

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais (LPqPN)



*Constituintes Químicos e Avaliação das Atividades Antioxidante,
Anticolinesterásica e Antiinflamatória Cutânea de Coutarea hexandra
(Jacq.) K. Schum. (Rubiaceae)*

Sandovânio Ferreira de Lima

Maceió/AL

2009

Sandovânio Ferreira de Lima

*Constituintes Químicos e Avaliação das Atividades Antioxidante,
Anticolinesterásica e Antiinflamatória Cutânea de *Coutarea hexandra*
(Jacq.) K. Schum. (Rubiaceae)*

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

Maceió/AL

2009

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

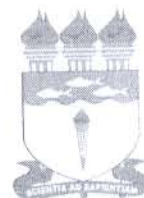
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- L732c Lima, Sandovânio Ferreira de.
Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante, anticolinesté-
rásica e antiinflamatória cutânea de *Coutarea hexandra* (Jacq.) k. Schum.
(Rubiaceae) / Sandovânio Ferreira de Lima, 2009.
xv, 145 f. : il.
- Orientadora: Lucia Maria Conserva.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.
- Bibliografia: f. 130-1145.
1. Fitoquímica. 2. Plantas medicinais. 3. *Coutarea hexandra*. 3. Antioxidante.
4. Anticolinesterásico. 5. Antiinflamatório. I. Título.

CDU: 547.9



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



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

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese de Doutorado de **Sandovânio Ferreira de Lima**, intitulada: "**Constituintes Químicos e Avaliação das Atividades Antioxidante, Anticolinesterásica e Antiinflamatória Cutânea de *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. (Rubiaceae)**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 05 de novembro de 2009, às 8h30min. na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Conserva
Orientadora – PPGQB/ IQB /UFAL

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

Prof.^o Dr.^o Jorge Mauricio David
IQ/UFBA

Prof.^o Dr.^o Emiliano de Oliveira Barreto
ICBS/UFAL

Prof.^a Dr.^a Simoni Margareti Plentz Meneghetti
PPGQB/IQB/UFAL

Dedico a realização deste trabalho, primordialmente a Deus pela oportunidade de estar na Terra neste momento e a minha avó, Quitéria Maria da Conceição, pelo amor e confiança a mim dedicados.

Aos meus pais, José Francisco de Lima (In memoriam) e Francisca Ferreira da Silva, pelo amor, exemplo e ensinamentos desde os primórdios da minha vida.

À minha esposa, Maria da Penha Farias Lima, pelo amor, compreensão, companheirismo e incentivo na busca das realizações dos sonhos de uma vida melhor.

Agradecimentos

À *Profa. Dra. Lucia Maria Conserva*, pela orientação, dedicação e objetividade no direcionamento dos trabalhos desenvolvidos, bem como pela amizade e exemplar postura de profissionalismo e exímio desempenho no magistério;

À botânica *Rosângela Pereira de Lyra Lemos*, do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, pela coleta e identificação da espécie vegetal selecionada para estudo;

À *MSc. Maria Aliete B. L. Machado*, pela colaboração na coleta da espécie em estudo;

Ao *Prof. Dr. Edson de Souza Bento*, pela obtenção dos espectros de RMN;

Ao *Prof. Dr. Michel F. Otuki*, pela realização dos ensaios antiinflamatórios;

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), a *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas* (FAPEAL), ao *Instituto do Milênio do Semi-Árido* (IMSEAR) e ao *Banco do Nordeste-Rede Nordestina de Biotecnologia* (BNB-RENORBIO), pelos recursos financeiros e a *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) pela Bolsa concedida;

Às *Profas. Dras. Ana Paula F. da Silva* e *Patrícia Emanuella S. de Oliveira*, pela colaboração nos ensaios de determinação do teor de fenóis totais e anticolinesterásicos, respectivamente;

Ao *MSc. Fernando M. de Oliveira*, pela amizade e compartilhamento de conhecimentos;

Aos professores do *PPGQB*, em especial as *Profas. Dras. Margarida Maria dos S. Humberto*, *Lucia M. Conserva* e *Lúcia Maria C. Rebouças*, pelos ensinamentos transmitidos;

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais, *Anderson Marques*, *Ewerton Henrique*, *Jésu Costa*, *Edmilson Pinto*, *Vivian Tenório*, *Nayara Condja*, *Jataí Sobreira*, *Maria José*, *Maria Lysete* e *Patrícia Vasconcelos*, pela assistência durante todo o trabalho, transmissão de conhecimentos, convívio e momentos agradáveis;

Aos demais colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação, em especial a *Anderson M. de Oliveira* e *José Rui M. Reys*, pelos momentos de estudo e descontração, e pela grande amizade;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho, especialmente ao técnico *Aldy dos Santos*.

Sumário

<i>Agradecimentos</i>	iv
<i>Sumário</i>	v
<i>Lista de Figuras</i>	vii
<i>Lista de Tabelas</i>	ix
<i>Lista de Quadros</i>	xi
<i>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos</i>	xi
<i>Resumo</i>	xiii
<i>Abstract</i>	xiv
1. Introdução	1
2. Considerações Sobre as Atividades Biológicas Relacionadas aos Objetivos do Trabalho, bem como sobre a Família, Gênero e Espécie Estudada	5
2.1. Atividade Antioxidante	5
2.2. Atividade Anticolinesterásica	9
2.3. Atividade Antiinflamatória	11
2.4. A Família Rubiaceae	15
2.5. O Gênero <i>Coutarea</i> e a Espécie <i>Coutarea hexandra</i> (Jacq.) K. Schum.	19
3. Objetivos	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos	30
4. Experimental	31
4.1. Solventes, Reagentes e Equipamentos	31
4.2. Coleta e Identificação dos Materiais Vegetais	32
4.3. Preparação dos Extratos	32
4.4. Avaliação do Potencial Biológico de Extratos, Frações e Substâncias Isoladas	35
4.4.1. Avaliação Qualitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres	35
4.4.2. Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais (FT)	36
4.4.3. Avaliação Quantitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres	37
4.4.4. Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo Método do Ferrocianeto Férrico (FTC)	40
4.4.5. Avaliação Qualitativa da Atividade Anticolinesterásica	41
4.4.6. Avaliação da Atividade Antiinflamatória Induzida pelo Óleo de <i>Croton</i>	42
4.5. Investigação Fitoquímica de Extratos de <i>C. hexandra</i>	45

4.5.1. Isolamento de Constituintes Químicos das Raízes	45
4.6. Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas	47
5. Resultados e Discussão	49
5.1. Resultados da Avaliação Qualitativa da Capacidade Seqüestradora de Radicais Livres	49
5.2. Resultados da Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais	49
5.3. Avaliação Quantitativa da Atividade Anti-radicalar (DPPH [*])	50
5.4. Atividade Antioxidante Total de Extratos/Frações/Subfrações	53
5.5. Resultados da Avaliação da Atividade Anticolinesterásica	54
5.6. Resultados da Aplicação Tópica de Óleo de Cróton (Atividade Antiinflamatória Cutânea)	55
5.7. Resultados da Investigação Fitoquímica com Extratos das Raízes	61
5.7.1. Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas	61
5.7.1.1. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRH-1a e ChRH-1b	63
5.7.1.2. Identificação Estrutural da Substância Codificada de ChRH-2	67
5.7.1.3. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRD-1 e ChRD-4 .	70
5.7.1.4. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRD-2 e ChRD-8	82
5.7.1.5. Identificação Estrutural da Substância Codificada de ChRD-3	95
5.7.1.6. Elucidação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRD-5 e ChRD-7	101
5.7.1.7. Elucidação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRD-6	116
6. Considerações Finais	128
7. Referências Bibliográficas	130

Lista de Figuras

- Figura 1.** Junção colinérgica focalizando os sítios do receptor, biossíntese, 10
armazenamento, liberação e hidrólise da ACh.
- Figura 2.** Fotos de *Coutarea hexandra*: Ramos com flores (A), inflorescência (B) e 20
frutos (C). (Fonte: Pereira, 2007).
- Figura 3.** Esquema geral do procedimento efetuado com raízes (A) e folhas (B) de *C.* 34
hexandra.
- Figura 4.** Esquema geral do procedimento efetuado com cascas do caule de *C.* 35
hexandra.
- Figura 5.** Representação esquemática da reação de redução do DPPH. 39
- Figura 6.** Gráficos do comportamento cinético dos padrões utilizados: Ácido gálico (A), 52
Ácido ascórbico (B) e BHT (C). As concentrações foram expressas em µg/mL.
- Figura 7.** Efeito da administração tópica do extrato bruto em EtOH das raízes nas doses 56
de 0,6 e 1,0 mg/orelha e de dexametasona (dexa) (0,05 mg/orelha). Cada
coluna representa a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) de 4-6
animais/grupo. Os Asteriscos mostram os níveis de significância quando
comparados com o grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).
- Figura 8.** Efeito da aplicação tópica dos extratos da partição (2 a 5), de algumas frações 57
(6 a 8) e subfrações (9 a 12) na dose de 0,6 mg/orelha. Cada coluna representa
a média ± E.P.M. (Erro Padrão da Média) de 4-6 animais. Os Asteriscos
mostram os níveis de significância (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) quando
comparados com o grupo controle.
- Figura 9.** Efeito da administração tópica de algumas das frações de filtração dos 58
extratos em CH₂Cl₂ e em AcOEt das raízes, na dose 0,6 mg/orelha. Cada
coluna representa a média ± E.P.M (Erro Padrão da Média) de 4-6 animais.
Os Asteriscos mostram os níveis de significância quando comparados com o
grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).
- Figura 10.** Efeito da administração tópica de alguns dos compostos isolados, na dose de 59
0,6 mg/orelha. Cada coluna representa a média ± E.P.M (Erro Padrão da
Média) de 4-6 animais. Os Asteriscos mostram os níveis de significância
quando comparados com o grupo controle (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$).
- Figura 11.** Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD) das substâncias **ChRH-1a** 65

	e ChRH-1b .	
Figura 12.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$) das substâncias ChRH-1a e ChRH-1b .	66
Figura 13.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância ChRH-2 .	69
Figura 14.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-1 .	74
Figura 15.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da substância ChRD-4 .	75
Figura 16.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-1 .	76
Figura 17.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da substância ChRD-4 .	77
Figura 18.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-1 .	78
Figura 19.	Espectro DEPT (100 MHz, acetona- d_6) da substância ChRD-4 .	79
Figura 20.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, acetona- d_6) da substância ChRD-4 .	79
Figura 21.	Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-1 .	80
Figura 22.	Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, acetona- d_6) da substância ChRD-4 .	81
Figura 23.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-2 .	87
Figura 24.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-8 .	88
Figura 25.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-2 .	89
Figura 26.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-8 .	90
Figura 27.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : (100 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-2 .	91
Figura 28.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-8 .	92
Figura 29.	Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) da substância ChRD-2 .	93
Figura 30.	Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-8 .	94
Figura 31.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-3 .	97
Figura 32.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-3 .	98
Figura 33.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-3 .	99
Figura 34.	Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-3 .	100
Figura 35.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-5 .	108
Figura 36.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-7 .	109
Figura 37.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-5 .	110

Figura 38.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-7 .	111
Figura 39.	Espectro DEPT (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-7 .	112
Figura 40.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-5	113
Figura 41.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-7	114
Figura 42.	Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância ChRD-5 .	115
Figura 43.	Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto ChRD-6 .	121
Figura 44.	Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto ChRD-6 .	122
Figura 45.	Expansão do espectro HSQC do composto ChRD-6 .	123
Figura 46.	Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto ChRD-6 .	124
Figura 47.	Espectro DEPT (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto ChRD-6 .	125
Figura 48.	Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto ChRD-6 .	125
Figura 49.	Expansão do espectro HMBC do composto ChRD-6 .	126
Figura 50.	Expansão do espectro HMBC do composto ChRD-6 .	127

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Usos etnobotânicos relatados em espécies do gênero <i>Coutarea</i> .	21
Tabela 2.	Atividades biológicas relatadas em espécies do gênero <i>Coutarea</i> .	23
Tabela 3.	Constituintes químicos relatados em espécies do gênero <i>Coutarea</i> .	24
Tabela 4.	Resultados dos ensaios anti-radicalares quantitativos, teores de fenóis totais e oxidação total dos extratos.	50
Tabela 5.	Resultados dos ensaios anticolinesterásicos com frações das raízes e comparação com os resultados dos ensaios anti-radicalares qualitativo (-/+) e quantitativo (CI_{50}).	55
Tabela 6.	Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , J em Hz) das substâncias ChRH-1a e ChRH-1b e comparação com dados da literatura (Macari <i>et al.</i> , 1990; Marques, 2001).	64
Tabela 7.	Dados de RMN ^{13}C de ChRH-2 (100 MHz, CDCl_3 , δ) e da <i>Sitostenona</i>	68

(100 MHz, CD₃OD, Hz) (Della Greca *et al.*, 1990).

- Tabela 8.** Dados de RMN (¹H: 400; ¹³C, 100 MHz, CDCl₃, δ, Hz) da substância **ChRD-1** e comparação com dados da literatura (Ito *et al.*, 2000). 72
- Tabela 9.** Dados de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C, 100 MHz, acetona-d₆, δ, Hz) da substância **ChRD-4** e comparação com dados da literatura da **5-Hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina** (Mata *et al.*, 1990) e da **5,7-Dihidroxi-4-(p-metoxifenil)cumarina** (Harbone, 1993). 73
- Tabela 10.** Dados de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃, δ, Hz) da substância **ChRD-2** e comparação com os da **5,7,8-Trimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina** (Ito *et al.*, 2000). 85
- Tabela 11.** Dados de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ, Hz) da substância **ChRD-8** e comparação com os da **5,7,8-Trimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina** (Delle Monache *et al.*, 1990). 86
- Tabela 12.** Dados de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C, 100 MHz, CDCl₃CD₃OD, δ, Hz) da substância **ChRD-3** e comparação com os da **5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-cumarina** (125 MHz, CDCl₃; Ito *et al.*, 2000). 96
- Tabela 13.** Dados de RMN (¹H: 400; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ) do composto **ChRD-5** e comparação com dados do **Khekadaengosídeo L** (¹H: 400; ¹³C: 100 MHz, C₅D₅N) (Kanchanapoom *et al.*, 2002). 105
- Tabela 14.** Dados de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ, Hz) do composto **ChRD-7** e comparação com dados da **25-Acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F** (Reguero *et al.*, 1987). 106
- Tabela 15.** Dados de RMN da substância **ChRD-5** e comparação com dados de **ChRD-7** (¹H: 400; ¹³C 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ) e de **25-Acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F** (Reguero *et al.*, 1987). 107
- Tabela 16.** Dados de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ, Hz) do composto **ChRD-6** e comparação com dados de **ChRD-5** e de **ChRD-7**. 119
- Tabela 17.** Dados de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD, δ, Hz) do composto **ChRD-6** e comparação com dados de **5,15-Rosadieno-3,11-diona** (CDCl₃). 120

Lista de Quadros

- Quadro 1.** Massas dos materiais secos das diferentes partes da planta, dos extratos brutos e das frações oriundas de partição ou filtração. 33
- Quadro 2.** Extratos, frações e subfrações submetidos à avaliação qualitativa frente ao DPPH. 36
- Quadro 3.** Extratos, frações e subfrações submetidos à avaliação quantitativa frente ao DPPH. 40
- Quadro 4.** Extratos e frações de *C. hexandra* que foram submetidos a ensaios anticolinesterásicos. 42
- Quadro 5.** Extratos, frações e substâncias isoladas de *C. hexandra* que foram submetidos a ensaios antiinflamatórios. 44

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Ac	Acetila
Acetona-d ₆	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de Etila
ATCI	Iodeto de Acetiltiocolina
BHT	Butil-hidroxitolueno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CCD	Cromatografia em camada delgada
CC	Cromatografia em coluna
CI	Concentração inibitória
CL	Concentração letal
cols.	Colaboradores
δ	Deslocamento Químico
d	Dupleto
DA	Doença de Alzheimer
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortioless Enhancement by Polarization Transfer

DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-Difenil-2-picril-hidrazina
DP	Desvio padrão
DTNB	Reagente de Ellman (Ácido 5,5'-bitiobis-[2-nitrobenzóico])
E.P.M.	Erro padrão da média
EtOH	Etanol
FTC	Tiocianeto férrico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	interleucina 1
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
Me	Metila
MeO	Metoxila
MHz	Megahertz
p. (pp.)	Página (s)
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
Rfs	Fatores de retenção
rpm	Rotação por minuto
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
t	Triplete
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TMS	Tetrametilsilano
Tris/HCl	Cloreto de tris[hidroximetil]aminometano
UV	Ultravioleta
Ui	Unidades Internacionais

Resumo

O presente trabalho descreve o isolamento e a elucidação estrutural de alguns constituintes químicos, bem como das atividades antioxidante, anticolinesterásica e antiinflamatória cutânea de extratos das raízes, folhas e cascas do caule de *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. (Rubiaceae), bem como de algumas das substâncias isoladas. Nos ensaios para avaliar atividade antioxidante, extratos das raízes e folhas forneceram os melhores resultados e alguns dos extratos das raízes foram eficazes em inibir o efeito da enzima acetilcolinesterase e a formação do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, na concentração de 0,6 mg/orelha. A investigação fitoquímica efetuada com extratos das raízes resultou na obtenção de três fitoesteróides (*sitosterol*, *stigmasterol* e *sitostenona*), dois triterpenos (*2β,3α-dihidroxi-11,16-dioxo-5-eno-octanorcucurbitacina* e *25-acetato da 23,24-diidrocurbitacina F*), um diterpeno (*2β,3α-diidroxi-11-oxo-ros-5-eno*) e cinco derivados 4-fenilcumarínicos [*5-hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina*, *5,7,8-trimetoxi-4-(p-metoxifenil)cumarina*, *5,7-dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina*, *5,7-dimetoxi-4-(p-metoxifenil)cumarina* e *5,7,8-trimetoxi-4-(3,4-dihidroxifenil)cumarina*]. Estes compostos tiveram suas estruturas elucidadas com base na análise dos dados de RMN e pela comparação com dados da literatura. Dentre as substâncias isoladas, o triterpeno *2β,3α-diidroxi-11,16-dioxo-5-eno-octanorcucurbitacina* e o diterpeno *2β,3α-diidroxi-11-oxo-ros-5-eno* estão sendo relatados pela primeira vez; a *5-hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina* está sendo descrita pela primeira vez como produto natural e a *5,7,8-trimetoxi-4-(3,4-diidroxifenil)cumarina* ocorre pela primeira vez no gênero *Coutarea*. Nos ensaios antiinflamatórios, as substâncias *5,7-dimetoxi-4-(p-metoxifenil)cumarina*, *5-hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina* e *25-acetato de 23,24-diidrocurbitacina F* inibiram o edema por cerca de 35, 67 e 30%, respectivamente. Nos ensaios frente ao DPPH, tanto a *5-hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina* ($43,70 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$) quanto a *5,7,8-trimetoxi-4-(3,4-diidroxifenil)cumarina* ($20,85 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$) seqüestraram radicais livres com valores de CI_{50} comparáveis aos do ácido ascórbico e do ácido gálico, respectivamente. Nos ensaios anticolinesterásicos, o diterpeno *2β,3α-diidroxi-11-oxo-ros-5-eno* inibiu a ação da enzima acetilcolinesterase.

Palavras-Chave: *Coutarea hexandra*, Rubiaceae, 4-fenilcumarinas, triterpenos, diterpeno antioxidante, antiinflamatórios, anticolinesterásicos.

Abstract

This work describes the isolation and structural elucidation of some chemical constituents as well as antioxidant, anticholinesterase and skin anti-inflammatory activities of extracts and some of the isolated compounds from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. (Rubiaceae). In the antioxidant assays, extracts from roots and leaves, when compared to positive controls used, free scavenger radical and inhibited the formation of peroxide of the linoleic acid. In the anticholinesterase and anti-inflammatory assays, at 0.6 mg/ear, some extracts from roots were effective in inhibiting the effects of the anticholinesterase enzyme and the formation of ear edema. The phytochemical investigation of some active extracts from roots resulted in the isolation of three phytosteroids (*sitosterol*, *stigmasterol* and *sitostenone*), a diterpene (*2 β ,3 α -dihydroxy-11-oxo-ros-5-ene*), two triterpenes (*2 β ,3 α -dihydroxy-11,16-dioxo-5-ene-octanor-cucurbitacin* and *23,24-dihydrocucurbitacin F 25-acetate*) and five 4-phenylcoumarin derivatives [*5,7,8-trimethoxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)coumarin*, *5-hydroxy-7-methoxy-4-(p-hydroxyphenyl)-coumarin*, *5,7,8-trimethoxy-4-(p-methoxyphenyl)coumarin*, *5,7-dimethoxy-4-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)coumarin*, and *5,7-dimethoxy-4-(p-methoxyphenyl)coumarin*]. These compounds had their structures elucidated based on their NMR spectral data and by comparison with literature data. Among isolated compounds, *2 β ,3 α -dihydroxy-11,16-dioxo-5-ene-octanorcucurbitacin* and *2 β ,3 α -dihydroxy-11-oxo-ros-5-ene* are being reported for the first time; *5-hydroxy-7-methoxy-4-(p-hydroxyphenyl)coumarin* are being described for the first time as natural product and *5,7,8-trimethoxy-4-(3,4-dihydroxy-phenyl)coumarin* occur for the first time in the *Coutarea* genus. In the anti-inflammatory assays, *5,7-dimethoxy-4-(p-methoxyphenyl)coumarin*, *5-hydroxy-7-methoxy-4-(p-hydroxyphenyl)coumarin*, *5,7-dimethoxy-4-(3-hydroxy-4-methoxy-phenyl)coumarin* and *23,24-dihydro-cucurbitacin F 25-acetate*, at 0.6 mg/ear, inhibited the edema by 35, 67, 19 and 30%, respectively. In the DPPH assays, *5-hydroxy-7-methoxy-4-(p-hydroxyphenyl)coumarin* ($43.70 \pm 0.21 \mu\text{g/mL}$) and *5,7,8-trimethoxy-4-(3,4-dihydroxyphenyl)coumarin* ($20.85 \pm 0.53 \mu\text{g/mL}$) free scavenger radical with IC_{50} values comparable to ascorbic acid and gallic acid, respectively. In the anticholinesterase assays, *2 β ,3 α -dihydroxy-11-oxo-ros-5-ene* showed inhibition of this enzyme.

Key words: *Coutarea hexandra*, Rubiaceae, 4-phenylcoumarins, triterpenes, diterpene antioxidant, antiinflammatory, anticholinesterase.

“Amor é o único caminho e cada simples problema é marcado por uma ausência do amor. Tudo é um paradoxo, um paradigma e está inter-relacionado. Cada problema existe onde há uma ausência de amor, mas se deixarem o amor fluir, o problema se resolverá, pois os problemas de seu mundo externo, originam-se de uma emoção interna”.

Kryon

1. Introdução

O homem moderno pode ser compreendido e diferenciado das demais épocas pelo consumo elevado de medicamentos. As pesquisas químicas e farmacológicas ao longo dos anos possibilitaram o alívio de males (tuberculose, a sífilis, o câncer e a hanseníase) que atingiram a humanidade por séculos, bem como para as endemias do mundo moderno, como a depressão, as cardiopatias e a AIDS. A grande oferta de medicamentos alopáticos, entretanto, não solucionou os problemas de saúde da maior parte das pessoas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80% da humanidade não têm acesso aos atendimentos primários de saúde, seja por se encontrarem distantes dos centros de saúde ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos (Valdir, 2008).

A fitoquímica estuda as substâncias ativas, suas estruturas, sua distribuição nas plantas, suas modificações e os processos de transformação que se produzem no decurso da vida da planta. Fitoquímica está em estreita ligação com a farmacologia, que estuda os efeitos das substâncias sobre o organismo humano, o mecanismo e a velocidade da sua ação, do processo de absorção e eliminação, das suas indicações, ou seja, o uso contra determinadas doenças (Ilef *et al.*, 2009).

As plantas sintetizam compostos químicos a partir dos nutrientes, da água e da luz que recebem. Algumas dessas substâncias químicas podem ou não ser tóxicas, isto depende muito da concentração em que venham a ser utilizadas. Assim, “planta medicinal é aquela que contém um ou mais de um princípio ativo que lhe confere atividade terapêutica”. Nem sempre os princípios ativos de uma planta são conhecidos, mas mesmo assim ela pode apresentar atividade medicinal satisfatória e ser usada desde que não apresente efeito tóxico (Ilef *et al.*, 2009).

As substâncias ativas das plantas medicinais são de dois tipos: os produtos do metabolismo primário (essencialmente sacarídeos), substâncias indispensáveis à vida da planta que se formam em todas as plantas verdes devido à realização da fotossíntese; o segundo tipo de substâncias é composto pelos produtos do metabolismo secundário, ou seja, processos que resultam essencialmente da assimilação do nitrogênio. Estes produtos parecem freqüentemente ser inúteis a planta, mas os seus efeitos terapêuticos, em contrapartida, são notáveis. Trata-se designadamente de óleos essenciais, resinas, alcalóides entre outras classes de substâncias. Geralmente, estas substâncias não se encontram na planta em estado puro, mais sobre a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e podem reforçar na sua ação sobre o organismo (Phillipson, 2007).

A natureza química da droga é determinada pelo seu teor em substâncias pertencentes aos seguintes grupos principais: alcalóides, glicosídeos, saponinas, princípios amargos, taninos, substâncias aromáticas, óleos essenciais e terpenos, glicoquininas, mucilagens vegetais, e anti-sépticos vegetais. As substâncias aromáticas de composição e ação por vezes muito variáveis podem estar associadas na planta a outras substâncias ativas. É neste grupo que encontramos os glicosídeos fenólicos, derivados do fenilpropano, como as cumarinas e furocumarinas. Um segundo grupo de substâncias aromáticas é constituído pelos produtos de condensação das moléculas de ácido acético ativado (acetogeninas). É a este grupo que pertencem os flavonóides e naftoquinonas (Phillipson, 2007).

As terapias alternativas são uma importante forma de tratamento e as plantas medicinais, principais fontes de princípios ativos (Pereira *et al.*, 2004; Vendruscolo *et al.*, 2005; Carlini *et al.*, 2006; Agra *et al.*, 2007; Biavatti *et al.*, 2007). Se a população dos países mais pobres utiliza as plantas medicinais por tradição e por não possuírem alternativas econômicas viáveis, nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitoterápicos influenciado pelo modismo de consumo de produtos naturais. Isto tem favorecido a difusão das promessas de cura através das plantas medicinais para muitos males. Entretanto, o conceito mais perigoso surgido foi o de que as plantas medicinais não representam quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido usadas popularmente durante séculos (Veiga Júnior *et al.*, 2005).

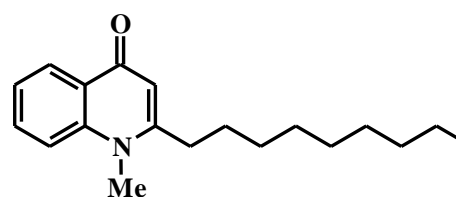
A falta de informações adequadas sobre as propriedades das plantas medicinais, seu consumo concomitante com os medicamentos tradicionais (alopáticos) sem aviso ao médico e, finalmente, a perda do conhecimento sobre os efeitos tóxicos das plantas, assim como a capacidade de identificá-las pela migração da população rural para as cidades são fatores críticos na automedicação (Veiga Júnior *et al.*, 2005; Albuquerque & Hanazaki, 2006). Esta prática é particularmente preocupante quando realizada em conjunto com outros medicamentos, pois pode levar a efeitos sinérgicos e interações inesperadas. Diversos estudos vêm sendo realizados analisando a potencialização dos efeitos de diuréticos de *Taraxacum officinale* Weber ex FH Wigg. (dente-de-leão), antidepressivos de *Hypericum perforatum* L. (erva-de-São-João), hipnóticos e ansiolíticos de *Passiflora incarnata* L. (maracujá), bem como as interações dos extratos à base de *Allium sativum* L. (alho) com os medicamentos que compõem o coquetel anti-HIV, como o saquinavir e o indinavir (Piscitelli, 2002; Cordeiro *et al.*, 2005; Alexandre *et al.*, 2008).

A aceitação de grande parte da comunidade da área de saúde à utilização das plantas medicinais como opção de tratamento completa o quadro atual de automedicação

indiscriminada em todas as classes sociais, muitas vezes sem o conhecimento da toxicidade dos extratos vegetais, o que pode ser perigoso se não houver a garantia de que as propriedades farmacológicas esperadas sejam realmente obtidas, sem efeitos colaterais ou adversos perigosos para sua saúde. Ao contrário dos medicamentos alopáticos que possuem estudos de farmacocinética, farmacodinâmica e toxicologia, a ausência de testes clínicos que comprovem as atividades farmacológicas da maioria dos extratos vegetais foram alguns dos principais motivos que levaram ao ceticismo quanto à prescrição de fitoterápicos (Veiga Júnior *et al.*, 2005).

Atualmente, muitas plantas medicinais utilizadas em rituais religiosos possuem estudos científicos que comprovam suas propriedades farmacológicas e dão sentido às utilizações ritualísticas. A *Ruta graveolens* L. (arruda), por exemplo, é empregada em banhos de “proteção em casos de amor”. Estudos recentes mostraram que um de seus constituintes químicos, a n-metil-2-nonil-4-quinolona (**1**), excita a motilidade uterina e ocasiona abortos. A *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira), usada em banhos de descarrego e alívio, apresenta efeitos analgésicos e tranqüilizantes, além de diminuição da insônia e da ansiedade. A *Erythrina verna* Vell. (mulungu), utilizado em rituais fúnebres, apresenta comprovados efeitos sedativos, podendo causar entorpecimento e bradicardia (Carmago, 1998). Neste contexto, quais extratos são realmente ativos, como e quando podem ser prescritos e como devem ser preparados? Estas questões que misturam o conhecimento popular ao científico devem ser respondidas através das comprovações científicas e da ampliação dos estudos das plantas, principalmente nas áreas de fitoquímica e etnofarmacologia (Maciel *et al.*, 2002). Somente com estas respostas, que já existem para dezenas de fitoterápicos, e sua divulgação, os médicos passarão a prescrevê-los, aproximando-se da necessidade da população utilizar as plantas medicinais (Valdir, 2008).

No Brasil, diretrizes do Ministério da Saúde (MS) determinaram prioridades na investigação das plantas medicinais e implantação da fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS). No entanto, para que isto ocorra são essenciais que se conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade dessas plantas em cada bioma, de acordo com os costumes, tradições e condição sócio-econômica da população. Algumas pesquisas já foram realizados com o objetivo de confirmar os efeitos terapêuticos de plantas medicinais utilizadas pela população (Silva *et al.*, 2006).

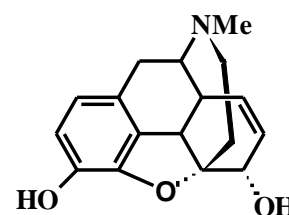


Quinolona (1)

Tradicionalmente, a atividade e a forma na qual as plantas são utilizadas na medicina popular é transferida oralmente de geração em geração em comunidades. É admirável que este conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios sem nunca, porém, cair no esquecimento. Assim, uma estratégia útil no desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais é utilizar o vasto conhecimento popular em relação ao uso de plantas e produtos de origem animal em diversas enfermidades, pois este tipo de informação permite guiar a química de produtos naturais na busca de novos agentes terapêuticos. Muitos dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado derivados de produtos naturais provêm desta informação, definida como informação etnobotânica ou etnofarmacológica (Rauh, 2008).

Segundo Henkel e cols. (1999), das cerca de 30.000 substâncias de origem natural bioativas atualmente conhecidas, 35% são provenientes de bactérias, 27% de plantas medicinais, 26% de fungos e 13% de animais. A diversidade molecular encontrada nos produtos naturais é a principal razão que tem motivado o direcionamento dos estudos na busca de protótipos que possam inibir ou antagonizar alvos biológicos definidos. A transição entre a busca de novos fármacos ou protótipos tornou-se possível através do avanço da química orgânica e da química medicinal.

Durante séculos, as plantas têm sido a maior fonte de fármacos como demonstrado com o isolamento da morfina (2) a partir do ópio no início do século XIX. Estima-se que atualmente 25% a 30% dos medicamentos utilizados derivam de fontes naturais (Calixto, 2005). Nesse contexto, a importância da investigação com plantas reside principalmente na identificação de protótipos, cuja atividade permita o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, ainda existe um grande desafio que é tornar um protótipo num fármaco apropriado para o uso terapêutico (Poser & Mentz, 2004).



Morfina (2)

2. Considerações Sobre as Atividades Biológicas Relacionadas aos Objetivos do Trabalho, bem como sobre a Família, Gênero e Espécie Estudada

2.1. Atividade Antioxidante

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados são classificados como radicais livres (Halliwell, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, muito reativas e com meia-vida curta. Algumas das espécies mais conhecidas são: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}), peroxinitrito (ONOO^{\cdot}) e o radical semiquinona (Q^{\cdot}). A presença de radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas (Pompella, 1997). Esses radicais podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. Entre as principais formas reativas de oxigênio o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) apresenta baixa capacidade de oxidação, o radical hidroxila (OH^{\cdot}) apesar de mostrar uma pequena capacidade de difusão, é considerado a espécie mais reativa na indução de lesões nas moléculas intracelulares. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos ao DNA por meio de reações enzimáticas (Thomas & Balasubramanian, 2004).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (respiração aeróbica, peroxissomos e enzimas do citocromo P450) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro). Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (Cerutti, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (Niki *et al.*, 2005). Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo) e não-enzimáticos (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, flavonóides, proteínas do plasma, glutathione, curcumina e outros) (Hansen *et al.*, 2006).

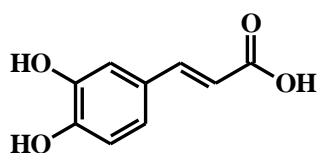
Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos:

- ▶ O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre.
- ▶ Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, aminoácidos, proteínas, ligação dupla de ácidos graxos poliinsaturados e bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes da dieta, como as vitaminas A, C e E, os flavonóides e os carotenóides são úteis neste processo.
- ▶ Outro mecanismo é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Este processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer adaptação do organismo em resposta aos radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes.

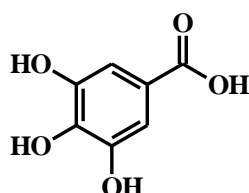
O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é de suma importância para a sobrevivência no ambiente aeróbico. Os organismos eucarióticos possuem enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase, que reagem com os oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (Azzi, 2007). Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão na dieta de antioxidantes é de grande importância, pois o consumo de frutas e legumes está relacionado com a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (Pompella, 1997). Entretanto, nos alimentos é encontrada uma grande variedade de substâncias que atuam em sinergismo na proteção das células e tecidos (Cicerale *et al.*, 2007). O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é freqüentemente citado na literatura, mostrando que suas interações são efetivas na inibição da peroxidação dos lipídeos e na proteção do DNA (Niki *et al.*, 2005).

A importância dos antioxidantes *in vivo* depende de fatores como os tipos de radicais livres formados, onde e como são gerados, análise e métodos para a identificação dos danos e doses ideais para obter proteção. Assim, é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos (Halliwell *et al.*, 1995). A vitamina C, por exemplo, atua como um antioxidante, mas é incapaz de agir nos compartimentos lipofílicos e inibir a peroxidação dos lipídeos. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que essa vitamina na presença de metais de transição, tal como o ferro, pode atuar como pró-oxidante e gerar os radicais. Geralmente, esses metais estão disponíveis em quantidades muito limitadas e as propriedades antioxidantes dessa vitamina predominam *in vivo* (Niki *et al.*, 2005). Dentre os antioxidantes presentes nos

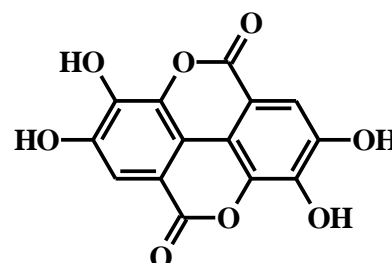
vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos (Decker, 1997). Os compostos mais estudados são os ácidos caféico (3), gálico (4) e elágico (5), de considerável importância na dieta e na inibição do processo de peroxidação lipídica (Halliwell *et al.*, 1995). O ácido elágico, encontrado principalmente na uva, morango e nozes, tem sido efetivo na prevenção do câncer induzido pelo cigarro (Niki *et al.*, 2005).



Ácido caféico (3)

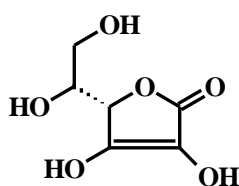


Ácido gálico (4)

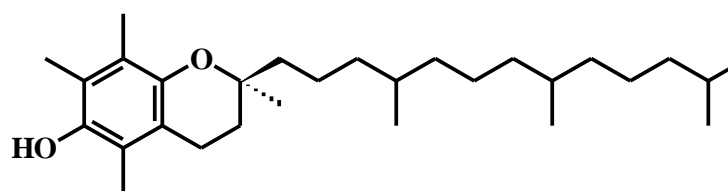


Ácido elágico (5)

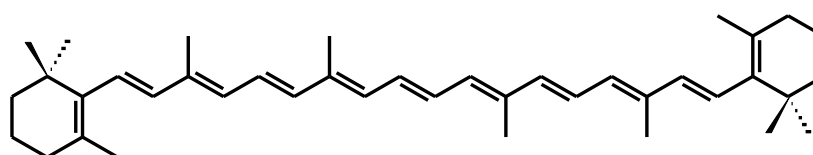
O desenvolvimento do estudo fotoquímico demonstra um grande avanço nas ações antioxidante, beneficiando a saúde humana e prevenindo patologias que incluem doenças coronárias, câncer, desordens degenerativas do cérebro e doenças infecciosas, atuando nos processos envolvendo oxigênio reativo e espécies de nitrogênio. Estudos epidemiológicos mostraram uma associação inversa constantemente entre consumo de legumes e frutas e o risco de doenças cardiovasculares e certas formas de câncer. Os efeitos protetores podem ser um resultado de combinadas ações de antioxidantes como ácido ascórbico (vitamina C) (6), α -tocoferol (vitamina E) (7), β -caroteno (8) e de compostos fenólicos. Compostos fenólicos ocorrem amplamente no reino vegetal e exibem uma variedade de propriedades farmacológicas, entre outras, antiinflamatória, anticarcinogênica e vasodilatadora (Muhammad *et al.*, 2008).



Ácido ascórbico (6)



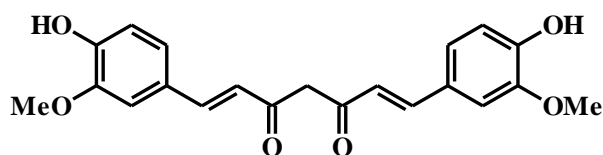
α -Tocoferol (7)



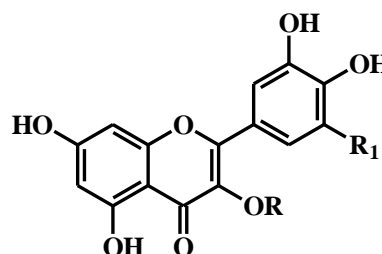
β -Caroteno (8)

Plantas constituem uma fonte importante de substâncias que diferem amplamente em termos de estrutura e propriedades biológicas. Muitas têm um papel notável dentro da medicina tradicional e, nos últimos anos, a prevenção de câncer e doenças cardiovasculares tem sido associada com a ingestão de frutas, legumes ou plantas ricas em antioxidantes naturais. Há muita evidência para sugerir essas combinações associada com um menor risco de mortalidade por doenças, como diabetes, hipertensão aguda e dispepsia e outras (Afef *et al.*, 2007).

A curcumina (9), obtido da *Curcuma longa* L. (cúrcuma), usado como corante de alimentos, é um antioxidante natural que atua no seqüestro dos radicais livres e inibe a peroxidação lipídica, agindo na proteção celular, incluindo o DNA, dos danos oxidativos (Subramanian *et al.*, 1994). De um modo geral, os compostos fenólicos inibem os processos da oxidação em certos sistemas, não significando, portanto, que possam proteger as células e os tecidos de todos os danos oxidativos, e em determinadas condições podem atuar como pró-oxidante. Os flavonóides, por exemplo, atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres nos compartimentos celulares, lipofílico e hidrofílico. Esses compostos têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia causada pelos radicais livres. As propriedades benéficas de flavonóides, como quercetina (10), miricetina (11) e rutina (12), por exemplo, podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar radicais livres (Decker, 1997).



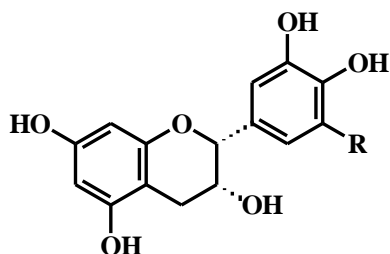
Curcumina (9)



Quercetina R = R₁ = H (10)

Miricetina R = H, R₁ = OH (11)

Rutina R = β-D-Glc-(1→6)-α-L-Rha, R₁ = H (12)



(-)-Epicatequina R = H (13)

(-)-Epigallocatequina R = OH (14)

Knekt e cols. (1997) encontraram uma relação inversa entre o consumo de flavonóides na dieta e o desenvolvimento de tumores em indivíduos na faixa etária de 50 anos e não-

fumantes. Esses autores observaram que entre as muitas fontes de flavonóides da dieta, o consumo de maçãs apresentou os melhores resultados na prevenção de tumores no pulmão. A quercetina, abundante no vinho tinto, está presente nas frutas e em vegetais. Entretanto, esse antioxidante pode reagir com ferro e tornar-se um pró-oxidante. Os flavonóides miricetina (**11**), quercetina (**10**) e rutina (**12**) foram mais efetivos do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo H₂O₂ no DNA de linfócitos humanos (Noroozi *et al.*, 1998). (-)-Epicatequina (**13**) e rutina (**12**) apresentaram atividade antioxidante sobre o OH• superior ao antioxidante manitol, um seqüestrador de radicais hidroxilas (Hanasaki *et al.*, 1994) e a (-)-Epicatequina (**13**) e a (-)-epigallocatequina (**14**), encontrados no chá verde e em menores concentrações no chá preto, possuem propriedades antioxidantes e inibem o processo de carcinogênese (Mukherjee *et al.*, 1997).

Sabe-se também que o dano causado por espécies reativas de oxigênio é considerado um fator contribuinte de diversas doenças, incluindo a doença de Alzheimer. Dessa forma, é adequada a associação de ambos os ensaios para um estudo monitorado mais eficiente. Levando-se em consideração os aspectos botânicos e quimiotaxonômicos, os produtos naturais destacam-se pela diversidade estrutural e, assim, as plantas são candidatas importantes na busca de novos fármacos (Giordani *et al.*, 2000).

2.2. Atividade Anticolinesterásica

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto sócio-econômico, responsável por cerca de 50-60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima dos 65 anos. Esta patologia afeta aproximadamente 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo. É considerada nos Estados Unidos um dos principais problemas de saúde devido ao enorme impacto causado ao indivíduo, famílias, sistema de saúde e à sociedade como um todo, uma vez que metade dos pacientes é internada em instituições de saúde. O restante recebe tratamento em casa, envolvendo em seu cuidado, familiares, parentes e amigos. O acompanhamento do paciente traz um enorme stress emocional, psicológico e financeiro, uma vez que o tratamento é caro e o paciente perde gradualmente suas funções motoras e de aprendizado (Viegas Júnior *et al.*, 2004).

Em nível celular, a DA está associada à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em

menor extensão. Estudos mais recentes demonstraram ocorrência de redução do número de receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh, muitos dos quais localizados nas terminações colinérgicas pré-sinápticas (Viegas Júnior *et al.*, 2004).

A etiologia da DA permanece desconhecida, mas estudos pós-morte têm mostrado que a doença é caracterizada pela diminuição da função colinérgica no cérebro. Os mais modernos medicamentos utilizados para tratar os sintomas da DA elevam os níveis de acetilcolina (ACh) pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Figura 1, p. 10).

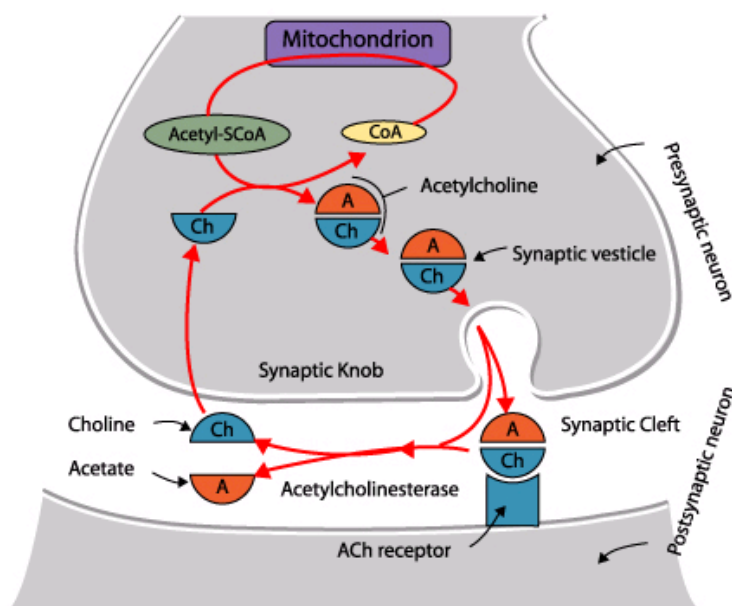
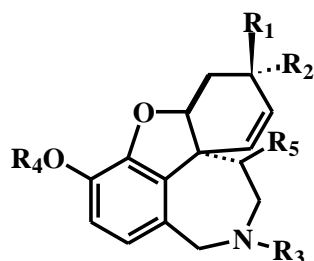


Figura 1. Junção colinérgica focalizando os sítios do receptor, biossíntese, armazenamento, liberação e hidrólise da ACh. (Fonte: <http://www.anaesthesiaweb.com/images/acetylcholine>. Acessado em janeiro/2009).

