

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

JÉSU COSTA FERREIRA JÚNIOR

**Estudo Químico Monitorado pelas Atividades Larvicida Antibacteriana e Anti-  
inflamatória de Duas Espécies de Bignoniaceae (*Tabebuia elliptica* (A. DC.)  
Sandwith e *T. roseo-alba* Ridl.)**

**Maceió/AL  
2015**

JÉSU COSTA FERREIRA JÚNIOR

**Estudo Químico Monitorado pelas Atividades Larvicida Antibacteriana e Anti-inflamatória de Duas Espécies de Bignoniaceae (*Tabebuia elliptica* (A. DC.) Sandwith e *T. roseo-alba* Ridl.)**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria  
Conserva

Coorientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Emiliano de Oliveira  
Barreto.

**Maceió/AL  
2015**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

F383e Ferreira Júnior, Jéssu Costa.  
Estudo químico monitorado pelas atividades larvicida antibacteriana e anti-inflamatória de duas espécies de Bignoniaceae (*Tabebuia elliptica* (A. DC.) Sandwith e *T. róseo-alba* Ridl.) / Jéssu Costa Ferreira Júnior. – 2015. [153]f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Lucia Maria Conserva.  
Coorientador: Emiliano de Oliveira Barreto.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2015.

Bibliografia: f. 131-145.  
Anexos: f. [146]-[153].

1. Produtos naturais – Atividade Anti-inflamatória. 2. Produtos naturais – Atividade antimicrobiana. 3. Efeito larvicida. 4. Química orgânica. 5. Fitoquímica. I. Título.

CDU: 547.9:615.2



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Jésu Costa Ferreira Júnior** intitulada: “**Estudo Químico Monitorado pelas Atividades Larvicidas, Antibacteriana e Anti-inflamatória de Duas Espécies de Bignoniaceae (*Tabebuia elliptica* e *T. roseo-alba*)**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 27 de maio de 2015, às 09h, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucia Maria Conserva  
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto  
Coorientador (ICBS/UFAL)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Teresa Salles Trevisan  
(DQ/UFC)

Prof. Dr. José Rui Machado Reys  
(ESENFAR/UFAL)

Prof. Dr. Edson de Souza Bento  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima  
(IQB/UFAL)

Dedico a realização deste trabalho inicialmente a **Deus**, por sempre iluminar meus caminhos;

Aos meus pais **Jésu Silva** e **M<sup>a</sup> da Penha**, pelo amor que me dedicaram durante todos os momentos da minha vida e por terem batalhado pela minha educação o que sem dúvida permitiu que eu chegasse até aqui;

A minha esposa **Larissa Soares**, por todo amor, incentivo, paciência, compreensão e preocupação pelas inúmeras vezes que sai de madrugada da universidade.

E a todos os familiares pelo apoio e bons momentos compartilhados.

## AGRADECIMENTOS

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Conserva**, por compartilhar seus conhecimentos, profissionalismo, oportunidade e bons momentos durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao **Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto**, pela disponibilidade, presteza e por pontuar de forma objetiva os experimentos;

A botânica **Rosângela Pereira de Lyra Lemos**, do Instituto do Meio Ambiente/AL, pela coleta e identificação do material vegetal;

Ao **Sr. Nilo Pinto**, da Reserva de Proteção Ambiental da Usina Coruripe, pela grande contribuição na localização das espécies vegetais;

A **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lysete de A. Bastos**, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas, pela colaboração nos ensaios antibacterianos;

Ao **Prof. Dr. Edson de Souza Bento** e ao técnico e amigo **Adilson Rodrigues Sabino**, pelos espectros de RMN;

Aos colegas do LPqPN: **Anderson Marques, Rossiel Aslan, Cinthia Lima, Luana Barros, Thaisa Alyvia**, pela amizade, apoio e transmissão conhecimentos;

Ao técnico de laboratório do LPqPN, **Fernando Maia**, pela disposição e acessibilidade;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)**, **Ministério da Ciência e Tecnologia-Instituto do Milênio do Semi-Árido (MCT-IMSEAR)** e **Banco do Nordeste-Rede Nordestina de Biotecnologia (BNB-RENORBIO)** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

**“Os gênios são as raras pessoas com grande capacidade mental, pessoas inteligentes são mais esforçadas que outras, desta forma, precisamos mais de pessoas esforçadas do que de gênios”**

Jésu Jr.

## RESUMO

Este trabalho apresenta o estudo químico monitorado pelas atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antibacteriana e larvicida de duas espécies de Bignoniaceae [*Tabebuia elliptica* (A. DC.) Sandwith e *T. roseo-alba* Ridl.]. Após secagem a temperatura ambiente e trituração, materiais das cascas, caule e folhas de ambas as espécies foram extraídos através de maceração com metanol e/ou acetona. Após eliminação dos solventes a pressão reduzida, os extratos brutos foram suspensos em solução de metanol e água e extraídos sucessivamente com hexano, clorofórmio e acetato de etila. As frações resultantes deste procedimento foram avaliadas no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético e exibiram uma redução significativa da resposta nociceptiva. O estudo químico de algumas das frações de *T. roseo-alba* resultou no isolamento e identificação através da técnica de RMN de duas neolignananas [Icarisideo E<sub>4</sub> e o (7R, 8S) - Álcool diidrodeidroconiferílico], um derivado do ácido benzoico (ácido p-metoxibenzoico), uma mistura de dois triterpenos (ácidos ursólico e oleanólico) e um fitoesteróide (sitostenona); enquanto que de frações de *T. elliptica* resultou no isolamento de um iridoide clorado (rehmaglutina D), um fenilpropanoide (ácido cumárico) e um fitoesteróide (β-sitosterol). Nos ensaios farmacológicos, Icarisideo E<sub>4</sub> mostrou um efeito antinociceptivo periférico, com o envolvimento de canais de potássio ATP-K<sup>+</sup> e o ácido cumárico reduziu significativamente os níveis de leucócitos totais, neutrófilos, bem como a porcentagem de células produtoras de ROS no modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS exibindo um potencial anti-inflamatório. Extratos do caule e das folhas de ambas as espécies apresentaram potencial antibacteriano contra cepas de *S. aureus* e *E. faecalis* e nos ensaios larvicidas, embora os extratos brutos das cascas, caule e folhas tenham exibido baixos índices de mortalidade a 250 ppm, as frações em hexano e clorofórmio das cascas e do caule de *T. roseo-alba* e em acetato do caule de *T. elliptica*, apresentaram altos índices de mortalidade. As substâncias, Icarisideo E<sub>4</sub> e (7R, 8S) - Álcool diidrodeidroconiferílico, estão sendo descritas pela primeira vez no gênero *Tabebuia* e o isolamento do iridoide clorado Rehma glutina D neste trabalho poderá auxiliar no posicionamento do gênero *Tabebuia* dentro da família Bignoniaceae.

**Palavras-chave:** *Tabebuia elliptica*. *Tabebuia roseo-alba*. Bignoniaceae. Icarisideo E<sub>4</sub>. Ácido cumárico.

## ABSTRACT

This work shows chemical study monitored by antinociceptive, anti-inflammatory, antimicrobial and larvicidal activities of two Bignoniaceae species [*Tabebuia elliptica* (A. DC.) Sandwith and *T. roseo-alba* Ridl.]. After drying at room temperature and grinding, the material from stem barks, stems and leaves of both species were extracted by maceration with methanol and/or acetone. After removal of the solvents under vacuum, crude extracts were suspended in methanol and water solution and successively extracted with hexane, chloroform and ethyl acetate. The fractions resulting from this procedure were evaluated in writhing model induced by acetic acid and exhibited a significant reduction of nociceptive response. Chemical studies of some fractions from these extracts of *T. roseo-alba* resulted in the isolation and identification by NMR technique of two neolignans [Icariside E<sub>4</sub> and (7R, 8S) - dihydrodehydrodiconiferyl alcohol], a benzoic acid derivative (p-methoxybenzoic acid), a mixture of two triterpenes (ursolic and oleanolic acids) and a phytosteroid (sitostenone); while from *T. elliptica* fractions resulted in the isolation of a chlorinated iridoid (rehmaglutin D), a phenylpropanoid (coumaric acid) and a phytosteroid ( $\beta$ -sitosterol). In pharmacological tests, Icariside E<sub>4</sub> showed a peripheral antinociceptive effect, involving potassium channel ATP-K<sup>+</sup> and coumaric acid significantly reduced levels of total leukocytes, neutrophils, as well as the percentage of ROS-producing cells in acute lung inflammation model induced by LPS showing an anti-inflammatory potential. Extracts from stems and leaves of both species showed antimicrobial activities against strains of *S. aureus* and *E. faecalis* and in the larvicidal assays, although the crude extracts of the barks, stems and leaves have exhibited low mortality at 250 ppm, hexane and chloroform fractions from barks and stems of *T. roseo-alba* and ethyl acetate from stems of *T. elliptica*, showed high mortality percentages. Substances, Icariside E<sub>4</sub> and (7R, 8S) - dihydrodehydrodiconiferyl alcohol, are being described for the first time in the genus *Tabebuia* and the isolation of the chlorinated iridoid, *Rehmaglutina D*, in this work can aid in positioning the *Tabebuia* genus in the Bignoniaceae family.

**Key-words:** *Tabebuia elliptica*. *Tabebuia roseo-alba*. Bignoniaceae. Icariside E<sub>4</sub>. Coumaric acid.

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1-</b>	Proposta biossintética para formação de diferentes tipos estruturas de iridoides.	47
<b>Esquema 2-</b>	Formação do ácido hipocloroso pela heme cloroperoxidase Fe-dependente	55
<b>Esquema 3-</b>	Cloração regioespecífica do Triptofano pela halogenase FADH <sub>2</sub> -dependente, catalisada pela SAM.	56
<b>Esquema 4-</b>	Produção de halometanos por meio de enzimas metil transferases, catalisada pela SAM	56
<b>Esquema 5-</b>	Reação de redução do CTT	73
<b>Esquema 6-</b>	Formação de <i>Rehmaglutina D</i> a partir do <i>Catalpol</i> .	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Processamento sensorial da dor.....	24
Figura 2 -	Ilustração do Processo inflamatório agudo.....	25
Figura 3 -	Estruturas e esqueleto geral de lignanas.....	36
Figura 4 -	Estruturas dos lignoides encontrados em espécies de <i>Tabebuia</i> .....	38
Figura 5 -	Esqueletos básicos de iridoides (A) e seco-iridoides (B) e estruturas de <i>iridodial</i> e <i>iridotrial</i> .....	46
Figura 6 -	Estruturas de iridoides clorados encontrados em plantas superiores. .....	51
Figura 7 -	Fotos das espécies coletadas na Reserva de proteção ambiental da Usina Coruripe.....	58
Figura 8 -	Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as cascas de <i>T. elliptica</i> .....	64
Figura 9 -	Esquema geral efetuado com as cascas de <i>T. roseo-alba</i> .....	66
Figura 10 -	Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as folhas de <i>T. roseo-alba</i> .....	69
Figura 11 -	Compostos isolados de <i>T. elliptica</i> (Te) e <i>T. roseo-alba</i> (Tr).....	76
Figura 12 -	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância TeCaA-1.....	78
Figura 13 -	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância TeCaA-1.....	79
Figura 14 -	Espectro DEPT 135 (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância TeCaA-1.....	80
Figura 15 -	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD/CDCl <sub>3</sub> ) da substância TeCaA-2.....	86
Figura 16 -	RMN <sup>35</sup> Cl (39,20 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância TeCaA-2.....	86
Figura 17 -	Espectro HSQC ( <sup>1</sup> H: 400; <sup>13</sup> C: 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância TeCaA-2.....	87
Figura 18 -	Espectro RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD/CDCl <sub>3</sub> ) da substância TeCaA-2.....	87
Figura 19 -	Espectro DEPT 135 (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD/CDCl <sub>3</sub> ) da substância TeCaA-2.....	88
Figura 20 -	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância TeCaH-1 .....	92
Figura 21 -	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância TrCaH-1.....	92

Figura 22 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -APT (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TeCaH-1.....	93
Figura 23 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaH-1.....	93
Figura 24 - Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaH-1.....	94
Figura 25 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias TrFC-1a e TrFC-1b.....	97
Figura 26 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias TrFC-1a e TrFC-1b.....	97
Figura 27 - Ampliação da região de $\delta$ 10-60 do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias TrFC-1a e TrFC-1b.....	98
Figura 28- Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias TrFC-1a e TrFC-1b.....	98
Figura 29 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-1.....	100
Figura 30 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-1.....	101
Figura 31 - Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-1.....	101
Figura 32 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-2.....	107
Figura 33 - Expansão de parte do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-2 (Região $\delta$ 5,40-7,0).....	107
Figura 34 - Expansão de parte do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-2 (Região $\delta$ 1,50-3,70).....	108
Figura 35 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	108
Figura 36 - Expansão de parte ( $\delta$ 1,20-4,10) do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	109
Figura 37 - Expansão de parte ( $\delta$ 5,0-7,0) do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1 (Região de $\delta$ 5,0-7,0).....	109
Figura 38 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-2.....	110
Figura 39 - Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-2.....	110
Figura 40 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	111
Figura 41 - Expansão da Região de $\delta$ 70 a $\delta$ 151 do Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	111

Figura 42 - Expansão da Região de $\delta$ 62 a $\delta$ 151 do Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	112
Figura 43 - Espectro DEPT 135 (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	112
Figura 44 - Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-2.....	113
Figura 45 - Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	113
Figura 46 - Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância TrCaC-2.....	114
Figura 47 - Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ : 400; $^{13}\text{C}$ : 100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância TrCaM-1.....	114
Figura 48 - Efeito dos extratos brutos (A) e frações das cascas (B) de <i>T. elliptica</i> no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético.....	115
Figura 49 - Efeito dos extratos brutos (A) e frações das cascas (B) de <i>T. roseoalba</i> no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético.....	116
Figura 50 - Efeito de <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético.....	118
Figura 51 - Efeito do tratamento de <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> no comportamento da nocicepção induzida por estímulo térmico*. O tempo de reação foi contado 0, 15, 30, 60 e 90 minutos depois da administração (i.p.) de salina, <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> (10 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg) com um tempo de limite de 30 s.....	119
Figura 52 - Efeito do tratamento de <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> sobre a nocicepção induzida por formalina*. O tempo de lambida foi determinado durante a os primeiros 5 minutos (1ª fase), e entre 15-30 minutos (2ª fase) depois da injeção de formalina a 2,5%.....	120
Figura 53 - Efeito do pré-tratamento com Naloxona (5 mg/kg), atropina (2 mg/kg), glibenclamida (10 mg/kg), ioimbina (1 mg/kg) ou haloperidol (1 mg/kg) administrado (i.p.) 10 minutos antes da administração da salina ou <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> (10 mg/kg).....	121

Figura 54 - Efeito do <i>ácido cumárico</i> (1 e 10 mg/kg, i.p.), administrado uma hora antes de instilação de LPS (0,2 µg/µL, i.n.) sobre o número de leucócitos totais no BAL.....	123
Figura 55 - Efeito do <i>ácido cumárico</i> (1 e 10 mg/kg, i.p.), administrado uma hora antes de instilação de LPS (0,2 µg/µL, i.n.) sobre o número de células totais [contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos)] no BAL.....	123
Figura 56 - Porcentagem de espécies ROS* nos leucócitos, após a administração do <i>ácido cumárico</i> nas doses de 1 e 10 mg/kg, (i.p.).....	124
Figura 57 - Resultados da avaliação do potencial larvicida. A = Extratos brutos de <i>T. elliptica</i> e <i>T. roseo-alba</i> ; B = Frações das cascas, caule e folhas de <i>T. elliptica</i> ; C = Frações das cascas, caule e folhas de <i>T. roseo-alba</i> .....	127

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Estruturas de iridoides e seco-iridoides isolados em espécies de <i>Tabebuia</i> .....	43
<b>Quadro 2-</b> Exemplos de coocorrência de iridoides epoxidados e suas respectivas cloridrinadas.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Alguns lignoides encontrados em espécies de <i>Tabebuia</i> .....	37
Tabela 2-	Exemplos de iridoides e seco-iridoides encontrados em espécies de <i>Tabebuia</i> .....	41
Tabela 3-	Iridoides clorados encontrados em plantas superiores.....	48
Tabela 4-	Dados de RMN ( <sup>1</sup> H: 400; <sup>13</sup> C: 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ, Hz) da substância TeCaA-1 e comparação com os do <i>Ácido p-cumárico</i> ....	79
Tabela 5-	Dados de RMN ( <sup>1</sup> H: 400; <sup>13</sup> C: 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD/CDCl <sub>3</sub> , δ, Hz) da substância TeCaA-2 e comparação com dados da <i>Rehmaglutina D</i> .....	85
Tabela 6-	Dados de RMN ( <sup>1</sup> H: 400; <sup>13</sup> C: 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δ, Hz) da substância TeCaH-1 e comparação com dados da literatura.....	90
Tabela 7-	Dados de RMN ( <sup>1</sup> H: 400; <sup>13</sup> C 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> , Hz) da substancia TrCaH-1 e comparação com dados da <i>Sitostenona</i> .....	91
Tabela 8-	Dados de RMN ( <sup>13</sup> C: 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD, δ) das substâncias TrFC-1a e TrFC-1b e comparação com dados da literatura.....	96
Tabela 9-	Dados de RMN ( <sup>1</sup> H: 400; <sup>13</sup> C 100 MHz, CDCl <sub>3</sub> , Hz) da substancia TrCaC-1 e comparação com dados da literatura do <i>Ácido anísico</i> e do <i>Metilparabeno</i> .....	100
Tabela 10-	Dados de RMN ( <sup>13</sup> C: 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ) da substância TrCaC-2 e comparação com os do <i>Álcool diidrodeidro-diconiferílico</i> .....	105
Tabela 11-	Dados de RMN ( <sup>13</sup> C: 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD, δ) da substância TrCaM-1 e comparação com os dados de <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> .....	106
Tabela 12-	Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima (µg/mL) dos extratos e frações das espécies <i>T. elliptica</i> e <i>T. roseoalba</i> .....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BHM	Caldo de Mueller Hinton
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória capaz de inibir 50% de uma resposta
CI <sub>95</sub>	Intervalo de Confiança de 95%
CIM	Concentração inibitória mínima
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal capaz de eliminar 50% da população
CTT	Cloreto de Trifenil Tetrazolium
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortioless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EPM	Erro Padrão da Média
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
J	Constante de acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Multiplete
MHz	Megahertz
p.	Página
pp.	Páginas
PBS	Tampão fosfato salino
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
s	Simpleto
s.p.	Subplantar
t	Triplete
TNF	Fator de necrose tumoral
TMS	Tetrametilsilano
WHO	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
2	<b>Revisão Bibliográfica: Considerações Sobre Dor, Inflamação, Doenças Infecciosas, Vetores que transmitem Dengue, Febre Amarela e a Febre do Chikungunya, Família Bignoniaceae, Gênero <i>Tabebuia</i> e Espécies em Estudo</b> .....	22
2.1	<b>Dor</b> .....	22
2.2	<b>Inflamação</b> .....	25
2.3	<b>Doenças infecciosas</b> .....	27
2.4	<b>Vetores que transmitem Dengue, Febre Amarela e a Febre do Chikungunya</b> .....	28
2.5	<b>Família Bignoniaceae</b> .....	32
2.6	<b>O Gênero <i>Tabebuia</i></b> .....	33
2.6.1	Considerações Sobre a Origem Biossintética de Iridoides.....	44
2.6.2	Possível Origem Biossintética de Iridoides Clorados.....	54
2.7	<b>Espécies <i>T. elliptica</i> (A. DC.) Sandwith e <i>T. roseo-alba</i> (Ridl.)</b> .....	56
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	59
4	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	60
4.1	<b>Materiais, Métodos e Equipamentos</b> .....	60
4.2	<b>Animais</b> .....	62
4.3	<b>Coleta e Identificação dos Materiais Vegetais</b> .....	62
4.4	<b>Preparação dos Extratos</b> .....	62
4.5	<b>Investigação Fitoquímica da Espécie <i>T. elliptica</i></b> .....	63
4.5.1	Procedimento Experimental Efetuado com Frações das Cascas.....	63
4.5.1.1	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Hexano.....	63
4.5.1.2	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Acetato de Etila.....	63
4.5.1.3	Procedimento Experimental Efetuado com as Frações em Clorofórmio e em MeOH-H <sub>2</sub> O.....	64
4.5.2	Procedimento Experimental Efetuado com as Frações do Caule e das Folhas.....	65
4.6	<b>Investigação Fitoquímica da Espécie <i>T. roseo-alba</i></b> .....	65

4.6.1	Procedimento Experimental Efetuado com as Frações das Cascas.....	65
4.6.1.1	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Hexano.....	65
4.6.1.2	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Clorofórmio.....	66
4.6.1.3	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Acetato de Etila.....	67
4.6.1.4	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em MeOH-H <sub>2</sub> O.....	67
4.6.2	Procedimento Experimental Efetuado com as Frações das Folhas de <i>T. roseo-alba</i> .....	67
4.6.2.1	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Clorofórmio.....	67
4.6.2.2	Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Acetato de Etila.....	68
4.6.3	Procedimento Experimental Efetuado com as Frações do Caule.....	68
<b>4.7</b>	<b>Avaliação da Atividade Biológica.....</b>	<b>69</b>
4.7.1	Ensaio para Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....	69
4.7.1.1	Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético.....	69
4.7.1.2	Nocicepção Induzida por Estímulo Térmico da Substância TrCAM-1.....	70
4.7.1.3	Nocicepção Induzida por Formalina da Substância TrCAM-1.....	70
4.7.1.4	Análise do Possível Mecanismo Antinociceptivo da Substância TrCaM-171	
4.7.2	Ensaio para Avaliação da Atividade Anti-inflamatória da substância Codificada de TeCaA-1.....	71
4.7.2.1	Efeito anti-inflamatório da substância codificada de TeCaA-1 no modelo de inflamação pulmonar aguda induzido do LPS.....	71
<b>4.8</b>	<b>Avaliação da Atividade Antibacteriana.....</b>	<b>72</b>
<b>4.9</b>	<b>Avaliação da Atividade Larvicida.....</b>	<b>73</b>
4.9.1	Criação e Manutenção dos Mosquitos.....	74
4.9.2	Ensaio para Avaliação da Atividade Larvicida.....	74
4.10	Análise Estatística.....	75
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Resultados Referentes à Investigação Fitoquímica.....</b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>Identificação Estrutural dos Compostos Isolados.....</b>	<b>77</b>
5.2.1	Identificação Estrutural da Substância TeCaA-1.....	77
5.2.2	Identificação Estrutural da Substância TeCaA-2.....	80
5.2.3	Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de TeCaH-1 e	

	TrCaH-1.....	88
5.2.4	Identificação Estrutural das Substâncias TrFC-1a e TrFC-1b.....	94
5.2.5	Identificação Estrutural da Substância Codificada de TrCaC-1.....	99
5.2.6	Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de TrCaC-2 e TrCaM-1.....	102
<b>5.3</b>	<b>Resultados dos Ensaios para Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....</b>	<b>115</b>
5.3.1	Avaliação da Atividade Antinociceptiva da Substância TrCaM-1.....	117
5.3.1.1	Atividade antinociceptiva de <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> induzida por ácido acético.....	117
5.3.1.2	Nocicepção induzida por Estímulo Térmico.....	118
5.3.1.3	Nocicepção Induzida por Formalina.....	119
5.3.1.4	Investigação do Mecanismo de Ação de <i>Icarisideo E<sub>4</sub></i> .....	120
<b>5.4</b>	<b>Resultado dos Ensaios para Avaliação da Atividade Anti-inflamatória do Ácido <i>p</i>-Hidroxicumárico (TeCaA-1) no Modelo de Inflamação Pulmonar Aguda Induzida por LPS.....</b>	<b>122</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação da Atividade Antibacteriana.....</b>	<b>125</b>
<b>5.6</b>	<b>Resultados dos Ensaios Larvicidas.....</b>	<b>126</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>128</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>130</b>

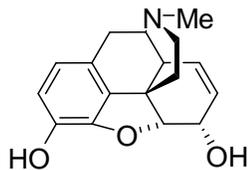
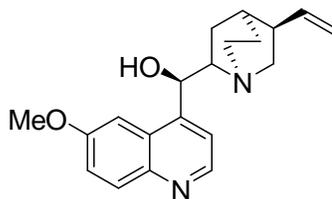
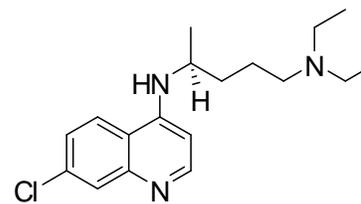
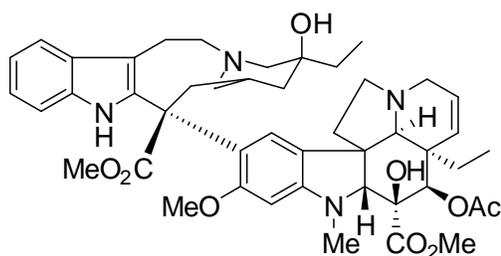
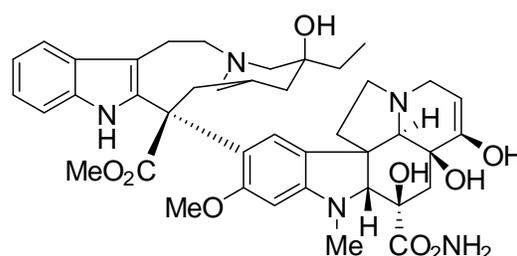
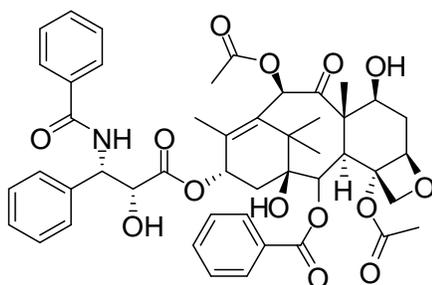
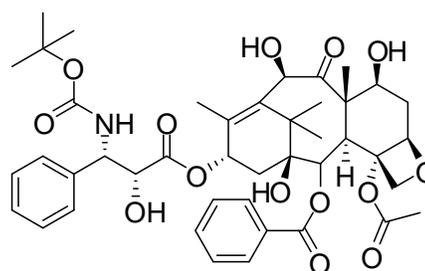
## 1 INTRODUÇÃO

O uso de recursos naturais como fonte para o tratamento de diversas enfermidades foi relatado durante a civilização grega por vários filósofos. Destaca-se no século XIX o papiro de Ebers, que enumera várias doenças e descreve um grande número de soluções medicamentosas provenientes de animais e vegetais (PINTO et al., 2002).

Em seu metabolismo primário, as plantas sintetizam celulose, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias essenciais para realização de funções vitais. Já no metabolismo secundário, há produção de estruturas de pequena massa molecular, polaridade diferenciada, enorme variabilidade estrutural e ocorrência esporádica, que atualmente são conceituados como metabólitos especiais, segundo Gottlieb e Borin (2012). Estes metabólitos secundários desempenham funções essenciais na inter-relação planta-inseto, incluindo proteção contra a herbivoria e a atração de polinizadores.

A partir dos produtos advindos do metabolismo de plantas, o Reino Vegetal tem contribuído de forma significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de inúmeras doenças que acometem os seres humanos. A grande variedade e complexidade de metabólitos especiais evoluíram como mecanismo de defesa dos vegetais às condições ambientais ricas em micro-organismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (MONTANARI; BOLZANI, 2001)

Como marco histórico, no século XVIII, ocorreu o isolamento e identificação das primeiras substâncias de origem vegetal com atividade biológica de relevância médica, como a morfina e quinina. Tais substâncias até hoje se consagraram como princípios ativos eficazes para o tratamento de dor e malária, respectivamente. Além disso, as substâncias de origem vegetal fornecem a base estrutural para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como quinina, vimblastina e paclitaxel que fornecem a cloroquina, vindesina e docetaxel respectivamente (MONTANARI; BOLZANI, 2001; PINTO et al., 2002).

**Morfina****Quinina****Cloroquina****Vimblastina****Vindesina****Paclitaxel****Docetaxel**

Após a descoberta destes substratos de origem vegetal, principalmente na década de 90, houve uma intensa atividade das indústrias farmacêuticas pela busca de novas substâncias bioativas de interesse farmacológico. Como alvo para esta exploração, as espécies que ocorrem nas florestas tropicais, especialmente no Brasil, foram às preferidas, devido a grande biodiversidade existente, e o pouco conhecimento sobre os aspectos químicos e/ou biológicos de substâncias advindas destas regiões (PINTO et al., 2002).

A procura e a obtenção de fármacos, tais como anti-inflamatórios, analgésicos e antibióticos, a partir de plantas medicinais, reforça ainda mais importância dos produtos naturais no tratamento de diversas doenças. Nos últimos anos, novos fitofármacos têm sido lançados no mercado pela indústria farmacêutica, como

exemplo o “Acheflan” considerado o primeiro fitomedicamento genuinamente brasileiro, rico em sesquiterpenos, extraído da planta *Cordia verbenácea* (Boraginaceae). Para revelar o impacto deste produto no mercado, após seu lançamento, este medicamento ficou em segundo lugar como o anti-inflamatório mais vendido no mundo inteiro (SOARES et al., 2009).

Neste contexto, o estado de Alagoas apresenta uma grande biodiversidade de espécies vegetais, entretanto, ainda pouco explorada quanto aos seus metabólitos secundários, o que revela a potencial fonte de moléculas bioativas de interesse terapêutico. Deste modo, o presente trabalho constitui parte de um projeto de pesquisa que visa à busca de agentes analgésico, anti-inflamatórios, antibacteriano e larvicidas, a partir de espécies vegetais das áreas de restinga e Mata Atlântica do Estado de Alagoas. Considerando esse objetivo, este trabalho buscou ampliar o conhecimento sobre a composição química e as atividades biológicas das espécies *Tabebuia elliptica* (A. DC.) Sandwith e *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.), duas espécies de Bignoniaceae. Por esta razão, serão relatadas a seguir algumas considerações teóricas sobre esses temas, bem como sobre a família, o gênero e as espécies selecionadas para o estudo.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: CONSIDERAÇÕES SOBRE DOR, INFLAMAÇÃO, DOENÇAS INFECCIOSAS, VETORES QUE TRANSMITEM DENGUE, FEBRE AMARELA E A FEBRE DO CHIKUNGUNYA, FAMÍLIA BIGNONIACEAE, GÊNERO *TABEBUIA* E ESPÉCIES EM ESTUDO**

### **2.1 Dor**

A palavra “dor” vem do latim *dolore*, que significa sofrimento. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser descrita como uma experiência emocional desagradável, induzida por estímulos mecânicos, térmicos, químicos, elétricos ou fisiopatológicos. A percepção do estímulo doloroso depende de vias conhecidas como vias nociceptivas que são compostas por fibras neuronais ativadas por estímulos nocivos. A percepção da dor está associada às respostas comportamentais, tanto que determinados comportamentos podem revelar a intensidade da dor, e alertar o organismo sobre uma potencial lesão (SIMÃO DA SILVA, 2007; BRIDGESTOCK; RAE, 2013).

Para o estudo da dor, utilizam-se metodologias que empregam animais e avaliam-se as reações comportamentais compatíveis com a sensação dolorosa. Porém, considerando que não há como determinar objetivamente se a sensação apresentada é realmente dor, já que o animal não pode se comunicar, convencionou-se classificar que o estímulo nocivo é capaz de ativar vias nociceptivas. Logo, determina-se que tais reações em animais de experimentação como nocicepção. Estímulos nociceptivos são capazes de ativar receptores sensoriais (nociceptores) especializados em transmitir sinais até o sistema nervoso central (SNC), local onde decodificam-se as informações sobre a lesão tecidual (FEIN, 2011)

Quando os nociceptores periféricos são estimulados, a informação nociceptiva é levada por meio das fibras aferentes até o sistema nervoso central. Os axônios presentes nas fibras nociceptivas estendem-se de seus corpos celulares, reunidos no gânglio da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos concomitantes à medula espinhal e aos tecidos corporais. No córtex cerebral essa informação é percebida e processada para desencadear a sensação de dor (OLIVEIRA, 2012).

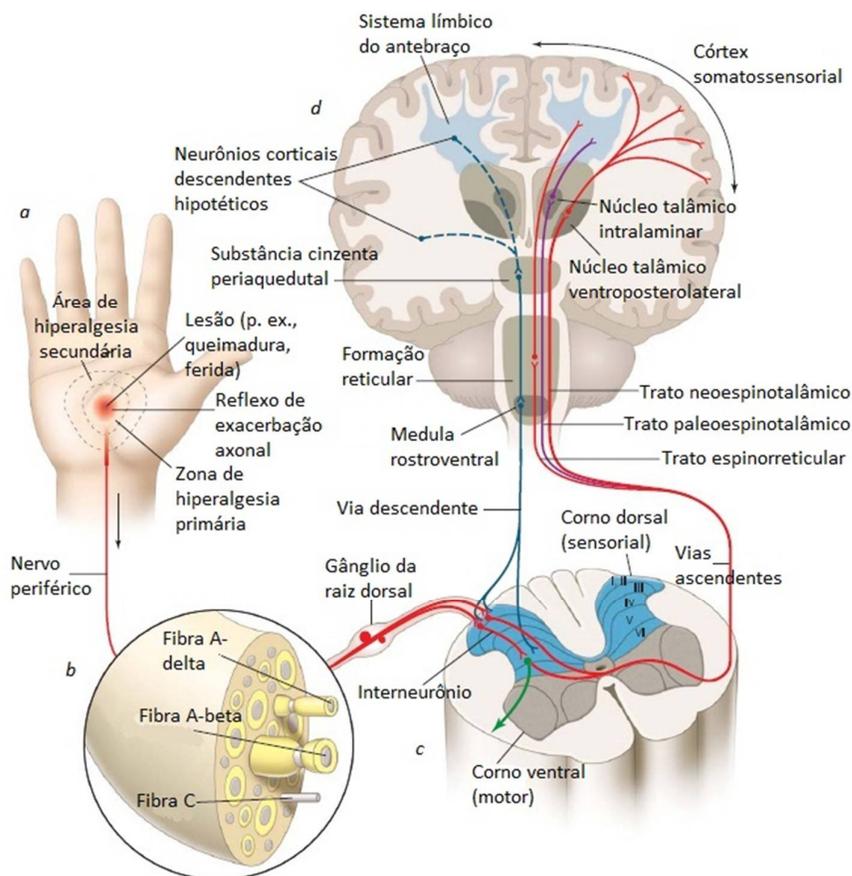
Dessa forma, o processo final da dor envolve uma rede complexa de processamento de informações divididas em três fases. A primeira é a transdução, onde um estímulo nocivo externo é convertido em atividade eletrofisiológica; a segunda é a transmissão, na qual a informação codificada é transmitida através da medula espinal e do tronco cerebral para o tálamo. Por fim, as ligações entre o tálamo e centros corticais superiores controlam a percepção para integrar a resposta afetiva à dor (BRIDGESTOCK; RAE , 2013) (Figura 1, p. 24).

A dor pode ser classificada em aguda ou crônica dependendo do período de duração. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual. Entretanto, esta pode se perpetuar por meses ou anos e se caracteriza em relação à persistência e alterações adaptativas, sendo classificada como dor crônica (CARR; GOUDAS, 1999; BESSON, 1999).

O funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais. Entretanto, quando a sensação dolorosa persiste por tempo maior que o necessário, existe uma diminuição na qualidade de vida dos seus portadores o que causa reações emocionais negativas e debilitantes (OLIVEIRA, 2012).

A nocicepção também pode ser modulada por mediadores de origem inflamatória produzidos no local da lesão. Tais mediadores endógenos são produzidos no local da lesão por células residentes, pelos leucócitos, e por células do sistema imune e do sistema nervoso periférico. Dentre os mediadores destacam-se a bradicinina, serotonina, derivados do ácido araquidônico, adenosina, histamina, neuropeptídeos como a substância P e citocinas. Os mediadores inflamatórios uma vez liberados promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo, aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores de elevado limiar, com conseqüente redução no limiar de percepção do estímulo doloroso, exagerada resposta a estímulos nociceptivos supralimiais (hiperalgesia) e dor espontânea (alodínia) (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

**Figura 1. Processamento sensorial da dor.**



Fonte: <[http://assinantes.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5249/dor\\_cronica\\_%E2%80%93\\_anne\\_louise\\_oaklander.htm](http://assinantes.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/5249/dor_cronica_%E2%80%93_anne_louise_oaklander.htm)>

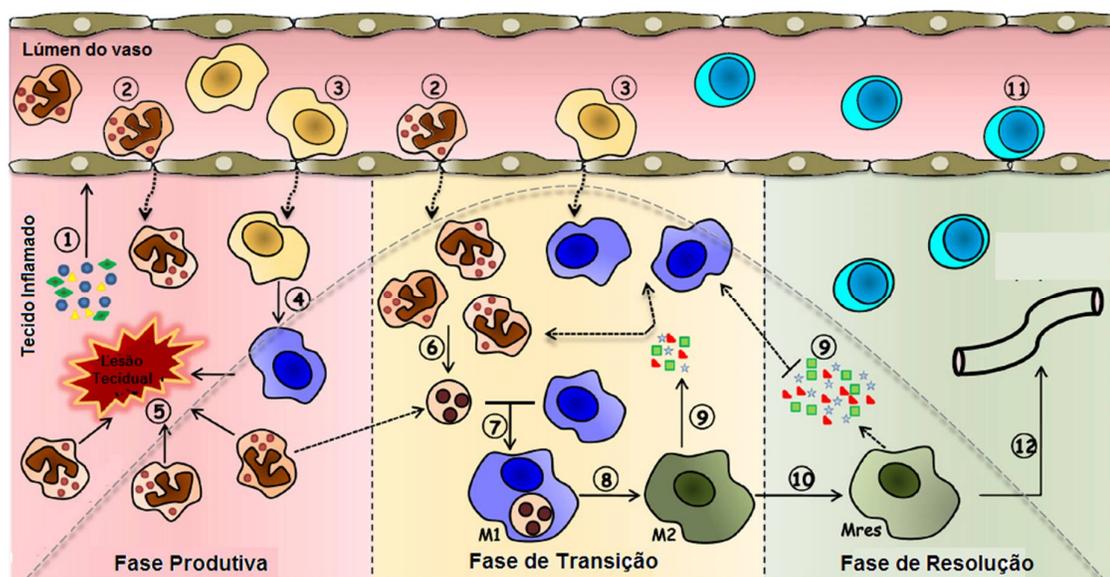
Os nociceptores são encontrados na maioria dos tecidos do corpo, incluindo pele, vísceras e tecidos somáticos como músculos e articulações. Nociceptores polimodais respondem aos estímulos nocivos; mecânicos, térmicos e químicos, possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem os impulsos na velocidade menor de 3 m/s, que é responsável pela dor fraca em queimadura. As pequenas fibras A $\delta$ - $\beta$  mielinizadas, são condutores mais rápidos (5-30 m/s) e estão associados a uma dor mais breve "aguda" e respondem a estímulos mecânicos e térmicos (FEIN, 2011; BRIDGESTOCK; RAE, 2013).

## 2.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta imediata do corpo causada por agentes patogênicos, substâncias nocivas ou danos físicos. Em resposta a estes agentes, a reação inflamatória mostra-se necessária para promover o isolamento/destruição do agente agressor e o reparo do local estimulado, visando o restabelecimento das funções normais do tecido (QUEIROZ et al., 2010).

A reação inflamatória é também reconhecida pelos sinais cardinais de calor, rubor, edema, dor e perda de função. A primeira etapa deste processo é uma resposta vascular com hiperemia e aumento da permeabilidade da parede do vaso. Inicialmente, observa-se uma vasoconstrição arteriolar promovida pela contração dos músculos vasculares lisos, o que aumenta o fluxo sanguíneo para a área estimulada e resulta na hiperemia local. Nesta fase, fenômenos vasculares como exsudação de proteínas do plasma para o tecido são observados, seguido pela mobilização de leucócitos circundantes para o sítio inflamatório. Este fenômeno envolve uma complexa reação em cadeia de eventos bioquímicos e celulares, que incluem ativação enzimática, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (ALESSANDRI et al., 2013) (Figura 2, p. 25).

**Figura 2** - Ilustração do processo inflamatório agudo.



Fonte: Adaptado de (ALESSANDRI et al., 2013)

A migração dos leucócitos envolve um complexo mecanismo de regulação de adesão ao endotélio e subsequente migração transendotelial. Nesta interação, tanto o endotélio quanto os leucócitos ativados interagem por meio de um grande número de moléculas de adesão, incluindo as selectinas e integrinas, citocinas e quimiocinas. Uma vez no sítio da lesão, os leucócitos desempenham um papel fundamental no estabelecimento da resposta inflamatória mediante a liberação de fatores solúveis que incluem, dentre outros, as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e fator alfa de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Tais mediadores inflamatórios são capazes de ativar as células endoteliais para produzirem selectinas, que iniciam o processo de adesão. Além disso, neste ambiente inflamado, há a produção/liberação de uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas que induzem um estresse oxidativo, no qual espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (ERN) são produzidas em abundância (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Merece ser mencionado que a qualidade dos mediadores produzidos no sítio da lesão mostra-se diretamente relacionado com o perfil de resposta inflamatórias denominado como agudo ou crônico.

A inflamação no tecido pulmonar está diretamente relacionada com inúmeras patologias pulmonares sejam agudas ou crônicas, incluindo síndrome de dificuldade respiratória aguda (SDRA), asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Na inflamação pulmonar aguda há uma presença marcante de neutrófilos, ao passo que nas reações crônicas há o envolvimento principalmente de macrófagos e linfócitos (MOLDOVEANU et al., 2009).

Compostos capazes de inibir ou amenizar a resposta inflamatória são chamados de anti-inflamatórios e podem ser divididos em anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais. Os anti-inflamatórios esteroidais, como os glicocorticoides, interagem com receptores específicos no citoplasma das células e atuam no núcleo celular, modulando a expressão gênica que codificam citocinas e enzimas relacionadas com o processo inflamatório. Já os anti-inflamatórios não-esteroidais, dentre suas ações, inibem a enzimas ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) responsáveis pela produção dos prostanoídes (KUMMER; COELHO, 2002). Os efeitos colaterais causados por ambas as classes de anti-inflamatórios são conhecidos. Desta forma, a descoberta de novos protótipos de fármacos capazes de inibir a inflamação e apresentarem efeitos colaterais reduzidos mostra-se necessário.

## 2.3 Doenças infecciosas

Doenças infecciosas são causadas por micro-organismos patogênicos, tais como bactérias, vírus, fungos e helmintos, que invadem o hospedeiro para a sua reprodução. As doenças infecciosas apresentam grande impacto negativo no sistema de saúde pública por afetar uma fração significativa da população mundial e, em razão de seu aspecto socioeconômico, representam grandes desafios, especialmente nas regiões mais pobres e vulneráveis do planeta (WHO, 2008). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas são responsáveis por aproximadamente um terço das causas de mortalidade no mundo. A relação entre essas enfermidades e a baixa renda das populações mais carentes fica evidente ao se constatar que as doenças infecciosas ocupam a primeira posição entre as principais causas de morte e incapacidade permanente nos países em desenvolvimento (WHO, 2008). Mesmo com os avanços na medicina, parte das doenças causadas por bactérias foi controlada através do uso de antibióticos. Entretanto, o uso indiscriminado deste medicamento resultou na seleção de microorganismos com virulência crescente, e capazes de resistir a vários antibióticos conhecidos (KUMAR et al., 2008).

As bactérias são células procarióticas unicelulares, com membrana citoplasmática que apresentam cadeias de peptidoglicanose, possuem tamanho médio de 1 a 4  $\mu\text{m}$  com organização celular simples. As bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas devido as características da parede celular destes organismos. A parede celular das bactérias Gram-positivas apresenta uma única camada composta de aproximadamente 90% de peptidoglicanos enquanto que a das Gram-negativas é constituída por estruturas de múltiplas camadas bastante complexas (SARTORI, 2005).

Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). É a segunda classe de medicamento mais utilizada sendo responsável por 20 a 50% das despesas hospitalares (MOTA et al., 2010).

O grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu em 1928 com a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming. Posteriormente, com a

industrialização deste fármaco houve um rápido crescimento na descoberta/desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Entre a década de 40 e 60 foram descobertos vários compostos, através de triagens de produtos naturais bioativos, tais como  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos e peptídeos, sendo utilizados para o tratamento das infecções bacterianas. A partir da década de 70, foram introduzidos no mercado antibióticos semi-sintéticos, análogos aos antibióticos naturais já existentes, para o tratamento de infecções bacterianas. A maior parte destes antibióticos semi-sintéticos foram obtidos a partir de protótipos naturais, como derivados  $\beta$ -lactâmicos (análogos de penicilina e cefalosporina, ácido clavulânico, aztreonam), análogos da tetraciclina, e derivados aminoglicosídicos (gentamicina, tobramicina, ampicilina) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Entre os anos de 1980-2000 houve uma redução na identificação de novos compostos pela indústria farmacêutica, este fato aliado ao alto índice de resistência encontrado nos micro-organismos, impulsionou nos anos seguintes, a um interesse pela descoberta de novos fármacos ou mesmo pelo desenvolvimento de fármacos inovadores. As fontes naturais, como os vegetais, são promissoras fontes para o fornecimento de novas substâncias bioativas, especialmente os antibióticos. Pois estes organismos são capazes de sintetizar compostos complexos que os protegem contra bactérias patogênicas (RATES, 2001).

Apesar da existência de vários antimicrobianos naturais derivados de plantas, que incluem fenóis, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e alcaloides, os mecanismos de ação distinguem-se entre si por conta das complexas variações na estrutura molecular destes compostos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

## **2.4 Vetores que transmitem Dengue, Febre Amarela e a Febre de Chikungunya**

Considerada pela OMS um problema de saúde pública, a dengue é uma arbovirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente pelas espécies *A. aegypti* e *A. albopictus*. A infecção por dengue inclui desde formas clinicamente assintomáticas até quadros graves de hemorragia e choque, podendo evoluir para óbito. Na dengue clássica (DC) a primeira manifestação é a febre, geralmente alta (acima dos 39°C), de início abrupto, associada à cefaleia,

prostração, dores musculares e nas articulações. Além destes sintomas, podem ser também observado náuseas, vômitos e diarreia. Os sintomas iniciais da dengue hemorrágica (FDH) são semelhantes ao da clássica, porém evoluem rapidamente para manifestações hemorrágicas que podem incluir derrames cavitários, instabilidade hemodinâmica e/ou choque. O estado febril na dengue hemorrágica pode manter-se por até sete dias, e evoluir para dores abdominais intensas, palidez cutânea, pele pegajosa e fria, agitação, sonolência, dificuldade respiratória, pulso rápido e fraco, podendo levar a óbito (MS/IT, 2014).

O vírus da dengue se mantém na natureza pela multiplicação de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*. O vírus pertence à família Flaviviridae, a mesma do vírus da febre amarela e apresenta quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, todos podem causar tanto a forma clássica quanto formas mais grave da doença. A circulação dos vírus só foi comprovada laboratorialmente em 1982, quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, em Boa Vista (RR) ficando o país sem notificação de casos por quatro anos. Em 1986, foi isolado o DENV-1 no Estado do Rio de Janeiro causando epidemia e dispersão desse sorotipo para diversas regiões do Brasil. Em seguida, com a introdução do DENV-2, também no Estado do Rio de Janeiro, confirmou-se o primeiro caso de dengue hemorrágico por esse sorotipo, com o aparecimento de formas graves também em outras regiões. Em janeiro de 2001, foi isolado o DENV-3 no município de Nova Iguaçu (RJ). Em 2010, o DENV-4 foi isolado a partir de casos detectados em Roraima e no Amazonas. Em janeiro de 2011, foi isolado no Pará e, em março do mesmo ano, os primeiros casos de DENV-4 no Rio de Janeiro foram confirmados pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz, 2014).

No ano de 2014, até o mês de dezembro, foram registrados 591.080 casos prováveis de dengue no país. A região Sudeste teve o maior número (312.318 casos; 52,8%) em relação ao total, seguida das regiões Centro-Oeste (114.814 casos; 19,4%), Nordeste (90.192 casos; 15,3%), Norte (49.534 casos; 8,4%) e Sul (24.222 casos; 4,1%). Em 2015, foram registrados 745.957 casos entre janeiro e abril, em apenas quatros meses houve um aumento de aproximadamente 28 % no número de casos comparado com todo o ano de 2014 (SVS/MS, 2015).

Com a nova classificação da OMS para os casos de dengue com sinais de alarme e dengue grave, no mesmo período acima mencionado, foram confirmados no país 404 casos de dengue grave e 6.553 casos com sinais de alarme. A região

com maior número de registros de casos graves e com sinais de alarme foi a região Sudeste (275 graves; 5.011 com sinais de alarme), com a seguinte distribuição entre seus estados: São Paulo (233 graves; 4.700 com sinais de alarme), Rio de Janeiro (18 graves; 70 com sinais de alarme), Minas Gerais (16 graves; 193 com sinais de alarme), e Espírito Santo (8 graves; 48 com sinais de alarme). Houve também confirmação de 229 óbitos no país, o que representa um aumento de 45% em comparação com o mesmo período de 2014, quando foram confirmados 158 óbitos (SVS/MS, 2015)

A transmissão da dengue ocorre pela picada da fêmea do mosquito *A. aegypti* infectada em um hospedeiro. As condições climáticas, como aumento da temperatura, pluviosidade, umidade do ar e a urbanização sem as devidas estruturas de saneamento, são fatores que contribuem para a dispersão ativa do mosquito e disseminação dos vários sorotipos da doença, tornando esta espécie predominantemente urbana. O *A. aegypti* é um vetor doméstico e tem hábitos antropofílicos e zoofílicos diurnos. Outro fator importante é a transmissão vertical do vírus (GUISSONI et al., 2013).

