

UFAL

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

Perfil Metabolômico e Farmacológico da *Mansoa hirsuta* D.C. (BIGNONIACEAE) por RMN¹H.

Daniel de Melo Silva

Universidade Federal de Alagoas

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



Universidade Federal de Alagoas

Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



IQB

Perfil Metabolômico e Farmacológico da *Mansoa hirsuta* D.C. (BIGNONIACEAE)

Daniel de Melo Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Co-orientadores: Robert Verpoorte e Young Hae Choi

Maceió – Alagoas
Agosto de 2009

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S586p

Silva, Daniel de Melo.

Perfil metabólico e farmacológico da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae) / Daniel de Melo Silva. – 2010.

xviii, 133 f. : il. tabs., grafs.

Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.

Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2010.

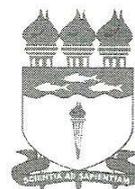
Bibliografia: f. 124-133.

1. *Mansoa hirsuta*. 2. Fitoquímica. 3. Imunomodulação. 4. Metabólico
I. Título.

CDU: 547.597



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



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

Membros da Comissão Julgadora de Defesa de Tese do Doutorando Daniel de Melo Silva, intitulada: "**Perfil Metabolômico e Farmacológico da *Mansoa hirsuta* D.C. (*Bignoniaceae*) por RMN¹H**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 06 de agosto de 2010, às 9h na Sala de Aulas do PPGQB/ UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Tanos Celmar Costa França
IME/RJ

Profª. Drª. Teresinha Gonçalves da Silva
Depto. de Antibiótico/UFPE

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

Prof. Dr. Renato Santos Rodarte
ICBS/UFAL

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

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) do Governo Brasileiro por ter fomentado a minha pesquisa e por ter fornecido uma bolsa de mestrado;

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

Aos Meus Professores coorientadores da Universitite Leiden: Robert Verport e Young Hae Choi que me receberam de portas abertas por duas vezes e contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

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

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

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

Ao Instituto do Milênio do Semi-Árido pelo material vegetal fornecido pelo projeto IMSEAR;

Aos Laboratórios de Pesquisa em Recursos Naturais e de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas onde foram desenvolvidos os experimentos e análises;

Ao Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela avaliação da atividade farmacológica;

Aos Prof. Dennis Imbróisi, pelo apoio e amizade;

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

A minha mãe, Telma de Melo Silva, por ter sempre acreditado em mim;

Aos amigos de laboratório: Ana, Milena, Claudia, Luciana, Dani, Mariana, Edilsão, Daniel, Cenira, Emilia e demais colegas, pela amizade, pelas trocas de conhecimento e experiências durante nossa convivência;

A Brancilene pelo exemplo de vida, pois é uma pessoa que sempre me espelhei para alcançar os meus objetivos.

Minha Tia Ligia e Tio Arthur por terem me acolhido como filho nas duas etapas do trabalho realizado na Holanda;

Aos Meus amigos da Leiden Univesitie- Holanda: Tony Palama, Andréa Loube, Justin, Quin Liu e Naira Quintana, por me fazerem sentir em casa e pelas trocas de conhecimento;

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

***Dedico este trabalho:* A Edna Beatriz Rocha Sampaio minha irmã, mãe e mestre, que enquanto esteve na terra fez-me privilegiado em receber seus ensinamentos, no qual usei e uso para conseguir vencer todas as etapas da minha vida, sejam elas acadêmicas, profissionais ou pessoais. E ao Meu pai Walmir dos Santos Silva também falecido que sempre acreditou e investiu em meu potencial. De onde estiverem se orgulham em ver hoje eu alcançar o grau de Doutor em ciências, especialidade Fitoquímica .**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FLUXOGRAMAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. Considerações gerais	01
1.1. INTRODUÇÃO	02
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
1.2.1. Espécie botânica	06
1.2.2. Doenças negligenciadas	08
1.2.3. As imunopatologias	11
1.2.4. Metabolômica e análise multivariada	14
1.2.4.1. As “Omicas”	14
1.2.4.2. Metabolômica	15
1.2.4.3. Quimiometria	16
1.2.4.4. Análise exploratória de dados	17
1.2.4.5. Análise de agrupamentos hierárquicos – HCA	18
1.2.4.6. Análise de componentes principais – PCA	19
1.2.4.7. Mínimos quadrados parciais discriminados ou PLS-DA	20
1.2.4.8. Metabolômica: aplicações em plantas	21
1.3. OBJETIVOS	23
1.3.1. Objetivos gerais	23
1.3.2. Objetivos específicos	23
2. EXPERIMENTAL	24
2.1. REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS	25
2.2. TRATAMENTO DA PLANTA	26

2.2.1. Escolha da Planta.....	26
2.2.2. Coleta e Descrição da Planta.....	26
2.2.2.1. Fitoquímica clássica.....	26
2.2.2.2. Metabolômica.....	27
2.2.3. Secagem e moagem das folhas.....	28
2.2.4. Obtenção do Extrato.....	28
2.2.4.1. Fitoquímica clássica.....	28
2.2.4.2. Metabolômica.....	29
2.3. FRACIONAMENTO EM FASE REVERSA COM CARVÃO ATIVO DO EXTRATO ETANÓLICO DA <i>M. hirsuta</i>	29
2.4. HIDRÓLISE.....	33
2.5. METILAÇÃO COM DIAZOMETANO.....	34
2.5.1. Preparação do Diazometano (CH ₂ N ₂)	34
2.5.2. Metilação com Diazometano.....	35
2.6. SILILAÇÃO COM BSTFA.....	35
2.7. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM).....	35
2.8. EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE VOLÁTEIS.....	36
2.9. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	37
2.10. ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	37
2.10.1. Animais	37
2.10.2. Avaliação da citotoxicidade.....	37
2.10.3. Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania amazonensis</i>	38
2.10.4. Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	39
2.10.5. Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico.....	39
2.10.6. Avaliação da inibição de linfoproliferação.....	40
2.11. Ressonância Magnética Nuclear.....	40
2.11.1. Análise dos dados.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1. TRATAMENTO DA PLANTA.....	44
3.1.1. Coleta e extrato da Planta.....	44
3.1.2. Partição em fase reversa em carvão ativo do extrato etanólico das folhas da <i>M. hirsuta</i>	44

3.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATO ETANÓLICO DA <i>M. hirsuta</i> D.C.....	45
3.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	47
3.3.1. Atividade citotóxica das frações das folhas de <i>M. hirsuta</i>	47
3.3.2. Atividade contra formas promastigotas de <i>Leshmania amazonensis</i> pelas frações das folhas de <i>M. hirsuta</i>	47
3.3.3. Atividade contra formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> pelas frações das folhas de <i>M. hirsuta</i>	48
3.3.4. Inibição da produção de óxido nítrico pelas frações das folhas de <i>M. hirsuta</i>	48
3.3.5. Inibição da linfoproliferação das frações das partições das folhas de <i>M. hirsuta</i>	49
3.3.6. Atividades biológicas da fração acetato.....	49
3.3.7. Atividades biológicas de MHFC1.....	50
3.4. CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS.....	51
3.4.1. Análise dos voláteis.....	51
3.4.2. Análise da subfração oleosa obtida da fração acetato de etila.....	51
3.4.3. Análise do etanol recuperado do extrato bruto.....	53
3.5. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	56
3.5.1. MHFA1	56
3.5.2. MHFA2.....	78
3.5.3. MHFC1a e MHFC1b.....	98
3.5.4. MHFC2.....	101
3.6. METABOLÔMICA DA <i>M. hirsuta</i>.....	104
4. Conclusões.....	121
5. Referências bibliográficas.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Artigos publicados relacionado à metabolômica de 1975 até setembro de 2005.	16
Figura 2.1. Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas utilizado na identificação dos voláteis.	26
Figur 2.2. Mapa com ilustração dos municípios os quais foram coletados os espécimes de <i>Mansoa Hirsuta</i> D.C..	27
Figura 2.3. Foto dos espécimes de <i>Mansoa Hirsuta</i> nas regiões coletadas.	28
Figura 2.4. Aparelho de klavenger utilizado na extração dos voláteis de <i>M. hirsuta</i> .	36
Figura 3.1. Cromatogramas da subfração oleosa obtida da fração acetato de etila (A) e fragmentogramas dos ésteres etílicos dos ácidos palmítico (B), esteárico (C), linoléico (D) e α -linolênico (E).	53
Figura 3.2. Cromatograma do extrato etanólico bruto (A) e fragmentogramas dos dissulfetos dialila (B) e trissulfeto dialila (C).	54
Figura 3.3. Mecanismo de fragmentação proposto para o dissulfeto de dialila (A) e trissulfeto de dialila (B).	55
Figura 3.4. Espectro da Substância MHFA1 na Região do Infravermelho.	57
Figura 3.5. Espectro de RMN H^1 de MHFA1 com Expansão, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3:1	58
Figura 3.6. Expansão do Espectro de RMN H^1 de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	59
Figura 3.7. Espectro de RMN C^{13} de MHFA1 com Expansão, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	60
Figura 3.8. Expansão do Espectro de RMN C^{13} de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	60
Figura 3.9. Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	61
Figura 3.10. Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	61
Figura 3.11. Expansão do Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1.	62
Figura 3.12. Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1.	63
Figura 3.13. Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1.	63
Figura 3.14 Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	65
Figura 3.15. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1.	65
Figura 3.16. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	66
Figura 3.17. Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1.	66
Figura 3.18. Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	67
Figura 3.19. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3.1	67

Figura 3.20. Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA1, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	68
Figura 3.21. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA1, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	68
Figura 3.22. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA1, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	69
Figura 3.23. Montagem Estrutural da MHFA1.	70
Figura 3.24. Correlações Observadas no Espectro HMBC de MHFA1. (a) ²⁻⁴ J _{C,H} ; (b) ² J _{C,H} ; (c) ³ J _{C,H} ; (d) ⁴ J _{C,H} .	71
Figura 3.25. Correlações Observadas no Espectro COSY de MHFA1.	72
Figura 3.26. Correlações Observadas no Espectro NOESY de MHFA1.	72
Figura 3.27. Estrutura do Ácido Oleanólico (MHFA1).	74
Figura 3.28. Espectro de Massas do Ácido Oleanólico (MHFA1).	77
Figura 3.29. Fragmentação do Ácido Oleanólico do Tipo Retro-Diels-Alder.	77
Figura 3.30. Espectro da Substância MHFA2 na Região do Infravermelho.	78
Figura 3.31. Espectro de RMN H ¹ de MHFA2 com Expansão, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1	79
Figura 3.32. Expansão do Espectro de RMN H ¹ de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1	80
Figura 3.33. Espectro de RMN C ¹³ de MHFA2 com Expansão, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1	81
Figura 3.34. Expansão do Espectro de RMN C ¹³ de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1	81
Figura 3.35. Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	82
Figura 3.36. Expansão do Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	82
Figura 3.37. Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	83
Figura 3.38. Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	84
Figura 3.39. Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	85
Figura 3.40. Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	86
Figura 3.41. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	87
Figura 3.42. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	87
Figura 3.43. Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	88
Figura 3.44. Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	89
Figura 3.45. Expansão do Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	89
Figura 3.46. Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1.	90
Figura 3.47. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA2, Solvente CDCl ₃ /CD ₃ OD 3.1	90
Figura 3.48. Montagem Estrutural da MHFA2.	91

Figura 3.49. Correlações Observadas no Espectro HMBC de MHFA2. (a) 2-4JC,H; (b) 2JC,H; (c) 3JC,H; (d) 4JC,H.	92
Figura 3.50. Correlações Observadas no Espectro COSY de MHFA2.	93
Figura 3.51. Correlações Observadas no Espectro NOESY de MHFA2.	93
Figura 3.52. Estrutura do ácido ursólico (MHFA2).	96
Figura 3.53. Cromatograma dos compostos β -sitosterol e estigmasterol e espectro de massas.	100
Figura 3.54. Principais fragmentos no espectrômetro de massas do β -sitosterol (MHFC1a) e estigmasterol (MHFC1b).	101
Figura 3.55. Fragmentograma da amostra MHFC2.	103
Figura 3.56. Principais fragmentos no espectrômetro de massas do lupeol (MHFC2) entre parênteses estão às intensidades relativas.	103
Figura 3.57. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo PCA. \blacktriangle 1: Campo Alegre de Lourdes, \blacktriangle 2: Gentio de Ouro, \blacktriangle 3: Morro do chapéu, \blacktriangle 4: Boninal e \blacktriangle 5: Caetité.	105
Figura 3.58. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo de PLS-DA. \blacksquare 1: Campo Alegre de Lourdes, \bullet 2: Gentio de Ouro, \blacklozenge 3: Morro do chapéu, \blackstar 4: Boninal e \blacktriangle 5: Caetité.	106
Figura 3.59. Espectro de ^1H RMN de um dos extratos brutos de <i>Mansoa hirsuta</i> .	107
Figura 3.60. Distribuição e agrupamento dos sinais de ^1H RMN para os dois componentes principais no modelo de PLS-DA.	108
Figura 3.61. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional de <i>M. hirsuta</i> na região δ 0-1.6 ppm característicos de triterpenos e esteróides.	109
Figura 3.62. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional de <i>M. hirsuta</i> na região δ 2,2-4,7 ppm característicos de triterpenos e esteróides.	109
Figura 3.63. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional de <i>M. hirsuta</i> na região δ 0-1.6 ppm contendo simpletos característico de esteróides como estigmasterol e β -sitosterol.	110
Figura 3.64. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional da <i>M. hirsuta</i> de Boninal na região de aromáticos característica de flavonóides.	111
Figura 3.65. Estrutura da tangeritina, uma metoxiflavona 5,6,7,8-substituída no anel A e 1', 4'-dissubstituída no anel B.	111
Figura 3.66. Estrutura geral de uma protoantocianidina (RAWAT <i>et al.</i> , 1999).	112
Figura 3.67. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional da <i>M. hirsuta</i> de Boninal na região de aromáticos característica de flavonóides.	112
Figura 3.68. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo PSL-DA 3D. \bullet 1: Campo Alegre de Lourdes, \bullet 2: Gentio de Ouro, \bullet 3: Morro do chapéu, \bullet 4: Boninal e \bullet 5: Caetité.	114
Figura 3.69. Dendrograma dos resultados da PLS-DA para os espécimes de <i>M. hirsuta</i> coletados em diferentes regiões. 1 Campo Alegre de Lourdes, 2 Gentio de Ouro, 3	115

Morro do Chapéu, 4 Boninal e 5 Caitité.	
Figura 3.70. Distribuição e agrupamento dos espécimes de <i>M. hirsuta</i> de acordo com os ambientes de coleta. ♦1: Campo Alegre de Lourdes, ♦2: Gentio de Ouro, ■3: Morro do chapéu, ■4: Boninal e ■5: Caitité.	116
Figura 3.71. Distribuição e agrupamento dos sinais de ¹H RMN de acordo com o ambiente.	116
Figura 3.72. Distribuição e agrupamento dos espécimes de <i>M. hirsuta</i> de acordo com os tipos de solo. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ■2: Gentio de Ouro, ♦3: Morro do chapéu, ♦4: Boninal e ♦5: Caitité.	117
Figura 3.73. Distribuição e agrupamento dos sinais de ¹H RMN de acordo com o tipo de solo.	118
Figura 3.74. Distribuição e agrupamento dos espécimes de <i>M. hirsuta</i> de acordo com o relevo. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ■2: Gentio de Ouro, ♦3: Morro do chapéu, ♦4: Boninal e ♦5: Caitité.	119
Figura 3.75. Distribuição e agrupamento dos sinais de ¹H RMN de acordo com o relevo.	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Fracionamento Cromatográfico da Fase MHFA das folhas de <i>M. hirsuta</i> D.C.	32
Tabela 2.2.	Fracionamento Cromatográfico da Fase MHFC das folhas de <i>M. hirsuta</i> D.C.	33
Tabela 3.1.	Resultados da prospecção feita com Extratos das folhas da <i>Mansoa hirsuta</i> .	46
Tabela 3.2.	Atividades biológicas dos triterpenos pentacíclicos isolados da fração acetato de folhas de <i>M. hirsuta</i> .	50
Tabela 3.3.	Dados de RMN ^1H , ^{13}C (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a substância MHFA1. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 3:1.	76
Tabela 3.4.	Dados de RMN ^1H , ^{13}C (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a Amostra MHFA2. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 3:1.	97
Tabela 3.5.	RMN das substâncias MHFC1a e MHFC1b e do Modelo da Literatura (MACARI <i>et al.</i> , 1990) em CDCl_3 , deslocamento em δ .	99
Tabela 3.6.	RMN da substância MHF2 e do Modelo da Literatura modelo do lupeol (MAHATO E KUNDU, 1994) em CDCl_3 , deslocamento em δ .	102
Tabela 3.7.	Deslocamentos químicos característicos dos metabólitos primários selecionados de <i>M. hirsuta</i> detectados a partir da análise do PLS e espectros RMN 1D e 2D.	113
Tabela 3.8.	Resumo dos dados obtidos no estudo metabolômico da <i>M. hirsuta</i> D.C..	120

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 2.1. Fracionamento em Fase Reversa em Carvão Ativo do Extrato Etanólico da <i>M. hirsuta</i>	30
Fluxograma 2.2. Partição da fração em AcOEt da espécie <i>M. hirsuta</i> (folhas)	31
Fluxograma 2.3. Partição da fração em clorofórmio da espécie <i>M. hirsuta</i> (folhas)	32
Fluxograma 2.4. Hidrólise do Óleo Extraído da Fração Acetato	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento Químico
μL	Microlitros
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>D</i>	Dupleto
<i>Dd</i>	Duplo Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EtOH	Etanol
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantun Coherence
Hz	Hertz
IMSEAR	Instituto do Milênio do Semi-árido
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Multiplete
MeOD	Metanol Deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
MTT	Brometo de (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Nm	Nanômetro
NOE	Nuclear Overhauser Effect
OC	Onda Contínua
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Principal component analysis
PLS-DA	Partial least square discriminant analysis
PTR-MS	Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry
Rf	Rádio Frequência
RMN C^{12}	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN H^1	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
S	Simpleto
T	Tripleto
TF	Transformada de Fourier

RESUMO

A espécie *Mansoa hirsuta* (Bignoniaceae), popularmente conhecida como Cipó d'alho, é quimicamente pouco conhecida, embora seja popularmente utilizada no tratamento de muitas infecções. O presente trabalho objetivou estudar o potencial biológico dos extratos e frações obtidos das folhas de *M. hirsuta*, isolar e purificar os possíveis princípios ativos e estudar o perfil metabolômico da planta. O material vegetal foi coletado em cinco regiões diferentes do Semi-Árido nordestino e foi submetido à fitoquímica clássica e análise metabolômica. Para tanto, o extrato bruto das plantas de Gentio de Ouro foi obtido pela extração com etanol 96% e submetido a fracionamento com diferentes solventes, enquanto os voláteis foram extraídos por Clavenger. Os compostos isolados foram identificados por GC-MS e dados de RMN. O extrato e as subfrações foram submetidos a testes biológicos para esclarecer suas possíveis atividades biológicas. Os extratos brutos das plantas provenientes das cinco regiões foi submetido a análise por RMN para obtenção de espectros 1D ^1H e 2D COSY e *J*-resolvido. Os dados provenientes do RMN foram então submetidos à métodos quimiométricos (HCA, PCA e PSL-DA) com vistas a classificar as espécies de acordo com seu metaboloma. Os triterpenos pentacíclicos ácidos ursólico e oleanólico e os esteróides estigmasterol, β -sttosterol e lupeol foram isolados, juntamente com o dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila. A fração acetato de etila inibiu a produção de NO (57,92%) e a linfoproliferação (99.92%), enquanto os ácidos ursólico e oleanólico apresentaram valores de inibição maiores que 99%. A análise metabólica permitiu estabelecer que as plantas oriundas de Gentio de Ouro são ricas em triterpernos pentacíclicos, enquanto as plantas de Boninal contêm principalmente flavonóides em sua composição química. Os resultados também sugerem que as protoantocianidinas são os principais constituintes das plantas oriundas de Caetité, enquanto saponinas são encontradas na plantas de Campo Alegre de Lourdes. As plantas de Morro do Chapéu diferem daquelas das demais regiões por serem ricas em oligossacarídeos e aminoácidos.

Palavras-chave: *Mansoa hirsuta*, fitoquímica, imunomodulação, metabolômica.

ABSTRACT

Mansoa hirsuta (Bignoniaceae), popularly known as Cipo d'álho, is chemically little known, although it is popularly used in the treatment of many diseases. The present study aimed to study the biological potential of the extracts and fractions obtained from leaves of *M. hirsuta*, to isolate and purify the active principles and to study the metabolomics of the plant. Plant materials were collected in five different regions from Semi-Arid in northeastern Brazil and were submitted to classic phytochemistry and analysis of the metabolomics. For that, the brute extract of the plants of Gentio do Ouro was obtained by extraction with ethanol 96% and was submitted to partitioning with different solvents, while the volatile were extracted by Clavenger apparatus. The isolated compounds were identified by GC-MS and NMR. Extract and subfractions were submitted to biological tests to clarify their possible biological activities. The brute extracts of the plants provenientes of the five regions was submitted to NMR analysis RMN to acquire 1D ^1H and 2D COSY and *J*-resolved spectra. NMR data were submitted to chemiometry (HCA, PC and PSL-of the) to classify the species according to their metabolome. Pentacyclic triterpenes ursólico and oleanolic acids, and the steroids stigmasterol, β -sttosterol and lupeol were isolated, together with dialyl sulfide and triallyl sulfide. The ethyl acetate fraction was able to inhibit the production of NO (57.92%) and proliferation of linfocites (99.92%), while the acid ursólico and oleanolic presented inhibition values greater than 99%. Metabolic analysis allowed to establish that plants of Gentio do Ouro are rich in pentacyclic triterpens, while plants from Boninal contains mostly flavonoids in its chemical composition. The results also suggest that protoantocianidinas are the main constituents of the plants from Caetité, while saponinas are found in the plants from Campo Alegre de Lourdes. Plants of Morro do Chapéu were distinguished form the other regions for being rich in oligosaccharides and aminoacids.

Keywords: *Mansoa hirsuta*, phytochemistry, metabolomics

1. Considerações Gerais

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento de uma diversidade de doenças é tradicional há centenas de anos pela humanidade (SANDES & DI BIASI, 2000). As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras a ao papiro de Ebers que inclui referência a mais de 7.000 drogas de natureza animal e vegetal, inseridas em mais de 800 fórmulas e enumera cerca de 100 doenças (PINTO *et al.*, 2002). Ainda hoje, as plantas medicinais constituem recurso terapêutico importante.

Um em cada quatro produtos vendidos nas farmácias é fabricado a partir de materiais extraídos de plantas das florestas tropicais ou de estruturas químicas derivadas desses vegetais (SANTANA, 2002). Partindo-se da estimativa de que existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas superiores no planeta, a parcela de espécies em uso é muito pequena. Somente uma pequena parcela foi investigada fitoquimicamente e o número submetido a ensaios biológicos é ainda menor (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991; SOERJATO, 1996) e estes números não mudaram muito desde estes trabalhos.

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a ocorrer no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracterizam-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides, sendo desta época o isolamento de morfina (1806), quinina (1818) e estriquinina (1820) (PINTO *et al.*, 2002).

Somente nos Estados Unidos, em 1980, foram vendidos formalmente cerca de US\$ 8 bilhões em medicamentos derivados de plantas. Durante os anos de 1959 a 1980, os medicamentos derivados de vegetais representaram 25% de todas as prescrições médicas dispensadas nas farmácias dos Estados Unidos (SANTANA, 2002). Então se nota que países desenvolvidos investem neste tipo de recurso natural.

Cerca de 33% da população da indústria farmacêutica provém de produtos de síntese e equivale a um faturamento anual da ordem de US\$ 280 bilhões. A distribuição por origem de medicamentos mostra que 65% são preparados em

laboratórios, sendo 25% a partir de plantas e 10% a partir de microrganismos, se considerarmos o mercado de drogas anticancerígenas e antibióticos estes percentuais ficam ainda maiores: cerca de 70% foram desenvolvidas a partir de recursos naturais (SANTANA, 2002). Assim os produtos naturais formam nichos especiais.

O setor farmacêutico utiliza aproximadamente 90 espécies vegetais em suas atividades de produção de medicamentos (RATES, 2001). Dezesete das grandes indústrias farmacêuticas mundiais têm programas de pesquisa e desenvolvimento na área de recursos naturais. O grande interesse do setor em fármacos oriundos de espécies vegetais é o baixo custo em relação aos produtos sintéticos (SANTANA, 2002).

Países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a implementação da tecnologia em química fina farmacêutica ainda não ocorreu, as pesquisas em recursos naturais assumem um papel importante, uma vez que a probabilidade de se encontrar novos fármacos ativos é maior através do estudo de plantas do que nos produtos sintéticos (LAPA, 1995). O custo de desenvolver um fármaco de origem sintética pode chegar a vários milhões de dólares e levar entre 7 e 20 anos até que o produto final estável chegue ao mercado. Já para o desenvolvimento de um produto proveniente de recursos naturais prever-se um valor de 5 vezes menor (SANTANA, 2002).

A descoberta de produtos naturais bioativos constitui, portanto, não apenas uma necessidade de sua identificação própria, mas principalmente, contribui para o conhecimento de novas substâncias químicas bioativas, que podem ser usadas como matrizes para descoberta de novos fármacos (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Nesse contexto, o Brasil apresenta uma flora rica, muito dela ainda não explorada quimicamente com vistas a obtenção de produtos naturais bioativos, sendo que as espécies vegetais estão distribuídas nas várias regiões geográficas. Entre estas podemos destacar a região semi-árida do nordeste. O termo Semi-árido e Caatinga são frequentemente utilizados de maneira equivocada. Caatinga é empregada para um tipo de vegetação, enquanto o Semi-Árido pode ter uma conotação geográfica ou política, a primeira relacionada à região onde predomina o clima Semi-Árido e a segunda à região compreendida pelo polígono das secas. Os limites da Caatinga podem ser considerados como coincidentes com os da região

Semi-Árido, porém é importante ressaltar que dentro destes limites há ambientes mais úmidos e com vegetação diferente da Caatinga. Longe de ser homogênea, a vegetação do Semi-Árido apresenta uma grande variação fisionômica e florística, relacionada à grande heterogeneidade do clima, solo e relevo. Apesar de até bem pouco tempo ser considerada como uma vegetação degradada pela utilização dos últimos cinco séculos e baixo nível de endemismos, verifica-se que mesmo apresentando áreas muito antropizadas e com graus de desertificação acentuada, ainda apresenta flora muito rica, desconhecida e com muitos endemismos, representados por cerca de vinte gêneros e mais de trezentas espécies (LUCCHESI, 2006).

O Brasil concentra parte significativa da biodiversidade mundial, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, constituindo uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos (SIMÕES *et al.*, 1999; MARINHO *et al.*, 2008). Em relação à região do Semi-Árido brasileiro falta informação básica sobre a caracterização, funcionamento e potencialidades dos seus recursos naturais o que gera um atraso científico e tecnológico em relação às outras regiões do país. O Semi-Árido brasileiro ocupa uma área de cerca de 955.000 km² e, apesar de ser cortada por um razoável sistema de rios, tem sérios problemas com os recursos hídricos, pois parte dos seus rios são temporários ocorrendo apenas no período de chuvas. De modo geral, ocorre um progressivo aumento da altitude do litoral para o Semi-Árido que se estabiliza mais ou menos em 500 metros e, paralelamente, uma redução da quantidade anual de chuvas associada a uma distribuição irregular durante o ano, onde ocorrem longos períodos sem chuvas e vários meses com chuvas. Essa paisagem geral pode ser modificada, dependendo principalmente do aumento da altitude, que pode levar ao aumento da quantidade de chuvas. Diferentemente de outras áreas semi-áridas do mundo, a do Brasil é bem populosa com mais de 20 milhões de habitantes que, devido a alguns fatores sócio-econômicos, desenvolveram uma estrutura sócio-cultural peculiar e um forte relacionamento com o uso dos recursos naturais disponíveis na região. A degradação ambiental da região do Semi-Árido resultou do uso da terra de forma inadequada e descontrolada, sendo ocasionada pela má utilização do solo que está diretamente associada à falta do conhecimento científico. Tentando mudar esse quadro é necessário conhecer os recursos naturais dessa região usando a

conservação e utilização racional desses recursos e, buscar novos medicamentos para doenças que incidem em grande parte da população (GIULIETTI, 2006).

As informações dadas pela medicina popular são de extrema importância na procura de substâncias ativas de plantas, pois dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas cuja coleta seja orientada pelo seu uso popular do que as escolhidas ao acaso. Resulta-se que cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados nas indústrias farmacêuticas foram isolados seguindo recomendações da medicina popular.

Para uma grande parte das aplicações fitoquímicas, torna-se necessária a utilização de métodos de separação, purificação e identificação dos produtos naturais presentes em plantas. Dessa forma, o desenvolvimento da fitoquímica está diretamente relacionado à utilização e ao desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas, que permitam o isolamento de compostos de interesse, normalmente presente em pequenas quantidades, concomitantemente com constituintes químicos já conhecidos e de grande ocorrência em plantas (FERRI, 1995).

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que geralmente apresentam melhores efeitos biológicos. Nesse sentido, torna-se indispensável à análise do potencial das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. Esta avaliação permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado. O fundamento básico deste procedimento consiste no fato de que toda substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo (FILHO & YUNES, 1998).

Dentre as plantas selecionadas para o estudo investigativo de atividades como tripanocida, leishmanicida, imunomoduladora e inibidora da produção de óxido nítrico pelo programa IMSEAR (Instituto Milênio do Semi-Árido) encontra-se a *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae) que é quimicamente pouco conhecida. A família Bignoniaceae é bastante estudada e apresenta resultados biologicamente relevantes, justificando assim a investigação química e farmacológica desta espécie.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Espécie botânica

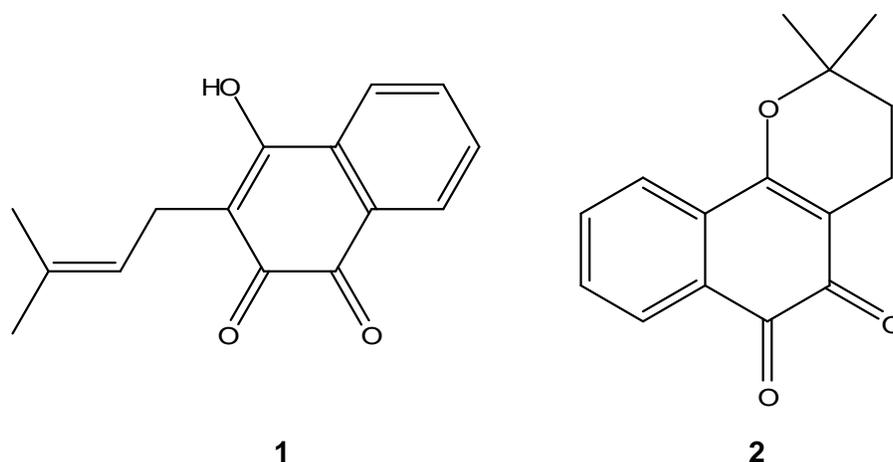
A *M. hirsuta* D.C. é uma trepadeira lenhosa (Cipó ou Liana), conhecida vulgarmente como Cipó d'alho, usada popularmente como antifúngica, anti-hipertensiva, diurética, além de ser utilizada no tratamento da diabetes e apresentar atividade antitumoral (CHAVES & REINHARD, 2003; UMBUZEIRO, 2005).

A descrição da *M. hirsuta* C.D. feita por SILVA (1999a) é a de uma liana de cerca de 4 m; ramos cilindros, com lenticelas, pubérrilos, com tricomas multicelulares e glandulosos. Suas folhas são do tipo trifolioladas com pecíolo 1,5-3 cm, folíolo 5-7 x 3,5-5,5 cm, discolores, semi-coriáceos, oblongo-elípticos, ápice agudo, margem lisa, levemente revoluta, base cortada à assimétrica, faces adaxial e abaxial pubescentes a pubéculas, com tricomas multicelulares, glandulosos e tricomas peltados; pecíolos 5-10 mm; gavinhas trifurcadas no ápice. Inflorescência tirsóide. Cálice ca. 15x8 mm, infundibuliforme, partido no ápice formando 2-3-lábios, lacínios prolongados, com tricomas peltados e tricomas multicelulares; corola com aproximadamente 6x4 cm, roxa, infundibuliforme, glabra na região mediana-inferior e pubescente na região mediano-superior, tricomas glandulosos. Cápsula linear-achatada com aproximadamente 12,5x1,5 cm.

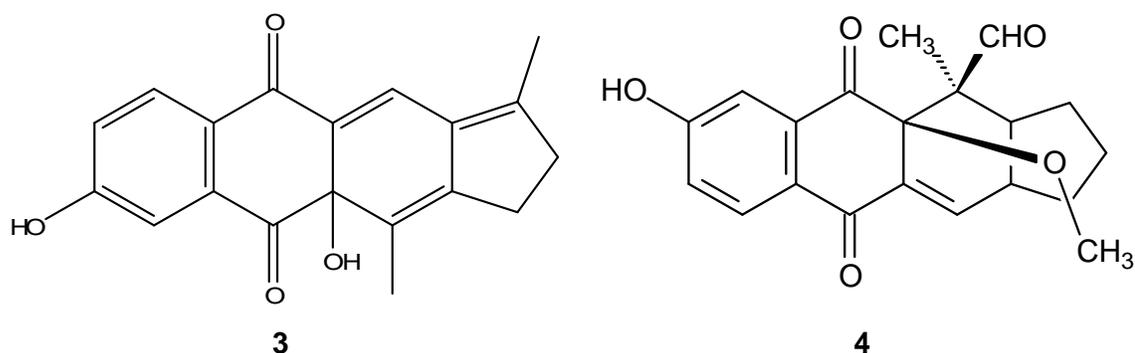
O Brasil é considerado o centro da diversidade da Bignoniaceae, uma grande família botânica que compreende aproximadamente 800 espécies que em sua maioria são encontradas em regiões neotropicais. Várias plantas desta família são utilizadas popularmente no Brasil como adstringente, contra febre e para tratamento de reumatismo, diarreia, câncer e infecções microbianas. Um grande número de efeitos biológicos tem sido experimentalmente observado incluindo atividades antitumoral, antiinflamatório e antimicrobiana, entre outros. Algumas espécies de Bignoniaceae têm sido testadas *in vitro* para a verificação de atividade antifúngica. Para a maioria dessas espécies, os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana vêm sendo isolados (LUCCHESI, 2006).

Os efeitos antifúngicos do lapachol (1) e β -lapachona (2), naftoquinonas encontradas em madeiras de espécies de *Tabebuia*, são bem conhecidos (ITOKAWA *et al.*, 1992). A resistência de fungos a antibióticos em uso clínico está aumentando e isso exige o desenvolvimento de novas drogas. O metabolismo

secundário das plantas pode fornecer uma fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Naftoquinonas, lignanas, triterpenos e flavonóides têm sido isolados das espécies da família Bignoniaceae. No entanto a composição química da maioria continua desconhecida (ROCHA *et al.*, 2004). O extrato etanólico das folhas de *M. hirsuta* mostrou efeito vasodilatador quando testado em anéis de aorta de ratos (CAMPANA *et al.*, 2009), enquanto os extratos etanólicos de *Clytostoma ramentaceum* e *M. hirsuta* mostraram ação antifúngica contra *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* (ROCHA *et al.*, 2004).



Uma nova naftoquinona, kigelinona (**3**), e uma nova lignana, kigeliol (**4**), juntos com seis constituintes conhecidos incluindo lapachol e desidroxilapachona foram isolados da madeira de *Kigelia pinnata*, que é uma planta da família Bignoniaceae nativa da África, encontrada abundantemente nos trópicos. Seu fruto é conhecido por possuir uma atividade purgativa e sua casca uma ação cicatrizante para úlceras (INOUE *et al.*, 1981).



1.2.2. Doenças negligenciadas

Estima-se que menos de 10% dos gastos globais em pesquisa em saúde são direcionados para doenças que representam cerca de 90% dos problemas de saúde globais (MOREL, 2003). Esta deficiência do mercado tem contribuído para a limitada disponibilidade de drogas para o tratamento das doenças que acometem principalmente indivíduos de países em desenvolvimento. O setor privado investe quase que exclusivamente no desenvolvimento de drogas voltadas para o tratamento de patologias comuns em países desenvolvidos (MOREL, 2003).

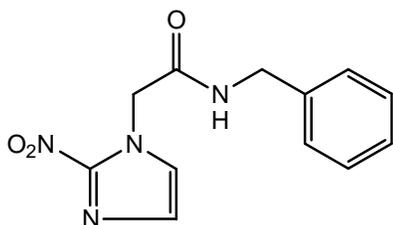
Dentre as doenças negligenciadas está a doença de Chagas, uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A maior parte dos casos de infecção em seres humanos ocorre através do contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos (triatomíneos) contaminados por *T. cruzi*. Este protozoário infecta quase 150 espécies de 24 famílias de mamíferos domésticos e selvagens, como também seres humanos (OMS, 1994).

A doença de chagas está presente em 18 países do continente americano, em duas zonas ecologicamente diferentes: a região do cone sul, onde os vetores do protozoário e humano convivem no mesmo ambiente peridomiciliar e a América Central e o México, onde os vetores estão presentes tanto em regiões povoadas quanto em áreas inabitadas (CHAGAS, 2003). As condições precárias de habitação, sobretudo em áreas rurais são os principais motivos para a expansão da doença.

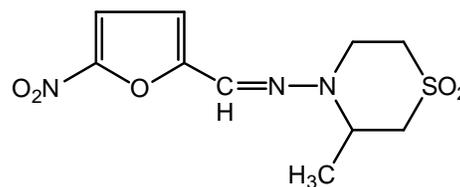
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2003), a prevalência da doença de Chagas é de 13 milhões de casos (CHAGAS, 2003). A incidência anual é de 200 mil casos, em quinze países latino-americanos. No Brasil, os dados disponíveis de 1995 indicavam que 4,2% da população rural e 1,3% da população brasileira estavam infectada pelo *T. cruzi* em (BRENER *et al.*, 2000). Por ser uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante, o custo econômico é elevado, e, como a população acometida é habitualmente de baixo nível sócio-econômico, os gastos são cobertos pelo Estado.

Atualmente, há uma droga existente no mercado para o tratamento específico, o benzonidazol (**5**), um derivado do nitroimidazol (Rochagan[®], Roche). Outra substância utilizada até recentemente é o nifurtimox (**6**), um nitrofurano (Lampit[®], Bayer 2502[®], Bayer). Ambas são eficazes somente na forma aguda ou crônica recente da doença, e ainda podem induzir efeitos colaterais tóxicos ao

paciente (URBINA *et al.*, 2002). Assim é de extrema relevância a busca de novas substâncias para o tratamento da doença de Chagas, que apresentem maior eficácia no tratamento de pacientes na fase crônica e menor toxicidade.



5

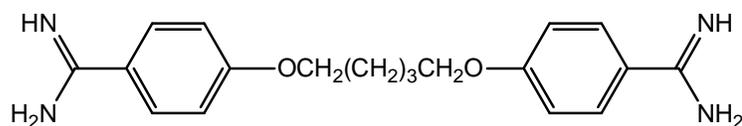


6

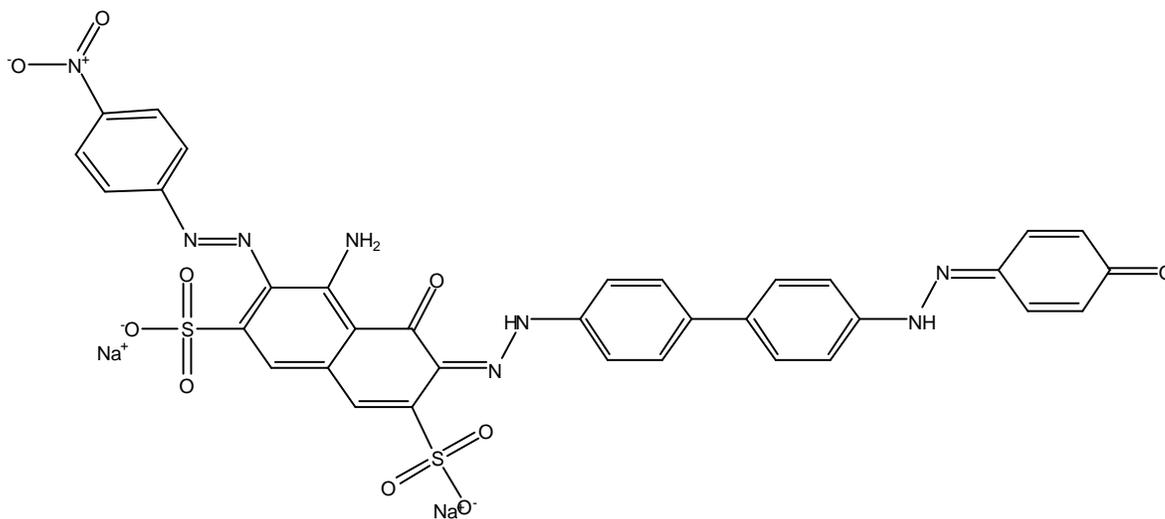
Entre as estratégias utilizadas na busca de novas drogas eficazes contra o *T. Cruzi* está a triagem de moléculas que atuam em alvos importantes da biologia do parasito. Dentre estes alvos moleculares mais utilizados estão as enzimas diidrofolato redutase (ZUCCOTTO, 2001), tripanotiona redutase (CHAN *et al.*, 2002) e cruzipaína (CAZZULO, 2001; CAZZULO, 2002). Inibidores da biossíntese de esteróides (URBINA *et al.*, 2002) e análogos mono- ou dissustituídos de poliaminas (BACCHI & YARLETT, 2002), componentes biológicos essenciais à viabilidade e sobrevivência do protozoário, também são moléculas com potencial atividade tripanocida.

Outro grande problema de saúde pública são as leishmanioses, doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (2004), estima-se que este conjunto de doenças afete mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e está presente em 88 países, sendo que, 72 são considerados como países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos (LEISH, 2002). No Brasil, durante os anos de 1984 e 1999, 37.294 novos casos de leishmaniose visceral humana foram notificados pelo Ministério da Saúde e somente no período compreendido entre 1998 e 2000 87.350 novos casos já foram registrados (LEISH, 2002). Recentemente o aumento elevado na taxa de co-infecção em pacientes HIV positivos (ALVAR *et al.*, 1997) e o desenvolvimento de resistência dos parasitos às drogas existentes têm aumentado a importância desta doença na saúde pública (LEANDRO & CAMPINO, 2003).

O tratamento das leishmanioses tem sido feito com a utilização de metais pesados, em particular os compostos antimoniais, como drogas de primeira escolha. Quando este tipo de terapia não é efetivo, outros medicamentos são usados, dentre estes a pentamidina (7) e a anfotericina B (8) lipossomais, medicamentos de administração injetável para os quais o paciente necessita de supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento devido à gravidade dos possíveis efeitos colaterais (BACAB & RODRIGUEZ, 2001). Dessa forma, a busca de novas substâncias, efetivas e seguras, para o tratamento das leishmanioses torna-se prioritária.



7

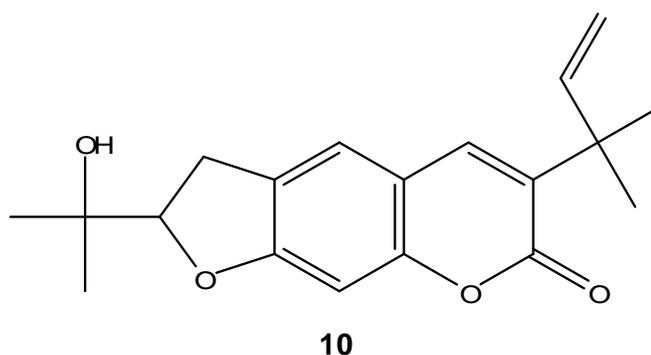
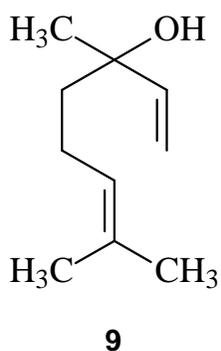


8

Uma das principais linhas de investigação de novos tratamentos para leishmanioses é a de desenvolvimento de fármacos capazes de bloquear alvos do sistema biológico do parasito vital à sobrevivência do mesmo, como por exemplo, os mecanismos que levam a síntese de ATP e que definem o estado energético do parasito. A fosforilação oxidativa é um processo essencial para preencher um nível

energético mínimo necessário a sobrevivência do parasito. Dessa forma, drogas que afetam a produção mitocondrial de ATP, tais como as licochalconas e naftoquinonas, são boas candidatas à drogas leishmanicidas. Moléculas com este mecanismo de ação diminuem os níveis de ATP intracelulares do parasito, uma vez que a glicólise é um processo ineficaz para contrabalancear o decréscimo de ATP (ORTEGA *et al.*, 2001).

Espécies vegetais podem servir como fonte de substâncias com atividade anti-protozoário. Da classe dos taninos, isolados de espécies vegetais, algumas substâncias demonstraram atividade leishmanicida, com ação sobre formas amastigotas da espécie *L. lonovani* (KIDERLEN *et al.*, 2001). Extratos de vegetais ricos em substâncias polifenólicas inibiram o crescimento de formas amastigotas e promastigotas de parasitos da espécie *L. amazonensis* (MENDONÇA-FILHO *et al.*, 2004). O óleo essencial da espécie *Cróton cajucara*, rico em linalol (**9**), mostrou-se ativo, inibindo o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (SOCORRO *et al.*, 2003). Extratos de espécies pertencentes à família Rutaceae apresentaram atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (MAFEZOLI *et al.*, 2000). A chalepina (**10**), substância isolada da espécie vegetal *Pilocarpus spicatus*, exibiu atividade tripanocida (PAVÃO *et al.*, 2002). Dessa forma, diversas substâncias têm sido identificadas e suas atividades demonstradas contra protozoários do gênero *Leishmania* e da espécie *T. cruzi*.



1.2.3. As imunopatologias

As doenças mediadas pelo sistema imune são problemas de saúde global, estão em crescimento em proporções epidêmicas (KRENSKY *et al.*, 2001) e

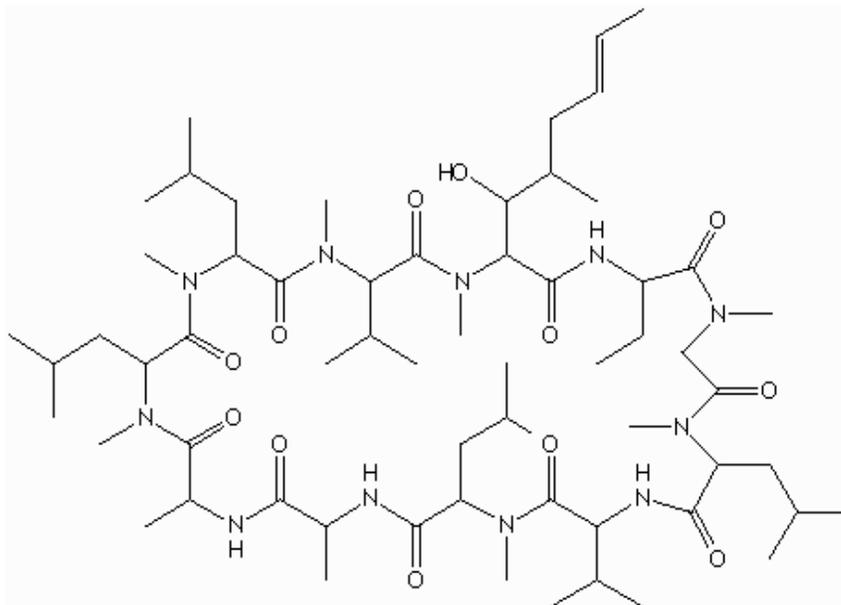
demandam rapidez na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. Estas doenças incluem um amplo espectro de patologias, dentre elas a artrite reumatóide, a diabetes mellitus tipo I, o lupus eritematoso sistêmico, a esclerose múltipla, a asma e várias outras condições alérgicas. A incidência das imunopatologias tende a aumentar com o envelhecimento da população, tendo em vista o aumento da expectativa de vida do ser humano (ROEP, 2003).

O transplante de órgão é uma das grandes possibilidades terapêuticas para o tratamento de diversas patologias. No entanto, a rejeição dos órgãos transplantados, mediada pelo sistema imune, permanece como um fator que dificulta a utilização desta tecnologia, sendo necessário o tratamento contínuo com drogas imunossupressoras. É de grande relevância, portanto, a descoberta de novas drogas imunomoduladoras, tendo em vista a sua aplicabilidade em processos imunopatológicos.

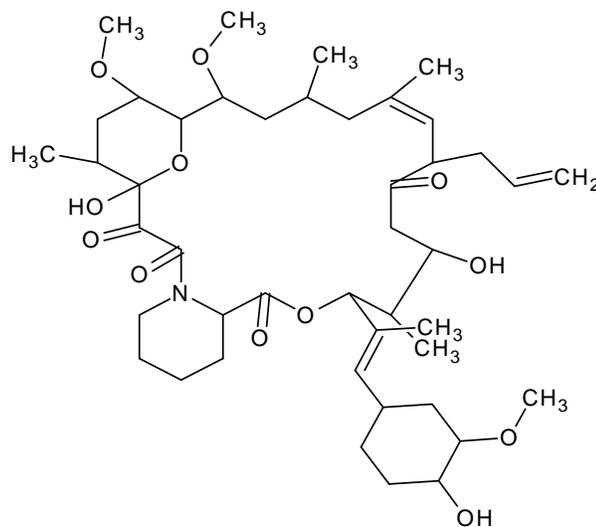
Drogas com ação moduladora da ativação de macrófagos e linfócitos, como os corticosteróides, têm sido amplamente utilizadas para o controle de respostas imunoinflamatórias indesejadas (KRENSKY *et al.*, 2001). Os corticóides e a ciclosporina (11) são exemplos de drogas imunossupressoras eficazes disponíveis atualmente no mercado, que causam vários efeitos colaterais no paciente. No caso dos corticóides, alguns dos efeitos colaterais observados são o retardo no crescimento, necrose avascular de medula, osteopenia, úlcera péptica, aumento do risco de contrair infecções, aparecimento de catarata, hiperglicemia e hipertensão, hiperlipidemia e também nefrotoxicidade, sendo este último efeito presente na maioria dos pacientes tratados com a droga (KRENSKY *et al.*, 2001; BURDMAN *et al.*, 2003).

Os corticóides têm seu mecanismo de ação imunomodulador baseado na diminuição do número de linfócitos no sangue periférico, na regulação da transcrição de diversos genes e na indução de apoptose, sendo este último efeito do aumento da concentração da proteína I κ B, reduzindo a ativação do gene NF κ B, que resulta no aumento da apoptose das células ativadas. É de importância central na ação dos esteróides e na diminuição da produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , Il-1 e Il-6, diminuindo conseqüentemente a ação de macrófagos e linfócitos (KRENSKY *et al.*, 2001). A ciclosporina (11), droga inibidora da calcineurina tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da transdução de sinal desencadeada pela ativação do receptor de linfócitos T, reduzindo a produção

de linfocinas, incluindo a Il-2, como também a expressão de proteínas antiapoptóticas. O tacrolimus (12) também inibe a ativação de células T através da inibição da calcineurina (KRENSKY *et al.*, 2001).



11



12

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

Espécies vegetais podem ser uma fonte de substâncias com atividade imunomoduladora. Recentemente foi demonstrado que substâncias químicas extraídas da espécie vegetal *Crotalaria pallida* inibem a produção de NO *in vitro* de forma concentração dependente (WENG *et al.*, 2003). Outros exemplos de moléculas com atividade imunomoduladora são as fisalinas, seco-esteróides purificados da espécie *Physalis angulata*, que apresentam potente atividade inibidora da produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (SOARES *et al.*, 2003) e a espécie *Dendrobium nobile* da qual se isolou um sesquiterpeno com atividade inibidora da proliferação de linfócitos (ZHAO *et al.*, 2001).

1.2.4. Metabolômica e análise multivariada.

1.2.4.1. As “Omicas”

As plataformas tecnológicas conhecidas como ômicas são aquelas que têm o objetivo de isolar e caracterizar o maior número de biomoléculas de um mesmo grupo, como ácidos desoxirribonucléicos (DNA), ácidos ribonucléicos (RNA), proteínas ou metabólitos. A primeira ômica a ser denominada como tal foi a genômica. Este termo vem da palavra genoma, que por sua vez se deve à junção da palavra gene e cromossoma. Graças a grande aceitação desse termo, transcriptômica, proteômica e metabolômica foram sugeridos para descrever a expressão de genes na forma de transcritos de mRNA, o conjunto de proteínas de um organismo e ainda o conjunto de moléculas do organismo, respectivamente (BINNECK, 2004; ROBERTSON, 2005). O conhecimento das ômicas pode contribuir para o isolamento e caracterização de DNA, RNA, proteínas e metabólitos. A integração das informações obtidas por essas plataformas são o objetivo principal de

biologia de sistemas, também conhecida como Genômica Funcional (ROCHFORT, 2005).

1.2.4.2. Metabolômica

Não há dúvidas que conhecer as proteínas de um organismo é importante, mas existe um universo de pequenas moléculas orgânicas que interagem diretamente com as proteínas e outras macromoléculas (HALL, 2006). Essas moléculas atuam como substratos, inibidores ou ativadores alostéricos de uma enzima. Podem ser precursores de alguma molécula importante nas inúmeras rotas metabólicas celulares, ou até mesmo um resíduo metabólico de alguma via de síntese ou degradação de macromoléculas que por algum motivo é estocada e utilizada como defesa química contra alguns patógenos (ENGEL *et al.*, 2002; DEMAIN & VAISHNAV, 2006). Essas pequenas, porém, importantes moléculas são conhecidas como metabólitos (DIXON, 2001).

Esses metabólitos são divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários e secundários. Os primários são aqueles que estão diretamente envolvidos nas rotas de síntese de degradação das macromoléculas em qualquer ser vivo (DIXON, 2001). Já os secundários são mais comuns em plantas e fungos (CHALLIS & HOPWOOD, 2003; HALL, 2006). Eles atuam como componentes estruturais de defesa contra herbívoros e patógenos, atrativos para polinizadores e agentes nas interações interespecíficas, como alelopatia (ENGEL *et al.*, 2002; CHALLIS & HOPWOOD, 2003).

O estudo desses metabólitos visando à obtenção de produtos efetivos contra diversas doenças e passíveis de comercialização já vem sendo feito desde o início do século XX. Entretanto, a idéia de se analisar todo o conjunto de metabólitos em qualquer nível de complexidade (organismo, órgão, tecido, célula ou mesmo compartimentos celulares) só começou a ganhar destaque nos últimos anos, conforme pode ser observado na Figura 1.1, onde é observado um aumento significativo no número de publicações sobre esse tema nos últimos anos (HORNIG & HORNING, 1971; NICHOLSON *et al.*, 1999; FIEHN, 2002; REO, 2002; LINDO *et al.*, 2003; NICHOLSON & WILSON, 2003; WECKWERTH, 2003; BINO *et al.*, 2004; FERNIE *et al.*, 2004; GOODACRE *et al.*, 2004; LINDO *et al.*, 2004a; LINDO *et al.*, 2004b; FUKUZAKI & KOBAYASHI, 2005; MUNGUR *et al.*, 2005; ROBERTSON,

2005; ROCHFORT, 2005; WECKWERTH & MORGENTAL, 2005). O nome dado a todas as tecnologias envolvidas na análise desses metabólitos foi metabolômica.

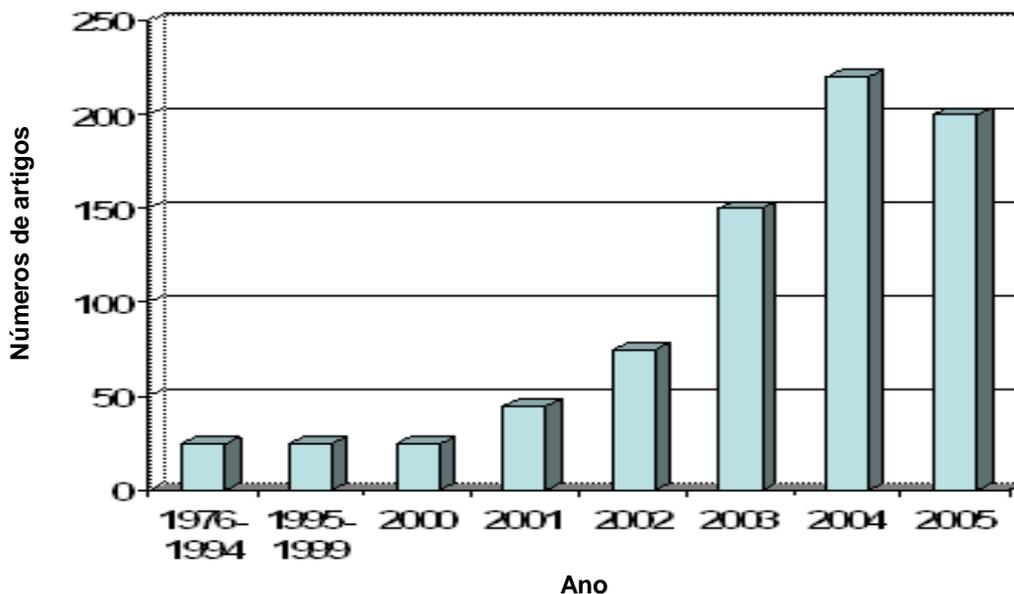


Figura 1.1. Artigos publicados relacionado à metabolômica de 1975 até setembro de 2005.

1.2.4.3. Quimiometria

A sofisticação das técnicas instrumentais, impulsionada pela invasão de microprocessadores e microcomputadores nos laboratórios químicos, aumentou significativamente nos últimos 15 anos. Isto faz com que se torne necessário o tratamento dos dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidade, por exemplo) com os resultados desejados (concentração) (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998).

Muita ênfase tem sido dada aos chamados sistemas multivariados, pelos quais se podem medir muitas variáveis simultaneamente ao analisar-se uma amostra qualquer. Entende-se por sistema multivariado aquele que analisa uma quantidade de dados multivariados que não apresentam uma informação direta como resultado (KOWALSKI & BENDER, 1972). Os sistemas multivariados de forma sequencial ou simultânea medem muitas variáveis para cada objeto, consistindo em um método eficiente e de fácil interpretação. Nesses sistemas, a conversão da

resposta instrumental no dado químico de interesse requer a utilização de técnicas de estatística, álgebra matricial e análise numérica. Essas técnicas constituem-se, atualmente, numa das melhores alternativas para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informações sobre um sistema.

Para tanto, faz-se necessário o uso de softwares capazes de reconhecer padrões em análises químicas, o que tem permitido interpretar mais precisamente os dados obtidos nos laboratórios de química analítica e, em consequência, das análises cromatográficas (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). Tem-se assim, a aplicação da quimiometria ou dos métodos quimiométricos (KWAN & KOWALSKI, 1980), os quais utilizam métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências e permitir a obtenção do máximo de informações a partir da análise de dados químicos multivariados. Os métodos quimiométricos são eficientes na análise, obtenção e interpretação destes dados, podendo solucionar vários tipos de problemas químicos (XIE, 1987). Define-se quimiometria como a área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, para interpretar problemas de origem química (MUNCK, 2006). Assim, através destas análises, as informações químicas podem ser classificadas em categorias conforme suas semelhanças ou diferenças, e ainda podem ser determinadas, propriedades de interesse das amostras analisadas. Dentre as técnicas quimiométricas mais utilizadas, a que foi empregada nesse trabalho foi a análise exploratória dos dados.

1.2.4.4. Análise exploratória de dados

BEEBE & SCASHOLTZ (1998) consideram a análise exploratória dos dados como uma ferramenta destinada a reunir amostras presentes em um grupo que apresentem determinadas características comuns, distinguindo-as de amostras com características diferentes. Ainda segundo esses pesquisadores, esse método também auxilia na identificação de amostras não usuais - conhecidas também como "outliers", isto é, aquelas que não seguem o padrão das demais amostras.

Em uma análise exploratória, algoritmos matemáticos reduzem grupos de dados grandes e complexos para um conjunto de interpretação mais simples. Esses cálculos apontam as informações importantes em poucas variáveis derivadas do grupo de dados originais, como as correlações existentes entre as amostras e/ou

variáveis independentes (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). CLEVE *et al.* (2000) descrevem a utilidade de técnicas quimiométricas para avaliar dados analíticos obtidos na indústria têxtil. Neste setor, o emprego de técnicas espectroscópicas no infravermelho próximo constitui uma fácil ferramenta a ser empregada no controle de qualidade. Entretanto, a grande quantidade de variáveis correlacionadas com o processo produtivo gera problemas na avaliação das características finais do produto acabado. Assim, os autores sugerem que o emprego da quimiometria pode auxiliar na determinação de características mais relevantes a serem consideradas, e conseqüentemente, diminuir a quantidade de variáveis a serem avaliadas. Através de uma análise exploratória foi possível classificar as variáveis e avaliar a qualidade dos dados originais. O estudo demonstrou que o uso da espectrometria de infravermelho próximo acoplada a métodos quimiométricos foi eficiente para ser empregado no controle de qualidade de amostras produzidas pelo segmento têxtil.

Em toda análise multivariada, primeiramente define-se o problema, com a determinação da natureza do trabalho, ou seja, se é um problema exploratório, de classificação ou uma combinação desses fatores. Posteriormente, os dados obtidos são organizados em um arquivo como uma matriz original X , que é construída por n amostras e m variáveis, e cada amostra corresponde a uma linha e cada variável corresponde a uma coluna na matriz de dados, de onde é possível a visualização dos dados brutos.

Antes da realização da análise exploratória dos dados, é importante atribuir o mesmo peso para todas as variáveis, caso contrário alguns valores ou medidas poderão mascarar outras medidas e valores e a análise poderá ficar comprometida. Por isso, usualmente os dados são auto-escalonados antes do início da análise exploratória. Finalizada essa fase inicial de pré-processamento dos dados, passa-se a fazer a análise de agrupamentos hierárquicos ou HCA (Hierarchical Cluster Analysis), análise de componentes principais ou PCA (Principal Component Analysis) e a análise dos mínimos quadrados parciais discriminados ou PLS-DA (Partial Least Square Discriminated) (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998).

1.2.4.5. Análise de agrupamentos hierárquicos – HCA

O principal objetivo da HCA é apresentar os dados de maneira que se enfatize o agrupamento natural, de acordo com semelhanças existentes entre as

amostras. O agrupamento das amostras revela similaridade entre essas e os dados são apresentados na forma de dendogramas, o que facilita o reconhecimento das categorias. BERENTE *et al.* (2000) realizaram o desenvolvimento de um método para determinação de antocianinas em vinhos empregando a CLAE e posteriormente classificaram amostras comerciais empregando métodos quimiométricos. Após o desenvolvimento do método cromatográfico em fase reversa para separar as principais antocianidinas presentes em amostras de vinhos, foi utilizada a técnica de HCA para visualizar as relações existentes entre as bandas cromatográficas obtidas. Nove bandas foram computadas nas amostras analisadas e o emprego da técnica de HCA permitiu visualizar que as áreas das bandas cromatográficas de determinadas antocianidinas apresentavam elevada correlação entre si. As amostras que continham esses compostos puderam ser classificadas como semelhantes. Esse trabalho demonstrou que a técnica de HCA permite a visualização do agrupamento das amostras que possuem características semelhantes entre si. BECKONERT *et al.* (2003) realizaram um estudo visando estabelecer os efeitos metabólicos e a toxicidade de 19 moléculas modelo com base na HCA combinada com dados de ^1H RMN. As substâncias foram administradas em ratos para estudo de sua toxicidade crônica e subcrônica. Amostras de urina foram coletadas em 8 diferentes dias e horários e, subsequentemente, analisadas por RMN, sendo que as similaridades das respostas dos animais tratados com diferentes substâncias foi investigada pela HCA considerando dose e efeitos adversos. O estudo revelou, por exemplo, que a toxicidade de algumas substâncias era similar independente do órgão analisado (fígado ou rim).

1.2.4.6. Análise de componentes principais – PCA

A análise por PCA pode apresentar relações entre amostras e variáveis, mas também fornece um meio de reduzir a dimensão dos dados e pode ser aplicada como uma ferramenta de visualização. É um método que transforma dados complexos em informações mais simples e ressalta os aspectos mais relevantes (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). Essa técnica auxilia a visualização de tendências em um conjunto de dados que não são óbvias a olho nu. Ela ainda melhora a visualização das informações, agrupando as variáveis que estão altamente

correlacionadas em um novo conjunto de dados chamado de PCs (componentes principais).

As PCs reduzem a dimensão de um conjunto de dados, de forma que as informações relevantes ficam condensadas e contidas nas primeiras componentes principais e as informações irrelevantes ou aleatórias, nas últimas (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). Isto pode ser observado, por exemplo, nos trabalhos realizados por LIANG *et al.* (2004), os quais empregaram métodos quimiométricos para classificar os “fingerprintings” de cromatogramas obtidos através de CLAE de produtos fitoterápicos produzidos a partir de *Cortex cinnamomi* e *Erigeron breviscapus* com o objetivo de realizar o controle de qualidade destes. BERENTE *et al.* (2000) também usaram a análise de componentes principais para a classificação de amostras de vinhos. Este método mostrou-se apropriado para extrair as informações relevantes encontradas nas variáveis originais, transformando-as em poucas novas variáveis (PCs). Foi observado que as duas primeiras componentes principais extraíram 70% de todas as informações relevantes e a interpretação dessas duas componentes principais permitiu determinar as variedades de vinhos que se correlacionavam. Assim, a utilização dessa técnica torna possível agrupar e classificar amostras através da análise das componentes principais que são apropriadas para se extrair as informações relevantes oriundas dos dados originais.

1.2.4.7. Mínimos quadrados parciais discriminados ou PLS-DA

Embora a PCA seja uma técnica versátil, uma vez que ela explica a variância máxima no conjunto de dados, a análise resultante pode ser complexa e não permitir a separação adequada das amostras de acordo com as matrizes de dados fornecida. Nesse contexto, a PLS-DA pode utilizar os dados oriundos da PCA e modelar de forma mais definida as relações entre as matrizes, uma vez que é possível considerar variáveis secundárias por este método. O método produz um conjunto de novas variáveis correlacionadas com os PCs e explica a covariância entre duas matrizes (CIOSEK *et al.*, 2005). A PLS-DA foi utilizada para a discriminação de diferentes histotipos de câncer de pulmão, e também para discriminar estes de câncer do cólon, uma vez que permitiu a definição de um conjunto de genes capazes de discriminar câncer de pulmão de metástases no cólon (MUSUMARA *et al.*, 2005). VAN RUTH *et al.* (2010) aplicou a PLS-DA em amostras

de gorduras e conseguiu identificar sete grupos referentes às origens das amostras (leite, vaca, porco, galinha, coco, palmeira e palmiste) usando os perfis de ácidos graxos, triacilglicerídeos, a combinação dos perfis de ácidos graxos e triacilgliceróis e o perfil de compostos orgânicos voláteis obtido a partir de PTR-MS. Os preços de preparações comerciais de espécies de *Angelica*, uma erva nativa chinesa usada no tratamento de distúrbios ginecológicos, além de artrite e anemia, são principalmente determinados com base nas suas qualidades sensoriais além das propriedades físicas. TARACHIWIN *et al.* (2008) avaliaram a qualidade das raízes da planta usando como variáveis secundárias suas origens geográficas e as diferenças sensoriais entre as variedades. Nesse estudo foi detectada uma ampla faixa de metabólitos por ^1H RMN e a PLS-DA permitiu o agrupamento das amostras com base na área de cultivo (China e Japão), além de mostrar que a qualidade sensorial das amostras independe da área de cultivo.

1.2.4.8. Metabolômica: aplicações em plantas

No passado a abordagem da genômica ou proteômica era aplicada para a caracterização dos organismos vivos isoladamente. No entanto, logo ficou evidente que uma única ômica não poderia satisfazer este objetivo ilimitadamente. Portanto, muito recentemente, o produto final da expressão gênica, os metabólitos, tornou-se o objetivo de uma nova ômica, a metabolômica.

A metabolômica é uma sistemática de identificação e quantificação de todos os metabólitos em um dado organismo ou amostra biológica. Naturalmente, as plataformas de análise para a aquisição de dados sobre o conteúdo de metabólitos são críticas para o sucesso dos estudos. Entre os vários candidatos, a ressonância magnética nuclear (RMN) revelou-se como uma ferramenta para permitir a detecção de uma vasta gama de metabólitos com robustez e exige apenas uma preparação muito simples da amostra. Mesmo com um dos principais inconvenientes para a aplicação de RMN, sensibilidade baixa, a resolução aprimorada e sensibilidade fornecida pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear juntamente com poderosas ferramentas quimiométricas, permitem que a metabolômica possa ser aplicada em diversos campos da ciência das plantas.

A caracterização química de vinhos tintos italianos a partir de diferentes localizações geográficas na Puglia, região do sul da Itália, foi realizada usando

dados de ressonância magnética nuclear (^1H RMN). Métodos de estatística multivariada foram aplicados para os dados analíticos de RMN permitindo elaborar uma técnica de controle de qualidade para vinhos (BRESCIA *et al.*, 2002). A análise metabólica mostrou um claro aumento dos níveis de fenilpropanóides em *Brassica rapa* após o tratamento com jasmonato de metila (LIANG *et al.*, 2006).

A espectroscopia de ^1H RMN juntamente com a análise de componentes principais foi utilizada no estudo da metabólica de 12 formas cultivadas de *Cannabis sativa*, para a diferenciação de cultivares de *Cannabis* baseada em uma variedade de metabólitos (CHOI *et al.*, 2004). Em outro estudo, a RMN-metabolômica foi aplicada à impressão digital metabólica de espécies de *Ephedra* permitindo a discriminação de três espécies diferentes dessa planta e a avaliação de nove ervas comerciais de *Ephedra* (KIM *et al.*, 2005). A utilização de RMN para o controle de qualidade de fitoterápicos também tem sido explorada. Um exame de 14 preparações a partir de extratos aquosos e orgânicos dos comprimidos comerciais de “feverfew” (BAILEY *et al.*, 2002) mostrou que dois deles tinham uma composição muito diferente dos outros. As 12 amostras restantes foram distinguidas na maior parte uma da outra, embora a diferença não tenha sido marcada e alguns grupos de 2 ou 3 amostras eram aparentes. Além disso, diferentes lotes de um mesmo produto do mesmo fornecedor podem ser distinguidos. Dados espectroscópicos de RMN em conjunto com a análise multivariada também foram relatados para a classificação de amostras comerciais de catuaba. A técnica descrita permitiu a discriminação de amostras com base no tipo de matéria-prima empregada em sua fabricação (DAOLIO *et al.*, 2008). Análise metabólica de 11 espécies de *Ilex* incluindo duas variedades foi realizada utilizando um método de espectroscopia de RMN acoplado à análise de componentes principais (PCA) no software SIMCA-P (CHOI *et al.*, 2005). Resultados como estes mostrados anteriormente prova a eficácia de métodos de análise multivariada na classificação e caracterização de espécies de plantas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivos gerais

Estudar o potencial biológico dos extratos e frações obtidos das folhas da *M. hirsuta*, Cipó d'alho, isolar e purificar os possíveis princípios ativos e estudar o perfil metabólico da planta.

1.3.2. Objetivos específicos

- Preparar os extratos etanólicos de plantas de *M. hirsuta* coletadas na região de Gentio de Ouro;
- Particionar o extrato etanólico de folhas de *M. hirsuta*;
- Realizar a prospecção fitoquímica para estabelecer as classes de metabólitos secundários presentes no extrato e frações;
- Estudar as atividades biológicas do extrato e frações com relação aos potenciais citotóxicos, leishmanicida, tripanocida, redutora do radical NO e inibidora da proliferação de linfócitos;
- Purificar possíveis compostos ativos por cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna;
- Elucidar a estrutura das substâncias isoladas com base em dados de GC-MS, ¹H RMN e 2D-RMN;
- Aplicar as técnicas HCA, PCA e PSL-DA para a caracterização metabólica de espécies de *M. hirsuta* coletadas em diferentes locais do Semi-Árido e
- Estabelecer correlações entre várias variáveis (tipo de solo, constituição química, relevo, meio ambiente), com a atividade biológica apresentada, de modo a selecionar plantas com a melhor atividade possível.

2. Experimental

EXPERIMENTAL

Experimento foi realizado na Universidade Federal de Alagoas, no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Departamento de Química – UFAL e na Divisão de Farmacognosia da Universidade de Leiden (Holanda).

2.1. REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS

- ⇒ Nas separações cromatográficas em coluna, utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 (70-230 Mesh ASTM) da (Merck - Darmstad – Alemanha). O comprimento e o diâmetro das colunas utilizadas variaram conforme as quantidades das amostras e de sílica gel a serem utilizadas. Nas permeações em gel, utilizou-se Sephadex LH-20 (Pharmacia, Suíça);
- ⇒ Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (**CCD**), utilizou-se gel de sílica 60 PF₂₅₄ da Merck. A suspensão de sílica, obtida em água destilada, foi distribuída sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico para ter uma espessura de 0.15 mm.
- ⇒ A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi realizada através da exposição dessas a irradiação com luz na região do UV, em comprimentos de onda 254 e 366 nm, e os reveladores. Solução alcoólica de anisaldeído 10%, solução ácida de sulfato cérico, solução de ácido fosfomolibidico e vapores de iodo;
- ⇒ Os solventes utilizados foram destilados no próprio laboratório para as partições e filtrações (Morais de Castro LTDA, Recife-PE). Porém, nas colunas cromatográficas e cristalizações foram utilizados solventes analiticamente puros de grau P.A.
- ⇒ A concentração das frações contendo grandes volumes de solvente foi efetuada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, tipo Büchler; enquanto que as soluções contendo pequeno volume foram concentradas á temperatura ambiente em capela de exaustão;
- ⇒ O critério de confirmação da pureza para as substâncias isoladas aferiu-se o ponto de fusão;

⇒ Os extratos foram obtidos com *n*-hexano e depois com diclorometano e em seguida submetidos à análise em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com uma coluna DB-1, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A (Shimadzu - Kyoto - Japão) (Figura 2.1). Foi utilizado hélio (He) como gás de arraste e os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico com energia do feixe eletrônico de 70 eV. Foi também analisado o etanol recuperado da extração bruta (Fluxograma 2.1).



Figura 2.1. Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas utilizado na identificação dos voláteis.

2.2. TRATAMENTO DA PLANTA

2.2.1. Escolha da Planta

A espécie *M. hirsuta* D.C apresenta atividades biológicas, e faz parte das plantas selecionadas no programa **IMSEAR** (Instituto do Milênio no Semi-árido) para estudo químico.

2.2.2. Coleta e Descrição da Planta

2.2.2.1. Fitoquímica clássica

As folhas da planta em estudo foram fornecidas pelo projeto IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-árido). A *M. hirsuta* trabalhada foi coletada e descrita por Teonildes Nunes em 16/05/2002 no Brasil, Bahia, Santo Inácio, estrada Xique-

Xique, para Gentio do Ouro, antes de Gameleira do Assuruá, 11°19' S e 42°40' O. Está registrada no **HUEFS** (Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana) com número de série de 59456. As plantas coletadas foram usadas no processo de isolamento e purificação de substâncias na fitoquímica clássica.

2.2.2.2. Metabolômica

As populações escolhidas foram: Campo Alegre de Lourdes (S 9° 28' 9,8" W 43° 05' 22,7"), Gentio de Ouro (S 11° 25' 38,5" W 42° 31' 13,7") Morro do Chapéu (S 10° 55' 35,1 W 42° 28' 24,0"), Boninal (S 12° 26' 36,5" W 41° 55' 9,7") e Caetité (S 14° 06' 57,9" W 42° 25' 56,9"). Estas regiões estão ilustradas e no Mapa da Figura 2.1. Na região de canudos Não foi encontrada espécie de *Mansoa hirsuta* por conta do desmatamento, nesta região do semi-árido da Bahia que faz vizinhança com a mata atlântica.

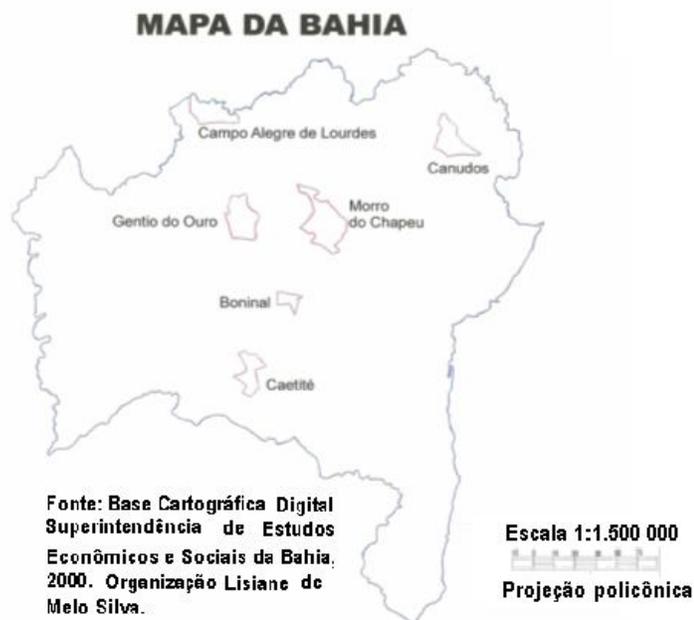


Figura 2.2. Mapa com ilustração dos municípios os quais foram coletados os espécimes de *Mansoa Hirsuta* D.C..

As folhas da *M. hirsuta* foram fornecidas pelo IMSEAR, coletadas e autenticadas pelo botânico Cosme Correia em agosto de 2009 e um exemplar de cada População da espécie coletada, se encontram depositados e registrados no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana sob números de série

161172 (C. Alegre de Lourdes), 161174 (G. de Ouro), 161175 (M. do chapéu), 161176 (Boninal), 16177 (Caetité), estes espécimes também foram fotografadas, para observar algumas características fenotípicas.

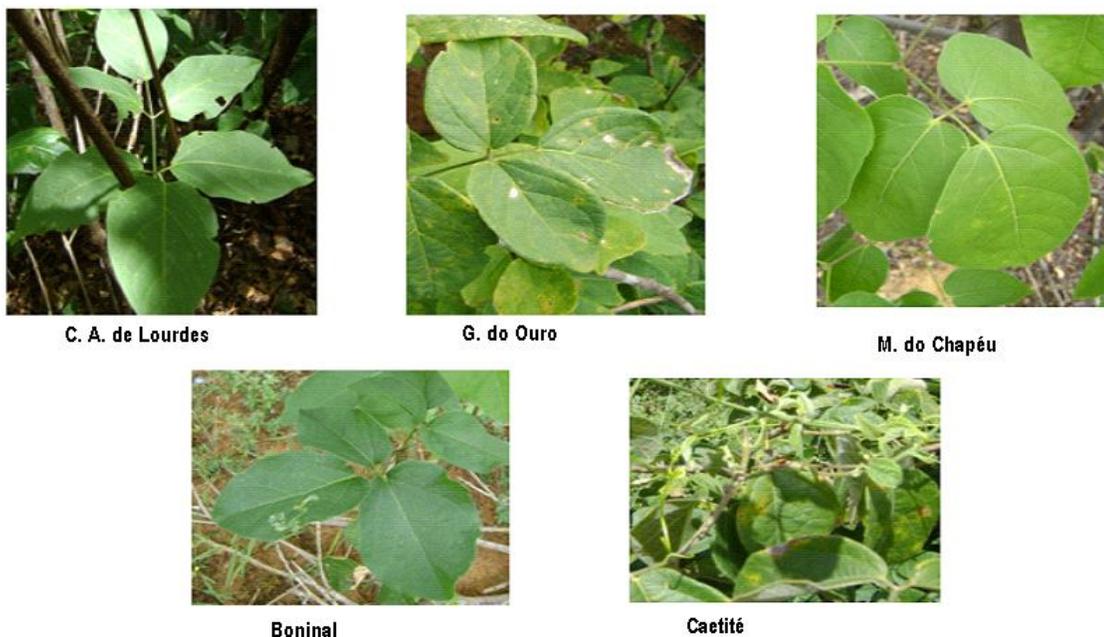


Figura 2.3. Fotos dos espécimes de *Mansoa Hirsuta* nas regiões coletadas.

2.2.3. Secagem e moagem das folhas

As folhas sadias da planta já foram fornecidas secas para que não houvesse crescimento de microrganismos, sendo então separadas de resíduos de outras partes das plantas e pulverizadas em moinho tipo forrageiras.

2.2.4. Obtenção do Extrato

2.2.4.1. Fitoquímica clássica

A planta pulverizada com o peso total de 15,0 kg, foi extraída com 60 L de etanol 90% v/v em extrator de aço inoxidável à temperatura ambiente (27 – 30 °C) por 96 h. A destilação do solvente sob pressão reduzida em aparelho rotatório forneceu 1800 g de extrato etanólico concentrado e homogêneo.

2.2.4.2. Metabolômica

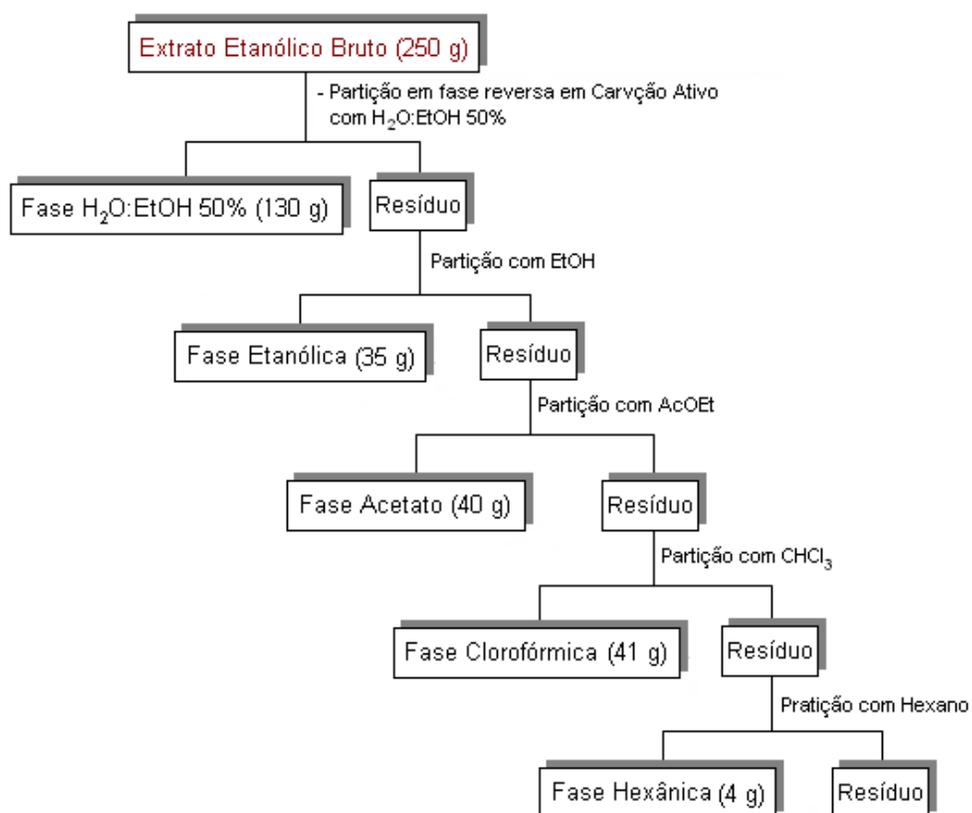
As folhas dos 50 indivíduos da *M. hirsuta*, sendo 10 de cada população, foram secas em estufa a 40 graus e depois pulverizada em um liquidificador industrial, sendo coletados aproximadamente 15,0 g de cada indivíduo e extraídas separadamente com 150 mL de etanol 90 % em Erlenmayer de 250 mL, temperatura ambiente (27 – 30 °C) por 96 h. A destilação do solvente sob pressão reduzida foi realizada em aparelho rotatório, elaborando extratos etanólicos concentrado e homogêneo. Depois todos os extratos foram liofilizados e 20 mg foram dissolvidas em 500 µL de metanol deuterado e 500 µL de água deuterada com tampão KH_2PO_4 pH 6.0, e para total dissolução usou-se vortex e ultrason. As amostras foram então centrifugadas, pipetados 700 µL e transferidos para tubos de RMN.

2.3. FRACIONAMENTO EM FASE REVERSA COM CARVÃO ATIVO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *M. hirsuta*

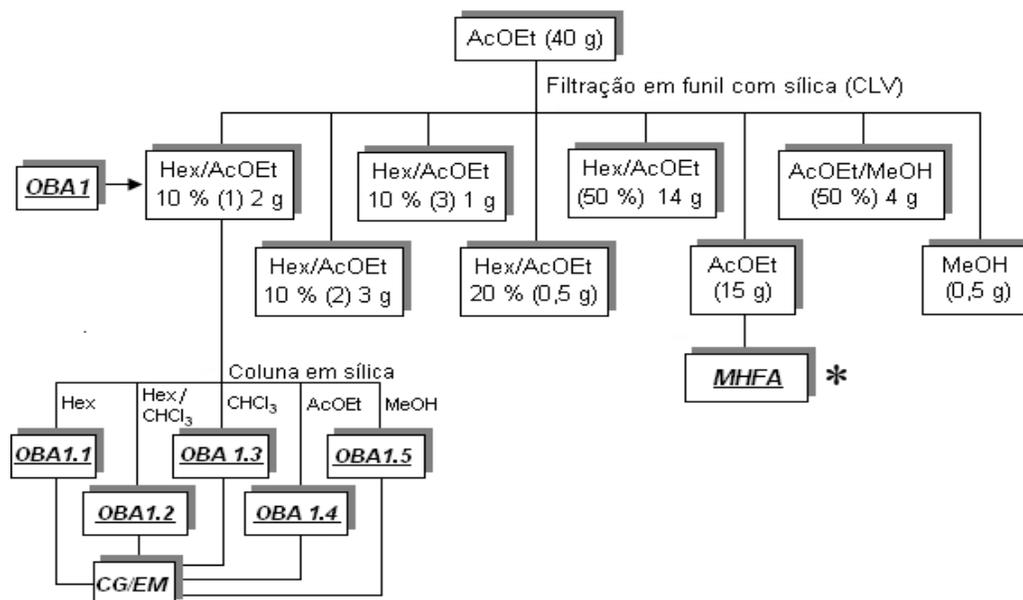
Pesou-se 250 g do extrato total e incorporou-se em carvão ativo até que todo o extrato tomasse forma de pó. Após secagem completa (48 h) o material foi colocado em um funil de Buchner forrado com papel de filtro e, uma camada de sílica (3 cm). Cobriu-se o material com outro papel de filtro. Com um funil de adição eluiu-se o material com os solventes segundo um gradiente decrescente de polaridade iniciando-se com EtOH:H₂O (1:1), EtOH, AcOEt, Clorofórmio e Hexano. Após evaporação em aparelho rotatório obteve-se 5 frações: hidroalcoólica 1:1 (130 g), alcoólica (35 g), acetato de etila (40 g), clorofórmio (41 g) e hexano (4 g). De acordo com o Fluxograma 2.1.

Após análise de CCD em sílica gel, a fração eluída com acetato (40 g) foi utilizada para purificação segundo o Fluxograma 2.2 sendo obtidas oito frações. Testes com base na cromatografia em camada de sílica, a fração eluída com acetato de etila (15 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico. Também no Fluxograma 2.2, foi utilizada a fração oleosa eluída com hexano/acetato de etila (2 g) submetida à coluna cromatográfica e analisada em CG/EM.

Fluxograma 2.1. Fracionamento em Fase Reversa em Carvão Ativo do Extrato Etanólico da *M. hirsuta*.



Fluxograma 2.2. Partição da fração em AcOEt da espécie *M. hirsuta* (folhas).



* A fração de 15 g de acetato identificada como **MHFA*** foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica, utilizando como fase móvel hexano (C₆H₁₄), acetato de etila (AcOEt) e misturas destes solventes. Coletou-se um total de 100 frações com um volume médio de 5 mL cada. Essas frações, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CCD) e revelação com anisaldeído, sulfato cérico e/ou vapores de iodo, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em sete grupos (Tabela 2.1).

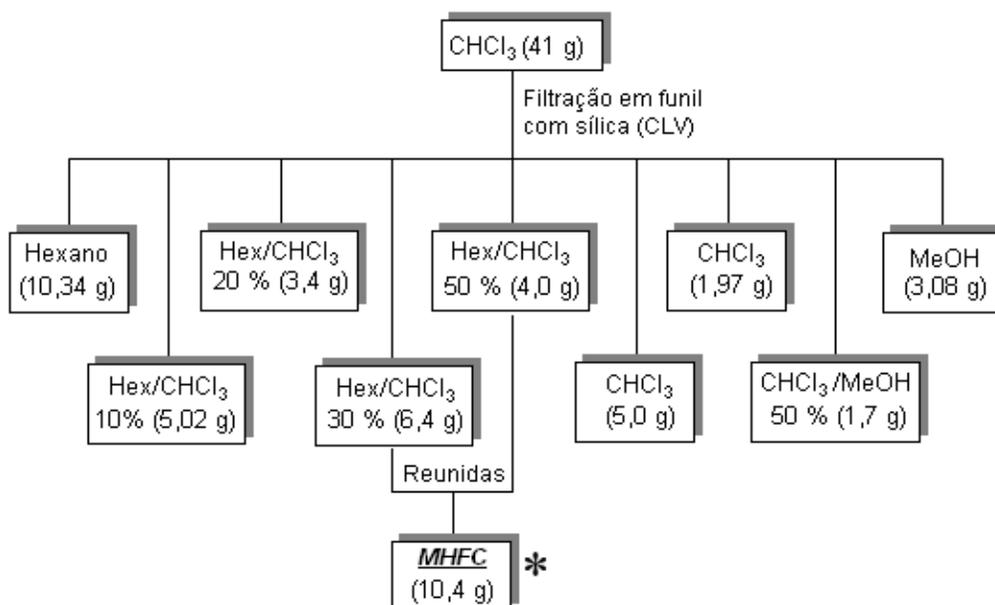
A fração {F-(43 - 60)} (2,05 g) (Tabela 2.1), foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel. Nesta separação foi utilizado 6 g de sílica e os solventes foram C₆H₁₄, C₆H₁₄/CHCl₃ 1:1 e CHCl₃. Este procedimento experimental resultou na obtenção de composto sólido amorfo denominado **MHFA1** (60 mg). A fração {F-(74-100)} (1,04 g) (Tabela 2.1) foi submetida ao procedimento acima descrito, que levou a purificação de um sólido amorfo denominado **MHFA2** (70 mg).

A fração eluída em clorofórmio (41 g) oriunda do extrato grama (Fluxograma 2.2) foi submetida à filtração em sílica gel sendo coletadas nove frações. Após análise em CCD, as frações em hexano/clorofórmio a 30% e 50% foram reunidas em uma única fração (10,4 g), e chamada de **MHFC** (Fluxograma 2.3).

Tabela 2.1. Fracionamento Cromatográfico da Fase MHFA das folhas de *M. hirsuta* D.C.

Grupos	Frações Reunidas	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	1 - 10	C ₆ H ₁₄	1,00 g	-
II	11 - 22	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 1%	5,15 g	-
III	23 - 35	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 2,5%	3,25 g	-
IV	36 - 42	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 5%	1,10 g	-
V	43 - 60	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 10%	2,05 g	MHFA1
VI	61 - 73	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 1:1	1,04 g	-
VII	74 - 100	AcOEt 100%	1,40 g	MHFA2

Fluxograma 2.3. Partição da fração em clorofórmio da espécie *M. hirsuta* (folhas)



* A fração **MHFC*** (Fluxograma 2.3) (10,4 g) foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, utilizando como fase móvel hexano (C₆H₁₄), clorofórmio (CHCl₃), metanol (MeOH) e misturas destes solventes. Coletou-se um total de 130 frações com um volume médio de 5 mL cada. Essas frações, após análise comparativa através de CCD e revelação com anisaldeído, sulfato cérico

e/ou vapores de iodo, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em doze grupos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Fracionamento Cromatográfico da Fase MHFC das folhas de *M. hirsuta* D.C.

Grupos	Frações Reunidas	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	1 - 20	C ₆ H ₁₄	1,00 g	-
II	21 - 33	C ₆ H ₁₄ /CHCl ₃ 1%	0,50 g	-
III	34 - 45	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 2,5%	1,20 g	-
IV	46 - 60	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 5%	0,80 g	-
V	61 - 69	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 10%	1,00 g	-
VI	70 - 75	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 1:1	1,20 g	MHFC1
VII	76 - 84	CHCl ₃ /MeOH 5%	1,00 g	-
VIII	85 - 94	CHCl ₃ /MeOH 10%	0,50 g	-
IX	95 - 100	CHCl ₃ /MeOH 20%	0,70 g	-
X	101 - 112	CHCl ₃ /MeOH 30%	1,30 g	MHFC2
XI	113 - 121	CHCl ₃ /MeOH 50%	0,40 g	-
XII	122 - 130	MeOH	0,80 g	-

A fração {F-(70 - 75)} (1,20 g) (Tabela 2.2), foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel. Nesta separação foi utilizado 3 g de sílica e os solventes foram C₆H₁₄, C₆H₁₄/CHCl₃ 1:1 e CHCl₃. Este procedimento experimental resultou na obtenção de um composto: um sólido cristalino **MHFC1** (80 mg).