Ensaio efetuados para detectar a inibição da AChE estão sendo usados para avaliar um grande número de plantas utilizadas popularmente para melhorar a memória. Após o isolamento da galantamina (**15**) de *Galanthus woronowii* Losins K. e sua aprovação, em 2001, pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para comercialização e utilização na DA (Giordani *et al.*, 2000) e de outros compostos como a sanguinina (**16**), encontrada em *Eucharis grandiflora* Planch. & Linden, o qual mostrou-se 10 vezes mais ativa que a galantamina (**15**); a zeatina (**19**), presente em *Fiatoua villosa* e, entre outros, a α -solanina (**17**) e α -chaconina (**18**), isolados de *Solanum tuberosum* L. (Viegas Júnior *et al.*, 2004), a busca por substâncias inibidoras da AChE, a partir de espécies vegetais de uso corrente na medicina popular tem sido intensificada. Recentemente, foi relatada uma série de espécies vegetais, pertencentes a diferentes famílias, bem como de substâncias isoladas (alcalóides, benzenóides, cumarinas,

flavonóides, lignóides, quinóides, terpenóides e outros) com atividade anticolinesterásica (Barbosa Filho *et al.*, 2006). Diante disso, torna-se evidente a necessidade de se explorar os vegetais como fonte de novos fármacos inibidores da acetilcolinesterase que sejam potentes, seletivos e com baixa toxicidade.

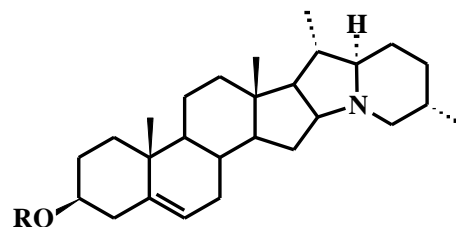


Galantamina (15)

R₁ = OH, R₂ = R₅ = H, R₃ = R₄ = Me

Sanguinina (16)

R₁ = OH, R₂ = R₄ = R₅ = H, R₃ = Me

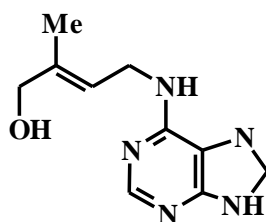


α -Solanina (17)

R = Ramnose-Galactose-Glicose

α -Chaconina (18)

R = Ramnose-Glicose-Ramnose



Zeatina (19)

2.3. Atividade Antiinflamatória

A reação inflamatória é um mecanismo de proteção do organismo contra agentes ofensores ou traumas. No entanto, em certas circunstâncias essa resposta pode ser dirigida de forma inadequada a substâncias externas ou tecidos do próprio organismo. Nestas condições, pode ser necessária a utilização de antiinflamatórios. A pesquisa em busca de terapias para o tratamento da inflamação está direcionada a doenças como lúpus eritematoso sistêmico, artrites reumatóides e psoriática, esclerose múltipla e outras. No entanto, essas terapias apresentam muitos efeitos colaterais. Por exemplo, os antiinflamatórios esteroidais causam imunossupressão e impedem a regressão da ferida, enquanto que novos fármacos que inibem seletivamente a ciclooxigenase induzida podem reduzir a síntese de prostaciclina e, assim, reduzir a atividade protetora vascular e conduzir a um aumento do risco de trombose. Apesar

destes efeitos colaterais estas drogas ainda são usadas na terapêutica de inflamações (Boller, 2007).

A resposta inflamatória iniciada com o fim de ajustar um desequilíbrio da homeostase seria ideal com um mínimo de modificação vascular e tecidual. Assim, juntamente com estas respostas pró-inflamatórias são gerados estímulos para inibição deste processo. Para tal, células e mediadores inflamatórios trabalham para corrigir distúrbios metabólicos, remover citodentritos resultantes da ação patogênica, refazer estruturas lesadas, a fim de reconstituir a capacidade funcional e a organização anatômica original ou, se os danos teciduais foram extensos, repará-los por uma cicatriz ou isolá-los dos tecidos ainda sãos. A falha de alguns destes mecanismos reguladores pode fazer com que este processo, inicialmente resolutivo, perca o controle e desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a desenvolver um processo inflamatório crônico. Uma resposta inflamatória excessiva significa uma manifestação clínica que necessita de uma intervenção terapêutica (Boller, 2007).

A pele tem um papel importante de proteção, termo-regulação, resposta imunológica, bem como na manutenção e de defesa, uma vez que está sujeita constantemente a estímulos externos, tais como patógenos, agentes mecânicos e químicos e resposta auto-imune. Esses estímulos desencadeiam uma resposta inflamatória imediata de proteção ao organismo, cuja finalidade é erradicar o agente agressor, de forma a evitar sua disseminação a outras regiões do organismo, promover o reparo tecidual e restabelecer a homeostasia da pele (Firestein, 2004). A resposta inflamatória é caracterizada, em nível clínico, por sinais como o calor, eritema, edema e dor. Porém, uma resposta exacerbada pode promover uma descompensação fisiológica, levando a perda de função do tecido e/ou órgão (Rang *et al.*, 2007; Rauh, 2008). Os eventos desencadeados após uma agressão ou estímulo aumentam a permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos e de vários mediadores pró-inflamatórios, que são liberados durante a inflamação, tanto pelas células cutâneas quanto pelos neutrófilos, linfócitos, monócitos. (Simmons, 2006; Rauh, 2008).

As citocinas, por exemplo, são mediadores protéicos cuja ação envolve o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, indução da inflamação, controle da proliferação e diferenciação celular, bem como a indução da cicatrização. Além disso, regulam a resposta imune e inflamatória através da interação com receptores específicos presentes nos queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos T, promovendo a mobilização de leucócitos e a ativação de outras células do tecido cutâneo (Rang *et al.*, 2007; Rauh, 2008). As citocinas desempenham um importante papel na homeostasia e na modulação a resposta imune da pele frente a agentes nocivos (vírus, fungos, bactérias, agentes químicos e radiação UV),

considerados potentes iniciadores do processo inflamatório e de reparo com ampla atividade biológica, incluindo a ativação das células endoteliais e a indução de várias citocinas, algumas delas com ação ativadora de leucócitos (Uchi *et al.*, 2000).

A exposição celular às citocinas (IL-1 e TNF- α) resulta na ativação de algumas vias de sinalização, como das proteínas quinases ativadas por mitógenos, que culmina na estimulação da atividade de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear-kB e a proteína ativadora-1. Estes fatores de transcrição quando ativados induzem a transcrição gênica de diversas, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários óxido nítrico sintetase induzida e cicloxigenase-2 (Pascual & Glass, 2006).

Além das citocinas, os metabólitos do ácido araquidônico tais como as prostaglandinas, também desempenham um papel importante no processo inflamatório e atuam em receptores específicos presentes em células-alvo. Na pele, os prostanóides são produzidos em abundância e os seus receptores também estão expressos de forma considerável. No entanto, o seu papel fisiológico no tecido cutâneo ainda não está totalmente esclarecido para alguns prostanóides (Kabashima & Miyachi, 2004).

Outro mediador químico que também desempenha uma ação importante durante o processo inflamatório cutâneo é a histamina. Ela também atua em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervêm nas reações alérgicas e nos receptores histaminérgicos promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido. Durante as reações inflamatórias, sua liberação ocorre pelo processo de exocitose (Rang *et al.*, 2007; Silva & Carvalho, 2004).

As doenças dermatológicas, incluindo as dermatites, eczemas e psoríase, têm componentes inflamatórios e/ou imunológicos em sua etiologia, caracterizam-se por alterações cutâneas que conferem um aspecto desagradável à pele e que necessitam de tratamento prolongado, além de envolver componentes emocionais, nos quais promovem recidivas ou exacerbação das lesões. As doenças inflamatórias da pele como dermatites e psoríase afetam vários indivíduos no mundo e a prevalência dessas doenças tem sido duplicada nos últimos 10 a 15 anos. Os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias cutâneas podem ser distintos, sendo algumas doenças iniciadas por um processo alérgico ou irritante. Assim, as doenças inflamatórias não envolvem necessariamente o mesmo perfil e, conseqüentemente o mesmo tipo de tratamento (Rauh, 2008).

A instalação de um processo inflamatório crônico tem sido considerada a base de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, asma, esclerose múltipla, artrite

reumatóide, doença de Alzheimer, câncer e algumas doenças cutâneas como dermatites e psoríase (Mueller, 2006). Desta forma, é necessária a manutenção do equilíbrio entre os efeitos benéficos da inflamação e o seu potencial de persistência que, em longo prazo, pode ser deletério por promover a destruição tecidual (Simmons, 2006; Rauh, 2008).

Os agentes imunossupressores **tacrolimus**, **pimecrolimus**, **ciclosporina** são utilizados no tratamento de afecções cutâneas que tenham em sua patogênese o envolvimento do sistema imune e exercem seus efeitos via inibição da produção ou ação de citocinas, e inibição da síntese de purinas ou pirimidinas [**micofenolato de mofetila** (CellCept[®]) - potente inibidor de uma enzima chamada inosina monofosfato desidrogenase, responsável pela síntese de proteínas que fazem parte do DNA de linfócitos, uma das principais células envolvidas no processo de rejeição de órgãos em casos de transplantes] (Rang *et al.*, 2007). Os imunomoduladores macrolactâmicos, como o pimecrolimus e o tacrolimus, inibem seletivamente a ativação das células T e a síntese de citocinas pró-inflamatórias. A terapia tópica com esses agentes se mostrou efetiva em diversas condições dermatológicas (dermatite atópica, dermatite de contato, etc.) (Skinner, 2005).

Os glicocorticóides restringem a proliferação clonal das células e também interferem na transcrição de outras citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1, etc). O micofenolato de mofetila tem sido cada vez mais utilizado no tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes na dermatologia, sendo útil como substituto de glicocorticóides em certas condições dermatológicas como distúrbios bolhosos auto-imunes. Também é eficaz no tratamento de doenças inflamatórias como a psoríase, dermatite atópica e piodermia gangrenosa (Fox *et al.*, 2006).

Mesmo com o arsenal de agentes antiinflamatórios e imunossupressores disponíveis, alguns fatores comprometem a adesão do paciente ao tratamento como efeitos adversos indesejáveis, custo elevado, etc (Leung *et al.*, 2004; Gottlieb, 2005). Além disso, alguns medicamentos não atingem a eficácia desejada ou comprometem a resposta imunológica, aumentando o risco de infecções (Fox *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2007). Assim, a indústria farmacêutica tem voltado sua atenção aos produtos naturais, na busca de um fármaco efetivo no tratamento das doenças inflamatórias e com efeitos adversos reduzidos.

Os compostos de origem natural podem interferir em vários mecanismos do processo inflamatório (Calixto, 2003). A considerável diversidade e complexidade das estruturas químicas e a atividade biológica, predispõem a identificação de protótipos com atividade antiinflamatória interessante. Nesse contexto, o interesse pelas plantas medicinais permanece forte, pois permite o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de diversas doenças,

inclusive aquelas que acometem a pele, considerando que os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento de várias dermatoses (psoríase, dermatite atópica, eczemas, etc), como os antiinflamatórios não-esteroidais, glicocorticóides, imunossupressores e anti-histamínicos, muitas vezes não apresentam a eficácia desejada, além de promoverem efeitos adversos que limitam seu uso (Rauh, 2008).

Cerca de 300 preparações de plantas medicinais destinadas ao tratamento de doenças inflamatórias, tiveram sua eficácia comprovada e seu uso tradicional validado pela entidade reguladora de medicamentos da Alemanha. Dentre as quais estão incluídas, a *Arnica montana* L., *Calendula officinalis* L., *Matricaria recutita* L., *Echinacea* sp., *Sanguinaria canadenses* L., *Avena sativa* L. e, entre outras, a *Aloe vera* L. (babosa). No entanto, grande parte das plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foi submetida a estudos que comprovem sua eficácia e segurança e o uso popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Afinal, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento, devem estar fundamentadas em evidências experimentais (Rauh, 2008).

Os agentes flogísticos utilizados em experimentos com animais apresentam ação tópica e induz uma inflamação local como resultado da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação e extravasamento de plasma, conduzindo assim à instalação dos sinais da inflamação. Esses modelos de inflamação permitem identificar compostos com atividade antiinflamatória úteis no tratamento de doenças que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (Gábor, 2003).

2.4. A Família Rubiaceae

A família Rubiaceae, descrita primeiramente por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, inclui representantes de hábitos variados, desde árvores, arbustos, subarbustos até ervas, além de lianas e, mais raramente, epífitas. Distribui-se, predominantemente, em regiões tropicais, principalmente na América do Sul. No Brasil, a maior representatividade ocorre na Mata Atlântica. Segundo Mabberley (1997), ela ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, perdendo apenas para Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae. Desde sua descrição original, a família tem passado por algumas mudanças quanto à delimitação taxonômica. De acordo com Gomes (1996), isto se deve à elevada riqueza e variedade de caracteres

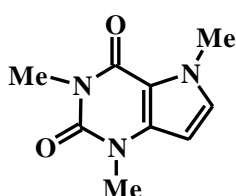
morfológicos. Essas mudanças concentram-se, mais freqüentemente, na delimitação das categorias infrafamiliares, como subfamílias e tribos (Pereira, 2007).

Esta família engloba cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies (Coelho *et al.*, 2006), essencialmente tropicais (Robbrecht, 1988). Alguns dos gêneros são endêmicos da região neotropical (Andersson, 1992), sendo *Psychotria* L. o maior deles, representado por cerca de 1.650 espécies (Hamilton, 1989). No Brasil, Barroso e cols. (1991) consideraram para a família 18 tribos, 101 gêneros e 1.010 espécies, de ampla distribuição em quase todas as formações vegetais. Souza e Lorenzi (2005), por exemplo, citam 127 gêneros e cerca de 1.500 espécies nativas, correspondendo a uma das principais famílias da flora brasileira. No entanto, os trabalhos sobre taxonomia na *Flora Brasiliensis* foram descritas 1.002 espécies, reunidas em 99 gêneros e 19 tribos. Estudos posteriores de floras regionais foram efetuados e no Nordeste foram encontrados 66 gêneros e 277 espécies (Pereira & Barbosa, 2004; Pereira, 2007).

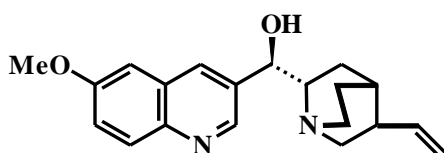
A divisão em subfamílias tem se baseado em diferentes características morfológicas. Dentre os sistemas taxonômicos clássicos, o de Jussieu em 1789, baseou na deiscência ou indeiscência dos frutos; os de Schumann em 1891, e De Candolle em 1930, no número de óvulos por lóculo do ovário. Dentre os sistemas modernos, Verdcourt em 1958 e Bremekamp em 1966 basearam principalmente na escassez ou abundância de endosperma e na presença ou ausência de ráfides (Pereira, 2007); enquanto Robbrecht (1988) baseou em várias combinações de caracteres, tais como a placentação, biologia floral, morfologia e anatomia de frutos e sementes. Este último, mais amplamente utilizado, considera como subfamílias a Antirrhoideae, Cinchonoideae, Ixoroideae e a Rubioideae, que reúnem 44 tribos, das quais cinco são ainda consideradas de posição incerta (Pereira, 2007).

A avaliação dos dados químicos, aliados aos parâmetros citados por Robbrecht (1988), permitiu boa correlação entre as vias biossintéticas e os aspectos morfológicos das subfamílias Ixoroideae, Cinchonoideae e Rubioideae, sendo que cada uma apresenta um perfil químico diferente e típico, considerado marcador quimiotaxonômico da família. Na subfamília Ixoroideae, os iridóides são exclusivos, enquanto que em Cinchonoideae os alcalóides indólicos predominam e, em Rubioideae, as antraquinomas são os principais constituintes. Por outro lado, em Antirrhoideae estes marcadores químicos não ocorrem, fato que está condizente com a divisão proposta por Robbrecht, baseada somente em informações morfológicas, (Bolzani *et al.*, 2001). Estudos quimiotaxonômicos com iridóides glicosilados em várias espécies concluíram que estes compostos estão presentes em todas as subfamílias (Hiroyuki *et al.*, 1988); enquanto que os gêneros *Rubia*, *Galium* e *Morinda*, pertencentes a Rubioideae, são importantes fontes de antraquinonas (Pereira & Barbosa, 2004).

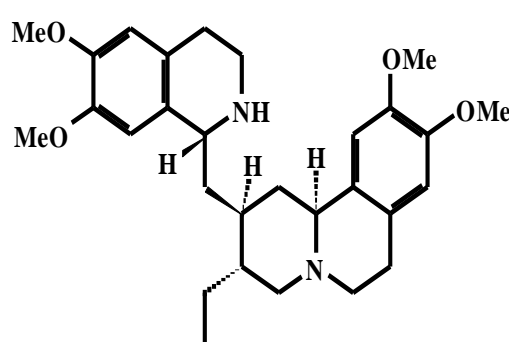
A família Rubiaceae reúne um considerável número de espécies com importância econômica, ornamental, medicinal ou alimentícia (Mendoza *et al.*, 2004). Dentre as quais, pode-se citar a *Coffea arabica* L. (café), fonte de várias substâncias farmacologicamente ativas, como a cafeína (**20**) (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002); *Cinchona calisaya* Wedd. e *C. succirubra* Pav. ex Klotzsch, conhecidas como quineira, das quais se extrai o alcalóide quinina (**21**), usado no tratamento da malária; *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) Rich. (ipeca), produtora do alcalóide emetina (**22**), usado como emético (Porto *et al.*, 1977); *Uncaria tomentosa* D.C. que tem sido usada no tratamento de câncer, alergias, artrites e infecções virais (Wurm *et al.*, 1998); o decocto de *Mitragyna ciliata* Aubrév & Pellegr. em doenças pulmonares, disenteria, reumatismo e gonorréia, além de possuir propriedades antiinflamatória e analgésica (Dongmo *et al.*, 2003). Há relatos de que o extrato aquoso de *Rothmannia longiflora* Salisb. é usado como antipirético (Bringmann *et al.*, 1999). Outras espécies, como *Palicourea marcgravii* A.St.-Hil. (erva-de-rato-verdadeira) que se destaca pela toxicidade (Oliveira *et al.*, 2003), *Gardenia jasminoides* Ellis (jasmim-do-cabo), *Ixora alba* L. e *I. coccinea* L. (ixora) e espécies dos gêneros *Pentas* Benth., *Mussaenda* Burm. ex L. e *Portlandia* P.Browne, que são úteis na ornamentação (Porto *et al.*, 1977; Pereira, 2007) e *Genipa americana* L. (jenipapo), com frutos apreciados em doces, vinho e licor, sendo empregada, também, como madeira na construção civil e na confecção de móveis, corante e pelas tribos indígenas em pinturas de pele (Lorenzi, 1998).



Cafeína (20)



Quinina (21)

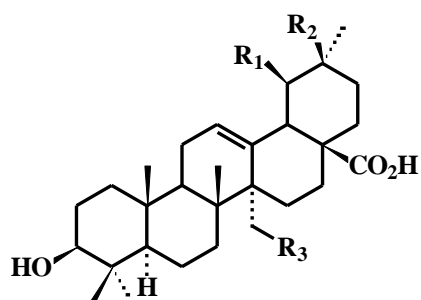


Emetina (22)

Outros gêneros possuem estreita relação com a fauna. Frutos carnosos de espécies da tribo Gardenieae, por exemplo, são consumidos por muitas espécies de mamíferos (Gomes, 1996) e diversas espécies de pássaros consomem frutos de *Alibertia sessilis* K. Schum., *Coussarea hydrangeaeifolia* Benth. & Hook.f., *Guettarda viburnoides* Cham. & Schldtl. e *Rudgea viburnoides* Benth., dentre outras (Lorenzi, 1998). A variedade de tamanhos, formas e cores das flores, muitas das quais nectaríferas e odoríferas, constituem atrativos para diferentes

tipos polinizadores (abelhas, beija-flores, borboletas moscas e aves) (Gomes, 1996). Mendonça e Anjos (2006) apresentaram uma compilação de vários trabalhos que destacam atributos, tanto morfológicos quanto energéticos, associados às interações com polinizadores. Dentre outros, os beija-flores são citados como freqüentes visitantes de espécies neotropicais de *Ferdinandusa* Pohl, *Hamelia* Jacq., *Isertia* Schreb., *Kerianthera* J.H.Kirkbr., *Manettia* Mutis ex L., *Palicourea* Aubl., *Pentagonia* Benth., *Psychotria* L. e *Sabicea* Aubl.

Investigações fitoquímicas revelaram que a família Rubiaceae é bastante estudada e está representada pela presença de várias classes de compostos: os alcalóides indólicos (Phuong *et al.*, 1999), antraquinonas (Ling *et al.*, 2002a,b), cumarinas (Kohler *et al.*, 2001), saponinas (Sahpaz *et al.*, 2000), lignanas, além de iridóides e *seco*-iridóides glicosilados ou não (Carbonezi *et al.*, 1999). Dentre estas classes, os alcalóides, iridóides e triterpenos têm despertado considerável interesse devido ao amplo espectro de atividades biológicas e potencial terapêutico. Como exemplos, podem ser citados os ácidos uncarínico E (**23**) e 27-*O-p-(E)*-cumaroiloxiursólico (**24**), isolados da espécie *Gardenia saxatilis* Geddes, ambos com ativos contra cepas do *Plasmodium falciparum* (Suksamrarn *et al.*, 2003); o *N*- β -D-glicopiranosilvincosamida (**25**), um alcalóide isolado do extrato em etanol de *Psychotria leiocarpa* Mart., que inibe a agregação plaquetária em humanos e é ativo como analgésico (Henriques *et al.*, 2004).

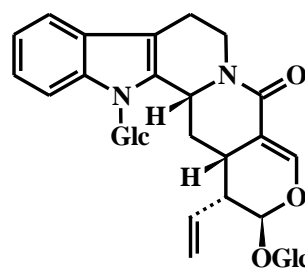


Ácido uncarínico E (23)

R₁ = H, R₂ = Me, R₃ = *E-p*-cumaroiloxi

27-*O-p-(E)*-Cumaroiloxiursólico (24)

R₁ = Me, R₂ = H, R₃ = *E-p*-cumaroiloxi



***N*- β -D-Glicopiranosilvincosamida (25)**

A tribo Cinchoneae, a qual pertence a espécie em estudo, ocorre no Brasil com muitos gêneros e espécies. Dos 38 gêneros conhecidos, quase a metade foi observada dentro dos limites da *Flora Brasiliensis*. Dentre os monotípicos, somente o *Molopanthera* é endêmico do Brasil. Cresce como árvore nas regiões das matas do litoral, entre a Bahia e o Rio de Janeiro e,

pela natureza das flores, ocupa um lugar intermediário entre as tribos Cinchoneae e Oldenlandieae (Pereira, 2007).

2.5. O Gênero *Coutarea* e a Espécie *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum.

O gênero *Coutarea* consta de seis espécies distribuídas na América Latina desde México até a Argentina. Estudos mais recentes abordam principalmente questões pertinentes à distribuição, filogenia e ecologia (McDowell *et al.*, 2003). Na medicina popular, somente duas espécies (*C. latiflora* e *C. hexandra*) têm sido mencionadas. Dentre as atividades citadas estão abortiva, antimalárica, antiinflamatória, antidiabética, contra febre tifóide e outras (Tabela 1, p. 21). Do ponto de vista biológico, atividade antimalárica *in vitro* (Noster & Kraus, 1990), hipoglicemiante (Barbosa-Filho *et al.*, 2005), bem como hemólise e rbdomiólise em seres humanos foram reportadas para *C. latiflora* (Roca, 2003) (Tabela 2, p. 23).

No que se refere aos aspectos químicos, os estudos revelaram para o gênero a presença de flavonóides (Reher *et al.*, 1983; Iinuma *et al.*, 1987; Delle Monache *et al.*, 1989), 4-fenilcumarinas (Aquino *et al.*, 1988; D'agostino *et al.*, 1989a,b; 1990; Delle Monache *et al.*, 1983; 1984; 1990) e de derivados de cucurbitacinas (Tabela 3, p. 24).

A espécie *C. hexandra* é uma árvore que ocorre desde a Guiana até São Paulo e outros estados brasileiros. Na região Nordeste, esta espécie é conhecida por “quina-quina”, em Minas Gerais como “murta-do-mato” e em São Paulo como “quina-quina-branca, quina-do-Pará, quina-do-Piauí e amora-do-Mato”. Possui em média 3 a 5 metros de altura, com folhas opostas, elípticas acuminadas e glabras. Possui flores grandes, axilares e frutos cápsula que maduros apresentam cor marrom café (Pereira, 2007) (Figura 2, p. 20). Em Sergipe, o chá da entrecasca é utilizado como abortivo, diurético e no combate à dor e à inflamação (Abner *et al.*, 2004; Lucena *et al.*, 2006). Estas indicações foram avaliadas em diferentes modelos para nocicepção (placa quente, formalina e ácido acético) e também em estímulo edematogênico induzido por carragenina. Os resultados sugeriram que o extrato aquoso foi ativo como antinociceptivo, confirmando o uso popular (Lucena *et al.*, 2006). Entre outras, atividades antiinflamatória (De Almeida *et al.*, 1991), citotóxica (Suffness *et al.*, 1988) e moluscicida (Silva *et al.*, 1971) também foram relatadas (Tabela 2, p. 23).

A indicação popular de efeito abortivo para as cascas desta espécie foi avaliada, onde se observou efeito anti-fertilizante com a fração em acetato de etila, interferência no crescimento fetal e aumento da mortalidade intra-uterina com a fração em hexano (Almeida *et al.*, 1990),

reabsorção fetal e atividade antiinflamatória com o extrato em etanol (Rao *et al.*, 1988; Falcão *et al.*, 2005) e antimicrobiano com o extrato em metanol e o composto isolado deste, o 5,7,2',5'-tetraacetoxi-4-fenilcumarina (Araújo *et al.*, 1988). Além destes, extratos aquosos, alcoólicos, hidroalcoólicos e decoctos das cascas do caule e/ou das partes aéreas, isolados ou em mistura entre si ou com de outras espécies vegetais têm sido utilizados para a profilaxia e tratamento de infecções virais causadas por Herpes (simples e zoster) (Patente PI0201219-7).

Apesar do extenso uso de *C. hexandra* como analgésico e antiinflamatório, não foram encontrados na literatura estudos que investigassem estes efeitos.



A



B



C

Figura 2. Fotos de *Coutarea hexandra*: Ramo com flores (**A**), inflorescência (**B**) e frutos (**C**).

Fonte: Pereira (2007).

Tabela 1. Usos etnobotânicos relatados em espécies do gênero *Coutarea*.

Espécies	Uso Etnobotânico	País de Uso	Parte da Planta	Extratos/Modo de Uso	Referências
<i>C. hexandra.</i>	Abortiva	Brasil	Cascas	Não citado, Decocto (VO, gestantes)	Rao <i>et al.</i> , 1988
	Antimalárica	Brasil	Cascas (Caule)	Não citado, Decocto (VO, adultos) Aquoso quente (VO, adultos)	Brandão <i>et al.</i> , 1992 De Almeida <i>et al.</i> , 1991
<i>C. latiflora.</i>		México	Cascas Cascas (Caule) Cascas Planta inteira	Não citado, (VO, adultos) Aquoso quente (VO, adultos)	Winkelman, 1986 Noster & Kraus, 1990 Bye, 1986 Perez <i>et al.</i> , 1984
		-	-		D'agostino <i>et al.</i> , 1990
<i>C. hexandra.</i>	Antidiabética	Brasil	Cascas (Caule)	Aquoso quente (VO, adultos)	De Almeida <i>et al.</i> , 1991
<i>C. latiflora.</i>		México	Cascas		Lozya, 1977 Winkelman, 1986
		México	Cascas	Não citado, Decocto (VO, adultos)	Winkelman., 1989
		México	Planta inteira	Não citado, (VO, adultos)	Perez <i>et al.</i> , 1984
		México	-	Aquoso quente (VO, adultos)	Guerra, 1947
		-	-		D'agostino <i>et al.</i> , 1990
<i>C. latiflora</i>	Antidiarréica	México	Planta inteira	Não citado (VO, adultos)	Perez <i>et al.</i> , 1984
<i>C. hexandra.</i>	Antiinflamatória	Brasil El Salvador	Cascas (Caule)	Aquoso quente (VO, adultos)	De Almeida <i>et al.</i> , 1991 Reher <i>et al.</i> , 1983
<i>C. latiflora.</i>	Antidiurética	México	Cascas	Aquoso quente (VO, adultos)	Lozya, 1977
<i>C. latiflora</i>	Contra Dermatites	México	Planta inteira	Não citado (Externo, adultos)	Perez <i>et al.</i> , 1984

Tabela 1 (*Continua*)

Tabela 1 (Continuação)

<i>C. latiflora</i>	Diurético	México	Planta inteira	Não citado (VO, adultos)	Perez <i>et al.</i> , 1984
<i>C. hexandra.</i>	Enemagogo	Brasil	Cascas	Não citado, Decocto (VO, mulheres adultas)	Rao <i>et al.</i> , 1988
<i>C. latiflora</i>	Contra Febres	Mexico	Cascas	Aquoso quente (VO, adultos)	Bye, 1986
<i>C. latiflora</i>	Contra Febre tifóide	México	Planta inteira	Não citado (VO, adultos)	Perez <i>et al.</i> , 1984
<i>C. latiflora</i>	Equimose	México	Cascas	Aquoso quente (VO, adultos)	Bye, 1986
<i>C. latiflora</i>	Nefrites	México	Planta inteira	Não citado (VO, adultos)	Perez <i>et al.</i> , 1984
<i>C. latiflora</i>	Problemas de vesícula	México	Cascas	Aquoso quente (VO, adultos)	Winkelman, 1986 Bye, 1986
	Problemas do fígado (Hepatite)	México	Cascas	Aquoso quente (VO, adultos)	Winkelman, 1986
<i>C. latiflora</i>	Problemas gastrointestinais Purificar o sangue	México	Cascas	Extrato aquoso (VO, adultos)	Bye, 1986
<i>C. latiflora</i>	Tônico	México	Planta inteira	Não citado (VO, adultos)	Perez <i>et al.</i> , 1984

Tabela 2. Atividades biológicas relatadas em espécies do gênero *Coutarea*.

Espécies	Atividade/Concentração ou Doses	Parte da Planta	Extratos	Local de Coleta	Referências
<i>C. hexandra</i> .	Antiinflamatória - (IG, ratos, 500 µg/Kg vs. Carragenina)	Cascas (Caule)	EtOH (95%)	Brasil	De Almeida <i>et al.</i> , 1991
<i>C. latiflora</i> .	Hipoglicêmica - (IG, ratos, 500 µg/Kg, CA-9KB)	Cascas	EtOH 100% AcOEt, Me ₂ CO CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃	-	Sensch & Zoukas, 1998
	(IG e IP, ratos) dose não citada	Planta inteira	Aquoso	México	Perez <i>et al.</i> , 1984
<i>C. latiflora</i>	Antimalárica - <i>Plasmodium falciparum</i> (CI ₅₀ 69,5 µg/mL)	Cascas (Caule)	EtOH (35%)	México	Noster & Kraus, 1990
	- <i>P. falciparum</i> (CI ₅₀ 31,3 µg/mL)	Cascas (Caule)	Éter	México	Noster & Kraus, 1990
	- <i>P. falciparum</i> (CI ₅₀ 9,2 µg/mL)	Cascas (Caule)	AcOEt	México	Noster & Kraus, 1990
<i>C. hexandra</i>	Citotóxica - Cultura de células (DE ₅₀ 1,8 µg/mL, CA-9KB)	Planta inteira	EtOH (95%)	-	Suffness <i>et al.</i> , 1988
	- Cultura de células (DE ₅₀ 11 µg/mL, CA-9KB)	Não citada	Fração cromatográfica	Brasil	Nascimento <i>et al.</i> , 1985
<i>C. hexandra</i> .	Efeito tóxico - (IP, ratos, 200 µg/Kg, Leuk-P388)	Planta inteira	EtOH (95%)	-	Suffness <i>et al.</i> , 1988
	- (IP, ratos, 112 µg/Kg, Colon 38)				
	- (IP, ratos, 200 µg/Kg Melanoma-B16)	Planta inteira	EtOH (95%)	-	Suffness <i>et al.</i> , 1988
<i>C. hexandra</i> .	Moluscicida - <i>Biophalaria straminea</i> (10000 ppm)	Cascas (Caule)	Aquoso quente	Brasil	Silva <i>et al.</i> , 1971

Tabela 3. Constituintes químicos relatados em espécies do gênero *Coutarea*.

Substâncias	Espécie	Parte da Planta	Local de Coleta	Referências
Acido ascórbico	<i>C. hexandra</i>	Cascas	México	Giral & Aguilar, 1953
Celotonina	<i>C. hexandra</i>	Cascas (Caule)	Brasil	De Almeida <i>et al.</i> , 1991
Coutareagenina	<i>C. hexandra</i> <i>C. latiflora</i>	Cascas (Caule)	El Salvador -	Reher <i>et al.</i> , 1983
Coutareosídeo	<i>C. hexandra</i> <i>C. latiflora</i>	Cascas (Caule)	El Salvador -	Reher <i>et al.</i> , 1983
3',4'-Dihidroxi-5,7'-dimetoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1983
5,7-Dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1984
3',8-Dihidroxi-4',5,7-trimetoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1990 D'agostino <i>et al.</i> , 1990
Exostemina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1987
3'-Hidroxi-4',5,7-trimetoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1983
3'-Hidroxi-4',5,7,8-tetrametoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1990
4'-Hidroxi-5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1983
8-Hidroxi-3',4',5,7-tetrametoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Planta inteira	Itália	D'agostino <i>et al.</i> , 1989
3',4',5-Trihidroxi-7-metoxi-neoflavona	<i>C. hexandra</i>	Planta inteira	Japão	Iinuma <i>et al.</i> , 1987
3',4',7-Trihidroxi-5-metoxi-neoflavona	<i>C. hexandra</i>	Caule	-	Delle Monache <i>et al.</i> , 1989

Tabela 3 (Continua)

Tabela 3 (Continuação)

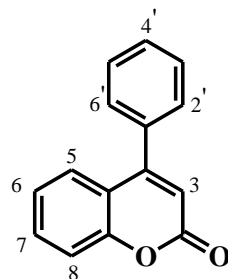
3',4',8-Trihidroxi-5,7-dimetoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	D'agostino <i>et al.</i> , 1989 Delle Monache <i>et al.</i> , 1990
4',5,7-Trimetoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1983
5,7,8,4'-Tetrametoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Delle Monache <i>et al.</i> , 1987
2',5',5,7,-Tetraacetoxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Cascas	Brasil	Falcão <i>et al.</i> , 2005
5-O-(β -D-Glicopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Aquino <i>et al.</i> , 1988
5-O-(β -D-Glicopiranosil)-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Aquino <i>et al.</i> , 1988
5-O-[β -D-Apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glicopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Aquino <i>et al.</i> , 1988
5-O-[β -D-Xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glicopiranosil]-7,3',4'-Trihidroxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Caule	Brasil	Aquino <i>et al.</i> , 1988
5-O- β -D-Glicopiranosil-7-metoxi-4'-hidroxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Frutos	Panamá	Olmedo <i>et al.</i> , 2007
5-O- β -D-Galactopiranosil-7-metoxi-4'-hidroxi-4-fenilcumarina	<i>C. hexandra</i>	Frutos	Panamá	Olmedo <i>et al.</i> , 2007
2',5-Óxido-monohidroxi-dimetoxicumarina	<i>C. latiflora</i>	Cascas (Caule)	Alemanha	Reher & Kraus, 1984
2',5,-Óxido-monohidroxi-trimetoxicumarina	<i>C. latiflora</i>	Cascas (Caule)	Alemanha	Reher & Kraus, 1984
2' -Óxido-4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina	<i>C. latiflora</i>	Cascas (Caule)	Alemanha	Reher & Kraus, 1984

Tabela 3 (Continua)

Tabela 3 (Continuação)

23,24-Diidroxicucurbitacina F	<i>C. latiflora</i>	Cascas (Caule)	México	Reguero <i>et al.</i> , 1987
	<i>C. hexandra</i>	Frutos	Panamá	Olmedo <i>et al.</i> , 2007
23,24-Diidro-25-acetilcucurbitacina F	<i>C. hexandra</i>	Frutos	Panamá	Olmedo <i>et al.</i> , 2007
2-O-β-D-Glicopiranosil-23,24-diidro-cucurbitacina F	<i>C. hexandra</i>	Frutos	Panamá	Olmedo <i>et al.</i> , 2007

Estruturas dos Compostos Relacionados em Espécies do Gênero *Coutarea*.



Celotonina: 2', 5', 5, 7 = OAc

Coutaregenina: 3', 4', 5 = OH, 8 = OMe

Coutareosídeo: 2', 5', 5 = OH, 7 = OMe

3', 4'-Dihidroxi-5, 7-dimetoxi-4-fenilcumarina: 3', 4' = OH, 5, 7 = OMe

5, 7-Dimetoxi-3', 4'-metilenodioxi-4-fenilcumarina: 5, 7 = OMe, 3', 4' = OCH₂O

3', 8-Dihidroxi-4', 5, 7-trimetoxi-4-fenilcumarina: 3', 8 = OH, 4', 5, 7 = OMe

Exostemina: 4', 5, 7 = OMe, 8 = OH

3'-Hidroxi-4', 5, 7-trimetoxi-4-fenilcumarina: 3' = OH, 4', 5, 7 = OMe

3'-Hidroxi-4', 5, 7, 8-tetrametoxi-4-fenilcumarina: 3' = OH, 4', 5, 7, 8 = OMe

4'-Hidroxi-5, 7-dimetoxi-4-fenilcumarina: 4' = OH, 5, 7 = OMe

8-Hidroxi-3', 4', 5, 7-tetrametoxi-4-fenilcumarina: 8 = OH, 3', 4', 5, 7 = OMe

3', 4', 5-Trihidroxi-7-metoxi-neoflavona: 3', 4', 5 = OH, 7 = OMe

Continua

3',4',7-Trihidroxi-5-metoksi-neoflavona: 3',4',7 = OH, 5 = OMe

3',4',8-Trihidroxi-5,7-dimetoksi-4-fenilcumarina: 3',4',8 = OH, 5,7 = OMe

4',5,7-Trimetoksi-4-fenilcumarina: 4',5,7 = OMe

4',5,7,8-Tetrametoksi-4-fenilcumarina: 4',5,7,8 = OMe

2',5',5,7-Tetraacetoksi-4-fenilcumarina: 2',5',5,7 = OAc

5-O-(β-D-Glicopiranosil)-3',4',7-trihidroxi-4-fenilcumarina: 3',4',7 = OH, 5-O-β-D-Glc

5-O-(β-D-Glicopiranosil)-3',4'-dihidroxi-7-metoksi-4-fenilcumarina: 3',4' = OH, 5-O-β-D-Glc, 7 = OMe

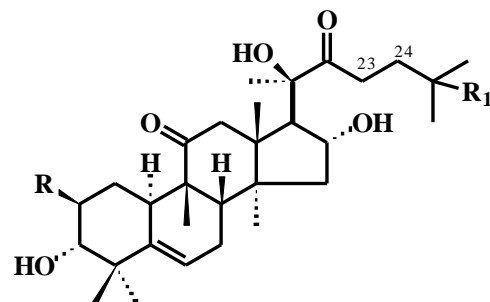
3',4'-Dihidroxi-5-O-[β-D-Apiofuranosil-(1→6)-β-glicopiranosil]-7-metoksi-4-fenilcumarina:
3',4' = OH, 5-O-β-D-Ap-(1→6)-β-Glc, 7 = OMe,

5-O-[β-D-Xilopiranosil-(1→6)-β-glicopiranosil]-3',4',7 -Trihidroxi-4-fenilcumarina:
3',4',7 = OH, 5-O-β-D-Xil-(1→6)- β-Glc

5-O-β-D-Glicopiranosil-7-metoksi-4'-hidroxi-4-fenilcumarina: 4' = OH, 5-O-β-D-Glc, 7 = OMe

5-O-β-D-Galactopiranosil-7-metoksi-4'-hidroxi-4-fenilcumarina: 4' = OH, 5-O-β-D-Gal, 7 = OMe

5,2'-Óxido-4',5'-dihidroxi-7-metoksi-4-fenilcumarina: 5,2',4',5' = OH, 7 = OMe



23,24-Diidroxicurbitacina F: $R = R_1 = OH$

23,24-Diidro-25-acetilcurbitacina F: $R = OH, R_1 = OAc$

2-O- β -D-glicopiranosil-23,24-diidrocurbitacina F: $R = O-\beta\text{-D-Glc}, R_1 = OH$

3. Objetivos

3.1 Geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento químico e biológico do gênero *Coutarea*, através do estudo químico e da avaliação das atividades antioxidante, anticolinesterásica e antiinflamatória da espécie *C. hexandra* (Rubiaceae).

3.2 Específicos

- ◆ Avaliar o potencial antioxidante (fenóis totais, DPPH e oxidação total) de extratos e frações da espécie *C. hexandra*;
- ◆ Avaliar o potencial anticolinesterásico de extratos e frações da espécie *C. hexandra*;
- ◆ Avaliar o efeito antiinflamatório de extratos, frações e substâncias isoladas, em modelo de edema de orelha mediado pelo óleo de cróton em camundongos;
- ◆ Isolar constituintes químicos e elucidar as estruturas dos compostos presentes nos extratos considerados potencialmente promissores nos ensaios efetuados;

4. *Experimental*

4.1 *Solventes, Reagentes e Equipamentos*

- ▶ Para obtenção dos extratos brutos foram utilizados extratores de vidro e de PVC;
- ▶ Nas partições e nas separações cromatográficas foram utilizados solventes destilados no próprio laboratório ou P.A. (Labsynth, Vetec e Quimex);
- ▶ Nos ensaios antioxidantes utilizou-se MeOH grau espectroscópico e as medidas de absorvância foram efetuadas em espectrofotômetro UV/VIS, modelo SP-220 da Biospectro.
- ▶ A concentração das soluções contendo grandes volumes foi efetuada em evaporadores rotativos, marcas BUCHI e IKA WERKE, modelos R-114 e RV06-ML, respectivamente; enquanto que as de pequeno volume foram feitas à temperatura ambiente em capela de exaustão da Permution;
- ▶ As pesagens das amostras e reagentes foram efetuadas em balança eletrônica analítica (modelo AX 200) e semi-analítica, das marcas SHIMADZU e BEL, respectivamente;
- ▶ Nas separações cromatográficas em coluna foram utilizados como adsorventes sílica gel 60 G (70-230 mesh e 230-240 mesh), 60 H (Merck) e Sephadex LH-20 (Pharmacia);
- ▶ Nas cromatografias em camada delgada analítica (CCD – 0,25 mm de espessura) utilizaram-se sílica gel 60 PF₂₅₄ da Merck. As cromatoplasmas foram preparadas manualmente utilizando-se suspensão de 7,5 g de gel de sílica em 21 mL de água destilada, as quais foram espalhadas através de um espalhador mecânico sobre as placas de vidro, sendo ativadas a 100 °C durante uma hora em estufa da Biomatic;
- ▶ Os cromatogramas foram revelados em lâmpada ultravioleta da Spectroline, modelo ENF-260C/F, em comprimento de onda de 254 e 366 nm, por imersão em cubas contendo vapores de iodo e/ou borrifação com solução Dragendorff;
- ▶ Nas solubilizações utilizou-se Ultrassom da Branson (modelo 1210);
- ▶ Os espectros de RMN (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz) foram obtidos em espectrômetros da Bruker Avance 400 (IQB-UFAL).