Outra doença de grande impacto negativo para o sistema de saúde pública é a febre amarela. Trata-se de uma doença infecciosa não contagiosa que se mantém endêmica ou enzoótica nas florestas tropicais da América e África causando periodicamente surtos isolados ou epidemias de maior ou menor impacto em saúde pública, sendo transmitida ao homem mediante a picada de mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Haemagogus*. Os principais sinais e sintomas desta doença são febre alta, dor de cabeça, vômito, icterícia (pele amarelada) e insuficiência dos rins e do fígado (VASCONCELOS, 2003). Sob o ponto de vista epidemiológico divide-se a febre amarela em duas formas, rural e urbana que diferem entre si quanto à natureza dos transmissores e dos hospedeiros vertebrados e o local de ocorrência. Sua importância epidemiológica advém do elevado potencial de disseminação, do risco de reurbanização da transmissão e da gravidade clínica da doença, com taxa de letalidade em torno de 50% entre os casos graves. A principal estratégia de prevenção é a vacinação, porém em 2008 ocorreu reemergência do vírus da febre amarela nas regiões centro-oeste, sudeste e sul. A partir de então, se sentiu a necessidade de acompanhar as áreas de ocorrência e dispersão do vírus. Entre 2012/2013, foram notificados ao Ministério da Saúde 282 casos suspeitos. A região Sudeste notificou a maior parte deles 143 (51,3%), seguida das regiões Centro-

Oeste com 52 (18,6%) e Sul com 49 (17,6%), embora nenhum caso tenha sido confirmado fora da região considerada endêmica. Os estados com maior frequência de notificação foram São Paulo, Goiás, Paraná e Minas Gerais. Em 2014, não foi confirmado nenhum caso da doença, entretanto, vários estados principalmente das regiões norte, centro-oeste, sudeste e alguns estados do nordeste apresentaram recomendações para vacinação (SVS/MS, 2014).

A febre de Chikungunya é uma doença viral causada por um arbovírus transmitido também pelos mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*. O nome chikungunya deriva de uma palavra em Makonde que significa aproximadamente “aqueles que se dobram”, descrevendo a aparência física de um paciente com características clínicas graves. Os sintomas são clinicamente semelhantes aos da dengue – febre de início agudo (tipicamente maior que 39°C), dores articulares e musculares, cefaleia, náusea, fadiga e exantema. A principal manifestação clínica que a difere da dengue são as fortes dores nas articulações. Além dessa fase inicial pode evoluir em duas etapas subsequentes: fase subaguda, onde a febre desaparece, podendo haver persistência ou agravamento da artralgia, e a crônica que apresenta o acometimento articular persistente nas mesmas articulações atingidas durante a fase aguda, caracterizado por dor com ou sem edema e limitação de movimento. Embora a febre de Chikungunya não seja uma doença de alta letalidade, tem elevada taxa de morbidade associada à artralgia persistente, que pode levar à incapacidade e, conseqüentemente, redução da produtividade e da qualidade de vida das pessoas (SVS/MS, 2014).

O controle do vetor é uma das formas de combater essas doenças e pode ser feito através três rotas principais: controle biológico, controle químico e educação. Uma das estratégias utilizada pelo controle biológico é o uso de espécies de peixes pequenos que são lançados em tanques de água ou até mesmo em caixas d’água que ajudam a reduzir os mosquitos por eliminação das larvas produzidas nos tanques, cuja desvantagem desta forma de controle é ser um processo lento. O controle químico é rápido e eficiente, mas sua desvantagem inclui a resistência dos mosquitos com a utilização de inseticidas. Neste sentido, compostos oriundos de plantas têm sido apresentados como alternativas ao controle de vetores, não só como novos agentes inseticidas, mas também por serem ambientalmente mais seguros (GUISSENI et al., 2013).

## 2.5 Família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae, pertencente à superordem Lamiiflorae, ordem Lamiales, possui 827 espécies distribuídas em 82 gêneros, que ocorrem em regiões tropicais de todo o mundo, com pouca ocorrência na região temperada (OLMSTEAD et al., 2009). O seu principal centro de diversidade é o Brasil com 56 gêneros e 338 espécies distribuídas nas tribos Bignonieae, Crescentieae e Tecomeae (BRANDÃO et al., 2010), tendo como gêneros mais estudados o *Tecoma*, *Catalpa*, *Tabebuia* e *Jacaranda*. Dentro da ordem Lamiales, embora não seja ainda definitivo devido às mudanças em andamento na circunscrição das famílias que a compõe, a família Bignoniaceae está posicionada perto das famílias Acanthaceae, Avicenniaceae, Lamiaceae, Lentibulariaceae, Phrymaceae, Schlegeliaceae e Verbenaceae. Este posicionamento também decorre do fato de que muitos dos seus componentes químicos também se encontram presentes nestas outras famílias (CIPRIANI et al., 2012).

Os estudos taxonômicos mais recentes, utilizando análises do material genético das plantas, vêm mostrando divergências quanto à classificação infrafamiliar. Com base em análises de sequência de DNA de cloroplastos (rbcL, ndhF, trnL-F), organiza-se uma divisão em oito grandes grupos: Bignonieae, Catalpeae, Jacarandaeae, Oroxyleae, Tourrettieae, Tecomeae, Clado Paleotropical e *Tabebuia* alliance. Para alguns gêneros que ainda não encontrou-se um posicionamento adequado, optou-se por incluí-los no grupo Bignoniae (OLMSTEAD et al., 2009). Alguns dos cladogramas são reconhecidos como tribos [Bignonieae (47 gêneros e 377 espécies), Catalpeae (2-3 gêneros e cerca de 11 espécies), Coleeae (6 gêneros e 52 espécies), Crescentieae (3 gêneros e 33 espécies), Jacarandaeae (2 gêneros e 55 espécies), Oroxyleae (4 gêneros e  $\cong$  6 espécies), Tecomeae (43 gêneros e  $\cong$  349 espécies) e Tourrettieae (2 gêneros e poucas espécies) (OLMSTEAD et al., 2009; CIPRIANI et al., 2012).

Os cladogramas Bignonieae e Crescentieae respondem por mais de 80% das espécies da família e as tribos Coleeae e Crescentieae foram incluídas em cladogramas maiores, Clado Paleotropical e *Tabebuia* alliance, respectivamente, sendo que cada grupo inclui uma série de táxons atribuída à tribo Tecomeae tradicional (OLMSTEAD et al., 2009). Devido ao grande número de indivíduos pertencentes a tribo Tecomeae, induziu-se a divisão das espécies de *Tabebuia* em três gêneros

(*Handroanthus*, *Roseodendron* e *Tabebuia* s.s.) e o seu deslocamento para o grupo *Tabebuia* alliance (irmão do Clado Paleotropical, endêmico da região neotropical e contém 14 gêneros e 147 espécies) e Clado Paleotropical (20 gêneros e  $\cong$  150 espécies). Assim, a tribo Tecomeae foi então reduzida a um clado de cerca de 12 gêneros (OLMSTEAD et al., 2009).

Muitas espécies de Bignoniaceae são usadas na medicina tradicional para tratar várias doenças (BRANDÃO et al., 2010). O perfil químico desta família caracteriza-se pela presença de terpenoides (triterpenos, fitosteróides, diterpenos, monoterpenos e iridoides), quinonas (naftoquinonas e antraquinonas), derivados não nitrogenados de cadeia longa, alcaloides, derivados aromáticos especiais (lignanas, derivados do ácido cinâmico, derivados de acetofenona e derivados do ácido benzoico) e flavonoides (flavonas, flavonóis e dihidroflavonas, antocianinas, flavan-3,4-dióis e chalcona) (VON POSER et al., 2000; SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001; CHOUDHURY et al., 2011; CIPRIANO et al., 2012).

O grupo *Tabebuia* alliance (*Handroanthus*, *Roseodendron* e *Tabebuia* s.s.) tem um perfil químico caracterizado principalmente pela ocorrência de quinonas (basicamente naftoquinonas) (CIPRIANO et al., 2012), iridoides e secoiridoides (SAMPALIO-SANTOS & KAPLAN, 2001; WARASSHINA et al., 2004; 2005; AWALE et al., 2005; GARCEZ et al., 2007; PIAZ et al., 2013), lignanas (SAMPALIO-SANTOS & KAPLAN, 2001; SICHAEM et al., 2012; SUO et al., 2013), derivados fenilpropanoides e feniletanoide (AWALE et al., 2005; GARCEZ et al., 2007; SICHAEM et al., 2012; SUO et al., 2013), derivados glicosilados do ácido benzoico (AWALE et al., 2005; GARCEZ et al., 2007; SICHAEM et al., 2012; SUO et al., 2013), sendo também encontrados triterpenos pentacíclicos, esteroides, derivados de cadeia longa da via do acetato, flavonoides, além de derivados de ácidos graxos saturados de cadeia longa e flavonoides (NOZAKI et al., 1989; SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 2001; CIPRIANO et al., 2012).

## **2.6 O Gênero *Tabebuia***

O gênero *Tabebuia* possui cerca de 100 espécies, nativas de florestas tropicais em toda América Central e do Sul (SON et al., 2006). Sua madeira é muito utilizada nas construções naval e civil, em virtude da dureza e resistência (NAKANO et al. 1993). Muitas dessas espécies têm sido usadas na medicina tradicional para tratar

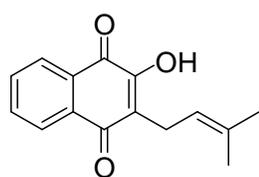
pacientes portadores de várias enfermidades. Dentre os tecidos vegetais utilizados pela medicina tradicional estão as cascas e caule de *T. avellanae*, *T. pentaphylla* e *T. ochracea*, utilizadas em países da América do Sul para tratar lesões gástricas (TWARDOWSCHY et al., 2008), câncer e inflamação (FUJIMOTO et al., 1991; SCHMEDA-HIRSCHMANN; PAPASTERGIOU, 2003; TWARDOWSCHY et al., 2008; THEODULOZ et al., 2012). Além disso, há registros na região Norte do Brasil de que as cascas do caule e entrecascas de *T. avellanae* também possuem ação diurética, adstringente, analgésica, anti-inflamatória e antineoplásica (YAMASHITA et al., 2007). Outros estudos revelam o potencial desta espécie para o tratamento da malária, câncer, febre, distúrbios estomacais, infecções microbianas, ansiedade, irritabilidade e depressão (GOMEZ CASTELLANOS et al., 2009). Algumas tribos indígenas brasileiras e colombianas utilizam espécies do gênero *Tabebuia* para tratamento de doenças inflamatórias da pele, incluindo eczema, psoríase, câncer de pele (BYEON et al., 2008) e como estimulante do SNC (FREITAS et al., 2013).

Estudos utilizando o extrato em etanol das cascas de *T. avellanae* revelou o potencial desta espécie em proteger a mucosa gástrica de lesões induzidas por etanol (TWARDOWSCHY et al., 2008; PEREIRA et al., 2012). Em estudos mais recentes, foi demonstrado que os extratos de *T. avellanae* são capazes de apresentarem efeitos antidepressivo e de inibir o acúmulo de gorduras em ratos (FREITAS et al., 2010; 2013; CHOI et al., 2014). Este extrato também mostrou atividade larvicida frente ao terceiro estágio de larva de *Aedes aegypti* (CL<sub>50</sub> 441,95 µg/mL) (GARCEZ et al., 2009). Já o extrato em metanol das cascas foi ativo como inseticida para os mosquitos *A. aegypti*, *Culex pipiens pallens* e *Ochlerotatus togoi* (100% mortalidade a 100 mg/L) (KIM et al., 2013). O extrato em etanol de *T. cassinoides* mostrou citotoxicidade para células tumorais P-388 (RAO e KINGSTON, 1982) e de *T. barbata* como antitumoral (PARKS et al., 2006).

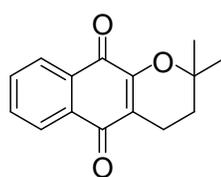
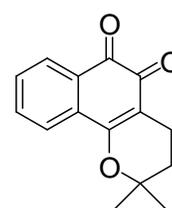
Um levantamento feito nas bases de dados (Scifinder, Sciencedirect e SciELO) revelam que o perfil químico deste gênero é caracterizado pela presença de naftoquinonas, (RAO & KINGSTON, 1982; SCHMEDA & PAPASTERGIOU, 2003; REIS DE MORAIS et al., 2007; SICHAEM et al., 2012; KIM et al., 2013; INAGAKI et al., 2013), incluindo as furanonaftoquinonas que tem sido encontradas em *T. avellanae*, *T. chrysotricha*, *T. incana*, *T. ochracea*, *T. rosea*, *T. barbata*, *T. cassinoides*, *T. ochracea* e *T. incana* (MORAIS, 2003), lignanas (Tabela 1, p. 37), iridoides e secoiridoides (Tabela 2, p. 41), fenilpropanoides (SUO et al., 2013), além

de flavonoides (MAKBOUL et al., 1984; BLATT, SALATINO, SALATINO, 1996), isocumarinas (WARASHINA et al., 2004), terpenoides (GARCEZ et al., 2007), derivados aldeídicos do tipo ciclopentadienos (GARCEZ et al., 2007; SICHAEM et al., 2012), derivados do ácido benzoico (WARASHINA et al., 2004; AWALE et al., 2005; GARCEZ et al., 2007; SICHAEM et al., 2012; SUO et al., 2013), flavonoides (VINOD et al., 2011; GUIMARAES et al., 2012), além de compostos alifáticos de cadeia longa (MORAIS, 2003). Dentre esta diversidade de constituintes, e dada a sua importância biológica, detalhes maiores serão dados somente para as três principais classes dos compostos que forneceram resultados relevantes tanto do ponto vista quimiotaxonômico quanto biológico no presente trabalho.

Naftoquinonas são compostos que estão presentes em várias famílias de plantas e estão envolvidos em múltiplos processos biológicos oxidativos. Plantas contendo esta classe de compostos têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias doenças. Lapachol,  $\alpha$ -lapachona e  $\beta$ -lapachona, que foram isoladas em vários gêneros de Bignoniaceae (*Catalpa*, *Heterophragma*, *Kigelia*, *Macfadyena*, *Mansonia*, *Markhamia*, *Newbouldia*, *Oroxylum*, *Radermachera*, *Stereospermum*, *Tabebuia* e *Zeyheria*) (WARASSHINA et al., 1996; PINTO; CASTRO, 2009) são exemplos de naftoquinonas responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antichagásica (PINTO; CASTRO, 2009), antiviral (YAMASHITA et al., 2007), antimaláricos (PÉREZ et al., 1997), anticancerígenos (ABBOTT et al., 1967; ALMEIDA, 2009; COSTA et al., 2011; MAHMOUD et al., 2011), antifúngica (GUIRAUD et al., 1988), antibacteriana e anti-inflamatória (ZANI et al., 1991; SITONIO et al., 2013) e antiofídico (STRAUCH et al., 2012).



Lapachol

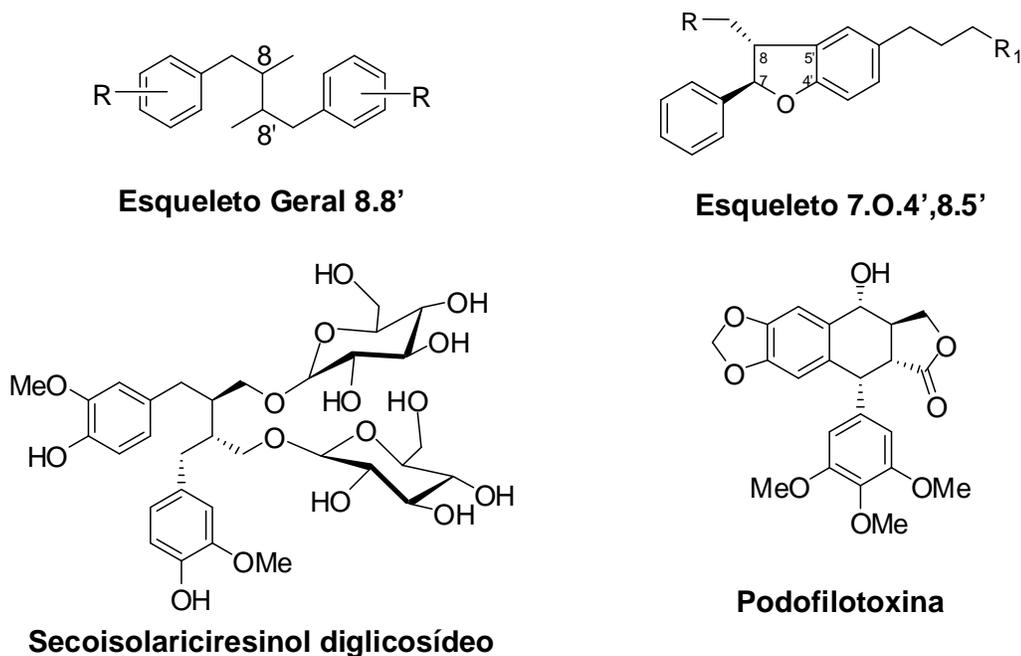
 $\alpha$ -Lapachona $\beta$ -Lapachona

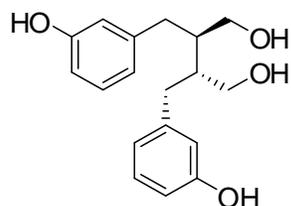
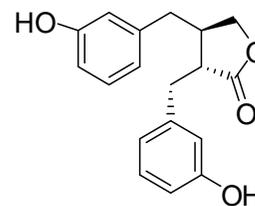
As lignanas constituem outra classe de compostos de ocorrência frequente em espécies de *Tabebuia*. Estes compostos além de estarem envolvidas na defesa das plantas contra patógenos são consideradas importantes em virtude do grande

número de atividades biológicas que apresentam. Muitas possuem propriedades antivirais, fungicidas, antiprotozoária (GERTSCH et al. 2003), antibacteriana, citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva (HUANG et al. 2003; SILVA et al. 2009; MACRAE et al. 1989; CHEN et al. 1996; FERREIRA- JÚNIOR et al., 2014) Do ponto de vista biológico, a lignana Secoisolariciresinol diglicosídeo, por exemplo, é convertida por bactérias da flora intestinal nos fitoestrógenos Enterodiol e Enterolactona que protegem o tecido contra o surgimento de cânceres de próstata e de mama (RICKARD-BOM; THOMPSON, 2003). Outro importante lignoide para o homem é a Podofilotoxina, pois a partir deste composto foram desenvolvidos derivados semissintéticos Etopophos® que são utilizados na terapia do câncer (IMBERT, 1998; Fuß, 2007).

Lignoides são formados na natureza pela dimerização oxidativa de duas unidades de fenilpropanoides ( $C_6C_3$ ) via acoplamento de seus átomos de carbono *beta* ou 8,8' (lignana). Os lignoides que são formados por outras vias de acoplamento, tal como diidrodeidrobenzofurânica (7.O.4',8.5'), são chamadas de neolignanas (Figura 3, p. 36) (Fuß, 2007 apud MOSS 2000).

**Figura 3** - Estruturas e esqueleto geral de lignanas.



**Enterodiol****Enterolactona**

De um modo geral, as neolignanas do tipo diidrodeidrobisfuranicas exibem atividades biológicas de interesse, tais como antitumoral ([PIERTERS et al., 1999; APERS, VLIETINCK, PIETERS, 2003) e antileishmanicida (VAN MIERT et al., 2005). No gênero *Tabebuia*, os representantes desta classe foram encontrados nas raízes de *T. rosea* e nas cascas de *T. impetiginosa*, *T. avellanadae*, *T. incana* e de *T. ochraceae* (Tabela 1, p. 37).

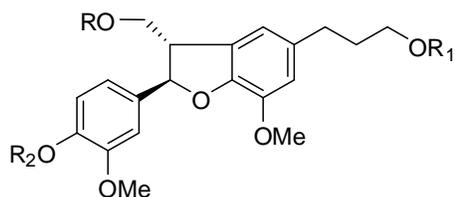
**Tabela 1** - Alguns lignoides encontrados em espécies de *Tabebuia*.

Nome dos Compostos	Espécies	Referências
Álcool Diidrodesidrodiconiferil 9-O-β-D-glicopiranosideo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
Álcool Diidrodesidrodiconiferil 9'-O-β-D-glicopiranosideo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
Álcool Diidrodesidrodiconiferil 4-O-β-D-glicopiranosideo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
Avellanadae A	<i>T. avellanadae</i>	SUO et al., 2012
(7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> )-Balanophonina 4-O-β-D-glicopiranosideo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
Ciclolivil	<i>T. ochraceae</i> <i>T. palmeri</i>	ZANI, OLIVEIRA, OLIVEIRA, 1991 VILLEGAS et al., 1995
Ciclolivil acetoneo*	<i>T. incana</i>	OLIVEIRA et al., 1993
Isopaulownin	<i>T. rosea</i>	SICHAEM et al., 2012
(+)-Lyoniresinol 3a-O-β-D-glicopiranosideo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005

**Continua**

## Continuação Tabela 1

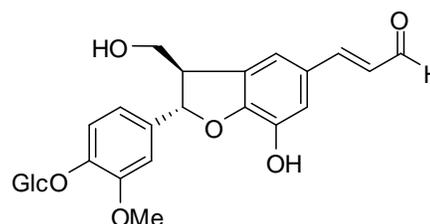
8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> -Secoisolariciresinol ou 8 <i>S</i> ,8' <i>S</i> -secoisolariciresinol	<i>T. impetiginosa</i>	
8 <i>R</i> ,8' <i>R</i> -5-Metoxisecoisolariciresinol ou 8 <i>S</i> ,8' <i>S</i> -5-metoxisecoisolariciresinol	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2004

Figura 4 - Estruturas dos lignoides encontrados em espécies de *Tabebuia*.

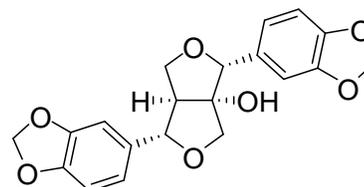
**Álcool Diidrodesidrodiconiferil 9-O-β-D-glicopiranosídeo** R = Glc, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

**Álcool Diidrodesidrodiconiferil 9'-O-β-D-glicopiranosídeo** R = R<sub>2</sub> = H, R<sub>1</sub> = Glc

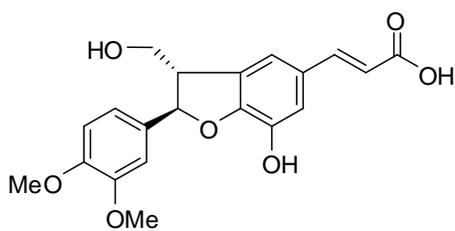
**Álcool Diidrodesidrodiconiferil 4-O-β-D-glicopiranosídeo** R = R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = Glc



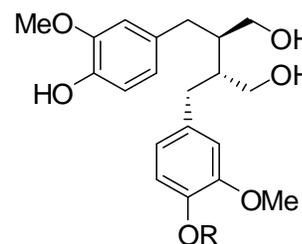
**7*S*,8*R*)-Balanofonina 4-O-β-D-glicopiranosídeo**



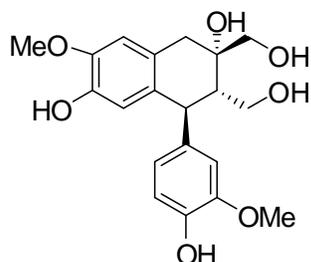
**Isopaulownina**



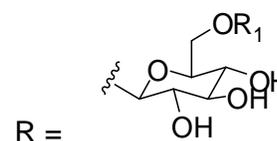
**Avencoside A**

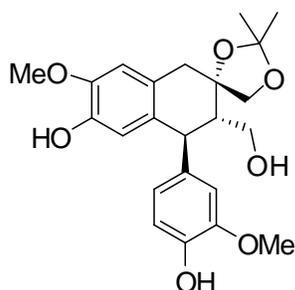


**8*R*,8'*R*-Secoisolariciresinol ou 8*S*,8'*S*-secoisolariciresinol**

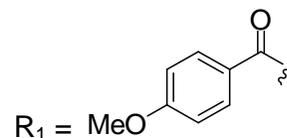


**Cicloolivil**

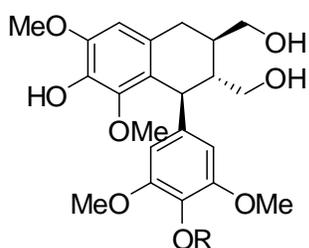




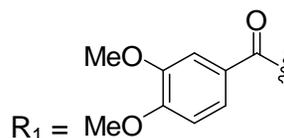
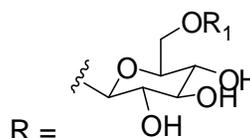
**Cicloolivil acetoneoide\***



**8*R*,8'*R*- 5-Metoxisecoisolariciresinol ou 8*S*, 8'*S*-metoxisecoisolariciresinol**



**(+)-Lyoniresinol 3a-O-β-D-glicopiranosideo**

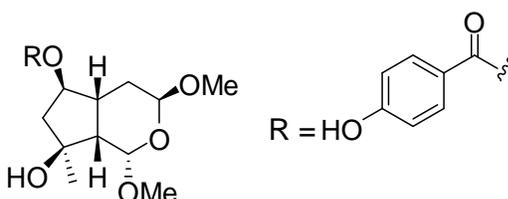


**8*R*,8'*R*- 5-Metoxisecoisolariciresinol ou 8*S*, 8'*S*-metoxisecoisolariciresinol**

\* **Cicloolivil acetoneoide** é possivelmente um artefato formado de cicloolivil pela adição de acetona por um período de 24 h.

Outra classe de composto encontrado neste gênero com impacto relevante sob aspectos quimiossistemáticos e farmacológico são os iridóides. Estes são monoterpenoides que apresentam propriedades antioxidante, antimicrobiana, neuroprotetora, anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora e efeitos cardioprotetores, ações anticâncer, hipoglicêmica, hiperlipidêmica, antiespasmódica e purgativa (SHARMA, RAO, DUDA, 1994; GHISALBERTI, 1998; LI et al., 2004; VILLASEÑOR, 2007; BAS et al., 2007a,b; DINDA, DEBNATH, HARIGAYA, 2007a,b; TUNDIS et al., 2008; DINDA, CHOWDHURY, MOHANTA, 2009; JAISHREE; BADAMI, 2010; DINDA, DEBNATH, BANIK, 2011).

Revelando o potencial farmacológico dos iridoides, estudos demonstraram anteriormente que o composto 8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(4'-hidroxi) benzoiloxi-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dimetoxi-octahidrociclopenta[c]pirano foi capaz de inibir *in vitro* a produção de óxido nítrico em macrófagos J774.1 ativados por LPS (SUO et al., 2013). Já o Argenteosideos A e B (Quadro 1, p. 43) inibiram a atividade da chaperona Hsp90, necessária para sobrevivência de células cancerígenas (PIAZ et al., 2013). Em outro estudo, o 6-O-*p*-Hidroxibenzoilajugol, 6-O-*p*-Metoxibenzoilajugol, 6-O-3'',4''-Dimetoxi-benzoil-ajugol e 8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(4'-hidroxi)benzoiloxi-1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dimetoxiocta-hidrociclopenta[c]pirano (Figura 4, p. 38) exibiram atividades antioxidantes por inibir a oxidação do  $\beta$ -caroteno (GARCEZ et al., 2007).



#### **8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(4'-hidroxi) benzoiloxi-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dimetoxioctahidrociclopenta[c]pirano**

De modo geral, os iridoides representam um marcador importante em classificação, filogenia e evolução vegetal e, portanto têm sido usados como marcadores quimiotaxonômicos, principalmente para as famílias que pertencem as superordens Corniflorae, Gentianiflorae, Loasiflorae e Lamiiflorae, superordem na qual a família Bignoniaceae está inserida (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 1997; 2001). No gênero *Tabebuia*, iridoides foram encontrados nas folhas de *T. argentea* (PIAZ et al., 2013), cascas de *T. heptaphylla* (GARCEZ et al., 2007), *T. avellanae* (AWALE et al., 2005), *T. impetiginosa* (WARASHINA et al., 2004; 2005) e cascas de *T. caraiba* (SOARES, 2006), enquanto que seco-iridoides foram encontrados somente nas cascas de *T. impetiginosa* (WARASHINA et al., 2005). A Tabela 2 (p. 41) mostra alguns tipos estruturais de iridoides e seco-iridoides encontrados em espécies de *Tabebuia*.

**Tabela 2** - Exemplos de iridoides e seco-iridoides encontrados em espécies de *Tabebuia*.

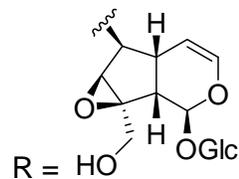
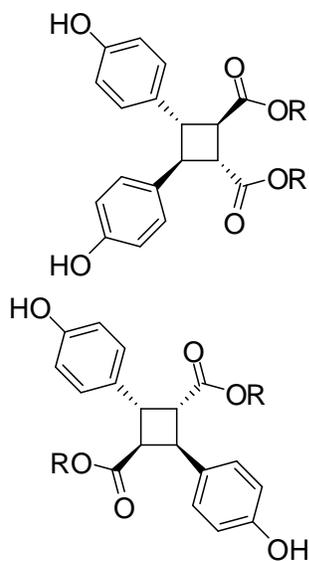
Nome dos Compostos	Espécies	Referências
Argenteosídeo A	<i>T. argentea</i>	PIAZ et al., 2013
Argenteosídeo B	<i>T. argentea</i>	PIAZ et al., 2013
Catalposídeo	<i>T. argentea</i>	PIAZ et al., 2013
6-O-3",4"-Dimetoxibenzoil-ajugol	<i>T. heptaphylla</i>	GARCEZ et al., 2007
6-O-(3,4-Dimetoxibenzoil)-ajugol	<i>T. avellanedae</i> <i>T. impetiginosa</i>	AWALE et al., 2005 WARASHINA et al., 2004
6-O-(3,4-Dimetoxicinamoil)-ajugol	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2004
Especiosídeo	<i>T. argentea</i>	PIAZ et al., 2013
Estereospermosídeo	<i>T. argentea</i>	PIAZ et al., 2013
6-O- <i>p</i> -Hidroxibenzoil-ajugol	<i>T. heptaphylla</i> <i>T. avellanedae</i> <i>T. impetiginosa</i>	GARCEZ et al., 2007 AWALE et al., 2005 WARASHINA et al., 2005
6-O-( <i>p</i> -Hidroxibenzoil)-6-epiaucubino	<i>T. argentea</i> <i>T. impetiginosa</i>	PIAZ et al., 2013 WARASHINA et al., 2005
6-O- <i>p</i> -Metoxibenzoil-ajugol	<i>T. heptaphylla</i> <i>T. avellanedae</i> <i>T. impetiginosa</i>	GARCEZ et al., 2007 AWALE et al., 2005 WARASHINA et al., 2004
6-O-(3,4,5-Trimetoxibenzoil)-ajugol	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2004
6-O-(4-Metoxibenzoil)-5,7-bisdeoxi-cinanchosídeo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
10-O-(4-Metoxibenzoil)-impetiginosídeo A	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
8 $\alpha$ -Methyl-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(3',4'-dime-toxi)benzoiloxi-1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dimetoxiocta-hidrociclo-penta[c]pirano	<i>T. heptaphylla</i>	GARCEZ et al., 2007
8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(4'-hidroxi)-benzoiloxi-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dimetoxioctahidro-ciclopenta[c]pirano)	<i>T. avellanedae</i>	AWALE et al., 2005

**Continua**

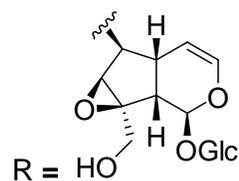
**Continuação Tabela 2**

8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(4'-hidroxi)-benzoiloxi-1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dimetoxioctahidro-ciclo-penta[c]pirano	<i>T. heptaphylla</i> <i>T. avellanedae</i>	GARCEZ et al., 2007 AWALE et al., 2005
Picosídeo II	<i>T. argentea</i>	PIAZ et al., 2013
Rehmaglutina A	<i>T. argentea</i>	PIAZ et al., 2013
Rehmaglutina D	<i>T. caraipa</i>	SOARES, 2006
6-O-Vanilloil-ajugol	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
<b>Seco-iridoides</b>		
6-O-(3,4-Dimetoxibenzoil)-crescentina IV 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
3-O-(4-Hidroxibenzoil)-10-deoxi-eucommiol 6-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005
6-O-(4-Metoxibenzoil)-crescentin IV 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	<i>T. impetiginosa</i>	WARASHINA et al., 2005

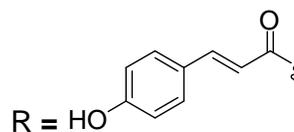
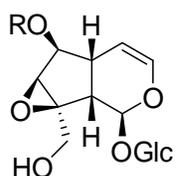
**Quadro 1** - Estruturas de iridoides e seco-iridoides isolados em espécies de *Tabebuia*.



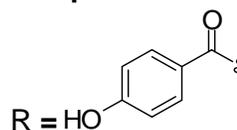
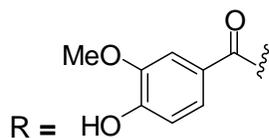
**Argentosídeo A**



**Argentosídeo B**

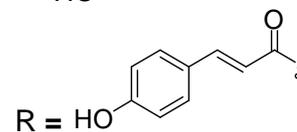
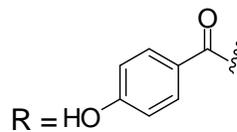
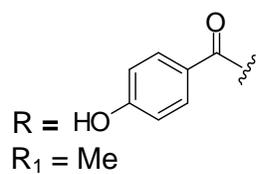
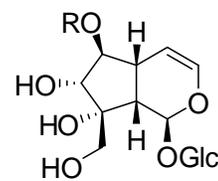
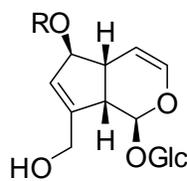
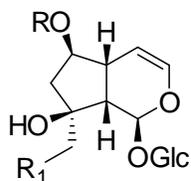


**Especiosídeo**



**Picosídeo II**

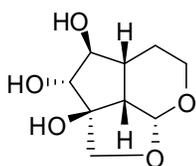
**Catalposídeo**



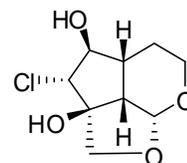
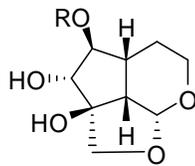
**6-O-(4-Hidroxi-benzoil)-ajugol**

**6-O-(p-Hidroxi-benzoil)-  
6-epi-aucubino**

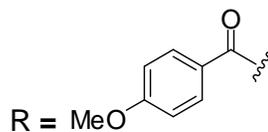
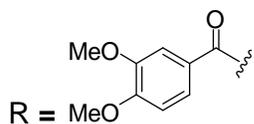
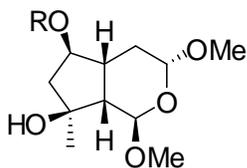
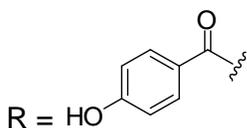
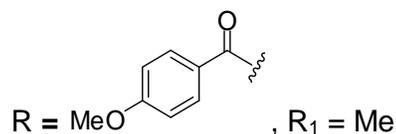
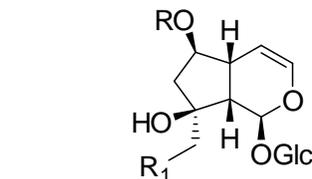
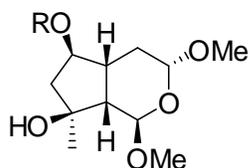
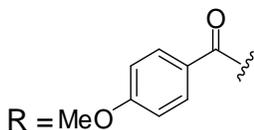
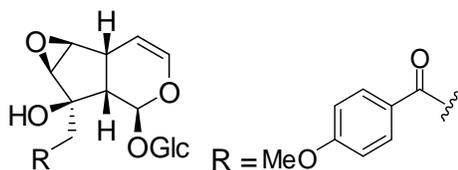
**Estereospermosídeo**



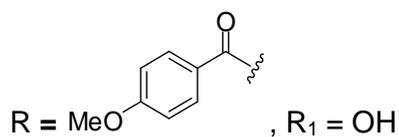
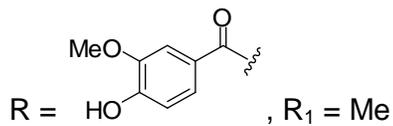
Rehmaglutina A



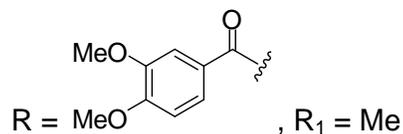
Rehmaglutina D

10-O-(4-Metoxibenzoil)-  
impetiginosideo A8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(3',4'-  
dimetoksi)benzoiloksi-1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -  
dimetoxioctaidrociclo-  
penta[c]pirano8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(4'-hidroxi)  
benzoiloksi-1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dimetoksi-  
octahidrociclo-penta[c]pirano

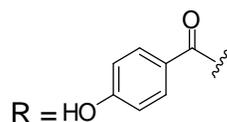
6-O-(4-Metoxibenzoil)-ajugol

6-O-(4-Metoxibenzoil)-5,7-bis-  
deoxicinanchosideo

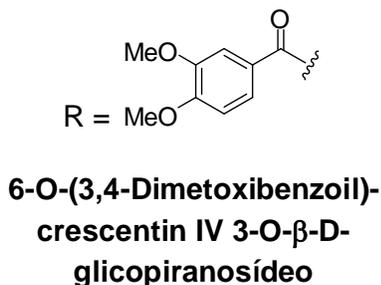
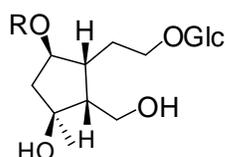
6-O-Vanilloilajugol



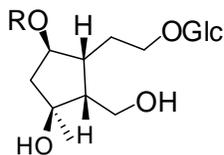
6-O-(3,4-Dimetoksi-benzoil)-ajugol



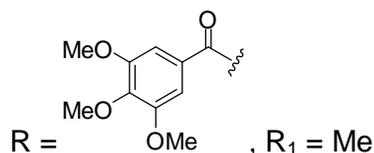
**8 $\alpha$ -Metil-8 $\beta$ -hidroxi-6 $\beta$ -(4'-hidroxi) benzoiloxi-1 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dimetoxi-octahidrociclo-penta[c]pirano**



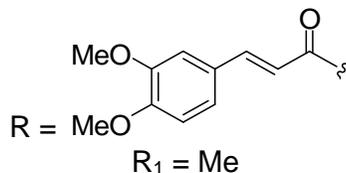
**6-O-(3,4-Dimetoxibenzoil)-crescentin IV 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo**



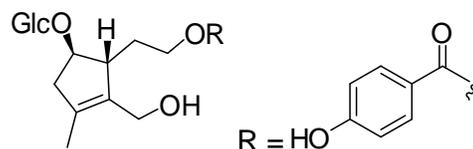
**6-O-(4-Metoxibenzoil)-crescentin IV 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo**



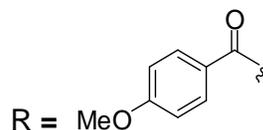
**6-O-(3,4,5-Trimetoxibenzoil)-ajugol**



**6-O-(3,4-Dimetoxicinamoil)-ajugol**



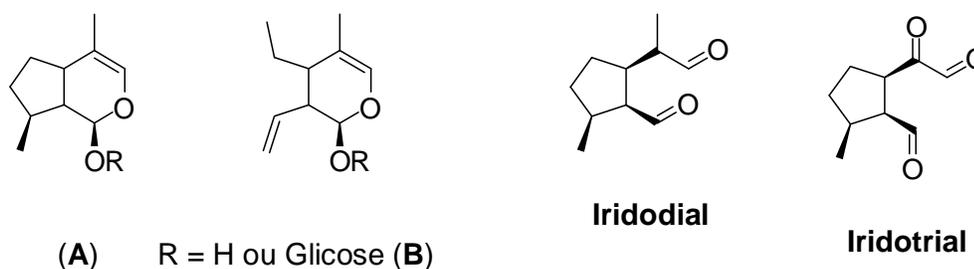
**3-O-(4-Hidroxiibenzoil)-10-deoxi-eucommiol 6-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo**



### 2.6.1. Considerações Sobre a Origem Biossintética de Iridoides

A estrutura química dos iridoides é baseada no esqueleto ciclopentano-[C]-pirano (iridoides carbocíclicos) e a clivagem oxidativa da ligação entre C-7 e C-8 do anel ciclopentano fornece os seco-iridóides (Figura 5, p. 46). Eles podem possuir dez, nove ou raramente oito átomos de carbono, sendo que C-11 é frequentemente perdido em relação ao C-10. As configurações nos estereocentros em C-5 e em C-9, levam a uma fusão de anel *cis*, comum em todos os iridoides que contém o esqueleto básico carbocílico ou de seco-iridoides em uma forma não rearranjada.

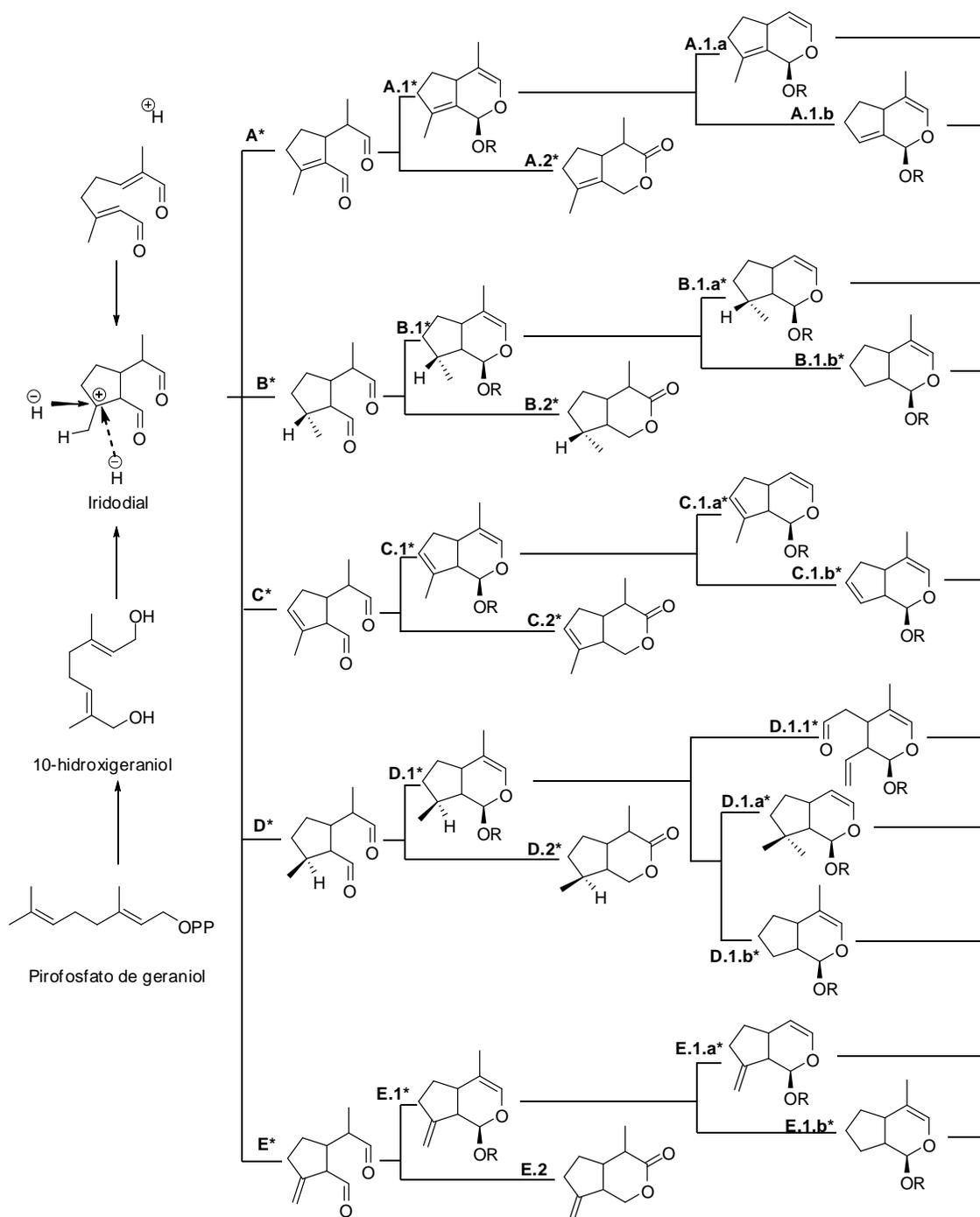
**Figura 5.** Esqueletos básicos de iridoides (A) e seco-iridoides (B) e estruturas de *iridodial* e *iridotrial*.



O número e a natureza desses compostos são indicativos da complexidade das vias biossintéticas envolvidas em suas formações (SAMPAIO-SANTOS & KAPLAN, 1997; 2001). Em plantas superiores, estes compostos são biossintetizados a partir de uma ciclização alternativa do pirofosfato de geranila, através do cátion iridodial e diversificam-se em 26 vias diferentes (Esquema 1, p. 47). O esqueleto básico iridano, contendo uma metila em C-4 e outra em C-8, é proveniente do pirofosfato de geraniol através do 10-hidroxigeraniol para produzir o iridodial, que subsequentemente é oxidado para iridotrial. Reações de glicosilação, metilação e oxidação convertem iridotrial em iridoides (RODRIGUEZ et al., 1998; NAGATOSHI et al., 2011). Os glicosilados, normalmente em C-1 ou C-11 da aglicona, são sensíveis a degradações por  $\beta$ -glicosidases e ácidos (GHISALBERTI, 1998), que podem ocorrer durante a secagem, o processamento, a armazenagem e a extração, cujas bioatividades poderão ser alteradas ou mesmo inativadas (WEI; WEN, 2014).

Iridoides clorados são encontrados somente em famílias que pertencem às superordens Gentianiflorae, Loasiflorae e Lamiiflorae. Até o momento, o único iridoide clorado conhecido no gênero *Tabebuia* foi obtido a partir das cascas de *T. caraipa* (Bignoniaceae) coletada no Mato Grosso do Sul, denominado *Rehmaglutina D* (Tabela 3, p. 48; Figura 6, p. 51), e nas cascas de *T. elliptica* no presente trabalho, que foi codificado neste estudo como TeCaA-2 (Item 4.5.1.2, p. 63).

**Esquema 1.** Proposta biossintética para formação de diferentes tipos estruturas de iridoides. \* R = H ou Glicose



Fonte: SAMPAIO-SANTOS, 1997; KAPLAN, 2001.

As rotas A, C e E são caracterizadas pela formação de derivados com ligação dupla entre C-8/C-9, C-7/C-8 e C-8/C-10, respectivamente; enquanto que as rotas B e D representam os componentes contendo grupo metila em C-10 com orientação  $\alpha$  ou  $\beta$ , respectivamente.

**Tabela 3** - Iridoides clorados encontrados em plantas superiores.

Compostos	Espécies	Família	Referências
Asistasiosideo E	<i>Asystasia bella</i>	ACA	DEMUTH, JENSEN, NIELSEN, 1989
	<i>Veronica longifolia</i>	PLA	JENSEN et al., 2010
	<i>Wulfenia baldaccii</i>	PLA	TASKOVA, GOTFREDSEN, JENSEN, 2006
Catarractosideo	<i>Veronica catarractae</i>	PLA	JENSEN et al., 2008
7-Clorodeutzio	<i>Mentzelia decapetala</i>	LOA	EL-NAGGAR, BEAL, DOSKOTCH, 1982
Clorovaltrato	<i>V. jatamansi</i> , <i>V. capense</i> <i>V. officinalis</i>	VAL	WANGA et al., 2014 FUZZATI et al., 1996
Clorovaltratos A-O	<i>V. jatamansi</i> (syn. <i>V. wallichii</i> )	VAL	LIN et al., 2013
Cistachlorina	<i>Cistanche tubulosa</i>	ORO	XIE et al., 2006
	<i>C. salsa</i>	ORO	KOBAYASHI et al., 1984
Eustosideo	<i>Eustoma russelianum</i>	GEN	UESATO, HASHIMOTO, INOUYE, 1979
	<i>Gentiana septemfida</i> <i>G. campestris</i>	GEN	CALIS et al., 1992 MPONDO, GARCIA, CHULIA, 1990
	(1S,3R,5R,7S,8S,9S) -3,8-Epoxi-1-O-etil-5-hidroxivaleclorina	<i>V. jatamansi</i>	VAL
(1R,3R,5R,7S,8S,9S) -3,8-Epoxi-1-O-etil-5-hidroxivaleclorina	<i>V. jatamansi</i>	VAL	LIN et al., 2013
(1S,3R,5R,7S,8S,9S) -3,8-Epoxi-1,5-dihidroxi-valeclorina	<i>V. jatamansi</i>	VAL	LIN et al., 2013

**Continua**

Tabela 3 (Continuação)

(1S,3R,5R,7S,8S,9S)-3,8-Epoxi-1,5-dihidroxi-valeclorina	<i>V. jatamansi</i>	VAL	LIN et al., 2013
1,5-Dihidroxi-3,8-epoxivaleclorina	<i>V. jatamansi</i>	VAL	LIN et al., 2010
Jatamandoide C	<i>V. jatamansi</i>	VAL	XU et al., 2012a
Jatamanins O – P	<i>V. jatamansi</i> (Roots)	VAL	LI et al., 2010
1,5-Dihidroxi-3,8-epoxi-valeclorina	<i>V. jatamansi</i> (Roots)	VAL	LIN et al., 2010 XU et al., 2011
Globulariosideo	<i>Globularia alypum</i>	GLO	ES-SAFI et al., 2006
Glutinosideo	<i>Rehmannia glutinosa</i>	SCR	KITAGAWA et al., 1995; YOSHIKAWA et al., 1986
	<i>Verbascum wiedemanni-anum</i>	SCR	ABOU GAZAR et al., 2003
clorohidrina de Isovaltrato	<i>Patrinia heterophylla</i>	VAL	YANG et al., 2014
Jatadoide B	<i>V. jatamansi</i>	VAL	XU et al., 2012b
Kankanol	<i>Cistanche tubulosa</i>	ORO	XIE et al., 2006
Kankanosida C	<i>Cistanche tubulosa</i>	ORO	XIE et al., 2006
Linariosideo	<i>Cymbalaria muralis</i>	SCR	KAPOOR, REISCH, SZENDREI, 1974
	<i>Kickxia elatine</i>	SCR	TOTH, CSORDAS, PAPAY, 1978
	<i>Linaria japonica</i>	SCR	KITAGAWA et al., 1972; 1973
	<i>L. flava</i> subsp. <i>sardoa</i>	SCR	BIANCO et al., 1996
	<i>L. aegyptiaca</i> subsp. <i>fruticosa</i>	SCR	FERHAT et al., 2010
	<i>Pseuderanthemum carruthersii</i> var. <i>Atropurpureum</i>	ACA	VO et al., 2012
Longifoliosideos A-B	<i>Veronica longifolia</i>	PLA	JENSEN et al., 2010
	<i>Wulfenia baldaccii</i>	PLA	TASKOVA, GOTFREDSSEN, JENSEN, 2006
Piscrosideo A	<i>Neopicrorhiza scrophulariiflora</i>	SCR	WANG et al., 2006b TUNDIS et al., 2008
Rehmaglutina B	<i>Rehmannia glutinosa</i>	SCR	KITAGAWA et al., 1986; 1991; YOSHIKAWA et al., 1986

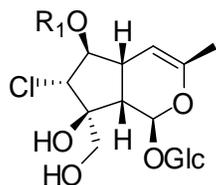
Continua

Tabela 3 (Continuação)

Rehmaglutina D	<i>Artemisia anomala</i>	AST	XIAO et al., 2013
	<i>Ailanthus integrifolia</i>	SIM	KOSUGE et al., 1994
	<i>Cymbaria mongolica</i>	SCR	DAI, LIU, YANG, 2002
	<i>Ixeris denticulate</i>	AST	CHEN et al., 2006
	<i>Picrorhiza kurroa</i>	SCR	NAGAOKA et al., 2001
	<i>P. scrophulariiflora</i>	SCR	WANG et al., 2006a NAGAOKA et al., 2001
	<i>Rehmannia glutinosa</i>	SCR	KITAGAWA et al., 1986; 1991; YOSHIKAWA et al., 1986
	<i>Verbascum wiedemannianum</i>	SCR	ABOU GAZAR et al., 2003
	<i>Veronica linariifolia</i>	PLA	YANG & ZHU, 1991
	<i>T. caraipa</i>	BIG	SOARES, 2006
Rupesino B	<i>V. jatamansi</i>	VAL	WANGA et al., 2014
Thunbergiosideo	<i>Thunbergia fragans,</i> <i>Thunbergia alata</i>	ACA	JENSEN & NIELSEN, 1989; DAMTOFT, FREDERIKSEN, JENSEN, 1994
	<i>Retzia capensis</i>	RET	DAMTOFT et al., 1993
Urphosideo B	<i>Veronica pectinata</i> var. <i>glandulosa</i>	PLA	HARPUT et al., 2003
Valerianoidees A-B	<i>V. jatamansi</i>	VAL	XU et al., 2011
Valeclorina	<i>V. officinalis</i>	VAL	POPOV, HANDZHIEVA, MAREKOV, 1973
Valeridina	<i>V. officinalis</i>	VAL	POPOV, HANDZHIEVA, MAREKOV, 1973
Versibiriosideo Volvaltrate B	<i>Veronica sibirica</i>	PLA	TENG et al., 2008
	<i>V. officinalis, V. jatamansi</i>	VAL	WANG et al., 2009 LIN et al., 2013

**Legenda:** ACA = Acanthaceae; AST = Asteraceae; BIG = Bignoniaceae; GEN = Gentianaceae; GLO = Globulariaceae; LOA = Loasaceae; ORO = Orobanchaceae; PLA = Plantaginaceae; RET = Retziaceae; SCR = Scrophulariaceae; SIM = Simaroubaceae; VAL = Valerianaceae; VER = Verbenaceae.

