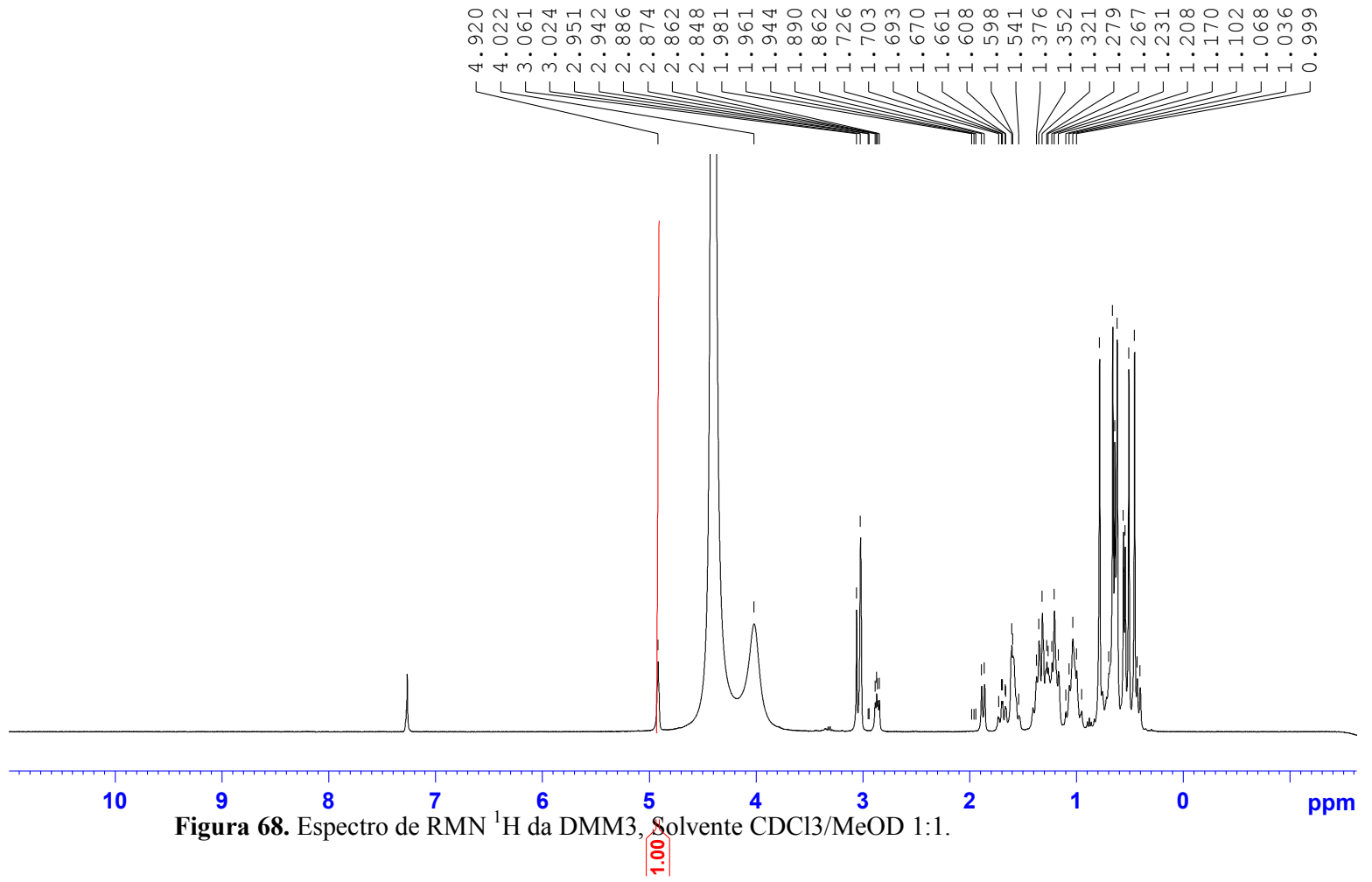


Figura 67. Espectro na região do infravermelho da substância DMM3 obtido através da técnica de ATR.



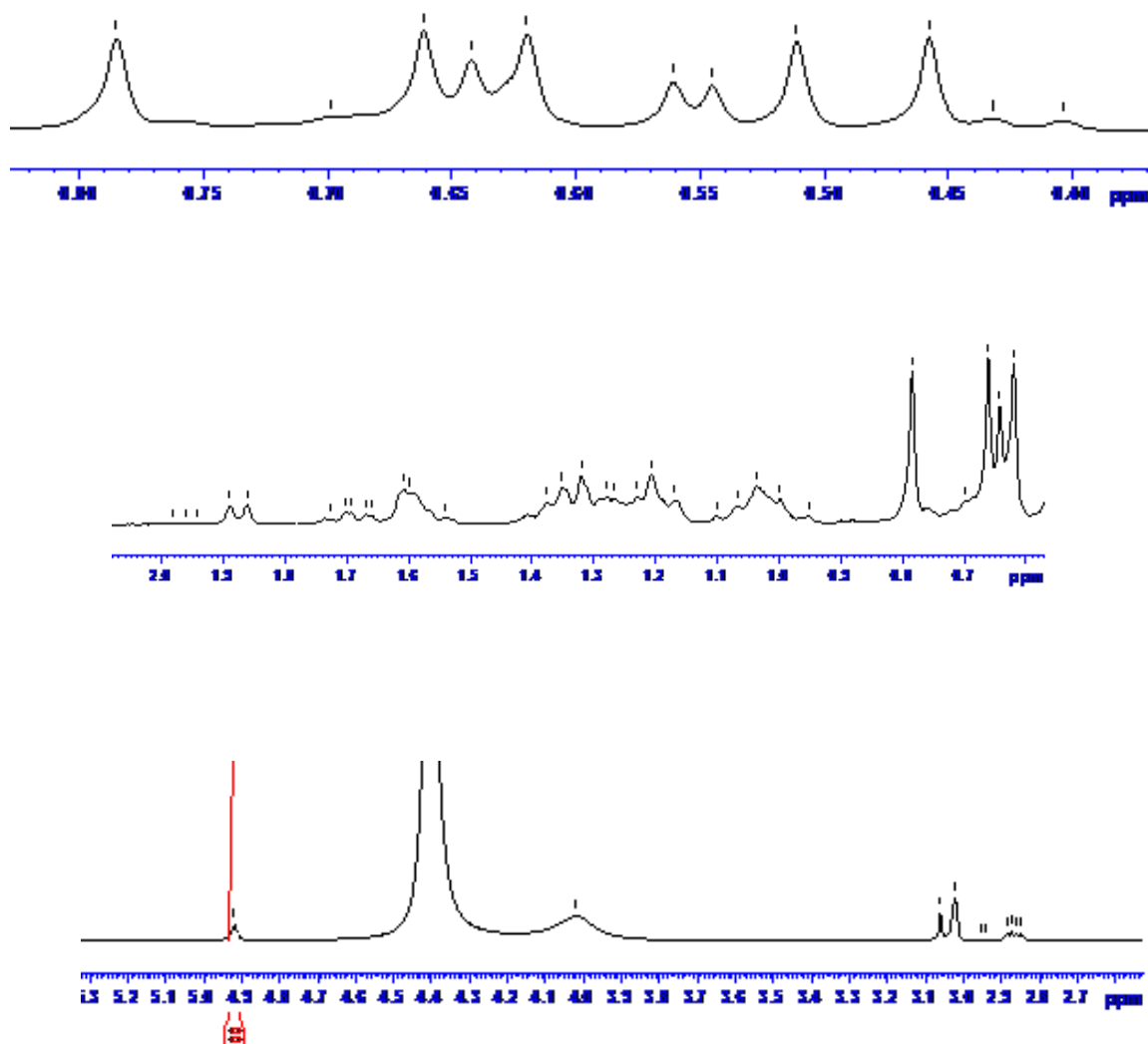


Figura 69. Espectro de RMN ^1H da DMM3 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