- ▶ Os pontos de fusão foram determinados em aparelho digital da Micro Química, modelo MQAPF-302;
- ▶ Para a realização dos ensaios antioxidantes a incubação das amostras foi feita em banho-maria da Quimis modelo Q-334-28;
- ▶ Para a realização dos ensaios anticolinesterásicos e antioxidantes foram utilizados ácido ascórbico (Vetec), ácido gálico, ácido tricloroacético, albumina sérica bovina (BSA, pH 7,0), (+)-catequina, 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH), 2,6-di-tert-butil-4-metil-fenol (BHT), 5,5'-Ditio-bis-(ácido 2-nitro-benzóico) (DTNB), enzima Acetil-colinesterase (AchE) de *Electrophorus electricus* (moréia elétrica) tipo VI-S com 10.000 U, hidrocloreto de tris[hidroximetil]-aminometano (Tris/HCl), iodeto de tioacetiltocolina (ATCI) e reagente Folin-Ciocalteu's, (todos da Sigma); cafeína (Acro Organics); as cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ e DC-Alufolien 0,2 mm (Merck ou Aldrich);
- ▶ Para a realização dos ensaios antiinflamatórios foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas e machos (25-35 g) do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR, mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), respeitando uma fase clara/escura de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial (Nuvital). As drogas utilizadas foram o óleo de cróton, dexametasona (Sigma) e acetona (Merck).

4.2. Coleta e Identificação dos Materiais Vegetais

Diferentes partes de *C. hexandra* (raízes, folhas, caule e cascas do caule) foram coletados, em abril de 2005, próximo a Usina Coruripe, município de Coruripe-AL. O espécime foi coletado e identificado pela botânica *Rosângela Pereira de Lyra Lemos* do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, onde exsiccata do material herborizado (MAC-22943) foi depositada.

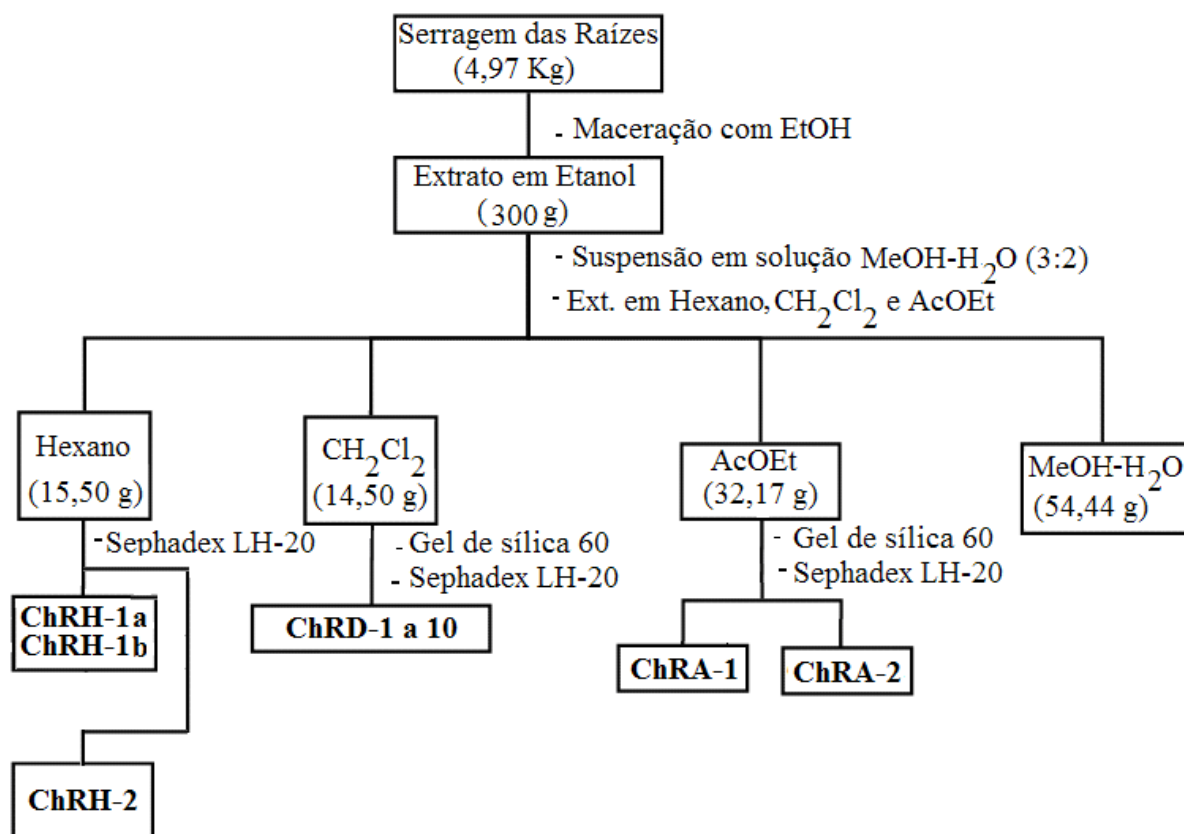
4.3. Preparação dos Extratos

As diferentes partes da planta, após secagem à temperatura ambiente e trituração, foram individualmente extraídas através de maceração com etanol 90%. Os extratos brutos das raízes, folhas e cascas do caule, após eliminação dos solventes em evaporador rotatório e secagem a temperatura ambiente, foram individualmente suspensos em solução MeOH-H₂O (3:2) e extraídos sucessivamente com hexano, CH₂Cl₂ ou CHCl₃ e AcOEt (Quadro 1, p. 33; Figuras 3-

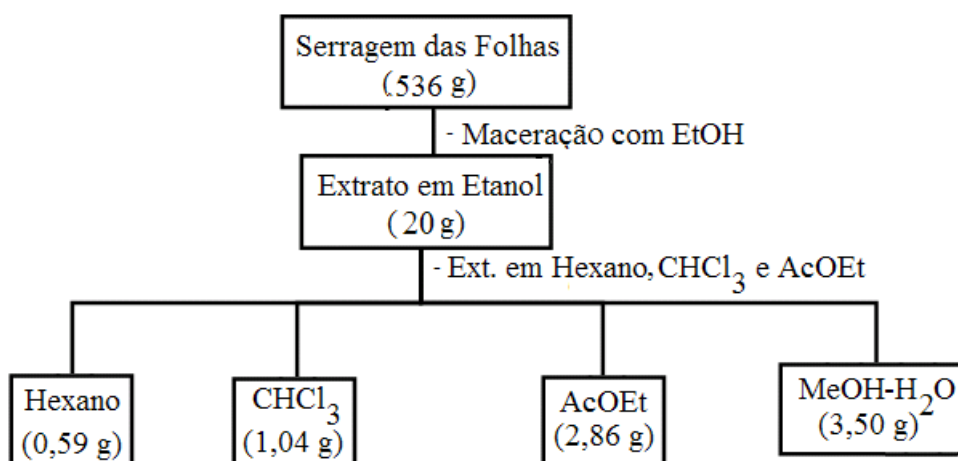
4, pp. 34-35). Os extratos provenientes das partições (hexano, CH₂Cl₂ ou CHCl₃, AcOEt e MeOH-H₂O) foram posteriormente filtrados em gel de sílica com solventes e misturas de solventes de diferentes polaridades. Os extratos brutos e provenientes de partição, bem como as frações oriundas de filtração, foram avaliados quanto ao potencial antioxidante (DPPH, fenóis totais e antioxidante total), anticolinesterásico e antiinflamatório (edema de orelha induzido pelo óleo de cróton).

Quadro 1. Massas dos materiais secos das diferentes partes da planta, dos extratos brutos e das frações oriundas de partição ou filtração.

Partes da Planta		Serragens (g)	Ext. em EtOH (g)	
	Raízes	4970	300	
	Folhas	536	20	
	Caule	1900	250	
	Cascas (Caule)	1890	190	
Extratos oriundos de partição dos extratos brutos				
Parte da planta	Extrato em Hexano (g)	Extrato em CH₂Cl₂ ou CHCl₃ (g)	Extrato em AcOEt (g)	Extrato em MeOH-H₂O (g)
Raízes	15,50	14,50	32,16	54,44
Folhas	0,59	1,04	2,86	3,50
Cascas do Caule	0,322	0,116	0,159	0,282



A



B

Figura 3. Esquema geral do procedimento efetuado com raízes (A) e folhas (B) de *C. hexandra*.

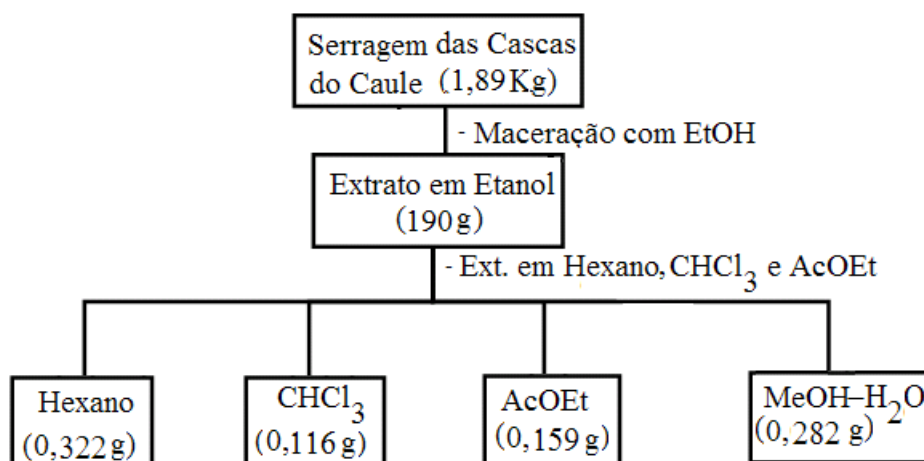


Figura 4. Esquema geral do procedimento efetuado com cascas do caule de *C. hexandra*.

4.4. Avaliação do Potencial Biológico de Extratos, Frações e Substâncias Isoladas

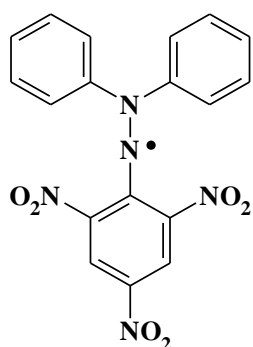
Os ensaios biológicos realizados no presente trabalho foram efetuados em função de alguns dos usos populares e de ensaios biológicos relatados com as cascas de *C. hexandra* como antiinflamatório (Reher *et al.*, 1983; De Almeida *et al.*, 1991). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais (LPqPN) da UFAL e no Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.4.1. Avaliação Qualitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres

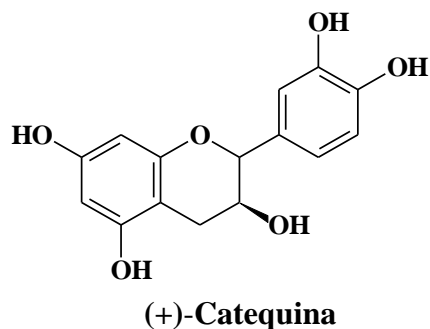
Os ensaios para avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres frente ao radical sintético DPPH foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Soler-Rivas e cols. (2000).

O Quadro 2 (p. 36) relaciona os extratos, frações e subfrações oriundas de partição e de filtração que foram submetidas a esses ensaios. Após dissolução em CH_2Cl_2 , CHCl_3 ou MeOH (10 mg/mL), 2 μL de cada amostra foram aplicados em cromatoplasas (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) e eluídas em sistemas de solventes adequados. Após a eluição, as placas cromatográficas foram imersas, durante 10 segundos, em solução metanólica a 0,4 mM do radical sintético DPPH. Após secagem a temperatura ambiente, o surgimento de manchas amareladas sob um fundo roxo nos R_fs das substâncias, sugeriu uma possível atividade. A

intensidade da cor depende da quantidade e da natureza das substâncias presentes. Neste experimento, (+)-catequina (2 µL, 1 mg/mL em MeOH) foi utilizada como controle positivo.



DPPH



Quadro 2. Extratos, frações e subfrações submetidos à avaliação qualitativa frente ao DPPH.

Parte da Planta	Extratos, Frações e Subfrações
Raízes	Extratos em: a) Hexano e sua fração: Hex-CH ₂ Cl ₂ 1:1 b) CH₂Cl₂ e suas frações: Hex-AcOEt 7:3, 1:1, AcOEt e MeOH c) AcOEt e suas frações: CHCl ₃ , AcOEt-MeOH 1:1 e MeOH d) MeOH-H₂O e suas frações: AcOEt-MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 e MeOH
Folhas	Extratos em EtOH, Hexano , CHCl₃ e AcOEt e suas frações: AcOEt-MeOH 8:2, 7:3, AcOEt e AcOEt-MeOH 1:1
Cascas (Caule)	Ext. em EtOH e frações de filtração: Hexano, Hex-AcOEt 9:1, 8:2, 1:1, AcOEt-MeOH 7:3 e 1:1

4.4.2 Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais (FT)

A determinação do teor de fenóis totais dos extratos, frações e subfrações que apresentaram resultados positivos nos ensaios qualitativos anti-radicalares foi efetuada seguindo metodologia descrita por Sousa e cols. (2007) com algumas modificações.

► Obtenção da curva de Calibração

A partir de uma solução estoque de ácido gálico (5 g/L em MeOH a 10%) foram preparadas dez concentrações (1000 a 100 µg/mL). A absorvância de cada solução foi medida, em triplicata, a 765 nm em espectrofotômetro operando no VIS. Para tanto, utilizou-se cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm, contendo 1 mL da solução. A construção da curva de calibração procedeu, utilizando o software Microcal OriginPro 7.0, através de análise de regressão linear dos valores médios de absorvâncias versus as concentrações usadas.

Curva de calibração obtida para ácido gálico: $Y = 0,06077 + 0,00112 X$

DP = 0,02679 e o coeficiente de correlação (R) = 0,99768

► Metodologia para Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais

Após preparo da solução estoque de cada amostra [50 mg/5 mL em MeOH-H₂O (1:1)], 35 µL de cada solução foi adicionado a 2,76 mL de H₂O e 175 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após um período de repouso de 5 minutos, 525 µL de solução de Na₂CO₃ a 15% foi adicionado, agitado durante 30 segundos e centrifugado durante 10 minutos (10.000 rpm). Após um período de repouso de 1 hora a 20 °C mediu-se, em triplicata, a absorvância da mistura reacional de cada solução. As medidas ± DP foram obtidas como forma de expressar a variabilidade dos dados para cada amostra.

4.4.3. Avaliação Quantitativa da Capacidade Seqüestradora de Radicais Livres

Os ensaios quantitativos frente ao radical sintético DPPH foram realizados, de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams e cols. (1995), somente com as amostras que forneceram resultados positivos (manchas amareladas) nos ensaios qualitativos.

► Obtenção da Curva de Calibração

A partir de uma solução estoque de DPPH em MeOH (40 mg/L ou 100 µMol/L) foram preparadas nove concentrações (40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL). A absorvância de cada solução a 515 nm foi determinada utilizando cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm, contendo 1 mL da solução, em espectrofotômetro UV/VIS. Como branco utilizou-se o MeOH grau espectroscópico.

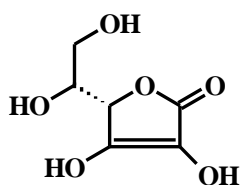
A curva de calibração foi construída, utilizando os valores médios de absorvância obtidos a 515 nm versus as concentrações usadas (40 a 1 $\mu\text{g/mL}$), através da análise de regressão linear utilizando o software Microcal OriginPro 7.0. Soluções de 100 $\mu\text{Mol/L}$ foram preparadas diariamente e de cada conjunto de dados foram obtidos desvio padrão (**DP**) e coeficiente de correlação (**R**). Para essas medidas de dispersão os coeficientes obtidos variaram entre 0,997 e 0,999 e os **DP** obtidos variaram de 0,02 a 0,01.

O coeficiente de correlação é um instrumento adequado para descobrir e medir a relação entre duas variáveis de natureza quantitativa, quanto maior o valor de **R** (positivo ou negativo), mais forte será a associação:

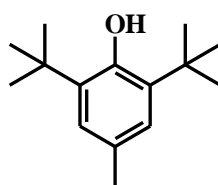
Valor de **R** (+ ou -): 0,00 a 0,19 → Correlação muito fraca
0,20 a 0,39 → Correlação fraca
0,40 a 0,69 → Correlação moderada
0,70 a 0,89 → Correlação forte
0,90 a 1,00 → Correlação muito forte

► Preparo das Amostras e Metodologia

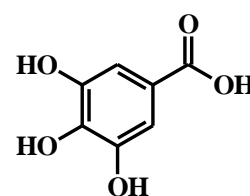
As soluções estoques dos extratos brutos e frações foram preparadas na concentração de 2,0 mg/10 mL em MeOH (grau espectroscópico). De cada amostra, bem como dos controles positivos utilizados: o ácido ascórbico (**26**), ácido gálico (**28**) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (**27**), foram testadas no mínimo cinco concentrações que variaram entre 200 a 25 $\mu\text{g/mL}$. Todas as amostras foram testadas inicialmente nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$, as concentrações que apresentaram percentual de DPPH remanescente inferior a 10% foram substituídas por concentrações menores.



Ácido ascórbico (**26**)



BHT (**27**)



Ácido gálico (**28**)

O Quadro 3 (p. 40) relaciona os extratos brutos, frações e subfrações que foram submetidos à avaliação quantitativa da capacidade de sequestrar o radical sintético DPPH em solução. Neste ensaio, o radical estável DPPH (cor violeta) absorve entre 515-528 nm, porém

ao ser reduzido (Figura 5, p. 39) por um agente antioxidante (doador de hidrogênio) ou uma espécie radicalar conduz a formação da difenil-picril-hidrazina (coloração amarela). A medida da absorbância foi feita em triplicata, a 515 nm, em espectrofotômetro UV/VIS.

Após obtenção da curva de calibração, alíquotas de 0,1 mL de cada concentração dos extratos, frações e subfrações foram colocadas em cubetas de poliestireno e adicionadas a cada uma delas 0,9 mL da solução do radical DPPH (100 µMol/L). As soluções foram protegidas da presença da luz, homogeneizadas com auxílio de ponteiras e as leituras de no mínimo cinco diferentes concentrações (200 a 25 µg/mL) foram feitas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. As absorbâncias das soluções foram registradas contra o branco (MeOH grau espectroscópico).

A percentagem de DPPH remanescentes (DPPH_{REM}) no meio reacional foi obtida, conforme fórmula descrita por Sánchez-Moreno e cols. (1998), a partir da equação matemática da curva de calibração e dos valores de absorbâncias obtidos após 60 minutos de análise ou dos valores constantes antes dos 60 minutos de análise para cada concentração testada.

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{T=t}/[DPPH]_{T=0} \times 100 \quad \text{onde:}$$

[DPPH]_{T=t} = Concentração de radical DPPH no meio após a reação com o extrato;

[DPPH]_{T=0} = Concentração inicial de radical DPPH no meio (40 mg/L ou 100 µMol/L)

As percentagens de radical DPPH remanescentes obtidas foram plotadas, através do programa Microcal OriginPro 7.0, versus as concentrações testadas. A quantidade de anti-radical necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (IC₅₀) foi obtida usando o modelo matemático $Y = a + b.x$.

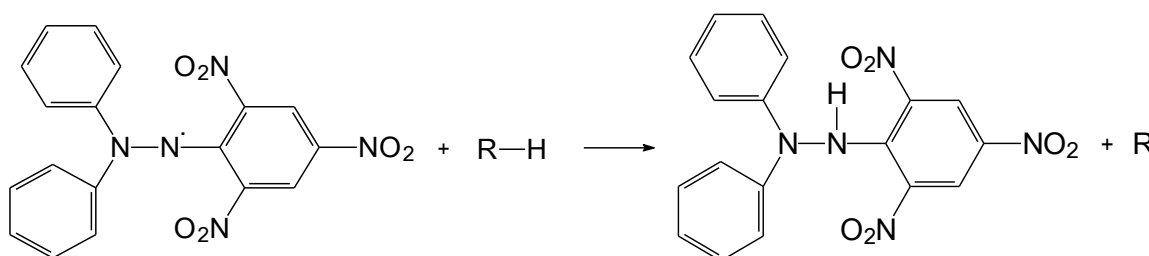


Figura 5. Representação esquemática da reação de redução do DPPH.

► Análise Estatística

Para cada conjunto de dados foram obtidas as médias, desvio padrão (**DP**) como medidas de expressar a variabilidade dos dados, além do coeficiente de correção (**R**) entre as duas variáveis: concentração como variável independente e percentual de DPPH remanescente como variável dependente. Para averiguar se as diferenças entre médias obtidas foram casuais ou significativas utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguido de teste Tukey, assumindo a probabilidade de erro ao nível de 5% ($p < 0,05$).

Quadro 3. Extratos, frações e subfrações submetidos à avaliação quantitativa frente ao DPPH.

Parte da planta	Extratos, Frações e Substâncias isoladas
Raízes	Extratos em a) Hexano e sua fração: Hex-CH ₂ Cl ₂ 1:1 b) CH₂Cl₂ e suas frações: Hex-AcOEt 7:3, 1:1, AcOEt e MeOH c) AcOEt e suas frações: CHCl ₃ , AcOEt-MeOH 1:1 e MeOH d) MeOH-H₂O e suas frações: AcOEt-MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 e MeOH
Folhas	Extratos em EtOH, Hexano , CHCl₃ , AcOEt e suas frações: AcOEt, AcOEt-MeOH 8:2, 7:3 e 1:1
Cascas (Caule)	Extrato EtOH e frações de filtração: Hexano, Hex-AcOEt 9:1, 8:2, 1:1, AcOEt-MeOH 7:3 e 1:1

4.4.4. Determinação da Atividade Antioxidante Total pelo Método do Ferrocianeto Férrico (FTC)

Os ensaios para avaliação da capacidade antioxidante total foram realizados, segundo metodologia descrita por Hu e cols. (2003) e Kim (2005), somente com as frações que forneceram valores de CI₅₀ menores que 200 µg/mL no ensaio quantitativo com o DPPH.

► Metodologia para Avaliação da Atividade Antioxidante Total por FTC

Após o preparo da solução estoque de cada fração ou substância pura (1 mg/5 mL em EtOH 95% P.A) foram preparadas as concentrações de 100, 75, 50 e 25 µg/mL. Em um frasco reacional tipo âmbar foi adicionado 2 mL da amostra, 2 mL da solução etanólica do ácido

linoléico a 2,5%, 2 mL de água destilada e 4 mL de tampão fosfato (0,05 M, pH 7,0). A mistura reacional (10 mL) foi incubada a 40°C em banho-maria durante seis dias. Adicionou-se na cubeta 0,1 mL da mistura reacional, 0,8 mL de etanol a 75% e 0,1 mL de tiocianato de amônio. Após 5 minutos, foi adicionado 0,1 mL de 0,02 M cloreto férrico em 3,5% de ácido clorídrico em intervalos de 24h durante os seis dias. O nível de peróxido foi determinado pela leitura da absorbância a 500 nm em espectrofotômetro UV/VIS (modelo SP-220 da Biospectro). Alta absorbância indicou alta oxidação da emulsão do ácido linoléico e a percentagem de inibição do ácido linoléico pelas amostras foi calculada pela equação:

$$\% \text{ de Inibição} = 100 - [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}} / Abs_{\text{controle}}) \times 100]$$

4.4.5. Avaliação Qualitativa da Atividade Anticolinesterásica

► Preparação das Soluções Utilizadas nos Ensaio

- a) **Solução Tampão 50 mM Tris/HCl pH 8,0** - Em um balão volumétrico de 25 mL foram dissolvidos em água destilada 0,197 g de hidrocloreto de Tris[hidroximetil]-aminometano. O pH (8,0) da solução foi ajustado pela adição de solução de NaOH 1 M.
- b) **Solução Tampão 50 mM Tris/HCl pH 8,0 com 0,1% de BSA** - Em um balão volumétrico de 25 mL foram adicionados 25 mg de BSA a uma solução tampão 50 mM Tris/HCl, pH 8,0.
- c) **Solução 1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB/Reagente de Ellman)**
Em um balão volumétrico de 5 mL dissolveu-se 0,00198 g de DTNB em solução tampão 50 Mm Tris/HCl, pH 8,0.
- d) **Solução 1 mM de Iodeto de Acetilcolina (ATCI)** - Em um balão volumétrico de 5 mL dissolveu-se 0,00144 g de iodeto de acetilcolina em água ultra-pura em aparelho Millipore.
- e) **Diluição da Enzima Acetilcolinesterase (AChE)** - A enzima liofilizada foi dissolvida em solução tampão 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) perfazendo uma solução estoque de 10.000 U/mL. Após obtenção de uma solução homogênea sob agitação, sucessivas diluições com a solução tampão 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) e 0,1% BSA foram feitas para obter 5U/mL da enzima AChE para borrifar nas placas.

► Metodologia para Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

O Quadro 4 (p. 42) relaciona os extratos e frações que foram submetidos a ensaios anticolinesterásicos. A avaliação qualitativa da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase foi efetuada de acordo com o ensaio enzimático descrito por Ellman e cols. (1961) e modificado por Rhee e cols. (2001). Cada extrato, fração ou subfração (5 mg) foi dissolvido em 1 mL de CHCl_3 ou MeOH. Em seguida, 3 μL de cada solução foram aplicados em **CCD** (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck). Foi mantida uma distância de 2,5 cm entre as amostras e as bordas para evitar sobreposição dos halos de inibição. Após eliminação dos solventes, as cromatoplasmas foram borrifadas com o substrato (ATCI) e o reagente de Ellman (DTNB). Após secagem da cromatoplasma por cerca de cinco minutos, aspergiu-se a enzima, na concentração de 5U, dissolvida em solução tampão 50 mM Tris/HCl pH 8,0 com 0,1% de BSA. Após cerca de 10 minutos a cromatoplasma adquiriu coloração amarela contendo halos brancos em torno das amostras que inibiram a enzima AChE, responsável pela hidrólise da acetilcolina (substrato). A atividade dos extratos e frações foi comparada com o halo branco apresentado pelo controle positivo (cafeína, 1 mg/mL dissolvido em CHCl_3).

Quadro 4. Extratos e frações das raízes de *C. hexandra* que foram submetidos a ensaios anticolinesterásicos.

Extratos e Frações
Extratos: a) Hexano (subfr.: Hex- CH_2Cl_2 1:1) b) CH_2Cl_2 e suas frações: Hex-AcOEt 7:3, Hex-AcOEt 1:1 (Subfrs.: Hex-AcOEt 7:3, 1:1, AcOEt e AcOEt-MeOH 1:1), AcOEt e MeOH; c) AcOEt e suas frações: CHCl_3 , AcOEt-MeOH 1:1 e MeOH d) MeOH-H_2O e suas frações: AcOEt-MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 1:1 e MeOH

4.4.6 Avaliação da Atividade Antiinflamatória induzida pelo Óleo de Croton

O Quadro 5 (p. 44) relaciona os extratos, frações, subfrações e substâncias isoladas que foram submetidos a ensaios antiinflamatórios. Nestes ensaios, antes do início dos experimentos os animais (4-6 animais/dose) foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora para adaptação. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em

Experimentação Animal (CEEA), da Universidade Federal do Paraná sob o número 127 e os experimentos conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEEA, 2003).

► Avaliação de Edema de Orelha Induzido pela Aplicação Tópica de Óleo de Cróton

O modelo animal *in vivo* mais utilizado para estudar o processo inflamatório cutâneo é a indução de edema em orelha de camundongos. Este modelo consiste num método rápido e simples, requer pouca quantidade de material e permite resultados reprodutíveis. No que diz respeito à sua aplicação farmacológica, pode ser induzido por diferentes agentes (ex.: ATF, radiação UVB, ácido araquidônico e oxazolona) permite uma variedade de modelos de inflamação cutânea apropriados para a avaliação tanto tópica como sistêmica de agentes sintéticos, extratos de plantas, bem como substâncias isoladas de plantas (Gábor, 2000; Winyard & Willoughby, 2003).

Ésteres de forbol, como o 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (ATF), são potentes agentes flogísticos e promotores de tumor capaz de induzir inflamação na pele e respostas hiperproliferativas nos animais, assemelhando-se sob muitos aspectos aos sinais de algumas doenças da pele (Gábor, 2000; 2003). Esse modelo de inflamação cutânea aguda permite identificar inibidores da biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos, sendo amplamente utilizado na triagem de compostos inibidores da cicloxigenase e/ou lipoxigenase, bem como com atividade corticóide (Gábor, 2000).

Neste modelo, o edema foi induzido pela aplicação tópica, na orelha direita de camundongos, de óleo de cróton (0,4 mg/orelha), dissolvido em 20 µL de acetona, de acordo com a metodologia revisada por Hecker e Schmidt (1974). O efeito antiedematogênico do extrato bruto (0,6 e 1,0 mg/orelha), frações (0,6 mg/orelha) e compostos isolados (0,6 mg/orelha) das raízes, bem como dos controles positivo (dexametasona; 0,05 mg/orelha) e negativo (acetona), também dissolvidos em acetona (20 µL), foi avaliado pela aplicação tópica imediatamente após o tratamento com o agente flogístico (óleo de cróton). A variação da espessura da orelha foi avaliada antes da aplicação e 6 horas após a indução da inflamação (Otuki *et al.*, 2005).

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos animais em µm. A espessura foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando um micrômetro digital (Great MT – 04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e registrado a sua espessura (µm) através da diferença entre a primeira medida (basal)

e a medida feita após a aplicação do agente flogístico (De Young *et al.*,1989). Para minimizar variações de medida concernentes à técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador.

► Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste “t” de Student. Valores de P menores do que $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o *Software* estatístico *GraphPad Prism* version 3.00, San Diego Califórnia, EUA.

Quadro 5. Extratos, frações e substâncias isoladas que foram submetidos a ensaios antiinflamatórios.

Parte da Planta e Substâncias isoladas	Extratos, Frações e Substâncias isoladas
<i>Raízes</i>	Extratos em EtOH e em a) Hexano b) CH₂Cl₂ e suas Subfrações: Hex-AcOEt 1:1/Hex-AcOEt 8:2, Hex-AcOEt 7:3/Hex-AcOEt 1:1, Hex-AcOEt 1:1/AcOEt e AcOEt/AcOEt e MeOH] c) AcOEt e suas Subfrações: AcOEt, AcOEt-MeOH 1:1 e MeOH d) MeOH-H₂O
<i>Substâncias isoladas</i>	5,7-Dimetoxi-4-(<i>p</i> -metoxi-fenil)cumarina (ChRD-1), 5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina (ChRD-3), 5-Hidroxi-7-metoxi-4-(<i>p</i> -hidroxifenil)cumarina (ChRD-4) e 25-Acetato da 23,24-diidro-cucurbitacina F (ChRD-7)

4.5. Investigação Fitoquímica de Extratos de *C. hexandra*

4.5.1 Isolamento de Constituintes Químicos das Raízes

► Extrato em Hexano

O extrato em hexano (15,50 g), oriundo da partição do extrato bruto em EtOH, por ter apresentado resultado positivo nos ensaios, foi filtrado em gel de sílica (70-230 mesh), utilizando solventes de diferentes polaridades: hexano (**A** → 8,29 g), Hex-AcOEt 1:1 (**B** → 0,54 g) AcOEt (**C** → 0,47 g), AcOEt-MeOH 1:1 (**D** → 4,60 g) e MeOH (**E** → 0,19 g). O material da fração em Hex-AcOEt 1:1 (**B** → 0,54 g) foi fracionado em gel de sílica, como eluentes foram usados misturas de hexano e AcOEt em gradientes crescentes de polaridade. Coletou-se um total de 102 subfrações (volume médio de 5 mL cada). Estas subfrações foram analisadas através de cromatografia em camada delgada (CCD) e as que apresentaram relação de fatores de retenção (Rfs) semelhantes foram agrupadas. Os materiais das subfrações reunidas 7-8 (0,019 g), 9-11 (0,040 g) e 23 a 33 (0,070 g), após cromatografia em coluna de gel de sílica (230-400 mesh, hexano-AcOEt e AcOEt-MeOH em proporções crescentes de polaridade) e sucessivas recristalizações com MeOH, conduziram ao isolamento de dois sólidos amorfos, codificados de **ChRH-1** (42 mg, p.f. 135-137 °C) e **ChRH-2** (62 mg, 165-169 °C).

As demais subfrações foram trabalhadas, porém não conduziram ao isolamento de substâncias com grau de pureza satisfatório após análise por espectros de RMN.

► Extrato em Diclorometano

O material do extrato em CH₂Cl₂ (14,50 g), oriundo da partição do extrato em EtOH, por ter apresentado resultado promissor nos ensaios, foi filtrado em gel de sílica (70-230 mesh) com solventes de diferentes polaridades: Hex-AcOEt 8:2 (**F** → 0,59 g), Hex-AcOEt 1:1 (**G** → 5,36 g) AcOEt (**H** → 3,14 g) e MeOH (**I** → 4,24 g). A subfração em Hex-AcOEt 8:2 (**F** → 0,59 g) foi novamente fracionada em gel de sílica (70-230 mesh), utilizando-se solventes de diferentes polaridades: hexano (**F-1** → 0,022 g), Hex-AcOEt 8:2 (**F-2** → 0,066 g), Hex-AcOEt 1:1 (**F-3** → 0,44 g), AcOEt (**F-4** → 0,012 g) e MeOH (**F-5** → 0,022 g). O material da subfração em Hex-AcOEt 1:1 (**F-3** → 0,44 g) foi permeada em gel (Sephadex LH-20 com MeOH). Após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas de eluentes, as frações foram reunidas. O material das subfrações reunidas 27-31 (0,04 g), proveniente da eluição com Hex-AcOEt 1:1, após sucessivas lavagens a frio com MeOH resultou na obtenção de um material cristalino, p.f. 149-151 °C, codificado de **ChRD-1** (28 mg).

O material da subfração em Hex-AcOEt 1:1 (**G** → 5,36 g) foi novamente fracionado em gel de sílica (70-230 mesh) com solventes de diferentes polaridades: Hex-AcOEt 9:1 (**G-1** → 0,054 g), Hex-AcOEt 8:2 (**G-2** → 0,42 g), Hex-AcOEt 7:3 (**G-3** → 3,10 g), Hex-AcOEt 1:1 (**G-4** → 1,20 g), AcOEt (**G-5** → 0,52 g) e MeOH (**G-6** → 0,05 g). O material da subfração Hex-AcOEt 8:2 (**G-2** → 0,42 g) foi permeado em gel (Sephadex LH-20 com MeOH). Após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas de eluentes, foram reunidas. O material das subfrações reunidas 20-24 (0,015 g), após sucessivas lavagens a frio com MeOH resultou na obtenção de um material cristalino, p.f. 152-154 °C, codificado de **ChRD-2** (18 mg).

O material da subfração hexano-AcOEt 7:3 (**G-3** → 3,10 g) foi submetido a permeação em gel (Sephadex LH-20 com MeOH). Após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas de eluentes foram reunidas. Os materiais das subfrações reunidas 14-15 (0,036 g), 17 a 20 (0,07 g) e 28-32 (0,032 g), após sucessivas lavagens a frio com MeOH forneceram sólidos cristalinos, codificados de **ChRD-3** (0,031 g; p.f. 152-154 °C), **ChRD-4** (0,060 g; p.f. 232-235 °C) e quantidade adicional de **ChRD-5** (0,027 g), respectivamente.

O material da subfração Hex-AcOEt 1:1 (**G-4** → 1,20 g) foi submetido a permeação em gel (Sephadex LH-20 com MeOH). Após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas de eluentes foram reunidas. Os materiais das subfrações reunidas 57-79 (0,076 g), 80-81 (0,016 g), 82-84 (0,03 g) e 85-93 (0,067 g), após sucessivas lavagens a frio com MeOH resultaram, respectivamente, na obtenção de quantidade adicional de **ChRD-4** (0,057 g) e de quatro sólidos cristalinos, codificados de **ChRD-5** (0,010 g, p.f. 213-216 °C), **ChRD-6** (0,021 g; p.f. 230-232 °C), **ChRD-7** (0,046 g; p.f. 153-155 °C) e **ChRD-8** (0,008 g; p.f. 222-225 °C) e **ChRD-9** (0,012 g, cujos espectros de RMN ainda foram obtidos), respectivamente.

O material da subfração em AcOEt (**G-5** → 0,52 g) foi permeado em gel (Sephadex LH-20 com MeOH). Após análise comparativa através de CCD, em diferentes sistemas de eluentes foram reunidas. Os materiais das subfrações reunidas 1-4 (0,008 g), 8-10 (0,009 g) após sucessivas lavagens a frio com MeOH resultaram na obtenção de sólidos cristalinos, codificados de **ChRD-10** (0,006 g), **ChRD-11** (0,006 g), respectivamente, cujos espectros de RMN ainda foram obtidos.

As demais subfrações foram trabalhadas, porém não conduziram ao isolamento de substâncias com um grau de pureza satisfatório para análise em RMN.

4.6 Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas

4.6.1. Sitosterol (ChRH-1a) e Estigmasterol (ChRH-1b)

Sólido cristalino branco, p.f. 135-137 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD): Tabela 6, p. 66; Figura 17, p. 67.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD): Tabela 6, p. 66; Figura 18, p. 68.

4.6.2. Sitostenona (ChRH-2)

Sólido amorfo. P.f 165-169 °C

RMN ¹³C: (100 MHz, CDCl₃): Tabela 7, p. 70; Figura 19, p. 71.

4.6.3. 5,7-Dimetoxi-4-(p-metoxifenil)cumarina (ChRD-1)

Sólido cristalino branco, p.f. 149-151 °C [Lit. p.f. 150-152 °C (Ito *et al.*, 2000)].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 8, p. 74; Figura 20, p. 76.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃): Tabela 8, p. 74; Figura 22, p. 78.

HSQC (¹H: 400; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃): Tabela 8, p. 74; Figura 24, p. 80.

HMBC (¹H: 400; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃): Tabela 8, p. 74; Figura 27, p. 82.

4.6.4. 5,7-Dimetoxi-8-hidroxi-4-(p-metoxifenil)cumarina (ChRD-2)

Sólido cristalino, p.f. 152-154 °C

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): Tabela 10, p. 87; Figura 29, p. 89.

RMN ¹³C: (100 MHz, CDCl₃): Tabela 10, p. 87; Figura 31, p. 91.

HSQC (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃) Tabela 10, p. 87; Figura 33, p. 93.

HMBC (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃) Tabela 10, p. 87; Figura 35, p. 95.

4.6.5. 5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina (ChRD-3)

Sólido cristalino, p.f. 152-154 °C [Lit. p.f. 153-155 °C (Ito *et al.*, 2000)].

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃/CD₃OD): Tabela 12, p. 98; Figura 37, p. 99.

RMN ¹³C: (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD): Tabela 12, p. 98; Figura 38, p. 100.

HSQC (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD): Tabela 12, p. 98; Figura 39, p. 101.

HMBC (¹H: 400 MHz; ¹³C: 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD): Tabela 12, p. 98; Figura 40, p. 102.

4.6.6. 5-Hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina (ChRD-4)

Sólido cristalino, p.f. 232-235 °C.

RMN ¹H (400 MHz, acetona-d₆): Tabela 9, p. 75; Figura 21, p. 77.

RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6): Tabela 9, p. 75; Figura 23, p. 79.

HSQC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, acetona- d_6) Tabela 9, p. 75; Figura 26, p. 81.

HMBC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, acetona- d_6) Tabela 9, p. 75; Figura 28, p. 83.

4.6.7. 2 β ,3 α -Diidrox-11,16-dioxo-octanorcucurbit-5-eno (ChRD-5)

Sólido cristalino, p.f. 213-216 °C.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 13, p. 107; Figura 41, p. 110.

RMN ^{13}C : (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 13, p. 107; Figura 43, p. 112.

HSQC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 13, p. 107; Figura 46, p. 115.

HMBC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 13, p. 107; Figura 48, p. 115.

4.6.8. 2 β ,3 α -Diidrox-11-oxo-5-roseno ChRD-6

Sólido cristalino, p.f. 230-232 °C.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 16, p. 121; Figura 49, p. 123.

RMN ^{13}C : (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 16, p. 121; Figura 52, p. 126.

DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 16, p. 121; Figura 53, p. 127.

HSQC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 16, p. 121; Figuras 50-51, pp. 124-125.

HMBC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 16, p. 121; Figuras 54-56, pp. 127-129.

4.6.9. 25-Acetoxi-23,24-diidrocucurbitacina F (ChRD-7)

Sólido cristalino, p.f. 153-155 °C [Lit. p.f. 155-156 °C (Reguero *et al.*, 1987)]

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 14, p. 108; Figura 42, p. 111.

RMN ^{13}C : (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 14, p. 108; Figura 44, p. 113.

DEPT 135 (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 14, p. 108; Figura 45, p. 114.

HSQC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 14, p. 108; Figura 47, p. 116.

4.6.10. 5,7,8-Trimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina (ChRD-8)

Sólido cristalino, p.f. 222-225 °C.

RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 11, p. 88; Figura 30, p. 90.

RMN ^{13}C : (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 11, p. 88; Figura 32, p. 92.

HSQC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 11, p. 88; Figura 34, p. 94.

HMBC (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): Tabela 11, p. 88; Figura 36, p. 96.

5. Resultados e Discussão

5.1. Resultados da Avaliação Qualitativa da Capacidade Sequestradora de Radicais Livres

Com o propósito de determinar o número total de extratos nas diferentes partes da planta (raízes, folhas e cascas do caule) com possível atividade antioxidante, extratos e algumas das substâncias isoladas foram avaliados qualitativamente frente ao radical sintético DPPH. Dentre esses extratos (Quadro 2, p. 36), todos sugeriram atividade anti-radicalar quando comparadas com o controle positivo utilizado [(+)-catequina], exceto as frações em Hex-AcOEt 8:2 e em AcOEt-MeOH 1:1, provenientes da filtração em gel de sílica de extratos das cascas do caule. De um modo geral, dentre os extratos/frações que forneceram resultados positivos, os mais polares (EtOH, CH₂Cl₂/CHCl₃, AcOEt e MeOH-H₂O), oriundos das diferentes partes da planta, forneceram as melhores respostas (coloração intensa). De acordo com Soler-Rivas e cols. (2000) e Sánchez-Moreno e cols. (1998), o grau dessa atividade aumenta com o tempo da reação entre os agentes que sequestram radicais livres e o DPPH, a concentração e a natureza dos compostos fenólicos presentes.

5.2. Resultados da Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais

O reagente de Folin-Ciocalteu é usado para obter uma estimativa bruta da quantidade de compostos fenólicos presentes em extratos vegetais. Compostos polifenólicos, incluindo os ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides e outros, formam um complexo de coloração azul com este reagente e passa a absorver na região UV a 765 nm. Nestes ensaios, os resultados foram expressos como miligramas de equivalente grama de ácido gálico (mg/g EAG) por grama de material vegetal seco e foram efetuados somente com os extratos/frações/subfrações que forneceram resultados positivos nos ensaios qualitativos frente ao DPPH (Tabela 4, p. 50).

Em acordo com os resultados dos ensaios qualitativos com o DPPH, com exceção do extrato bruto em EtOH das raízes, os maiores teores de fenóis totais foram também obtidos com os extratos mais polares (CH₂Cl₂/CHCl₃, AcOEt e MeOH-H₂O), sendo que extratos das raízes forneceram melhores resultados que os das folhas e das cascas do caule [raízes (95,74 ± 2,68 a 1385,03 ± 5,38 mg/g) > folhas (103,77 ± 9,55 a 888,60 ± 2,57 mg/g) > cascas do caule (13,60 ± 6,57 a 638,60 ± 2,06 mg/g)].

Tabela 4. Resultados dos ensaios anti-radicalares quantitativos, teores de fenóis totais e oxidação total dos extratos.

Partes da Planta	Extrato/fração/subfração	Fenóis Totais (mg/g EAG)	CI₅₀* (µg/mL)	Oxidação Total (%)
Raízes	Ext. bruto em EtOH	109,13 ± 0,02	643,80 ± 0,17	90,91
	Fração Hexano	128,78 ± 4,13	NT	NT
	Fração CH ₂ Cl ₂	572,53 ± 2,87	14,81 ± 0,83	88,64
	Fração AcOEt	1385,03 ± 5,38	46,05 ± 0,34	97,42
	Fração MeOH-H ₂ O	602,00 ± 3,61	12,69 ± 0,89	76,21
	Subfr. Hex-CH ₂ Cl ₂ 1:1/Hexano	95,74 ± 2,68	NT	NT
	Subfr. AcOEt/CH ₂ Cl ₂	464,49 ± 3,71	133,98 ± 2,40	60,29
	Subfr. AcOEt-MeOH 1:1/AcOEt	865,38 ± 0,30	19,12 ± 0,15	83,16
	Subfr. MeOH/AcOEt	647,53 ± 0,41	20,58 ± 0,19	74,41
	Subfr. Hex-AcOEt 1:1/CH ₂ Cl ₂	543,95 ± 4,21	27,82 ± 0,38	70,16
Folhas	Ext. bruto em EtOH	888,60 ± 2,57	12,24 ± 0,45	79,23
	Fração Hexano	103,77 ± 9,55	NT	NT
	Fração CHCl ₃	886,81 ± 2,25	57,26 ± 0,28	58,39
	Subfr. AcOEt-MeOH 8:2/AcOEt	435,03 ± 0,00	156,89 ± 0,15	92,41
	Subfr. AcOEt-MeOH 7:3/AcOEt	237,70 ± 0,00	159,55 ± 0,53	NT
Cascas (Caule)	Ext. bruto em EtOH	638,60 ± 2,06	43,78 ± 0,22	95,10
	Fração Hexano	13,60 ± 6,57	NT	NT
	Fração Hex-AcOEt 9:1	16,27 ± 8,23	NT	NT
	Fração AcOEt-MeOH 7:3	131,45 ± 0,01	NT	NT
	Fração AcOEt-MeOH 1:1	74,31 ± 9,47	NT	NT
Padrões positivos	Ácido gálico		11,83 ± 0,03	
	Ácido ascórbico		41,46 ± 0,37	91,0
	BHT		54,60 ± 0,22	

Os valores representam a média ± desvio padrão da média em triplicata. NT = Não testado.