**Figura 6** - Estruturas de iridoides clorados encontrados em plantas superiores.

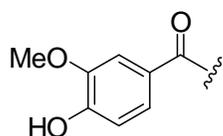


**Asytasioside E**  $R = H, R_1 = H$

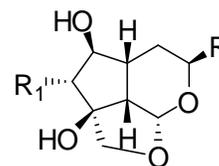
**Catarractoside**  $R = Rha, R_1 = H$

**Longifolioside A**  $R = 3,4\text{-di-OH-Bz}, R_1 = H$

**Longifolioside B**  $R_1 = Caf, R_1 = H$

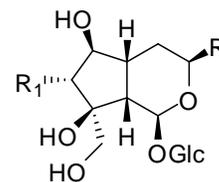


**Urphorside B**  $R = H, R_1 =$

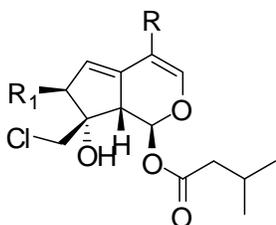


**Cistacolorino**  $R = H, R_1 = Cl$

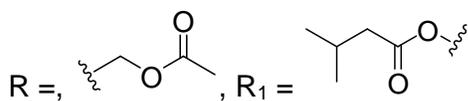
**Kankanol**  $R = Cl, R_1 = OH$



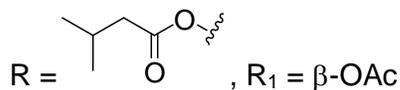
**Kankanoside C**  $R = Cl, R_1 = OH$



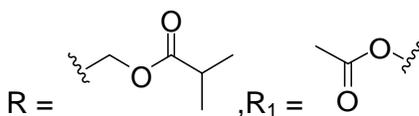
**Clorovaltrato**



**Isocloroaltrato**



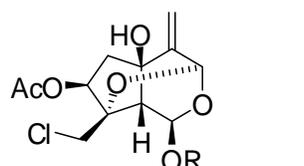
**Rupesino B**



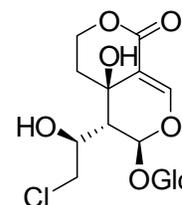
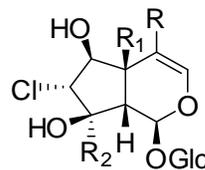
**Clorodeutziole**  $R = R_1 = R_2 = H$

**Linarioside**  $R = H, R_1 = OH, R_2 = Me$

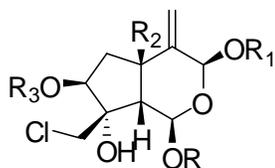
**Thunbergioside**  $R = R_2 = H, R_1 = OH$



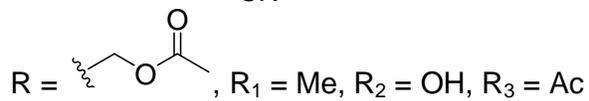
**1,5-Dihydroxy-3,8-epoxy-valchlorino**  $R = OH$



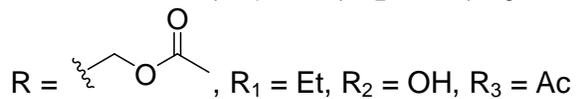
**Eustoside**



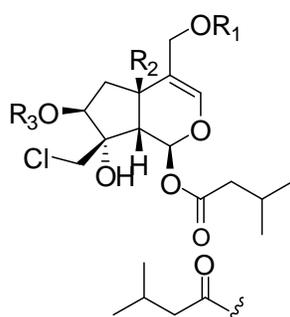
**Clorovaltrato B**



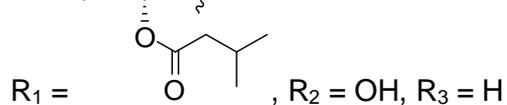
**Clorovaltrato C**



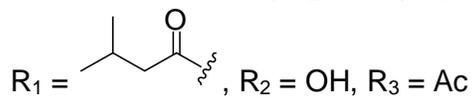
**Clorovaltrato D** R = R<sub>1</sub> = Et, R<sub>2</sub> = OH, R<sub>3</sub> = Ac



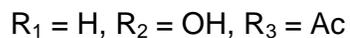
**Clorovaltrato E**



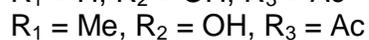
**Clorovaltrato F**



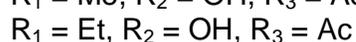
**Clorovaltrato G**



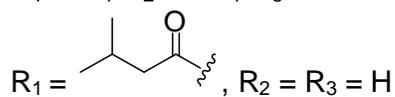
**Clorovaltrato H**



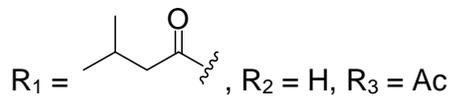
**Clorovaltrato I**



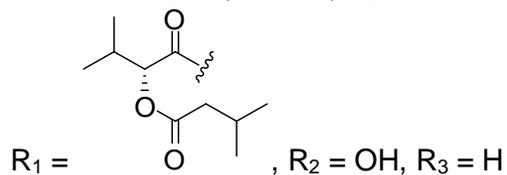
**Clorovaltrato J**



**Clorovaltrato K**

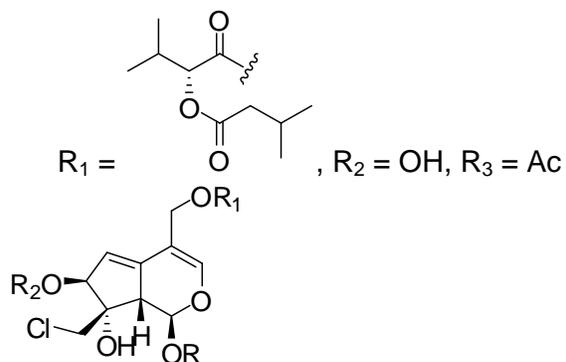
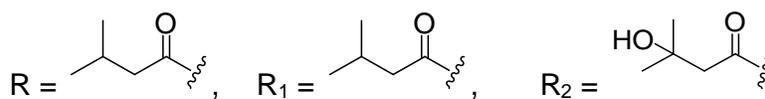
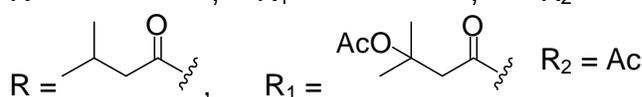
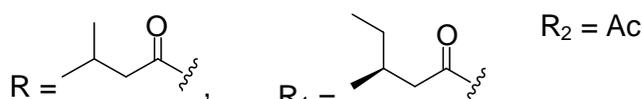
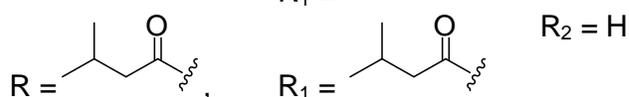
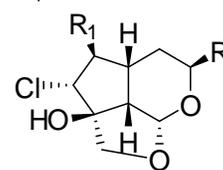
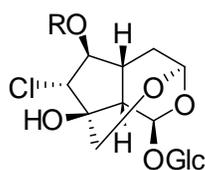
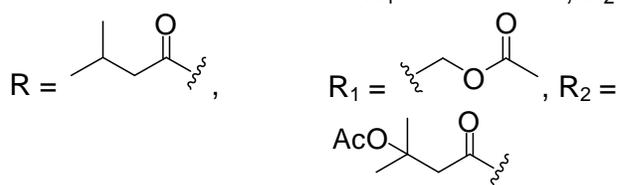
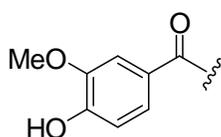


**Jatamandoid A**



**Jatadoid B**



**Volvaltrate B****Clorovaltrato L****Clorovaltrato M****Clorovaltrato N****Clorovaltrato O****Valeriandoide A****Valeriandoide B****Glutinosideo** $R = \text{H}$ **Rehmaglutina B**  $R = R_1 = \text{OH}$ **Piscrosideo A** $R =$ **Rehmaglutina D**  $R = \text{H}$ ,  $R_1 = \text{OH}$ **Versibirioside** $R = \text{Rha}$ 

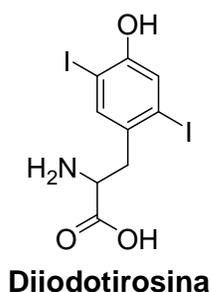
Ac = Acil; Bz = Benzoil; Caf = Cafeoil; Gli =  $\beta$ -D-Glicopiranosil; Rha =  $\alpha$ -Rhamnopiranosil.

### 2.6.2 Possível Origem Biossintética de Iridoides Clorados

Muitos dos compostos halogenados podem ser formados naturalmente pela influência de ambientes organohalogenados. Contudo, os mecanismos pelo quais são produzidos ainda não estão bem esclarecidos (MURPHY, 2003). Sabe-se que a sua síntese ocorre em condições suaves e, frequentemente, com um maior grau de especificidade. Por isso, uma compreensão da biossíntese de halometabólitos, e em particular, a formação da ligação carbono-halogênio, poderá fornecer um provável entendimento para a sua origem.

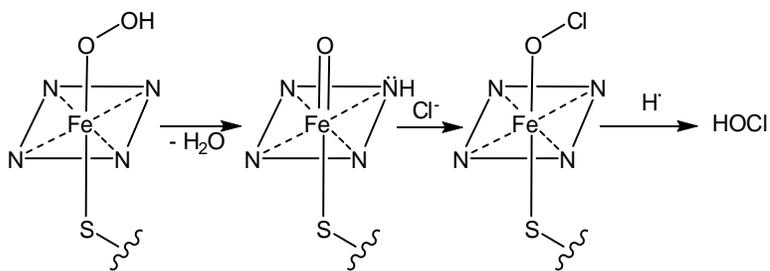
O primeiro relato de um produto natural halogenado ocorreu no século XIX, com a Diiodotirosina, um aminoácido diiodado do coral *Gorgonia cavolii*, e durante muitos anos esses compostos foram considerados raros e de pouca significância biológica. Mais de 4000 produtos naturais halogenados oriundos de bactérias, fungos, algas, plantas superiores e animais são conhecidos (NEUMANN, FUJIMORI, WALSH, 2008). Destes, os produtos clorados e bromados são mais abundantes quando comparados aos iodados e fluorados. As funções biológicas destes compostos são variadas e pouco exploradas, pois a presença dos halogênios influencia nas bioatividades (GRIBBLE, 1999).

A primeira descoberta de uma enzima halogenizante ocorreu na biossíntese de Caldariomicina, um composto clorado obtido do fungo *Caldariomyces fumago*, catalisada por cloroperoxidase (SHAW; HAGER, 1959; 1961) na presença de peróxido de hidrogênio e íons cloretos (HAGER et al., 1966). Até o momento, as haloperoxidasas foram às únicas enzimas identificadas e aceitas como as responsáveis por quase todas as reações biológicas de halogenação. Contudo, nos últimos anos há evidências para a existência de outras halogenases (NEUMANN, FUJIMORI, WALSH, 2008).



Existem inúmeras discussões a respeito do mecanismo das haloperoxidasas e, em particular da natureza do agente halogenizante. Segundo Van Pée (2001), a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela enzima gera um potencial redox suficiente para oxidar o íon haleto, produzindo um reagente halogenizante eletrofílico, como um ácido hipohalogenoso. Com base nestas observações, é possível que no fungo *C. fumago* a reação proceda via uma clivagem heterolítica da ligação O-O do peróxido, facilitada por um resíduo glutamato do sítio ativo da enzima, atuando como um catalisador ácido-base, que primeiro desprotona o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e depois reprotona a ligação ionizada do peróxido liberando água e deixando um centro oxiferríco. Este reage com o íon cloreto gerando um aduto Fe-OCl, que libera HOCl e este retorna à enzima no seu estado nativo e o ácido hipohalogenoso reage com o sítio ativo do substrato orgânico (Esquema 2, p. 55).

**Esquema 2.** Formação do ácido hipocloroso pela heme cloroperoxidas Fe-dependente.



Halogenação de substratos orgânicos pode proceder diretamente do aduto ou alternativamente do ácido hipohalogenoso livre, o agente halogenante dominante. Embora o uso de haloperoxidasas como biocatalisadores seja limitado devido ao fato dessas reações necessitarem de especificidade de substrato e regioseletividade. Todavia, a ausência de régio-especificidade é também inconsistente com as halogenações específicas requeridas na biossíntese de muitos halocompostos. Por esta razão, a função das haloperoxidasas em muitos organismos é ainda pouco compreendida (NEUMANN, FUJIMORI, WALSH, 2008).

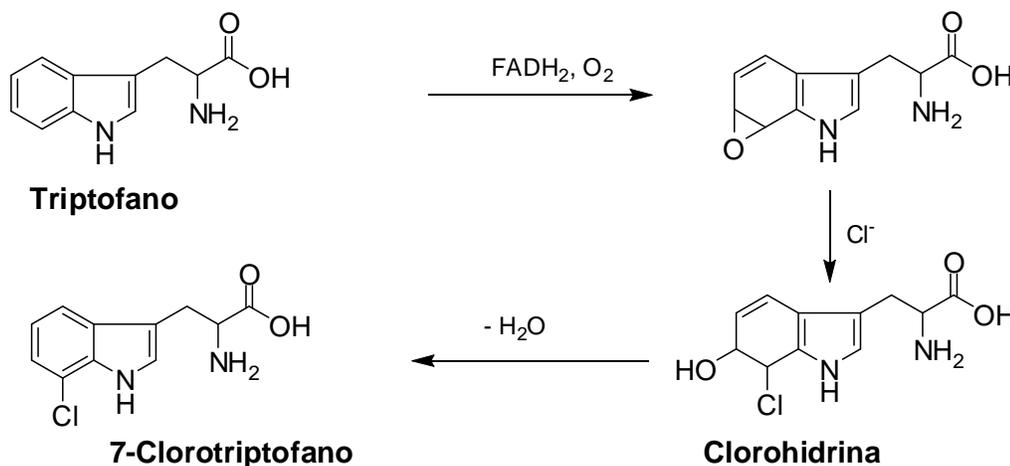
O exemplo mais citado da ausência de envolvimento das haloperoxidasas em halogenações biológicas foi a biossíntese do antifúngico Pirrolnitrino por espécies de *Pseudomonas*, na qual um novo tipo de enzima halogenizante foi descoberta (KIRNER et al., 1998). A enzima que catalisa esta reação requer uma  $\text{FADH}_2$ -

halogenase dependente e  $O_2$ , sugerindo um mecanismo do tipo monooxigenase, no qual o hidropéroxido flavino ativa o substrato via um epóxido, que é atacado pelo íon cloreto gerando uma halohidrina. A partir desta ocorre remoção de água para produzir 7-Clorotriptofano (Esquema 3, p. 56). Esta classe de enzima parece desempenhar um papel central nas reações de cloração, pois diversos derivados do Triptofano e indólicos foram clorados por esta halogenase, embora a reação tenha se processado em C-2 ou C-3 do anel indólico e não em C-7.

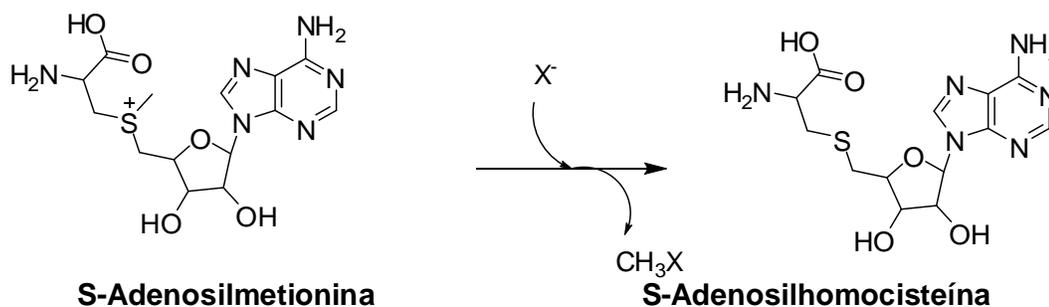
Fungos, algas e plantas superiores produzem clorometanos por meio de enzimas metil transferases (WUOSMAA; HAGER, 1990; SAXENA et al., 1998), na qual ocorre a transferência de um grupo metila da *S*-adenosilmetionina (SAM) para os íons cloretos, brometos ou iodetos (Esquema 4, p. 56).



**Esquema 3.** Cloração regioespecífica do Triptofano pela halogenase  $FADH_2$ -dependente.

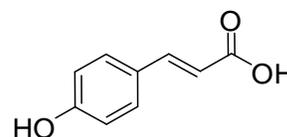


**Esquema 4.** Produção de halometanos por meio de enzimas metil transferases, catalisada pela SAM.  $X^- = Cl^-, Br^-$  ou  $I^-$ .



Outra classe de compostos de ocorrência bastante frequente em espécies de *Tabebuia* são os derivados fenilpropanoides. Neste gênero eles têm sido encontrados nas cascas de *T. avellanae* (Brasil e Japão; GARCEZ et al., 2007; SUO et al., 2013), *T. heptaphylla* (Brasil; GARCEZ et al., 2007) e raízes de *T. rosea* (Tailândia; SICHAEM et al., 2012). Destes, os mais investigados têm sido o *Ácido cinâmico* e seus derivados. Estes fenilpropanoides têm sido encontrados na natureza em frutos, flores, e outras partes dos vegetais. São consumidos como compostos fenólicos na dieta e desempenham um papel vital na formação de moléculas necessárias para a produção de diferentes produtos farmacêuticos e na síntese de importantes compostos. De um modo geral, apresentam atividade antioxidante, hepatoprotetora, ansiolítica, repelente de insetos, antimicrobiana, antidiabética, anticolesterolêmica, antiviral e anti-inflamatória (SHARMA, 2011).

No presente trabalho, o fenilpropanoide conhecido como *Ácido 4-hidroxicinâmico* foi avaliado como anti-inflamatório utilizando o modelo de inflamação pulmonar aguda.



**Ácido 4-hidroxicinâmico**

## 2.7 Espécies *T. elliptica* (A. DC.) Sandwith.e *T. roseo-alba* (Ridl.)

As espécies *T. elliptica*, conhecida como ipê-mirim, e *T. roseo-alba* (Figura 7, p. 58), conhecida como ipê-branco, são árvores nativas de ocorrência ampla em todo o território brasileiro. Apresentam florescimento exuberante e características de árvore de grande porte com vasta utilização no paisagismo, particularmente para a arborização de ruas e avenidas (STOCKMAN et al., 2007). Até o presente momento nenhum estudo químico e/ou biológico foi relatado para *T. elliptica*. Já a espécie *T. roseo-alba* a exceção do trabalho publicado pelo nosso grupo (FERREIRA- JÚNIOR et al., 2014), observa-se apenas um estudo avaliando a inibição de microorganismos associados a doenças infecciosas nosocomiais (GAETTI-JARDIM JUNIOR et al., 2009).

**Figura 7.** Fotos das espécies coletadas na Reserva de proteção ambiental da Usina Coruripe.



Caule de *T. elliptica*



Folhas de *T. roseo-alba*

Fonte: Fotos tiradas pelo autor em 2011.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Geral

Conhecer e ampliar o perfil químico e avaliar o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório, antibacteriano e larvicida (larvas do *Aedes aegypti*) dos extratos, bem como das substâncias isoladas, das espécies *Tabebuia elliptica* D.C e *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Bignoniaceae).

### 3.2 Específicos

- Avaliar o potencial antinociceptivo de extratos, frações e substâncias isoladas utilizando modelos para o estudo da dor em animais de experimentação;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório de substâncias isoladas no modelo de inflamação pulmonar aguda em camundongos;
- Avaliar o potencial antibacteriano (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) de extratos e frações;
- Realizar ensaios frente a larvas do 4<sup>o</sup> estágio do *A. aegypti* de extratos e frações;
- Isolar os constituintes químicos dos extratos e frações ativos nos ensaios efetuados;
- Identificar as substâncias isoladas utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C).

## 4 EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiais, Métodos e Equipamentos

- ▶ Para obtenção dos extratos brutos foram utilizados extratores de vidro e de aço inoxidável;
- ▶ Nas partições e nas separações cromatográficas foram utilizados solventes P.A. (LABSYNTH<sup>®</sup>, VETEC<sup>®</sup> e QUIMEX<sup>®</sup>);
- ▶ A concentração das soluções contendo grandes volumes foi efetuada em evaporadores rotativos, marcas BUCHI<sup>®</sup> e IKA WERKE<sup>®</sup>, modelos R-114 e RV06-ML, respectivamente; enquanto que as de pequeno volume foram feitas à temperatura ambiente em capela de exaustão da PERMUTION<sup>®</sup>;
- ▶ As pesagens das amostras e reagentes foram efetuadas em balança eletrônica analítica (modelo AX 200) e semi-analítica, das marcas SHIMADZU<sup>®</sup> e BEL<sup>®</sup>, respectivamente;
- ▶ Nas separações cromatográficas em coluna foram utilizados como adsorventes sílica gel 60 (70-230 mesh e 230-240 mesh, MERCK), e Sephadex LH-20 (PHARMACIA<sup>®</sup>);
- ▶ Nas cromatografias em camada delgada analítica (CCDA - 0,50 mm de espessura) e preparativa (CCDP - 0,75 mm de espessura) foi utilizada sílica gel 60 PF<sub>254</sub> da MERCK<sup>®</sup>. As cromatoplasmas foram preparadas manualmente utilizando-se suspensões de gel de sílica em água destilada espalhadas sobre as placas de vidro através de um espalhador mecânico, sendo ativadas a 100°C durante uma hora em estufa da BIOMATIC<sup>®</sup>;
- ▶ Os cromatogramas foram revelados através do uso de lâmpada ultravioleta da SPECTROLINE<sup>®</sup>, modelo ENF-260C/F, em comprimento de onda de 254 e 366 nm; por imersão em cubas contendo vapores de iodo e/ou borrifração com solução ácida de sulfato cérico;
- ▶ Nas solubilizações utilizou-se Ultrassom da BRANSON<sup>®</sup>, modelo 1210;
- ▶ Na secagem da vidraria utilizou-se estufa de esterilização universal, modelo 219;

- ▶ Os espectros de RMN ( $^1\text{H}$ : 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz) foram obtidos no espectrômetro BRUKER<sup>®</sup>, modelo Avance 400, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB-UFAL) e processados utilizando o software TOPSPIN 2.1. As amostras foram dissolvidas em solventes deuterados (clorofórmio, metanol ou em mistura destes). O sinal residual do solvente ou o TMS foi utilizado como referência interna.
- ▶ Para análise da rotação óptica foi utilizado o polarímetro Rudolph Research Analytical, modelo Autopol IV, com célula type 40 (5,0 mm x 100 mm, 2 mL). Utilizando a linha D de sódio (589 nm).
- ▶ Para a realização dos ensaios antinociceptivos e anti-inflamatórios as drogas utilizadas foram atropina, diazepam, glibenclamida, indometacina, ioimbina, metoclopramida, morfina e naloxona adquiridas da SIGMA CHEMICAL<sup>®</sup>, formalina, ácido acético adquirido da MERCK<sup>®</sup>;
- ▶ Nos ensaios de nocicepção induzida por estímulo térmico foi utilizado o aparelho modelo EFF-361, INSIGHT<sup>®</sup>.
- ▶ Na contagem total de neutrófilos foram utilizados citocentrífuga, modelo CT-2000, CIENTEC<sup>®</sup>, e microscópio óptico modelo BX 41, OLYMPUS<sup>®</sup>.
- ▶ Ensaios antibacterianos foram utilizados bactérias Gram-positivas [*Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212)] e Gram-negativas [*Escherichia coli* (ATCC-14942) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27583)] que foram adquiridos da empresa Laborclin, e foram padronizados e distribuídos pelo American Type Cell Collection (ATCC, Manassas/VA/USA). As amostras foram mantidas em refrigerador com temperatura entre 4 a 8 °C até o momento do uso.

## 4.2 Animais

Para a avaliação farmacológica foram utilizados camundongos machos Swiss adultos (18 a 22 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Biologia Celular em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Para sua adaptação, os animais permaneceram na sala de realização de experimentos comportamentais por um período de pelo menos 2 horas antes da realização dos ensaios. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes para o uso ético de animais em pesquisa publicado pela Associação Internacional para o Estudo da Dor. Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da Sociedade Brasileira de Animais de Laboratório Ciência (SBCAL), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA da UFAL (Licença nº 9244/2011-45).

## 4.3 Coleta e Identificação dos Materiais Vegetais

Cascas, caule e folhas de espécimes de *Tabebuia elliptica* (MAC-46880) e de *Tabebuia roseo-alba* (MAC-46879) foram coletadas, em novembro de 2009, na Reserva de proteção ambiental da Usina Coruripe, Coruripe - AL. Os espécimes foram coletados e identificados por Rosângela Pereira de Lyra Lemos, botânica do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, onde exsiccatas dos materiais foram depositadas.

## 4.4 Preparação dos Extratos

As diferentes partes de cada espécie (caule, cascas e folhas), após secagem à temperatura ambiente e trituração, foram individualmente extraídas através de maceração com metanol (Caule e cascas de ambas as espécies) ou acetona (Folhas de ambas as espécies). Os extratos brutos obtidos [*T. elliptica*: caule (42,1 g), cascas (7,9 g) e folhas (9,8 g); *T. roseo-alba*: caule (100,0 g) cascas (27,9 g) e folhas (15,2 g)], após eliminação dos solventes em evaporador rotatório e secagem a

temperatura ambiente, foram individualmente suspensos em solução MeOH-H<sub>2</sub>O (3:2) e extraídos sucessivamente com hexano, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt. Inicialmente, tanto os extratos brutos quanto as frações provenientes de partição dos extratos com resultados promissores de cada espécie foram submetidos a ensaios de nocicepção, através do modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, larvicida (larvas do 4º estágio do *Aedes aegypti*) e antibacteriano (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas) através do método de microdiluição em caldo.

#### 4.5 Investigação Fitoquímica da Espécie *T. elliptica*

##### 4.5.1 Procedimento Experimental Efetuado com Frações das Cascas

Em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de nocicepção (Item 5.3, p. 115), frações oriundas da partição das cascas que apresentaram algum tipo de atividade nos ensaios efetuados foram submetidas a técnicas de separação e purificação de seus constituintes químicos (Figura 8, p. 64) com o objetivo de isolar o componente bioativo.

##### 4.5.1.1 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Hexano

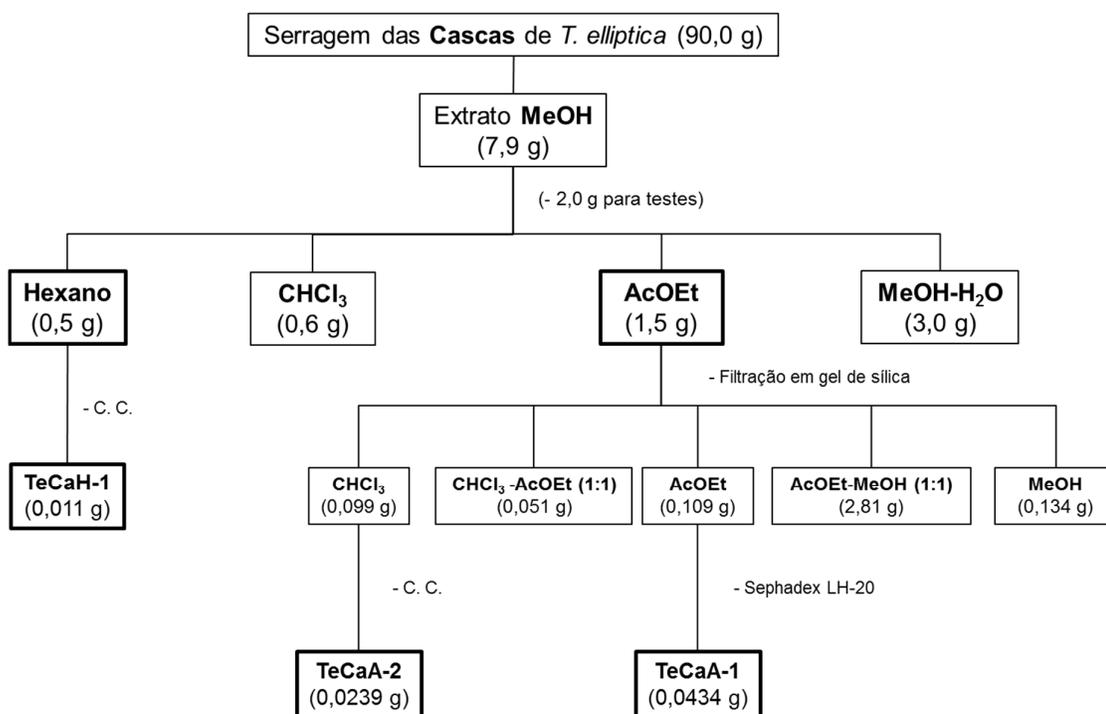
A fração em hexano (0,5 g) das cascas, por ter apresentado resultados promissores nos ensaios antibacterianos (Item 5.5, p. 125), foi submetida a fracionamentos cromatográficos em coluna de gel de sílica (70-230 mesh) utilizando misturas de hexano e AcOEt em gradiente crescente de polaridade. Foi coletado um total de 119 frações, com volume médio de aproximadamente 10 mL cada, que após análise através de CCDA foram agrupadas. O material da subfração reunida 26-28 (0,02 g) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluída com uma mistura de Hex-AcOEt (9:1), este procedimento resultou no isolamento da substância codificada de **TeCaH-1** (0,011 g).

##### 4.5.1.2 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Acetato de Etila

A fração em AcOEt (1,5 g) das cascas, embora tenha apresentado no modelo experimental de contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos, uma redução estatisticamente não significativa da nocicepção (Item 5.3, p. 115), foi

submetida a filtração em gel de sílica gel, utilizando como eluentes misturas de  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH. Este procedimento resultou em cinco frações [ $\text{CHCl}_3$  (0,10 g),  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt 1:1 (0,05 g); AcOEt (0,10 g), AcOEt-MeOH 1:1 (2,81 g) e MeOH (0,13 g)]. O material da subfração em AcOEt (0,10 g) foi permeada em Sephadex-LH 20 com metanol, resultando em um total de 14 subfrações que foram agrupadas após análise comparativa através de CCDA. A subfração 8-10 (0,0434 g), constituída de um sólido amorfo, após análise de CCD apresentou uma única mancha, sendo codificada de **TeCaA-1**. A subfração em  $\text{CHCl}_3$  (0,10 g) foi fracionada em gel de sílica (70-230 mesh) utilizando misturas de hexano e AcOEt em proporções crescentes de polaridade. Este procedimento resultou na obtenção de um sólido amorfo que foi codificado de **TeCaA-2** (0,0239 g).

**Figura 8** - Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as cascas de *T. elliptica*.



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.5.1.3 Procedimento Experimental Efetuado com as Frações em Clorofórmio e MeOH-H<sub>2</sub>O

As frações em  $\text{CHCl}_3$  (0,6 g) e MeOH-H<sub>2</sub>O (3,0 g) das cascas, por terem apresentado resultados promissores nos ensaios antibacterianos (Item 5.5, p. 125) e

de nocicepção (Item 5.3, p. 116), foram submetidos a diferentes técnicas cromatográficas, entretanto, não resultou no isolamento de substâncias com grau de pureza satisfatório para obtenção de dados espectrais.

#### 4.5.2 Procedimento Experimental Efetuado com as Frações do Caule e das Folhas

As frações obtidas provenientes dos extratos brutos do caule [Hexano (5,4 g); CHCl<sub>3</sub> (6,4 g); AcOEt (2,7 g) e MeOH-H<sub>2</sub>O (15,0 g)] e das folhas [Hexano (5,3 g); CHCl<sub>3</sub> (3,8 g); AcOEt (0,9 g) e MeOH-H<sub>2</sub>O (0,5 g)], apesar de algumas destas frações terem apresentado atividade biológica nos testes efetuados neste trabalho, estas frações foram submetidos a diversas técnicas cromatográficas, entretanto, não resultou no isolamento e/ou grau de pureza para obtenção de dados espectrais

### 4.6 Investigação Fitoquímica da Espécie *T. roseo-alba*

#### 4.6.1 Procedimento Experimental Efetuado com as Frações das Cascas

O extrato em MeOH das cascas de *T. roseo-alba*, com resultados promissores nos ensaios de nocicepção (Item 5.3, p. 115), foi particionado com solução MeOH-H<sub>2</sub>O 3:2 e extraído com hexano, CHCl<sub>3</sub> e AcOEt. As frações resultantes foram submetidas a técnicas de separação e purificação de seus constituintes químicos (Figura 9, p. 66).

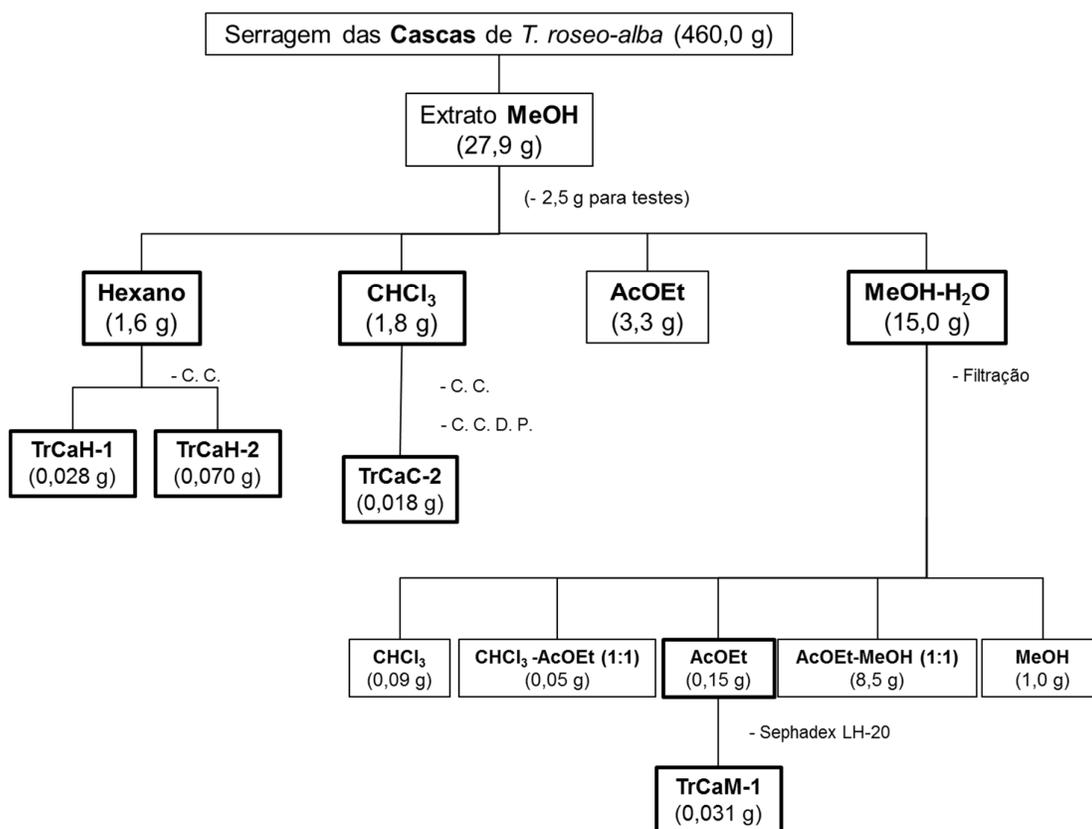
##### 4.6.1.1 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Hexano

A fração em hexano das cascas (1,6 g), em virtude dos resultados apresentados nos ensaios antibacterianos (Item 5.5, p. 125) e larvicidas (Item 5.6, p. 126), foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica (70-230 mesh) utilizando misturas de hexano e AcOEt em proporções crescentes de polaridade. Este procedimento resultou no isolamento de duas substâncias que foram codificados de **TrCaH-1** (0,028 g) e de **TrCaH-2** (0,070 g).

#### 4.6.1.2 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Clorofórmio

A fração em clorofórmio (1,8 g), em virtude dos resultados apresentados nos ensaios antibacterianos (Item 5.5, p.125) e larvicidas (Item 5.6, p.126), foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica (70-230 mesh) utilizando misturas de hexano; AcOEt e MeOH em proporções crescentes de polaridade. Um total de 62 subfrações foi coletado, após análise através de CCDA utilizando diferentes sistemas de eluentes foram agrupadas. A subfração 47-49 (0,032 g) revelou através de CCDA a presença de dois componentes. Este material foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa eluída com AcOEt. Este procedimento resultou no isolamento de uma substância que foi codificada de **TrCaC-2** (0,018 g).

**Figura 9** - Esquema geral efetuado com as cascas de *T. roseo-alba*



Fonte: Elaborada pelo autor

#### 4.6.1.3 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Acetato de Etila

A fração em AcOEt (3,3 g) das cascas, por apresentar resultados promissores nos ensaios antibacterianos (Item 5.5, p.125), apesar de submetido a diversas técnicas cromatográficas não resultou no isolamento de substância com grau de pureza para obtenção de dados espectrais.

#### 4.6.1.4 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em MeOH-H<sub>2</sub>O

A fração em MeOH-H<sub>2</sub>O (15,0 g), por ter apresentado resultados promissores nos ensaios de nocicepção (Item 5.3, p. 115), foi submetido a filtração em gel de sílica utilizando misturas de CHCl<sub>3</sub>, AcOEt e MeOH em gradiente crescente de polaridade, resultando em cinco frações [CHCl<sub>3</sub>, (0,09 g), CHCl<sub>3</sub>-AcOEt 1:1 (0,05 g), AcOEt (0,15 g) e AcOEt-MeOH 1:1 (8,55 g) e MeOH ( 1,0 g)].

O material da subfração em AcOEt (0,15 g) foi permeada em Sephadex LH-20 (com MeOH) resultando em 36 subfrações. O material das subfrações reunidas 13-15 (0,031 g) se mostrou como um sólido amorfo que após análise através de CCD não apresentou uma boa definição. Por esta razão, parte desta amostra foi submetida à análise através de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, Shimadzu LC-10A, utilizando as seguintes condições: coluna analítica de fase reversa C<sub>18</sub>; detector UV em 254 nm; fase móvel MeOH-ACN 1:1 com fluxo de 1mL/min. Obtendo-se um material com pureza de 98%, codificado de **TrCaM-1**.

#### 4.6.2 Procedimento Experimental Efetuado com as Frações das Folhas de *T. roseo-alba*

Embora o extrato em acetona das folhas de *T. roseo-alba* não tenha apresentado resultados promissores quando submetidos aos ensaios biológicos, algumas de suas frações de partição se mostraram promissoras em alguns dos ensaios efetuados. Por esta razão, algumas dessas frações foram investigadas.

##### 4.6.2.1 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Clorofórmio

O material da fração em CHCl<sub>3</sub> (3,8 g) das folhas de *T. roseo-alba*, em virtude dos resultados apresentados nos ensaios antibacterianos (Item 5.5, p. 125), foi

submetido a filtração em gel de sílica, utilizando como eluentes misturas de hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:1),  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt-MeOH (1:1) e MeOH (Figura 10, p. 69). Foram obtidas 27 subfrações com volume médio de 5 mL cada, que foram reunidas após análise comparativa através de CCDA. O material das subfrações reunidas 8-10 (0,33 g) foi submetido a um novo fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica (70-230 mesh) utilizando misturas de hexano e AcOEt. As 18 subfrações resultantes deste procedimento foram agrupadas com base na análise de CCDA. O material das subfrações reunidas 8-9 (0,07 g) foi fracionado em gel de sílica e resultando no isolamento de uma substância codificada de **TrFC-1** (0,016 g).

O material das subfrações reunidas 11-14 (0,32 g), oriunda da filtração da fração em  $\text{CHCl}_3$ , foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica utilizando misturas de hexano e AcOEt, resultando no isolamento de material sólido que após análise através de CCDA, bem como comparação dos dados de RMN constatou-se que se tratava de quantidade adicional da substância codificada de **TrFC-1** (0,025 g).

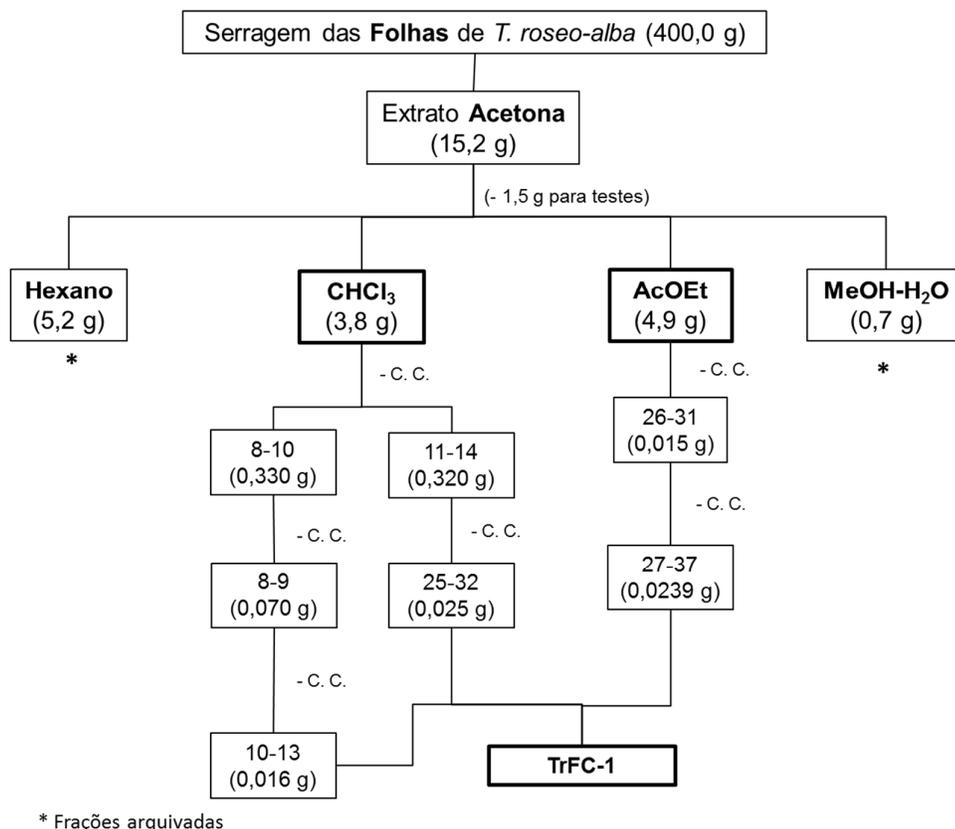
#### 4.6.2.2 Procedimento Experimental Efetuado com a Fração em Acetato de Etila

O material da fração em AcOEt (1,1 g) das folhas de *T. roseo-alba* foi submetido a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica (70-230 mesh) utilizando misturas de hexano e AcOEt como eluentes em gradiente crescente de polaridade. Coletou-se um total de 85 subfrações com volume médio de 5 mL cada. Essas subfrações após análise através de CCDA foram agrupadas. O material das subfrações reunidas 26-31 (0,15 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica. Este procedimento resultou no isolamento de uma substância que após comparação através de CCDA e com dados de RMN constatou-se que se tratava de quantidade adicional de **TrFC-1** (0,010 g).

#### 4.6.3 Procedimento Experimental Efetuado com as Frações do Caule

O extrato bruto do caule (100,0 g) foi particionado e as subfrações resultantes em hexano,  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  foram arquivadas.

**Figura 10** - Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as folhas de *T. roseo-alba*.



Fonte: Elaborada pelo autor

## 4.7 Avaliação da Atividade Biológica

### 4.7.1 Ensaios para Avaliação da Atividade Antinociceptiva

#### 4.7.1.1 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O potencial de inibição da dor dos extratos, frações e substância isolada (**TrCaM-1**) foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Barros et al., 2011. Neste experimento todos os animais ( $n = 5$ ) receberam, por via intraperitoneal (i.p.), 0,1 mL de ácido acético a 0,6% a cada 10 gramas do peso do animal como estímulo. Os extratos brutos (100 mg/kg) e frações (100 mg/kg) e a substância isolada e (10, 1 e 0,1 mg/kg) foram solubilizados em Tween 80 em seguida adicionado solução salina (0,9%) de forma que a quantidade máxima Tween 80 no veículo não ultrapassa-se 1%. Uma hora antes da injeção do estímulo com ácido acético, os

animais do seu respectivo grupo receberam por via i.p. os extratos, frações e substância isolada **TrCaM-1**. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (i.p.) e como fármaco de referência foi utilizado indometacina (10 mg/kg, i.p.). Cinco minutos após a administração do ácido acético, o número de vezes que cada animal apresentou contorções abdominais foi contado durante 10 minutos consecutivos. (REANMONGKOL et al., 1994). A percentagem de inibição para cada grupo teste foi determinada usando a fórmula abaixo, na qual **C** indica grupo controle e **T** o grupo tratado com extrato/frações e/ou substância isolada.

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{T \times 100}{C}$$

#### 4.7.1.2 Nocicepção Induzida por Estímulo Térmico da Substância TrCaM-1

Para uma melhor compreensão da atividade antinociceptiva da substância isolada **TrCaM-1** foi efetuado o teste de latência ao calor descrito por Oliveira et al., (2012). Os animais ( $n = 6$ ) foram colocados individualmente sobre a superfície de uma placa metálica aquecida e mantida a  $54 \pm 1^\circ\text{C}$ . O tempo de latência ao calor foi avaliado utilizando como parâmetro o tempo que o animal levou para retirar uma das patas traseira da superfície aquecida, lambê-la ou pular. Os animais foram colocados na placa aquecida, 60 minutos após a administração intraperitoneal da substância codificada de **TrCaM-1** (10, 1 e 0,1 mg/kg); grupo controle (veículo) e com morfina (5 mg/kg) utilizado como fármaco de referência.

#### 4.7.1.3 Nocicepção Induzida por Formalina da Substância TrCaM-1

O ensaio de formalina foi utilizado para melhor avaliar os parâmetros relacionados à nocicepção (dor neurogênica e dor inflamatória), para tanto, os animais ( $n = 5$ ) foram tratados com formalina (2,5%, 20  $\mu\text{L}$ ) na área subplantar da pata direita e colocada em uma câmara triangular com duas faces espelhadas e a outra apenas com vidro. Após o estímulo com formalina, o tempo (em segundos) que o animal passou lambendo a pata traseira foi cronometrado durante os primeiros 5 minutos (primeira fase) e no intervalo de 15-30 minutos (segunda fase), sendo considerado tempo zero o momento imediatamente após a administração intraplantar de formalina no animal (OLIVEIRA et al., 2012). Os animais foram pré-

tratados por via intraperitoneal com a substância **TrCaM-1** (10 mg/kg), solução salina (controle) e o fármaco de referência, a indometacina (10 mg/kg), 60 minutos antes da administração do estímulo.