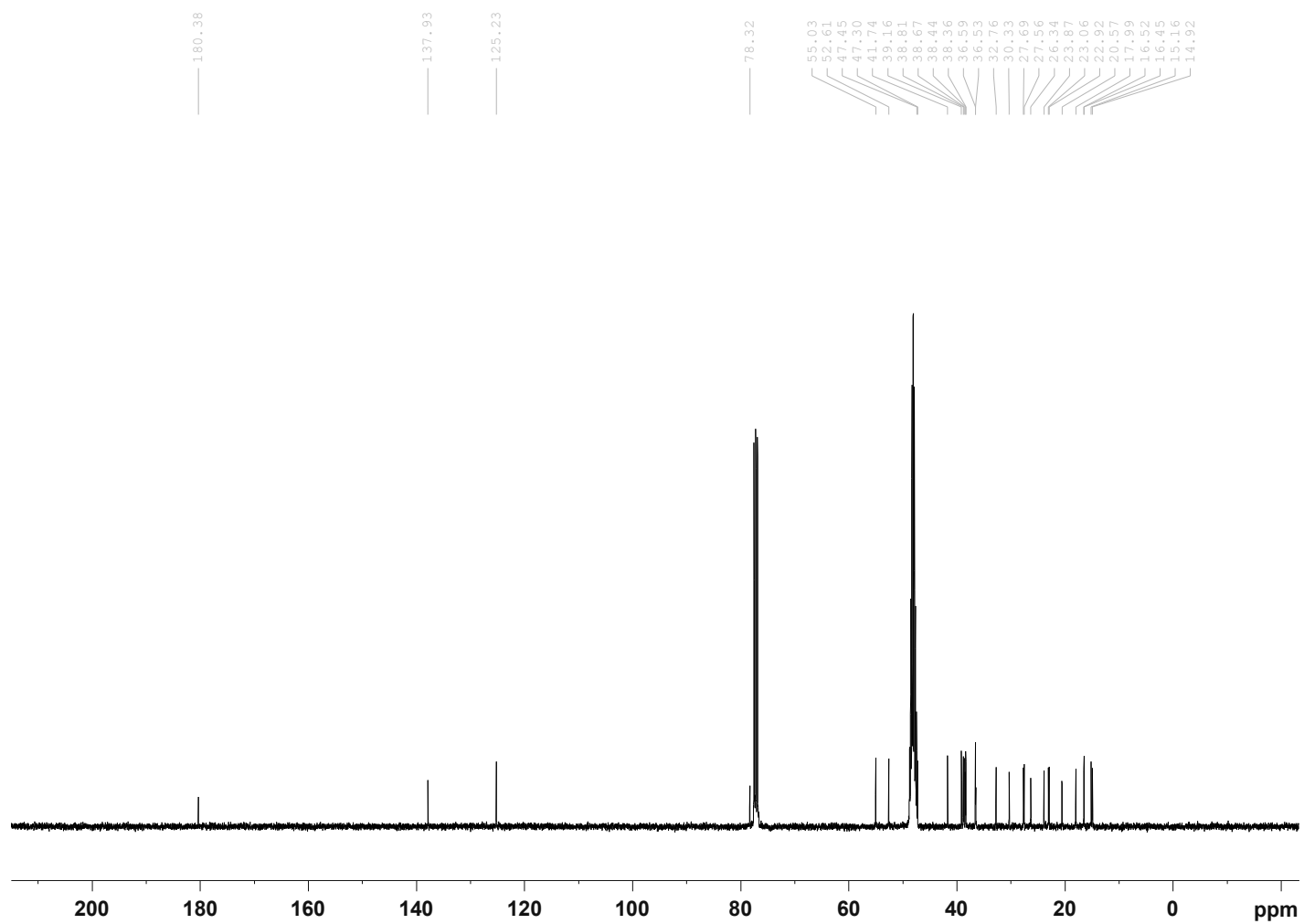


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

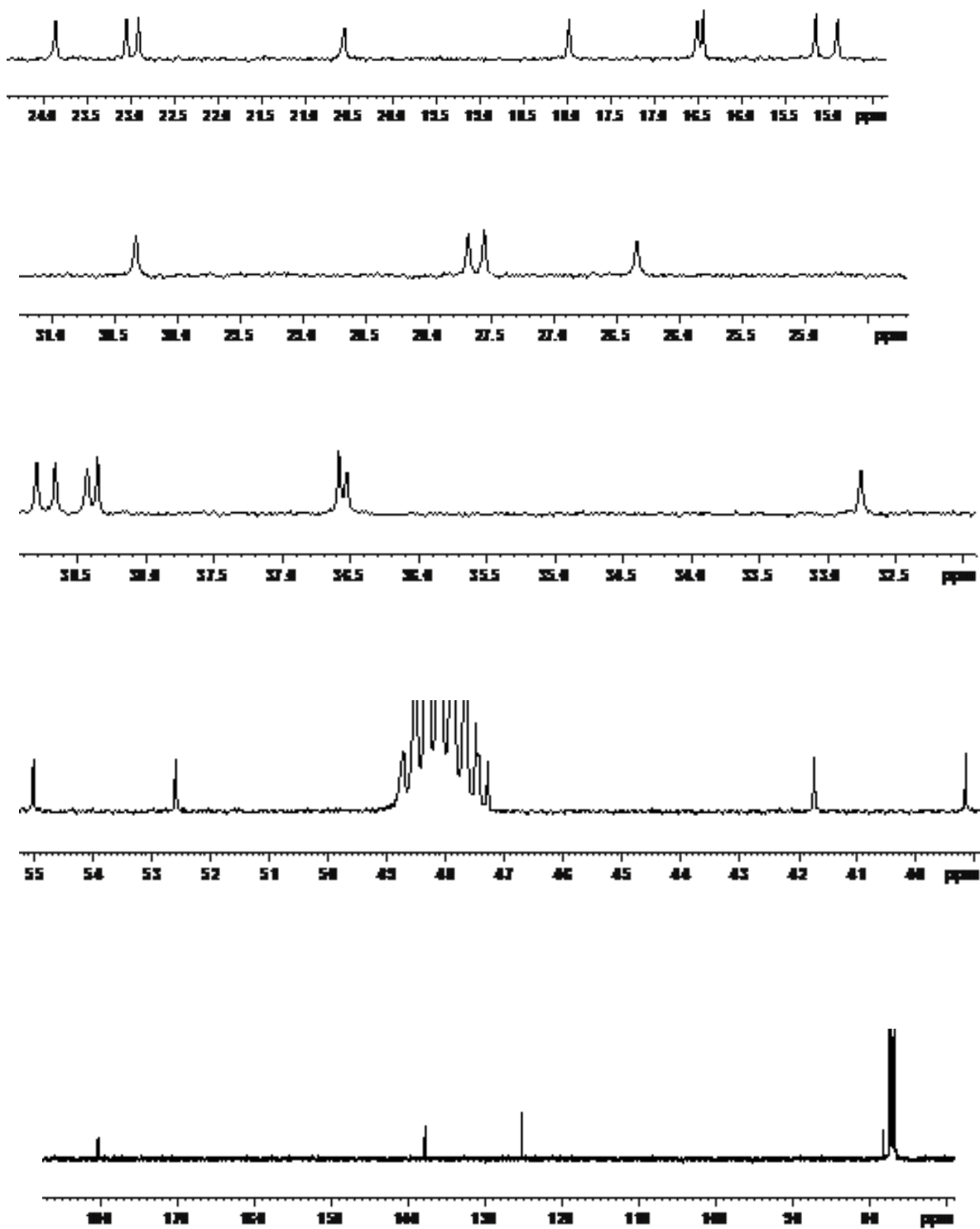


Figura 71. Espectro de RMN ^{13}C da DMM3 com expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

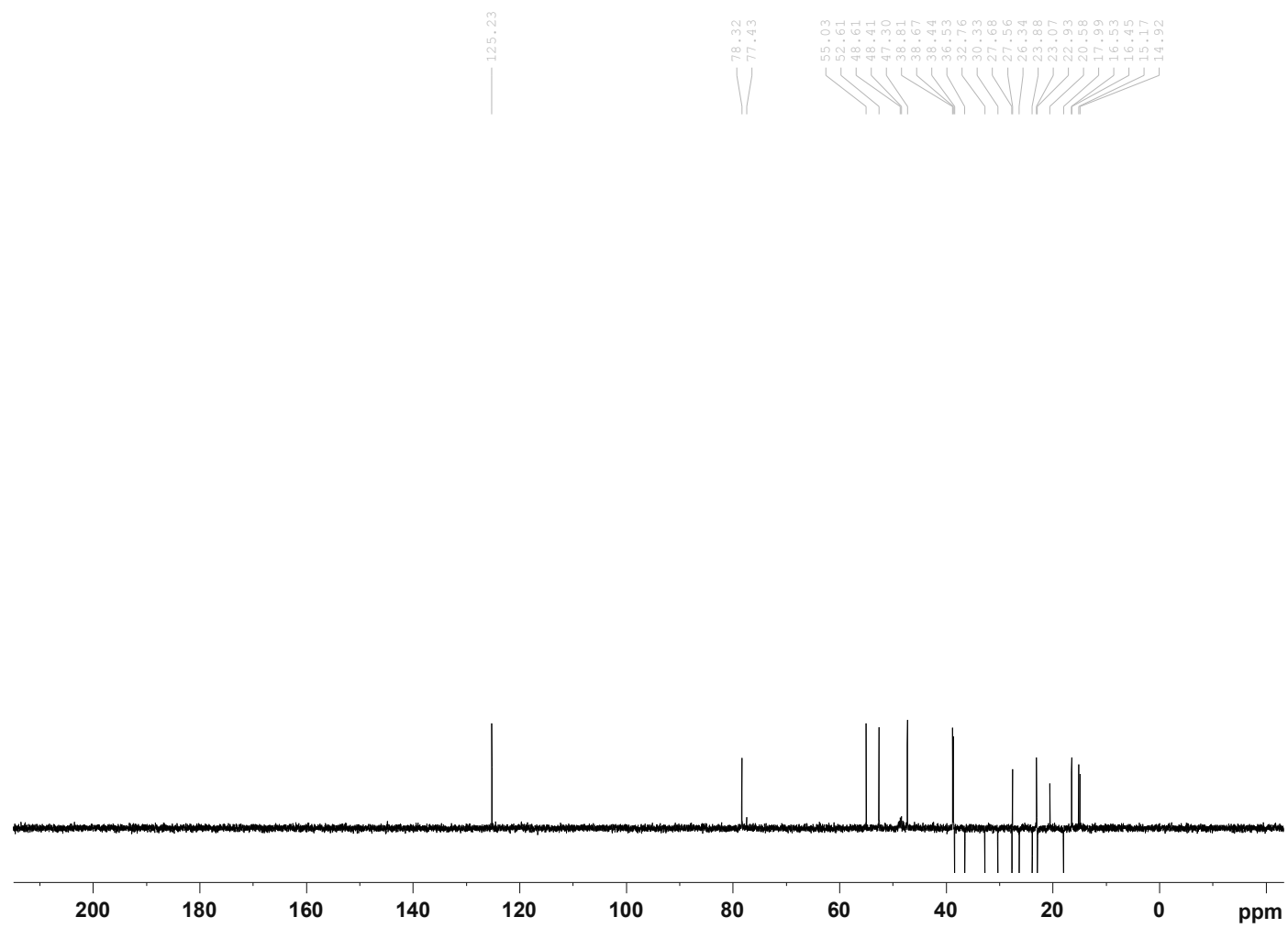


Figura 72. Espectro de DEPT 135 da DMM3, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

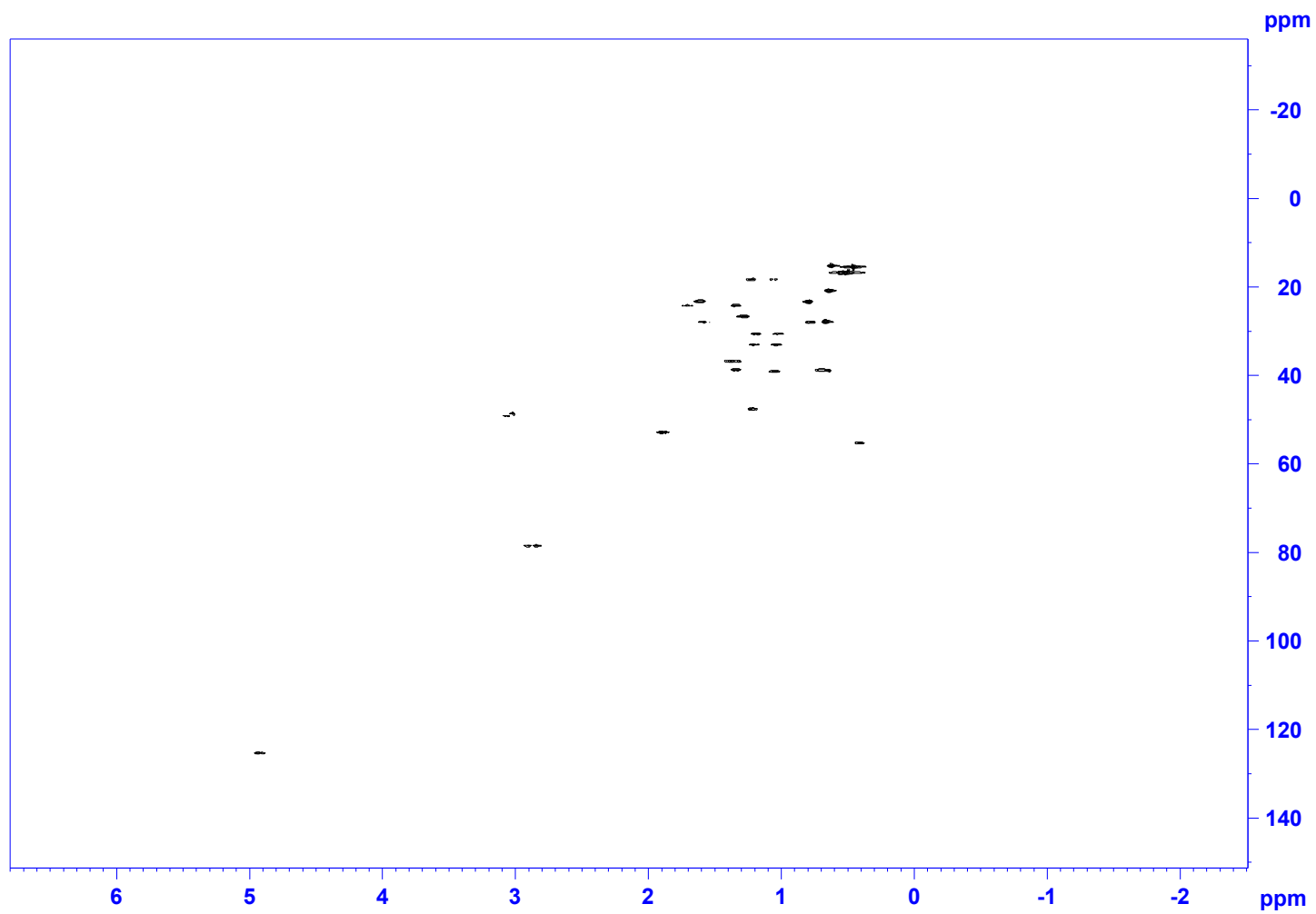


Figura 73. Espectro de HSQC da DMM3, Solvente CDCl₃/MeOD 1:1.

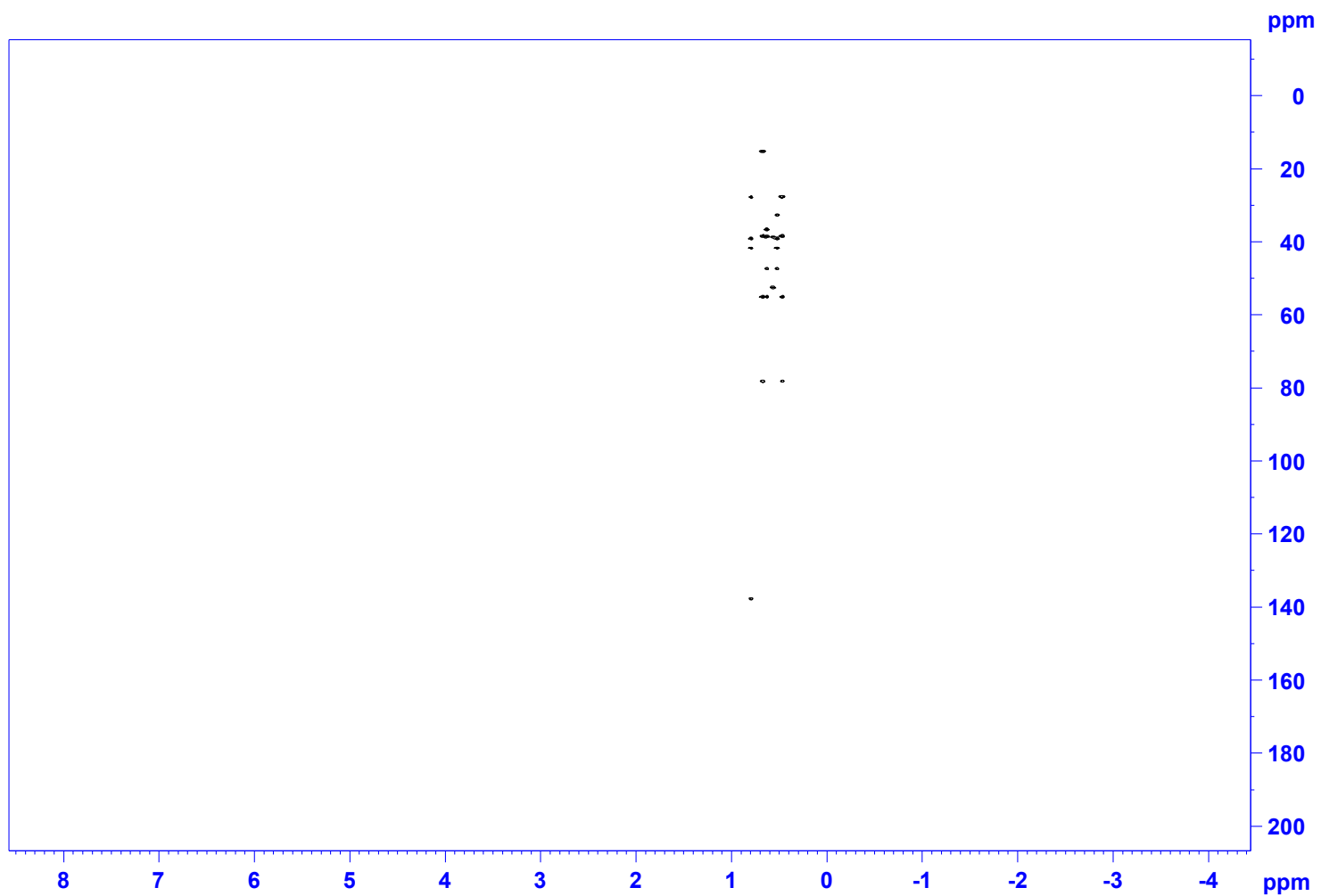


Figura 74. Espectro de HMBC da DMM3, Solvente CDCl₃/MeOD 1:1.