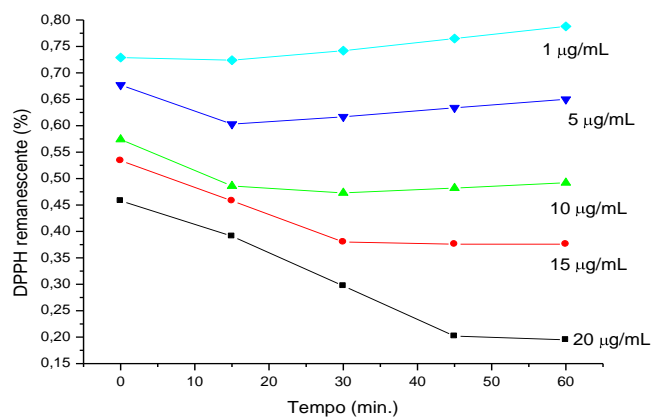
5.3. Avaliação Quantitativa da Atividade Anti-radicalar (DPPH[•])

Ensaio com o radical sintético DPPH são amplamente utilizados para investigar atividades sequestradoras de radicais livres de muitos compostos fenólicos presentes em extratos vegetais. Nestes ensaios, os valores da CI₅₀ são inversamente relacionados à atividade e esta aumenta com a diminuição do DPPH[•] remanescente no meio reacional. Amostras oriundas

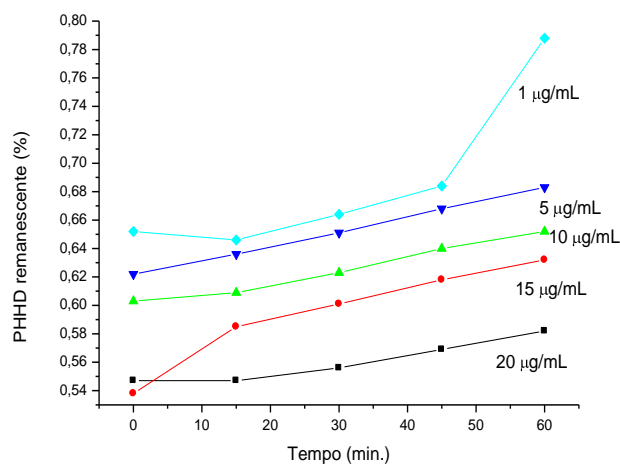
das raízes, folhas e cascas do caule que apresentaram resultados positivos nos ensaios qualitativos anti-radicalares e que forneceram uma quantidade relativamente considerável de fenóis totais (superior a 230 mg/g), exceto o extrato bruto em EtOH das raízes, foram avaliados quantitativamente frente ao radical sintético DPPH.

De acordo com os valores de CI_{50} relacionados na Tabela 4 (p. 50), com exceção do extrato bruto em EtOH ($643,80 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$) e a subfração em AcOEt/ CH_2Cl_2 ($133,98 \pm 2,40 \mu\text{g/mL}$) das raízes; subfrações em AcOEt-MeOH 8:2/AcOEt ($156,89 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$) e em AcOEt-MeOH 7:3/AcOEt ($159,55 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$) das folhas que apresentaram somente fraca ou nenhuma capacidade de sequestrar radicais livres ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$), significantes efeitos inibitórios ($CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), com valores de CI_{50} comparáveis com os padrões positivos utilizados [ácido gálico ($CI_{50} 11,83 \pm 0,03 \mu\text{g/mL} \rightarrow$ cinética muito rápida; Figura 6A, p. 52), ácido ascórbico ($CI_{50} 41,46 \pm 0,37 \mu\text{g/mL} \rightarrow$ cinética rápido; Figura 6B, p. 52) e BHT ($CI_{50} 54,60 \pm 0,22 \mu\text{g/mL} \rightarrow$ cinética lenta; Figura 6C, p. 52)], foram observados para os extratos/frações/subfrações que apresentaram alto teor de fenóis totais.

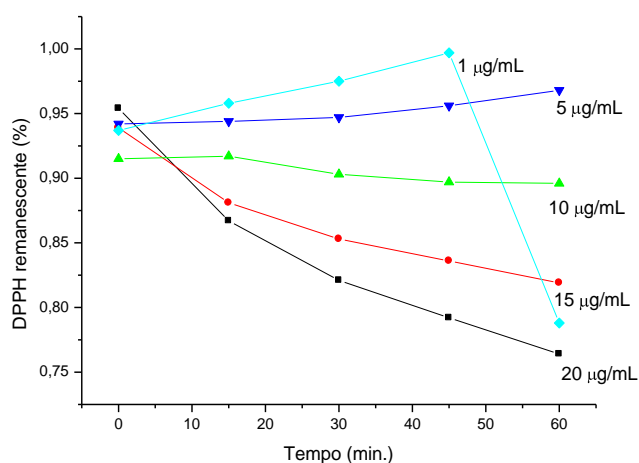
Muitos destes extratos foram estatisticamente significativos para ($p < 0,05$) e, com exceção das frações em CH_2Cl_2 ($14,81 \pm 0,83 \mu\text{g/mL}$), MeOH- H_2O ($12,69 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$), oriundas do extrato bruto em EtOH das raízes e o extrato bruto em EtOH das folhas ($12,24 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$) apresentaram comportamento cinético e valores de CI_{50} comparável ao ácido gálico. Por outro lado, a fração em AcOEt ($46,05 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$), oriunda do extrato em EtOH das raízes, o extrato bruto em EtOH das cascas do caule ($43,78 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$) e as subfrações em MeOH/AcOEt ($20,58 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$) e em Hex-AcOEt 1:1/ CH_2Cl_2 ($27,82 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$), oriundas do extrato bruto em EtOH das raízes, apresentaram comportamento cinético comparável ao do ácido ascórbico e mostraram-se bem mais efetivas em sequestrar radicais livres do que este padrão ($CI_{50} 41,46 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$). Os demais extratos, frações e subfrações (Tabela 4, p. 50) apresentaram comportamento cinético e valores de CI_{50} comparáveis ao do BHT ($CI_{50} 54,60 \pm 0,22 \mu\text{g/mL}$) e, em todos os casos, a análise estatística das concentrações testadas revelou significância estatística diferente para $p < 0,05$.



A



B



C

Figura 6. Gráficos do comportamento cinético dos padrões utilizados: Ácido gálico (A), Ácido ascórbico (B) e BHT (C). As concentrações foram expressas em µg/mL.

5.4. *Atividade Antioxidante Total de Extratos/Frações/Subfrações*

O método FTC, considerado como um método mais completo para avaliar a atividade antioxidante, foi realizado com a finalidade de confirmar a atividade antioxidante dos extratos/frações/subfrações que foram avaliados. Neste experimento, uma inibição da oxidação do ácido linoléico pelas amostras, bem como pelo controle positivo (ácido ascórbico), foi observada somente após seis dias de incubação a 40 °C. Com poucas exceções, somente extratos que apresentaram um alto valor de fenóis totais (superior a 230 mg/g) e de moderada a forte capacidade de sequestrar radicais livres (CI₅₀ inferior a 160 µg/mL) foram avaliados.

A Tabela 4 (p. 50) mostra os resultados, como a média percentual das concentrações utilizadas (100, 75, 50 e 25 µg/mL), da inibição da peroxidação do ácido linoléico por extratos das raízes, folhas e cascas do caule de *C. hexandra*. Em geral, dentre os extratos testados, com exceção do extrato bruto em EtOH das raízes, os extratos que mostraram uma boa capacidade de seqüestrar radicais livres apresentaram significativa inibição da atividade antioxidante do ácido linoléico (superior a 58%) quando comparado com o controle positivo utilizado (ácido ascórbico; 91,0%).

Baseado nestes resultados, a atividade antioxidante dos extratos nas diferentes partes da planta diminuiu na seguinte ordem: raízes > folhas > cascas do caule. Estes resultados também mostraram que os extratos mais polares (AcOEt e MeOH-H₂O), com poucas exceções, exerceram maior atividade quando comparados com os mais apolares (CH₂Cl₂ e CHCl₃). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de muitos dos compostos ativos, provavelmente contendo grupos hidroxilas, serem mais facilmente dissolvidos em solventes polares. Assim, considerando que o método FTC é usado para determinar a quantidade de peróxido produzida pela oxidação do ácido linoléico, os resultados sugeriram que a quantidade de peróxido produzida neste estágio é alta. Em alguns casos, essas atividades foram melhores ou próximas aos padrões positivos utilizados (ácido gálico, ácido ascórbico e BHT). Além disso, de moderada a forte correlação entre os conteúdos de fenóis totais e a capacidade de sequestrar radicais livres foram observados. Embora exista a possibilidade de taninos e pigmentos presentes nos extratos apresentarem atividades antioxidantes, os resultados mostraram que os efeitos de alguns extratos parecem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos, tais como os derivados 4-fenilcumarinas isoladas em estudos fitoquímicos anteriores e no presente trabalho. Deste modo, concluiu-se que a espécie *C. hexandra* poderá ser considerada uma interessante fonte de compostos fenólicos antioxidantes.

5.5. Resultados da Avaliação da Atividade Anticolinesterásica

O ensaio em CCD para avaliação da atividade anticolinesterásica é um método qualitativo rápido e barato usado para reconhecer compostos com possível atividade (Rhee *et al.*, 2001). Trevisan e cols. (2003) realizaram um estudo comparando os resultados obtidos com o ensaio em CCD (qualitativo) e microplaca (quantitativo) e concluíram que a confiabilidade do ensaio em CCD é de 81,1%, demonstrando ser um método útil para fracionamentos biomonitorados.

A Tabela 5 (p. 55) relaciona os resultados das frações/subfrações oriundas de partição e filtração das raízes de *C. hexandra* que foram submetidos a ensaios visando à inibição da enzima acetilcolinesterase. De um total de treze (13) amostras avaliadas, 41,67% foram efetivas em inibir a enzima. Dentre as frações testadas que forneceram resultados positivos, quatro delas também forneceram bons resultados como anti-radicalares nos ensaios quantitativos (CH₂Cl₂, Hex-AcOEt 1:1/CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH-H₂O).

O cérebro é um órgão particularmente vulnerável ao estresse oxidativo. A hipótese de que este processo está envolvido em eventos neurodegenerativos, bem como na morte de células neuronais (Mata *et al.*, 2007), mostra a importância da associação das duas atividades. Segundo Dias-Santagata e cols. (2007), substâncias que combatem a oxidação de células nervosas poderão ser úteis no tratamento de doenças neurodegenerativas, tal como a doença de Alzheimer. Dessa forma, a co-existência de extratos ativos como anticolinesterásico e como antioxidante torna-se relevante, pois além de inibir a ação da enzima através do aumento dos níveis do neurotransmissor, também promovem a diminuição de radicais livres presentes em indivíduos portadores de doenças neurodegenerativas. Portanto, é possível que substâncias que atuem ao mesmo tempo como anticolinesterásica e como antioxidante possam contribuir para o tratamento da doença de Alzheimer.

Tabela 5. Resultados dos ensaios anticolisterásicos com frações das raízes e comparação com os resultados dos ensaios anti-radicalares qualitativo (-/+) e quantitativo (CI₅₀).

Frações e Substâncias isoladas	Inibição da Enzima AChE	Anti-radicalar (CI₅₀; µg/mL)
<i>Frações e Subfrações</i>		
Fração em Hexano	-	-
Subfr. Hex-CH ₂ Cl ₂ 1:1/Hexano	-	-
Fração em CH ₂ Cl ₂	+	14,81 ± 0,83
Subfr. Hex-AcOEt 1:1/CH ₂ Cl ₂	+	27,82 ± 0,38
Subfr. Hex-AcOEt 7:3/CH ₂ Cl ₂	+	+
Fração em AcOEt	+	46,05 ± 0,34
Fração em MeOH-H ₂ O	-	12,69 ± 0,89
Subfr. AcOEt-MeOH 7:3/MeOH-H ₂ O	-	+
Subfr. AcOEt-MeOH 1:1/MeOH-H ₂ O	-	+
Subfr. MeOH/MeOH-H ₂ O	-	+
<i>Substância isolada</i>		
2β,3α-Dihidroxi-11-oxo-5-roseto (ChRD-6)	+	

5.6. Resultados da Aplicação Tópica de Óleo de Cróton (Atividade Antiinflamatória Cutânea)

Considerando que o edema pode ser um indicativo de processo inflamatório, a atividade antiedematogênica de extratos, frações e compostos isolados foi avaliada pelo método de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em camundongos (Otuki et al., 2005). Este óleo é rico em derivados de ésteres do forbol, e consiste em um modelo experimental simples e útil para triagem de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos inflamatórios hiperproliferativos (Marks, 1990; Gábor, 2000; Rauh, 2008). A aplicação tópica deste óleo induz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema nas primeiras duas horas da aplicação, seguido do aumento da espessura da orelha como resultado do extravasamento celular que atinge um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 horas.

Conforme pode ser observado na Figura 7 (p. 56), a aplicação tópica de óleo de cróton (0,4 mg/orelha) promoveu um aumento significativo na espessura da orelha dos animais do

grupo controle. Após 6 horas da aplicação, quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu topicamente o veículo acetona, essa resposta foi revertida em parte pelo extrato bruto em EtOH nas doses de 0,6 e 1,0 mg/orelha, de forma a causar inibição da formação do edema por cerca de 36,0% e 52,0%, respectivamente. Neste experimento, o controle positivo utilizado, a dexametasona (0,05 mg/orelha), promoveu inibição do edema induzido por cerca de 95,0%. Os resultados obtidos demonstraram que houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) entre o grupo controle e o extrato bruto em EtOH, nas doses de 0,6 e 1,0 mg/orelha. Por sua vez, a aplicação tópica do veículo (acetona) não induziu a formação do edema.

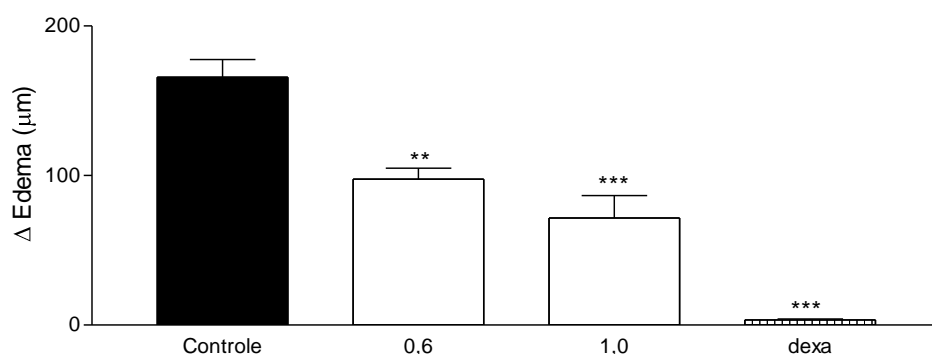


Figura 7. Efeito da administração tópica do extrato bruto em EtOH das raízes nas doses de 0,6 e 1,0 mg/orelha e de dexametasona (dexa) (0,05 mg/orelha). Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de 4-6 animais/grupo. Os Asteriscos mostram os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Por se tratar de um material constituído por uma mistura complexa de compostos de diferentes polaridades, o extrato bruto em EtOH foi submetido à partição com solventes de diferentes polaridades e os extratos resultantes (hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e MeOH- H_2O) foram também avaliados, na dose de 0,6 mg/orelha, quanto ao efeito antiedematogênico (Figura 8, p. 57; barras 2 a 5). Dentre os quais, o extrato em CH_2Cl_2 (3) foi o mais efetivo visto que inibiu cerca de 51,0% a formação do edema, seguido em menor proporção dos extratos em hexano (2) e em AcOEt (4), cerca de 28,0% cada.

Visando a obtenção de compostos com possíveis atividades antiinflamatórias, tanto o extrato em diclorometano quanto em acetato de etila foram fracionados em gel de sílica com solventes e misturas de solventes de diferentes polaridades. Algumas dessas frações foram avaliadas no modelo de edema de orelha induzido (Figuras 8-9, pp. 57-58; A-E e barras 6 a 8) e novamente fracionadas. Algumas das subfrações resultantes foram também avaliadas (Figura 9, p. 58; barras 9 a 12). Dentre as frações que foram avaliadas, seis delas [AcOEt-MeOH

1:1/AcOEt (**7**) e MeOH/AcOEt (**8**) (Figura 8, p. 57), AcOEt-MeOH 1:1/AcOEt (**A**), Hex-AcOEt 1:1/CH₂Cl₂ (**B**), AcOEt/CH₂Cl₂ (**C**) e AcOEt/AcOEt (**D**) (Figura 9, p. 58)], quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu topicamente o veículo acetona, se mostraram efetivas em reduzir o edema por cerca de 28,0% (frações **7** e **8**), 35,0% (frações **A-C**) e 38,0% (fração **D**). No caso das subfrações (Figura 8, p. 57; barras **9** a **12**), três das quais [Hex-AcOEt 7:3/Hex-AcOEt 1:1/CH₂Cl₂ (**10**), Hex-AcOEt 1:1/AcOEt/CH₂Cl₂ (**11**) e AcOEt/AcOEt/CH₂Cl₂ (**12**)] também reduziram o edema por cerca de 28,0%, 30,0% e de 33,0%, respectivamente, sendo que a fração **12**, proveniente do extrato em CH₂Cl₂, foi a mais efetiva. Em todos os casos, os resultados demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) entre o grupo controle e os extratos e frações testados, exceto para extrato em MeOH-H₂O (**5**) e a fração MeOH/CH₂Cl₂ (**6**).

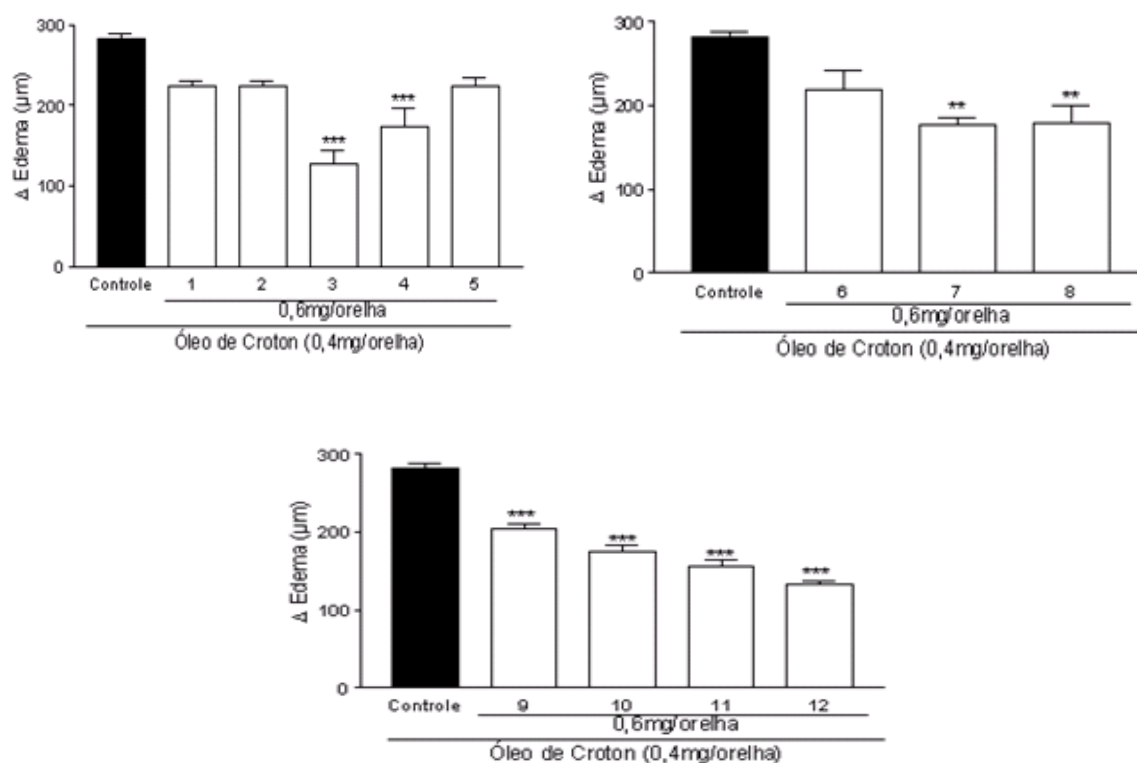


Figura 8. Efeito da aplicação tópica dos extratos da partição (**2** a **5**), de algumas frações (**6** a **8**) e subfrações (**9** a **12**) na dose de 0,6 mg/orelha. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de 4-6 animais. Os Asteriscos mostram os níveis de significância (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) quando comparados com o grupo controle.

Legenda: C = Controle; **1** = Ext. bruto em EtOH; **2** = Ext. em Hexano; **3** = Ext. em CH₂Cl₂; **4** = Ext. em AcOEt; **5** = Ext. em MeOH-H₂O; **6** = Fração MeOH/CH₂Cl₂; **7** = Fração AcOEt-MeOH 1:1/AcOEt; **8** = Fração MeOH/AcOEt; **9** = Subfração Hex-AcOEt 1:1/Hex-AcOEt 8:2/CH₂Cl₂; **10** = Subfração Hex-AcOEt 7:3/Hex-AcOEt 1:1/CH₂Cl₂; **11** = Subfração Hex-AcOEt 1:1/AcOEt/CH₂Cl₂ e **12** = Subfração AcOEt/AcOEt/CH₂Cl₂.

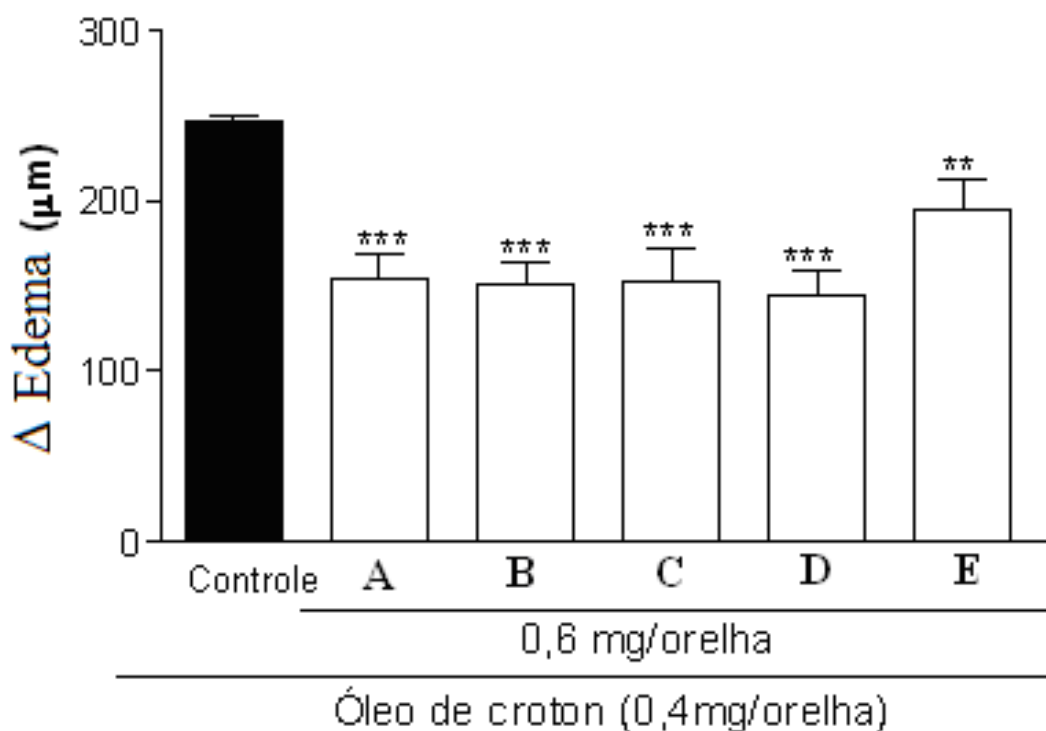


Figura 9. Efeito da administração tópica de algumas das frações de filtração dos extratos em CH_2Cl_2 e em AcOEt das raízes, na dose 0,6 mg/orelha. Cada coluna representa a média \pm E.P.M (Erro Padrão da Média) de 4-6 animais. Os Asteriscos mostram os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Legenda: **A** = AcOEt-MeOH 1:1/AcOEt; **B** = Hex-AcOEt 1:1/ CH_2Cl_2 ; **C** = AcOEt/ CH_2Cl_2 ; **D** = AcOEt/AcOEt e **E** = Hex-AcOEt 8:2/ CH_2Cl_2 .

Algumas das frações e subfrações que forneceram resultados promissores foram investigadas e tiveram seus principais constituintes químicos isolados e caracterizados estruturalmente. Dentre os compostos isolados, quatro deles [5,7-Dimetoxi-4-(*p*-metoxifenil)cumarina (**ChRD-1**), 5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina (**ChRD-3**), 5-Hidroxi-7-metoxi-4-(*p*-hidroxifenil)cumarina (**ChRD-4**) e 25-Acetato da 23,24-diidrocurcubitacina F (**ChRD-7**)] foram topicamente administrados, na dose de 0,6 mg/orelha, utilizando o modelo de edema de orelha. Dentre os compostos testados, quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu topicamente o veículo acetona, todos em diferentes proporções inibiram a formação do edema induzido pelo óleo de cróton (Figura 10, p. 59). O composto 5-Hidroxi-7-metoxi-4-(*p*-hidroxifenil)cumarina (**ChRD-4**), barra 3 do gráfico com cerca de 67,0% de inibição, foi o mais efetivo, seguido da 5,7-Dimetoxi-4-(*p*-metoxifenil)cumarina (**ChRD-1**, cerca de 35,0%), 25-Acetato da 23,24-diidrocurcubitacina F

(ChRD-7, cerca de 30,0%) e 5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina (ChRD-3, cerca de 19,0%). Em todos os casos, os resultados demonstraram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) entre o grupo controle e os compostos testados.

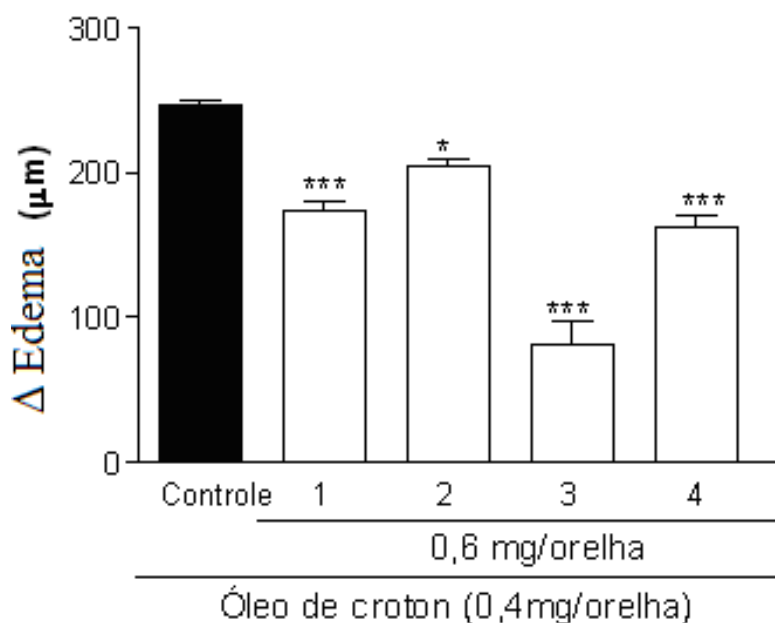


Figura 10. Efeito da administração tópica de alguns dos compostos isolados, na dose de 0,6 mg/orelha. Cada coluna representa a média \pm E.P.M (Erro Padrão da Média) de 4-6 animais. Os Asteriscos mostram os níveis de significância quando comparados com o grupo controle (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$).

Legenda: **1** = 25-Acetato da 23,24-diidrocurbitacina F (ChRD-7); **2** = 5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina (ChRD-3); **3** = 5-Hidroxi-7-metoxi-4-(*p*-hidroxifenil)cumarina (ChRD-4) e **4** = 5,7-Dimetoxi-4-(*p*-metoxi-fenil)cumarina (ChRD-1).

A aplicação tópica do óleo de cróton promove eventos inflamatórios, com produção de metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios (Otuki *et al.*, 2005). Este modelo de inflamação também permite avaliar outros parâmetros inflamatórios envolvidos em muitas doenças cutâneas, como por exemplo, a infiltração leucocitária no tecido lesado durante uma resposta inflamatória aguda. Neste processo, os neutrófilos são os primeiros a migrarem para a região exposta a um estímulo nocivo. Uma vez instalados no local inflamado, liberam uma variedade de substâncias, tais como as espécies reativas de oxigênio, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, contribuindo de forma significativa para a manutenção do processo inflamatório (Rauh, 2008). Isto desencadeia as doenças cutâneas inflamatórias, como a psoríase e as dermatites atópicas e de contato que têm uma grande

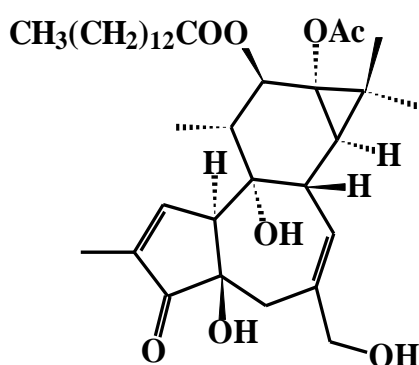
incidência na população mundial. A psoríase, por exemplo, afeta cerca de 1-3% da população mundial (Pietrovski *et al.*, 2008). Neste processo, as drogas antiinflamatórias correntemente utilizadas para tratar doenças inflamatórias crônicas estão distantes de serem ideais. Deste modo, os produtos naturais, incluindo compostos derivados de plantas, vêm sendo investigados como uma estratégia para descobrir novos compostos biologicamente ativos.

A espécie *C. hexandra* tem sido utilizada na medicina popular como diurético, abortivo, no combate a dor e a inflamação (Reher *et al.*, 1983; De Almeida *et al.*, 1991; Lucena *et al.*, 2006) e estudos têm demonstrado que os extratos em etanol e aquoso das cascas do caule desta espécie, no modelo de edema de pata induzido por carragenina (De Almeida *et al.*, 1991) e no teste da formalina (Lucena *et al.*, 2006), apresentaram atividade antiinflamatória. No entanto, nenhum estudo avaliou o potencial antiinflamatório tópico desta espécie ou de nenhuma outra espécie deste gênero. Deste modo, a investigação da atividade antiinflamatória tópica de extratos das raízes desta espécie se faz necessária para averiguação da eficácia nas diferentes partes desta espécie na inflamação. Nesse contexto, um dos objetivos deste trabalho foi investigar a eficácia de extratos, frações e substâncias isoladas desta espécie em processos inflamatórios cutâneos, utilizando o modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, uma vez que sua aplicação é um método comum para identificar agentes antiinflamatórios de aplicação tópica.

O agente flogístico utilizado nos experimentos do presente trabalho apresenta ação tópica e induz uma inflamação local como resultado da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, infiltração de células e extravasamento de plasma, conduzindo assim à instalação dos sinais clássicos da inflamação. Assim, esse modelo de inflamação cutânea permite identificar compostos com atividade antiinflamatória que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (Otuki *et al.*, 2006).

De acordo com Murakawa e cols. (2006), o mecanismo pelo qual ésteres do forbol, tal como o ATF, exerce seus efeitos é decorrente da ativação da proteína quinase C, bem como da ativação seqüencial da via da proteína quinase ativada por mitógeno, fosfolipase A2, indução da expressão da COX-2 e outros, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema. Entretanto, evidências mais recentes demonstram que a resposta inflamatória do tipo persistente, característica nesse modelo de inflamação, decorre da produção seqüencial de mediadores inflamatórios como os eicosanóides e citocinas (Marakawa *et al.*, 2006; Rauh, 2008). No entanto, é sabido que os

metabólitos do ácido araquidônico são os principais mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida por ésteres do forbol. Assim, compostos capazes de inibir esses metabólitos se mostram eficientes no modelo de edema de orelha induzido pelo 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (Rauh, 2008). Da mesma forma que esses agentes antiinflamatórios, nossos resultados sugeriram que a aplicação tópica dos extratos, bem como das suas frações provenientes de filtração e compostos isolados, especialmente a *5-Hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxi-fenil)cumarina* (**ChRD-4**), embora de forma muito menos eficaz do que o corticóide dexametasona, inibiram pelo menos um dos eventos, o edema relacionado com a resposta inflamatória tópica induzida pelo óleo de cróton.

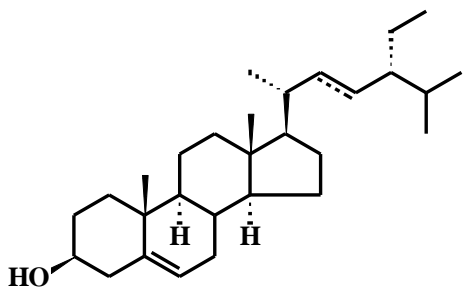


13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (ATF)

5.7. Resultados da Investigação Fitoquímica com Extratos das Raízes

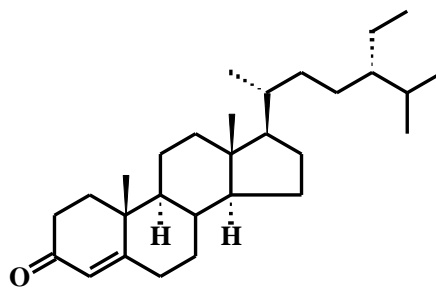
5.7.1. Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas

A investigação fitoquímica monitorada pelos ensaios anti-radicalares, antioxidante, anticolinesterásico e antiinflamatório das frações em hexano, em diclorometano e em acetato de etila das raízes de *C. hexandra*, conduziu ao isolamento de onze substâncias que foram denominadas por letras referentes ao nome e parte da planta, solventes usados nas partições e ordem de polaridade de isolamento (Exemplo, **ChRH-1**: C = *Coutarea*, h = *hexandra*, R = raízes e H = hexano). A elucidação estrutural dessas substâncias foi efetuada com base na análise de dados de RMN em uma e duas dimensões e pela comparação com dados de compostos correspondentes ou de modelos da literatura.

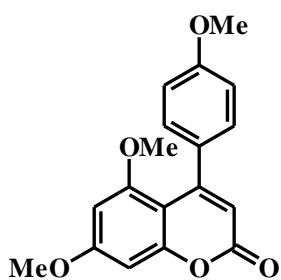


ChRH-1a 22,23 diidro

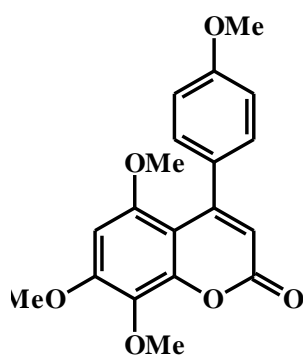
ChRH-1b $\Delta^{22,23}$



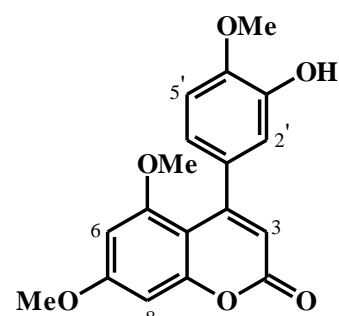
ChRH-2



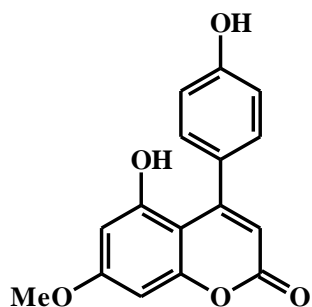
ChRD-1



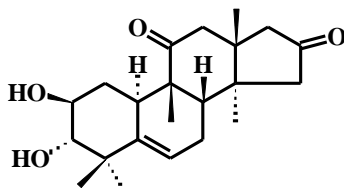
ChRD-2



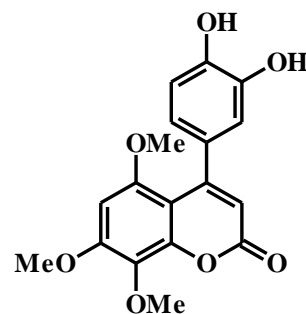
ChRD-3



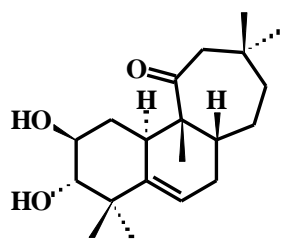
ChRD-4



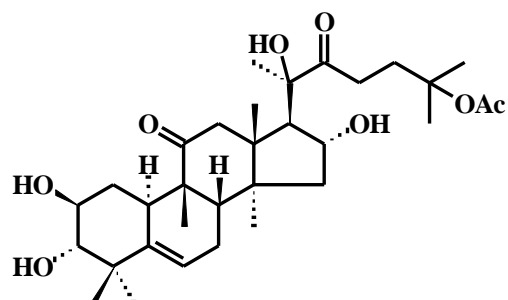
ChRD-5



ChRD-8



ChRD-6



ChRD-7

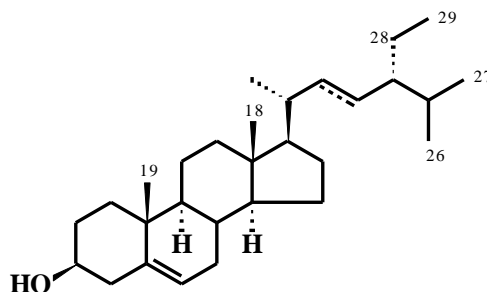
5.7.1.1. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRH-1a e ChRH-1b

A substância codificada de **ChRH-1** apresentou uma única mancha em CCD após revelação com luz UV e vapores de iodo. Após análise dos dados espectrais observou-se que a mesma era constituída por uma mistura de dois componentes que foram denominados de **ChRH-1a** (componente majoritário) e **ChRH-1b** (componente minoritário). Essas substâncias foram identificadas como sendo dois fitoesteróides com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN e pela comparação com dados da literatura (Macari *et al.*, 1990; Marques, 2001).

Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H da mistura (Figura 11, p. 65; Tabela 6, p. 64) evidenciaram a presença de sinais cujos valores de deslocamentos químicos estão condizentes com a presença de hidrogênio metínico carbinólico [**ChRH-1a** e **ChRH-1b**: δ 3,38 (m, H-3)], hidrogênio olefínico [**ChRH-1a** e **ChRH-1b**: δ 5,34 (sl, H-6); **ChRH-1b**: δ 5,12 (dd, $J = 11,6$; 8,0, H-22) e δ 4,91 (m, H-23)] e para vários grupos metila [δ 0,68 (s), 0,92 (s) e 0,79-0,86 (m)].

A análise conjunta dos dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C (Figura 12, p. 66) permitiu reconhecer um total de trinta e oito sinais correspondentes aos átomos de carbonos. Dentre esses carbonos, ressaltam-se valores de deslocamentos químicos referentes a carbonos oximetínicos [**ChRH-1a** e **ChRH-1b**: δ 71,5 (CH, C-3)], olefínicos [**ChRH-1a** e **ChRH-1b**: δ 140,9 (C, C-5) e δ 121,7 (CH, C-6); **ChRH-1b**: δ 138,5 (CH, C-22) e δ 129,4 (CH, C-23)], além de sinais para grupos metilas de ambos compostos (Tabela 6, p. 64).

Os dados espectrais discutidos, associados à análise comparativa com dados dos compostos correspondentes descritos na literatura (Macari *et al.*, 1990; Marques, 2001) permitiram identificar **ChRH-1a** e **ChRH-1b** como sendo os fitoesteróides conhecidos como *Sitosterol* e *Estigmasterol*, respectivamente.



ChRH-1a 22, 23 diidro

ChRH-1b $\Delta^{22,23}$

Tabela 6. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, J em Hz) das substâncias **ChRH-1a** e **ChRH-1b** e comparação com dados da literatura (Macari *et al.*, 1990; Marques, 2001).

Posição	ChRH-1a		ChRH-1b		Sitosterol	Estigmasterol
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,4		37,4		37,3	37,2
2	31,3		31,3		31,6	31,6
3	71,5	3,38 m	71,5	3,38 m	71,7	71,7
4	42,0		39,8		42,3	39,8
5	140,9		140,9		140,8	140,7
6	121,7	5,34 (sl)	121,7	5,34 (sl)	121,6	121,7
7	32,0		31,3		31,9	31,6
8	32,0		32,0		31,9	31,9
9	50,3		50,3		50,2	50,2
10	36,6		36,6		36,5	36,5
11	21,2		21,2		21,1	21,1
12	39,8		39,8		39,8	39,8
13	42,3		42,3		42,3	42,2
14	56,9		56,9		56,8	56,8
15	24,5		24,5		24,3	24,3
16	28,4		28,4		28,3	28,2
17	56,1		56,1		56,1	56,1
18	12,0	0,68 s	12,0	0,68 s	11,9	11,8
19	19,5	1,03 s	19,0	1,03 s	19,4	19,3
20	36,6		40,6		36,1	40,5
21	19,0	0,92	21,3	0,92	18,8	21,2
22	32,1		138,5	5,12 (dd, $J = 11,6; 8,0$)	34,0	138,3
23	25,5		129,4	4,91 m	26,4	129,3
24	45,9		51,4		46,1	51,2
25	29,0		29,0		29,0	31,9
26	19,5	0,79-0,86	21,3	0,79-0,86	19,1	21,2
27	19,0	0,79-0,86	19,5	0,79-0,86	18,9	18,8
28	25,5	0,79-0,86	25,5	0,79-0,86	23,1	25,4
29	11,9	0,79-0,86	12,0	0,79-0,86	12,3	12,2

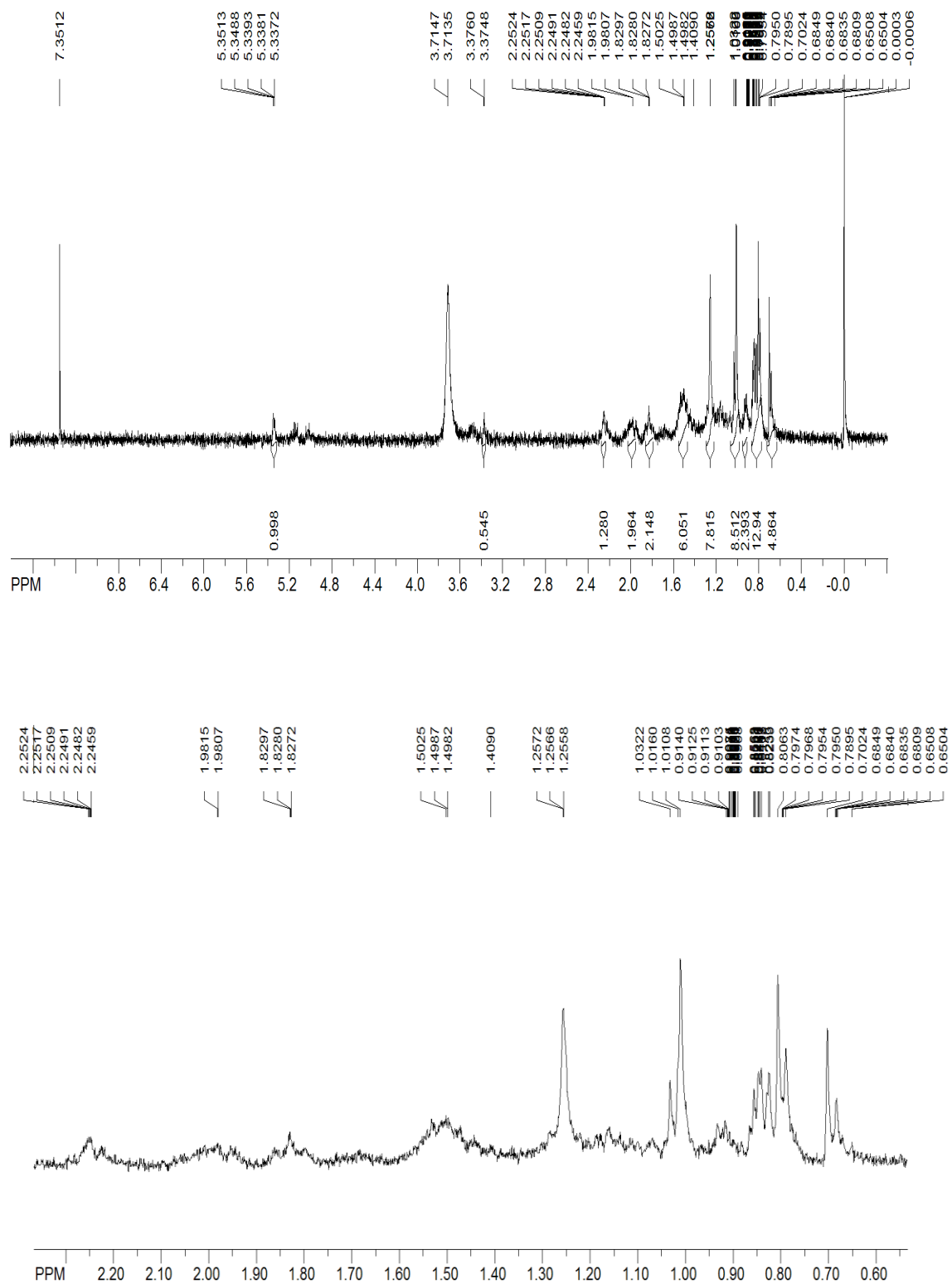


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) das substâncias **ChRH-1a** e **ChRH-1b**.