#### 4.7.1.4 Análise do Possível Mecanismo Antinociceptivo da Substância TrCaM-1

Para esclarecer o possível mecanismo de ação envolvido na resposta antinociceptiva da substância testada **TrCaM-1** (10 mg/kg; i.p.), os animais foram tratados, por via intraperitoneal (i.p.), seguindo o modelo induzido por ácido acético, com antagonistas que atuam nos receptores opióides [naloxona (5 mg/kg)], muscarínico [atropina (2 mg/kg)],  $\alpha$ -2-adrenérgico [ioimbina (1 mg/kg)], dopaminérgicos [haloperidol (1 mg/kg)], bem como no envolvimento de canais de potássio [glibenclamida (10 mg/kg)], 15 minutos antes da administração da amostra teste (PANDURANG et al., 2014).

#### 4.7.2 Ensaios para Avaliação da Atividade Anti-inflamatória da substância Codificada de TeCaA-1

##### 4.7.2.1 Efeito anti-inflamatório da substância codificada de TeCaA-1 no modelo de inflamação pulmonar aguda induzido do LPS

Os animais ( $n = 5$ ) foram inicialmente tratados por via i.p., recebendo 10  $\mu$ L/g por peso corpóreo do animal com a substância **TeCaA-1**, nas doses de 10 e 1 mg/Kg, salina ou dexametasona (2,5 mg/Kg). Após 60 min os animais foram anestesiados i.p. (100  $\mu$ L, de uma solução 8:1:1, salina (0,9% NaCl), xilazina e cetamina, respectivamente). Em seguida os animais foram instilados, com o auxílio de uma micropipeta automática, com 50  $\mu$ L de LPS por via intranasal (i.n.) na dose de 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L. Os animais foram eutanasiados 6 horas depois para a coleta do lavado broncoalveolar (BAL). Para tanto, estes foram traqueostomizados e canulados com cateter de polietileno (SZARKA et al., 1997). As vias respiratórias foram lavadas com 1 mL de PBS/EDTA 10 mM e centrifugados a 1500 rpm a 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido em eppendorfs e armazenado no ultrafreezer -80°C. Para determinar o número total de células no BAL, 90  $\mu$ l da suspensão de células foram adicionados a 10  $\mu$ l de líquido de Turk e avaliados em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial, células foram ressuspensas em 1 mL de PBS 1x gelado, e 100

µL deste material foi colocado em uma citocentrífuga na qual foram processados a 1500 rpm a 4°C por 5 minutos, ao final deste processo, os citocentrifugados foram corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. As análises foram feitas com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 100x. Em outra alíquota contendo células foi realizada marcação visando à quantificação de espécies reativas e oxigênio pela técnica de citometria de fluxo utilizando DCFH.

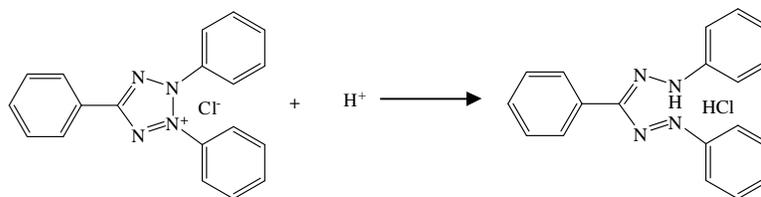
#### 4.8 Avaliação da Atividade Antibacteriana

Os ensaios antibacterianos foram realizados em colaboração com a *Profª Drª Maria Lysete de Assis Bastos*, no Laboratório de Pesquisa e Tratamento de Feridas, da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas. Para tanto, os extratos brutos e frações oriundas de partição ou de filtração de *T. elliptica* e *T. roseo-alba* foram avaliados e tiveram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada através à técnica de microdiluição em caldo (AYRES et al. 2008), frente a duas Gram-positivas [*Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC-29212)] e a duas Gram-negativas [*Escherichia coli* (ATCC-14942) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27583)] (AYRES et al. 2008). Nestes ensaios, foram utilizados placas estéreis de 96 poços (fundo em “U”, com 12 colunas (1-12) e 8 linhas (A-H). Para tanto, seis miligramas de cada extrato foram previamente dissolvido em 300 µL de DMSO, após completa dissolução foram acrescentados 2700 µL de solução salina tamponada estéril [5,61 g de NaCl; 0,11 g de KCl; 1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em 1L de H<sub>2</sub>O], obtendo-se uma concentração final de 2000 µg/mL. Em cada poço das colunas de 1-12 das microplacas, foram adicionados 100 µL do meio de cultura *Mueller Hinton Broth* – BHM (21 g de pó de BHM em 1L de água destilada, após completa dissolução, esta foi esterilizada em autoclave, a 121°C durante 15 minutos). Como todos os ensaios foram realizados em triplicata, cada microplaca comportou três amostras por placa. Desta forma, 100 µL da solução estoque preparada inicialmente foram adicionados nos poços 1-3, 4-6 e 7-9 da linha A, após homogeneização e com o auxílio de uma pipeta multicanal semiautomática, 100 µL do conteúdo da linha A foram transferidos para a linha B, o mesmo foi transferido da linha B para a linha C, e assim sucessivamente até a linha H, desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição. Este procedimento resultou na obtenção de concentrações de 1000 µg/mL (linha A), 500 µg/mL (linha

B), B; 250 µg/mL (linha C), 125 µg/mL (linha D), 62,5 µg/mL (linha E), 32,25 µg/mL (linha F), 15,625 µg/mL (linha G) e 7,8125 µg/mL (linha H).

Os experimentos foram realizados depositando em um tubo de ensaio, os inócuos microbianos em 10 mL de água destilada estéril. A turbidez desta solução foi comparada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland [0,5 mL de BaCl<sub>2</sub> (0,048 mol/L) e 99,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,18 mol/L)] que corresponde a 1,5 x 10<sup>6</sup> Unidade Formadora de Colônias -UFC/mL, em seguida o 5 µL dos inócuos foram depositados em todos os poços das colunas 1-11 e das linhas A-H. Os orifícios das colunas 10, 11 e 12 foram reservados para o controle de crescimento (inócuo e o meio BHM); controle negativo (DMSO 10 %, inócuo e o meio BHM) e o controle de esterilidade da placa (apenas o meio BHM). As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas. Decorrido este intervalo de tempo foi acrescentado a cada um dos poços 20 µL de CTT (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5 % e as microplacas foram incubadas novamente por mais três horas a 35°C. Após este período, o surgimento da coloração vermelha nos poços indicou crescimento microbiano, visto que o CTT se reduz na presença de H<sup>+</sup>, formando o trifetil formazan que apresenta coloração vermelha (Esquema 5, p. 73).

**Esquema 5.** Reação de redução do CTT.



**4.9 Avaliação da Atividade Larvicida**

Os extratos brutos, bem como as frações oriundas das partições, foram submetidos a ensaios frente a larvas do quarto estágio (L4) do mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae). Os experimentos foram realizados no Insetário do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL (LPqPN-IQB/UFAL), seguindo recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) com algumas modificações.

#### 4.9.1 Criação e Manutenção dos Mosquitos

Larvas de *A. aegypti* foram obtidas a partir de ovos depositados em papéis de filtro e adicionados em bacias com água destilada, por um período de 48 h, para eclosão das larvas. Seu desenvolvimento em diferentes estádios (L1, L2, L3 e L4), que posteriormente evoluiu para pupas e por fim até a forma adulta, foi mantido a uma temperatura média de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $80 \pm 4\%$ , com fotoperíodo de aproximadamente 12 horas. Durante este período, as larvas foram alimentadas com ração (autoclavada) para gatos. Os insetos adultos foram mantidos em gaiolas teladas com nylon (15 x 25 cm), alimentados com uma solução de glicose a 10% em chumaços de algodão, trocados diariamente. Para maturação dos ovos, o repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito foi feito, por 1h, com pombos da espécie *Columbia livia*.

#### 4.9.2 Ensaios para Avaliação da Atividade Larvicida

Para a realização dos ensaios foram utilizadas larvas jovens do 4º estágio. Após a triagem de acordo com o estágio, estas foram colocadas em copos plásticos descartáveis de 200 mL. Foram utilizadas por teste 15 larvas, com três réplicas para cada amostra analisada. Após pesagem, os extratos foram dissolvidos em solução aquosa de DMSO a 1%. Para avaliação preliminar da mortalidade, cada grupo foi exposto, na concentração de 250 ppm, à solução teste durante 48 horas. Para o controle negativo utilizou-se solução aquosa de DMSO a 1% e para controle positivo utilizou-se Temefós a 3 ppm, os quais foram mantido nas mesmas condições do teste. A mortalidade das larvas foi computada em 24 e 48 horas após o início do teste.

De acordo com o percentual de mortalidade após 48 horas, obteve-se o grau de atividade dos extratos e frações testados de acordo com os seguintes critérios: a) Mortalidade superior a 75% → considerado promissor; b) Mortalidade entre 50% e 75% → considerado parcialmente promissor; c) Mortalidade entre 25% e inferior a 50% → considerado fracamente promissor e d) Mortalidade inferior a 25% → considerado inativo.

Os testes considerados promissores foram novamente testados em concentrações menores, com o objetivo de observar do máximo ao mínimo de

mortalidade, com base nesses resultados foi calculada a  $CL_{50}$  utilizando o programa POLO pelo método PROBIT de análise.

#### **4.10 Análise Estatística**

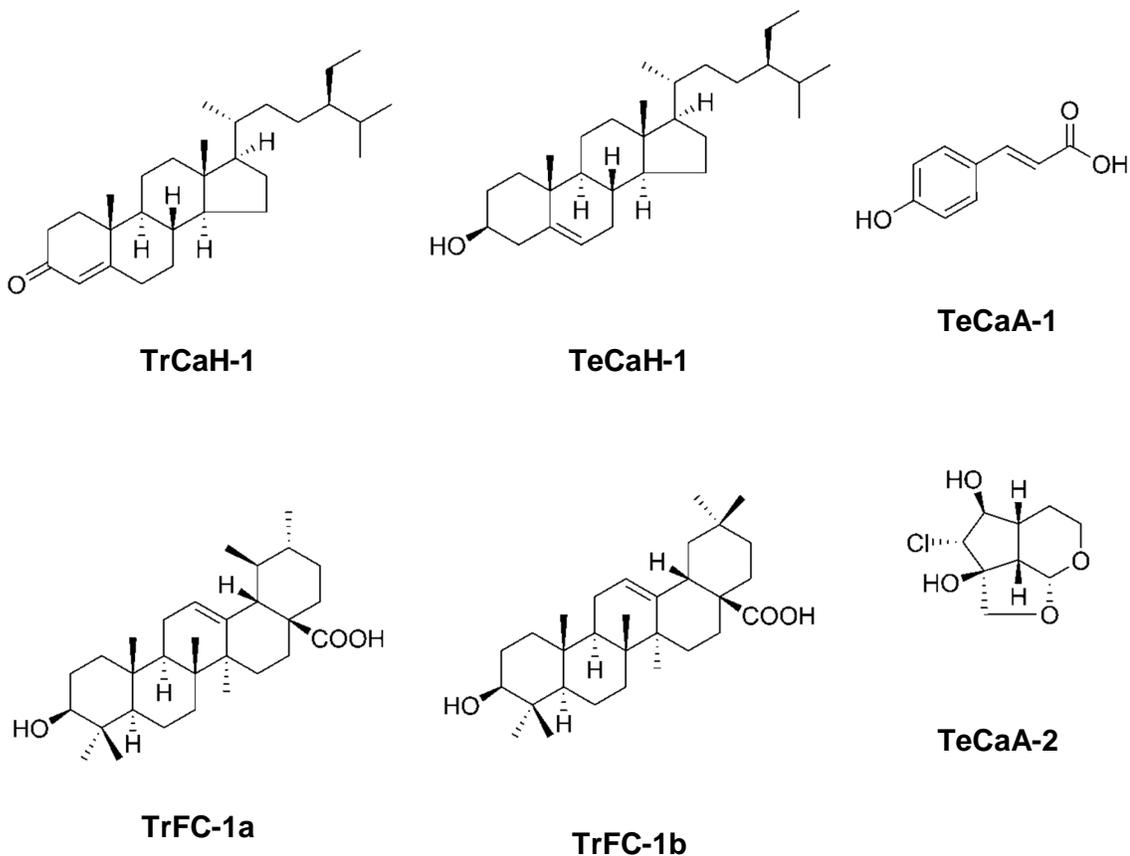
Os resultados obtidos nos experimentos farmacológicos foram analisados através do teste de análise de variância do teste t (ANOVA), seguido do teste estatístico one-way de Newman-Keuls-Student. Os dados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) com um mínimo seis animais, onde os valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativo. Nos ensaios larvicidas a determinação  $CL_{50}$  (concentração da amostra inibitória para 50% de uma população de larvas) foi realizada através do método de análise PROBIT (FINNEY, 1972).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

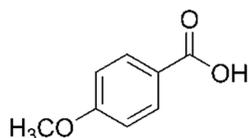
### 5.1 Resultados Referentes à Investigação Fitoquímica

A investigação fitoquímica efetuada com diferentes partes das espécies *T. elliptica* (**Te**) e *T. roseo-alba* (**Tr**) resultou no isolamento de nove substâncias (Figura 11, p. 76) que foram codificadas de acordo com o nome da espécie, da parte da planta estudada (**C** = Caule, **Ca** = Cascas e **F** = Folhas) e do extrato oriundo de partição (**H** = hexano, **C** = clorofórmio, **A** = acetato de etila e **M** = metanol/água) das quais foram isoladas.

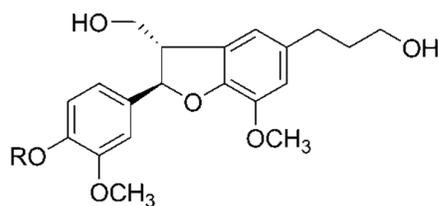
**Figura 11** – Compostos isolados de *T. elliptica* (**Te**) e *T. roseo-alba* (**Tr**).



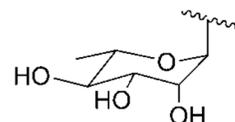
*Continua*



TrCaH-2



TrCaM-1 R =



TrCaC-2 R = H

Fonte: Elaborada pelo autor

## 5.2 Identificação Estrutural dos Compostos Isolados

### 5.2.1 Identificação Estrutural da Substância TeCaA-1

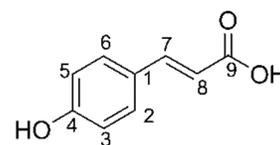
A substância codificada de **TeCaA-1** foi identificada como sendo um derivado fenilpropanoide, conhecido como **Ácido *p*-hidroxicinâmico** ou **Ácido cumárico**, com base na análise dos dados de RMN, bem como comparação com dados descritos na literatura (GOETZ et al., 1999).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 12, p. 78; Tabela 4, p. 80) permitiu reconhecer sinais, cujos valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento estão condizentes com a presença de hidrogênios olefínicos  $\alpha,\beta$ -insaturados em configuração *trans* [ $\delta$  6,26 (d,  $J = 15,9$  Hz, H- $\alpha$ ) e  $\delta$  7,59 (d,  $J = 15,9$  Hz, H- $\beta$ )] e hidrogênios aromáticos em um sistema 1,4-dissubstituídos [ $\delta$  7,43 (d,  $J = 8,6$  Hz, H-2/6) e  $\delta$  6,79 (d,  $J = 8,6$  Hz, H-3/5)].

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT [Figuras 13 (p.79) e 14 (p. 80); Tabela 4, p. 79] evidenciou a presença de sete sinais representando um total de nove átomos (três não hidrogenados e seis mono-hidrogenados), visto que dois deles apresentam intensidades relativas para dois carbonos cada. Dentre esses carbonos foram observados sinais com valores de deslocamentos químicos que confirmam a presença de um grupo carboxila conjugado ( $\delta$  171,09), dois carbonos olefínicos  $\alpha,\beta$ -insaturados [ $\delta$  115,67 (CH, C-8) e  $\delta$  146,56 (CH, C-7)], um carbono aromático oxigenado ( $\delta$  161,09, C-4), além de quatro carbonos aromáticos mono-hidrogenados [ $\delta$  116,8 (C-3 e C-5) e  $\delta$  131,06 (C-

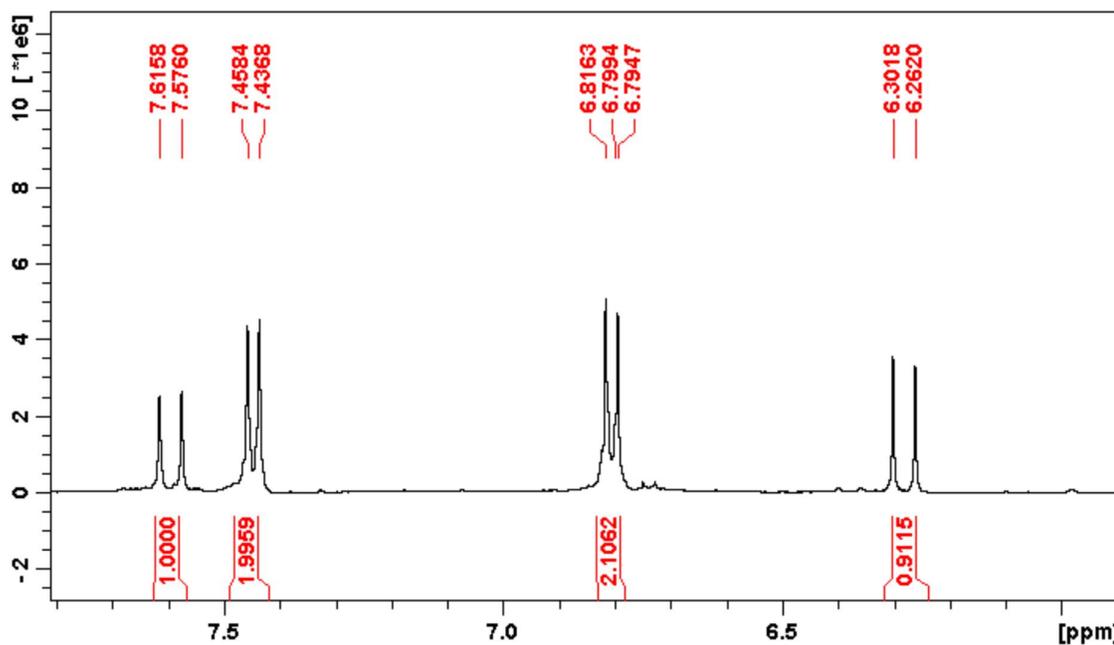
2 e C-6)] e de um carbono  $sp^2$  não hidrogenado ( $\delta$  127,24). Esta análise permitiu constatar que as atribuições de C-2/C-6 e C-1 estão invertidas na literatura. Estas informações, aliadas a comparação com dados de RMN  $^{13}C$  descritos na literatura para o **Ácido *p*-hidroxicinâmico**, também conhecido como **Ácido *p*-cumárico**, permitiram identificar **TeCaA-1** com este ácido.

Estudos prévios demonstram que o **Ácido *p*-hidroxicumárico** (**TeCaA-1**) apresentou atividades hepatoprotetora, pela inibição da enzima 5-lipoxygenase, e antioxidante, inibição do LDL (SHARMA, 2011), e não foi citotóxico para linhagens de células tumorais KB e HeLa (SICHAEM et al., 2012). No gênero *Tabebuia* este ácido foi isolado previamente somente em *T. roseo*. Considerando este e outros estudos que demonstram os diferentes efeitos biológicos para **TeCaA-1**, no presente este composto foi avaliado no modelo de inflamação pulmonar aguda e os resultados estão demonstrados no item 5.4 (p. 122).



**TeCaA-1**

**Figura 12** - Espectro de RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CD_3OD$ ) da substância **TeCaA-1**.



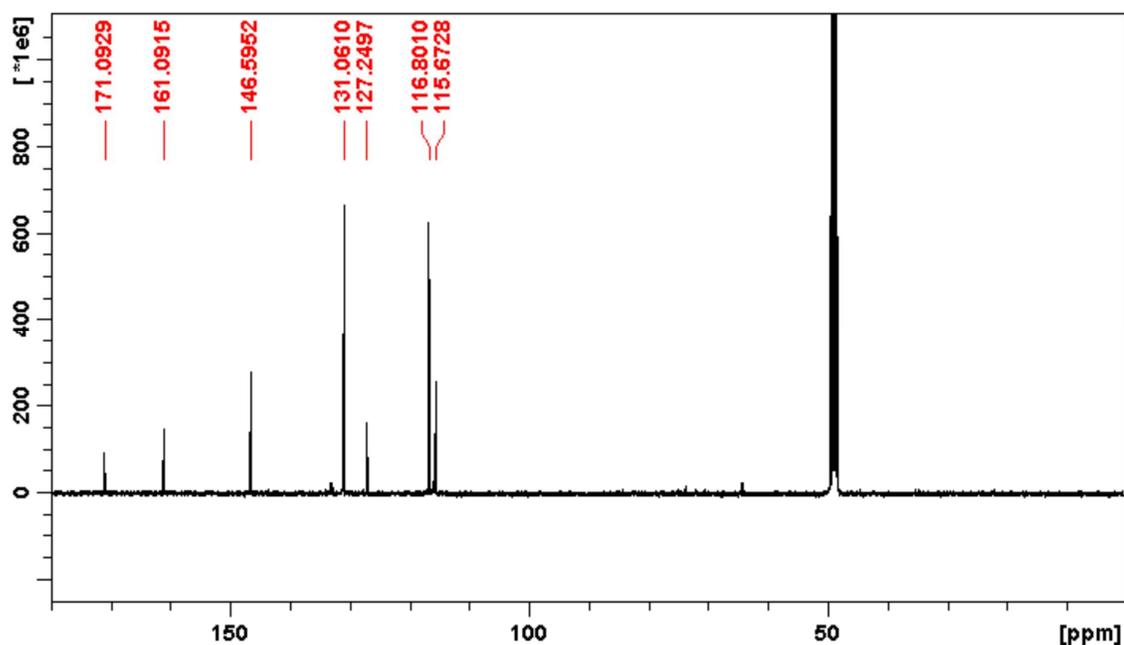
Fonte: Elaborada pelo autor

**Tabela 4.** Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ , Hz) da substância **TeCaA-1** e comparação com dados do **Ácido p-cumárico** em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (GOETZ et al., 1999).

Posição	TeCaA-1		Ácido p-cumárico	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	127,24		131,3 <sup>a</sup>	
2/6	131,06	7,43 (2H, d, J = 8,6)	127,5 <sup>a</sup>	7,54 (2H, d, J = 8,6)
3/5	116,8	6,79 (2H, d, J = 8,6)	117,1	6,89 (2H, d, J = 8,6)
4	161,09		161,2	
7	146,56	7,59 (1H, d, J = 15,9)	146,9	7,69 (1H, d, J = 15,9)
8	115,67	6,26 (1H, d, J = 15,9)	115,8	6,37 (1H, d, J = 15,9)
9	171,09		171,3	

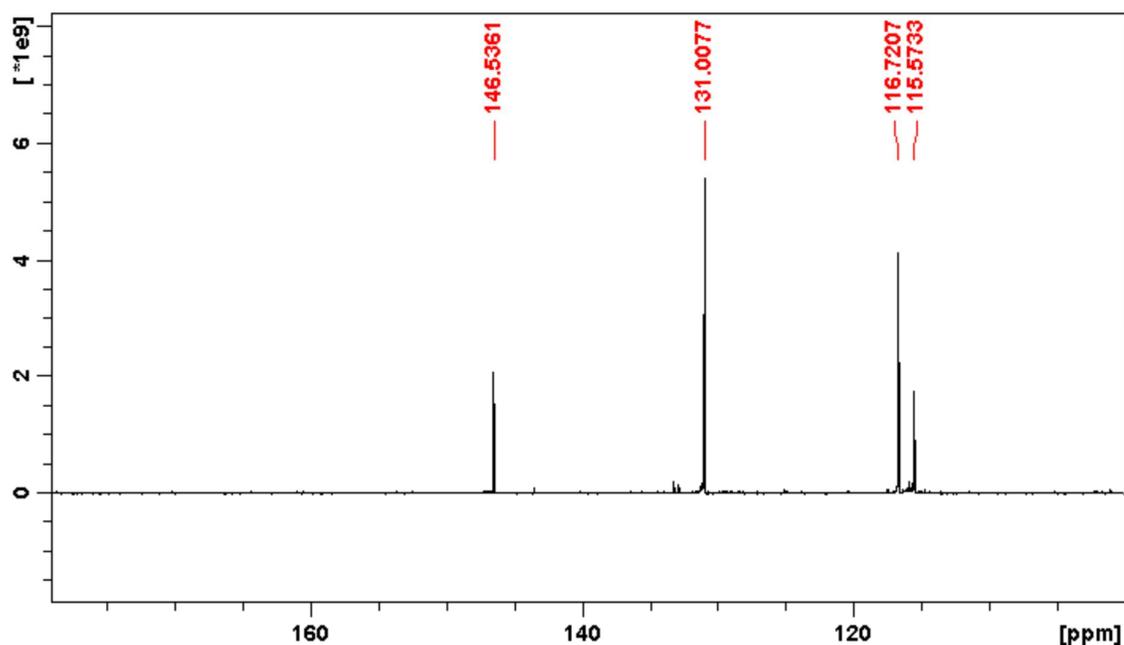
<sup>a</sup> Atribuições invertidas na literatura.

**Figura 13** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TeCaA-1**.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 14** - Espectro DEPT 135 (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância **TeCaA-1**.



Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.2.2 Identificação Estrutural da Substância TeCaA-2

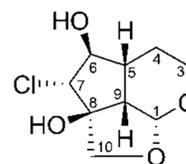
A substância codificada de **TeCaA-2** foi identificada como sendo um iridoide do tipo C<sub>9</sub> tricíclico não glicosilado com base na análise dos dados de RMN, bem como pela comparação com dados de RMN relatados na literatura (MOROTA et al., 1989).

A análise conjunta dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e (Figura 15, p. 86; Tabela 5, p. 85) permitiu reconhecer sinais cujos valores de deslocamentos químicos estão compatíveis com a presença de um hidrogênio dioximetínico [ $\delta$  5,31 (d, 5,4 Hz, H-1)], quatro hidrogênios oximetilênicos [ $\delta$  3,54 (m, H-3 $\alpha$ ),  $\delta$  3,89 (m, H-3 $\beta$ ),  $\delta$  3,44 (d, 10,5 Hz, H-10 $\beta$ ) e  $\delta$  4,41 (d, 10,5 Hz, H-10 $\alpha$ )], um oximetínico [ $\delta$  3,82 (dd, 10,4 Hz, H-6)] e metilênicos [ $\delta$  1,68 (m, H-4)]. Essa feição espectral permitiu sugerir a presença de um composto alifático saturado bastante oxigenado, possivelmente de um iridoide.

A análise conjunta dos dados obtidos dos espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figura 18, p. 87; Tabela 5, p. 85), DEPT 135 (Figura 19, p. 88) e HSQC (Figura 17, p. 87) permitiu reconhecer sinais para nove átomos de carbono (um não hidrogenado, três di-hidrogenados e cinco mono-hidrogenados). Destes, atenção especial foi dada aos sinais característicos de anel pirânico de iridoide que não possui insaturação entre

C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> [ $\delta$  101,28 (C-1, carbono acetálico),  $\delta$  56,46 (C-3) e  $\delta$  21,89 (C-4),  $\delta$  36,52 (C-5) e  $\delta$  45,73 (C-9)]. Adicionalmente, foi observada a presença de três átomos de carbonos, cujos valores de deslocamentos químicos estão compatíveis com a presença de um anel ciclopentano de iridoídes oxigenados em C-6 ( $\delta$  76,10), C-7 ( $\delta$  73,91) e C-8 ( $\delta$  85,12 (C-8). A comparação do valor do deslocamento químico esperado para C-7 ( $\delta$  84,0; MOROTA et al., 1989) em compostos oxigenados permitiu inferir a presença de um átomo de cloro (Cl), que foi confirmado no espectro de RMN <sup>35</sup>Cl (Figura 16, p. 86). Estas informações, aliadas a comparação com dados da literatura permitiram propor para **TeCaA-2** a estrutura do iridoíde conhecido como **Rehmaglutina D**.

A literatura científica relata para este composto atividade antitumoral frente a células de hepatoma humano (SMMC-7721), de carcinomas uterino humano (Hela) e melanótico em ratos, bem como antibacteriana (*B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus*) (DAI, LIU, YANG, 2002; TUNDIS et al., 2008).



**TeCaA-2**

**Rehmaglutina D** foi isolado anteriormente somente em espécies cujas famílias estão inseridas na superordem Lamiiflorae, tais como Simaroubaceae (KOSUGE et al., 1994), Asteraceae (CHEN et al., 2006; XIAO et al., 2013), Bignoniaceae (SOARES, 2006), Orobanchaceae (DAI, LIU, LI, 2002), Schrophulariaceae (KITAGAWA et al., 1973; 1986; NAGAOKA et al., 2001; NGUYEN et al., 2002; ANH et al., 2003; HASSAN et al., 2003; WANG et al., 2006) e Plantaginaceae (YANG; ZHU, 1991; GENÇ et al., 2010)]. Em Bignoniaceae este composto tem sido relatado somente na espécie *Tabebuia caraipa* (SOARES, 2006), o único iridoíde clorado até então reportado nesta família. Considerando que iridoídes são marcadores taxonômicos para esta família (OLMSTEAD et al., 2009; CIPRIANO et al., 2012), o isolamento deste composto no presente trabalho poderá auxiliar no posicionamento do gênero *Tabebuia* dentro da família.

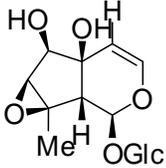
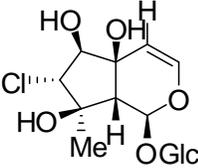
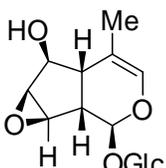
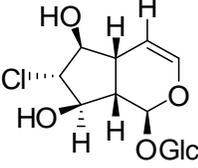
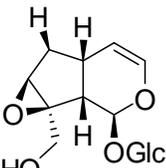
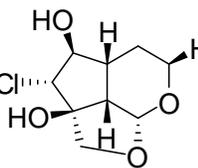
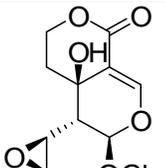
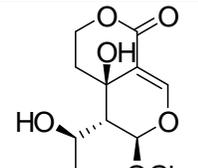
Do ponto de vista biossintético, iridoídes clorados parecem ser produzidos a partir dos correspondentes iridoídes epoxidados pela adição de íon cloreto visto que estes ocorrem com frequência (KITAGAWA et al., 1986). O Quadro 2 (p. 83) mostra alguns exemplos de iridoídes epoxidados e suas respectivas cloridrinadas.

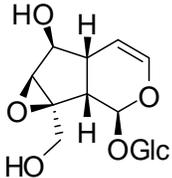
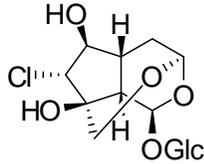
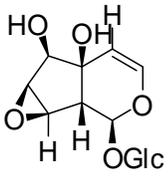
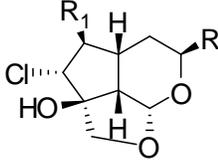
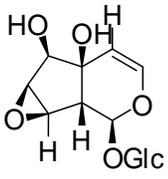
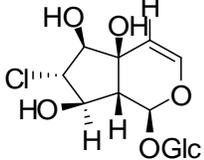
Mais de 4000 produtos naturais halogenados, oriundos de bactérias, fungos, algas, plantas superiores, insetos e animais são conhecidos (NEUMANN, FUJIMORI, WALSH, 2008) e vários deles podem ser formados naturalmente pela influência de ambientes organohalogenados (MURPHY, 2003). No entanto, os mecanismos pelos quais são formados ainda não estão bem esclarecidos (MURPHY, 2003). Sabe-se que os metabólitos secundários desempenham um importante papel em suas defesas contra seus inimigos naturais (patógenos, herbívoros, microorganismos do solo, parasitoides, nematoides, etc.) (WURST et al., 2010) e que quase todas as plantas vivem em associação com micro-organismos, tal como fungos, por exemplo, que podem colonizar a superfície (colonização epifítica) ou ocupar os espaços intercelulares (colonização endofítica - vivem no interior das plantas, em harmonia com o hospedeiro) dos tecidos vegetais. Nessas associações mutualísticas, a convivência entre o fungo e a planta hospedeira é pacífica, ambos são beneficiados. O fungo recebe da planta nutrição e abrigo, aumentando a sua sobrevivência e a planta aumenta sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos e abióticos. Um dos mecanismos pelo qual os fungos aumentam o desempenho do hospedeiro é através da excreção de metabólitos, pois protegendo a planta ele está protegendo a si próprio. Os fungos endofíticos, por exemplo, não causam prejuízos à planta hospedeira, pelo contrário, muitas vezes contribuem para sua defesa, por meio da competição com fitopatógenos, produção de metabólitos e indução de resistência sistêmica, além de em alguns casos promover o crescimento do vegetal, por meio da produção ou indução da síntese de substâncias reguladoras do crescimento e outras (BORGES, 2008). Dada essa complexidade de interações, é possível que o átomo de cloro presente em **TeCaA-2** (**Rehmaglutina D**) possa ter origem em uma das interações da planta com seus simbióticos.

Do ponto de vista químico, **Rehmaglutina D** poderá ser obtido a partir do iridoide **Catalpol** após hidrogenação catalítica e tratamento com HCl-MeOH via clivagem do anel epóxido e formação do acetal entre C-3 e C-10, seguido de hidrólise (KITAGAWA et al., 1991) (Esquema 6, p. 84). Assim sendo, considerando as condições experimentais que foram utilizadas durante as etapas de secagem, extração, isolamento e purificação deste composto no presente trabalho (itens 4.4. e 4.5.1.2. pp. 62-63) sugerimos que a substância codificada de **TeCaA-2**

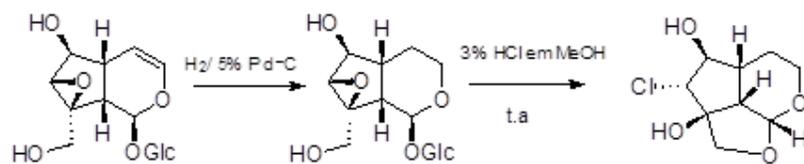
(*Rehmaglutina D*) seja um produto natural cuja possível origem da presença do átomo de cloro foi abordada anteriormente no item 2.6.2 (p. 54).

**Quadro 2.** Exemplos de coocorrência de iridoídeos epoxidados e suas respectivas cloridrinas.

Iridoídeo	Cloridrina/Espécie	Referência
 <p><b>Antirrhinosídeo</b></p>	 <p><b>Linariosídeo</b> (<i>Linaria japonica</i>)</p>	KITAGAWA et al., 1973;
 <p><b>Deutziosídeo</b></p>	 <p><b>7-Clorodeutzíol</b> (<i>Mentzelia decapetala</i>)</p>	EL-NAGGAR, BEAL, DOSKOTCH, 1982
 <p><b>6-Deoxicatalpol</b></p>	 <p><b>Cistaclorina</b> (<i>Cistanche salsa</i>)</p>	KOBAYASHI et al., 1984
 <p><b>Eustomosídeo</b></p>	 <p><b>Eustosídeo</b> (<i>Eustoma russelianum</i>)</p>	UESATO, HASHIMOTO, INOUE, 1979  <b>Continua</b>

Quadro 1 ( <i>Continuação</i> )		
 <p><b>Catalpol</b></p>	 <p><b>Glutinosideo</b> (<i>Rehmannia glutinosa</i>)</p>	KITAGAWA et al., 1986; YOSHIKAWA et al., 1986
 <p><b>Stilbericosideo</b></p>	 <p><b>Rehmaglutina B</b> (<i>R. glutinosa</i>) R = R<sub>1</sub> = OH</p> <p><b>Rehmaglutina D</b> (<i>R. glutinosa</i>) R = H, R<sub>1</sub> = OH</p>	KITAGAWA et al., 1986; YOSHIKAWA et al., 1986
 <p><b>Stilbericosideo</b></p>	 <p><b>Thunbergiosideo</b> (<i>Thunbergia fragans</i>)</p>	JENSEN; NIELSEN, 1989

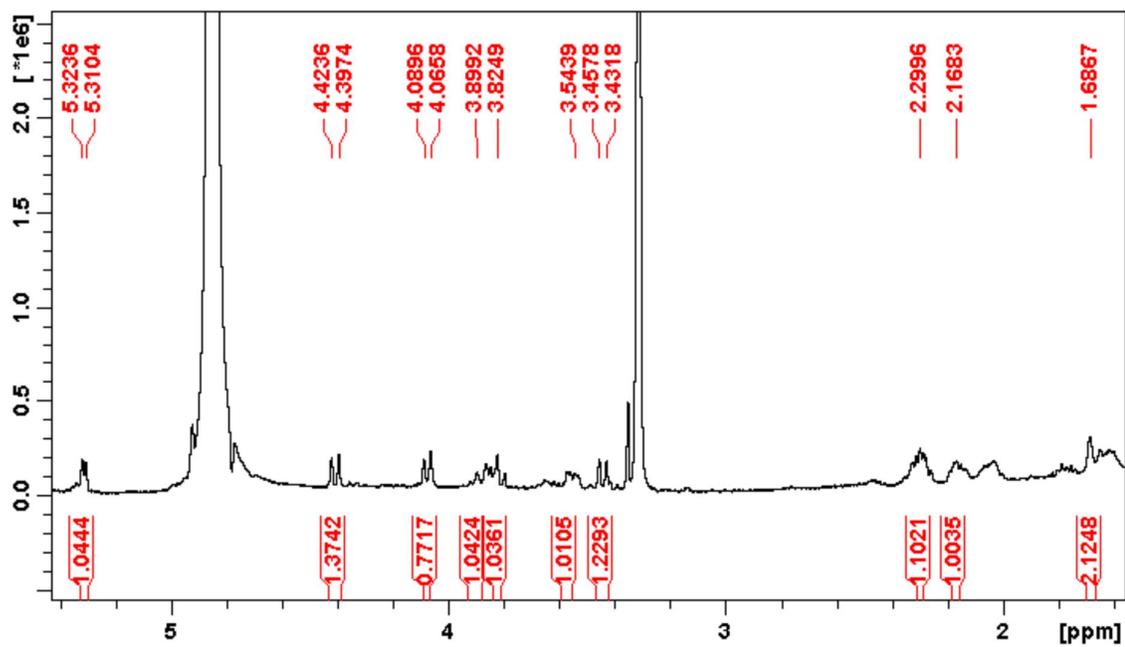
**Esquema 6.** Formação de *Rehmaglutina D* a partir do *Catalpol*.



**Tabela 5** - Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , Hz) da substância **TeCaA-2** e comparação com dados da **Rehmaglutina D** (MOROTA et al., 1989).

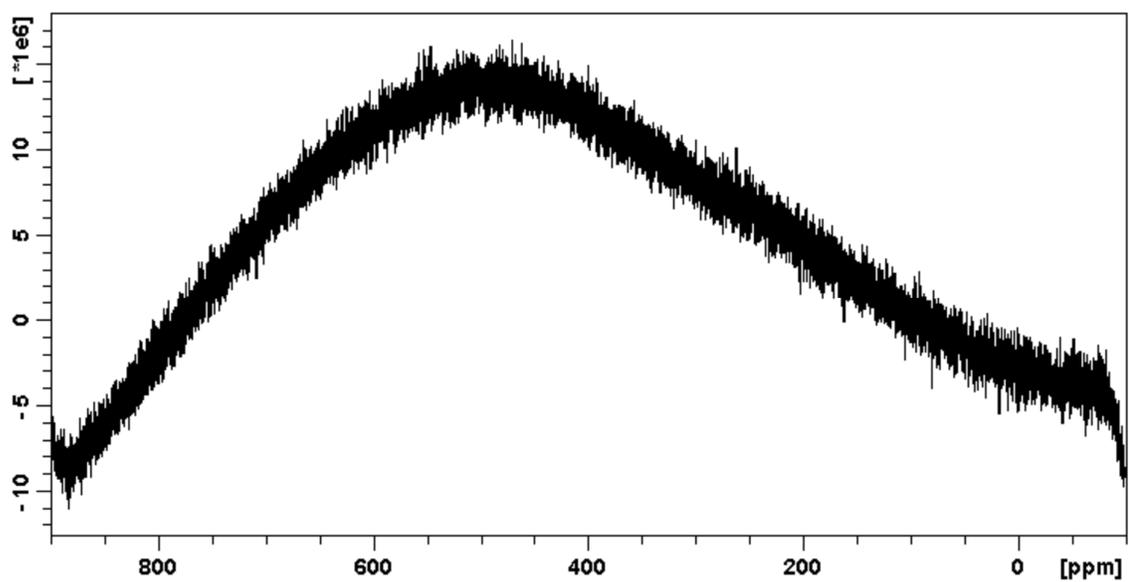
Posição	TeCaA-2		Rehmaglutina D	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>CH</b>				
1	101,28	5,31 (1H,d, J = 5,4)	101,4	5,31 (1H, d, J = 5,5)
5	36,52	2,15 m	36,7	2,15 (1H, dddd, J = 10,3; 10,3; 5,5; 2,0; 0,8)
6	76,10	3,82 (1H, dd, J = 10,1; 10,5)	76,3	3,81 (1H, dd, J = 10,1; 10,1)
7	73,91	4,07 (1H, dd, J = 9,4)	74,1	4,06 (1H, dd, J = 10,1; 1,6)
9	45,73	2,30 (1H, m)	45,9	2,29 (1H, dd, J = 10,3; 5,5)
<b>CH<sub>2</sub></b>				
3	56,62	3,89 (1H <sub><math>\alpha</math></sub> , m) 3,55 (1H <sub><math>\beta</math></sub> ,m)	56,5	3,85 (1H <sub><math>\alpha</math></sub> , ddd, J = 12,8; 11,7; 2,9); 3,54 (1H <sub><math>\beta</math></sub> , dddd, J = 11,7; 5,3; 2,0; 0,8)
4	21,89	1,68 m	22,0	1,78 (1H <sub><math>\alpha</math></sub> , dddd, J = 14,4; 12,8; 5,5; 5,3) 1,66 (1H <sub><math>\beta</math></sub> , dddd, J = 14,4; 2,9; 2,0; 2,0)
10	72,68	4,41 (1H <sub><math>\alpha</math></sub> , d, J = 10,4) 3,44 (1H <sub><math>\beta</math></sub> , d, J = 10,4)	72,8	4,39 (1H <sub><math>\alpha</math></sub> , d, J = 10,3) 3,43 (1H <sub><math>\beta</math></sub> , dd, J = 10,3; 1,6)
<b>C</b>				
8	85,12		85,3	

**Figura 15** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ) da substância **TeCaA-2**.



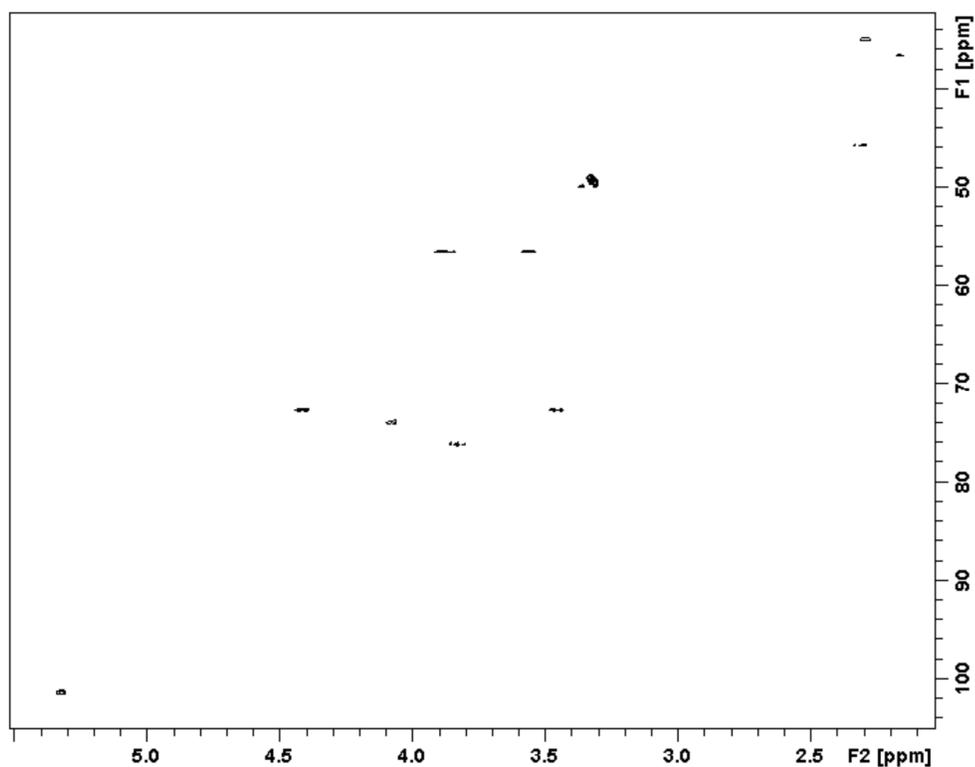
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 16** - RMN  $^{35}\text{Cl}$  (39,20 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TeCaA-2**



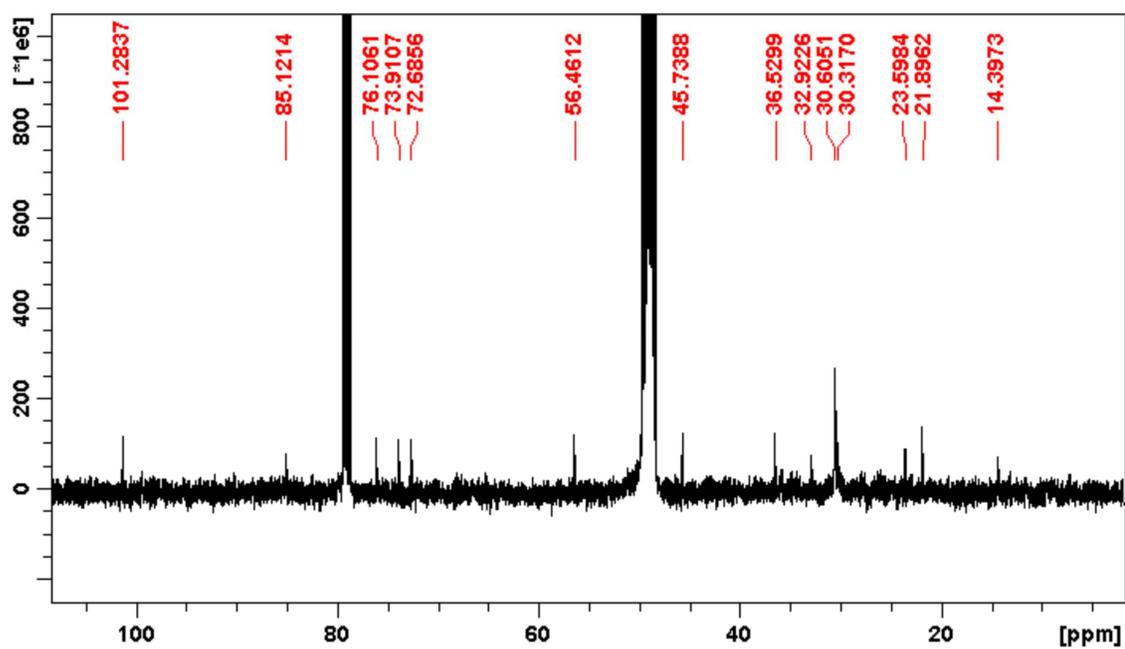
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 17 - Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TeCaA-2**.



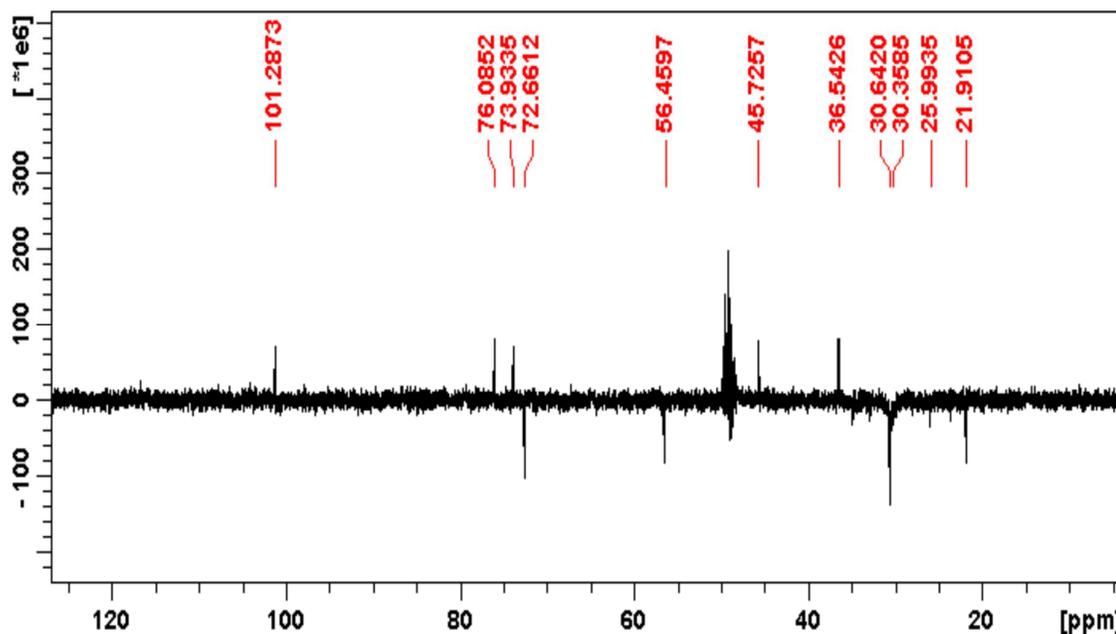
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 18 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ) da substância **TeCaA-2**.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 19** - Espectro DEPT 135 (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>) da substância **TeCaA-2**.



Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.2.3. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de **TeCaH-1** e **TrCaH-1**

As substâncias codificadas de **TeCaH-1** e **TrCaH-1** foram identificadas como sendo fitoesteróides com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN, bem como pela comparação com dados da literatura.