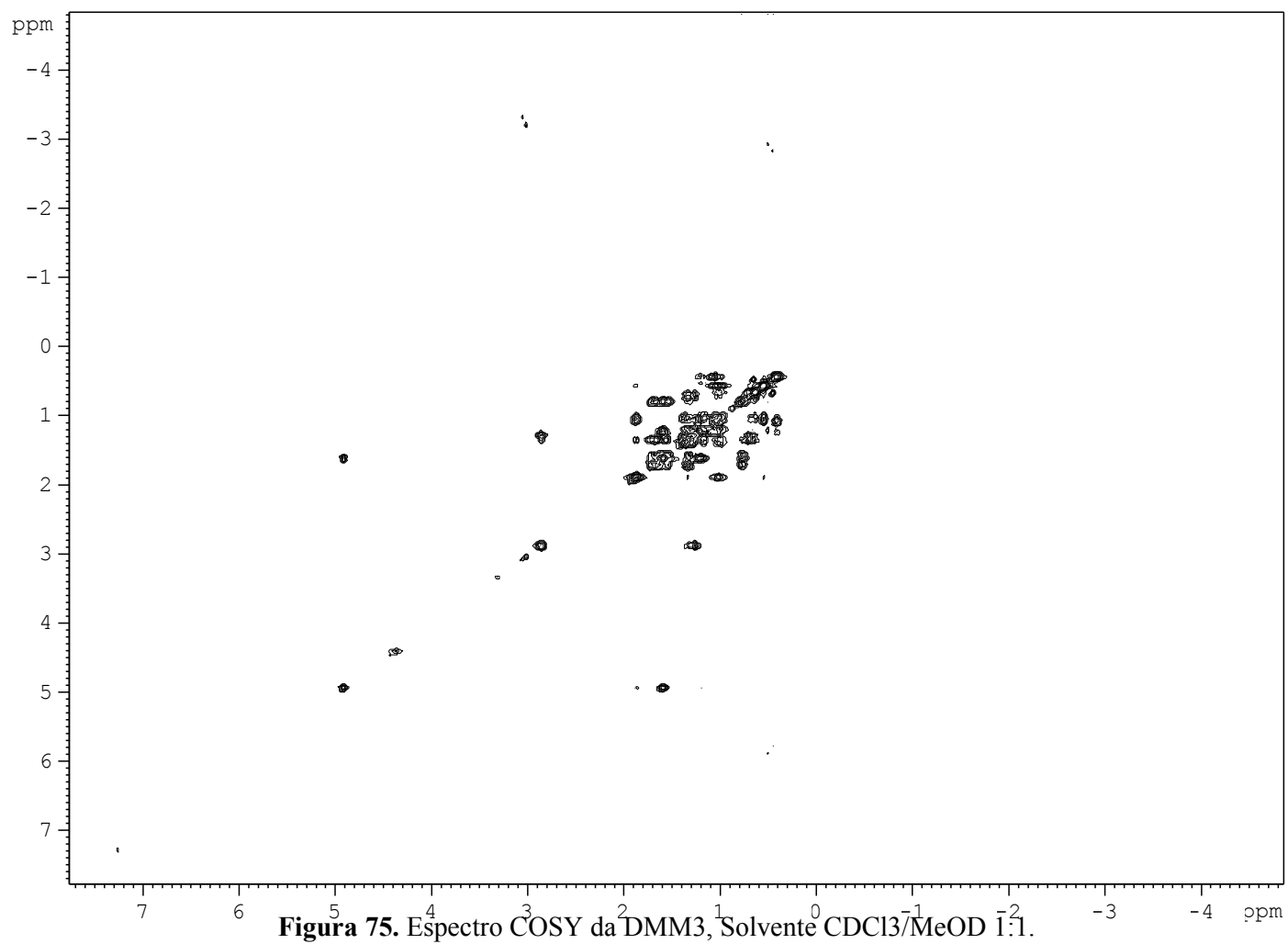


Tabela 8. Dados de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT135°, HSQC, HMBC, COSY e NOESY da substância DMM3. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 1:1.

			H^1	HMBC		COSY		NOESY
	Carbono	δC^{13}	δH^1	δH^1	ΔHa	ΔHb	δHa	δHb
1	CH_2	38,43	0,68m; 1,34m	0,62 (H-25)	0,68(H-1) ;[1,34 (H-1)]	1,34 (H-1);2,86(H-3)		
2	CH_2	26,34	1,25m; 1,32m		1,32(H-2) ;[1,25(H-2)]	1,32(H-2) ;2,86(H-3) [1,25(H-2);2,86(H-3)]		
3	CH	78,32	2,86dd($J=5,37e$ 10,80Hz)	0,65(H-23); 0,45(H-24)	2,86(H-3)	2,86(H-3);1,34 (H-1); 1,32(H-2);1,25(H-2);	2,86(H-3)	1,25(H-2);0,65(H-23);0,45(H-24)
4	C	38,30		1,20 (H-9);0,65 (H-23); 0,45 (H-24)				
5	CH	55,03	0,41d	0,65 (H-23); 0,45 (H-24)	0,41(H-5)	1,05(H-6);	0,41(H-5)	1,20 (H-6)
6	CH_2	17,99	1,05m; 1,20m	0,41(H-5)	1,05(H-6);[1,20(H-6)]	1,05(H-6);0,41d (H-5);	1,20 (H-6)	0,41(H-5);0,65 (H-23);0,78 (H-27)
7	CH_2	32,75	1,03m ;1,18m	0,53(H-26)			1,03(H-7)	0,78 (H-27);0,62(H-25);0,53(H-26)
8	C	39,16		1,20 (H-9);0,78 (H-27);0,53 (H-26)				
9	CH	47,29	1,20m	4,91 (H-12); 0,62 (H-25);0,53 (H-26)				
10	C	36,58		0,41 (H-5); 1,20 (H-9);0,62 (H-25)				
11	CH_2	27,68	0,77m ;1,54m	0,78 (H-27)	0,77(H-11); [1,54(H-11)]	0,77(H-11);1,54(H-11) [1,54(H-11);0,77(H-11);]		
12	CH	125,23	4,91t($J=3,4\text{Hz}$)	1,20 (H-9);1,87 (H-18); 0,77(H-11);	4,91(H-12)	1,58(H-15);1,65(H-15); 1,87 (H-18)	4,91(H-12)	1,87 (H-18);1,54(H-11);0,53(H-30)
13	C	137,92		1,58(H-15);1,87 (H-18); 0,78 (H-27);				
14	C	41,74		1,20 (H-9); 4,91 (H-12);1,87 (H-18); 0,53 (H-26); 0,78(H-27)				
15	CH_2	22,92	1,58m ;1,65m		1,58(H-15);1,65(H-15);	1,58(H-15); 4,91(H-12); 1,32(H-16);0,78 (H-27);[1,65(H-15);1,32(H-16);0,78 (H-27)]		
16	CH_2	23,87	1,32m; 1,69m	1,87 (H-18)	1,32(H-16); 1,69(H-16);	1,32(H-16);1,65(H-15);1,58(H-15);1,69(H-16);1,87 (H-18) [1,69(H-16);1,32(H-16);0,78 (H-27)]	1,32(H-16);1,69(H-16);	1,32(H-16);1,69(H-16);1,03(H-22);0,78 (H-27); [1,69(H-16);1,32(H-16);1,03(H-22);0,78 (H-27)]
17	C	47,43		1,87 (H-18)				
18	CH	52,60	1,87d	4,91 (H-12);0,55(H-29)	1,87 (H-18)	4,91 (H-12);1,32(H-16);1,04 (H-20); 1,32(H-22);1,03(H-21); 0,55 (H-29)	1,87 (H-18)	0,55 (H-29);0,64 (H-30)
19	CH	38,67	0,69	1,87 (H-18); 0,55 (H-29)				
20	CH	38,80	1,04	0,55 (H-29)	1,04 (H-20)	1,87 (H-18);0,55 (H-29)		
21	CH_2	30,33	1,03m; 1,18m	0,64 (H-30)	1,03(H-21);1,18(H-21);	1,03(H-21);1,87 (H-18);	1,18(H-21)	1,03(H-21);0,64(H-30)
22	CH_2	36,53	1,03m;1,32m	0,64 (H-30)				
23	CH_3	27,55	0,65s	0,45(H-24)	0,65(H-23)	0,45(H-24)	0,65(H-23)	0,45(H-24)
24	CH_3	15,15	0,45s	2,86(H-3); 0,65(H-23);	0,45(H-24)	0,65(H-23)		
25	CH_3	14,91	0,62s	0,41(H-5);1,20 (H-9)				
26	CH_3	16,45	0,53s	1,20 (H-9);0,62 (H-25)	0,53(H-26)	1,04 (H-20)		
27	CH_3	23,06	0,78s					

28	C	180,32		1,69(H-16)
29	CH ₃	16,52	0,55d(<i>J</i> =7,31Hz)	1,87 (H-18)
30	CH ₃	20,56	0,64d(<i>J</i> =7,71Hz)	

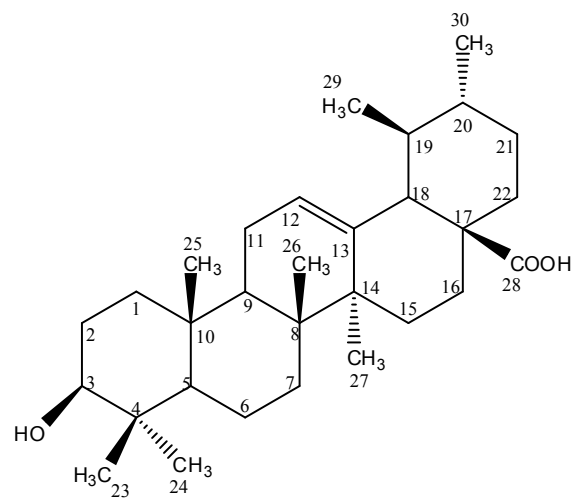


Figura 76. Estrutura da substância DMM3 isolada do caule de *D. morotoni*.

CAPÍTULO III

Atividade Larvicida, Leishmanicida, Moluscicida e Tripanocida de *Didymopanax morototoni* (Aublet.) Decaisne. et Planchon.

Ana Lucila dos Santos COSTA¹, Cenira M. de Carvalho¹, Karlos Antônio L. Ribeiro¹, Milena Botelho P. Soares², José Fernando O. Costa² & Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana^{*1}

¹ Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais. CEP-57.072.970 - Maceió-AL

² Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). CEP-40296710 - Salvador, BA Brazil.

*Corresponding author: anafar2@yahoo.com.br

RESUMO

Muitas são as substâncias do metabolismo vegetal que têm despertado grande interesse acadêmico, principalmente as chamadas plantas medicinais que são fontes de inspiração para trabalhos com substâncias bioativas. No presente estudo, foram avaliadas as atividades Larvicida, Moluscicida, Leishmanicida e Tripanocida de extratos, frações e substâncias isoladas de *Didymopanax morototoni* (Araliaceae). O extrato etanólico da folha mostrou-se ativo com CL₅₀ 55,02 µg. mL⁻¹ frente as larvas do quarto instar de *Aedes aegypti*. O extrato bruto etanólico da raiz apresentou maior atividade moluscicida com CL₅₀ 5,33 µg. mL⁻¹. Os compostos isolados da fração clorofórmica da casca do caule o ácido 3-O-β-D- xilopiranosil (1→3) β- glicopiranosil-oleano-12-en-28- oico e ácido 3-O-β-D- glicopiranosil (1→2) β - arabinopiranosil (4→ 1)β-glicopiranosil- oleano-12-en-28-oico, apresentaram excelente atividade moluscicida com CL₅₀ 1,01 e 0,90 µg. mL⁻¹, respectivamente. A fração hexânica do extrato etanólico da casca do caule apresentou atividade tripanocida.