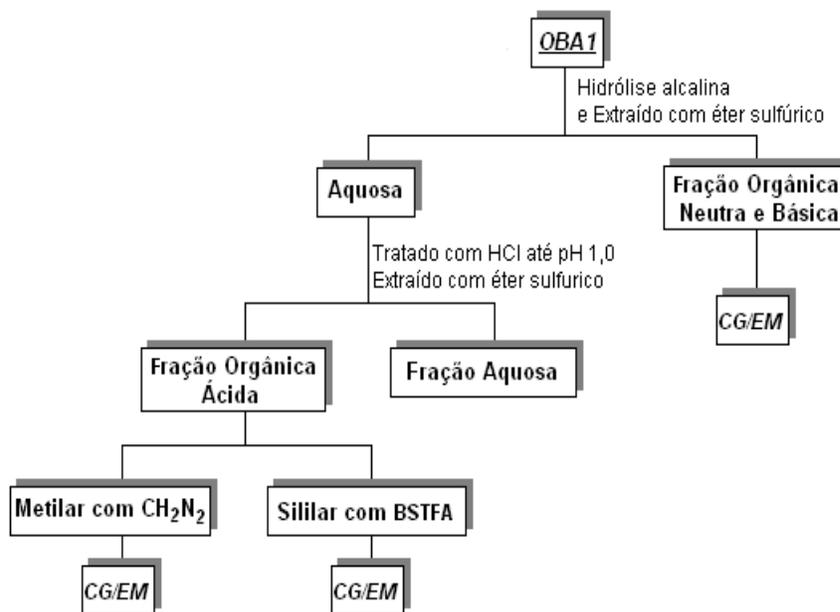
A fração {F-(101 - 112)} (1,30 g) (Tabela 2.2), foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel. Nesta separação foi utilizado 3 g de sílica e os solventes foram C₆H₁₄, C₆H₁₄/CHCl₃ 1:1 e CHCl₃. Este procedimento experimental resultou na obtenção de um composto: um sólido cristalino **MHFC2** (60 mg).

2.4. HIDRÓLISE

Colocou-se 10 mg do material (**OBA1**) em 6 balões de fundo redondo de 100 mL dissolvido em 10 mL de etanol. Adicionou-se a esta solução 20 mL da solução a 10% de KOH em etanol. O material foi submetido a refluxo por um período de 2 horas. Após resfriar, o volume da solução foi reduzido à metade e adicionou-se 50 mL de água destilada. A solução foi extraída em um funil com éter etílico (4 x 40 mL). A fração solúvel em éter foi lavada com água e seca com Na₂SO₄ anidro. A solução alcalina foi acidificada com solução aquosa de HCl a 1% até pH ~ 1. Seguiu-

se a extração com éter etílico (4 x 40 mL). A fração orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl e seca com Na₂SO₄ anidro. O material foi dividido em duas frações. Uma para sililação e outra para metilação seguindo-se análise por CG/EM. As frações oleosas obtidas nos fracionamentos das partes de acetato e clorofórmio foram hidrolisados para que pudessem ser analisados em GC/EM (Fluxograma 2.4).

Fluxograma 2.4. Hidrólise do Óleo Extraído da Fração Acetato



2.5. METILAÇÃO COM DIAZOMETANO

2.5.1. Preparação do Diazometano (CH₂N₂)

O diazometano foi preparado pela mistura de duas soluções. A solução A foi preparada em um balão de fundo redondo de 125 mL pela dissolução de 1,25 g de KOH em 20 mL de água destilada e, posterior adição de 6,25 mL de etanol. A solução B foi preparada pela dissolução de 5,35 g de N-metil-N-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (**Diazald**) em 50 mL de éter anidro em uma ampola de decantação de 100 mL.

A solução A no balão de fundo redondo foi colocada em banho de óleo sob agitação. A este balão foi conectada uma ampola de adição com a solução B e um condensador reto contendo na saída um balão coletor. Ver-teu-se, através de

gotejamento a solução B sobre a solução A. O diazometano produzido foi recolhido no balão coletor.

2.5.2. Metilação com Diazometano

Cinco miligramas da fração ácida foram solubilizadas com éter sulfúrico seco e adicionado na solução do diazometano recém preparada. A solução resultante foi deixada em repouso por 12 horas e o éter removido por passagem de um fluxo de N₂.

2.6. SILILAÇÃO COM BSTFA

Diluiu-se 1 mg da amostra em 100 µL de diclorometano mais 100 µL de BSTF (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoracetamida) e aquecido em banho de areia a 70°C por 50 minutos, adiciona-se 100 µL de Hexano e concentrou-se em fluxo de nitrogênio até 100 µL e depois analisou-se em GC-MS.

2.7. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM).

As frações oleosas e os solventes destilados das extrações foram analisadas por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG/EM) em um aparelho Shimadzu (Instituto de Química e Biotecnologia-IQB – UFAL).

As análises por CG/EM foram realizadas em aparelho Shimadzu CG/EM QP5050 (no Depto. Química - UFAL). O **CG** operou com coluna capilar apolar HP-1 (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm de espessura do filme), tendo Hélio como gás de arraste (1 mL/min). As amostras foram analisadas com energia de ionização 70 eV, corrente do filamento 220 µA, temperatura da fonte 190 °C e voltagem do multiplicador 2000 V. O CG operou com temperatura programada: SREEB, EBVH e EBVD - 35 °C (10 min), 2 °C/min, 120 °C, 8 °C/min, 310 °C (5 min); OBA1 e suas fações - 40 °C (5 min), 100 °C, 10 °C/min (2 min), 200 °C, 20 °C/min (5 min) e ISOLADOS e HIDROLIZADOS e os óleos extraídos da fração de acetato e clorofórmio - 40 °C (1 min), 10 °C/min, 200 °C, 3 °C/min, 300 °C (20 min). Utilizou-se

a mesma programação de temperaturas descrita acima. O analisador quadrupolo operou na técnica SIM.

As amostras dos sólidos isolados foram injetadas diretamente no CG-EM.

2.8. EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE VOLÁTEIS

Os extratos obtidos por hexano e diclorometano foram preparados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da UFAL utilizando-se de um aparelho de Klavenger (Figura 2.2), usando em cada experimento duas folhas da *M. hirsuta* para a extração dos voláteis por arraste a vapor.



Figura 2.4. Aparelho de klavenger utilizado na extração dos voláteis de *M. hirsuta*.

2.9. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os extratos da *M. hirsuta* utilizada neste trabalho foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se as metodologias descritas na literatura (MATOS, 1997; ESTEVAM, 2006; SILVA, 2006).

2.10. ENSAIOS BIOLÓGICOS

2.10.1. Animais

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

2.10.2. Avaliação da citotoxicidade

Para a determinação da concentração atóxica para células de mamíferos, os extratos e frações foram avaliados em diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 mg/mL e eventualmente a 0,05 e 0,005 mg/mL). Para este ensaio, foram utilizadas células de baço ($6 \cdot 10^5$ /poço) de camundongos isogênicos incubadas na presença das amostras e de timidina tritiada, durante 24 horas. Cada concentração das drogas foi avaliada em triplicata em placa de 96 poços, em estufa úmida a 37 °C, com 5 % de CO₂. A cultura de células de baço foi feita em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo (suplementado com soro bovino fetal a 10 % e gentamicina a 50 µg/mL). As drogas foram diluídas em meio de cultura no dia da realização do experimento. A timidina tritiada foi adicionada de forma a obter uma concentração final de 1 µCi por poço.

Para este ensaio, dois controles foram feitos: um controle sem tratamento, no qual se incubou somente células e timidina tritiada, e um controle de células tratadas com saponina (concentração final de 0,05 %), substância com reconhecida atividade citotóxica. Após o período de incubação, as células foram coletadas em um filtro de fibra de vidro, utilizando-se um coletor de células (Filtermate 196, Packard, Meriden,

CT, EUA). Os filtros foram secos à temperatura ambiente durante 24 horas e, posteriormente, lidos em contador de radiação beta (Beta Counter, Packard, Meriden, CT, EUA). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se os valores de radiação incorporados pelas células incubadas na presença dos extratos com os valores do controle não tratado. A concentração dos extratos e frações utilizada para os ensaios posteriores foi a mais elevada que apresentasse uma toxicidade de até 30 %.

2.10.3. Avaliação da atividade anti-*Leishmania amazonensis*

Para este ensaio foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura axênica em meio LIT completo enriquecido com soro bovino fetal a 10 % e gentamicina a uma concentração final de 50 µg/mL. Os parasitos foram incubados na presença dos extratos ou frações vegetais em placa de 96 poços. Foram plaqueados 5×10^6 parasitos/poço em volume final de 200 µl, sendo cada substância avaliada em triplicata.

Dois controles foram preparados: um controle sem tratamento, consistindo da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e em controle de leishmanias tratadas com parasitos em meio de cultura LIT completo, e um controle de leishmanias tratadas com uma droga com atividade leishmanicida conhecida, a anfotericina B a 25 µg/mL. Os parasitos foram incubados na presença das drogas durante 24 horas a 26 °C. Após esse período, adicionou-se o MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-brometodifeniltetrazolio) e incubou-se novamente a 26 °C durante 2 horas, após as quais foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (pectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda 570 nm. A viabilidade dos parasitos foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor de absorbância obtido. Os percentuais de atividade anti-*L.amazonensis* foram definidos comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado.

2.10.4. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi*

Formas epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de cultura axênica em meio de cultura LIT completo. Os parasitos foram plaqueados em placas de 96 poços a 10^7 parasitos/poço, em volume final de 200 μ l. Foram realizados controles sem tratamento, consistindo da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e com tratamento com uma droga com atividade anti-*T. cruzi* conhecida, a anfotericina B a 25 μ g/mL. Os parasitos foram incubados durante 24 horas a 26 °C em presença dos extratos ou frações testados. Após esse período, adicionou-se o MTT e incubou-se novamente a 37 °C durante 3 horas, uma vez que o metabolismo desse sal pelos parasitos demonstrou-se mais intenso nesta temperatura. A leitura foi feita a 570 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices). Os percentuais de atividade anti-*T. cruzi* foram determinados comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado.

2.10.5. Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos e frações de vegetais quanto à inibição da produção de óxido nítrico, utilizaram-se macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos injetados, por via intraperitoneal, com tioglicolato a 3% em salina. A lavagem peritoneal, com meio de cultura DMEM suplementado com 50 μ g/mL de gentamicina, foi feita após um período de 4-5 dias de injeção do tioglicolato. As células do exsudato peritoneal incubadas em placas de cultura de 96 poços (2×10^5 células/poço) por um período de 2 horas, em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não-aderentes. As células aderentes foram estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL), na presença ou não dos extratos ou frações, em meio DMEM completo. Após 24 horas, 50 μ l do sobrenadante de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para a avaliação da quantidade de nitrito através do método de Griess (DING et al., 1988).

A reação de Griess foi feita adicionando-se aos 50 μ l do sobrenadante/poço igual volume do reagente do Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloreto naftiletileno diamina – NEED – 0,1% em H₃PO₄ a 0,3 M). A leitura das placas foi feita

imediatamente em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico de cada extrato ou fração avaliada foi determinada comparando-se os resultados obtidos com os resultados dos sobrenadantes de culturas de células não tratadas com drogas.

2.10.6. Avaliação da inibição de linfoproliferação

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

As células foram incubadas durante 48 horas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, adicionou-se timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci/poço}$) e incubou-se novamente as células em estufa sob as mesmas condições, por um período de 12-48 horas. As células foram então coletadas para quantificação da radioatividade beta, conforme descrito através da comparação da incorporação da tiamina em culturas de células estimuladas com Con A somente ou em presença dos extratos e frações.

2.11. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia e Metabolômica de Plantas, na Universidade de Leiden, em estágio doutoral realizado na Holanda, sob orientação do Professor PhD Robert Verpoort. As análises de 1D-¹H RMN, J-resolvido bem como os experimentos de correlação homonuclear ¹H-¹H e heteronuclear ¹H-¹³C foram realizados a 25 °C em um espectrômetro de RMN modelo Bruker AVANCE II 600MHz (600.13 MHz de frequência do próton) equipado com uma crioprobe TCI e um sistema de gradiente Z. CD₃OD foi usado como padrão interno. Para adquirir os espectros de 1D-¹H RMN, um total de 32768 pontos de dados foram registrados cobrindo a janela espectral de 9615 Hz. 128 varreduras foram aplicadas com uma sequência de um pulso padrão com 30° de ângulo de

nutação para excitação e pressaturação durante 2 sec de relaxação com campo efetivo de $\gamma B_1 = 50\text{Hz}$ para supressão dos sinais de H_2O residual (PRICE, 1999). Uma função de janela exponencial com um fator de alargamento de linha de 0.3Hz foi aplicada primeiramente por transformada de Fourier. Os espectros resultantes foram manualmente calibrados para a fase e a linha de base usando o padrão interno TMS⁺ em 0.0 ppm.

Para a aquisição dos espectros 2D-J-resolvido (AUE *et al.*, 1976), uma matrix de dados de 62 x 16384 cobrindo 50 x 7739.4 Hz foi usada e os espectros foram adquiridos após 16 varreduras para cada incremento em F1. A pressaturação foi aplicada durante a relaxação de 1.5 segundo com um campo efetivo de $\gamma B_1 = 50\text{Hz}$. Os dados também foram calibrados no intervalo 512 x 32768 antes da análise por transformada de Fourier com funções de janela com em forma de seno para ambas as dimensões. Os dados no domínio da frequência resultante foram alinhados para 45° e então simetrizados ao longo da dimensão F2 (F1 = 0Hz) e também calibrados para o padrão interno TMS⁺. Projeções 1D na dimensão F1 foram extraídas dos espectros 2D-J-resolvidos usando a rotina de projeção interna do programa Topspin (versão 2.1, Bruker Biospin).

Os espectros bidimensionais de correlação homonuclear de hidrogênio ^1H - ^1H (COSY, DEROME *et al.*, 1990) foram adquiridos com pressaturação ($\gamma B_1 = 50\text{Hz}$) durante uma relaxação de 1.5 segundo. Uma matrix de dados de 1024 x 2048 pontos cobrindo 7739.4 x 7739.4 Hz foi registrada com 8 varreduras para cada increment. Os dados foram preenchidos com zero em 2048 x 2048 pontos antes da transformada de Fourier 2D do tipo "States-TPPI" e uma função de janela na forma de seno foi aplicada em ambas as dimensões. O

Os espectros bidimensionais de correlação heteronuclear (HSQC, KAY *et al.*, 1992) foram registrados para uma matrix de 256 x 2048 pontos cobrindo 30182.7 x 7812.5 Hz com 64 varreduras para cada incremento. A transferência INEPT foi otimizada para o acoplamento heteronuclear de 145 Hz e uma relaxação de 1.5 segundos. Os dados foram linearmente previsto para 512 x 2048 usando 32 coeficientes e então preenchidos com zero em 2048 x 2048 pontos antes da transformada de Fourier 2D do tipo eco-anti eco e uma função de janela na forma de seno deslocada por $\pi/2$ em ambas as dimensões foi aplicada. Projeções 1D ao longo do eixo F1 forma extraídas usando a ferramenta de projeção positiva do programa Topspin (versão 2.1, Bruker Biospin).

Os espectros bidimensionais de correlação heteronuclear para ligações múltiplas (HMBC, BAX *et al.*, 1986) foram adquiridos usando uma matrix de 300 x 2048 pontos cobrindo 33201.9 x 6265.6 Hz após 256 varreduras para cada incremento. Um tempo de relaxação de 1.5 segundos e uma transferência de coerência otimizada para acoplamentos a distância de 8 Hz foi aplicada. Os dados foram linearmente previstos para 600 x 2048 pontos usando 32 coeficientes antes da transformada de Fourier 2D do tipo eco-anti eco e uma função de janela com forma de sino deslocada por $\pi/2$ na dimensão F1 e $\pi/6$ na dimensão F2 foi aplicada. O espectro final foi obtido por cálculo de magnitude na dimensão F2.

2.11.1. Análise dos dados

Os espectros ^1H RMN e *J*-resolvido foram automaticamente reduzidos a arquivos ASCII usando o programa AMIX (v. 3.7, Bruker Biospin). As intensidades espectrais foram escalonadas para o TMS e reduzidas para as regiões integradas de igual largura (0.04 ppm para ^1H e *J*-resolvido projetado, 0.5 ppm para o HSQC projetada) correspondendo as regiões de δ 0.3-10.00. As regiões de δ 4.7-5.0 e δ 3.28-3.34 foram excluídas das análises por causa do sinal de água e $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ residual, respectivamente. As análises de PCA, HCA e PLS-DA foram realizadas usando o programa SIMCA-P (v. 12.0, Umetrics, Umeå, Sweden). Ambos os métodos de escalonamento, Pareto e Unidade de Variância (UV), foram aplicados ao PCA e PLS-DA.

3. Resultados e Discussões

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. TRATAMENTO DA PLANTA

3.1.1. Coleta e extrato da Planta

Inicialmente foi feito um estudo da distribuição da *M. hirsuta* em todo o semi-árido com base nos dados fornecidos pela Universidade Estadual de Feira de Santana, depois foram escolhidas 5 populações desta espécie com base nas variações ambientais existente nesta região, como altitude, relevo, stress hídrico, solo dentre outros que podem vir a influenciar a variação de metabólitos em uma mesma espécie. Esta espécie foi escolhida a priori pelo programa IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-árido criado em 2002 pelo ministério da ciência e tecnologia-Brasil) para estar inclusa dentre as plantas de ocorrência no semi-árido, com o objetivo de fazer a bioprospecção química e farmacológica. Considerando que esta espécie além de fazer parte de uma família muito promissora em relação aos compostos de interesse pela industria farmacêutica foi visto em uma primeira triagem que esta tem um potencial imunomodulador interessante. Esta espécie ainda é desconhecida quimicamente e por isso foi também escolhida para fazermos o estudo metabolômico.

De acordo com informações etnobotânicas e quimiosistemático, a planta foi selecionada para estudo pelo programa IMSEAR. Desta planta foi obtida uma grande quantidade de extrato etanólico, tornando possível testar metodologias diferentes para separação dos constituintes químicos e algumas atividades biológicas. Assim foi possível escolher o método mais satisfatório.

3.1.2. Partição em fase reversa em carvão ativo do extrato etanólico das folhas da *M. hirsuta*

Este particionamento forneceu bons resultados, mostrando características de um extrato pouco complexo, apresentando poucas manchas e com boa separação das substâncias nas placas de CCD. Estas frações foram submetidas à separação por cromatografia em coluna de sílica. Para guiar o trabalho de isolamento,

realizamos os testes de prospecção fitoquímica paralelamente com os resultados dos bioensaios com estas frações.

3.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATO ETANÓLICO DA *M. hirsuta* D.C.

O resultado da prospecção fitoquímica é mostrado na Tabela 3.1. O teste para a detecção de saponinas baseia-se na formação de espuma em forma de anel. Pode ocorrer a formação de espuma por causa da agitação e oxigenação da água, mas este tipo de espuma não é persistente. Ou pode ainda não ter concentração suficiente para formação de emulsão. No nosso caso a espuma formada foi persistente e abundante, indicando a presença de saponinas e heterosídeos em geral no extrato bruto, e nas frações hidroetanólica e etanólica proveniente da partição. Assim, o teste caracterizou estas frações como as mais importantes caso haja um interesse em isolar estes tipos de compostos da *M. hirsuta* D.C..

Os esteróides e triperpenóides foram identificados pela cor esverdeada no extrato bruto e nas frações de acetato de etila, clorofórmica e hexânica, indicando a presença de esteróides. Caso o interesse seja esse tipo de metabólitos sugere-se que comece das frações apolares citadas.

Os resultados também foram positivos para a presença de fenóis e taninos condensados no extrato bruto, nas frações hidroalcoólica, alcoólica e acetato de etila, devido à formação de precipitado verde característico desse tipo de metabólito. Embora não tenha sido possível identificá-los, não se descarta a possibilidade da ocorrência de taninos hidrolisáveis, uma vez que a cor indicativa da presença dos mesmos nos extratos e frações pode ter sido mascarada pelas reações acima.

A presença de flavonóides e suas subclasses podem ser indicadas pela mudança de cor da solução que os contém uma vez que as mesmas dependem do pH do meio. Assim, uma alteração no equilíbrio ácido-base e as mudanças de cor associadas com a mesma levam à identificação de antocianinas, antocianidinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas. Durante a realização dos testes das classes acima foi detectada alteração de cor no extrato bruto e nas frações hidroalcoólica e alcoólica, com coloração amarelada e avermelhada confirmando a

presença de antocianinas e antocianidinas, além de flavonóides das classes flavonóis, flavononas, flavononóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

Tabela 3.1. Resultados da prospecção feita com Extratos das folhas da *Mansoa hirsuta*.

Constituintes Químicos	Extratos					
	Extrato Etanólico Bruto	Fração hidro-alcoólica	Fração Alcoólica	Fração Acetato de Etila	Fração Cloro-fórmica	Fração Hexânica
Fenóis e taninos	+	+	+	+	-	-
Esteróides e triterpênos	+	-	-	+	+	+
Saponinas	+	+	+	-	-	-
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Flavonóis, flavanonois, flavanonas e xantonas	+	+	+	-	-	-
Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	+	+	+	+	-	-

Legenda: Positivo = +; Negativo = -.

Obs.: Os resultados tratados como negativo referem-se aos testes que não demonstraram nenhum indício de reação aos métodos propostos.

O reagente de Dragendorff é usado em geral como revelador da presença de alcalóides em extratos vegetais. Nas triagens feitas na família das Bignoniáceas não foram encontrados alcalóides. No presente estudo, os extratos de folha de *M. hirsuta* não reagiram com o reativo de Dragendorff, indicando a ausência de alcalóides nas folhas desta espécie.

3.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os extratos de *M. hirsuta* foram submetidos a vários testes para estabelecer seu potencial biológico. Os ensaios para atividades larvicidas, moluscicida e anticolinesterásica não apresentaram resultados significantes.

3.3.1. Atividade citotóxica das frações das folhas de *M. hirsuta*

A avaliação da citotoxicidade foi testada para a escolha das concentrações dos extratos a serem utilizados nos ensaios posteriores como imunomodulação e antiparasitários. As concentrações escolhidas foram aquelas que produziram um nível citotóxico menor que 30%. Foi determinada a concentração de 0,01 mg/mL para as frações H₂O/EtOH 1:1, que não apresentou níveis citotóxicos, CHCl₃ apresentando 29,79%, C₆H₁₄ com nível citotóxico de 3,19% e AcOEt com 18,62%. Este experimento faz-se necessário para racionalizar a pesquisa de fitofármacos, direcionada na busca de compostos naturais mais ativos e menos tóxicos ou com um risco/benefício menor que as drogas disponíveis no mercado farmacêutico atual.

3.3.2. Atividade contra formas promastigotas de *Leshmania amazonensis* pelas frações das folhas de *M. hirsuta*

Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados na presença ou ausência dos extratos durante 24h. A viabilidade foi mensurada com base no metabolismo da MTT pelas enzimas mitocondriais do parasito, uma vez que esta metodologia oferece rapidez aos ensaios. As formas testadas dos parasitos utilizados nos ensaios foram devido à facilidade de crescimento e obtenção dos mesmos. Alguns extratos apresentavam coloração, fato que pode interferir na absorvância das amostras. A correção foi efetuada analisando-se as placas ao microscópio com confirmação através de contagem, na tentativa de observar a viabilidade dos parasitos e comparar posteriormente com os resultados do método de metabolismo da MTT. Nenhum extrato mostrou efeito significativo sobre as formas promastigotas do parasito, uma vez que os percentuais foram menores que 60%, o que é preconizado pela Fundação Oswaldo Cruz (Bahia) como porcentual ideal mínimo de

atividade para que um extrato ou substância seja considerado um bom candidato a um novo fármaco.

3.3.3. Atividade contra formas epimastigotas do *T. cruzi* pelas frações das folhas de *M. hirsuta*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram incubadas na presença ou ausência dos extratos durante 24h, sendo também tratadas de acordo com o método do MTT previamente descrito. As formas testadas dos parasitos utilizados nos ensaios foram escolhidas pelos mesmos motivos daquelas de *L. amazonensis* e a cor dos extratos também foi corrigida para reduzir as interferências na absorvância. A fração H₂O/EtOH não foi ativa contra o parasito, enquanto as frações EtOH, AcOEt e CHCl₃ apresentaram percentagens de inibição do crescimento do mesmo de 19,89, 16,20 e 12,32%, respectivamente. A partir desses resultados obtidos podemos descartar a possibilidade de haver compostos bioativos nas frações testadas, considerando que as percentagens de inibição do crescimento do parasito foram menores que os 60% preconizados como mínimo aceitável.

3.3.4. Inibição da produção de óxido nítrico pelas frações das folhas de *M. hirsuta*

Macrófagos do exudato peritoneal de camundongos foram estimulados com IFN- γ e LPS na presença ou ausência dos extratos, durante 24h. A produção de óxido nítrico foi estimada através da dosagem de nitrito pelo método de Griss. Os resultados foram obtidos por dosagem de valores do controle estimulado e cultivado na ausência dos extratos e frações.

Uma inibição significativa da produção de óxido nítrico foi causada pela fração acetato de etila (57,92%, 0,01 mg/mL), enquanto as frações H₂O/EtOH, EtOH e CHCl₃ inibiram a produção de NO entre 5-14%. A fração acetato de etila foi então trabalhada no intuito de isolar o composto responsável por tal atividade. Compostos inibidores de NO geralmente tem potencial imunomodulador, e no caso deste trabalho observa-se que a mesma fração de acetato de etila com atividade inibidora deste radical livre, possui também efeito inibidor de linfócitos (COSTA, 2004).

3.3.5. Inibição da linfoproliferação das frações das partições das folhas de *M. hirsuta*.

Células de baço de camundongo foram estimuladas pelo mitógeno concanavalina A na presença ou ausência das frações durante 48h. A inibição da linfoproliferação foi determinada com base nos valores de incorporação de timidina tritiada por células estimuladas e na ausência das frações. No caso específico da linfoproliferação, deve-se considerar que existe uma remota possibilidade de uma ação inespecífica das substâncias presentes nas frações, que podem agir de forma a impedir que a concanavalina A ligue-se às moléculas que levam a estimulação dos linfócitos, e não por um mecanismo direto de inibição da ativação linfocitária.

Para confirmar o efeito supressor, as frações foram submetidas a ensaios de linfoproliferação por estimulação com antígeno e de reações mistas linfocitárias nas quais poderá ser observada a existência ou não da atividade em questão. Os resultados obtidos foram 65, 39,71, 8,74, 48,05 e 99,92% para o extrato bruto e as frações H₂O/EtOH, EtOH, CHCl₃ e AcOEt, respectivamente, sendo este último o resultado mais significativo e promissor. No presente estudo, a fração AcOEt foi mais ativa que o extrato bruto, o que pode ser explicado pelos efeitos antagônicos das diferentes substâncias presentes no mesmo, que uma vez separadas, mostraram maior potencial imunomodulador. Substâncias imunossupressoras podem ser utilizadas em transplantes e doenças auto-imunes, que são patologias que nos dias de hoje não existem nenhum tipo de cura, apenas paliativos. Por isso esta foi uma das frações que foram trabalhadas, a fim de isolar o composto responsável por esta atividade.

3.3.6. Atividades biológicas da fração acetato

Uma vez que a fração acetato exibiu o maior percentual de inibição de linfoproliferação, a mesma foi reparticionada em coluna de sílica gel de onde foi obtida uma subfração apolar oleosa, que de acordo com Rocha *et al.* (2004) apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium*. Sendo assim, esta subfração foi submetida aos testes biológicos mencionados anteriormente e não mostrou efeito significativo sobre as formas *in vitro* dos

parasitas *L. amazonensis* (3,38%) e *T. cruzi* e sobre a inibição da produção do radical NO (14,18%). A mesma também não apresentou atividade de inibição da linfoproliferação causada pela concanavalina A, indicando que ela não contribui para este efeito previamente observado na fração acetato.

Duas substâncias, codificadas como MHFA1 e MHFA2, também foram isoladas da fração acetato e foram identificadas posteriormente como sendo os triterpenos pentacíclicos ácido oleanólico e ácido ursólico. Estes triterpenos apresentaram potencial imunossupressor uma vez que eles reduziram tanto a linfoproliferação como a produção de NO, como pode ser visto na Tabela 3.2. Não foi possível calcular os valores de LC50 para ambos os ácidos isolados a partir dos resultados obtidos, o que indica que os valores de LC50 são superiores a 100 µg/mL, a maior concentração testada, o que está de acordo com o trabalho de Costa *et al.* (2008).

Tabela 3.2. Atividades biológicas dos triterpenos pentacíclicos isolados da fração acetato de folhas de *M. hirsuta*.

Substância	Citotoxicidade (%)	IC50 Linfoproliferação (µg/mL)	Inibição da linfoproliferação (%)	Inibição do NO (%)
Ácido oleanólico	70,8	8,51	99,35	41,5
Ácido ursólico	69,9	2,80	99,17	44,1

3.3.7. Atividades biológicas de MHFC1

A fração CHCl₃ também apresentou atividade imunomoduladora, embora inferior à fração AcOEt, e por isso também foi reparticionada em coluna de sílica gel o que levou ao isolamento de uma substância codificada MHFC1, que foi revelada como sendo uma mistura dos esteróides estigmasterol e β-sitosterol após análise por RMN. Esta mistura somente apresentou atividade inibitória da produção de NO (28,02%), a qual foi superior ao observado para fração antes do reparticionamento, o que pode novamente ser explicado pelos efeitos antagônicos das diferentes moléculas presentes na fração.

3.4. CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

3.4.1. Análise dos voláteis

A análise por GC-MS dos voláteis obtidos das folhas de *M. hirsuta* por Clavenger usando hexano como solvente de extração mostrou a presença de uma série homologa de *n*-alcanos e suas olefinas correspondentes. A comparação dos dados espectrais com aqueles da biblioteca Wiley do aparelho indicou que estes alcanos tinham alto peso molecular e pertenciam às famílias *n*-C21, *n*-C22, *n*-C23, *n*-C25, *n*-C27 e *n*-C29 com tempos de retenção de 68,0, 69,2, 70,1, 72,2, 74,3 e 76,0 minutos e abundâncias de 4,6, 1,6, 29,3, 6,2, 5,3 e 4,9%, respectivamente, com as olefinas homologas, predominantemente ímpares, na mesma faixa. As olefinas foram identificadas pela presença de picos com diferença de 2 *m/z* quando comparados com o *n*-alcano correspondente, o que é característico da presença de uma ligação dupla na molécula (SILVERSTEIN & WEBSTER, 1997).

A análise dos voláteis obtidos com diclorometano revelou a presença de três compostos principais com tempos de retenção de 36,7, 51,6 e 64,3 minutos e abundâncias de 36,2, 29,6 e 5,3%, respectivamente, que não estavam na mesma série homologa. Novamente, a comparação com a biblioteca Wiley permitiu a identificação destes picos como sendo o 2-metil-3-heptanol, isobutirato isobutílica e 3-hexadecanol. Séries de alcoóis secundários e terciários, tais como 4-metil-2-pentanol e 4-metil-3-hexanol, foram previamente identificadas nas folhas de *M. hirsuta* por CG-MS em diclorometano e outros solventes apolares (ROCHA *et al.*, 2004).

3.4.2. Análise da subfração oleosa obtida da fração acetato de etila

O reparticionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna de sílica gel levou a obtenção de duas subfrações, sendo uma delas em hexane:acetato de etila 10% e a outra uma subfração oleosa codificada como OBA1.

A análise de OBA1 por CG-MS revelou a presença de quatro compostos principais, como mostrado na Figura 3.1. Três destes compostos foram identificados

como ésteres de ácidos graxos, que foram caracterizados pela perda de um fragmento m/z 88 $[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3]^+$ resultante da clivagem da carbonila α - β . O fragmentograma 3.1B sugere que o pico 1 do cromatograma 3.1A é o éster etílico do ácido hexadecanóico (ácido palmítico, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$) com tempo de retenção de 18,8 minutos e abundância de 35,1% e M^+ 284. O pico 2 (Figura 3.1A e 3.1C) foi caracterizado como o éster etílico do ácido octadecanóico (ácido esteárico, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$) com um tempo de retenção de 20,8 minutos e abundância de 30% e M^+ 312. Os picos 3 e 4 mostraram tempos de retenção de 20,3 e 20,5 minutos, respectivamente, e foram caracterizados como os ésteres etílicos dos ácidos 9,12-octadecadienóico (ácido linoléico, Figura 3.1A e 3.1D) e 9,12,15-octadecatrienóico (ácido linolênico, Figure 3.1A e 3.1E) com M^+ de 308 e 306, respectivamente. Ambos os ácidos apresentaram abundâncias de 28,5%.

A cromatografia em coluna de sílica gel de OBA₁ produziu cinco subfrações codificadas OBA1.1, OBA1.2, OBA1.3, OBA1.4 and OBA1.5. A subfração OBA1.1, resultante da extração com hexano, continha todos os compostos do óleo bruto, enquanto as outras subfrações não produziram picos na análise por CG-MS.

A hidrólise com hidróxido de potássio de OBA1 resultou na mistura dos ácidos graxos mencionados acima na forma livre. A presença de ácido graxos foi também confirmada quando a solução resultante da metilação foi analisada, uma vez que os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos correspondentes, que foram caracterizados pela perda do fragmento m/z 74 $[\text{CH}_3\text{COOCH}_3]^+$. Assim, o éster metílico do ácido 9-octadecenoico (ácido oléico), que não foi previamente detectado no óleo bruto ou na subfração OBA1.1, foi agora observado.

Quando a fração ácida foi sililada com BSTFA, ésteres trimetilsililanos dos ácidos palmítico, esteárico, linolênico, linoléico e palmitoléico foram identificados. Este último ácido também não foi previamente detectado em qualquer das frações analisadas. Todos os derivados sililados foram caracterizados pela presença do fragmento m/z 73 referente ao grupo trimetilsilil.

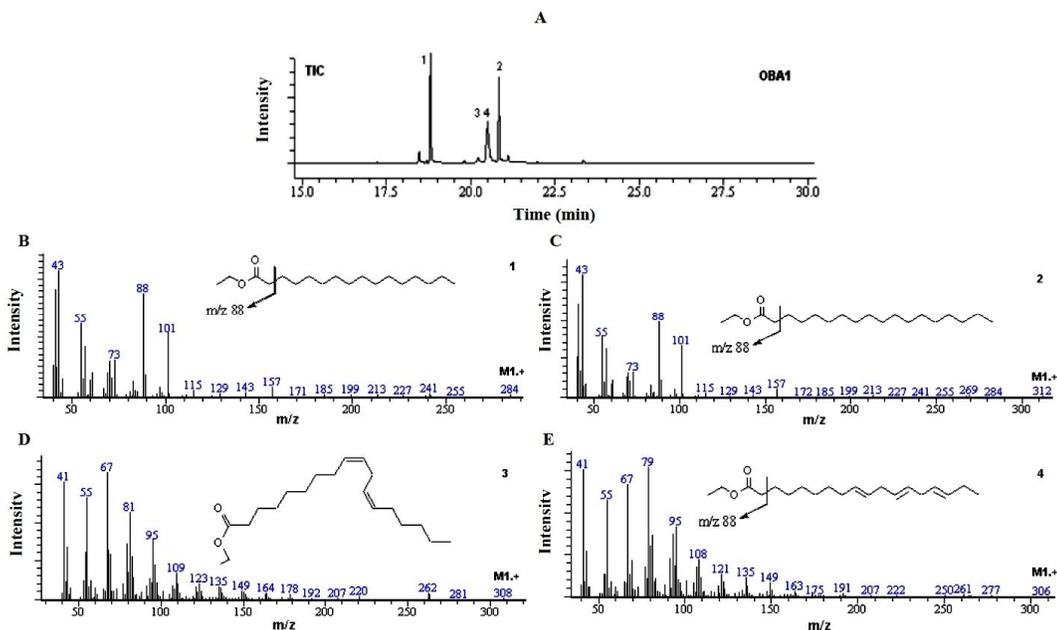


Figura 3.1. Cromatogramas da subfração oleosa obtida da fração acetato de etila (A) e fragmentogramas dos ésteres etílicos dos ácidos palmítico (B), esteárico (C), linoléico (D) e α -linolênico (E).

3.4.3. Análise do etanol recuperado do extrato bruto

Dois sulfetos com diferentes tempos de retenção foram detectados quando o etanol recuperado da preparação do extrato etanólico bruto foi analisado por CG-MS, como mostrado na Figura 3.2. Estes compostos foram identificados como dissulfeto de dialila (pico 1, tempo de retenção de 6,8 minutos, abundância de 27%, M^{+} 146, $C_6H_{10}S_2$) e o trissulfeto de dialila (pico 2, tempo de retenção de 11.2 minutos, abundância de 51,1%, M^{+} 178, $C_6H_{10}S_3$). A Figura 3.3 propõe um mecanismo de fragmentação para estes dois sulfetos.

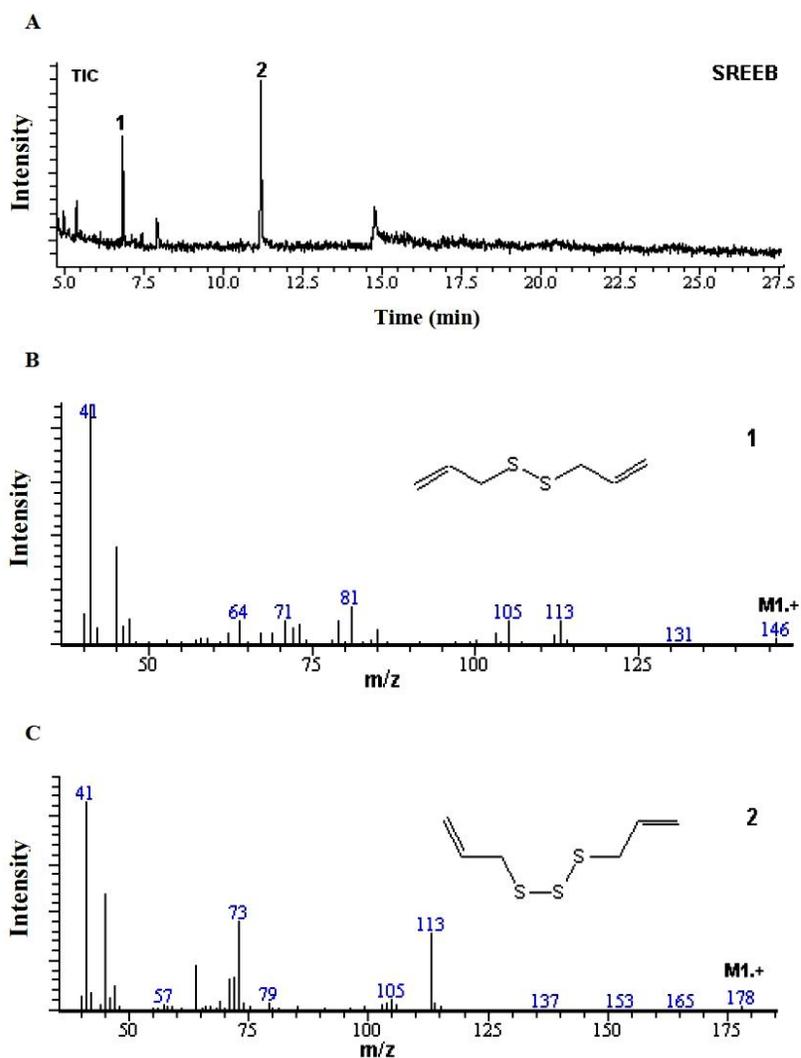


Figura 3.2. Cromatograma do extrato etanólico bruto (A) e fragmentogramas dos dissulfetos dialila (B) e trissulfeto dialila (C).

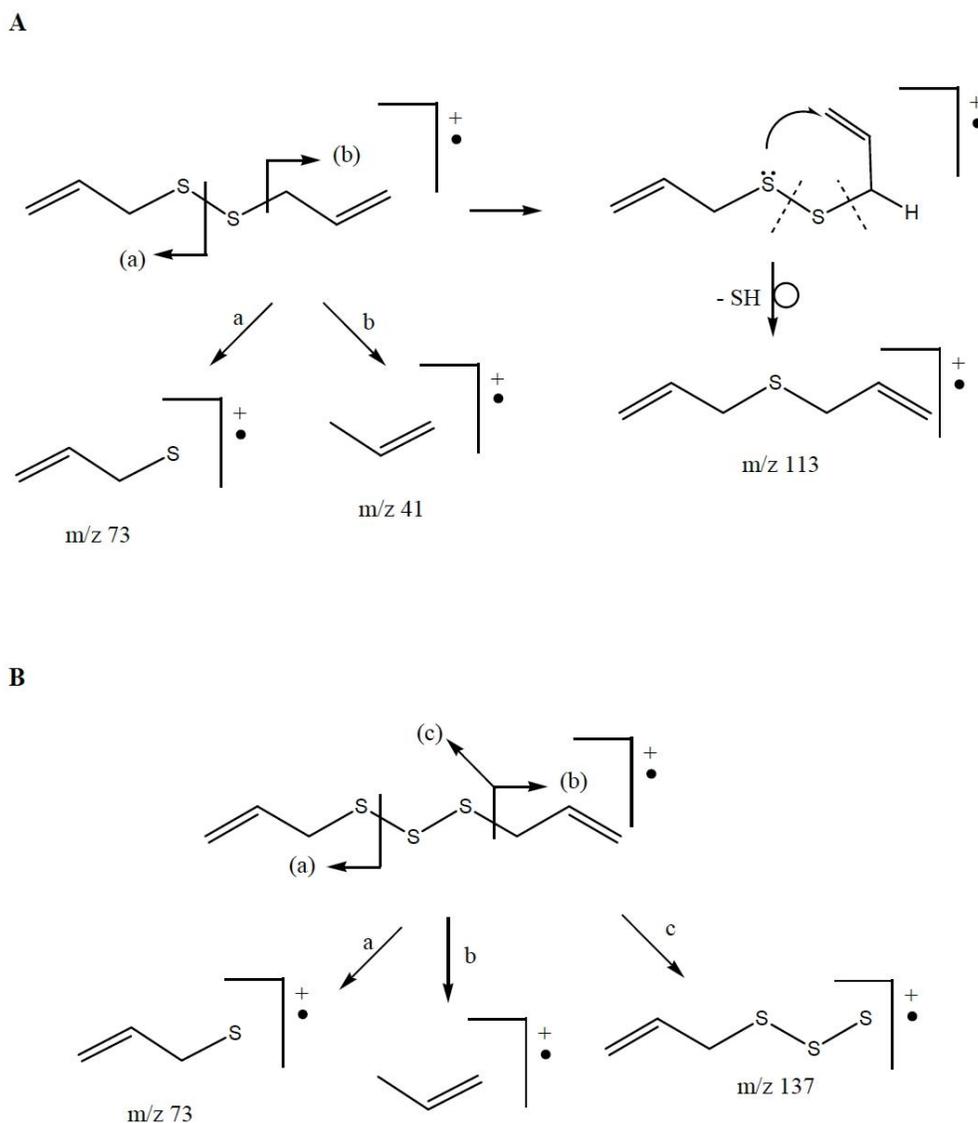
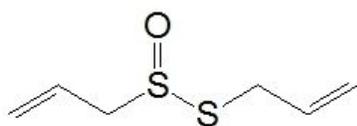


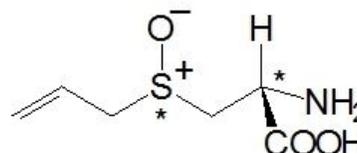
Figura 3.3. Mecanismo de fragmentação proposto para o dissulfeto de dialila (A) e trissulfeto de dialila (B).

O alho e a cebola são popularmente usados no Brasil como condimentos, mas vários estudos foram realizados com vistas a estabelecer o potencial terapêutico dessas plantas (TSAO *et al.*, 2003). Estes estudos atribuíram as muitas atividades biológicas destas plantas à presença de compostos sulfurados na sua composição química, principalmente entre os voláteis (TSAO *et al.*, 2003; CUTLER & WILSON, 2004). A molécula básica do aroma destas plantas é a alicina (**13**), um dissulfeto oxigenado. De acordo com CUTLER & WILSON (2004), a alicina é o

principal agente antimicrobiano do alho e é o precursor da alina (**14**), cuja reação é catalisada pela enzima alinase quando os dentes de alho são esmagados. Os autores testaram duas formulas em creme contendo alicina, que se mostraram mais efetivas no tratamento de infecções causadas por uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilciclina do que a mupirocina, que é a droga de escolha para o tratamento destas infecções.



13



14

Os sulfetos de dialila isolados do extrato etanólico bruto de *M. hirsuta* são derivados desoxigenados da alicina, que apresentaram atividade antitumoral (MANIVASAGAM *et al.*, 2005) e mostraram atividade contra a levedura *Candida albicans* (TSAO e YIN, 2001), além de serem usados no controle de *Sclerotium cepivorum*, um parasita da cultura de alho (TYSON *et al.*, 2000). Assim, estes dois compostos, que dão o cheiro característico do alho e são responsáveis pelos efeitos biológicos atribuídos ao óleo extraído do alho, justificam o nome popular da *M. hirsuta* conhecida como cipó d'alho ou alho bravo por ter aroma semelhante (BLOCK, 1996).

3.5. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

3.5.1. MHFA1

A substância codificada de **MHFA1** apresentou-se como um sólido branco amorfo, de ponto de fusão 291-292 °C (CHCl₃/MeOH).

- Infra Vermelho (IV)

A carbonila carboxílica e o grupo hidroxila da substância codificada como MHFA1, foram confirmados por espectro do composto na região do infravermelho (IV) (Figuras 3.4), o qual revelou bandas de absorção de estiramento e deformação sugerido grupo hidroxílico ($3442,69\text{ cm}^{-1}$) e carbonila ($1692,82\text{ cm}^{-1}$) (MAHATO & KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

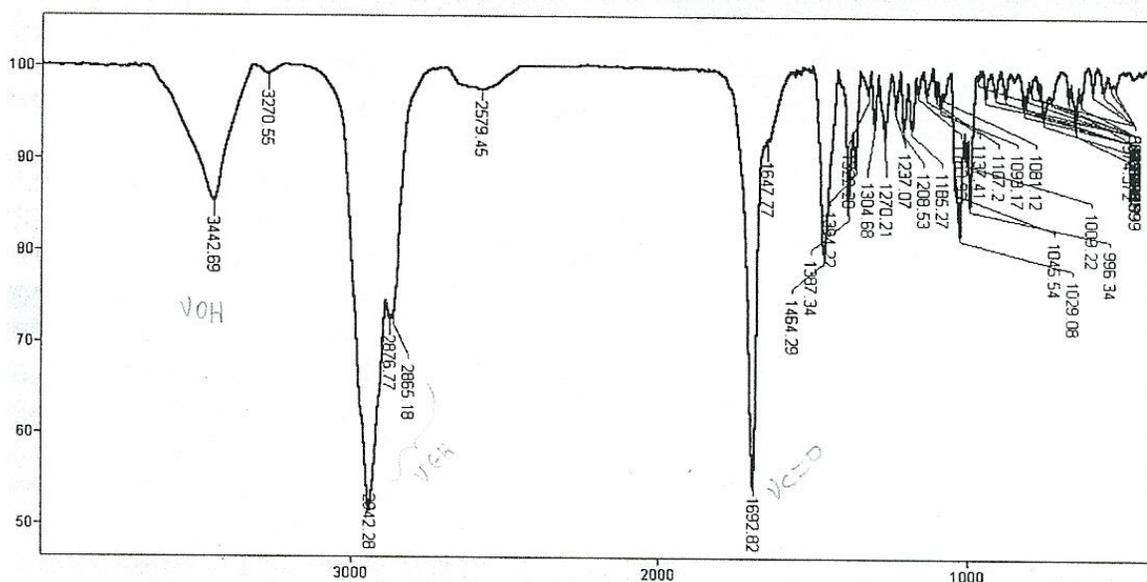


Figura 3.4. Espectro da Substância MHFA1 na Região do Infravermelho.

- RMN 1D

A análise do espectro de RMN ^1H da substância codificada como MHFA1, de cor branca (Figura 3.5), mostrou 7 sinais na região mais blindada entre δ 1,26 e 1,63; todos simpletos (s) (δ 1,46; δ 1,26; δ 1,40; δ 1,27; δ 1,63; δ 1,39; δ 1,42) referentes aos prótons de grupos metilas ligados a carbonos não hydrogenados (Figura 3.5); um sinal em δ 3,67 na forma de um duplo duplete (dd) com constante de acoplamento (J) ($J=7,20\text{ Hz}$ e $J=13,20\text{ Hz}$) relativo ao hidrogênio carbinólico que está orientado em estereoquímica β e acoplado com os hidrogênios δ 1,42 e δ 2,07; um sinal em δ 5,76 tripleto (t) com $J=3,60\text{ Hz}$, relativo ao hidrogênio olefínico acoplado com os hidrogênios δ 1,42 e δ 2,36 (Figura 36) (ARAÚJO & CHAVES,

2005). Neste espectro foram identificados, com o auxílio do HSQC e do COSY, 21 sinais na forma de multipletos (m), sendo 20 deles relativos aos prótons de grupos metilenos H (δ 1,46; 2,11), H (δ 1,42; 2,07), H (δ 1,87; 2,02), H (δ 1,80; 1,95), H (δ 1,42; 2,36), H (δ 2,09; 2,45), H (δ 1,57; 2,20), H (δ 1,63; 2,12), H (δ 1,69; 1,83), H (δ 2,04; 2,22) e um sinal relativo ao próton de grupo metínico H (δ 2,05). Foram identificados ainda um sinal relativo ao hidrogênio H (δ 1,23; $J=10,60$ Hz) na forma de um duplete (d), e um sinal relativo ao hidrogênio H (δ 3,33; $J=4,16$ Hz e $J=3,64$ Hz) na forma de um duplo duplete (dd), sendo estes sinais referentes a prótons de grupos metínicos. Todos os deslocamentos químicos dos sinais do espectro de ^1H encontram-se na Tabela 3.3.

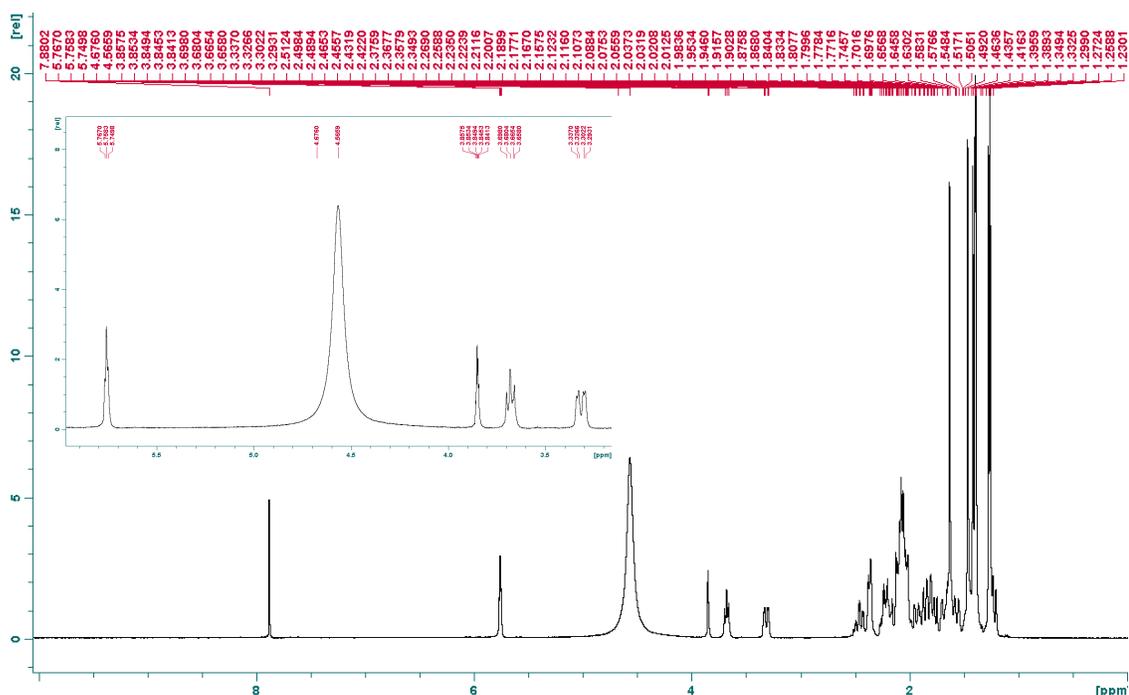


Figura 3.5. Espectro de RMN ^1H de MHFA1 com Expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1

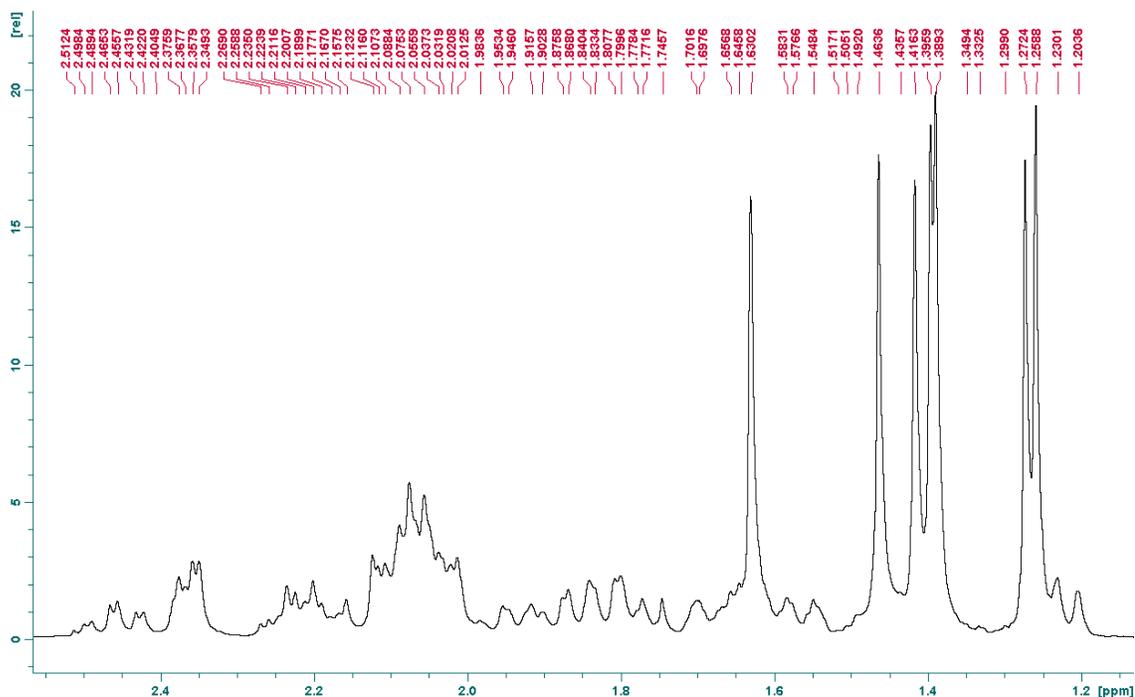


Figura 3.6. Expansão do Espectro de RMN H^1 de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3:1

A análise dos espectros de ^{13}C (Figuras 3.7 e 3.8), DEPT 90 (Figuras 3.9) e DEPT 135° (Figuras 3.10 e 3.11) da substância MHFA1 conferiram uma indicação de esqueleto oleanânico mostrando a presença de 30 átomos de carbonos: sendo 7 grupos metila (CH_3) e 10 grupos metilenos (CH_2), segundo o DEPT de 135°, 5 grupos metínicos (CH), conforme o DEPT de 90° e 8 carbonos não hidrogenados (C), sendo um deles um grupo carbonila, segundo o espectro C^{13} por diferença com os DEPTs de 90° e 135° (SILVA, 2006; SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

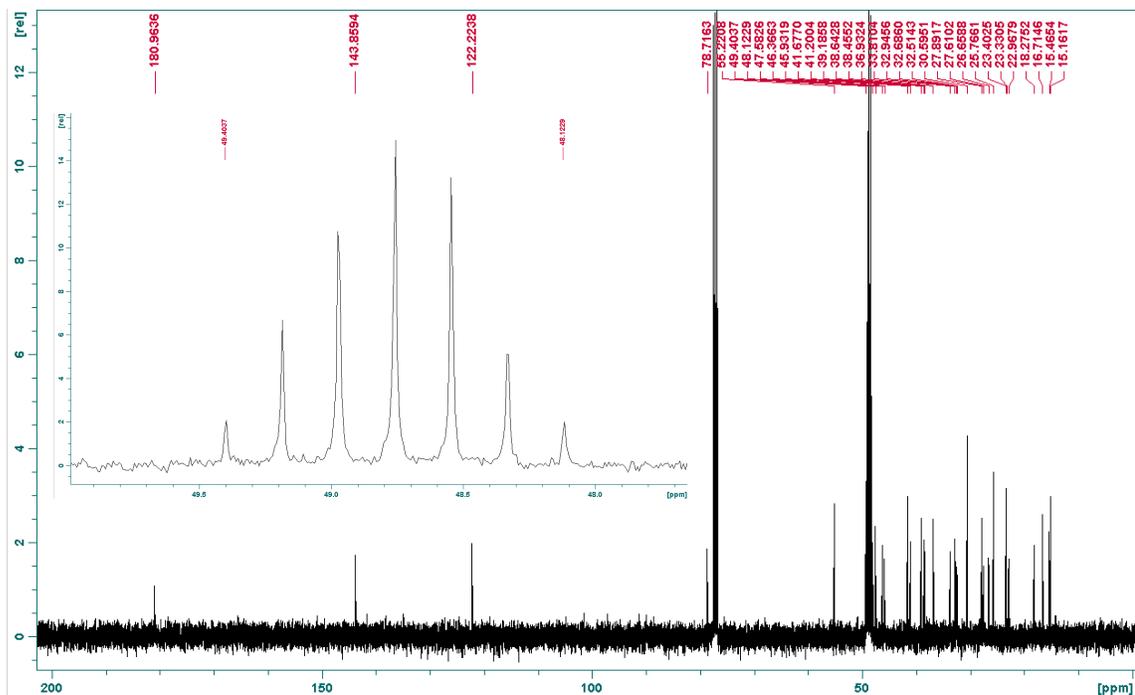


Figura 3.7. Espectro de RMN C¹³ de MHFA1 com Expansão, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1

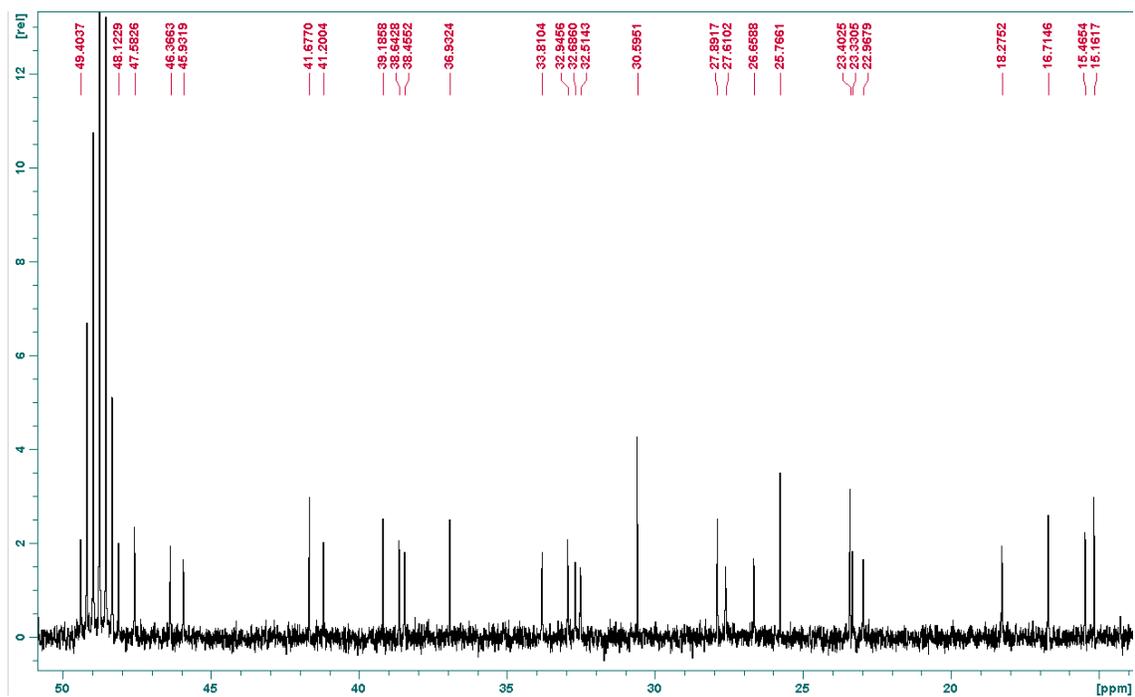


Figura 3.8. Expansão do Espectro de RMN C¹³ de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1

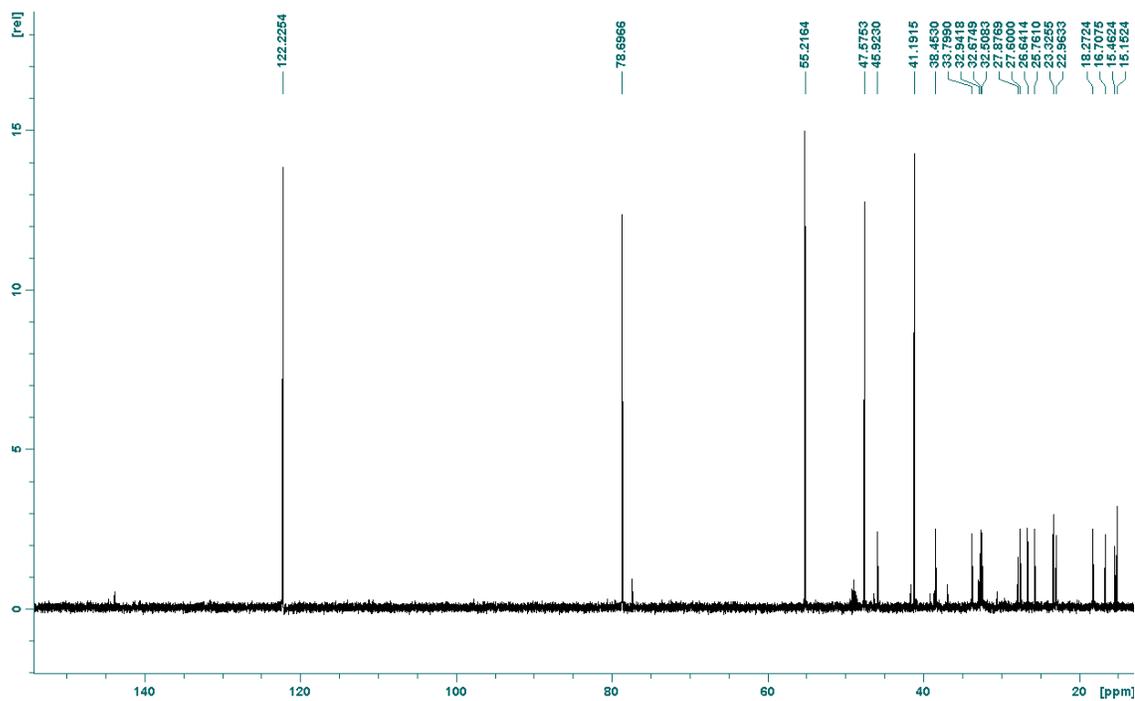


Figura 3.9. Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1

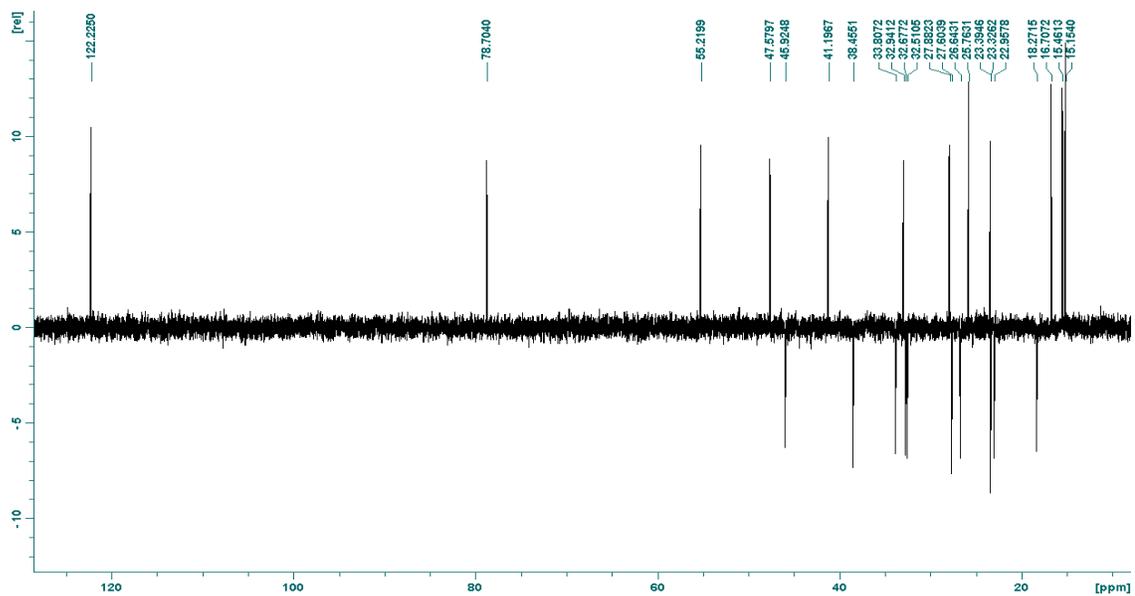


Figura 3.10. Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1

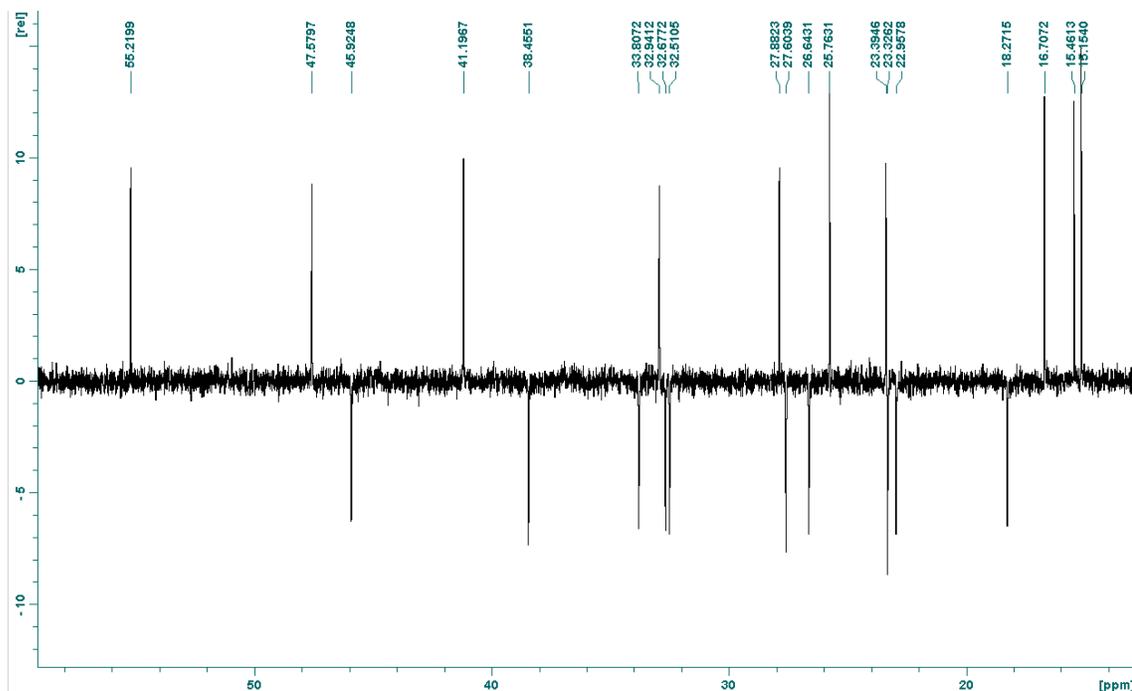


Figura 3.11. Expansão do Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.7) mostra também a presença do carbono carbinólico com deslocamento químico em δ 78,72 e ainda os deslocamentos químicos dos carbonos da ligação dupla C (δ 122,22) e C (δ 143,86), carbonos vinílicos, ligação esta característica dos esqueletos ursânico e oleanânico (JUNGES *et al.*, 1999; MAHATO & KUNDU, 1994).

A MHFA1 apresenta o carbono da carbonila carboxílica com deslocamento químico em δ 180,96. A análise completa dos deslocamentos químicos do RMN ^{13}C encontra-se na Tabela 3.3.

- Determinação estrutural da substância codificada como MHFA1, usando espectros de RMN bidimensionais.

Para fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas unidimensionais e dados de possíveis compostos similares da literatura, foram utilizados as técnicas bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), que permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$; $^nJ_{\text{C,H}}$) ou espacial (H,H- ou H,C -NOE) entre si (KAISER, 2000).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C demonstraram a natureza dos prótons e dos C-13. Os espectros de ^{13}C e DEPTs de 90° e 135° possibilitaram a proposta de numeração dos sinais dos carbonos (Tabela 3.3). Já a proposta de numeração dos sinais dos prótons foi feita via HSQC (Figura 3.12 e 3.13), que mostrou a correlação direta destes com os seus respectivos carbonos (Tabela 3.3, p. 84).

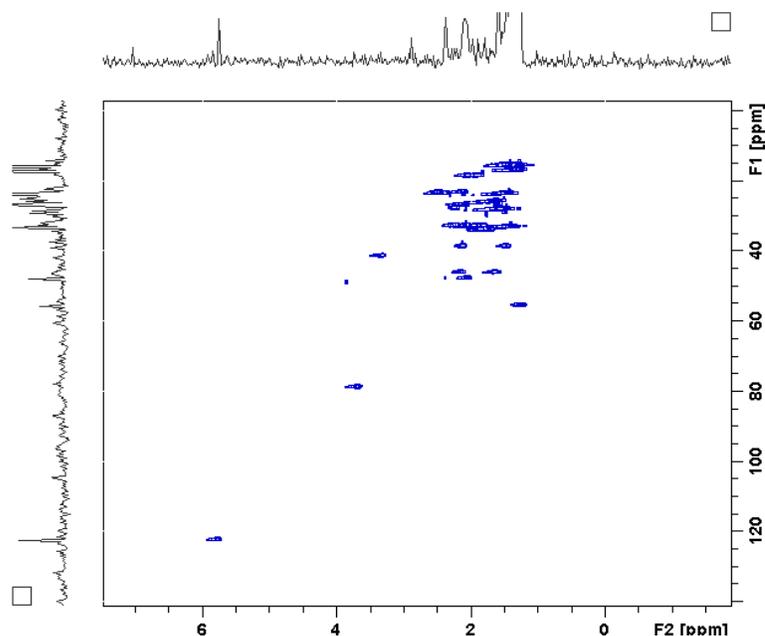


Figura 3.12. Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

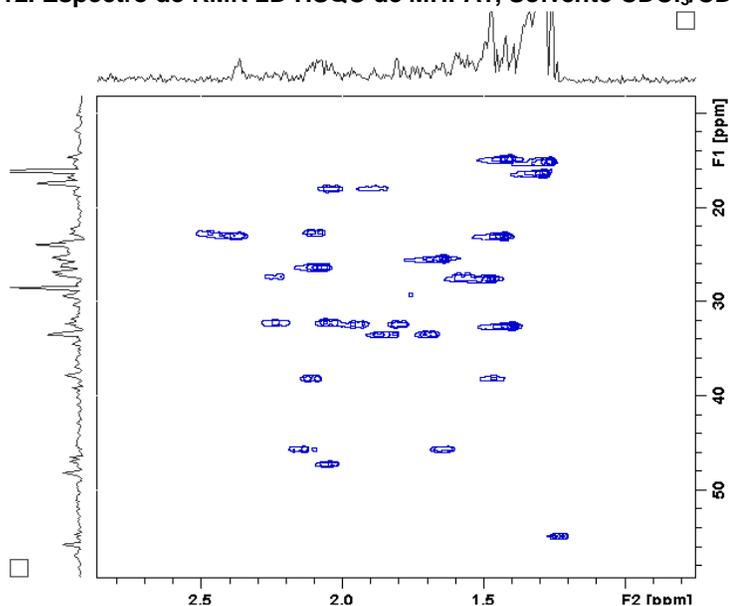


Figura 3.13. Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

Através do espectro de HSQC observou-se as correlações do hidrogênio carbinólico (δ 3,67) com o carbono δ 78,72; do hidrogênio vinílico (δ 5,76) com o carbono δ 122,22 e dos hidrogênios metílicos (δ 1,26; 1,27; 1,39; 1,40; 1,42; 1,46; 1,63) com os seus respectivos carbonos (δ 15,46; 16,71; 32,95; 15,16; 23,40; 27,89; 25,77). As outras correlações estão descritas na Tabela 3.3.

O espectro de RMN de COSY (Figuras 3.14 a 3.17) mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por ${}^{2-3}J_{H,H}$ (acoplamentos germinais e vicinais) e ainda por ${}^{4-6}J_{H,H}$, permitindo assim a montagem de microfragmentos da estrutura.

Acoplamentos geminais: H_{1A} (δ 1,46) e H_{1B} (δ 2,11), H_{2A} (δ 1,42) e H_{2B} (δ 2,07), H_{7A} (δ 1,80) e H_{7B} (δ 1,95), H_{15A} (δ 2,09) e H_{15B} (δ 2,45), H_{16A} (δ 1,57) e H_{16B} (δ 2,20), H_{19A} (δ 1,63) e H_{19B} (δ 2,12), H_{21A} (δ 1,69) e H_{21B} (δ 1,83), H_{22A} (δ 2,04) e H_{22B} (δ 2,22).

Acoplamentos vicinais: H_{1A} (δ 1,46) e H_{2B} (δ 2,07), H_{2B} (δ 2,07) e H₃ (δ 3,67), H_{2A} (δ 1,42) e H₃ (δ 3,67), H₅ (δ 1,23) e H_{6A} (δ 1,87), H₅ (δ 1,23) e H_{6B} (δ 2,02), H_{6B} (δ 2,02) e H_{7A} (δ 1,80), H_{6B} (δ 2,02) e H_{7B} (δ 1,95), H₉ (δ 2,05) e H_{11A} (δ 1,42), H₉ (δ 2,05) e H_{11B} (δ 2,36), H_{11A} (δ 1,42) e H₁₂ (δ 5,76), H_{11B} (δ 2,36) e H₁₂ (δ 5,76), H_{15B} (δ 2,45) e H_{16A} (δ 1,57), H_{15B} (δ 2,45) e H_{16B} (δ 2,20), H₁₈ (δ 3,33) e H_{19A} (δ 1,63), H₁₈ (δ 3,33) e H_{19B} (δ 2,12), H_{21A} (δ 1,69) e H_{22A} (δ 2,04), H_{21A} (δ 1,69) e H_{22B} (δ 2,22), H_{21B} (δ 1,83) e H_{22A} (δ 2,04), H_{21B} (δ 1,83) e H_{22B} (δ 2,22).

Hidrogênios acoplados por ${}^{4-6}J_{H,H}$: H₂₃ (δ 1,46) e H₂₄ (δ 1,26), H₁₂ (δ 5,76) e H₁₈ (δ 3,33), H_{22B} (δ 2,22) e H_{16A} (δ 1,57)

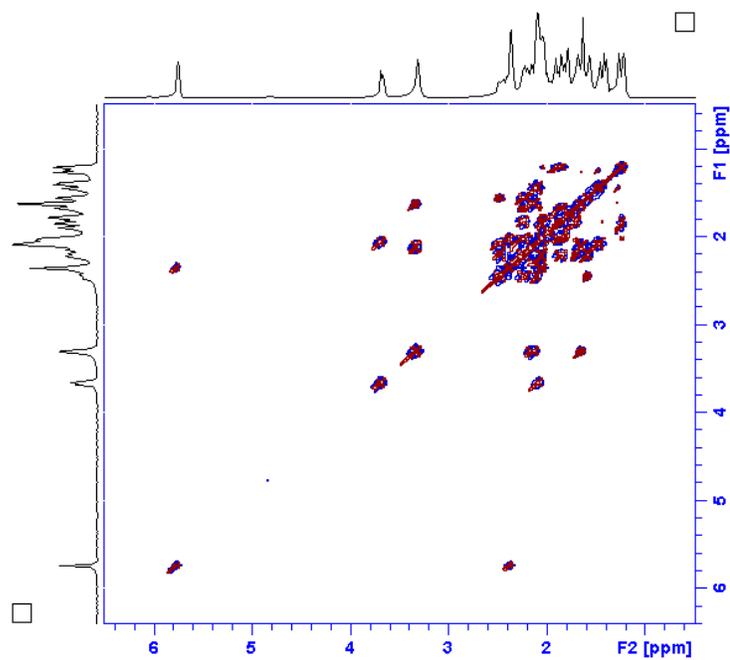


Figura 3.14 Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

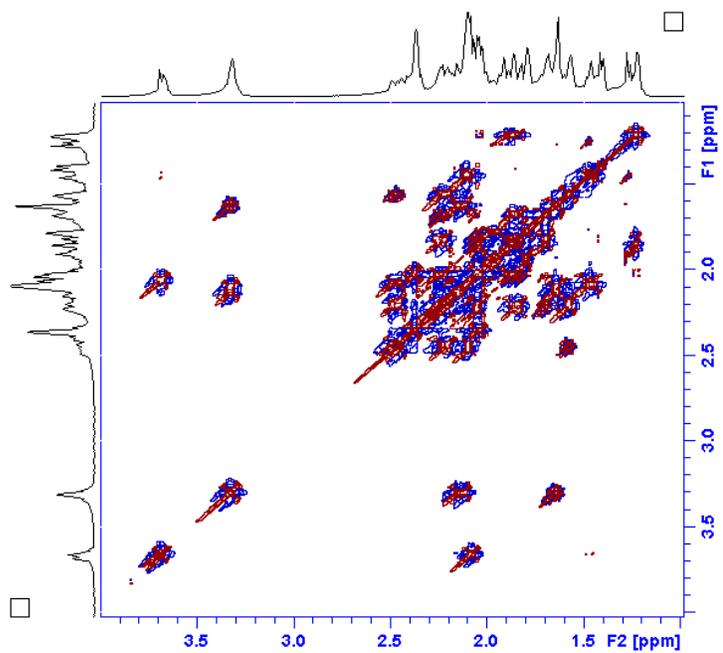


Figura 3.15. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

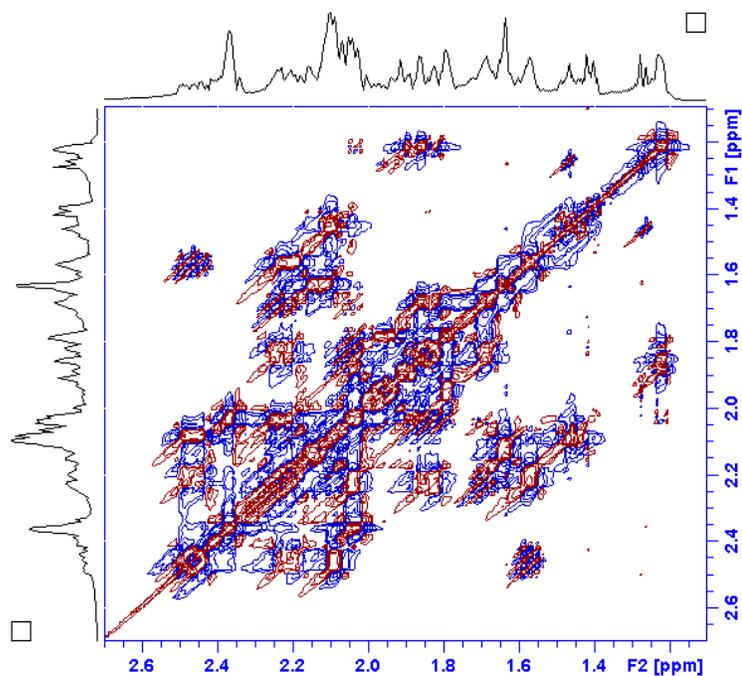


Figura 3.16. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

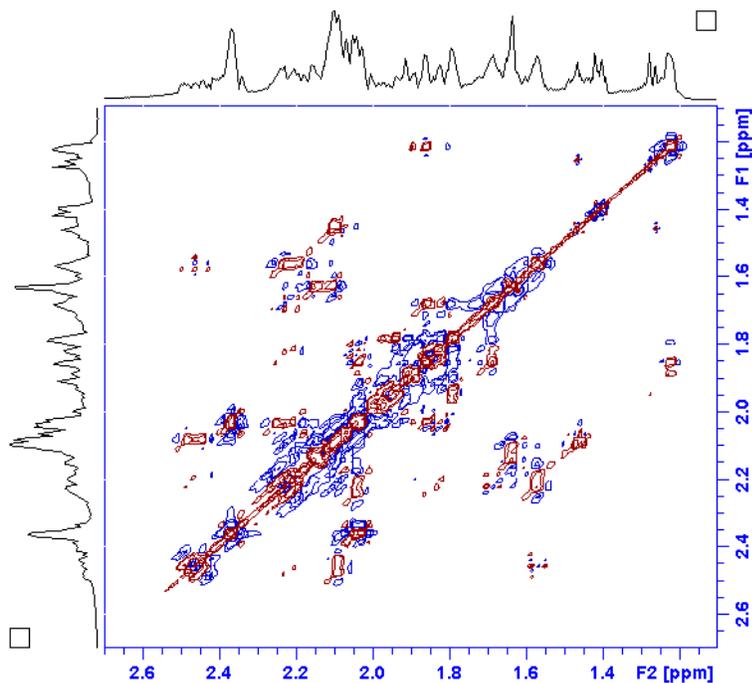


Figura 3.17. Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1 .

Os dados obtidos a partir do espectro HMBC (Figuras 3.18 a 3.22) foram os responsáveis pela união dos fragmentos, já que existem interações com átomos de carbono que não possuem hidrogênio na montagem da molécula. O espectro NOESY (Figuras 44 a 46) ajudou na indicação da estereoquímica.

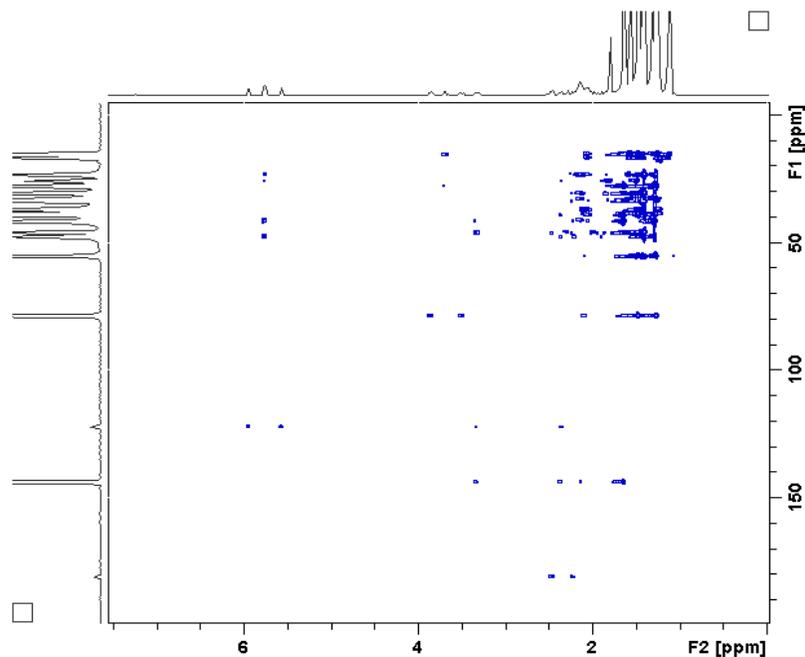


Figura 3.18. Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

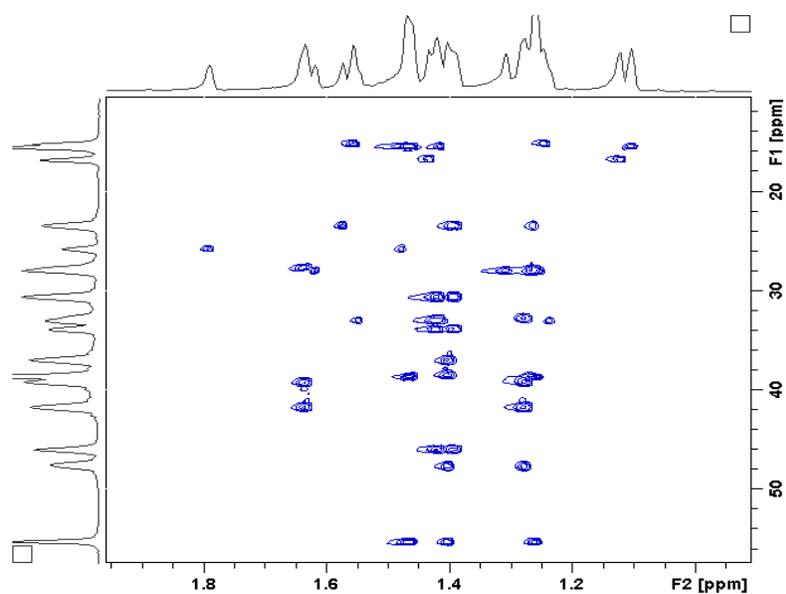


Figura 3.19. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1

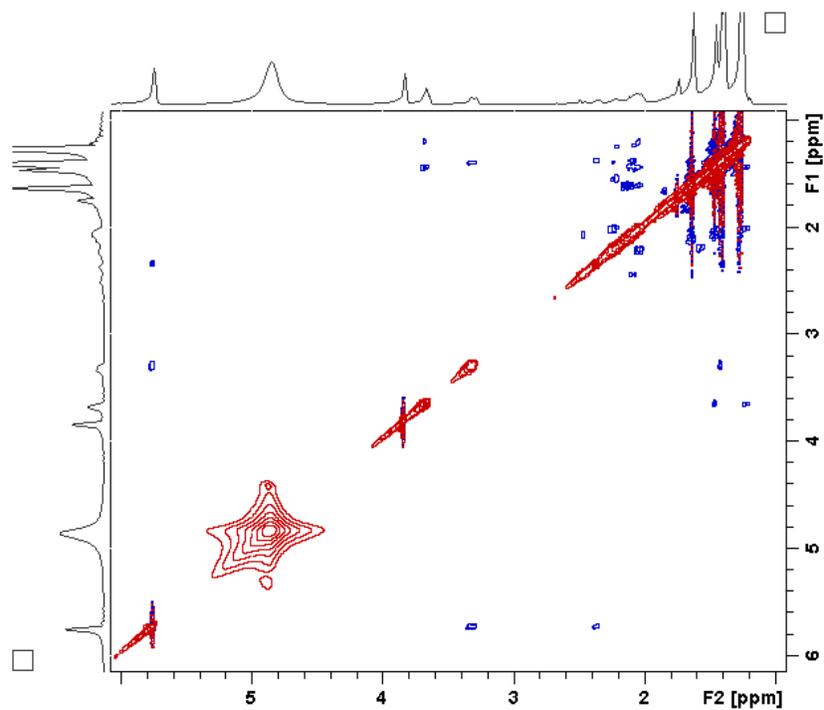


Figura 3.20. Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

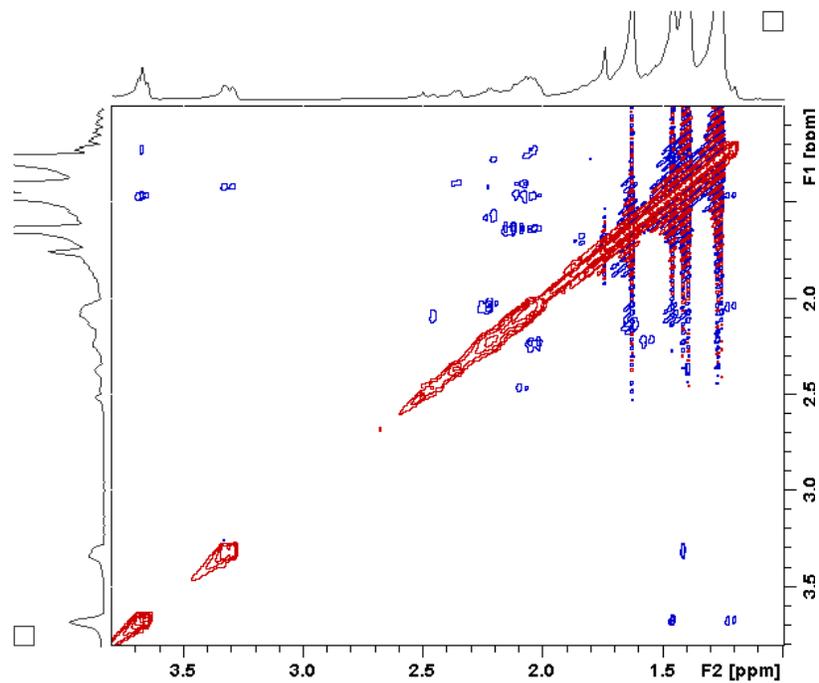


Figura 3.21. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

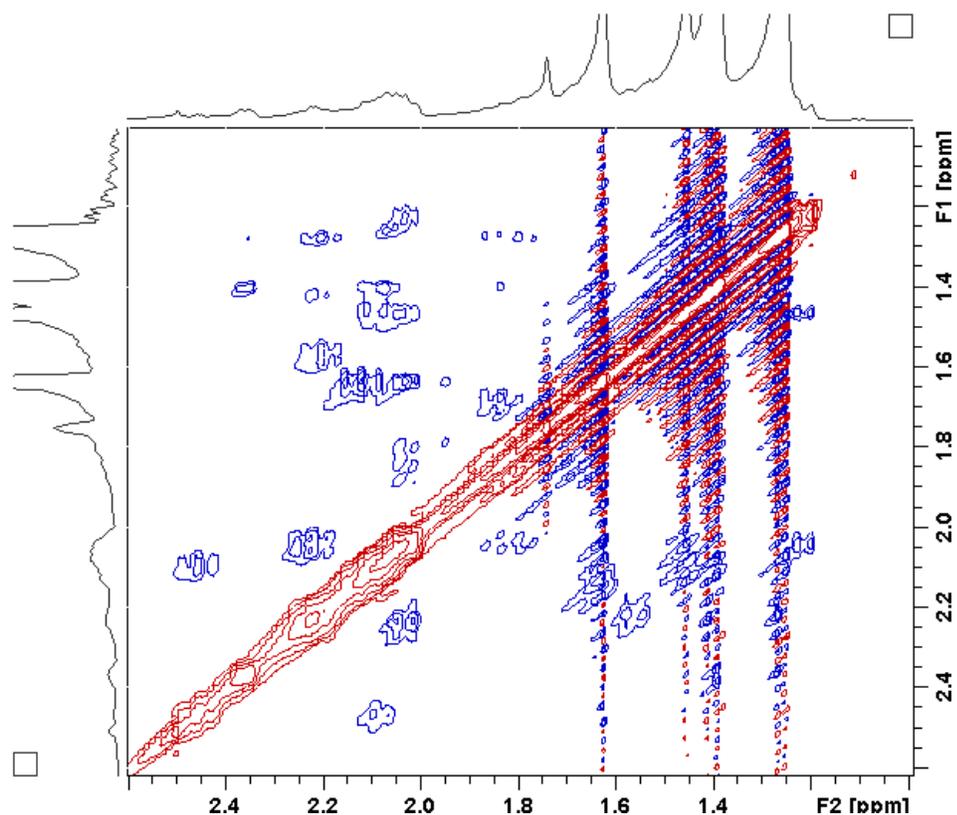


Figura 3.22. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D NOESY da MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

A figura 3.23 refere-se à montagem estrutural da molécula codificada como MHFA1 e mostra alguns fragmentos (a-f) em vermelho montados com base no espectro COSY (Figura 3.24) e a ligação destes em linhas pontilhadas, sugeridas através das correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY (Figuras 3.25 e 3.26), e com base nos principais valores de ${}^{2-3}J_{\text{H,H}}$ e ${}^{2-3}J_{\text{C,H}}$.