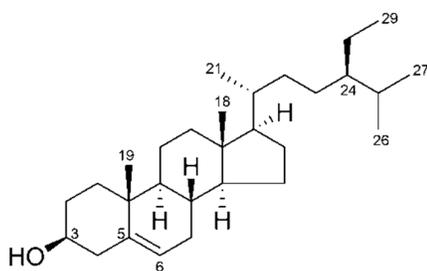
A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN <sup>1</sup>H (Figuras 20-21, p. 92; Tabelas 6-7, pp. 90-91) permitiu reconhecer valores de deslocamentos químicos compatíveis com a presença de hidrogênios carbinólico [**TeCaH-1**: δ 3,54 (m, H-3)], olefínico [**TeCaH-1**: δ 5,35 (m, H-6); **TrCaH-1**: [δ 5,73 (sl)], além de vários sinais simples, duplos e múltiplos entre δ 0,68 a δ 1,01 em **TeCaH-1** e entre δ 0,69 e δ 1,18 em **TrCaH-1**, atribuídos a grupos metílicos, metilênicos e metínicos. No espectro de **TrCaH-1**, foi observado um tripleto em δ 2,34, atribuído a hidrogênio *alfa* a um grupo carbonílico. Estes dados permitiram sugerir para ambos esqueletos de fitoesteróides.

A análise conjunta dos dados dos respectivos espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figuras 22-23, p. 93; Tabelas 6-7, pp. 90-91) e DEPT 135 (Figura 24 p. 94) permitiram confirmar a presença de um carbono carbinólico δ 71,82 (CH, C-3), carbonos

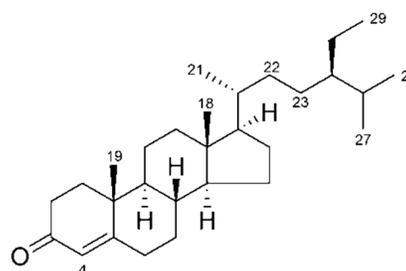
olefínicos para uma ligação dupla trissubstituída em  $\delta$  140,74 (C, C-5) e  $\delta$  121,75 (CH, C-6)], compatíveis com uma ligação entre C-5 e C-6 de um núcleo estigmastano, bem como a presença de seis metilas (Tabela 6, p. 90) em **TeCaH-1**. Nos espectros de **TrCaH-1**, além dos sinais de grupos metilas (Tabela 7, p. 91), foi observada a presença de um grupo carbonílico conjugado [ $\delta$  200,05 (C)], uma ligação dupla conjugada do tipo trissubstituída [ $\delta$  171,00 (C) e  $\delta$  123,70 (CH)].

A análise conjunta dos dados espectrais de RMN e a comparação com dados da literatura permitiu identificar **TeCaH-1** e **TrCaH-1** como sendo fitoesteroides conhecidos como  ***$\beta$ -Sitosterol*** (MACARI; EMERENCIANO; FERREIRA, 1990) e ***Sitostenona*** (GRECA; MONACO; PREVITERA, 1990), respectivamente.

O  ***$\beta$ -Sitosterol*** possui ocorrência frequente em plantas superiores e apresenta diversas atividades biológicas relatadas na literatura. Vale destacar o trabalho realizado por Gupta et al. (2010), que mostra a inibição da expressão de moléculas de adesão, bem como a própria inibição da adesão celular dos neutrófilos a células endoteliais humanas, exibindo um potencial promissor no desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios.



**TeCaH-1**



**TrCaH-1**

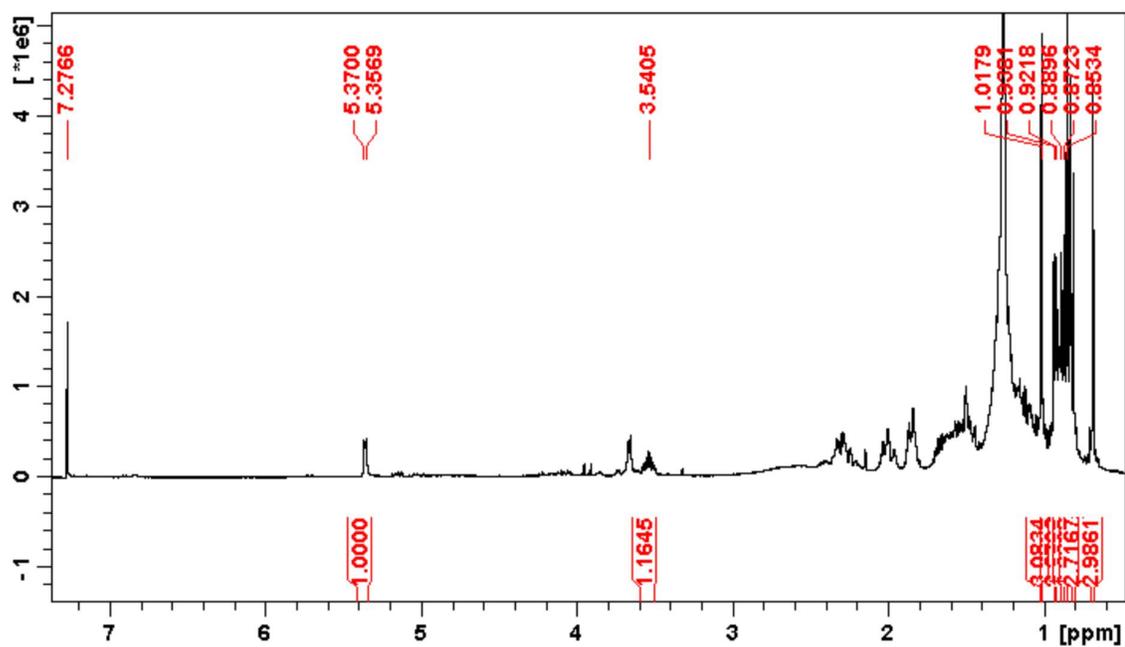
**Tabela 6** - Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , Hz) da substância **TeCaH-1** e comparação com dados da literatura (MACARI; EMERENCIANO; FERREIRA, 1990).

Posição	TeCaH-1		<i><math>\beta</math>-Sitosterol</i>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	37,24		37,30	
2	31,63		31,60	
3	71,82	3,54 (m)	71,70	3,50 (m, 1H)
4	42,30		42,30	
5	140,74		140,80	
6	121,75	5,36 (m)	121,60	5,20 (m, 1H,)
7	31,91		31,90	
8	31,88		31,90	
9	50,10		50,20	
10	36,49		36,50	
11	21,07		21,10	
12	39,76		39,80	
13	42,26		42,30	
14	56,80		56,80	
15	24,30		24,30	
16	28,26		28,30	
17	56,02		56,10	
18	11,86	0,68 (s)	11,90	0,69 (s)
19	19,41	1,01 (s)	19,40	0,99 (s)
20	36,15		36,10	
21	19,83		18,80	
22	33,90		34,00	
23	26,01		26,40	
24	45,80		46,10	
25	29,38		29,00	
26	19,02	0,92 (d, J = 0,65)	19,10	0,83 (d, J = 6,4 )
27	18,78	0,87 (d, J = 6,9)	18,90	0,81 (d, J = 6,4)
28	23,04	0,68 (s)	23,10	
29	11,98	0,83 (t, J = 6,9)	12,30	0,83 (t, J = 6,5)

**Tabela 7.** Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz) da substancia **TrCaH-1** e comparação com dados da **Sitostenona** (GRECA; MONACO; PREVITERA, 1990).

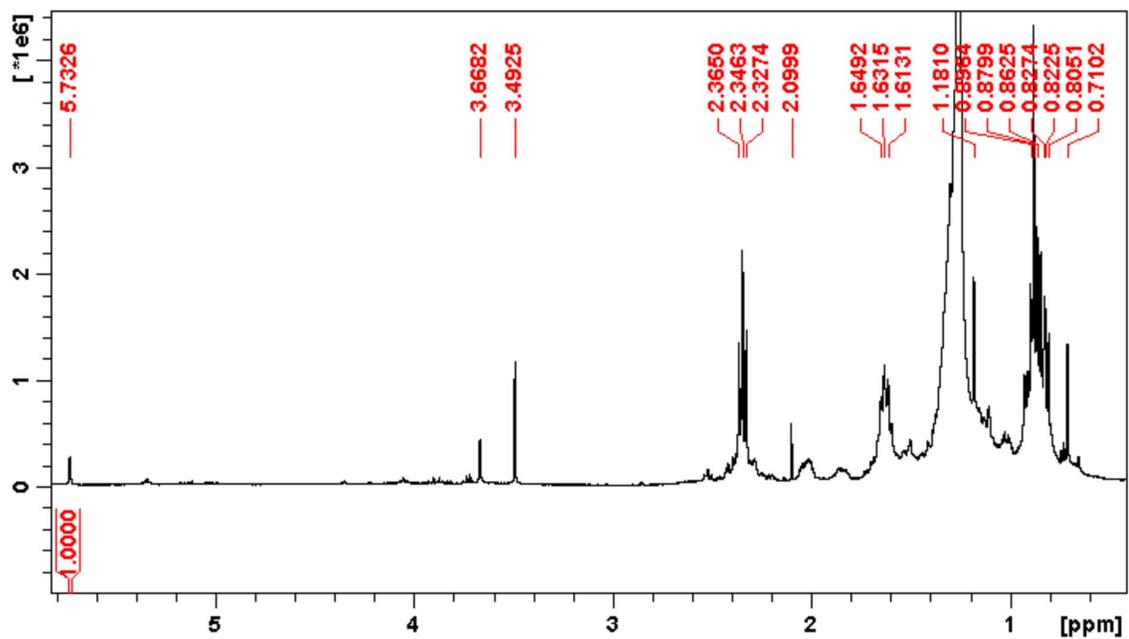
<i>Posição</i>	<b>TrCaH-1</b>		<b>Sitostenona</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	35,66		35,68	
2	33,94	2,34 (t, J = 7,4; 15,0)	33,89	
3	200,05		198,92	
4	123,70	5,73 (sl)	123,64	5,74 (s)
5	171,00		171,01	
6	32,97		32,86	
7	32,04		32,07	
8	35,62		35,73	
9	53,81		53,04	
10	38,62		38,58	
11	21,02		21,03	
12	39,62		39,48	
13	42,39		42,35	
14	55,87		55,94	
15	24,18		24,12	
16	28,18		28,10	
17	56,01		56,08	
18	11,96	0,69 (s)	11,98	0,71 (s)
19	17,37	1,18 (s)	17,38	1,18 (s)
20	36,11		36,10	
21	18,69		18,72	
22	33,88		34,01	
23	26,08		25,99	
24	45,83		45,80	
25	29,23		29,11	
26	19,80		19,81	
27	19,02		19,18	
28	33,68		33,10	
29	11,96		11,14	

Figura 20 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TeCaH-1**.



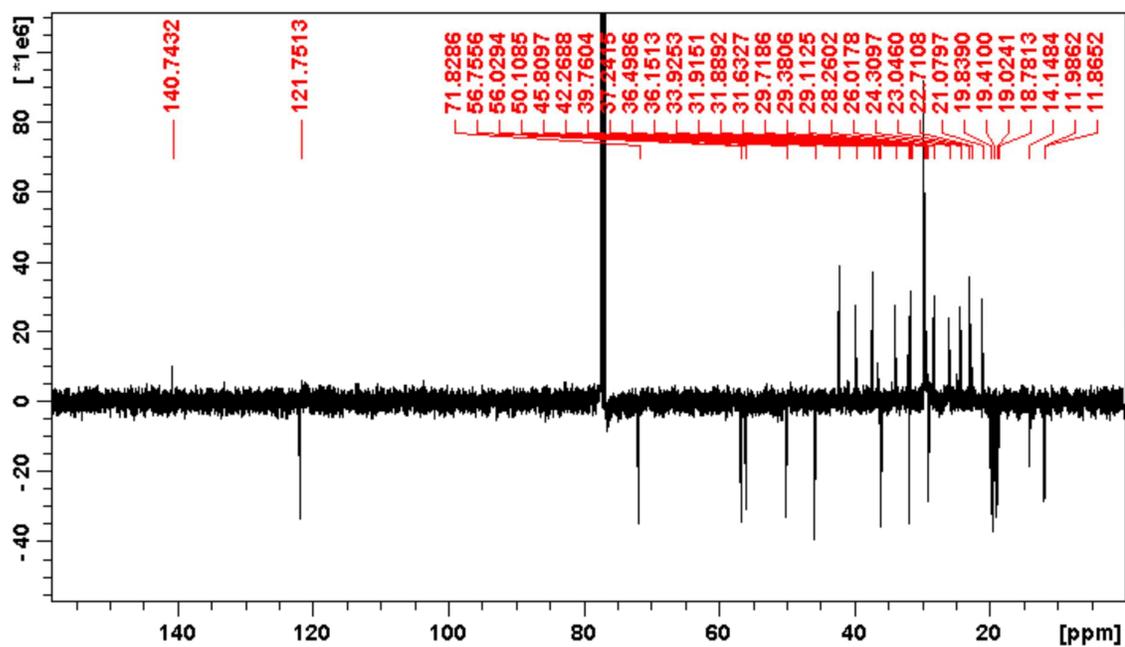
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaH-1**.



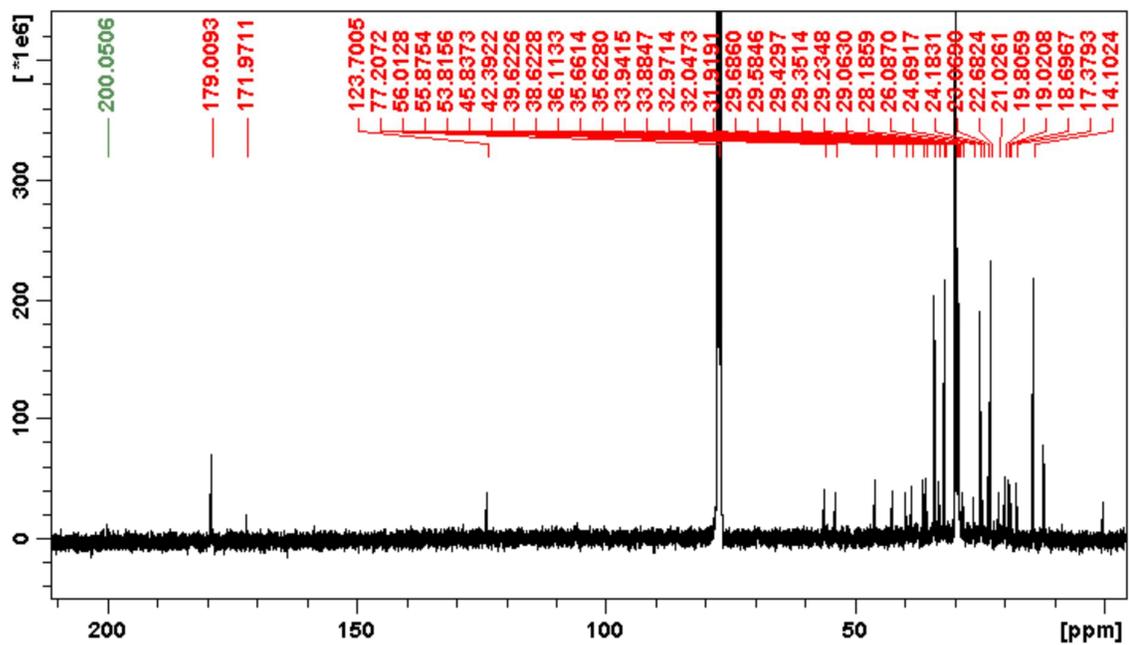
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 22 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TeCaH-1**.



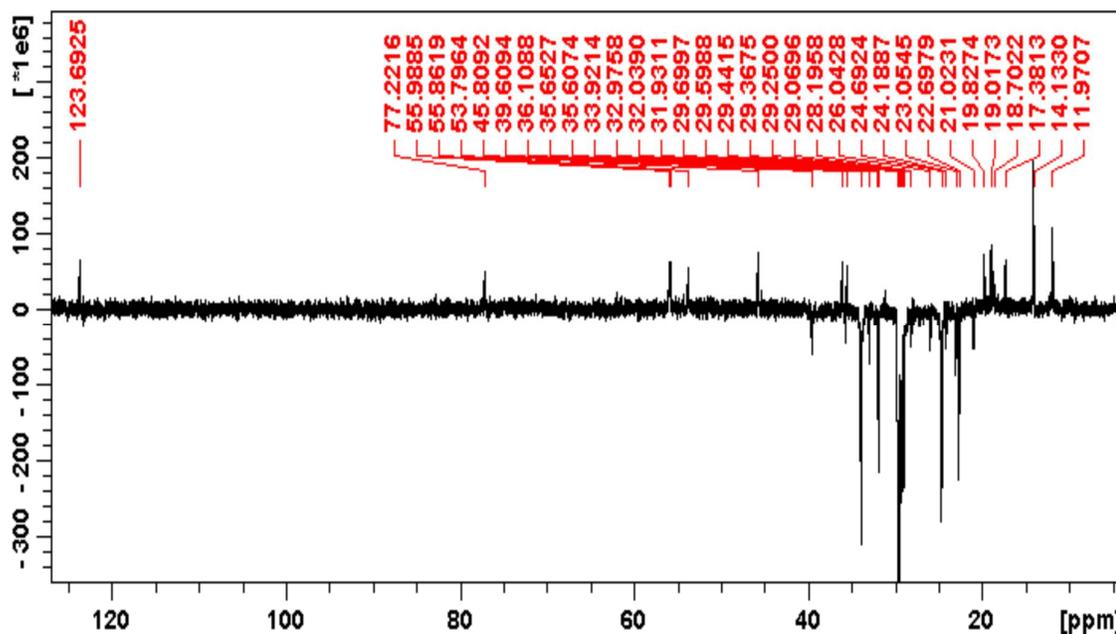
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 23 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaH-1**.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 24** - Espectro DEPT 135 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância **TrCaH-1**.



Fonte: Elaborada pelo autor

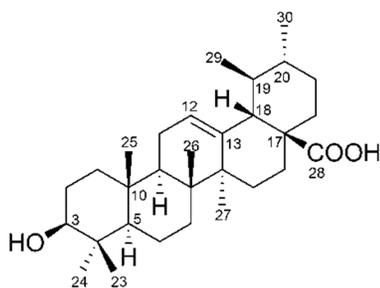
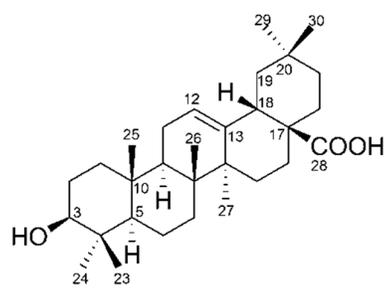
#### 5.2.4 Identificação Estrutural das Substâncias **TrFC-1a** e **TrFC-1b**

A análise dos dados obtidos dos espectros de RMN e a comparação com dados da literatura da amostra codificada de **TrFC-1** revelou que se tratava de uma mistura constituída por dois componentes que foram codificados de **TrFC-1a** e **TrFC-1b**.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura (Figura 25, p. 97) evidenciou sinais cujos deslocamentos químicos estão coerentes com a presença de hidrogênios carbinólicos [**TrFC-1a** e **TrFC-1b**:  $\delta$  3,36 sl], olefínicos [**TrFC-1a**:  $\delta$  5,23 sl e **TrFC-1b**:  $\delta$  5,27 sl], além de vários sinais para grupos metilas entre  $\delta$  0,77 a  $\delta$  1,26 ppm. Esta feição espectral permitiu sugerir que se tratava de uma mistura de triterpenos.

A análise dos espectros de RMN <sup>13</sup>C (Figuras 26-27, pp. 97-98; Tabela 8, p. 96) e DEPT 135 (Figura 28, p. 98) da mistura permitiu reconhecer sinais, cuja natureza e valores de deslocamentos químicos estão compatíveis com esqueletos de triterpenos pentacíclicos das séries ursano (**TrFC-1a**:  $\delta$  125,7 (CH, C-12) e  $\delta$  137,8 (C, C-13) e oleanano (**TrFC-1b**:  $\delta$  122,5 (CH, C-12) e  $\delta$  144,0 (C, C-13), além de outros sinais para os carbonos que diferenciam os dois esqueletos, tais como C-

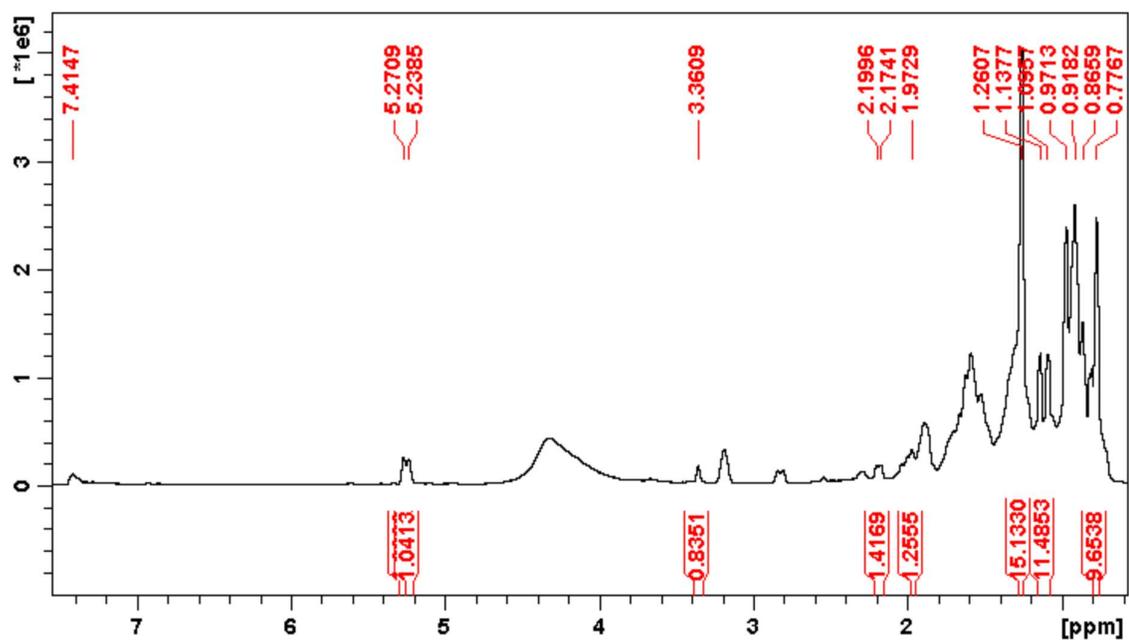
18 (**TrFC-1a**:  $\delta$  53,0 e **TrFC-1b**:  $\delta$  41,9), C-19 (**TrFC-1a**:  $\delta$  39,3 e **TrFC-1b**:  $\delta$  45,8) e C-20 (**TrFC-1a**:  $\delta$  39,1 e **TrFC-1b**:  $\delta$  30,9) de ambos. Estas informações aliadas a comparação com dados da literatura (Tabela 8, p. 96) permitiram identificar **TrFC-1a** como sendo o **Ácido ursólico** e **TrFC-1b** o **Ácido oleanólico**. Estes ácidos e seus derivados ocorrem com frequência em plantas superiores e possuem atividades biológicas de grande interesse, tais como antitumoral, anti-HIV, antibacteriana e antimaláricos (WU et al., 2014). Estes compostos já foram isolados em espécies do gênero *Tabebuia*: **Ácido ursólico** (*T. caraiba* e *T. ochracea*) (IIDA et al., 1998) e **Ácido ursólico** (*T. pentaphylla*) (BISHAY et al., 1987).

**TrFC-1a****TrFC-1b**

**Tabela 8** - Dados de RMN ( $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) das substâncias **TrFC-1a** e **TrFC-1b** e comparação com dados da literatura (FALCÃO; FERNANDES; MENEZES, 2003).

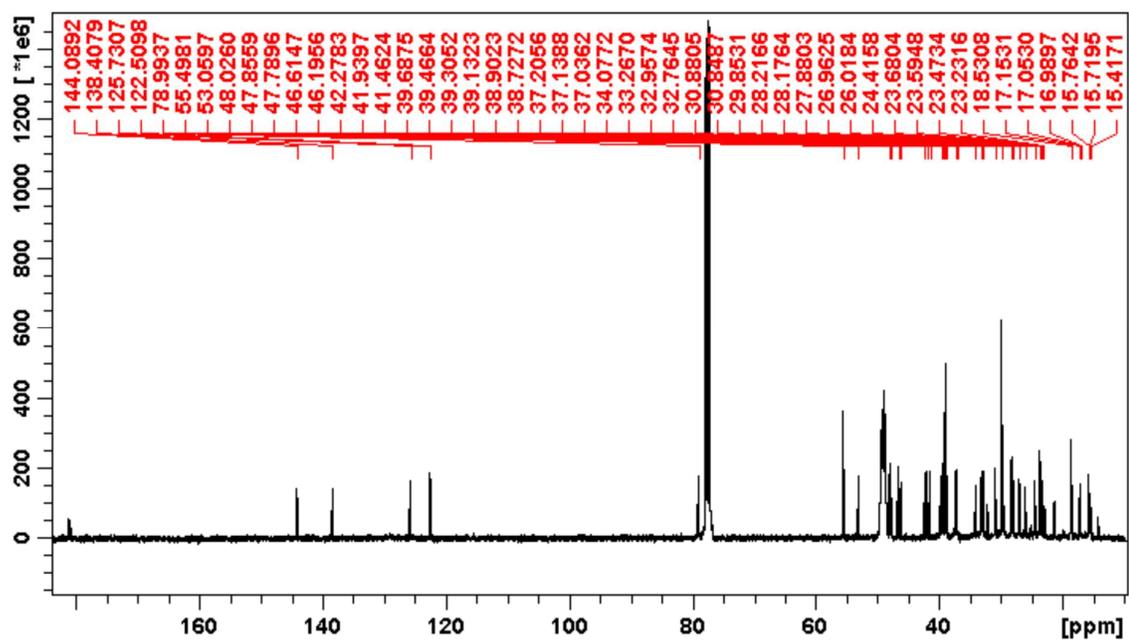
Posição	TrFC-1a	TrFC-1b	Ácido ursólico	Ácido oleanólico
1	38,9	38,9	38,9	38,5
2	23,23	26,9	23,5	27,4
3	78,99	78,99	78,3	78,7
4	37,2	39,5	37,3	38,7
5	55,5	55,5	55,7	55,2
6	18,5	18,5	18,7	18,3
7	33,3	32,7	33,3	32,6
8	39,7	39,7	39,3	39,3
9	46,2	47,8	46,7	47,6
10	37,1	37,0	37,2	37,0
11	23,5	22,8	23,8	23,1
12	<b>125,7</b>	<b>122,5</b>	<b>125,5</b>	<b>122,1</b>
13	<b>138,4</b>	<b>144,0</b>	<b>139,2</b>	<b>143,4</b>
14	42,3	41,9	42,0	41,6
15	29,5	28,2	28,4	27,7
16	23,6	24,4	22,7	23,4
17	48,0	46,6	47,9	46,6
18	<b>53,0</b>	<b>41,9</b>	<b>53,4</b>	<b>41,3</b>
19	<b>39,3</b>	<b>45,8</b>	<b>39,3</b>	<b>45,8</b>
20	<b>39,1</b>	<b>30,9</b>	<b>39,8</b>	<b>30,6</b>
21	30,8	34,0	30,9	33,8
22	38,7	32,9	37,3	32,3
23	28,2	28,1	28,6	28,1
24	16,9	15,7	16,5	15,6
25	15,6	15,4	15,6	15,3
26	15,7	17,0	16,5	16,8
27	23,7	26,0	23,5	26,0
28	180,9	181,0	179,8	181,0
29	17,1	33,2	17,3	33,1
30	21,3	22,8	21,3	23,6

**Figura 25** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias **TrFC-1a** e **TrFC-1b**.



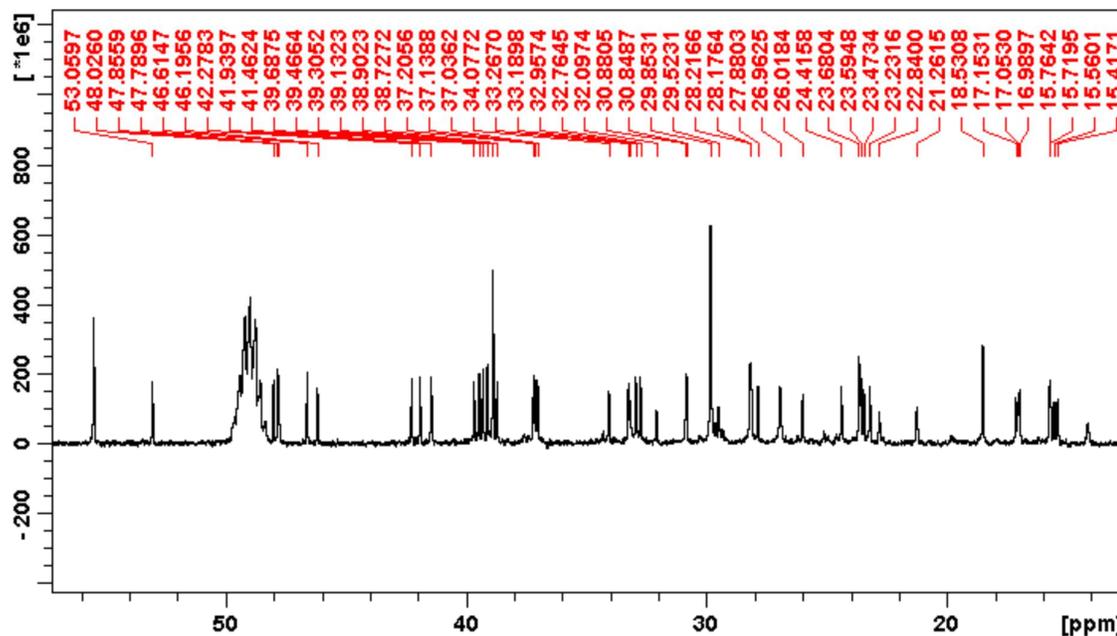
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 26** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias **TrFC-1a** e **TrFC-1b**.



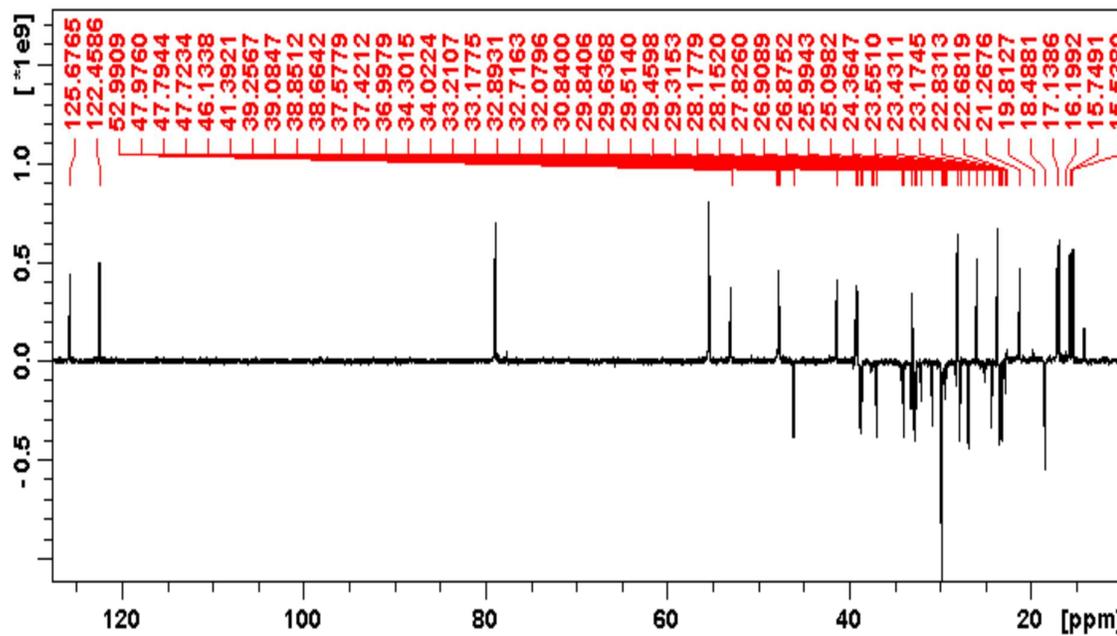
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 27** - Ampliação da região de  $\delta$  10-60 do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias **TrFC-1a** e **TrFC-1b**.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 28** - Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) das substâncias **TrFC-1a** e **TrFC-1b**.



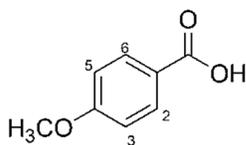
Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.2.5 Identificação Estrutural da Substância Codificada de TrCaC-1

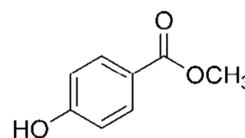
A substância codificada de **TrCaC-1** foi identificada como sendo um derivado do ácido benzoico com base na análise dos dados dos espectros de RMN, bem como pela comparação com os descritos na literatura .

Os dados fornecidos pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 29, p. 100; Tabela 9, p. 100) permitiram identificar sinais cujos valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento estão coerentes com a presença de hidrogênios aromáticos em um sistema 1,4-dissubstituído [ $\delta$  8,06 (d,  $J = 8,9$  Hz) e  $\delta$  6,95 (d,  $J = 8,9$  Hz)], bem como de um grupo metoxila ( $\delta$  3,89 s).

A análise conjunta dos dados dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Figuras 30-31, p. 101; Tabela 9, p. 100) indicou à presença de sinais para oito átomos de carbonos (três não hidrogenados, quatro monohidrogenados e um trihidrogenado). Dentre os quais foram observados sinais com valores de deslocamentos condizentes com a presença de uma carbonila conjugada de ácido carboxílico [ $\delta$  171,13 (C)], um carbono aromático oxigenado [ $\delta$  164,03 (C, C-4)] e quatro carbonos aromáticos monohidrogenados [ $\delta$  113,74 (C-3 e C-5) e  $\delta$  132,33 (C-2 e C-6)], além de um carbono  $\text{sp}^2$  não hidrogenado ( $\delta$  121,59). Estas informações aliadas a comparação com dados descritos na literatura permitiram propor para **TrCaC-1** a estrutura do **Ácido *p*-metoxibenzoico**, também conhecido como **Ácido anísico**. Este ácido foi encontrado também nas raízes de *T. rosea* (SICHAEM et al., 2012) e nas cascas de *T. heptaphylla* (GARCEZ et al., 2007). Segundo Singh et al. (2006), este ácido apresentou um grande potencial anti-inflamatório ao inibir enzimas específicas, fosfolipases de baixo peso molecular (PLA2s), que são responsáveis pela liberação do ácido araquidônico.



**TrCaC-1**

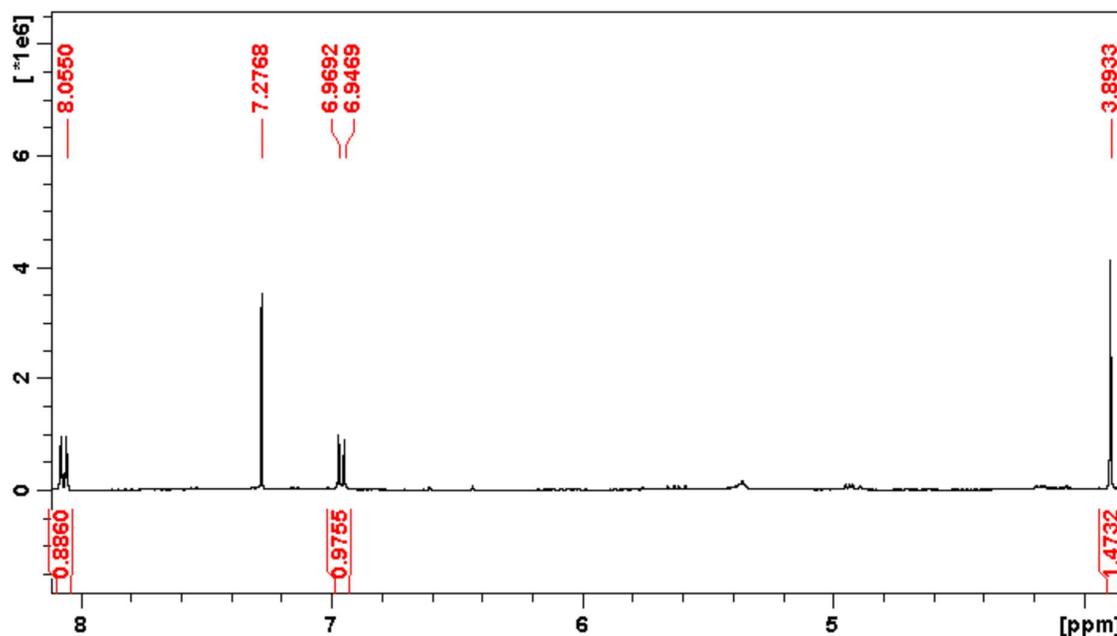


**Metilparabeno**

**Tabela 9.** Dados de RMN ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$  100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Hz) da substancia **TrCaC-1** e comparação com dados da literatura do **Ácido anísico** (CHAGAS, 2011) e do **Metilparabeno** (SUGITA et al., 2014).

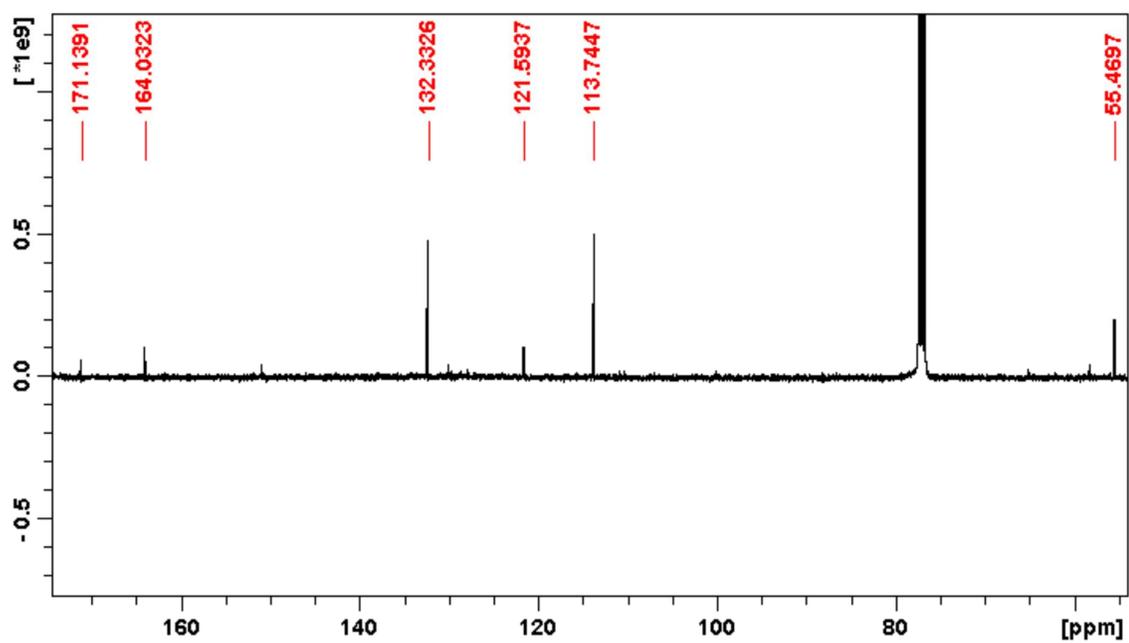
Posição	TrCaC-1		Ácido anísico	Metilparabeno
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	121,59		123,04	122,98
2	132,33	8,06 dd J = 8,9	131,81	132,09
3	113,74	6,95 dd J = 8,9	113,85	115,31
4	164,03		163,70	159,92
5	113,74	6,95 dd J = 8,9	113,85	115,31
6	132,33	8,06 dd J = 8,9	131,81	132,09
OMe	55,5	3,89 s	55,21	52,09
C=O	171,13		170,00	167,00

**Figura 29** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-1**.



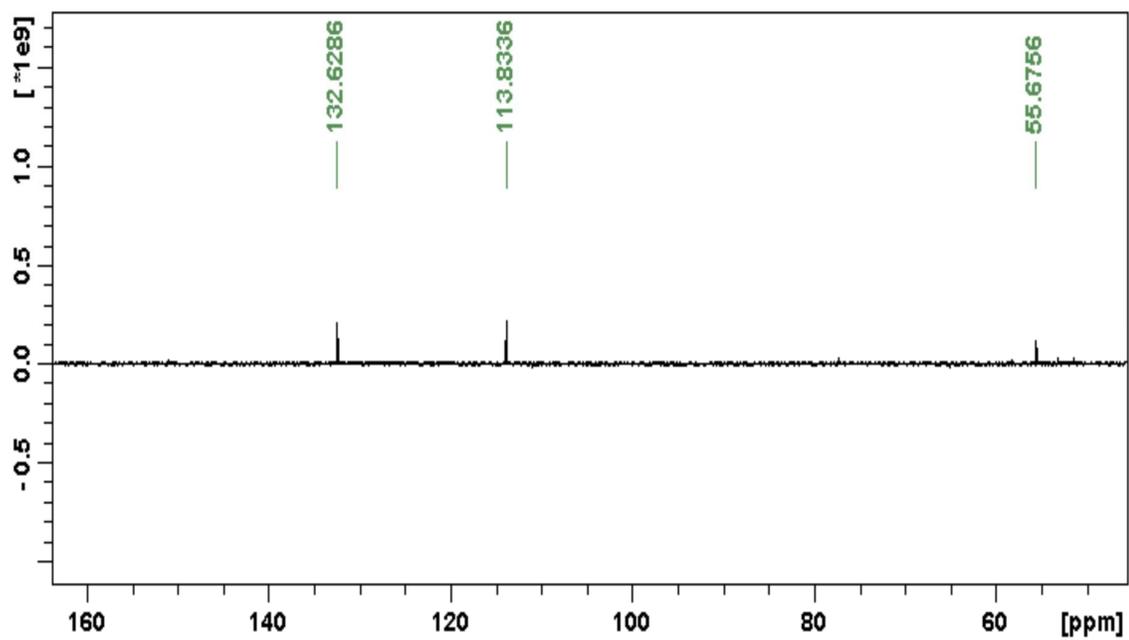
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 30** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-1**.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 31** - Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-1**.



Fonte: Elaborada pelo autor

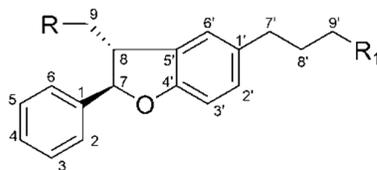
### 5.2.6 Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de TrCaC-2 e TrCaM-1

As substâncias codificadas de **TrCaC-2** e **TrCaM-1** foram identificadas como sendo lignoides com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN e pela comparação com dados dos compostos correspondentes descritos na literatura.

Os dados obtidos dos respectivos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 32-35, pp. 107-108; Tabelas 10-11, pp. 105-106) sugeriram para ambas as substâncias a presença de sistemas aromáticos dos tipos 1,3,4-trissubstituídos [**TrCaC-2**:  $\delta$  6,67 (d,  $J = 8,2$  Hz),  $\delta$  6,93 (d,  $J = 1,7$  Hz),  $\delta$  6,88 (dd,  $J = 8,2$  e  $1,7$  Hz); **TrCaM-1**:  $\delta$  7,09 (d,  $J = 8,5$  Hz),  $\delta$  7,01 (d,  $J = 1,9$  Hz) e  $\delta$  6,93 (1H, dd,  $J = 8,5$  e  $1,9$  Hz)] e 1,2,3,5-tetrassubstituídos [**TrCaC-2**:  $\delta$  6,86 (s) e  $\delta$  6,86 (s); **TrCaM-1**:  $\delta$  6,73 (s) e  $\delta$  6,70 (s)], um hidrogênio oxibenzílico [**TrCaC-2**:  $\delta$  5,52 (d,  $J = 7,3$  Hz); **TrCaM-1**:  $\delta$  5,55 (1H, d,  $J = 6$  Hz)], dois grupos metilênicos [**TrCaC-2**:  $\delta$  2,65 (dd,  $J = 7,2$  Hz) e  $\delta$  1,87 (m); **TrCaM-1**:  $\delta$  2,62 (2H, dd,  $J = 7,8$  Hz) e  $\delta$  1,81 (2H, m)], dois grupos de hidrogênios oximetilênicos [**TrCaC-2**:  $\delta$  3,67 (d,  $J = 6,2$  Hz) e  $\delta$  3,78 (d,  $J = 4,5$  Hz),  $\delta$  3,66 (dd,  $J = 6,4$  Hz); **TrCaM-1**:  $\delta$  3,80 (m) e  $\delta$  3,55 (dd,  $J = 6,5$  Hz)] e um metínico [**TrCaC-2**:  $\delta$  3,59 (m); **TrCaM-1**:  $\delta$  3,80 (m)] e dois grupos metoxilas [**TrCaC-2**:  $\delta$  3,84 (s) e  $\delta$  3,86 (s); **TrCaM-1**:  $\delta$  3,78 (s) e  $\delta$  3,84 (s)]. Em **TrCaM-1** foi observado também sinais para uma unidade  $\alpha$ -L-ramnopiranosídica ( $\delta$  5,32 d,  $J = 1,8$  Hz, hidrogênio anomérico),  $\delta$  1,2 (3H, d,  $6,2$  Hz, H-6''), além de outros sinais para hidrogênios oximetínicos (Tabela 11, p. 106).

A análise conjunta dos respectivos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  [Figuras 38-40, pp. 110-111), DEPT 135 [Figuras 39 (p. 110) e 43 (p. 112)] e Tabelas 10-11, pp. 105-106) evidenciou a presença de um total de vinte átomos de carbonos para **TrCaC-2** (sete não hidrogenados, sete monoidrogenados, quatro diidrogenados e dois triidrogenados) e de vinte e seis para **TrCaM-1** (sete não hidrogenados, doze monoidrogenados, quatro diidrogenados e três triidrogenados). Dentre esses carbonos foram identificados para ambos componentes sinais para dois grupos metoxilas [**TrCaC-2**:  $\delta$  56,0 (3-OMe) e  $\delta$  55,9 (3'-OMe); **TrCaM-1**:  $\delta$  56,4 (3-OMe) e  $\delta$  56,5 (3'-OMe)] e para uma unidade  $\alpha$ -L-ramnopiranosídica em **TrCaM-1** [ $\delta$  101,1 (C-1''),  $\delta$  72,0 (C-2''),  $\delta$  71,8 (C-3''),  $\delta$  73,6 (C-4''),  $\delta$  70,6 (C-5'') e  $\delta$  17,7 (C-6'')]. Estas informações permitiram sugerir para ambos um esqueleto contendo duas unidades

fenilpropanoídica (C<sub>6</sub>.C<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, possivelmente de um lignoides. Adicionalmente foram observados nos respectivos espectros sinais para um carbono oxibenzílico [**TrCaC-2**:  $\delta$  87,8 (C-7); **TrCaM-1**:  $\delta$  88,2 (C-7)], um carbono metínico desprotegido [**TrCaC-2**:  $\delta$  53,8; **TrCaM-1**:  $\delta$  55,4 (C-8)], dois carbonos oximetilênicos [**TrCaC-2**:  $\delta$  64,9 (C-9), 62,0 (C-9') e **TrCaM-1**:  $\delta$  63,9 (C-9) e  $\delta$  62,1 (C-9')], dois carbonos metínicos [**TrCaC-2**:  $\delta$  32,6 (C-7') e  $\delta$  35,4 (C-8'); **TrCaM-1**:  $\delta$  31,9 (C-7') e  $\delta$  34,5 (C-8')], além de outros sinais cuja natureza e valores de deslocamentos químicos (Tabelas 10-11, pp. 105-106) estão compatíveis com esqueleto de lignoides do tipo diidrobenzofurano substituído nas posições 3,4,3' (PARK, et al., 2011).

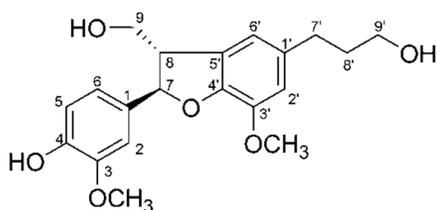


### Esqueleto Básico de Neolignanas do Tipo Diidrobenzofurânica

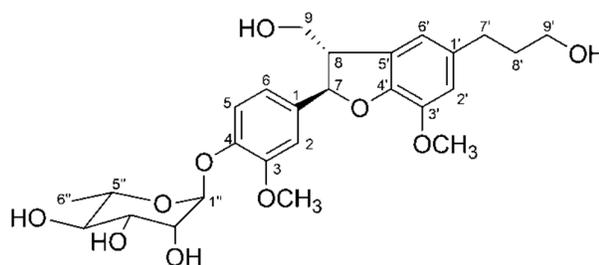
As correlações observadas no mapa de contorno dos espectros HMBC (Figuras 46-47, p. 114) de ambos, além de permitir atribuir inequivocamente os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos das moléculas, permitiram também definir as posições dos grupos metoxilas, especialmente pelas correlações entre os hidrogênios desses grupos e seus carbonos aos quais estão ligados [**TrCaC-2** e de **TrCaM-1**, OMe/C-3 e OMe/C-3'] e da unidade ramnopropanoídica pela correlação entre H-1'' (hidrogênio anomérico) e o C-4.

As configurações relativas dos estereocentros (C-7 e C-8) de ambos compostos foram sugeridas com base no valor de deslocamento químico de H-7 (**TrCaC-2**:  $\delta$  5,52 J = 7,5 Hz); **TrCaM-1**:  $\delta$  5,55 (J = 6,0 Hz) entre H-7 e H-8. Segundo Garcia-Munoz et al. (2006), quando o valor do deslocamento químico de H-7 é mais desprotegido ( $\delta \sim 5,80$ ) é sugerida uma configuração relativa *cis* entre estes hidrogênios; enquanto que valores de deslocamento químico mais protegidos ( $\delta \sim 5,50$ ) sugerem uma configuração relativa *trans*. Com base nos dados observados (Tabelas 10-11, pp. 105-106) foram sugeridas configurações relativas *trans* entre H-7 e H-8 de ambos. Entretanto, a configuração relativa *trans* pode ser observada nos dois estereoisômeros (7*R*,8*S* ou 7*S*,8*R*), apesar de não termos encontrados registro

do estereoisômero *7R,8R* proveniente de plantas na literatura, análise da rotação óptica de **TrCaM-1** foi levorotatória ( $\alpha_D^{26,2} = -21,7^\circ$ ). Esta informação, aliada a comparação com os dados da literatura (PARK et al., 2011), permitiram propor para **TrCaC-2** a estrutura do **Álcool diidrodeidroconiferílico** e para **TrCaM-1** a do (*7R,8S*)-**Álcool 4-O- $\alpha$ -L-Ramnopiranosil-trans-diidrodeidroconiferílico**, conhecido como **Icarisideo E<sub>4</sub>**.