Palavra - chave: *Didymopanax morototoni*, *Biomphalaria glabrata*, triterpenos, *tripanossoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

There are many of plant substances that have attracted much academic interest, especially the so-called medicinal plants that are sources of inspiration for working with bioactive substances. In the present study, we assessed the larvicidal activity, molluscicides, leishmanicidal and trypanocidal extracts, fractions and substances isolated from *Didymopanax morototoni* (Araliaceae). The ethanol extract of the leaf was active with LC₅₀ 55.02 µg. mL⁻¹ against fourth instar larvae of *Aedes aegypti*. The crude ethanol extract of the root showed higher molluscicidal activity with LC₅₀ 5.33 µg. mL⁻¹. The compounds isolated from the chloroform fraction of the stem bark acid 3-O-β-D-xilopiranosil (1 → 3) β-glucopyranosyl-

olean-12-en-28-oic acid and 3-O- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -arabinopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -glucopyranosyl olean-12-en-28-oic acid, showed excellent activity molluscicide with LC50 1.01 mg and 0.90. mL-1, respectively. The hexane fraction of the ethanolic extract of stem bark showed trypanocidal activity.

INTRODUÇÃO

Didymopanax morototoni (Araliaceae), é popularmente conhecida como “morototó”, “caixeta”, “sambaqui”, entre outros (OHASHI; LEÃO, 2005). Apresenta ampla distribuição geográfica desde a América Central até regiões subtropicais, e em outros países América do Sul (SALOMÃO; SILVA, 2006). No território brasileiro ocorre com frequência na região de Mata Atlântica e em formação florestais inseridas no domínio do Cerrado e na Floresta Amazônica (FIASCHI; PIRANI, 2008). Morototó é extremamente elegante podendo ser amplamente empregada na carpintaria, marcenaria, caixotaria (CÔRREA, 1978), paisagismo (LORENZI, 1992), reflorestamento (MAZZEI *et al.*, 1998), construção civil (CARVALHO, 2003) e na fabricação de celulose (OHASHI; LEÃO, 2005). Os extratos brutos de *D. morototoni* demonstraram atividade anti-helmíntica e larvicida (OMENA *et al.*, 2007), moluscicida (MELÉNDEZ; CAPRILES, 2002).

As doenças tropicais consideradas “negligenciadas” constituem um conjunto de enfermidades prevalentes nos países em desenvolvimento, que afetam indistintamente toda a população, mas que tem tido maior impacto em grupos populacionais em situação de vulnerabilidade social representando um sério obstáculo ao desenvolvimento socioeconômico e a melhoria da qualidade de vida (OMS, 2005).

O uso de derivados de plantas para controle ou erradicação dessas doenças, aliado à imediata disponibilidade de plantas nas áreas afetadas são de grande valor, já que a maior parte da população que vive nessas áreas encontra nos produtos naturais, especialmente nas plantas, a única fonte de recursos terapêuticos disponíveis (LUNA *et al.*, 2005).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico

A planta utilizada neste estudo foi coletada no mês de junho de 2007 no município de Pilar no Estado de Alagoas. A confirmação da identificação botânica foi realizada pelo Prof.

José Elias de Paula, e a exsicata se encontra depositada sob o N° JEP3634UB no Herbário do Departamento de Botânica do Campus da Universidade de Brasília – UnB.

Métodos gerais

As colunas cromatográficas clássicas foram realizadas utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 (70-230 e 230-400 Mesh) da Merck (Alemanha). Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas cromatográficas de gel de sílica G60 PF₂₅₄ da Merck. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro da marca Varian 660-IR/FT-IR, através da técnica de ATR. Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C, uni e bidimensionais, foram registrados em espectrômetro Bruker 400 MHz.

Extração e isolamento dos constituintes químicos

As partes das plantas (casca do caule, madeira, raiz, casca da raiz e folhas) coletadas, foram submetidas a secagem na temperatura ambiente (26 ± 1 °C) e triturados em máquina forrageira. A extração foi efetuada por percolação com etanol 90%, por três vezes e o etanol foi removido em aparelho rotatório a 50 °C sob a pressão reduzida de 30 mmHg. Os extratos brutos, frações e substâncias foram submetidos a bioensaios para avaliar suas atividades moluscicida, larvicida, tripanocida e leishmanicida.

ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os testes larvicida e moluscicida foram realizados no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, e os testes leishmanicida e tripanossomicida foram realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia no Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)-Salvador-BA pelo grupo da professora da Dra. Milena Botelho Pereira Soares.

Avaliação da atividade Larvicida

Larvas de mosquitos *Aedes aegypti*, obtidas a partir de ovos cedidos pelo Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE), foram criadas e mantidas no laboratório de Entomologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

Os ovos desta população de *A. aegypti* foram lavados por submersão em água desclorada a uma temperatura de 26 ± 1 °C e larvas no quarto estágio foram coletadas 72

horas após a lavagem. Cada bioensaio foi conduzido em triplicata, com larvas precoces no 4º instar coletadas do mesmo local de reprodução, utilizando métodos padrão (WHO, 2005).

Foram preparadas soluções com água desclorada a 1 % de DMSO dos extratos etanólicos da madeira caule, cascas do caule, casca da raiz, raiz e folhas de *D. morototoni* na concentração inicial de 500 µg. mL⁻¹. Cada parcela experimental constou de 25 larvas, que foram postas em contato com 20 mL de solução teste. A contagem das larvas foi realizada a 24 h e 48 h do início do experimento. Paralelamente, foram realizados testes de controle com solução aquosa de DMSO a 1 % e com o larvicida sintético, Temephos® [(O,O'-(tiodi-4,1-fenileno)bis(O,O-dimetilfosforotiolato)] a 3 µg/mL. A análise foi realizada utilizando o probit com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para calcular as concentrações letais (CL₁₀, CL₅₀ e CL₉₀) (MCLAUGHLIN *et al.*, 1991).

Avaliação da atividade Leishmanicida

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain) foram cultivadas em meio *liver infusion tryptose* (LIT) suplementado com soro bovino fetal (FBS) 10%, urina humana estéril 5% e gentamicina a uma concentração final de 50 µg.mL⁻¹ a 26 °C e pH 7,2. Os parasitas foram incubados na presença dos extratos ou frações vegetais na concentração de (100, 33, 11, 3 e 1 µg.mL⁻¹) em placas de 96 poços. Foram plaqueados 5 x 10⁶ células/poço em volume final de 200 µL, sendo avaliada em triplicata. Após 24, 72 e 120 h uma contagem direta dos parasitas viáveis foi realizada em uma câmara de Neubauer, utilizando um microscópio de contraste de fase. Após esse período, adicionou-se o MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio] e incubou-se novamente a 26 °C durante 2 horas, após as quais foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda 570 nm. A viabilidade dos parasitos foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor de absorbância obtido. Os percentuais de atividade anti-*L.amazonensis* foram definidos comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado. Como referência foi utilizado Anfotericina B.

Avaliação da atividade moluscicida

Os testes de atividade moluscicida foram realizados com os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* Say na fase adulta, criados em laboratório e descendentes de

exemplares, não infectados por trematódeos, originários da região de Barreiro de Cima, zona periférica de Belo Horizonte, Minas Gerais. Essa população caracteriza-se por possuir 5 % de exemplares albinos (SANTOS, 2005). Os caramujos foram mantidos em aquários sob circulação contínua de água desclorada e a uma temperatura de 28 °C. A metodologia utilizada está de acordo com a descrita na literatura (SANTOS E SANT'ANA, 1999). Foram testados os extratos etanólicos da casca do caule, madeira do caule, casca da raiz, raiz e folhas. O ensaio biológico para avaliação da atividade moluscicida consistiram na imersão do caramujo em soluções aquosas a 0,1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) dos extratos etanólico, frações e subfrações sob investigação nas concentrações apropriadas (SANTOS E SANT'ANA, 1999). O ensaio consistiu na imersão do caramujo em uma solução aquosa a 0,1 % de DMSO dos extratos, frações e isolados sob investigação, por 24 horas, nas concentrações apropriadas. Decorrido esse período, os moluscos foram lavados, introduzidos em água desclorada e alimentados, permanecendo sob observação por mais 24 horas, com registro e retirada dos caramujos mortos. Nos bioensaios foram utilizados cinco caramujos em 125 mL de solução, em concentrações que variaram de 100 µg. mL⁻¹ a 5 µg. mL⁻¹, sendo cada concentração testada em triplicata. Os extratos que apresentaram atividade moluscicida em concentrações abaixo de 100 µg. mL⁻¹, nos bioensaios, foram considerados ativos e submetidos a testes posteriores onde foram utilizados 5 caramujos, mantendo sempre a relação de 25 mL de solução por caramujo, sendo cada concentração testada em triplicata. Paralelamente, foram realizados testes de controle com solução aquosa de dimetilsulfóxido a 0,1 % e com o moluscicida Niclosamida® a 3 µg. mL⁻¹. Para a determinação dos valores de CL₉₀, CL₅₀ e CL₁₀ através análise de regressão linear, utilizando o programa Probit.

Avaliação da atividade Tripanossomicida

Os epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (linhagem Y) foram cultivados em meio *liver infusion tryptose* (LIT) suplementado com FBS 10%, urina humana estéril 5% e gentamicina 50 µg. mL⁻¹ a 26 °C e pH 7,2. Os parasitas foram cultivados em placas de 96 poços com 10⁷ células/poço, em volume final de 200 µL. Foram realizados controles sem tratamento, consistindo de cultura dos parasitas em meio LIT, e com tratamento com uma droga com atividade anti-*T. cruzi* conhecida, a anfotericina B a 25 µg. mL⁻¹. Os parasitos foram incubados durante 24 horas a 26 °C em presença dos extratos ou frações testados (100, 10 ou 1 µg. mL⁻¹). Após 24 h as placas foram pulsadas com MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). As placas foram incubadas a 37 °C durante 3 h uma vez que o metabolismo desse sal pelos parasitos demonstrou-se mais intensas nesta temperatura e lidas em

espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular devices, Sunnyvale, CA) em 570 nm. Os percentuais de atividade anti-*T. cruzi* foram determinados comparando-se os valores das absorvâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade contra larvas do quarto instar de *Aedes aegypti* pelos extratos e frações de *D. morototoni*

Dos extratos etanólicos analisados na concentração de 500 µg. mL⁻¹ os extratos da folha, casca do caule e raiz de *D. morototoni* apresentaram resultados satisfatório com taxa de mortalidade de 90, 75 e 70% respectivamente. O percentual de larvas mortas em diferentes concentrações permitiu determinar os valores de CL₅₀ (**Tabela 9**).

Dentre as amostras analisadas foi possível constatar que o extrato etanólico da folha, de *D. morototoni*, apresentou a melhor atividade frente às larvas de *A. aegypti* com CL₅₀ 55, 02 µg. mL⁻¹. De acordo com a literatura (CHENG *et al.*, 2003), substâncias com valores de CL₅₀ menores que 100 µg. mL⁻¹ são considerados bons agentes larvicidas.

Do fracionamento, guiado por bioensaio do extrato etanólico da folha e casca do caule utilizando partição líquido/líquido nenhuma fração demonstrou atividade a 100 µg. mL⁻¹ para as larvas do quarto instar de *Aedes aegypti*. Esse resultado pode está de acordo com a observação feitas por Kao *et al.*, (2001) que frações vegetais devem ser analisadas também em conjunto, vistos que existe a possibilidade de uma ação sinérgica ou aditiva entre eles. Nenhum composto isolado foi ativo frente as larvado quarto estágio de *A. aegypti*.

(**Tabela 9.** Atividade larvicida das frações da folha e casca do caule de *D. morototoni* sobre larvas do quarto estágio *A. aegypti*.)

Atividade do extrato e frações da casca do caule de *D. morototoni* contra formas promastigotas de *Leshmania amazonensis*

Nenhuma fração ou extrato mostrou efeito significativo sobre as formas promastigotas do parasito, uma vez que os percentuais foram menores que 60%, o que é preconizado pela Fundação Oswaldo Cruz (Bahia) como percentual ideal mínimo de atividade para que um extrato ou substância seja considerado um bom candidato a estudo.

Atividade dos extratos, frações e substâncias isoladas de *D. morototoni* contra caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*

Extratos:

Os extratos brutos etanólico da folha e casca da raiz de *D. morototoni* demonstraram uma fraca atividade causando 30% de mortalidade frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* na concentração de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ nesta concentração são considerados inativo. Os extratos etanólicos da madeira, casca do caule e raiz causaram a morte total dos caramujos na concentração de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, demonstrando uma forte atividade moluscicida, e os estudos prosseguiram com estes extratos. Os valores de CL_{10} , CL_{50} , CL_{90} encontram-se na **Tabela 10**. Dos extratos brutos etanólico da casca do caule, madeira do caule e raiz o que apresentou a melhor atividade moluscicida foi o extrato da raiz com CL_{50} 5, 336 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Os extratos de *Phytolacca dodecandra* CL_{50} 3,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (SOUZA *et al.*, 1987) e do látex de *Euphorbia milii* CL_{50} 0,12 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (OLIVEIRA-FILHO & PAUMGAETTEN, 2000) são considerados os mais ativos até agora descritos na literatura. O extrato de *D. morototoni* possui uma excelente atividade, na mesma ordem de grandeza do extrato da *Phytolacca dodecandra* e cerca de uma potencia menor do que o da *Euphorbia milii*.