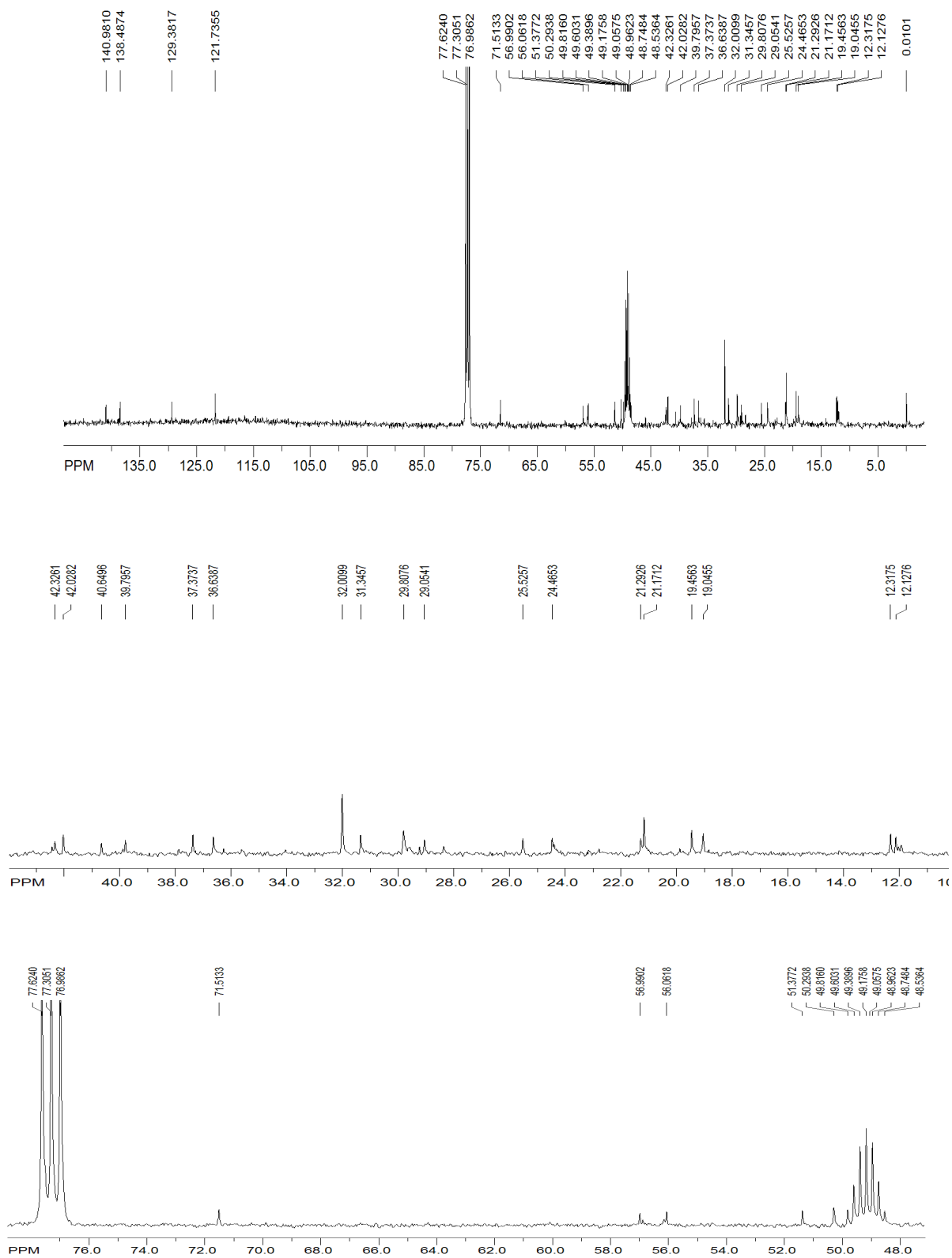
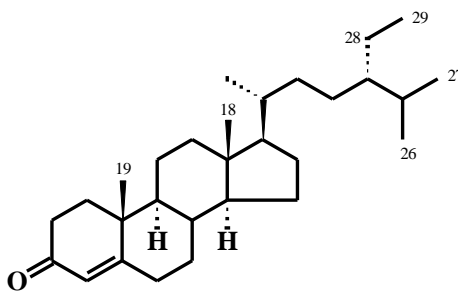


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$) das substâncias **ChRH-1a** e **ChRH-1b**.

5.7.1.2. Identificação Estrutural da Substância Codificada de ChRH-2

A substância codificada de **ChRH-2** foi identificada como sendo o fitoesteróide conhecido como *sitostenona* com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN ^{13}C , bem como pela comparação com os dados do composto descritos na literatura.

A análise dos dados obtidos do espectro de RMN ^{13}C (Figura 13, p. 69; Tabela 7, p. 68) permitiu reconhecer sinais correspondendo a vinte e nove átomos de carbono. Dentre esses carbonos foram observados sinais para uma ligação dupla conjugada do tipo trissubstituída [δ 171,23 (C) e δ 122,64 (CH)] e para um grupo carbonila de cetona conjugado [δ 199,07 (C)]. Estas informações, associadas aos valores de deslocamentos químicos dos grupos metílicos e demais carbonos, bem como a comparação com dados do composto corresponde descritos na literatura permitiram a identificação de **ChRH-2** como sendo o fitoesteróide conhecido como *sitostenona* (Della Greca *et al.*, 1990).



ChRH-2

Tabela 7. Dados de RMN de **ChRH-2** (^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ) e da **Sitostenona** (^{13}C : 100 MHz, CD_3OD , Hz) (Della Greca *et al.*, 1990).

<i>Posição</i>	δ_{C}	ChRH-2	<i>Sitostenona</i>
			δ_{C}
C			
3	199,07		198,92
5	171,23		171,01
10	38,58		38,58
13	41,35		42,35
CH			
4	122,64		123,64
8	35,13		35,73
9	52,78		53,84
14	54,97		55,94
17	55,06		56,08
20	37,60		36,10
24	44,78		45,80
25	29,76		29,11
CH₂			
1	35,27		35,68
2	33,45		33,89
6	32,88		32,86
7	32,01		32,07
11	21,68		21,03
12	38,58		39,48
15	24,38		24,12
16	28,09		28,10
22	34,57		34,01
23	25,09		25,99
28	23,17		23,10
CH₃			
18	13,11		11,98
19	17,68		17,38
21	18,80		18,72
26	19,99		19,81
27	19,18		19,18
29	10,95		11,14

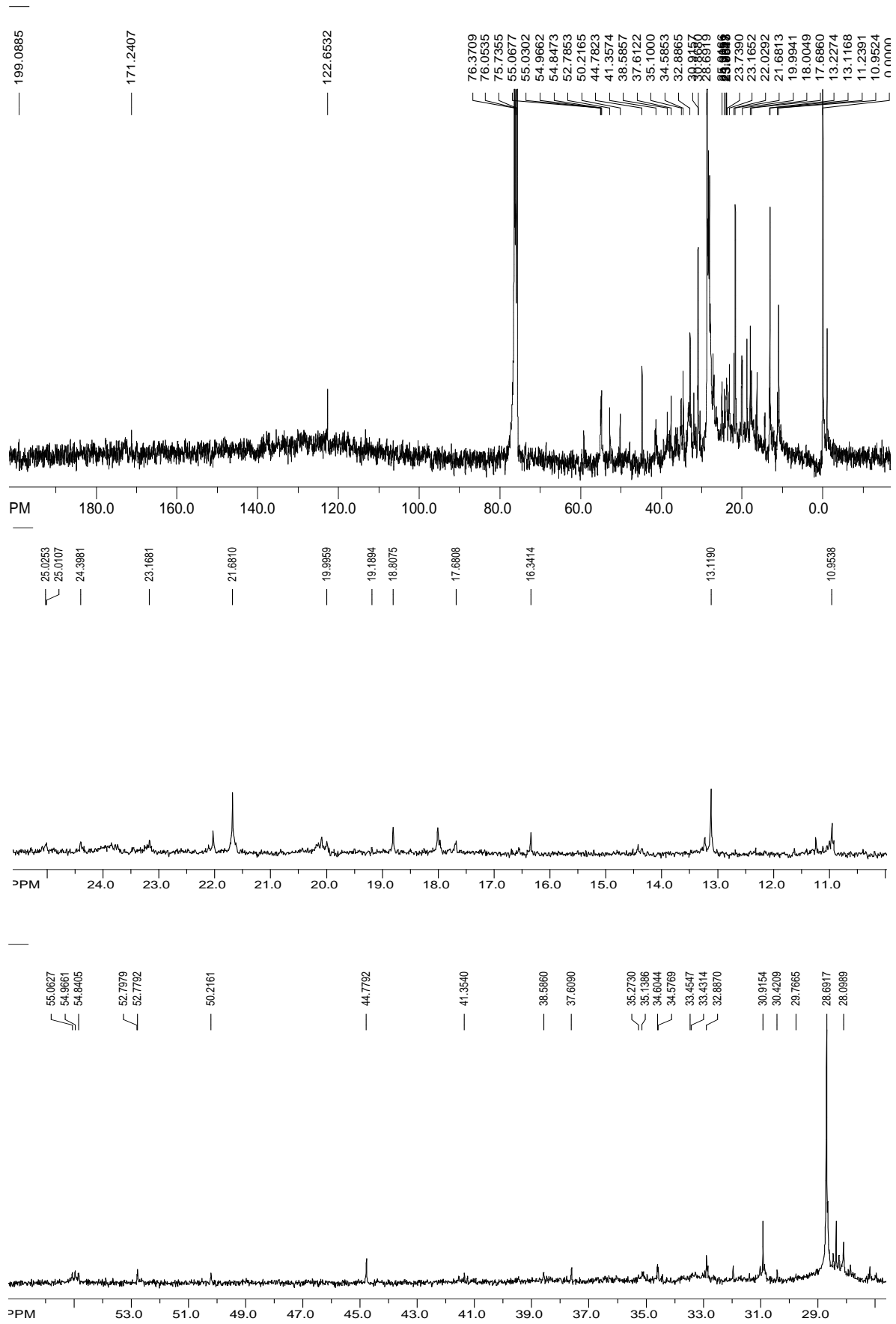


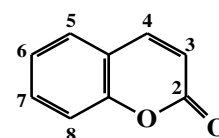
Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância ChRH-2.

5.7.1.3. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRD-1 e ChRD-4.

As substâncias codificadas de **ChRD-1** e **ChRD-4** tiveram suas estruturas identificadas como sendo derivados 4-fenilcumarínicos com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN em uma e duas dimensões, bem como pela comparação com dados da literatura.

A análise dos dados dos respectivos espectros de RMN ^1H [Figuras 14 (p. 74) e 15 (p. 75)] revelou a presença de sinais simples e duplos, cujos valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento estão condizentes com a presença de núcleos cumarínicos trissubstituídos [**ChRD-1**: δ 5,99 (1H, s, H-3); δ 6,25 (d, $J = 2,4$ Hz, H-6) e δ 6,52 (d, $J = 2,4$ Hz, H-8); **ChRD-4**: δ 5,83 (1H, s, H-3), δ 6,33 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-6) e δ 6,48 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8)], de anéis aromáticos 1,4-dissubstituídos [**ChRD-1**: δ 6,91 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-3' e H-5') e δ 7,23 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-2' e H-6'); **ChRD-4**: δ 6,87 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3' e H-5') e δ 7,27 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2' e H-6')], de sinais simples para três grupos metoxilas em **ChRD-1** [δ 3,49 (3H, s) e 3,87 (6H, s)] e um em **ChRD-4** [δ 3,86 (3H, s)], além de sinais para dois grupos hidroxilas em **ChRD-4** [δ 8,67 e δ 9,04 (s)] (Tabelas 8-9, pp. 72-73).

A análise destes dados, associada à multiplicidade do sinal atribuído ao H-3 de ambos [δ 5,99 (s) e δ 5,83 (s)] e a ausência de um sinal duplo em torno de δ 7,50 ($J = 9,5$ Hz), típico do H-4 de núcleo cumarínico (De Oliveira *et al.*, 2005), permitiu sugerir para ambas uma substituição no C-4 deste núcleo.

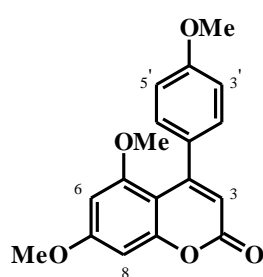


A proteção observada no espectro de RMN ^1H de **ChRD-1** para um dos grupos metoxila (δ 3,49), quando comparado com o valor de deslocamento químico do hidrogênio do grupo metoxila de **ChRD-4** (δ 3,86) excluiu a possibilidade deste grupo encontrar-se no C-5 de **ChRD-4**, pois quando nesta posição, o valor de deslocamento químico dos hidrogênios é protegido (δ 3,50-3,60), em virtude do efeito anisotrópico exercido pelo grupo fenila em C-4 (D'Agostino *et al.*, 1989).

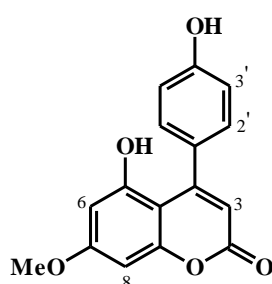
A análise conjunta dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^{13}C (Figuras 16-17, pp. 76-77), HSQC (**ChRD-1**: Figuras 18, p. 78), DEPT e HSQC (**ChRD-4**: Figuras 19-20, p. 79) e permitiu reconhecer para **ChRD-1** um total de 18 átomos de carbono (08 não hidrogenados, 07 monoidrogenados e 03 triidrogenados) e para **ChRD-4** um total de 16 sinais (08 não hidrogenados, 07 monoidrogenados e 01 triidrogenado). Dentre esses carbonos foram identificados sinais cuja natureza e valores de deslocamentos químicos estão compatíveis com a

presença de núcleos cumarínicos trissubstituídos [**ChRD-1**: δ 160,7 (C, C-2), δ 112,57 (CH, C-3), δ 95,79 (CH, C-6) e δ 93,60 (CH, C-8); **ChRD-4**: δ 160,7 (C, C-2), δ 112,4 (CH, C-3), δ 99,4 (CH, C-6) e δ 94,1 (CH, C-8)], de anéis aromáticos 1,4-dissubstituídos [**ChRD-1**: δ 112,73 (CH, C-3' e C-5') e δ 128,71 (C-2' e C-6'); **ChRD-4**: δ 115,2 (CH, C-3' e C-5'), δ 130,0 (CH, C-2' e C-6')] e para três grupos metoxilas em **ChRD-1** [δ 55,46 (MeO-5), 55,75 (MeO-7) e δ 55,31 (MeO-4')] e de um em **ChRD-4** [δ 56,1 (CH₃)] (Tabela 9, p. 73). Estas informações, associadas a ausência nos espectros de RMN de um carbono monoidrogenado em torno de δ 145,0 (De Oliveira *et al.*, 2005), referente ao C-4 de um núcleo cumarínico, confirma em ambos a proposição de uma substituição em C-4 deste núcleo. Além disso, a desproteção observada para o sinal atribuído ao C-3' e ao C-5' do anel aromático 1,4-dissubstituído de **ChRD-4** (δ 115,2), quando comparado com os carbonos correspondentes de **ChRD-1** (δ 112,73), sugeriu um grupo hidroxila em C-4' de **ChRD-4** e um grupo metoxila no de **ChRD-1**. Estas observações permitiram propor para **ChRD-1** e **ChRD-4**, respectivamente, as estruturas da *5,7-Dimetoxi-4-(p-metoxifenil)cumarina* e da *5-Hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxi-fenil)cumarina*.

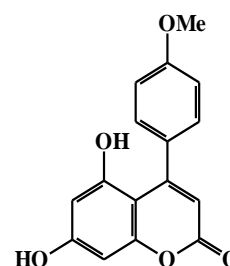
As correlações observadas nos respectivos mapas de contorno dos espectros bidimensionais HMBC (Figuras 21-22, pp. 80-81; Tabelas 8-9, pp. 72-73), além de permitir atribuir inequivocamente os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos, permitiram também confirmar as propostas estruturais. Em **ChRD-4** o sinal do grupo metoxila (δ 3,86) correlaciona com o carbono não hidrogenado que absorve em δ 164,1 (C-7) e o sinal de H-2' e H-6' (δ 7,27) com C-4 (δ 156,6) e C-4' (δ 158,7).



ChRD-1



ChRD-4

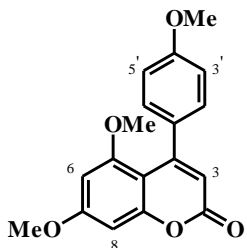


5,7-Diidroxi-4-(p-metoxifenil)-cumarina

A comparação dos dados espectrais obtidos com os dados de RMN ¹H do composto correspondente (Mata *et al.*, 1990) e do modelo *5,7-Diidroxi-4-(p-metoxifenil)cumarina* descrito na literatura (Tabela 9, p. 73) permitiu confirmar estas propostas estruturais.

A substância codificada de **ChRD-4** foi obtida anteriormente somente como produto de hidrólise química ou enzimática de constituintes químicos das cascas do caule de *Hintonia latiflora* (Rubiaceae) (Mata *et al.*, 1990) ou por síntese orgânica (Bose & Banerji, 1990). Tanto a substância codificada de **ChRD-1** quanto de **ChRD-4** foram avaliadas no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e ambas inibiram o edema por cerca de 35% e 67%, respectivamente. A substância codificada de **ChRD-4** frente ao DPPH também sequestrou radicais livres com um valor de CI_{50} comparável ao do ácido ascórbico ($43,70 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$).

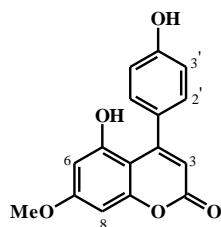
Tabela 8. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C , 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) da substância **ChRD-1** e comparação com dados da literatura (Ito *et al.*, 2000).



5,7-Dimetoxi-4-(p-metoxifenil)-cumarina

Posição	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	HMBC	δ_{C}	δ_{H}
C					
2	160,98			161,3	
4	157,26			157,6	
4a	103,64			103,9	
5	158,30			158,6	
7	163,27			163,6	
8a	155,48			155,4	
1'	132,09			132,4	
4'	159,57			160,0	
CH					
3	112,57	5,99 (1H, s)	C-1', C-2, C-4a	112,8	5,96 (1H, s)
6	95,79	6,25 (1H, d, $J = 2,4$)	C-4a, C-7	96,0	
8	93,60	6,52 (1H, d, $J = 2,4$)	C-6, C-4a	94,0	6,50 (2H, $J = 2,5$)
3',5'	112,73	6,91 (2H, d, $J = 8,7$)	C-1', C-4'	113,1	6,87 (2H, $J = 8,5$)
2',6'	128,71	7,23 (2H, d, $J = 8,7$)	C-1'	129,1	7,20 (2H, $J = 8,5$)
CH₃					
MeO-5	55,31	3,49 (3H, s)	C-5	55,8	3,46 (3H, s)
MeO-7	55,46	3,87 (3H, s)	C-7	56,1	3,83 (3H, s)
MeO-4'	55,75	3,87 (3H, s)	C-4'	55,7	3,83 (3H, s)

Tabela 9. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, acetona- d_6 , δ , Hz) da substância **ChRD-4** e comparação com dados da literatura da *5-Hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina* (Mata *et al.*, 1990) e da *5,7-Diidroxi-4-(p-metoxifenil)-cumarina* (Harbone, 1993).



ChRD-4

5-Hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)-cumarina

5,7-Diidroxi-4-(p-metoxifenil)-cumarina

Posição	δ_C	δ_H /HSQC	HMBC	δ_H	δ_C
C					
2	160,7				159,7
4	156,6				155,5
4a	103,1				100,5
5	157,5				156,9
7	164,1				161,3
8a	158,3				156,5
1'	131,3				131,4
4'	158,7				158,9
CH					
3	112,4	5,83 s	C-2, C-3, C-4a, C-1'	5,78 s	109,7
6	99,4	6,33 (d, $J = 2,5$)		6,35 (d, $J = 3,0$)	99,1
8	94,1	6,48 (d, $J = 2,4$)		6,25 (d, $J = 3,0$)	94,5
3',5'	115,2	6,87 (dd, $J = 8,6$)	C-1'	6,75 (d, $J = 8,0$)	112,4
2',6'	130,0	7,27 (dd, $J = 8,6$)	C-4, C-4'	7,12 (d, $J = 8,0$)	128,7
CH₃					
MeO-7	56,1	3,86 s	C-7	3,78 s	55,0
OH-5		8,67 sl		8,10 sl	
OH-4'		9,04 sl		9,10 sl	

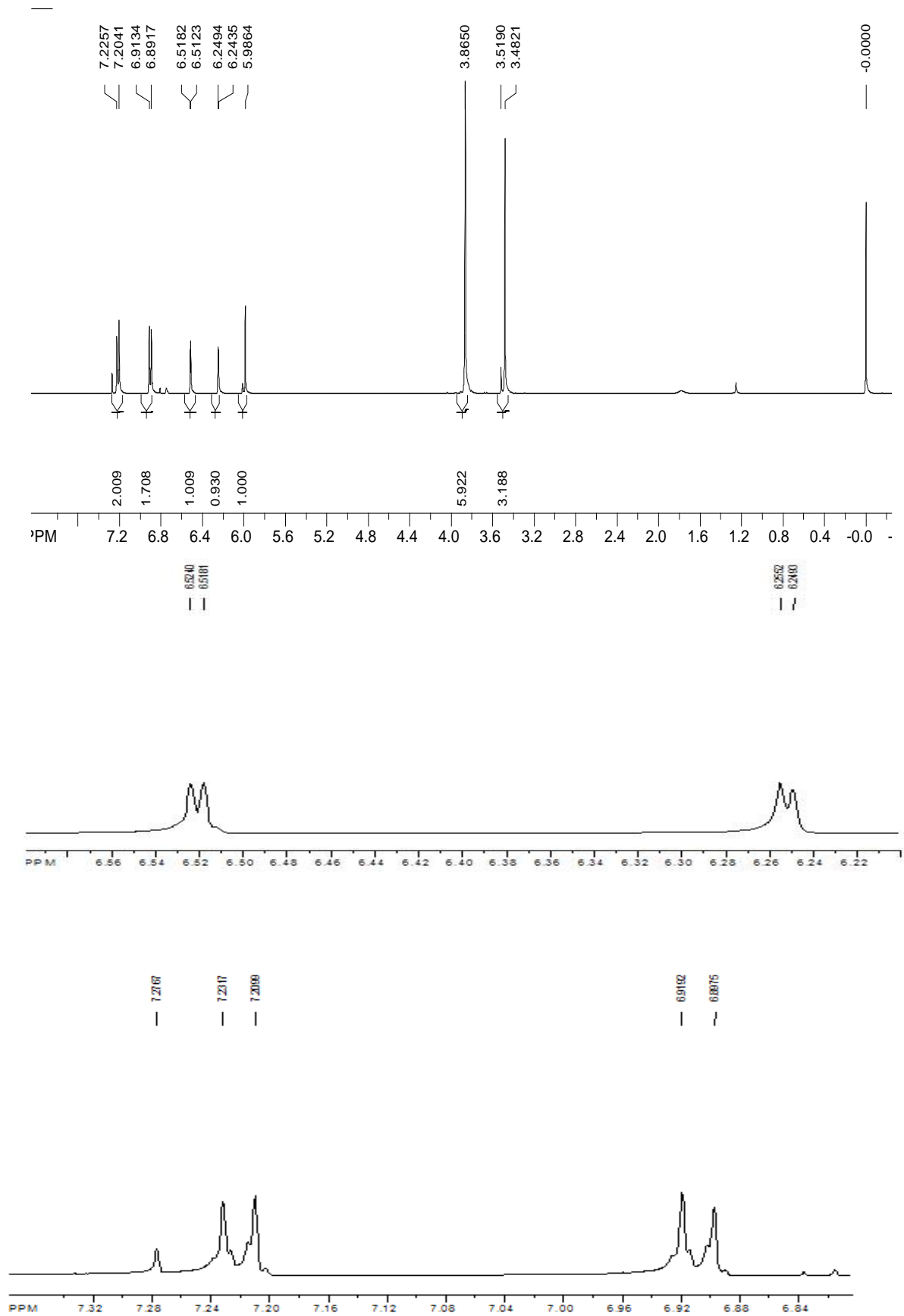


Figura 14. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-1**.

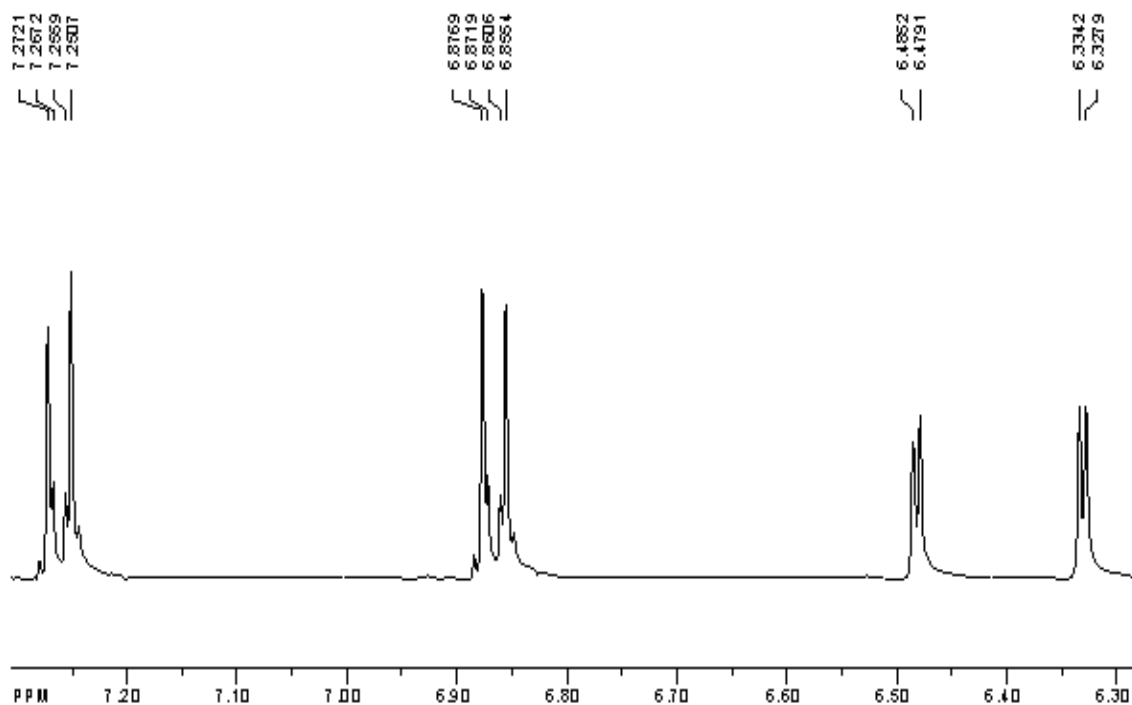
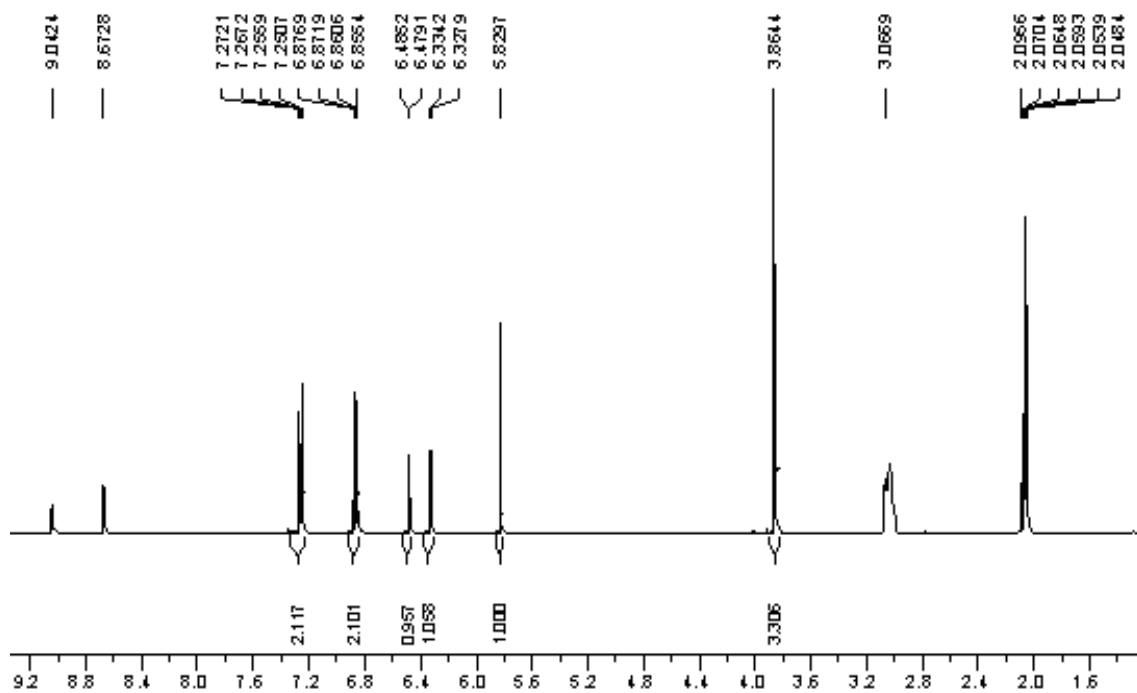


Figura 15. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, acetona- d_6) da substância **ChRD-4**.

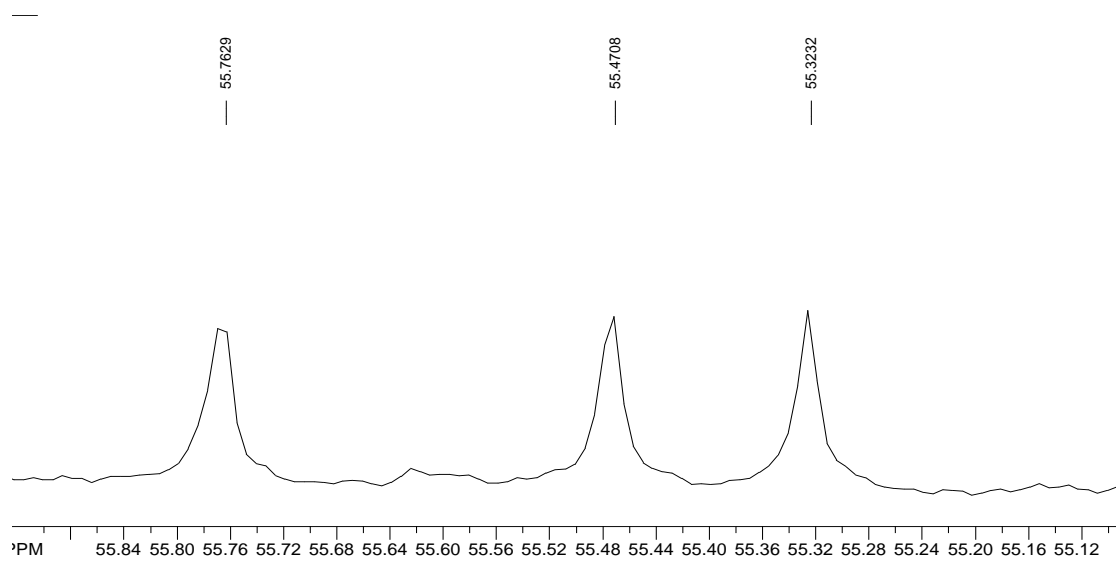
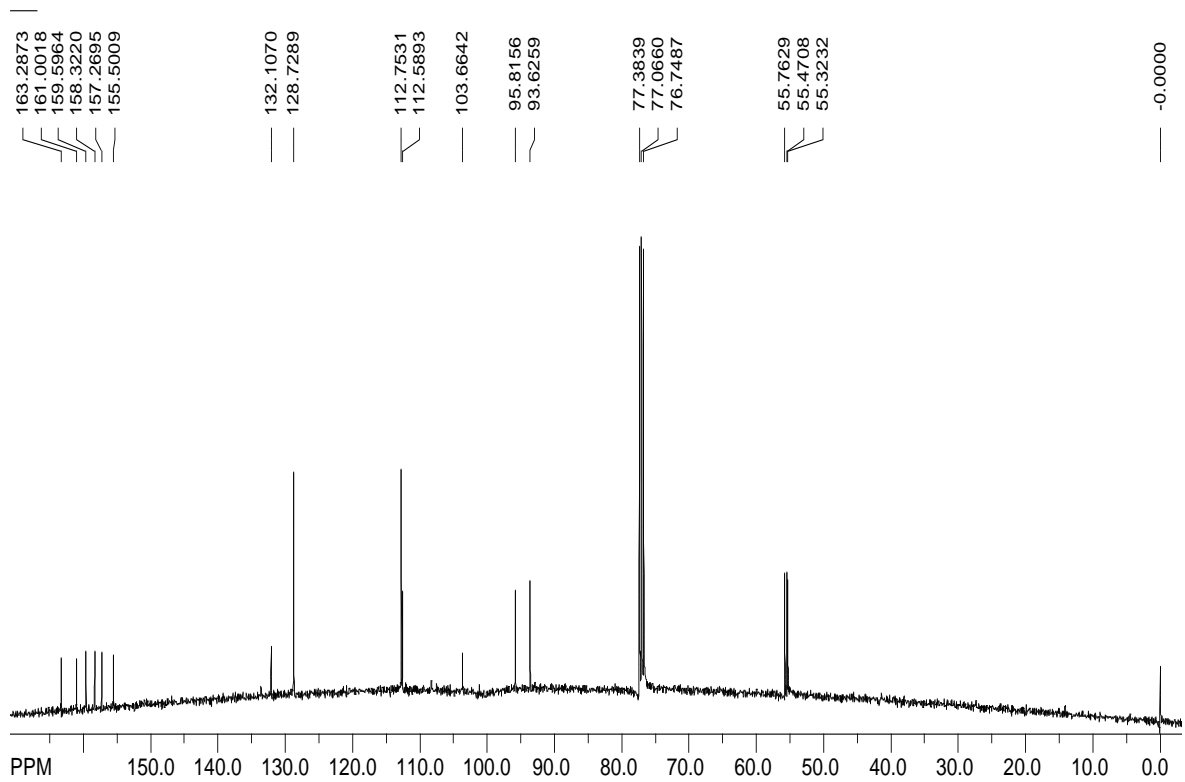


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-1**.

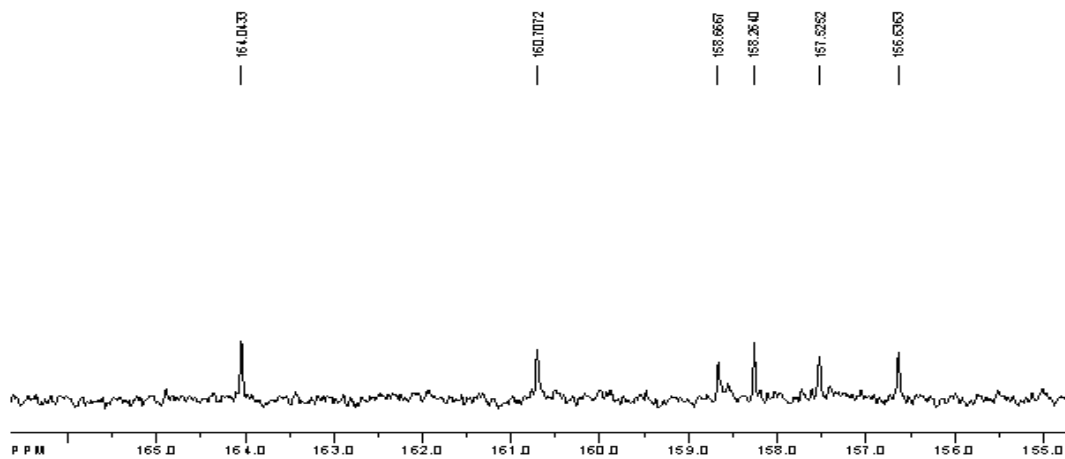
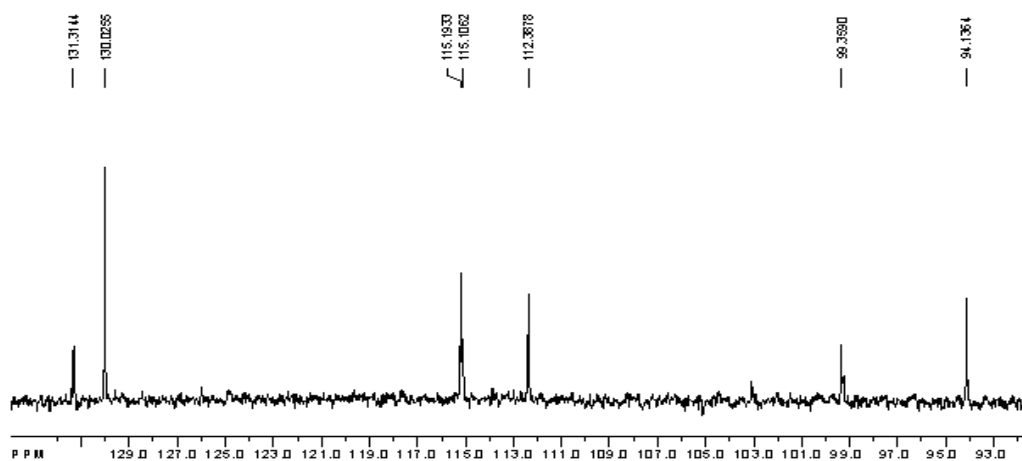
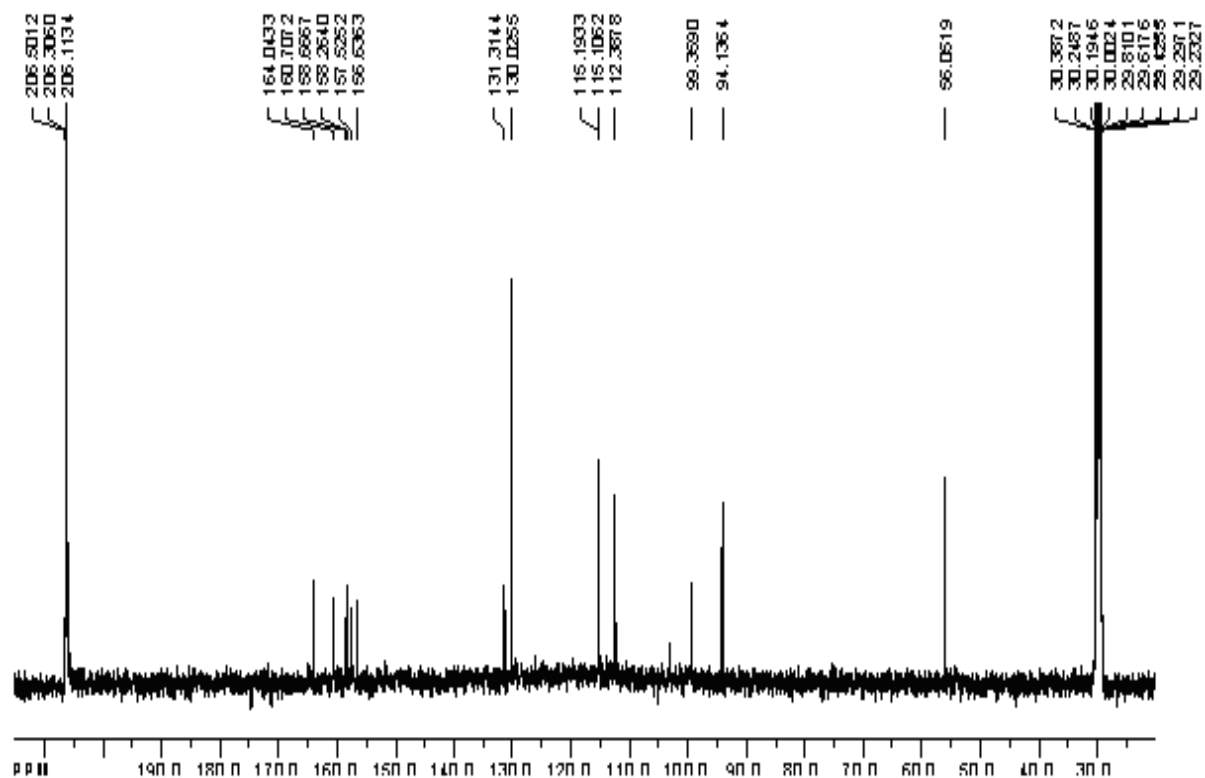


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, acetona- d_6) da substância **ChRD-4**.

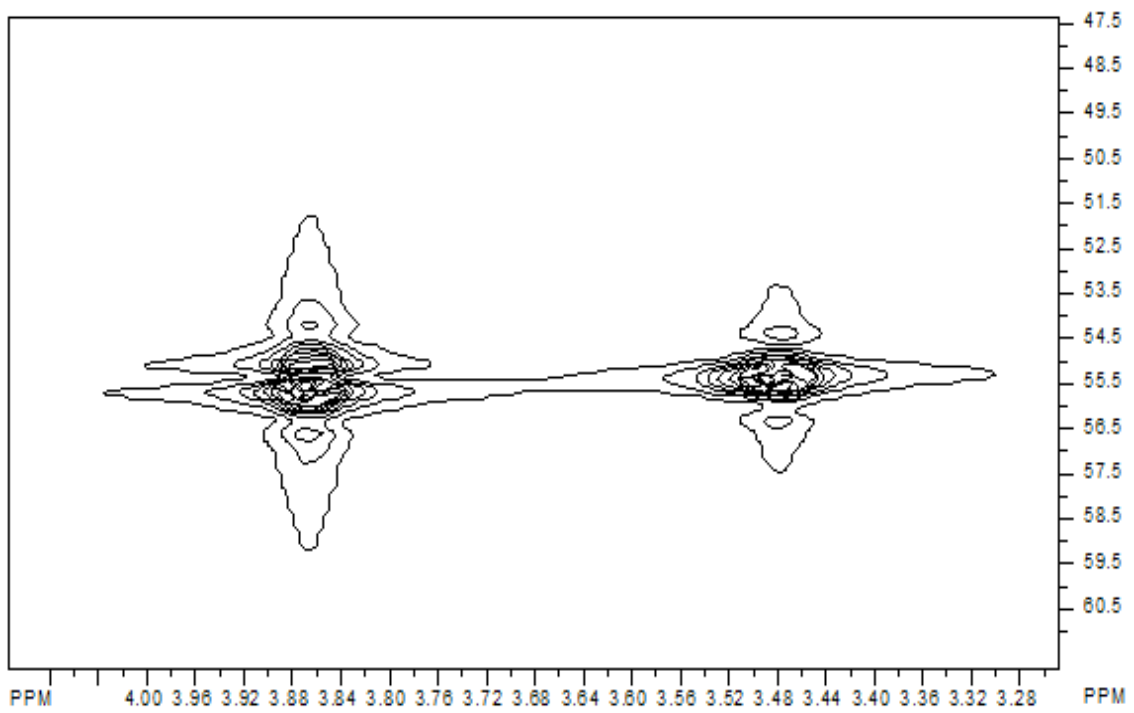
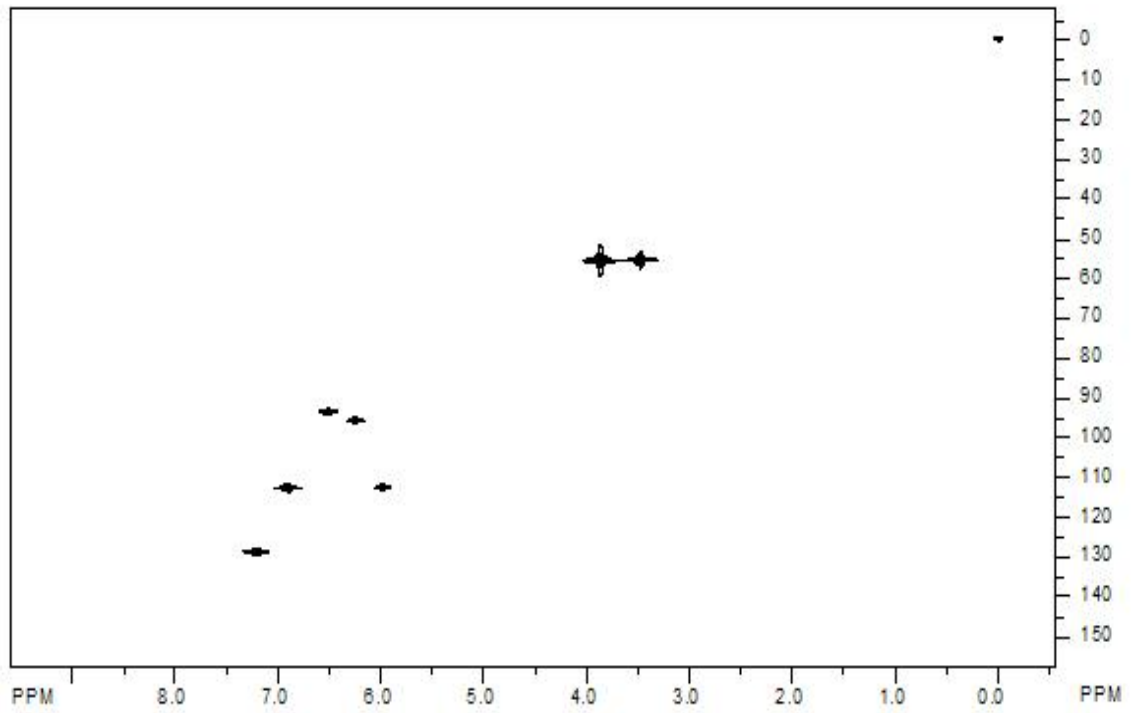


Figura 18. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-1**.