TrCaC-2



TrCaM-1

Vários estudos têm demonstrado os efeitos biológicos do **Álcool diidrodeidroconiferílico** (**TrCaC-2**) e de seus derivados, como **TrCaM-1** (**Icarisideo E<sub>4</sub>**). Dentre os quais estão efeitos antifúngico (CHOI et al., 2012) e anti-HIV (LEE et al., 2010), atividade estrogênica (INNOCENTI et al., 2007) e inibitória de metaloproteinase (KIM et al., 2004) e para **TrCaM-1** (**Icarisideo E<sub>4</sub>**) efeito citotóxico sobre células tumorais (WOO et al., 2011; YUAN et al., 2011), ação antineuroinflamatória (KIM et al., 2013), atividade anti-HIV-1 (LIANG et al., 2013), efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeo em células RAW 264.7 (KWON et al., 2010; LI et al., 2012), atividade antiproliferativa contra células de câncer de colo uterino (GONZÁLEZ-SARRÍAS et al., 2012) e antioxidante (LI & SEERAM, 2011; YOSHIKAWA et al., 2011). No presente trabalho, esta substância foi avaliada e apresentou resultados promissores nos ensaios antinociceptivos (Item 5.3, p. 115).

**Tabela 10** - Dados de RMN ( $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) da substância **TrCaC-2** e comparação com os do **Álcool diidrodeidroconiferílico** (PARK, et al., 2011).

Posição	TrCaC-2		(7R,8S)- Álcool diidrodeidroconiferílico	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	133,1		133,6	
2	108,9	6,93 (1H, d, J = 1,7)	109,4	6,95 (1H, d, J = 1,6 Hz)
3	146,7		147,9	
4	146,4		146,3	
5	114,3	6,67 (1H, d, J = 8,2)	115,0	6,72 (1H, d, J = 8,0 Hz)
6	119,3	6,88 (1H, dd, J = 7,9; 1,7)	118,6	6,83 (1H, dd, J = 8,0; 1,6)
7	87,8	5,52 (1H, d, J = 7,4)	87,8	5,47 (1H, d, J = 5,2)
8	53,8	3,59 (1H, m)	54,2	3,45 (1H, m)
9	63,9	3,67 (1H, d, J = 6,2) 3,78 (1H, d, J = 4,5)	63,8	3,46 (1H, dd, J = 11,2; 6,4); 3,74 (1H, dd, J = 11,2; 5,6)
1'	135,3		135,7	
2'	112,4	6,86 (1H, s)	113,0	6,78 (1H, s)
3'	144,1		144,0	
4'	145,6		146,4	
5'	127,9		128,6	
6'	116,1	6,86 (1H, s)	116,8	6,78 (1H,s)
7'	31,95	2,65 (2H, dd, J = 7,2)	31,7	2,62 (2H, t, J = 7,2)
8'	34,5	1,87 (2H, m)	34,6	1,81 (2H, m)
9'	62,1	3,66 (2H, dd, J = 6,4)	61,1	3,56 (2H, t, J = 6,4)
3-OMe	55,9	3,84 (s)	55,2	3,79 (3H, s)
3'-OMe	56,0	3,86 (s)	55,6	3,82 (3H, s)

**Tabela 11** - Dados de RMN ( $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) da substância **TrCaM-1** e comparação com os dados de **Icarisideo E<sub>4</sub>** (NAKANISHI et al., 2004).

Posição	TrCaM-1		Icarisideo E <sub>4</sub>	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	138,5		138,9	
2	111,3	7,01 (d, J = 1,9)	111,4	7,03 (d, J = 1,8)
3	151,7		152,2	
4	146,2		146,6	
5	119,4	7,09 (d, J = 8,5)	119,7	7,08 (d, J = 8,4)
6	118,9	6,93 (dd, J = 8,5; 1,9)	119,2	6,91 (dd, J = 8,4; 1,8)
7	88,2	5,55 (d, J = 6,0)	88,6	5,55 (d, J = 5,9)
8	55,4	3,80 (m)	55,7	3,46 (q, J = 5,4)
9	64,9		65,1	3,85 (dd, 11,4; 5,4) 3,75 (dd, 11,4; 7,8)
1'	136,9		137,1	
2'	117,7	6,74 (s)	114,3	6,73 (s)
3'	145,3		145,3	
4'	147,0		147,6	
5'	129,4		129,7	
6'	113,9	6,72 (s)	118,0	6,72 (s)
7'	32,6	2,62 (d, J = 7,8)	32,9	2,62 (t, J = 7,7)
8'	35,4	1,81 (m)	35,8	1,81 (tt, J = 7,7; 6,5)
9'	62,0	3,55 (2H, d, J = 6,5)	62,3	3,56 (t, J = 6,5)
3-OMe	56,4	3,78 (s)	56,5	3,80 (s)
3'-OMe	56,5	3,84 (s)	56,9	3,86 (s)
<b>Rha</b>				
1	101,1	5,35 (1H, d, J = 1,8)	101,5	5,34 (1H, d, J = 1,8)
2	72,0	3,88 (1H, m)	72,1	3,88 (1H, dd, J = 1,8; 3,6)
3	71,8	4,00 (1H, m)	72,3	4,00 (1H, dd, J = 3,6; 9,6)
4	73,6	3,44 (1H, m)	73,9	3,45 (1H, dd, J = 9,6; 9,6)
5	70,6	3,79 (1H, m)	70,9	3,80 (1H, m)
6	17,7	1,2 (3H, d, 6,2)	18,0	1,21 (3H, d, 6,0)

Figura 32 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-2**.

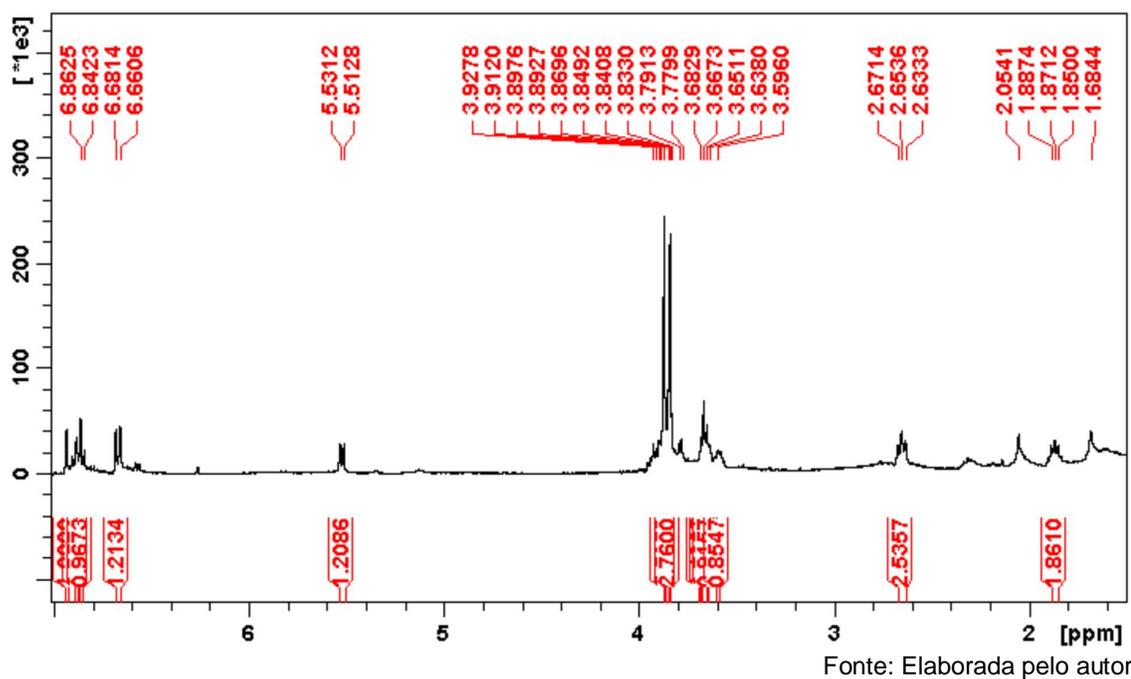
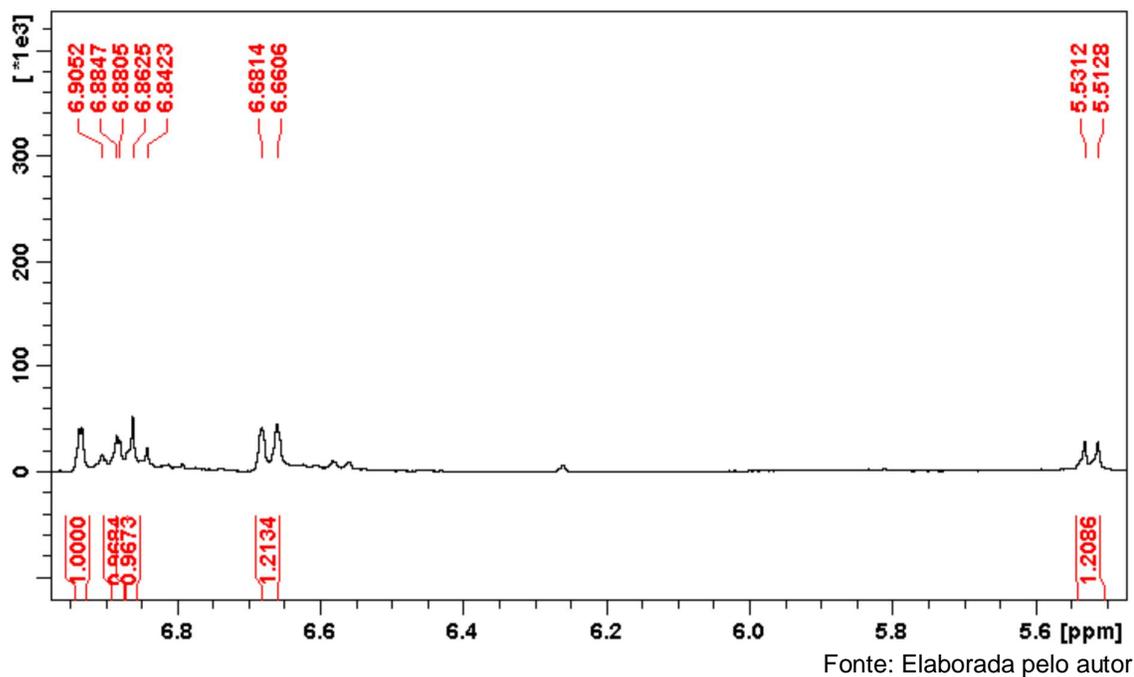
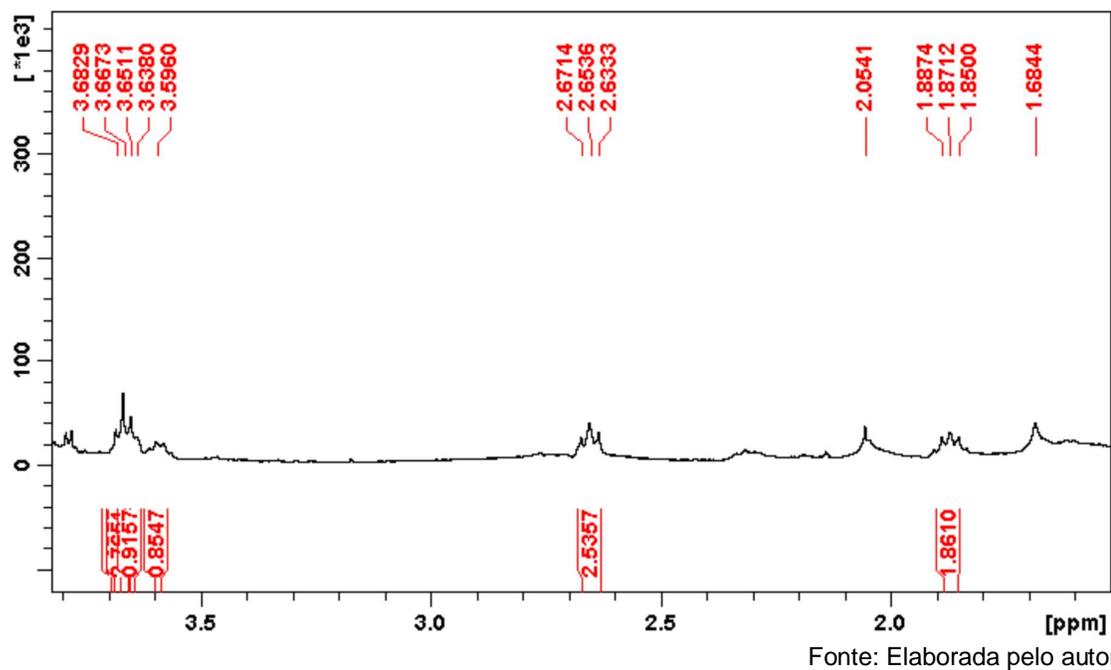


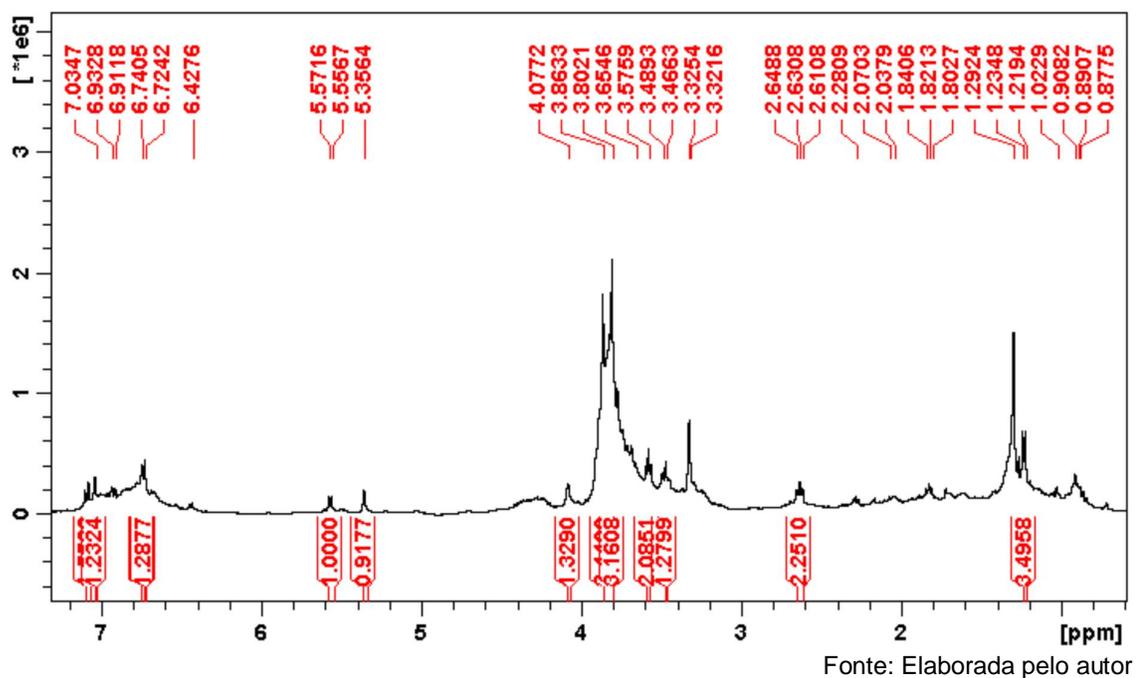
Figura 33 - Expansão de parte do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-2** (Região  $\delta$  5,40-7,0).



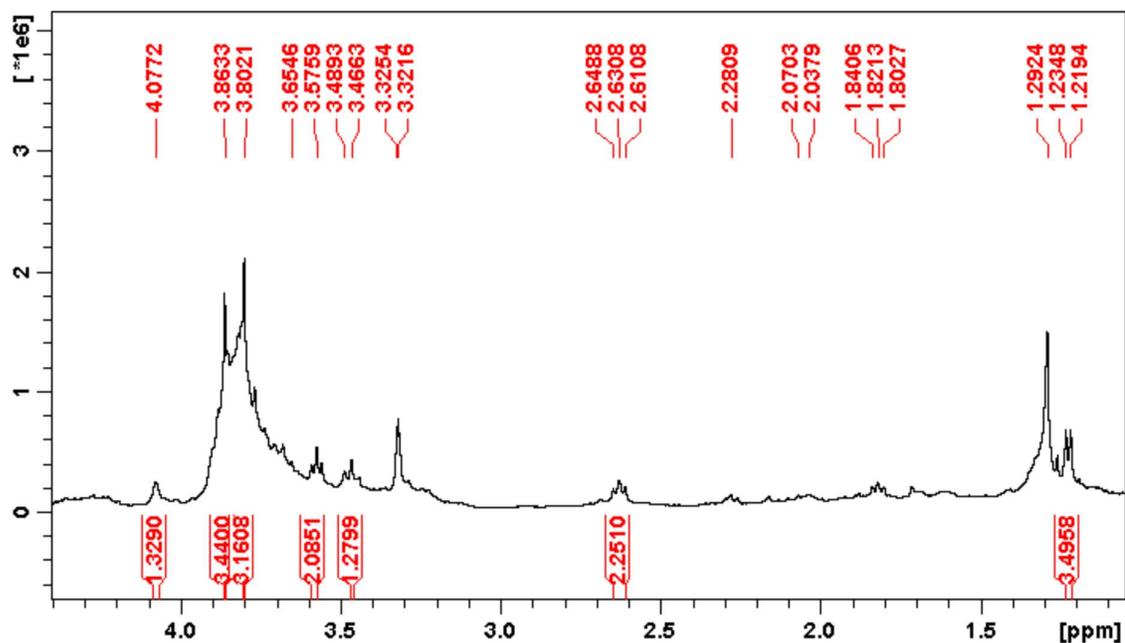
**Figura 34** - Expansão de parte do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-2** (Região  $\delta$  1,50-3,70).



**Figura 35** – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.

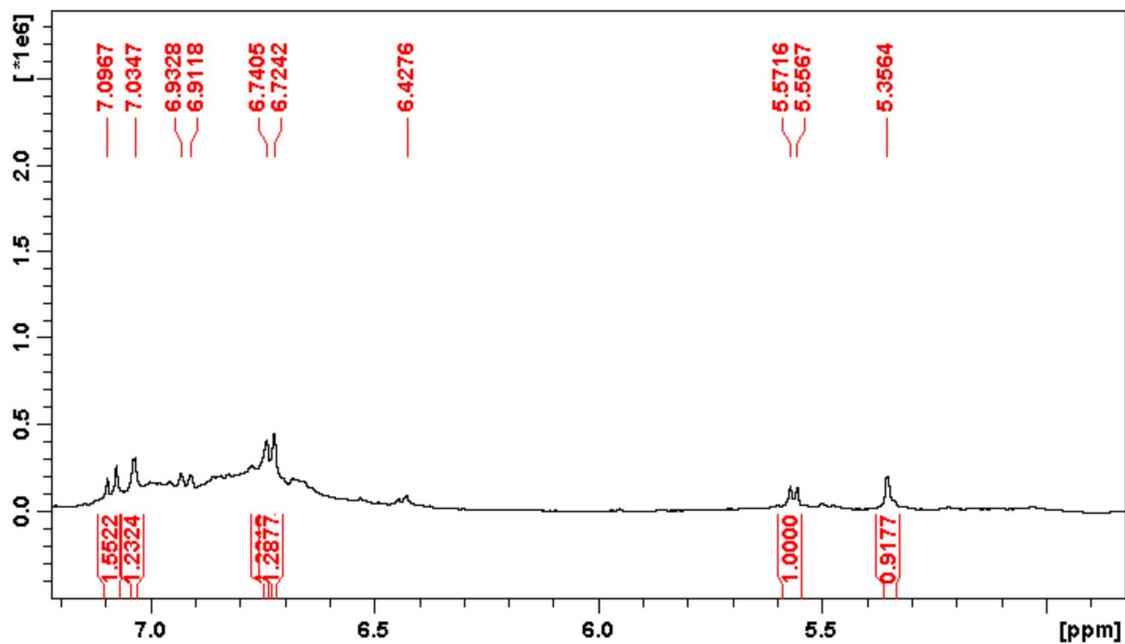


**Figura 36** - Expansão de parte ( $\delta$  1,20-4,10) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.



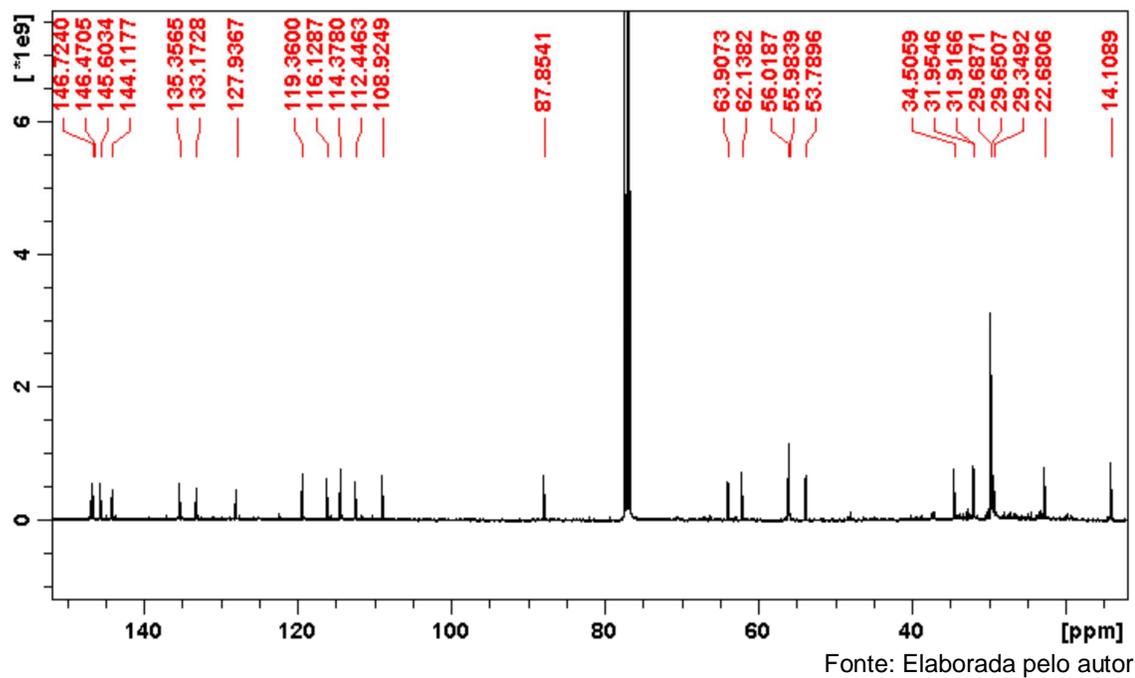
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 37** - Expansão de parte ( $\delta$  5,0-7,0) do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1** (Região de  $\delta$  5,0-7,0).

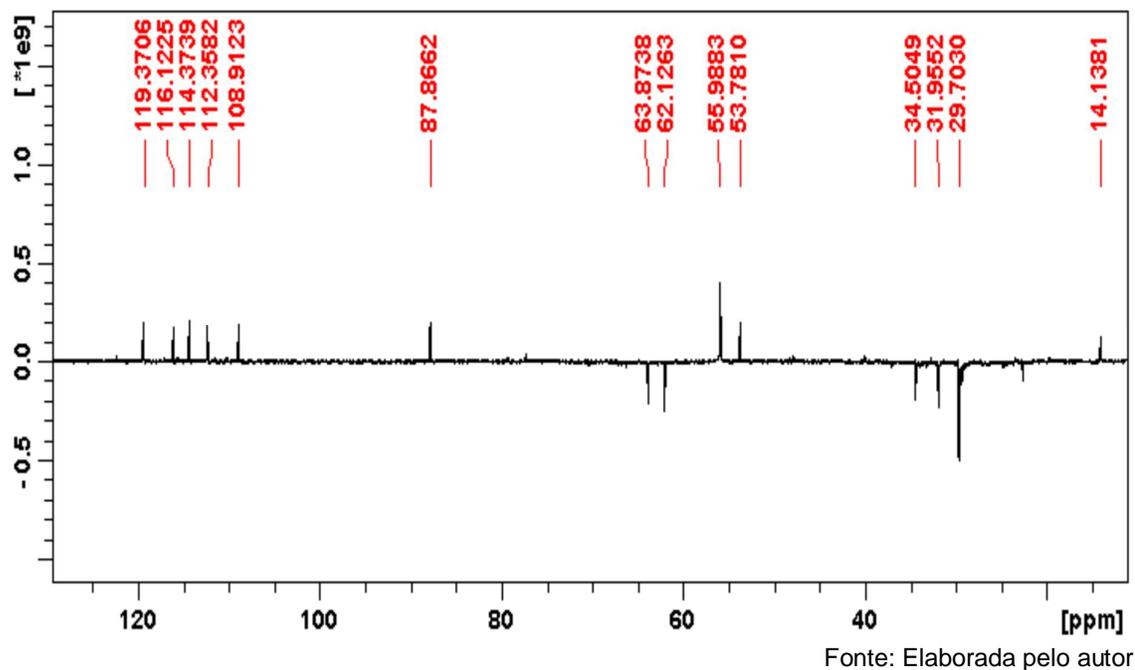


Fonte: Elaborada pelo autor

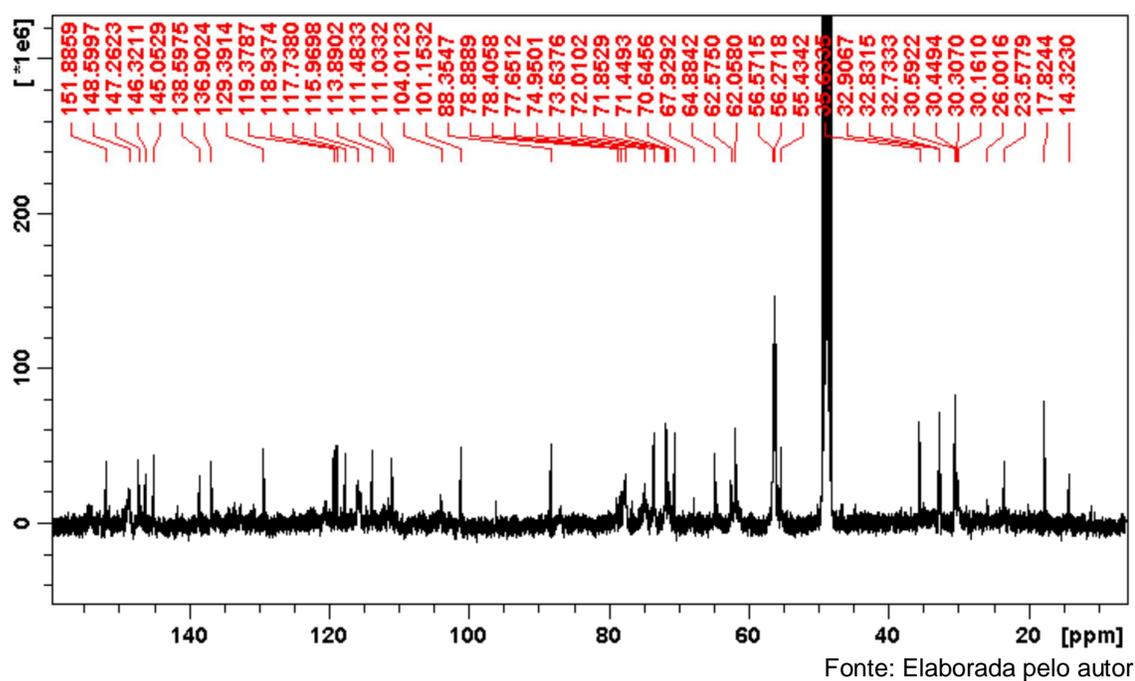
**Figura 38** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-2**.



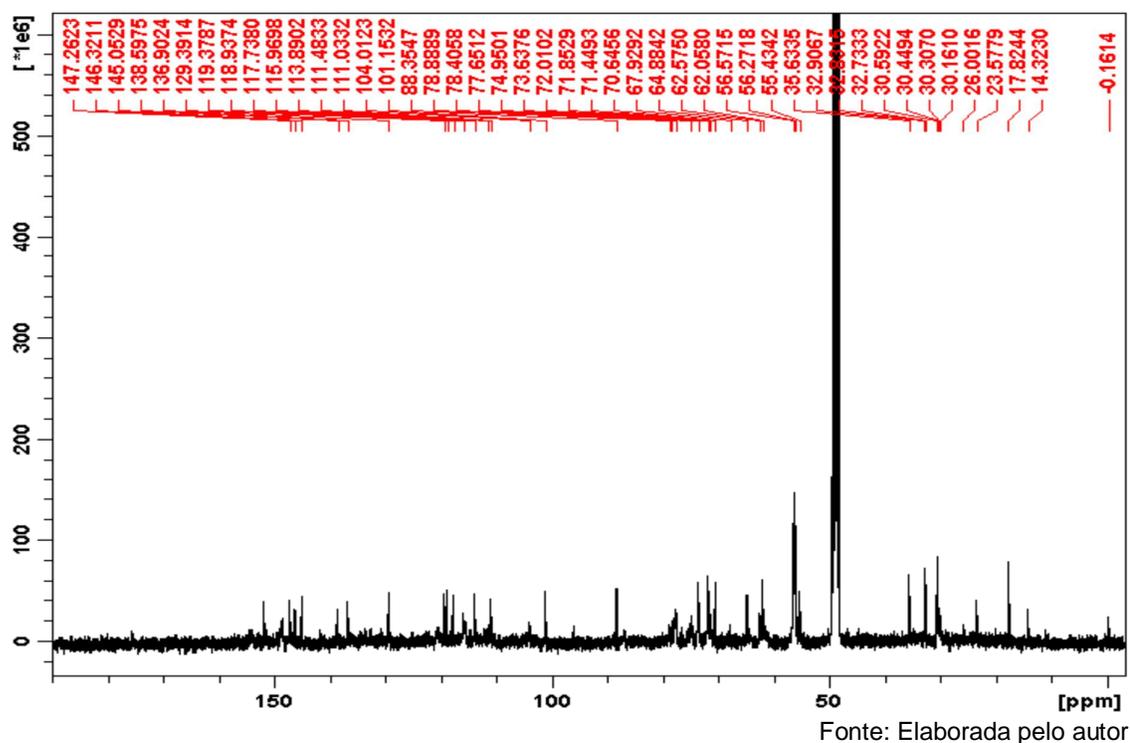
**Figura 39** - Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-2**.



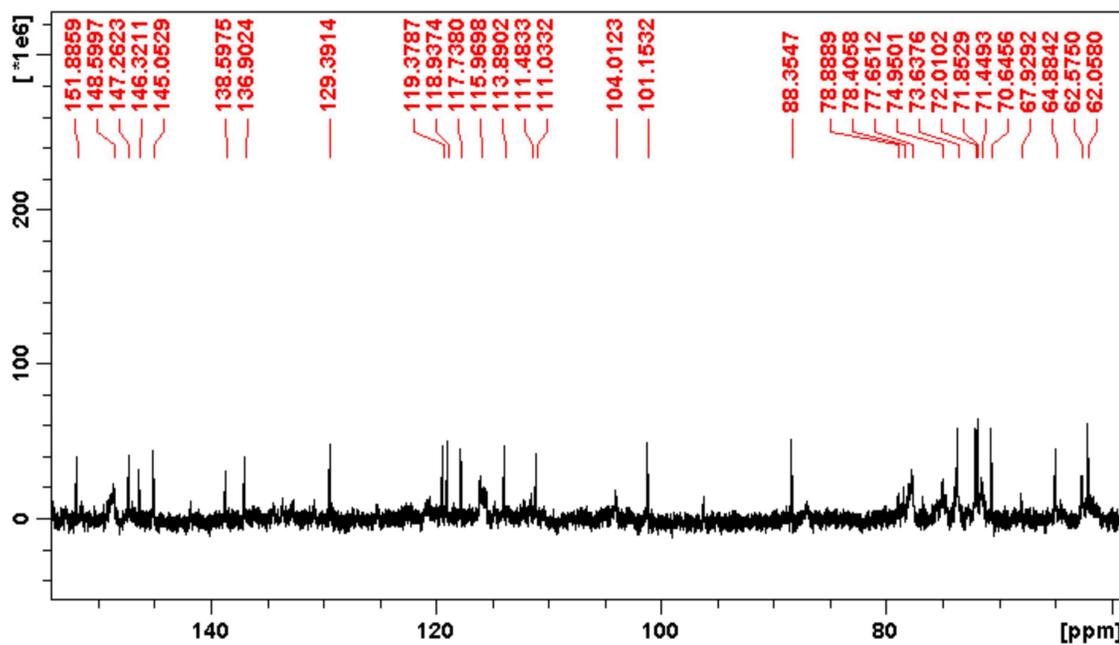
**Figura 40** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.



**Figura 41** - Expansão da Região de  $\delta$  70 a  $\delta$  151 do Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.

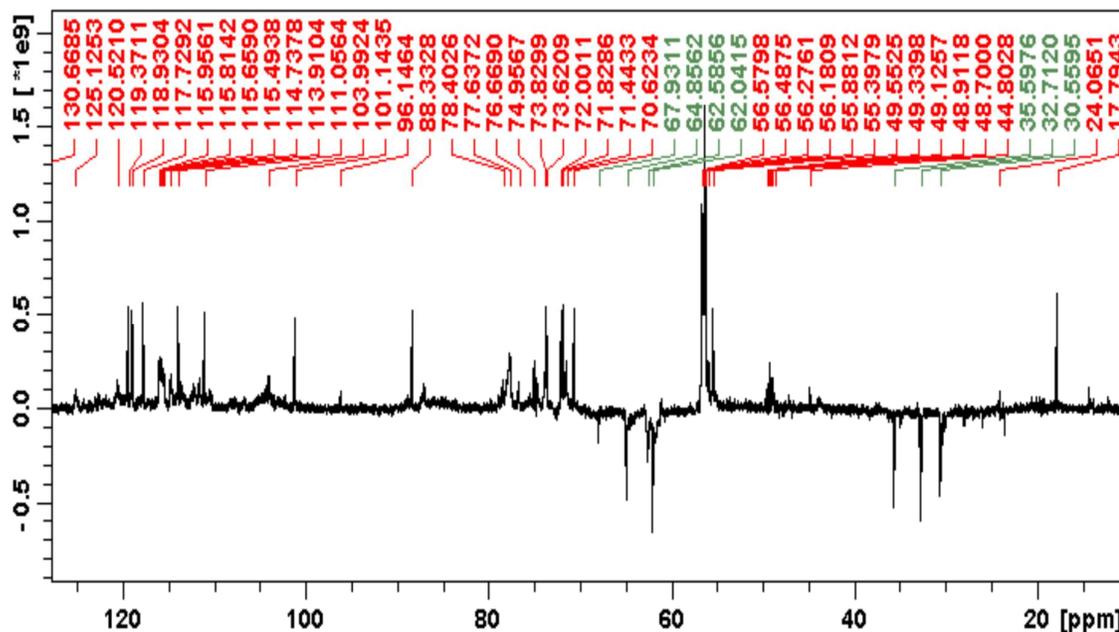


**Figura 42** - Expansão da Região de  $\delta$  62 a  $\delta$  151 do Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.



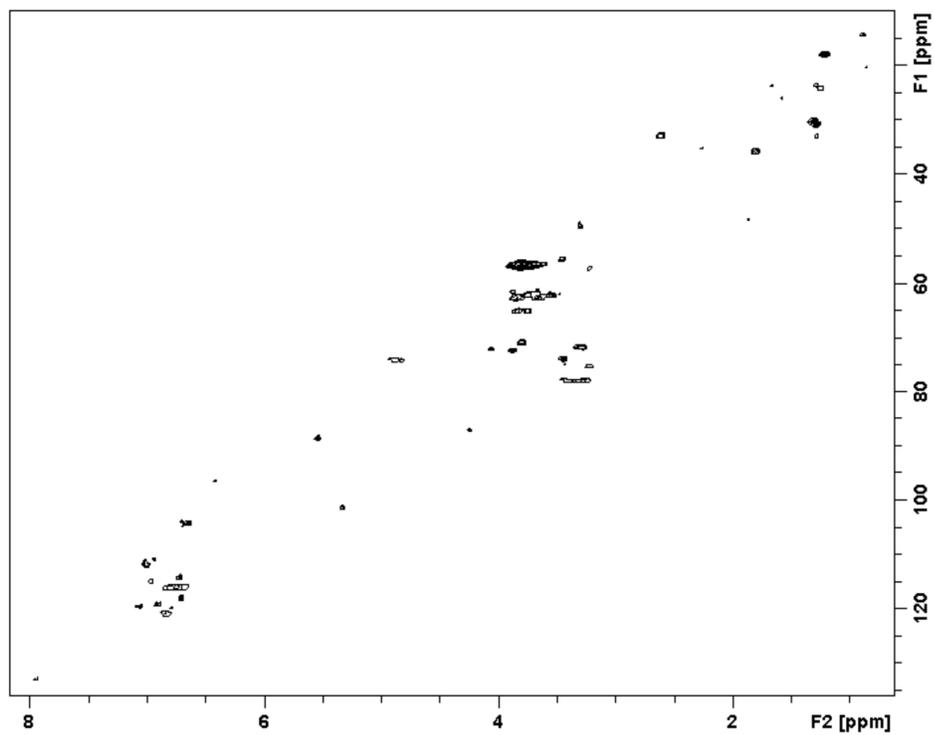
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 43**- Espectro DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.



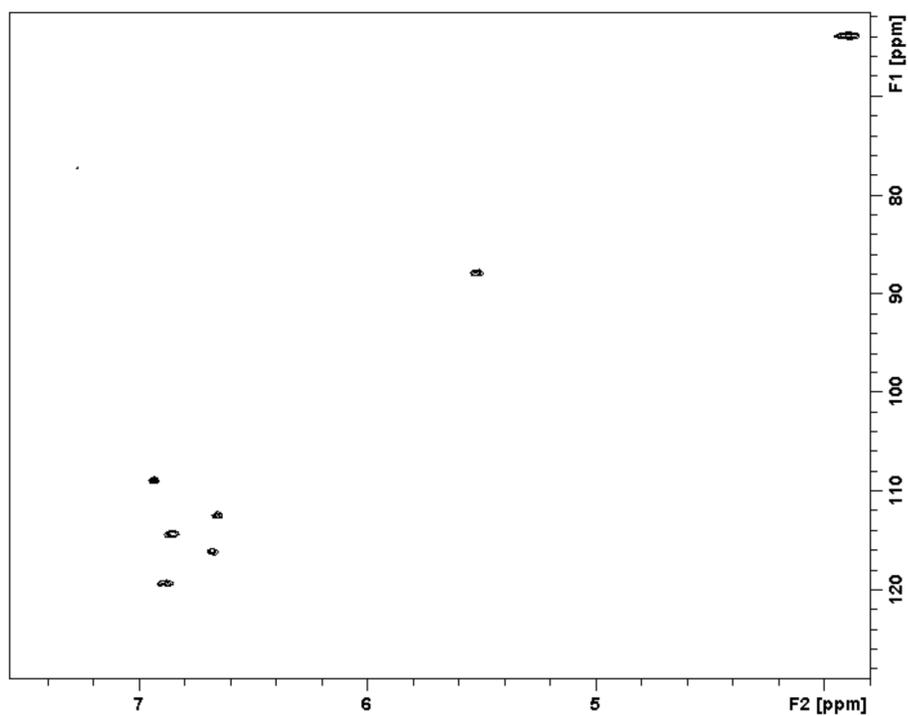
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 44-** Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-2**.



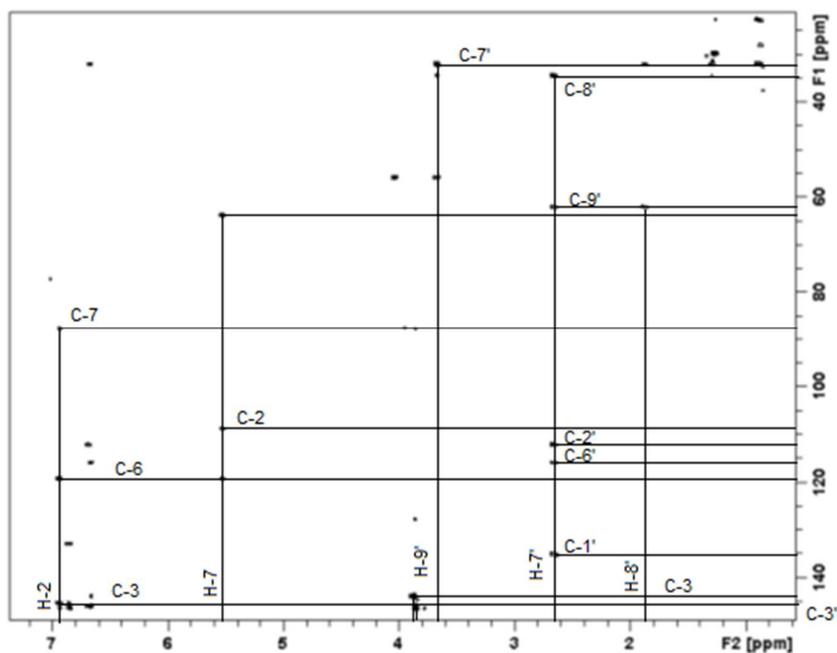
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 45 -** Espectro HSQC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.



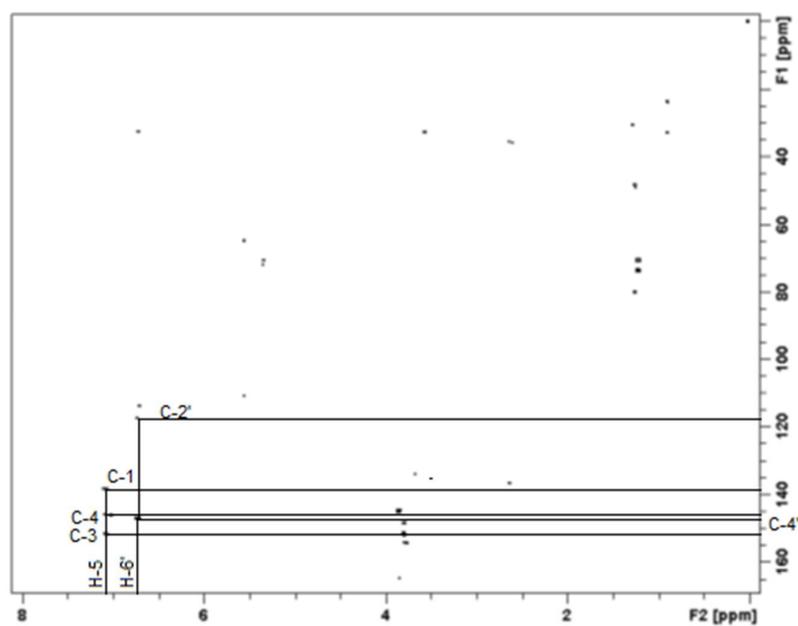
Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 46** - Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **TrCaC-2**.



Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 47** - Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ : 400;  $^{13}\text{C}$ : 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância **TrCaM-1**.

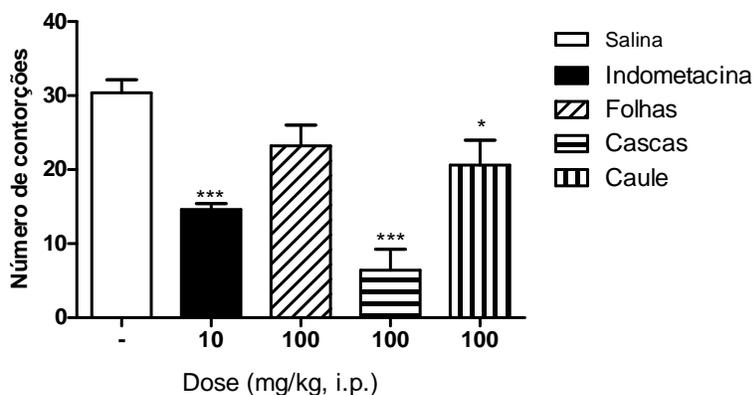


Fonte: Elaborada pelo autor

### 5.3 Resultados dos Ensaio para Avaliação da Atividade Antinociceptiva

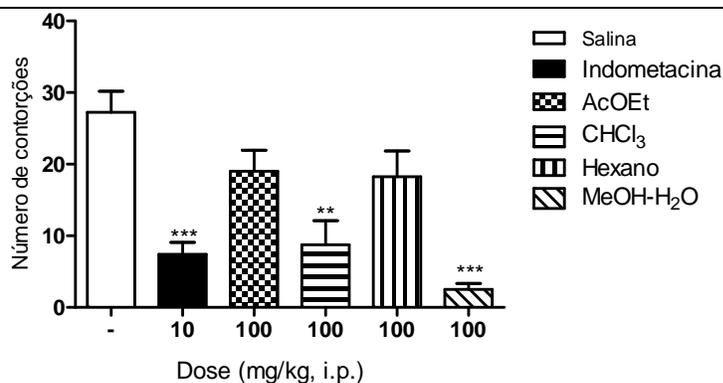
Os resultados da avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos e frações das espécies estudadas estão apresentados nas Figuras 48 (p. 115) e 49 (p. 116). Quando os animais foram tratados com os extratos das *T. elliptica*, somente os extratos provenientes do caule (32%) e das cascas (79%) apresentaram reduções significativas no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Em seguida, o extrato das cascas foi fracionado e as frações resultantes foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a dor induzida pelo ácido acético. Os animais tratados com as frações em CHCl<sub>3</sub> (68%) e MeOH-H<sub>2</sub>O (91%) apresentaram um alto percentual índice de inibição do comportamento antinociceptivo. De forma semelhante, os extratos brutos das folhas, caule e cascas de *T. roseo-alba* também foram avaliados neste modelo experimental, sendo que o extrato das cascas foi o que apresentou a maior percentual de inibição (79%). Este extrato foi particionado e as frações resultantes apresentaram redução significativa no número de contorções (Hexano: 56%; CHCl<sub>3</sub>: 60%; AcOEt: 74% e MeOH-H<sub>2</sub>O 79%). A fração em metanol apresentou um percentual de inibição 10% superior ao fármaco de referência, indometacina, utilizado como controle positivo.

**Figura 48** - Efeito dos extratos brutos (A) e frações das cascas (B) de *T. elliptica* no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético.



**A\***

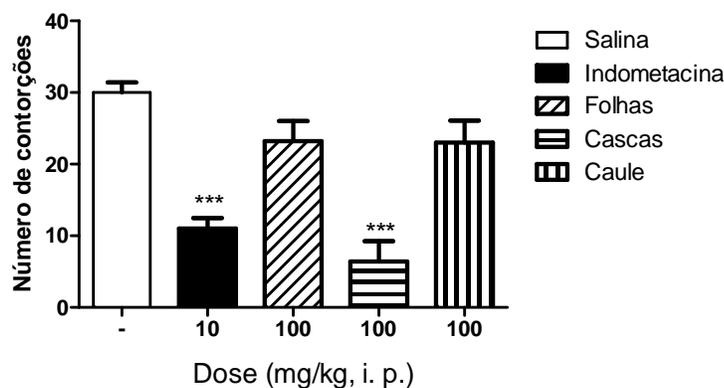
**Continua**



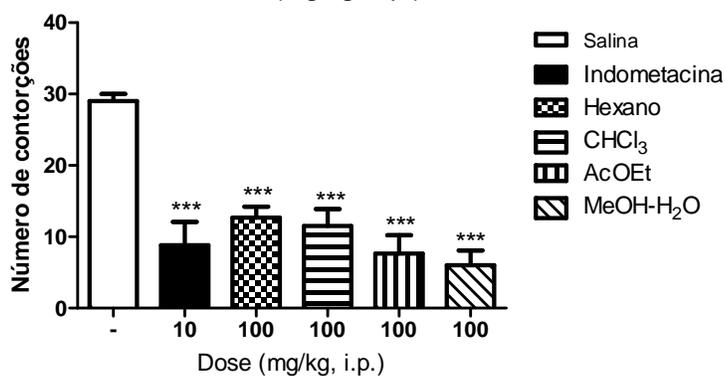
Fonte: Elaborada pelo autor

\* Todos os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) 1 h antes do estímulo álgico com extrato, frações, indometacina (controle +) ou salina (controle -). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n = 5$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo tratado com salina.

**Figura 49** - Efeito dos extratos brutos (A) e frações das cascas (B) de *T. roseo-alba* no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético.



A\*



B\*

Fonte: Elaborada pelo autor

\* Todos os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) 1 h antes do estímulo álgico com extrato, frações, indometacina (controle +) ou salina (controle -). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M ( $n = 5$ ). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo salina.

### 5.3.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva da Substância TrCaM-1

Após a análise dos resultados da avaliação da atividade antinociceptiva dos extratos e frações de *T. roseo-alba*, constatou-se que a fração em metanol apresentou uma alta porcentagem de inibição da resposta nociceptiva. Em busca de compostos responsáveis pela atividade, esta fração foi submetida a diferentes procedimentos cromatográficos que resultou no isolamento da substância codificada de **TrCaM-1 (Icarisideo E<sub>4</sub>)**. Com base nos resultados da avaliação da atividade antinociceptiva da fração em metanol aliada à ausência de trabalhos que avaliem a atividade antinociceptiva de **Icarisideo E<sub>4</sub>**, justificou-se o avanço na investigação experimental farmacológica para esta substância.