No entanto segundo recomendações da WHO (1993) extratos vegetais com CL_{50} menor que 20 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ pode ser empregado diretamente no combate ao molusco e merecem atenção em termos de purificação e isolamentos dos compostos ativos.

Frações:

Frações do extrato bruto da madeira

As frações hexânica e acetato de etila oriunda da partição líquido-líquido do extrato bruto da madeira exibiram respectivamente atividade moluscicida com CL_{50} de 74, 55 e 19, 57 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. No entanto os compostos isolados da fração hexânica da madeira, a mistura de sitosterol e estigmasterol, ácido oleanólico e ácido ursólico não apresentaram atividade moluscicida.

Frações da raiz

Das frações oriundas da partição líquido-líquido do extrato bruto da raiz as frações clorofórmica e acetato de etila exibiram atividade moluscicida com CL_{50} 15,18 e 12,96 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente.

Frações e subfrações da casca do caule:

Das frações oriundas da partição líquido-líquido do extrato bruto da casca do caule apenas as frações clorofórmica e acetato de etila exibiram atividade moluscicida com CL_{50} de 15,184 e 0,014 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente, havendo diferença significativa entre a atividade moluscicida das duas frações quando testados em *B. Glabrata*. As subfrações $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20% e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50% da fração clorofórmica da casca do caule foram ativas frente aos caramujos *Biomphalaria glabrata* com CL_{50} 8,045 e 3,329 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente.

Atividade moluscicida das substâncias isoladas da subfrações $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50% clorofórmica da casca do caule

Das substâncias isoladas de *D. morototoni* apenas as saponinas triterpênicas ácido 3-O- β -D-xilopiranosil (1 \rightarrow 3) β - glicopiranosil-oleano-12-en-28-oico (DMCC1) e o ácido 3-O- β -D- glicopiranosil (1 \rightarrow 2) β - arabinopiranosil (4 \rightarrow 1) β -glicopiranosil- oleano-12-en-28 oico (DMCC3) apresentaram excelente atividade moluscicida com CL_{50} 1,012 e 0,906 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, respectivamente (**Tabela 10**). Substâncias puras com atividades moluscicida menores que 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ possuem valor comercial (HOSTETTMANN *et al.*, 1982).

(**Tabela10.** Atividade moluscicida dos extratos, frações e isolados de *D. morototoni* sobre caramujo adulto de *B. glabrata*)

Atividade do extrato e frações da casca do caule contra as formas epimastigotas do *T. cruzi*

Dentre o extrato etanólico da casca do caule e suas frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila, butanólica e hidroalcoólica), apenas a fração hexânica foi ativa contra o parasito.

CONCLUSÃO

O extrato etanólico da folha de *D. morototoni* exibiu atividade larvicida com CL_{50} 55,02 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Dos extratos brutos etanólicos o da raiz apresentou maior atividade moluscicida com CL_{50} 5,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e apenas as frações em clorofórmio e em acetato de etila exibiram atividade moluscicida com CL_{50} 15,18 e 12,967 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente. As frações em clorofórmio e em acetato de etila do extrato etanólico do caule exibiram atividade moluscicida com CL_{50} de 15,18 e 0,014 $\mu\text{g. /mL}$ respectivamente. As subfrações $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20% e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50% da fração clorofórmica foram ativas frente aos caramujos *Biomphalaria glabrata* com CL_{50} 8,04 e 3,32 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Os compostos isolados da

fração clorofórmica da casca do caule ácido 3-O-β-D- xilopiranosil (1→3) β- glicopiranosil-oleano-12-en-28-oico (DMCC1) e 3-O-β-D- glicopiranosil (1→2) β - arabinopiranosil (4→1)β-glicopiranosil- oleano-12-en-28-oico (DMCC3) apresentaram excelente atividade moluscicida com CL₅₀ 1,012 e 0,906 µg. mL⁻¹, respectivamente. A fração hexânica do extrato etanólico da casca do caule apresentou atividade tripanocida.

Os resultados desse trabalho foram conclusivos para afirmar que *D. morototoni* possui potencial para o controle de vetores da esquistossomose mansônica e da dengue.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras** Colombo: Embrapa Florestais, p. 2003, p. 1039.
- CHENG, S. S. *et al.* Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 99-102, 2003.
- CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, IBDF, v. 1,3,5, 1978.
- FIASCHI, P., PIRANI, J. R. Padrões de distribuição geográfica das espécies de *Schefflera* J. R. Forst. & G. Forst. (Araliaceae) do Brasil extra-amazônico. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.4, p.633-644, 2008.
- HOSTETTMANN, K., KIZU, T., TOMIMORI, T. Molluscicidal properties of various saponins. **Planta Médica**, v. 44, p.34-35, 1982.
- KAO, S. T. *et al.* The chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. **Life Sciences**, v. 69, p. 1485-1496, 2001.
- LUNA, J. S. *et al.* A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 199-206, 2005.
- MAZZEI, L. J. *et al.* Crescimento de plântulas de *Schefflera morototoni* (Aubl.) Maguire, Steyermark & frodin em diferentes níveis de sombreamento no viveiro. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v. 3, p. 27 – 36, 1998.
- MCLAUGHLIN, J. L., CHANG, C. J., SMITH, D. L “Bench-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman, A.U. (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 1991.
- MELÉNDEZ, P. A., CAPRILES, V. A. Molluscicidal activity of plants from Puerto Rico. **Annals of Tropical Medicine Eparasitology**, v.96, n. 2, p. 209-218, 2002.
- OHASHI, S. T., LEÃO, N. V. M. Morototó *Schefflera morototoni* (Aubl.) Maguire, Steyermark & frodin. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia, n. 12, 2005. Disponível em: <<http://www.rsa.ufam.edu.br/8080/sementes/especies/pdf/doc12.pdf>> Acesso em 11 setembro de 2009.

OLIVEIRA-FILHO, E. C., PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicity of *Euphorbia milii* látex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p.342-350, 2000.

OMENA, M. C. *et al.* Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2549-p2556, 2007.

SALOMÃO, A. N., SILVA, J. A. da (Ed.) Reserva Genética Florestal Tamanduá. Brasília: **Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia**, 2006, 137 p.

SANTOS, A. F. **Determinação da Atividade Anti-Esquistossomótica de Extratos e Substâncias Puras Obtidas de Plantas**. Maceió. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas.

SANTOS, A. F., SANT'ANA, A. E. G. Molluscicide activity of the diterpenoids jatrophone and jatrofolones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. **Phytotherapy Research**, v.13, p. 660-664, 1999.

SOUZA, C. P. *et al.* Atividade moluscicida do extrato butílico de *Phytolaca dodecandra* (Endod) sobre *Biomphalaria glabrata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 345-349, 1987.

World Health Organization. **Guidelines for laboratory field testing of mosquito larvicides**. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2005.13.WHO, Geneva, 2005.

World Health Organization. Strategic and technical meeting on intensified control of neglected tropical diseases: A renewed effort to combat entrenched communicable diseases of the poor: Report of an international workshop, Berlin, 18–20 April 2005 [Internet]. WHO; 2006 [Acesso 05 março 2009]. 46p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_2006.1_eng.pdf.

World Health Organization. **Tropical Disease Research**. World Health Organization, Geneva, 1993.

World Health Organization. **The control of schistosomiasis**. Second report of WHO expert committee. Geneva: World Health Organization, 1993.

Tabela 9. Atividade larvicida do extrato etanólico da folha e casca do caule de *D. morototoni* sobre larvas do quarto estágio *A. aegypti* em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Extrato etanólico	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₉₀
Folha	45,633(33,299-86,197)	55,0264	454,181(359,125- 652,231)
Casca do Caule	63,794 (54,949 - 69,884)	110,941 (100,403- 131,800)	192,932(55,016 – 292,841)

Tabela 10. Atividade moluscicida de extratos, frações e isolados de *D. morotoni* sobre caramujos adultos de *B. glabrata* CL em $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

Extrato e Frações da	CL₁₀	CL₅₀	CL₉₀
Casca do Caule			
Extrato Bruto Etanólico	9, 878 (8, 553-11, 184)	38, 610 (35, 407-42, 328)	150, 906 (127, 892-183, 590)
Fração Clorofórmica	9, 684 (9, 092 -10, 214)	15, 184 (14, 665-15, 726)	23, 810 (22, 545-25, 400)
CHCl ₃ /MeOH 20%	0, 812 (0, 367-1, 340)	8, 045 (6, 702-9, 375)	79, 687 (52, 986-151, 402)
CHCl ₃ -MEOH 1:1	0, 850 (0, 698-1, 008)	3, 329 (2, 998-3, 671)	13, 036(11, 617-14, 829)
DMCC1	0, 363 (0, 325-0, 400)	1, 012 (0, 938-1, 097)	2, 821 (2, 483-3, 273)
DMCC3	0, 287 (0, 253-0, 321)	0, 906 (0, 837-0, 983)	2, 855 (2, 503-3, 325)
Fração Acetato de etila	0, 002 (000-0, 002)	0, 014 (0, 001-0, 042)	0, 953 (0, 667-1, 698)
Extrato e Frações da Madeira			
Extrato Bruto Etanólico	12, 860 (11, 411-14, 273)	37, 424 (34, 930- 40, 139)	108, 905 (97, 274-124, 077)
Fração Hexânica	3, 624 (1, 974 -5, 378)	74.558 (55.199-116.087)	1533, 839 (669, 449-5776, 587)
Fração Acetato de Etila	7, 638 (6, 941-8, 311)	19, 573 (18, 525-20, 691)	50, 161 (45, 906-55, 472)
Extrato Frações da Raiz			
	CL₁₀	CL₅₀	CL₉₀
Extrato Bruto Etanólico	0, 042 (0, 008-0, 112)	5, 336 (3, 865-7, 422)	670, 955 (247,1 -3371,8)
Fração Clorofórmica	9, 684 (9, 092-10, 214)	15, 184 (14, 665-15, 726)	23, 810 (22, 545-25, 400)
Fração Acetato de Etila	7, 212 (6, 523-7, 814)	12, 967 (12, 517-13, 39)	23, 311 (21, 970-25, 085)

CL:concentração letal , IC 95%:intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

CAPÍTULO IV

Atividade Anticolinesterásica, Antiretroviral, Antitumoral, Imunomodulatória de *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch.

Ana Lucila dos Santos Costa¹, Roberta Costa Santos Ferreira¹, Dannielle de Lima Costa¹, Teresinha Gonçalves da Silva², Milena Botelho Pereira Soares³, Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana *¹

¹ Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alago., Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais , Campus A. C. Simões s/n Cidade Universitária– Maceió – AL, Brasil. CEP: 50050-900.

² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

³ Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)-Salvador-BA

RESUMO

Didymopanax morototoni (Aubl.) Dcne. et Planch., é uma planta da família Araliaceae popularmente conhecida como caixeta, mandioqueira e louro-sambaqui. A casca do caule é usada no tratamento da picada de escorpião, úlceras e feridas, sua madeira é empregada no tratamento de abscessos e suas folhas são utilizadas no tratamento da malária. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial biológico *in vitro* das atividades anticolinesterásica, antiviral, antitumoral e imunomodulatória dos extratos, frações e isolados de *D. morototoni*. Os extratos etanólico da folha e casca da raiz a 50 µg. mL⁻¹ inibiram a transcriptase reversa em 100 e 51% respectivamente. Substâncias isoladas de *D. morototoni* foram ativas a 10 µg. mL⁻¹ com inibição da transcriptase reversa variando de 42 a 59%. O extrato da casca do caule exibiu atividade antitumoral com CI₅₀ 8 µg. mL⁻¹ contra as células NCI-H292 e 3,44 µg. mL⁻¹ contra as células K5632. O extrato e as frações da casca do caule inibiram a linfoproliferação variando de 64,08 a 99,25 %.

ABSTRACT

Didymopanax morototoni (Aubl.) Dcne. et Planch., is a plant family Araliaceae popularly known as caixeta, louro - sambaqui and mandioqueira. The stem bark is used to treat scorpion bites, ulcers and wounds, its wood is used in the treatment of abscesses and their leaves are used to treat malaria. The aim of this study was to evaluate the biological potential *in vitro* anticholinesterase activity, antiviral, immunomodulatory and antitumor extracts, fractions and isolated from *D. morototoni*. The ethanolic extracts of the leaf and root bark of 50 µg. mL⁻¹ inhibited the reverse transcriptase in 100 and 51% respectively. Substances isolated from *D. morototoni* were active at 10 µg. mL⁻¹ reverse transcriptase with inhibition ranging from 42 to 59%. The extract of the stem bark exhibited antitumor activity with IC₅₀ 8 µg. mL⁻¹ against NCI-H292 cells and 3.44 µg. mL⁻¹ against K5632 cells. The extract and fractions from the stem bark inhibited lymphoproliferation ranging from 64.08 to 99.25%.