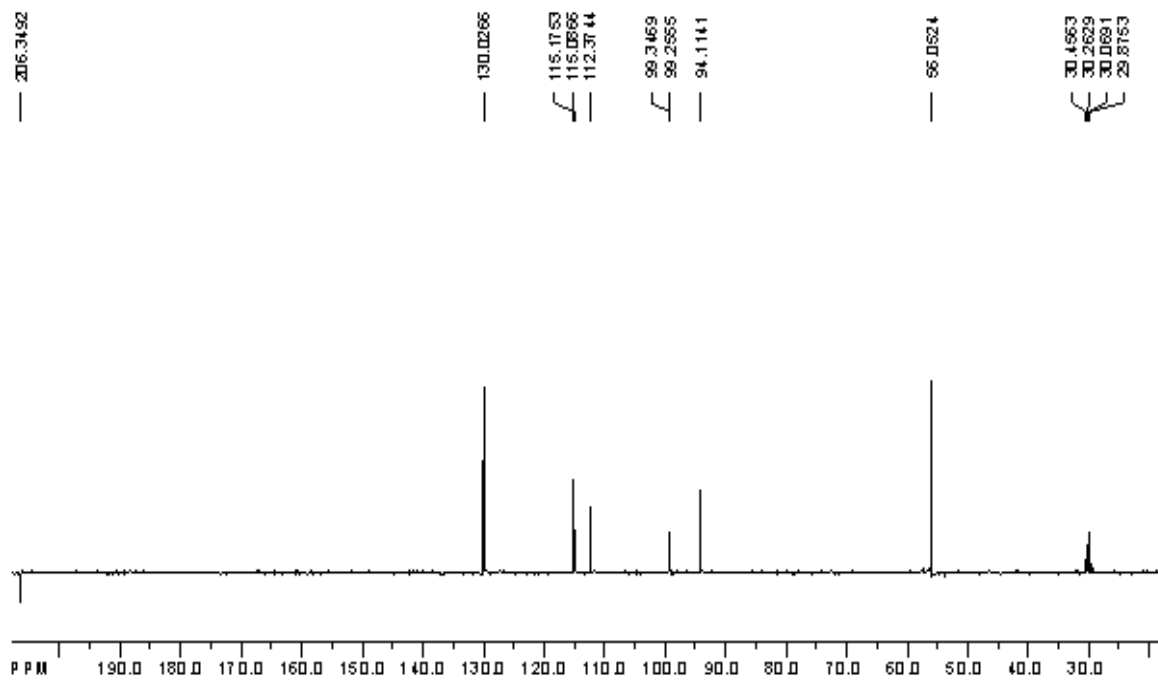


Figura 19. Espectro DEPT (100 MHz, acetona-d₆) da substância **ChRD-4**.

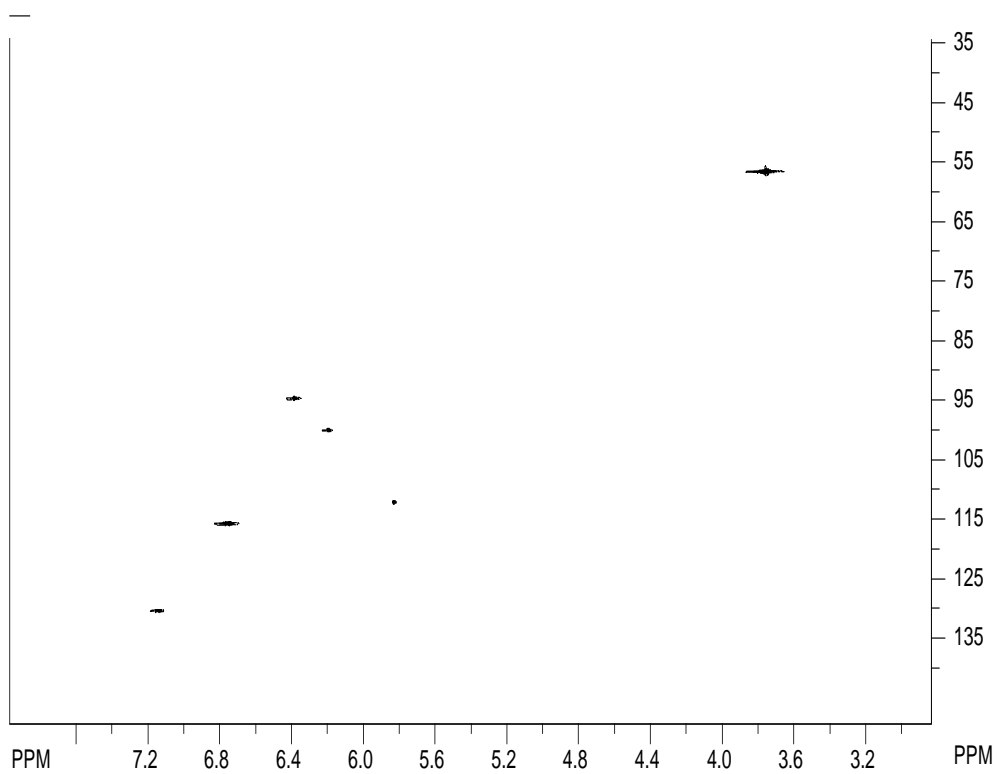


Figura 20. Espectro HSQC (¹H: 400; ¹³C: 100 MHz, acetona-d₆) da substância **ChRD-4**.

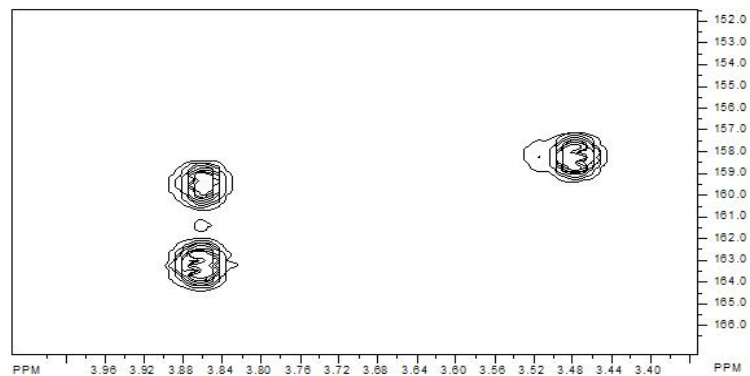
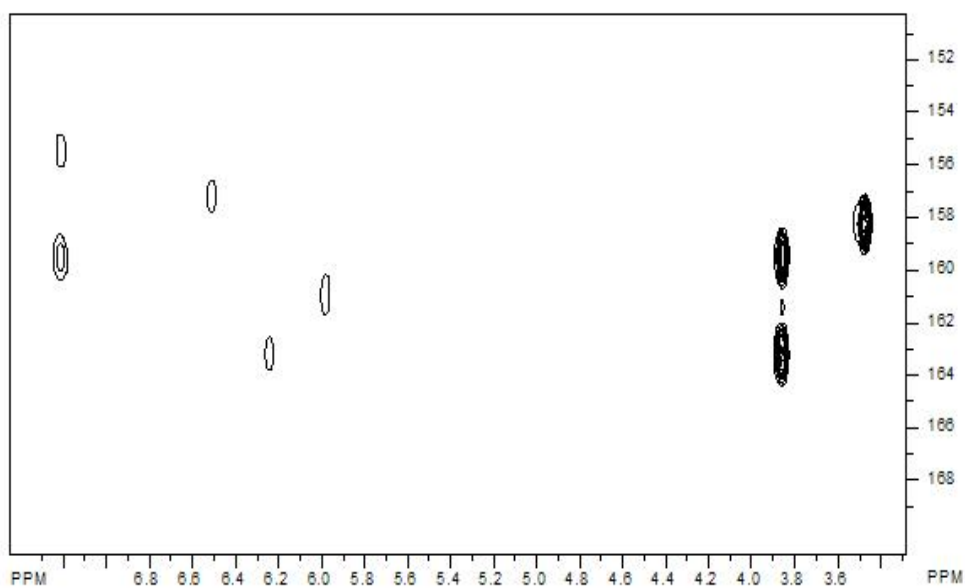
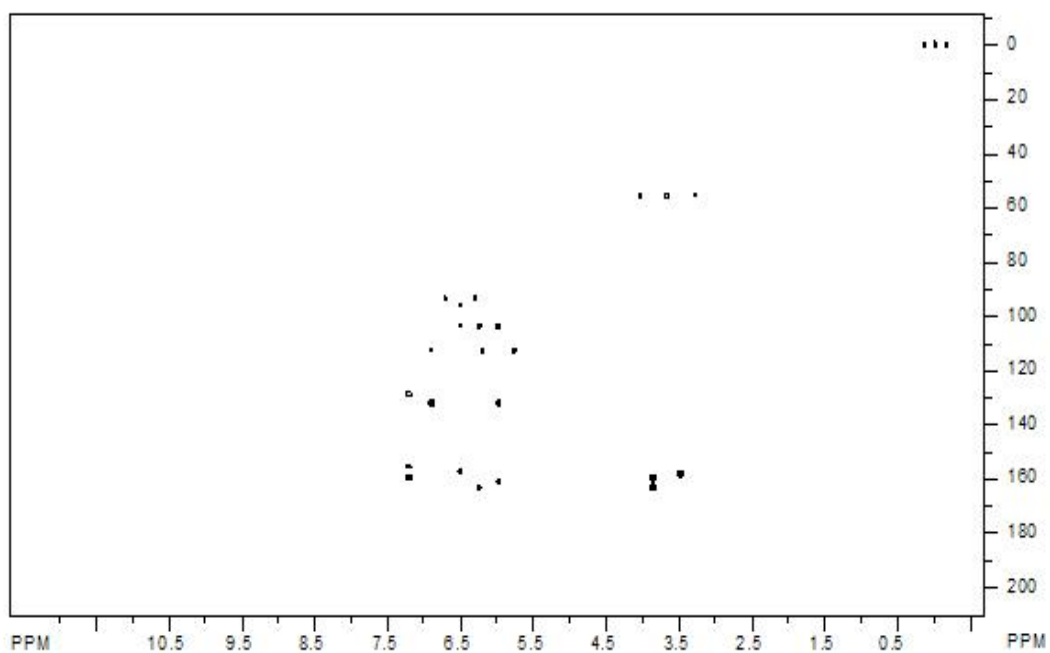


Figura 21. Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-1**.

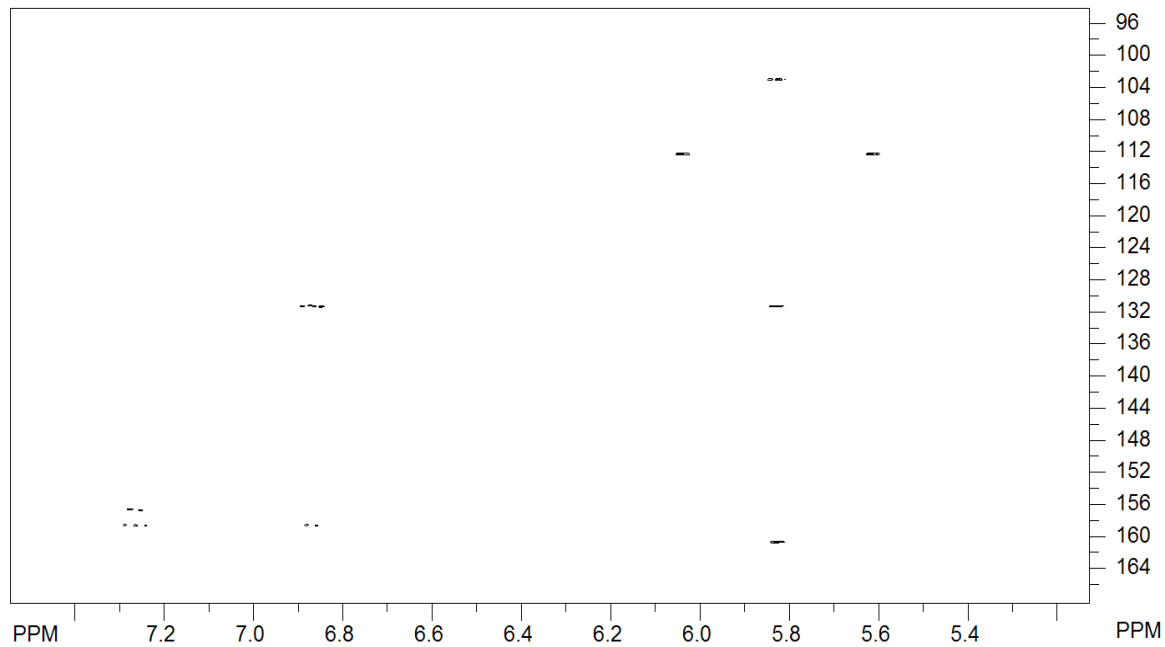
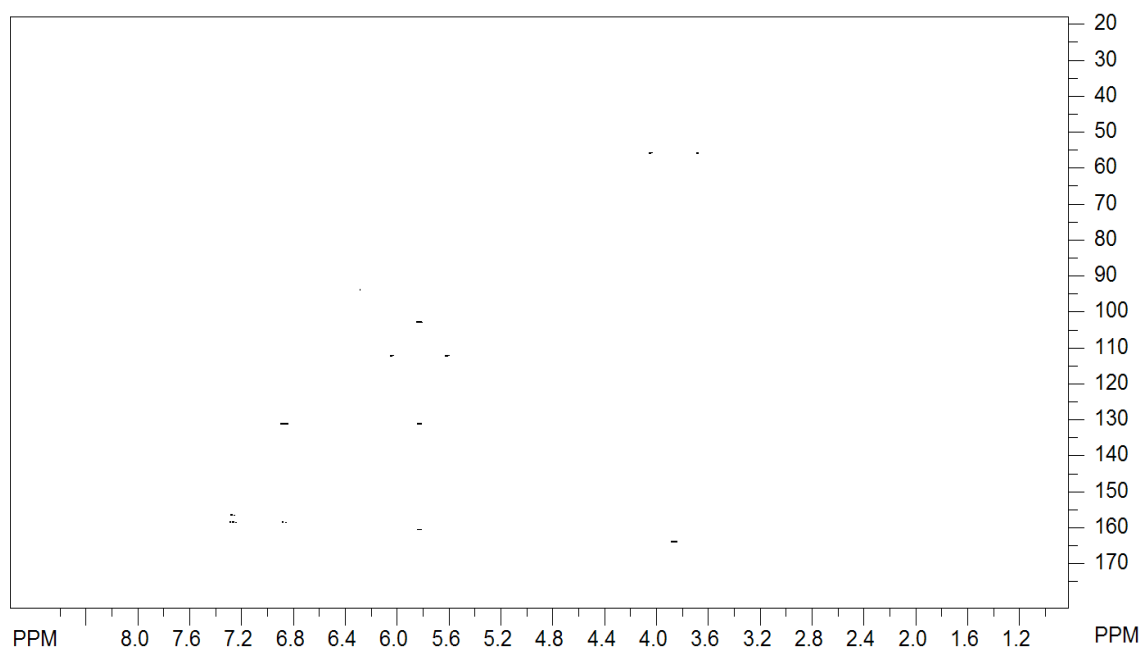


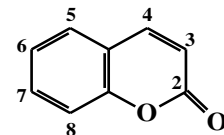
Figura 22. Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, acetona- d_6) da substância **ChRD-4**.

5.7.1.4. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRD-2 e ChRD-8

As substâncias codificadas de **ChRD-2** e **ChRD-8** tiveram suas estruturas identificadas como sendo derivados 4-fenilcumarínicos com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN em uma e em duas dimensões, bem como pela comparação com dados descritos na literatura.

Os dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^1H a 400 MHz (Figuras 23-24, pp. 87-88) revelaram a presença de sinais simples e duplos, cujos valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento estão condizentes com a presença de núcleos cumarínicos tetrassubstituídos [**ChRD-2**: δ 5,99 (1H, s, H-3) e δ 6,31 (1H, sl, H-6); **ChRD-8**: δ 5,98 (1H, s, H-3), δ 6,46 (1H, s, H-6)], de um anel aromático do tipo 1,4-dissubstituído para **ChRD-2** [δ 6,91 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-3',5') e δ 7,23 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-2',6')] e do tipo 1,3,4-trissubstituído para **ChRD-8** [δ 6,78 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ 6,67 (1H, dd, $J = 2,1$ e 8,1 Hz, H-6') e δ 6,83 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-5')] e de quatro grupos metoxilas em **ChRD-2** [δ 3,49, 3,87, 3,93 e 3,96 (s, 3H cada)] e três em **ChRD-8** [δ 3,56; 3,91 e 3,99 (3H, s, cada)] (Tabelas 10-11, pp. 85-86).

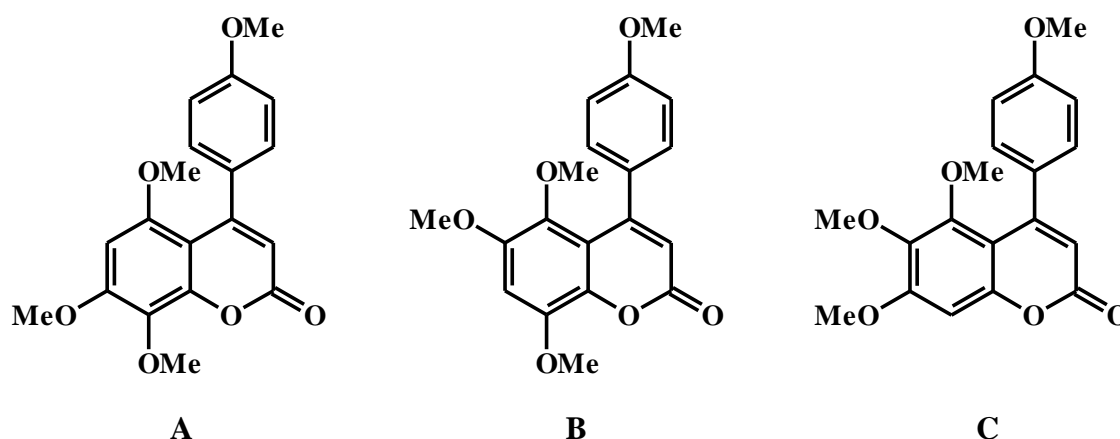
A análise destes dados, associada à multiplicidade do sinal atribuído ao H-3 de ambos compostos [**ChRD-2**: δ 5,99 (s); **ChRD-8**: δ 5,98 (s)] e a ausência de um sinal duplo em torno de δ 7,50 ($J = 9,5$ Hz), típico de núcleo cumarínico (De Oliveira *et al.*, 2005), permitiu sugerir para ambas estruturas uma fenilcumarina substituída em C-4. Além disso, os valores de deslocamentos químicos atribuídos a um dos grupos metoxilas de ambos os compostos (**ChRD-2**: δ 3,49; **ChRD-8**: δ 3,56) possibilitou inferir um grupo metoxila em C-5 do núcleo cumarínico.



A análise conjunta dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^{13}C (Figuras 25-26, pp. 89-90) e HSQC (Figuras 27-28 pp. 91-92) permitiu reconhecer um total de dezenove sinais de átomos de carbonos (nove não hidrogenados, seis monoidrogenados e quatro triidrogenados). Dentre os carbonos monoidrogenados e triidrogenados foram identificados sinais cujos valores de deslocamentos químicos coerentes com a presença de núcleos cumarínicos tetrassubstituídos [**ChRD-2**: δ 112,8 (CH, C-3) e δ 92,7 (CH, C-6); **ChRD-8** [δ 112,21 (CH, C-3), 93,82 (CH, C-6)], de um anel aromático do tipo 1,4-dissubstituído para **ChRD-2** [δ 112,9 (CH, C-3' e C-5') e δ 128,6 (C-2' e C-6')] e do tipo 1,3,4-trissubstituído para **ChRD-8** [δ 115,41 (CH, C-2'), 114,93 (CH, C-5') e 119,90 (CH, C-6')] e de quatro grupos

metoxilas para **ChRD-2** [δ 55,9 (MeO-5), 56,3 (MeO-7), 61,6 (MeO-8) e 55,3 (MeO-4')] e de três em **ChRD-8** [δ 56,27 (MeO-5), 56,67 (MeO-7), 61,79 (MeO-8)], sendo que um deles está bem desprotegido (Tabelas 10-11, pp. 85-86).

A análise destes dados, associada à ausência no espectro de RMN ^{13}C de um carbono monoidrogenado com valor de deslocamento químico em torno de δ 145,0 (De Oliveira *et al.*, 2005), referente ao C-4 de um núcleo cumarínico, confirma a proposição de uma substituição no C-4 deste núcleo em **ChRD-2** e **ChRD-8**. Por sua vez, a proteção observada para C-3' e C-5' do anel 1,4-dissubstituído de **ChRD-2** (δ 112,9), quando comparados com os correspondentes das substâncias **ChRD-1** (δ 112,7) e de **ChRD-4** (δ 115,2) descritas anteriormente, permitiu inferir um grupo metoxila no C-4' deste composto. Estas informações, permitiram propor para **ChRD-2** três possibilidades estruturais (A-C). No entanto, a proteção observada nos deslocamentos químicos dos carbonos de três dos grupos metoxilas (δ 56,3, 55,9 e 55,3) permitiu excluir a possibilidade estrutural C, pois nesta estrutura seriam esperados pelo menos dois carbonos desprotegidos ($\approx \delta$ 60,0).



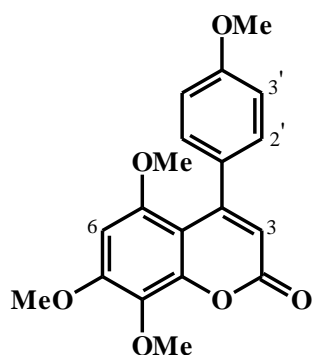
Correlações observadas no mapa de contorno do espectro bidimensional HMBC (Figura 29, p. 93) de **ChRD-2**, além de permitir atribuir inequivocamente os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da molécula, permitiu também propor para este composto a possibilidade estrutural A [*5,7,8-Trimetoxi-4-(p-metoxifenil)cumarina*], principalmente, pelas correlações dos hidrogênios dos grupos metoxilas e de H-6 (δ 6,31) com C-4a (δ 103,9), C-5 (δ 153,8) e C-7 (δ 155,8) (Tabela 10, p. 85)

No caso do composto **ChRD-8**, as correlações observadas no mapa de contorno do espectro bidimensional HMBC (Figura 30, p. 94), além de permitir atribuir inequivocamente os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos da molécula, permitiu também

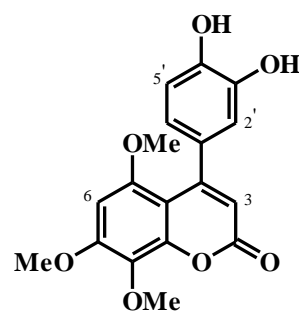
propor para este composto a estrutura *5,7,8-Trimetoxi-4-(3,4-diidroxi-fenil)cumarina*, principalmente, pelas correlações entre os hidrogênios dos grupos metoxilas, de H-6 (δ 6,46) com C-4a (δ 104,53), C-5 (δ 155,01), C-7 (δ 156,83) e C-8 (δ 130,97), bem como de H-2', H-3' e H-6' (Tabela 11, p. 86).

A comparação dos dados espectrais obtidos com os de modelos descritos na literatura (Delle Monache *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 2000) permitiram confirmar estas propostas estruturais.

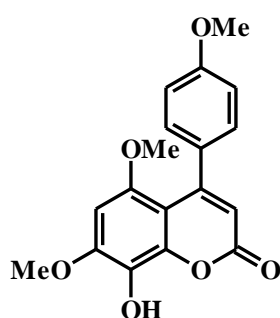
A substância codificada de **ChRD-8**, conhecida como exomexin B, foi isolada anteriormente em Rubiaceae somente em *Exostema mexicanum* (Kohler *et al.*, 2001; Jenett-Siems *et al.*, 2002). Nos ensaios frente ao DPPH esta substância apresentou uma CI_{50} de $20,85 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$, uma atividade comparável ao ácido gálico.



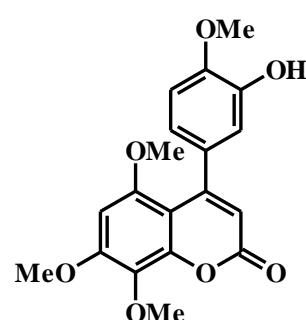
ChRD-2



ChRD-8



5,7-Dimetoxi-8-hidroxi-4-(p-metoxifenil) cumarina



5,7,8-Trimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil) cumarina

Tabela 10. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3 , δ , Hz) da substância **ChRD-2** e comparação com os da *5,7,8-Trimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina* (Ito *et al.*, 2000).

Posição	ChRD-2			5,7-Dimetoxi-8-hidroxi-4-(<i>p</i> -metoxifenil)cumarina
	δ_{C}	δ_{H} /HSQC	HMBC	δ_{C}
C				
2	160,4			160,1
4	149,3			156,2
4a	103,9			
5	153,8			150,3
7	155,8			151,3
8	130,8			132,2
8a	155,5			143,4
1'	132,1			127,9
4'	159,6			160,4
CH				
3	112,8	5,99 (1H, s)	C-2, C-4a, C-1'	113,0
6	92,7	6,31 (1H, s)	C-4a, C-5, C-7	93,6
3',5'	112,9	6,91 (2H, d, $J = 8,7$)	C-1'	113,2
2',6'	128,6	7,23 (2H, d, $J = 8,7$)	C-2',6'	129,2
CH₃				
MeO-5	55,9	3,49 (3H, s)	C-5	56,9
MeO-7	56,3	3,96 (3H, s)	C-7	56,7
MeO-8	61,6	3,93 (3H, s)	C-8	-
MeO-4'	55,3	3,87 (3H, s)	C-4'	55,7

Tabela 11. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância **ChRD-8** e comparação com os da **5,7,8-Trimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina** (Delle Monache et al., 1990).

		ChRD-8			5,7,8-Trimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina	
<i>Posição</i>	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	HMBC	δ_{C}^*	δ_{H}^{**}	
C	2	162,39		159,3		
	4			155,7		
	4a	104,53		102,8		
	5	155,01		153,6		
	7	156,83		155,3		
	8	130,97		129,8		
	8a	157,99		144,6		
	1'	132,0		132,0		
	3'	146,0		145,5		
	4'	149,61		147,7		
CH	3	112,21	5,97 (1H, s)	C-2, C-4a, C-1'	111,5	5,87 s
	6	93,82	6,46 (1H, s)	C-4a, C-5, C-7, C-8	94,0	6,64 s
	2'	115,41	6,78 (1H, d, $J = 2,0$)	C-4'; C-6'	114,9	6,87 (d, $J = 2,0$)
	5'	114,93	6,83 (1H, d, $J = 8,1$)	C-1'; C-3'; C-4'	111,2	6,98 (d, $J = 8,2$)
	6'	119,90	6,67 (1H, dd, $J = 8,1$ e $2,0$)	C-2'; C-4'	118,2	6,79 (dd, $J = 2,0$ e $8,2$)
CH₃	MeO-5	56,27	3,56 (3H, s)	C-5	56,1	3,56 s
	MeO-7	56,67	3,99 (3H, s)	C-7	56,3	3,99 s
	MeO-8	61,79	3,91 (3H, s)	C-8	60,7	3,90 s
	MeO-4'	-	-		55,5	3,83 s

* (300 MHz, acetona- d_6); ** (75 MHz, DMSO- d_6).

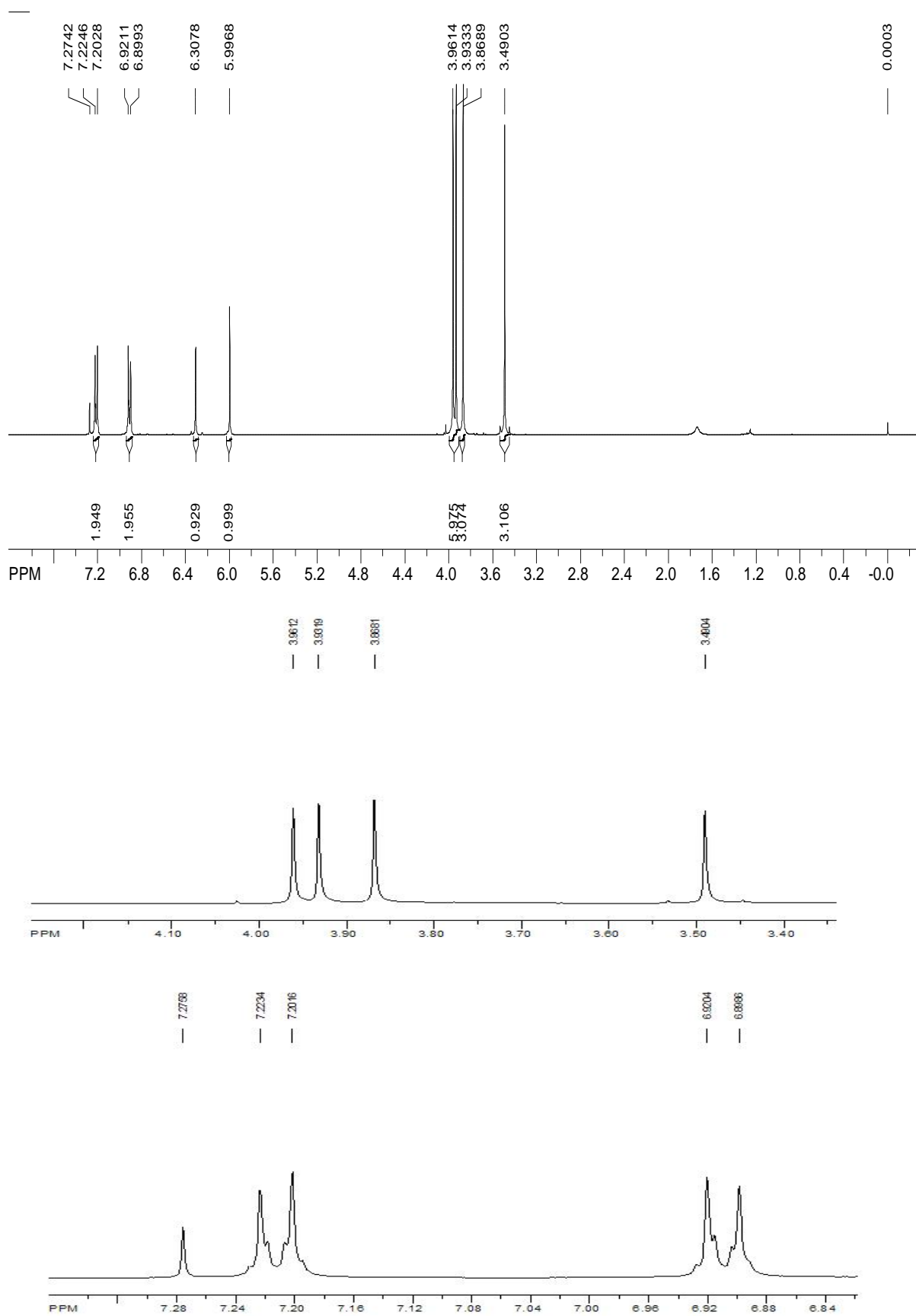


Figura 23. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-2**.

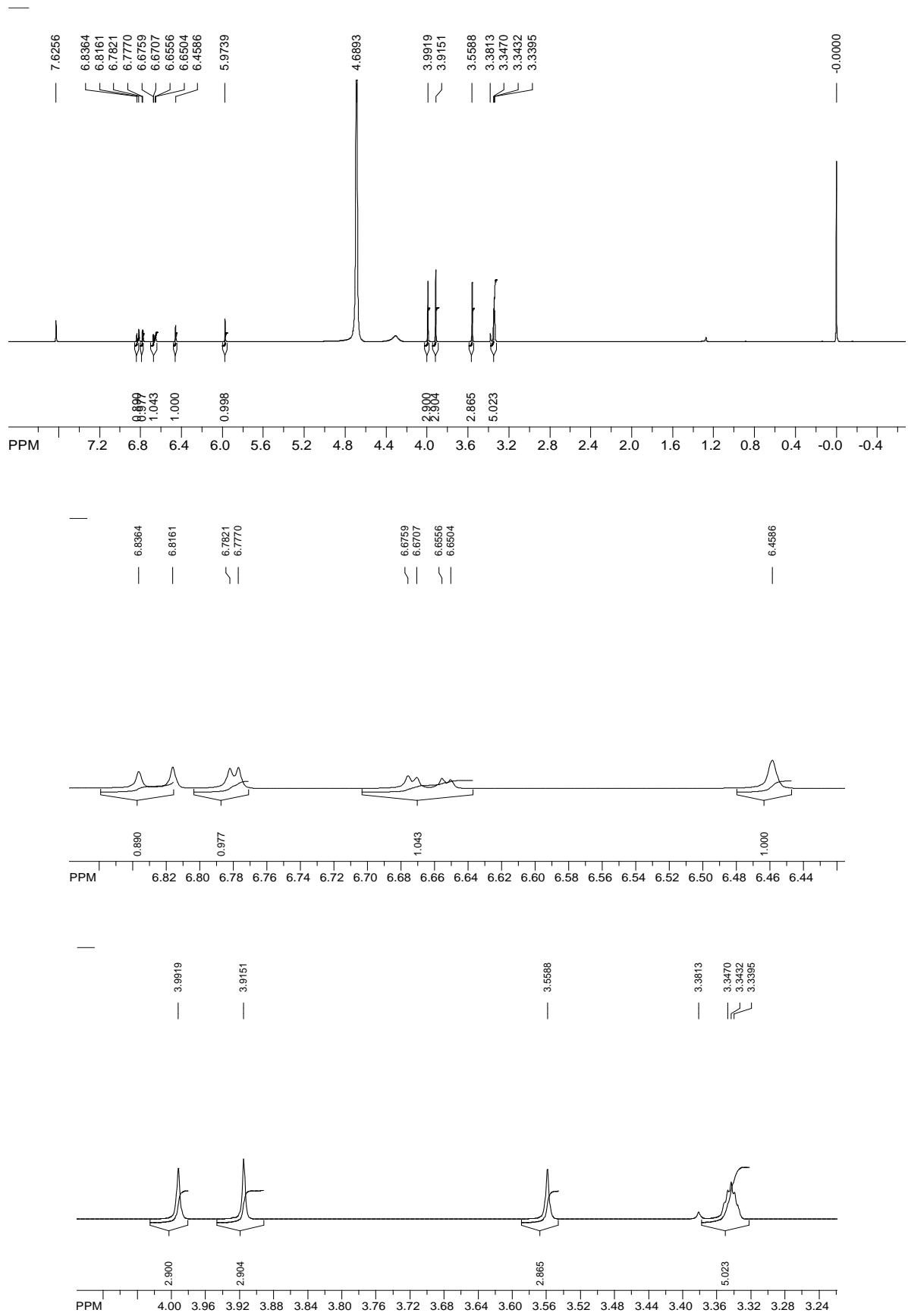


Figura 24. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-8**.

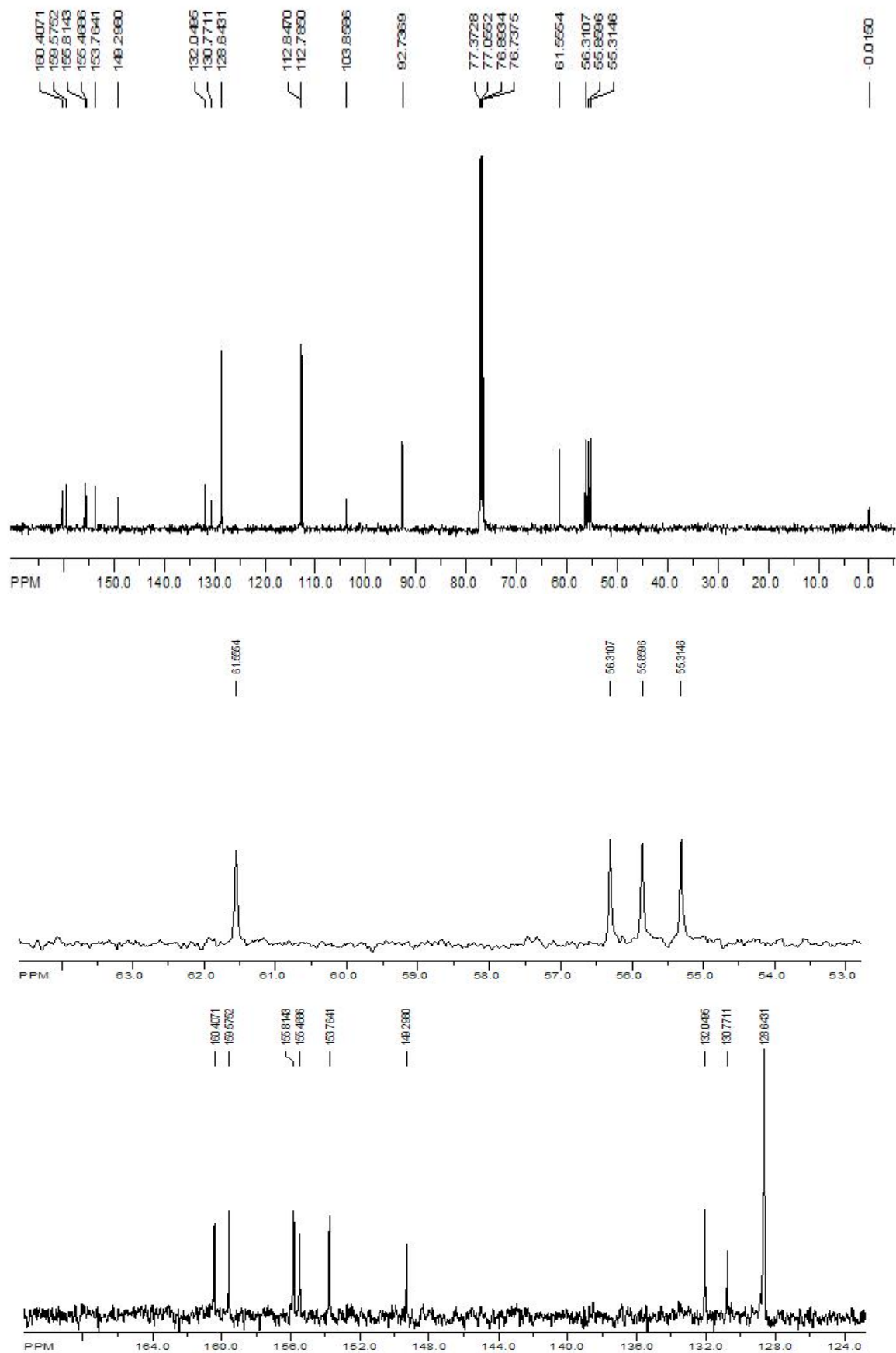


Figura 25. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-2**.

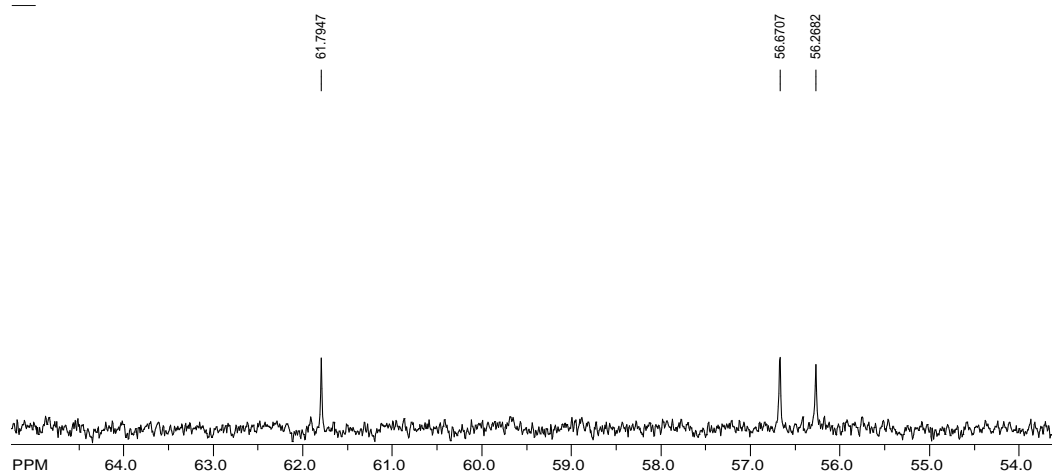
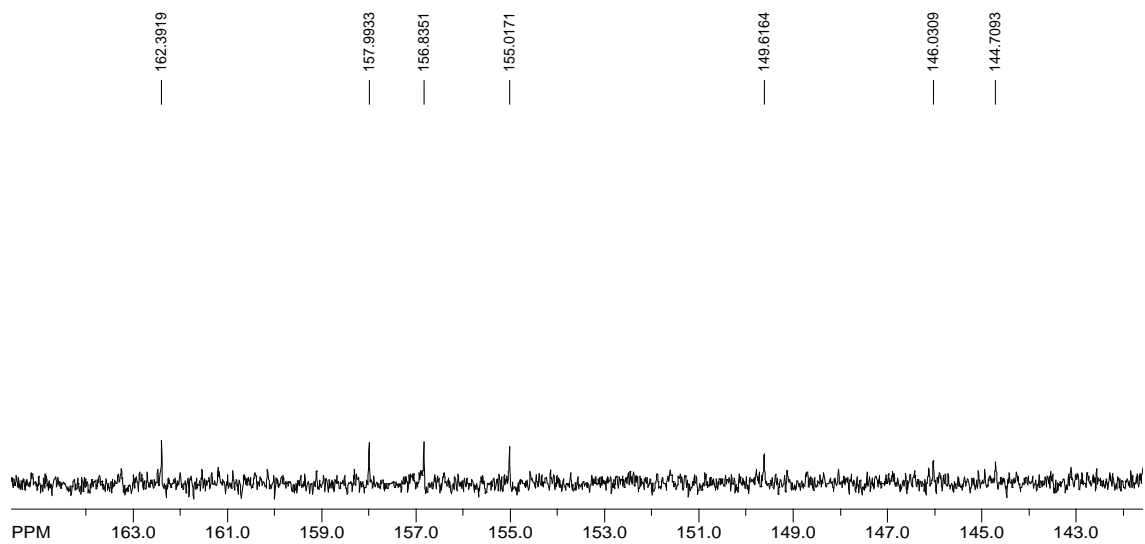
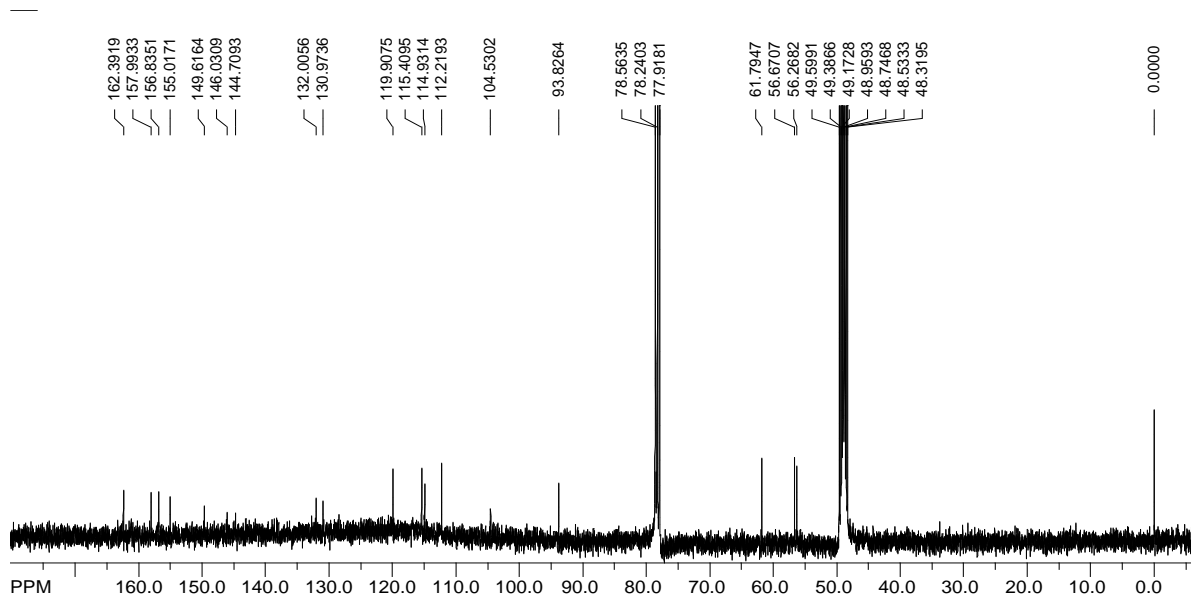


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-8**.