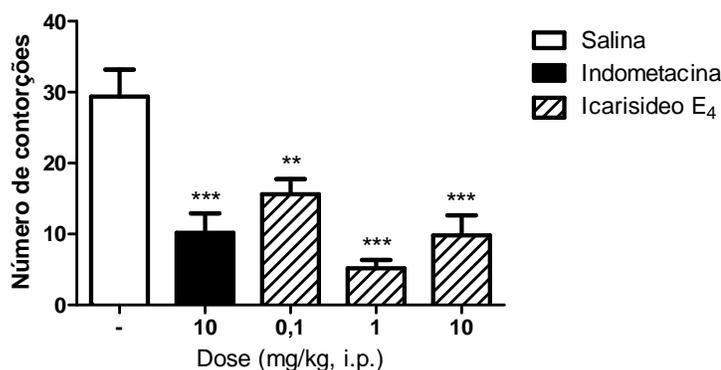
#### 5.3.1.1 Atividade antinociceptiva de Icarisideo E<sub>4</sub> induzida por ácido acético

O modelo de algesia induzida por ácido acético mostra-se como um método de fácil execução e sensível para a triagem de compostos com o efeito antinociceptivo e possui uma correlação direta com as doses de analgésicos utilizados em humanos (DIRIG, ISAKSON, YAKSH, 1998). Neste modelo o ácido acético provoca um aumento nos níveis de eicosanoides e mediadores inflamatórios no sítio de sua administração. Quando os animais foram tratados com **Icarisideo E<sub>4</sub>** (0,1; 1,0 e 10 mg/kg) (Figura 50, p. 118), houve uma redução de 46,9 82,3 e 66,6%, respectivamente no número de contorções abdominais nos animais quando comparado ao grupo salina. Vale ressaltar, que na dose de 1,0 mg/kg, **Icarisideo E<sub>4</sub>** apresentou um índice de redução de 17,01% a mais que a indometacina (65,3%).

Estes resultados indicam que **Icarisideo E<sub>4</sub>** possui grande potencial antinociceptivo de, sendo até mais eficiente que o fármaco de referência, além disso, sugere que pode ser o composto bioativo envolvido no efeito antinociceptivo no extrato das cascas, bem como na fração em metanol de *T. roseo-alba*. No entanto, os resultados deste modelo experimental por si só não são suficientes para determinar se essa atividade antinociceptiva envolve a participação de mecanismos

central ou periférico. Desta forma, foi necessária a realização de ensaios complementares para obter mais informações sobre o mecanismo de ação de **Icarisideo E<sub>4</sub>**. Os resultados desta investigação encontram-se publicados no *Archives of Pharmacal Research* (2014); DOI 10.1007/s12272-014-0468-4 (Anexo I).

**Figura 50** - Efeito de **Icarisideo E<sub>4</sub>** no modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético\*.



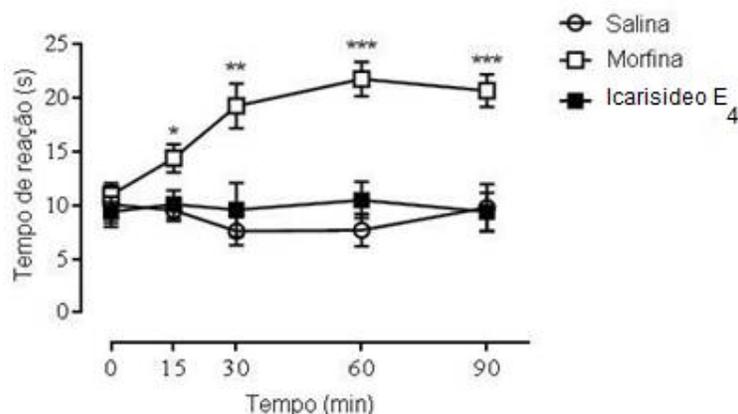
Fonte: Elaborada pelo autor

\* As barras representam a média ± E.P.M ( $n = 5$ ). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo salina.

### 5.3.1.2 Nociceção induzida por Estímulo Térmico

O teste de nociceção induzida por estímulo térmico é um modelo que revela a ação de substâncias capazes de induzir nociceção por vias de ação central, tal como a morfina (QUEIROZ et al., 2010). Neste ensaio o pré-tratamento com Icarisideo E<sub>4</sub> (10 mg/kg) não alterou a média do tempo ( $11,44 \pm 1,2$  s) de reação (Figura 51, p. 119) provocado pelo estímulo térmico dentro de 90 minutos de observação em comparação com os animais tratados com solução salina ( $9,81 \pm 1,45$  s). Entretanto os animais tratados com o agonista opióide morfina (10 mg/kg) aumentou significativamente o tempo de reação para a retirada da pata nos animais submetidos ao estímulo térmico ( $20,77 \pm 3,83$  s). A ausência de atividade neste ensaio sugere que Icarisideo E<sub>4</sub> não possui um efeito antinociceptivo de ação central, uma vez que o teste de nociceção induzida por estímulo térmico é predominantemente um reflexo espinal e é considerado seletivo para compostos analgésicos de ação central (YE; Li; CHEN, 2013).

**Figura 51** - Efeito do tratamento de **Icarisideo E<sub>4</sub>** no comportamento da nocicepção induzida por estímulo térmico\*. O tempo de reação foi contado 0, 15, 30, 60 e 90 minutos depois da administração (i.p.) de salina, **Icarisideo E<sub>4</sub>** (10 mg/kg) ou morfina (5 mg/kg) com um tempo de limite de 30 s.



Fonte: Elaborada pelo autor

\* Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M ( $n = 5$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle.

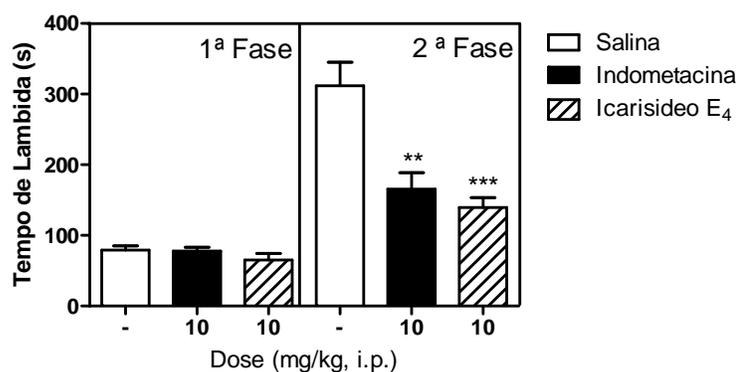
### 5.3.1.3 Nocicepção Induzida por Formalina

No teste da formalina podem ser observadas duas fases distintas. A primeira é causada pelo efeito direto da formalina sobre as fibras sensoriais C, enquanto que a segunda está associada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória e a libertação de mediadores nociceptivos (QUEIROZ et al., 2010).

Neste experimento, a resposta nociceptiva é avaliada pelo comportamento de lambida da pata após injeção intraplantar de formalina (2,5%). É um experimento comportamental onde é observado durante 5 minutos o tempo de lambida da pata do animal imediatamente após a injeção da formalina, está é caracterizada como a primeira de fase (dor neurogênica). Quinze minutos após a injeção de formalina, o comportamento novamente é avaliado o tempo de lambida da pata do animal por um período de 15 minutos, está é caracterizada como a segunda fase (dor inflamatória). Neste experimento (Figura 52, p. 120) os animais foram tratados 60 minutos antes da injeção de formalina, o tratamento de **Icarisideo E<sub>4</sub>** (10 mg/kg, i.p.) foi incapaz de inibir a nocicepção na primeira fase [salina  $79,0 \pm 6,0$ ; Indometacina  $77,9 \pm 5,3$  e

Icarisideo E<sub>4</sub> 65,0 ± 9,2 (s)], entretanto, na segunda fase **Icarisideo E<sub>4</sub>** mostrou redução (55,2%) significativa no tempo de lambida dos animais quando comparado ao grupo salina [salina 311,8 ± 33,3 e Icarisideo E<sub>4</sub> 139,7 ± 13,8 (s)]. De forma similar, a indometacina (10 mg/kg, i.p.) mostrou significativa inibição (46,8%) apenas na segunda fase (Indometacina 165,6 ± 23,2 s).

**Figura 52** - Efeito do tratamento de **Icarisideo E<sub>4</sub>** sobre a nocicepção induzida por formalina\*. O tempo de lambida foi determinado durante a os primeiros 5 minutos (1ª fase), e entre 15-30 minutos (2ª fase) depois da injeção de formalina a 2,5%.



Fonte: Elaborada pelo autor

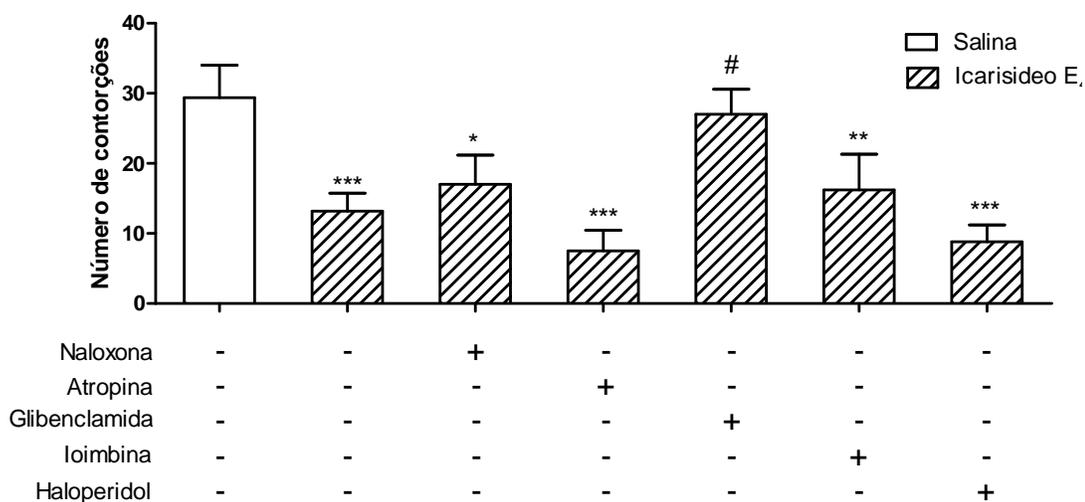
\* As barras representam a média ± E.P.M ( $n = 5$ ). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo salina.

#### 5.3.1.4 Investigação do Mecanismo de Ação de Icarisideo E<sub>4</sub>

Para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva de **Icarisideo E<sub>4</sub>**, os animais foram tratados previamente com antagonistas opioide, dopaminérgico, adrenérgico e bloqueador dos canais de potássio. O tratamento de **Icarisideo E<sub>4</sub>** (10 mg/kg) forneceu uma redução significativa (55,1%) no número de constrições abdominais, comparando com o grupo salina, reforçando seu potencial antinociceptivo (Figura 53, p. 121). O pré-tratamento (i.p.) dos animais com naloxona (5 mg/kg), atropina (2 mg/kg), ioimbina (1 mg/kg) e haloperidol (1 mg/kg) dez minutos antes do tratamento com **Icarisideo E<sub>4</sub>** (10 mg/kg) não alterou significativamente o número de contorções abominais induzida por ácido acético

quando comparado com **Icarisideo E<sub>4</sub>**. No entanto, glibenclamida (10 mg/kg) reverteu significativamente o efeito antinociceptivo de Icarisideo E<sub>4</sub> levando a um aumento no número de contrações abdominais. A ativação dos canais de potássio leva a hiperpolarização da membrana, reduzindo a despolarização neuronal e potencializando a transmissão induzindo um efeito analgésico (RODRIGUES; DUARTE, 2000; OCANA et al., 2004). Estes resultados indicam que Icarisideo E<sub>4</sub> mostra-se capaz de agir por um mecanismo que envolve canais ATP-K<sup>+</sup>. Reforçando esta proposta, estudos anteriores demonstram que glibenclamida mostra-se capaz de modular a potência de fármacos de ação analgésica em ratos (ORTIZ et al., 2002; ALVES et al., 2004).

**Figura 53** - Efeito do pré-tratamento com Naloxona (5 mg/kg), atropina (2 mg/kg), glibenclamida (10 mg/kg), ioimbina (1 mg/kg) ou haloperidol (1 mg/kg) administrado (i.p.) 10 minutos antes da administração da salina ou Icarisideo E<sub>4</sub> (10 mg/kg)<sup>a</sup>.



Fonte: Elaborada pelo autor

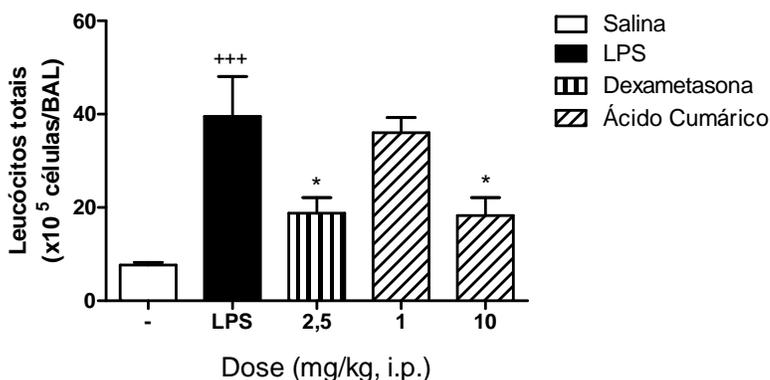
<sup>a</sup> Sob o gráfico, os sinais + e - indicam a presença ou ausência do respectivo tratamento. Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M (n = 5). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  indica diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo salina. # indica  $p < 0,05$  quando comparado com o grupo tratado apenas com **Icarisideo E<sub>4</sub>**.

#### 5.4 Resultado dos Ensaio para Avaliação da Atividade Anti-inflamatória do Ácido *p*-Hidroxicumárico (TeCaA-1) no Modelo de Inflamação Pulmonar Aguda Induzida por LPS

A substância codificada de **TeCaA-1** (**Ácido *p*-Hidroxicoumárico ou Ácido cumárico**) foi isolada de uma fração (AcOEt das cascas de *T. elliptica*) que no modelo experimental de contorção abdominal induzida pelo ácido acético não apresentou uma redução significativa da nocicepção (Figura 48, p. 115). Contudo, segundo Kim et al. (2012), este ácido inibiu a resposta inflamatória em macrófagos Raw264.7, um modelo experimental muito utilizado para o estudo de respostas inflamatórias *in vitro*. Os resultados desses estudos nos induziram a avaliar o seu potencial no modelo *in vivo* de inflamação pulmonar aguda. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que **TeCaA-1** apresentou potencial como um agente anti-inflamatório.

O modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS apresenta como características o recrutamento massivo de granulócitos e o aumento das expressões de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (SZARKA et al., 1997). Quando os animais foram tratados com LPS observou-se (Figuras 54 e 55, p. 123) um aumento no número de leucócitos totais no lavado broncoalveolar (de  $7,6 \pm 0,5$  para  $39,5 \pm 8,5 \times 10^5$  células/BAL), caracterizado principalmente pelo aumento nas contagens de neutrófilos (de  $1,3 \pm 0,5$  para  $36,7 \pm 8,1 \times 10^5$  células/BAL). Entretanto, quando os animais foram tratados (i.p.) com ácido cumárico (10 mg/kg), notou-se uma redução significativa no número de leucócito totais ( $18,2 \pm 3,8 \times 10^5$  células/BAL) e de neutrófilos ( $14,8 \pm 3,6 \times 10^5$  células/BAL). Resultado semelhante ( $18,7 \pm 3,4 \times 10^5$  células/BAL) foi observado utilizando o fármaco de referência dexametasona (2,5 mg/kg).

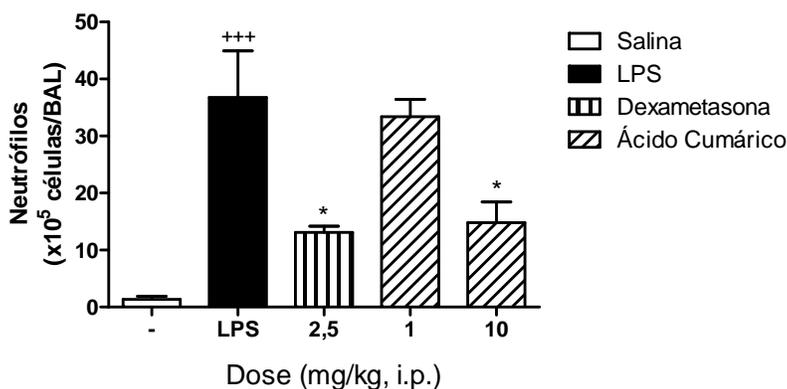
**Figura 54** - Efeito do **ácido cumárico** (1 e 10 mg/kg, i.p.), administrado uma hora antes de instilação de LPS (0,2 µg/µL, i.n.) sobre o número de leucócitos totais no BAL.



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: As barras representam a média ± E.P.M ( $n = 5$ ). +++  $p < 0,001$  indica a diferença estatística significativa em relação ao grupo salina. \*  $p < 0,05$  indica a diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado apenas com LPS.

**Figura 55** - Efeito do **ácido cumárico** (1 e 10 mg/kg, i.p.), administrado uma hora antes de instilação de LPS (0,2 µg/µL, i.n.) sobre o número de células totais [contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos)] no BAL.

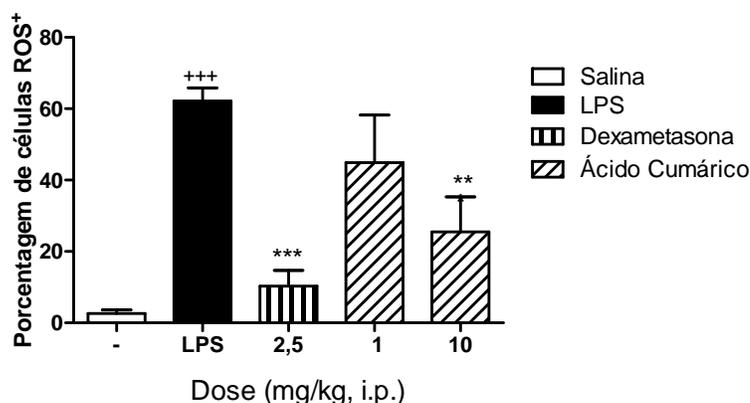


Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: As barras representam a média ± E.P.M ( $n = 5$ ). +++  $p < 0,001$  indica a diferença estatística significativa em relação ao grupo salina. \*  $p < 0,05$  indica a diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado apenas com LPS

Com propósito de avaliar o grau de ativação das células recuperadas no BAL, foi realizada a quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Figura 56, p. 124) nos leucócitos. Neste experimento a administração (i.p.) de **ácido cumárico** (10 mg/kg) antes da instilação de LPS, induziu uma redução significativa ( $25,48 \pm 9,8 \%$ ) na porcentagem de células produtoras ROS quando comparado ao grupo tratado apenas com LPS ( $62,2 \pm 3,6 \%$ ). Como esperado, o fármaco de referência, dexametasona (2,5 mg/kg), também inibiu a geração de ROS.

**Figura 56** - Porcentagem de espécies ROS\* nos leucócitos, após a administração do **ácido cumárico** nas doses de 1 e 10 mg/kg, (i.p.).



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n = 5). +++  $p < 0,001$  indica as diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo tratado com salina. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  indica as diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo tratado apenas com LPS

Nos ensaios para a avaliação da expressão de VLA-5 nos leucócitos, quantificação de TNF- $\alpha$ , e na adesão de leucócitos as células endoteliais, o **Ácido cumárico** (10 mg/kg) não mostraram alteração significativa na expressão de VLA-5 ( $5,462 \pm 0,554$ ; 10 mg/kg) em relação ao controle ( $6,190 \pm 0,623$ ), na quantidade de TNF- $\alpha$ , além de ter sido ineficiente em promover a adesão de leucócitos a células endoteliais quando comparado com o grupo controle sensibilizado com LPS.

### 5.5 Avaliação da Atividade Antibacteriana

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) duas bactérias Gram-negativas (*S. aureus* e *E. faecalis*) e duas Gram-positivas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) foram utilizados. Os resultados da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) estão apresentados na tabela 12 (p. 125). Dentre os extratos avaliados, o extrato em hexano do caule e em metanol das folhas de *T. elliptica* forneceram os melhores resultados com CIM 15,63 µg/mL. Apesar, deste resultado estes extrato foram incapazes de inibir o crescimento de bactérias Gram-ativas. Os extratos em clorofórmio do caule de *T. elliptica* e (caule e folhas) de *T. roseo-alba* mostraram boa correlação nas duas bactérias Gram-positivas. Nenhum dos extratos testados inibiu o crescimento da bactéria *E. coli*.

**Tabela 12** - Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima (µg/mL) dos extratos e frações das espécies *T. elliptica* e *T. roseo-alba*.

Espécie	Parte da planta	Fração	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>T. elliptica</i>	Cascas		1000	1000	-	1000
		Hexano	500	-	-	1000
		CHCl <sub>3</sub>	500	1000	-	-
		AcOEt	-	1000	-	-
		MeOH	-	500	-	-
	Caule		1000	1000	-	-
		Hexano	15,63	1000	-	-
		CHCl <sub>3</sub>	250	500	-	-
		AcOEt	1000	500	-	-
		MeOH	-	-	-	-
	Folhas		1000	1000	-	1000
		Hexano	500	-	-	1000
		CHCl <sub>3</sub>	1000	-	-	1000
		AcOEt	1000	-	-	1000
		MeOH	15,63	-	-	-
<i>T. roseo-</i>	Cascas		1000	1000	-	-

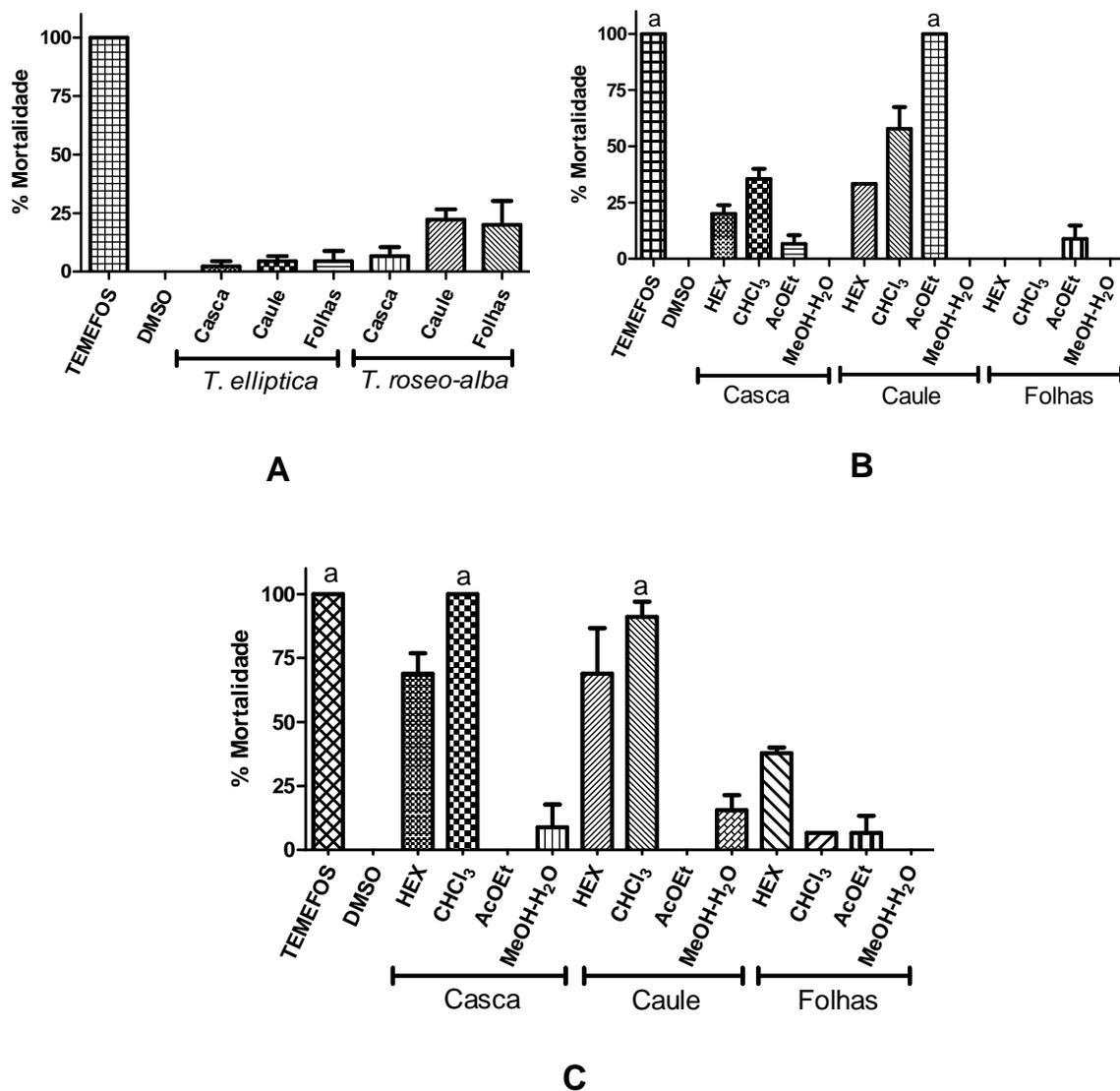
*alba*

	<b>Hexano</b>	500	500	-	-
	<b>CHCl<sub>3</sub></b>	500	1000	-	-
	<b>AcOEt</b>	1000	-	-	-
	<b>MeOH</b>	-	-	-	-
<b>Caule</b>		1000	1000	-	-
	<b>Hexano</b>	250	1000	-	-
	<b>CHCl<sub>3</sub></b>	250	125	-	-
	<b>AcOEt</b>	1000	1000	-	-
	<b>MeOH</b>	-	-	-	-
<b>Folhas</b>		1000	1000	-	-
	<b>Hexano</b>	1000	-	-	-
	<b>CHCl<sub>3</sub></b>	15,63	250	-	-
	<b>AcOEt</b>	250	500	-	-
	<b>MeOH</b>	-	-	-	-

## 5.6 Resultados dos Ensaio Larvicidas

Os resultados obtidos nos ensaios preliminares, na concentração de 250 ppm, frente larvas do 4º estágio do *A. aegypti*, são apresentados na Figura 57, p. 127. Os extratos das frações que não apresentaram diferença estatística entre o controle positivo (temefós) foram submetidos a ensaios de menor concentração para determinação da concentração letal de 50% da população (CL<sub>50</sub>). Dentre os extratos que foram avaliados, após 48 horas de exposição das larvas, os resultados mais promissores foram obtidos com os extratos do caule (22,2 % de mortalidade) e folhas (20,0%) de *T. roseo-alba*, Apesar da baixa mortalidade dos extratos brutos, algumas das frações provenientes de *T. roseo-alba* apresentaram um elevado índice de mortalidade [frações em CHCl<sub>3</sub> das cascas 100% (CL<sub>50</sub> 98,74 ppm; IC<sub>95</sub> 89,23-106,36 ppm) e do caule 91,1% (CL<sub>50</sub> 50,74 ppm; IC<sub>95</sub> 32,87-64,74 ppm)]. De forma semelhante, apesar dos extratos brutos das cascas de *T. elliptica* terem sido inativos [cascas (2,2%), caule (4,4%) e folhas (4,4%)], a fração em AcOEt do caule apresentou 100% de mortalidade (CL<sub>50</sub> 82,53 ppm; IC<sub>95</sub> 57,12-103,69 ppm). Em todos os testes o controle negativo (apenas com DMSO) não apresentou mortalidade indicando que o DMSO utilizado para diluir o extrato, não afetou o desenvolvimento larval.

**Figura 57** - Resultados da avaliação do potencial larvicida. **A** = Extratos brutos de *T. elliptica* e *T. roseo-alba*; **B** = Frações das cascas, caule e folhas de *T. elliptica*; **C** = Frações das cascas, caule e folhas de *T. roseo-alba*.



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Valores expressos em média  $\pm$  E.P.M. Letras iguais significa que não ocorreu diferenças estatísticas entre estas amostras.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho envolvendo o estudo químico das espécies *T. elliptica* e *T. roseo-alba* (Bignoniaceae) e a avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antibacteriana e larvicida de extratos, frações e substâncias isoladas permitiram relacionar as seguintes conclusões:

- Extratos e frações das cascas de *T. elliptica* e *T. roseo-alba* exibiram, no modelo de contração induzida pelo ácido acético, uma redução significativa da nocicepção quando comparado com o fármaco de referência (indometacina);
- O estudo químico de algumas frações ativas conduziram ao isolamento de nove substâncias, identificadas principalmente através da técnica de RMN, como sendo um fenilpropanoide (*ácido cumárico*), um iridoide clorado, (*rehmaglutina D*), duas lignanas (*Icarisideo E<sub>4</sub>* e o (7R,8S) - *Álcool diidrodeidrodiconiferílico*), uma mistura de dois triterpenos (*ácidos ursólico e oleanólico*), dois fitoesteroides (*sitostenona* e *β-sitosterol*), além de um derivado do ácido benzoico (*ácido p-metoxibenzoico*);
- A substância identificada como *Icarisideo E<sub>4</sub>* apresentou um efeito antinociceptivo periférico, com o envolvimento de canais de potássio ATP-K<sup>+</sup>;
- O ácido cumárico reduziu significativamente os níveis de leucócitos totais e neutrófilos quando comparado com o controle negativo. Este composto também reduziu a porcentagem de células produtoras de ROS, no modelo de inflamação pulmonar aguda induzida por LPS, sugerindo um potencial anti-inflamatório;
- Os resultados obtidos permitiram concluir que *Icarisideo E<sub>4</sub>* e o *Ácido cumárico* poderão ser úteis para o tratamento da dor e inflamação;
- Os extratos do caule e das folhas de ambas as espécies mostraram atividade antibacteriana, principalmente frente a duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*);

- Nos ensaios larvicidas, apesar dos extratos brutos das cascas, caule e folhas exibirem baixos índices de mortalidade durante um período de exposição das larvas de 48h, as frações em hexano e em  $\text{CHCl}_3$  das cascas e do caule de *T. roseo-alba* e em AcOEt do caule de *T. elliptica*, apresentaram índices de mortalidade comparáveis com o controle positivo (Temefós);
- As substâncias identificadas como *Icarisideo E<sub>4</sub>* e (7R, 8S) - *Álcool diidrodeidroconiferílico* estão sendo descritas pela primeira vez no gênero *Tabebuia*;
- O isolamento do iridoide clorado (*Rehmaglutina D*) no presente trabalho poderá auxiliar no posicionamento do gênero *Tabebuia* dentro da família Bignoniaceae.

Como perspectivas futuras:

- Isolar, caracterizar as estruturas das substâncias das frações com resultados promissores nos ensaios larvicida e antibacteriano, bem como avaliar as atividades dessas substâncias;
- Efetuar modificações estruturais nas substâncias ativas e avaliar o seu potencial biológico.

## REFERÊNCIAS

- ALESSANDRI, L. A.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M., Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189–212, 2013.
- ALMEIDA, E. R. Preclinical and Clinical Studies of Lapachol and *Beta*-Lapachone. **The Open Natural Products Journal**, v. 2, p. 42-47, 2009.
- ALVES, D. P.; TATSUO, M. A.; LEITE, R.; DUARTE, I. D., Diclofenac induced peripheral antinociception is associated with ATP sensitive K<sup>+</sup> channels activation. *Life Sciences*, v.74, p. 2577–2591, 2004.
- ANH, N. T. H.; SUNG, T. V.; FRANKE, K.; WESSJOHANN, L. A. Phytochemical studies of *Rehmannia glutinosa* rhizomes. **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 593-595, 2003.
- APERS, S.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Lignans and neolignans as lead compounds. **Phytochemistry Reviews** v. 2, n. 3, p. 202-217, 2003.
- AWALE, S.; KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y. O; UEDA, J.; TANAKA, K.; KADOTA, S. Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 6, p. 710-713, 2005.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n.1, p. 90-97, 2008
- BARROS, B. S.; DA SILVA, J. P.; DE SOUZA FERRO, J. N.; AGRA, I. K.; DE ALMEIDA BRITO, F.; ALBUQUERQUE, E. D.; CAETANO, L.C.; BARRETO, E. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces AND E. antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 526–531, 2011.
- BAS, E.; RECIO, M. C.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; ESCANDELL, J. M.; LOPEZ-GINES, C.; RIOS, J-L. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed type hypersensitivity reactions in mice by scopolioside. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, n. 2-3, p. 199–210, 2007a.
- BESSON, J. M., The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 8 n. 353, p.1610-1615, 1999.
- BISHAY, D. W.; ABDEL-BAKY, A. M.; ROSS, S. A.; IBRAHIM, Z. Z. Phytochemical study of *Tabebuia pentaphylla* Hemsl. cultivated in Egypt. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 1-20, 1987.
- BLATT, C. T.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F., Flavonoids of *Tabebuia caraiba* (Bignoniaceae), **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 1, p. 89, 1996.

BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; RODRIGUES, S. J.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J.A.; BRAGA DE OLIVEIRA, A. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2. Screening Bignoniaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, 742-750, 2010.

BRIDGESTOCK, C.; RAE, C. P.; Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and intensive care medicine**, v. 14, n. 11, p. 480-483, 2013.

BYEON, S. E.; CHUNG, J. Y.; LEE, Y. G.; KIM, B. H.; KIM, K. H.; CHO, J. Y. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 119, p. 145-152, 2008.

CARR D.B.; GOUDAS L.C., Acute Pain. **Lancet**. v.12, n. 353, p.2051-2058, 1999.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 48, n. 2, p. 137 – 158, 1998.

CHAGAS, J. N. **Estudo químico e avaliação biológica de *Piper klotzschianum* Kunth (Piperaceae) e *Croton grewoides* (Euphorbiaceae)**. 2011. 178f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2011.

CHEN, C. C.; HSIN, W. C.; KO, F. N.; HUANG, Y. L.; OU J. C.; TENG, C. M., Antiplatelet aryl naphthalide lignans from *Justica procumbens*. **Journal Natural Products**, v. 59, n. 12, p. 1149-1150, 1996.

CHEN, H.; LI, S.; ZHOU, Z.; BAI, N.; HO, C-T. Characterization of chemical components of *Ixeris denticulate*. **ACS Symposium Series**, v. 925, p.195-211, 2006.

CHOI, H.; CHO, J.; JIN, Q.; WOO, E.; LEE, D. Antifungal property of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 9'-O- $\beta$ -D-glucoside and its pore-forming action in plasma membrane of *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1818, n.7, p. 1648–1655, 2012.

CIPRIANO, F.A.; FIGUEIREDO, M.R.; SOARES, G.L.G.; KAPLAN, M.A.C. Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2125-2131, 2012

CHOI, W. H.; UM, M. Y.; AHN, J.; JUNG, C. H.; PARK, M. K.; HA, T. Y. Ethanol extract of Taheebo attenuates increase in body weight and fatty liver in mice fed a high-fat diet. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16013-16023, 2014.

CHOUDHURY, S.; DATTA, S.; TALUKDAR, A. D.; CHOUDHURY, M. D. Phytochemistry of the Family Bignoniaceae - A review. **Assam University Journal of Science & Technology: Biological and Environmental Sciences** v. 7, n. 1, p.145-150, 2011.

COSTA, W. F.; OLIVEIRA, A. B.; NEPOMUCENO, J. C. Lapachol as an epithelial tumor inhibitor agent in *Drosophila melanogaster* heterozygote for tumor suppressor

gene wts. GMR, **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3236-3245, 2011.

DAI, J-Q.; LIU, Z-L.; YANG, L. Non-glycosidic iridoids from *Cymbaria mongolica*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 537-542, 2002.

DEMUTHI, H.; JENSEN, S. R.; NIELSEN, B. J. Iridoid glucosides from *Asystasia bella*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 12, p. 3361-3364, 1989.

DIRIG, D. M.; ISAKSON, P.C.; YAKSH, L. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, p. 1031–1038, 1998.

DIXIT, B. S.; SRIVASTAVA, S. N. Flavonoids and carotenoids of *Tecoma argentea* flowers. **Fitoterapia**, v. 63, n. 3, p. 272, 1992.

DINDA, B.; CHOWDHURY, D. R.; MOHANTA, B. C. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 8, p. 765–96, 2009.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; BANIK, R. Naturally occurring iridoids and secoiridoids. An updated review, part 4. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 7, p. 803–833, 2011.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring iridoids. A review, part 1. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 2, p. 159–222, 2007a.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** v. 55, n. 5, p. 689–728, 2007b.

EL-NAGGAR, L. J.; BEAL, J. L.; DOSKOTCH, R. W. Iridoid Glycosides From *Mentzelia decapetala*, **Journal of Natural Products**, n. 45, n. 5, p. 539-550, 1982.

FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S.; Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 13, supl., p. 81-83, 2003.

FEIN, A., **Nociceptores**: As células que sentem dor. (Tradutor: Petov, P.; Francishi, J. N.; Ferreira S. H.). Ribeirão Preto—SP: Dor On Line, 2011. Disponível em: < <http://www.dol.inf.br/html/LivroNociceptores/Nociceptores.pdf>> Acesso em: 01 de fev. 2015.

FERREIRA-JUNIOR, J. C.; CONSERVA, L. M.; LYRA L. R. P.; DE OMENA-NETA, G.C.; CAVALCANTE-NETO, A.; BARRETO, E. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan, icariside E4, with an antinociceptive effect from *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae) bark. **Archives of Pharmacal Research**, 2014. Disponível

em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12272-014-0468-4> >.  
Acesso em: 20 de agosto de 2014.

FINNEY, D.J. (1972) Probit Analyses. Cambridge: Cambridge University Press.

FREITAS, A. E., BUDNI, J., LOBATO, K. R., BINFARÉ, R. W., MACHADO, D. G., JACINTO, J., VERONEZI, P. O., PIZZOLATTI, M. G., RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 335-343, 2010.

FREITAS, A. E.; MACHADO, D. G.; BUDNI, J.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; LOPES, M. W.; DE SOUZA, L. F.; VERONEZI, P. O.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; DAFRE, A. L.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. **Journal Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 737-745, 2013.

FUß, E. Biosynthesis of Lignans. Habilitationsschrift zur Erlangung der Habilitation im Fach Biologie der Pflanzen an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. 2007.

FUJIMOTO, Y.; EGUCHI, T.; MURASAKI, C.; OHASHI, Y.; KAKINUMA, K.; TAKAGAKI, H.; ABE, M.; INAZAWA, K.; YAMAZAKI, K.; IKEKAWA, N.;

GAETTI-JARDIM JUNIOR, E.; LANDUCCI, L. F.; GAETTI-JARDIM, E. C.; SANGALLI, J.; SOUSA, F. R. N. Atividade Inibitória de Extratos do Cerrado Brasileiro sobre Microrganismos Anaeróbios e Associados a Infecções Nosocomiais. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 13, n. 2, p. 43-52, 2009.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MAHMOUD T. S.; FIGUEIREDO, P. O. Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*, **Química nova**, v. 30, n. 8, p. 1887-1891, 2007.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; DA SILVA, L. M. G. E.; HAMERSKI, L. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6647-6650, 2009.

GARCIA-MUNOZ, S., CORRAL, A. M.; GONZALEZ, L.J. ; SÁNCHEZ, C. L.; ROSALES, A.; DORADO, M. M.; GARCIA, I. R. Synthesis of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol and derivatives through intramolecular C-H insertion. **Tetrahedron Letters**, v. 62, p. 12182–12190, 2006.

GENÇ, Y.; SARAÇOĞLU, Y.; NAGATSU, A.; HARPUT, S. Iridoid and megastigman glucosides from *Plantago lagopus* L. **FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 35, p. 29-34, 2010.

GERTSCH, J.; TOBLER, R. T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, S., Antifungal, antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal properties of justicidin B and a new aryl-naphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorum*. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 420-424, 2003.

GHISALBERTI E.L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. **Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 147-63, 1998.

GOETZ, G.; FKYERAT, A.; METAIS, N.; KUNZ, M.; TABACCHI, R.; PEZET, R.; PONT, V. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. **Phytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 759-767, 1999.

GOMEZ CASTELLANOS, J. R., PRIETO, J. M., HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) - a global ethnopharmacological commodity?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 1-13, 2009.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Químico-Biologia Quantitativa: Um novo paradigma. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105-2114, 2012.

GRECA, M. D.; MONACO, P.; PREVITERA, L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1430-1435, 1990.

GRIBBLE, G.W. The diversity of naturally occurring organobromine compounds. **Chemical Society Reviews**, v. 28, n.5, p. 335-346, 1999.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUISSONI, A. C. P.; SILVA, I. G.; GERIS, S.; CUNHA, L. C.; SILVA, H. H. G., Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 363-367, 2013.

GUPTA, P.; BALWANI, S.; KUMAR, S.; AGGARWAL, N.; ROSSI, M.; PAUMIER, F. C.; BOVICELLI, P.; SASO, L.; DEPASS, A. L.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V.; GHOSH, B.  $\beta$ -sitosterol among other secondary metabolites of *Piper galeatum* shows inhibition of TNF $\alpha$ -induced cell adhesion molecule expression on human endothelial cells. **Biochimie**, v. 92, n. 9, p. 1213-1221, 2010.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A., Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HAGER, L.P.; MORRIS, D.R.; BROWN, F.S.; EBERWEIN, H. Chloroperoxidase II. Utilization of halogen anions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 8, p. 1769-1777, 1966.

HASSAN, A. G.; DENIZ, T.; CHRIS, M. I.; IHSAN, C. Iridoids and triterpene saponins from *Verbascum wiedemannianum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 4, p. 433-436, 2003.

HUANG, R. L.; HUANG, Y. L.; OU, J. C.; CHEN, C. C.; HSU, F. L.; CHANG, C., Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus *in vitro*. **Phytother Research**, v. 17, n. 5, p. 449-453, 2003.  
IMBERT, T. F., Discovery of podophyllotoxin. **Biochimie** v. 80, n. 3, p. 207-222, 1998.

IIDA, A.; KAKO, T.; KANO, M.; TOMIOKA, K. DNA topoisomerase II inhibitors targeting the ATPase domain. **Nippon Kagakkai**, v. 40, p. 139-144, 1998.

INAGAKI, R.; NINOMIYA, M.; TANAKA, K.; WATANABE, K.; KOKETSU, M. Synthesis and cytotoxicity on human leukemia cells of furonaphthoquinones isolated from *Tabebuia* plants. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 6, p. 670-673, 2013.

INNOCENTI, G. E.; VEGETO, S.; DALL'ACQUA, P.; CIANA, M.; GIORGETTI, E.; AGRADI, A.; SOZZI, G.; FICO, T. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. **Phytomedicine**, v. 14, p. 147–152, 2007.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ, O mosquito *Aedes aegypti* faz parte da história e vem se espalhando pelo mundo desde o período das colonizações. Disponível em: < <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html> >. Acesso em: 27 out. 2014.

JAISHREE, V.; BADAMI, S.; Anti-oxidant and hepatoprotective effect of swetiamarin from *Enocostemma axillare* against D-galactosamine induced acute liver damage in rats. **Journal Ethnopharmacol**, v. 130, n. 1, p. 103–106, 2010.

JENSEN, S. R.; GOTFREDSEN, C. H.; GRAYER, R. J.; Unusual iridoid glucosides in *Veronica* sects. *Hebe* and *Labiatoideis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 207–215, 2008.

JENSEN, S. R.; GOTFREDSEN, C. H.; HARPUT, U. S.; SARACOGLU, I. Chlorinated Iridoid Glucosides from *Veronica longifolia* and their Antioxidant Activity. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 9, p. 1593-1596, 2010.

JENSEN, S. R.; NIELSEN, B. J.; Iridoids in *Thunbergia* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 3059–3061, 1989.

KIM, E. O.; MIN K. J.; KWON, T. K.; UM, B. H.; MOREAU, R. A.; CHOI, S. W. Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1309-1316, 2012.

KIM, G. H.; NOH, Y. J. Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo. **Composition comprising *Tabebuia avellanedae* fraction and used for treating arthritis**. Coreia do Sul n. KR 2014029561, 28 de agosto de 2014.

KIM, M. G.; JEON, J. H.; LEE, H. S., Larvicidal activity of active constituent isolated from *Tabebuia avellanedae* bark and structurally related analogues against three mosquito species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 45, p. 10741-10745, 2013.

KIM, M. R.; MOON, H. I.; CHUNG, J. H.; MOON, Y. H.; HAHM, K. S.; WOO, E. R. Matrix metalloproteinase-1 inhibitor from the stem bark of *Styrax japonica* S. et Z. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 1466–1469, 2004.

KIRNER, S.; HAMMER, P. E.; HILL, D. S.; ALTMANN, A.; FISCHER, I.; WEISLO, L. J.; LANAHAN, M.; VAN PÉE, K. H.; LIGON, J. M. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1939-1943, 1998.

KITAGAWA, I.; FUKUDA, Y.; TANIYAMA, T.; YOSHIKAWA, M. Absolute stereostructures of rehmaglutins A, B, and D three new iridoids isolated from *Chinese rehmanniae* radix. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 3, p. 1399-402, 1986.

KITAGAWA, I.; FUKUDA, Y.; TANIYAMA, T.; YOSHIKAWA, M. Chemical studies on crude drug processing. VII. On the constituents of *Rehmanniae* radix. (1): Absolute stereostructures of Rehmaglutins A, B, and D isolated from Chinese *rehmanniae* radix, the dried root of *Rehmannia glutinosa* Libosch. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 5, p. 1171-1176, 1991.

KITAGAWA, I.; TANI, T.; AKITA, K.; YOSIOKA, I. Constituents of *Linaria japonica*. I. Structure of linarioside, a new chlorinated iridoid glucoside and identification of two related glucosides. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 9, p. 1978-1987, 1973.

KOBAYASHI, H.; KARSAWA, H.; MIYASE T.; FUKUSHIMA, S. Studies on the Constituents of *Cistanchis herba*. II. Isolation and Structures of New Iridoids, Cistanin and Cistachlorin. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 5, p. 1729-1734, 1984.

KÖNIG, G.; RIMPLER, H.; HUNKLER, D. Iridoid glucosides in *Avicennia officinalis*, **Phytochemistry**, v. 26, n. 2, p. 423-427, 1987.

KUMAR, K.; ABRAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R., **Robbins**: Patologia básica. 8 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios não esteroides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, 2002.

KWON, J. H.; KIM, J. H.; CHOI, S. E.; PARK, K. H.; LEE, M. W. Inhibitory Effects of Phenolic Compounds from Needles of *Pinus densiflora* on Nitric Oxide and PGE2 Production. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 12, p. 2011-2016, 2010.

LEE, S.; KIM, S.; KWAK, T. H.; YOO, H. H., Comparative metabolism study of  $\beta$ -lapachone in mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, p. 286-292, 2013.

LEE, D. G.; JIN, Q.; JIN, H. G.; SHIN, J. E.; CHOI, E. J.; WOO E. R. Isolation of virus–cell fusion inhibitory components from the stem bark of *Styrax japonica* S. et Z. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, p. 863–866, 2010.

- LI, D-Q.; BAO, Y-M.; ZHAO, J-J.; LIU, C-P.; LIU, Y.; NA, L-J. Neuroprotective properties of catalpol in transient global cerebral ischemia in gerbils: dose-response, therapeutic time window and long-term efficacy. **Brain Research**, v. 1029, n. 2, p. 179–185, 2004.
- MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* TRIANA através de análise por computador. **Química nova**, v. 13, n. 4, p. 260-262, 1990.
- MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. O.; LOTUFO, L. V. C.; MAGALHAES, H. I. F.; DE MORAES, M. O.; DE LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; DE OLIVEIRA, J. E. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456-464, 2011.
- MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H., The antiviral action of lignans. **Planta Medica**, v. 55, n. 6, p. 531-535, 1989.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, INFORMAÇÕES TÉCNICAS. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-dengue> >. Acesso em: 26 out. 2014.
- MOLDOVEANU, B.; OTMISHI, P.; JANI, P.; WALKER, J.; SARMIENTO, X.; GUARDIOLA, J.; SAAD, M.; YU, J., Inflammatory mechanisms in the lung. **Journal of Inflammation Research**, v. 2, p. 1–11, 2009.
- MONTANARI, A. C.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MOROTA, T.; NISHIMURA, H.; SASAKI, H.; CHIN, M.; SUGAMA, K.; KATSUHARA, T.; MITSUHASHI, H. Five cyclopentanoid monoterpenes from *Rehmanniaglutinosa*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2385-2391, 1989.
- MOSS, G. P., Nomenclature of lignans and neolignans. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, p. 1493-1523, 2000.
- MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS L. B. A.; NUNES, T. F.; MORIGUTI, J. C., Uso racional de antimicrobianos. **Revista Medicina**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.
- MURPHY, C.D. A review - New frontiers in biological halogenations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, 539–548, 2003.
- NAGAOKA, T.; TANAKA, K.; TEZUKA, Y.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Origin of "Kokuoren", one of the Shosoin Items. **Natural Medicines**, v. 55, n. 1, p. 23-27, 2001.
- NAGATOSHI, M.; TERASAKA, K.; NAGATSU, A.; MIZUKAMI, H. Iridoid-specific glucosyltransferase from *Gardenia jasminoides*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 37, p. 32866–32874, 2011.
- NAKANISHI, T.; LIDA, I.; INATOMI, Y.; MURATA, H.; INADA, A.; MURATA, J.; LANG, F. A.; LINUMA, M.; TANAKA, T. Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*, **Phytochemistry**, v. 65, p. 207-213, 2004.

NAKANO K., MARUYAMA K., TAKAISHI Y., TOMIMATSU T. Iridoids from *Tabebuia avellanedae*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 371-373, 1993.

NEUMANN, C. S.; FUJIMORI, D. G.; WALSH, C. T. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. p. 99-109, 2008.

NGUYEN, T. H. A.; TRAN, V. S.; LUDGER, W.; GUENTER, A. Iridoid and iridoid glycosides from the *Rehmannia glutinosa* rhizome. **Tap Chi Hoa Hoc**, v. 40, n. 4, p. 17-22, 2002.

NOZAKI, T.; WATANABE, F.; ISHINO, M.; MORIMOTO, I.; KONDOH, H.; KOYAMA, K.; NATORI, S. A mutagenic new iridoid in the water extract of *Catalpa fructus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 2838–2840, 1989.

OCANA, M.; CENDAN, C. M.; COBOS, E. J.; ENTRENA, J. M.; BAEYENS, J. M., Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 203–219, 2004.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, G. G.; MAIA, J. G. S. Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia incana*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p.1409-1412, 1993.