INTRODUÇÃO

A espécie *Didymopanax morototoni* é pertencente à família Araliaceae é popularmente conhecida como morototó. O uso de espécies do gênero *Schefflera* para o tratamento de doenças reumáticas, artrite, fraturas, entorses, lombalgia é rotineiro na China e em certos países asiáticos (YANG *et al.*, 1996).

O mal de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa que destrói as células do cérebro lenta e progressivamente; é caracterizada por uma deterioração das faculdades superiores, manifestando-se inicialmente por alterações na memória episódica. Estes déficits amnésicos agravam-se com a progressão da doença, e são posteriormente acompanhados por alterações visuoespaciais e de linguagem (RITCHOE; LOVESTONE, 2002). Uma característica marcante da doença é a perda progressiva de neurônios colinérgicos localizados nos núcleos de Meinert (DAVIES; MALONEY, 1976; SCHLIEBS; ARENDT, 2006).

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus imunodeficiência humana (HIV), um retrovírus pertencente à família Retroviridae, cujo processo de replicação do material genético é procedido por um processo de transcrição reversa, onde a partir do RNA é produzida a molécula de DNA (GALLO; MONTAGNEIR, 1988). Conhecido há pouco mais de 27 anos, o HIV já causou cerca de 25 milhões de mortes no mundo (FERREIRA, *et al.*, 2010).

Atualmente, o câncer é considerado a segunda principal causa de morte humana no mundo ocidental (COZZI, 2003; OTTO, 2002). A incidência média desta enfermidade é de aproximadamente 10 milhões, com 5 milhões de mortes que ocorrem por ano (OMS, 2005).

As células cancerosas possuem comportamento alterado devido a mutações sofridas pelo seu DNA. Estas mutações permitem que a célula prolifere desreguladamente e lhe confere capacidade de invadir outros tecidos do organismo. O câncer pode matar devido à invasão destrutiva de órgãos sadios por células cancerosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

Apesar dos variados esforços desprendidos na busca de terapias mais eficazes para o tratamento do câncer, o sucesso nos tratamentos medicamentosos tem se mostrado discreto, não somente pelo grau de agressividade da doença ou pelos mecanismos de escape das células neoplásicas, mas também pela toxicidade medular exercida pelos agentes antineoplásicos clássicos (RAFFERTY *et al.*, 1996; NEWMANN, 2003).

Grande parte dos fármacos antitumorais atualmente utilizados em clínica são produtos naturais derivados de plantas, microrganismos ou animais (BEIRA, 2000). Os produtos

naturais têm sido uma importante fonte de componentes antineoplásicos. Existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas no mundo, sendo que mais de 1000 plantas apresentam propriedades antitumorais significantes (FERRAZ *et al.*, 2005; MUKHERJEE *et al.*, 2001)..

A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou através de supressão de elementos do sistema imunológico (KIRKLEY, 1999). A exacerbação das reações imunes é definida como imunoestimulação, enquanto que a imunossupressão implica principalmente na diminuição da resistência a infecção (PATWARDHAN *et al.*, 1990; MAKARE *et al.*, 2001). Neste sentido, vários estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias capazes de auxiliar o sistema imune no combate a microrganismos patogênicos, ou a doenças com outras etiologias, tais como câncer e doenças auto-imunes (LABRO, 2000).

Constituintes ativos das plantas medicinais são considerados recursos promissores em esquemas terapêuticos (MAKARE *et al.*, 2001) voltados para o tratamento de estados imunossupressivos e imunodeficientes (MATHEW; KUTTAN, 1999). Uma substância imunomoduladora é importante para o tratamento de câncer e doenças infecciosas (HARADA *et al.*, 2002, HARADA *et al.*, 2006). Segundo Spelman *et al.* (2006), o imunomoduladores fitoterápicos podem ser definidos como produtos originários de plantas que alteram a atividade do sistema imune por meios de regulação dinâmica de moléculas informais, como citocinas, hormônios, neurotransmissores e outros peptídios.

No que tange a investigação de novas substâncias com finalidade medicinal de origem vegetal os primeiros passos compreendem os testes *in vitro*, por se tratarem de sistema de alta capacidade com custo relativamente baixo (LÜLLMANN *et al.*, 2000; DOUBLE, 2002; BRUNTON, 2006, VAN ROMPAY, 2010).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar as atividades anticolinesterásica, antiretroviral, citotóxicas, inibição de linfócitos e NO de extratos brutos, frações e compostos isolados de *D. morototoni*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

A planta utilizada neste estudo foi coletada no mês de junho de 2007 no município de Pilar no Estado de Alagoas. A confirmação da identificação botânica foi realizada pelo Prof. José Elias de Paula, e a exsicata se encontram depositada sob o N°JEP3634 (UB) no Herbário do Departamento de Botânica do Campus da Universidade de Brasília – UnB.

Preparo dos extratos

As partes das plantas (folhas, madeira do caule, casca do caule, raiz e casca da raiz), foram submetidas à secagem a temperatura ambiente (26 ± 1 °C) e trituradas em máquina forrageira (Nogueira S.A. Máquinas Agrícolas, Itapira, S. P., Brasil). O material pulverizado das folhas (500 g), madeira do caule (2000 g), casca do caule (2000 g), raiz (300 g) e casca da raiz (100 g) foram submetidos separadamente à percolação com álcool etílico a 90% previamente destilado, por quatro vezes e o álcool etílico foi removido em aparelho rotatório a 50 °C e pressão de 30 mmHg. Foram obtidos 60 g de extrato bruto etanólico da folha, 225 g de extrato bruto etanólico da madeira do caule, 300 g de extrato bruto etanólico da casca do caule, 42 g de extrato bruto etanólico da raiz e 18 g de extrato bruto etanólico da casca da raiz os quais foram separadamente, solubilizados em MeOH:H₂O (3:1) e extraídas sucessivamente com solventes em ordem crescente de polaridade *n*-C₆H₁₄, CHCl₃ e AcOEt e BuOH.

A fração clorofórmica da casca do caule forneceu os compostos DMCC1, DMCC2 e DMCC3. A fração hexânica da madeira forneceu os compostos DMM1, DMM2 e DMM3.

Local de realização dos ensaios biológicos

Os experimentos da avaliação da atividade anticolinesterásica e retroviral foram realizado no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O teste da atividade imunomodulatória foi realizado pelo grupo da professora Dra. Milena Botelho Pereira Soares do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)-Salvador-BA e os testes da avaliação da atividade citotóxica foram realizados pelo grupo da professora Prof^ª. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos e Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Medida da atividade de acetilcolinesterase em cromatografia em camada delgada fina

Para avaliação do potencial inibitório da acetilcolinesterase foram utilizados ensaio qualitativo (CCD) e quantitativo (Microplaca) utilizando o método de Ellman com modificações (TREVISAN *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 2003; NIÑO *et al.*, 2006).

Ensaio da atividade anticolinesterásica em cromatografia em camada delgada fina

Prepararam-se as seguintes soluções: (1) 50 mM Tris/HCl pH 8; (2) 0.1 mM de iodeto de acetilcolina (ACTI - Sigma); (3) 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzólico] (DTNB ou reagente de Ellman - Sigma), (4) (enzima acetilcolinesterase (pó liofilizado contendo 1,18 mg; 426 U/mg de sólido - Sigma).

A enzima AChE liofilizada foi dissolvida na solução tampão (1) para fazer uma solução estoque 502, 68, deixando-se na solução por 20 min, depois sob agitação por mais um período de 10-15 min, para obtenção de uma solução homogênea. Para as diluições posteriores, utilizou-se a solução tampão (1) para obter uma solução final a 3 U/mL.

Ensaio em cromatografia de camada delgada (CCD)

Os extratos e frações das folhas, madeira do caule e casca do caule, raiz e casca da raiz de *D. morototoni*, foram solubilizados em metanol ou mistura de metanol : clorofórmio (1:1) para uma concentração de 3 mg/mL. Utilizou-se como controle a cumarina na concentração de 2 mg/mL solubilizada em metanol. As amostras e o controle (2,5 µL) foram aplicados em cromatoplas DC-Alufolien, Sílicagel 60 F254, 0,2 mm (Merck). Em seguida a placa foi levada para capela de exaustão para evaporação por completo do solvente.

Borrifou-se a placa com uma solução de (2) + (3) (1:1), deixando 3 minutos. Após secar, borrifou-se a enzima 3U/m e em 10 min, apareceu a coloração amarela, mas onde houve inibição da enzima, observou-se um halo branco. Em 20 - 30 min a coloração desapareceu.

Ensaio da atividade anticolinesterásica em microplaca

Para os ensaios da atividade anticolinesterásica em microplacas foram preparadas as seguintes soluções: Tampão A: 50 mM de Tris-HCl em pH 8,0; Tampão B: 50 mM de Tris-HCl em pH 8,0 contendo 0,1 % de albumina bovina sérica (BSA); Substrato: 15 mM de iodeto de acetilcolina (ATCI) (Sigma) solubilizado em água desionizada; Reagente de

Ellman: 3mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB-Sigma) dissolvido no tampão A; Enzima: Acetilcolinesterase (pó liofilizado contendo 1,18 mg; 426 U/mg de sólido - Sigma). A enzima foi inicialmente dissolvida no tampão A para obtenção de uma solução estoque 502,68 U/mL. Em seguida esta solução foi diluída no tampão B para a obtenção de uma solução final a 0,2 U/mL, concentração necessária para realização do ensaio em microplaca. Amostra: extratos e frações de *D. morotoni*, foram solubilizados em metanol para produzir uma solução estoque de 3 mg. mL⁻¹. Em seguida essa solução foi diluída 10 vezes com o tampão A. Controle positivo: 2 mM de carbaril dissolvido em metanol. Branco: metanol a 10 % com o tampão A.

Para a reação enzimática no ensaio em microplaca utilizou-se espectrofotômetro Thermo Scientific - Multiskan Spectrum. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. Em cada poço da placa foi adicionado 125 µL de DTNB; 50 µL de tampão B; 25 µL da amostra ou branco ou controle positivo e 25 µL da enzima acetilcolinesterase 0,2 U. mL⁻¹. Em seguida a velocidade da reação enzimática foi medida 10 vezes a cada 13 segundos. Após este período adicionou-se 25 µL do substrato ATCI, e a absorvância foi novamente medida por 10 vezes a cada 13 segundos. Antes de cada leitura a placa foi levemente agitada por 10 segundos.

Após a leitura espectrofotométrica, a velocidade da reação antes de adicionar o substrato foi subtraída da velocidade de reação depois da adição do substrato. A porcentagem de inibição das amostras foi calculada por comparação com a inibição observada no branco (10 % de metanol em tampão A).

Segundo, Trevisan (2003), os extratos são considerados candidatos a futuros fracionamentos somente quando a inibição enzimática for maior ou igual a 50 %.

Teste de inibição da TR do HIV-1

Para o ensaio da inibição da TR em microplaca foi utilizado: 1. TR recombinante do HIV-1, diluída em tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,25 de albumina sérica bovina (BSA); 2. Tampão de incubação (50 mM de tampão Tris 319 mM de cloreto de potássio, 33 mM de cloreto de magnésio, 11mM de DTT, pH 7,4); 3. Nucleotídios; 4. *template/primer*; 5. Tampão de lise (50 mM de tampão Tris, 80 mM de cloreto de potássio, 2,5 mM DTT, 0.75 mM EDTA, 0,5% de triton X-1000, pH 7.8); 6. Placa tratada com estreptavidina ; 7. Solução

de anticorpos anti-digoxigenina conjugados à peroxidase (anti-DIG-POD); 8. ABTS (ácido 2, 2-azino-bis(etilbenziazolino-6-sulfônico).

Para avaliar o efeito inibitório dos extratos, frações e substâncias puras sobre a transcriptase reversa (TR) do HIV foi utilizado um método colorimétrico quantitativo imunoenzimático (Reverse Transcriptase Assay, Roche[®], Germany). O teste foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Utilizamos TR recombinante do HIV-1, diluída em tampão de lise na concentração de 2ng/poço e um tempo de incubação de 2 horas.

Foram adicionados em uma placa de 96 poços, 40 µL da solução com nucleotídeos e o *template/primer*, 40µL de tampão de lise com 4ng de TR recombinante do HIV-1 e 40µL de tampão de lise com os extratos, frações e substâncias a serem testados. Esta placa foi incubada por 2h a 37°C, para que a TR, utilizando o *template/primer*, pudesse produzir DNA proviral, incorporando nucleotídeos marcados com digoxigenina e biotina.

Após a incubação, foram transferidos 60 µL desta mistura para cada poço de uma placa tratada com estreptavidina, incubando-se por 1h a 37°C para que a biotina pudesse ligar o DNA proviral sintetizado, à superfície da microplaca revestida com estreptavidina. A seguir, cada poço foi lavado cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem e foram adicionados 200 µL/poço, da solução de anticorpos anti-digoxigenina conjugados à peroxidase (anti-DIG-POD) na concentração de 200 mU/mL. Incubou-se a placa por 1h a 37°C, a fim de que o anti-DIG-POD se ligasse ao DNA marcado com digoxigenina.

Removeu-se então a solução dos poços e estes foram lavados cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem.