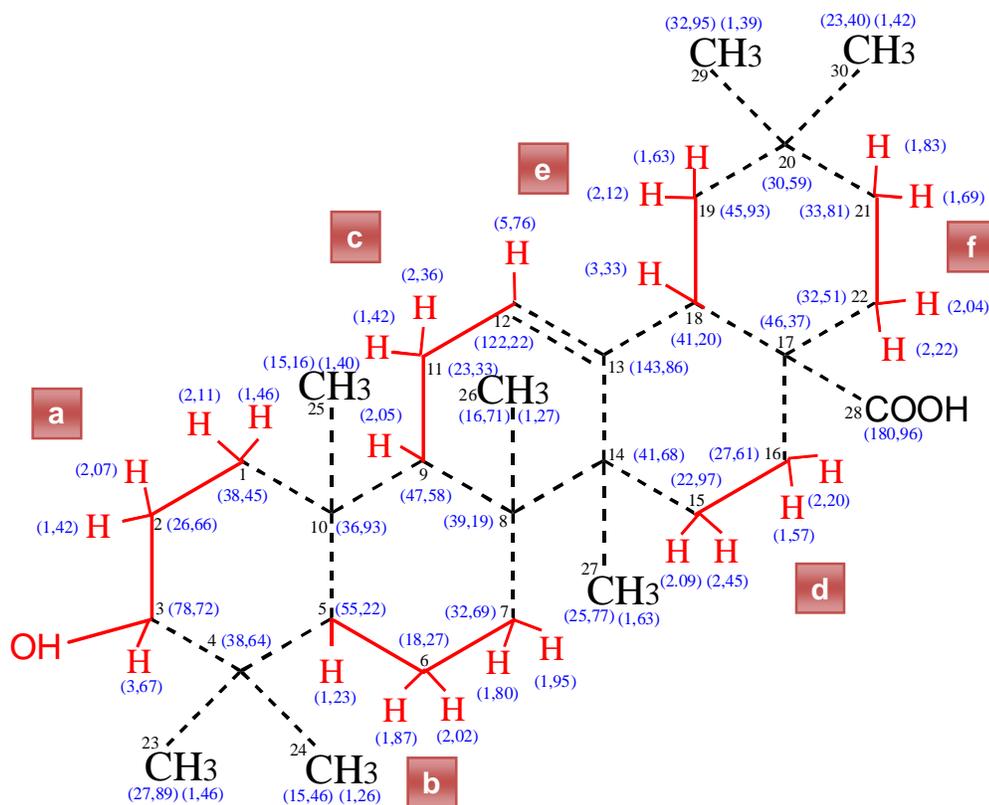


Figura 3.23. Montagem Estrutural da MHFA1

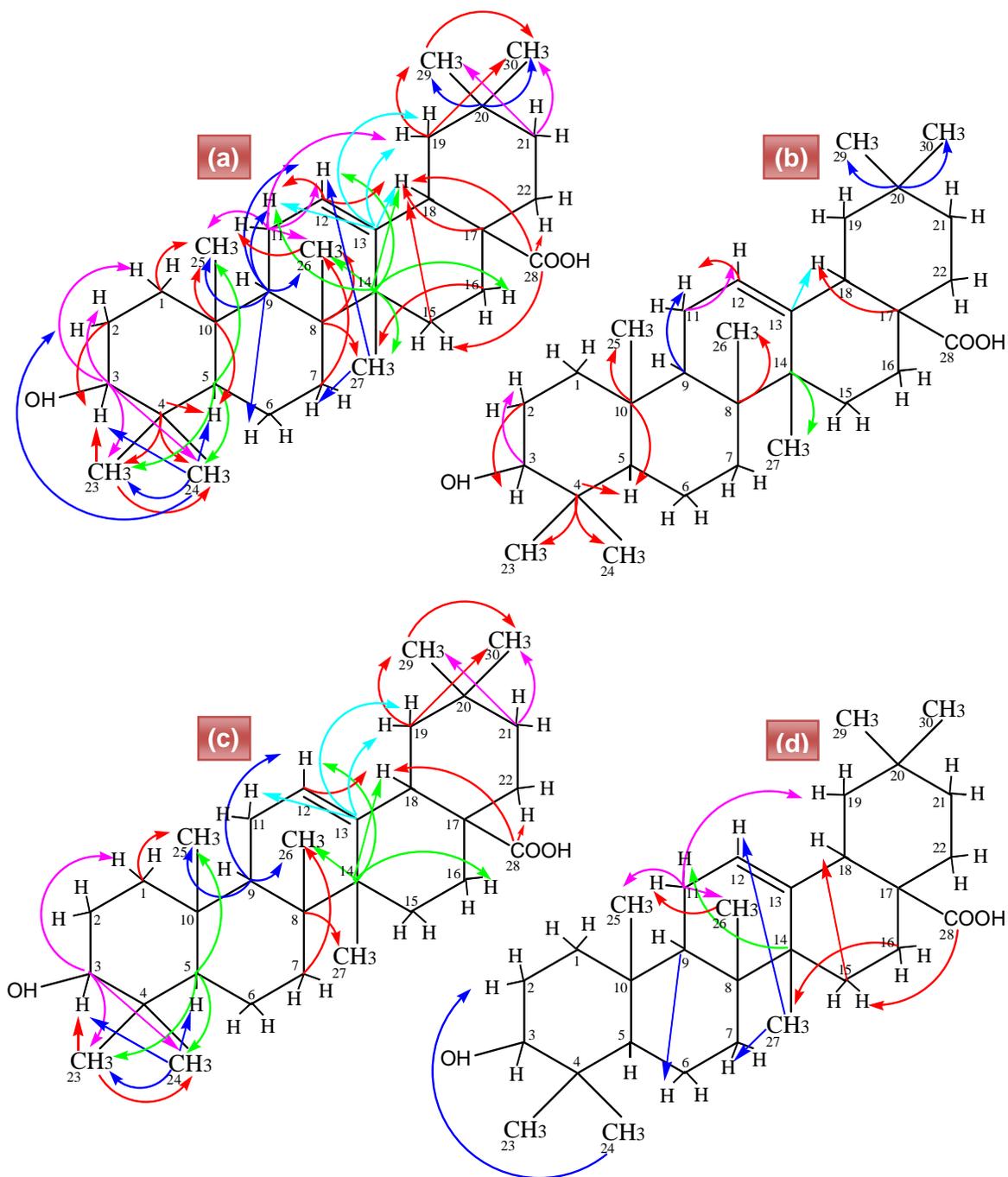


Figura 3. 24. Correlações Observadas no Espectro HMBC de MHFA1. (a) ${}^{2-4}J_{C,H}$; (b) ${}^2J_{C,H}$; (c) ${}^3J_{C,H}$; (d) ${}^4J_{C,H}$.

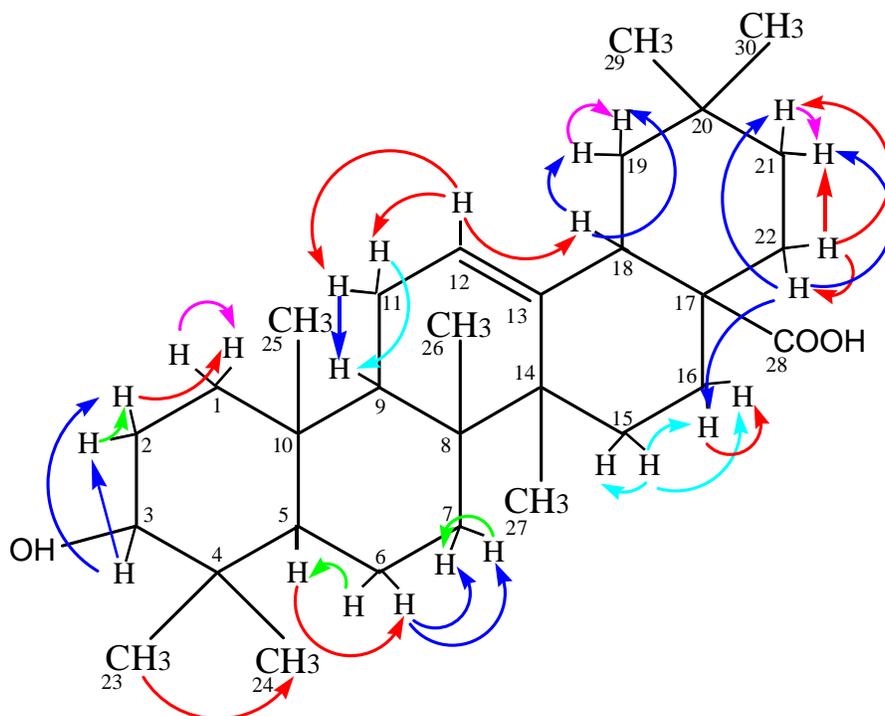


Figura 3.25. Correlações Observadas no Espectro COSY de MHFA1.

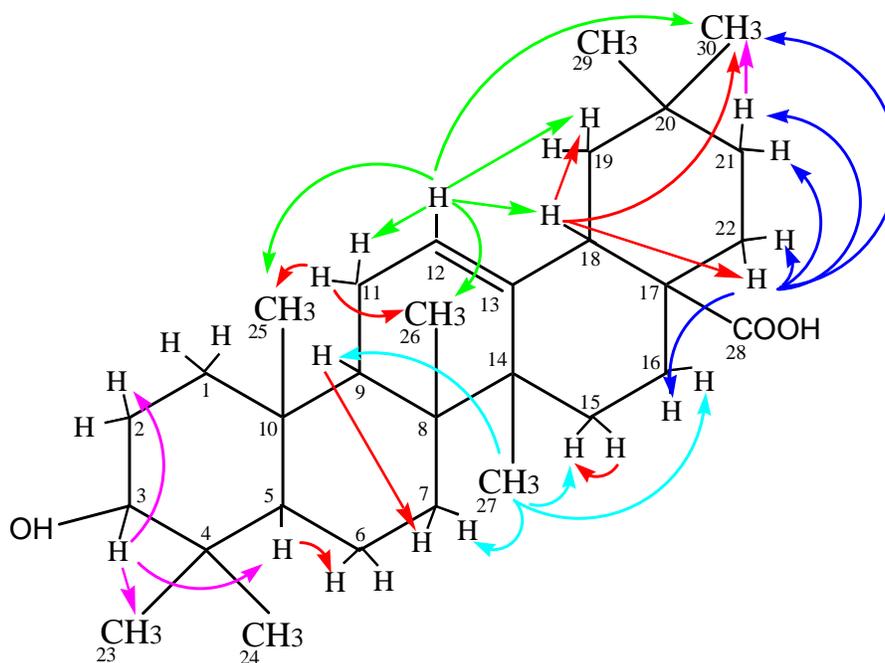


Figura 3.26. Correlações Observadas no Espectro NOESY de MHFA1.

Determinados alguns fragmentos (Figuras 3.23 e 3.24), partiu-se para definição de como estão interligados estes fragmentos através dos carbonos não hidrogenados, sendo utilizado para isso o HMBC (Figuras 3.23 e 3.25), $^{2-3}J_{C,H}$. Partindo-se do fragmento **a** observa-se que: o C₃ (δ 78,72) está correlacionado com os hidrogênios de duas metilas, C₂₃ (δ_H 1,46) e C₂₄ (δ_H 1,26), as quais estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY) e com o C₄ (δ 38,64), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono C₄ (δ 38,64) e que este está ligado ao C₃ (δ 78,72); o C₄ (δ 38,64) também mostra correlação com o H (δ 1,23) do C₅ (δ 55,22), e este H (δ 1,23) mostra correlação com o C₁₀ (δ 36,93), o qual está correlacionado com o H (δ 1,40) da metila C₂₅ (δ 15,16), cujos hidrogênios estão correlacionados com o C₁ (δ 38,45). Isto confirma que o fragmento **a** está ligado através do C₃ (δ 78,72) ao C₄ (δ 38,24), que por sua vez está ligado às metilas C₂₃ (δ 27,89) e C₂₄ (δ 15,46) e ao C₅ (δ 55,22), o qual está ligado ao C₁₀ (δ 36,93), que está ligado a metila C₂₅ (δ 15,16) e ao fragmento **a**, através do C₁ (δ 38,45), fechando o primeiro ciclo. O NOESY mostra ainda que a metila C₂₃ (δ 27,89) está espacialmente próxima ao hidrogênio carbinólico H (δ 3,67), pois há correlação do H (δ 3,67) carbinólico, que se encontra na posição axial, com o H (δ 1,46) desta metila, na posição equatorial (estas posições são definidas no espectro de 1H pelo sinal em δ 3,67 na forma de um duplo duplete (dd) que mostra o acoplamento do H-3 carbinólico com os hidrogênios H-2, $J^3=7,20$ Hz e $J^3=13,20$ Hz, sendo que a correlação espacial com o H-2 (δ 2,07) confirmada pelo espectro NOESY);

Observando-se agora o fragmento **b**, os hidrogênios do C₆ (δ 18,27) e do C₇ (δ 32,69) correlacionam com o C₉ (δ 32,66) (a correlação do C₇ (δ 32,69) é confirmada pelo NOESY), sendo que o C₇ (δ 32,69) mostra ainda correlação com duas metilas C₂₆ (δ 16,71) e C₂₇ (δ 25,77), que são as mesmas e únicas correlações do C₈ (δ 39,19); logo, considerando que o C₉ (δ 32,66) está correlacionado com C₆ (δ 18,27), C₇ (δ 32,69) e com a metila C₂₅ (δ 15,16), ligada ao C₁₀ (δ 36,93), e ainda com a metila C₂₆ (δ 16,71), ligada ao C₈ (δ 39,19), conclui-se que o fragmento **b** está ligado ao C₈ (δ 39,19) através do C₇ (δ 32,69), e o C₈ (δ 39,19) liga-se a metila C₂₆ (δ 16,71) e ao C₉ (δ 32,66), o qual está ligado ao C₁₀ (δ 36,93), fechando o segundo ciclo.

Considerando o fragmento **c**, observa-se que o H (δ 5,76) do C₁₂ (δ 125,13), identificado como carbono vinílico, bastante desprotegido, mostra correlação com o C₁₄ (δ 41,68) quaternário, que está correlacionado também com o C₁₁ (δ 23,33) e com as mesmas metilas do C₈ (δ 39,19), a C₂₆ (δ 16,71) e a C₂₇ (δ 25,77); observando-se ainda que o C₁₃ (δ 143,86) é altamente desprotegido, devido à ligação dupla, e estando este correlacionado com os hidrogênios do C₁₁ (δ 23,33) e do C₁₈ (δ 41,20), confirma-se então que o fragmento **c** está fundido através do C₁₂ (δ 125,13) ao C₁₃ (δ 143,86), o qual está ligado ao C₁₄ (δ 41,68), que liga-se ao C₈ (δ 39,19), sendo este ligado a metila C₂₆ (δ 16,71) e ao C₉ (δ 32,66), fechando o terceiro ciclo.

Todas as correlações observadas nos espectros HMBC (Figura 3.24), COSY (Figura 3.25) e NOESY (Figura 3.26), que proporcionaram a determinação estrutural da substância MHFA1 (Figura 3.27), identificada como sendo um triterpeno da classe oleanólica, conhecido como Ácido Oleanólico (rotação específica $[\alpha]_D^{26,6} = +273^\circ$, CHCl₃/MeOH 3:1).

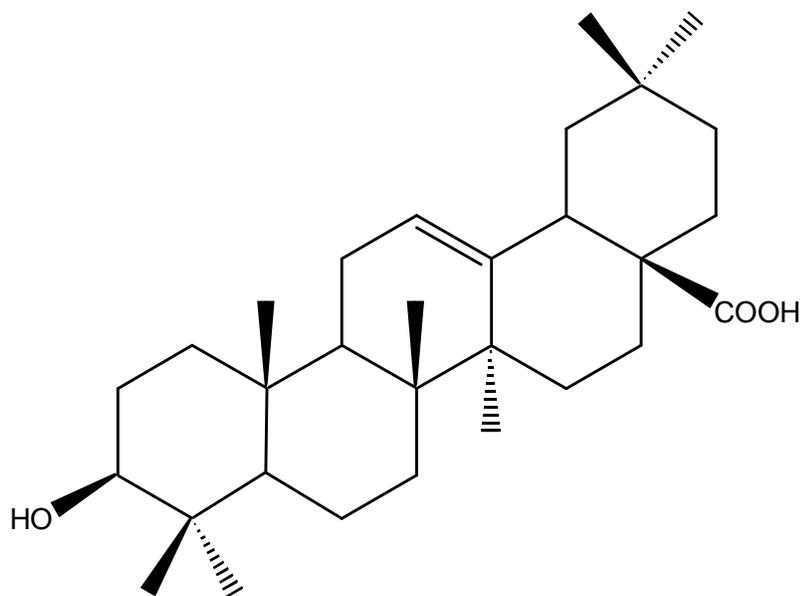


Figura 3.27. Estrutura do Ácido Oleanólico (MHFA1).

Os valores dos deslocamentos dos sinais mostrados nos espectros unidimensionais e bidimensionais e suas respectivas correlações também constam na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Dados de RMN ¹H, ¹³C (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a substância MHFA1. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

	¹³ C		¹ H	HMBC		COSY		NOESY	
	Carbonos	δC ¹³	δH ¹	δH ¹		δHa	δHb	δHa	δHb
1	CH ₂	38,45	1,46; 2,11	1,40 (H-25)		2,11 (H-1); [1,46 (H-1)]	1,46 (H-1); [2,11 (H-1)]; 2,07 (H-2)]		
2	CH ₂	26,66	1,42; 2,07	3,67 (H-3)		2,07 (H-2); [1,42(H-2)]	1,46 (H-1); 1,42 (H-2); 3,67 (H-3); [2,07 (H-2); 3,67 (H-3)]		
3	CH	78,72	3,67dd (J=13,0 e 7,0 Hz)	2,11 (H-1); 2,07 (H-2); 1,46 (H-23); 1,26 (H-24)		3,67 (H-3)	2,07 (H-2); 1,42 (H-2)	3,67 (H-3)	2,07 (H-2); 1,23 (H-5); 1,46 (H-23)
4	C	38,64		1,23 (H-5); 1,46 (H-23); 1,26 (H-24)					
5	CH	55,22	1,23	1,46 (H-23); 1,26 (H-24); 1,40 (H-25)		1,23 (H-5)	1,87 (H-2); 2,02 (H-6)	1,23 (H-5)	2,02 (H-6)
6	CH ₂	18,27	1,87; 2,02			1,87 (H-6); [2,02 (H-6)]	1,23 (H-5); [1,23 (H-5); 1,80 (H-7); 1,95 (H-7)]		
7	CH ₂	32,69	1,80; 1,95	1,27 (H-26)		1,80 (H-7); [1,95 (H-7)]	2,02 (H-6); 1,95 (H-7); [2,02 (H-6); 1,80 (H-7)]		
8	C	39,19		1,27 (H-26); 1,63 (H-27)					
9	CH	47,58	2,05	1,87 (H-6); 2,36 (H-11); 5,76 (H-12); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26)		2,05 (H-9)	1,42 (H-11); 2,36 (H-11)	2,05 (H-9)	1,80 (H-7)
10	C	36,93		1,23 (H-5); 1,40 (H-25)					
11	CH ₂	23,33	1,42; 2,36	5,76 (H-12); 2,12 (H-19); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26)		1,42 (H-11); [2,36 (H-11)]	2,05 (H-9); 5,76 (H-12); [2,05 (H-9); 5,76 (H-12)]	2,36 (H-11)	1,40 (H-25); 1,27 (H-26)
12	CH	122,22	5,76t (J=3,40 Hz)			5,76 (H-12)	1,42 (H-11); 2,36 (H-12); 3,33 (H-18)	5,76 (H-12)	1,63 (H-11); 2,36 (H-11); 3,33 (H-18); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26); 1,42 (H-30)
13	C	143,86		2,36 (H-11); 3,33 (H-18); 1,63 (H-19); 2,12 (H-19)					
14	C	41,68		2,36 (H-11); 5,76 (H-12); 2,20 (H-16); 3,33 (H-18); 1,27 (H-26); 1,63 (H-27)					
15	CH ₂	22,97	2,09; 2,45	3,33 (H-18)		2,09 (H-15); 2,45 (H-15)	2,45 (H-15); [2,09 (H-15); 1,57 (H-16); 2,20 (H-16)]	2,45 (H-15)	2,09 (H-15)
16	CH ₂	27,61	1,57; 2,20	1,63 (H-27)		1,57 (H-16); [2,20 (H-16)]	2,20 (H-16); 2,45 (H-15); 2,22 (H-22); [2,45 (H-15); 1,57 (H-16)]		
17	C	46,37		3,33 (H-18)					
18	CH	41,20	3,33			3,33 (H-18)	1,63 (H-19); 2,12 (H-19)	3,33 (H-18)	1,63 (H-19); 2,22 (H-22); 1,42 (H-30)
19	CH ₂	45,93	1,63; 2,12	1,39 (H-29); 1,42 (H-30)		1,63 (H-19); [2,12 (H-19)]	3,33 (H-18); 2,12 (H-19); [3,33 (H-18); 1,63 (H-19)];		
20	C	30,59		1,39 (H-29); 1,42 (H-30)					
21	CH ₂	33,81	1,69; 1,83	1,39 (H-29); 1,42 (H-30)		1,83 (H-21); [1,69 (H-21)]	1,69 (H-21); 2,04 (H-22); 2,22 (H-22); [1,83 (H-21); 2,04 (H-22); 2,22 (H-22)]	1,83 (H-21)	1,42 (H-30)
22	CH ₂	32,51	2,04; 2,22			2,04 (H-22); [2,22 (H-22)]	1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,22 (H-22); [1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,04 (H-21)]	2,22 (H-22)	1,57 (H-16); 1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,04 (H-22); 1,42 (H-30)
23	CH ₃	27,89	1,46s	3,67 (H-3); 1,26 (H-24)		1,46 (Me-23)	1,26 (Me-24)		
24	CH ₃	15,46	1,26s	1,42 (H-2); 3,67 (H-3); 1,23 (H-5); 1,46 (H-23)		1,26 (Me-24)	1,46 (Me-23)		
25	CH ₃	15,16	1,40s						
26	CH ₃	16,71	1,27s	1,42 (H-11)					
27	CH ₃	25,77	1,63s	1,80 (H-7); 5,76 (H-12)				1,63 (H-27)	1,95 (H-7); 2,05 (H-9); 2,09 (H-15); 2,20 (H-16)
28	C	180,96		2,45 (H-15); 3,33 (H-18); 2,22 (H-22)					
29	CH ₃	32,95	1,39s	1,42 (H-30)					
30	CH ₃	23,40	1,42s						

- Espectrometria de Massas (EM)

O espectro de massas (Figura 3.28) da substância codificada como MAHF1, identificada como ácido oleanólico, obtido por ionização química no modo positivo, indicou o peso molecular de $M = 456$ u com fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. O espectro mostra o pico $M+1 = 457$ u. O íon molecular sofre uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder (Figura 3.29), sendo mostrado no espectro o pico $M-208 = 248$ u, que é característico dessa classe de compostos (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

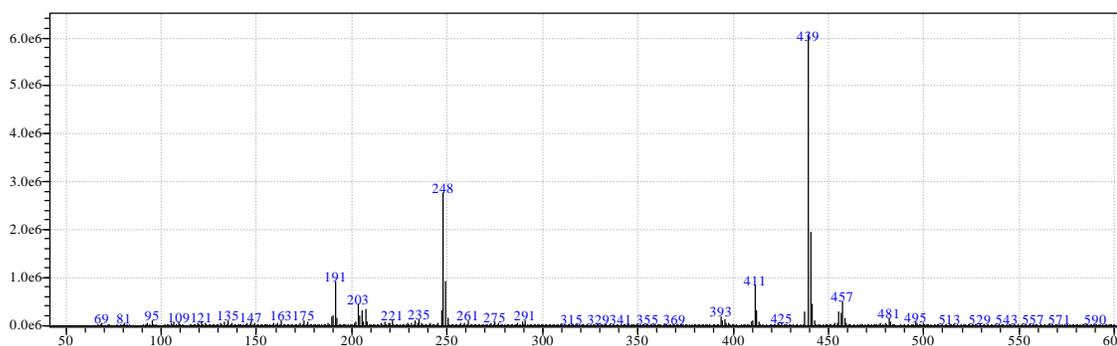


Figura 3.28. Espectro de Massas do Ácido Oleanólico (MHFA1).

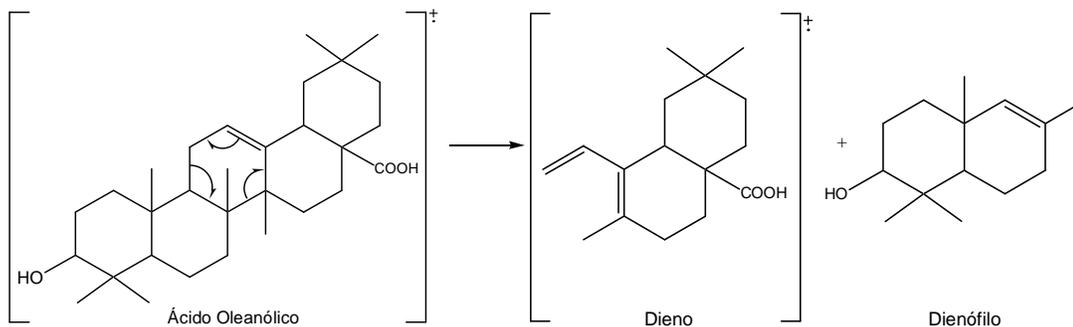


Figura 3.29. Fragmentação do Ácido Oleanólico do Tipo Retro-Diels-Alder.

3.5.2. MHFA2

A substância codificada de **MHFA2** apresentou-se como um sólido branco amorfo, de ponto de fusão 291-292 °C (CHCl₃/MeOH).

- Infravermelho (IV)

A carbonila carboxílica e o grupo hidroxila da MHFA2 foram sugeridos por espectro do composto na região do Infravermelho (IV) (Figura 3.30), o qual revelou bandas de absorção de estiramento e deformação sugerindo grupo hidroxílico (3434,39 cm⁻¹) e carbonila (1690,79 cm⁻¹) (MAHATO & KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

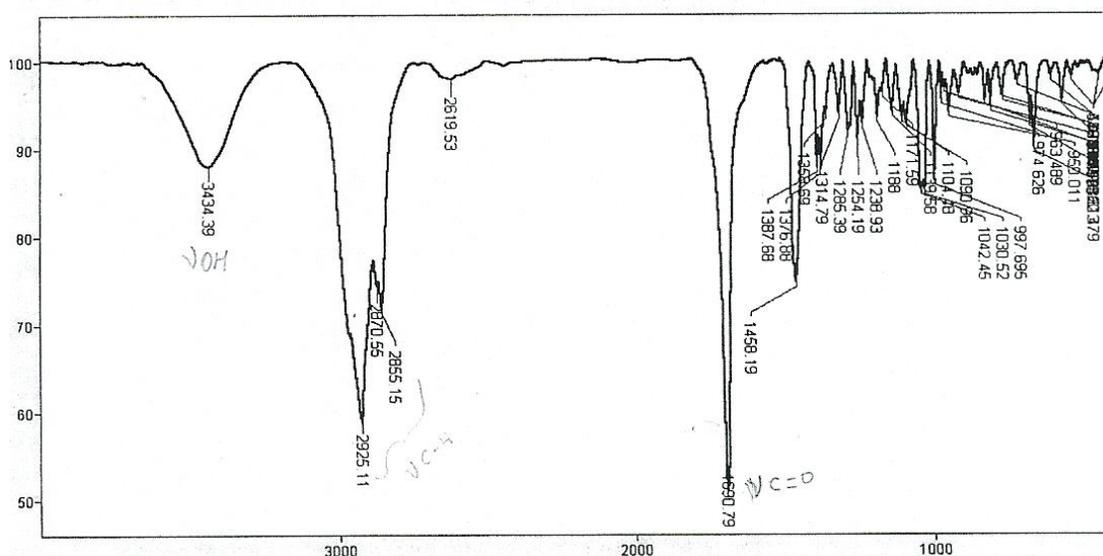


Figura 3.30. Espectro da Substância MHFA2 na Região do Infravermelho.

- RMN 1D

A análise do espectro de RMN ¹H da substância codificada como MHFA2, de cor branca (Figura 3.31), mostrou 7 sinais na região mais blindada entre δ 1,03 e 1,36; sendo 5 simpletos (s) (δ 1,03; 1,09; 1,19; 1,23; 1,36) referentes aos prótons de grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados e 2 dupletos (d) (δ 1,13; J = 6,4 Hz e δ 1,20; J = 8,0 Hz) relativos aos prótons de metilas ligadas a carbonos

monohidrogenados (Figura 3.32); um sinal em δ 3,43 na forma de um duplo duplete (dd) com constante de acoplamento (J) ($J=5,20$ Hz e $J=10,80$ Hz) relativo ao hidrogênio carbinólico que está orientado em estereoquímica α e acoplado com os hidrogênios δ 1,26 e δ 1,85; um sinal em δ 5,49 triplete (t) com $J=3,60$ Hz, relativo ao hidrogênio olefínico acoplado com os hidrogênios δ 1,33 e δ 2,17 (Figura 3.31) (ARAÚJO & CHAVES, 2005; JUNGES *et al.*, 1999).

Neste espectro foram identificados ainda, com o auxílio dos espectros DEPTs, HSQC e COSY, 19 sinais na forma de multipletos (m), sendo 18 relativos aos prótons de grupos metílicos H (δ 1,27; 1,91), H (δ 1,26; 1,85), H (δ 1,64; 1,80), H (δ 1,61; 1,79), H (δ 1,33; 2,17), H (δ 1,79; 2,18), H (δ 1,90; 2,27), H (δ 1,60; 1,75), H (δ 1,88; 1,94) e um sinal relativo ao próton de grupo metínico H (δ 1,78). Foram identificados ainda 4 sinais relativos aos hidrogênios δ 0,99 ($J=10,48$ Hz), δ 2,45 ($J=11,4$ Hz), δ 1,21 ($J=8,1$ Hz) e δ 1,12 ($J=6,44$), na forma de dupletos (d) referentes a prótons de grupos metínicos. Todos os deslocamentos químicos dos sinais do espectro de ^1H encontram-se na Tabela 3.4.

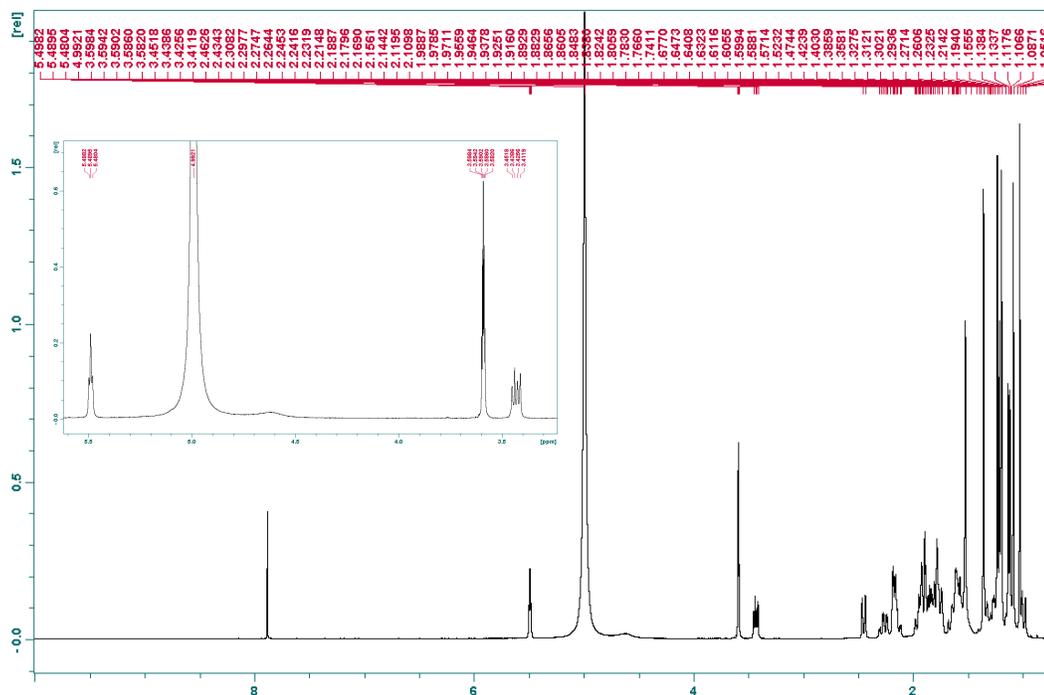


Figura 3.31. Espectro de RMN ^1H de MHFA2 com Expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

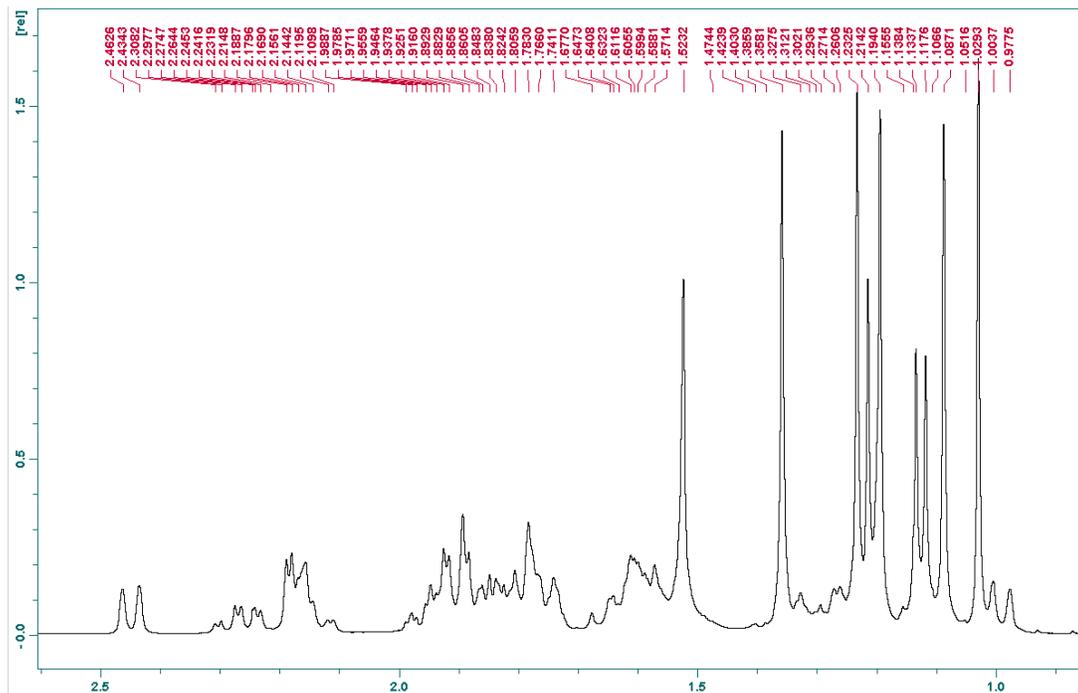


Figura 3.32. Expansão do Espectro de RMN H^1 de MHFA2, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3:1 .

A análise dos espectros de ^{13}C (Figuras 3.33 e 3.34), DEPT 90° (Figuras 3.35 e 3.36) e DEPT 135° (Figura 3.37) da substância MHFA2 lhe conferiu uma indicação de esqueleto ursânico mostrando a presença de 30 átomos de carbonos: sendo 7 grupos metila (CH_3) e 9 grupos metilenos (CH_2), segundo o DEPT de 135° , 7 grupos metínicos (CH), conforme o DEPT de 90° e 7 carbonos não hidrogenados, sendo um deles um grupo carbonila, segundo o espectro ^{13}C por diferença com os DEPTs de 90° e 135° (SILVA, 2006; SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

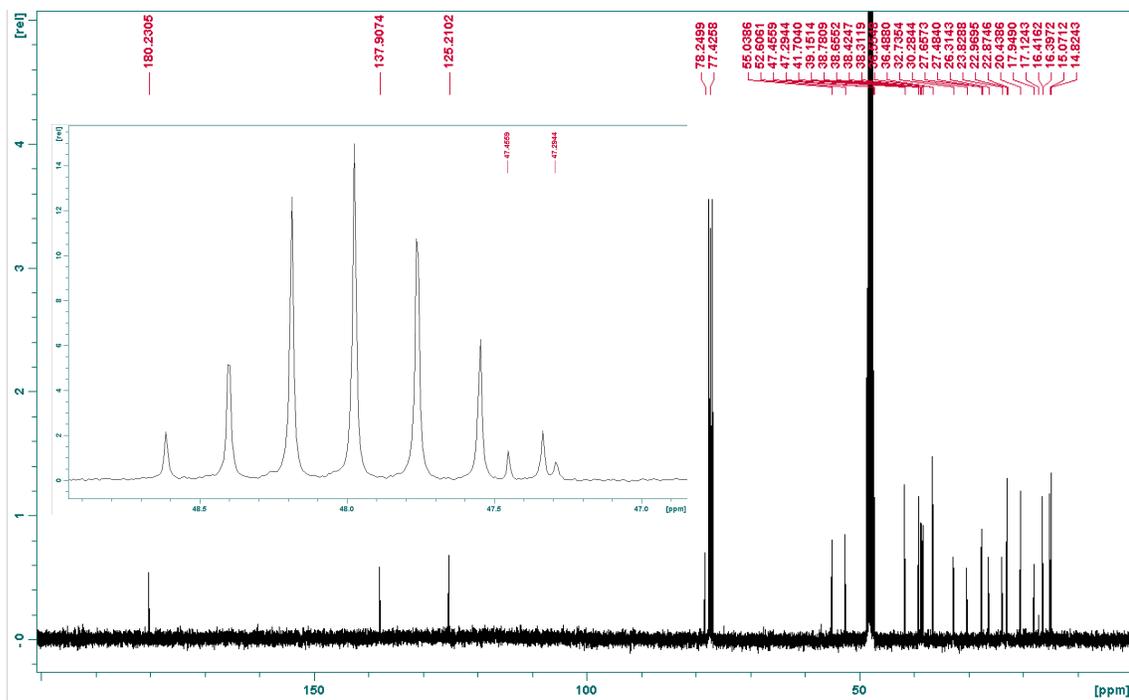


Figura 3.33. Espectro de RMN C^{13} de MHFA2 com Expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

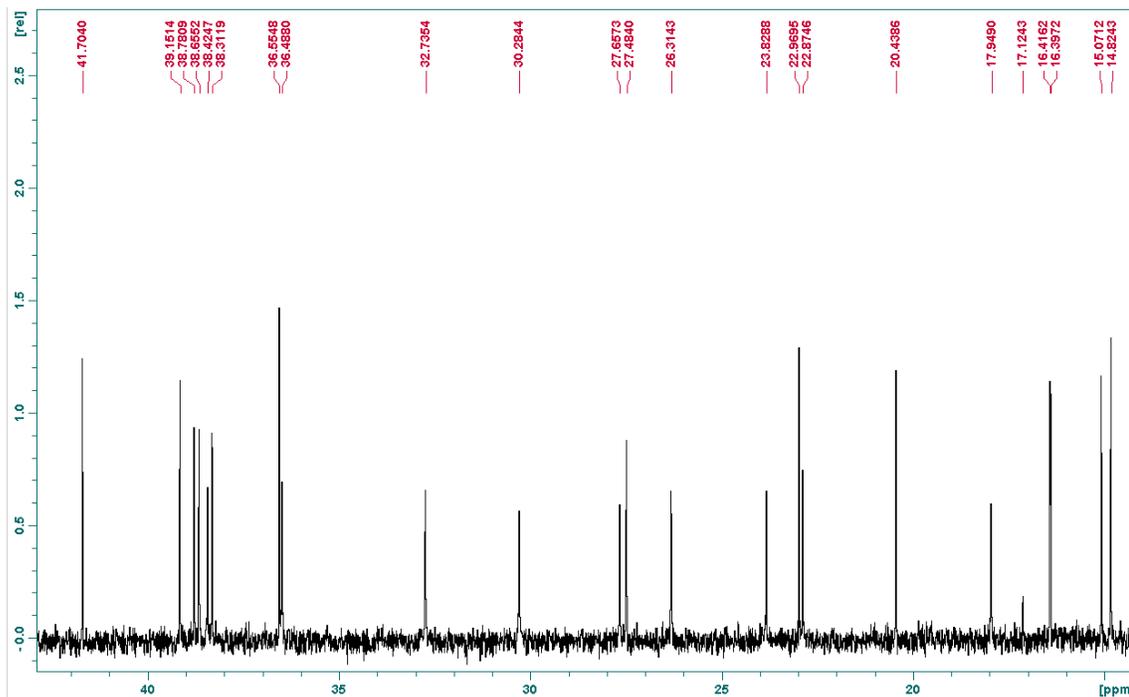


Figura 3.34. Expansão do Espectro de RMN C^{13} de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

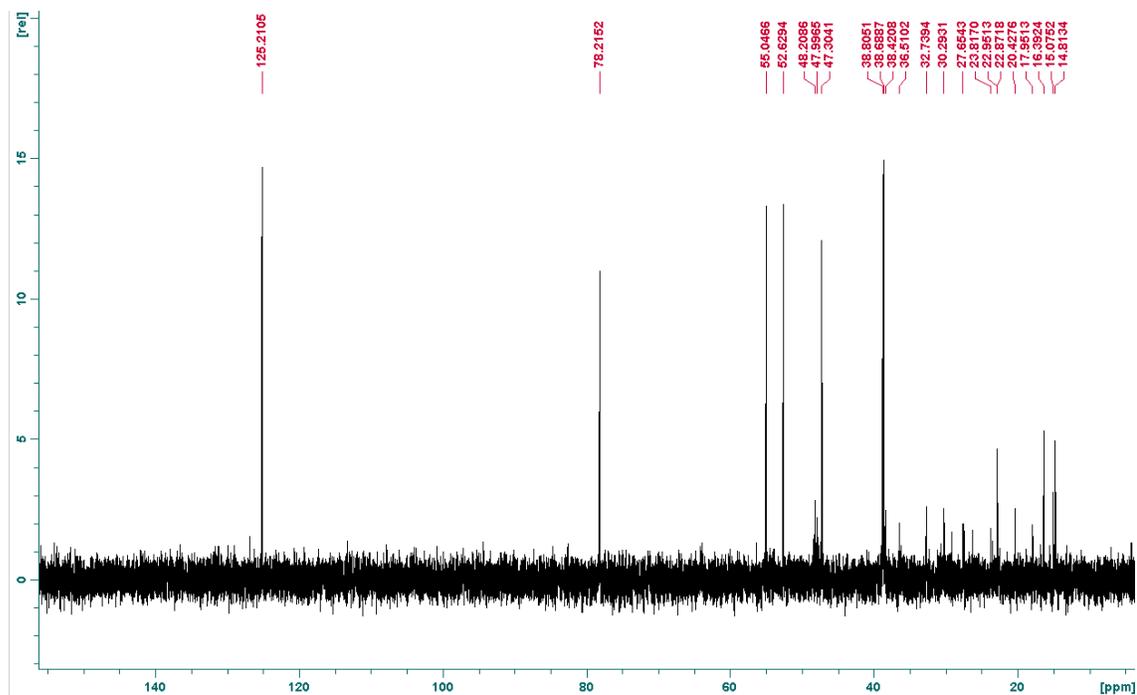


Figura 3.35. Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA2, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1 .

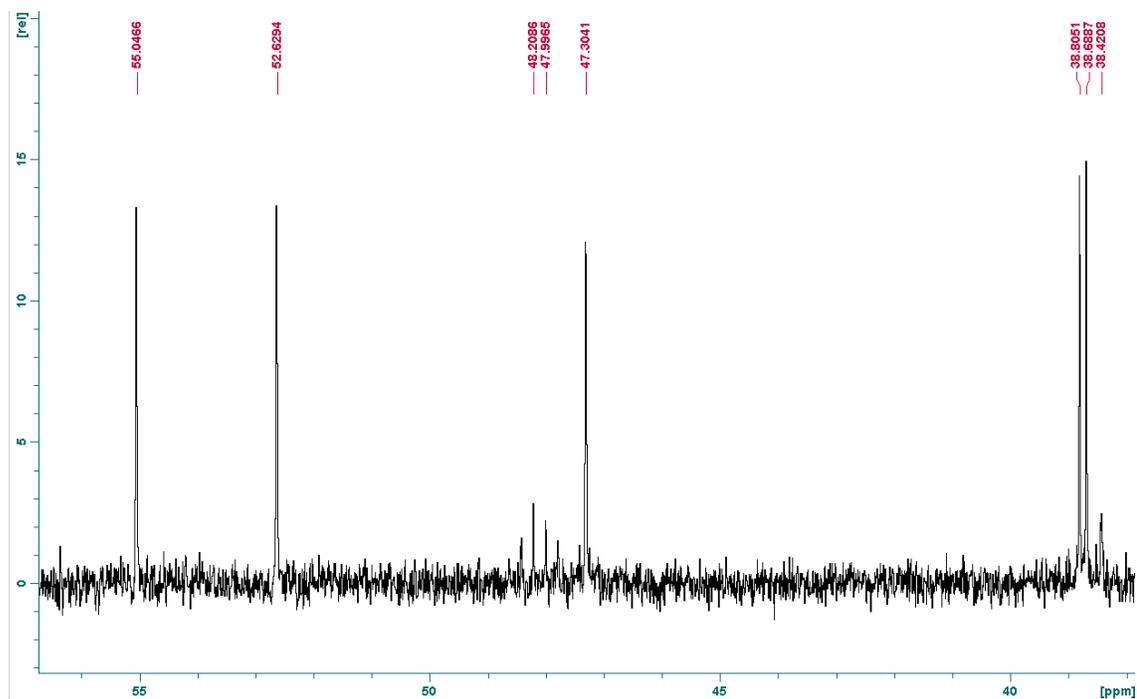


Figura 3.36. Expansão do Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA2, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

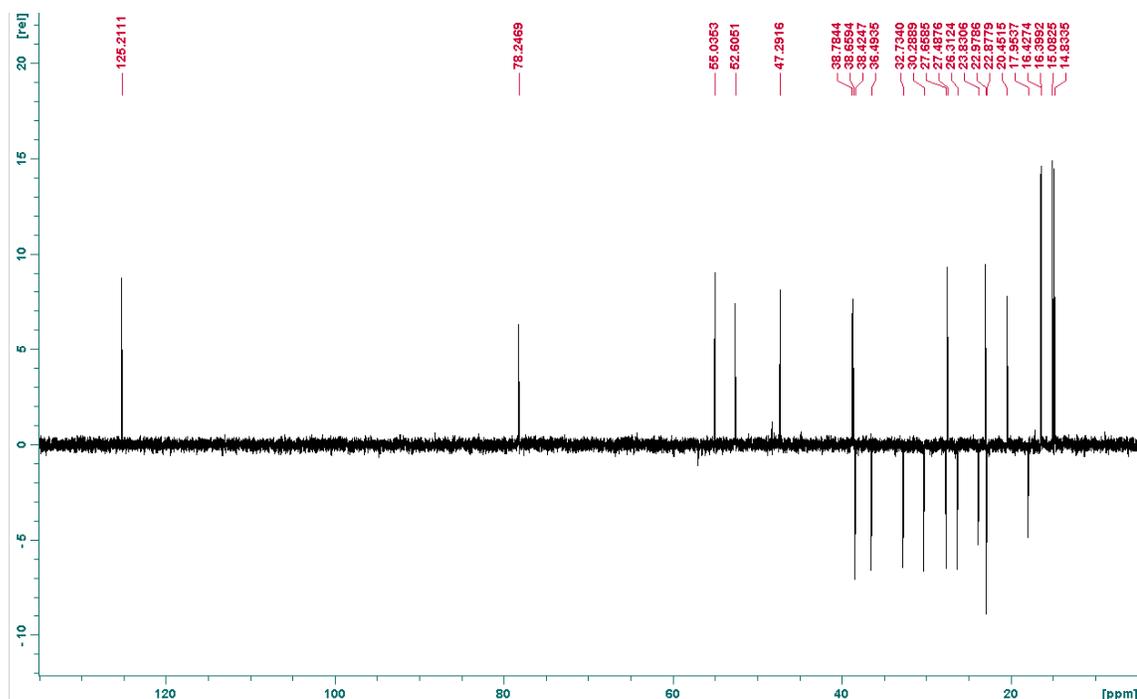


Figura 3.37. Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD } \text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD } 3:1$.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.33) mostra também a presença do carbono carbinólico com deslocamento químico em δ 78,15 e ainda os deslocamentos químicos dos carbonos da ligação dupla C (δ 125,13) e C (δ 137,86), carbonos vinílicos, ligação esta característica dos esqueletos ursânicos e oleanânicos (JUNGES *et al.*, 1999; MAHATO & KUNDU, 1994).

A MHAF2 apresenta o carbono da carbonila carboxílica com deslocamento químico em δ 180,26. A análise completa dos deslocamentos químicos do RMN ^{13}C encontra-se na Tabela 3.4.

- Determinação estrutural da substância codificada como MHFA2, usando espectros de RMN Bidimensionais.

Para fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas unidimensionais e dados de possíveis compostos similares da literatura, foram utilizados as técnicas bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), que permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$; $^nJ_{\text{C,H}}$) ou espacial (H,H- ou H,C –NOE) entre si (CARVALHO e BRAZ FILHO, 1992; KAISER, 2000).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância codificada como MHFA2 demonstraram a natureza dos prótons e dos carbonos. Os espectros de ^{13}C e DEPTs de 90° e 135° possibilitaram a identificação dos sinais dos carbonos quanto aos grupos metila, metileno, metínico e quanto aos carbonos não hidrogenados, mas a numeração dos sinais de carbono foi feita através dos espectros de RMN COSY e HMBC. A identificação dos hidrogênios dos grupos foi feita via HSQC (Figuras 3.38 e 3.39), que mostrou a correlação direta destes com os seus respectivos carbonos (Tabela 3.4).

Através do espectro de HSQC observou-se as correlações do hidrogênio carbinólico (δ 3,43) com o carbono δ 78,15; do hidrogênio vinílico (δ 5,49) com carbono δ 125,13 e dos hidrogênios metílicos (δ 1,03; 1,09; 1,13; 1,19; 1,20; 1,23; 1,36) com os seus respectivos carbonos (δ 15,00; 16,31; 16,34; 14,75; 20,36; 27,39; 22,88). As outras correlações estão descritas na Tabela 3.4.

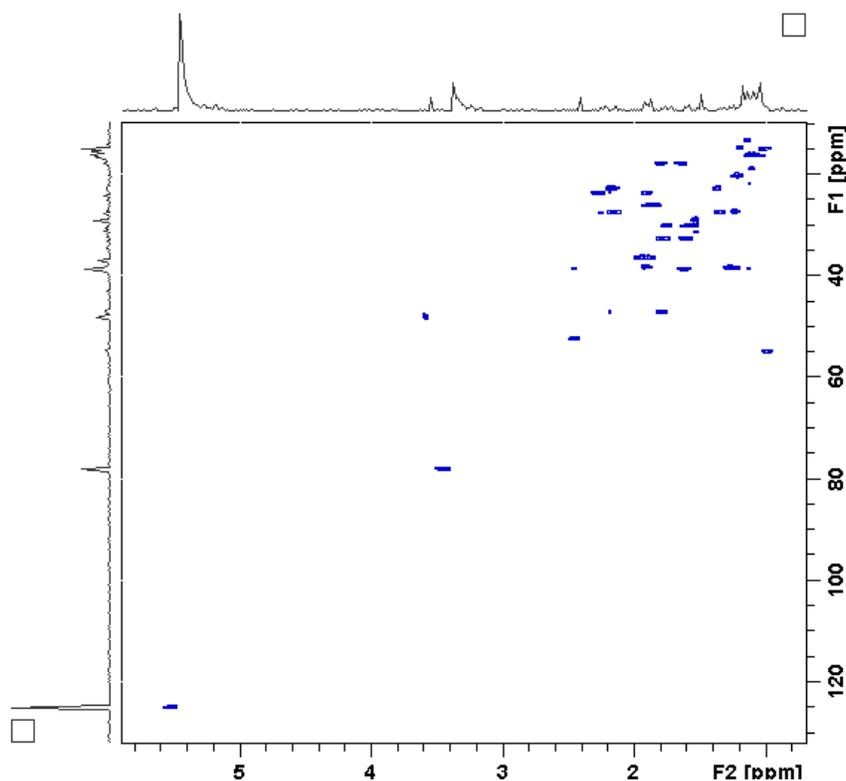


Figura 3.38. Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

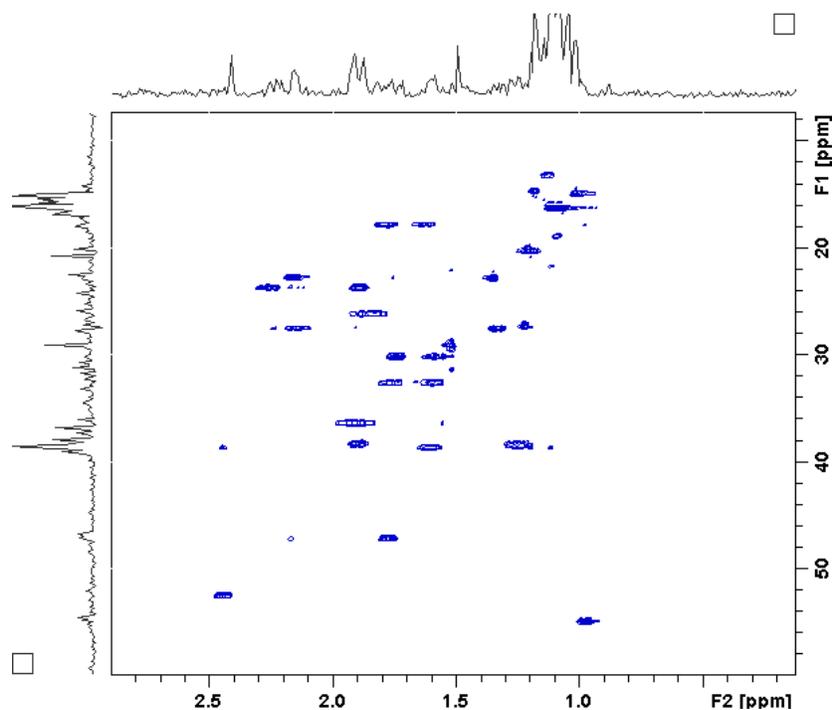


Figura 3.39. Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

O espectro de RMN de COSY (Figuras 3.40 a 3.43) mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^2\text{-}^3\text{J}_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais) e ainda por $^4\text{-}^6\text{J}_{\text{H,H}}$, permitindo assim a montagem de microfragmentos da estrutura.

Acoplamentos geminais: $\text{H}_{1\text{A}}$ (δ 1,27) e $\text{H}_{1\text{B}}$ (δ 1,91), $\text{H}_{2\text{A}}$ (δ 1,26) e $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85), $\text{H}_{6\text{A}}$ (δ 1,64) e $\text{H}_{6\text{B}}$ (δ 1,80), $\text{H}_{7\text{A}}$ (δ 1,61) e $\text{H}_{7\text{B}}$ (δ 1,79), $\text{H}_{11\text{A}}$ (δ 1,33) e $\text{H}_{11\text{B}}$ (δ 2,17), $\text{H}_{15\text{A}}$ (δ 1,79) e $\text{H}_{15\text{B}}$ (δ 2,18), $\text{H}_{16\text{A}}$ (δ 1,90) e $\text{H}_{16\text{B}}$ (δ 2,27), $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60) e $\text{H}_{21\text{B}}$ (δ 1,75), $\text{H}_{22\text{A}}$ (δ 1,88) e $\text{H}_{22\text{B}}$ (δ 1,94).

Acoplamentos vicinais: $\text{H}_{1\text{A}}$ (δ 1,27) e $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85), $\text{H}_{1\text{B}}$ (δ 1,91) e $\text{H}_{2\text{A}}$ (δ 1,26), $\text{H}_{1\text{B}}$ (δ 1,91) e $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85), $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85) e H_3 (δ 3,43), $\text{H}_{2\text{A}}$ (δ 1,26) e H_3 (δ 3,43), H_5 (δ 0,99) e $\text{H}_{6\text{A}}$ (δ 1,64), H_5 (δ 0,99) e $\text{H}_{6\text{B}}$ (δ 1,80), $\text{H}_{6\text{A}}$ (δ 1,64) e $\text{H}_{7\text{B}}$ (δ 1,79), $\text{H}_{6\text{B}}$ (δ 1,80) e $\text{H}_{7\text{A}}$ (δ 1,61), H_9 (δ 1,78) e $\text{H}_{11\text{A}}$ (δ 1,33), H_9 (δ 1,78) e $\text{H}_{11\text{B}}$ (δ 2,17), $\text{H}_{11\text{A}}$ (δ 1,33) e H_{12} (δ 5,49), $\text{H}_{11\text{B}}$ (δ 2,17) e H_{12} (δ 5,49), $\text{H}_{15\text{B}}$ (δ 2,18) e $\text{H}_{16\text{A}}$ (δ 1,90), $\text{H}_{15\text{B}}$ (δ 2,18) e $\text{H}_{16\text{B}}$ (δ 2,27), H_{18} (δ 2,45) e H_{19} (δ 1,21), H_{20} (δ 1,12) e $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60), H_{20} (δ 1,12) e $\text{H}_{21\text{B}}$ (δ 1,75), $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60) e $\text{H}_{22\text{A}}$ (δ 1,88), $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60) e $\text{H}_{22\text{B}}$ (δ 1,94).

Hidrogênios acoplados por $^4\text{-}^6\text{J}_{\text{H,H}}$: H₂₃ (δ 1,23) e H₂₄ (δ 1,03), H₉ (δ 1,78) e H₂₆ (δ 1,09), H₁₂ (δ 5,49) e H₁₈ (δ 2,45), H₁₈ (δ 2,45) e H_{21A} (δ 1,60), H₁₈ (δ 2,45) e H_{22A} (δ 1,88).

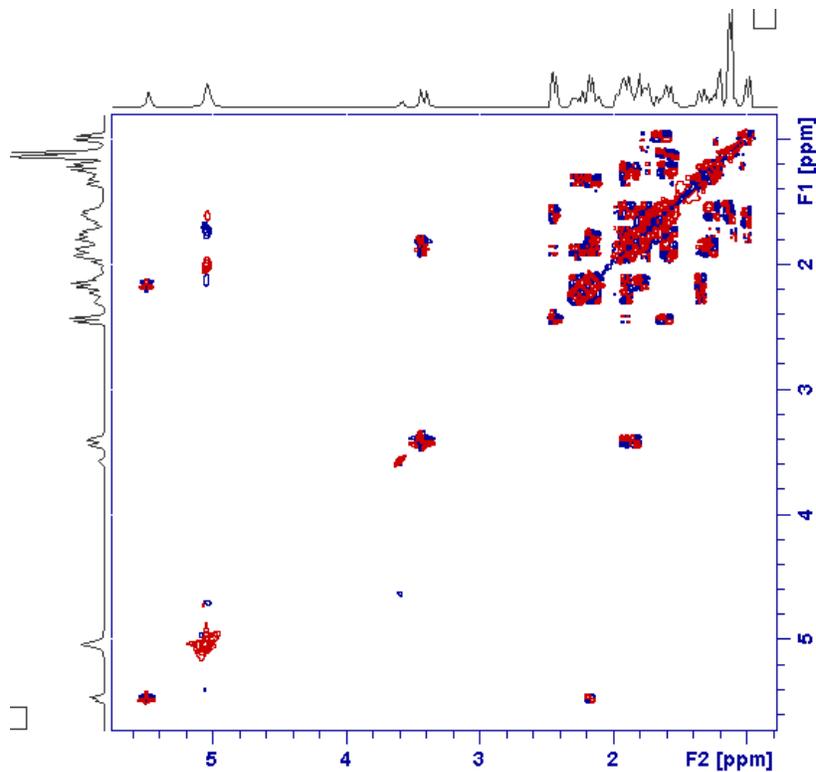


Figura 3.40. Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

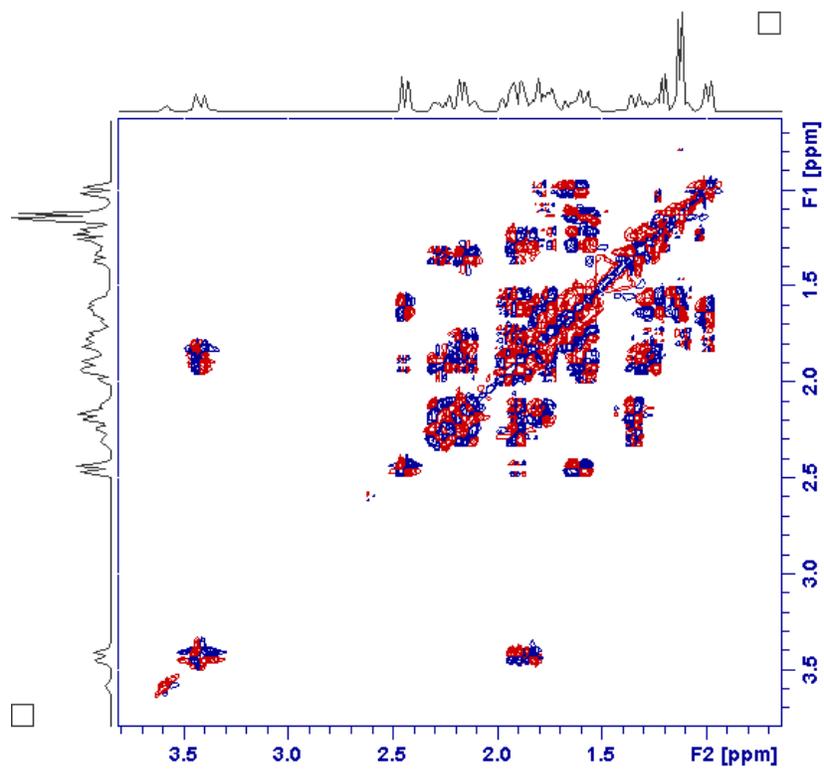


Figura 3.41. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

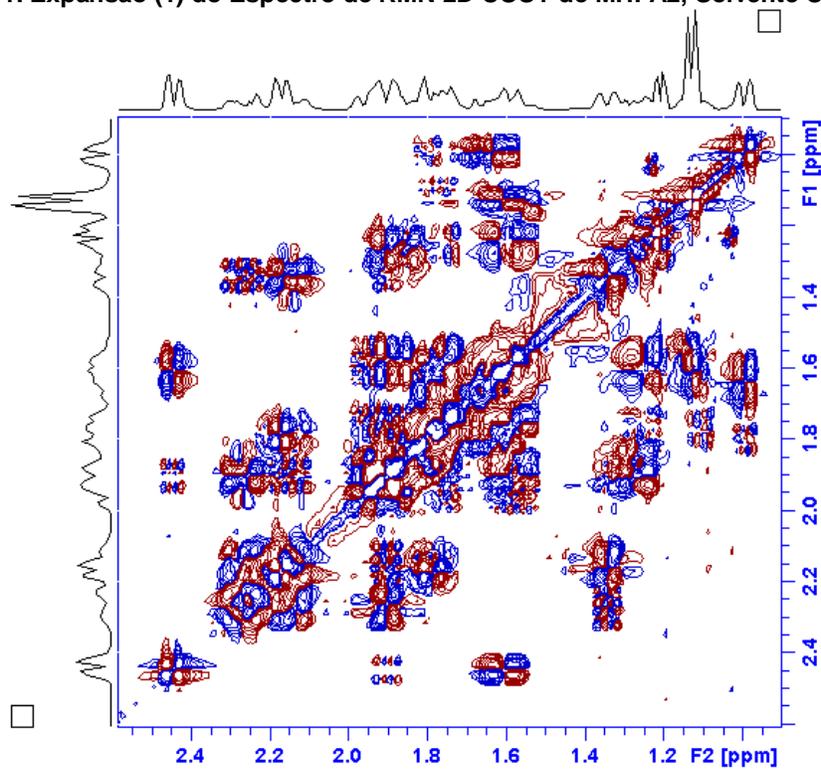


Figura 3.42. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

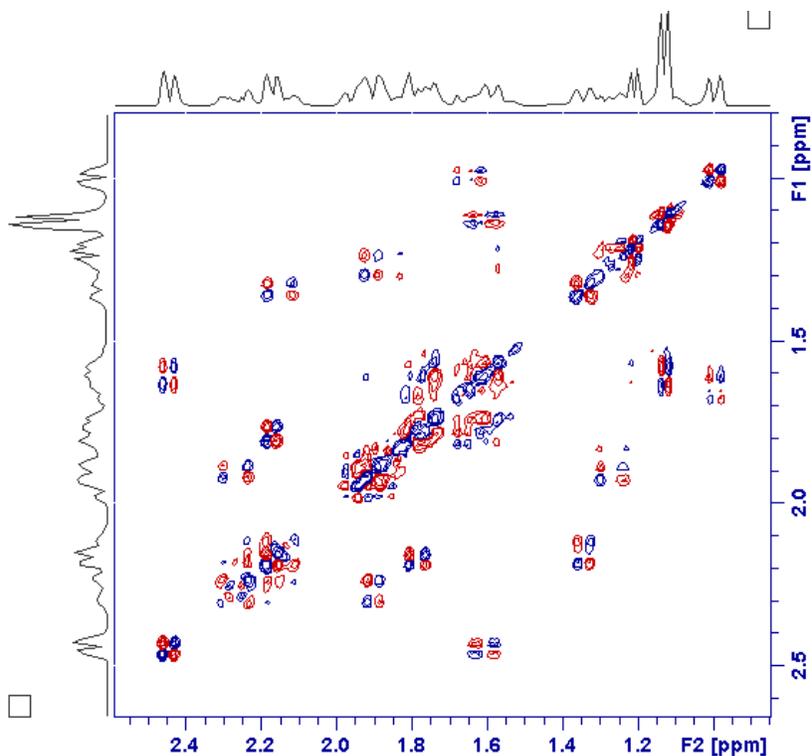


Figura 3.43. Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

A análise do espectro HMBC (Figuras 3.44 e 3.45) (correlação H-C a longa distância) foi o responsável pela união dos fragmentos definidos pela análise do espectro COSY, devido às interações observadas entre átomos de carbono não hidrogenados. A análise do espectro NOESY (Figuras 3.46 e 3.47) (correlação H-H espacial) produziu informações relacionadas com a estereoquímica da molécula. A montagem completa da estrutura da MHFA2 está descrita a seguir:

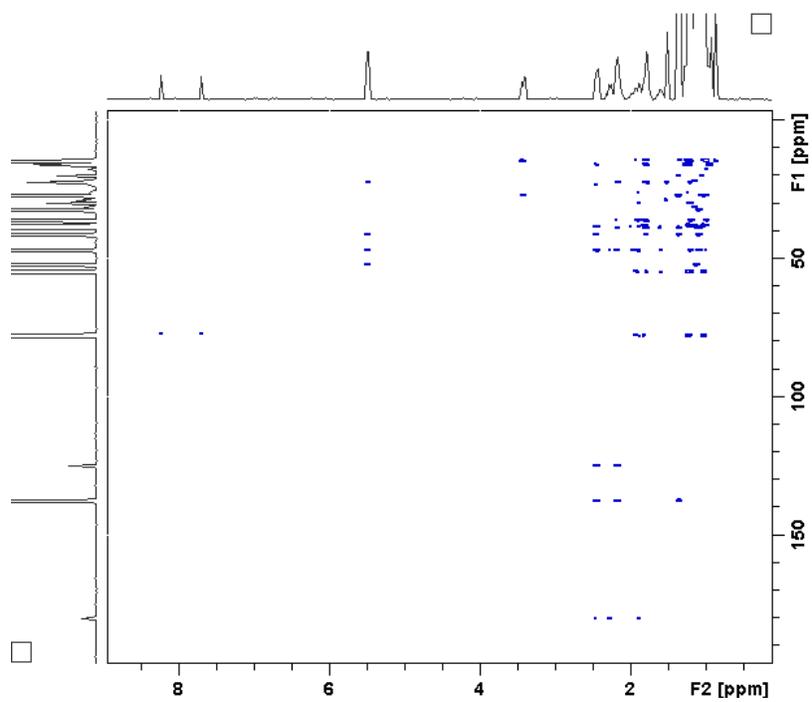


Figura 3.44. Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

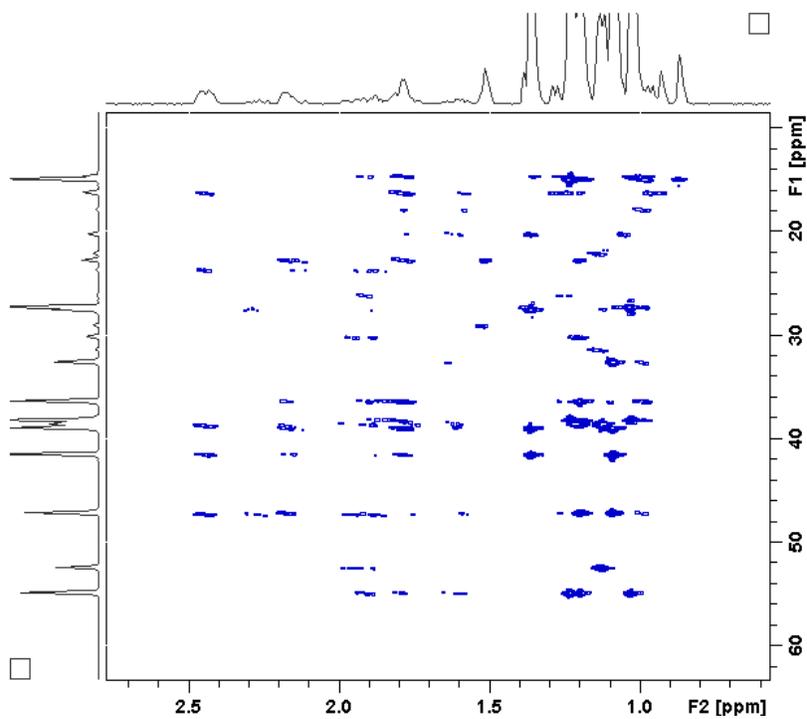


Figura 3.45. Expansão do Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

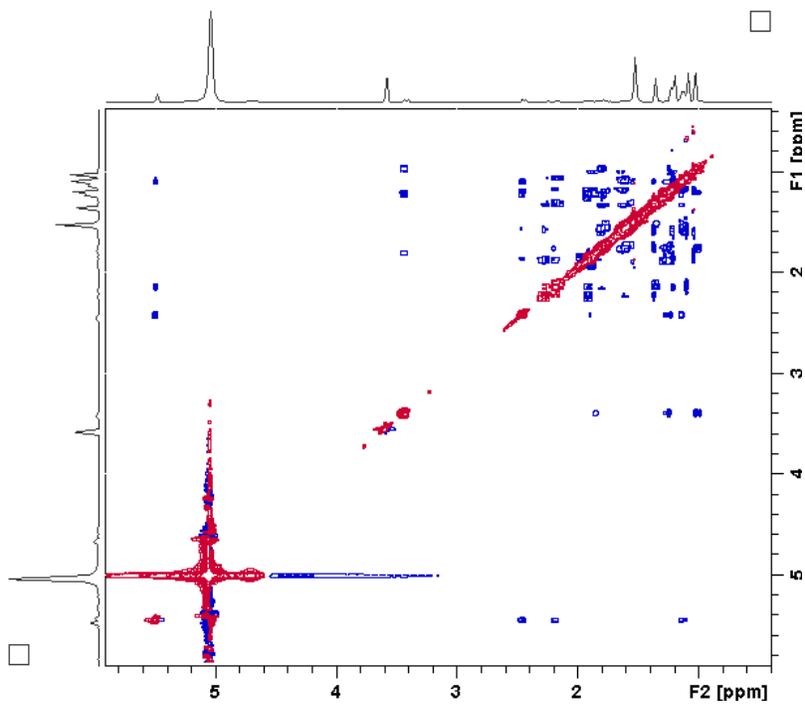


Figura 3.46. Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

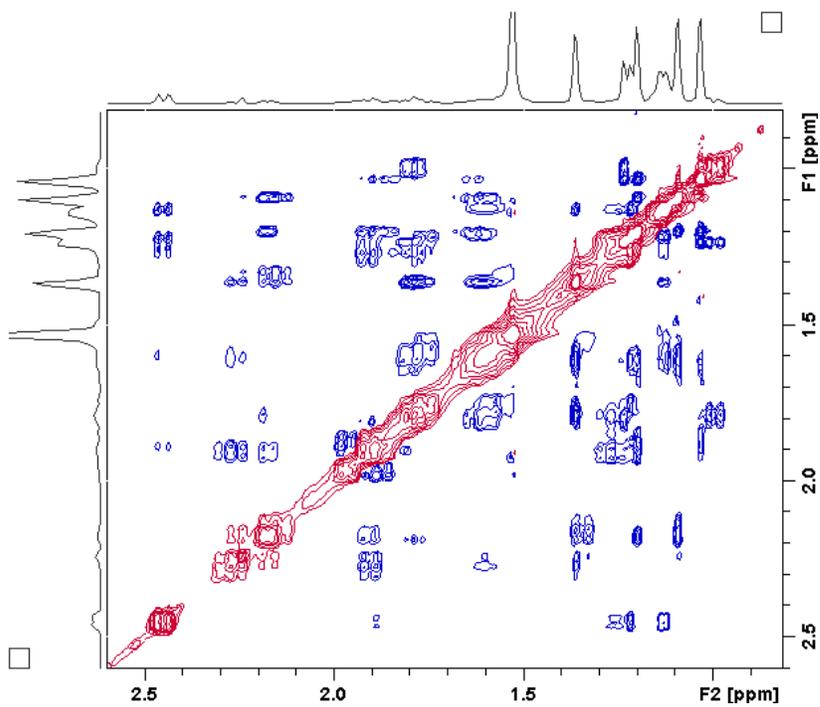


Figura 3.47. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

A Figura 3.48 refere-se à montagem estrutural da molécula codificada como ZTC9 através de dados de RMN bidimensionais e mostra alguns fragmentos (a-f) em vermelho montados com base no espectro COSY (Figura 3.49) e a ligação destes em linhas pontilhadas, sugeridas através das correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY (Figuras 3.50 e 3.51), e com base nos principais valores de ${}^{2-3}J_{\text{H,H}}$ e ${}^{2-3}J_{\text{C,H}}$.

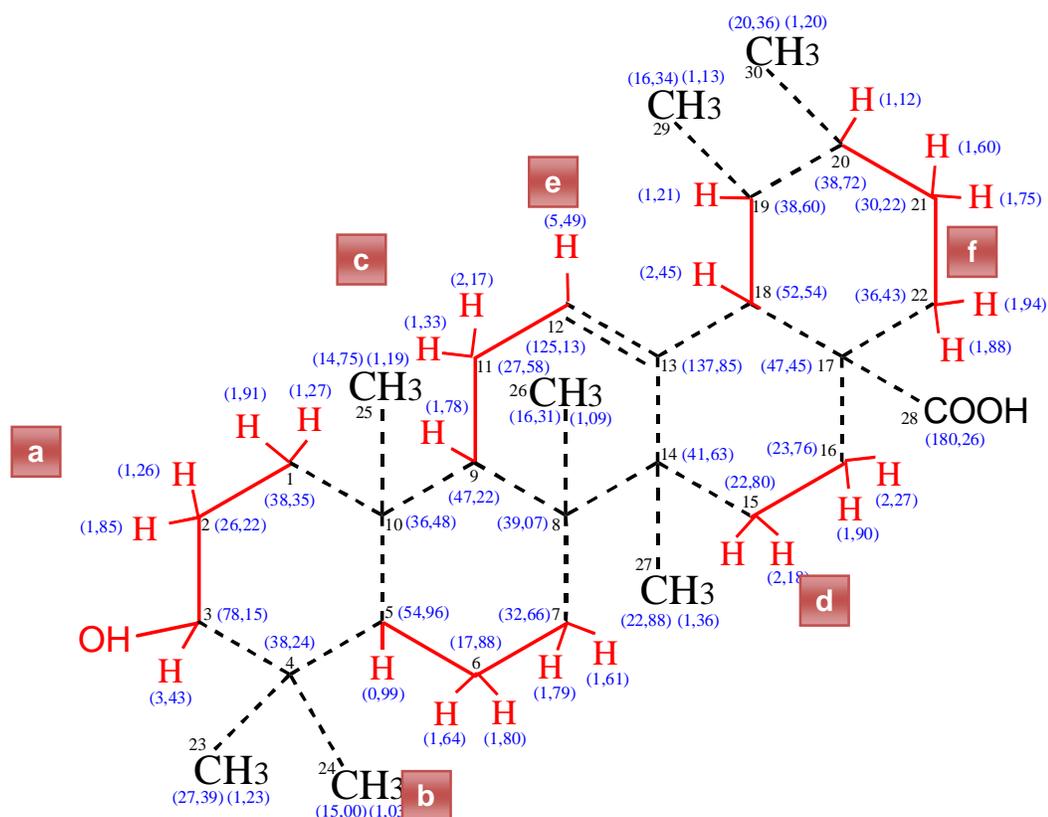


Figura 3.48. Montagem Estrutural da MHFA2.

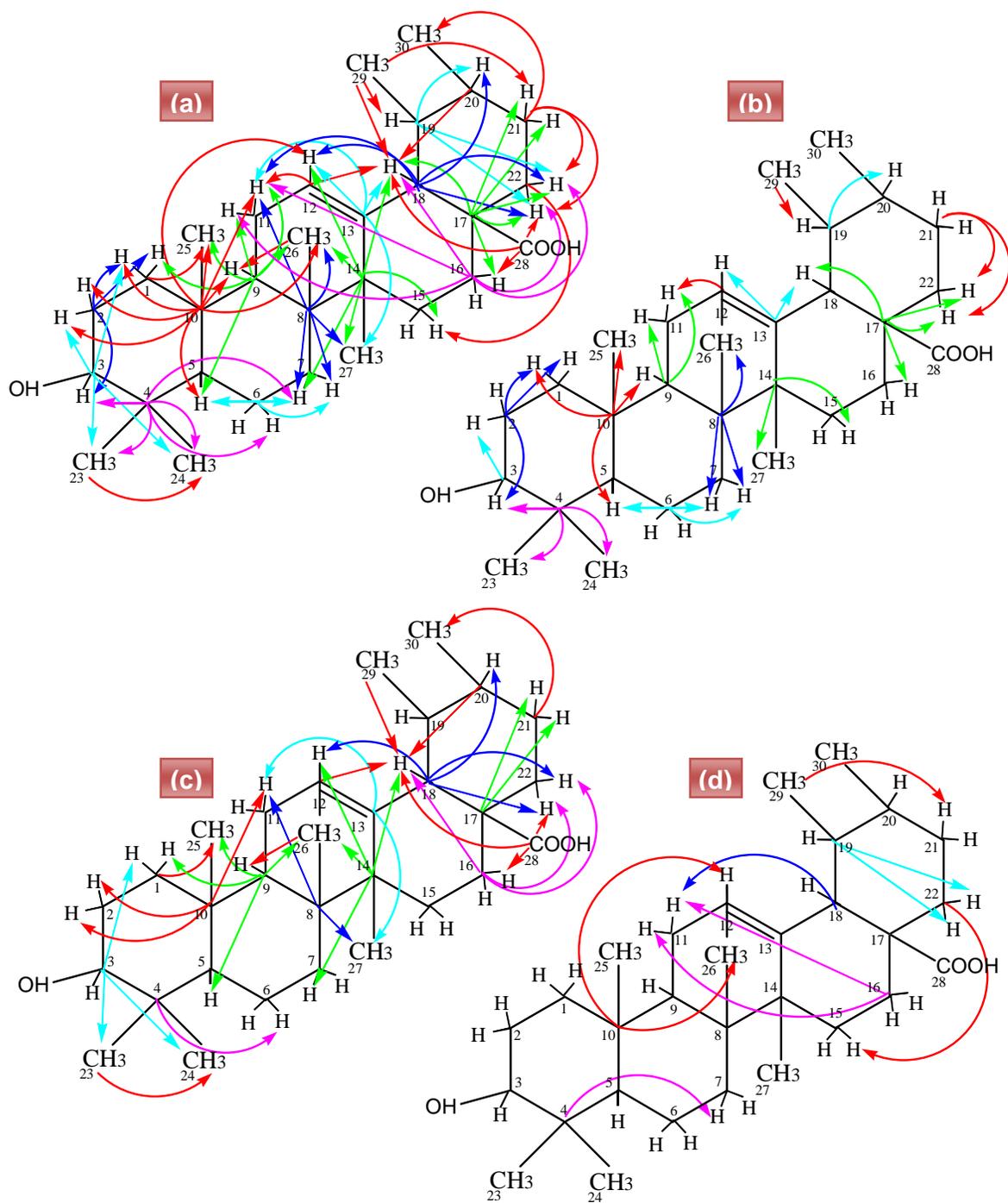


Figura 3.49. Correlações Observadas no Espectro HMBC de MHFA2. (a) $^{2-4}J_{C,H}$; (b) $^2J_{C,H}$; (c) $^3J_{C,H}$; (d) $^4J_{C,H}$.

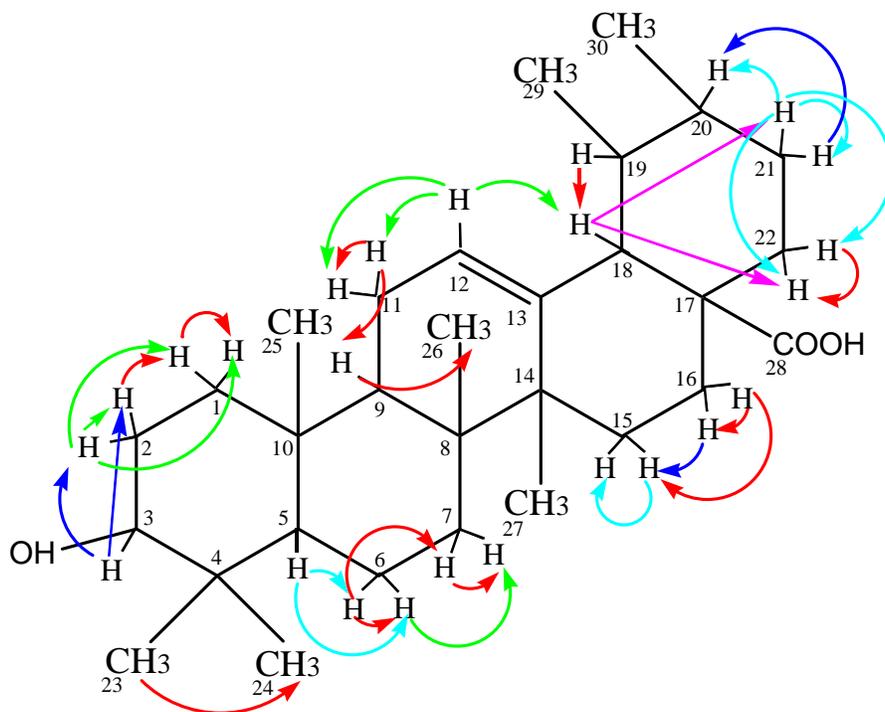


Figura 3.50. Correlações Observadas no Espectro COSY de MHFA2.

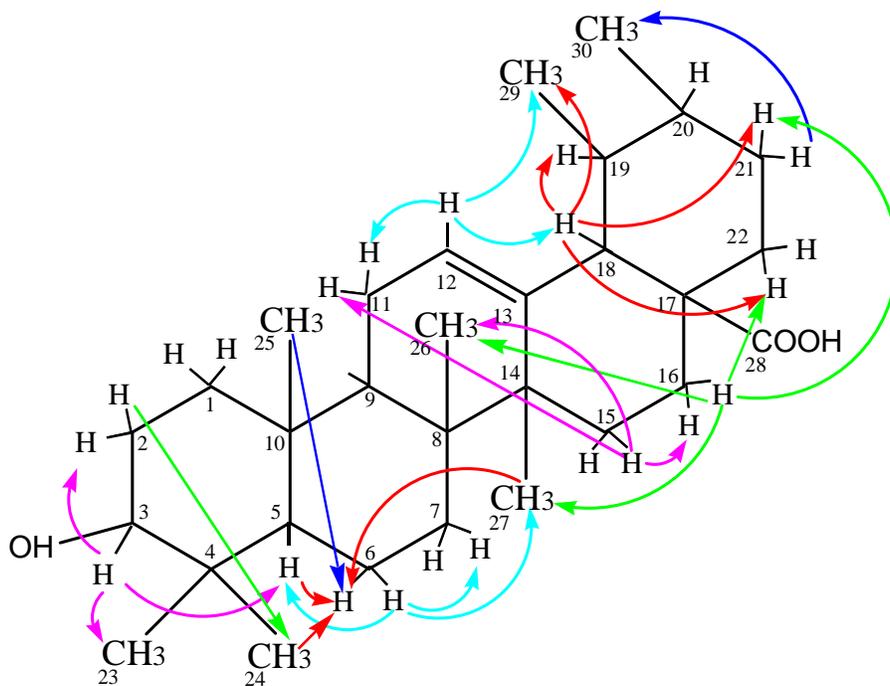


Figura 3.51. Correlações Observadas no Espectro NOESY de MHFA2.

Determinados alguns fragmentos (Figuras 3.48 e 3.49), partiu-se para definição de como estão interligados estes fragmentos através dos carbonos não hidrogenados, sendo utilizado para isso o espectro HMBC (Figuras 3.48 e 3.50), $^2\text{-}^3J_{C,H}$: Partindo-se do fragmento **a** observa-se que o C_3 (δ 78,15) está correlacionado com os hidrogênios das metilas C_{23} (δ_H 1,23) e C_{24} (δ_H 1,03) e, através do H-3 (δ 3,43), correlaciona com o C_4 (δ 38,24) quaternário, o qual também mostra correlação com os hidrogênios das duas metilas C_{23} (δ_H 1,23) e C_{24} (δ_H 1,03), que estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono, α à hidroxila; o NOESY mostra ainda que a metila C_{23} (δ_H 1,23) está espacialmente próxima ao hidrogênio carbinólico H-3 (δ 3,43), pois há correlação do H-3 (δ 3,43) carbinólico, que se encontra na posição axial, com o H-23 (δ 1,23), na posição equatorial (estas posições são definidas no espectro de 1H pelo sinal em δ 3,43 na forma de um duplo duplete (dd) que mostra o acoplamento do H-3 carbinólico com os hidrogênios H-2, $J^3=5,20$ Hz e $J^3=10,80$ Hz, sendo que a correlação espacial com o H-2_{eq} (δ_H 1,85) é confirmada pelo espectro NOESY); o H-5 (δ 0,99) do C_5 (δ 54,96) monohidrogenado, está correlacionado com o C_{10} (δ 36,48) quaternário, o qual mostra correlação com o H-1 (δ 1,91) do C_1 (δ 38,35) e com os hidrogênios do C_2 (δ 26,22) e da metila C_{25} (δ 14,75) [cujos hidrogênios também correlacionam com o C_1 (δ 38,35) e C_9 (δ 47,22)], o NOESY mostra a correlação do C_3 (δ 78,15) com o H-5 (δ 0,99), confirmando que realmente o C_5 (δ 54,96) é o carbono monohidrogenado que está ligado ao C_4 (δ 38,24). Logo, tem-se que o fragmento **a** está ligado através do C_3 (δ 78,15) ao C_4 (δ 38,24), que por sua vez está ligado às duas metilas C_{23} (δ 27,39) e C_{24} (δ 15,00) e ao C_5 (δ 54,96), que está ligado ao C_{10} (δ 36,48), que se liga a metila C_{25} (δ 14,75) e ao C_1 (δ 38,35), fechando o primeiro ciclo.

Partindo do fragmento **b**, observa-se que os hidrogênios do C_7 (δ 32,66) correlacionam com o C_8 (δ 39,07) quaternário, que mostra correlação com os hidrogênios do C_{11} (δ 27,58) e das metilas C_{26} (δ 16,31) e C_{27} (δ 22,88), sendo que o C_{14} (δ 41,63) quaternário também mostra correlação com estas mesmas metilas e ainda com um dos hidrogênios do C_7 (δ 32,66), porém vê-se que o carbono C_7 (δ 32,66) está ligado ao C_8 (δ 39,07) e não ao C_{14} (δ 41,63), porque o C_{14} (δ 41,63) mostra correlação com hidrogênios mais distantes, os H dos carbonos C_{15} (δ 22,80) e C_{18} (δ 52,54), que pertencem ao quarto ciclo, enquanto que todas as correlações

do C₈ (δ 39,07) restringem-se aos segundo e terceiro ciclos. Tem-se ainda que o C₉ (δ 47,22) está correlacionado com os hidrogênios das metilas C₂₅ (δ 14,75) e C₂₆ (δ 16,31) e também com os hidrogênios do C₁₁ (δ 27,58), C₁ (δ 38,35) e C₅ (δ 54,96) comprovando que ele é o carbono monohidrogenado pertencente ao segundo e terceiro ciclos; considerando que o C₁₀ (δ 36,48) é o único carbono quaternário que correlaciona com a metila C₂₅ (δ 14,75), cujos hidrogênios correlacionam com o carbono C₁ (δ 38,35) e C₉ (δ 47,22), assim confirma-se que esta metila está ligada ao C₁₀ (δ 36,48), e este está ligado ao C₉ (δ 47,22) [O C₁₀ (δ 36,48) também está correlacionado com o H-9 (δ 1,78) do C₉ (δ 47,22)]. Consequentemente, confirmou-se que o fragmento **b** está ligado através do C₇ (δ 32,66) ao carbono C₈ (δ 39,07), que está ligado à metila C₂₆ (δ 16,31) e ao C₉ (δ 47,22), que se liga a C₁₀ (δ 36,48) fechando o segundo ciclo.

Considerando agora o fragmento **c**, observa-se que os hidrogênios do C₁₁ (δ 27,58) estão correlacionados com o C₉ (δ 47,22) e com o C₈ (δ 39,07), e que o H-12 (δ 5,49) do C₁₂ (δ 125,13), carbono vinílico bastante desprotegido, mostra correlação com o C₁₃ (δ 137,85), altamente desprotegido, e com o carbono quaternário C₁₄ (δ 41,63), sendo que este mostra correlação com os hidrogênios das metilas C₂₆ (δ 16,31) e C₂₇ (δ 22,88). Logo, tem-se que o fragmento **c** está ligado através do C₉ (δ 47,22) ao C₈ (δ 39,07), que está ligado à metila C₂₆ (δ 16,31) e ao C₁₄ (δ 41,63), o qual se liga ao C₁₃ (δ 137,85), que se funde ao fragmento **c** através do C₁₂ (δ 125,13), fechando o terceiro ciclo.

Todas as correlações observadas nos espectros HMBC (Figura 3.49), COSY (Figura 3.50) e NOESY (Figura 3.51), que proporcionaram a determinação estrutural da substância MHFA2 (Figura 3.52), identificada como sendo um triterpeno da classe ursânica conhecido como ácido ursólico (rotação específica $[\alpha]_D^{26,6} = +242^\circ$, CHCl₃/MeOH 1:1).

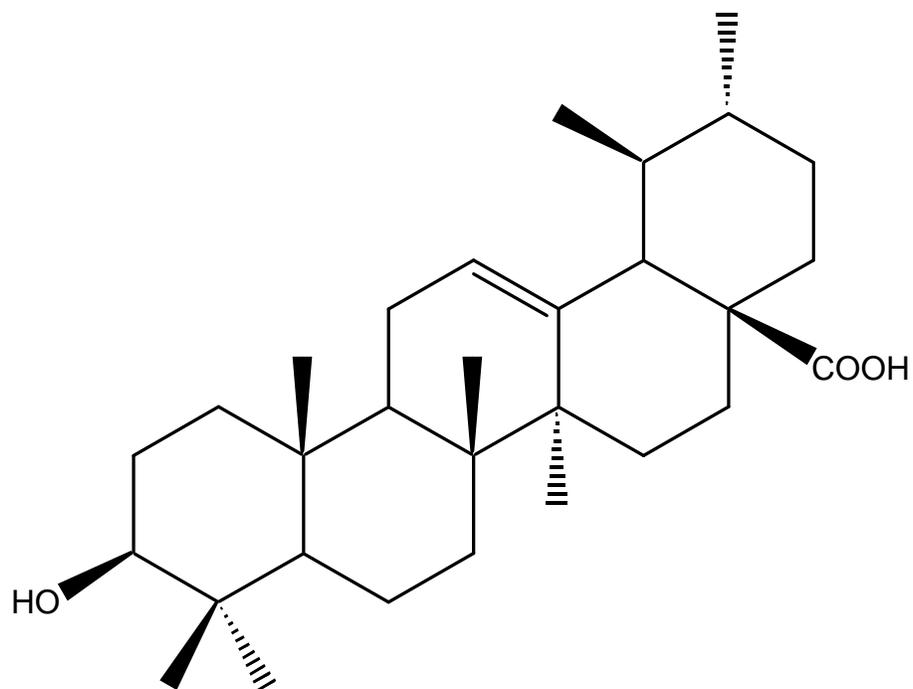


Figura 3.52. Estrutura do ácido ursólico (MHFA2).