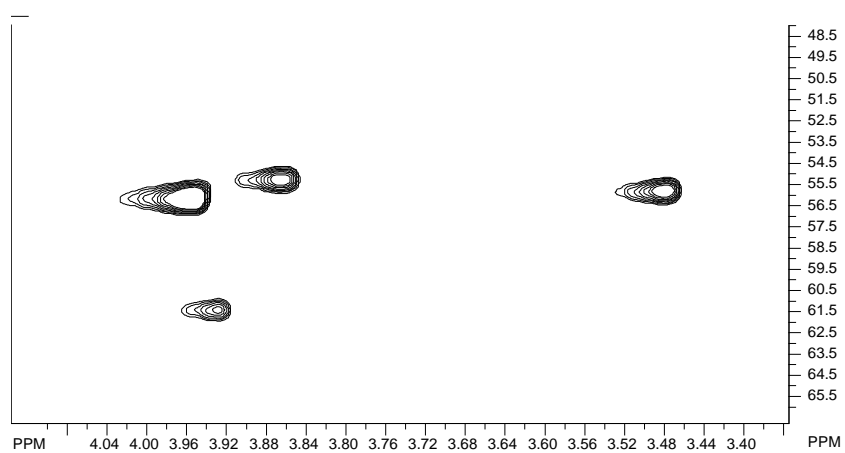
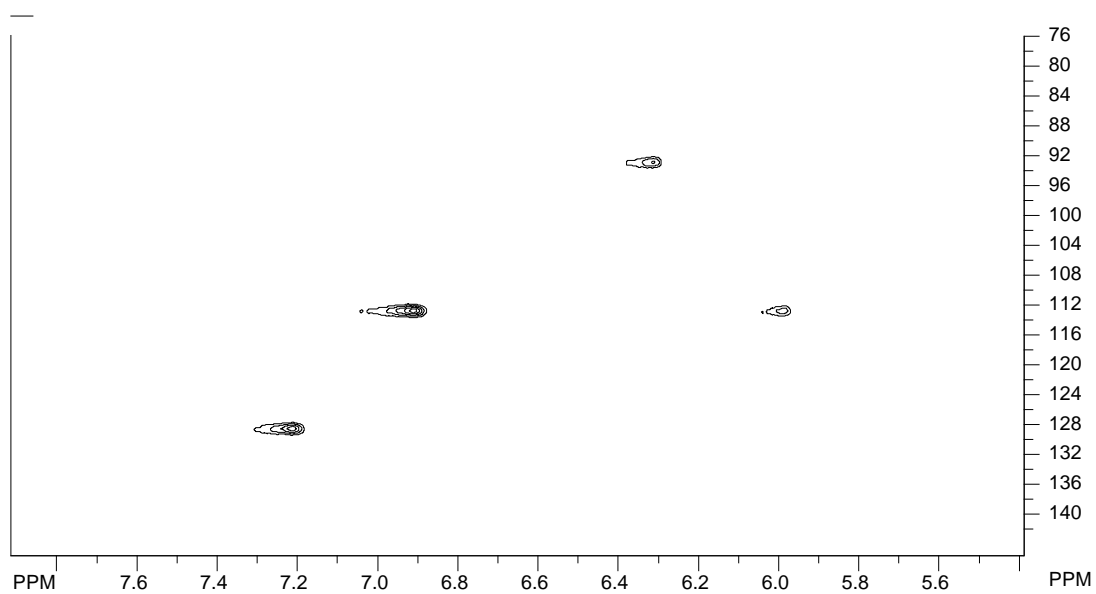
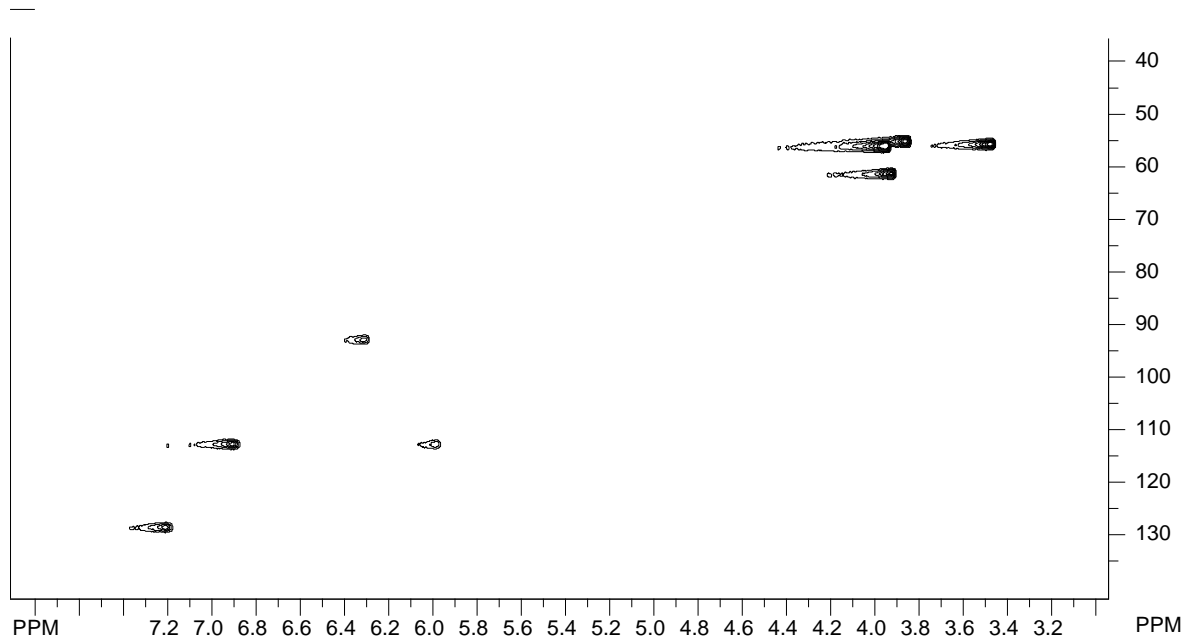


Figura 27. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : (100 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-2**.

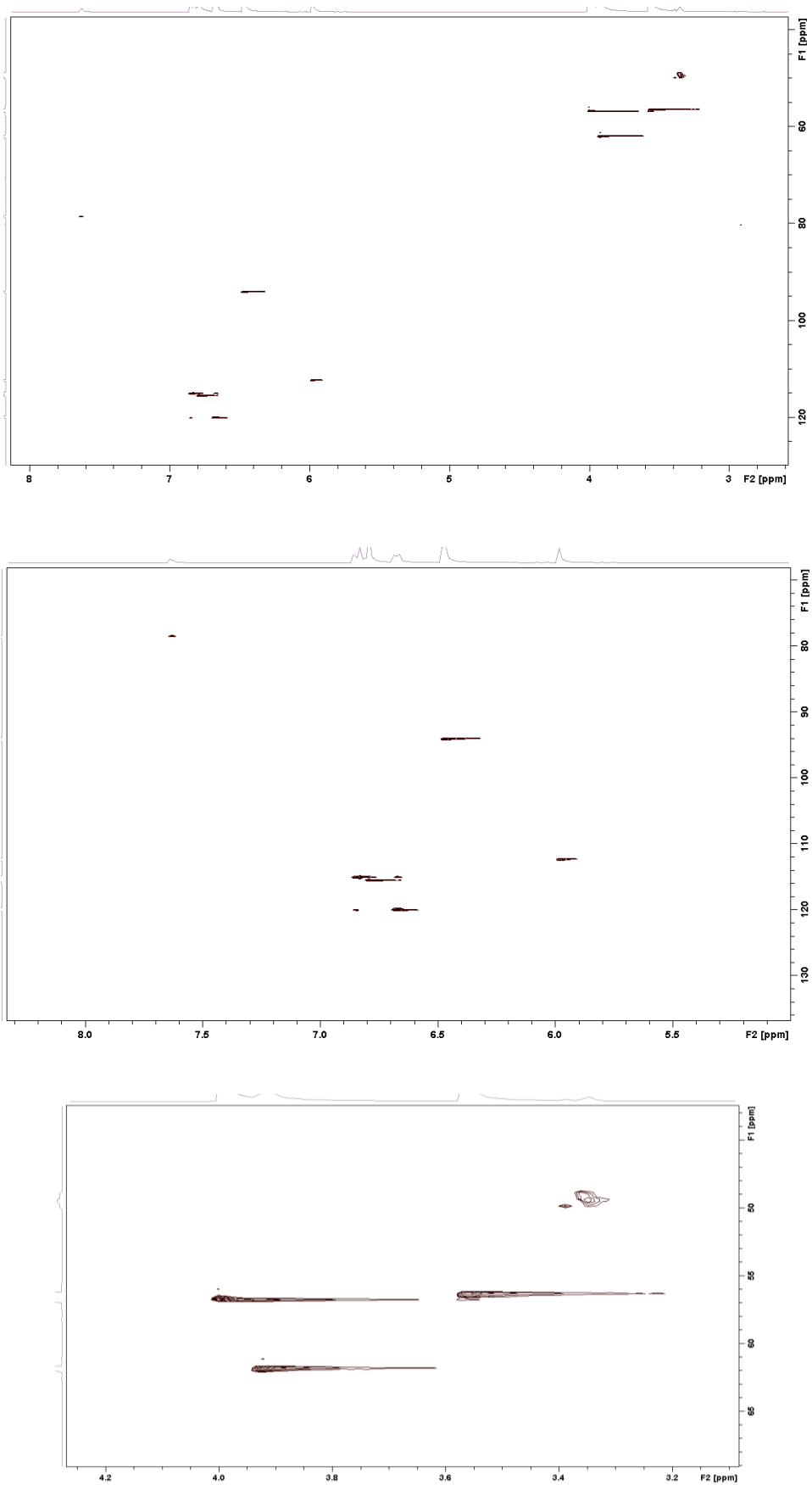


Figura 28. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-8**.

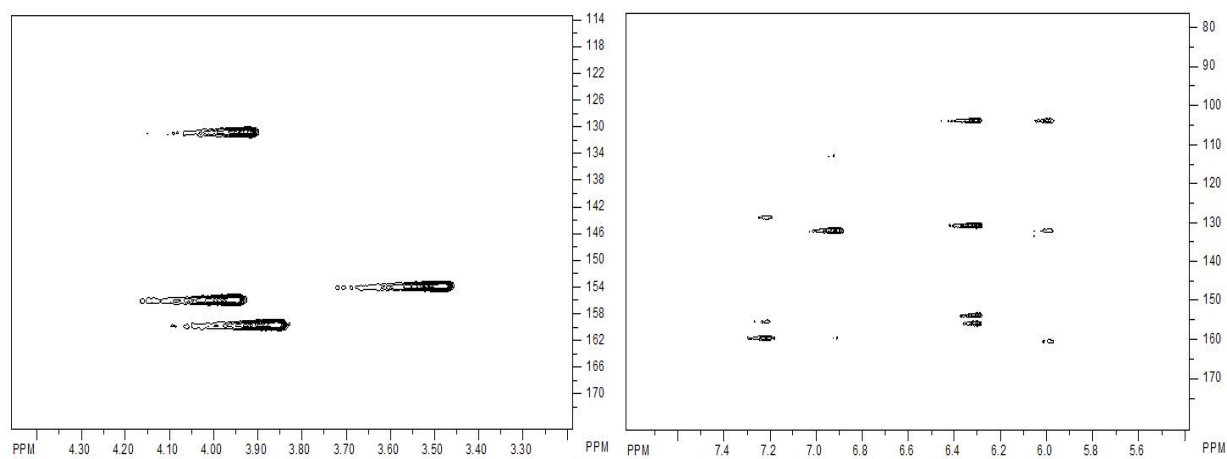
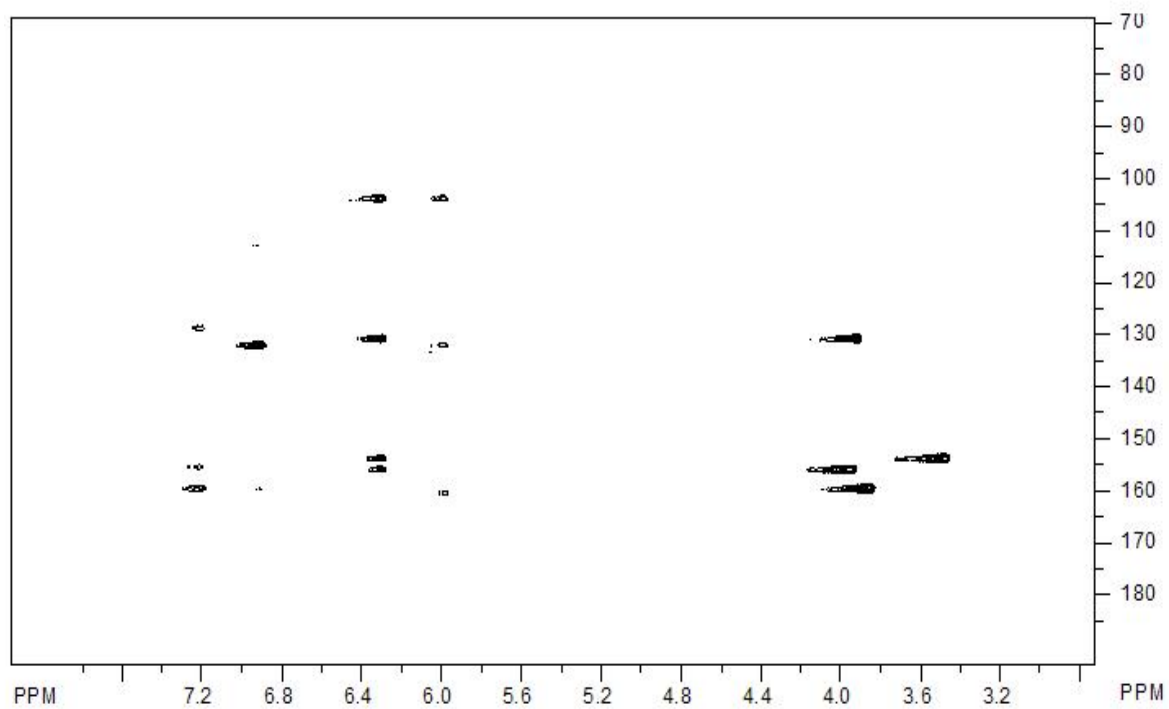


Figura 29. Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, CDCl_3) da substância **ChRD-2**.

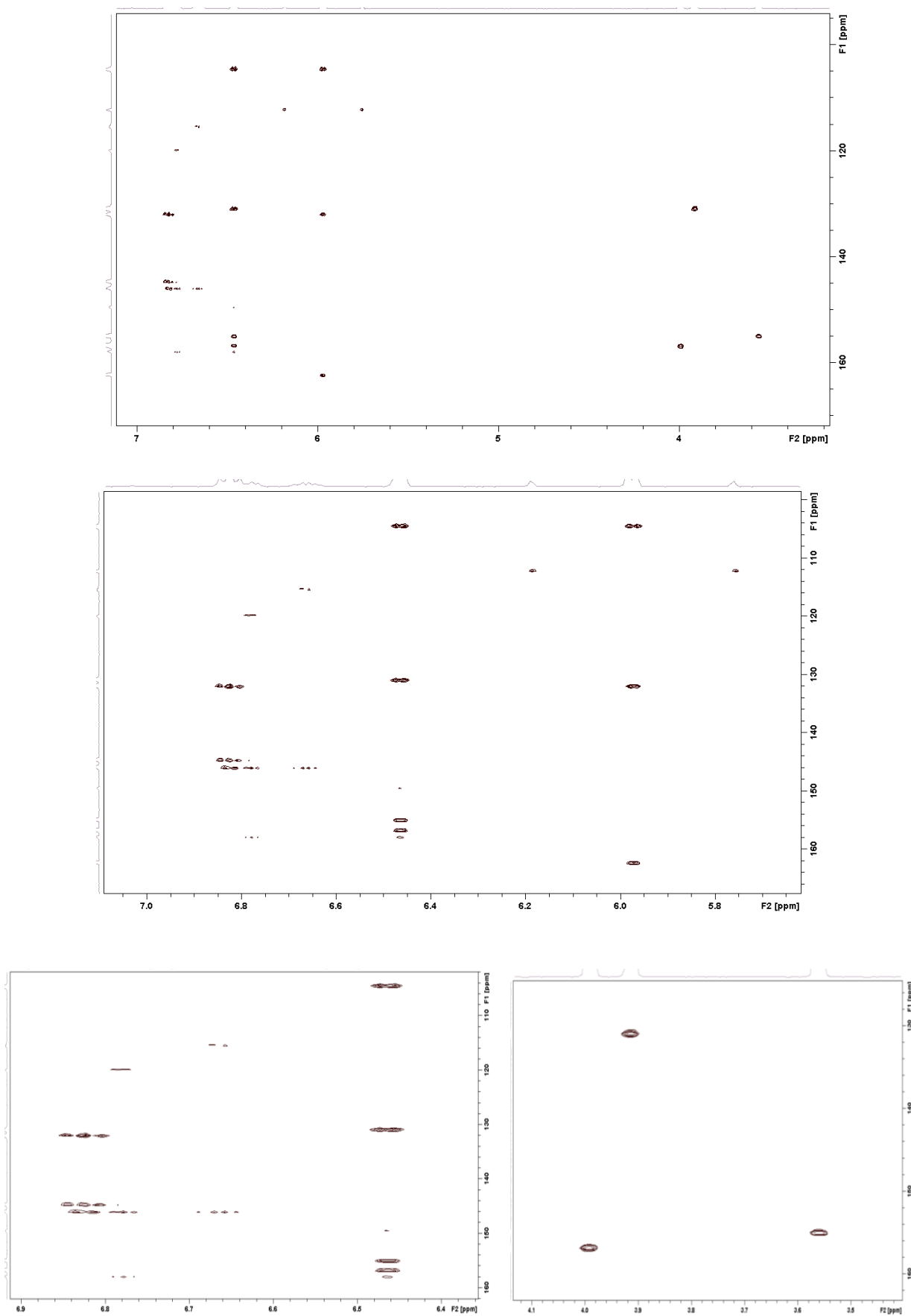
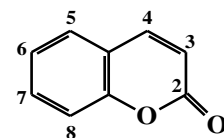


Figura 30. Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-8**.

5.7.1.5. Identificação Estrutural da Substância Codificada de ChRD-3

A substância codificada de **ChRD-3** teve sua estrutura identificada como um derivado 4-fenilcumarínico através da análise dos dados obtidos dos espectros de RMN em uma e duas dimensões, bem como pela comparação com dados da literatura.

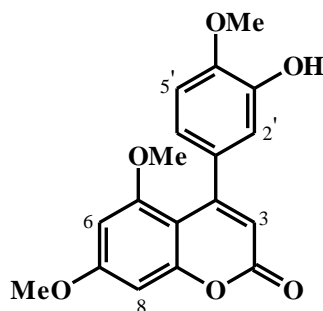
A análise dos dados obtidos do espectro de RMN ^1H (Figura 31, p. 97) revelou a presença de sinais simples e duplos, cujos valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento estão condizentes com a presença de um núcleo cumarínico trissubstituído [δ 5,98 (1H, s, H-3), δ 6,30 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-6) e δ 6,53 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8)], um anel aromático do tipo 1,3,4-trissubstituído [δ 6,83 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ 6,77 (1H, dd, $J = 2,1$ e 8,2 Hz, H-6') e δ 6,88 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-5')] e de três grupos metoxilas [δ 3,52; 3,88 e 3,94 (3H, s, cada)] (Tabela 12, p. 96). A multiplicidade do sinal atribuído ao H-3 [δ 5,98 (1H, s, H-3)], associado à ausência de um duplete em torno de δ 7,5 ($J = 9,5$ Hz) (De Oliveira *et al.*, 2005) referente ao H-4 de um núcleo cumarínico, bem como a proteção observada para um dos grupos metoxilas (δ 3,52), efeito anisotrópico exercido pelo substituinte fenila em C-4, sugeriram para este composto a estrutura de um derivado 4-fenilcumarina, contendo um grupo metoxila em C-5.



A análise conjunta dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 32, p. 98) e HSQC (Figura 33, p. 99) permitiu identificar sinais, cuja natureza e valores de deslocamentos químicos estão compatíveis com a presença de um núcleo cumarínico trissubstituído [δ 162,4 (C, C-2), δ 112,0 (CH, C-3), δ 96,3 (CH, C-6) e δ 93,7 (CH, C-8)], de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído [δ 110,4 (CH, C-2'), 114,9 (CH, C-5') e 119,3 (CH, C-6')] e de três grupos metoxilas (Tabela 12, p. 96). Estas informações, associada à ausência de um sinal para um carbono monoidrogenado referente ao C-4 de um núcleo cumarínico em torno de δ 145,0 (De Oliveira *et al.*, 2005) confirmou a proposição de uma substituição em C-4 do núcleo cumarínico.

As correlações observadas a duas e três ligações no mapa de contorno do espectro HMBC (Figura 34, p. 100), especialmente entre os sinais dos grupos metoxilas com C-5 (δ 158,7), C-7 (δ 163,8) e C-4' (δ 147,8) e das correlações observadas do H-6' (δ 6,77) com C-1' (δ 132,8), C-3' (δ 145,2) e C-4' (δ 147,8), permitiram a identificação de **ChRD-3** como sendo a **5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina**, cuja confirmação foi dada pela comparação dos dados espectrais obtidos com os do mesmo composto descritos na literatura (Ito *et al.*, 2000). Esta substância foi avaliada, na concentração de 0,6 mg/orelha, no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e inibiu somente cerca de 19,0% do edema.

Tabela 12. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) da substância **ChRD-3** e comparação com os da *5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina* (125 MHz, CDCl_3 ; Ito *et al.*, 2000).



ChRD-3

5,7-Dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina

Posição	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	HMBC	δ_{C}
C				
2	162,4			161,0
4	157,2			157,2
4a	103,9			103,6
5	158,7			160,0
7	163,8			163,6
8a	156,8			155,4
1'	132,8			133,1
3'	145,2			144,6
4'	147,8			146,6
CH				
3	112,0	5,98 (1H, s)	C-2, C-4a, C-1'	109,6
6	96,3	6,30 (1H, d, $J = 2,4$)	C-4a	95,9
8	93,7	6,53 (1H, d, $J = 2,4$)		93,6
2'	114,9	6,83 (1H, d, $J = 2,1$)	C-1'	114,2
5'	110,4	6,88 (1H, d, $J = 8,2$)		112,6
6'	119,3	6,77 (1H, dd, $J = 2,1$ e $8,2$)	C-1', C-3', C-4'	119,1
CH₃				
MeO-5	55,73	3,52 (3H, s)	C-5	56,0
MeO-7	55,94	3,94 (3H, s)	C-7	55,7
MeO-4'	56,03	3,88 (3H, s)	C-4'	55,6

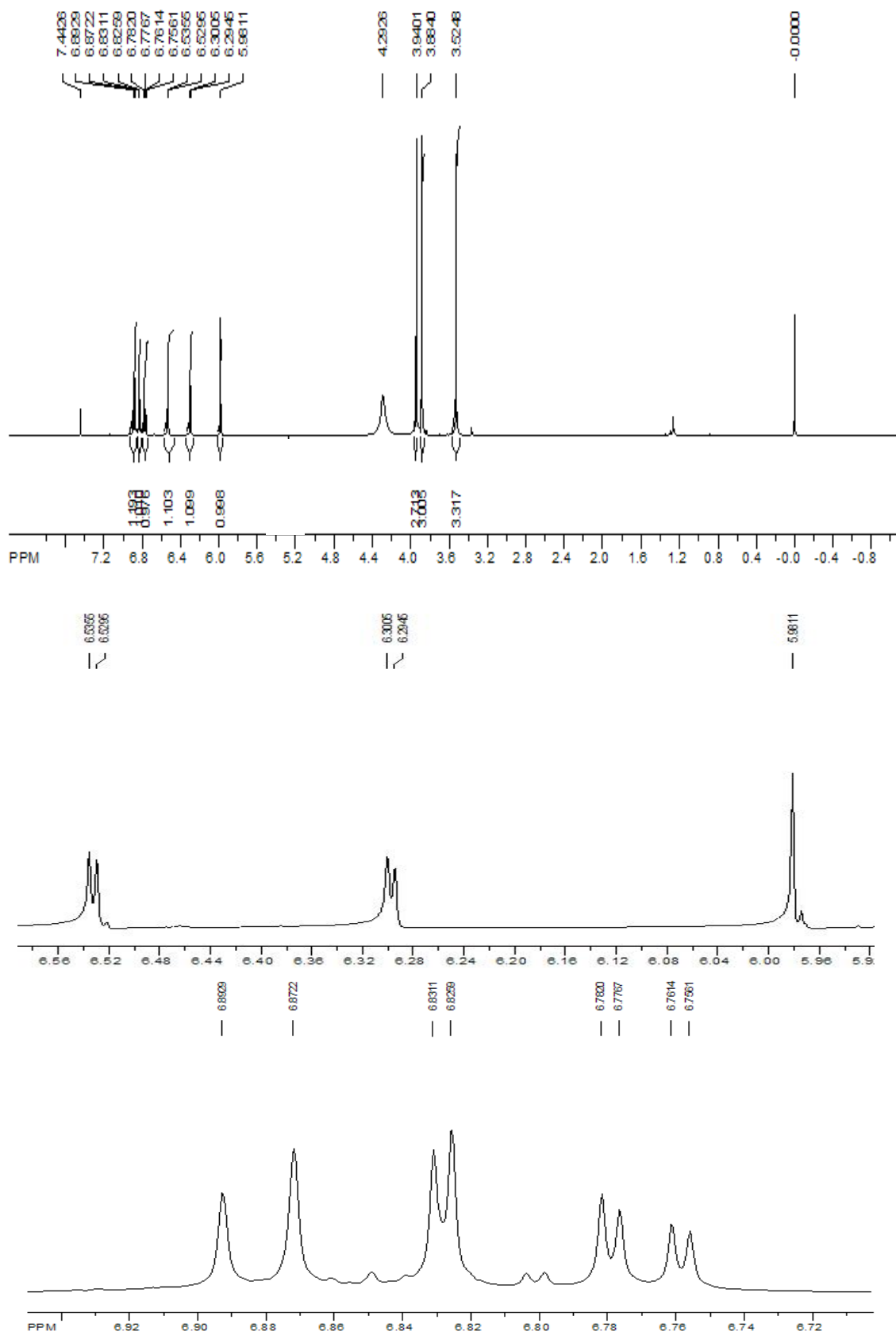


Figura 31. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-3**.

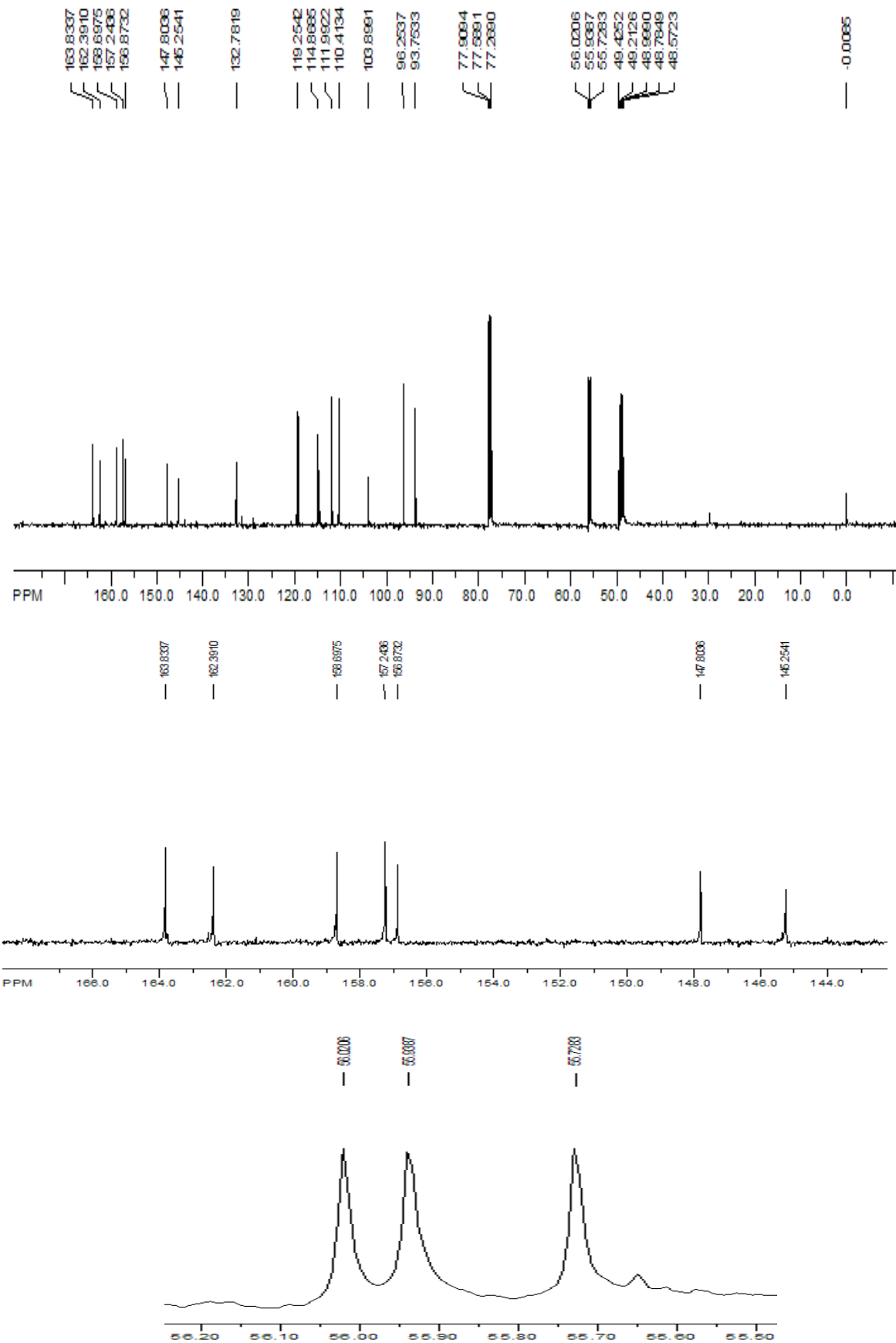


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-3**.

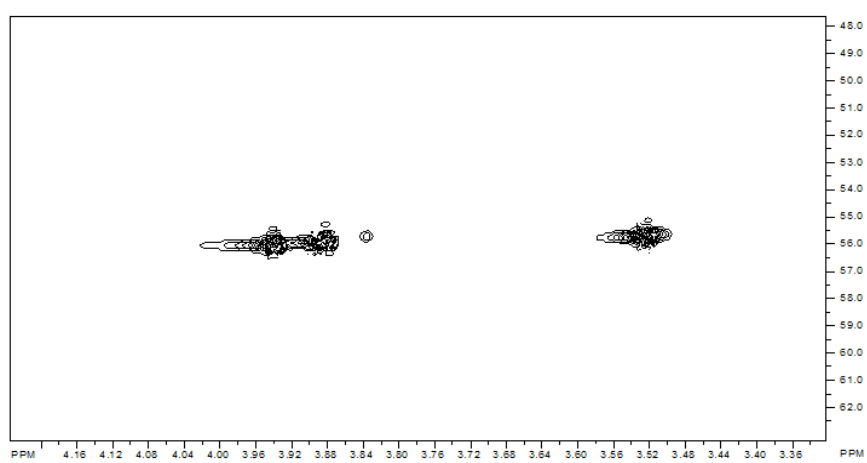
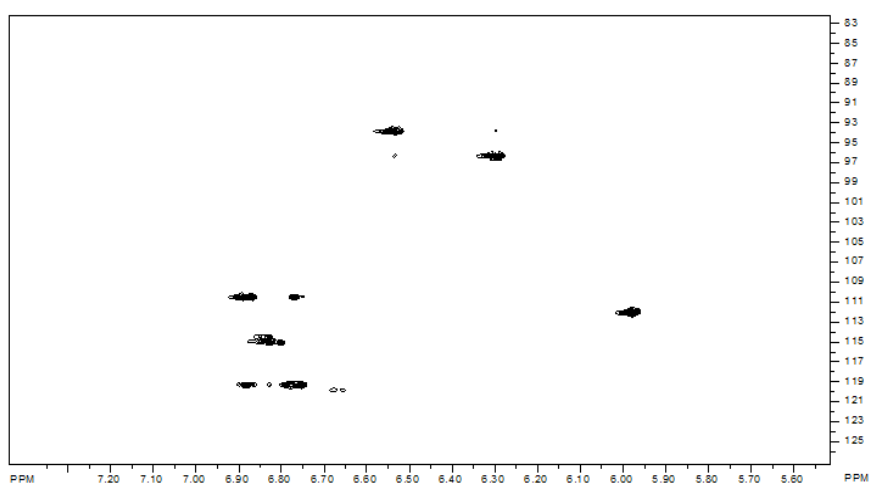
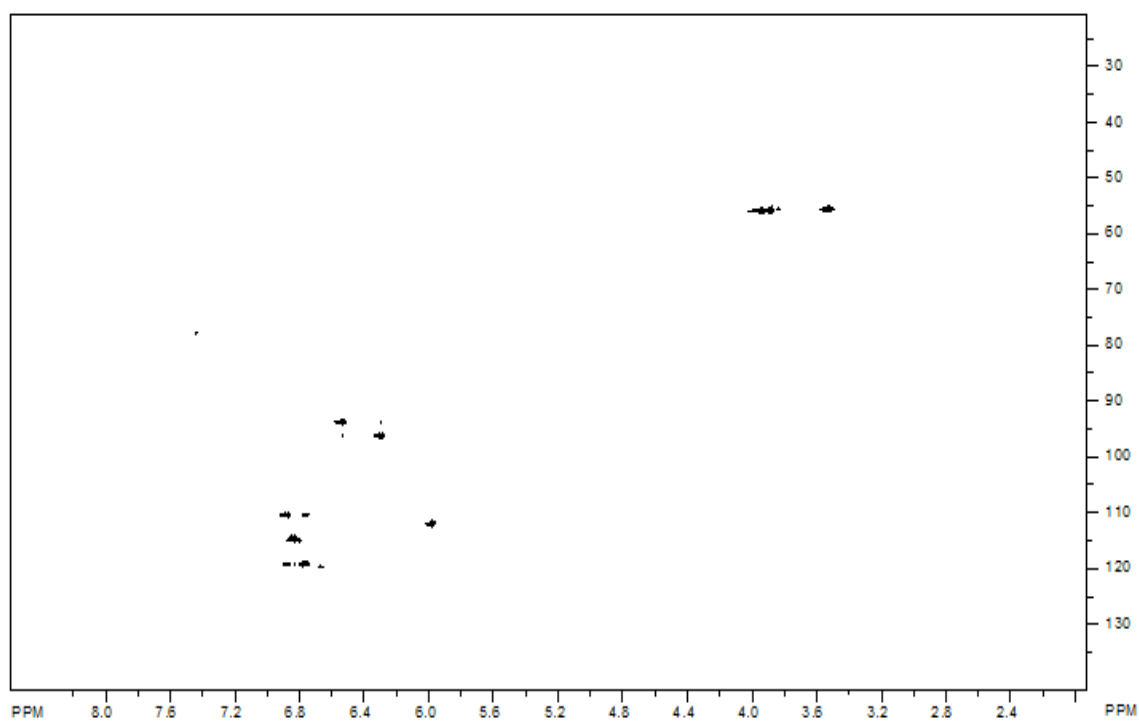


Figura 33. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-3**.

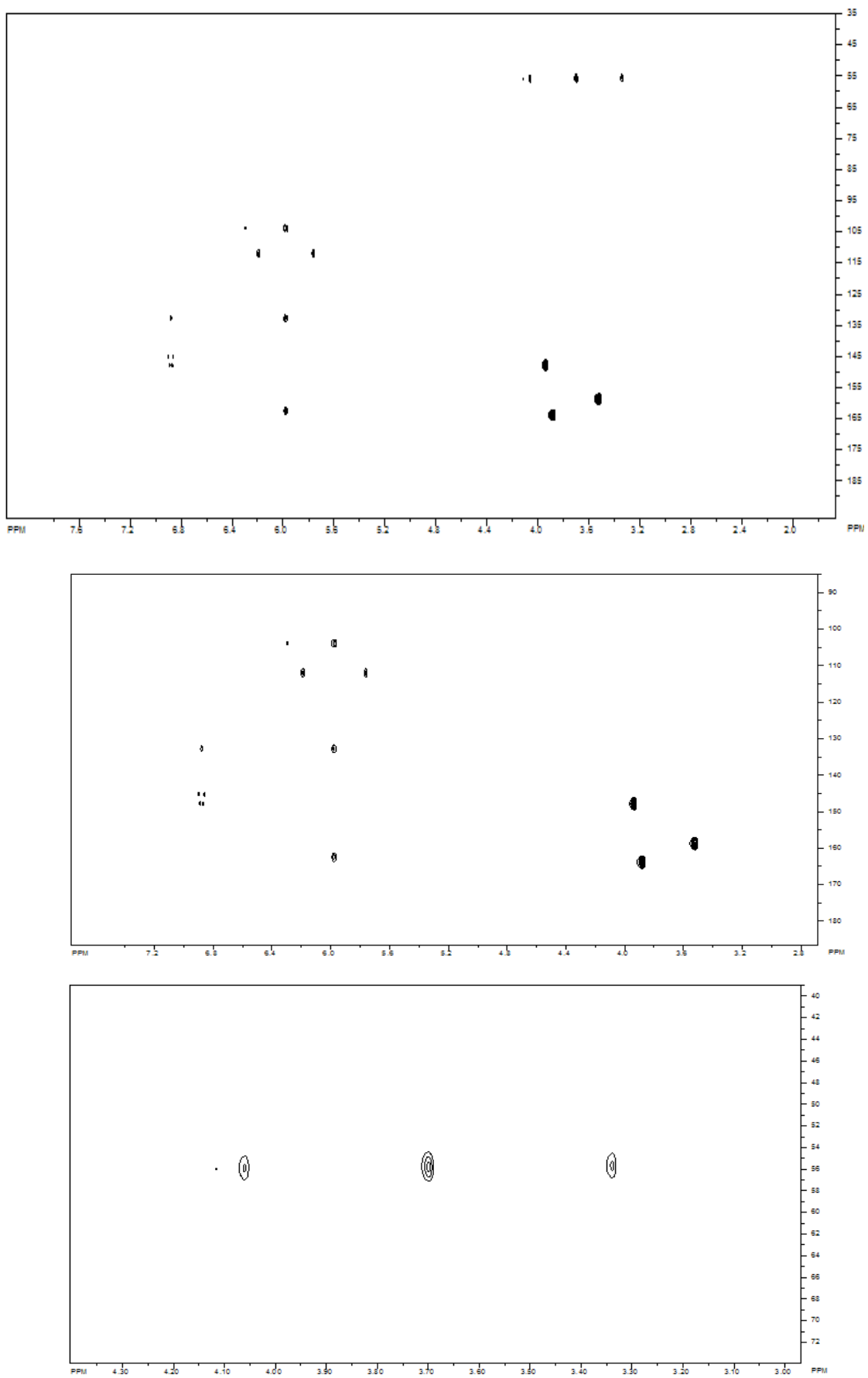


Figura 34. Espectro HMBC (¹H: 400; ¹³C 100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da substância **ChRD-3**.

5.7.1.6. Elucidação Estrutural das Substâncias Codificadas de ChRD-5 e ChRD-7

Os compostos codificados de **ChRD-5** e **ChRD-7** tiveram suas estruturas elucidadas como sendo triterpenos de esqueletos *octanorcucurbitano* e *cucurbitano*, respectivamente, com base na análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN em uma e duas dimensões, bem como pela comparação com dados de modelos da literatura.

A análise dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^1H (Figuras 35-36, pp. 108-109) sugeriu para cada composto a presença de um hidrogênio olefínico [**ChRD-5**: δ_{H} 5,75 (sl); **ChRD-7**: δ_{H} 5,73 (dl, $J = 5,5$ Hz)], dois hidrogênios oximetínicos para **ChRD-5** [δ_{H} 2,91 (d, $J = 9,2$ Hz) e 3,55 (m)] e três para **ChRD-7** [δ_{H} 2,90 (d, $J = 9,3$ Hz), 3,55 e 4,20 (m, cada)] e simpletos para cinco grupos metílicos em **ChRD-5** [δ_{H} 0,95; 1,0; 1,17; 1,18 e 1,19 (s, cada)] e nove para **ChRD-7** [δ_{H} 0,94; 0,95; 1,09; 1,19; 1,28; 1,41; 1,44; 1,46 e 1,97 (s, cada), sendo que um deles pertence possivelmente a um grupo acetoxila δ_{H} 1,97 (s)]. Além de vários dubletos e multipletos para hidrogênios de grupos metínicos e metilênicos de carbonos alifáticos saturados (Tabelas 13-14, pp. 105-106).

A análise conjunta dos dados obtidos dos respectivos espectros de RMN ^{13}C (Figuras 37-38, pp. 110-111), DEPT (**ChRD-7**: Figura 39, p. 112) e HSQC (Figuras 40-41, pp. 113-114) permitiu reconhecer para **ChRD-5** um total de **vinte e dois** átomos de carbonos (07 não hidrogenados, 05 monoidrogenados, 05 diidrogenados e 05 triidrogenados) e de **trinta e dois** para **ChRD-7** (10 não hidrogenados, 07 monoidrogenados, 06 diidrogenados e 09 triidrogenados).

Dentre esses carbonos foi possível identificar, com auxílio do HSQC, em ambos espectros valores de deslocamentos químicos condizentes com a presença de duas carbonilas de cetonas não conjugadas [**ChRD-5**: δ 212,72 e 218,24; **ChRD-7**: δ 213,80 e 214,21], um grupo acil de éster em **ChRD-7** [δ 170,87 (C)], uma ligação dupla trissubstituída [**ChRD-5**: δ 118,73 (CH \rightarrow δ_{H} 5,75) e δ 141,43 (C); **ChRD-7**: δ 118,99 (CH \rightarrow δ_{H} 5,73) e δ 140,79 (C)], dois carbonos oximetínicos para **ChRD-5**: (δ_{C} 70,71 \rightarrow δ_{H} 3,55 e δ_{C} 80,85 \rightarrow δ_{H} 2,91) e três para **ChRD-7** (δ 70,49 \rightarrow δ_{H} 3,55, 70,65 \rightarrow δ_{H} 4,20 e 80,61 \rightarrow δ_{H} 2,90)], um carbono sp^3 não hidrogenado oxigenado em **ChRD-7** (δ 79,02; ausente em **ChRD-5**), dois carbonos sp^3 metínicos em **ChRD-5** (δ 43,52 \rightarrow δ_{H} 2,19 e 34,26 \rightarrow δ_{H} 2,42) e três em **ChRD-7** (δ 57,72 \rightarrow δ_{H} 2,52; 42,57 \rightarrow δ_{H} 1,92 e 33,76 \rightarrow δ_{H} 2,36), cinco grupos metílicos em **ChRD-5** (δ_{H} 0,95; 1,0; 1,18; 1,17 e 1,19 \rightarrow δ_{C} 21,67; 24,39; 19,54; 20,22 e 24,80, respectivamente) e nove em **ChRD-7**, além de cinco e seis carbonos metilênicos, respectivamente, para **ChRD-5** para

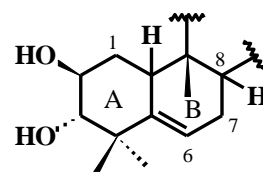
ChRD-7 (Tabelas 13-14, pp. 105-106). Esta análise permitiu reconhecer que **ChRD-5** possui dez átomos de carbono a menos do que **ChRD-7**, uma vez que dois nesta última pertencem a um grupo acetoxila [δ_{H} 1,97 \rightarrow δ_{C} 22,32 (CH₃); δ 170,87 (C)], ausente em **ChRD-5**].

A análise dos dados de RMN ¹³C obtidos e a comparação com os de outros triterpenos de esqueletos cucurbitano (Reguero *et al.*, 1987; Monte *et al.*, 2000; Maloney *et al.*, 2008) e norcucurbitano (Kanchanapoom *et al.*, 2002), sugeriu para **ChRD-7** e para **ChRD-5**, respectivamente, estruturas com os mesmos esqueletos.

No caso da substância **ChRD-7**, a comparação dos dados de RMN com os da **25-acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F** (Reguero *et al.*, 1987) permitiu sua identificação com este composto. O valor da constante de acoplamento (9,2 Hz) do sinal atribuído ao H-3 sugeriu uma relação de acoplamento *trans*-diaxial entre este hidrogênio e H-2, sugerindo, portanto, configurações relativas para os grupos hidroxilas em C-2 e C-3 de *2 β ,3 α -equatorial*, respectivamente (Reguero *et al.*, 1987).