Na etapa final adicionou-se 200 µL/poço do substrato para peroxidase ABTS. A enzima peroxidase cataliza a clivagem do substrato, produzindo um produto de reação colorimétrica. A intensidade da coloração das amostras foi determinada utilizando-se um leitor de microplaca no comprimento de onda de 490nm. A intensidade da coloração, e conseqüentemente a absorvância, está diretamente correlacionada ao nível de atividade da TR na amostra.

Avaliação da atividade citotóxica frente às células cancerígenas

Os testes de citotoxicidade foram realizados frente a duas linhagens celulares: células NCIH292 (Carcinoma de pulmão humano) e células K-562 (Leucemia mielóide humana) obtidas da seção de culturas celulares do Instituto Adolfo Lutz (SP) e mantidas de acordo com

o protocolo estabelecido pelo laboratório de cultura de células do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT [sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium] vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por ter a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbrometo] (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (**Figura 77**).

Este teste realiza ensaios quantitativos para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica presente no ambiente biológico estudado (Mosman, 1983). Neste ensaio, o sal MTT solúvel e de cor amarela é acumulado pelas células por endocitose e no interior da mitocôndria a enzima succinato desidrogenase reduz o anel tetrazólico deste sal formando o produto insolúvel de cor azul, *formazan* (CHIBA *et al.*, 1998, CRUZ *et al.*, 2004).

As células foram mantidas em DMEM – Minimum Essencial Médium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM.

A viabilidade celular representa o percentual de células não coradas, a qual foi determinada utilizando-se o corante vital Azul Tripán (Merck) 0,4% p/v, em tampão fosfato (PBS). A contagem das células foi realizada em microscópio invertido LETIZ, com a utilização de um hemocitômetro, preenchido com uma alíquota da solução que é formada por 0,35 mL de solução salina (NaCl 9%), 0,1 mL de suspensão celular e uma gota de azul tripan (0,05 mL), que cora as células mortas de azul.

Uma suspensão celular (10^5 células/mL) foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (225 μ L em cada poço), as quais foram incubadas por 24h a 37°C em estufa (Sedas, Milão- Itália), com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. Após 24h foram adicionados os extratos e frações e substâncias puras (25 μ L/poço) e as placas foram reincubadas a 37 °C. Após 72 h de contato das células com o produto teste, foi adicionado em cada poço, 25 μ L de MTT a uma

concentração de 5 mg/mL em PBS (p/v) e a placa foi deixada por duas horas em estufa 37 °C . Ao final desse período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT, foi aspirado em seguida, 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para a dissolução de cristais Formazan (ALLEY *et al*, 1998).

A leitura óptica foi feita em leitor automático e placas, do tipo BIO-RAD Modelo 3550 (595 nm), e a densidade óptica (DO) média dos poços, foi comparada com a DO média dos poços controles. As concentrações testadas foram (50,00, 25,00, 12,50 e 6,25 µg/mL), e as concentrações que mataram aproximadamente 50% das células (CI₅₀), foram retestadas em quadruplicatas, para confirmação dos resultados e cálculo da CI₅₀.

Análise Estatística

Os experimentos foram feitos em quadruplicatas e analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) de três experimentos independentes. A determinação da CI₅₀ foi feita a partir de uma regressão não linear, usando o programa *GraphPad Prism*, relacionando-se o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testada.

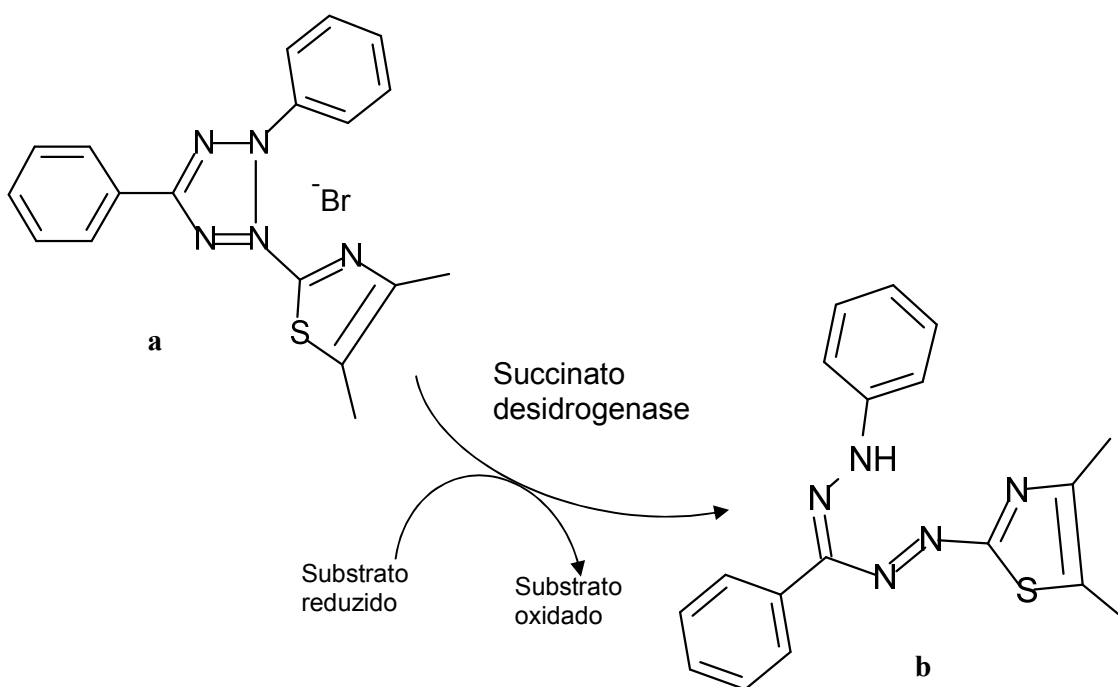


Figura 77. Redução do MTT (a) a formazana (b) por desidrogenases mitocondriais.

Avaliação da inibição da proliferação celular

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com idade entre 2 e 3 meses (n = 1/ensaio), todos oriundos do biotério do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. Os animais sofreram eutanásia em câmara de CO e éter.

Para avaliar a atividade inibitória da linfoproliferação dos extratos e frações de *D. morototoni* foram utilizadas células do baço de camundongos (4×10^5 células/poço) distribuídas em placa de 96 cavidades em meio DMEM completo na presença ou não dos extratos e frações (0,1 mg/mL) estimulada com mitógeno concanavalina A (1 μ g/mL) Sigma, Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e lectina de origem vegetal (*Canavalia ensiformis*) capaz de provocar ativação policlonal dos linfócitos. Cada substância foi testada em triplicata e incubada (37° C/36 h, 5% CO₂). Após incubação foram adicionados 10 μ L de H-timidina (1 μ Ci/poço), sucedendo nova incubação sob as mesmas condições. As células foram então coletadas em membranas de fibra de vidro e submetidas à leitura em um contador de radiação. O percentual de inibição da linfoproliferação foi dado por um índice da inibição da incorporação de H-timidina em culturas de células estimuladas com concavalina A na presença dos extratos, com as células cultivadas apenas em presença dos extratos.

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 lavagem peritoneal, com meio de cultura DMEM suplementado com 50 μ g.mL⁻¹ de gentamicina, foi feita após um período de 4-5 dias de injeção do tioglicolato. As células do exsudato foram distribuídas em placa de cultura de 96 cavidades (2×10^5 células/poço) para posterior incubação em atmosfera úmida (37° C/2 h, 5% CO e 95% ar). Após este período, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não-aderentes, as células aderentes foram estimuladas com 500 ng/mL de lipopolisacarídeos (LPS) (Sigma, EUA; Lipopolysaccharides 0111:B4), IFN- γ (5 ng/mL), 0,1mg/mL de extratos e frações. O controle negativo consistiu de células aderidas, RPMI completo, LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL), e o positivo apenas de células aderidas e RPMI completo. Sucedeu-se a incubação a (37° C/24 h, 5% CO₂). Após 24 horas, 50 μ L 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 (DING *et al.*, 1988). 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 M). A leitura das placas foi feita imediatamente em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. A percentagem 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.

Análise estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados com o auxílio do programa GraphPad InStat (ANOVA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inibição da Atividade Anticolinesterásica

Os resultados obtidos no ensaio qualitativo em CCD demonstram que todos os extratos etanólicos foram positivos com formação de um halo de inibição, com isso as frações foram também destinadas para análise em CCD. Todas as frações foram positivas no ensaio em CCD. No entanto em relação aos ensaios quantitativos realizados em microplaca não houve inibição satisfatória da acetilcolinesterase. Sendo assim os extratos e frações de *D. morototoni* não foram considerados promissores para o fracionamento bio-guiado e para isolamento de princípios ativos (**Tabela 11**).

(**Tabela 11.** Atividade anticolinesterásica quantitativa do extrato e frações de *D. morototoni*)

Inibição da enzima transcriptase reversa

Dos extratos de *D. morototoni* apenas o extrato da folha e da casca da raiz inibiram a ação da enzima transcriptase reversa em 100% e 51% respectivamente. As frações da folha exibiram atividade menor que 40% de inibição da transcriptase reversa. Das frações da casca do caule apenas a hexânica mostrou atividade inibitória. Todas as substâncias isoladas de *D. morototoni* inibiram a TR, sendo a SM3 que apresentou maior potencial inibidor da TR com 70,41% (**Tabela 12**).

(**Tabela 12.** Extratos etanólico, frações e substâncias isoladas de *D. morotoni* que apresentam atividade inibitória da TR do HIV *in vitro*)

Citotoxicidade frente às células cancerígenas

O ensaio do MTT vem sendo rotineiramente utilizado para a detecção de citotoxicidade de compostos sintéticos e de origem natural (SUDO *et al.*, 1994; TAKAHASHI, *et al.*, 2001).

As viabilidades das células NCIH-292 (Carcinoma de pulmão humano) e K-562 (Leucemia mielóide humana) foram avaliadas após 24 h de exposição a diferentes concentrações dos extratos e frações de *D. morotoni* pelo método de redução do corante MTT.

A citotoxicidade é um indicativo inicial da atividade antitumoral presente na maioria dos quimioterápicos. Atualmente, os agentes antitumorais usados clinicamente, na sua grande maioria, possuem marcada atividade citotóxica (AJITH & JANARDTHANAN, 2003). O método de redução do MTT fornece informações sobre a função mitocondrial através da avaliação da atividade da succinato desidrogenase (MOSMANN, 1983). O emprego deste método demonstrou que o extrato bruto etanólico da casca do caule produziu um efeito citotóxico. Os valores de CI_{50} do extrato bruto etanólico da casca do caule foi $3,44 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para células K-562 e $8,01 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para células NCI-H292. Segundo protocolo National Cancer Institute (NCI), valores de $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g. mL}^{-1}$ devem ser considerados significativos para extratos brutos de origem vegetal. Diante dos resultados obtidos partiu para determinação de citotoxicidade das frações obtidas da partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca do caule de *D. morotoni*, foi observado que apenas a fração clorofórmica mostrou atividade citotóxica significativa com CI_{50} 13,32 e $7,97 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para as células NCI-H292 e K562 respectivamente. As subfrações ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 5%) e ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 30%) obtidas após cromatografia em coluna de sílica normal da fração clorofórmica da casca do caule, produziram atividade citotóxica frente à linhagem celular K562 com CI_{50} $29,54 \pm 3,52 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para a subfração ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 5%) e $10,68 \pm 0,53 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para a subfração ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 30%) (**Tabela 13**). As substâncias puras obtidas da casca do caule e caule exibiram atividade CI_{50} maior que $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$ e segundo protocolo do National Cancer Institute (NCI), valores de $CI_{50} \leq 4 \mu\text{g. mL}^{-1}$, devem ser considerados significativos para substâncias puras.

Plantas do mesmo gênero apresentam atividade frente às células cancerígenas o extrato bruto etanólico da folha de *Didymopanax vinosum* apresentou efeito citostático para as linhagens celulares de carcinoma de pulmão humano e leucemia mielóide humana na concentração de 25 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, no entanto o extrato etanólico da casca do caule de *D. morotoni* demonstrou maior atividade para leucemia mielóide humana e carcinoma de pulmão humano com CI_{50} 3,44 e 8,01 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ respectivamente.

Isso permite uma avaliação de substâncias de origem vegetal em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade (SKEHAN *et al.*, 1990).

Os resultados de atividade citotóxica de *D. morotoni* observados frente às linhagens celulares testadas (NCI-H292 e K562), estimulam a continuidade desse estudo considerando que os constituintes com maior ação antineoplásica estariam presentes nas subfrações $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 5% e $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 30% oriunda da fração clorofórmica da casca do caule.

Tabela 13. Atividade citotóxica de extratos, frações e isolados de *D. morotoni* frente às células NCI -H292 e K562.