Os valores dos deslocamentos dos sinais mostrados nos espectros unidimensionais e bidimensionais e suas respectivas correlações também constam da Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Dados de RMN ¹H, ¹³C (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a Amostra MHFA2. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

C13 Carbon	δC ¹³	H ¹ δH ¹	HMBC δH ¹	δHa	COSY		δHa	NOESY δHb
					δHb	δHb		
1	CH ₂ 38,35	1,27m; 1,91m		1,19 (H-25)	1,27 (H-1); [1,91 (H-1)]	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); [1,27 (H-1); 1,26 (H-2); 1,85 (H-2)]		
2	CH ₂ 26,22	1,26m; 1,85m	1,27 (H-1); 1,91 (H-1); 3,43 (H-3)		1,26 (H-2); [1,85 (H-2)]	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); 3,43 (H-3); [1,27 (H-1); 1,91 (H-1); 1,26 (H-2); 3,43 (H-3)]	1,26 (H-2)	1,03 (H-24)
3	CH 78,15	3,43dd (J= 5,20 e 10,80 Hz)	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); 1,23 (H-23); 1,03 (H-24)		3,43 (H-3)		1,26 (H-2); 1,85 (H-2)	1,85 (H-2); 0,99 (H-5); 1,23 (H-23)
4	C 38,24		3,43 (H-3); 1,80 (H-6); 1,79 (H-7); 1,23 (H-23); 1,03 (H-24)					
5	CH 54,96	0,99d			0,99 (H-5)		1,64 (H-6); 1,80 (H-6)	1,64 (H-6)
6	CH ₂ 17,88	1,64m; 1,80m	0,99 (H-5); 1,61 (H-7); 1,79 (H-7)		1,64 (H-6); [1,80 (H-6)]	1,80 (H-6); 0,99 (H-5); 1,79 (H-7); [0,99 (H-5); 1,64 (H-6); 1,61 (H-7)]	1,80 (H-6)	0,99 (H-5); 1,61 (H-7); 1,36 (H-27)
7	CH ₂ 32,66	1,61m; 1,79m			1,61 (H-7); [1,79 (H-7)]	1,79 (H-7); 1,80 (H-6); [1,61 (H-7); 1,64 (H-6)]		
8	C 39,07		1,61 (H-7); 1,79 (H-7); 2,17 (H-11); 1,09 (H-26); 1,36 (H-27)					
9	CH 47,22	1,78m	1,27 (H-1); 0,99 (H-5); 1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 1,19 (H-25); 1,09 (H-26)	1,78 (H-9)		1,09 (H-26); 1,33 (H-11); 2,17 (H-11)		
10	C 36,48		1,91 (H-1); 1,26 (H-2); 1,85 (H-2); 0,99 (H-5); 1,78 (H-9); 2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 1,19 (H-25); 1,09 (H-26)					
11	CH ₂ 27,58	1,33m; 2,17m			1,33 (H-11); [2,17 (H-11)]	1,78 (H-9); 2,17 (H-11); 5,49 (H-12); [1,78 (H-9); 1,33 (H-11); 5,49 (H-12)]		
12	CH 125,13	5,49t (J=3,60 Hz)	2,17 (H-11); 2,45 (H-18)	5,49 (H-12)		1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 2,45 (H-18)	5,49 (H-12)	2,17 (H-11); 2,45 (H-18); 1,13 (H-29)
13	C 137,85		2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 2,45 (H-18); 1,36 (H-27)					
14	C 41,63		1,79 (H-7); 5,49 (H-12); 2,18 (H-15); 2,45 (H-18); 1,09 (H-26); 1,36 (H-27)					
15	CH ₂ 22,80	1,79m; 2,18m			1,79 (H-15); [2,18 (H-15)]	2,18 (H-15); [1,79 (H-15); 1,90 (H-16); 2,27 (H-16)]	2,18 (H-15)	1,33 (H-11); 1,90 (H-16); 1,09 (H-26)
16	CH ₂ 23,76	1,90m; 2,27m	1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 2,45 (H-18); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)	1,90 (H-16); [2,27 (H-16)]		2,18 (H-15); 2,27 (H-16); [1,90 (H-16); 2,18 (H-15)]	2,27 (H-16)	1,88 (H-22); 1,36 (H-27); 1,60 (H-21); 1,09 (H-26)
17	C 47,45		2,27 (H-16); 2,45 (H-18); 1,60 (H-21); 1,75 (H-21); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)					
18	CH 52,54	2,45d	2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 1,12 (H-20); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)	2,45 (H-18)	1,60 (H-21); 1,88 (H-22); 5,49 (H-12); 1,21 (H-19)		2,45 (H-18)	1,21 (H-19); 1,60 (H-21); 1,88 (H-22); 1,13 (H-29)
19	CH 38,60	1,21d	1,12 (H-20); 1,88 (H-22); 1,94 (H-22)	1,21 (H-19)			2,45 (H-18)	
20	CH 38,72	1,12d	2,45 (H-18)	1,12 (H-20)			1,60 (H-21); 1,75 (H-21)	
21	CH ₂ 30,22	1,60m; 1,75m	1,88 (H-22); 1,95 (H-22); 1,20 (H-30)	1,60 (H-21); [1,75 (H-21)]	1,12 (H-20); 1,75 (H-21); 1,88 (H-22); 1,94 (H-22); [1,60 (H-21); 1,12 (H-20)]		1,75 (H-21)	1,20 (H-30)
22	CH ₂ 36,43	1,88m; 1,94m		2,18 (H-15)	1,88 (H-22); [1,94 (H-22)]	1,60 (H-21); 1,88 (H-22); [1,94 (H-22); 1,60 (H-21)]		
23	CH ₃ 27,39	1,23s		1,03 (H-24)			1,03 (H-24)	
24	CH ₃ 15,00	1,03s		1,03 (H-24)			1,03 (H-24)	1,64 (H-6)
25	CH ₃ 14,75	1,19s					1,19 (H-25)	1,64 (H-6)
26	CH ₃ 16,31	1,09s		1,78 (H-9)	1,09 (H-26)		1,78 (H-9)	
27	CH ₃ 22,88	1,36s					1,36 (H-27)	1,64 (H-6)
28	C 180,26		2,27 (H-16); 2,45 (H-18); 1,88 (H-22)					
29	CH ₃ 16,34	1,13d (J=6,4 Hz)	2,45 (H-18); 1,21 (H-19); 1,60 (H-21)					
30	CH ₃ 20,36	1,20d (J=8,0 Hz)						

3.5.3. MHFC1a e MHFC1b

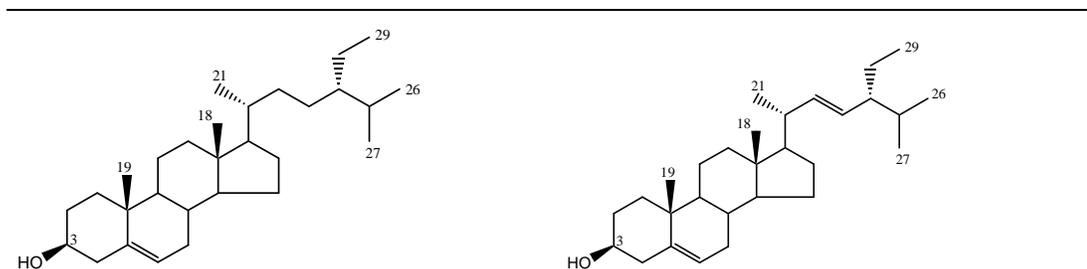
As substâncias codificadas de **MHFC1a** (componente predominante) e **MHFC1b** foram isoladas como uma mistura e identificadas como sendo os fitoesteróides β -sitosterol e estigmasterol, respectivamente, com base na interpretação dos espectros na reação do IV e RMN ^1H .

O espectro na região do IV revelou bandas de absorção de estiramento e deformação sugerindo a natureza alifática dos componentes (2936, 2866, 1465, 1381 cm^{-1}), grupo hidroxílico (3432, 1054 e 1022 cm^{-1}) e de ligação dupla (1645 cm^{-1}). O espectro de RMN ^1H , por sua vez, revelou a presença de sinais simples e múltiplos correspondentes aos hidrogênios dos grupos metílicos (vários sinais entre δ 0,96 a 0,68), de hidrogênio metílico carbinólico [δ 3,56-3,47 (m, H-3 de MHF2)] e de hidrogênios olefínicos [δ 5,05-4,97 (m, H=6) e δ 5,19-5,11 (m, H-22 e H-23)] (Tabela 3.5).

A análise do espectro de RMN ^{13}C e DEPT permitiu reconhecer a natureza dos sinais correspondentes aos átomos de carbono trihidrogenados (CH_3), dihidrogenados (CH_2), monoiidrogenados (CH) e não hidrogenados (C) referentes ao componente **MHFC1a** e, somente alguns, referentes a **MHFC1b** (Tabela 3.5). Dentre esses carbonos, ressaltam-se os valores de deslocamento químicos referentes aos carbonos sp^2 [δ 138,33 (C , C-5) e δ 121,72 (CH , C-6) de ambos componentes] e [δ 138,33 (CH , C-22) e δ 129,04 (CH , C-23) de **MHFC1b**] e do carbono sp^3 oxigenado de ambos componentes [δ 71,80 (CH , C-3)] (Tabela 3.5).

Os compostos **MHFC1a** e **MHFC1b** não foram injetados diretamente no espectrômetro de massas, uma vez que a análise por CCD revelou apenas uma mancha, quando na realidade estes compostos se dividiram em tempos de retenção diferente quando sililados e analisados em GC-MS (Figura 3.53 e 3.54) (BULL *et al.*, 2001).

Tabela 3.5. RMN das substâncias MHFC1a e MHFC1b e do Modelo da Literatura (MACARI *et al.*, 1990) em CDCl₃, deslocamento em δ.



¹ H	MHFC1a	MHFC1b	¹³ C	MHFC1a	MHFC1b
H-3	3,56-3,47 (m)	3,56-3,47 (m)	1	37,23 CH ₂	37,23 CH ₂
			2	31,63 CH ₂	31,63 CH ₂
			3	71,80 CH	71,80 CH
H-6	5,05-4,97 (m)	4,97-5,19 (m)	4	42,27 CH ₂	42,27 CH ₂
			5	138,33 C	138,33 C
			6	121,72 CH	121,72 CH
H-22, H-23	*	5,19-5,11 (m)	7	31,63 CH ₂	31,63 CH ₂
			8	31,87 CH	31,87 CH
			9	50,12 CH	50,12 CH
Me-18	0,68 s	0,68 s	10	36,14 C	36,14 C
			11	21,06 CH ₂	21,06 CH ₂
			12	39,75 CH ₂	39,75 CH ₂
Me-19	0,96 s	0,96 s	13	42,29 C	39,75 C
			14	55,91 CH	56,85 CH
			15	24,36 CH ₂	24,36 CH ₂
Me-21	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	16	28,25 CH ₂	28,93 CH ₂
			17	56,85 CH	55,91 CH
Me-26	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	18	11,85 CH ₃	11,85 CH ₃
			19	19,40 CH ₃	19,97 CH ₃
Me-27	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	20	36,14 CH	40,52 CH
			21	18,97 CH ₂	21,21 CH ₂
Me-29	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	22	31,87 CH ₂	138,33 CH
			23	23,01 CH ₂	129,04 CH
			24	45,82 CH	51,23 CH
			25	29,11 CH	29,71 CH
			26	19,83 CH ₃	21,06 CH ₃
			27	18,77 CH ₃	18,97 CH ₃
			28	23,06 CH ₂	25,39 CH ₂
			29	11,85 CH ₃	12,26 CH ₃

Os dados espectrais discutidos, associados à análise comparativa dos dados espectrais dos respectivos compostos descritos na literatura permitiram identificar os componentes **MHFC1a** e **MHFC1b** como sendo o β-Sitosterol (**15**) e o estigmasterol (**16**), respectivamente.

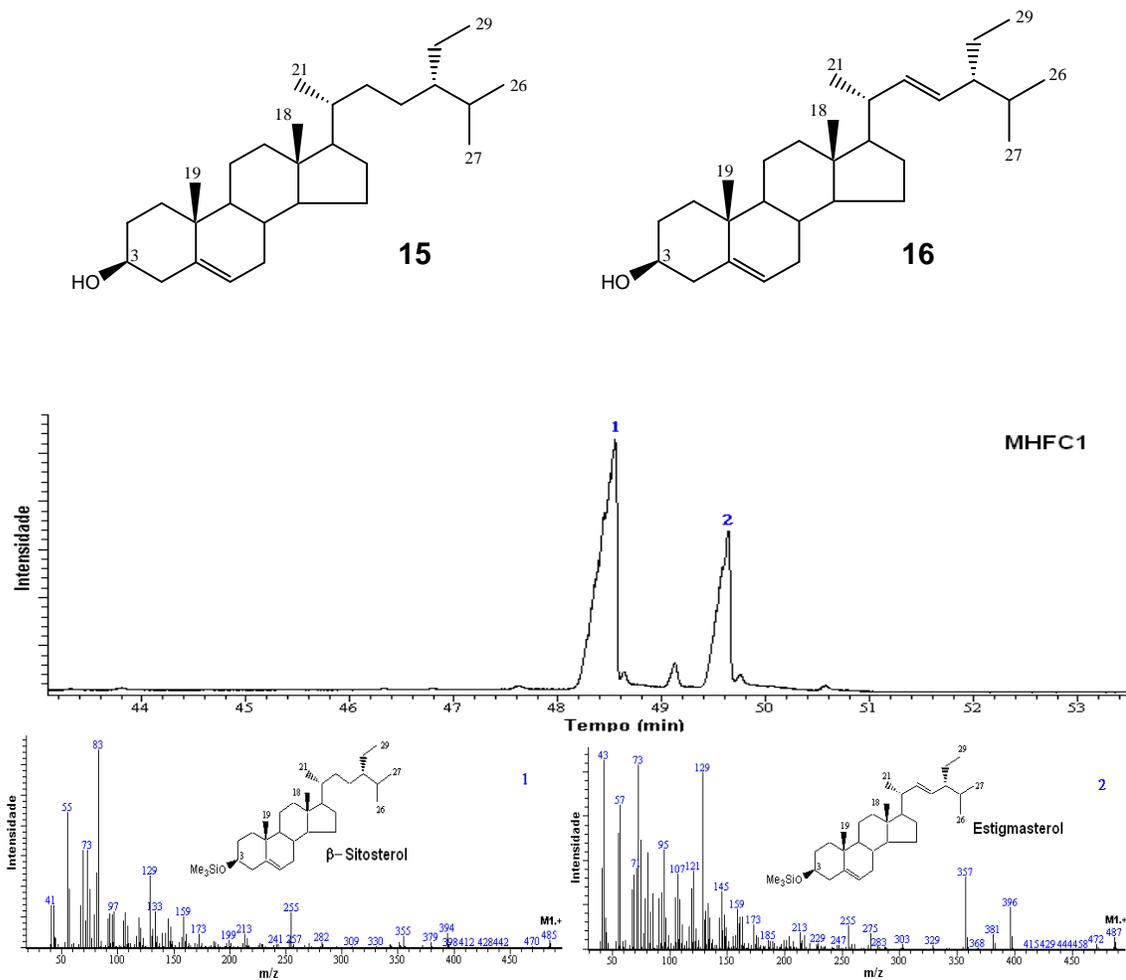


Figura 3.53. Cromatograma dos compostos β-sitosterol e estigmasterol e espectro de massas.

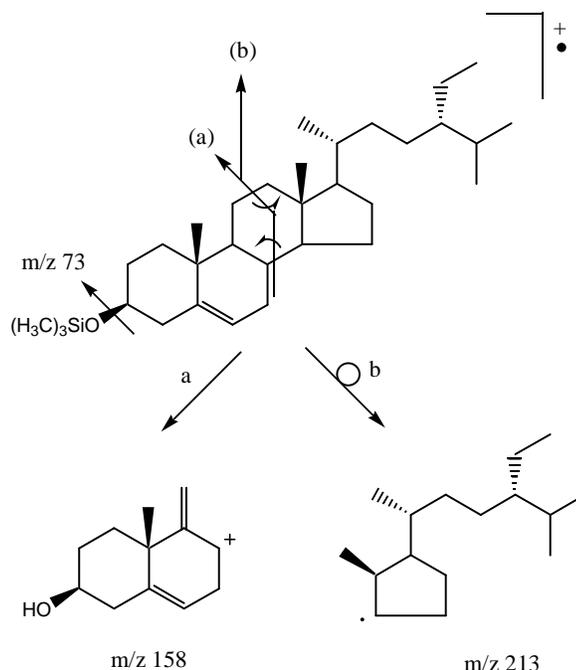


Figura 3.54. Principais fragmentos no espectrômetro de massas do β -sitosterol (MHFC1a) e estigmasterol (MHFC1b).

3.5.4. MHFC2

A substância codificada de **MHFC2** apresentou-se como um sólido branco, de ponto de fusão 176-178 °C (MeOH). Sua natureza triterpenóica foi sugerida por esta apresentar coloração rósea avermelhada frente ao reagente de Liebermann-Buchard e coloração violeta em solução ácida de sulfato cérico.

O espectro de absorção do infravermelho obtido em KBr, revelou bandas de absorção indicativas da presença de grupo hidroxila (3375 e 1043 cm^{-1}) e de grupos alquila saturados (2943 , 2870 , 1454 e 1380 cm^{-1}). O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 a 300 MHz revelou sinais, cujos valores de deslocamentos químicos e multiplicidades estão consistentes com a presença de seis grupos metila terciários [$(\delta\ 1,67, 30\text{H (s)}, \delta\ 4,67\text{ (d, J = 2,4 Hz)}$ e $4,55\text{ (d, J = 2,4 Hz)}$] para um hidrogênio cada, de hidrogênio metílico carbinólico [$\delta\ 3,21, 1\text{H (m)}$].

O espectro de massa obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Figura 3.55) em espectrômetro de baixa resolução, forneceu o pico do íon molecular de $m/z\ 426$ (38%), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{O}$, e o pico base de $m/a\ 218$, que sugere fragmentação envolvendo a reação do tipo retro Diels Alder em triterpeno

pentacíclico da série lupano. Acompanhado de dois fragmentários em m/z 203 (23%), 190 (12%) e 189 (71%) dentre outros de menores intensidades (Figura 3.56).

A substância **MHFC2** foi assim identificada como sendo o triterpenóide pentacíclico da série lupano, denominado 3β-hidroxi-lup-20(29)-ene (**17**), conhecido como lupeol. De acordo com os dados espectrais discutidos e comparação destes com os descritos na literatura e com uma amostra autêntica (Tabela 3.6).

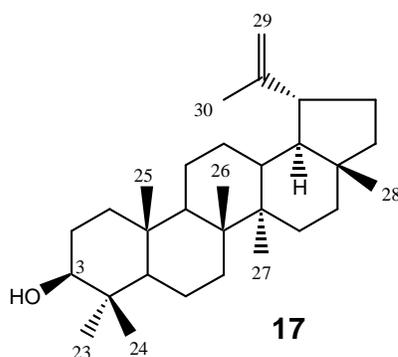


Tabela 3.6. RMN da substância MHF2 e do Modelo da Literatura modelo do lupeol (MAHATO E KUNDU, 1994) em CDCl₃, deslocamento em δ.

¹ H	MHFC2	Lupeol
H-3	3,21-3,16 (m)	3,21 -3,16 (m)
H-19	2,42-2,29 (m)	2,42-2,29 (m)
H-29a	4,67 (d, J = 2,4 Hz)	4,66 (d, J = 2,2 Hz)
H-29b	4,55 (d, J = 2,4 Hz)	4,54 (d, J = 2,2 Hz)
Me-23	0,75 s	0,76 s
Me-24	0,78 s	0,92 s
Me-25	0,82 s	0,80 s
Me-26	0,93 s	1,01 s
Me-27	0,96 s	0,94 s
Me-28	1,02 s	0,74 s
Me-30	1,67 s	1,65 s

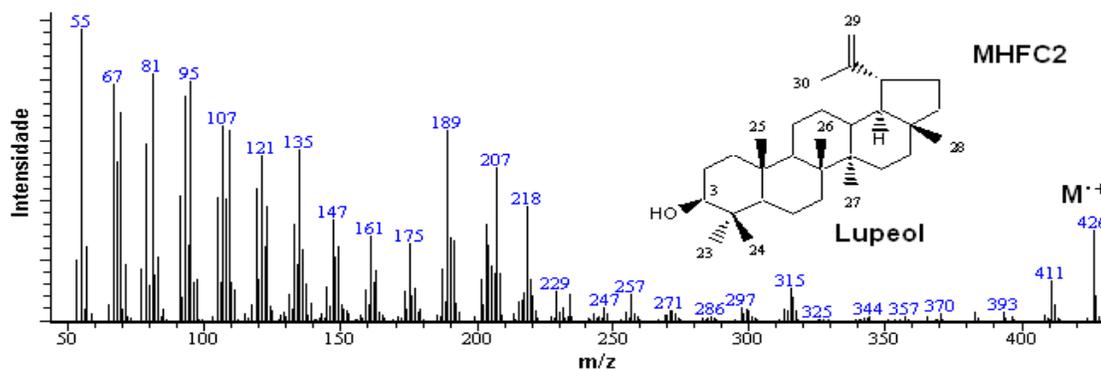


Figura 3.55. Fragmentograma da amostra MHFC2.

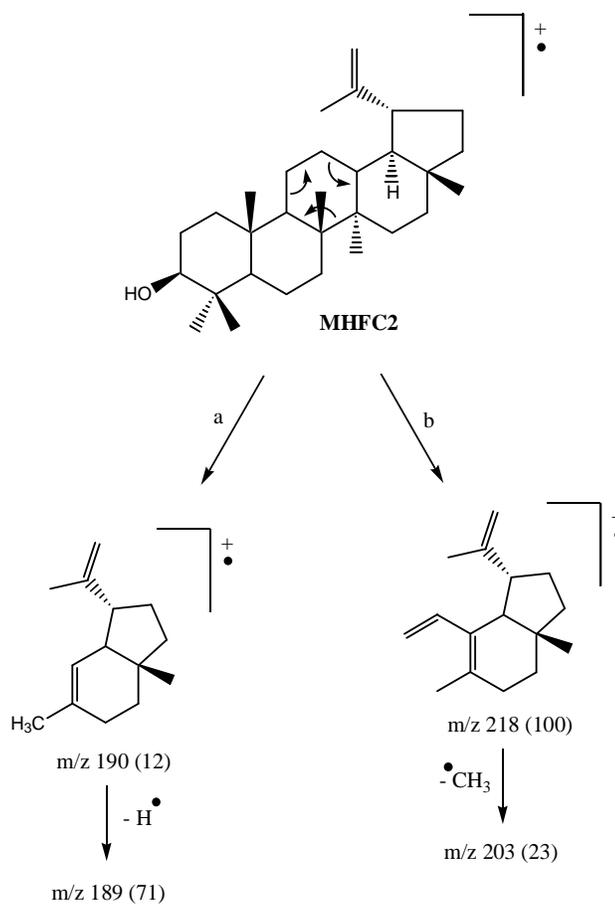


Figura 3.56. Principais fragmentos no espectrômetro de massas do lupeol (MHFC2) entre parênteses estão às intensidades relativas.

3.6. METABOLÔMICA DA *M. hirsuta*

O Brasil apresenta 55 mil espécies vegetais catalogadas, o que corresponde a uma parte significativa da diversidade vegetal do mundo (SIMÕES *et al.*, 2000). Dentro deste contexto se destaca o Semi-Árido brasileiro, que é uma região bastante populosa principalmente constituída de indivíduos que muitas vezes não tem acesso aos serviços básicos de saúde e que, por isso, utilizam as plantas como recurso principal no tratamento de doenças.

As plantas da família Bignoneaceae são frequentemente encontradas e usadas pela população do Semi-Árido para este fim, sendo que uma vez que várias espécies desta família apresentam atividades biológicas importantes como antinociceptiva e antiinflamatória em *Catalpa bignonioides* Walt (MUNOZ-MINGARRO *et al.*, 2003), antimicrobiana em *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (LIMA *et al.*, 2003), *Tabebuia aurea* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2004) e *T. impetiginosa* (PEREZ & ANESINI, 1994), antimalárica em *Tabebuia aurea* (SILVA & QUEIROZ, 2003), antiviral em *Tabebuia impetiginosa* (SIMÕES *et al.*, 1999) citotoxicidade para células de tumor pulmonar da linhagem NCIH-292 em *Melloa quadrivalvis* (Jacq.) A.H. Gentry (LIMA *et al.*, 2005) e atividade antitumoral contra células da linhagem 38 de carcinoma de cólon e P-388 de leucemia (SUFFNESS *et al.*, 1988), o que justifica a necessidade da análise do perfil metabolômico das espécies desta família, dentre elas a *M. hirsuta*.

A *M. hirsuta* pode ser encontrada em várias localidades no Semi-Árido nordestino como as regiões escolhidas no presente estudo (Campo Alegre de Lourdes, Gentio de Ouro, Morro do Chapéu, Boninal e Caetité). Embora seja quimicamente pouco conhecida, ela apresentou atividade imunomoduladora e redutora do radical NO, como visto anteriormente. Por isso, ela foi escolhida para o estudo metabolômico, uma vez que o mesmo permite estabelecer correlações entre várias variáveis (tipo de solo, constituição química, relevo, meio ambiente, etc) com a atividade biológica apresentada, de modo a selecionar plantas com a melhor atividade possível.

A partir da similaridade metabolômica obtida a partir da PCA, as 5 populações de *M. hirsuta* foram divididas em cinco grandes grupos. A Figura 3.57 mostra o resultado da PCA para as amostras das cinco regiões pesquisadas, sendo que os

dados permitiram estabelecer que dois componentes são responsáveis por 57,40% da variação das espécies, sendo 18,5% da variância ao longo do eixo Y causada pelo componente 2 e 38,9% da variância no eixo X causada pelo componente 1. Foi possível observar a separação das espécies em regiões mais ou menos definidas, embora sobreposições tenham sido observadas, bem como a separação dos indivíduos dentro de uma mesma região, o que pode ser atribuído à coleta de plantas em idades distintas, pois o trabalho objetivou apenas visualizar a influência de alguns fatores geográficos no metabolismo desta espécie.

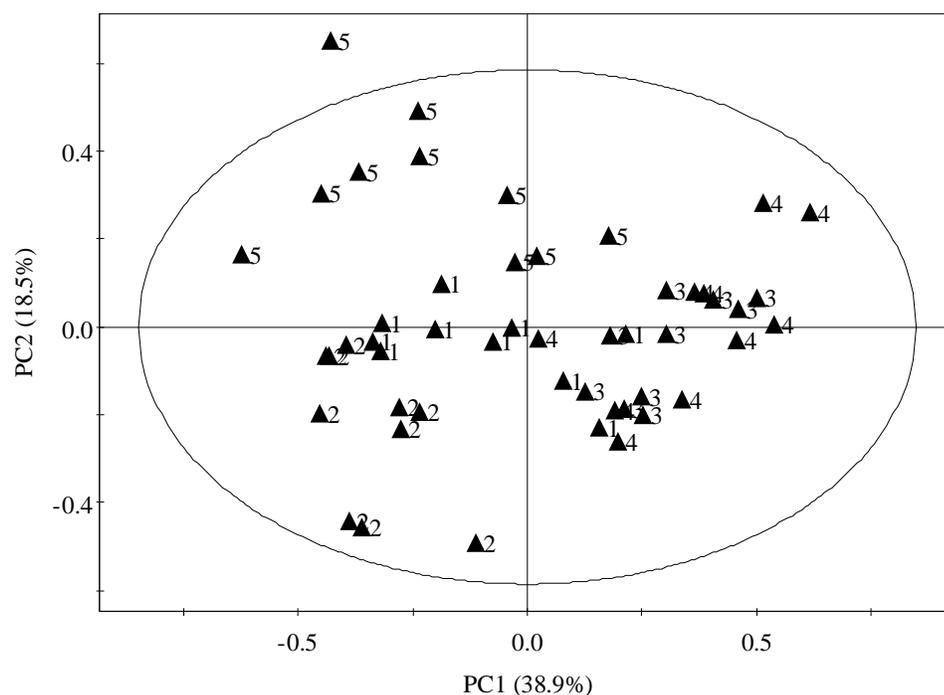


Figura 3.57. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo PCA. ▲1: Campo Alegre de Lourdes, ▲2: Gentio de Ouro, ▲3: Morro do chapéu, ▲4: Boninal e ▲5: Caetité.

Uma vez que o padrão de separação mostrou a sobreposição de espécies na mesma área, as análises subsequentes levaram em consideração variáveis secundárias tais como as características geográficas. Para tanto, foi usada a PLS-DA que permitiu a separação mais acentuada das plantas em cinco regiões bem definidas, como pode ser visto na Figura 3.58, o que é indicativo de que plantas de uma determinada região apresentam metabolismo particular, com pelo menos dois

componentes principais que as definem e que ajudam a diferenciá-las de espécies de outra região de coleta. A variação total observada para os dois componentes foi de 42%, sendo que 18.9% da variância ao longo do eixo Y foi causada pelo componente 2 e 23.1% da variância no eixo X causada pelo componente 1.

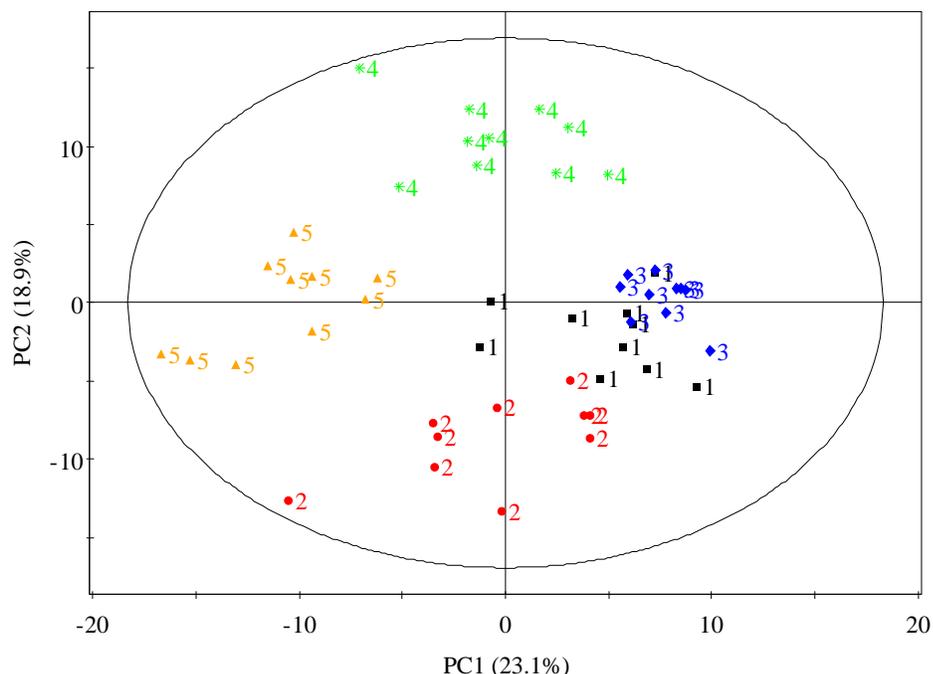


Figura 3.58. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo de PLS-DA. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ●2: Gentio de Ouro, ◆3: Morro do chapéu, *4: Boninal e ▲5: Caetité.

Os extratos brutos metanólicos de *M. hirsuta* foram submetidos à ^1H RMN e posteriormente agrupados de acordo com a PLS-DA. Para identificar as substâncias nos espectros ^1H RMN, os sinais ocorrendo nas diferentes regiões do espectro foram utilizados para classificar os tipos de metabólitos secundários presentes nos mesmos. A Figura 3.59 mostra um espectro de um dos extratos brutos de *M. hirsuta*. Em geral, os sinais em δ 0,5-3,0 são atribuídos a prótons alifáticos dos grupos metil (CH_3 -), metileno (CH_2 -) e metino (CH -) típicos de compostos não aromáticos, indicando que os extratos apresentavam uma alta concentração dos mesmos. Embora presentes, os sinais dos compostos aromáticos tiveram pouca intensidade.

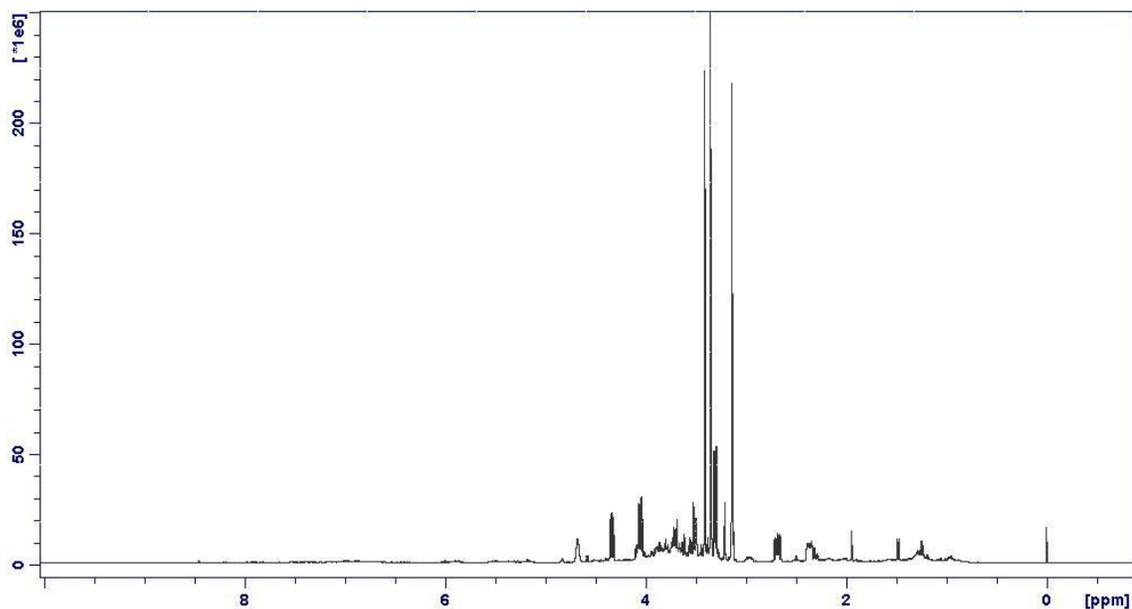


Figura 3.59. Espectro de ^1H RMN de um dos extratos brutos de *Mansoa hirsuta*.

A Figura 3.60 mostra a distribuição dos deslocamentos químicos observados para os principais metabólitos nos extratos. Os escores em vermelho indicam as regiões e ao seu redor estão os picos que se diferenciam entre uma região e outra. A correlação entre os valores de δ dos espectros de ^1H RMN na Figura 3.60 e os dados da Figura 3.58 permite estabelecer que as plantas da região de Gentio de Ouro (Figura 3.58, PC1 entre -10 e +10 e PC2 -10), por exemplo, são ricas em triterpenos e esteróides.

A fim de lidar com o congestionamento de sinais observado na Figura 3.60, foram empregadas técnicas bidimensionais de RMN. Apesar de ^1H RMN ser considerada uma promissora ferramenta analítica para investigação metabolômica, alguns problemas podem ser encontrados quando da aplicação desta técnica, dentre eles a sobreposição de sinais. Neste caso, o congestionamento de sinais pode ser resolvido aplicando diversas técnicas bidimensionais de RMN-2D, como foi aplicado para a resolução dos metabólitos nos extratos das populações de *M. hirsuta*. Dentre as técnicas empregados, a 2D- ^1H - ^1H -J-resolvido mostrou eficiência e robustez do sinal em diversas aplicações de metabolômica (VIANT, 2003; CHOI *et al.*, 2006).

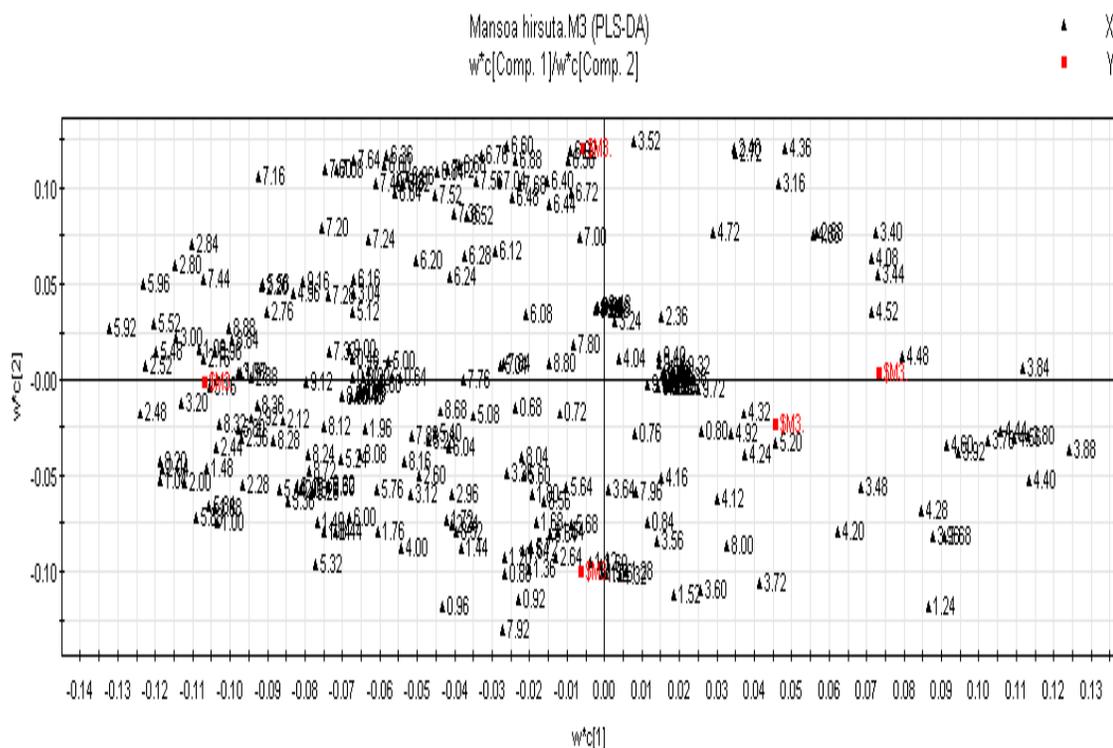


Figura 3.60. Distribuição e agrupamento dos sinais de ^1H RMN para os dois componentes principais no modelo de PLS-DA.

No escore relativo à região de Gentio de Ouro (Figuras 3.58 e 3.60) observa-se deslocamentos químicos relativos à triterpenos pentacíclicos (ácidos ursólico e oleanólico) e esteróides, caracterizados pelos sinais referentes à região blindada entre δ 1,03-1,36 ppm referentes aos prótons de grupos metila (CH_3 -) ligados a carbono não hydrogenado (2 dupletos, δ 1,13 ppm e $J = 6,4$ Hz e δ 1,20 ppm e $J = 8,0$ Hz), que foi confirmado no J -resolvido (Figuras 3.60 e 3.61). O hidrogênio carbinólico dos triterpenos pentacíclicos foi caracterizado pela presença de um duplo duplete em δ 3,56 ppm ($J = 5,20$ Hz e 10,80 Hz, Figura 3.60 e 3.62). Os deslocamentos químicos relativos aos esteróides estigmasterol e β -sitosterol são simpletos na região de δ 0,68-0,92 ppm (Figura 3.60 e 3.63), e no caso do lupeol em uma região mais ampla indo de δ 0,68 a 1,68 ppm (Figura 3.60 e 3.63). Os demais sinais relativos a estas substâncias podem ser conferidos nos espectros de MHAF1, MHAF2, MHFC1a, MHFC1b e MHFC2, conforme visto anteriormente.

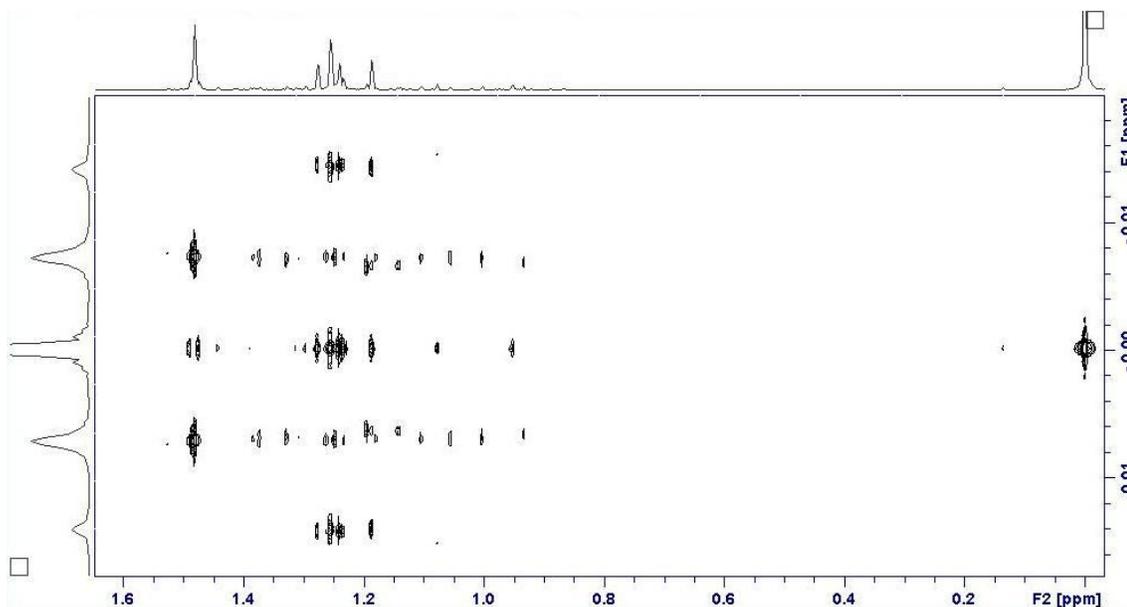


Figura 3.61. Espectro ¹H-¹H J-resolvido bidimensional de *M. hirsuta* na região δ 0-1.6 ppm característicos de triterpenos e esteróides.

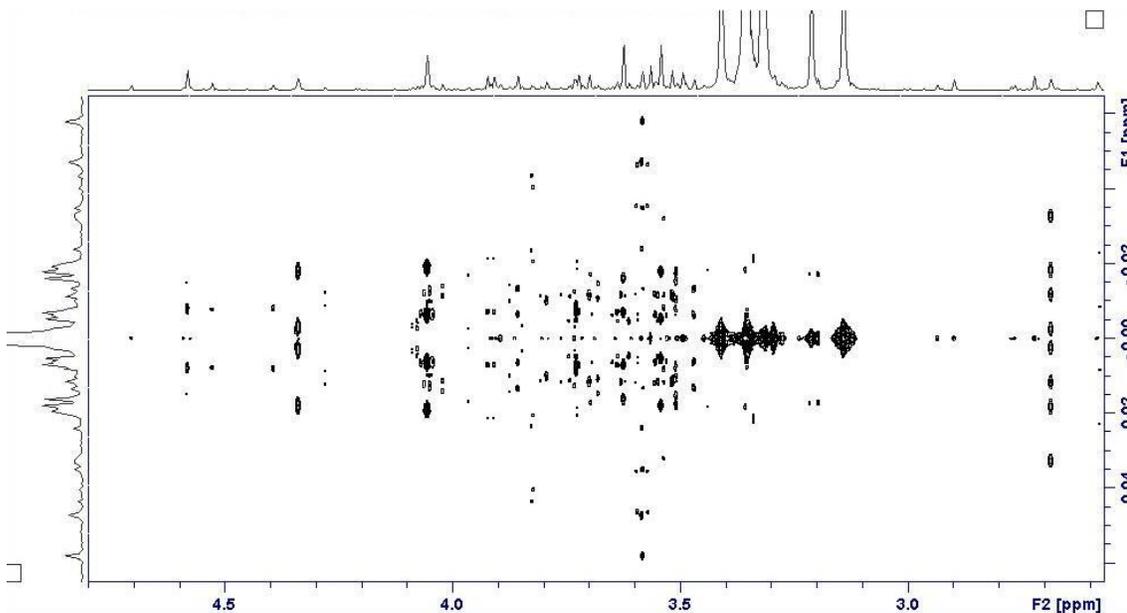


Figura 3.62. Espectro ¹H-¹H J-resolvido bidimensional de *M. hirsuta* na região δ 2,2-4,7 ppm característicos de triterpenos e esteróides.

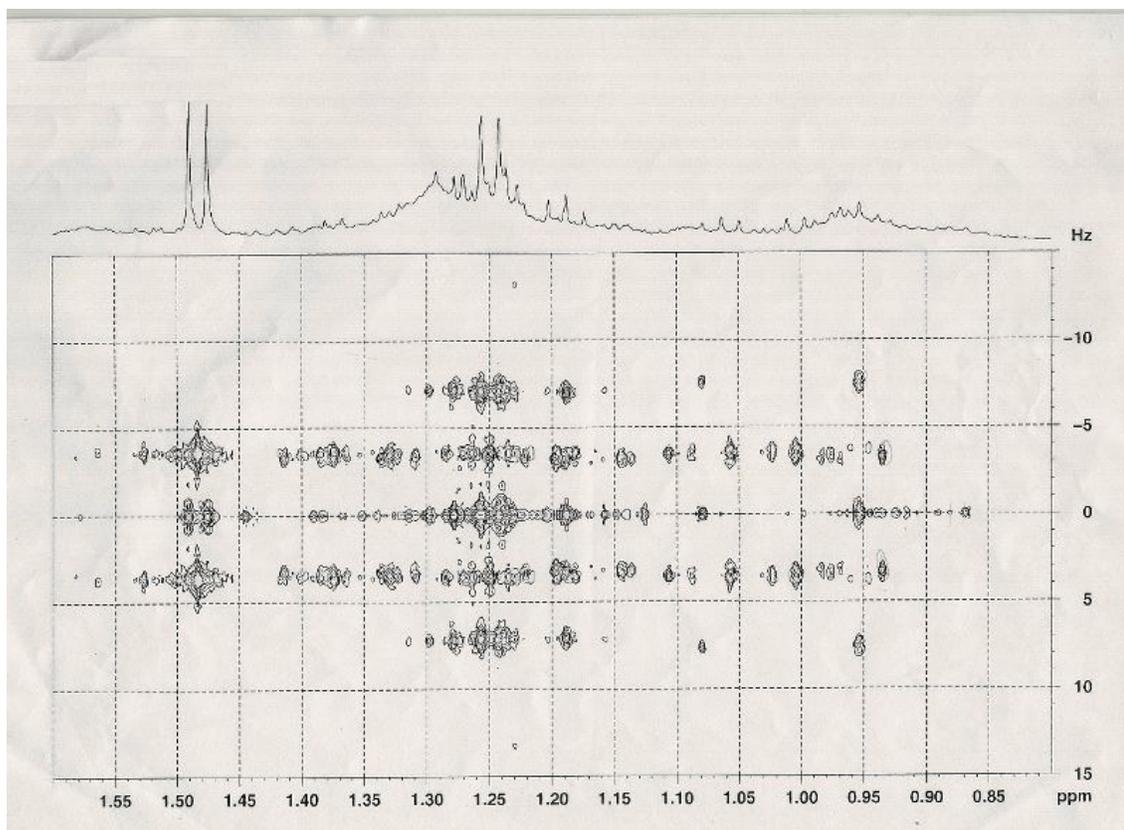


Figura 3.63. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional de *M. hirsuta* na região δ 0-1.6 ppm contendo simpletos característico de esteróides como estigmasterol e β -sitosterol.

No escurecimento relativo à região de Boninal (Figuras 3.58 e 3.60) observa-se δ possivelmente relacionados à flavonóides, uma vez que estes compostos foram detectados pela presença no escurecimento relativo a esta região de uma grande quantidade de sinais com δ 6-8 ppm (Figura 3.60). O espectro *J*-resolvido (Figura 3.64) evidencia os sinais cujos valores de δ , multiplicidades e constantes de acoplamento estão compatíveis com o esqueleto de flavonóides substituídos nos anéis A (Figura 3.65), na posição 5, 6, 7 e 8 (δ 6,78 e 6,72, simpletos) e anéis B do tipo 1,4-dissubstituídos (δ 7,66, 7,84 e 6,81, dupletos) de acordo com o descrito na literatura para metoxiflavonas previamente isoladas de Bignoniaceae (KUTNEY & HANSEN, 1971; BASTOS *et al.*, 2009).

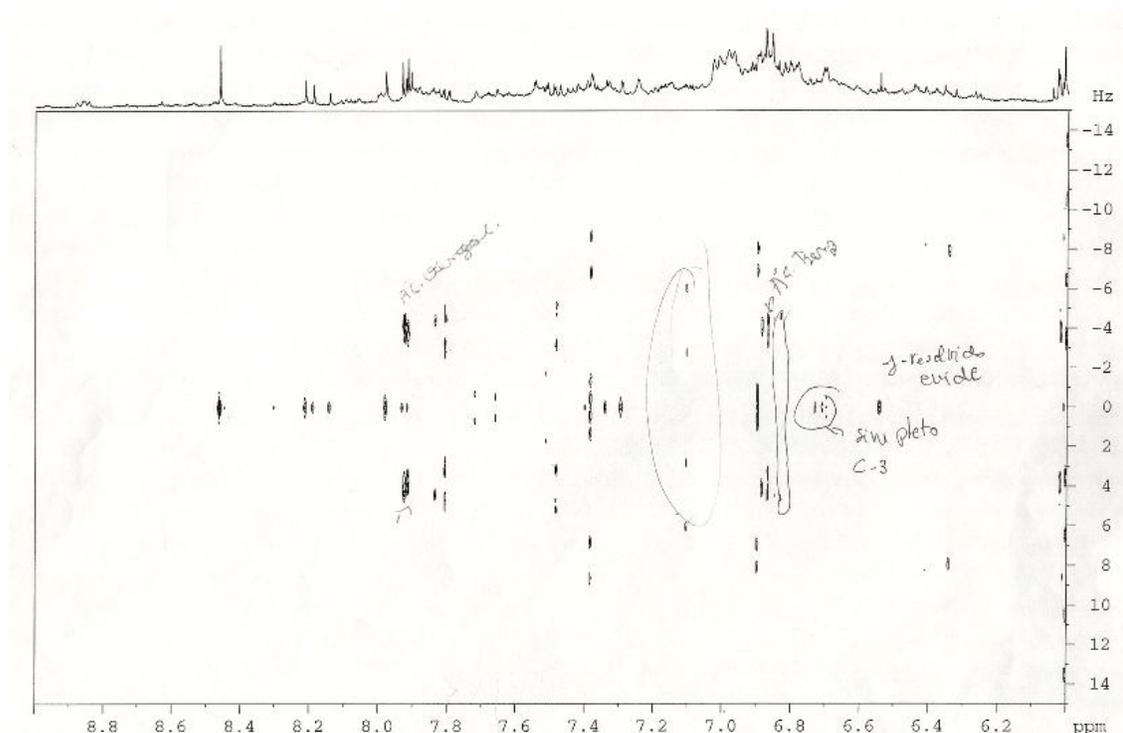


Figura 3.64. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional da *M. hirsuta* de Boninal na região de aromáticos característica de flavonóides.

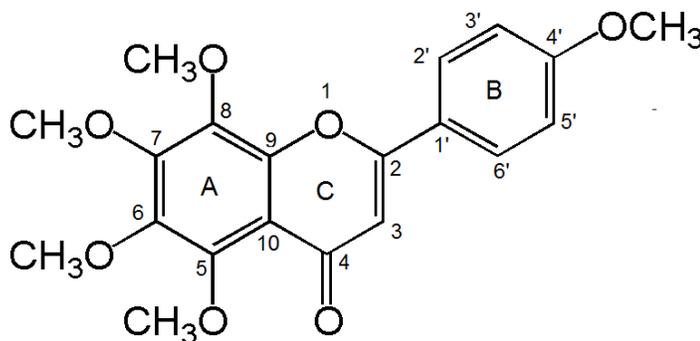


Figura 3.65. Estrutura da tangeritina, uma metoxiflavona 5,6,7,8-substituída no anel A e 1', 4'-dissubstituída no anel B.

No escorrelativo à região de Caetitê (Figuras 3.58 e 3.60), os δ encontrados sugerem a presença de taninos do tipo proantocianidinas (Figura 3.66) tais como catequina e epicatequina, como previamente descrito para a *M. hirsuta* por CAMPANA *et al.* (2009). Os δ na região entre 5,0 e 6,0 são característicos de prótons aromáticos no anel A e o próton residual no anel D, enquanto a região com δ entre 6,5-7,5 é característica dos prótons localizados nos anéis B e E como descrito por APPELDOORN *et al.* (2009). Estes dados estão de acordo com o observado

para estas regiões no espectro *J*-resolvido, que mostra a presença de dupletos e simpletos característicos dos sinais acima.

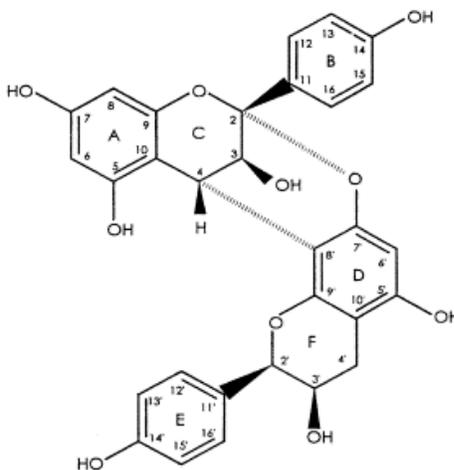


Figura 3.66. Estrutura geral de uma protoantocianidina (RAWAT *et al.*, 1999).

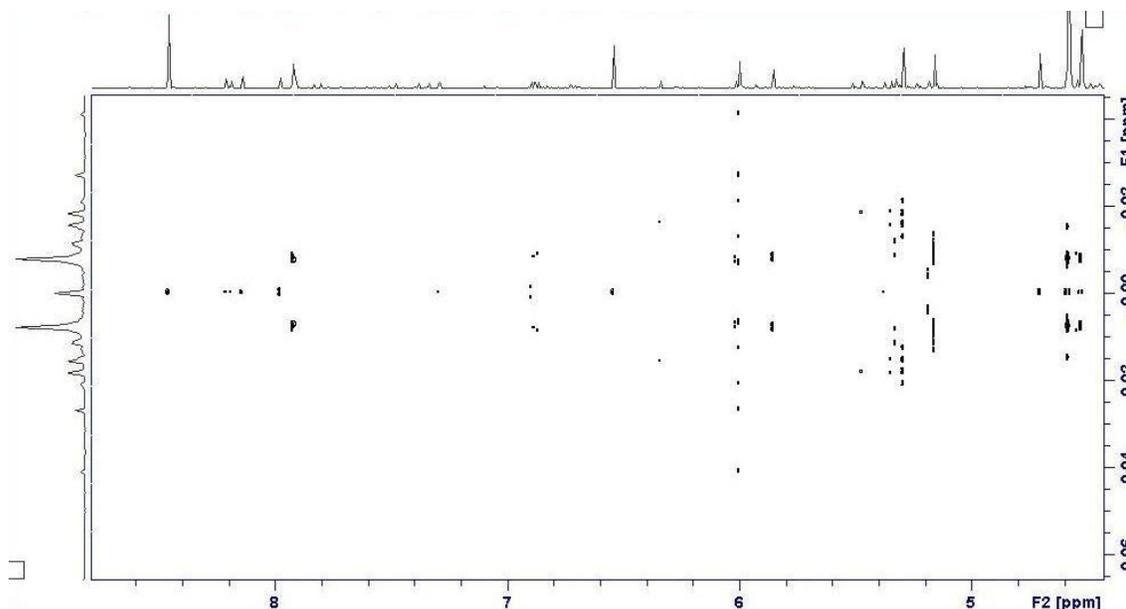


Figura 3.67. Espectro ^1H - ^1H *J*-resolvido bidimensional da *M. hirsuta* de Boninal na região de aromáticos característica de flavonóides.

O escore referente à região de Campo Alegre de Lourdes (Figuras 3.58 e 3.60) mostra-se rico em sinais característicos de prótons anoméricos de saponinas (δ 0,6-1,4 ppm) e dos prótons de oligossacarídeos (3,5-4,5 ppm). Os escores para a região de Morro do Chapéu, por sua vez, mostraram que esta região é pobre em

sinais para metabólitos secundários, apresentando apenas sinais na região dos oligossacarídeos e aminoácidos.

A partir da análise dos espectros 1D, 2D e do PLS foi possível identificar os compostos do metabolismo primário cuja variância contribui para PC1 e PC2. São eles glicose (formas α e β), os aminoácidos asparagina e alanina e o ácido málico, como pode ser visto na Tabela 3.7, cujos dados estão de acordo com o encontrado na literatura (LIANG *et al.*, 2006; MANNINA *et al.*, 2008).

Tabela 3.7. Deslocamentos químicos característicos dos metabólitos primários selecionados de *M. hirsuta* detectados a partir da análise do PLS e espectros RMN 1D e 2D.

Metabólitos	δ (PPM)	Multiplicidade	J (Hz)	Prótons	Região
Glicose	3,60-3,83	<i>M</i>	4,34 e 2,51		Campo Alegre de Lourdes e Morro do Chapéu
	3,80-3,89	<i>2 d</i>	1,85		
	4,57-4,59	<i>D</i>	7,80	H-1 β	
	5,18-5,19	<i>D</i>	3,80	H-1 α	
Asparagina	2,85-2,90	<i>Dd</i>	17.0 e 7.6	H-2	Gentio de Ouro e Caetité
		<i>Dd</i>	17.0 e 4.3	H-2'	
	3,95	<i>M</i>	-	H-1	
Alanina	1,49	<i>D</i>	7,20	H-3	Gentio de Ouro
	3,70	<i>M</i>	-		
Ácido málico	2,70	<i>Dd</i>	16,6 e 4,7	H-3 α	Caetité.
	2,80	<i>Dd</i>	16,6 e 6,6	H-3 β	
	4,50	<i>Dd</i>	6,6 e 4,7	H-2	

Da similaridade metabolômica obtida a partir do PCA e PLS-DA 2D, as plantas das diferentes regiões de coleta foram agrupadas. Entretanto, este agrupamento pode ser observado somente do ponto de vista visual porque ambas as técnicas objetivam a separação de cada amostra individual pela variância máxima. Conseqüentemente, o uso de mais variáveis Y é necessário para confirmar o agrupamento de *M. hirsuta*. Para tanto, as amostras foram analisadas por PLS-DA 3D, que permite usar mais que dois componentes, no nosso caso PC1, PC2 e PC3,

para uma melhor visualização dos diferentes perfis metabolômicos, como pode ser visto na Figura 3.68, com uma variância de 56,49%. As plantas coletadas de cinco regiões diferentes claramente podem ser classificadas em quatro grupos distintos, como pode ser visto na Figura 3.69. O dendograma permitiu separar dois grandes grupos: um que é composto pelas regiões 4 e 5, e outro com as regiões 1, 2 e 3, que ainda se subdividem em mais dois grupo um composto pela região 2, e o outro com as regiões 1 e 3. Com base na discussão anterior, os grupos 4 e 5 são ricos em compostos aromáticos (flavonóides e protoantocianidinas, respectivamente), enquanto o segundo grupo formado pelas regiões 1, 2 e 3 é rico em triterpenos pentacíclicos, esteróides e saponinas.

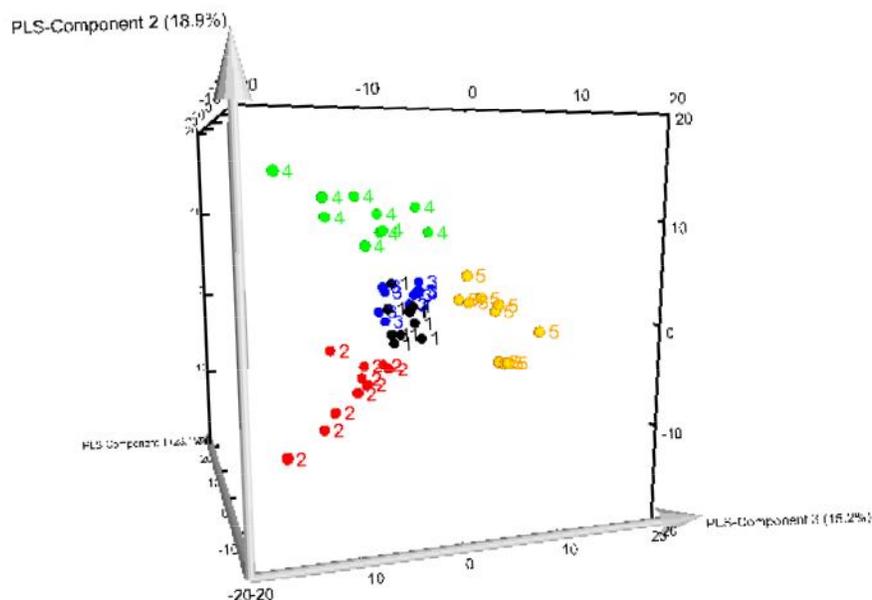


Figura 3.68. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo PSL-DA 3D. ●1: Campo Alegre de Lourdes, ●2: Gentio de Ouro, ●3: Morro do chapéu, ●4: Boninal e ●5: Caetité.

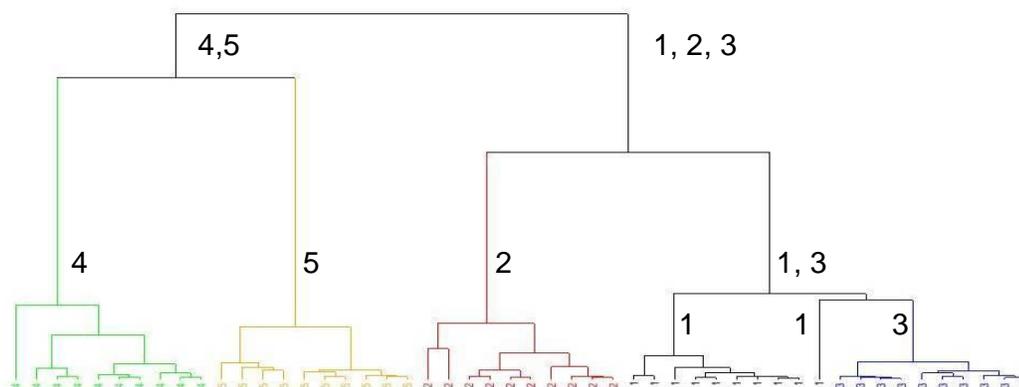


Figura 3.69. Dendrograma dos resultados da PLS-DA para os espécimes de *M. hirsuta* coletados em diferentes regiões. 1 Campo Alegre de Lourdes, 2 Gentio de Ouro, 3 Morro do Chapeu, 4 Boninal e 5 Caitité.

As Figuras 3.70 e 3.71 exibem o agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com o ambiente, isto é, caatinga ou caatinga arbustiva, o que permite visualizar os metabólitos que são diferentes entre as amostras levando em consideração os ambientes citados. As plantas das regiões 1 e 2 (Caatinga arbustiva) estão agrupadas na região positiva em relação a PC1, cujos δ conferem com aqueles das classes de terpenos pentacíclicos, esteróides e saponinas, enquanto as plantas provenientes das regiões 3, 4 e 5 (Caatinga) foram agrupadas na região negativa em relação a PC1, cujos δ são atribuídos a aminoácidos, oligossacarídeos e compostos aromáticos (flavonóides e protoantocianidinas).

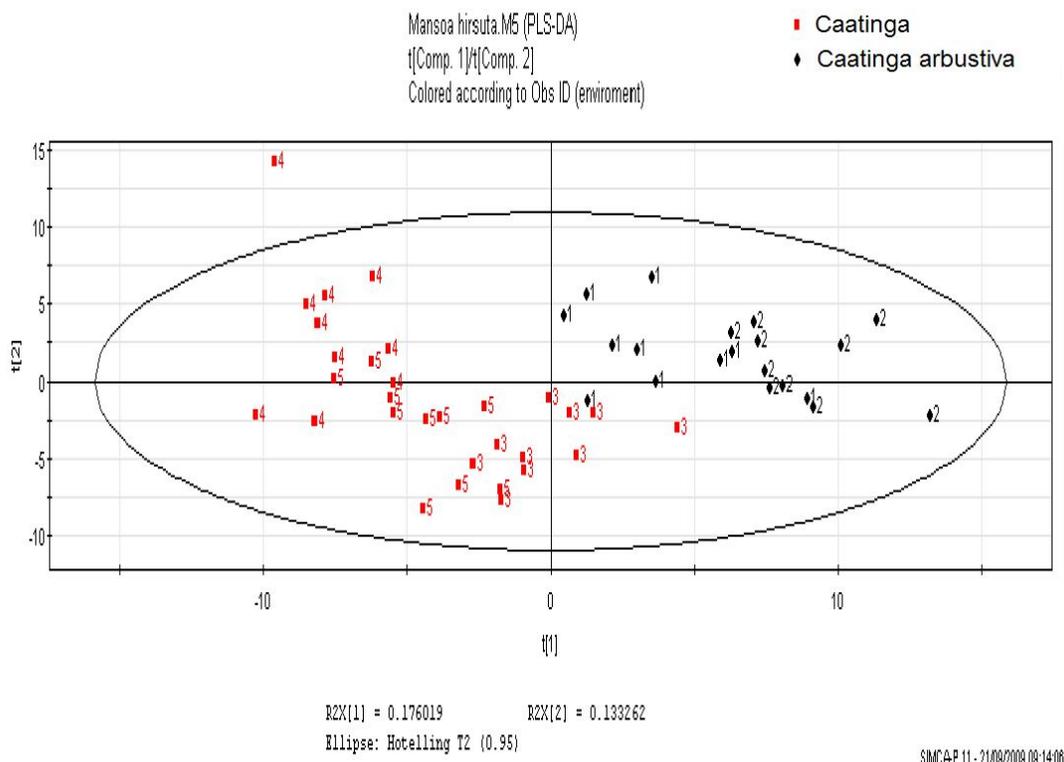


Figura 3.70. Distribuição e agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com os ambientes de coleta. ◆1: Campo Alegre de Lourdes, ◆2: Gentio de Ouro, ■3: Morro do chapéu, ■4: Boninal e ■5: Caetité.

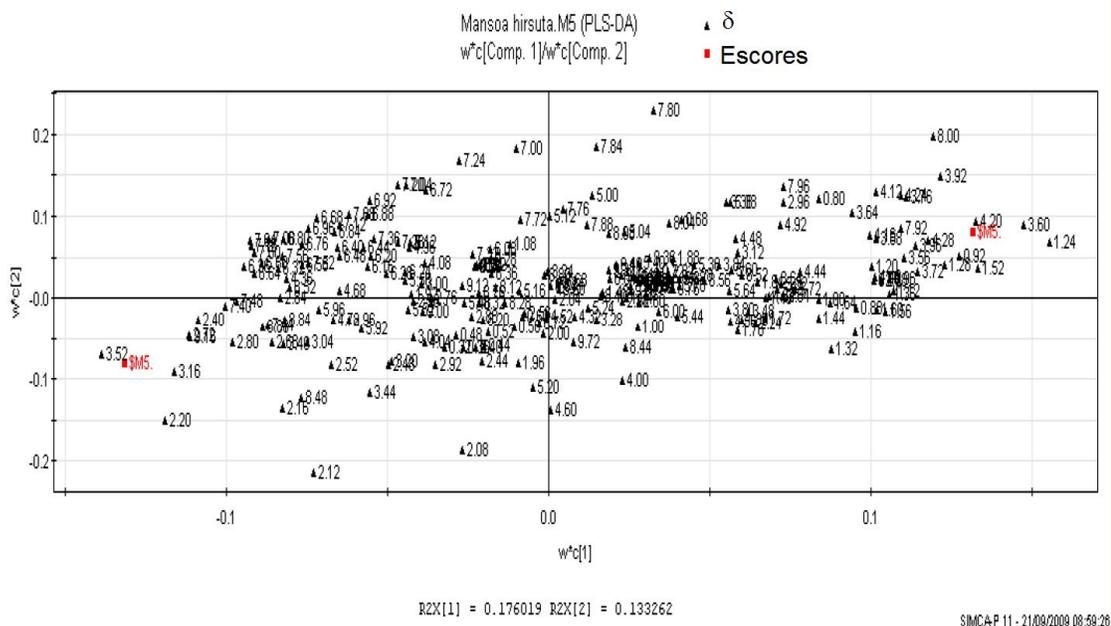


Figura 3.71. Distribuição e agrupamento dos sinais de ^1H RMN de acordo com o ambiente.

Levando em consideração o tipo de solo, os espécimes de *M. hirsuta* foram separados em três classes (Figura 3.72), sendo que as plantas das regiões 1 e 2 estão agrupadas na região positiva em relação a PC1, sendo caracterizada pelos δ de terpenos, esteróides e saponinas (Figura 3.73). A região 4 coletada em um solo muito arenoso está agrupada em uma região negativa em relação a PC1, que é caracterizada pelos δ de compostos aromáticos. As espécimes de plantas coletadas nas regiões 3 e 5 coletadas em solo argilo-arenoso estão localizadas na região positiva em relação a PC2 e são caracterizadas pelos δ referentes a oligossacarídeos e aminoácidos (Figura 3.73).

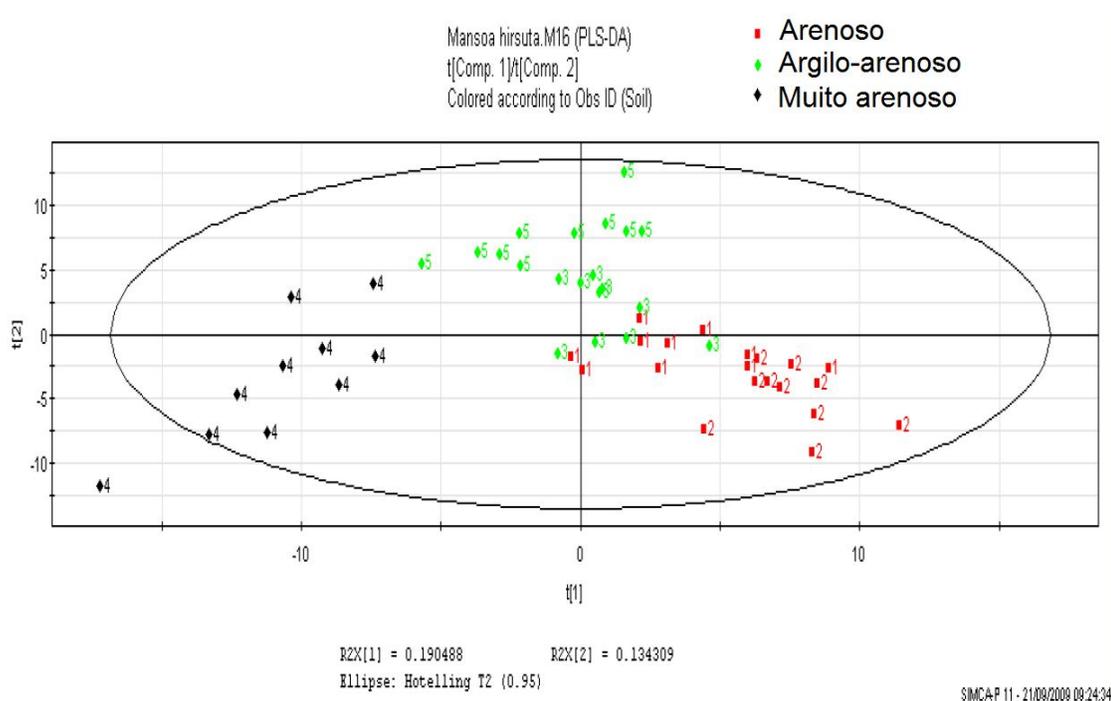


Figura 3.72. Distribuição e agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com os tipos de solo. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ■2: Gentio de Ouro, ◆3: Morro do chapéu, ◆4: Boninal e ◆5: Caetité.

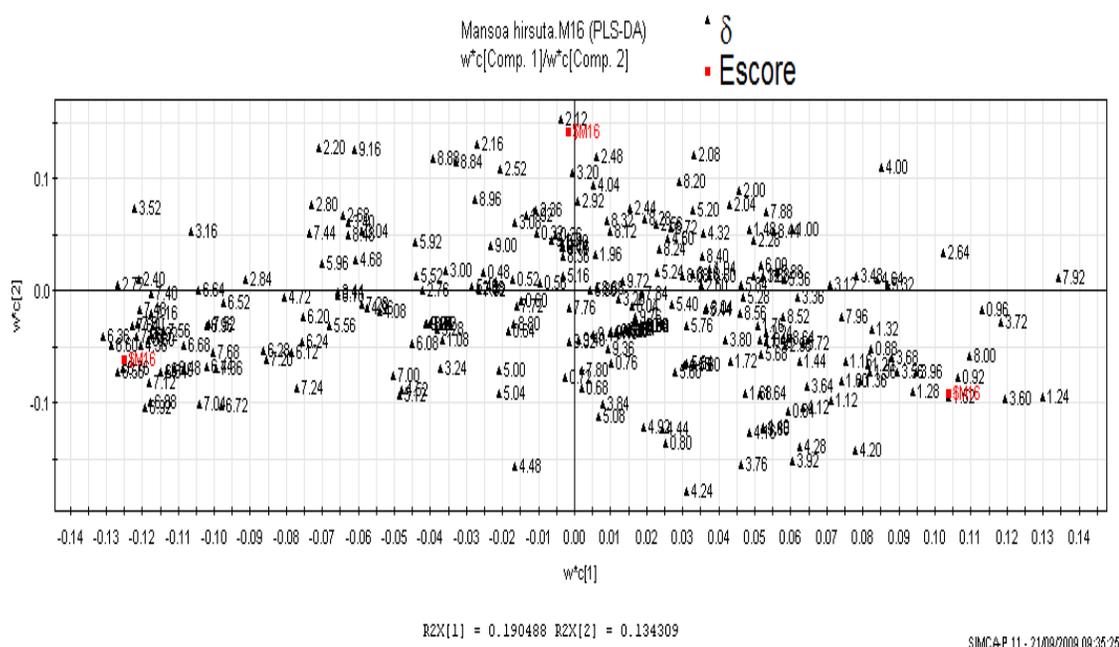
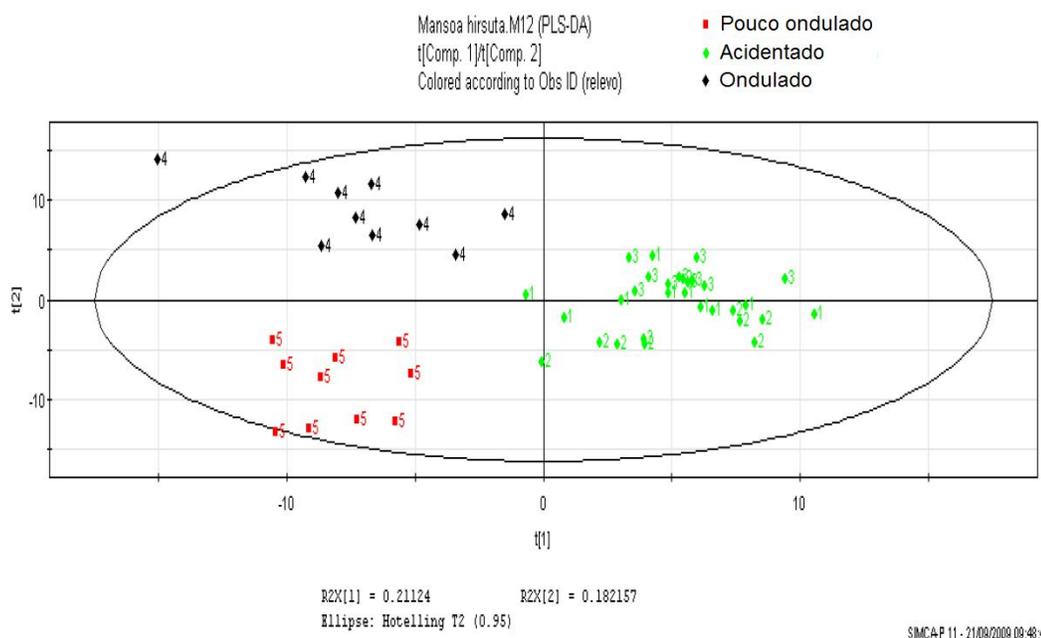


Figura 3.73. Distribuição e agrupamento dos sinais de ¹H RMN de acordo com o tipo de solo.

As espécimes coletadas nas regiões 1, 2 e 3 em um relevo acidentado foram agrupadas na região positiva em relação a PC1 rica em δ referentes a triterpenos pentacíclicos, esteróides e saponinas (Figuras 3.74 e 3.75). Os espécimes da região 4 estão localizadas na região negativa em relação a PC1 e na região positiva em relação a PC2 cujos δ são característicos de flavonóides. As plantas da região 5 estão localizadas no histograma na região negativa em relação a PC1 e negativa em relação a PC2, sendo estas regiões ricas em δ referentes a protoantocianidinas, aminoácidos e oligossacarídeos.

A Tabela 3.8 ajuda a visualizar de forma resumida todos os resultados observados no presente estudo de acordo com as características geográficas relacionadas com o local de coleta.



3.74. Distribuição e agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com o relevo. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ■2: Gentio de Ouro, ◆3: Morro do chapéu, ◆4: Boninal e ◆5: Caetité.

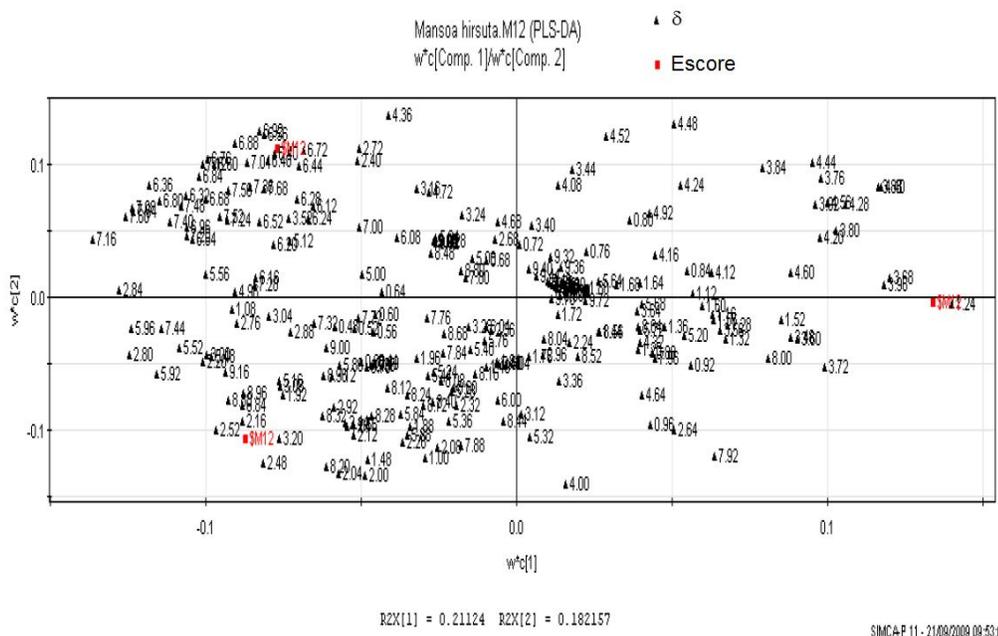


Figura 3.75. Distribuição e agrupamento dos sinais de ¹H RMN de acordo com o relevo.

Tabela 3.8. Resumo dos dados obtidos no estudo metabólico da *M. hirsuta* D.C..

Características geográficas	Local de coleta				
	Campo Alegre de Lourdes	Gentio de Ouro	Morro do Chapéu	Boninal	Caetité
Ricos em	Saponinas, oligossacarídeos	Triterpenos pentacíclicos (ácido ursólico e oleanólico), fitoesteróides	Aminoácidos e oligossacarídeos	Flavonóides	Taninos, protoantocianidinas
Metabólitos principais	Glicose	Asparagina e alanina	Glicose	-	Asparagina e ácido málico
Ambiente	Caatinga arbustiva	Caatinga arbustiva	Caatinga	Caatinga	Caatinga
Tipo de solo	Arenoso	Arenoso	Argilo-arenoso	Muito arenoso	Argilo-arenoso
Relevo	Acidentado	Acidente	Acidentado	Ondulado	Pouco ondulado
Altitude (metros)	517	1100	469	1045	700

4. Conclusões

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho expressam o potencial imunomodulador e inibidor do radical NO dos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico e ácido oleanólico (> 99%) isolados da *M. hirsuta* D.C. A triagem fitoquímica mostra a presença de várias classes de metabólitos secundários tais como fenóis, taninos, esteróides e compostos flavônicos. Os bioensaios com o extrato AcOEt (PFR) mostraram atividades significativas acima de 60% quanto a inibição de linfócitos, o que sugere a atividade imunossupressora do extrato. A presença do dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila no etanol recuperado, bem como lupeol, estigmasterol e β -sitosterol. A análise metabólica permitiu estabelecer que as plantas oriundas de Gentio de Ouro são ricas em triterpenos pentacíclicos, enquanto as plantas de Boninal contêm principalmente flavonóides em sua composição química. Os resultados também sugerem que as protoantocianidinas são constituintes presentes em maior quantidade nas plantas oriundas de Caetité, enquanto saponinas predominam nas plantas de Campo Alegre de Lourdes. As plantas de Morro do Chapéu diferem daquelas das demais regiões por serem ricas em oligossacarídeos e aminoácidos.

5. Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE K, MATSUKI N. 2000. Measurement of the 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*, v. 38, n. 4, pp. 325-329.
- ALI RM, HOUGHTON PJ, HOO TS. 1998. Antifungal activity of some Bignoniaceae found in Malaysia. *Phytotherapy Research*, v. 12, n. 5, pp. 331-334, 1998.
- ALVAR J, CANAVATE C, GUTIERREZ-SOLAR B, JIMENEZ M, LAGUNA F, LOPEZ-VELEZ R, MOLINA R, MORENO J. 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 2, pp. 298-319.
- APPELDOORN MM, SANDERS M, VINCKEN J-P, CHEYNIER V, LE GUERNEVE C, HOLLMAN PCH, GRUPPEN H. 2009. Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. *Food Chemistry*, v. 117, n. 4, pp. 713-720,
- ARAUJO DS, CHAVES MH. 2005. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de Terminalia brasiliensis. *Química Nova*, v. 28, n. 6, pp. 996-999, 2005.
- ASLAN M. 2002. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunological Research*, v. 26, n. 1-3, pp. 107-118, 2002.
- AUE WP, KARHAN J, ERNST RR. 1976. Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*, v. 64, pp. 4226-4227.
- BACAB MJC, RODRIGUEZ LMP. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports*, v. 18, n. 6, pp. 674-688.
- BACCHI CJ, YARLETT N. 2002. Polyaminemetabolism as chemotherapeutic target in protozoan parasites. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 6, pp. 553-563.
- BARBOSA LCA. 2007. Espectrometria no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa, Ed. UFV.
- BARBOSA-FILHO JM., LIMA CSA, AMORIM ELC, SENA KXFR, ALMEIDA JRGS, CUNHA EVL, SILVA MS, AGRA MF, BRAZ-FILHO R. 2004. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea* (with 1 table & 1 figure). *Phyton*, v. 4, n. 7, p. 221-228.
- BASTOS MLA, LIMA MRF, CONSERVA L, ANDRADE VS, ROCHA EMM, LEMOS RPL. 2009. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeuheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 8, n. 1, 16-21.
- BAILEY NJC, SAMPSON J, HYLANDS PJ, NICHOLSON JK, HOLMES E. 2002. Multi-component metabolic classification of commercial feverfew preparations via high-field ¹H-NMR spectroscopy and chemometrics. *Planta Medica*, v. 68, n. 8, pp. 734-738.
- BAX A, SUMMERS MF. 1986. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *Journal of the American Chemical Society*, v. 108, n. 8, pp. 2093-2094

- BECKONERT O, BOLLARD ME, EBBELS TMD, KEUN HC, ANTTI H, HOLMES E, LINDON JC, NICHOLSON JK. 2003. NMR-based metabonomic toxicity classification: hierarchical cluster analysis and k-nearest-neighbour approaches. *Analytica Chimica Acta*, v. 490, n. 1-2, pp. 3-15.
- BEEBE K, SCASHOLTZ RPMB. 1998. *Chemometrics, a Pratical Guide*, Nova Iorque, Ed. John Wiley & Sons.
- BERENTE B, GARCIA DC, REICHENBACHER M, DANZER K. 2000. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A*, v. 871, n. 1-2, pp. 95-103.
- BINNECK E. 2004. AS ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 1, n. 32, pp. 28-37.
- BINO RJ, HALL RD, FIEHN O, KOPKA J, SAITO K, DRAPER J, NIKOLAU BJ, MENDES P, ROESSNER-TUNALI U, BEALE MH, TRETHERWEY RN, LANGE BM, WURTELE ES, SUMNER LW. 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Science*, v. 9, n. 9, pp. 418-425.
- BLOCK E. 1996. Biologically ctive organosulfur compounds from garlic and onions: the search for new drugs. Department of Chemistry, Albany, N.Y., USA.
- BOGDAN C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, pp. 907-915.
- BRAGA FC, WAGNER H, LOMBARDI JA, OLIVEIRA AB. 2000. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, v. 7, n. 3, pp. 245-250, 2000.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Instituto do Milênio: Uma nova perspectiva para a pesquisa e o desenvolvimento do Brasil, 2002.
- BRENER Z, ANDRADE ZA, BARRAL-NETTO M. 2000. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- BRESCIA MA, CALDAROLA V, DEGIGLIO A, BENEDETTI D, FANIZZI FP, SACCO A. 2002. Characterization of the geographical origin of italian wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytical Chimica Acta*, v. 458, n. 1, pp. 177-186.
- BUDZIKIEWICZ H, DJERASSI C, WILLIAMS DH. 1964. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*. Amsterdam: Ed. Holden.
- BULL ID, BETANCOURT PP, EVERSLED RP. 2001. Na organic geochemical investigation of the practice of manuring at a minoan site on Pseira Island, Crete. *Geoarchaeology: Na International Journal*, v. 16, n. 2, p. 223-242, 2001.
- BURDMANN EA, ANDOH TF, YU L, BENNETT WM. 2003. Cyclosporine nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology*, v. 23, n. 5, pp. 465-476.
- CAMPANA P, BRAGA F, CORTES S. 2009. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. *Phytomedicine*, v. 16, n. 5, pp. 456-461.
- CARVALHO M, BRAZ FILHO R. 1993. Novas Técnicas de RMN e os Deslocamentos Químicos dos Átomos de ¹H e ¹³C da Isoflavona Duartina. *Química Nova*, v. 16, n. 2, pp. 89-94.

- CASTRO BF, WAGNER H, LOMBARDI JA, OLIVEIRA AB. 2000. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, v. 7, n. 3, pp. 245-250.
- CAZZULO JJ. 2001. The major cysteine proteinase of *T. cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 7, n. 12, pp. 1143-1156.
- CAZZULO JJ. 2002. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potencial targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Current Topics Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 11, pp. 1261-1271.
- CHAGAS 2003 – <http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>. Acesso em: 10/2005.
- CHAN C, YIN H, MCKIE JH, FAIRLAMB AH, DOUGLAS KT. 2002. Peptoid inhibition of trypanothione reductase as a potencial antitrypanosomal and antileishmanial drug lead. *Amino Acids*, v. 22, n. 4, pp. 297-308.
- CHAVES SAM, REINHARD KJ. 2003. Paleopharmacology and pollen: theory, method and application. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 1, pp. 207-211.
- CHALLIS GL, HOPWOOD DA. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS*, v. 100, n. 2, pp. 14555-14561.
- CHOI YH, KIM HK, HAZEKAMP A, ERKELENS C, LEFEBER AWM, VERPOORTE R. 2004. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 6, pp. 953-957.
- CHOI YH, SERTIC S, KIM HK, WILSON EG, MICHOPoulos F, LEFEBER AWM, ERKELENS C, KRICUN SDP, VERPOORTE R. 2005. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 53, n. 4, pp. 1237-1245.
- CHOI YH, KIM HK, LINTHORST HJM, HOLLANDER JG, LEFEBER AWM, ERKELENS C, NUZILLARD J-M, VERPOORTE R. 2006. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 5, pp. 742-748.
- CIOSEK P, BRZOZKA Z, WROBLEWSKI W, MARTINELLI E, DI NATALE C, D'AMICO A. 2005. Direct and two-stage data analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue--Effect of supervised feature extraction. *Talanta*, v. 67, n. 3, pp. 590-596.
- CLEVE E, BACH E, SCHOLLMAYER E. 2000. Using chemometric methods and NIR spectrophotometry in the textile industry. *Analytica Chimica Acta*, v. 420, n. 2, pp. 163-167.
- COSTA JFO. (2004). Investigação de atividades anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora em extratos de plantas do Semi-Árido brasileiro. Tese de mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia/FIOCRUZ.
- COSTA JFO, DAVID JPL, DAVID JM, GIULIETTI AM, QUEIROZ LP, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MBP. 2008. Immunomodulatory activity of extracts from *Cordia superba* Cham. and *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae), plant species native from Brazilian Semi-arid.. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 11-15, 2008.
- COTRAN RS, VINAY K, TUCKER C. 2000. Patologia Estrutural e Funcional – Robbins. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- CRUZ GL. 1979. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Civilizações Brasileiras S.A.
- CUTLER RR, WILSON P. 2004. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of alliin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*, v. 61, n. 2, pp. 71-74.
- DAOLIO C, BELTRAME FL, FERREIRA AG, CASS QB, CORTEZ DAG, FERREIRA MC. 2008. Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochemical Analysis*, v. 19, n. 3, pp. 218–228.
- DEMAIN AL, VAISHNAV P. 2006. Involvement of Nitrogen-Containing Compounds in β -Lactam Biosynthesis and its Control. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 26, n. 2, pp. 67-82.
- DEROME A, WILLIAMSON M. 1990. Rapid pulsing artifacts in double-quantum filtered COSY. *Journal of Magnetic Ressonace*, v. 88, 177-185.
- DING AH, NATHAN C, STUEHR DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, v. 141, n. 7, pp. 2407-2412.
- DIXON RA. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, v. 411, n. 6839, pp. 843-847.
- ENGEL S, JENSEN PR, FENICAL W. 2002. Chemical ecology of marine microbial defense. *Journal of Chemical Ecology*, v. 28, n. 10, pp. 1971-1985.
- ESTEVAM CS. 2006. Estudo fitoquímico biomonitorado dos extratos de *Maytenus rigida* Mart. Tese de doutorado, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.
- FERNIE AR, TRETWEY RN, KROTZKY AJ, WILLMITZER L. 2004. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 9, pp. 763-769 .
- FERRI PH. 1995. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI LC. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista.
- FIEHN O. 2002. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 1-2, pp. 155-171.
- FILHO VC, YUNES RA. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural, para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, pp. 99-105.
- FUKUSAKI E, KOBAYASHI A. 2005. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of Bioscience Bioengineering*, v. 100, n. 4, pp. 347-54.
- GIULIETTI AM, CONCEIÇÃO A, QUEIROZ LP. 2006. Diversidade e caracterização das fenerógramas do semi-árido brasileiro. *Associação Plantas do Nordeste*, v. 1.
- GOTTLIEB O. 1993. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. *Ciência Hoje*, v. 15.
- HALL RD. 2006. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, v. 169, n. 3, pp. 453-68.
- HAMBURGER M, HOSTETTMANN K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, pp. 3864-3874.

- HORNING EC, HORNING MG. 1971. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical Chemistry*, v. 17, n. 8, pp. 802-809.
- HUNT JM. 1995. Petroleum Geochemistry and Geology. 2ª ed.. EUA.
- INOUE K, INOUYET H, CHEN CC. 1981. A naphthoquinone and a lignan from the wood of *Kigelia pinnata*. *Phytochemistry*, v.20, n. 9, p. 2271-2276, 1981.
- ITOKAWA H, MATSUMOTO K, MORITA H, TAKEYA K. 1992. Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 3, pp. 1061-1062.
- JUNGES MJ, FERNANDES JB, VIEIRA PC, SILVA, MFGF, RODRIGUES FILHO E. 1999. The use of ¹³C and ¹H-NMR in the structural elucidation of a new Nor-lupane triterpene. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 10, n. 4, pp. 317-320.
- KAISER CR. 2000. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, v. 23, n. 2, pp. 231-236.
- KAUFMANN HES, KABELITZ D. 1998. Immunology of infectious methods in microbiology. San Diego: Academic Press, v. 25.
- KAY LE, KEIFER P, SAARINENT. 1992. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, n. 26, pp. 10663–10665.
- KIDERLEN AF, KAYSER O, FERREIRA D, KOLODZIEJ H. 2001. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages *in vitro*. *Zeitschrift Für Naturforschung*, v. 56, n. 5-6, p. 444-454, 2001.
- KIM HK, CHOI YH, ERKELENS C, LEFEBER AWM, VERPOORTE R. 2005. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using ¹H-NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n. 1, pp. 105-109.
- KOWALSKI BR, BENDER CF. 1972. Pattern-recognition-powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of American Chemical Society*, v. 94, n. 16, pp. 5632-5639.
- KRESNKY, A. M.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. The pharmacological basis of therapeutics. Drugs used for immunomodulation. In: GOODMAN e GILMAN'S, 2001 e GILMAN'S. 20ª ed., New York: McGraw Hill Companies, 2001.
- KUTNEY JP, HANSEN HW. 1971. 5,6,7-methoxyflavone and 5,6,7,8-tetramethoxyflavone from *Zeyhera tuberculosa*. *Phytochemistry*, v. 10, n. 2, pp. 3298-3302.
- KWAN WO, KOWALSKI BR. 1980. Correlation of objective chemical measurements and subjective sensory evaluations. wines of *Vitis vinifera* variety 'pinot noir' from France and the United States. *Analytica Chimica Acta*, v. 122, n. 2, pp. 215-222.
- LAPA AJ. 1995. Importância da farmacologia tradicional e novas descobertas no estudo das plantas medicinais. *Ars Cvrandi – a revista da clínica médica*, pp. 46-52.
- LEANDRO C, CAMPINO L. 2003. *Leishmania*: efflux pumps and chemoresistance. *International Journal of Antimicrobiology Agents* v. 22, n. 3, p. 352-357, 2003.
- LEISH 2002 – <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>. Acesso em: 10/2005.

- LEITE JPV, LOMBARDI JA, CHIARI E, OLIVEIRA AB. 2001. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, n. 2, p. 77-87, 2001.
- LIANG YZ, XIE P, CHAN, K. 2004. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, v. 812, n. 1-2, pp. 53-70.
- LIANG Y-S, CHOI YH, KIM HK, LINTHORST HJM, VERPOORTE R. 2006. Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, v. 67, n. 22, pp. 2503-2511.
- LIMA CSA, AMORIM ELC, SENA KXFR, CHIAPPETA AA, NUNES XP, AGRA MF, CUNHA, EVL, SILVA MS, BARBOSA-FILHO JM. 2003. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, pp. 77-81 .
- LIMA, CSA, AMORIM ELC, NASCIMENTO SC, ARAUJO CF, AGRA MF, BARBOSA-FILHO JM, SILVA MS, CUNHA EV, VIERA IJ, BRAZ-FILHO R. 2005. Cytotoxic pyranonaphthoquinones from *Melloa quadrival* vis (Bignoniaceae). *Natural Products Research*, v. 19, n. 3, pp 217-22.
- LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. 2003. So what's the deal with metabonomics? *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 17, pp. 384A-391A.
- LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. 2004a. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 4, n. 2, pp. 189-199.
- LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. 2004b. Metabonomics: systems biology in pharmaceutical research and development. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, v. 6, n. 3, pp. 265-72.
- LIU J. 1995. Pharmacology of oleanolic and ursolic acids. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, n. 2, pp. 57-68, 1995.
- LUCCHESI AM. 2006. Plantas da Caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímica e Atividade Biológica. *Associação Plantas do Nordeste*, v. 4.
- MACIEL MA. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, pp. 429-438.
- MAFEZOLI J, VIVEIRA PC, FERNANDES JB, SILVA MF, ALBUQUERQUE S. 2000. *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypanostigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n. 1-2, pp. 335-340, 2000.
- MAHATO SB, KUNDU AP. 1994. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 47, n. 6, pp. 1517-1575.
- MANIVASAGAM T, SUBRAMANIAN P, SUTHAKAR G, ESSA MM, SIVAPERUMAL R, SUBASH S. 2005. Influence of diallyl disulphide on temporal patterns of liver marker enzymes in experimental hepatocarcinogenesis in rats. *Biologia Bratislava*, v. 60, n. 6, pp. 697-702.
- MANNINA L, SOBOLEV AP, CAPITANI D, IAFFALDANO N, ROSATO MP, RAGNI P, REALE A, SORRENTINO E, D'AMICO I, COPPOLA R. 2008. NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: Implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta*, v. 77, n. 1, pp. 433-444.