OLIVEIRA, A. M. **Estudo químico das espécies *Sabicea grisea* CHAM. & SCHLTDL. VAR. *grisea* e *Psychotria barbiflora* D.C (Rubiaceae) e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos e constituintes isolados.** 2012. 174f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2012.

OLIVEIRA, A. M.; CONSERVA, L. M.; DE SOUZA, J. N.; DE ALMEIDA, F.; LYRA LEMOS, R. P.; BARRETO, E. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of octacosanol from the leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p.1598–1611, 2012.

OLMSTEAD, R.G.; ZJHRA, M.L.; LOHMANN, L.G.; GROSE, S.O.; ECKERT, A.J.; A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1731-1743, 2009.

ORTIZ, M. I.; TORRES-LOPEZ, J. E.; CASTANEDA, H. G.; ROSAS, R.; VIDAL-CANTU, G. C.; GRANADOS, S. V. Pharmacological evidence for the activation of K(+) channels by diclofenac. **European Journal of Pharmacology**, v. 438, p. 85–91, 2002.

PANDURANGAN, K.; KRISHNAPPAN, V.; SUBRAMANIAN, V.; SUBRAMANYAN, R. Antinociceptive effect of certain dimethoxy flavones in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 727, p. 148-157, 2014.

PARK, C. H., KIM, K. H., LEE, I. K., LEE, S. Y., CHOI, S. V., LEE, J. H., LEE K. R. Phenolic constituents of *Acorusgramineus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 8, p. 1289-1296, 2011.

- PARK, B. S.; LEE, H. K.; LEE, S. E.; PIAO, X. L.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; AHN, Y. J.; KIM, J. H., Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 255-262, 2006.
- PEREIRA, I. T., BURCI, L. M., DA SILVA, L. M., BAGGIO, C. H., HELLER, M., MICKE, G. A., PIZZOLATTI, M. G., MARQUES, M. C., WERNER, M. F. Antiulcer effect of bark extract of *Tabebuia avellanedae*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 7, p. 1067-1073, 2012.
- PEREZ, H.; DIAZ, F.; MEDINA, J. D., Chemical investigation and in vitro antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysantha*, **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 4, p. 227-231, 1997.
- PIAZ, F. D.; VASSALLO, A.; TEMRAZ, A.; COTUGNO, R.; BELISARIO, M. A.; BIFULCO, G.; CHINI, M. G.; PISANO, C. O.; DE TOMMASI, N.; BRACA, A. L., A Chemical-Biological Study Reveals C9-type Iridoids as Novel Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 4, p.1583-1595, 2013.
- PIERTERS, L.; VAN DYCK, S.; GAO, M.; BAI, R.; HAMEL, E.; VLIETINCK, A.; LEMIERE, G. Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibits tubulin polymerization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 5475-5481, 1999.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.
- PINTO, A.V.; CASTRO, S.L. The Trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4570-4590, 2009.
- QUEIROZ, A. C.; DE LIRA, D. P.; DIAS, T, L. M. F.; DE SOUZA, E. T.; DA MATTA, C. B. B.; DE AQUINO, A. B.; SILVA, L. H. A. C.; DA SILVA, D. J. C.; MELLA, E. A. C.; AGRA, M. F.; FILHO, J. M. B.; DE ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S., The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology** v. 128, n. 2, p. 377–383, 2010.
- RAO M. M., KINGSTON D. G. I. Plant anticancer agents. XII.1 Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinines from *Tabebuia cassinoides*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 600–604, 1982.
- RATES, S. M. K. Promoção do Uso Racional de Fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.
- REANMONGKOL, W.; ATSUMOTO, K.; WATANABE, H.; SUBHADHIRASAKUL, S.; SAKAI, S. Antinociceptive and Antipyretic Effects of Alkaloids Extracted from the Stem Bark of *Hunteria zeylanica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 10, p. 1345-1350, 1994.

REIS DE MORAIS, S. K.; SILVA, S. G.; PORTELA, C. N.; NUNOMURA, S. M.; QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M. Bioactive dihydroxyfuranonaphthoquinones from the bark of *Tabebuia incana* A.H. Gentry (Bignoniaceae) and HPLC analysis of commercial pau d' arco and certified *T. incana* bark infusions. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 99-102, 2007.

RICKARD-BON S. E.; THOMPSON, L. U., The role of flaxseed lignans in hormone-dependant and independent cancer. In: Flax, The genus *Linum*, MUIR, A. D. and WESTCOTT, N. D., **Taylor and Francis**, cap. 8, p. 181-203, 2003.

RODRIGUES, A. R.; DUARTE I. D., The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 110–114, 2000.

RODRIGUEZ, S.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J-L.; HOSTETTMANN, K. Iridoids and secoiridoids in the Gentianaceae. **Current Organic Chemistry**, v. 2, p. 627–648, 1998.

SAMPAIO-SANTOS M. I.; KAPLAN M. A. C. Superordem Corniflorae: química, etnofarmacologia e farmacologia. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 599-611, 1997.

SAMPAIO-SANTOS M. I.; KAPLAN M. A. C. Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 12, n. 2, p. 144-153, 2001.

SARTORI, M. R. K., **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (ASTERACEAE)**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, SC, 2005.

SAXENA, D.; AOUAD, S.; ATTIEH, J.; SANI, H.S. Biochemical characterisation of chloromethane emission from the wood-rotting fungus *Phellinus pomaceus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2831–2835, 1998.

SCHMEDA, H.G.; PAPASTERGIOU, F., Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug “tayĩ pytá” (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, p. 495-501, 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico, v. 14, nº 46, 2014.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim epidemiológico, v. 53, nº 46, 2014.

SHARMA, M.L; RAO, C.S, DUDA, P.L. Immunostimulatory activity of *Picrorhiza kurroa* leaf extract. **Journal Ethnopharmacol**, v. 41, n. 3, p. 185–192, 1994.

SHARMA K. S.; AROGYA, S. M.; BHASKARMURTHY, D. H.; AGARWAL, A.; VELUSAMI, A. C. Hepatoprotective activity of the *Phyllanthus* species on tert-butyl hydroperoxide (t-BH)-induced cytotoxicity in HepG2 cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n. 27, p. 229-233, 2011.

SHAW, P.D.; HAGER, L.P. Biological chlorination. III. beta-Ketoadipate chlorinase: a soluble enzyme system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n.10, p. 2565-2569, 1959.

SHAW, P.D.; HAGER, L.P. Biological chlorination. VI. Chloroperoxidase: a component of the b-ketoadipate chlorinase system. **Journal of Biological Chemistry** v. 236, n. 6, p. 1626-1630, 1961.

SICHAEM, J.; KAENNAKAM, S.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Tabebuialdehydes A–C, cyclopentene dialdehyde derivatives from the roots of *Tabebuia rosea*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1456-1459, 2012.

SILVA, A. J. M.; NETTO, C. D.; PACIENZA-LIMA, W.; TORRES-SANTOS, E. C.; ROSSI-BERGMANN, B.; MAUREL, S.; VALENTIND, A.; COSTA, P. R. R.; Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1,4-naphthoquinone derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 176-182, 2009.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B., **Caracterização dos efeitos do Plumierídeo, um iridóide isolado de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), em modelos de inflamação e dor**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2007.

SINGH, N.; JABEEN, T.; PAL, A.; SHARMA, S.; PERBANDT M.; BETZEL, C.; SINGH T. P. Crystal structures of the complexes of a group IIA phospholipase A2 with two natural anti-inflammatory agents, anisic acid, and atropine reveal a similar mode of binding. **Proteins**, v. 64, n. 1, p. 89-100, 2006.

SITONIO, M. M.; CARVALHO, C. H. R.; CAMPOS, I. A.; SILVA, J. B. N. F.; LIMA, M. C. A.; GOES, A. J. S.; MAIA, M. B. S.; ROLIM NETO, P. J.; SILVA, T. G. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione ( $\beta$ -lapachone). **Inflammation Research**, v. 62, n. 1, p. 107-113, 2013.

SOARES, A.O. **Estudo Fitoquímico das Flores e Casca do Caule de um Espécime de *Tabebuia caraipa* (Bignoniaceae) Coletado na Região do Cerrado em Mato Grosso do Sul**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em química) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2006.

SOARES, C. C.; MARQUES, T. M.; RIGOLIN, G. G.; NEIS, E.; FRIAÇA, A. M. V.; SILVA, A. S.; BARRETO, G. S.; LOUSA, L. Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1A, p. 77-81, 2009.

SON, D. J.; LIM, Y.; PARK, Y. H.; CHANG, S. K.; YUN, Y. P.; HONG, J. T.; TAKEOKA, G. R.; LEE, K. G.; LEE, S. E.; KIM, M. R. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2MAPK activation. **Journal Ethnopharmacology**, v.108, p.148-151, 2006.

- STOCKMAN, A. L.; BRANCALION, P. H. S.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. - Bignoniaceae): temperatura e substrato para o teste de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.3, p.139-143, 2007.
- STRAUCH, M. A.; TOMAZ, M. A.; MACHADO, M. M.; CRUZ, J. M. T.; CONS, B. L.; DA SILVA, A. J. M.; COSTA, P. R. R.; MELO, P. A. Evaluation of the Antiophidic Activity of Lapachol and Synthetic Analogues. **Toxicon**, v. 60, n. 2, p. 205, 2012.
- SUGITA, P.; ARITIN, B.; RACHMAWATI, S.; YULY, S. A. Identification of compounds from extracts methanol of ketepeng leaves (*Cassia alata*). **Journal of Natural Product and Plant Resource**, v. 4, n. 5, p. 39-48, 2014.
- SUO, M.; OHTA, T.; TAKANO, F.; JIN, S. Bioactive phenylpropanoid glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7336-7345. 2013.
- SZARKA, R. J.; WANG, N.; GORDON, L. NATION, P. N.; SMITH, R. H., A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation, **Journal of Immunological Methods**, v. 202, n. 1, p. 49–57, 1997.
- TASKOVA, R. M.; GOTFREDSEN, C. H.; JENSEN, S. R. Chemotaxonomiy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. **Phytochemistry** , v. 67, p. 286–30,1 2006.
- THEODULOZ, C.; CARRION, I. B.; PERTINO, M. W.; VALENZUELA, D.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Potential gastroprotective effect of novel cyperenoic acid/quinone derivatives in human cell cultures. **Planta Medica**, v. 78, n. 17, p. 1807-1812, 2012.
- TUNDIS, R.; LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; STATTI, G.A.; MENICHINI, F. Biological and pharmacological activities of iridoids: Recent developments. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 399-420, 2008.
- TWARDOWSCHY, A.; SETIM, C. F.; HATSUKO BAGGIO, C.; MAYER, B.; DOS SANTOS A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; ALVAREZ, Z. A.; DOS SANTOS, E. P.; OTUKI, M. F.; MARQUES, M. C. A. Antiulcerogenic activity of bark extract of *Tabebuia avellanedae*, Lorentz ex Griseb. **Journal Ethnopharmacology**, v.118, p. 455-459, 2008.
- UESATO, S.; HASHIMOTO, T.; INOUE, H. Three new secoiridoid glucosides from *Eustoma russellianum*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 12, p. 1981-1986, 1979.
- VAN MIERT, S.; VAN DYCK, S.; SCHMIDT, T. J.; BRUN, R.; VLIETINCK, A.; LEMIERE, G.; PIETERS, L. Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignan and related benzofurans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 661-669, 2005.

- VAN PÉE, K.H. Microbial biosynthesis of halometabolites. **Archives of Microbiology**, v. 175, n. 4, p. 250-258, 2001.
- VASCONCELOS, P. F. Febre amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 2, p. 275-293, 2003.
- VILLASEÑOR I. M. Bioactivities of iridoids. **Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**. v. 6, n. 4, p. 307–314, 2007.
- VILLEGAS, J. R.; AMATO, S.; CASTRO, I.; CASTRO, O.; JACOBSON, U. 4-Aryltetraline tipul and furanonaphthoquinone from *Tabebuia palmeri* wood **Fitoterapia**, v. 66, n. 3, p. 281-282 ,1995.
- VON POSER G. L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 4, p. 351-366, 2000.
- WANG, H.; WU, J-J.; LIU, G.; YE, W-C.; ZHAO, S-X. Chemical studies on iridoids from *Picrorhiza scrophulariiflora*. **Zhongguo Tianran Yaowu**, v. 4, n.1, p. 36-39, 2006.
- WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 2003-2011, 2004.
- WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 5, p. 589-598, 2005.
- WEI, G.; WEN, X. Characteristics and kinetics of catalpol degradation and the effect of its degradation products on free radical scavenging. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, Suppl 1, p. S122–S129, 2014.
- WOO, K. W.; CHOI, S. U.; PARK, J. C.; LEE, K. R. A New Lignan Glycoside from *Juniperus rigida*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 12, p. 2043-2049, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, p. 13, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. The global burden of disease: update. Geneva: World Health Organization, 146f., 2008.
- WUOSMAA, A.M.; HAGER, L.P. Methyl chloride transferase: a carbocation route for biosynthesis of halometabolites. **Science**, v. 249, n. 4965, p. 160-162, 1990.
- WU, P-P.; ZHANG, K.; LU, Y-L.; HE, P.; ZHAO S-Q. In vitro and in vivo evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 80, n. 10, p 502-508, 2014.
- WURST, S.; WAGENAAR, R.; BIERE, A.; VAN DER PUTTEN, W.H. Microorganisms and nematodes increase levels of secondary metabolites in roots and root exudates of *Plantago lanceolata*. **Plant and Soil**, v. 329 n. 2, p. 117-126, 2010.

XIAO, T.; WANG, Q.; JIANG, L.; JIANG, J.; LI, Y. Chemical constituents of *Artemisia anomala*. **Zhongcaoyao**, v. 44, n. 5, p. 515-518, 2013.

YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; IIDA, A.; TOKUDA, H.; NISHIMURA, K. Stereoselective synthesis and cytotoxicity of a cancer chemopreventive naphthoquinone from *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, n. 23, p. 6417-6420, 2007.

YANG, D.; ZHU, K. Chemical constituents of linearleaf speedwell (*Veronica linariifolia*) (II). **Zhongcaoyao**, v. 22, n. 2, p. 57-59, 1991.

YE, Y.; LI, M.; CHEN, X., Purification and characterization of a novel antinociceptive peptide from venom of *Agkistrodon halys* Pallas. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36 n. p. 448-456, 2013.

YOSHIKAWA, M.; FUKUDA, Y.; TANIYAMA, T.; KITAGAWA, I. Absolute stereostructures of rehmaglucin C and glutinoside a new iridoid lactone and a new chlorinated iridoid glucoside from Chinese rehmannaiae radix. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 3, 1403-1406, 1986.

YOSHIKAWA, O.; IKEKAWA, T. Studies on the structure and stereochemistry of cytotoxic furanonaphthoquinones from *Tabebuia impetiginosa*: 5-and 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b] furan-4,9-diones. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 2323-2327, 1991.

ZANI, C. L.; DE OLIVEIRA, A. B.; DE OLIVIERA, G. G. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2379-2381, 1991.

## **ANEXO I**

# Isolation of a dihydrobenzofuran lignan, icariside E<sub>4</sub>, with an antinociceptive effect from *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae) bark

Jesu C. Ferreira-Júnior · Lucia M. Conserva ·  
Rosângela P. Lyra Lemos · Genilda C. de Omena-Neta ·  
Araken Cavalcante-Neto · Emiliano Barreto

Received: 22 May 2014 / Accepted: 8 August 2014  
© The Pharmaceutical Society of Korea 2014

**Abstract** The antinociceptive activity of icariside E<sub>4</sub>, a dihydrobenzofuran-type lignan isolated from *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae) bark, was evaluated in mice by using chemical and thermal models of nociception. Intraperitoneal (i.p.) administration of crude *T. roseo-alba* bark extract and its methanol fraction inhibited acetic acid-induced abdominal constriction in mice. Furthermore, i.p. administration of 0.1, 1, and 10 mg/kg of icariside E<sub>4</sub> reduced the number of writhes evoked by acetic acid injection by 46.9, 82.3, and 66.6 %, respectively. Icariside E<sub>4</sub> administration had no effect in the first phase of the formalin test, but it reduced nociceptive behavior in the second phase as indicated by a reduction in the licking time. Icariside E<sub>4</sub> did not modify thermal nociception in the hot-plate test model, suggesting that it had a peripheral antinociceptive action. The antinociceptive effect of icariside E<sub>4</sub> in the writhing test was reversed by pre-administration of glibenclamide, but not of naloxone, atropine, yohimbine, or haloperidol. Together, these results indicated that the antinociceptive activity of icariside E<sub>4</sub> from *T. roseo-alba* in models of chemical pain occurred through ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent mechanisms.

**Keywords** *Tabebuia roseo-alba* · Bignoniaceae · Icariside E<sub>4</sub> · Antinociceptive effect

## Introduction

The many tree species of the genus *Tabebuia* (Bignoniaceae) that are native to Brazil are commonly known as “ipê” and have great ornamental and medicinal value. The common name of each species is accompanied by the color of the flowers, which can be purple, yellow, pink, or white. *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith, which has white flowers, is among the most widely cultivated tree species native to Brazil (Degan et al. 2001).

Species from the *Tebebuia* genus have been traditionally used for ethnopharmacological purposes to treat inflammation, malaria, cancer, stomach disorders, bacterial and fungal infections, anxiety, poor memory, irritability, and depression (Sichaem et al. 2012). Phytochemical studies revealed that the extracts from species of this genus contain a wide diversity of secondary metabolites such as tannins, flavonoids, quinones, alkaloids, naphthoquinones, and iridoids (Abreul et al. 2014).

*Tabebuia roseo-alba* is economically important because of its ornamental and ethnopharmacological uses. Previous studies revealed that leaves and stem bark from this plant inhibited nosocomial infections (Gaetti-Jardim Júnior et al. 2009). To the best of our knowledge, no phytochemical studies have been undertaken with this species. Scientific reports have only shown that lignan glycosides are present in species from this genus (Warashina et al. 2005). The icariside E<sub>5</sub> lignan showed relevant biological activities, including antioxidant and anti-apoptotic effects (Iorizzi et al. 2001). In addition, icariside E<sub>3</sub> exhibited a potent inhibitory effect on DNA topoisomerase activity (Mukherjee et al.

J. C. Ferreira-Júnior · L. M. Conserva  
Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL 57072-970, Brazil

R. P. Lyra Lemos  
Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas,  
Maceió-AL 57017-020, Brazil

G. C. de Omena-Neta · A. Cavalcante-Neto · E. Barreto (✉)  
Laboratório de Biologia Celular, Universidade Federal de Alagoas, Maceió-AL 57072-970, Brazil  
e-mail: emilianobarreto@icbs.ufal.br

2012). The diverse biological effects induced by lignan glycosides make these compounds an interesting target for pharmacological studies.

To date, there are no reports on the antinociceptive activity of *T. roseo-alba*. Therefore, this study was undertaken to evaluate the antinociceptive effect of *T. roseo-alba* extracts and purified icariside E<sub>4</sub> in chemical and thermal models of nociception. Moreover, the mechanisms through which icariside E<sub>4</sub> exerted its effects were investigated.

## Materials and methods

### General experimental procedures

Optical rotation was measured at 26.2 °C on a Rudolph Research Analytical, Autopol IV. The infra-red (IR) spectral (KBr) was obtained on a Shimadzu, IRPrestigo-21 spectrometer. The nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded by using a Bruker Avance 400 spectrometer, operating at 400 and 100 MHz for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, respectively, in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD solutions. Silica gel (70–230 mesh; Merck) and Sephadex LH-20 (Pharmacia) were used for column chromatography separations, while analytical thin-layer chromatography (0.5-mm thickness) was carried out on silica gel plates (60 F<sub>254</sub>; Merck). The purity of icariside E<sub>4</sub> (98 %) was determined by using high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis carried out with an HPLC Shimadzu LC-10A system (MeOH-MeCN 1:1) with a UV detector set to 254 nm. Formalin and acetic acid were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil) and indomethacin, yohimbine, atropine, naloxone, haloperidol, glibenclamide, morphine, and phosphate-buffered saline were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Immediately prior to use, icariside E<sub>4</sub> was dissolved in saline (NaCl, 0.9 %) containing 1 % Tween 80 to make a stock solution with a concentration of 100 mg/ml, which was diluted further to achieve the required concentrations for subsequent experiments.

### Animals

Male Swiss mice weighing 18–22 g were obtained from the breeding colonies of the Universidade Federal de Alagoas. Animals were housed at the Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde animal housing facility at 22 ± 2 °C and a 12/12-h light/dark cycle, with free access to food and water. Experiments were performed during the light phase of the cycle. The animals were allowed to adapt to the laboratory conditions for at least 2 h before testing and were used only once. This study was carried out in

accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Alagoas (Comissão de Ética no Uso de Animais—CEUA, License n° 014512/2011-65). All efforts were made to minimize animal suffering.

### Plant material

*Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith was collected in October 2011 at Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, Sítio do Pau-Brasil, Coruripe, Alagoas, Brazil, and identified by Rosangela P. Lyra Lemos of the Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, where a voucher specimen was deposited (MAC-46879).

### Extract preparation and isolation of the active compound

Dried and powdered leaves (400 g), stems (3,240 g) and barks (460 g) from *T. roseo-alba* were exhaustively extracted with methanol at room temperature and the solvent was evaporated under vacuum. After drying under vacuum, the MeOH extract from the bark (27.9 g) was suspended in MeOH:H<sub>2</sub>O solution (3:2) and successively extracted with hexane, chloroform, and ethyl acetate. The hydroalcoholic fraction (15.0 g) yielded icariside E<sub>4</sub> (31 mg) as an amorphous powder after successive chromatographic fractionations over silica gel by using a gradient of EtOAc in MeOH and Sephadex LH-20 with MeOH. The structure of this compound was identified by using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, including correlation spectroscopy, heteronuclear single quantum coherence, and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) experiments, and comparing the results with those reported in literature. Dose selection for extracts or icariside E<sub>4</sub> for the pharmacological assays was based on the results of a pilot experiment.

### *Trans-Dihydrodehydrodiconiferylalcohol 4-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (icariside E<sub>4</sub>)*

Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{26.2}$ -21,7° (*c* = 1.3, MeOH); IR (KBr) 3,400, 2,918, 2,845, 1,647, 1,600, 1,580, 1,500, 1,452, 1,261, 1,217, 1,062, 1,024 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_H$  7.09 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-5), 7.01 (1H, d, *J* = 1.9 Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, H-6), 6.73 (1H, s, H-2'), 6.70 (1H, s, H-6'), 5.55 (1H, d, *J* = 6 Hz, H-7), 3.84 (3H, s, OMe), 3.80 (1H, m, H-8), 3.78 (3H, s, OMe), 3.55 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, H-9'), 2.62 (2H, t, *J* = 7.8 Hz, H-7'), 1.81 (2H, m, H-8');  $\alpha$ -L-

rhamnopyranosyl moiety  $\delta_{\text{H}}$ : 5.32 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-1''), 4.0 (1H, m, H-3''), 3.88 (1H, m, H-2''), 3.79 (1H, m, H-5''), 3.44 (1H, m, H-4''), 1.2 (3H, d, 6.2 Hz, H-6'');  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta_{\text{C}}$  151.7 (C, C-3), 147.0 (C-4'), 146.2 (C-4), 145.3 (C-3'), 138.4 (C-1), 136.9 (C-1'), 129.4 (C-5'), 119.4 (C-5), 118.9 (C-6), 117.7 (C-2'), 111.3 (C-2), 113.9 (C-6'), 88.2 (C-7), 55.4 (C-8), 64.9 (C-9), 35.4 (C-8'), 62.0 (C-9'), 56.5 (3'-OMe), 56.4 (3-OMe), 32.6 (C-7');  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl moiety:  $\delta_{\text{C}}$  101.1 (C-1''), 72.0 (C-2''), 71.8 (C-3''), 73.6 (C-4''), 70.6 (C-5''), and 17.7 (C-6'').

## Pharmacological tests

### Acetic acid-induced writhing test

The writhing test was carried out in mice according to the previously described method (de Barros et al. 2011). Abdominal writhing was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 0.1 mL of 0.6 % acetic acid/10 g body weight. Control mice were administered the equivalent volume of saline (NaCl, 0.9 %). Animals were administered crude methanol extracts from leaves, stems, and bark (100 mg/kg), hydroalcoholic fractions (100 mg/kg), icariside E<sub>4</sub> (0.1, 1, or 10 mg/kg), or indomethacin (10 mg/kg) 1 h before stimulation with acetic acid. Five minutes after the acetic acid injection, the number of times that each animal exhibited abdominal constriction was counted for 10 consecutive minutes. The percentage of inhibition was determined for each experimental group by using the following formula: Inhibition (%) =  $100 - (T \times 100)/C$ ; where  $C$  and  $T$  indicate untreated (vehicle) and drug-treated, respectively.

Another set of experiments was conducted to investigate the mechanisms involved in the antinociceptive effect of icariside E<sub>4</sub> (10 mg/kg, i.p.). Animals were administered antagonists, including yohimbine (1 mg/kg), atropine (2 mg/kg), naloxone (5 mg/kg), haloperidol (1 mg/kg), and glibenclamide (10 mg/kg) i.p. 15 min prior to treatment with acetic acid. The doses for the positive control or antagonists used in this work were selected based on our previous studies (de Oliveira et al. 2012; Ferro et al. 2013).

### Formalin test

Mice were injected with 20  $\mu\text{L}$  of 2.5 % formalin in the subplantar area of the right hind paw. The duration of paw licking (in seconds) was determined over 0–5 min (first phase) and 15–30 min (second phase) after formalin injection (de Oliveira et al. 2012). Animals ( $n = 6$ ) were treated with icariside E<sub>4</sub> (10 mg/kg) or the reference compound (indomethacin, 10 mg/kg), 1 h before administration of formalin. Control animals were administered sterile saline.

### Hot-plate test

This test was used to measure reaction times according to the method described by (de Oliveira et al. 2012). Animals were placed individually on a hot plate metallic surface (model EFF-361; Insight, Brazil) maintained at  $54 \pm 1$  °C, and the time between placement of the animal on the hot plate and the occurrence of either licking of the hind paws, shaking, or jumping off the surface was recorded as reaction time (s). Reaction time was measured 60 min after i.p. administration of saline, icariside E<sub>4</sub> (10 mg/kg), or morphine (5 mg/kg), with a cut-off time of 30 s. Each experimental group contained six animals.

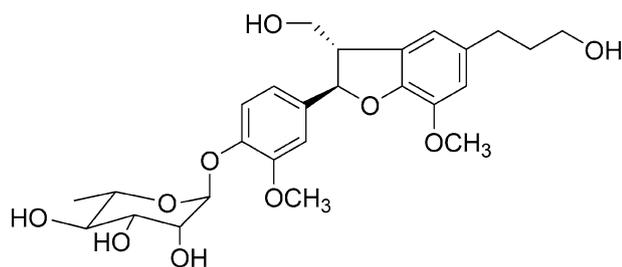
### Statistical analysis

Data are reported as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and were analyzed by using GraphPad Prism software, version 5.0 (San Diego, CA, USA). Comparisons between the experimental groups were performed either by using one-way ANOVA followed by Tukey's test or by two-way ANOVA followed by the Bonferroni test.  $P$  values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

## Results

### Phytochemical analysis

The hydroalcoholic fraction obtained from the *T. roseo-alba* bark extract was subjected to successive fractionation that resulted in the isolation of a lignan glycoside identified as *trans*-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside, known as icariside E<sub>4</sub> (Fig. 1). This compound was isolated as an amorphous powder and  $[\alpha]_{\text{D}}^{26.2} -21.7^\circ$  ( $c = 1.3$ , MeOH). The HMBC correlation of anomeric hydrogen ( $\delta$  5.32, d,  $J = 1.8$  Hz, H-1'') to C-4 ( $\delta$  146.2) indicated that the rhamnose unit was linked to the oxygen of this carbon, and the  $J$  value (1.8 Hz) confirmed that it was  $\alpha$ -rhamnose. The correlations between  $\delta_{\text{H}}$  3.78 (3-OMe) and 151.7 (C-3), and  $\delta_{\text{H}}$  3.84 (3'-OMe) with 145.3 (C-3') suggested that there were methoxyl groups at these positions. A relative *trans*-configuration between H-7 and H-8 was indicated by the chemical shift of H-7 and  $J$  value between this hydrogen and H-8 of benzofuran-type neolignans (Garcia-Munoz et al. 2006, Kim et al. 2013). Garcia-Munoz et al. (2006) found that a chemical shift for H-7 at  $\delta$  5.84 ( $J = 8.4$  Hz) indicated a *cis*-configuration while a relative upfield chemical shift ( $\delta$  5.57,  $J = 6$  Hz) indicated a *trans*-form. Thus, the observed data for H-7 of icariside E<sub>4</sub> ( $\delta$  5.55,  $J = 6$  Hz) indicated a relative *trans*-configuration.



**Fig. 1** Molecular structure of icariside E<sub>4</sub> isolated from *Tabebuia roseo-alba*

### Acetic acid-induced writhing

The intense nociceptive behavior in mice observed 10 min after i.p. injection of acetic acid was inhibited by pre-treatment with indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), which was used as positive control (Fig. 2). Intraperitoneal injection of 100 mg/kg of crude methanol bark extract significantly reduced the number of abdominal writhes by 79 % [F (4,18) = 14.37,  $P < 0.001$ ; Fig. 2a]. However, treatment with 100 mg/kg of crude leaf or stem extracts did not interfere with the nociceptive behavior of the animals [F (2,11) = 2.814,  $P > 0.05$ ; Fig. 2a].

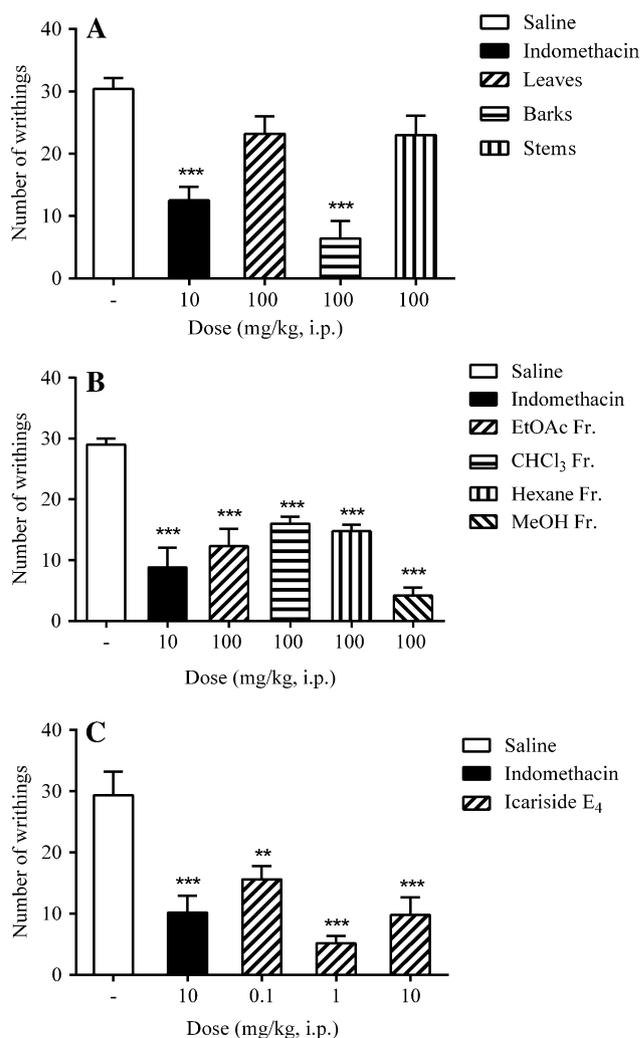
Similarly, the ethyl acetate, chloroform, hexane, and methanol fractions (100 mg/kg) obtained from crude methanol bark extract significantly reduced [F (5,18) = 16.57,  $P < 0.001$ ] the number of abdominal writhes by 57.4, 44.8, 49.1, and 85.5 %, respectively (Fig. 2b). These effects were not significantly different from the effect of 10 mg/kg of indomethacin (69.6 %; Fig. 2b).

As shown in Fig. 2c, pre-treatment with 0.1, 1, and 10 mg/kg of icariside E<sub>4</sub> obtained from column chromatographic separation of the aqueous/methanol fraction, significantly reduced [F (4,20) = 12.18,  $P < 0.001$ ] the number of abdominal writhes by 46.9, 82.3 and 66.6 %, respectively.

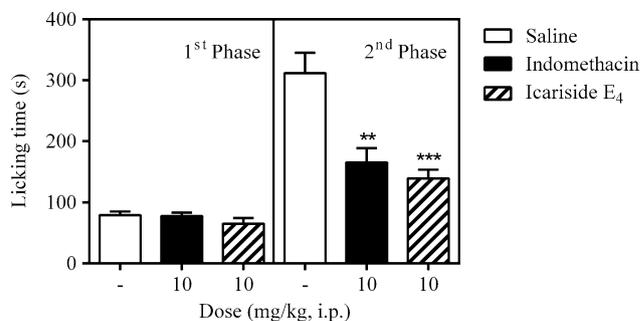
### Formalin-induced nociception

In saline-treated control group, injection of formalin (2.5 %) evoked immediate nociceptive behavior that lasted for 5 min (1st phase response). Fifteen minutes after the formalin injection, the nociceptive behavior associated with the 2nd phase was evaluated and lasted for approximately 15 min (Fig. 3).

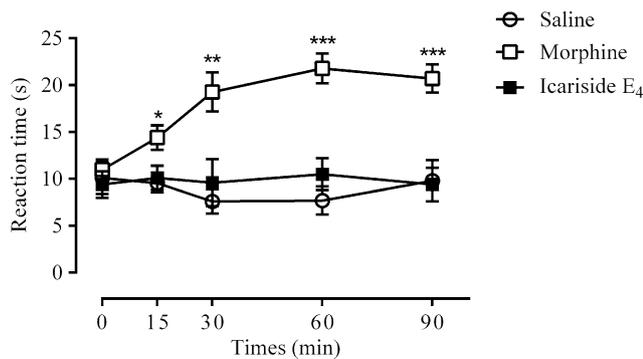
As shown in Fig. 3, treatment with 10 mg/kg of icariside E<sub>4</sub> did not inhibit the first phase of formalin-induced nociception [F (4,12) = 1.171,  $P > 0.05$ ; 1st phase panel]. However, in the 2nd phase, treatment with 10 mg/kg of icariside E<sub>4</sub> significantly reduced licking time by 55.2 % [F



**Fig. 2** Effects of crude extract from *T. roseo-alba* **a**, extract fractions obtained from bark **b**, and icariside E<sub>4</sub> isolated from the methanol fraction **c** in the acetic acid-induced writhing test in mice. *Double asterisks* indicates  $P < 0.01$  and *triple asterisks* indicates  $P < 0.001$  as compared to control values (one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $n = 6$ )



**Fig. 3** Effect of icariside E<sub>4</sub> treatment on formalin-induced nociception. The licking time was determined during the first 5 min (1st phase), and 15–30 min (2nd phase) after injection of 2.5 % formalin in mice. *Double asterisks* indicates  $P < 0.01$  and *triple asterisks* indicates  $P < 0.001$  as compared to control values (one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $n = 6$ )



**Fig. 4** Effect of icariside E<sub>4</sub> treatment on nociceptive behavior induced by a thermal stimulus (hot plate). Reaction times were measured 0, 15, 30, 60, and 90 min after i.p. administration of saline, icariside E<sub>4</sub> (10 mg/kg), or morphine (5 mg/kg), with a cut-off time of 30 s. Asterisk indicates  $P < 0.05$ , double asterisks indicates  $P < 0.01$ , and triple asterisks indicates  $P < 0.001$  as compared to control values (one-way ANOVA, Tukey's post hoc test,  $n = 6$ )

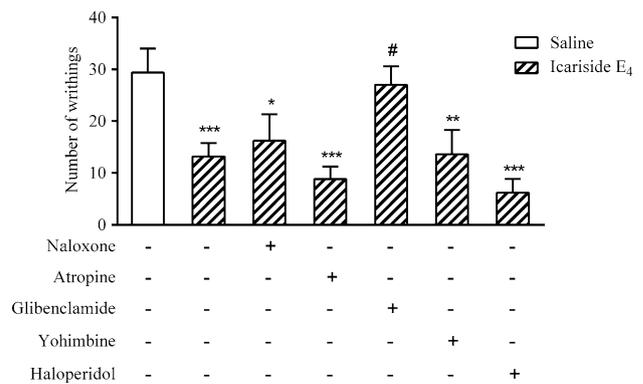
(4,12) = 14.06,  $P < 0.001$ ; Fig. 3, 2nd phase panel]. Similarly, indomethacin (10 mg/kg, i.p.) significantly inhibited the second phase (46.8 %), but not the first phase (Fig. 3).

#### Hot-plate test

Pre-treatment with icariside E<sub>4</sub> (10 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) did not alter the thermal withdrawal threshold within 90 min of observation as compared with mice treated with saline [F (4,12) = 1.058,  $P > 0.05$ ; Fig. 4]. In contrast, treatment with the opioid agonist morphine (10 mg/kg, i.p.) significantly increased the reaction time for paw withdrawal in animals subjected to thermal stimulation [F (4,12) = 14.42,  $P < 0.001$ ; Fig. 4].

#### Investigation of the mechanism of action of the extract

To study the mechanisms underlying the antinociceptive activity of icariside E<sub>4</sub>, the effects of naloxone, atropine, glibenclamide, yohimbine, and haloperidol on acetic acid-induced writhing were examined. As shown in Fig. 5, only pre-treatment with 10 mg/kg of glibenclamide, an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel inhibitor, reversed [F (2,15) = 10.53,  $P < 0.001$ ] the antinociceptive effect of 10 mg/kg of icariside E<sub>4</sub> [F (2,15) = 10.23,  $P < 0.001$ ]. Pre-treatment with naloxone [F (2,12) = 0.407,  $P > 0.05$ ], atropine [F (2,12) = 0.656,  $P > 0.05$ ], yohimbine [F (2,15) = 0.525,  $P > 0.05$ ], and haloperidol [F (2,12) = 0.509,  $P > 0.05$ ] did not cause any significant changes in the number of abdominal constrictions induced by acetic acid in mice (data not shown).



**Fig. 5** Effect of naloxone, atropine, glibenclamide, yohimbine, and haloperidol on the antinociceptive effect of icariside E<sub>4</sub>. Naloxone (5 mg/kg), atropine (2 mg/kg), glibenclamide (10 mg/kg), yohimbine (1 mg/kg), or haloperidol (1 mg/kg) was administered i.p. 10 min before administration of vehicle or icariside E<sub>4</sub> (10 mg/kg i.p.). The vertical bars denote the standard error of the mean. Under the graph, the plus and minus signs indicate the presence or absence of the respective treatment. Asterisk indicates  $P < 0.05$ , double asterisks indicates  $P < 0.01$ , and triple asterisks indicates  $P < 0.001$  as compared to the saline-treated group. Ash indicates  $P < 0.05$  as compared to the icariside E<sub>4</sub>-treated group (two-way ANOVA, Bonferroni post hoc test,  $n = 6$ )

#### Discussion

In this study, crude methanol extract from *T. roseo-alba* bark and the active compound icariside E<sub>4</sub> were evaluated in experimental models of nociception in mice. Even though the *Tabebuia* genus has an important pharmacological profile, this is the first demonstration that *T. roseo-alba* extract and purified icariside E<sub>4</sub> have antinociceptive activity.

Crude *T. roseo-alba* bark methanol extract had a significant antinociceptive effect. The hydroalcoholic fraction of the extract was subjected to successive fractionation resulting in the isolation of a lignan glycoside identified as *trans*-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 4-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (icariside E<sub>4</sub>), which was directly compared with an authentic sample and published NMR spectral data (Miyase et al. 1989; Woo et al. 2011). Lignan glycosides, like icariside, have been identified in other species of the genus *Tabebuia* and exhibited relevant biological properties (Warashina et al. 2005; Kim et al. 2013). Icariside E<sub>4</sub> was identified in other species, such as *Viburnum erosum*, and exhibited anti-inflammatory activity and potent neuroprotective action (Warashina et al. 2004; In et al. 2014). Our results showed that *T. roseo-alba* bark extract and purified icariside E<sub>4</sub> had significant antinociceptive activity.

In this study, treatment with the hydroalcoholic fraction obtained *T. roseo-alba* crude bark extract significantly reduced the number of acetic acid-induced abdominal constrictions as compared to treatment with leaf or stem

extracts. It is important to note that the ethyl acetate, chloroform, and hexane fractions of the bark extract, which also showed significant antinociceptive activity, are probably sources of other bioactive compounds. We are currently conducting studies to identify the compounds from these fractions that were responsible for antinociceptive responses.

Icariside E<sub>4</sub> was evaluated in the acetic acid-induced abdominal constriction test and had a similar antinociceptive effect as compared to indomethacin. These results indicated that icariside E<sub>4</sub> might be a bioactive compound that was involved in the antinociceptive effect of the *T. roseo-alba* bark extract. Even though acetic acid-induced abdominal writhing is not a specific pain model, it is a very sensitive method for screening the antinociceptive effects of compounds and shows a good correlation between the determined 50 % effective dose values and analgesic doses in humans (Dirig et al. 1998). Acetic acid-induced nociceptive behavior has generally been associated with an increased level of eicosanoids in peritoneal fluids as well as with the release of many inflammatory mediators, such as bradykinin and tumor necrosis factor- $\alpha$ , leading to excitation of the primary afferent nociceptors entering the dorsal horn of the central nervous system (Ahmed et al. 2006; Gomez et al. 2011). Therefore, our results suggested that icariside E<sub>4</sub>-dependent inhibition of these mediators could interfere with signal transduction in primary afferent nociceptors. However, the results of the writhing test alone were not sufficient to ascertain whether the antinociceptive activity was due to a central or peripheral effect.

The formalin-induced nociceptive behavior test can discriminate between central and/or peripheral components of pain. It has been reported that formalin-induced nociceptive behavior involves biphasic neurogenic and inflammatory nociception associated with the release of substance P and serotonin, histamine, bradykinin, and prostaglandins, respectively (Tjolsen et al. 1992; Woolf et al. 2004). Central analgesics, such as narcotics, inhibit both phases, while peripherally acting drugs, such as steroids and NSAIDs suppress mainly the late phase (Park et al. 2013). In this study, the antinociceptive effect of icariside E<sub>4</sub> was also confirmed by the results of the formalin test. However, the icariside E<sub>4</sub>-induced antinociceptive effect occurred only in the second phase of the formalin test. Thus, these results suggested that the mechanism of icariside E<sub>4</sub>-mediated antinociception was similar to that of peripheral analgesics drugs. Furthermore, the lack of activity in the thermal test confirmed that icariside E<sub>4</sub> did not have a central antinociceptive effect, since this test is predominantly a spinal reflex and it is considered selective for centrally acting analgesic compounds (Ye et al. 2013). Thus, the results of the acetic acid,

formalin, and hot plate tests suggested a peripheral antinociceptive response for icariside E<sub>4</sub>.

To confirm that icariside E<sub>4</sub> acted at the peripheral level, the effect of different receptor antagonists was examined in the acetic acid-induced writhing test. Different mechanisms are involved in the acetic acid-induced nociceptive response. In this study, the effect of icariside E<sub>4</sub> was investigated in the presence of naloxone, atropine, glibenclamide, yohimbine, and haloperidol. Our results demonstrated that only glibenclamide, an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker, was able to block the antinociceptive activity of icariside E<sub>4</sub>. The activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels was implicated in changes in membrane hyperpolarization and it reduced neuronal depolarization and action potential transmission thereby inducing an analgesic effect (Rodrigues and Duarte 2000; Ocana et al. 2004). In agreement with our findings, previous reports demonstrated that glibenclamide was able to block the peripheral antinociceptive activity of NSAIDs in rodents (Ortiz et al. 2002; Alves et al. 2004), suggesting a possible role for ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in peripheral antinociceptive effects.

In conclusion, these results indicated that *T. roseo-alba* was a good source of compounds with pharmacological activities including pain inhibition. This is the first demonstration that icariside E<sub>4</sub> is one of the active components in *T. roseo-alba*, and that it is responsible for its antinociceptive activity. In addition, our results indicated that the mechanism of action of icariside E<sub>4</sub> might involve ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Thus, *T. roseo-alba* could be a good candidate for further development as a new phytotherapeutic agent.

**Acknowledgments** This project was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Programa de Cooperação Acadêmica/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD/CAPES) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) (Brazil).

## References

- Abreul, M.B., A. Temraz, A. Vassalo, A. Braca, and N. Tommasi. 2014. Phenolic glycoside from *Tabebuia agentea* and *Catalpa bignonioides*. *Phytochemistry Letters* 7: 85–88.
- Ahmed, F., M.H. Hossain, A.A. Rahman, and I.Z. Shahid. 2006. Antinociceptive and sedative effects of the bark of *Cerbera odollam* Gaertn. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 6: 344–348.
- Alves, D.P., M.A. Tatsuo, R. Leite, and I.D. Duarte. 2004. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels activation. *Life Sciences* 74: 2577–2591.
- De Barros, B.S., J.P. Da Silva, J.N. De Souza Ferro, I.K. Agra, F. De Almeida Brito, E.D. Albuquerque, L.C. Caetano, and E. Barreto. 2011. Methanol extract from mycelium of endophytic fungus *Rhizoctonia* sp. induces antinociceptive and anti-inflammatory activities in mice. *Journal of Natural Medicines* 65: 526–531.

- De Oliveira, A.M., L.M. Conserva, J.N. De Souza, F. De Almeida, R.P. Lyra Lemos, and E. Barreto. 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of octacosanol from the leaves of *Sabicea grisea* var. *grisea* in mice. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 1598–1611.
- Degan, P., I.B. de Aguiar, R. Sader, D. Percin, and L.R. Pinto. 2001. The influence of drying methods on the conservation of *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. seeds. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 5(3): 492–496.
- Dirig, D.M., P.C. Isakson, and T.L. Yaksh. 1998. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 285: 1031–1038.
- Ferro, J.N.D., J.P. Da Silva, L.M. Conserva, and E. Barreto. 2013. Leaf extract from *Clusia nemorosa* induces an antinociceptive effect in mice via a mechanism that is adrenergic systems dependent. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11: 385–390.
- Gaetti-Jardim Jr, E., L.F. Landucci, E.C. Gaetti-Jardim, J. Sangalli, and F.R.N. Souza. 2009. Inhibitory activity of extracts of the Brazilian Cerrado on anaerobic microorganisms and associated with nosocomial infections. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 13: 43–52.
- Garcia-Munoz, S., A.M. Corral, L.J. Gonzalez, C.L. Sánchez, A. Rosales, M.M. Dorado, and I.R. Garcia. 2006. Synthesis of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol and derivatives through intramolecular C-H insertion. *Tetrahedron Letters* 62: 12182–12190.
- Gomez, R., E.D. Por, K.A. Berg, W.P. Clarke, M.J. Glucksman, and N.A. Jeske. 2011. Metallopeptidase inhibition potentiates bradykinin-induced hyperalgesia. *Pain* 152: 1548–1554.
- In, S.J., K.H. Seo, N.Y. Song, D.S. Lee, Y.C. Kim, and N.I. Beak. 2014. Lignans and neolignans from the stems of *Viburnum erosum* and their neuroprotective and anti-inflammatory activity. *Archives of pharmacol research*. doi:10.1007/s12272-014-0358-9.
- Iorizzi, M., V. Lanzotti, S. De Marino, F. Zollo, M. Blanco-Molina, A. Macho, and E. Munoz. 2001. New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 2022–2029.
- Kim, C.S., O.W. Kwon, S.Y. Kim, and K.R. Lee. 2013. Bioactive lignans from the trunk of *Abies holophylla*. *Journal of Natural Products* 76: 2131–2135.
- Miyase, T., A. Ueno, N. Takizawa, H. Kobayashi, and H. Oguchi. 1989. Ionone and lignan glycosides from *Epimedium diphyllum*. *Phytochemistry* 28: 3483–3485.
- Mukherjee, T., S. Chowdhury, A. Kumar, H.K. Majumder, P. Jaisankar, and S. Mukhopadhyay. 2012. Saracoside: a new lignan glycoside from *Saraca indica*, a potential inhibitor of DNA topoisomerase IB. *Natural Products Communications* 7: 767–769.
- Ocana, M., C.M. Cendan, E.J. Cobos, J.M. Entrena, and J.M. Baeyens. 2004. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. *European Journal of Pharmacology* 500: 203–219.
- Ortiz, M.I., J.E. Torres-Lopez, G. Castaneda-Hernandez, R. Rosas, G.C. Vidal-Cantu, and V. Granados-Soto. 2002. Pharmacological evidence for the activation of K(+) channels by diclofenac. *European Journal of Pharmacology* 438: 85–91.
- Park, S.H., Y.B. Sim, Y.J. Kang, S.S. Kim, C.H. Kim, S.J. Kim, and H.W. Suh. 2013. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of orally administered oleanolic acid in the mouse. *Archives of Pharmacol Research* 36: 905–911.
- Rodrigues, A.R., and I.D. Duarte. 2000. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. *British Journal of Pharmacology* 129: 110–114.
- Sichaem, J., S. Kaennakam, P. Siripong, and S. Tip-Pyang. 2012. Tabebuialdehydes A-C, cyclopentene dialdehyde derivatives from the roots of *Tabebuia rosea*. *Fitoterapia* 83: 1456–1459.
- Tjolsen, A., O.G. Berge, S. Hunskaar, J.H. Rosland, and K. Hole. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5–17.
- Warashina, T., Y. Nagatani, and T. Noro. 2004. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 65: 2003–2011.
- Warashina, T., Y. Nagatani, and T. Noro. 2005. Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 66: 589–597.
- Woo, K.W., S.U. Choi, J.C. Park, and K.R. Lee. 2011. A new lignan glycoside from *Juniperus rigida*. *Archives of Pharmacol Research* 34: 2043–2049.
- Woolf, C.J. 2004. Pain: Moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine* 140(6): 441–451.
- Ye, Y., M. Li, and X. Chen. 2013. Purification and characterization of a novel antinociceptive peptide from venom of *Agkistrodon halys* Pallas. *Archives of Pharmacol Research* 36: 448–456.