Potencial imunomodulador

Baixos índices foram observados para a inibição da produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos ativados, pois os percentuais variaram de 0% (fração acetato de etila e hidrometanólica da casca do caule) a 27,42% (fração hexânica da casca do caule) (**Tabela 5**). No entanto, esses extratos inibiram significativamente a proliferação de células esplênicas isoladas de camundongos BALB/c cultivadas com concanavalina A. Este efeito inibitório da linfoproliferação foi mais evidente no extrato bruto da casca do caule com 99,25 e observado em menor escala na fração butanólica com 64,08 quando avaliados na concentração de 0,1 mg/mL (**Tabela 14**). Em geral, a mensuração da imunossupressão baseia-se na detecção do crescimento celular resultante de uma ativação ou de condições da cultura, sendo que a inibição pode ocorrer quando as células têm seus fatores de crescimento suprimidos, ou quando há indução de energia ou apoptose celular (SHE *et al.*, 1998). Todavia, independentemente do modo de ação das drogas, a inibição da proliferação celular parece estar associada a uma atividade antiinflamatória, pois a redução do crescimento celular implica em diminuição de receptores solúveis produzidos por estas células e de proteases que convertem precursores inativos em ativos (PUNZON *et al.*, 2003).

Tabela 14. Atividade imunomodulatória do extrato e frações da casca do caule de *D. morototoni*.

CONCLUSÕES

Os melhores resultados de inibição da enzima transcriptase reversa foram observados para o extrato bruto etanólico da folha e o extrato bruto etanólico da raiz. Todas as substâncias testadas tiveram potencial inibidor da TR. Para a atividade antitumoral observou-se que o extrato bruto etanólico da casca do caule de *D. morototoni* e sua fração em clorofórmio foram capazes de inibir a proliferação de células cancerígenas NCI-H292 e K-562. Esse extrato e suas frações ainda apresentaram satisfatório potencial imunomodulatório

Os resultados desse estudo estimulam novas investigações para avaliar substâncias de origem vegetal em diversos tipos de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade, rapidez, eficiência e reprodutibilidade. O mesmo potencial não foi observado quando se avaliou a espécie vegetal *D. morototoni* frente a inibição de óxido nítrico e atividade anticolinesterásica

REFERÊNCIAS

ALLEY, M. C. **Cancer Research.**, v. 48, p. 589-60, 1988.

AJITH, T. A., JANARDHANAN, K. K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 157-162, 2003.

BEIRA, F. T. A. **Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de La planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.** 2000. 130 f. Tesis (Doctor em Farmacia) – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidadde Barcelona, Barcelona.

BRUNTON, L. L., LAZO, J. S., PARKER, K. L. Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11.ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2006. 1821p.

CHIBA, K., KAWAKAMI, K., TOHYAMA, K. imultaneous Evaluation of Cell ViabilityBy Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. **Toxicology inVitro**, v. 12, p. 251-258, 1998.

COZZI, P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. **II Farmaco**, v.58, n.3, p. 213-220, 2003.

CRUZ, A. S., BARBOSA, M.L., PINTO, T. J. A. Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.1, p.1-9, 2004.

DAVIES, P., MALONEY, A. J. **Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease.** *Lancet*, v. 2, p. 1403, 1976

DING, A., NATHAN, C. F., STUER, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v.141, p.2407-2503, 1988.

DOUBLE, J. Toxicity testing in the development of anticancer drugs. **The Lancet Oncology**, v.3, p. 438-9, 2002.

FERRAZ, A. *et al.* Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, v. 12, p. 112-115, 2005.

FERREIRA, R. C. S., RIFFEL, A., SANT'ANA, A. E. G. HIV: mecanismo de replicação, alvos farmacológicos e inibição por produtos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.8, p.1743-1755, 2010.

GALLO, R. C., MONTAGNEIR, L. Pharmacological strategies for antiHIV therapy. **Scientific American**, v. 259, n. 41, p. 10-16, 1998.

HARADA, T. *et al.* IFN- γ induction by SCG, 1,3-D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBAq2 mice in vitro. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 22, p.1227-1239, 2002.

HARADA, T. *et al.* Mechanism Microbiology and immunology of enhanced hematopoietic response by soluble β -glucan SGC in cyclophosphamide-treated mice. **Microbiology**, v. 50, p. 687-700, 2006.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2000. p. 292-295.

KIRKLEY, S. A. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.5, p.652-657, 1999.

LABRO, R. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales" **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.615-650, 2000.

LÜLLMANN, H. *et al.* **Color Atlas of Pharmacology**, 2.ed. New York, Thieme, 2000. 386p. MAKARE, N., BODHANKAR, S., RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.

MATHEW, S., KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumour activities of *Tinospora cordifolia*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 35-43, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983.

MUKHERJEE, A. K. *et al.* Advances in cancer therapy with plant based natural products. **Curr Med Chem**, v. 8, n. 12, p. 1467-1486, 2001.

NEWMANN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p.1022-37, 2003.

NIÑO, J. *et al.* In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extract from Colombia flora. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101(7), p.783-785, 2006.

OMS-Organização mundial de saúde. Câncer. Disponível em:<<http://www.who.int/cancer/en/>>acesso em 3 maio 2009.

OTTO, S. **Enfermagem Prática:Oncologia**. Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso, 2002, p.526.

PATWARDHAN, B. *et al.* Search of immunomodulatory agents: a review. **India Drugs**, v. 28, n. 2, p. 348-358, 1990.

PUNZON, C., ALCAIDE, A., FRESNO, M. In vitro anti-inflammatory activity of *Phlebodium decumanum*. Modulation of tumor necrosis factor and soluble TNF receptors. **In Immunopharmacol**, v. 3, n. 9, p. 1293-1299, 2003.

RAFFERTY, J. A. *et al.* Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. **Cancer Metast Rev**, v.1, p. 365-383, 1996.

RHEE, I. K., RIJN, R. M. V.; VERPOORTE, R. Qualitative determination of false-positive effects in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.14, p.127-131, 2003.

RITCHOE K., LOVESTONE, S. The dementias. **Lancet**, v. 360, p. 1759-1766, 2002.

SCHLIEBS, R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. **Neurochemical Research**, v.30, p. 895-908, 2005.

SHE, K., KABELITZ, D. Immunology of infection: methods in microbiology. New York: **Academic Press**; 1998.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p.1107-1112, 1990.

SPELMAN, K. *et al.* Modulation of cytokines expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Alternative medicine Review**, v. 11, p. 128-150, 2006.

SUDO, K. *et al.* A sensitive assay system for screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. **Journal of Virological Methods**, v. 49, p. 169-178, 1994.

TAKAHASHI, K. *et al.* Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. **Antiviral Research**, v. 49, p. 15-24, 2001.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p.301-304, 2003.

VAN ROMPAY, K. K. A. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. *Antiviral Research*, v.85, p.159–75, 2010.
 YANG, M. S. *et al.* Triterpene glycosides from *schefflera bodinieri* roots. *Phytochemistry*, v.43, n. 6, p. 1313-1318, 1996.

Tabela 11. Atividade anticolinesterásica quantitativa do extrato e frações de *D. morototoni* a $3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Parte da Planta	Microplaca (% de Inibição)					
	Extrato EtOH	Fração n-C ₆ H ₁₄	Fração CHCl ₃	Fração AcOEt	Fração BuOH	Fração Hidrometanólica
Folha	29,62	0	0	0	0	0
Casca do Caule	22,64	31,69	9,36	8,84	0	21,72
Madeira do Caule	2,06	0	0	0	0	0
Raiz	18,54	14,56	13,81	35,31	11,38	17,44
Casca da Raiz	16,07	0	0	0	0	0
Carbaril	100	-	-	-	-	-

Tabela 12. Extratos etanólico, frações e substâncias isoladas de *D. morototoni* que apresentam atividade inibitória da TR do HIV *in vitro*.

Parte utilizada / solvente da extração	Solvente para diluir	Concentração no teste	% de inibição
Extrato bruto etanólico da casca do caule	EtOH	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	20,77
Extrato bruto etanólico do caule	Água	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0
Extrato bruto etanólico da raiz	Água	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	30,77
Extrato bruto etanólico da casca da raiz	Água	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	51,28
Extrato bruto etanólico da folha	Água	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100
Casca do caule, fração hexânica	EtOH 40%	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	79,62
Casca do caule, fração hidrometanólica	EtOH 40%	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0
Casca do caule, fração clorofórmio	EtOH 40%	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10,38
Casca do caule, fração acetato	Água	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0
Casca do caule, fração butanólica	EtOH	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	33,59
Folha, fração hexânica	EtOH	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	27,14
Folha, fração clorofórmio	EtOH	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25,19
Folha, fração acetato	EtOH	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	36,22
Folha, fração hidrometanólica	Água	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	11,56
DMCC3	EtOH	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	56,30
DMCC1	EtOH	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	54,94
DMM2	EtOH	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	59,11
DMM3	EtOH	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50,18
DMCC2	EtOH	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	70,41
DMM1	EtOH	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	42,24
Efavirenz	EtOH 40%	1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	98

Todos os extratos e frações foram diluídos na concentração de $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Tabela 13. Atividade citotóxica de extratos e frações de *D. morototoni* frente às células NCI -H292 e K562.

Extratos	Linhagens celulares CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	
	NCI-H292	K562
Extrato Bruto Etanólico do Caule	> 50	> 50
Extrato Bruto Etanólico da Casca do Caule	8,0*	3,44*
Extrato Bruto Etanólico da Raiz	> 50	> 50
Extrato bruto Etanólico da Casca da Raiz	> 50	> 50
Extrato bruto Etanólico da Folha	> 50	> 50
Casca caule		
Hexano	> 50	> 50
Clorofórmio	13,32*	7,97*
Acetato de Etila	> 50	> 50
Butanol	> 50	> 50
Hidrometanólica	> 50	> 50
Fração Clorofórmica	ND	
CHCl ₃ /MeOH 5% Casca do caule	ND	29,54±3,52
CHCl ₃ /MeOH 30% Casca do caule	ND	10,68± 0,53
CHCl ₃ /MeOH 50% Casca do caule	ND	> 50
MeOH 100%	ND	> 50
Etoposídeo	ND	4.48±0,23

*valores considerados significativos

Tabela 14. Atividade imunomodulatória do extrato e frações da casca do caule de *D. morototoni*

Parte da Planta	% inib. NO	% inib. Linfo
Extrato Bruto da casca do caule	14,23	99,25
Fração Hidromatanólica	0,00	67,95
Fração Hexânica	27,42	98,68
Fração Clorofórmica	5,14	98,15
Fração Acetato de etila	0,00	67,64
Fração Butanólica	1,76	64,08

6. CONCLUSÃO GERAL

O estudo fitoquímico de *Didymopanax morototoni* (Araliaceae) conduziu até o presente momento, no isolamento de dois triterpenos glicosilados [ácido 3-O-β-D-glicopiranosil (1→2) β - arabinopiranosil (4→ 1) β-glicopiranosil- oleano-12-en-28-oico,, ácido 3-O-β-D- xilopiranosil (1→3) β- glicopiranosil-oleano-12-en-28-oico], dois terpenos os ácidos ursólico e oleanólico, dois fitoesteróides glicosilado [3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol e 3-O-β-D-glicopiranosil-estigmasterol] e dois fitoesteróides, o sitosterol e o estigmasterol. A avaliação do potencial larvicida revelou que o extrato da folha de *D. morototoni* apresentou atividade larvicida com CL₅₀ 55,02 µg. mL⁻¹.

No teste da atividade moluscicida os extratos etanólicos da raiz, casca do caule e madeira mostrou-se ativos contra a espécie *Biomphalaria glabrata* com CL₅₀ = 5,33; 38,6 e 37, 42 µg. mL⁻¹ respectivamente. Os compostos isolados da fração clorofórmica da casca do caule o ácido 3-O-β-D- xilopiranosil (1→3) β- glicopiranosil-oleano-12-en-28- oico e ácido 3-O-β-D-glicopiranosil (1→2) β - arabinopiranosil (4→ 1)β-glicopiranosil- oleano-12-en-28-oico, apresentaram excelente atividade moluscicida com CL₅₀ 1,01 e 0,90 µg. mL⁻¹, respectivamente. A fração hexânica do extrato etanólico da casca do caule apresentou atividade tripanocida.

Os extratos etanólico da folha e casca da raiz a 50 µg. mL⁻¹ inibiram a transcriptase reversa em 100 e 51% respectivamente. Substâncias isoladas de *D. morototoni* foram ativas a 10 µg. mL⁻¹ com inibição da transcriptase reversa variando de 42 a 59%. O extrato da casca do caule exibiu atividade antitumoral com CI₅₀ 8 µg. mL⁻¹ contra as células NCI-H292 e 3,44 µg. mL⁻¹ contra as células K5632. O extrato e as frações da casca do caule inibiram a linfoproliferação variando de 64,08 a 99,25 %.

A avaliação da atividade anticolinesterásica revelou que os extratos etanólicos das folhas, casca e madeira do caule, raiz e casca da raiz de *D. morototoni* são positivos para o teste qualitativo, no entanto quanto ao teste quantitativo os extratos não apresentaram atividade inibidora da AChE.

Esta pesquisa foi de suma importância, tendo em vista que da planta em estudo foram isolados esteróides e triterpenos que exibiram atividade antiviral e moluscicida, visto que até o momento não havia nenhum relato da riqueza química e biológica deste vegetal.