- MARINHO VMC, SEIDL PR, LONGO WP. 2008. La diversidad biológica - una posible fuente de ventaja competitiva para la industria farmacéutica brasileña. *Espacios*, v. 29, n.1, pp. 49-67.
- MATOS FJ. 1997. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: Ed. Adjunto.
- MENDONÇA-FILHO RR, RODRIGUES IAZ, ALVIANO DS, SANTOS AL, SOARES RM, ALVIANO CS, LOPES AH, ROSA MDOS. 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, v. 155, n. 3, pp. 136-143, 2004.
- MONTANARI CA, BOLZANI VS. 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v 24, n. 1, pp 105-111, 2001.
- MOREL CM. 2003. Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. *Embo Reports*, v. 4, n. 1, pp. 35-38.
- MOSMANN T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, v. 65, n. 1-2, pp. 55-63.=
- MRAZEK MF, MOSSIALOS E. 2003. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases. *Health Policy*, v. 64, n. 1, pp. 75-88.
- MUNGUR R, GLASS ADM, GOODENOW DB, LIGHTFOOT DA. 2005. Metabolite Fingerprinting in Transgenic *Nicotiana tabacum* Altered by the *Escherichia coli* Glutamate Dehydrogenase Gene. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2005, n. 2, pp. 198–214.
- MUNCK L. 2006. Conceptual validation of self-organisation studied by spectroscopy in an endosperm gene model as a data-driven logistic strategy in chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 84, n. 1-2, pp. 26-32.
- MUNOZ-MINGARRO NA, LLINARES F, POZUELO JM, DE MERA AG, VICENTEN JA, MORALES L, ALGUACIL LF, PEREZ C. 2003. Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 87, n. 2-3, pp. 163-167.
- MUSUMARRA G, BARRESI V, CONDORELLI DF, FORTUNA CG, SCIRE S. 2005. Genome-based identification of diagnostic molecular markers for human lung carcinomas by PLS-DA, *Computational Biology and Chemistry*, v. 29, n. 3, pp. 183-195.
- NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. 1999. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, v. 29, n. 11, pp. 1181-1189.
- NICHOLSON JK, WILSON ID. 2003. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 2, n. 8, pp. 668-676.
- ORTEGA JRL, RIVERO-LEZCANO OM, CROFT SL, RIVAS L. 2001. *In vivo* monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, n. 4, pp. 1121-1125.
- OMS. 1994. Segundo relatório do comitê de especialistas. O controle da esquistossomose. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 830p.
- PAVÃO F, CASTILHO MS, PUPO MT, DIAS RL, CORREA AG, FERNANDES JB, SILVA MF, MAFEZOLI J, VIEIRA PC, OLIVA G. 2002. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1,95 Å resolution. *FEBS Letters*, v. 520, n. 1, pp. 13-17, 2002.

- PAVIA DL, LAMPMAN GM, KRIZ GS. 1996. Introduction to spectroscopy. 2a. Ed. Editora Saunders Golden Sunburst Series.
- PEREZ C E ANESINI C. 1994. *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 44, n. 1, pp. 41-46.
- PINTO AC, SILVA DHS, BOLZANI VS, LOPES NP, EPIFÂNIO RA. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas. *Química Nova*, v 25, n. 1, pp 45-61, 2002.
- PHILLIPSON JD. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* v. 56, n. 3, pp. 237-243.
- PRICE WS. 1999. Water signal suppression in NMR spectroscopy. *Annual Reports NMR Spectroscopy*, v. 38, 289-354.
- RATES SMK. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001, v. 39, n. 5, 603-613.
- RAWAT MSM, PRASAD D, JOSHI RK, PANT G. 1999. Proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots. *Phytochemistry*, v. 50, n. 2, pp. 321-324.
- REO NV. 2002. NMR-based metabolomics. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 25, n. 4, pp. 375-82.
- ROBERTSON DG. 2005. Metabolômico in toxicology: a review. *Toxicological Sciences*, v. 85, n. 2, pp. 809-822.
- ROCHA AD, OLIVEIRA AB, FILHO JDS, LOMBARDI JA, BRAGA FC. (2004). Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 6, pp. 463-467.
- ROCHFORT S. 2005. Metabolomics review: a new "ômico" platform technology for system biology and implications for natural products research. *Journal of Natural products*, v. 68, n.12, pp. 1813-1820.
- ROEP BO. 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, v. 46, n. 3, pp. 305-321.
- SANDES ARR, DI BIASI G. 2000. Biodiversidade e diversidade química e genética. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n. 13, pp. 28-32.
- SANTANA PJP. 2002. A bioprospecção no Brasil - Contribuições para uma gestão ética. Brasília: Paralelo, pp. 15.
- SILVA MM. 1991a. A família Bignoniaceae na Região de Catolés, Cachapada Diamantina, Bahia, Brazil. Monografia. Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia.
- SILVA MM, QUEIROZ LP. 2003. A família Biognoniaceae da Região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v. 3, n. 1/2, pp. 3-21.
- SILVERSTEIN RM, BASSLER GC, MORRILL TC. 1994. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan.
- SILVERSTEIN RM, WEBSTER FX. 1997. Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York: John Wiley & Sons.
- SILVA DM. 2006. Estudo químico e de atividades biológicas da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoneaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.
- SIMÕES CM, FALKENBERG M, MENTZ LA, SCHENKEL EP, AMOROS M, GIRRE L. 1999. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, n. 6, v. 3, pp. 205-14.
- SOARES MBP, BELLINTANI MC, RIBEIRO IM, TOMASSINI TC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. 2003. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*, v. 459, n. 1, pp. 107-112, 2003.

- SOCORRO S, ROSA MS, MENDONÇA-FILHO RR, BIZZO HR, ALMEIDA RI, SOARES RM, SOUTO-PADRON T, ALVIANO CS, LOPES AH. 2003. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Cróton cajucara*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 47, n. 6, pp. 1895-1901.
- SOERJATO DD. 1996. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspective from field. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, n. 1-3, pp. 1-15.
- SOLOMONS TWG, FRYHLE CB. 2005. Química Orgânica. 8. ed. Rio de Janeiro: Ed. Copyright, 2005.
- SUFFNESS M, ABBOTT B, STATZ D, WONILOWICZ E, SPJUT R. 1988. The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for *in vivo* screening of plant extracts. *Phytotherapy Research*, v. 2, n. 2, pp. 89 – 97.
- TARACHIWIN L, KATOH A, UTE K, FUKUSAKI E. 2008. Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by ¹H NMR-based metabolic fingerprinting. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 48, n. 1, pp. 42-48.
- TSAO SM, YIN MC. 2001. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *Journal of Medical Microbiology*, v. 50, n. 7, pp. 646-649.
- TSAO SM, HSU CC, YIN MC. 2003. Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in BALB/cA mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 6, pp. 974–980.
- TYSON JL, FULLERTON RA, ELLIOTT, GS, REYNOLDS PJ. 2000. Use of diallyl disulphide for the commercial control of *Sclerotium cepivorum*. *New Zealand Plant Protection*, v. 53, 393-397.
- UMBUZEIRO, <http://umbuzeiro.cnip.org.br>. Acesso em: 10/2005.
- URBINA JA, CONCPCION JL, RANGEL S, VISBAL G, LIRA R. 2002. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *T cruzi* and *L. mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 125, n. 1-2, pp. 35-45.
- VAN RUTH SM, VILLEGAS B, AKKERMANS W, ROZIEN M, VAN DER KAMP H, KOOT A. 2010. Prediction of the identity of fats and oils by their fatty acid, triacylglycerol and volatile compositions using PLS-DA. *Food Chemistry*, v. 118, n. 4, pp. 948-955.
- VIANT MR. 2003. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 310, n. 3, pp. 943-948.
- WENG JR, TSAO LT, YEN MH, WANG JP, LIN CN. 2003. Anti-inflammatory constituents and new pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 3, pp. 404-407.
- WECKWERTH W. 2003. Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54: 669-689.
- WECKWERTH W, MORGENTHAL K. 2005. Metabolomics - from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 22, pp. 1551-1558.
- XIE PS. 1987. HPTLC fingerprinting identification of commercial ginseng drugs-reinvestigation of HPTLC of ginsenosides. *Journal Of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, v. 10, n. 11, pp. 607-613.

ZHAO W, YE Q, TAN X, JIANG H, LI X, CHEN K, KINGHORN AD. 2001. Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 9, pp. 1196-2000.

ZUCCOTTO F. 2001. Novel inhibitors of *T. cruzi* dihydrofolate reductase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, n. 5, pp. 395-405.

1. Considerações Gerais

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento de uma diversidade de doenças é tradicional há centenas de anos pela humanidade (SANDES & DI BIASI, 2000). As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras a ao papiro de Ebers que inclui referência a mais de 7.000 drogas de natureza animal e vegetal, inseridas em mais de 800 fórmulas e enumera cerca de 100 doenças (PINTO *et al.*, 2002). Ainda hoje, as plantas medicinais constituem recurso terapêutico importante.

Um em cada quatro produtos vendidos nas farmácias é fabricado a partir de materiais extraídos de plantas das florestas tropicais ou de estruturas químicas derivadas desses vegetais (SANTANA, 2002). Partindo-se da estimativa de que existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas superiores no planeta, a parcela de espécies em uso é muito pequena. Somente uma pequena parcela foi investigada fitoquimicamente e o número submetido a ensaios biológicos é ainda menor (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991; SOERJATO, 1996) e estes números não mudaram muito desde estes trabalhos.

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a ocorrer no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracterizam-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides, sendo desta época o isolamento de morfina (1806), quinina (1818) e estriquinina (1820) (PINTO *et al.*, 2002).

Somente nos Estados Unidos, em 1980, foram vendidos formalmente cerca de US\$ 8 bilhões em medicamentos derivados de plantas. Durante os anos de 1959 a 1980, os medicamentos derivados de vegetais representaram 25% de todas as prescrições médicas dispensadas nas farmácias dos Estados Unidos (SANTANA, 2002). Então se nota que países desenvolvidos investem neste tipo de recurso natural.

Cerca de 33% da população da indústria farmacêutica provém de produtos de síntese e equivale a um faturamento anual da ordem de US\$ 280 bilhões. A distribuição por origem de medicamentos mostra que 65% são preparados em

laboratórios, sendo 25% a partir de plantas e 10% a partir de microrganismos, se considerarmos o mercado de drogas anticancerígenas e antibióticos estes percentuais ficam ainda maiores: cerca de 70% foram desenvolvidas a partir de recursos naturais (SANTANA, 2002). Assim os produtos naturais formam nichos especiais.

O setor farmacêutico utiliza aproximadamente 90 espécies vegetais em suas atividades de produção de medicamentos (RATES, 2001). Dezesete das grandes indústrias farmacêuticas mundiais têm programas de pesquisa e desenvolvimento na área de recursos naturais. O grande interesse do setor em fármacos oriundos de espécies vegetais é o baixo custo em relação aos produtos sintéticos (SANTANA, 2002).

Países em desenvolvimento, como o Brasil, onde a implementação da tecnologia em química fina farmacêutica ainda não ocorreu, as pesquisas em recursos naturais assumem um papel importante, uma vez que a probabilidade de se encontrar novos fármacos ativos é maior através do estudo de plantas do que nos produtos sintéticos (LAPA, 1995). O custo de desenvolver um fármaco de origem sintética pode chegar a vários milhões de dólares e levar entre 7 e 20 anos até que o produto final estável chegue ao mercado. Já para o desenvolvimento de um produto proveniente de recursos naturais prever-se um valor de 5 vezes menor (SANTANA, 2002).

A descoberta de produtos naturais bioativos constitui, portanto, não apenas uma necessidade de sua identificação própria, mas principalmente, contribui para o conhecimento de novas substâncias químicas bioativas, que podem ser usadas como matrizes para descoberta de novos fármacos (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Nesse contexto, o Brasil apresenta uma flora rica, muito dela ainda não explorada quimicamente com vistas a obtenção de produtos naturais bioativos, sendo que as espécies vegetais estão distribuídas nas várias regiões geográficas. Entre estas podemos destacar a região semi-árida do nordeste. O termo Semi-árido e Caatinga são frequentemente utilizados de maneira equivocada. Caatinga é empregada para um tipo de vegetação, enquanto o Semi-Árido pode ter uma conotação geográfica ou política, a primeira relacionada à região onde predomina o clima Semi-Árido e a segunda à região compreendida pelo polígono das secas. Os limites da Caatinga podem ser considerados como coincidentes com os da região

Semi-Árido, porém é importante ressaltar que dentro destes limites há ambientes mais úmidos e com vegetação diferente da Caatinga. Longe de ser homogênea, a vegetação do Semi-Árido apresenta uma grande variação fisionômica e florística, relacionada à grande heterogeneidade do clima, solo e relevo. Apesar de até bem pouco tempo ser considerada como uma vegetação degradada pela utilização dos últimos cinco séculos e baixo nível de endemismos, verifica-se que mesmo apresentando áreas muito antropizadas e com graus de desertificação acentuada, ainda apresenta flora muito rica, desconhecida e com muitos endemismos, representados por cerca de vinte gêneros e mais de trezentas espécies (LUCCHESI, 2006).

O Brasil concentra parte significativa da biodiversidade mundial, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, constituindo uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos (SIMÕES *et al.*, 1999; MARINHO *et al.*, 2008). Em relação à região do Semi-Árido brasileiro falta informação básica sobre a caracterização, funcionamento e potencialidades dos seus recursos naturais o que gera um atraso científico e tecnológico em relação às outras regiões do país. O Semi-Árido brasileiro ocupa uma área de cerca de 955.000 km² e, apesar de ser cortada por um razoável sistema de rios, tem sérios problemas com os recursos hídricos, pois parte dos seus rios são temporários ocorrendo apenas no período de chuvas. De modo geral, ocorre um progressivo aumento da altitude do litoral para o Semi-Árido que se estabiliza mais ou menos em 500 metros e, paralelamente, uma redução da quantidade anual de chuvas associada a uma distribuição irregular durante o ano, onde ocorrem longos períodos sem chuvas e vários meses com chuvas. Essa paisagem geral pode ser modificada, dependendo principalmente do aumento da altitude, que pode levar ao aumento da quantidade de chuvas. Diferentemente de outras áreas semi-áridas do mundo, a do Brasil é bem populosa com mais de 20 milhões de habitantes que, devido a alguns fatores sócio-econômicos, desenvolveram uma estrutura sócio-cultural peculiar e um forte relacionamento com o uso dos recursos naturais disponíveis na região. A degradação ambiental da região do Semi-Árido resultou do uso da terra de forma inadequada e descontrolada, sendo ocasionada pela má utilização do solo que está diretamente associada à falta do conhecimento científico. Tentando mudar esse quadro é necessário conhecer os recursos naturais dessa região usando a

conservação e utilização racional desses recursos e, buscar novos medicamentos para doenças que incidem em grande parte da população (GIULIETTI, 2006).

As informações dadas pela medicina popular são de extrema importância na procura de substâncias ativas de plantas, pois dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas cuja coleta seja orientada pelo seu uso popular do que as escolhidas ao acaso. Resulta-se que cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados nas indústrias farmacêuticas foram isolados seguindo recomendações da medicina popular.

Para uma grande parte das aplicações fitoquímicas, torna-se necessária a utilização de métodos de separação, purificação e identificação dos produtos naturais presentes em plantas. Dessa forma, o desenvolvimento da fitoquímica está diretamente relacionado à utilização e ao desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas, que permitam o isolamento de compostos de interesse, normalmente presente em pequenas quantidades, concomitantemente com constituintes químicos já conhecidos e de grande ocorrência em plantas (FERRI, 1995).

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que geralmente apresentam melhores efeitos biológicos. Nesse sentido, torna-se indispensável à análise do potencial das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. Esta avaliação permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado. O fundamento básico deste procedimento consiste no fato de que toda substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo (FILHO & YUNES, 1998).

Dentre as plantas selecionadas para o estudo investigativo de atividades como tripanocida, leishmanicida, imunomoduladora e inibidora da produção de óxido nítrico pelo programa IMSEAR (Instituto Milênio do Semi-Árido) encontra-se a *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoniaceae) que é quimicamente pouco conhecida. A família Bignoniaceae é bastante estudada e apresenta resultados biologicamente relevantes, justificando assim a investigação química e farmacológica desta espécie.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Espécie botânica

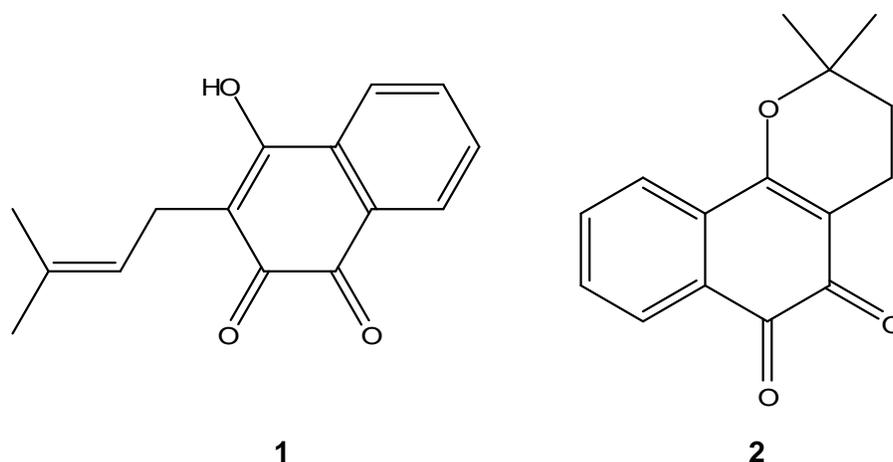
A *M. hirsuta* D.C. é uma trepadeira lenhosa (Cipó ou Liana), conhecida vulgarmente como Cipó d'alho, usada popularmente como antifúngica, anti-hipertensiva, diurética, além de ser utilizada no tratamento da diabetes e apresentar atividade antitumoral (CHAVES & REINHARD, 2003; UMBUZEIRO, 2005).

A descrição da *M. hirsuta* C.D. feita por SILVA (1999a) é a de uma liana de cerca de 4 m; ramos cilindros, com lenticelas, pubérrilos, com tricomas multicelulares e glandulosos. Suas folhas são do tipo trifolioladas com pecíolo 1,5-3 cm, folíolo 5-7 x 3,5-5,5 cm, discolores, semi-coriáceos, oblongo-elípticos, ápice agudo, margem lisa, levemente revoluta, base cortada à assimétrica, faces adaxial e abaxial pubescentes a pubéculas, com tricomas multicelulares, glandulosos e tricomas peltados; pecíolos 5-10 mm; gavinhas trifurcadas no ápice. Inflorescência tirsóide. Cálice ca. 15x8 mm, infundibuliforme, partido no ápice formando 2-3-lábios, lacínios prolongados, com tricomas peltados e tricomas multicelulares; corola com aproximadamente 6x4 cm, roxa, infundibuliforme, glabra na região mediana-inferior e pubescente na região mediano-superior, tricomas glandulosos. Cápsula linear-achatada com aproximadamente 12,5x1,5 cm.

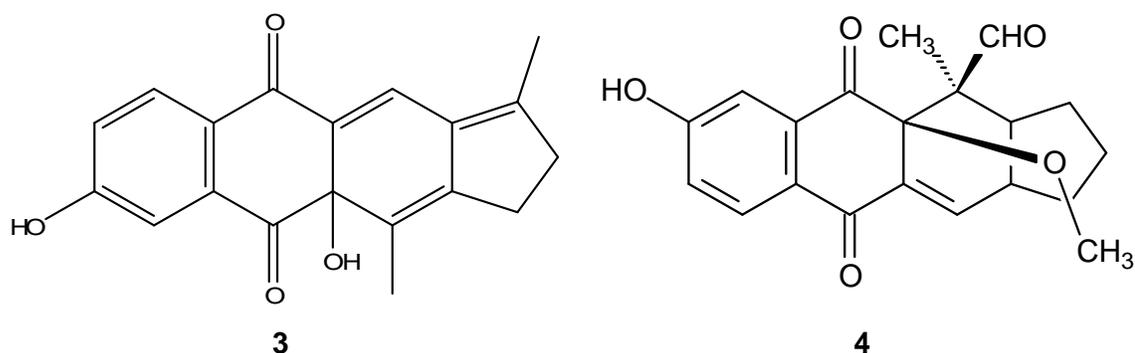
O Brasil é considerado o centro da diversidade da Bignoniaceae, uma grande família botânica que compreende aproximadamente 800 espécies que em sua maioria são encontradas em regiões neotropicais. Várias plantas desta família são utilizadas popularmente no Brasil como adstringente, contra febre e para tratamento de reumatismo, diarreia, câncer e infecções microbianas. Um grande número de efeitos biológicos tem sido experimentalmente observado incluindo atividades antitumoral, antiinflamatório e antimicrobiana, entre outros. Algumas espécies de Bignoniaceae têm sido testadas *in vitro* para a verificação de atividade antifúngica. Para a maioria dessas espécies, os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana vêm sendo isolados (LUCCHESI, 2006).

Os efeitos antifúngicos do lapachol (1) e β -lapachona (2), naftoquinonas encontradas em madeiras de espécies de *Tabebuia*, são bem conhecidos (ITOKAWA *et al.*, 1992). A resistência de fungos a antibióticos em uso clínico está aumentando e isso exige o desenvolvimento de novas drogas. O metabolismo

secundário das plantas pode fornecer uma fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Naftoquinonas, lignanas, triterpenos e flavonóides têm sido isolados das espécies da família Bignoniaceae. No entanto a composição química da maioria continua desconhecida (ROCHA *et al.*, 2004). O extrato etanólico das folhas de *M. hirsuta* mostrou efeito vasodilatador quando testado em anéis de aorta de ratos (CAMPANA *et al.*, 2009), enquanto os extratos etanólicos de *Clytostoma ramentaceum* e *M. hirsuta* mostraram ação antifúngica contra *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus niger* (ROCHA *et al.*, 2004).



Uma nova naftoquinona, kigelinona (**3**), e uma nova lignana, kigeliol (**4**), juntos com seis constituintes conhecidos incluindo lapachol e desidroxilapachona foram isolados da madeira de *Kigelia pinnata*, que é uma planta da família Bignoniaceae nativa da África, encontrada abundantemente nos trópicos. Seu fruto é conhecido por possuir uma atividade purgativa e sua casca uma ação cicatrizante para úlceras (INOUE *et al.*, 1981).



1.2.2. Doenças negligenciadas

Estima-se que menos de 10% dos gastos globais em pesquisa em saúde são direcionados para doenças que representam cerca de 90% dos problemas de saúde globais (MOREL, 2003). Esta deficiência do mercado tem contribuído para a limitada disponibilidade de drogas para o tratamento das doenças que acometem principalmente indivíduos de países em desenvolvimento. O setor privado investe quase que exclusivamente no desenvolvimento de drogas voltadas para o tratamento de patologias comuns em países desenvolvidos (MOREL, 2003).

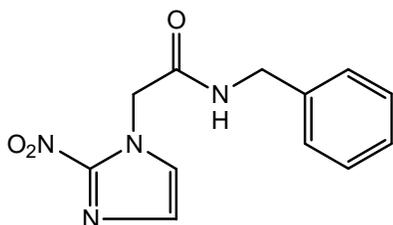
Dentre as doenças negligenciadas está a doença de Chagas, uma zoonose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. A maior parte dos casos de infecção em seres humanos ocorre através do contato da pele ou mucosas com as fezes ou urina de insetos hematófagos (triatomíneos) contaminados por *T. cruzi*. Este protozoário infecta quase 150 espécies de 24 famílias de mamíferos domésticos e selvagens, como também seres humanos (OMS, 1994).

A doença de chagas está presente em 18 países do continente americano, em duas zonas ecologicamente diferentes: a região do cone sul, onde os vetores do protozoário e humano convivem no mesmo ambiente peridomiciliar e a América Central e o México, onde os vetores estão presentes tanto em regiões povoadas quanto em áreas inabitadas (CHAGAS, 2003). As condições precárias de habitação, sobretudo em áreas rurais são os principais motivos para a expansão da doença.

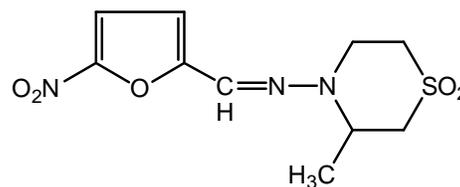
De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2003), a prevalência da doença de Chagas é de 13 milhões de casos (CHAGAS, 2003). A incidência anual é de 200 mil casos, em quinze países latino-americanos. No Brasil, os dados disponíveis de 1995 indicavam que 4,2% da população rural e 1,3% da população brasileira estavam infectada pelo *T. cruzi* em (BRENER *et al.*, 2000). Por ser uma enfermidade crônica debilitante e incapacitante, o custo econômico é elevado, e, como a população acometida é habitualmente de baixo nível sócio-econômico, os gastos são cobertos pelo Estado.

Atualmente, há uma droga existente no mercado para o tratamento específico, o benzonidazol (**5**), um derivado do nitroimidazol (Rochagan[®], Roche). Outra substância utilizada até recentemente é o nifurtimox (**6**), um nitrofurano (Lampit[®], Bayer 2502[®], Bayer). Ambas são eficazes somente na forma aguda ou crônica recente da doença, e ainda podem induzir efeitos colaterais tóxicos ao

paciente (URBINA *et al.*, 2002). Assim é de extrema relevância a busca de novas substâncias para o tratamento da doença de Chagas, que apresentem maior eficácia no tratamento de pacientes na fase crônica e menor toxicidade.



5

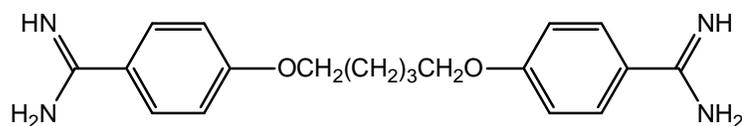


6

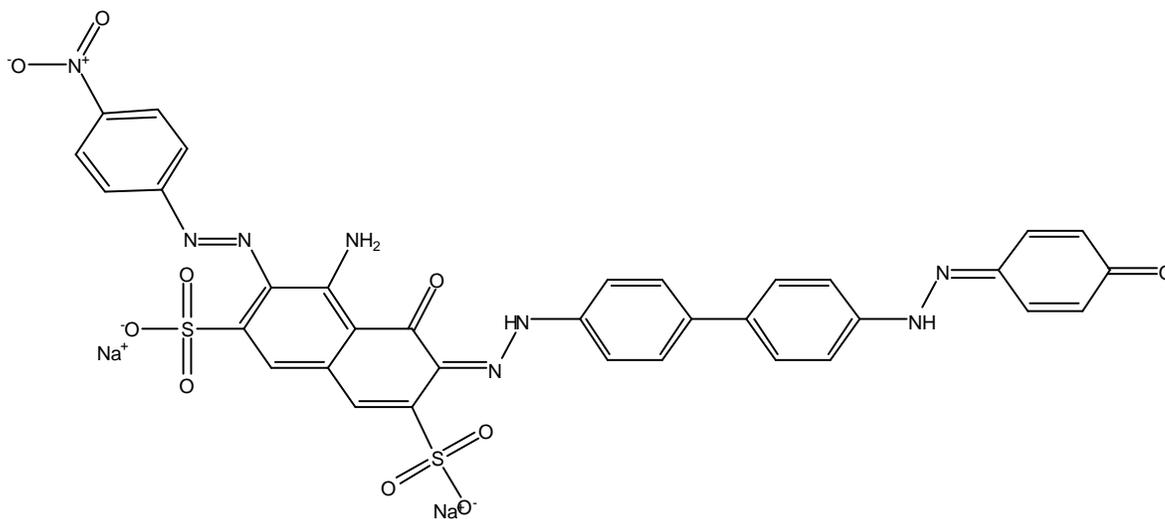
Entre as estratégias utilizadas na busca de novas drogas eficazes contra o *T. Cruzi* está a triagem de moléculas que atuam em alvos importantes da biologia do parasito. Dentre estes alvos moleculares mais utilizados estão as enzimas diidrofolato redutase (ZUCCOTTO, 2001), tripanotona redutase (CHAN *et al.*, 2002) e cruzipaina (CAZZULO, 2001; CAZZULO, 2002). Inibidores da biossíntese de esteróides (URBINA *et al.*, 2002) e análogos mono- ou dissustituídos de poliaminas (BACCHI & YARLETT, 2002), componentes biológicos essenciais à viabilidade e sobrevivência do protozoário, também são moléculas com potencial atividade tripanocida.

Outro grande problema de saúde pública são as leishmanioses, doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (2004), estima-se que este conjunto de doenças afete mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e está presente em 88 países, sendo que, 72 são considerados como países em desenvolvimento e 13 estão entre os menos desenvolvidos (LEISH, 2002). No Brasil, durante os anos de 1984 e 1999, 37.294 novos casos de leishmaniose visceral humana foram notificados pelo Ministério da Saúde e somente no período compreendido entre 1998 e 2000 87.350 novos casos já foram registrados (LEISH, 2002). Recentemente o aumento elevado na taxa de co-infecção em pacientes HIV positivos (ALVAR *et al.*, 1997) e o desenvolvimento de resistência dos parasitos às drogas existentes têm aumentado a importância desta doença na saúde pública (LEANDRO & CAMPINO, 2003).

O tratamento das leishmanioses tem sido feito com a utilização de metais pesados, em particular os compostos antimoniais, como drogas de primeira escolha. Quando este tipo de terapia não é efetivo, outros medicamentos são usados, dentre estes a pentamidina (7) e a anfotericina B (8) lipossomais, medicamentos de administração injetável para os quais o paciente necessita de supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento devido à gravidade dos possíveis efeitos colaterais (BACAB & RODRIGUEZ, 2001). Dessa forma, a busca de novas substâncias, efetivas e seguras, para o tratamento das leishmanioses torna-se prioritária.



7

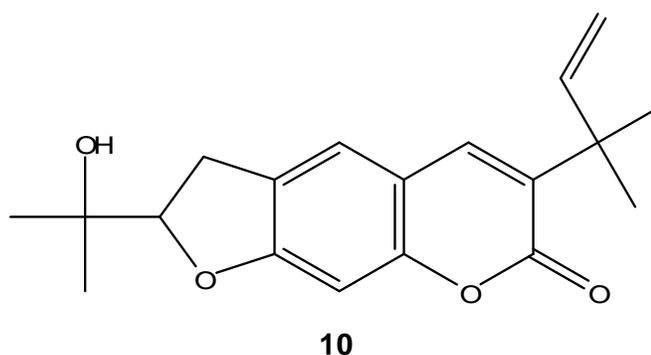
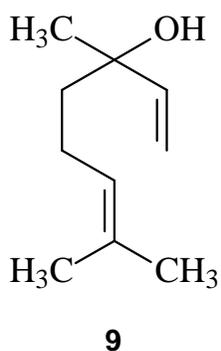


8

Uma das principais linhas de investigação de novos tratamentos para leishmanioses é a de desenvolvimento de fármacos capazes de bloquear alvos do sistema biológico do parasito vital à sobrevivência do mesmo, como por exemplo, os mecanismos que levam a síntese de ATP e que definem o estado energético do parasito. A fosforilação oxidativa é um processo essencial para preencher um nível

energético mínimo necessário a sobrevivência do parasito. Dessa forma, drogas que afetam a produção mitocondrial de ATP, tais como as licochalconas e naftoquinonas, são boas candidatas à drogas leishmanicidas. Moléculas com este mecanismo de ação diminuem os níveis de ATP intracelulares do parasito, uma vez que a glicólise é um processo ineficaz para contrabalancear o decréscimo de ATP (ORTEGA *et al.*, 2001).

Espécies vegetais podem servir como fonte de substâncias com atividade anti-protozoário. Da classe dos taninos, isolados de espécies vegetais, algumas substâncias demonstraram atividade leishmanicida, com ação sobre formas amastigotas da espécie *L. lonovani* (KIDERLEN *et al.*, 2001). Extratos de vegetais ricos em substâncias polifenólicas inibiram o crescimento de formas amastigotas e promastigotas de parasitos da espécie *L. amazonensis* (MENDONÇA-FILHO *et al.*, 2004). O óleo essencial da espécie *Cróton cajucara*, rico em linalol (**9**), mostrou-se ativo, inibindo o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (SOCORRO *et al.*, 2003). Extratos de espécies pertencentes à família Rutaceae apresentaram atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* (MAFEZOLI *et al.*, 2000). A chalepina (**10**), substância isolada da espécie vegetal *Pilocarpus spicatus*, exibiu atividade tripanocida (PAVÃO *et al.*, 2002). Dessa forma, diversas substâncias têm sido identificadas e suas atividades demonstradas contra protozoários do gênero *Leishmania* e da espécie *T. cruzi*.



1.2.3. As imunopatologias

As doenças mediadas pelo sistema imune são problemas de saúde global, estão em crescimento em proporções epidêmicas (KRENSKY *et al.*, 2001) e

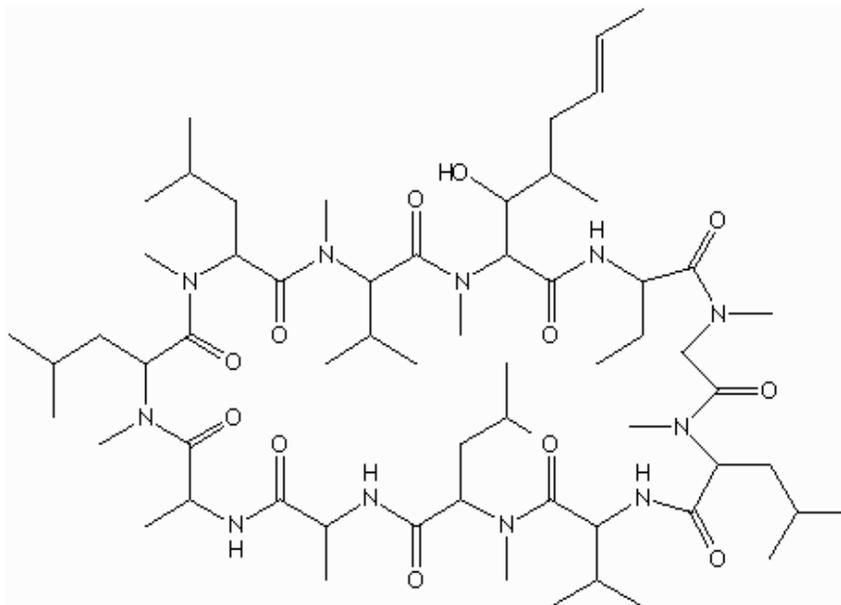
demandam rapidez na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. Estas doenças incluem um amplo espectro de patologias, dentre elas a artrite reumatóide, a diabetes mellitus tipo I, o lupus eritematoso sistêmico, a esclerose múltipla, a asma e várias outras condições alérgicas. A incidência das imunopatologias tende a aumentar com o envelhecimento da população, tendo em vista o aumento da expectativa de vida do ser humano (ROEP, 2003).

O transplante de órgão é uma das grandes possibilidades terapêuticas para o tratamento de diversas patologias. No entanto, a rejeição dos órgãos transplantados, mediada pelo sistema imune, permanece como um fator que dificulta a utilização desta tecnologia, sendo necessário o tratamento contínuo com drogas imunossupressoras. É de grande relevância, portanto, a descoberta de novas drogas imunomoduladoras, tendo em vista a sua aplicabilidade em processos imunopatológicos.

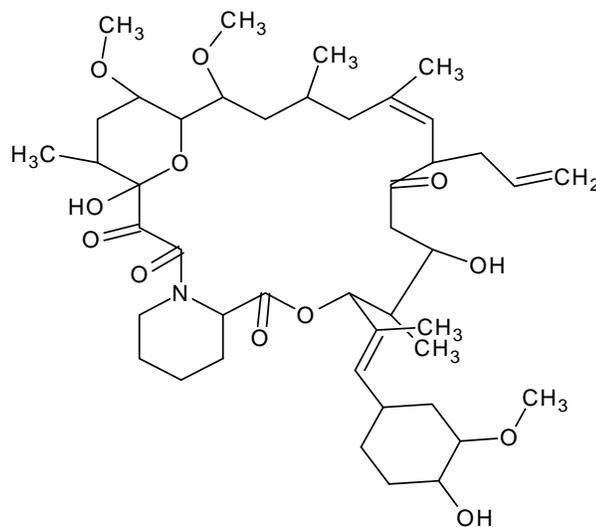
Drogas com ação moduladora da ativação de macrófagos e linfócitos, como os corticosteróides, têm sido amplamente utilizadas para o controle de respostas imunoinflamatórias indesejadas (KRENSKY *et al.*, 2001). Os corticóides e a ciclosporina (**11**) são exemplos de drogas imunossupressoras eficazes disponíveis atualmente no mercado, que causam vários efeitos colaterais no paciente. No caso dos corticóides, alguns dos efeitos colaterais observados são o retardo no crescimento, necrose avascular de medula, osteopenia, úlcera péptica, aumento do risco de contrair infecções, aparecimento de catarata, hiperglicemia e hipertensão, hiperlipidemia e também nefrotoxicidade, sendo este último efeito presente na maioria dos pacientes tratados com a droga (KRENSKY *et al.*, 2001; BURDMAN *et al.*, 2003).

Os corticóides têm seu mecanismo de ação imunomodulador baseado na diminuição do número de linfócitos no sangue periférico, na regulação da transcrição de diversos genes e na indução de apoptose, sendo este último efeito do aumento da concentração da proteína I κ B, reduzindo a ativação do gene NF κ B, que resulta no aumento da apoptose das células ativadas. É de importância central na ação dos esteróides e na diminuição da produção de importantes citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , Il-1 e Il-6, diminuindo conseqüentemente a ação de macrófagos e linfócitos (KRENSKY *et al.*, 2001). A ciclosporina (**11**), droga inibidora da calcineurina tem seu mecanismo de ação baseado na inibição da transdução de sinal desencadeada pela ativação do receptor de linfócitos T, reduzindo a produção

de linfocinas, incluindo a Il-2, como também a expressão de proteínas antiapoptóticas. O tacrolimus (12) também inibe a ativação de células T através da inibição da calcineurina (KRENSKY *et al.*, 2001).



11



12

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

Espécies vegetais podem ser uma fonte de substâncias com atividade imunomoduladora. Recentemente foi demonstrado que substâncias químicas extraídas da espécie vegetal *Crotalaria pallida* inibem a produção de NO *in vitro* de forma concentração dependente (WENG *et al.*, 2003). Outros exemplos de moléculas com atividade imunomoduladora são as fisalinas, seco-esteróides purificados da espécie *Physalis angulata*, que apresentam potente atividade inibidora da produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (SOARES *et al.*, 2003) e a espécie *Dendrobium nobile* da qual se isolou um sesquiterpeno com atividade inibidora da proliferação de linfócitos (ZHAO *et al.*, 2001).

1.2.4. Metabolômica e análise multivariada.

1.2.4.1. As “Omicas”

As plataformas tecnológicas conhecidas como ômicas são aquelas que têm o objetivo de isolar e caracterizar o maior número de biomoléculas de um mesmo grupo, como ácidos desoxirribonucléicos (DNA), ácidos ribonucléicos (RNA), proteínas ou metabólitos. A primeira ômica a ser denominada como tal foi a genômica. Este termo vem da palavra genoma, que por sua vez se deve à junção da palavra gene e cromossoma. Graças a grande aceitação desse termo, transcriptômica, proteômica e metabolômica foram sugeridos para descrever a expressão de genes na forma de transcritos de mRNA, o conjunto de proteínas de um organismo e ainda o conjunto de moléculas do organismo, respectivamente (BINNECK, 2004; ROBERTSON, 2005). O conhecimento das ômicas pode contribuir para o isolamento e caracterização de DNA, RNA, proteínas e metabólitos. A integração das informações obtidas por essas plataformas são o objetivo principal de

biologia de sistemas, também conhecida como Genômica Funcional (ROCHFORT, 2005).

1.2.4.2. Metabolômica

Não há dúvidas que conhecer as proteínas de um organismo é importante, mas existe um universo de pequenas moléculas orgânicas que interagem diretamente com as proteínas e outras macromoléculas (HALL, 2006). Essas moléculas atuam como substratos, inibidores ou ativadores alostéricos de uma enzima. Podem ser precursores de alguma molécula importante nas inúmeras rotas metabólicas celulares, ou até mesmo um resíduo metabólico de alguma via de síntese ou degradação de macromoléculas que por algum motivo é estocada e utilizada como defesa química contra alguns patógenos (ENGEL *et al.*, 2002; DEMAIN & VAISHNAV, 2006). Essas pequenas, porém, importantes moléculas são conhecidas como metabólitos (DIXON, 2001).

Esses metabólitos são divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários e secundários. Os primários são aqueles que estão diretamente envolvidos nas rotas de síntese de degradação das macromoléculas em qualquer ser vivo (DIXON, 2001). Já os secundários são mais comuns em plantas e fungos (CHALLIS & HOPWOOD, 2003; HALL, 2006). Eles atuam como componentes estruturais de defesa contra herbívoros e patógenos, atrativos para polinizadores e agentes nas interações interespecíficas, como alelopatia (ENGEL *et al.*, 2002; CHALLIS & HOPWOOD, 2003).

O estudo desses metabólitos visando à obtenção de produtos efetivos contra diversas doenças e passíveis de comercialização já vem sendo feito desde o início do século XX. Entretanto, a idéia de se analisar todo o conjunto de metabólitos em qualquer nível de complexidade (organismo, órgão, tecido, célula ou mesmo compartimentos celulares) só começou a ganhar destaque nos últimos anos, conforme pode ser observado na Figura 1.1, onde é observado um aumento significativo no número de publicações sobre esse tema nos últimos anos (HORNIG & HORNING, 1971; NICHOLSON *et al.*, 1999; FIEHN, 2002; REO, 2002; LINDO *et al.*, 2003, NICHOLSON & WILSON, 2003; WECKWERTH, 2003; BINO *et al.*, 2004; FERNIE *et al.*, 2004; GOODACRE *et al.*, 2004; LINDO *et al.*, 2004a; LINDO *et al.*, 2004b; FUKUZAKI & KOBAYASHI, 2005; MUNGUR *et al.*, 2005; ROBERTSON,

2005; ROCHFORT, 2005; WECKWERTH & MORGENTAL, 2005). O nome dado a todas as tecnologias envolvidas na análise desses metabólitos foi metabolômica.

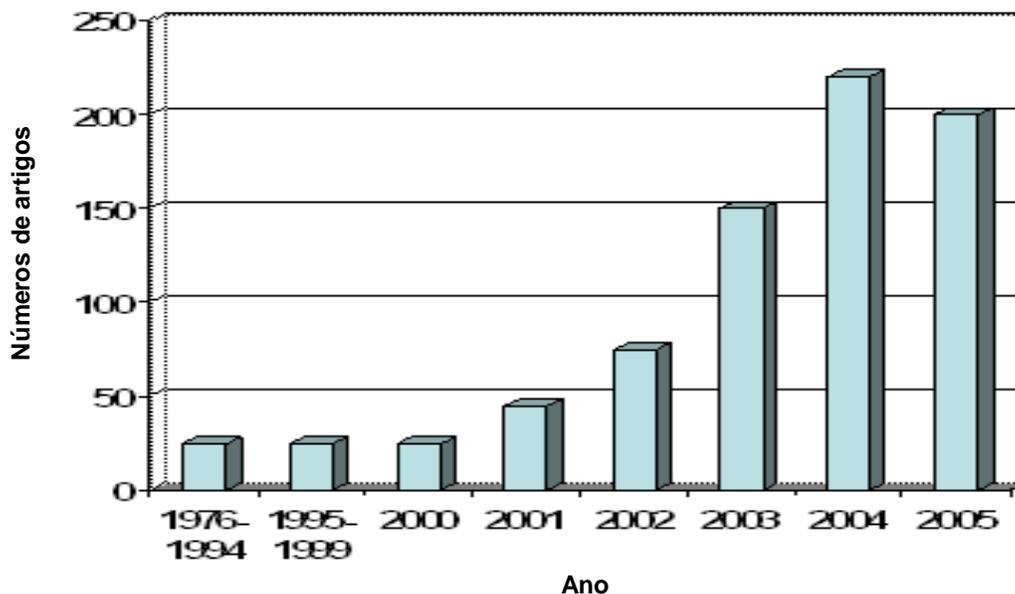


Figura 1.1. Artigos publicados relacionado à metabolômica de 1975 até setembro de 2005.

1.2.4.3. Quimiometria

A sofisticação das técnicas instrumentais, impulsionada pela invasão de microprocessadores e microcomputadores nos laboratórios químicos, aumentou significativamente nos últimos 15 anos. Isto faz com que se torne necessário o tratamento dos dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidade, por exemplo) com os resultados desejados (concentração) (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998).

Muita ênfase tem sido dada aos chamados sistemas multivariados, pelos quais se podem medir muitas variáveis simultaneamente ao analisar-se uma amostra qualquer. Entende-se por sistema multivariado aquele que analisa uma quantidade de dados multivariados que não apresentam uma informação direta como resultado (KOWALSKI & BENDER, 1972). Os sistemas multivariados de forma sequencial ou simultânea medem muitas variáveis para cada objeto, consistindo em um método eficiente e de fácil interpretação. Nesses sistemas, a conversão da

resposta instrumental no dado químico de interesse requer a utilização de técnicas de estatística, álgebra matricial e análise numérica. Essas técnicas constituem-se, atualmente, numa das melhores alternativas para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informações sobre um sistema.

Para tanto, faz-se necessário o uso de softwares capazes de reconhecer padrões em análises químicas, o que tem permitido interpretar mais precisamente os dados obtidos nos laboratórios de química analítica e, em consequência, das análises cromatográficas (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). Tem-se assim, a aplicação da quimiometria ou dos métodos quimiométricos (KWAN & KOWALSKI, 1980), os quais utilizam métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências e permitir a obtenção do máximo de informações a partir da análise de dados químicos multivariados. Os métodos quimiométricos são eficientes na análise, obtenção e interpretação destes dados, podendo solucionar vários tipos de problemas químicos (XIE, 1987). Define-se quimiometria como a área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, para interpretar problemas de origem química (MUNCK, 2006). Assim, através destas análises, as informações químicas podem ser classificadas em categorias conforme suas semelhanças ou diferenças, e ainda podem ser determinadas, propriedades de interesse das amostras analisadas. Dentre as técnicas quimiométricas mais utilizadas, a que foi empregada nesse trabalho foi a análise exploratória dos dados.

1.2.4.4. Análise exploratória de dados

BEEBE & SCASHOLTZ (1998) consideram a análise exploratória dos dados como uma ferramenta destinada a reunir amostras presentes em um grupo que apresentem determinadas características comuns, distinguindo-as de amostras com características diferentes. Ainda segundo esses pesquisadores, esse método também auxilia na identificação de amostras não usuais - conhecidas também como "outliers", isto é, aquelas que não seguem o padrão das demais amostras.

Em uma análise exploratória, algoritmos matemáticos reduzem grupos de dados grandes e complexos para um conjunto de interpretação mais simples. Esses cálculos apontam as informações importantes em poucas variáveis derivadas do grupo de dados originais, como as correlações existentes entre as amostras e/ou

variáveis independentes (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). CLEVE *et al.* (2000) descrevem a utilidade de técnicas quimiométricas para avaliar dados analíticos obtidos na indústria têxtil. Neste setor, o emprego de técnicas espectroscópicas no infravermelho próximo constitui uma fácil ferramenta a ser empregada no controle de qualidade. Entretanto, a grande quantidade de variáveis correlacionadas com o processo produtivo gera problemas na avaliação das características finais do produto acabado. Assim, os autores sugerem que o emprego da quimiometria pode auxiliar na determinação de características mais relevantes a serem consideradas, e conseqüentemente, diminuir a quantidade de variáveis a serem avaliadas. Através de uma análise exploratória foi possível classificar as variáveis e avaliar a qualidade dos dados originais. O estudo demonstrou que o uso da espectrometria de infravermelho próximo acoplada a métodos quimiométricos foi eficiente para ser empregado no controle de qualidade de amostras produzidas pelo segmento têxtil.

Em toda análise multivariada, primeiramente define-se o problema, com a determinação da natureza do trabalho, ou seja, se é um problema exploratório, de classificação ou uma combinação desses fatores. Posteriormente, os dados obtidos são organizados em um arquivo como uma matriz original X , que é construída por n amostras e m variáveis, e cada amostra corresponde a uma linha e cada variável corresponde a uma coluna na matriz de dados, de onde é possível a visualização dos dados brutos.

Antes da realização da análise exploratória dos dados, é importante atribuir o mesmo peso para todas as variáveis, caso contrário alguns valores ou medidas poderão mascarar outras medidas e valores e a análise poderá ficar comprometida. Por isso, usualmente os dados são auto-escalonados antes do início da análise exploratória. Finalizada essa fase inicial de pré-processamento dos dados, passa-se a fazer a análise de agrupamentos hierárquicos ou HCA (Hierarchical Cluster Analysis), análise de componentes principais ou PCA (Principal Component Analysis) e a análise dos mínimos quadrados parciais discriminados ou PLS-DA (Partial Least Square Discriminated) (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998).

1.2.4.5. Análise de agrupamentos hierárquicos – HCA

O principal objetivo da HCA é apresentar os dados de maneira que se enfatize o agrupamento natural, de acordo com semelhanças existentes entre as

amostras. O agrupamento das amostras revela similaridade entre essas e os dados são apresentados na forma de dendogramas, o que facilita o reconhecimento das categorias. BERENTE *et al.* (2000) realizaram o desenvolvimento de um método para determinação de antocianinas em vinhos empregando a CLAE e posteriormente classificaram amostras comerciais empregando métodos quimiométricos. Após o desenvolvimento do método cromatográfico em fase reversa para separar as principais antocianidinas presentes em amostras de vinhos, foi utilizada a técnica de HCA para visualizar as relações existentes entre as bandas cromatográficas obtidas. Nove bandas foram computadas nas amostras analisadas e o emprego da técnica de HCA permitiu visualizar que as áreas das bandas cromatográficas de determinadas antocianidinas apresentavam elevada correlação entre si. As amostras que continham esses compostos puderam ser classificadas como semelhantes. Esse trabalho demonstrou que a técnica de HCA permite a visualização do agrupamento das amostras que possuem características semelhantes entre si. BECKONERT *et al.* (2003) realizaram um estudo visando estabelecer os efeitos metabólicos e a toxicidade de 19 moléculas modelo com base na HCA combinada com dados de ^1H RMN. As substâncias foram administradas em ratos para estudo de sua toxicidade crônica e subcrônica. Amostras de urina foram coletadas em 8 diferentes dias e horários e, subsequentemente, analisadas por RMN, sendo que as similaridades das respostas dos animais tratados com diferentes substâncias foi investigada pela HCA considerando dose e efeitos adversos. O estudo revelou, por exemplo, que a toxicidade de algumas substâncias era similar independente do órgão analisado (fígado ou rim).

1.2.4.6. Análise de componentes principais – PCA

A análise por PCA pode apresentar relações entre amostras e variáveis, mas também fornece um meio de reduzir a dimensão dos dados e pode ser aplicada como uma ferramenta de visualização. É um método que transforma dados complexos em informações mais simples e ressalta os aspectos mais relevantes (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). Essa técnica auxilia a visualização de tendências em um conjunto de dados que não são óbvias a olho nu. Ela ainda melhora a visualização das informações, agrupando as variáveis que estão altamente

correlacionadas em um novo conjunto de dados chamado de PCs (componentes principais).

As PCs reduzem a dimensão de um conjunto de dados, de forma que as informações relevantes ficam condensadas e contidas nas primeiras componentes principais e as informações irrelevantes ou aleatórias, nas últimas (BEEBE & SCASHOLTZ, 1998). Isto pode ser observado, por exemplo, nos trabalhos realizados por LIANG *et al.* (2004), os quais empregaram métodos quimiométricos para classificar os “fingerprintings” de cromatogramas obtidos através de CLAE de produtos fitoterápicos produzidos a partir de *Cortex cinnamomi* e *Erigeron breviscapus* com o objetivo de realizar o controle de qualidade destes. BERENTE *et al.* (2000) também usaram a análise de componentes principais para a classificação de amostras de vinhos. Este método mostrou-se apropriado para extrair as informações relevantes encontradas nas variáveis originais, transformando-as em poucas novas variáveis (PCs). Foi observado que as duas primeiras componentes principais extraíram 70% de todas as informações relevantes e a interpretação dessas duas componentes principais permitiu determinar as variedades de vinhos que se correlacionavam. Assim, a utilização dessa técnica torna possível agrupar e classificar amostras através da análise das componentes principais que são apropriadas para se extrair as informações relevantes oriundas dos dados originais.

1.2.4.7. Mínimos quadrados parciais discriminados ou PLS-DA

Embora a PCA seja uma técnica versátil, uma vez que ela explica a variância máxima no conjunto de dados, a análise resultante pode ser complexa e não permitir a separação adequada das amostras de acordo com as matrizes de dados fornecida. Nesse contexto, a PLS-DA pode utilizar os dados oriundos da PCA e modelar de forma mais definida as relações entre as matrizes, uma vez que é possível considerar variáveis secundárias por este método. O método produz um conjunto de novas variáveis correlacionadas com os PCs e explica a covariância entre duas matrizes (CIOSEK *et al.*, 2005). A PLS-DA foi utilizada para a discriminação de diferentes histotipos de câncer de pulmão, e também para discriminar estes de câncer do cólon, uma vez que permitiu a definição de um conjunto de genes capazes de discriminar câncer de pulmão de metástases no cólon (MUSUMARA *et al.*, 2005). VAN RUTH *et al.* (2010) aplicou a PLS-DA em amostras

de gorduras e conseguiu identificar sete grupos referentes às origens das amostras (leite, vaca, porco, galinha, coco, palmeira e palmiste) usando os perfis de ácidos graxos, triacilglicerídeos, a combinação dos perfis de ácidos graxos e triacilgliceróis e o perfil de compostos orgânicos voláteis obtido a partir de PTR-MS. Os preços de preparações comerciais de espécies de *Angelica*, uma erva nativa chinesa usada no tratamento de distúrbios ginecológicos, além de artrite e anemia, são principalmente determinados com base nas suas qualidades sensoriais além das propriedades físicas. TARACHIWIN *et al.* (2008) avaliaram a qualidade das raízes da planta usando como variáveis secundárias suas origens geográficas e as diferenças sensoriais entre as variedades. Nesse estudo foi detectada uma ampla faixa de metabólitos por ^1H RMN e a PLS-DA permitiu o agrupamento das amostras com base na área de cultivo (China e Japão), além de mostrar que a qualidade sensorial das amostras independe da área de cultivo.

1.2.4.8. Metabolômica: aplicações em plantas

No passado a abordagem da genômica ou proteômica era aplicada para a caracterização dos organismos vivos isoladamente. No entanto, logo ficou evidente que uma única ômica não poderia satisfazer este objetivo ilimitadamente. Portanto, muito recentemente, o produto final da expressão gênica, os metabólitos, tornou-se o objetivo de uma nova ômica, a metabolômica.

A metabolômica é uma sistemática de identificação e quantificação de todos os metabólitos em um dado organismo ou amostra biológica. Naturalmente, as plataformas de análise para a aquisição de dados sobre o conteúdo de metabólitos são críticas para o sucesso dos estudos. Entre os vários candidatos, a ressonância magnética nuclear (RMN) revelou-se como uma ferramenta para permitir a detecção de uma vasta gama de metabólitos com robustez e exige apenas uma preparação muito simples da amostra. Mesmo com um dos principais inconvenientes para a aplicação de RMN, sensibilidade baixa, a resolução aprimorada e sensibilidade fornecida pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear juntamente com poderosas ferramentas quimiométricas, permitem que a metabolômica possa ser aplicada em diversos campos da ciência das plantas.

A caracterização química de vinhos tintos italianos a partir de diferentes localizações geográficas na Puglia, região do sul da Itália, foi realizada usando

dados de ressonância magnética nuclear (^1H RMN). Métodos de estatística multivariada foram aplicados para os dados analíticos de RMN permitindo elaborar uma técnica de controle de qualidade para vinhos (BRESCIA *et al.*, 2002). A análise metabólica mostrou um claro aumento dos níveis de fenilpropanóides em *Brassica rapa* após o tratamento com jasmonato de metila (LIANG *et al.*, 2006).

A espectroscopia de ^1H RMN juntamente com a análise de componentes principais foi utilizada no estudo da metabólica de 12 formas cultivadas de *Cannabis sativa*, para a diferenciação de cultivares de *Cannabis* baseada em uma variedade de metabólitos (CHOI *et al.*, 2004). Em outro estudo, a RMN-metabolômica foi aplicada à impressão digital metabólica de espécies de *Ephedra* permitindo a discriminação de três espécies diferentes dessa planta e a avaliação de nove ervas comerciais de *Ephedra* (KIM *et al.*, 2005). A utilização de RMN para o controle de qualidade de fitoterápicos também tem sido explorada. Um exame de 14 preparações a partir de extratos aquosos e orgânicos dos comprimidos comerciais de “feverfew” (BAILEY *et al.*, 2002) mostrou que dois deles tinham uma composição muito diferente dos outros. As 12 amostras restantes foram distinguidas na maior parte uma da outra, embora a diferença não tenha sido marcada e alguns grupos de 2 ou 3 amostras eram aparentes. Além disso, diferentes lotes de um mesmo produto do mesmo fornecedor podem ser distinguidos. Dados espectroscópicos de RMN em conjunto com a análise multivariada também foram relatados para a classificação de amostras comerciais de catuaba. A técnica descrita permitiu a discriminação de amostras com base no tipo de matéria-prima empregada em sua fabricação (DAOLIO *et al.*, 2008). Análise metabólica de 11 espécies de *Ilex* incluindo duas variedades foi realizada utilizando um método de espectroscopia de RMN acoplado à análise de componentes principais (PCA) no software SIMCA-P (CHOI *et al.*, 2005). Resultados como estes mostrados anteriormente prova a eficácia de métodos de análise multivariada na classificação e caracterização de espécies de plantas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivos gerais

Estudar o potencial biológico dos extratos e frações obtidos das folhas da *M. hirsuta*, Cipó d'alho, isolar e purificar os possíveis princípios ativos e estudar o perfil metabólico da planta.

1.3.2. Objetivos específicos

- Preparar os extratos etanólicos de plantas de *M. hirsuta* coletadas na região de Gentio de Ouro;
- Particionar o extrato etanólico de folhas de *M. hirsuta*;
- Realizar a prospecção fitoquímica para estabelecer as classes de metabólitos secundários presentes no extrato e frações;
- Estudar as atividades biológicas do extrato e frações com relação aos potenciais citotóxicos, leishmanicida, tripanocida, redutora do radical NO e inibidora da proliferação de linfócitos;
- Purificar possíveis compostos ativos por cromatografia em camada delgada e cromatografia em coluna;
- Elucidar a estrutura das substâncias isoladas com base em dados de GC-MS, ¹H RMN e 2D-RMN;
- Aplicar as técnicas HCA, PCA e PSL-DA para a caracterização metabólica de espécies de *M. hirsuta* coletadas em diferentes locais do Semi-Árido e
- Estabelecer correlações entre várias variáveis (tipo de solo, constituição química, relevo, meio ambiente), com a atividade biológica apresentada, de modo a selecionar plantas com a melhor atividade possível.

2. Experimental

EXPERIMENTAL

Experimento foi realizado na Universidade Federal de Alagoas, no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do Departamento de Química – UFAL e na Divisão de Farmacognosia da Universidade de Leiden (Holanda).

2.1. REAGENTES, SOLVENTES E EQUIPAMENTOS

- ⇒ Nas separações cromatográficas em coluna, utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 (70-230 Mesh ASTM) da (Merck - Darmstad – Alemanha). O comprimento e o diâmetro das colunas utilizadas variaram conforme as quantidades das amostras e de sílica gel a serem utilizadas. Nas permeações em gel, utilizou-se Sephadex LH-20 (Pharmacia, Suíça);
- ⇒ Nas análises comparativas através de cromatografia em camada delgada (**CCD**), utilizou-se gel de sílica 60 PF₂₅₄ da Merck. A suspensão de sílica, obtida em água destilada, foi distribuída sobre placas de vidro através de um espalhador mecânico para ter uma espessura de 0.15 mm.
- ⇒ A revelação das substâncias nas cromatoplasmas foi realizada através da exposição dessas a irradiação com luz na região do UV, em comprimentos de onda 254 e 366 nm, e os reveladores. Solução alcoólica de anisaldeído 10%, solução ácida de sulfato cérico, solução de ácido fosfomolibidico e vapores de iodo;
- ⇒ Os solventes utilizados foram destilados no próprio laboratório para as partições e filtrações (Morais de Castro LTDA, Recife-PE). Porém, nas colunas cromatográficas e cristalizações foram utilizados solventes analiticamente puros de grau P.A.
- ⇒ A concentração das frações contendo grandes volumes de solvente foi efetuada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, tipo Büchler; enquanto que as soluções contendo pequeno volume foram concentradas á temperatura ambiente em capela de exaustão;
- ⇒ O critério de confirmação da pureza para as substâncias isoladas aferiu-se o ponto de fusão;

⇒ Os extratos foram obtidos com *n*-hexano e depois com diclorometano e em seguida submetidos à análise em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com uma coluna DB-1, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A (Shimadzu - Kyoto - Japão) (Figura 2.1). Foi utilizado hélio (He) como gás de arraste e os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico com energia do feixe eletrônico de 70 eV. Foi também analisado o etanol recuperado da extração bruta (Fluxograma 2.1).



Figura 2.1. Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas utilizado na identificação dos voláteis.

2.2. TRATAMENTO DA PLANTA

2.2.1. Escolha da Planta

A espécie *M. hirsuta* D.C apresenta atividades biológicas, e faz parte das plantas selecionadas no programa **IMSEAR** (Instituto do Milênio no Semi-árido) para estudo químico.

2.2.2. Coleta e Descrição da Planta

2.2.2.1. Fitoquímica clássica

As folhas da planta em estudo foram fornecidas pelo projeto IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-árido). A *M. hirsuta* trabalhada foi coletada e descrita por Teonildes Nunes em 16/05/2002 no Brasil, Bahia, Santo Inácio, estrada Xique-

Xique, para Gentio do Ouro, antes de Gameleira do Assuruá, 11°19' S e 42°40' O. Está registrada no **HUEFS** (Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana) com número de série de 59456. As plantas coletadas foram usadas no processo de isolamento e purificação de substâncias na fitoquímica clássica.

2.2.2.2. Metabolômica

As populações escolhidas foram: Campo Alegre de Lourdes (S 9° 28' 9,8" W 43° 05' 22,7"), Gentio de Ouro (S 11° 25' 38,5" W 42° 31' 13,7") Morro do Chapéu (S 10° 55' 35,1 W 42° 28' 24,0"), Boninal (S 12° 26' 36,5" W 41° 55' 9,7") e Caetité (S 14° 06' 57,9" W 42° 25' 56,9"). Estas regiões estão ilustradas e no Mapa da Figura 2.1. Na região de canudos Não foi encontrada espécie de *Mansoa hirsuta* por conta do desmatamento, nesta região do semi-árido da Bahia que faz vizinhança com a mata atlântica.



Figura 2.2. Mapa com ilustração dos municípios os quais foram coletados os espécimes de *Mansoa Hirsuta* D.C..

As folhas da *M. hirsuta* foram fornecidas pelo IMSEAR, coletadas e autenticadas pelo botânico Cosme Correia em agosto de 2009 e um exemplar de cada População da espécie coletada, se encontram depositados e registrados no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana sob números de série

161172 (C. Alegre de Lourdes), 161174 (G. de Ouro), 161175 (M. do chapéu), 161176 (Boninal), 161177 (Caetité), estes espécimes também foram fotografadas, para observar algumas características fenotípicas.

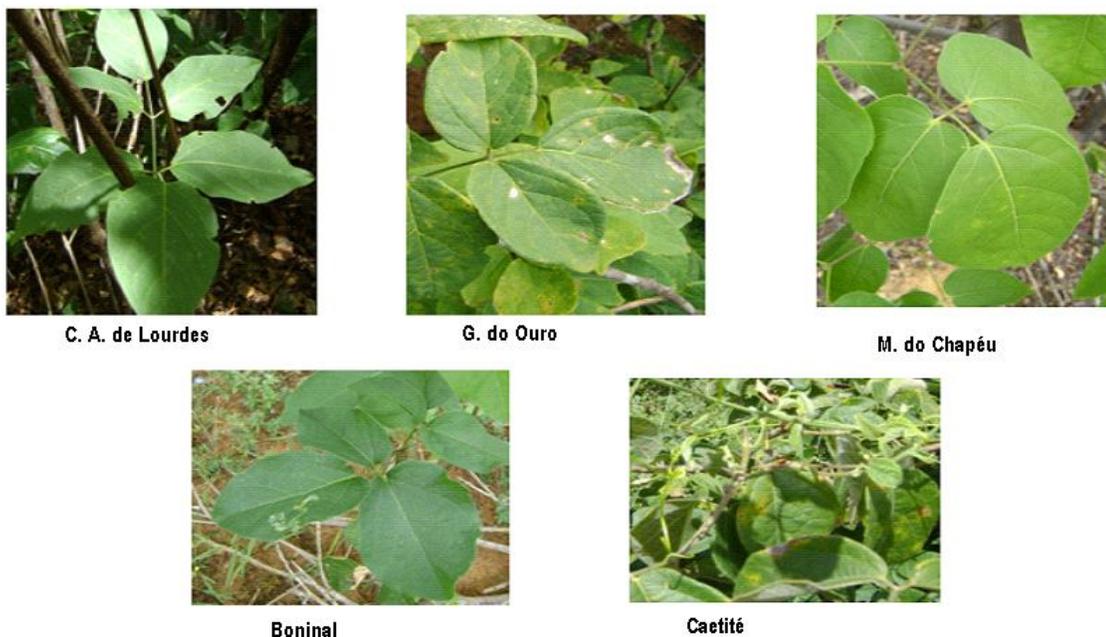


Figura 2.3. Fotos dos espécimes de *Mansoa Hirsuta* nas regiões coletadas.

2.2.3. Secagem e moagem das folhas

As folhas sadias da planta já foram fornecidas secas para que não houvesse crescimento de microrganismos, sendo então separadas de resíduos de outras partes das plantas e pulverizadas em moinho tipo forrageiras.

2.2.4. Obtenção do Extrato

2.2.4.1. Fitoquímica clássica

A planta pulverizada com o peso total de 15,0 kg, foi extraída com 60 L de etanol 90% v/v em extrator de aço inoxidável à temperatura ambiente (27 – 30 °C) por 96 h. A destilação do solvente sob pressão reduzida em aparelho rotatório forneceu 1800 g de extrato etanólico concentrado e homogêneo.

2.2.4.2. Metabolômica

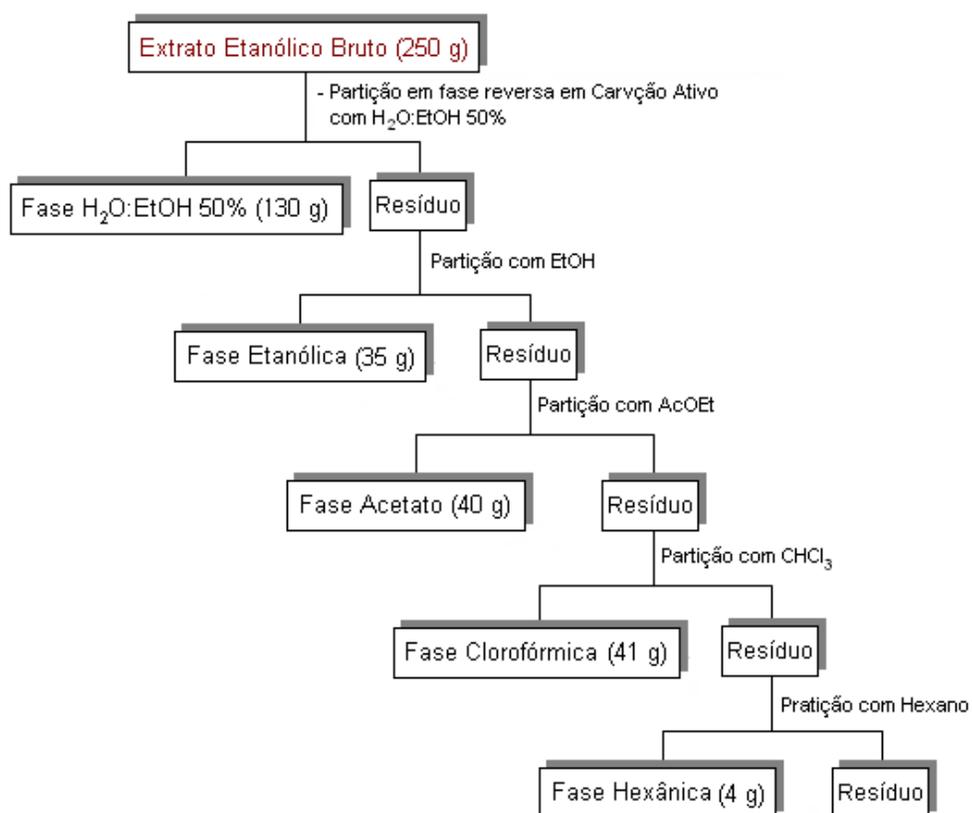
As folhas dos 50 indivíduos da *M. hirsuta*, sendo 10 de cada população, foram secas em estufa a 40 graus e depois pulverizada em um liquidificador industrial, sendo coletados aproximadamente 15,0 g de cada indivíduo e extraídas separadamente com 150 mL de etanol 90 % em Erlenmayer de 250 mL, temperatura ambiente (27 – 30 °C) por 96 h. A destilação do solvente sob pressão reduzida foi realizada em aparelho rotatório, elaborando extratos etanólicos concentrado e homogêneo. Depois todos os extratos foram liofilizados e 20 mg foram dissolvidas em 500 µL de metanol deuterado e 500 µL de água deuterada com tampão KH_2PO_4 pH 6.0, e para total dissolução usou-se vortex e ultrason. As amostras foram então centrifugadas, pipetados 700 µL e transferidos para tubos de RMN.

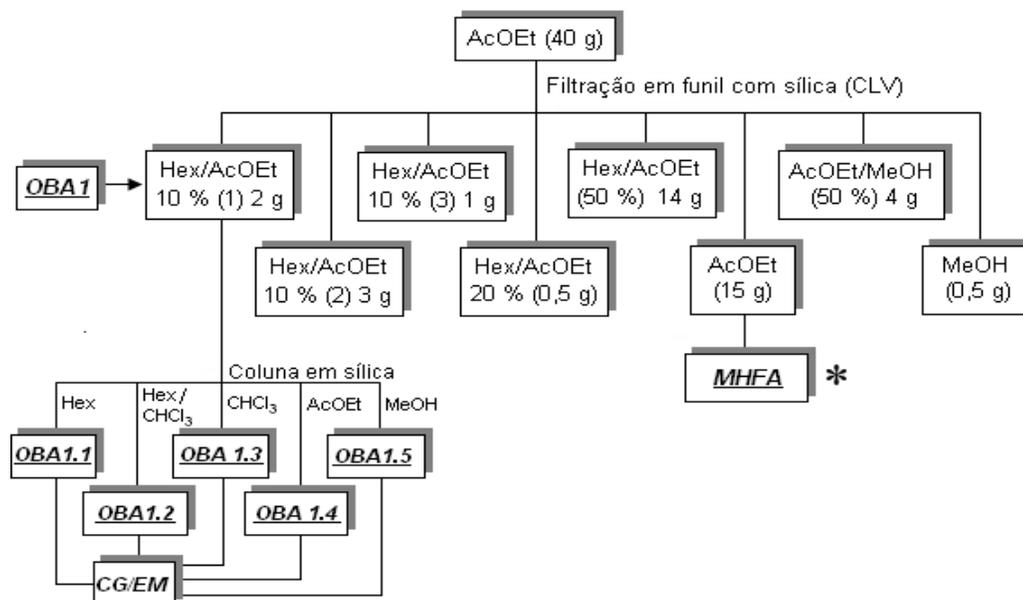
2.3. FRACIONAMENTO EM FASE REVERSA COM CARVÃO ATIVO DO EXTRATO ETANÓLICO DA *M. hirsuta*

Pesou-se 250 g do extrato total e incorporou-se em carvão ativo até que todo o extrato tomasse forma de pó. Após secagem completa (48 h) o material foi colocado em um funil de Buchner forrado com papel de filtro e, uma camada de sílica (3 cm). Cobriu-se o material com outro papel de filtro. Com um funil de adição eluiu-se o material com os solventes segundo um gradiente decrescente de polaridade iniciando-se com EtOH:H₂O (1:1), EtOH, AcOEt, Clorofórmio e Hexano. Após evaporação em aparelho rotatório obteve-se 5 frações: hidroalcoólica 1:1 (130 g), alcoólica (35 g), acetato de etila (40 g), clorofórmio (41 g) e hexano (4 g). De acordo com o Fluxograma 2.1.

Após análise de CCD em sílica gel, a fração eluída com acetato (40 g) foi utilizada para purificação segundo o Fluxograma 2.2 sendo obtidas oito frações. Testes com base na cromatografia em camada de sílica, a fração eluída com acetato de etila (15 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico. Também no Fluxograma 2.2, foi utilizada a fração oleosa eluída com hexano/acetato de etila (2 g) submetida à coluna cromatográfica e analisada em CG/EM.

Fluxograma 2.1. Fracionamento em Fase Reversa em Carvão Ativo do Extrato Etanólico da *M. hirsuta*.



Fluxograma 2.2. Partição da fração em AcOEt da espécie *M. hirsuta* (folhas).

* A fração de 15 g de acetato identificada como **MHFA*** foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica, utilizando como fase móvel hexano (C₆H₁₄), acetato de etila (AcOEt) e misturas destes solventes. Coletou-se um total de 100 frações com um volume médio de 5 mL cada. Essas frações, após análise comparativa através de cromatografia em camada delgada (CCD) e revelação com anisaldeído, sulfato cérico e/ou vapores de iodo, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em sete grupos (Tabela 2.1).

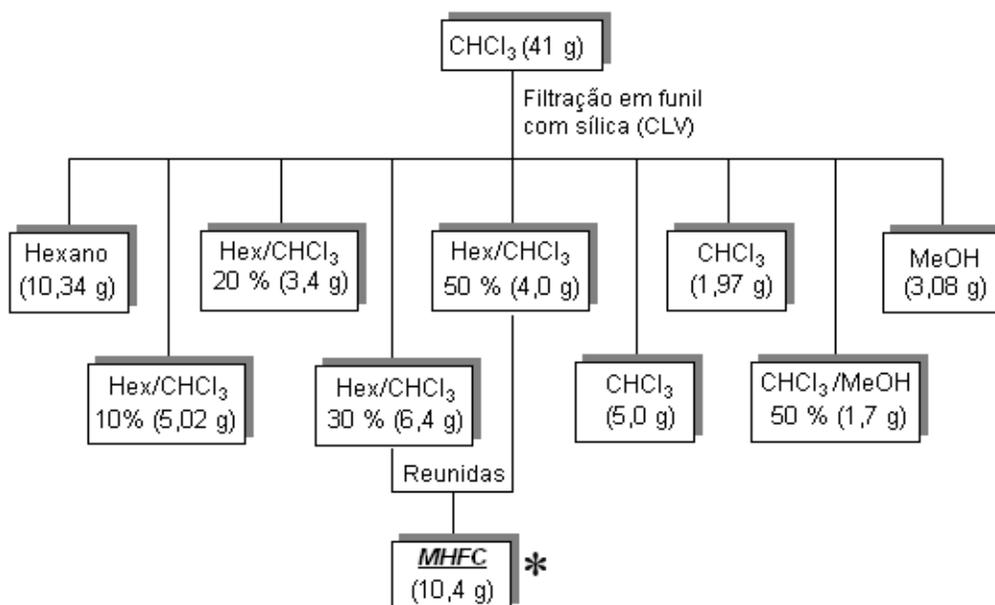
A fração {F-(43 - 60)} (2,05 g) (Tabela 2.1), foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel. Nesta separação foi utilizado 6 g de sílica e os solventes foram C₆H₁₄, C₆H₁₄/CHCl₃ 1:1 e CHCl₃. Este procedimento experimental resultou na obtenção de composto sólido amorfo denominado **MHFA1** (60 mg). A fração {F-(74-100)} (1,04 g) (Tabela 2.1) foi submetida ao procedimento acima descrito, que levou a purificação de um sólido amorfo denominado **MHFA2** (70 mg).

A fração eluída em clorofórmio (41 g) oriunda do extrato grama (Fluxograma 2.2) foi submetida à filtração em sílica gel sendo coletadas nove frações. Após análise em CCD, as frações em hexano/clorofórmio a 30% e 50% foram reunidas em uma única fração (10,4 g), e chamada de **MHFC** (Fluxograma 2.3).

Tabela 2.1. Fracionamento Cromatográfico da Fase MHFA das folhas de *M. hirsuta* D.C.

Grupos	Frações Reunidas	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	1 - 10	C ₆ H ₁₄	1,00 g	-
II	11 - 22	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 1%	5,15 g	-
III	23 - 35	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 2,5%	3,25 g	-
IV	36 - 42	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 5%	1,10 g	-
V	43 - 60	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 10%	2,05 g	MHFA1
VI	61 - 73	C ₆ H ₁₄ /AcOEt 1:1	1,04 g	-
VII	74 - 100	AcOEt 100%	1,40 g	MHFA2

Fluxograma 2.3. Partição da fração em clorofórmio da espécie *M. hirsuta* (folhas)



* A fração **MHFC*** (Fluxograma 2.3) (10,4 g) foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, utilizando como fase móvel hexano (C₆H₁₄), clorofórmio (CHCl₃), metanol (MeOH) e misturas destes solventes. Coletou-se um total de 130 frações com um volume médio de 5 mL cada. Essas frações, após análise comparativa através de CCD e revelação com anisaldeído, sulfato cérico

e/ou vapores de iodo, utilizando-se diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas em doze grupos (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Fracionamento Cromatográfico da Fase MHFC das folhas de *M. hirsuta* D.C.

Grupos	Frações Reunidas	Condições de eluição	Massa	Substâncias Isoladas(g)
I	1 - 20	C ₆ H ₁₄	1,00 g	-
II	21 - 33	C ₆ H ₁₄ /CHCl ₃ 1%	0,50 g	-
III	34 - 45	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 2,5%	1,20 g	-
IV	46 - 60	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 5%	0,80 g	-
V	61 - 69	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 10%	1,00 g	-
VI	70 - 75	C ₆ H ₁₄ / CHCl ₃ 1:1	1,20 g	MHFC1
VII	76 - 84	CHCl ₃ /MeOH 5%	1,00 g	-
VIII	85 - 94	CHCl ₃ /MeOH 10%	0,50 g	-
IX	95 - 100	CHCl ₃ /MeOH 20%	0,70 g	-
X	101 - 112	CHCl ₃ /MeOH 30%	1,30 g	MHFC2
XI	113 - 121	CHCl ₃ /MeOH 50%	0,40 g	-
XII	122 - 130	MeOH	0,80 g	-

A fração {F-(70 - 75)} (1,20 g) (Tabela 2.2), foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel. Nesta separação foi utilizado 3 g de sílica e os solventes foram C₆H₁₄, C₆H₁₄/CHCl₃ 1:1 e CHCl₃. Este procedimento experimental resultou na obtenção de um composto: um sólido cristalino **MHFC1** (80 mg).

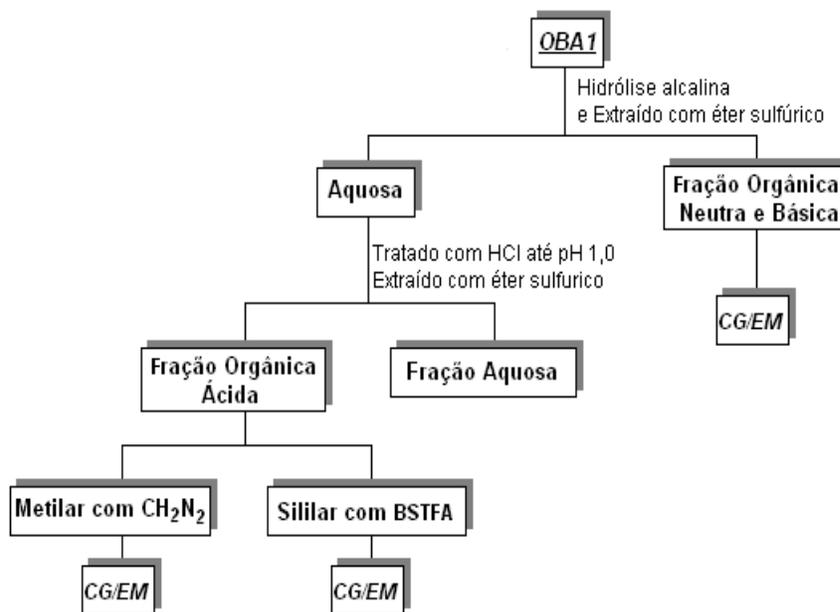
A fração {F-(101 - 112)} (1,30 g) (Tabela 2.2), foi submetida a uma coluna cromatográfica em sílica gel. Nesta separação foi utilizado 3 g de sílica e os solventes foram C₆H₁₄, C₆H₁₄/CHCl₃ 1:1 e CHCl₃. Este procedimento experimental resultou na obtenção de um composto: um sólido cristalino **MHFC2** (60 mg).

2.4. HIDRÓLISE

Colocou-se 10 mg do material (**OBA1**) em 6 balões de fundo redondo de 100 mL dissolvido em 10 mL de etanol. Adicionou-se a esta solução 20 mL da solução a 10% de KOH em etanol. O material foi submetido a refluxo por um período de 2 horas. Após resfriar, o volume da solução foi reduzido à metade e adicionou-se 50 mL de água destilada. A solução foi extraída em um funil com éter etílico (4 x 40 mL). A fração solúvel em éter foi lavada com água e seca com Na₂SO₄ anidro. A solução alcalina foi acidificada com solução aquosa de HCl a 1% até pH ~ 1. Seguiu-

se a extração com éter etílico (4 x 40 mL). A fração orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl e seca com Na₂SO₄ anidro. O material foi dividido em duas frações. Uma para siliilação e outra para metilação seguindo-se análise por CG/EM. As frações oleosas obtidas nos fracionamentos das partes de acetato e clorofórmio foram hidrolisados para que pudessem ser analisados em GC/EM (Fluxograma 2.4).

Fluxograma 2.4. Hidrólise do Óleo Extraído da Fração Acetato



2.5. METILAÇÃO COM DIAZOMETANO

2.5.1. Preparação do Diazometano (CH₂N₂)

O diazometano foi preparado pela mistura de duas soluções. A solução A foi preparada em um balão de fundo redondo de 125 mL pela dissolução de 1,25 g de KOH em 20 mL de água destilada e, posterior adição de 6,25 mL de etanol. A solução B foi preparada pela dissolução de 5,35 g de N-metil-N-nitroso-*p*-tolueno-sulfonamida (**Diazald**) em 50 mL de éter anidro em uma ampola de decantação de 100 mL.

A solução A no balão de fundo redondo foi colocada em banho de óleo sob agitação. A este balão foi conectada uma ampola de adição com a solução B e um condensador reto contendo na saída um balão coletor. Ver-teu-se, através de

gotejamento a solução B sobre a solução A. O diazometano produzido foi recolhido no balão coletor.

2.5.2. Metilação com Diazometano

Cinco miligramas da fração ácida foram solubilizadas com éter sulfúrico seco e adicionado na solução do diazometano recém preparada. A solução resultante foi deixada em repouso por 12 horas e o éter removido por passagem de um fluxo de N₂.

2.6. SILILAÇÃO COM BSTFA

Diluiu-se 1 mg da amostra em 100 µL de diclorometano mais 100 µL de BSTF (N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoracetamida) e aquecido em banho de areia a 70°C por 50 minutos, adiciona-se 100 µL de Hexano e concentrou-se em fluxo de nitrogênio até 100 µL e depois analisou-se em GC-MS.

2.7. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM).

As frações oleosas e os solventes destilados das extrações foram analisadas por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG/EM) em um aparelho Shimadzu (Instituto de Química e Biotecnologia-IQB – UFAL).

As análises por CG/EM foram realizadas em aparelho Shimadzu CG/EM QP5050 (no Depto. Química - UFAL). O **CG** operou com coluna capilar apolar HP-1 (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 µm de espessura do filme), tendo Hélio como gás de arraste (1 mL/min). As amostras foram analisadas com energia de ionização 70 eV, corrente do filamento 220 µA, temperatura da fonte 190 °C e voltagem do multiplicador 2000 V. O CG operou com temperatura programada: SREEB, EBVH e EBVD - 35 °C (10 min), 2 °C/min, 120 °C, 8 °C/min, 310 °C (5 min); OBA1 e suas fações - 40 °C (5 min), 100 °C, 10 °C/min (2 min), 200 °C, 20 °C/min (5 min) e ISOLADOS e HIDROLIZADOS e os óleos extraídos da fração de acetato e clorofórmio - 40 °C (1 min), 10 °C/min, 200 °C, 3 °C/min, 300 °C (20 min). Utilizou-se

a mesma programação de temperaturas descrita acima. O analisador quadrupolo operou na técnica SIM.

As amostras dos sólidos isolados foram injetadas diretamente no CG-EM.

2.8. EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE VOLÁTEIS

Os extratos obtidos por hexano e diclorometano foram preparados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da UFAL utilizando-se de um aparelho de Klavenger (Figura 2.2), usando em cada experimento duas folhas da *M. hirsuta* para a extração dos voláteis por arraste a vapor.



Figura 2.4. Aparelho de klavenger utilizado na extração dos voláteis de *M. hirsuta*.

2.9. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os extratos da *M. hirsuta* utilizada neste trabalho foram submetidos à prospecção fitoquímica, seguindo-se as metodologias descritas na literatura (MATOS, 1997; ESTEVAM, 2006; SILVA, 2006).

2.10. ENSAIOS BIOLÓGICOS

2.10.1. Animais

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

2.10.2. Avaliação da citotoxicidade

Para a determinação da concentração atóxica para células de mamíferos, os extratos e frações foram avaliados em diferentes concentrações (0,1, 0,01 e 0,001 mg/mL e eventualmente a 0,05 e 0,005 mg/mL). Para este ensaio, foram utilizadas células de baço ($6 \cdot 10^5$ /poço) de camundongos isogênicos incubadas na presença das amostras e de timidina tritiada, durante 24 horas. Cada concentração das drogas foi avaliada em triplicata em placa de 96 poços, em estufa úmida a 37 °C, com 5 % de CO₂. A cultura de células de baço foi feita em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) completo (suplementado com soro bovino fetal a 10 % e gentamicina a 50 µg/mL). As drogas foram diluídas em meio de cultura no dia da realização do experimento. A timidina tritiada foi adicionada de forma a obter uma concentração final de 1 µCi por poço.

Para este ensaio, dois controles foram feitos: um controle sem tratamento, no qual se incubou somente células e timidina tritiada, e um controle de células tratadas com saponina (concentração final de 0,05 %), substância com reconhecida atividade citotóxica. Após o período de incubação, as células foram coletadas em um filtro de fibra de vidro, utilizando-se um coletor de células (Filtermate 196, Packard, Meriden,

CT, EUA). Os filtros foram secos à temperatura ambiente durante 24 horas e, posteriormente, lidos em contador de radiação beta (Beta Counter, Packard, Meriden, CT, EUA). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se os valores de radiação incorporados pelas células incubadas na presença dos extratos com os valores do controle não tratado. A concentração dos extratos e frações utilizada para os ensaios posteriores foi a mais elevada que apresentasse uma toxicidade de até 30 %.

2.10.3. Avaliação da atividade anti-*Leishmania amazonensis*

Para este ensaio foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* obtidas de fase estacionária de cultura axênica em meio LIT completo enriquecido com soro bovino fetal a 10 % e gentamicina a uma concentração final de 50 µg/mL. Os parasitos foram incubados na presença dos extratos ou frações vegetais em placa de 96 poços. Foram plaqueados 5×10^6 parasitos/poço em volume final de 200 µl, sendo cada substância avaliada em triplicata.

Dois controles foram preparados: um controle sem tratamento, consistindo da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e em controle de leishmanias tratadas com parasitos em meio de cultura LIT completo, e um controle de leishmanias tratadas com uma droga com atividade leishmanicida conhecida, a anfotericina B a 25 µg/mL. Os parasitos foram incubados na presença das drogas durante 24 horas a 26 °C. Após esse período, adicionou-se o MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-brometodifeniltetrazolio) e incubou-se novamente a 26 °C durante 2 horas, após as quais foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (pectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda 570 nm. A viabilidade dos parasitos foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor de absorbância obtido. Os percentuais de atividade anti-*L.amazonensis* foram definidos comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado.

2.10.4. Avaliação da atividade anti-*T. cruzi*

Formas epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas de cultura axênica em meio de cultura LIT completo. Os parasitos foram plaqueados em placas de 96 poços a 10^7 parasitos/poço, em volume final de 200 μ l. Foram realizados controles sem tratamento, consistindo da cultura dos parasitos em meio de cultura LIT completo, e com tratamento com uma droga com atividade anti-*T. cruzi* conhecida, a anfotericina B a 25 μ g/mL. Os parasitos foram incubados durante 24 horas a 26 °C em presença dos extratos ou frações testados. Após esse período, adicionou-se o MTT e incubou-se novamente a 37 °C durante 3 horas, uma vez que o metabolismo desse sal pelos parasitos demonstrou-se mais intenso nesta temperatura. A leitura foi feita a 570 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices). Os percentuais de atividade anti-*T. cruzi* foram determinados comparando-se os valores das absorbâncias dos poços incubados com as drogas e os valores do controle não tratado.

2.10.5. Avaliação da inibição da produção de óxido nítrico

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos e frações de vegetais quanto à inibição da produção de óxido nítrico, utilizaram-se macrófagos do exsudato peritoneal de camundongos injetados, por via intraperitoneal, com tioglicolato a 3% em salina. A lavagem peritoneal, com meio de cultura DMEM suplementado com 50 μ g/mL de gentamicina, foi feita após um período de 4-5 dias de injeção do tioglicolato. As células do exsudato peritoneal incubadas em placas de cultura de 96 poços (2×10^5 células/poço) por um período de 2 horas, em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, os poços foram lavados com meio DMEM para remoção das células não-aderentes. As células aderentes foram estimuladas com LPS (500 ng/mL) e IFN- γ (5 ng/mL), na presença ou não dos extratos ou frações, em meio DMEM completo. Após 24 horas, 50 μ l do sobrenadante de cada poço foram coletados e transferidos para placas de 96 poços para a avaliação da quantidade de nitrito através do método de Griess (DING et al., 1988).

A reação de Griess foi feita adicionando-se aos 50 μ l do sobrenadante/poço igual volume do reagente do Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloreto naftiletileno diamina – NEED – 0,1% em H₃PO₄ a 0,3 M). A leitura das placas foi feita

imediatamente em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 570 nm. A porcentagem de inibição da produção de óxido nítrico de cada extrato ou fração avaliada foi determinada comparando-se os resultados obtidos com os resultados dos sobrenadantes de culturas de células não tratadas com drogas.

2.10.6. Avaliação da inibição de linfoproliferação

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

As células foram incubadas durante 48 horas em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, adicionou-se timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci/poço}$) e incubou-se novamente as células em estufa sob as mesmas condições, por um período de 12-48 horas. As células foram então coletadas para quantificação da radioatividade beta, conforme descrito através da comparação da incorporação da tiamina em culturas de células estimuladas com Con A somente ou em presença dos extratos e frações.

2.11. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

As análises de RMN foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia e Metabolômica de Plantas, na Universidade de Leiden, em estágio doutoral realizado na Holanda, sob orientação do Professor PhD Robert Verpoort. As análises de 1D-¹H RMN, J-resolvido bem como os experimentos de correlação homonuclear ¹H-¹H e heteronuclear ¹H-¹³C foram realizados a 25 °C em um espectrômetro de RMN modelo Bruker AVANCE II 600MHz (600.13 MHz de frequência do próton) equipado com uma crioprobe TCI e um sistema de gradiente Z. CD₃OD foi usado como padrão interno. Para adquirir os espectros de 1D-¹H RMN, um total de 32768 pontos de dados foram registrados cobrindo a janela espectral de 9615 Hz. 128 varreduras foram aplicadas com uma sequência de um pulso padrão com 30° de ângulo de

nutação para excitação e pressaturação durante 2 sec de relaxação com campo efetivo de $\gamma B_1 = 50\text{Hz}$ para supressão dos sinais de H_2O residual (PRICE, 1999). Uma função de janela exponencial com um fator de alargamento de linha de 0.3Hz foi aplicada primeiramente por transformada de Fourier. Os espectros resultantes foram manualmente calibrados para a fase e a linha de base usando o padrão interno TMSP em 0.0 ppm.

Para a aquisição dos espectros 2D-J-resolvido (AUE *et al.*, 1976), uma matrix de dados de 62 x 16384 cobrindo 50 x 7739.4 Hz foi usada e os espectros foram adquiridos após 16 varreduras para cada incremento em F1. A pressaturação foi aplicada durante a relaxação de 1.5 segundo com um campo efetivo de $\gamma B_1 = 50\text{Hz}$. Os dados também foram calibrados no intervalo 512 x 32768 antes da análise por transformada de Fourier com funções de janela com em forma de sino para ambas as dimensões. Os dados no domínio da frequência resultante foram alinhados para 45° e então simetrizados ao longo da dimensão F2 (F1 = 0Hz) e também calibrados para o padrão interno TSMP. Projeções 1D na dimensão F1 foram extraídas dos espectros 2D-J-resolvidos usando a rotina de projeção interna do programa Topspin (versão 2.1, Bruker Biospin).

Os espectros bidimensionais de correlação homonuclear de hidrogênio ^1H - ^1H (COSY, DEROOME *et al.*, 1990) foram adquiridos com pressaturação ($\gamma B_1 = 50\text{Hz}$) durante uma relaxação de 1.5 segundo. Uma matrix de dados de 1024 x 2048 pontos cobrindo 7739.4 x 7739.4 Hz foi registrada com 8 varreduras para cada increment. Os dados foram preenchidos com zero em 2048 x 2048 pontos antes da transformada de Fourier 2D do tipo "States-TPPI" e uma função de janela na forma de seno foi aplicada em ambas as dimensões. O

Os espectros bidimensionais de correlação heteronuclear (HSQC, KAY *et al.*, 1992) foram registrados para uma matrix de 256 x 2048 pontos cobrindo 30182.7 x 7812.5 Hz com 64 varreduras para cada incremento. A transferência INEPT foi otimizada para o acoplamento heteronuclear de 145 Hz e uma relaxação de 1.5 segundos. Os dados foram linearmente previsto para 512 x 2048 usando 32 coeficientes e então preenchidos com zero em 2048 x 2048 pontos antes da transformada de Fourier 2D do tipo eco-anti eco e uma função de janela na forma de seno deslocada por $\pi/2$ em ambas as dimensões foi aplicada. Projeções 1D ao longo do eixo F1 forma extraídas usando a ferramenta de projeção positiva do programa Topspin (versão 2.1, Bruker Biospin).

Os espectros bidimensionais de correlação heteronuclear para ligações múltiplas (HMBC, BAX *et al.*, 1986) foram adquiridos usando uma matrix de 300 x 2048 pontos cobrindo 33201.9 x 6265.6 Hz após 256 varreduras para cada incremento. Um tempo de relaxação de 1.5 segundos e uma transferência de coerência otimizada para acoplamentos a distância de 8 Hz foi aplicada. Os dados foram linearmente previstos para 600 x 2048 pontos usando 32 coeficientes antes da transformada de Fourier 2D do tipo eco-anti eco e uma função de janela com forma de sino deslocada por $\pi/2$ na dimensão F1 e $\pi/6$ na dimensão F2 foi aplicada. O espectro final foi obtido por cálculo de magnitude na dimensão F2.

2.11.1. Análise dos dados

Os espectros ^1H RMN e *J*-resolvido foram automaticamente reduzidos a arquivos ASCII usando o programa AMIX (v. 3.7, Bruker Biospin). As intensidades espectrais foram escalonadas para o TMS e reduzidas para as regiões integradas de igual largura (0.04 ppm para ^1H e *J*-resolvido projetado, 0.5 ppm para o HSQC projetada) correspondendo as regiões de δ 0.3-10.00. As regiões de δ 4.7-5.0 e δ 3.28-3.34 foram excluídas das análises por causa do sinal de água e $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ residual, respectivamente. As análises de PCA, HCA e PLS-DA foram realizadas usando o programa SIMCA-P (v. 12.0, Umetrics, Umeå, Sweden). Ambos os métodos de escalonamento, Pareto e Unidade de Variância (UV), foram aplicados ao PCA e PLS-DA.

3. Resultados e Discussões

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. TRATAMENTO DA PLANTA

3.1.1. Coleta e extrato da Planta

Inicialmente foi feito um estudo da distribuição da *M. hirsuta* em todo o semi-árido com base nos dados fornecidos pela Universidade Estadual de Feira de Santana, depois foram escolhidas 5 populações desta espécie com base nas variações ambientais existente nesta região, como altitude, relevo, stress hídrico, solo dentre outros que podem vir a influenciar a variação de metabólitos em uma mesma espécie. Esta espécie foi escolhida a priori pelo programa IMSEAR (Instituto do Milênio do Semi-árido criado em 2002 pelo ministério da ciência e tecnologia-Brasil) para estar inclusa dentre as plantas de ocorrência no semi-árido, com o objetivo de fazer a bioprospecção química e farmacológica. Considerando que esta espécie além de fazer parte de uma família muito promissora em relação aos compostos de interesse pela industria farmacêutica foi visto em uma primeira triagem que esta tem um potencial imunomodulador interessante. Esta espécie ainda é desconhecida quimicamente e por isso foi também escolhida para fazermos o estudo metabolômico.

De acordo com informações etnobotânicas e quimiosistemático, a planta foi selecionada para estudo pelo programa IMSEAR. Desta planta foi obtida uma grande quantidade de extrato etanólico, tornando possível testar metodologias diferentes para separação dos constituintes químicos e algumas atividades biológicas. Assim foi possível escolher o método mais satisfatório.

3.1.2. Partição em fase reversa em carvão ativo do extrato etanólico das folhas da *M. hirsuta*

Este particionamento forneceu bons resultados, mostrando características de um extrato pouco complexo, apresentando poucas manchas e com boa separação das substâncias nas placas de CCD. Estas frações foram submetidas à separação por cromatografia em coluna de sílica. Para guiar o trabalho de isolamento,

realizamos os testes de prospecção fitoquímica paralelamente com os resultados dos bioensaios com estas frações.

3.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATO ETANÓLICO DA *M. hirsuta* D.C.

O resultado da prospecção fitoquímica é mostrado na Tabela 3.1. O teste para a detecção de saponinas baseia-se na formação de espuma em forma de anel. Pode ocorrer a formação de espuma por causa da agitação e oxigenação da água, mas este tipo de espuma não é persistente. Ou pode ainda não ter concentração suficiente para formação de emulsão. No nosso caso a espuma formada foi persistente e abundante, indicando a presença de saponinas e heterosídeos em geral no extrato bruto, e nas frações hidroetanólica e etanólica proveniente da partição. Assim, o teste caracterizou estas frações como as mais importantes caso haja um interesse em isolar estes tipos de compostos da *M. hirsuta* D.C..

Os esteróides e triperpenóides foram identificados pela cor esverdeada no extrato bruto e nas frações de acetato de etila, clorofórmica e hexânica, indicando a presença de esteróides. Caso o interesse seja esse tipo de metabólitos sugere-se que comece das frações apolares citadas.

Os resultados também foram positivos para a presença de fenóis e taninos condensados no extrato bruto, nas frações hidroalcoólica, alcoólica e acetato de etila, devido à formação de precipitado verde característico desse tipo de metabólito. Embora não tenha sido possível identificá-los, não se descarta a possibilidade da ocorrência de taninos hidrolisáveis, uma vez que a cor indicativa da presença dos mesmos nos extratos e frações pode ter sido mascarada pelas reações acima.

A presença de flavonóides e suas subclasses podem ser indicadas pela mudança de cor da solução que os contém uma vez que as mesmas dependem do pH do meio. Assim, uma alteração no equilíbrio ácido-base e as mudanças de cor associadas com a mesma levam à identificação de antocianinas, antocianidinas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas. Durante a realização dos testes das classes acima foi detectada alteração de cor no extrato bruto e nas frações hidroalcoólica e alcoólica, com coloração amarelada e avermelhada confirmando a

presença de antocianinas e antocianidinas, além de flavonóides das classes flavonóis, flavononas, flavononóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

Tabela 3.1. Resultados da prospecção feita com Extratos das folhas da *Mansoa hirsuta*.

Extratos Constituintes Químicos	Extratos					
	Extrato Etanólico Bruto	Fração hidro-alcoólica	Fração Alcoólica	Fração Acetato de Etila	Fração Cloro-fórmica	Fração Hexânica
Fenóis e taninos	+	+	+	+	-	-
Esteróides e triterpênos	+	-	-	+	+	+
Saponinas	+	+	+	-	-	-
Alcalóides	-	-	-	-	-	-
Flavonóis, flavanonois, flavanonas e xantonas	+	+	+	-	-	-
Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	+	+	+	+	-	-

Legenda: Positivo = +; Negativo = -.

Obs.: Os resultados tratados como negativo referem-se aos testes que não demonstraram nenhum indício de reação aos métodos propostos.

O reagente de Dragendorff é usado em geral como revelador da presença de alcalóides em extratos vegetais. Nas triagens feitas na família das Bignoniáceas não foram encontrados alcalóides. No presente estudo, os extratos de folha de *M. hirsuta* não reagiram com o reativo de Dragendorff, indicando a ausência de alcalóides nas folhas desta espécie.

3.3. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os extratos de *M. hirsuta* foram submetidos a vários testes para estabelecer seu potencial biológico. Os ensaios para atividades larvicidas, moluscicida e anticolinesterásica não apresentaram resultados significantes.

3.3.1. Atividade citotóxica das frações das folhas de *M. hirsuta*

A avaliação da citotoxicidade foi testada para a escolha das concentrações dos extratos a serem utilizados nos ensaios posteriores como imunomodulação e antiparasitários. As concentrações escolhidas foram aquelas que produziram um nível citotóxico menor que 30%. Foi determinada a concentração de 0,01 mg/mL para as frações H₂O/EtOH 1:1, que não apresentou níveis citotóxicos, CHCl₃ apresentando 29,79%, C₆H₁₄ com nível citotóxico de 3,19% e AcOEt com 18,62%. Este experimento faz-se necessário para racionalizar a pesquisa de fitofármacos, direcionada na busca de compostos naturais mais ativos e menos tóxicos ou com um risco/benefício menor que as drogas disponíveis no mercado farmacêutico atual.

3.3.2. Atividade contra formas promastigotas de *Leshmania amazonensis* pelas frações das folhas de *M. hirsuta*

Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubados na presença ou ausência dos extratos durante 24h. A viabilidade foi mensurada com base no metabolismo da MTT pelas enzimas mitocondriais do parasito, uma vez que esta metodologia oferece rapidez aos ensaios. As formas testadas dos parasitos utilizados nos ensaios foram devido à facilidade de crescimento e obtenção dos mesmos. Alguns extratos apresentavam coloração, fato que pode interferir na absorvância das amostras. A correção foi efetuada analisando-se as placas ao microscópio com confirmação através de contagem, na tentativa de observar a viabilidade dos parasitos e comparar posteriormente com os resultados do método de metabolismo da MTT. Nenhum extrato mostrou efeito significativo sobre as formas promastigotas do parasito, uma vez que os percentuais foram menores que 60%, o que é preconizado pela Fundação Oswaldo Cruz (Bahia) como porcentual ideal mínimo de

atividade para que um extrato ou substância seja considerado um bom candidato a um novo fármaco.

3.3.3. Atividade contra formas epimastigotas do *T. cruzi* pelas frações das folhas de *M. hirsuta*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram incubadas na presença ou ausência dos extratos durante 24h, sendo também tratadas de acordo com o método do MTT previamente descrito. As formas testadas dos parasitos utilizados nos ensaios foram escolhidas pelos mesmos motivos daquelas de *L. amazonensis* e a cor dos extratos também foi corrigida para reduzir as interferências na absorvância. A fração H₂O/EtOH não foi ativa contra o parasito, enquanto as frações EtOH, AcOEt e CHCl₃ apresentaram percentagens de inibição do crescimento do mesmo de 19,89, 16,20 e 12,32%, respectivamente. A partir desses resultados obtidos podemos descartar a possibilidade de haver compostos bioativos nas frações testadas, considerando que as percentagens de inibição do crescimento do parasito foram menores que os 60% preconizados como mínimo aceitável.

3.3.4. Inibição da produção de óxido nítrico pelas frações das folhas de *M. hirsuta*

Macrófagos do exudato peritoneal de camundongos foram estimulados com IFN- γ e LPS na presença ou ausência dos extratos, durante 24h. A produção de óxido nítrico foi estimada através da dosagem de nitrito pelo método de Griss. Os resultados foram obtidos por dosagem de valores do controle estimulado e cultivado na ausência dos extratos e frações.

Uma inibição significativa da produção de óxido nítrico foi causada pela fração acetato de etila (57,92%, 0,01 mg/mL), enquanto as frações H₂O/EtOH, EtOH e CHCl₃ inibiram a produção de NO entre 5-14%. A fração acetato de etila foi então trabalhada no intuito de isolar o composto responsável por tal atividade. Compostos inibidores de NO geralmente tem potencial imunomodulador, e no caso deste trabalho observa-se que a mesma fração de acetato de etila com atividade inibidora deste radical livre, possui também efeito inibidor de linfócitos (COSTA, 2004).

3.3.5. Inibição da linfoproliferação das frações das partições das folhas de *M. hirsuta*.

Células de baço de camundongo foram estimuladas pelo mitógeno concanavalina A na presença ou ausência das frações durante 48h. A inibição da linfoproliferação foi determinada com base nos valores de incorporação de timidina tritiada por células estimuladas e na ausência das frações. No caso específico da linfoproliferação, deve-se considerar que existe uma remota possibilidade de uma ação inespecífica das substâncias presentes nas frações, que podem agir de forma a impedir que a concanavalina A ligue-se às moléculas que levam a estimulação dos linfócitos, e não por um mecanismo direto de inibição da ativação linfocitária.

Para confirmar o efeito supressor, as frações foram submetidas a ensaios de linfoproliferação por estimulação com antígeno e de reações mistas linfocitárias nas quais poderá ser observada a existência ou não da atividade em questão. Os resultados obtidos foram 65, 39,71, 8,74, 48,05 e 99,92% para o extrato bruto e as frações H₂O/EtOH, EtOH, CHCl₃ e AcOEt, respectivamente, sendo este último o resultado mais significativo e promissor. No presente estudo, a fração AcOEt foi mais ativa que o extrato bruto, o que pode ser explicado pelos efeitos antagônicos das diferentes substâncias presentes no mesmo, que uma vez separadas, mostraram maior potencial imunomodulador. Substâncias imunossupressoras podem ser utilizadas em transplantes e doenças auto-imunes, que são patologias que nos dias de hoje não existem nenhum tipo de cura, apenas paliativos. Por isso esta foi uma das frações que foram trabalhadas, a fim de isolar o composto responsável por esta atividade.

3.3.6. Atividades biológicas da fração acetato

Uma vez que a fração acetato exibiu o maior percentual de inibição de linfoproliferação, a mesma foi reparticionada em coluna de sílica gel de onde foi obtida uma subfração apolar oleosa, que de acordo com Rocha *et al.* (2004) apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium*. Sendo assim, esta subfração foi submetida aos testes biológicos mencionados anteriormente e não mostrou efeito significativo sobre as formas *in vitro* dos

parasitas *L. amazonensis* (3,38%) e *T. cruzi* e sobre a inibição da produção do radical NO (14,18%). A mesma também não apresentou atividade de inibição da linfoproliferação causada pela concanavalina A, indicando que ela não contribui para este efeito previamente observado na fração acetato.

Duas substâncias, codificadas como MHFA1 e MHFA2, também foram isoladas da fração acetato e foram identificadas posteriormente como sendo os triterpenos pentacíclicos ácido oleanólico e ácido ursólico. Estes triterpenos apresentaram potencial imodussupressor uma vez que eles reduziram tanto a linfoproliferação como a produção de NO, como pode ser visto na Tabela 3.2. Não foi possível calcular os valores de LC50 para ambos os ácidos isolados a partir dos resultados obtidos, o que indica que os valores de LC50 são superiores a 100 µg/mL, a maior concentração testada, o que está de acordo com o trabalho de Costa *et al.* (2008).

Tabela 3.2. Atividades biológicas dos triterpenos pentacíclicos isolados da fração acetato de folhas de *M. hirsuta*.

Substância	Citotoxicidade (%)	IC50 Linfoproliferação (µg/mL)	Inibição da linfoproliferação (%)	Inibição do NO (%)
Ácido oleanólico	70,8	8,51	99,35	41,5
Ácido ursólico	69,9	2,80	99,17	44,1

3.3.7. Atividades biológicas de MHFC1

A fração CHCl₃ também apresentou atividade imunomoduladora, embora inferior à fração AcOEt, e por isso também foi reparticionada em coluna de sílica gel o que levou ao isolamento de uma substância codificada MHFC1, que foi revelada como sendo uma mistura dos esteróides estigmasterol e β-sitosterol após análise por RMN. Esta mistura somente apresentou atividade inibitória da produção de NO (28,02%), a qual foi superior ao observado para fração antes do reparticionamento, o que pode novamente ser explicado pelos efeitos antagônicos das diferentes moléculas presentes na fração.

3.4. CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS

3.4.1. Análise dos voláteis

A análise por GC-MS dos voláteis obtidos das folhas de *M. hirsuta* por Clavenger usando hexano como solvente de extração mostrou a presença de uma série homologa de *n*-alcanos e suas olefinas correspondentes. A comparação dos dados espectrais com aqueles da biblioteca Wiley do aparelho indicou que estes alcanos tinham alto peso molecular e pertenciam às famílias *n*-C21, *n*-C22, *n*-C23, *n*-C25, *n*-C27 e *n*-C29 com tempos de retenção de 68,0, 69,2, 70,1, 72,2, 74,3 e 76,0 minutos e abundâncias de 4,6, 1,6, 29,3, 6,2, 5,3 e 4,9%, respectivamente, com as olefinas homologas, predominantemente ímpares, na mesma faixa. As olefinas foram identificadas pela presença de picos com diferença de 2 *m/z* quando comparados com o *n*-alcano correspondente, o que é característico da presença de uma ligação dupla na molécula (SILVERSTEIN & WEBSTER, 1997).

A análise dos voláteis obtidos com diclorometano revelou a presença de três compostos principais com tempos de retenção de 36,7, 51,6 e 64,3 minutos e abundâncias de 36,2, 29,6 e 5,3%, respectivamente, que não estavam na mesma série homologa. Novamente, a comparação com a biblioteca Wiley permitiu a identificação destes picos como sendo o 2-metil-3-heptanol, isobutirato isobutílica e 3-hexadecanol. Séries de alcoóis secundários e terciários, tais como 4-metil-2-pentanol e 4-metil-3-hexanol, foram previamente identificadas nas folhas de *M. hirsuta* por CG-MS em diclorometano e outros solventes apolares (ROCHA *et al.*, 2004).

3.4.2. Análise da subfração oleosa obtida da fração acetato de etila

O reparticionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna de sílica gel levou a obtenção de duas subfrações, sendo uma delas em hexane:acetato de etila 10% e a outra uma subfração oleosa codificada como OBA1.

A análise de OBA1 por CG-MS revelou a presença de quatro compostos principais, como mostrado na Figura 3.1. Três destes compostos foram identificados

como ésteres de ácidos graxos, que foram caracterizados pela perda de um fragmento m/z 88 $[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3]^+$ resultante da clivagem da carbonila α - β . O fragmentograma 3.1B sugere que o pico 1 do cromatograma 3.1A é o éster etílico do ácido hexadecanóico (ácido palmítico, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$) com tempo de retenção de 18,8 minutos e abundância de 35,1% e M^+ 284. O pico 2 (Figura 3.1A e 3.1C) foi caracterizado como o éster etílico do ácido octadecanóico (ácido esteárico, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$) com um tempo de retenção de 20,8 minutos e abundância de 30% e M^+ 312. Os picos 3 e 4 mostraram tempos de retenção de 20,3 e 20,5 minutos, respectivamente, e foram caracterizados como os ésteres etílicos dos ácidos 9,12-octadecadienóico (ácido linoléico, Figura 3.1A e 3.1D) e 9,12,15-octadecatrienóico (ácido linolênico, Figure 3.1A e 3.1E) com M^+ de 308 e 306, respectivamente. Ambos os ácidos apresentaram abundâncias de 28,5%.

A cromatografia em coluna de sílica gel de OBA₁ produziu cinco subfrações codificadas OBA1.1, OBA1.2, OBA1.3, OBA1.4 and OBA1.5. A subfração OBA1.1, resultante da extração com hexano, continha todos os compostos do óleo bruto, enquanto as outras subfrações não produziram picos na análise por CG-MS.

A hidrólise com hidróxido de potássio de OBA1 resultou na mistura dos ácidos graxos mencionados acima na forma livre. A presença de ácido graxos foi também confirmada quando a solução resultante da metilação foi analisada, uma vez que os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos correspondentes, que foram caracterizados pela perda do fragmento m/z 74 $[\text{CH}_3\text{COOCH}_3]^+$. Assim, o éster metílico do ácido 9-octadecenoico (ácido oléico), que não foi previamente detectado no óleo bruto ou na subfração OBA1.1, foi agora observado.

Quando a fração ácida foi sililada com BSTFA, ésteres trimetilsililanos dos ácidos palmítico, esteárico, linolênico, linoléico e palmitoléico foram identificados. Este último ácido também não foi previamente detectado em qualquer das frações analisadas. Todos os derivados sililados foram caracterizados pela presença do fragmento m/z 73 referente ao grupo trimetilsilil.

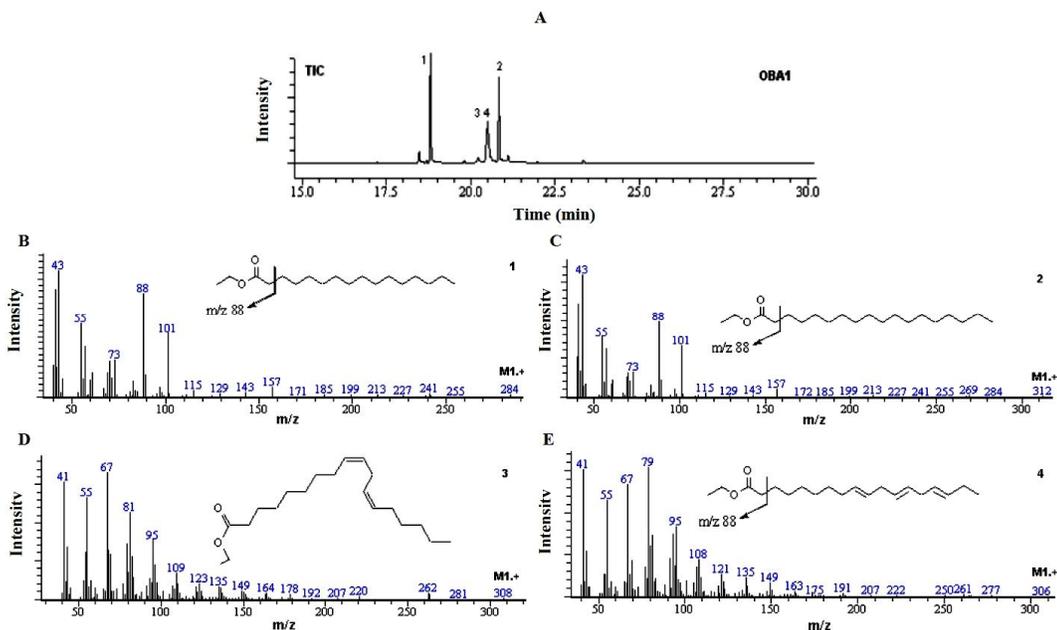


Figura 3.1. Cromatogramas da subfração oleosa obtida da fração acetato de etila (A) e fragmentogramas dos ésteres etílicos dos ácidos palmítico (B), esteárico (C), linoléico (D) e α -linolênico (E).

3.4.3. Análise do etanol recuperado do extrato bruto

Dois sulfetos com diferentes tempos de retenção foram detectados quando o etanol recuperado da preparação do extrato etanólico bruto foi analisado por CG-MS, como mostrado na Figura 3.2. Estes compostos foram identificados como dissulfeto de dialila (pico 1, tempo de retenção de 6,8 minutos, abundância de 27%, M^{+} 146, $C_6H_{10}S_2$) e o trissulfeto de dialila (pico 2, tempo de retenção de 11,2 minutos, abundância de 51,1%, M^{+} 178, $C_6H_{10}S_3$). A Figura 3.3 propõe um mecanismo de fragmentação para estes dois sulfetos.

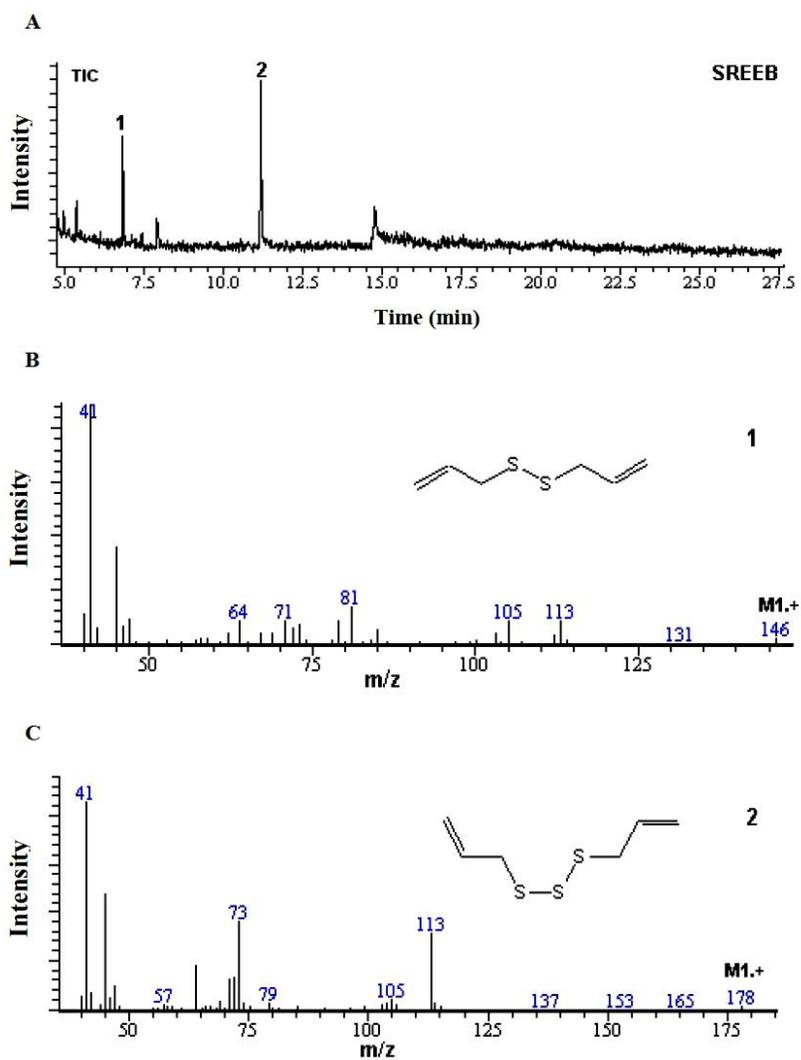


Figura 3.2. Cromatograma do extrato etanólico bruto (A) e fragmentogramas dos dissulfetos dialila (B) e trissulfeto dialila (C).

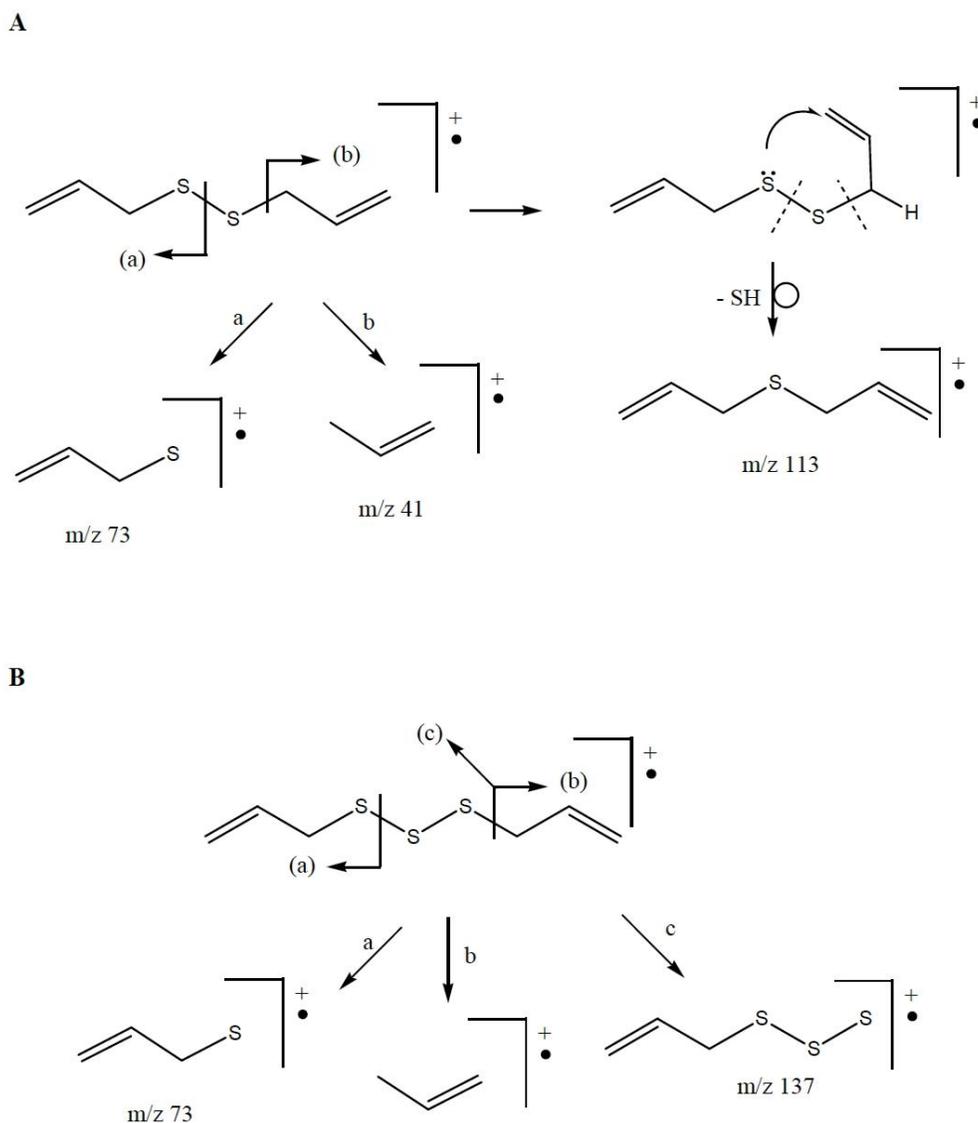
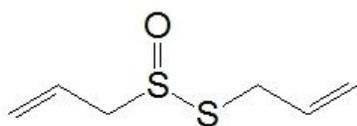


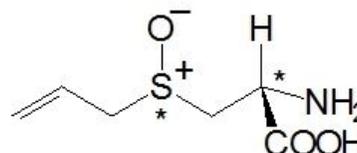
Figura 3.3. Mecanismo de fragmentação proposto para o dissulfeto de dialila (A) e trissulfeto de dialila (B).

O alho e a cebola são popularmente usados no Brasil como condimentos, mas vários estudos foram realizados com vistas a estabelecer o potencial terapêutico dessas plantas (TSAO *et al.*, 2003). Estes estudos atribuíram as muitas atividades biológicas destas plantas à presença de compostos sulfurados na sua composição química, principalmente entre os voláteis (TSAO *et al.*, 2003; CUTLER & WILSON, 2004). A molécula básica do aroma destas plantas é a alicina (**13**), um dissulfeto oxigenado. De acordo com CUTLER & WILSON (2004), a alicina é o

principal agente antimicrobiano do alho e é o precursor da alina (**14**), cuja reação é catalisada pela enzima alinase quando os dentes de alho são esmagados. Os autores testaram duas formulas em creme contendo alicina, que se mostraram mais efetivas no tratamento de infecções causadas por uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilciclina do que a mupirocina, que é a droga de escolha para o tratamento destas infecções.



13



14

Os sulfetos de dialila isolados do extrato etanólico bruto de *M. hirsuta* são derivados desoxigenados da alicina, que apresentaram atividade antitumoral (MANIVASAGAM *et al.*, 2005) e mostraram atividade contra a levedura *Candida albicans* (TSAO e YIN, 2001), além de serem usados no controle de *Sclerotium cepivorum*, um parasita da cultura de alho (TYSON *et al.*, 2000). Assim, estes dois compostos, que dão o cheiro característico do alho e são responsáveis pelos efeitos biológicos atribuídos ao óleo extraído do alho, justificam o nome popular da *M. hirsuta* conhecida como cipó d'alho ou alho bravo por ter aroma semelhante (BLOCK, 1996).

3.5. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

3.5.1. MHFA1

A substância codificada de **MHFA1** apresentou-se como um sólido branco amorfo, de ponto de fusão 291-292 °C (CHCl₃/MeOH).

- Infra Vermelho (IV)

A carbonila carboxílica e o grupo hidroxila da substância codificada como MHFA1, foram confirmados por espectro do composto na região do infravermelho (IV) (Figuras 3.4), o qual revelou bandas de absorção de estiramento e deformação sugerido grupo hidroxílico ($3442,69\text{ cm}^{-1}$) e carbonila ($1692,82\text{ cm}^{-1}$) (MAHATO & KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

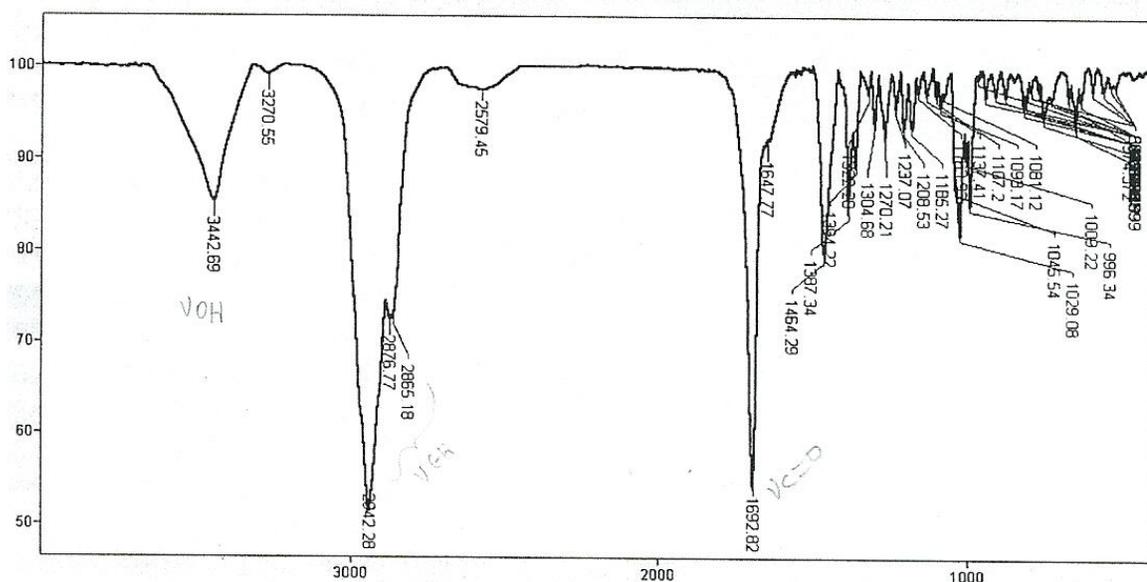
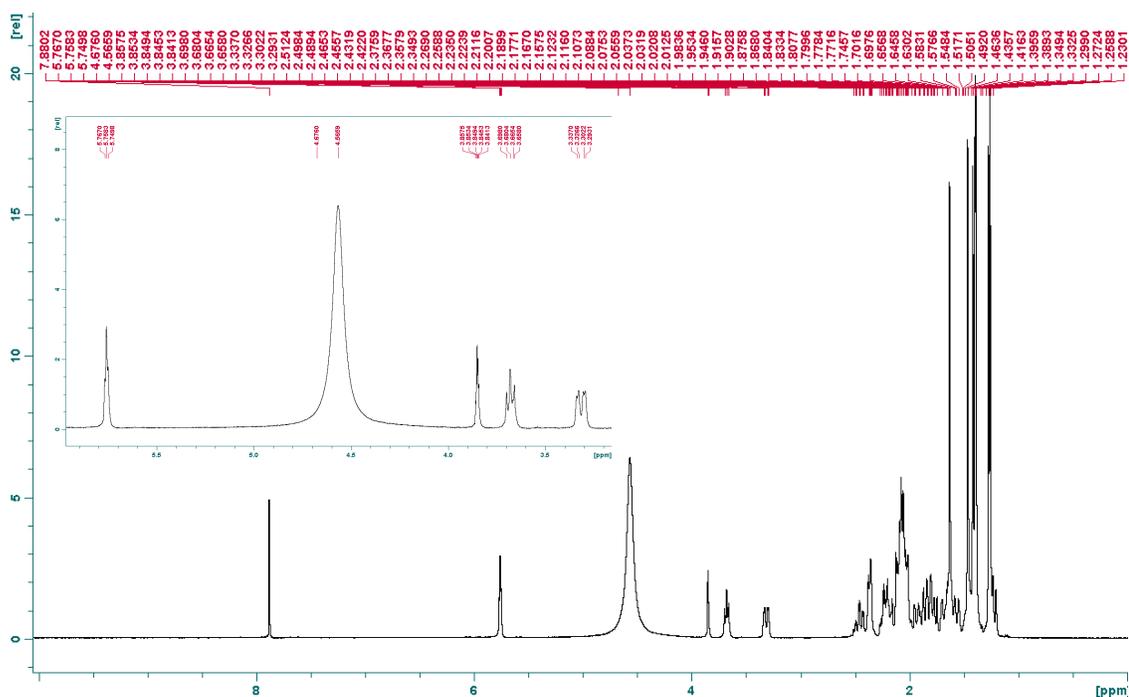


Figura 3.4. Espectro da Substância MHFA1 na Região do Infravermelho.

- RMN 1D

A análise do espectro de RMN ^1H da substância codificada como MHFA1, de cor branca (Figura 3.5), mostrou 7 sinais na região mais blindada entre δ 1,26 e 1,63; todos simpletos (s) (δ 1,46; δ 1,26; δ 1,40; δ 1,27; δ 1,63; δ 1,39; δ 1,42) referentes aos prótons de grupos metilas ligados a carbonos não hydrogenados (Figura 3.5); um sinal em δ 3,67 na forma de um duplo duplete (dd) com constante de acoplamento (J) ($J=7,20\text{ Hz}$ e $J=13,20\text{ Hz}$) relativo ao hidrogênio carbinólico que está orientado em estereoquímica β e acoplado com os hidrogênios δ 1,42 e δ 2,07; um sinal em δ 5,76 tripleto (t) com $J=3,60\text{ Hz}$, relativo ao hidrogênio olefínico acoplado com os hidrogênios δ 1,42 e δ 2,36 (Figura 36) (ARAÚJO & CHAVES,

2005). Neste espectro foram identificados, com o auxílio do HSQC e do COSY, 21 sinais na forma de multipletos (m), sendo 20 deles relativos aos prótons de grupos metilenos H (δ 1,46; 2,11), H (δ 1,42; 2,07), H (δ 1,87; 2,02), H (δ 1,80; 1,95), H (δ 1,42; 2,36), H (δ 2,09; 2,45), H (δ 1,57; 2,20), H (δ 1,63; 2,12), H (δ 1,69; 1,83), H (δ 2,04; 2,22) e um sinal relativo ao próton de grupo metínico H (δ 2,05). Foram identificados ainda um sinal relativo ao hidrogênio H (δ 1,23; $J=10,60$ Hz) na forma de um duplete (d), e um sinal relativo ao hidrogênio H (δ 3,33; $J=4,16$ Hz e $J=3,64$ Hz) na forma de um duplo duplete (dd), sendo estes sinais referentes a prótons de grupos metínicos. Todos os deslocamentos químicos dos sinais do espectro de ^1H encontram-se na Tabela 3.3.



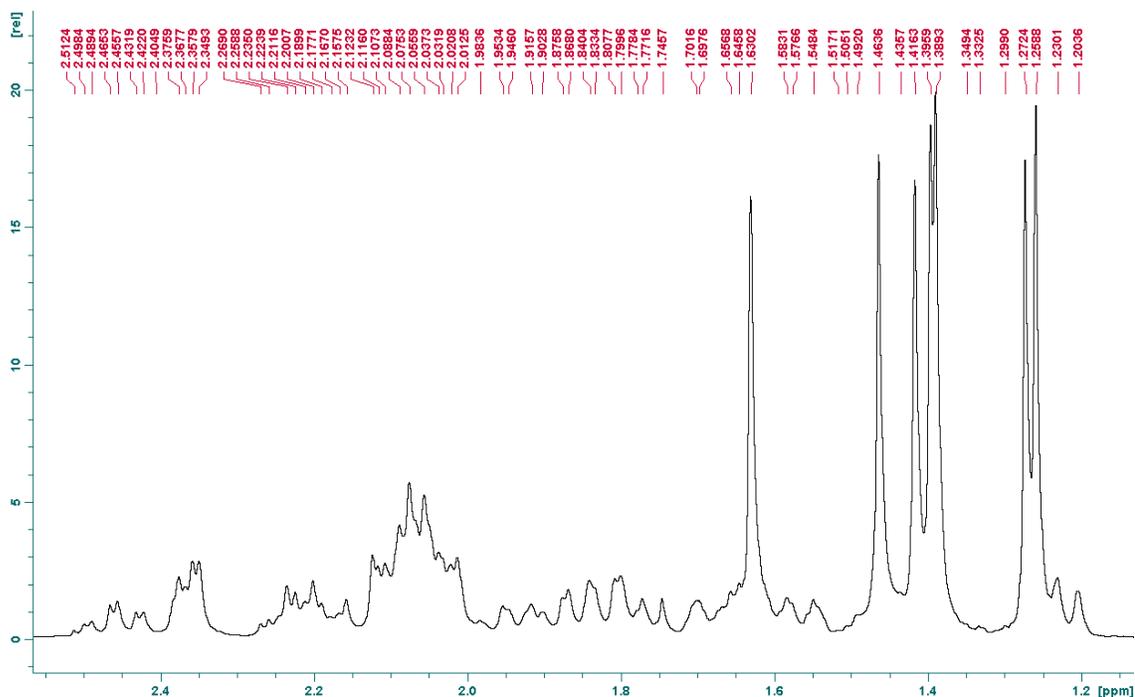


Figura 3.6. Expansão do Espectro de RMN H^1 de MHFA1, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3:1

A análise dos espectros de ^{13}C (Figuras 3.7 e 3.8), DEPT 90 (Figuras 3.9) e DEPT 135° (Figuras 3.10 e 3.11) da substância MHFA1 conferiram uma indicação de esqueleto oleanânico mostrando a presença de 30 átomos de carbonos: sendo 7 grupos metila (CH_3) e 10 grupos metilenos (CH_2), segundo o DEPT de 135°, 5 grupos metínicos (CH), conforme o DEPT de 90° e 8 carbonos não hidrogenados (C), sendo um deles um grupo carbonila, segundo o espectro C^{13} por diferença com os DEPTs de 90° e 135° (SILVA, 2006; SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

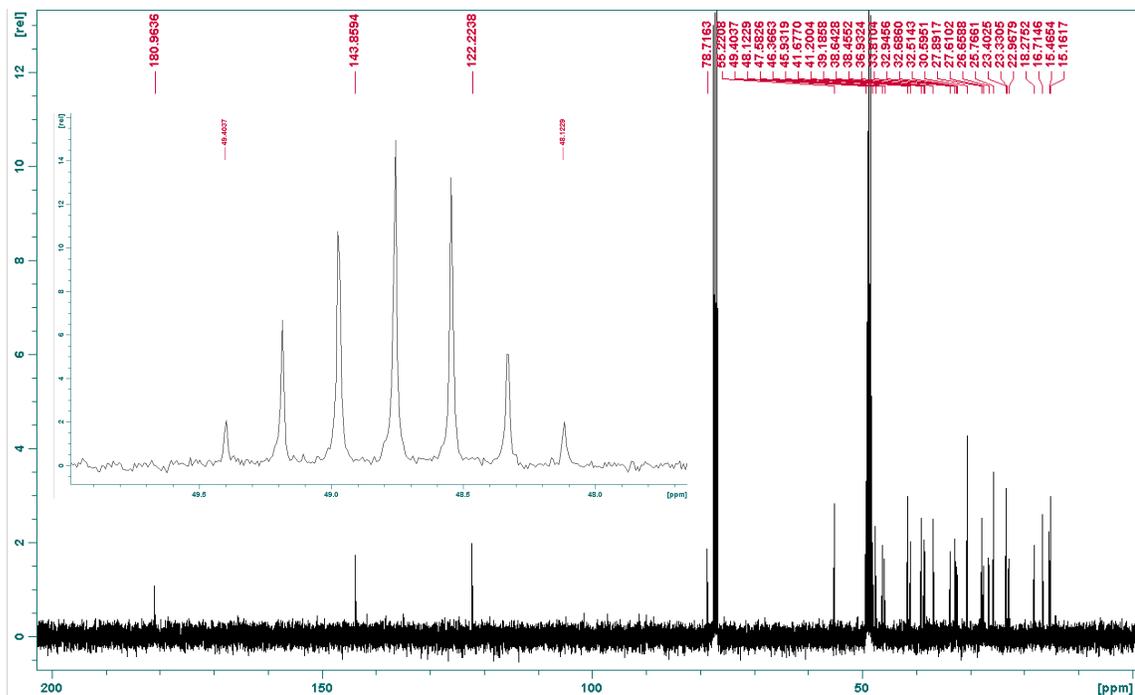


Figura 3.7. Espectro de RMN C^{13} de MHFA1 com Expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1

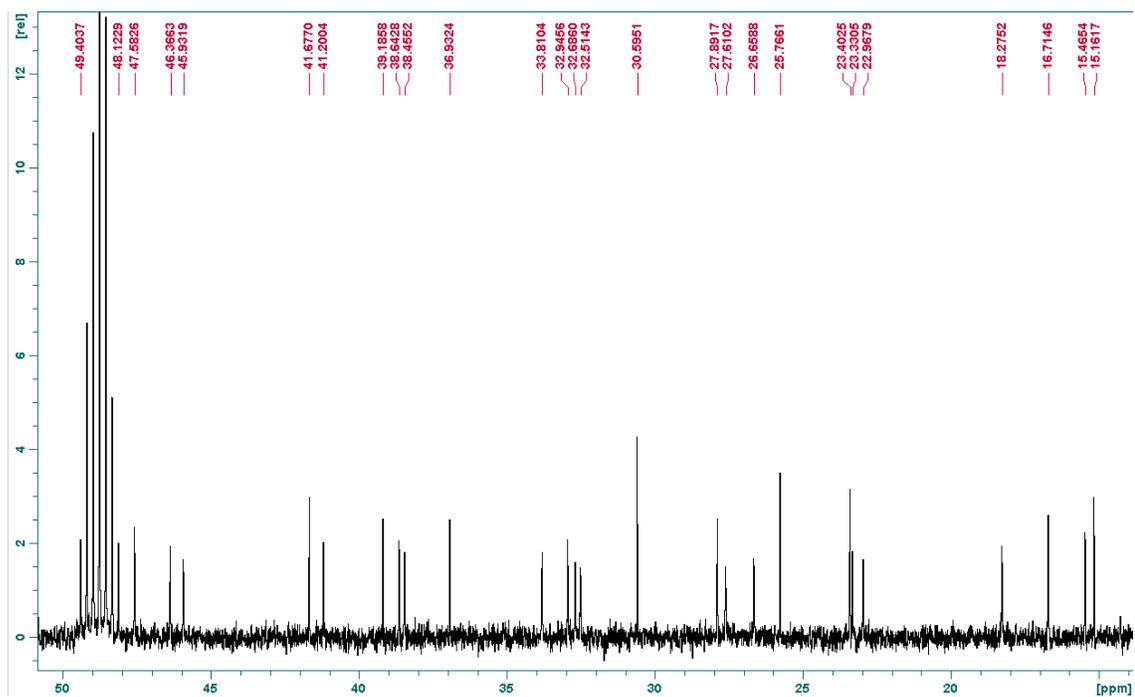


Figura 3.8. Expansão do Espectro de RMN C^{13} de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1

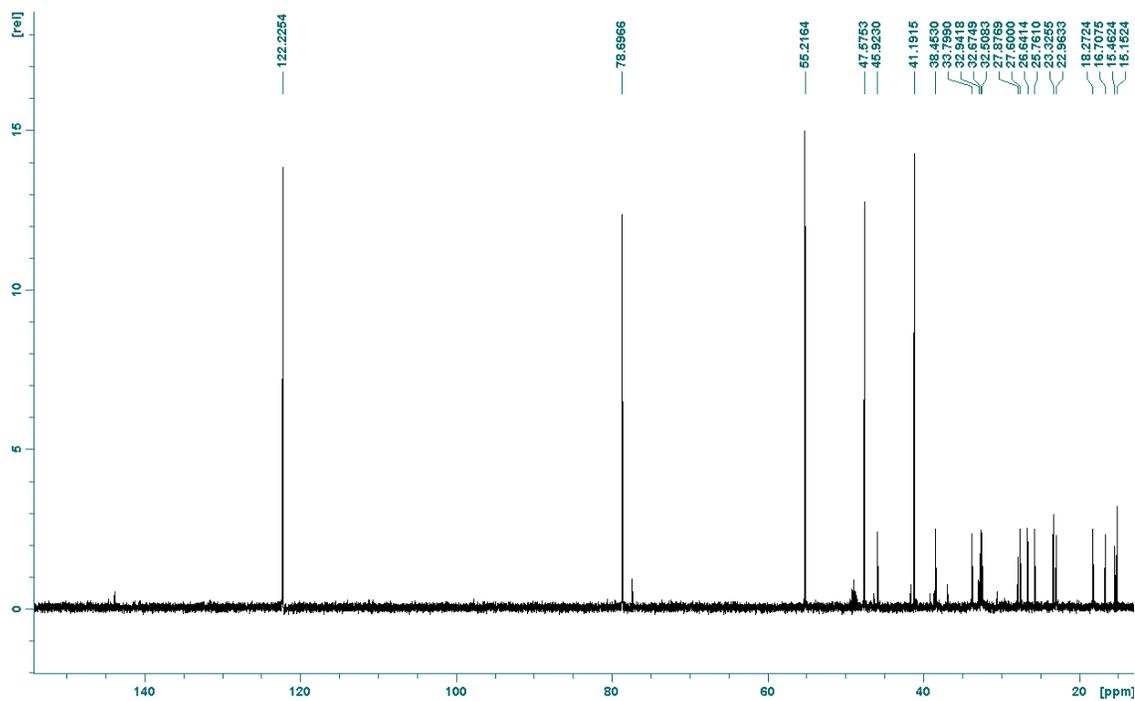


Figura 3.9. Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1

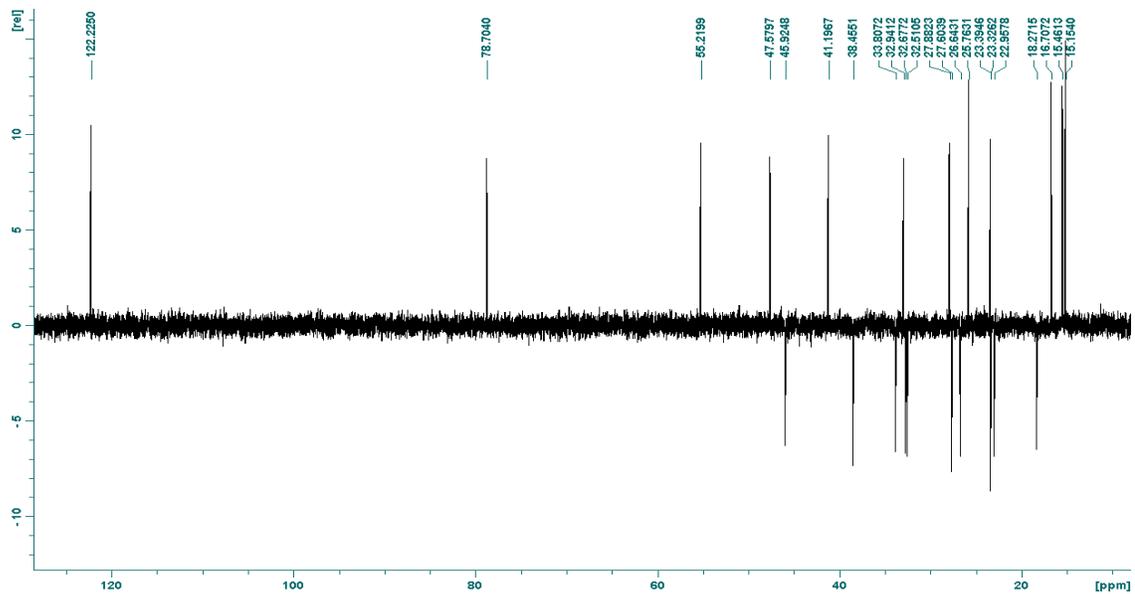


Figura 3.10. Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1

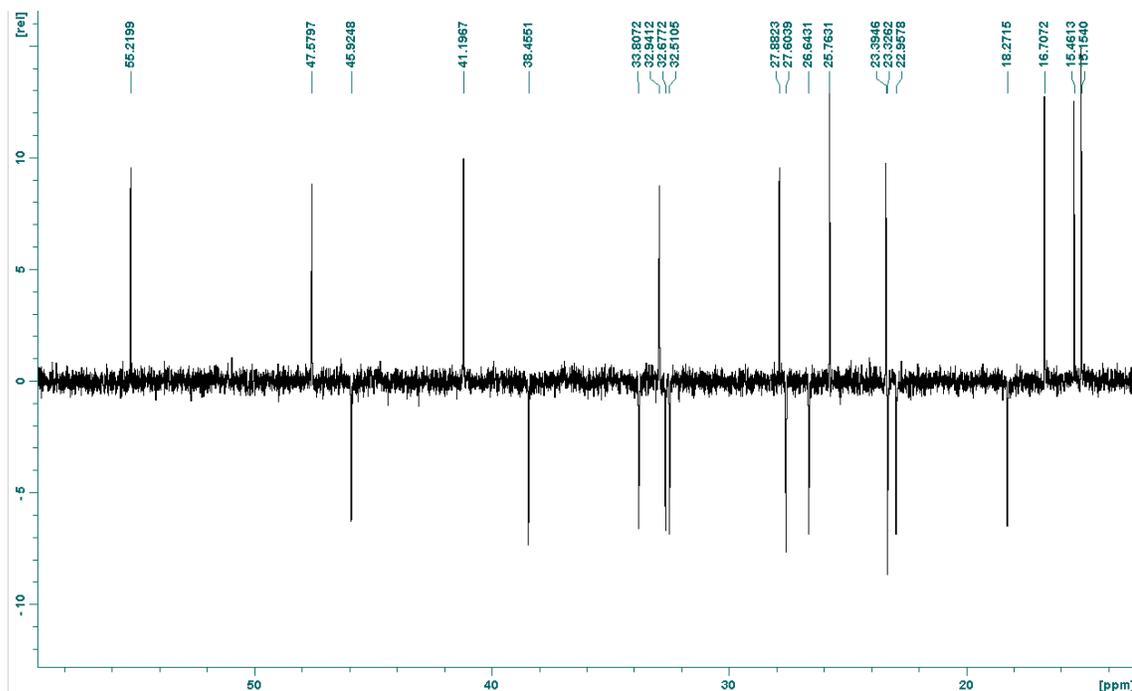


Figura 3.11. Expansão do Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.7) mostra também a presença do carbono carbinólico com deslocamento químico em δ 78,72 e ainda os deslocamentos químicos dos carbonos da ligação dupla C (δ 122,22) e C (δ 143,86), carbonos vinílicos, ligação esta característica dos esqueletos ursânico e oleanânico (JUNGES *et al.*, 1999; MAHATO & KUNDU, 1994).

A MHFA1 apresenta o carbono da carbonila carboxílica com deslocamento químico em δ 180,96. A análise completa dos deslocamentos químicos do RMN ^{13}C encontra-se na Tabela 3.3.

- Determinação estrutural da substância codificada como MHFA1, usando espectros de RMN bidimensionais.

Para fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas unidimensionais e dados de possíveis compostos similares da literatura, foram utilizados as técnicas bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), que permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$; $^nJ_{\text{C,H}}$) ou espacial (H,H- ou H,C –NOE) entre si (KAISER, 2000).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C demonstraram a natureza dos prótons e dos C-13. Os espectros de ^{13}C e DEPTs de 90° e 135° possibilitaram a proposta de numeração dos sinais dos carbonos (Tabela 3.3). Já a proposta de numeração dos sinais dos prótons foi feita via HSQC (Figura 3.12 e 3.13), que mostrou a correlação direta destes com os seus respectivos carbonos (Tabela 3.3, p. 84).

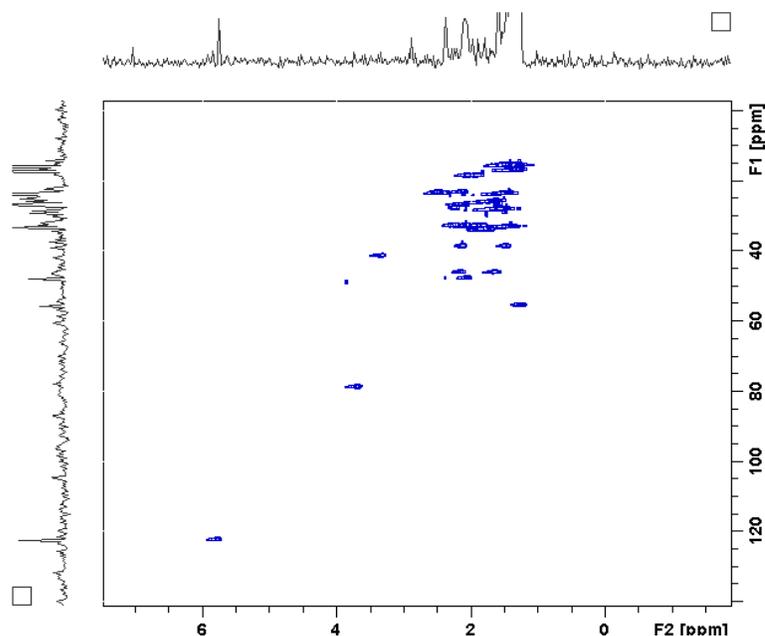


Figura 3.12. Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

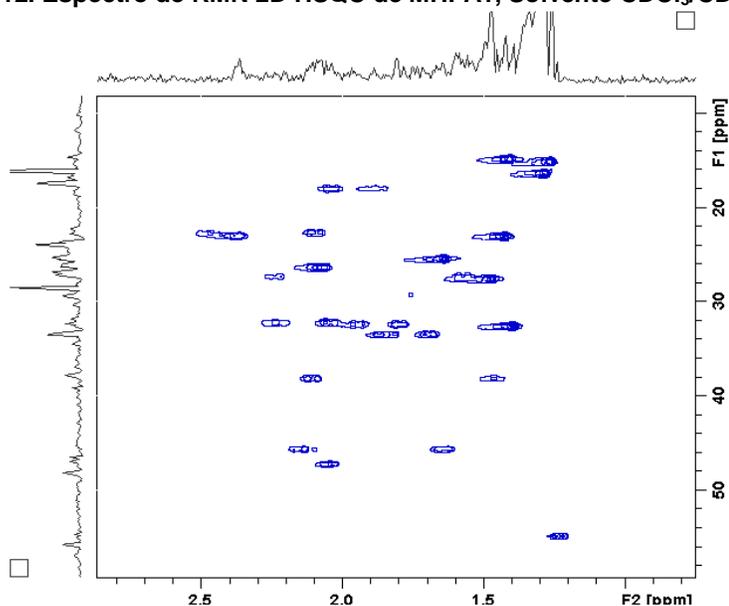


Figura 3.13. Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

Através do espectro de HSQC observou-se as correlações do hidrogênio carbinólico (δ 3,67) com o carbono δ 78,72; do hidrogênio vinílico (δ 5,76) com o carbono δ 122,22 e dos hidrogênios metílicos (δ 1,26; 1,27; 1,39; 1,40; 1,42; 1,46; 1,63) com os seus respectivos carbonos (δ 15,46; 16,71; 32,95; 15,16; 23,40; 27,89; 25,77). As outras correlações estão descritas na Tabela 3.3.

O espectro de RMN de COSY (Figuras 3.14 a 3.17) mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por ${}^{2-3}J_{H,H}$ (acoplamentos germinais e vicinais) e ainda por ${}^{4-6}J_{H,H}$, permitindo assim a montagem de microfragmentos da estrutura.

Acoplamentos geminais: H_{1A} (δ 1,46) e H_{1B} (δ 2,11), H_{2A} (δ 1,42) e H_{2B} (δ 2,07), H_{7A} (δ 1,80) e H_{7B} (δ 1,95), H_{15A} (δ 2,09) e H_{15B} (δ 2,45), H_{16A} (δ 1,57) e H_{16B} (δ 2,20), H_{19A} (δ 1,63) e H_{19B} (δ 2,12), H_{21A} (δ 1,69) e H_{21B} (δ 1,83), H_{22A} (δ 2,04) e H_{22B} (δ 2,22).

Acoplamentos vicinais: H_{1A} (δ 1,46) e H_{2B} (δ 2,07), H_{2B} (δ 2,07) e H₃ (δ 3,67), H_{2A} (δ 1,42) e H₃ (δ 3,67), H₅ (δ 1,23) e H_{6A} (δ 1,87), H₅ (δ 1,23) e H_{6B} (δ 2,02), H_{6B} (δ 2,02) e H_{7A} (δ 1,80), H_{6B} (δ 2,02) e H_{7B} (δ 1,95), H₉ (δ 2,05) e H_{11A} (δ 1,42), H₉ (δ 2,05) e H_{11B} (δ 2,36), H_{11A} (δ 1,42) e H₁₂ (δ 5,76), H_{11B} (δ 2,36) e H₁₂ (δ 5,76), H_{15B} (δ 2,45) e H_{16A} (δ 1,57), H_{15B} (δ 2,45) e H_{16B} (δ 2,20), H₁₈ (δ 3,33) e H_{19A} (δ 1,63), H₁₈ (δ 3,33) e H_{19B} (δ 2,12), H_{21A} (δ 1,69) e H_{22A} (δ 2,04), H_{21A} (δ 1,69) e H_{22B} (δ 2,22), H_{21B} (δ 1,83) e H_{22A} (δ 2,04), H_{21B} (δ 1,83) e H_{22B} (δ 2,22).

Hidrogênios acoplados por ${}^{4-6}J_{H,H}$: H₂₃ (δ 1,46) e H₂₄ (δ 1,26), H₁₂ (δ 5,76) e H₁₈ (δ 3,33), H_{22B} (δ 2,22) e H_{16A} (δ 1,57)

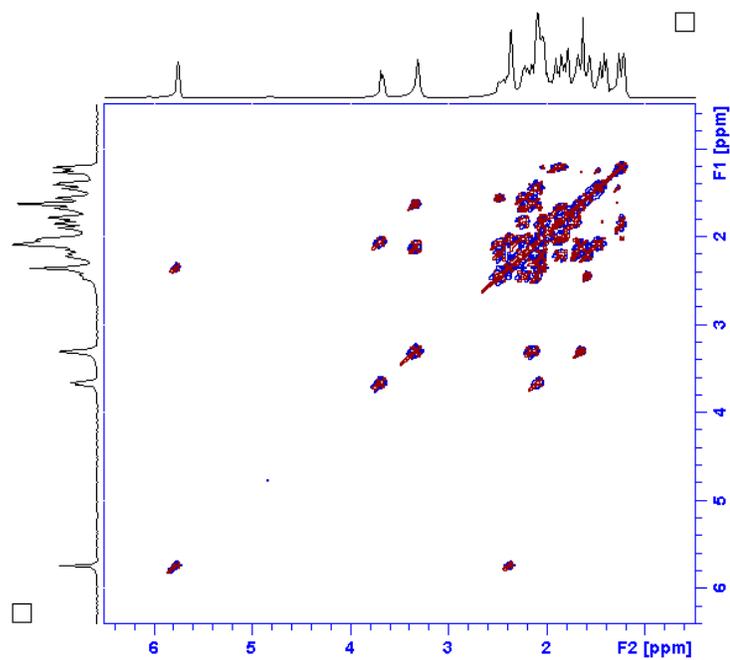


Figura 3.14 Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

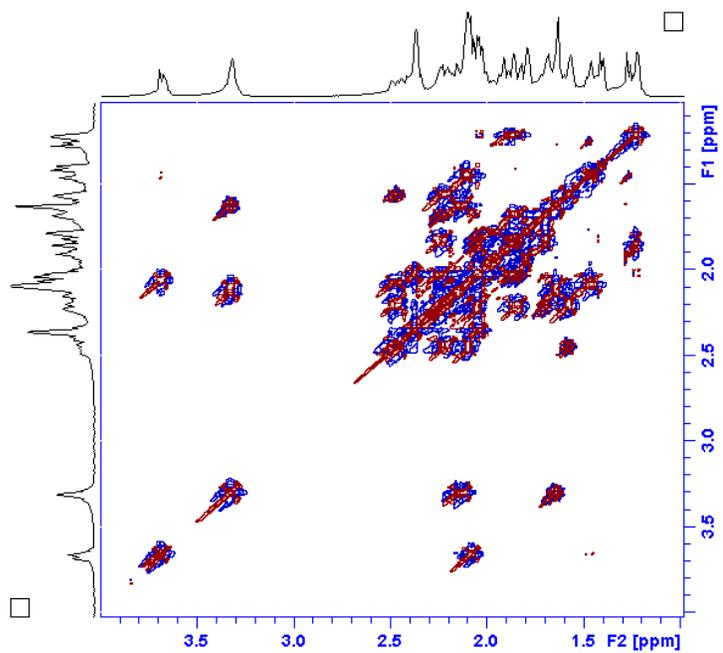


Figura 3.15. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

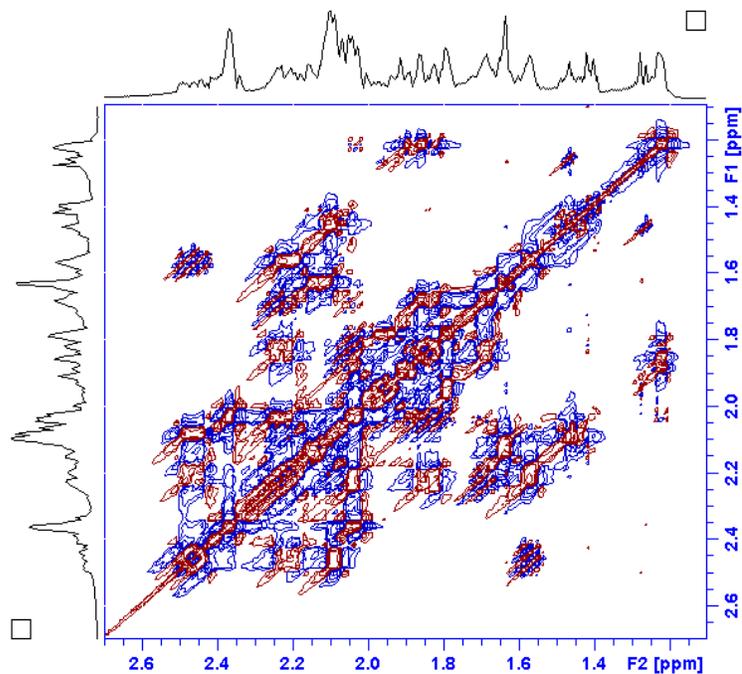


Figura 3.16. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

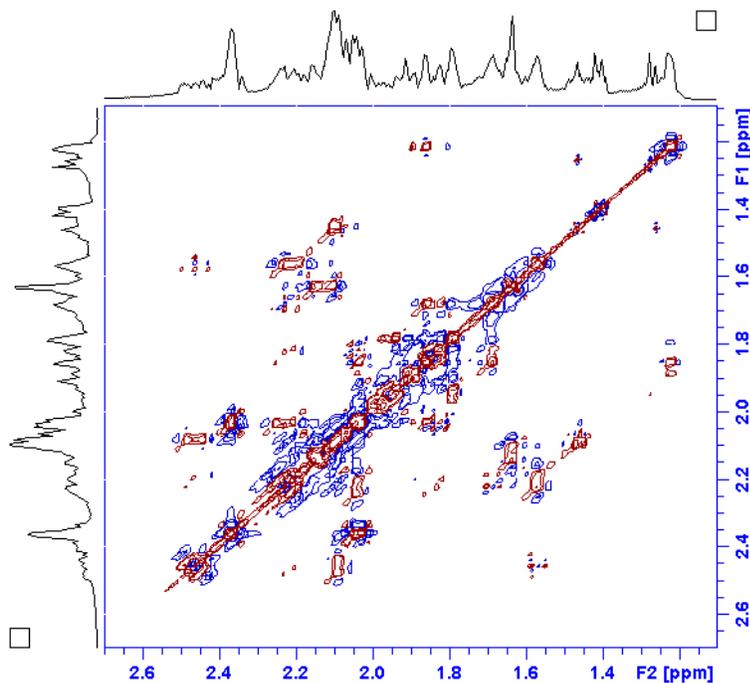


Figura 3.17. Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA1, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1 .

Os dados obtidos a partir do espectro HMBC (Figuras 3.18 a 3.22) foram os responsáveis pela união dos fragmentos, já que existem interações com átomos de carbono que não possuem hidrogênio na montagem da molécula. O espectro NOESY (Figuras 44 a 46) ajudou na indicação da estereoquímica.

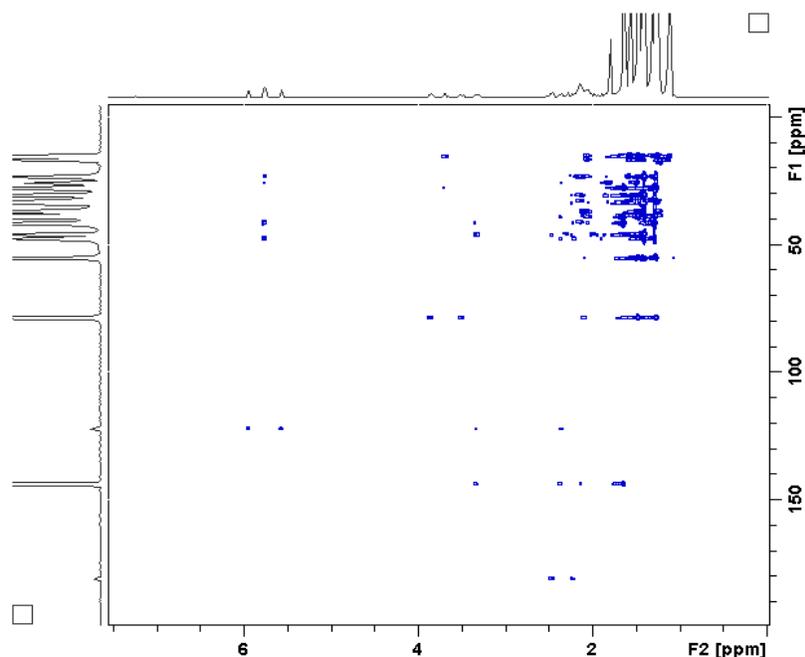


Figura 3.18. Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

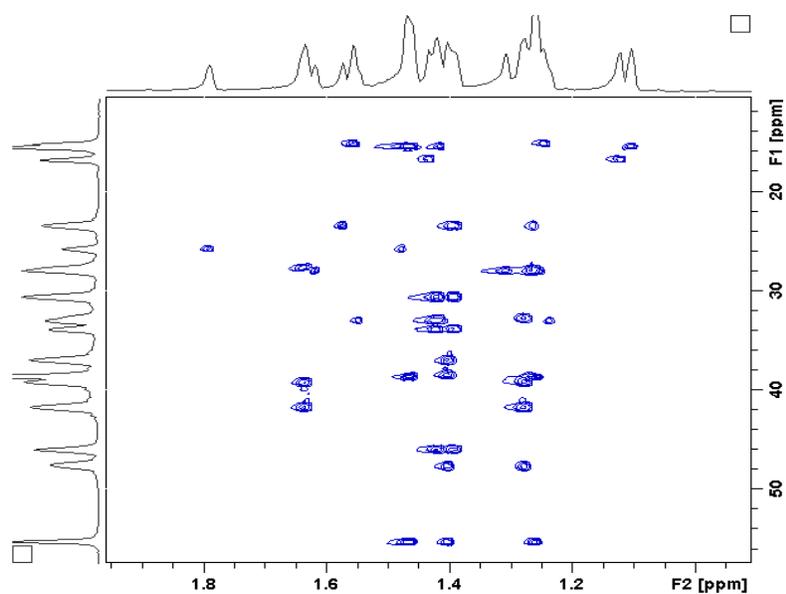


Figura 3.19. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1

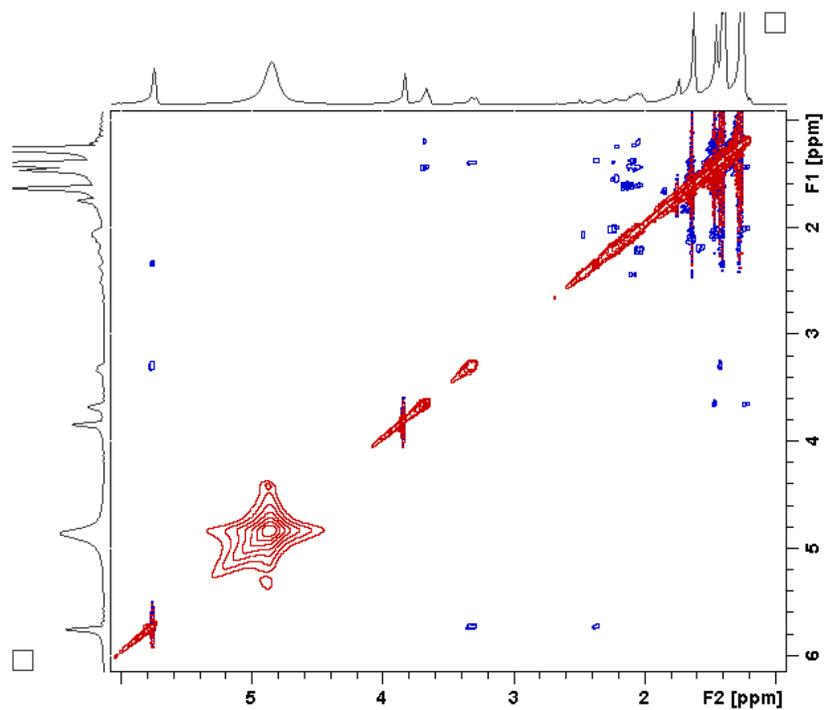


Figura 3.20. Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

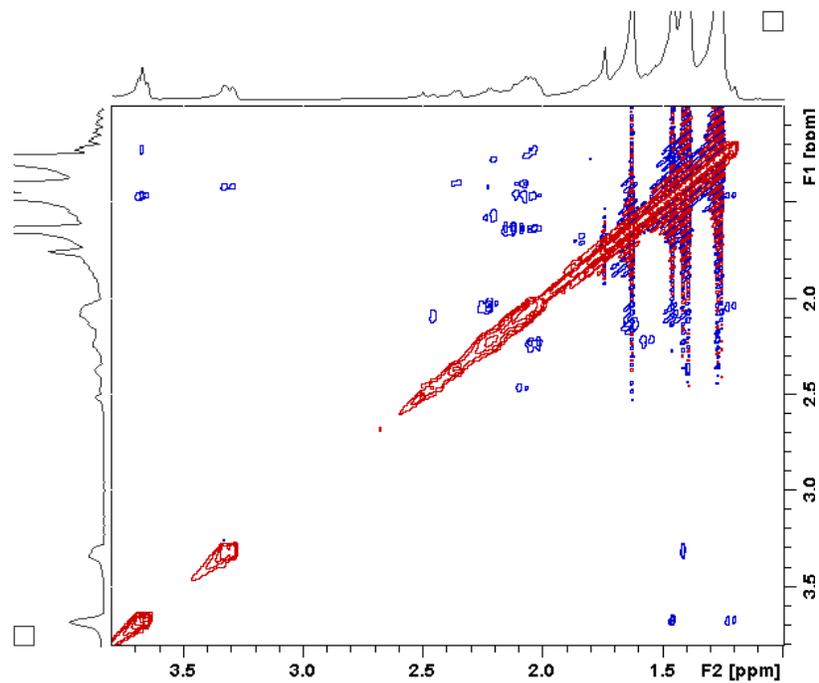


Figura 3.21. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

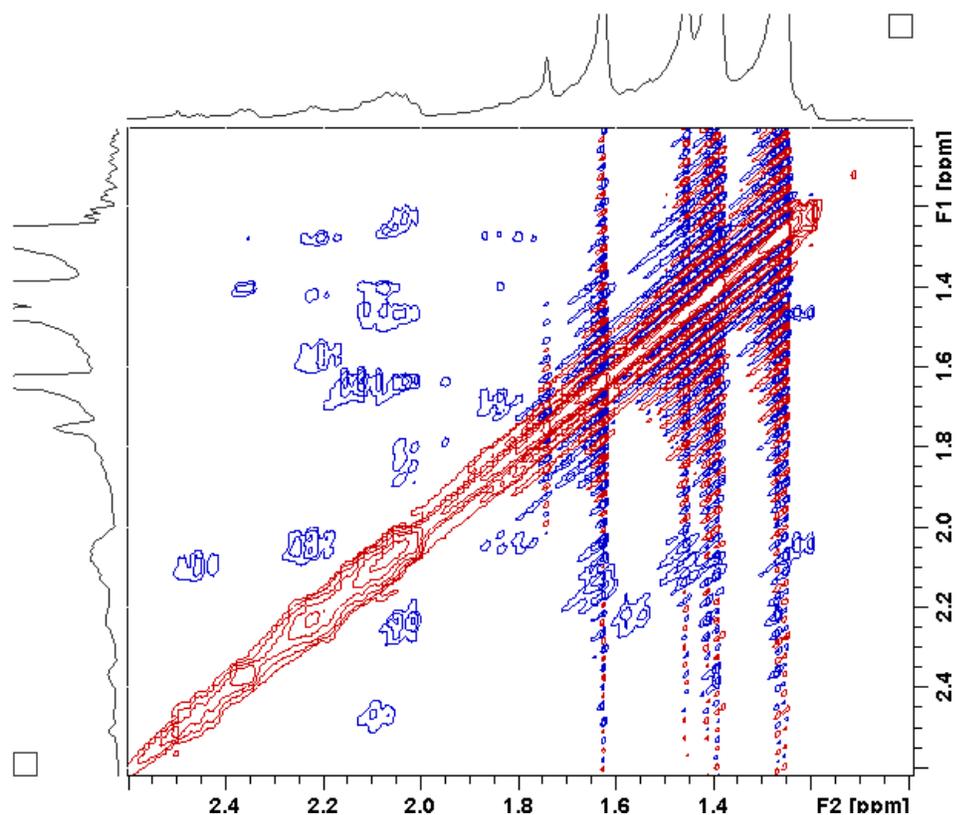


Figura 3.22. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D NOESY da MHFA1, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

A figura 3.23 refere-se à montagem estrutural da molécula codificada como MHFA1 e mostra alguns fragmentos (a-f) em vermelho montados com base no espectro COSY (Figura 3.24) e a ligação destes em linhas pontilhadas, sugeridas através das correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY (Figuras 3.25 e 3.26), e com base nos principais valores de ${}^{2-3}J_{\text{H,H}}$ e ${}^{2-3}J_{\text{C,H}}$.

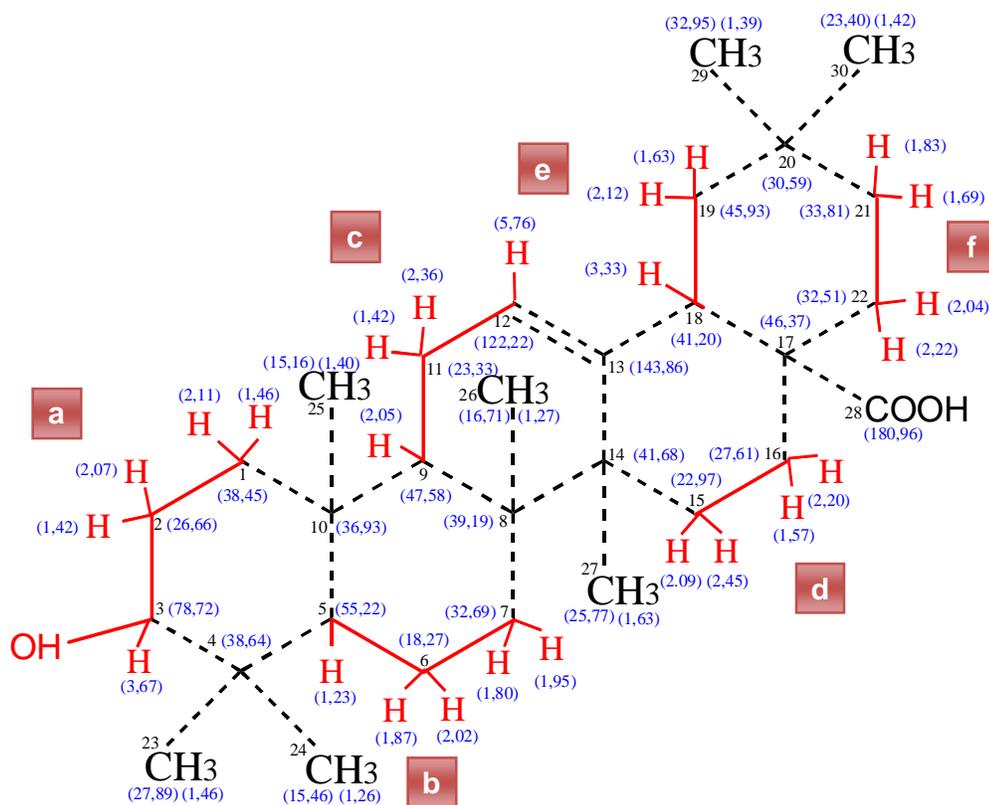


Figura 3.23. Montagem Estrutural da MHFA1

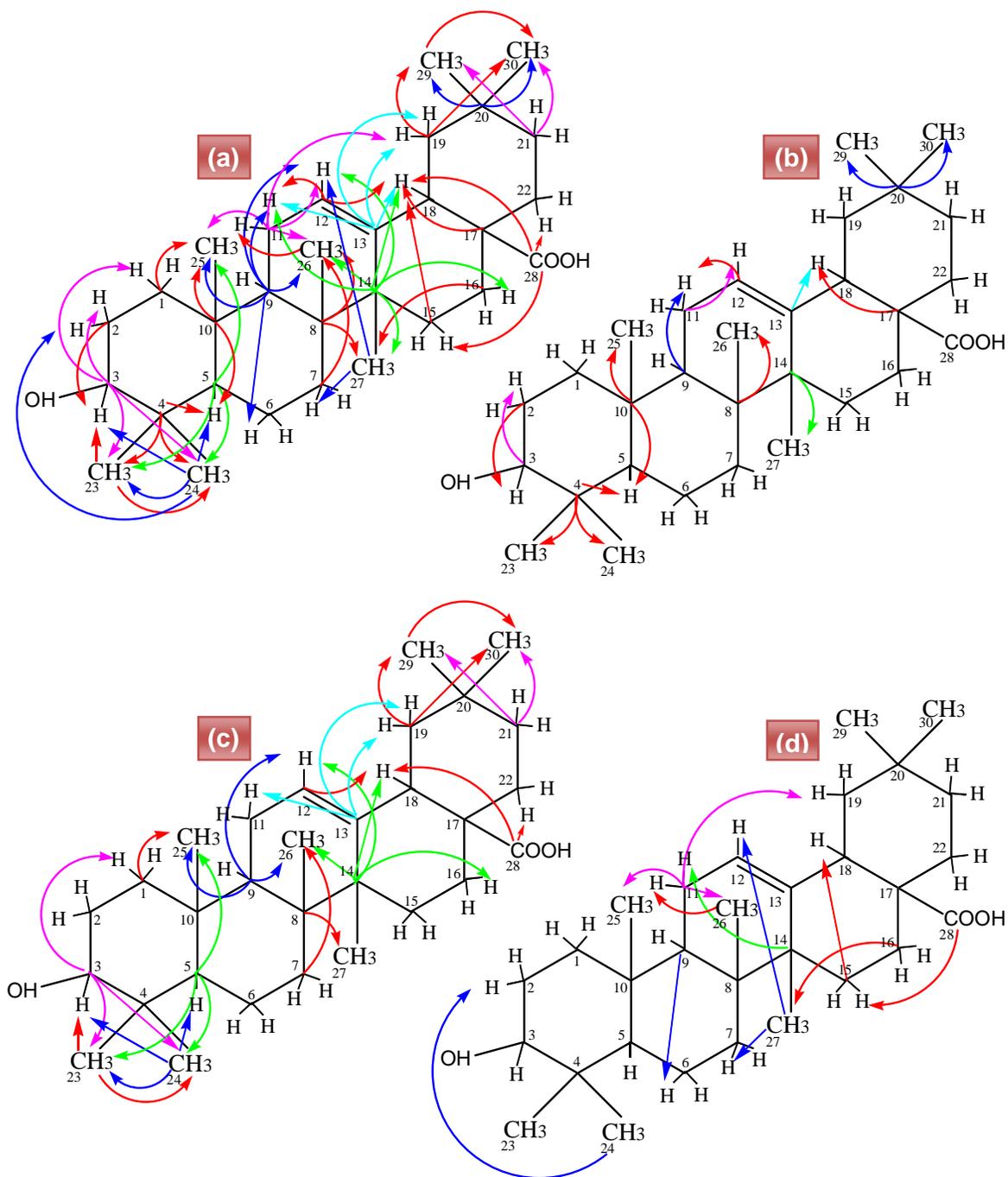


Figura 3. 24. Correlações Observadas no Espectro HMBC de MHFA1. (a) ${}^2J_{C,H}$; (b) ${}^3J_{C,H}$; (c) ${}^4J_{C,H}$; (d) ${}^5J_{C,H}$.

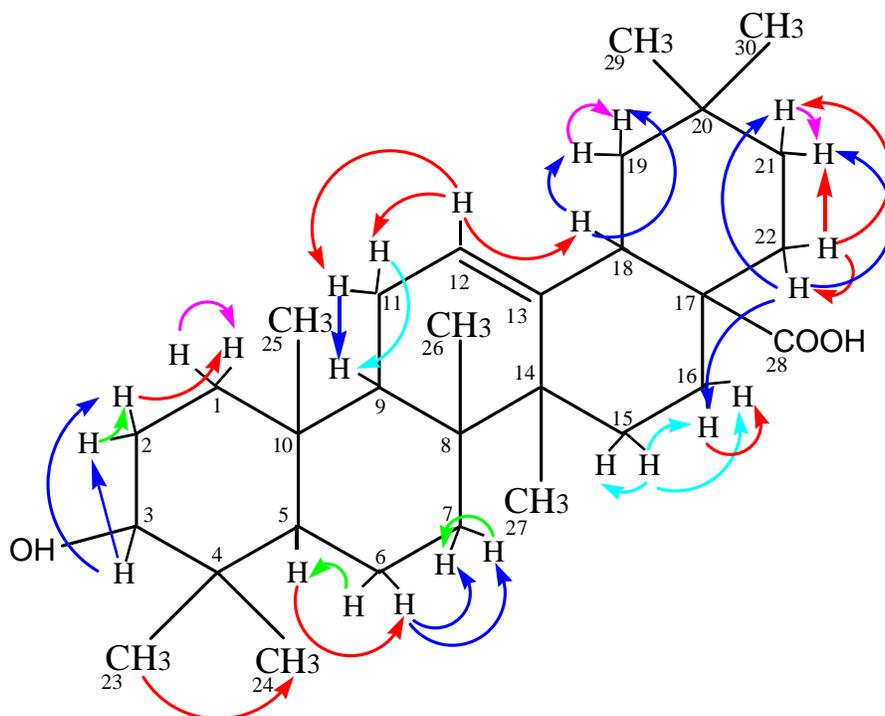


Figura 3.25. Correlações Observadas no Espectro COSY de MHFA1.

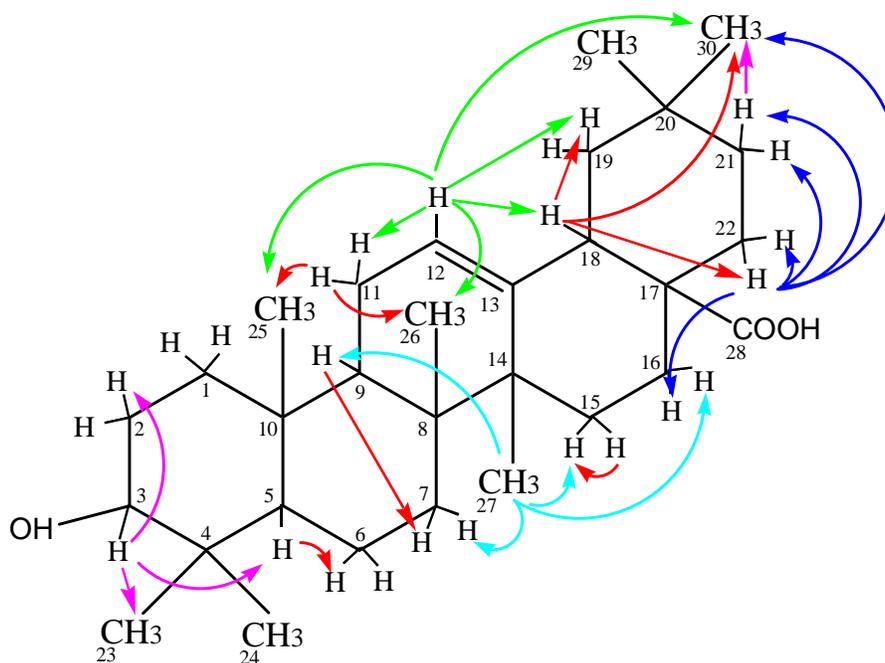


Figura 3.26. Correlações Observadas no Espectro NOESY de MHFA1.

Determinados alguns fragmentos (Figuras 3.23 e 3.24), partiu-se para definição de como estão interligados estes fragmentos através dos carbonos não hidrogenados, sendo utilizado para isso o HMBC (Figuras 3.23 e 3.25), $^{2-3}J_{C,H}$. Partindo-se do fragmento **a** observa-se que: o C₃ (δ 78,72) está correlacionado com os hidrogênios de duas metilas, C₂₃ (δ_H 1,46) e C₂₄ (δ_H 1,26), as quais estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY) e com o C₄ (δ 38,64), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono C₄ (δ 38,64) e que este está ligado ao C₃ (δ 78,72); o C₄ (δ 38,64) também mostra correlação com o H (δ 1,23) do C₅ (δ 55,22), e este H (δ 1,23) mostra correlação com o C₁₀ (δ 36,93), o qual está correlacionado com o H (δ 1,40) da metila C₂₅ (δ 15,16), cujos hidrogênios estão correlacionados com o C₁ (δ 38,45). Isto confirma que o fragmento **a** está ligado através do C₃ (δ 78,72) ao C₄ (δ 38,24), que por sua vez está ligado às metilas C₂₃ (δ 27,89) e C₂₄ (δ 15,46) e ao C₅ (δ 55,22), o qual está ligado ao C₁₀ (δ 36,93), que está ligado a metila C₂₅ (δ 15,16) e ao fragmento **a**, através do C₁ (δ 38,45), fechando o primeiro ciclo. O NOESY mostra ainda que a metila C₂₃ (δ 27,89) está espacialmente próxima ao hidrogênio carbinólico H (δ 3,67), pois há correlação do H (δ 3,67) carbinólico, que se encontra na posição axial, com o H (δ 1,46) desta metila, na posição equatorial (estas posições são definidas no espectro de 1H pelo sinal em δ 3,67 na forma de um duplo duplete (dd) que mostra o acoplamento do H-3 carbinólico com os hidrogênios H-2, $J^3=7,20$ Hz e $J^3=13,20$ Hz, sendo que a correlação espacial com o H-2 (δ 2,07) confirmada pelo espectro NOESY);

Observando-se agora o fragmento **b**, os hidrogênios do C₆ (δ 18,27) e do C₇ (δ 32,69) correlacionam com o C₉ (δ 32,66) (a correlação do C₇ (δ 32,69) é confirmada pelo NOESY), sendo que o C₇ (δ 32,69) mostra ainda correlação com duas metilas C₂₆ (δ 16,71) e C₂₇ (δ 25,77), que são as mesmas e únicas correlações do C₈ (δ 39,19); logo, considerando que o C₉ (δ 32,66) está correlacionado com C₆ (δ 18,27), C₇ (δ 32,69) e com a metila C₂₅ (δ 15,16), ligada ao C₁₀ (δ 36,93), e ainda com a metila C₂₆ (δ 16,71), ligada ao C₈ (δ 39,19), conclui-se que o fragmento **b** está ligado ao C₈ (δ 39,19) através do C₇ (δ 32,69), e o C₈ (δ 39,19) liga-se a metila C₂₆ (δ 16,71) e ao C₉ (δ 32,66), o qual está ligado ao C₁₀ (δ 36,93), fechando o segundo ciclo.

Considerando o fragmento **c**, observa-se que o H (δ 5,76) do C₁₂ (δ 125,13), identificado como carbono vinílico, bastante desprotegido, mostra correlação com o C₁₄ (δ 41,68) quaternário, que está correlacionado também com o C₁₁ (δ 23,33) e com as mesmas metilas do C₈ (δ 39,19), a C₂₆ (δ 16,71) e a C₂₇ (δ 25,77); observando-se ainda que o C₁₃ (δ 143,86) é altamente desprotegido, devido à ligação dupla, e estando este correlacionado com os hidrogênios do C₁₁ (δ 23,33) e do C₁₈ (δ 41,20), confirma-se então que o fragmento **c** está fundido através do C₁₂ (δ 125,13) ao C₁₃ (δ 143,86), o qual está ligado ao C₁₄ (δ 41,68), que liga-se ao C₈ (δ 39,19), sendo este ligado a metila C₂₆ (δ 16,71) e ao C₉ (δ 32,66), fechando o terceiro ciclo.

Todas as correlações observadas nos espectros HMBC (Figura 3.24), COSY (Figura 3.25) e NOESY (Figura 3.26), que proporcionaram a determinação estrutural da substância MHFA1 (Figura 3.27), identificada como sendo um triterpeno da classe oleanólica, conhecido como Ácido Oleanólico (rotação específica $[\alpha]_D^{26,6} = +273^\circ$, CHCl₃/MeOH 3:1).

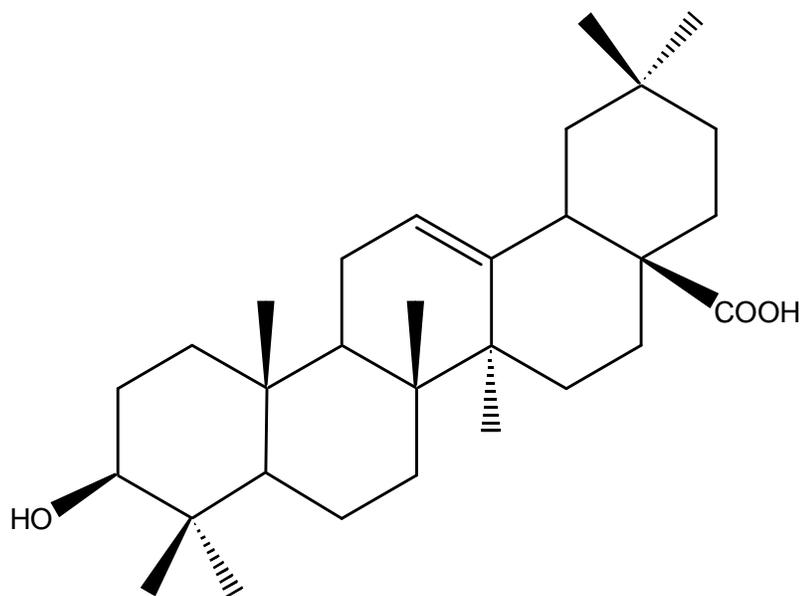


Figura 3.27. Estrutura do Ácido Oleanólico (MHFA1).

Os valores dos deslocamentos dos sinais mostrados nos espectros unidimensionais e bidimensionais e suas respectivas correlações também constam na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Dados de RMN ¹H, ¹³C (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a substância MHFA1. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

	¹³ C Carbonos	δC ¹³	¹ H δH ¹	HMBC δH ¹	COSY		NOESY	
					δHa	δHb	δHa	δHb
1	CH ₂	38,45	1,46; 2,11	1,40 (H-25)	2,11 (H-1); [1,46 (H-1)]	1,46 (H-1); [2,11 (H-1)]; 2,07 (H-2)]		
2	CH ₂	26,66	1,42; 2,07	3,67 (H-3)	2,07 (H-2); [1,42(H-2)]	1,46 (H-1); 1,42 (H-2); 3,67 (H-3); [2,07 (H-2); 3,67 (H-3)]		
3	CH	78,72	3,67dd (J=13,0 e 7,0 Hz)	2,11 (H-1); 2,07 (H-2); 1,46 (H-23); 1,26 (H-24)	3,67 (H-3)	2,07 (H-2); 1,42 (H-2)	3,67 (H-3)	2,07 (H-2); 1,23 (H-5); 1,46 (H-23)
4	C	38,64		1,23 (H-5); 1,46 (H-23); 1,26 (H-24)				
5	CH	55,22	1,23	1,46 (H-23); 1,26 (H-24); 1,40 (H-25)	1,23 (H-5)	1,87 (H-2); 2,02 (H-6)	1,23 (H-5)	2,02 (H-6)
6	CH ₂	18,27	1,87; 2,02		1,87 (H-6); [2,02 (H-6)]	1,23 (H-5); [1,23 (H-5); 1,80 (H-7); 1,95 (H-7)]		
7	CH ₂	32,69	1,80; 1,95	1,27 (H-26)	1,80 (H-7); [1,95 (H-7)]	2,02 (H-6); 1,95 (H-7); [2,02 (H-6); 1,80 (H-7)]		
8	C	39,19		1,27 (H-26); 1,63 (H-27)				
9	CH	47,58	2,05	1,87 (H-6); 2,36 (H-11); 5,76 (H-12); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26)	2,05 (H-9)	1,42 (H-11); 2,36 (H-11)	2,05 (H-9)	1,80 (H-7)
10	C	36,93		1,23 (H-5); 1,40 (H-25)				
11	CH ₂	23,33	1,42; 2,36	5,76 (H-12); 2,12 (H-19); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26)	1,42 (H-11); [2,36 (H-11)]	2,05 (H-9); 5,76 (H-12); [2,05 (H-9); 5,76 (H-12)]	2,36 (H-11)	1,40 (H-25); 1,27 (H-26)
12	CH	122,22	5,76t (J=3,40 Hz)		5,76 (H-12)	1,42 (H-11); 2,36 (H-12); 3,33 (H-18)	5,76 (H-12)	1,63 (H-11); 2,36 (H-11); 3,33 (H-18); 1,40 (H-25); 1,27 (H-26); 1,42 (H-30)
13	C	143,86		2,36 (H-11); 3,33 (H-18); 1,63 (H-19); 2,12 (H-19)				
14	C	41,68		2,36 (H-11); 5,76 (H-12); 2,20 (H-16); 3,33 (H-18); 1,27 (H-26); 1,63 (H-27)				
15	CH ₂	22,97	2,09; 2,45	3,33 (H-18)	2,09 (H-15); 2,45 (H-15)	2,45 (H-15); [2,09 (H-15); 1,57 (H-16); 2,20 (H-16)]	2,45 (H-15)	2,09 (H-15)
16	CH ₂	27,61	1,57; 2,20	1,63 (H-27)	1,57 (H-16); [2,20 (H-16)]	2,20 (H-16); 2,45 (H-15); 2,22 (H-22); [2,45 (H-15); 1,57 (H-16)]		
17	C	46,37		3,33 (H-18)				
18	CH	41,20	3,33		3,33 (H-18)	1,63 (H-19); 2,12 (H-19)	3,33 (H-18)	1,63 (H-19); 2,22 (H-22); 1,42 (H-30)
19	CH ₂	45,93	1,63; 2,12	1,39 (H-29); 1,42 (H-30)	1,63 (H-19); [2,12 (H-19)]	3,33 (H-18); 2,12 (H-19); [3,33 (H-18); 1,63 (H-19)];		
20	C	30,59		1,39 (H-29); 1,42 (H-30)				
21	CH ₂	33,81	1,69; 1,83	1,39 (H-29); 1,42 (H-30)	1,83 (H-21); [1,69 (H-21)]	1,69 (H-21); 2,04 (H-22); 2,22 (H-22); [1,83 (H-21); 2,04 (H-22); 2,22 (H-22)]	1,83 (H-21)	1,42 (H-30)
22	CH ₂	32,51	2,04; 2,22		2,04 (H-22); [2,22 (H-22)]	1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,22 (H-22); [1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,04 (H-21)]	2,22 (H-22)	1,57 (H-16); 1,69 (H-21); 1,83 (H-21); 2,04 (H-22); 1,42 (H-30)
23	CH ₃	27,89	1,46s	3,67 (H-3); 1,26 (H-24)	1,46 (Me-23)	1,26 (Me-24)		
24	CH ₃	15,46	1,26s	1,42 (H-2); 3,67 (H-3); 1,23 (H-5); 1,46 (H-23)	1,26 (Me-24)	1,46 (Me-23)		
25	CH ₃	15,16	1,40s					
26	CH ₃	16,71	1,27s	1,42 (H-11)				
27	CH ₃	25,77	1,63s	1,80 (H-7); 5,76 (H-12)			1,63 (H-27)	1,95 (H-7); 2,05 (H-9); 2,09 (H-15); 2,20 (H-16)
28	C	180,96		2,45 (H-15); 3,33 (H-18); 2,22 (H-22)				
29	CH ₃	32,95	1,39s	1,42 (H-30)				
30	CH ₃	23,40	1,42s					

- Espectrometria de Massas (EM)

O espectro de massas (Figura 3.28) da substância codificada como MAHF1, identificada como ácido oleanólico, obtido por ionização química no modo positivo, indicou o peso molecular de $M = 456$ u com fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. O espectro mostra o pico $M+1 = 457$ u. O íon molecular sofre uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder (Figura 3.29), sendo mostrado no espectro o pico $M-208 = 248$ u, que é característico dessa classe de compostos (BUDZIKIEWICZ *et al.*, 1964).

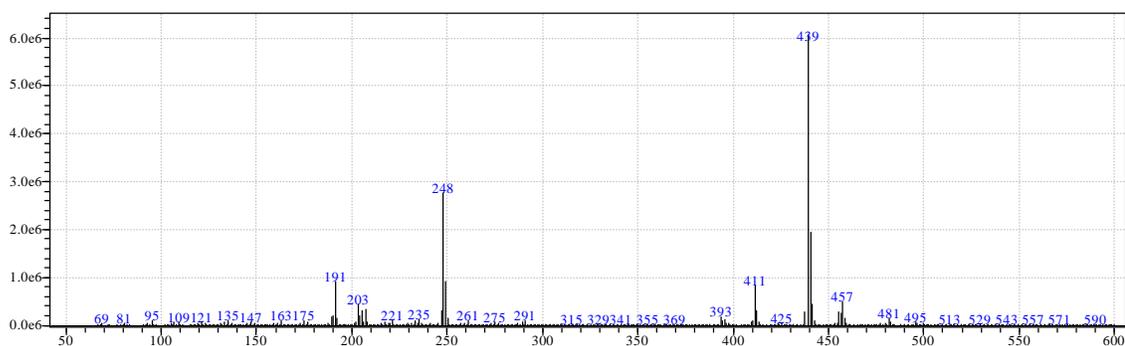


Figura 3.28. Espectro de Massas do Ácido Oleanólico (MHFA1).

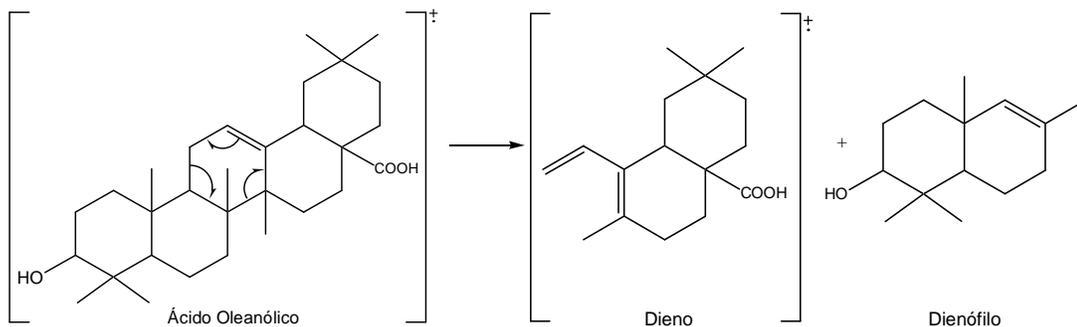


Figura 3.29. Fragmentação do Ácido Oleanólico do Tipo Retro-Diels-Alder.

3.5.2. MHFA2

A substância codificada de **MHFA2** apresentou-se como um sólido branco amorfo, de ponto de fusão 291-292 °C (CHCl₃/MeOH).

- Infravermelho (IV)

A carbonila carboxílica e o grupo hidroxila da MHFA2 foram sugeridos por espectro do composto na região do Infravermelho (IV) (Figura 3.30), o qual revelou bandas de absorção de estiramento e deformação sugerindo grupo hidroxílico (3434,39 cm⁻¹) e carbonila (1690,79 cm⁻¹) (MAHATO & KUNDU, 1994; BARBOSA, 2007).

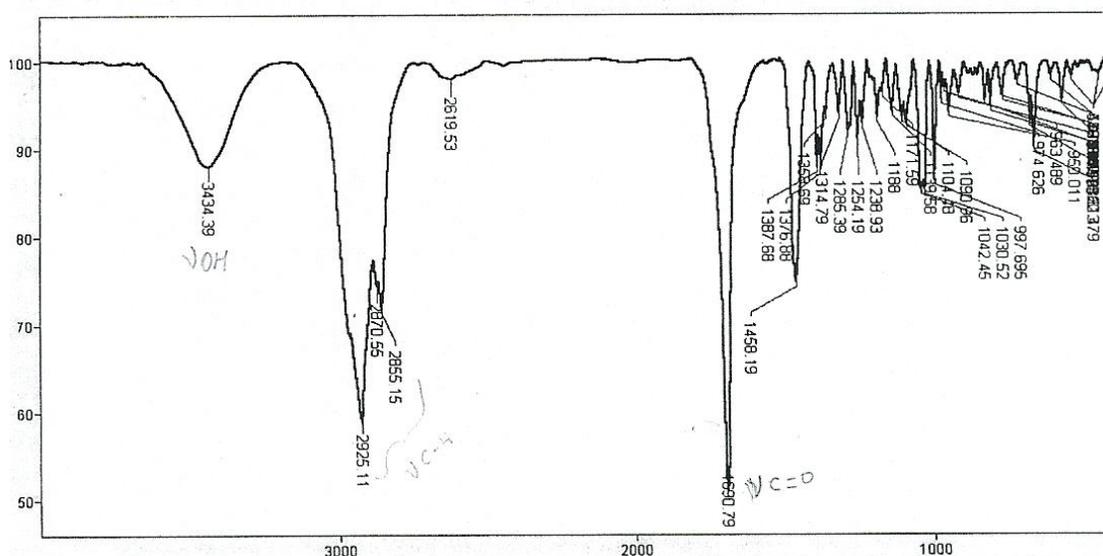


Figura 3.30. Espectro da Substância MHFA2 na Região do Infravermelho.

- RMN 1D

A análise do espectro de RMN ¹H da substância codificada como MHFA2, de cor branca (Figura 3.31), mostrou 7 sinais na região mais blindada entre δ 1,03 e 1,36; sendo 5 simpletos (s) (δ 1,03; 1,09; 1,19; 1,23; 1,36) referentes aos prótons de grupos metilas ligados a carbonos não hidrogenados e 2 dupletos (d) (δ 1,13; J = 6,4 Hz e δ 1,20; J = 8,0 Hz) relativos aos prótons de metilas ligadas a carbonos

monohidrogenados (Figura 3.32); um sinal em δ 3,43 na forma de um duplo duplete (dd) com constante de acoplamento (J) ($J=5,20$ Hz e $J=10,80$ Hz) relativo ao hidrogênio carbinólico que está orientado em estereoquímica α e acoplado com os hidrogênios δ 1,26 e δ 1,85; um sinal em δ 5,49 triplete (t) com $J=3,60$ Hz, relativo ao hidrogênio olefínico acoplado com os hidrogênios δ 1,33 e δ 2,17 (Figura 3.31) (ARAÚJO & CHAVES, 2005; JUNGES *et al.*, 1999).

Neste espectro foram identificados ainda, com o auxílio dos espectros DEPTs, HSQC e COSY, 19 sinais na forma de multipletos (m), sendo 18 relativos aos prótons de grupos metílenos H (δ 1,27; 1,91), H (δ 1,26; 1,85), H (δ 1,64; 1,80), H (δ 1,61; 1,79), H (δ 1,33; 2,17), H (δ 1,79; 2,18), H (δ 1,90; 2,27), H (δ 1,60; 1,75), H (δ 1,88; 1,94) e um sinal relativo ao próton de grupo metínico H (δ 1,78). Foram identificados ainda 4 sinais relativos aos hidrogênios δ 0,99 ($J=10,48$ Hz), δ 2,45 ($J=11,4$ Hz), δ 1,21 ($J=8,1$ Hz) e δ 1,12 ($J=6,44$), na forma de dupletos (d) referentes a prótons de grupos metínicos. Todos os deslocamentos químicos dos sinais do espectro de ^1H encontram-se na Tabela 3.4.

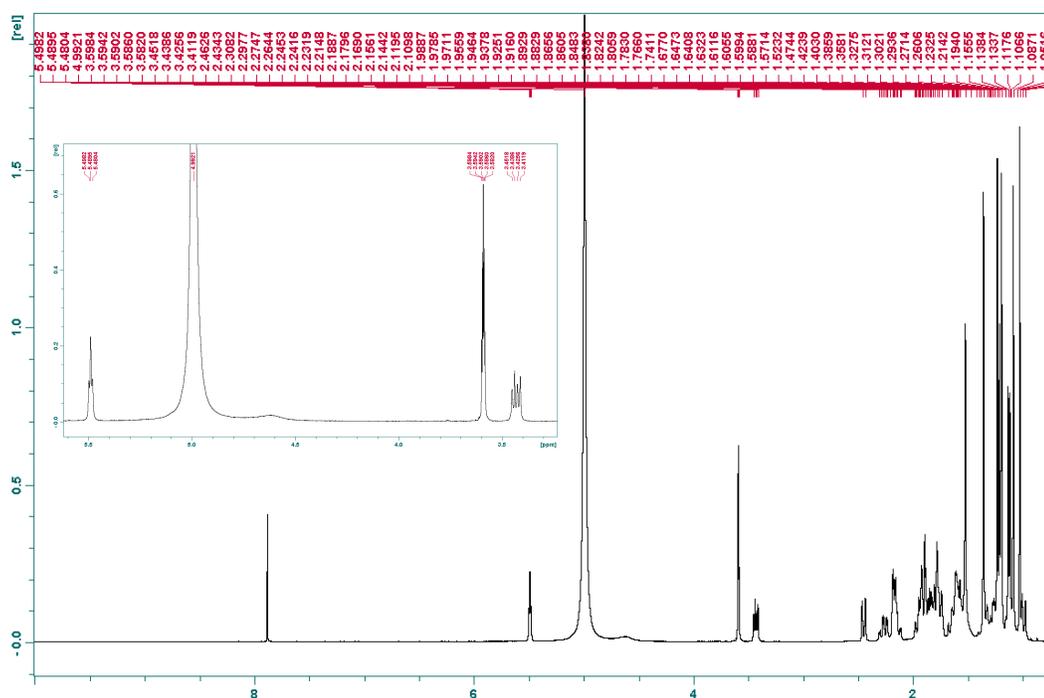


Figura 3.31. Espectro de RMN ^1H de MHFA2 com Expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

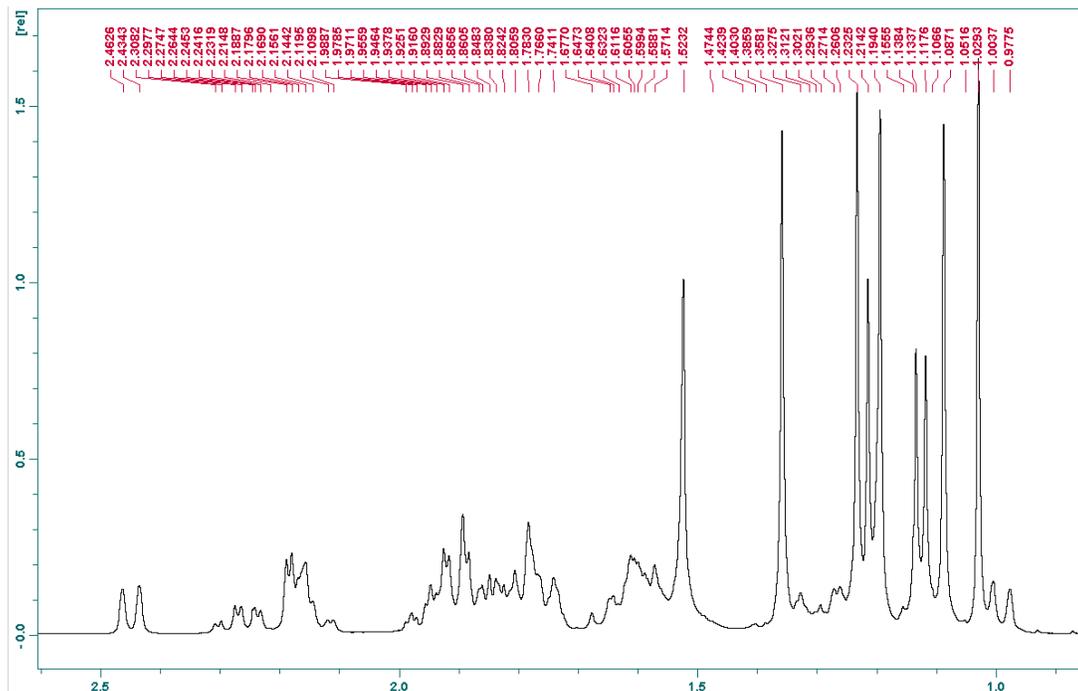


Figura 3.32. Expansão do Espectro de RMN H^1 de MHFA2, Solvente $CDCl_3/CD_3OD$ 3:1 .

A análise dos espectros de ^{13}C (Figuras 3.33 e 3.34), DEPT 90° (Figuras 3.35 e 3.36) e DEPT 135° (Figura 3.37) da substância MHFA2 lhe conferiu uma indicação de esqueleto ursânico mostrando a presença de 30 átomos de carbonos: sendo 7 grupos metila (CH_3) e 9 grupos metilenos (CH_2), segundo o DEPT de 135° , 7 grupos metínicos (CH), conforme o DEPT de 90° e 7 carbonos não hidrogenados, sendo um deles um grupo carbonila, segundo o espectro ^{13}C por diferença com os DEPTs de 90° e 135° (SILVA, 2006; SOLOMONS & FRYHLE, 2005).

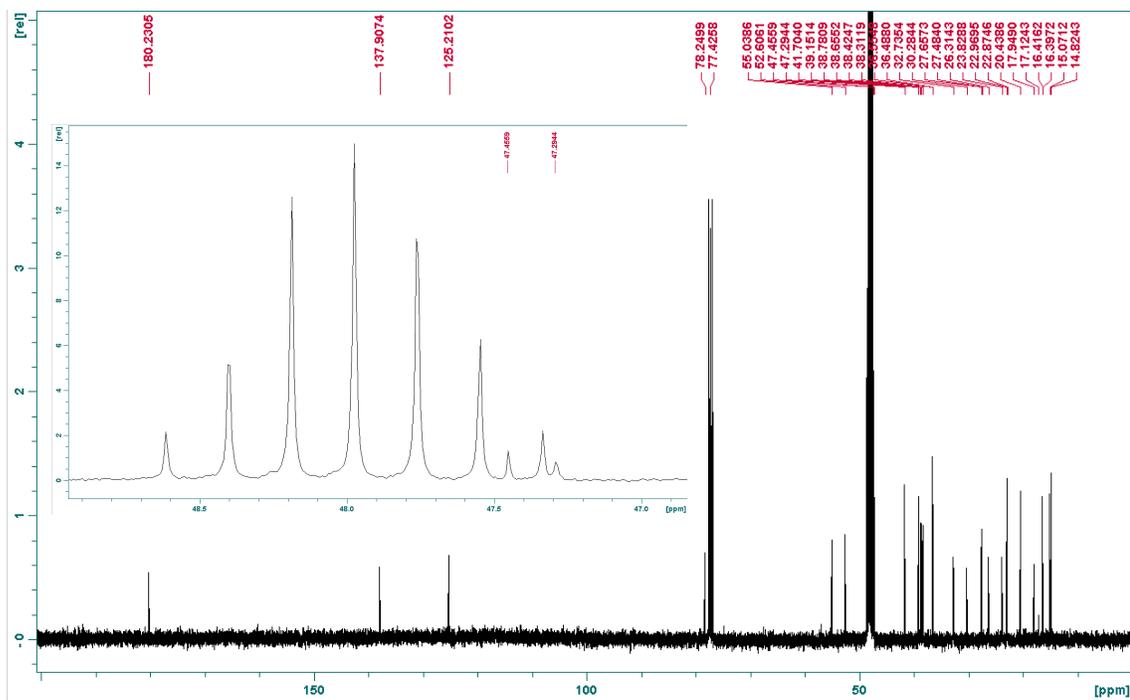


Figura 3.33. Espectro de RMN C^{13} de MHFA2 com Expansão, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

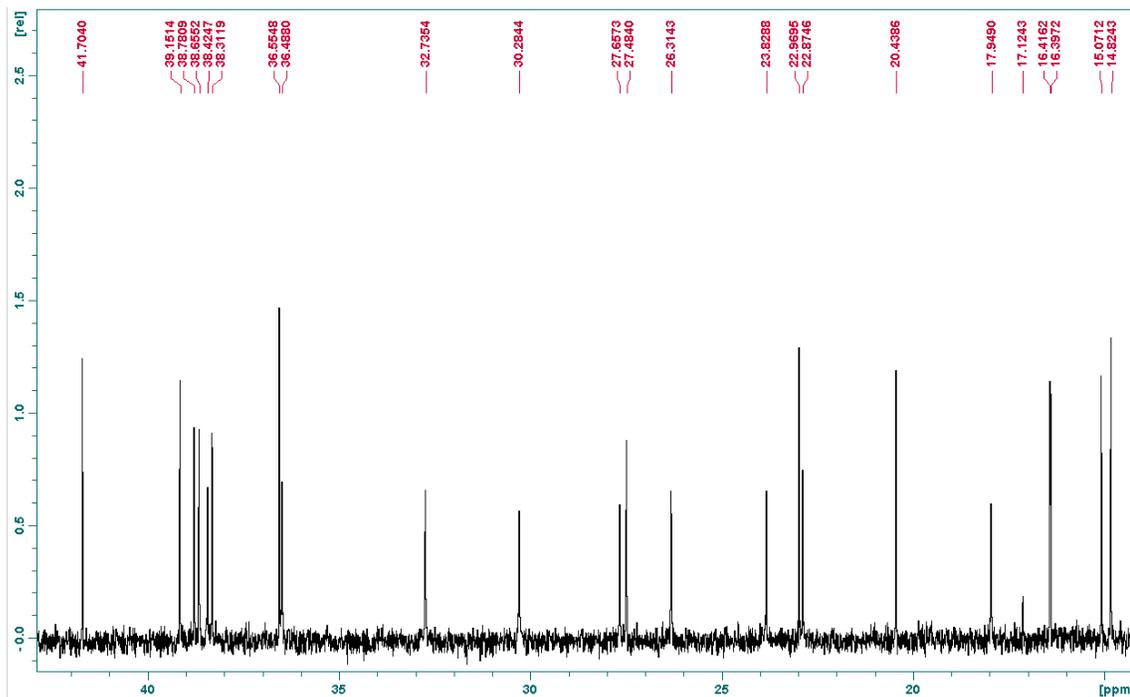


Figura 3.34. Expansão do Espectro de RMN C^{13} de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

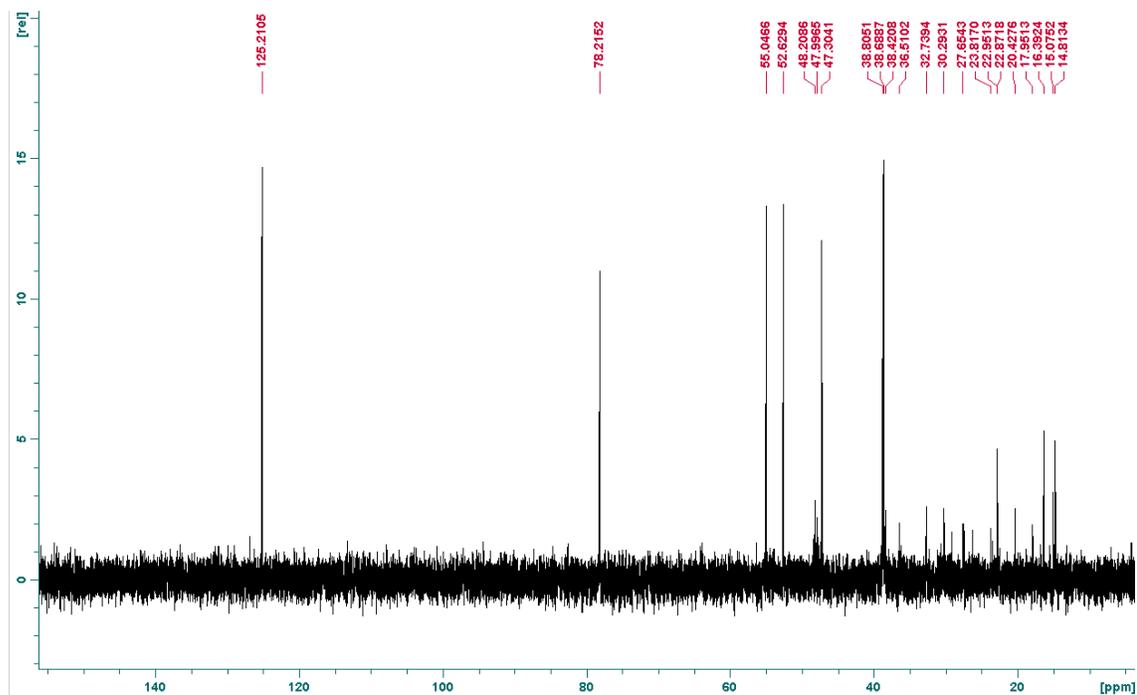


Figura 3.35. Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA2, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1 .

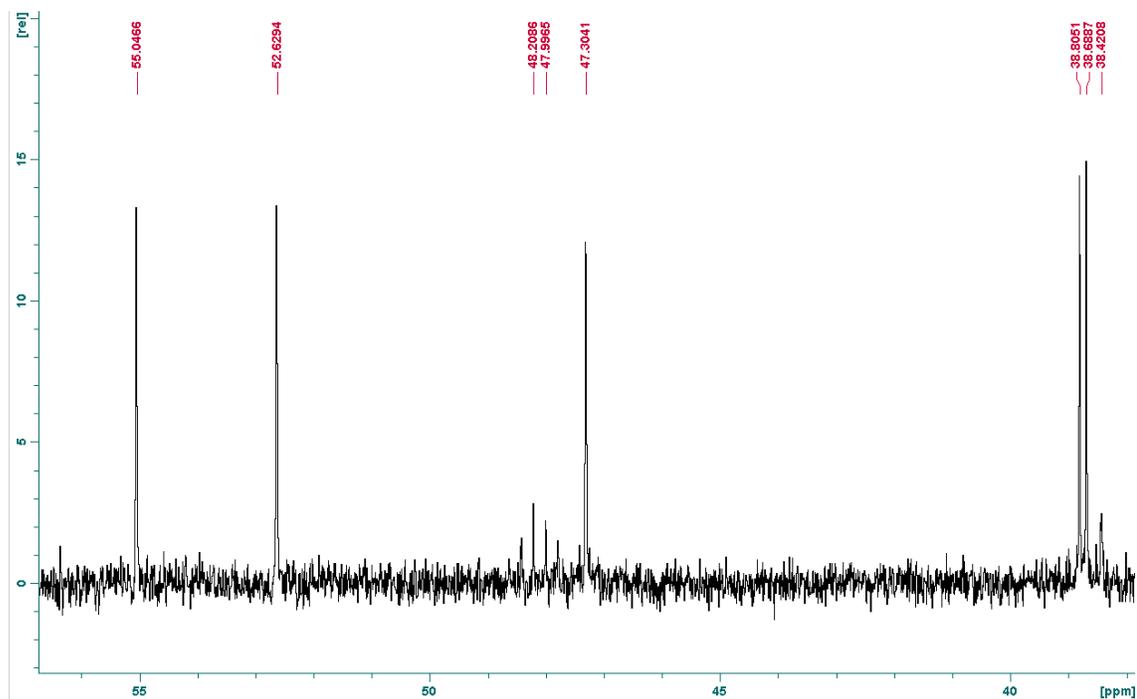


Figura 3.36. Expansão do Espectro de RMN DEPT 90° de MHFA2, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

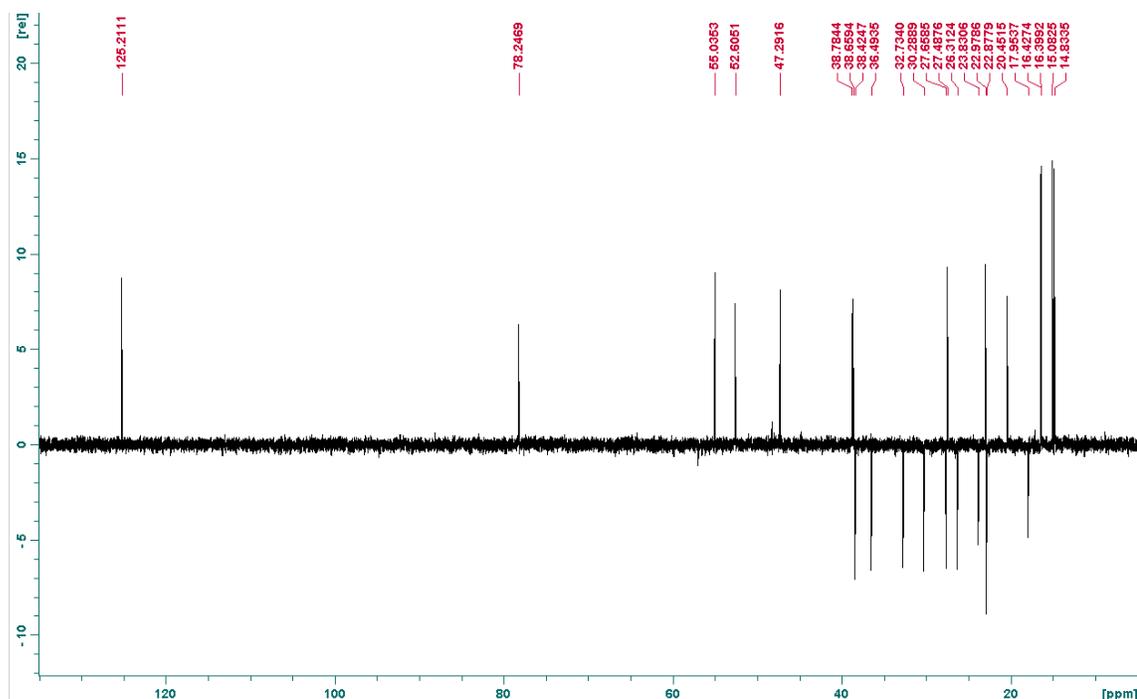


Figura 3.37. Espectro de RMN DEPT 135° de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{MeOD } \text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD } 3:1$.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.33) mostra também a presença do carbono carbinólico com deslocamento químico em δ 78,15 e ainda os deslocamentos químicos dos carbonos da ligação dupla C (δ 125,13) e C (δ 137,86), carbonos vinílicos, ligação esta característica dos esqueletos ursânicos e oleanânicos (JUNGES *et al.*, 1999; MAHATO & KUNDU, 1994).

A MHAF2 apresenta o carbono da carbonila carboxílica com deslocamento químico em δ 180,26. A análise completa dos deslocamentos químicos do RMN ^{13}C encontra-se na Tabela 3.4.

- Determinação estrutural da substância codificada como MHFA2, usando espectros de RMN Bidimensionais.

Para fazer um mapeamento estrutural mais preciso do que utilizando somente as técnicas unidimensionais e dados de possíveis compostos similares da literatura, foram utilizados as técnicas bidimensionais de RMN (HSQC, HMBC, COSY e NOESY), que permitem correlacionar hidrogênios e/ou carbonos que possuam alguma relação escalar ($^nJ_{\text{H,H}}$; $^nJ_{\text{C,H}}$) ou espacial (H,H- ou H,C –NOE) entre si (CARVALHO e BRAZ FILHO, 1992; KAISER, 2000).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância codificada como MHFA2 demonstraram a natureza dos prótons e dos carbonos. Os espectros de ^{13}C e DEPTs de 90° e 135° possibilitaram a identificação dos sinais dos carbonos quanto aos grupos metila, metileno, metínico e quanto aos carbonos não hidrogenados, mas a numeração dos sinais de carbono foi feita através dos espectros de RMN COSY e HMBC. A identificação dos hidrogênios dos grupos foi feita via HSQC (Figuras 3.38 e 3.39), que mostrou a correlação direta destes com os seus respectivos carbonos (Tabela 3.4).

Através do espectro de HSQC observou-se as correlações do hidrogênio carbinólico (δ 3,43) com o carbono δ 78,15; do hidrogênio vinílico (δ 5,49) com carbono δ 125,13 e dos hidrogênios metílicos (δ 1,03; 1,09; 1,13; 1,19; 1,20; 1,23; 1,36) com os seus respectivos carbonos (δ 15,00; 16,31; 16,34; 14,75; 20,36; 27,39; 22,88). As outras correlações estão descritas na Tabela 3.4.

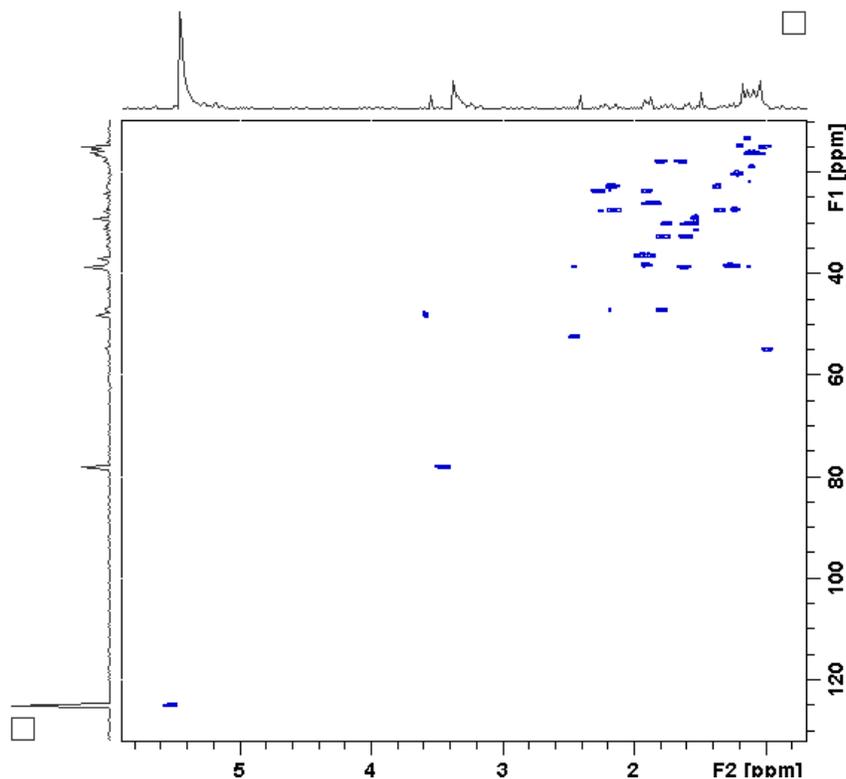


Figura 3.38. Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1 .

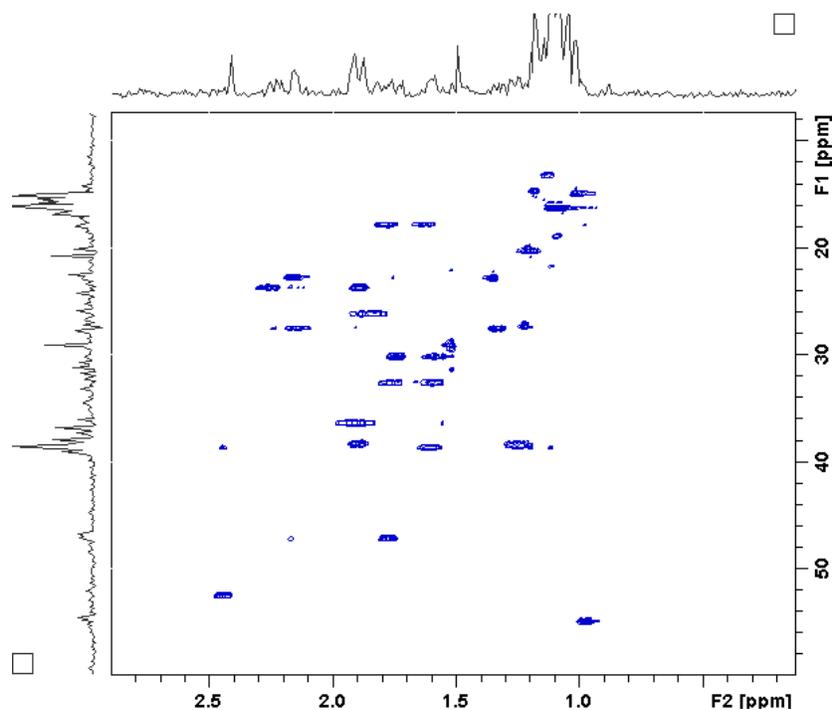


Figura 3.39. Expansão do Espectro de RMN 2D HSQC de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

O espectro de RMN de COSY (Figuras 3.40 a 3.43) mostrou as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por $^2\text{-}^3\text{J}_{\text{H,H}}$ (acoplamentos geminais e vicinais) e ainda por $^4\text{-}^6\text{J}_{\text{H,H}}$, permitindo assim a montagem de microfragmentos da estrutura.

Acoplamentos geminais: $\text{H}_{1\text{A}}$ (δ 1,27) e $\text{H}_{1\text{B}}$ (δ 1,91), $\text{H}_{2\text{A}}$ (δ 1,26) e $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85), $\text{H}_{6\text{A}}$ (δ 1,64) e $\text{H}_{6\text{B}}$ (δ 1,80), $\text{H}_{7\text{A}}$ (δ 1,61) e $\text{H}_{7\text{B}}$ (δ 1,79), $\text{H}_{11\text{A}}$ (δ 1,33) e $\text{H}_{11\text{B}}$ (δ 2,17), $\text{H}_{15\text{A}}$ (δ 1,79) e $\text{H}_{15\text{B}}$ (δ 2,18), $\text{H}_{16\text{A}}$ (δ 1,90) e $\text{H}_{16\text{B}}$ (δ 2,27), $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60) e $\text{H}_{21\text{B}}$ (δ 1,75), $\text{H}_{22\text{A}}$ (δ 1,88) e $\text{H}_{22\text{B}}$ (δ 1,94).

Acoplamentos vicinais: $\text{H}_{1\text{A}}$ (δ 1,27) e $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85), $\text{H}_{1\text{B}}$ (δ 1,91) e $\text{H}_{2\text{A}}$ (δ 1,26), $\text{H}_{1\text{B}}$ (δ 1,91) e $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85), $\text{H}_{2\text{B}}$ (δ 1,85) e H_3 (δ 3,43), $\text{H}_{2\text{A}}$ (δ 1,26) e H_3 (δ 3,43), H_5 (δ 0,99) e $\text{H}_{6\text{A}}$ (δ 1,64), H_5 (δ 0,99) e $\text{H}_{6\text{B}}$ (δ 1,80), $\text{H}_{6\text{A}}$ (δ 1,64) e $\text{H}_{7\text{B}}$ (δ 1,79), $\text{H}_{6\text{B}}$ (δ 1,80) e $\text{H}_{7\text{A}}$ (δ 1,61), H_9 (δ 1,78) e $\text{H}_{11\text{A}}$ (δ 1,33), H_9 (δ 1,78) e $\text{H}_{11\text{B}}$ (δ 2,17), $\text{H}_{11\text{A}}$ (δ 1,33) e H_{12} (δ 5,49), $\text{H}_{11\text{B}}$ (δ 2,17) e H_{12} (δ 5,49), $\text{H}_{15\text{B}}$ (δ 2,18) e $\text{H}_{16\text{A}}$ (δ 1,90), $\text{H}_{15\text{B}}$ (δ 2,18) e $\text{H}_{16\text{B}}$ (δ 2,27), H_{18} (δ 2,45) e H_{19} (δ 1,21), H_{20} (δ 1,12) e $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60), H_{20} (δ 1,12) e $\text{H}_{21\text{B}}$ (δ 1,75), $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60) e $\text{H}_{22\text{A}}$ (δ 1,88), $\text{H}_{21\text{A}}$ (δ 1,60) e $\text{H}_{22\text{B}}$ (δ 1,94).

Hidrogênios acoplados por $^4\text{-}^6\text{J}_{\text{H,H}}$: H₂₃ (δ 1,23) e H₂₄ (δ 1,03), H₉ (δ 1,78) e H₂₆ (δ 1,09), H₁₂ (δ 5,49) e H₁₈ (δ 2,45), H₁₈ (δ 2,45) e H_{21A} (δ 1,60), H₁₈ (δ 2,45) e H_{22A} (δ 1,88).

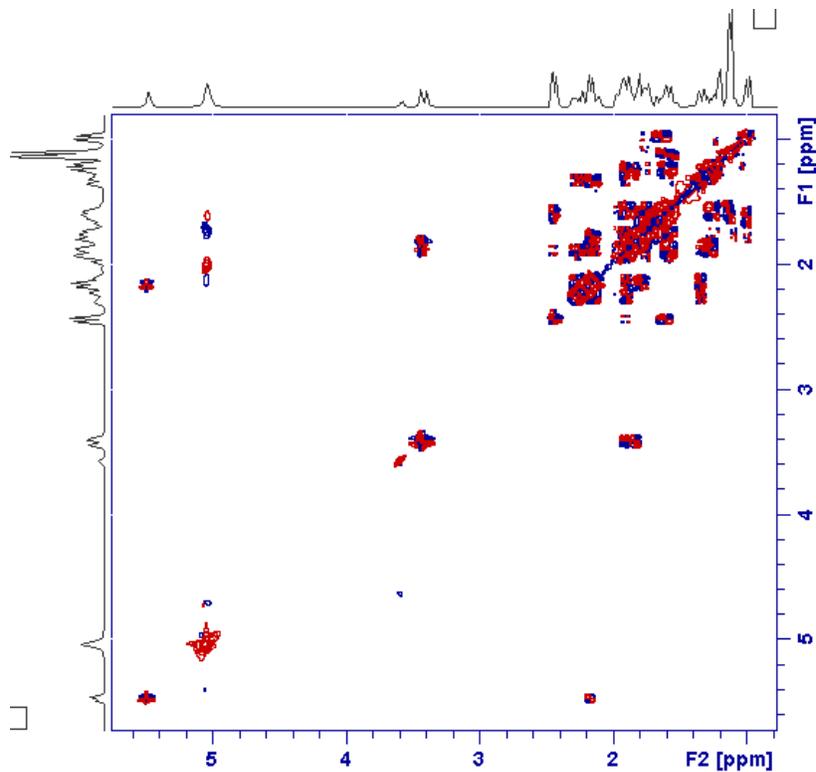


Figura 3.40. Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

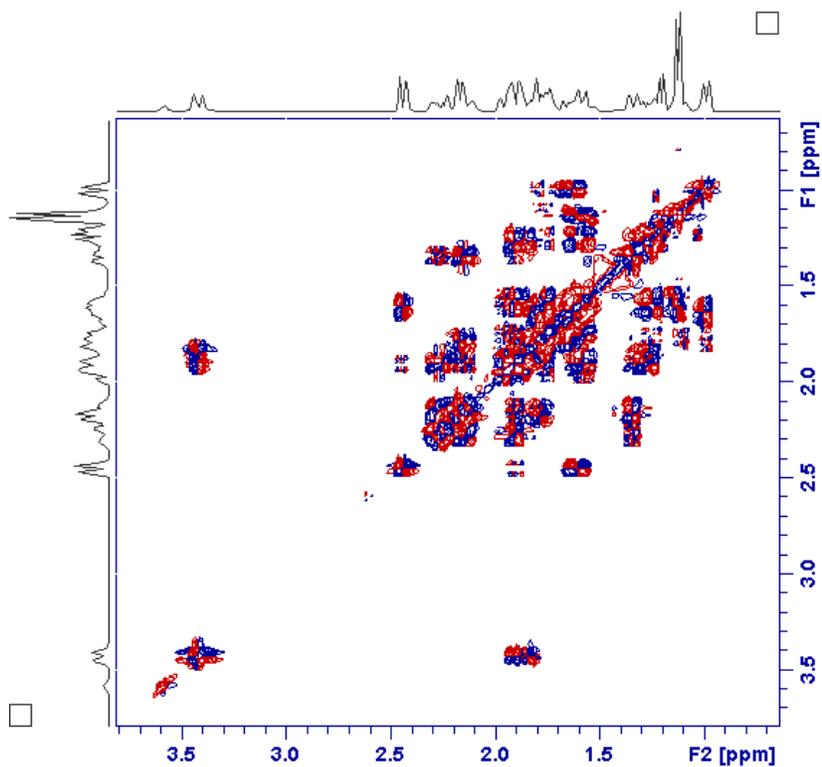


Figura 3.41. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

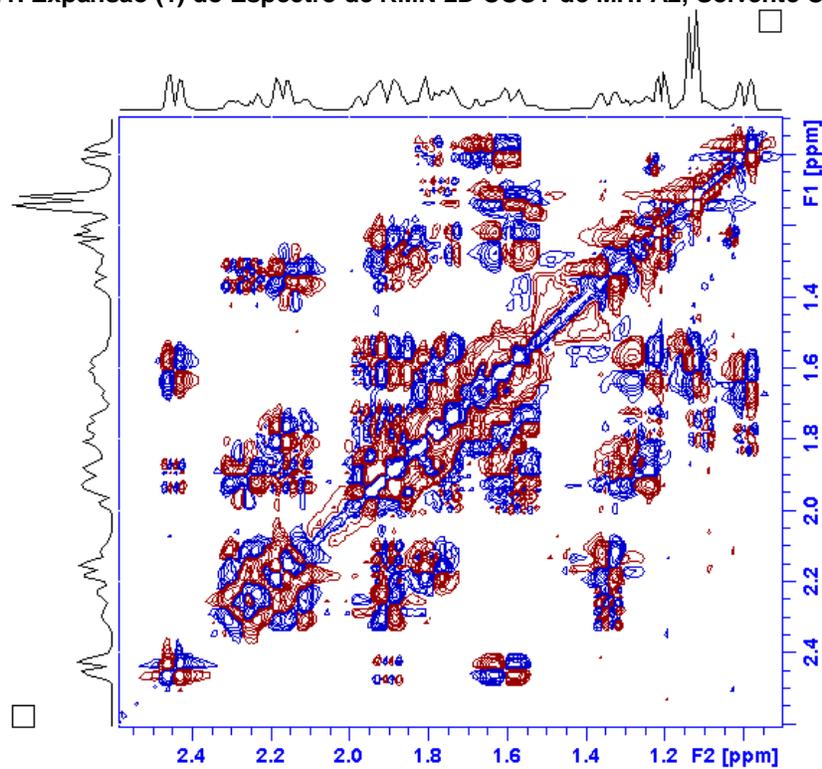


Figura 3.42. Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

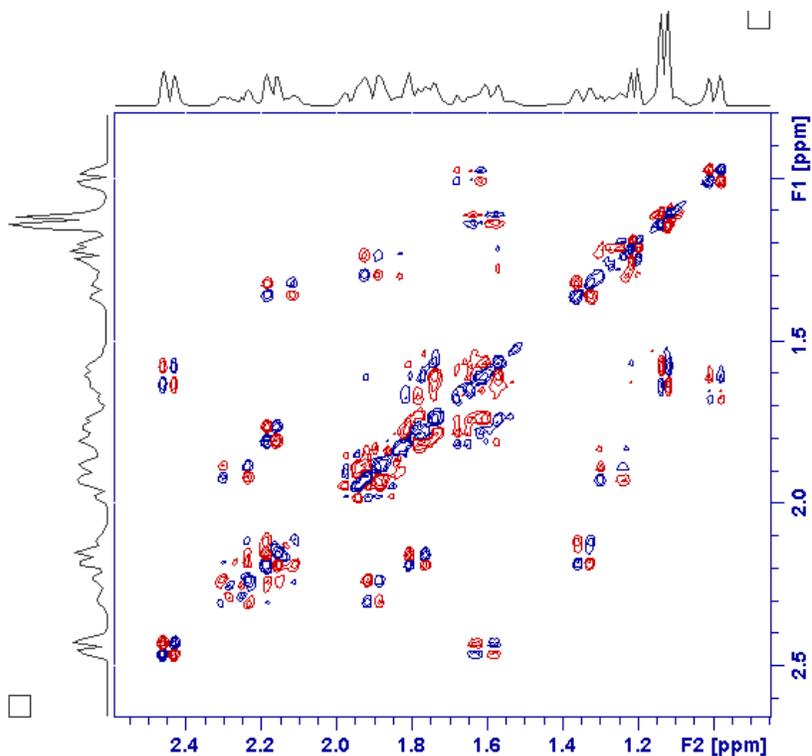


Figura 3.43. Redução dos Sinais da Expansão (2) do Espectro de RMN 2D COSY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

A análise do espectro HMBC (Figuras 3.44 e 3.45) (correlação H-C a longa distância) foi o responsável pela união dos fragmentos definidos pela análise do espectro COSY, devido às interações observadas entre átomos de carbono não hidrogenados. A análise do espectro NOESY (Figuras 3.46 e 3.47) (correlação H-H espacial) produziu informações relacionadas com a estereoquímica da molécula. A montagem completa da estrutura da MHFA2 está descrita a seguir:

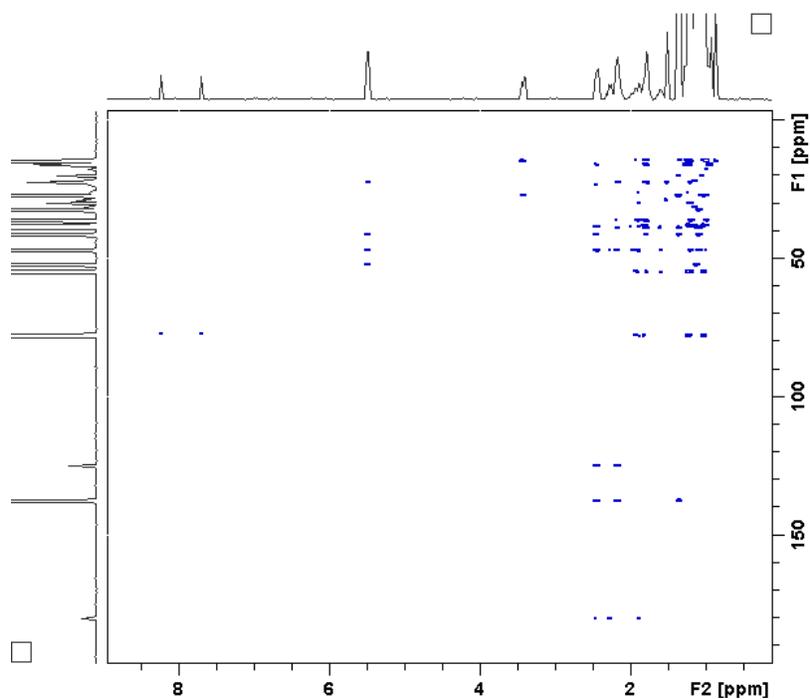


Figura 3.44. Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA2, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1 .

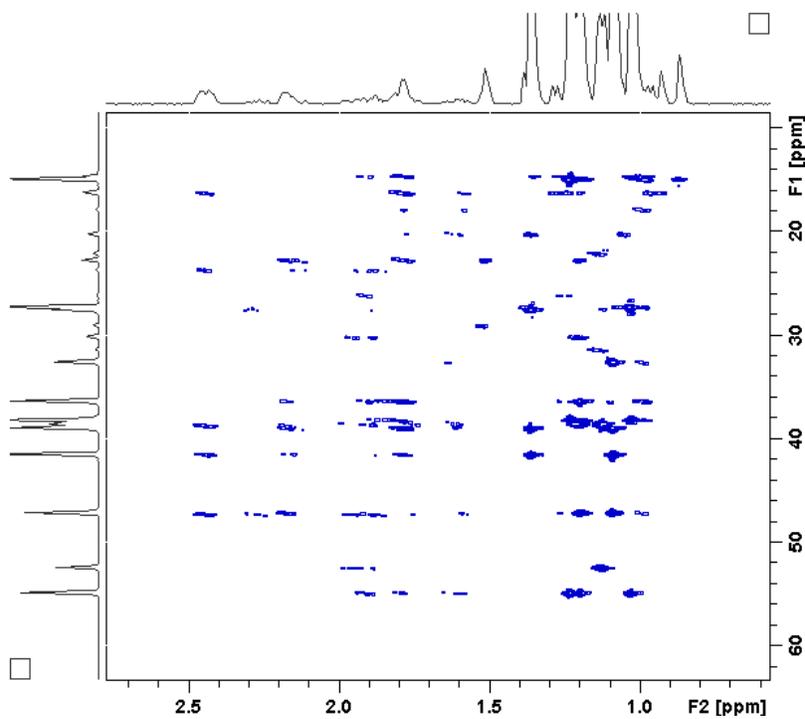


Figura 3.45. Expansão do Espectro de RMN 2D HMBC de MHFA2, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

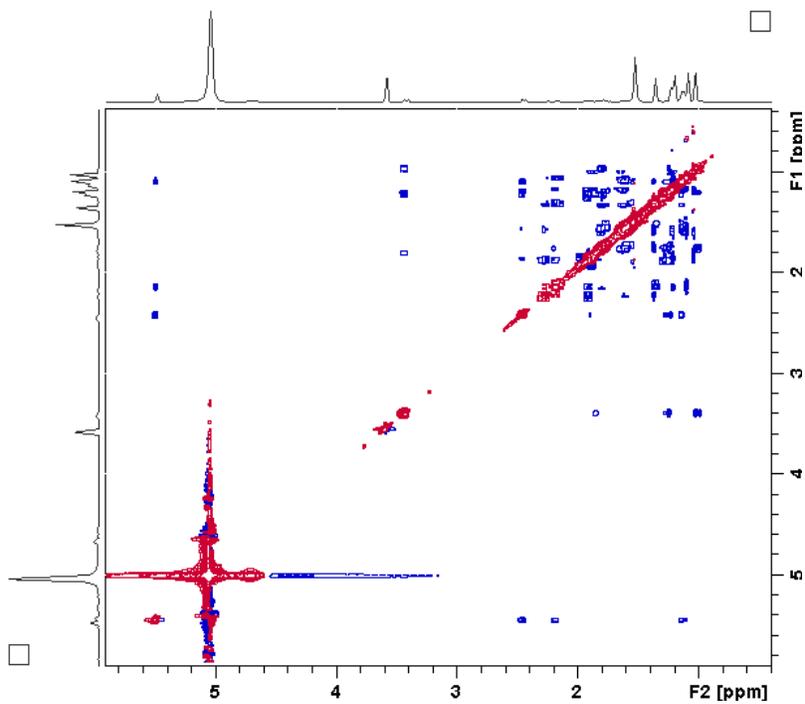


Figura 3.46. Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

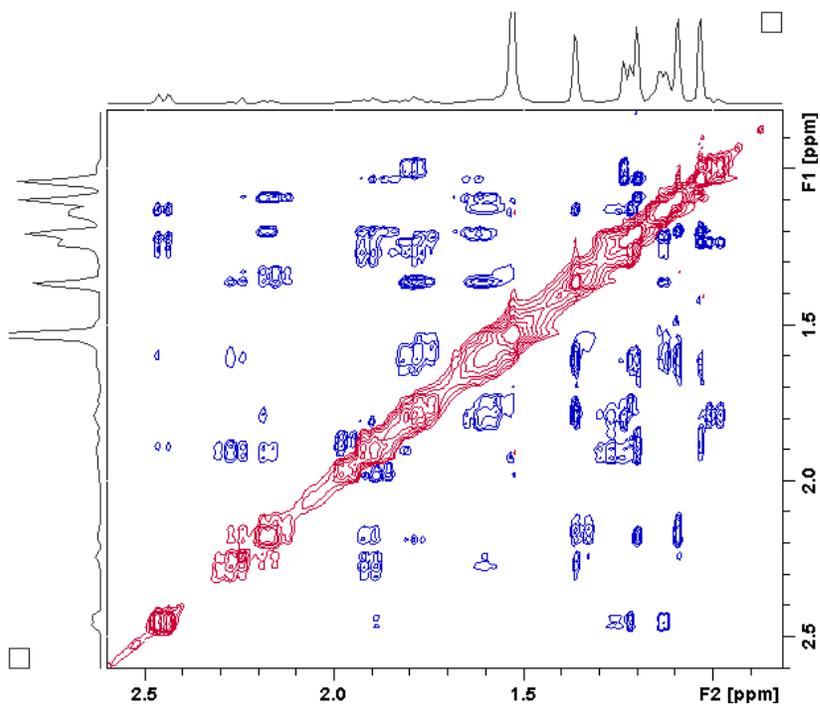


Figura 3.47. Expansão (1) do Espectro de RMN 2D NOESY de MHFA2, Solvente $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1.

A Figura 3.48 refere-se à montagem estrutural da molécula codificada como ZTC9 através de dados de RMN bidimensionais e mostra alguns fragmentos (a-f) em vermelho montados com base no espectro COSY (Figura 3.49) e a ligação destes em linhas pontilhadas, sugeridas através das correlações observadas nos espectros HMBC e NOESY (Figuras 3.50 e 3.51), e com base nos principais valores de ${}^{2-3}J_{\text{H,H}}$ e ${}^{2-3}J_{\text{C,H}}$.

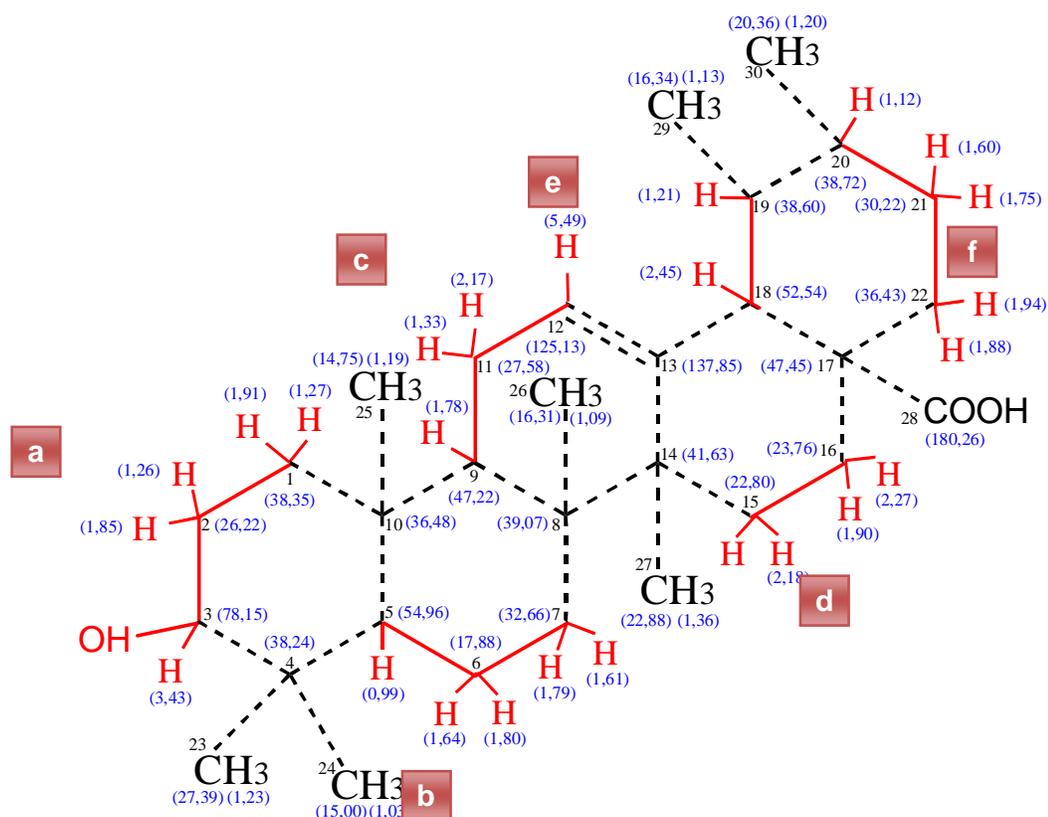


Figura 3.48. Montagem Estrutural da MHFA2.

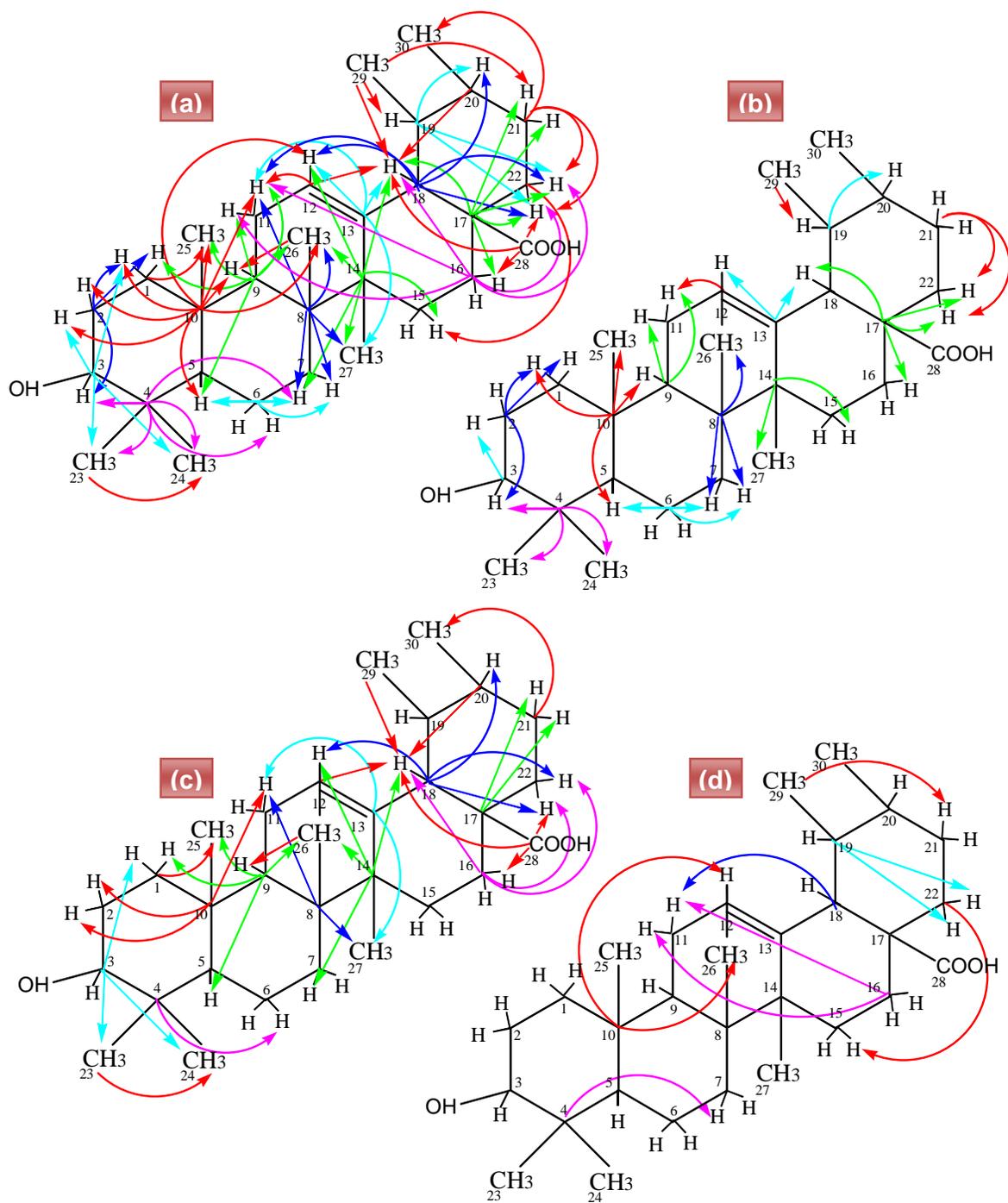


Figura 3.49. Correlações Observadas no Espectro HMBC de MHFA2. (a) $^{2-4}J_{C,H}$; (b) $^2J_{C,H}$; (c) $^3J_{C,H}$; (d) $^4J_{C,H}$.

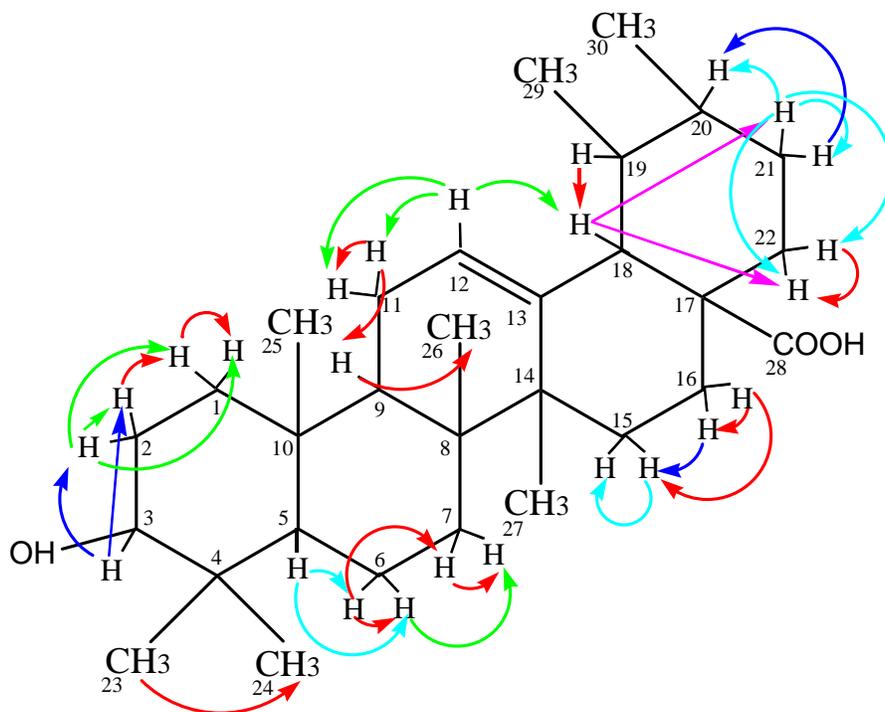


Figura 3.50. Correlações Observadas no Espectro COSY de MHFA2.

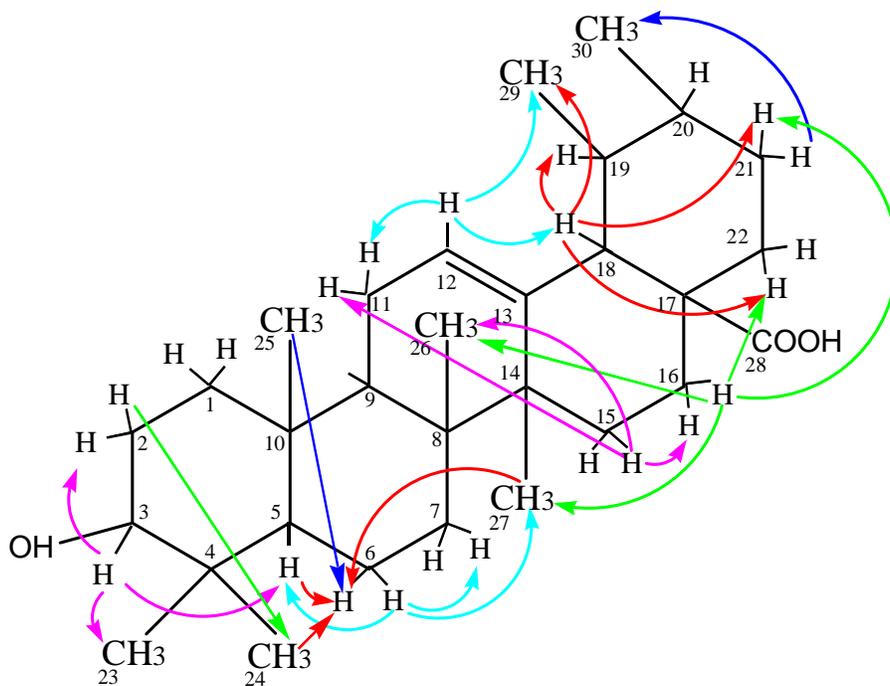


Figura 3.51. Correlações Observadas no Espectro NOESY de MHFA2.

Determinados alguns fragmentos (Figuras 3.48 e 3.49), partiu-se para definição de como estão interligados estes fragmentos através dos carbonos não hidrogenados, sendo utilizado para isso o espectro HMBC (Figuras 3.48 e 3.50), $^2\text{-}^3J_{C,H}$: Partindo-se do fragmento **a** observa-se que o C₃ (δ 78,15) está correlacionado com os hidrogênios das metilas C₂₃ (δ_H 1,23) e C₂₄ (δ_H 1,03) e, através do H-3 (δ 3,43), correlaciona com o C₄ (δ 38,24) quaternário, o qual também mostra correlação com os hidrogênios das duas metilas C₂₃ (δ_H 1,23) e C₂₄ (δ_H 1,03), que estão correlacionadas entre si (esta correlação em W também é mostrada no COSY), isto confirma que estas metilas estão no mesmo carbono, α à hidroxila; o NOESY mostra ainda que a metila C₂₃ (δ_H 1,23) está espacialmente próxima ao hidrogênio carbinólico H-3 (δ 3,43), pois há correlação do H-3 (δ 3,43) carbinólico, que se encontra na posição axial, com o H-23 (δ 1,23), na posição equatorial (estas posições são definidas no espectro de ^1H pelo sinal em δ 3,43 na forma de um duplo duplete (dd) que mostra o acoplamento do H-3 carbinólico com os hidrogênios H-2, $J^3=5,20$ Hz e $J^3=10,80$ Hz, sendo que a correlação espacial com o H-2_{eq} (δ_H 1,85) é confirmada pelo espectro NOESY); o H-5 (δ 0,99) do C₅ (δ 54,96) monohidrogenado, está correlacionado com o C₁₀ (δ 36,48) quaternário, o qual mostra correlação com o H-1 (δ 1,91) do C₁ (δ 38,35) e com os hidrogênios do C₂ (δ 26,22) e da metila C₂₅ (δ 14,75) [cujos hidrogênios também correlacionam com o C₁ (δ 38,35) e C₉ (δ 47,22)], o NOESY mostra a correlação do C₃ (δ 78,15) com o H-5 (δ 0,99), confirmando que realmente o C₅ (δ 54,96) é o carbono monohidrogenado que está ligado ao C₄ (δ 38,24). Logo, tem-se que o fragmento **a** está ligado através do C₃ (δ 78,15) ao C₄ (δ 38,24), que por sua vez está ligado às duas metilas C₂₃ (δ 27,39) e C₂₄ (δ 15,00) e ao C₅ (δ 54,96), que está ligado ao C₁₀ (δ 36,48), que se liga a metila C₂₅ (δ 14,75) e ao C₁ (δ 38,35), fechando o primeiro ciclo.

Partindo do fragmento **b**, observa-se que os hidrogênios do C₇ (δ 32,66) correlacionam com o C₈ (δ 39,07) quaternário, que mostra correlação com os hidrogênios do C₁₁ (δ 27,58) e das metilas C₂₆ (δ 16,31) e C₂₇ (δ 22,88), sendo que o C₁₄ (δ 41,63) quaternário também mostra correlação com estas mesmas metilas e ainda com um dos hidrogênios do C₇ (δ 32,66), porém vê-se que o carbono C₇ (δ 32,66) está ligado ao C₈ (δ 39,07) e não ao C₁₄ (δ 41,63), porque o C₁₄ (δ 41,63) mostra correlação com hidrogênios mais distantes, os H dos carbonos C₁₅ (δ 22,80) e C₁₈ (δ 52,54), que pertencem ao quarto ciclo, enquanto que todas as correlações

do C₈ (δ 39,07) restringem-se aos segundo e terceiro ciclos. Tem-se ainda que o C₉ (δ 47,22) está correlacionado com os hidrogênios das metilas C₂₅ (δ 14,75) e C₂₆ (δ 16,31) e também com os hidrogênios do C₁₁ (δ 27,58), C₁ (δ 38,35) e C₅ (δ 54,96) comprovando que ele é o carbono monohidrogenado pertencente ao segundo e terceiro ciclos; considerando que o C₁₀ (δ 36,48) é o único carbono quaternário que correlaciona com a metila C₂₅ (δ 14,75), cujos hidrogênios correlacionam com o carbono C₁ (δ 38,35) e C₉ (δ 47,22), assim confirma-se que esta metila está ligada ao C₁₀ (δ 36,48), e este está ligado ao C₉ (δ 47,22) [O C₁₀ (δ 36,48) também está correlacionado com o H-9 (δ 1,78) do C₉ (δ 47,22)]. Consequentemente, confirmou-se que o fragmento **b** está ligado através do C₇ (δ 32,66) ao carbono C₈ (δ 39,07), que está ligado à metila C₂₆ (δ 16,31) e ao C₉ (δ 47,22), que se liga a C₁₀ (δ 36,48) fechando o segundo ciclo.

Considerando agora o fragmento **c**, observa-se que os hidrogênios do C₁₁ (δ 27,58) estão correlacionados com o C₉ (δ 47,22) e com o C₈ (δ 39,07), e que o H-12 (δ 5,49) do C₁₂ (δ 125,13), carbono vinílico bastante desprotegido, mostra correlação com o C₁₃ (δ 137,85), altamente desprotegido, e com o carbono quaternário C₁₄ (δ 41,63), sendo que este mostra correlação com os hidrogênios das metilas C₂₆ (δ 16,31) e C₂₇ (δ 22,88). Logo, tem-se que o fragmento **c** está ligado através do C₉ (δ 47,22) ao C₈ (δ 39,07), que está ligado à metila C₂₆ (δ 16,31) e ao C₁₄ (δ 41,63), o qual se liga ao C₁₃ (δ 137,85), que se funde ao fragmento **c** através do C₁₂ (δ 125,13), fechando o terceiro ciclo.

Todas as correlações observadas nos espectros HMBC (Figura 3.49), COSY (Figura 3.50) e NOESY (Figura 3.51), que proporcionaram a determinação estrutural da substância MHFA2 (Figura 3.52), identificada como sendo um triterpeno da classe ursânica conhecido como ácido ursólico (rotação específica $[\alpha]_D^{26,6} = +242^\circ$, CHCl₃/MeOH 1:1).

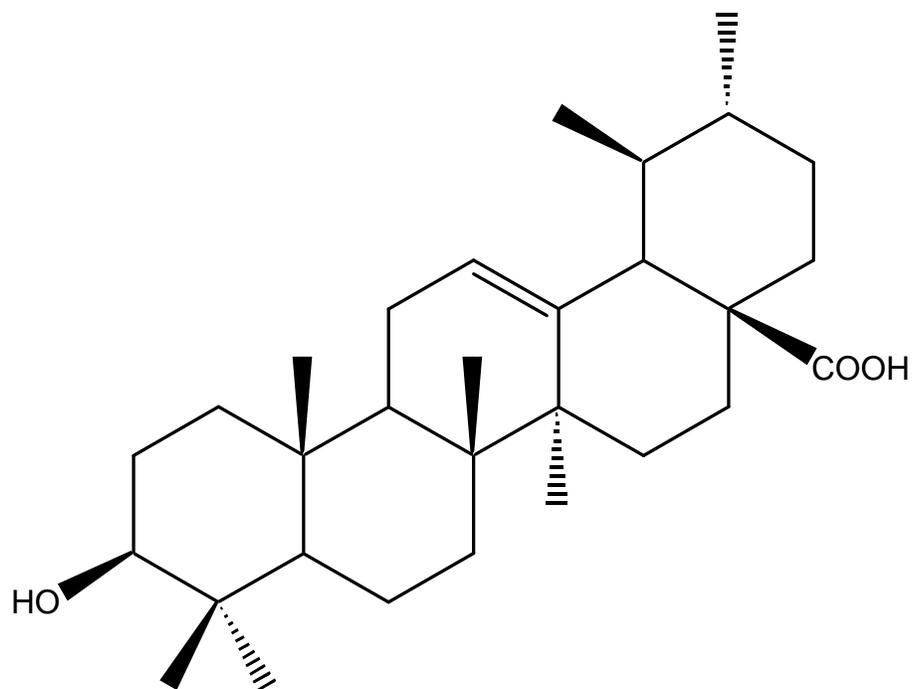


Figura 3.52. Estrutura do ácido ursólico (MHFA2).

Os valores dos deslocamentos dos sinais mostrados nos espectros unidimensionais e bidimensionais e suas respectivas correlações também constam da Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Dados de RMN ¹H, ¹³C (DEPT 90° e 135°), HSQC, HMBC, COSY e NOESY, para a Amostra MHFA2. Valores de Deslocamento Químico em ppm, Solvente CDCl₃/CD₃OD 3:1.

C13 Carbon	δC ¹³	H ¹ δH ¹	HMBC δH ¹	δHa	COSY		δHa	NOESY	
					δHb	δHb		δHb	δHb
1	CH ₂ 38,35	1,27m; 1,91m		1,19 (H-25)	1,27 (H-1); [1,91 (H-1)]	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); [1,27 (H-1); 1,26 (H-2); 1,85 (H-2)]			
2	CH ₂ 26,22	1,26m; 1,85m	1,27 (H-1); 1,91 (H-1); 3,43 (H-3)		1,26 (H-2); [1,85 (H-2)]	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); 3,43 (H-3); [1,27 (H-1); 1,91 (H-1); 1,26 (H-2); 3,43 (H-3)]	1,26 (H-2)		1,03 (H-24)
3	CH 78,15	3,43dd (J= 5,20 e 10,80 Hz)	1,91 (H-1); 1,85 (H-2); 1,23 (H-23); 1,03 (H-24)		3,43 (H-3)		1,26 (H-2); 1,85 (H-2)	3,43 (H-3)	1,85 (H-2); 0,99 (H-5); 1,23 (H-23)
4	C 38,24		3,43 (H-3); 1,80 (H-6); 1,79 (H-7); 1,23 (H-23); 1,03 (H-24)						
5	CH 54,96	0,99d			0,99 (H-5)		1,64 (H-6); 1,80 (H-6)	0,99 (H-5)	1,64 (H-6)
6	CH ₂ 17,88	1,64m; 1,80m	0,99 (H-5); 1,61 (H-7); 1,79 (H-7)		1,64 (H-6); [1,80 (H-6)]	1,80 (H-6); 0,99 (H-5); 1,79 (H-7); [0,99 (H-5); 1,64 (H-6); 1,61 (H-7)]	1,80 (H-6)	0,99 (H-5); 1,61 (H-7); 1,36 (H-27)	
7	CH ₂ 32,66	1,61m; 1,79m			1,61 (H-7); [1,79 (H-7)]	1,79 (H-7); 1,80 (H-6); [1,61 (H-7); 1,64 (H-6)]			
8	C 39,07		1,61 (H-7); 1,79 (H-7); 2,17 (H-11); 1,09 (H-26); 1,36 (H-27)						
9	CH 47,22	1,78m	1,27 (H-1); 0,99 (H-5); 1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 1,19 (H-25); 1,09 (H-26)		1,78 (H-9)	1,09 (H-26); 1,33 (H-11); 2,17 (H-11)			
10	C 36,48		1,91 (H-1); 1,26 (H-2); 1,85 (H-2); 0,99 (H-5); 1,78 (H-9); 2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 1,19 (H-25); 1,09 (H-26)						
11	CH ₂ 27,58	1,33m; 2,17m			1,33 (H-11); [2,17 (H-11)]	1,78 (H-9); 2,17 (H-11); 5,49 (H-12); [1,78 (H-9); 1,33 (H-11); 5,49 (H-12)]			
12	CH 125,13	5,49t (J=3,60 Hz)	2,17 (H-11); 2,45 (H-18)		5,49 (H-12)	1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 2,45 (H-18)	5,49 (H-12)	2,17 (H-11); 2,45 (H-18); 1,13 (H-29)	
13	C 137,85		2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 2,45 (H-18); 1,36 (H-27)						
14	C 41,63		1,79 (H-7); 5,49 (H-12); 2,18 (H-15); 2,45 (H-18); 1,09 (H-26); 1,36 (H-27)						
15	CH ₂ 22,80	1,79m; 2,18m			1,79 (H-15); [2,18 (H-15)]	2,18 (H-15); [1,79 (H-15); 1,90 (H-16); 2,27 (H-16)]	2,18 (H-15)	1,33 (H-11); 1,90 (H-16); 1,09 (H-26)	
16	CH ₂ 23,76	1,90m; 2,27m	1,33 (H-11); 2,17 (H-11); 2,45 (H-18); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)		1,90 (H-16); [2,27 (H-16)]	2,18 (H-15); 2,27 (H-16); [1,90 (H-16); 2,18 (H-15)]	2,27 (H-16)	1,88 (H-22); 1,36 (H-27); 1,60 (H-21); 1,09 (H-26)	
17	C 47,45		2,27 (H-16); 2,45 (H-18); 1,60 (H-21); 1,75 (H-21); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)						
18	CH 52,54	2,45d	2,17 (H-11); 5,49 (H-12); 1,12 (H-20); 1,88 (H-22); 1,95 (H-22)		2,45 (H-18)	1,60 (H-21); 1,88 (H-22); 5,49 (H-12); 1,21 (H-19)	2,45 (H-18)	1,21 (H-19); 1,60 (H-21); 1,88 (H-22); 1,13 (H-29)	
19	CH 38,60	1,21d	1,12 (H-20); 1,88 (H-22); 1,94 (H-22)		1,21 (H-19)		2,45 (H-18)		
20	CH 38,72	1,12d	2,45 (H-18)		1,12 (H-20)		1,60 (H-21); 1,75 (H-21)		
21	CH ₂ 30,22	1,60m; 1,75m	1,88 (H-22); 1,95 (H-22); 1,20 (H-30)		1,60 (H-21); [1,75 (H-21)]	1,12 (H-20); 1,75 (H-21); 1,88 (H-22); 1,94 (H-22); [1,60 (H-21); 1,12 (H-20)]	1,75 (H-21)	1,20 (H-30)	
22	CH ₂ 36,43	1,88m; 1,94m			2,18 (H-15)	1,60 (H-21); 1,88 (H-22); [1,94 (H-22); 1,60 (H-21)]			
23	CH ₃ 27,39	1,23s			1,03 (H-24)		1,03 (H-24)		
24	CH ₃ 15,00	1,03s			1,03 (H-24)		1,23 (H-23)	1,03 (H-24)	1,64 (H-6)
25	CH ₃ 14,75	1,19s						1,19 (H-25)	1,64 (H-6)
26	CH ₃ 16,31	1,09s			1,78 (H-9)		1,78 (H-9)		
27	CH ₃ 22,88	1,36s						1,36 (H-27)	1,64 (H-6)
28	C 180,26		2,27 (H-16); 2,45 (H-18); 1,88 (H-22)						
29	CH ₃ 16,34	1,13d (J=6,4 Hz)	2,45 (H-18); 1,21 (H-19); 1,60 (H-21)						
30	CH ₃ 20,36	1,20d (J=8,0 Hz)							

3.5.3. MHFC1a e MHFC1b

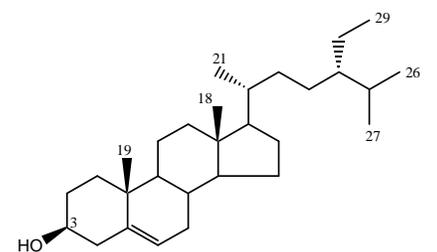
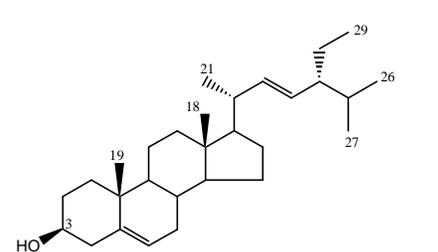
As substâncias codificadas de **MHFC1a** (componente predominante) e **MHFC1b** foram isoladas como uma mistura e identificadas como sendo os fitoesteróides β -sitosterol e estigmasterol, respectivamente, com base na interpretação dos espectros na reação do IV e RMN ^1H .

O espectro na região do IV revelou bandas de absorção de estiramento e deformação sugerindo a natureza alifática dos componentes (2936, 2866, 1465, 1381 cm^{-1}), grupo hidroxílico (3432, 1054 e 1022 cm^{-1}) e de ligação dupla (1645 cm^{-1}). O espectro de RMN ^1H , por sua vez, revelou a presença de sinais simples e múltiplos correspondentes aos hidrogênios dos grupos metílicos (vários sinais entre δ 0,96 a 0,68), de hidrogênio metílico carbinólico [δ 3,56-3,47 (m, H-3 de MHF2)] e de hidrogênios olefínicos [δ 5,05-4,97 (m, H=6) e δ 5,19-5,11 (m, H-22 e H-23)] (Tabela 3.5).

A análise do espectro de RMN ^{13}C e DEPT permitiu reconhecer a natureza dos sinais correspondentes aos átomos de carbono trihidrogenados (CH_3), dihidrogenados (CH_2), monoiidrogenados (CH) e não hidrogenados (C) referentes ao componente **MHFC1a** e, somente alguns, referentes a **MHFC1b** (Tabela 3.5). Dentre esses carbonos, ressaltam-se os valores de deslocamento químicos referentes aos carbonos sp^2 [δ 138,33 (C , C-5) e δ 121,72 (CH , C-6) de ambos componentes] e [δ 138,33 (CH , C-22) e δ 129,04 (CH , C-23) de **MHFC1b**] e do carbono sp^3 oxigenado de ambos componentes [δ 71,80 (CH , C-3)] (Tabela 3.5).

Os compostos **MHFC1a** e **MHFC1b** não foram injetados diretamente no espectrômetro de massas, uma vez que a análise por CCD revelou apenas uma mancha, quando na realidade estes compostos se dividiram em tempos de retenção diferente quando sililados e analisados em GC-MS (Figura 3.53 e 3.54) (BULL *et al.*, 2001).

Tabela 3.5. RMN das substâncias MHFC1a e MHFC1b e do Modelo da Literatura (MACARI *et al.*, 1990) em CDCl₃, deslocamento em δ.

¹ H	MHFC1a	MHFC1b	¹³ C	MHFC1a	MHFC1b
H-3	3,56-3,47 (m)	3,56-3,47 (m)	1	37,23 CH ₂	37,23 CH ₂
			2	31,63 CH ₂	31,63 CH ₂
			3	71,80 CH	71,80 CH
H-6	5,05-4,97 (m)	4,97-5,19 (m)	4	42,27 CH ₂	42,27 CH ₂
			5	138,33 C	138,33 C
			6	121,72 CH	121,72 CH
H-22, H-23	*	5,19-5,11 (m)	7	31,63 CH ₂	31,63 CH ₂
			8	31,87 CH	31,87 CH
			9	50,12 CH	50,12 CH
Me-18	0,68 s	0,68 s	10	36,14 C	36,14 C
			11	21,06 CH ₂	21,06 CH ₂
			12	39,75 CH ₂	39,75 CH ₂
Me-19	0,96 s	0,96 s	13	42,29 C	39,75 C
			14	55,91 CH	56,85 CH
			15	24,36 CH ₂	24,36 CH ₂
Me-21	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	16	28,25 CH ₂	28,93 CH ₂
			17	56,85 CH	55,91 CH
Me-26	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	18	11,85 CH ₃	11,85 CH ₃
			19	19,40 CH ₃	19,97 CH ₃
Me-27	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	20	36,14 CH	40,52 CH
			21	18,97 CH ₂	21,21 CH ₂
Me-29	0,91-0,78 sl	0,91-0,78 sl	22	31,87 CH ₂	138,33 CH
			23	23,01 CH ₂	129,04 CH
			24	45,82 CH	51,23 CH
			25	29,11 CH	29,71 CH
			26	19,83 CH ₃	21,06 CH ₃
			27	18,77 CH ₃	18,97 CH ₃
			28	23,06 CH ₂	25,39 CH ₂
			29	11,85 CH ₃	12,26 CH ₃

Os dados espectrais discutidos, associados à análise comparativa dos dados espectrais dos respectivos compostos descritos na literatura permitiram identificar os componentes **MHFC1a** e **MHFC1b** como sendo o β-Sitosterol (**15**) e o estigmasterol (**16**), respectivamente.

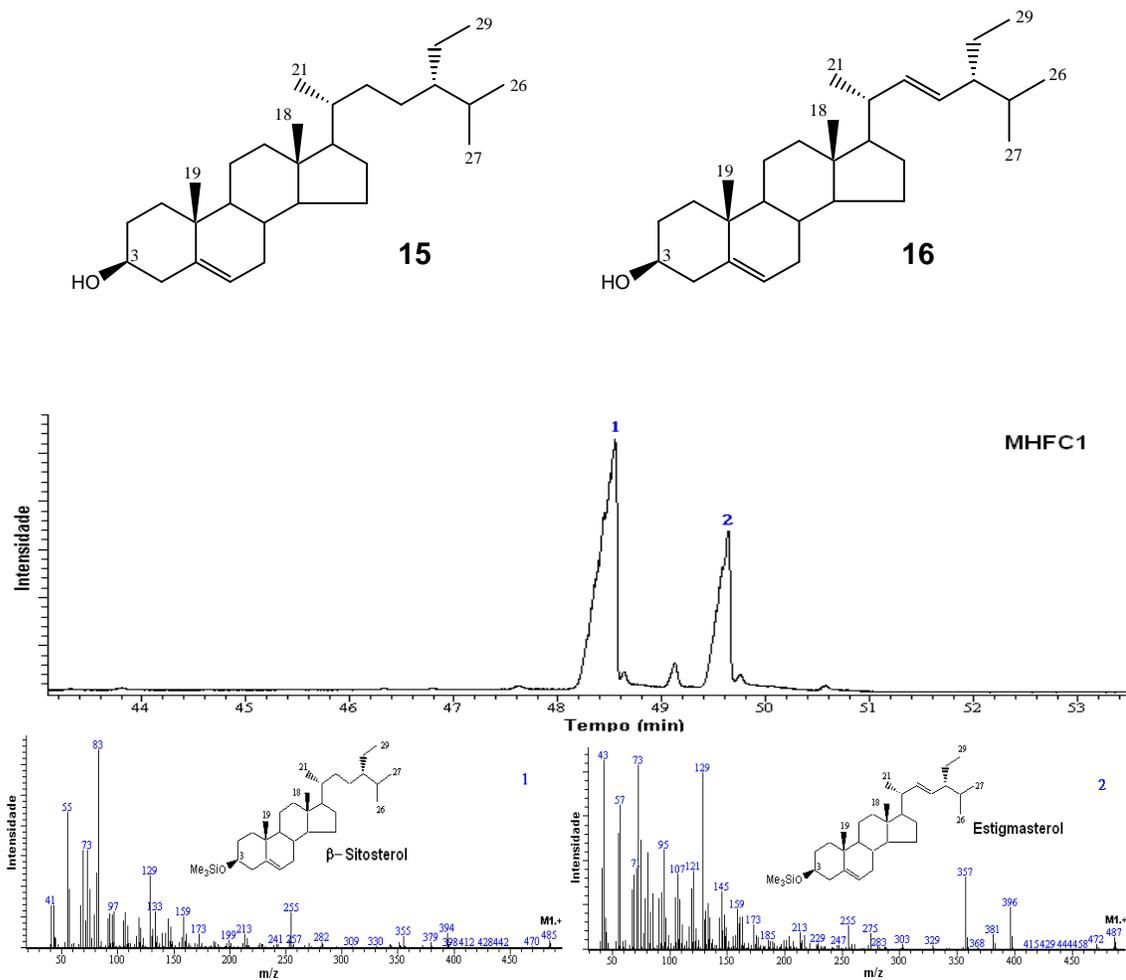


Figura 3.53. Cromatograma dos compostos β -sitosterol e estigmasterol e espectro de massas.

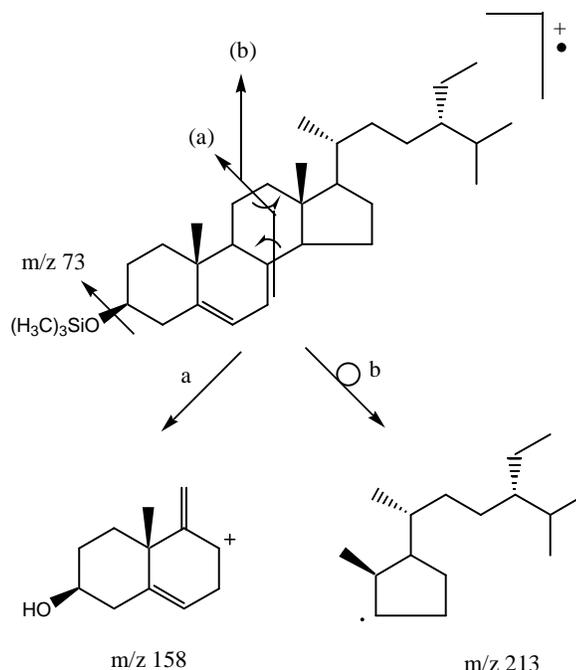


Figura 3.54. Principais fragmentos no espectrômetro de massas do β-sitosterol (MHFC1a) e estigmasterol (MHFC1b).

3.5.4. MHFC2

A substância codificada de **MHFC2** apresentou-se como um sólido branco, de ponto de fusão 176-178 °C (MeOH). Sua natureza triterpenóica foi sugerida por esta apresentar coloração rósea avermelhada frente ao reagente de Liebermann-Buchard e coloração violeta em solução ácida de sulfato cérico.

O espectro de absorção do infravermelho obtido em KBr, revelou bandas de absorção indicativas da presença de grupo hidroxila (3375 e 1043 cm^{-1}) e de grupos alquila saturados (2943 , 2870 , 1454 e 1380 cm^{-1}). O espectro de RMN ^1H em CDCl_3 a 300 MHz revelou sinais, cujos valores de deslocamentos químicos e multiplicidades estão consistentes com a presença de seis grupos metila terciários [$(\delta\ 1,67, 30\text{H (s)}, \delta\ 4,67\text{ (d, J = 2,4 Hz)}$ e $4,55\text{ (d, J = 2,4 Hz)}$] para um hidrogênio cada, de hidrogênio metílico carbinólico [$\delta\ 3,21, 1\text{H (m)}$].

O espectro de massa obtido por impacto eletrônico a 70 eV (Figura 3.55) em espectrômetro de baixa resolução, forneceu o pico do íon molecular de $m/z\ 426$ (38%), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{O}$, e o pico base de $m/a\ 218$, que sugere fragmentação envolvendo a reação do tipo retro Diels Alder em triterpeno

pentacíclico da série lupano. Acompanhado de dois fragmentários em m/z 203 (23%), 190 (12%) e 189 (71%) dentre outros de menores intensidades (Figura 3.56).

A substância **MHFC2** foi assim identificada como sendo o triterpenóide pentacíclico da série lupano, denominado 3 β -hidroxi-lup-20(29)-ene (**17**), conhecido como lupeol. De acordo com os dados espectrais discutidos e comparação destes com os descritos na literatura e com uma amostra autêntica (Tabela 3.6).

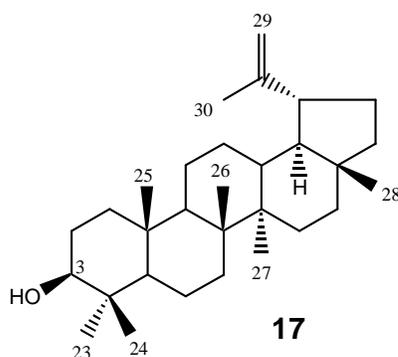


Tabela 3.6. RMN da substância MHF2 e do Modelo da Literatura modelo do lupeol (MAHATO E KUNDU, 1994) em CDCl₃, deslocamento em δ .

¹ H	MHFC2	Lupeol
H-3	3,21-3,16 (m)	3,21 -3,16 (m)
H-19	2,42-2,29 (m)	2,42-2,29 (m)
H-29a	4,67 (d, J = 2,4 Hz)	4,66 (d, J = 2,2 Hz)
H-29b	4,55 (d, J = 2,4 Hz)	4,54 (d, J = 2,2 Hz)
Me-23	0,75 s	0,76 s
Me-24	0,78 s	0,92 s
Me-25	0,82 s	0,80 s
Me-26	0,93 s	1,01 s
Me-27	0,96 s	0,94 s
Me-28	1,02 s	0,74 s
Me-30	1,67 s	1,65 s

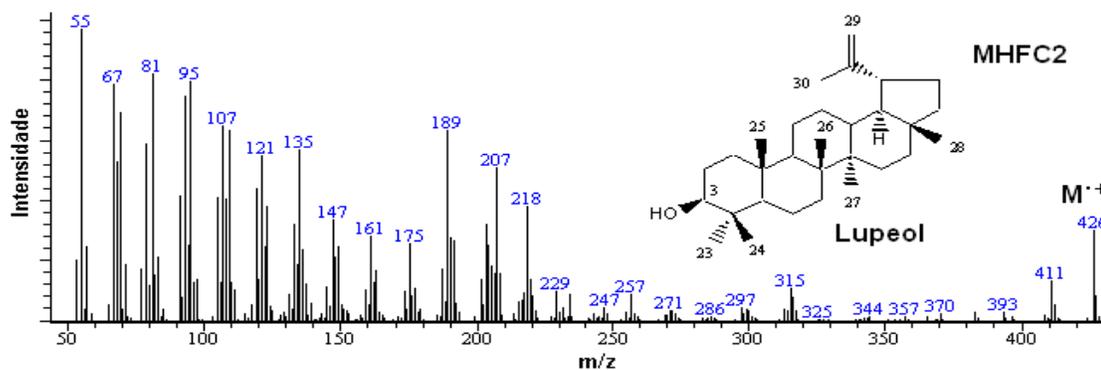


Figura 3.55. Fragmentograma da amostra MHFC2.

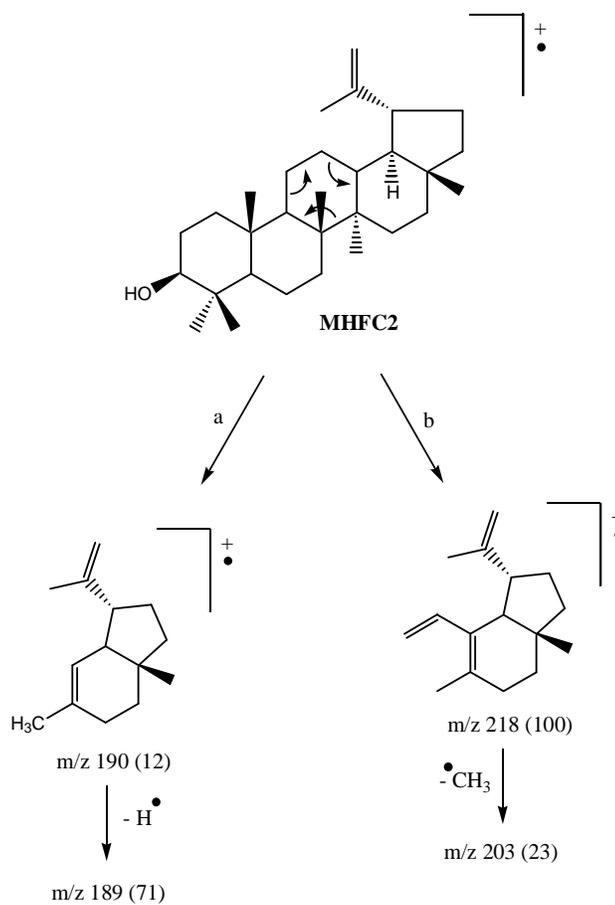


Figura 3.56. Principais fragmentos no espectrômetro de massas do lupeol (MHFC2) entre parênteses estão às intensidades relativas.

3.6. METABOLÔMICA DA *M. hirsuta*

O Brasil apresenta 55 mil espécies vegetais catalogadas, o que corresponde a uma parte significativa da diversidade vegetal do mundo (SIMÕES *et al.*, 2000). Dentro deste contexto se destaca o Semi-Árido brasileiro, que é uma região bastante populosa principalmente constituída de indivíduos que muitas vezes não tem acesso aos serviços básicos de saúde e que, por isso, utilizam as plantas como recurso principal no tratamento de doenças.

As plantas da família Bignoneaceae são frequentemente encontradas e usadas pela população do Semi-Árido para este fim, sendo que uma vez que várias espécies desta família apresentam atividades biológicas importantes como antinociceptiva e antiinflamatória em *Catalpa bignonioides* Walt (MUNOZ-MINGARRO *et al.*, 2003), antimicrobiana em *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (LIMA *et al.*, 2003), *Tabebuia aurea* (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2004) e *T. impetiginosa* (PEREZ & ANESINI, 1994), antimalárica em *Tabebuia aurea* (SILVA & QUEIROZ, 2003), antiviral em *Tabebuia impetiginosa* (SIMÕES *et al.*, 1999) citotoxicidade para células de tumor pulmonar da linhagem NCIH-292 em *Melloa quadrivalvis* (Jacq.) A.H. Gentry (LIMA *et al.*, 2005) e atividade antitumoral contra células da linhagem 38 de carcinoma de cólon e P-388 de leucemia (SUFFNESS *et al.*, 1988), o que justifica a necessidade da análise do perfil metabolômico das espécies desta família, dentre elas a *M. hirsuta*.

A *M. hirsuta* pode ser encontrada em várias localidades no Semi-Árido nordestino como as regiões escolhidas no presente estudo (Campo Alegre de Lourdes, Gentio de Ouro, Morro do Chapéu, Boninal e Caetité). Embora seja quimicamente pouco conhecida, ela apresentou atividade imunomoduladora e redutora do radical NO, como visto anteriormente. Por isso, ela foi escolhida para o estudo metabolômico, uma vez que o mesmo permite estabelecer correlações entre várias variáveis (tipo de solo, constituição química, relevo, meio ambiente, etc) com a atividade biológica apresentada, de modo a selecionar plantas com a melhor atividade possível.

A partir da similaridade metabolômica obtida a partir da PCA, as 5 populações de *M. hirsuta* foram divididas em cinco grandes grupos. A Figura 3.57 mostra o resultado da PCA para as amostras das cinco regiões pesquisadas, sendo que os

dados permitiram estabelecer que dois componentes são responsáveis por 57,40% da variação das espécies, sendo 18,5% da variância ao longo do eixo Y causada pelo componente 2 e 38,9% da variância no eixo X causada pelo componente 1. Foi possível observar a separação das espécies em regiões mais ou menos definidas, embora sobreposições tenham sido observadas, bem como a separação dos indivíduos dentro de uma mesma região, o que pode ser atribuído à coleta de plantas em idades distintas, pois o trabalho objetivou apenas visualizar a influência de alguns fatores geográficos no metabolismo desta espécie.

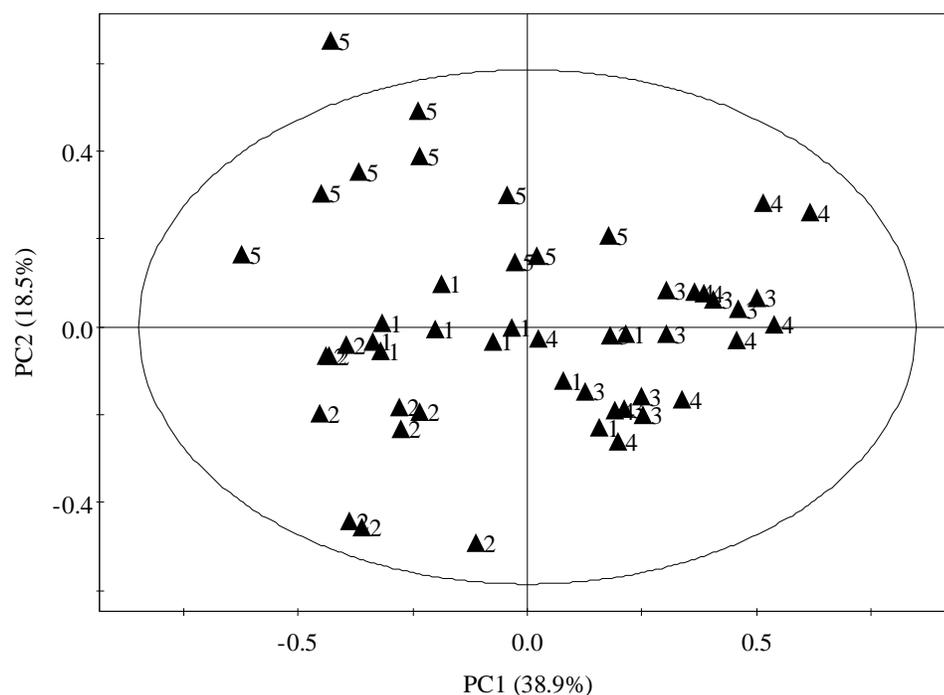


Figura 3.57. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo PCA. ▲1: Campo Alegre de Lourdes, ▲2: Gentio de Ouro, ▲3: Morro do chapéu, ▲4: Boninal e ▲5: Caetité.

Uma vez que o padrão de separação mostrou a sobreposição de espécies na mesma área, as análises subsequentes levaram em consideração variáveis secundárias tais como as características geográficas. Para tanto, foi usada a PLS-DA que permitiu a separação mais acentuada das plantas em cinco regiões bem definidas, como pode ser visto na Figura 3.58, o que é indicativo de que plantas de uma determinada região apresentam metabolismo particular, com pelo menos dois

componentes principais que as definem e que ajudam a diferenciá-las de espécies de outra região de coleta. A variação total observada para os dois componentes foi de 42%, sendo que 18.9% da variância ao longo do eixo Y foi causada pelo componente 2 e 23.1% da variância no eixo X causada pelo componente 1.

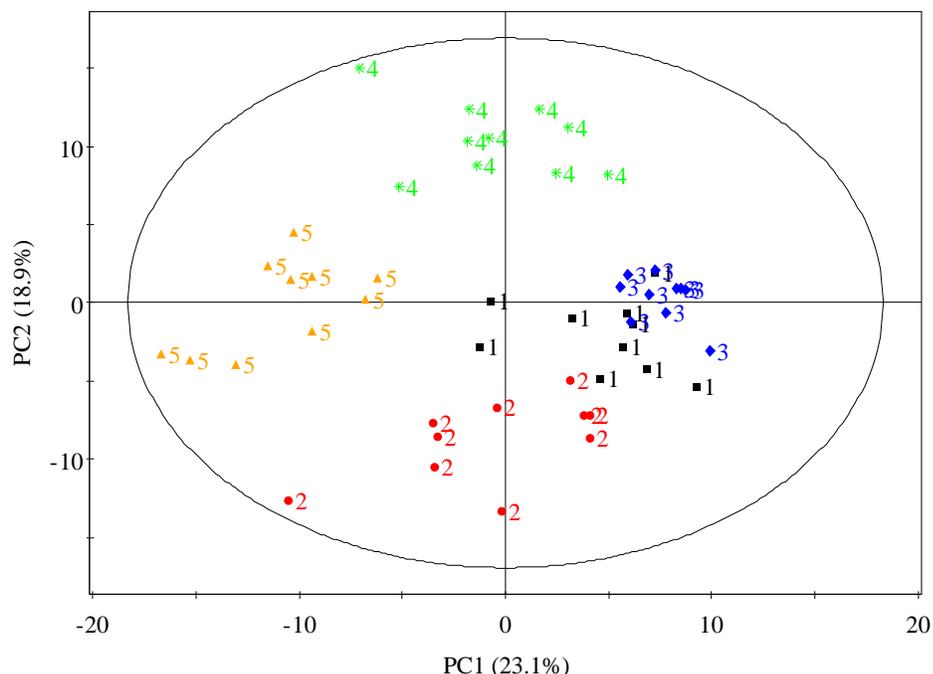


Figura 3.58. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo de PLS-DA. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ●2: Gentio de Ouro, ◆3: Morro do chapéu, *4: Boninal e ▲5: Caetité.

Os extratos brutos metanólicos de *M. hirsuta* foram submetidos à ^1H RMN e posteriormente agrupados de acordo com a PLS-DA. Para identificar as substâncias nos espectros ^1H RMN, os sinais ocorrendo nas diferentes regiões do espectro foram utilizados para classificar os tipos de metabólitos secundários presentes nos mesmos. A Figura 3.59 mostra um espectro de um dos extratos brutos de *M. hirsuta*. Em geral, os sinais em δ 0,5-3,0 são atribuídos a prótons alifáticos dos grupos metil (CH_3 -), metileno (CH_2 -) e metino (CH -) típicos de compostos não aromáticos, indicando que os extratos apresentavam uma alta concentração dos mesmos. Embora presentes, os sinais dos compostos aromáticos tiveram pouca intensidade.

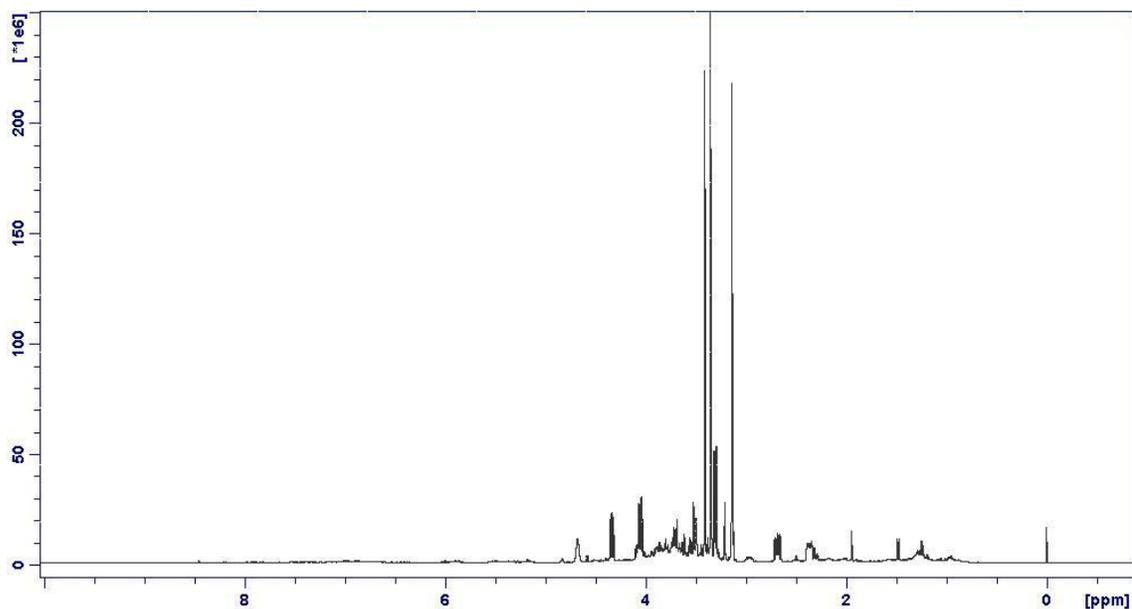


Figura 3.59. Espectro de ^1H RMN de um dos extratos brutos de *Mansoa hirsuta*.

A Figura 3.60 mostra a distribuição dos deslocamentos químicos observados para os principais metabólitos nos extratos. Os escores em vermelho indicam as regiões e ao seu redor estão os picos que se diferenciam entre uma região e outra. A correlação entre os valores de δ dos espectros de ^1H RMN na Figura 3.60 e os dados da Figura 3.58 permite estabelecer que as plantas da região de Gentio de Ouro (Figura 3.58, PC1 entre -10 e +10 e PC2 -10), por exemplo, são ricas em triterpenos e esteróides.

A fim de lidar com o congestionamento de sinais observado na Figura 3.60, foram empregadas técnicas bidimensionais de RMN. Apesar de ^1H RMN ser considerada uma promissora ferramenta analítica para investigação metabolômica, alguns problemas podem ser encontrados quando da aplicação desta técnica, dentre eles a sobreposição de sinais. Neste caso, o congestionamento de sinais pode ser resolvido aplicando diversas técnicas bidimensionais de RMN-2D, como foi aplicado para a resolução dos metabólitos nos extratos das populações de *M. hirsuta*. Dentre as técnicas empregados, a 2D- ^1H - ^1H -J-resolvido mostrou eficiência e robustez do sinal em diversas aplicações de metabolômica (VIANT, 2003; CHOI *et al.*, 2006).

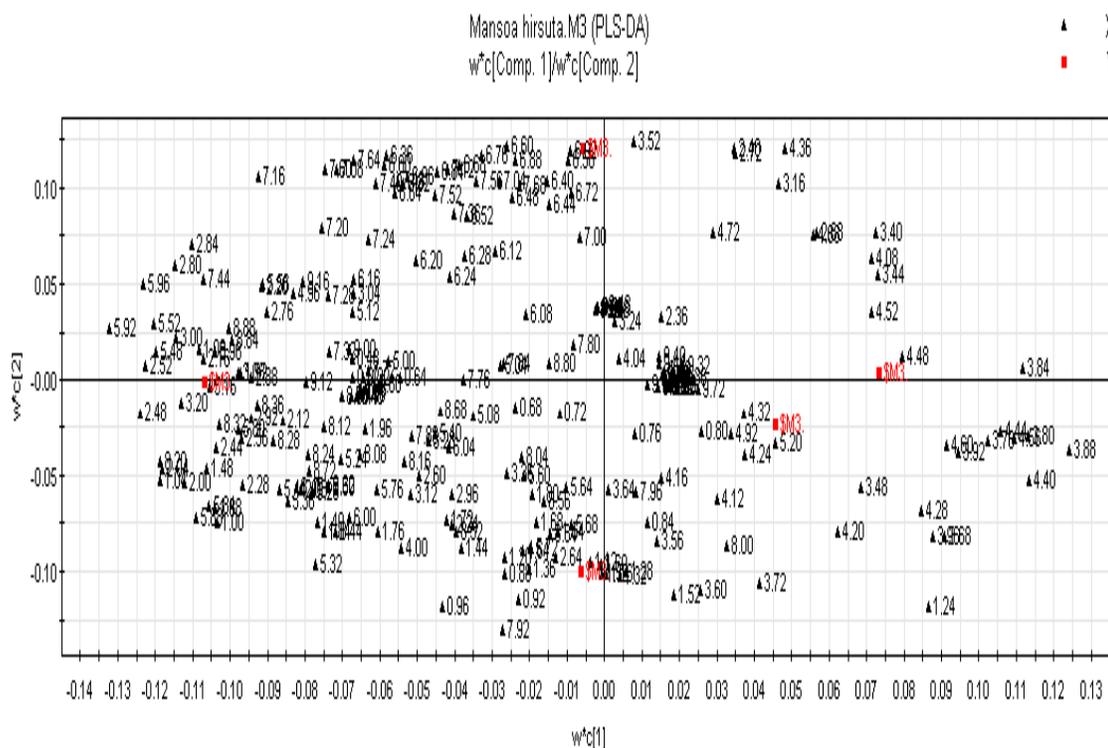


Figura 3.60. Distribuição e agrupamento dos sinais de ^1H RMN para os dois componentes principais no modelo de PLS-DA.

No escore relativo à região de Gentio de Ouro (Figuras 3.58 e 3.60) observa-se deslocamentos químicos relativos à triterpenos pentacíclicos (ácidos ursólico e oleanólico) e esteróides, caracterizados pelos sinais referentes à região blindada entre δ 1,03-1,36 ppm referentes aos prótons de grupos metila (CH_3 -) ligados a carbono não hydrogenado (2 dupletos, δ 1,13 ppm e $J = 6,4$ Hz e δ 1,20 ppm e $J = 8,0$ Hz), que foi confirmado no J -resolvido (Figuras 3.60 e 3.61). O hidrogênio carbinólico dos triterpenos pentacíclicos foi caracterizado pela presença de um duplo duplete em δ 3,56 ppm ($J = 5,20$ Hz e 10,80 Hz, Figura 3.60 e 3.62). Os deslocamentos químicos relativos aos esteróides estigmasterol e β -sitosterol são simpletos na região de δ 0,68-0,92 ppm (Figura 3.60 e 3.63), e no caso do lupeol em uma região mais ampla indo de δ 0,68 a 1,68 ppm (Figura 3.60 e 3.63). Os demais sinais relativos a estas substâncias podem ser conferidos nos espectros de MHAF1, MHAF2, MHFC1a, MHFC1b e MHFC2, conforme visto anteriormente.

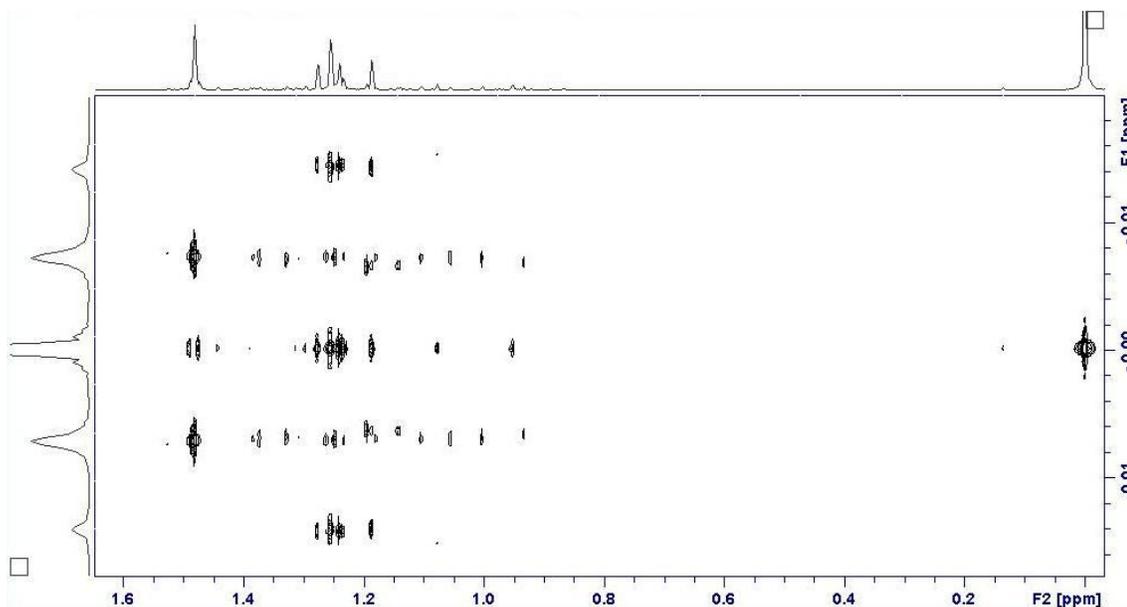


Figura 3.61. Espectro ¹H-¹H J-resolvido bidimensional de *M. hirsuta* na região δ 0-1.6 ppm característicos de triterpenos e esteróides.

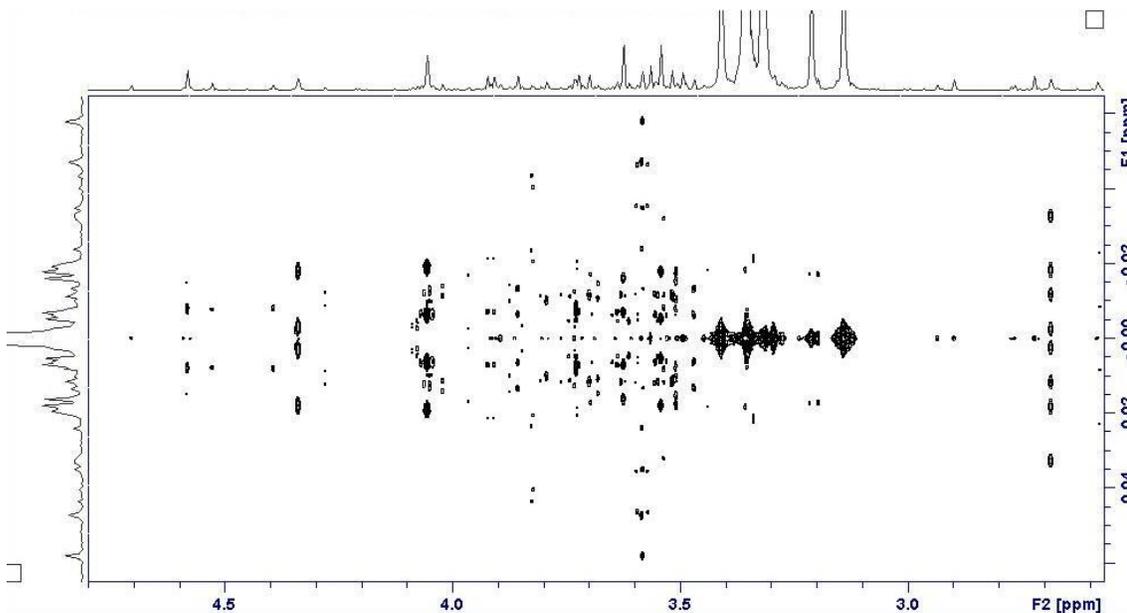


Figura 3.62. Espectro ¹H-¹H J-resolvido bidimensional de *M. hirsuta* na região δ 2,2-4,7 ppm característicos de triterpenos e esteróides.

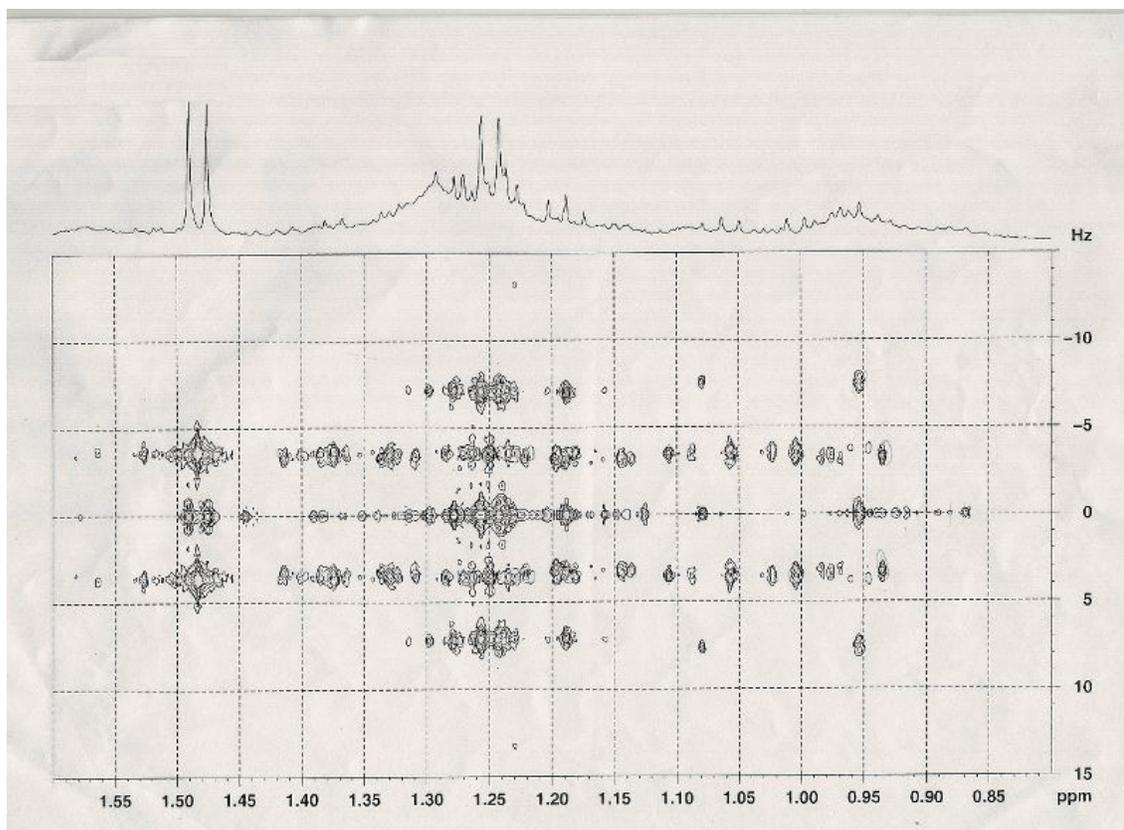


Figura 3.63. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional de *M. hirsuta* na região δ 0-1.6 ppm contendo simpletos característico de esteróides como estigmasterol e β -sitosterol.

No escurecimento relativo à região de Boninal (Figuras 3.58 e 3.60) observa-se δ possivelmente relacionados à flavonóides, uma vez que estes compostos foram detectados pela presença no escurecimento relativo a esta região de uma grande quantidade de sinais com δ 6-8 ppm (Figura 3.60). O espectro J-resolvido (Figura 3.64) evidencia os sinais cujos valores de δ , multiplicidades e constantes de acoplamento estão compatíveis com o esqueleto de flavonóides substituídos nos anéis A (Figura 3.65), na posição 5, 6, 7 e 8 (δ 6,78 e 6,72, simpletos) e anéis B do tipo 1,4-dissubstituídos (δ 7,66, 7,84 e 6,81, dupletos) de acordo com o descrito na literatura para metoxiflavonas previamente isoladas de Bignoniaceae (KUTNEY & HANSEN, 1971; BASTOS *et al.*, 2009).

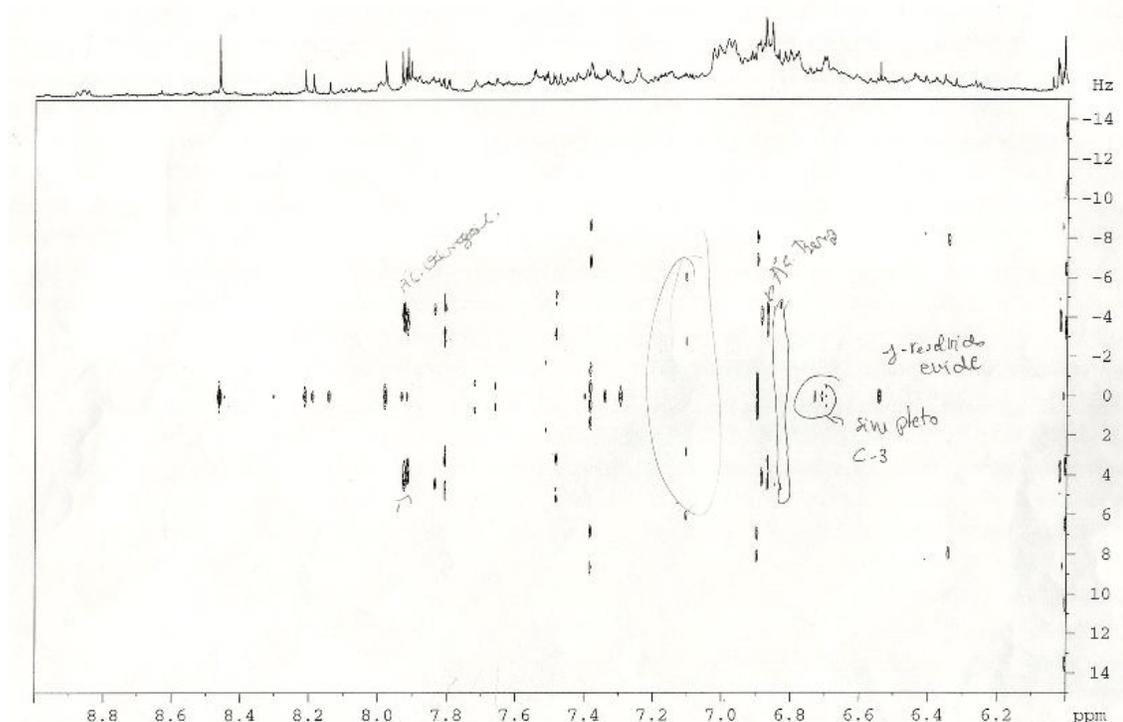


Figura 3.64. Espectro ^1H - ^1H J-resolvido bidimensional da *M. hirsuta* de Boninal na região de aromáticos característica de flavonóides.

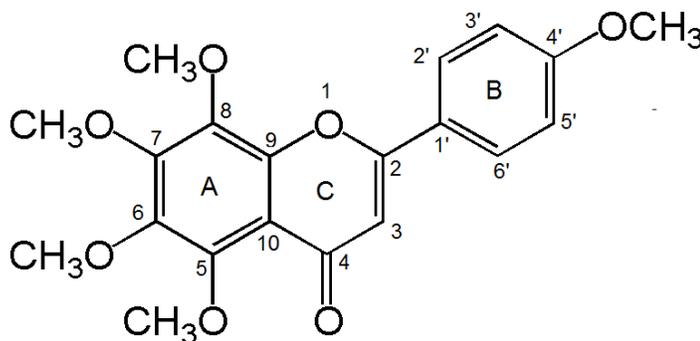


Figura 3.65. Estrutura da tangeritina, uma metoxiflavona 5,6,7,8-substituída no anel A e 1', 4'-dissubstituída no anel B.

No escorrelativo à região de Caetitê (Figuras 3.58 e 3.60), os δ encontrados sugerem a presença de taninos do tipo proantocianidinas (Figura 3.66) tais como catequina e epicatequina, como previamente descrito para a *M. hirsuta* por CAMPANA *et al.* (2009). Os δ na região entre 5,0 e 6,0 são característicos de prótons aromáticos no anel A e o próton residual no anel D, enquanto a região com δ entre 6,5-7,5 é característica dos prótons localizados nos anéis B e E como descrito por APPELDOORN *et al.* (2009). Estes dados estão de acordo com o observado

para estas regiões no espectro *J*-resolvido, que mostra a presença de dupletos e simpletos característicos dos sinais acima.

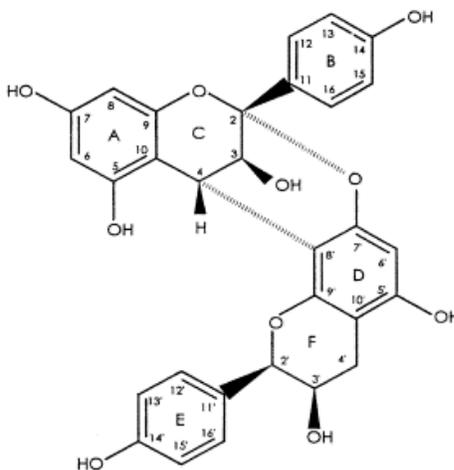


Figura 3.66. Estrutura geral de uma protoantocianidina (RAWAT *et al.*, 1999).

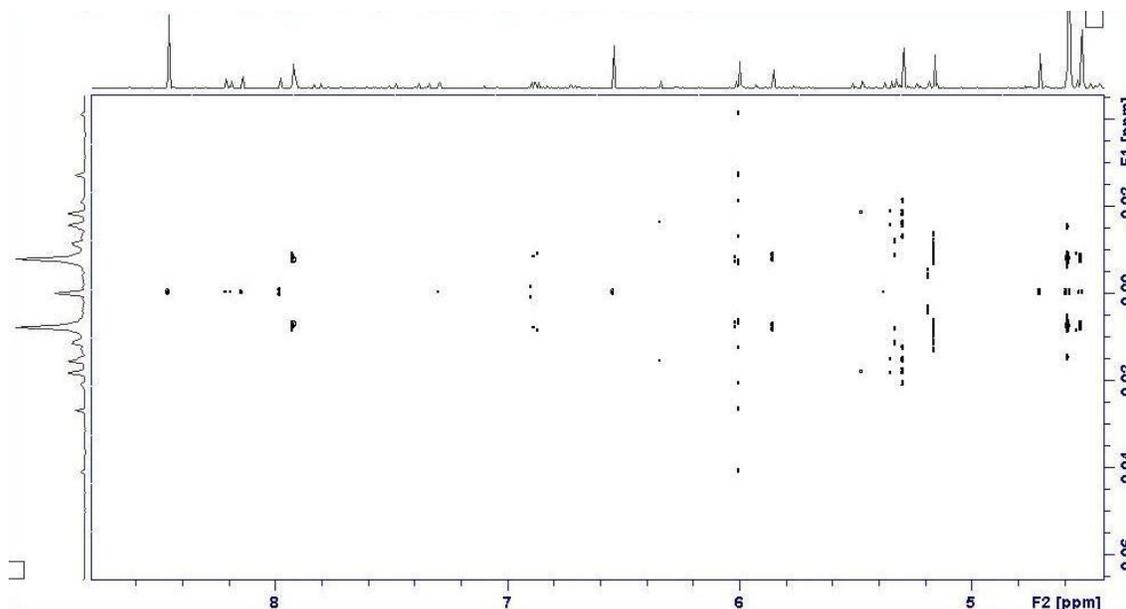


Figura 3.67. Espectro ^1H - ^1H *J*-resolvido bidimensional da *M. hirsuta* de Boninal na região de aromáticos característica de flavonóides.

O escore referente à região de Campo Alegre de Lourdes (Figuras 3.58 e 3.60) mostra-se rico em sinais característicos de prótons anoméricos de saponinas (δ 0,6-1,4 ppm) e dos prótons de oligossacarídeos (3,5-4,5 ppm). Os escores para a região de Morro do Chapéu, por sua vez, mostraram que esta região é pobre em

sinais para metabólitos secundários, apresentando apenas sinais na região dos oligossacarídeos e aminoácidos.

A partir da análise dos espectros 1D, 2D e do PLS foi possível identificar os compostos do metabolismo primário cuja variância contribui para PC1 e PC2. São eles glicose (formas α e β), os aminoácidos asparagina e alanina e o ácido málico, como pode ser visto na Tabela 3.7, cujos dados estão de acordo com o encontrado na literatura (LIANG *et al.*, 2006; MANNINA *et al.*, 2008).

Tabela 3.7. Deslocamentos químicos característicos dos metabólitos primários selecionados de *M. hirsuta* detectados a partir da análise do PLS e espectros RMN 1D e 2D.

Metabólitos	δ (PPM)	Multiplicidade	J (Hz)	Prótons	Região
Glicose	3,60-3,83	<i>M</i>	4,34 e 2,51		Campo Alegre de Lourdes e Morro do Chapéu
	3,80-3,89	<i>2 d</i>	1,85		
	4,57-4,59	<i>D</i>	7,80	H-1 β	
	5,18-5,19	<i>D</i>	3,80	H-1 α	
Asparagina	2,85-2,90	<i>Dd</i>	17.0 e 7.6	H-2	Gentio de Ouro e Caetité
		<i>Dd</i>	17.0 e 4.3	H-2'	
	3,95	<i>M</i>	-	H-1	
Alanina	1,49	<i>D</i>	7,20	H-3	Gentio de Ouro
	3,70	<i>M</i>	-		
Ácido málico	2,70	<i>Dd</i>	16,6 e 4,7	H-3 α	Caetité.
	2,80	<i>Dd</i>	16,6 e 6,6	H-3 β	
	4,50	<i>Dd</i>	6,6 e 4,7	H-2	

Da similaridade metabolômica obtida a partir do PCA e PLS-DA 2D, as plantas das diferentes regiões de coleta foram agrupadas. Entretanto, este agrupamento pode ser observado somente do ponto de vista visual porque ambas as técnicas objetivam a separação de cada amostra individual pela variância máxima. Conseqüentemente, o uso de mais variáveis Y é necessário para confirmar o agrupamento de *M. hirsuta*. Para tanto, as amostras foram analisadas por PLS-DA 3D, que permite usar mais que dois componentes, no nosso caso PC1, PC2 e PC3,

para uma melhor visualização dos diferentes perfis metabolômicos, como pode ser visto na Figura 3.68, com uma variância de 56,49%. As plantas coletadas de cinco regiões diferentes claramente podem ser classificadas em quatro grupos distintos, como pode ser visto na Figura 3.69. O dendograma permitiu separar dois grandes grupos: um que é composto pelas regiões 4 e 5, e outro com as regiões 1, 2 e 3, que ainda se subdividem em mais dois grupo um composto pela região 2, e o outro com as regiões 1 e 3. Com base na discussão anterior, os grupos 4 e 5 são ricos em compostos aromáticos (flavonóides e protoantocianidinas, respectivamente), enquanto o segundo grupo formado pelas regiões 1, 2 e 3 é rico em triterpenos pentacíclicos, esteróides e saponinas.

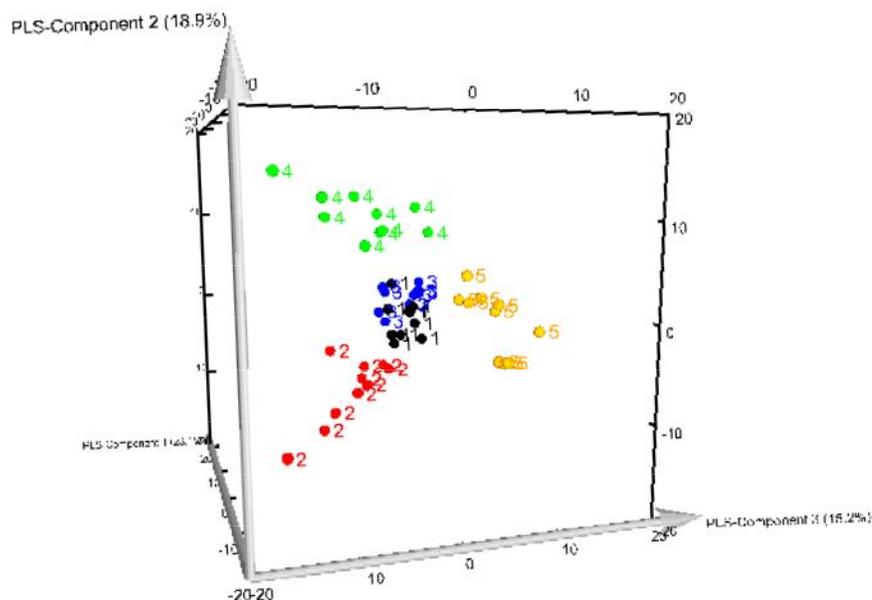


Figura 3.68. Distribuição e agrupamento das regiões de coleta para os dois principais componentes no modelo PSL-DA 3D. ●1: Campo Alegre de Lourdes, ●2: Gentio de Ouro, ●3: Morro do chapéu, ●4: Boninal e ●5: Caetité.

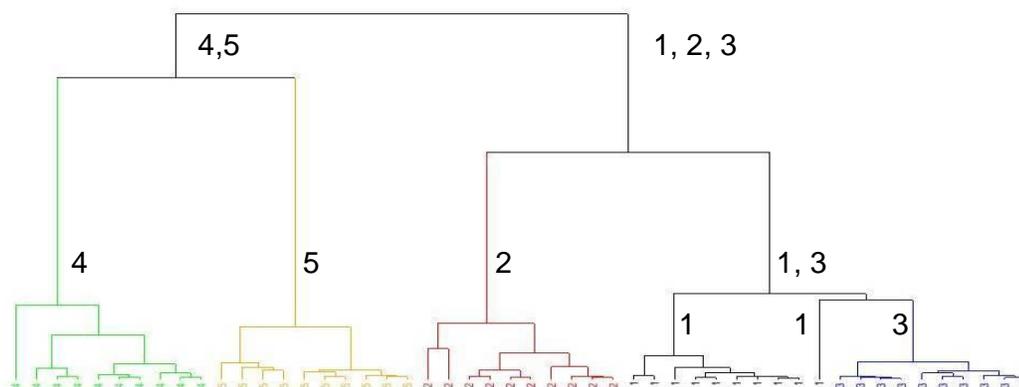


Figura 3.69. Dendrograma dos resultados da PLS-DA para os espécimes de *M. hirsuta* coletados em diferentes regiões. 1 Campo Alegre de Lourdes, 2 Gentio de Ouro, 3 Morro do Chapeu, 4 Boninal e 5 Caitité.

As Figuras 3.70 e 3.71 exibem o agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com o ambiente, isto é, caatinga ou caatinga arbustiva, o que permite visualizar os metabólitos que são diferentes entre as amostras levando em consideração os ambientes citados. As plantas das regiões 1 e 2 (Caatinga arbustiva) estão agrupadas na região positiva em relação a PC1, cujos δ conferem com aqueles das classes de terpenos pentacíclicos, esteróides e saponinas, enquanto as plantas provenientes das regiões 3, 4 e 5 (Caatinga) foram agrupadas na região negativa em relação a PC1, cujos δ são atribuídos a aminoácidos, oligossacarídeos e compostos aromáticos (flavonóides e protoantocianidinas).

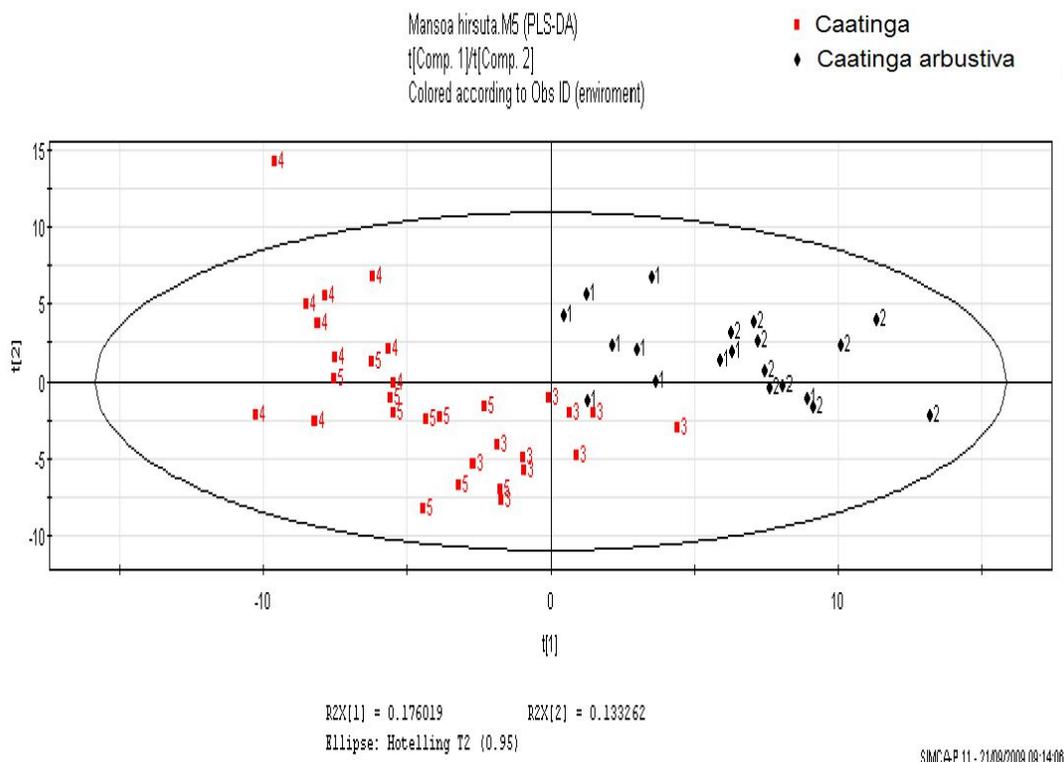


Figura 3.70. Distribuição e agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com os ambientes de coleta. ◆1: Campo Alegre de Lourdes, ◆2: Gentio de Ouro, ■3: Morro do chapéu, ■4: Boninal e ■5: Caetité.

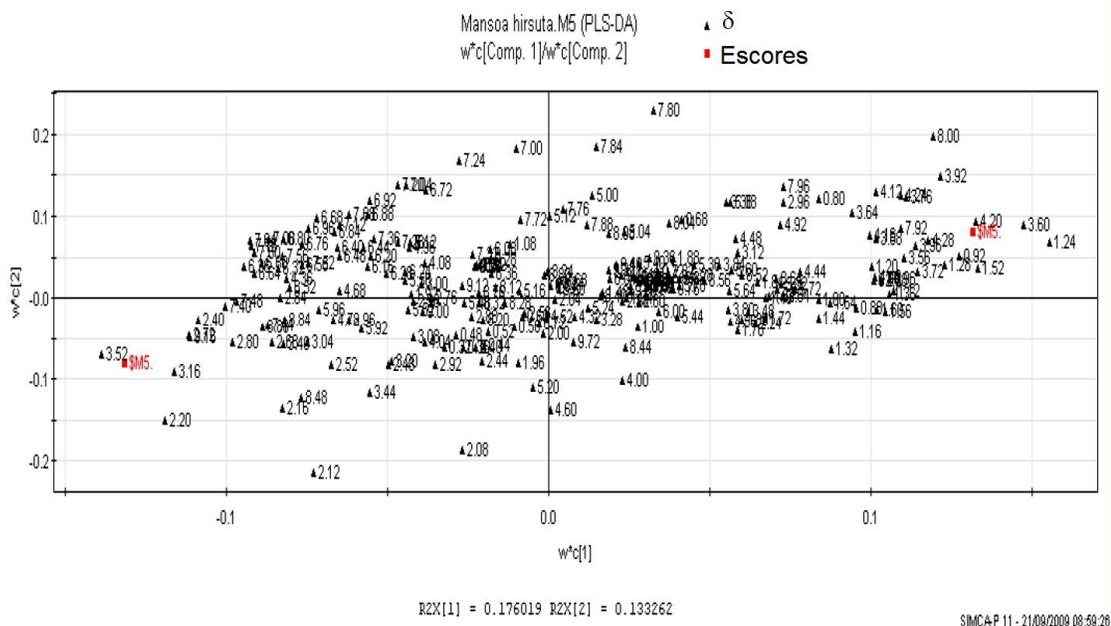


Figura 3.71. Distribuição e agrupamento dos sinais de ^1H RMN de acordo com o ambiente.

Levando em consideração o tipo de solo, os espécimes de *M. hirsuta* foram separados em três classes (Figura 3.72), sendo que as plantas das regiões 1 e 2 estão agrupadas na região positiva em relação a PC1, sendo caracterizada pelos δ de terpenos, esteróides e saponinas (Figura 3.73). A região 4 coletada em um solo muito arenoso está agrupada em uma região negativa em relação a PC1, que é caracterizada pelos δ de compostos aromáticos. As espécimes de plantas coletadas nas regiões 3 e 5 coletadas em solo argilo-arenoso estão localizadas na região positiva em relação a PC2 e são caracterizadas pelos δ referentes a oligossacarídeos e aminoácidos (Figura 3.73).

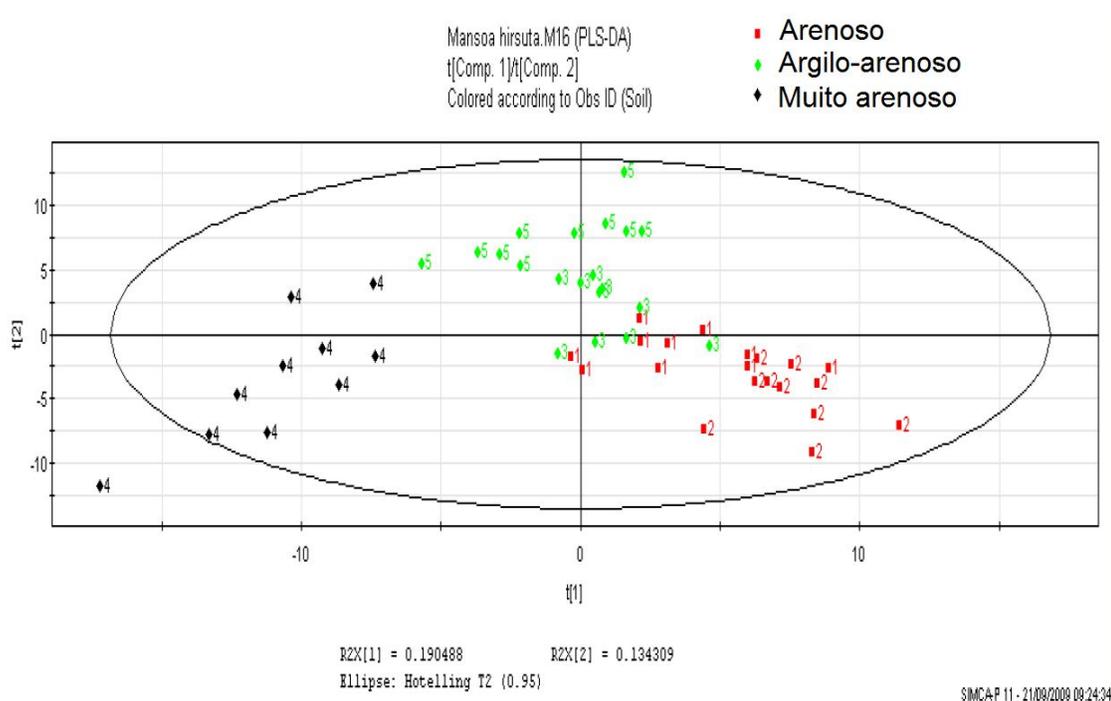


Figura 3.72. Distribuição e agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com os tipos de solo. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ■2: Gentio de Ouro, ◆3: Morro do chapéu, ◆4: Boninal e ◆5: Caetité.

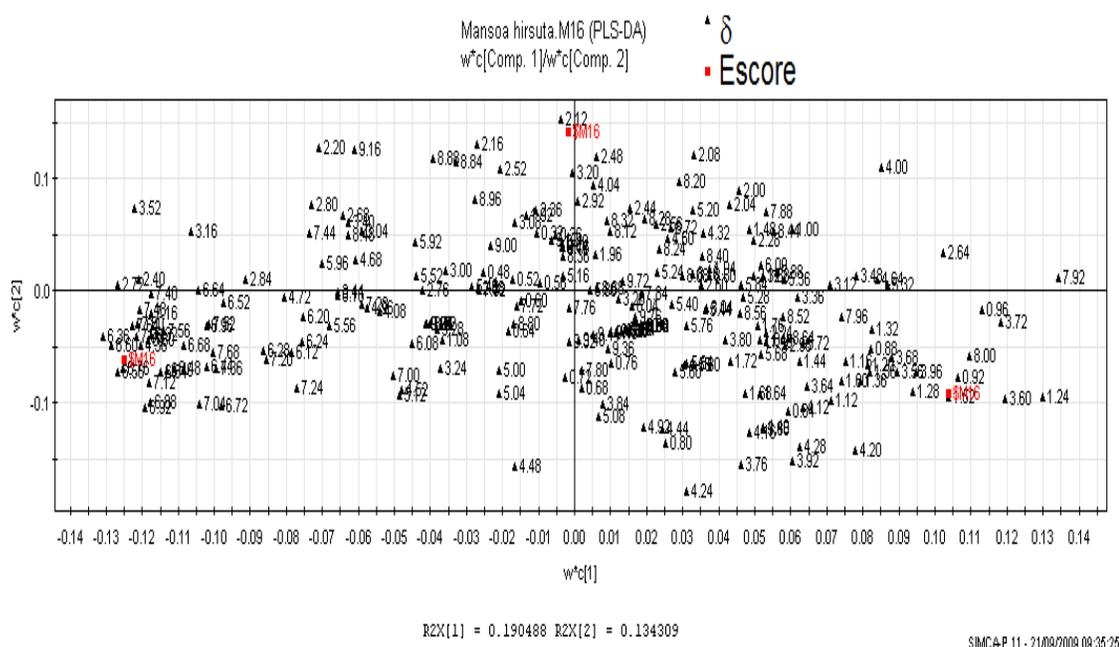
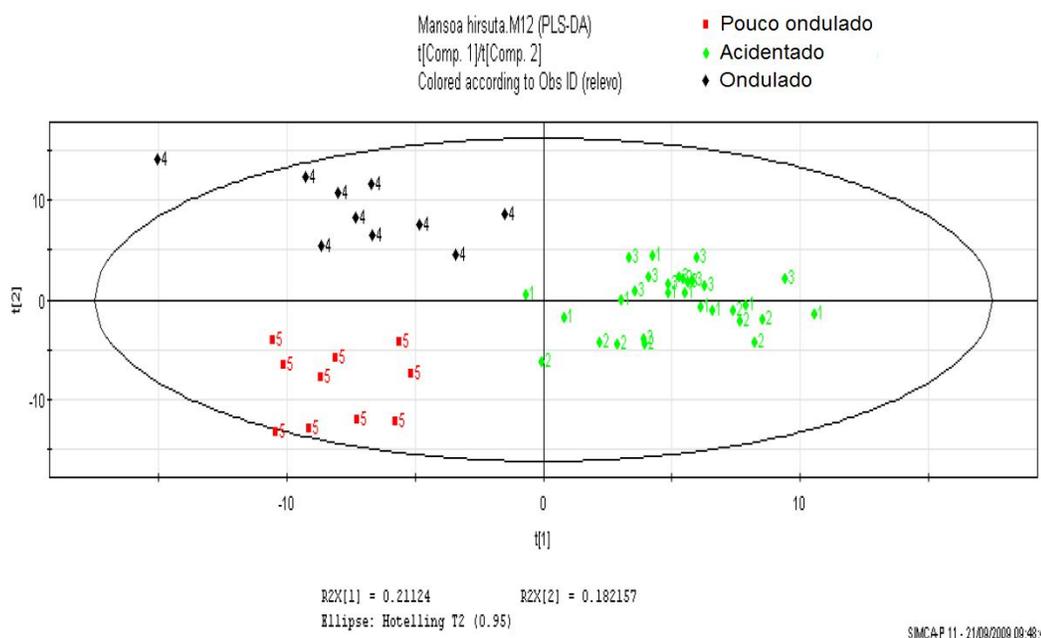


Figura 3.73. Distribuição e agrupamento dos sinais de ¹H RMN de acordo com o tipo de solo.

As espécimes coletadas nas regiões 1, 2 e 3 em um relevo acidentado foram agrupadas na região positiva em relação a PC1 rica em δ referentes a triterpenos pentacíclicos, esteróides e saponinas (Figuras 3.74 e 3.75). Os espécimes da região 4 estão localizadas na região negativa em relação a PC1 e na região positiva em relação a PC2 cujos δ são característicos de flavonóides. As plantas da região 5 estão localizadas no histograma na região negativa em relação a PC1 e negativa em relação a PC2, sendo estas regiões ricas em δ referentes a protoantocianidinas, aminoácidos e oligossacarídeos.

A Tabela 3.8 ajuda a visualizar de forma resumida todos os resultados observados no presente estudo de acordo com as características geográficas relacionadas com o local de coleta.



3.74. Distribuição e agrupamento dos espécimes de *M. hirsuta* de acordo com o relevo. ■1: Campo Alegre de Lourdes, ■2: Gentio de Ouro, ◆3: Morro do chapéu, ◆4: Boninal e ◆5: Caetité.

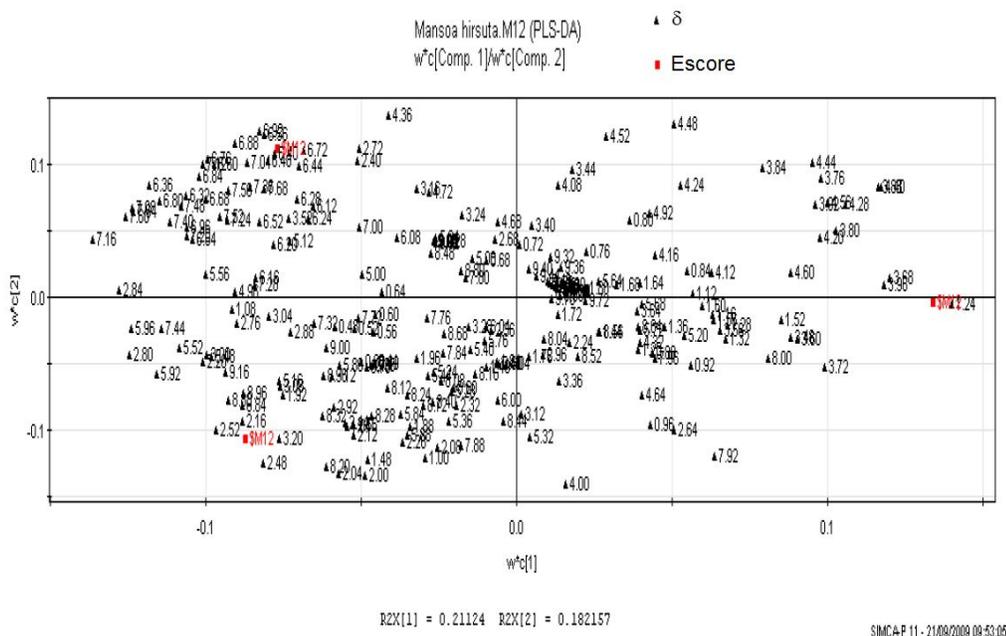


Figura 3.75. Distribuição e agrupamento dos sinais de ¹H RMN de acordo com o relevo.

Tabela 3.8. Resumo dos dados obtidos no estudo metabólico da *M. hirsuta* D.C..

Características geográficas	Local de coleta				
	Campo Alegre de Lourdes	Gentio de Ouro	Morro do Chapéu	Boninal	Caetité
Ricos em	Saponinas, oligossacarídeos	Triterpenos pentacíclicos (ácido ursólico e oleanólico), fitoesteróides	Aminoácidos e oligossacarídeos	Flavonóides	Taninos, protoantocianidinas
Metabólitos principais	Glicose	Asparagina e alanina	Glicose	-	Asparagina e ácido málico
Ambiente	Caatinga arbustiva	Caatinga arbustiva	Caatinga	Caatinga	Caatinga
Tipo de solo	Arenoso	Arenoso	Argilo-arenoso	Muito arenoso	Argilo-arenoso
Relevo	Acidentado	Acidente	Acidentado	Ondulado	Pouco ondulado
Altitude (metros)	517	1100	469	1045	700

4. Conclusões

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho expressam o potencial imunomodulador e inibidor do radical NO dos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico e ácido oleanólico (> 99%) isolados da *M. hirsuta* D.C. A triagem fitoquímica mostra a presença de várias classes de metabólitos secundários tais como fenóis, taninos, esteróides e compostos flavônicos. Os bioensaios com o extrato AcOEt (PFR) mostraram atividades significativas acima de 60% quanto a inibição de linfócitos, o que sugere a atividade imunossupressora do extrato. A presença do dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila no etanol recuperado, bem como lupeol, estigmasterol e β -sitosterol. A análise metabólica permitiu estabelecer que as plantas oriundas de Gentio de Ouro são ricas em triterpenos pentacíclicos, enquanto as plantas de Boninal contêm principalmente flavonóides em sua composição química. Os resultados também sugerem que as protoantocianidinas são constituintes presentes em maior quantidade nas plantas oriundas de Caetité, enquanto saponinas predominam nas plantas de Campo Alegre de Lourdes. As plantas de Morro do Chapéu diferem daquelas das demais regiões por serem ricas em oligossacarídeos e aminoácidos.

5. Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE K, MATSUKI N. 2000. Measurement of the 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neuroscience Research*, v. 38, n. 4, pp. 325-329.
- ALI RM, HOUGHTON PJ, HOO TS. 1998. Antifungal activity of some Bignoniaceae found in Malaysia. *Phytotherapy Research*, v. 12, n. 5, pp. 331-334, 1998.
- ALVAR J, CANAVATE C, GUTIERREZ-SOLAR B, JIMENEZ M, LAGUNA F, LOPEZ-VELEZ R, MOLINA R, MORENO J. 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 2, pp. 298-319.
- APPELDOORN MM, SANDERS M, VINCKEN J-P, CHEYNIER V, LE GUERNEVE C, HOLLMAN PCH, GRUPPEN H. 2009. Efficient isolation of major procyanidin A-type dimers from peanut skins and B-type dimers from grape seeds. *Food Chemistry*, v. 117, n. 4, pp. 713-720,
- ARAUJO DS, CHAVES MH. 2005. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de Terminalia brasiliensis. *Química Nova*, v. 28, n. 6, pp. 996-999, 2005.
- ASLAN M. 2002. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunological Research*, v. 26, n. 1-3, pp. 107-118, 2002.
- AUE WP, KARHAN J, ERNST RR. 1976. Homonuclear broad band decoupling and two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*, v. 64, pp. 4226-4227.
- BACAB MJC, RODRIGUEZ LMP. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports*, v. 18, n. 6, pp. 674-688.
- BACCHI CJ, YARLETT N. 2002. Polyaminemetabolism as chemotherapeutic target in protozoan parasites. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 6, pp. 553-563.
- BARBOSA LCA. 2007. Espectrometria no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa, Ed. UFV.
- BARBOSA-FILHO JM., LIMA CSA, AMORIM ELC, SENA KXFR, ALMEIDA JRGS, CUNHA EVL, SILVA MS, AGRA MF, BRAZ-FILHO R. 2004. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea* (with 1 table & 1 figure). *Phyton*, v. 4, n. 7, p. 221-228.
- BASTOS MLA, LIMA MRF, CONSERVA L, ANDRADE VS, ROCHA EMM, LEMOS RPL. 2009. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeuheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 8, n. 1, 16-21.
- BAILEY NJC, SAMPSON J, HYLANDS PJ, NICHOLSON JK, HOLMES E. 2002. Multi-component metabolic classification of commercial feverfew preparations via high-field ¹H-NMR spectroscopy and chemometrics. *Planta Medica*, v. 68, n. 8, pp. 734-738.
- BAX A, SUMMERS MF. 1986. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. *Journal of the American Chemical Society*, v. 108, n. 8, pp. 2093-2094

- BECKONERT O, BOLLARD ME, EBBELS TMD, KEUN HC, ANTTI H, HOLMES E, LINDON JC, NICHOLSON JK. 2003. NMR-based metabonomic toxicity classification: hierarchical cluster analysis and k-nearest-neighbour approaches. *Analytica Chimica Acta*, v. 490, n. 1-2, pp. 3-15.
- BEEBE K, SCASHOLTZ RPMB. 1998. *Chemometrics, a Pratical Guide*, Nova Iorque, Ed. John Wiley & Sons.
- BERENTE B, GARCIA DC, REICHENBACHER M, DANZER K. 2000. Method development for the determination of anthocyanins in red wines by high-performance liquid chromatography and classification of German red wines by means of multivariate statistical methods. *Journal of Chromatography A*, v. 871, n. 1-2, pp. 95-103.
- BINNECK E. 2004. AS ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 1, n. 32, pp. 28-37.
- BINO RJ, HALL RD, FIEHN O, KOPKA J, SAITO K, DRAPER J, NIKOLAU BJ, MENDES P, ROESSNER-TUNALI U, BEALE MH, TRETHERWEY RN, LANGE BM, WURTELE ES, SUMNER LW. 2004. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. *Trends Plant Science*, v. 9, n. 9, pp. 418-425.
- BLOCK E. 1996. Biologically ctive organosulfur compounds from garlic and onions: the search for new drugs. Department of Chemistry, Albany, N.Y., USA.
- BOGDAN C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, pp. 907-915.
- BRAGA FC, WAGNER H, LOMBARDI JA, OLIVEIRA AB. 2000. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, v. 7, n. 3, pp. 245-250, 2000.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Instituto do Milênio: Uma nova perspectiva para a pesquisa e o desenvolvimento do Brasil, 2002.
- BRENER Z, ANDRADE ZA, BARRAL-NETTO M. 2000. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- BRESCIA MA, CALDAROLA V, DEGIGLIO A, BENEDETTI D, FANIZZI FP, SACCO A. 2002. Characterization of the geographical origin of italian wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Analytical Chimica Acta*, v. 458, n. 1, pp. 177-186.
- BUDZIKIEWICZ H, DJERASSI C, WILLIAMS DH. 1964. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*. Amsterdam: Ed. Holden.
- BULL ID, BETANCOURT PP, EVERSLED RP. 2001. Na organic geochemical investigation of the practice of manuring at a minoan site on Pseira Island, Crete. *Geoarchaeology: Na International Journal*, v. 16, n. 2, p. 223-242, 2001.
- BURDMANN EA, ANDOH TF, YU L, BENNETT WM. 2003. Cyclosporine nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology*, v. 23, n. 5, pp. 465-476.
- CAMPANA P, BRAGA F, CORTES S. 2009. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. *Phytomedicine*, v. 16, n. 5, pp. 456-461.
- CARVALHO M, BRAZ FILHO R. 1993. Novas Técnicas de RMN e os Deslocamentos Químicos dos Átomos de ¹H e ¹³C da Isoflavona Duartina. *Química Nova*, v. 16, n. 2, pp. 89-94.

- CASTRO BF, WAGNER H, LOMBARDI JA, OLIVEIRA AB. 2000. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine*, v. 7, n. 3, pp. 245-250.
- CAZZULO JJ. 2001. The major cysteine proteinase of *T. cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 7, n. 12, pp. 1143-1156.
- CAZZULO JJ. 2002. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potencial targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Current Topics Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 11, pp. 1261-1271.
- CHAGAS 2003 – <http://www.who.int/tdr/dw/chagas2003.htm>. Acesso em: 10/2005.
- CHAN C, YIN H, MCKIE JH, FAIRLAMB AH, DOUGLAS KT. 2002. Peptoid inhibition of trypanothione reductase as a potencial antitrypanosomal and antileishmanial drug lead. *Amino Acids*, v. 22, n. 4, pp. 297-308.
- CHAVES SAM, REINHARD KJ. 2003. Paleopharmacology and pollen: theory, method and application. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 1, pp. 207-211.
- CHALLIS GL, HOPWOOD DA. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *PNAS*, v. 100, n. 2, pp. 14555-14561.
- CHOI YH, KIM HK, HAZEKAMP A, ERKELENS C, LEFEBER AWM, VERPOORTE R. 2004. Metabolomic differentiation of *Cannabis sativa* cultivars using ¹H NMR spectroscopy and principal component analysis. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 6, pp. 953-957.
- CHOI YH, SERTIC S, KIM HK, WILSON EG, MICHOPoulos F, LEFEBER AWM, ERKELENS C, KRICUN SDP, VERPOORTE R. 2005. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 53, n. 4, pp. 1237-1245.
- CHOI YH, KIM HK, LINTHORST HJM, HOLLANDER JG, LEFEBER AWM, ERKELENS C, NUZILLARD J-M, VERPOORTE R. 2006. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 5, pp. 742-748.
- CIOSEK P, BRZOZKA Z, WROBLEWSKI W, MARTINELLI E, DI NATALE C, D'AMICO A. 2005. Direct and two-stage data analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue--Effect of supervised feature extraction. *Talanta*, v. 67, n. 3, pp. 590-596.
- CLEVE E, BACH E, SCHOLLMEYER E. 2000. Using chemometric methods and NIR spectrophotometry in the textile industry. *Analytica Chimica Acta*, v. 420, n. 2, pp. 163-167.
- COSTA JFO. (2004). Investigação de atividades anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora em extratos de plantas do Semi-Árido brasileiro. Tese de mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia/FIOCRUZ.
- COSTA JFO, DAVID JPL, DAVID JM, GIULIETTI AM, QUEIROZ LP, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MBP. 2008. Immunomodulatory activity of extracts from *Cordia superba* Cham. and *Cordia rufescens* A. DC. (Boraginaceae), plant species native from Brazilian Semi-arid.. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 11-15, 2008.
- COTRAN RS, VINAY K, TUCKER C. 2000. Patologia Estrutural e Funcional – Robbins. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- CRUZ GL. 1979. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Editora Civilizações Brasileiras S.A.
- CUTLER RR, WILSON P. 2004. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*, v. 61, n. 2, pp. 71-74.
- DAOLIO C, BELTRAME FL, FERREIRA AG, CASS QB, CORTEZ DAG, FERREIRA MC. 2008. Classification of commercial catuaba samples by NMR, HPLC and chemometrics. *Phytochemical Analysis*, v. 19, n. 3, pp. 218–228.
- DEMAIN AL, VAISHNAV P. 2006. Involvement of Nitrogen-Containing Compounds in β -Lactam Biosynthesis and its Control. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 26, n. 2, pp. 67-82.
- DEROME A, WILLIAMSON M. 1990. Rapid pulsing artifacts in double-quantum filtered COSY. *Journal of Magnetic Ressonace*, v. 88, 177-185.
- DING AH, NATHAN C, STUEHR DJ. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, v. 141, n. 7, pp. 2407-2412.
- DIXON RA. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*, v. 411, n. 6839, pp. 843-847.
- ENGEL S, JENSEN PR, FENICAL W. 2002. Chemical ecology of marine microbial defense. *Journal of Chemical Ecology*, v. 28, n. 10, pp. 1971-1985.
- ESTEVAM CS. 2006. Estudo fitoquímico biomonitorado dos extratos de *Maytenus rigida* Mart. Tese de doutorado, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.
- FERNIE AR, TRETWEY RN, KROTZKY AJ, WILLMITZER L. 2004. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 5, n. 9, pp. 763-769 .
- FERRI PH. 1995. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI LC. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista.
- FIEHN O. 2002. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, v. 48, n. 1-2, pp. 155-171.
- FILHO VC, YUNES RA. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural, para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, pp. 99-105.
- FUKUSAKI E, KOBAYASHI A. 2005. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of Bioscience Bioengineering*, v. 100, n. 4, pp. 347-54.
- GIULIETTI AM, CONCEIÇÃO A, QUEIROZ LP. 2006. Diversidade e caracterização das fenerógramas do semi-árido brasileiro. *Associação Plantas do Nordeste*, v. 1.
- GOTTLIEB O. 1993. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. *Ciência Hoje*, v. 15.
- HALL RD. 2006. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, v. 169, n. 3, pp. 453-68.
- HAMBURGER M, HOSTETTMANN K. 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, pp. 3864-3874.

- HORNING EC, HORNING MG. 1971. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clinical Chemistry*, v. 17, n. 8, pp. 802-809.
- HUNT JM. 1995. Petroleum Geochemistry and Geology. 2ª ed.. EUA.
- INOUE K, INOUYET H, CHEN CC. 1981. A naphthoquinone and a lignan from the wood of *Kigelia pinnata*. *Phytochemistry*, v.20, n. 9, p. 2271-2276, 1981.
- ITOKAWA H, MATSUMOTO K, MORITA H, TAKEYA K. 1992. Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 3, pp. 1061-1062.
- JUNGES MJ, FERNANDES JB, VIEIRA PC, SILVA, MFGF, RODRIGUES FILHO E. 1999. The use of ¹³C and ¹H-NMR in the structural elucidation of a new Nor-lupane triterpene. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 10, n. 4, pp. 317-320.
- KAISER CR. 2000. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, v. 23, n. 2, pp. 231-236.
- KAUFMANN HES, KABELITZ D. 1998. Immunology of infectious methods in microbiology. San Diego: Academic Press, v. 25.
- KAY LE, KEIFER P, SAARINENT. 1992. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, n. 26, pp. 10663–10665.
- KIDERLEN AF, KAYSER O, FERREIRA D, KOLODZIEJ H. 2001. Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages *in vitro*. *Zeitschrift Für Naturforschung*, v. 56, n. 5-6, p. 444-454, 2001.
- KIM HK, CHOI YH, ERKELENS C, LEFEBER AWM, VERPOORTE R. 2005. Metabolic fingerprinting of *Ephedra* species using ¹H-NMR spectroscopy and principal component analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n. 1, pp. 105-109.
- KOWALSKI BR, BENDER CF. 1972. Pattern-recognition-powerful approach to interpreting chemical data. *Journal of American Chemical Society*, v. 94, n. 16, pp. 5632-5639.
- KRESNKY, A. M.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. The pharmacological basis of therapeutics. Drugs used for immunomodulation. In: GOODMAN e GILMAN'S, 2001 e GILMAN'S. 20ª ed., New York: McGraw Hill Companies, 2001.
- KUTNEY JP, HANSEN HW. 1971. 5,6,7-methoxyflavone and 5,6,7,8-tetramethoxyflavone from *Zeyhera tuberculosa*. *Phytochemistry*, v. 10, n. 2, pp. 3298-3302.
- KWAN WO, KOWALSKI BR. 1980. Correlation of objective chemical measurements and subjective sensory evaluations. wines of *Vitis vinifera* variety 'pinot noir' from France and the United States. *Analytica Chimica Acta*, v. 122, n. 2, pp. 215-222.
- LAPA AJ. 1995. Importância da farmacologia tradicional e novas descobertas no estudo das plantas medicinais. *Ars Cvrandi – a revista da clínica médica*, pp. 46-52.
- LEANDRO C, CAMPINO L. 2003. *Leishmania*: efflux pumps and chemoresistance. *International Journal of Antimicrobiology Agents* v. 22, n. 3, p. 352-357, 2003.
- LEISH 2002 – <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm>. Acesso em: 10/2005.

- LEITE JPV, LOMBARDI JA, CHIARI E, OLIVEIRA AB. 2001. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, n. 2, p. 77-87, 2001.
- LIANG YZ, XIE P, CHAN, K. 2004. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, v. 812, n. 1-2, pp. 53-70.
- LIANG Y-S, CHOI YH, KIM HK, LINTHORST HJM, VERPOORTE R. 2006. Metabolomic analysis of methyl jasmonate treated *Brassica rapa* leaves by 2-dimensional NMR spectroscopy. *Phytochemistry*, v. 67, n. 22, pp. 2503-2511.
- LIMA CSA, AMORIM ELC, SENA KXFR, CHIAPPETA AA, NUNES XP, AGRA MF, CUNHA, EVL, SILVA MS, BARBOSA-FILHO JM. 2003. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, pp. 77-81 .
- LIMA, CSA, AMORIM ELC, NASCIMENTO SC, ARAUJO CF, AGRA MF, BARBOSA-FILHO JM, SILVA MS, CUNHA EV, VIERA IJ, BRAZ-FILHO R. 2005. Cytotoxic pyranonaphthoquinones from *Melloa quadrival* vis (Bignoniaceae). *Natural Products Research*, v. 19, n. 3, pp 217-22.
- LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. 2003. So what's the deal with metabonomics? *Analytical Chemistry*, v. 75, n. 17, pp. 384A-391A.
- LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. 2004a. Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 4, n. 2, pp. 189-199.
- LINDON JC, HOLMES E, NICHOLSON JK. 2004b. Metabonomics: systems biology in pharmaceutical research and development. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, v. 6, n. 3, pp. 265-72.
- LIU J. 1995. Pharmacology of oleanolic and ursolic acids. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, n. 2, pp. 57-68, 1995.
- LUCCHESI AM. 2006. Plantas da Caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímica e Atividade Biológica. *Associação Plantas do Nordeste*, v. 4.
- MACIEL MA. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, pp. 429-438.
- MAFEZOLI J, VIVEIRA PC, FERNANDES JB, SILVA MF, ALBUQUERQUE S. 2000. *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypanostigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n. 1-2, pp. 335-340, 2000.
- MAHATO SB, KUNDU AP. 1994. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 47, n. 6, pp. 1517-1575.
- MANIVASAGAM T, SUBRAMANIAN P, SUTHAKAR G, ESSA MM, SIVAPERUMAL R, SUBASH S. 2005. Influence of diallyl disulphide on temporal patterns of liver marker enzymes in experimental hepatocarcinogenesis in rats. *Biologia Bratislava*, v. 60, n. 6, pp. 697-702.
- MANNINA L, SOBOLEV AP, CAPITANI D, IAFFALDANO N, ROSATO MP, RAGNI P, REALE A, SORRENTINO E, D'AMICO I, COPPOLA R. 2008. NMR metabolic profiling of organic and aqueous sea bass extracts: Implications in the discrimination of wild and cultured sea bass. *Talanta*, v. 77, n. 1, pp. 433-444.

- MARINHO VMC, SEIDL PR, LONGO WP. 2008. La diversidad biológica - una posible fuente de ventaja competitiva para la industria farmacéutica brasileña. *Espacios*, v. 29, n.1, pp. 49-67.
- MATOS FJ. 1997. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: Ed. Adjunto.
- MENDONÇA-FILHO RR, RODRIGUES IAZ, ALVIANO DS, SANTOS AL, SOARES RM, ALVIANO CS, LOPES AH, ROSA MDOS. 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, v. 155, n. 3, pp. 136-143, 2004.
- MONTANARI CA, BOLZANI VS. 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v 24, n. 1, pp 105-111, 2001.
- MOREL CM. 2003. Neglected diseases: under-funded research and inadequate health interventions. *Embo Reports*, v. 4, n. 1, pp. 35-38.
- MOSMANN T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*, v. 65, n. 1-2, pp. 55-63.=
- MRAZEK MF, MOSSIALOS E. 2003. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases. *Health Policy*, v. 64, n. 1, pp. 75-88.
- MUNGUR R, GLASS ADM, GOODENOW DB, LIGHTFOOT DA. 2005. Metabolite Fingerprinting in Transgenic *Nicotiana tabacum* Altered by the *Escherichia coli* Glutamate Dehydrogenase Gene. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2005, n. 2, pp. 198–214.
- MUNCK L. 2006. Conceptual validation of self-organisation studied by spectroscopy in an endosperm gene model as a data-driven logistic strategy in chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 84, n. 1-2, pp. 26-32.
- MUNOZ-MINGARRO NA, LLINARES F, POZUELO JM, DE MERA AG, VICENTEN JA, MORALES L, ALGUACIL LF, PEREZ C. 2003. Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 87, n. 2-3, pp. 163-167.
- MUSUMARRA G, BARRESI V, CONDORELLI DF, FORTUNA CG, SCIRE S. 2005. Genome-based identification of diagnostic molecular markers for human lung carcinomas by PLS-DA, *Computational Biology and Chemistry*, v. 29, n. 3, pp. 183-195.
- NICHOLSON JK, LINDON JC, HOLMES E. 1999. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, v. 29, n. 11, pp. 1181-1189.
- NICHOLSON JK, WILSON ID. 2003. Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nature Reviews: Drug Discovery*, v. 2, n. 8, pp. 668-676.
- ORTEGA JRL, RIVERO-LEZCANO OM, CROFT SL, RIVAS L. 2001. *In vivo* monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 45, n. 4, pp. 1121-1125.
- OMS. 1994. Segundo relatório do comitê de especialistas. O controle da esquistossomose. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 830p.
- PAVÃO F, CASTILHO MS, PUPO MT, DIAS RL, CORREA AG, FERNANDES JB, SILVA MF, MAFEZOLI J, VIEIRA PC, OLIVA G. 2002. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1,95 Å resolution. *FEBS Letters*, v. 520, n. 1, pp. 13-17, 2002.

- PAVIA DL, LAMPMAN GM, KRIZ GS. 1996. Introduction to spectroscopy. 2a. Ed. Editora Saunders Golden Sunburst Series.
- PEREZ C E ANESINI C. 1994. *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 44, n. 1, pp. 41-46.
- PINTO AC, SILVA DHS, BOLZANI VS, LOPES NP, EPIFÂNIO RA. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafio e perspectivas. *Química Nova*, v 25, n. 1, pp 45-61, 2002.
- PHILLIPSON JD. 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* v. 56, n. 3, pp. 237-243.
- PRICE WS. 1999. Water signal suppression in NMR spectroscopy. *Annual Reports NMR Spectroscopy*, v. 38, 289-354.
- RATES SMK. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001, v. 39, n. 5, 603-613.
- RAWAT MSM, PRASAD D, JOSHI RK, PANT G. 1999. Proanthocyanidins from *Prunus armeniaca* roots. *Phytochemistry*, v. 50, n. 2, pp. 321-324.
- REO NV. 2002. NMR-based metabolomics. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 25, n. 4, pp. 375-82.
- ROBERTSON DG. 2005. Metabolômico in toxicology: a review. *Toxicological Sciences*, v. 85, n. 2, pp. 809-822.
- ROCHA AD, OLIVEIRA AB, FILHO JDS, LOMBARDI JA, BRAGA FC. (2004). Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 6, pp. 463-467.
- ROCHFORT S. 2005. Metabolomics review: a new "ômico" platform technology for system biology and implications for natural products reseach. *Jornal of Natural products*, v. 68, n.12, pp. 1813-1820.
- ROEP BO. 2003. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, v. 46, n. 3, pp. 305-321.
- SANDES ARR, DI BIASI G. 2000. Biodiversidade e diversidade química e genética. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n. 13, pp. 28-32.
- SANTANA PJP. 2002. A bioprospecção no Brasil - Contribuições para uma gestão ética. Brasília: Paralelo, pp. 15.
- SILVA MM. 1991a. A família Bignoniaceae na Região de Catolés, Cachapada Diamantina, Bahia, Brazil. Monografia. Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Bahia.
- SILVA MM, QUEIROZ LP. 2003. A família Biognoniaceae da Região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v. 3, n. 1/2, pp. 3-21.
- SILVERSTEIN RM, BASSLER GC, MORRILL TC. 1994. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan.
- SILVERSTEIN RM, WEBSTER FX. 1997. Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York: John Wiley & Sons.
- SILVA DM. 2006. Estudo químico e de atividades biológicas da *Mansoa hirsuta* D.C. (Bignoneaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas.
- SIMÕES CM, FALKENBERG M, MENTZ LA, SCHENKEL EP, AMOROS M, GIRRE L. 1999. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, n. 6, v. 3, pp. 205-14.
- SOARES MBP, BELLINTANI MC, RIBEIRO IM, TOMASSINI TC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. 2003. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. *European Journal of Pharmacology*, v. 459, n. 1, pp. 107-112, 2003.

- SOCORRO S, ROSA MS, MENDONÇA-FILHO RR, BIZZO HR, ALMEIDA RI, SOARES RM, SOUTO-PADRON T, ALVIANO CS, LOPES AH. 2003. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Cróton cajucara*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 47, n. 6, pp. 1895-1901.
- SOERJATO DD. 1996. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspective from field. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, n. 1-3, pp. 1-15.
- SOLOMONS TWG, FRYHLE CB. 2005. Química Orgânica. 8. ed. Rio de Janeiro: Ed. Copyright, 2005.
- SUFFNESS M, ABBOTT B, STATZ D, WONILOWICZ E, SPJUT R. 1988. The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for *in vivo* screening of plant extracts. *Phytotherapy Research*, v. 2, n. 2, pp. 89 – 97.
- TARACHIWIN L, KATOH A, UTE K, FUKUSAKI E. 2008. Quality evaluation of *Angelica acutiloba* Kitagawa roots by ¹H NMR-based metabolic fingerprinting. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 48, n. 1, pp. 42-48.
- TSAO SM, YIN MC. 2001. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *Journal of Medical Microbiology*, v. 50, n. 7, pp. 646-649.
- TSAO SM, HSU CC, YIN MC. 2003. Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in BALB/cA mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 6, pp. 974–980.
- TYSON JL, FULLERTON RA, ELLIOTT, GS, REYNOLDS PJ. 2000. Use of diallyl disulphide for the commercial control of *Sclerotium cepivorum*. *New Zealand Plant Protection*, v. 53, 393-397.
- UMBUZEIRO, <http://umbuzeiro.cnip.org.br>. Acesso em: 10/2005.
- URBINA JA, CONCPCION JL, RANGEL S, VISBAL G, LIRA R. 2002. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *T cruzi* and *L. mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 125, n. 1-2, pp. 35-45.
- VAN RUTH SM, VILLEGAS B, AKKERMANS W, ROZIJN M, VAN DER KAMP H, KOOT A. 2010. Prediction of the identity of fats and oils by their fatty acid, triacylglycerol and volatile compositions using PLS-DA. *Food Chemistry*, v. 118, n. 4, pp. 948-955.
- VIANT MR. 2003. Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 310, n. 3, pp. 943-948.
- WENG JR, TSAO LT, YEN MH, WANG JP, LIN CN. 2003. Anti-inflammatory constituents and new pterocarpanoid of *Crotalaria pallida*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 3, pp. 404-407.
- WECKWERTH W. 2003. Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54: 669-689.
- WECKWERTH W, MORGENTHAL K. 2005. Metabolomics - from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today*, v. 10, n. 22, pp. 1551-1558.
- XIE PS. 1987. HPTLC fingerprinting identification of commercial ginseng drugs-reinvestigation of HPTLC of ginsenosides. *Journal Of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications*, v. 10, n. 11, pp. 607-613.

ZHAO W, YE Q, TAN X, JIANG H, LI X, CHEN K, KINGHORN AD. 2001. Three new sesquiterpene glycosides from *Dendrobium nobile* with immunomodulatory activity. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 9, pp. 1196-2000.

ZUCCOTTO F. 2001. Novel inhibitors of *T. cruzi* dihydrofolate reductase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, n. 5, pp. 395-405.