No caso da substância **ChRD-5**, as correlações observadas a duas e três ligações no mapa de contorno do espectro HMBC (Figura 42, p. 115; Tabela 13, p. 105) foi fundamental para definir as posições dos grupos hidroxilas, ligação dupla, carbonilas e metilas presentes. Dentre as mais informativas estão a do sinal do grupo metila que absorve em δ **0,95** (Me-28 \rightarrow δ_{C} 21,67) com os carbonos que absorvem em δ 80,85 (C-3 \rightarrow δ_{H} 2,91), 42,42 (C-4), 141,43 (C-5) e 24,80 (Me-29 \rightarrow δ_{H} 1,19); do sinal do hidrogênio que absorve em δ 2,91 (**H-3**) com C-1 [δ 33,54 \rightarrow δ_{H} 1,88 (H-1a) e δ 1,08 (H-1b)], C-2 (δ 70,71 \rightarrow δ 3,55), C-4 e com dois dos grupos metilas (δ 21,67 e δ 24,80) e do sinal em δ 3,55 (**H-2**) com C-3. Por outro lado, as correlações de H-7a e H-7b (δ 1,92 e δ 1,04 \rightarrow δ_{C} 24,39) com C-5, C-6 (δ 118,99 \rightarrow δ_{H} 5,75) e C-8 (δ 43,52 \rightarrow δ_{H} 2,19), bem como de **H-1a** (δ 1,88) e **H-1b** (δ 1,08) com C-2, C-3 e um carbono não hidrogenado (δ 50,35), além de definir a posição da ligação dupla entre C-5 e C-6 e de um grupo metila em C-9, permitiram também inferir grupos hidroxilas em C-2 e em C-3 e, portanto, definir para **ChRD-5** uma estrutura parcial para os anéis A e B, idênticos ao da molécula de **ChRD-7** e da **25-acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F**.

O valor da constante de acoplamento (9,3 Hz) do sinal de H-3, de modo análogo ao composto **ChRD-7**, sugeriu também uma relação de acoplamento *trans*-diaxial entre este hidrogênio e H-2 e para os grupos hidroxilas configurações relativas de *2 β ,3 α -diequatoriais*.



Anéis A e B de **ChRD-5**

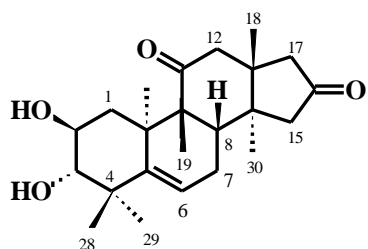
Corroborando com a proposição acima, foram observadas também correlações do sinal do grupo Me-29 (δ 1,19) com a Me-28 (δ 21,67), C-3, C-4, C-5 e C-6 (δ 118,73 \rightarrow δ 5,75) e deste, com C-4, C-7 (δ 24,39), C-8 (δ 43,52) e C-10 (δ 34,26).

Adicionalmente, foram observadas correlações entre o sinal de **H-8** (δ 2,19) com C-6, C-7, C-10, dois dos grupos metilas (δ 19,54 \rightarrow δ 1,18 e δ 20,22 \rightarrow δ 1,17), que por sua vez estão correlacionados com C-8, C-10, um carbono não hidrogenado (δ 44,41) e um diidrogenado [δ 45,33 \rightarrow δ 3,19 e δ 2,33, cujo valor de constante de acoplamento (14,6 Hz) sugeriu uma relação de acoplamento geminal entre eles]. Estes hidrogênios (δ 3,19 e δ 2,33), por outro lado, correlacionam com δ 44,71 (C), 45,33 (ele mesmo) e com um dos grupos metila (δ 1,0 \rightarrow δ 24,39). O sinal deste grupo metila, por sua vez, correlaciona com δ 44,71 (C), δ 45,33 (CH₂) e δ 46,02 (C) e os sinais correspondentes aos hidrogênios que absorvem em δ 2,55 e δ 1,97 (\rightarrow δ 49,50 CH₂), cujo valor de constante de acoplamento (17,9 Hz cada) sugere entre eles uma relação de acoplamento geminal, correlacionam com δ 46,02 (C-13), δ 44,71 (C-14), δ 45,33 (C-15), δ 24,39 (Me-30) e δ 19,54 (Me-19). Estas correlações, além de definir os anéis D e E da molécula, permitiram também propor para **ChRD-5** a estrutura de um novo triterpeno de esqueleto *octanorcucurbitano*. Esta proposta estrutural foi reforçada pela comparação dos dados espectrais obtidos com os do *Khekadaengosídeo L* (Kanchanapoom *et al.*, 2002), de **ChRD-7** e da *25-Acetoxi-23,24-diidro-cucurbitacina F* (Reguero *et al.*, 1987) (Tabela 15, p. 109). Com o objetivo de facilitar a comparação entre os compostos, a numeração adotada foi à mesma dada para a *25-Acetoxi-23,24-diidro-cucurbitacina F*.

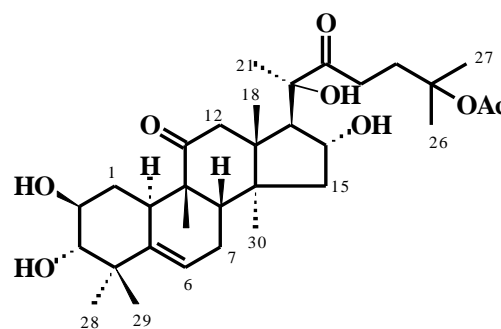
As cucurbitacinas são triterpenos tetracíclicos com esqueleto cucurbitano, isolados primeiramente na família Cucurbitaceae. Estes triterpenos, presentes em plantas na forma livre ou glicosilada, são geralmente tóxicos e responsáveis pelo sabor amargo das plantas que as contêm, sendo provavelmente os responsáveis pelos efeitos anti-alimentar observados nessas plantas (Kanchanapoom *et al.*, 2002).

Várias espécies vegetais usadas na medicina tradicional para tratar diversos tipos de tumores e doenças inflamatórias são ricas em cucurbitacinas, um fato que tem sido alvo de vários estudos referentes ao uso destes compostos como agentes antiinflamatórios e anticancerígenos. No entanto, como muitas das cucurbitacinas são extremamente tóxicas, poucos trabalhos enfatizam suas atividades farmacológicas (Rios *et al.*, 2005). Mesmo assim, a literatura relata que estes compostos são citotóxicos, antitumorais, antiinflamatórios, antifertilizantes, fago-repelentes, hepatoprotetores, curativas e antimicrobianas (Valente, 2004). No presente trabalho, a substância **ChRD-7** (*25-Acetoxi-23,24-diidro-cucurbitacina F*), na

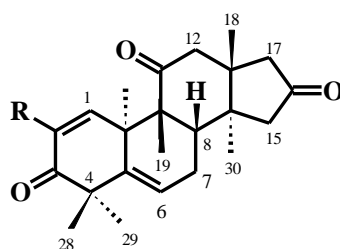
concentração de 0,6 mg/orelha, inibiu somente cerca de 30,0% do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu topicamente o veículo acetona.



ChRD-5



ChRD-7



Khekadaengosídeo L R = $-\beta^2\text{-OGlc-}\alpha\text{-Rha}$

Tabela 13. Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ) do composto **ChRD-5** e comparação com dados do *Khekadaengosídeo L* (^1H : 400; ^{13}C : 100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Kanchanapoom *et al.*, 2002).

ChRD-5				<i>Khekadaengosídeo L</i>	
<i>Posição</i>	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	HMBC	δ_{C}	δ_{H}
C					
4	42,42			49,5	
5	141,43			137,0	
9	50,35			50,5	
11	212,72			211,8	
13	46,02			45,3	
14	44,71			44,4	
16	218,24			215,5	
CH					
2	70,71	3,55 m	C-3	146,9	
3	80,85	2,91 (d, $J = 9,3$)	C-1, C-2, C-4, Me-28, Me-29	196,2	
6	118,73	5,75 sl	C-4, C-7, C-8, C-10	120,3	5,61 sl
8	43,52	2,19 (d, $J = 7,8$)	C-6, C-7, C-9, C-10, C- 14, C-15, Me-19	42,0	2,05 m
10	34,26	2,42 (d, $J = 12,9$)		35,5	3,70 sl
CH₂					
1	33,54	1,88 e 1,08 m	C-2, C-3, C-6, C-9	119,1	6,30 sl
7	24,39	1,92 e 1,04 m		24,1	2,12 e 1,84 m
12	50,43	2,26 e 2,06 (d, $J = 17,9$ cada)	Me-18	49,4	3,40 e 2,48 (d, $J = 14,6$ cada)
15	45,33	3,19 e 2,33 (d, $J = 14,6$ cada)	C-13, C-14, C-15, C-17	46,5	2,55 e 1,92 (d, $J = 17,8$ cada)
17	49,50	2,55 e 1,97 (d, $J = 17,9$ cada)	C-14, C-15, Me-18	50,3	2,24 e 2,10 (d, $J = 17,7$ cada)
CH₃					
18	20,22	1,17s	C-10, C-8, C-14	20,8	0,98 s
19	19,54	1,18 s	C-10, C-8, C-14	18,3	1,18 s
28	21,67	0,95 s	C-3, C-4, C-5, Me-29	20,8	1,30 s
29	24,80	1,19 s	C-3, C-4, C-5, C-6, Me-28	27,4	1,38 s
30	24,39	1,0 s	C-13, C-14, C-15	19,9	0,88 s

Tabela 14. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) do composto **ChRD-7** e comparação com dados da **25-Acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F** (Reguero *et al.*, 1987).

Posição	ChRD-7		25-Acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	δ_{C}	δ_{H}
C				
4	41,90		41,69	
5	140,79		140,80	
9	48,39		48,29	
11	213,80		213,0	
13	48,18		47,87	
14	50,57		50,36	
20	80,61		80,43	
22	214,21		214,10	
25	81,54		81,60	
CH				
2	70,65	3,55 m	70,12	4,12 m
3	79,02	2,90 (d, $J = 9,2$)	79,03	3,50 m
6	118,99	5,73 (dl $J = 5,5$)	118,70	5,63 (dl, $J = 5,5$)
8	42,57	1,92 m	42,58	
10	33,76	2,36 m	33,65	
16	70,49	4,20 m	70,33	4,22 (dd, $J = 7,0$)
17	57,72	2,79 (d, $J = 7,0$)	57,60	2,79 (d, $J = 7,0$)
CH₂				
1	33,04	1,83 e 1,05 m	32,86	
7	23,65	1,92 e 1,04 m	23,40	
12	48,67	3,10 (d, $J = 15,0$)	48,45	3,10 (d, $J = 15,0$)
15	45,36	1,85 e 1,15 m	45,15	
23	30,74	2,56 e 2,85 t	30,74	
24	34,52	2,05 t	34,55	
CH₃				
18	19,71	0,95 s	19,28	0,85 s
19	18,82	1,28 s	18,53	1,34 s
21	24,56	1,41 s	24,19	1,24 s
26	25,78	1,46 s	25,36	1,40 s
27	26,05	1,44 s	25,57	1,40 s
28	21,50	0,95 s	21,13	1,12 s
29	24,41	1,19 s		1,01 s
30	20,07	1,09 s	19,65	0,90 s
AcO	170,87		170,71	
	22,32	1,97 s	21,71	1,90 s

Tabela 15. Dados de RMN da substância **ChRD-5** e comparação com dados de **ChRD-7** (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ) e de **25-Acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F** (Reguero *et al.*, 1987).

Posição	ChRD-5		ChRD-7		25-Acetoxi-23,24-diidrocurbitacina F	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	33,54	1,88 e 1,08 m	33,04		32,86	
2	70,71	3,55 m	70,65	4,12 m	70,12	4,12 m
3	80,85	2,91 (d, $J = 9,3$)	80,61	3,50 m	79,03	3,50 m
4	42,42	-	41,90		41,69	
5	141,43	-	140,79		140,80	
6	118,73	5,75 sl	118,99	5,63 (dl, $J = 5,5$)	118,70	5,63 (dl, $J = 5,5$)
7	24,39	1,92 e 1,04 m	23,65		23,40	
8	43,52	2,19 (d, $J = 7,8$)	42,57		42,58	
9	44,71	-	48,39		48,29	
10	34,26	2,42 (d, $J = 12,9$)	33,76		33,65	
11	212,72		213,80		213,0	
12	50,43	2,26 e 2,06 (d, $J = 17,9$)	48,67	3,10 (d, $J = 15,0$)	48,45	3,10 (d, $J = 15,0$)
13	46,02		48,18		47,87	
14	44,71		50,57		50,36	
15	45,33	3,19 e 2,33 (d, $J = 14,6$)	45,36		45,15	
16	218,24		70,49	4,22 (dd, $J = 7,0$)	70,33	4,22 (dd, $J = 7,0$)
17	49,50	2,55 e 1,97 (d, $J = 17,9$)	57,72	2,79 (d, $J = 7,0$)	57,60	2,79 (d, $J = 7,0$)
18	20,22	1,18s	19,71	0,85 s	19,28	0,85 s
19	19,54	1,17 s	18,82	1,34 s	18,53	1,34 s
20	-	-	79,02	-	80,43	-
21	-	-	24,56	1,24 s	24,19	1,24 s
22	-	-	214,21		214,16	
23	-	-	30,74		30,74	
24	-	-	34,52		34,55	
25	-	-	81,54		81,60	
26	-	-	25,78	1,40 s	25,36	1,40 s
27	-	-	26,05	1,40 s	25,57	1,40 s
28	21,67	0,95 s	21,50	1,12 s	21,13	1,12 s
29	24,80	1,19 s	24,41	1,01 s		1,01 s
30	24,39	1,0 s	20,07	0,90 s	19,65	0,90 s

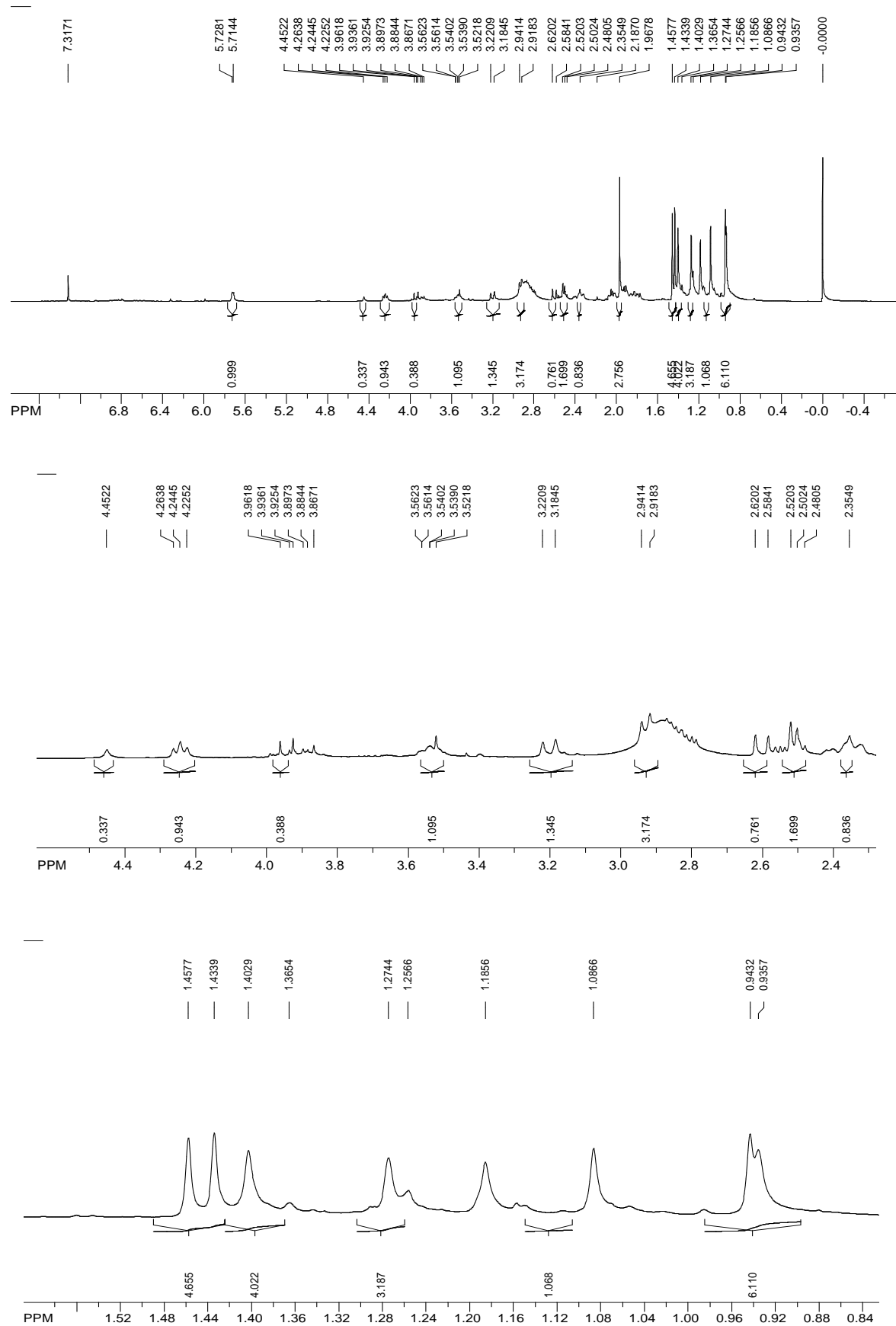


Figura 36. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-7**.

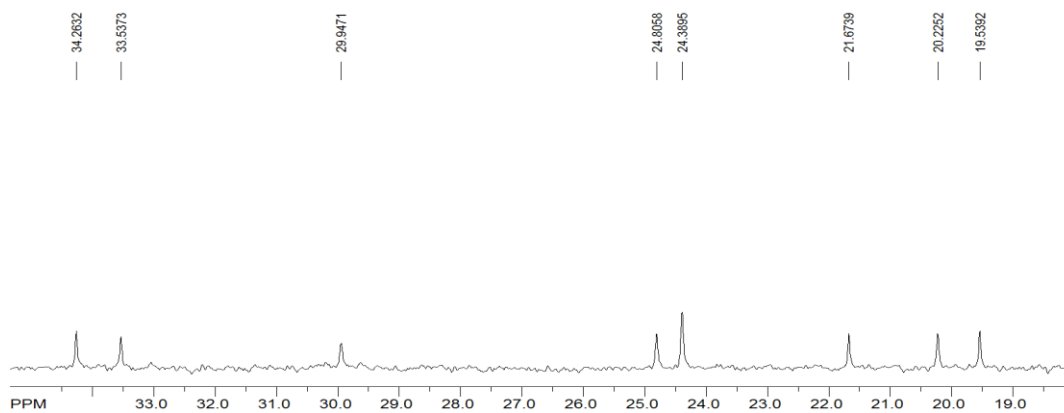
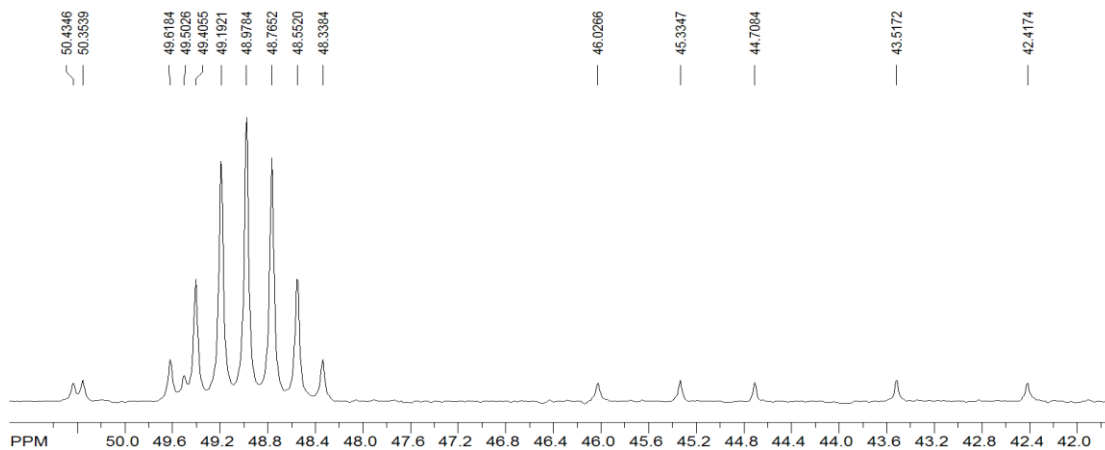
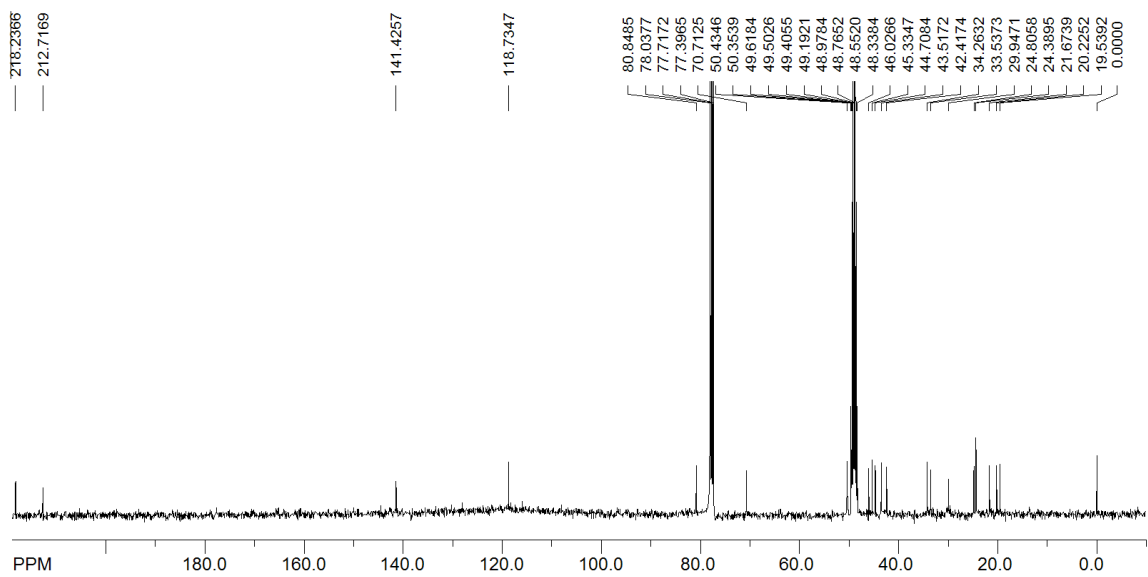


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-5**.

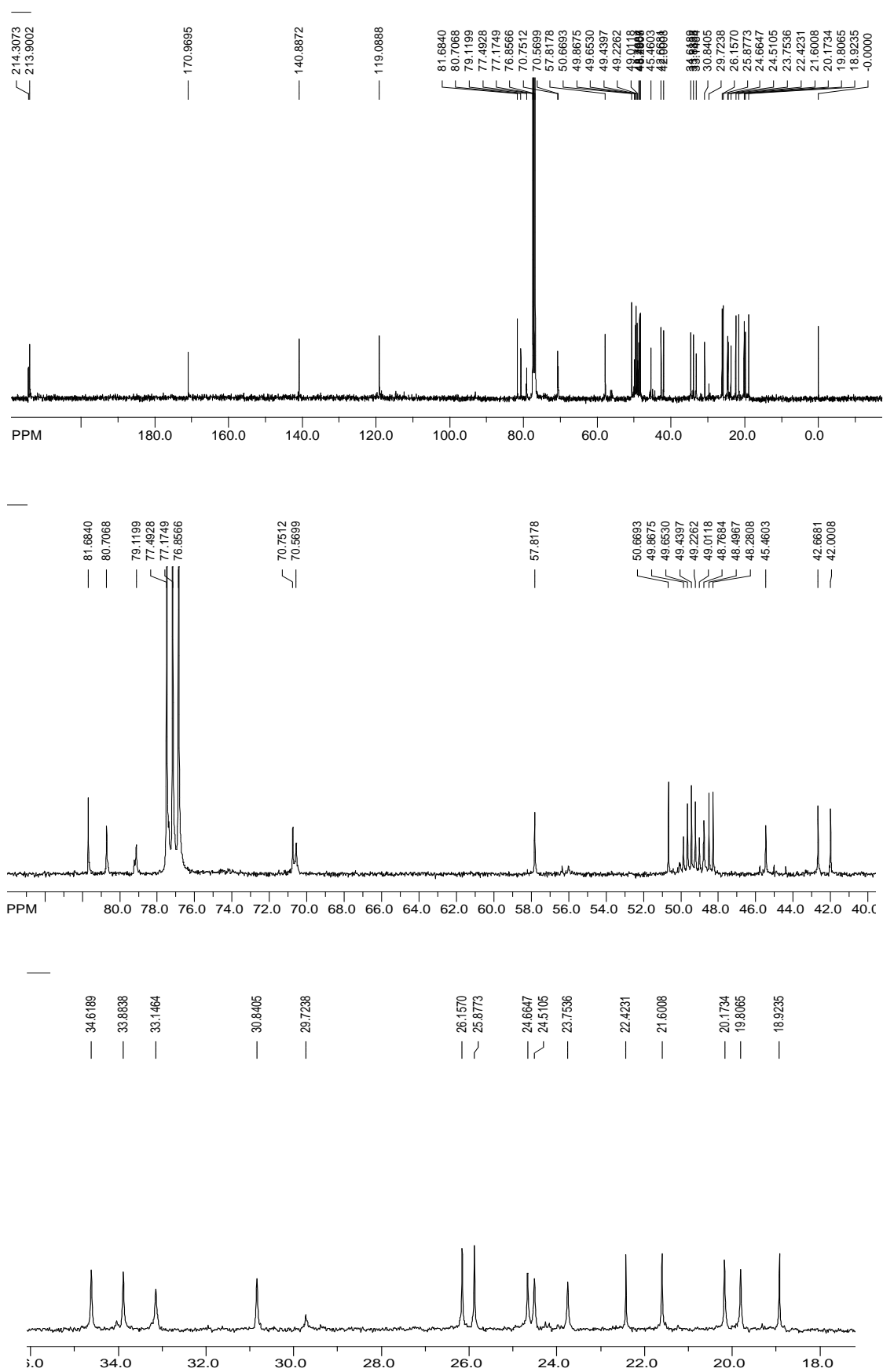


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-7**.

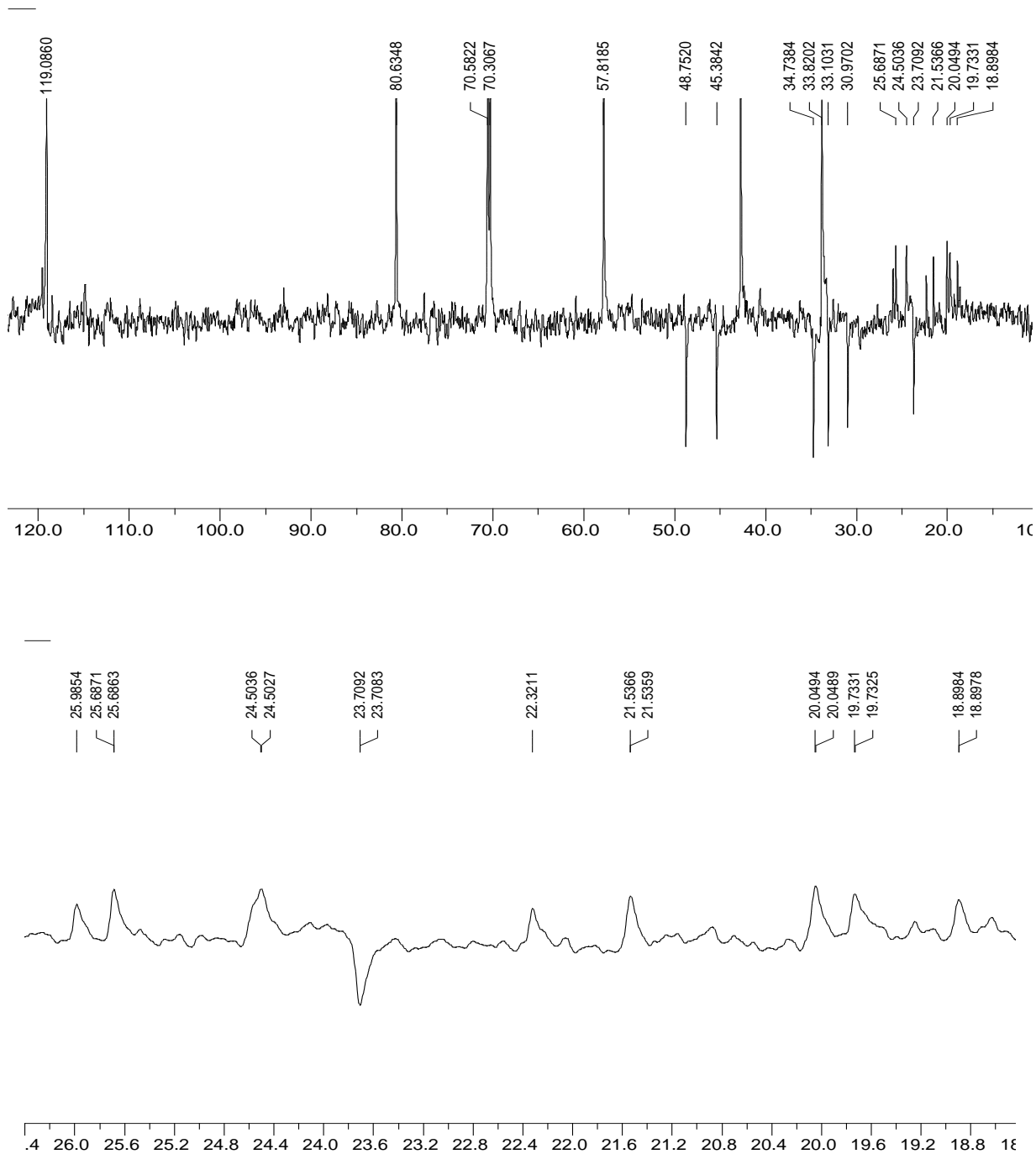


Figura 39. Espectro DEPT (100 MHz, CDCl₃/CD₃OD) da substância **ChRD-7**.

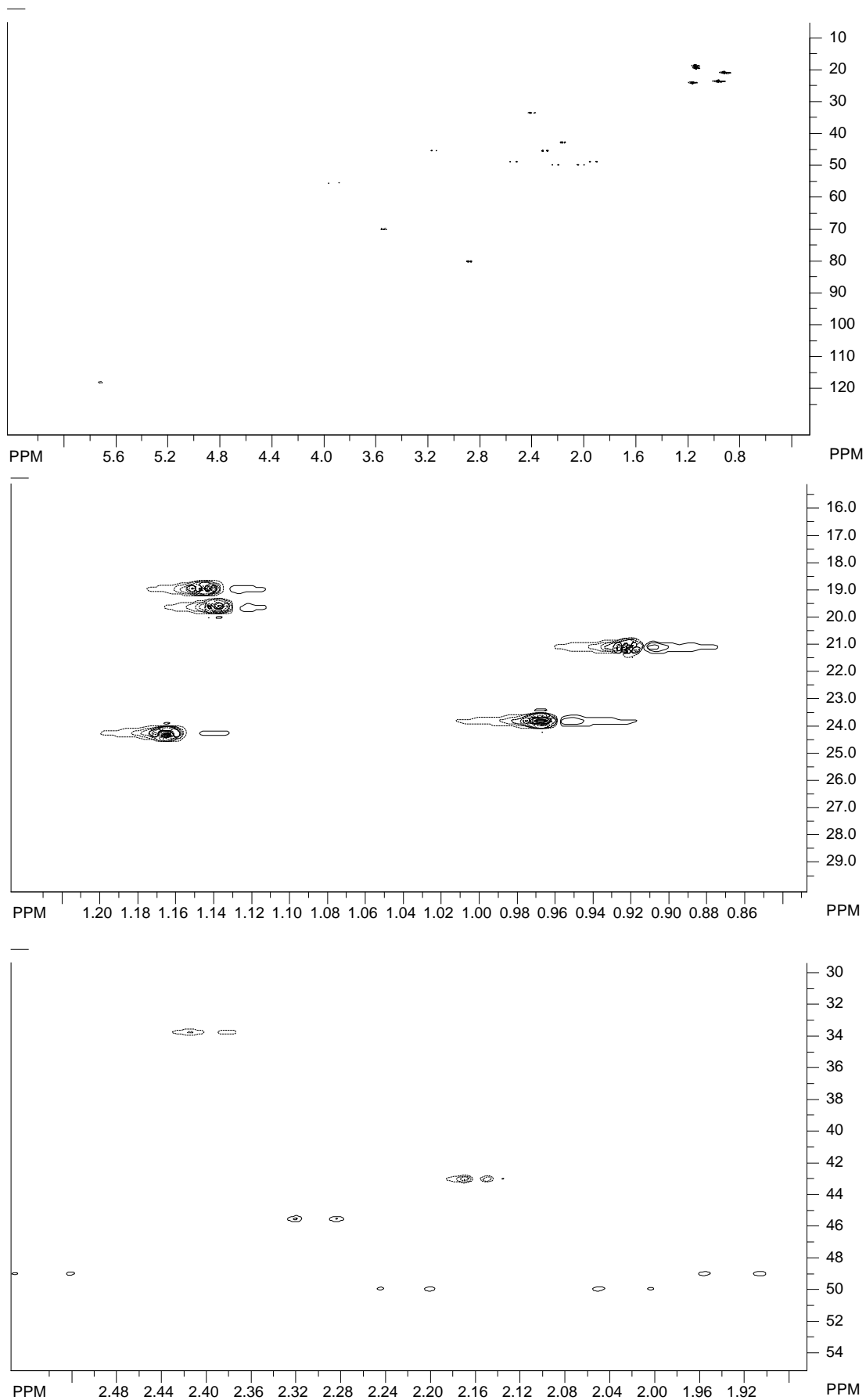


Figura 40. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-5**.

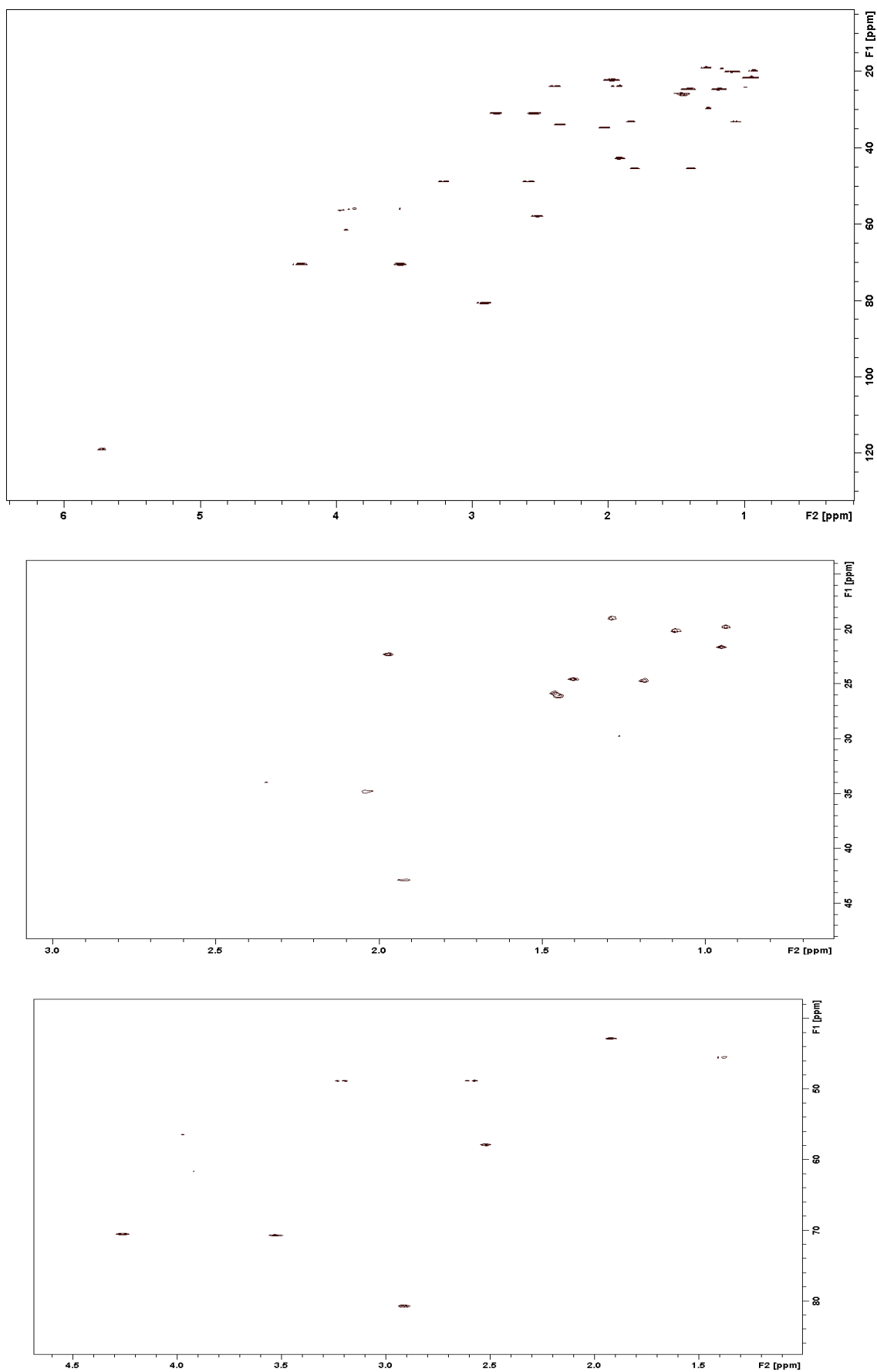


Figura 41. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-7**.

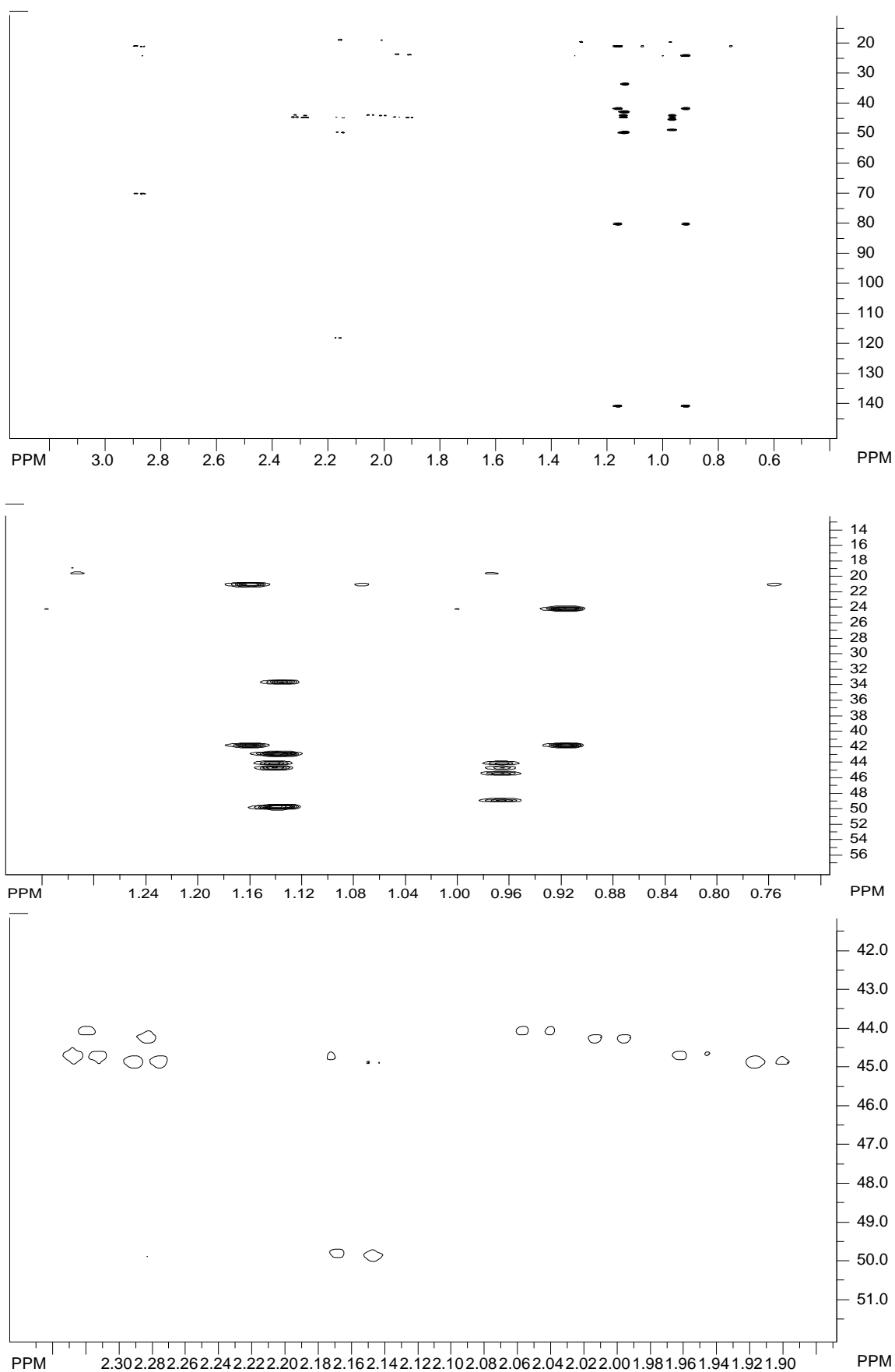


Figura 42. Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) da substância **ChRD-5**.

5.7.1.7. Elucidação Estrutural da Substância Codificada de ChRD-6

A substância codificada de **ChRD-6** teve sua estrutura elucidada com base na análise dos dados obtidos dos espectros de RMN, incluindo DEPT, HSQC e HMBC, bem como pela comparação com os dados de RMN de **ChRD-5** e de outros compostos de esqueleto semelhante descritos na literatura.

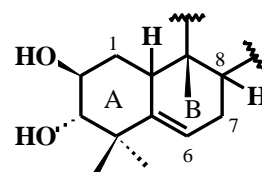
A análise dos dados obtidos do espectro de RMN ^1H de **ChRD-6** (Figura 43, p. 121), associado às correlações observadas no mapa de contorno do espectro HSQC (Figuras 44-45, pp. 122-123), evidenciou sinais cujos valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento sugeriram para **ChRD-6** o mesmo padrão de funcionalização observado para os anéis A e B de **ChRD-5** e de **ChRD-7**: dois hidrogênios oximetínicos [δ_{H} 2,92 (d, $J = 9,3$ Hz, H-3) e δ 3,55 (m, H-2)], um hidrogênio olefínico [δ 5,73 (dl $J = 5,3$ Hz, H-6)] e cinco grupos metílicos [δ 0,95; 0,99; 1,16 (com intensidade relativa para dois grupos) e 1,19 (s, cada)]. Além destes, foram observados também sinais para dois hidrogênios metínicos [δ_{H} 2,18 (d, $J = 7,8$ Hz, H-8) e 2,40 (m, H-10)] e cinco metilênicos saturados não oxigenados (Tabela 16, p. 119).

A análise conjunta dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 46, p. 124), incluindo DEPT (Figura 47, p. 125) e HSQC (Figuras 44-45, pp. 122-123), permitiu reconhecer a presença de um total de **vinte** átomos de carbono, dois a menos que **ChRD-5** (05 não hidrogenados, 05 monoidrogenados, 05 diidrogenados e 05 triidrogenados). Dentre os quais, foram identificados sinais cuja natureza e valores de deslocamentos químicos estão condizentes com a presença dos anéis A e B de **ChRD-5** e de **ChRD-7**: dois carbonos oximetínicos (δ 70,57 \rightarrow δ_{H} 3,55 e δ 80,65 \rightarrow δ_{H} 2,92), uma ligação dupla trissubstituída [δ 140,20 (C), δ 118,53 (CH \rightarrow δ_{H} 5,73)], cinco grupos metilas (δ 19,39; 20,14; 21,56; 24,29 e 24,69, correlacionados respectivamente no espectro HSQC com δ_{H} 0,95; 0,99; 1,16; 1,16 e 1,19), de além de sinais para dois carbonos metínicos (δ_{C} 43,31 \rightarrow δ_{H} 2,18 e δ_{C} 34,08 \rightarrow δ_{H} 2,40), um grupo carbonila de cetona não conjugada [δ 213,38 (C)], cinco carbonos metilênicos e três não hidrogenados (Tabela 16, p. 119), sugerindo, portanto, estrutura de um diterpeno, de fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$.

As principais correlações observadas a duas e três ligações no mapa de contorno do espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Figuras 48-50, pp. 125-127) permitiram também identificar na estrutura de **ChRD-6** o mesmo padrão de funcionalização dos anéis A e B (C-1 a C-10) de **ChRD-5** e **ChRD-7**. Dentre as quais estão correlações recíprocas entre os grupos metilas que absorvem em δ 0,95 (**Me-19** \rightarrow δ_{C} 21,56) e em δ 1,19

(**Me-18** $\rightarrow \delta_C$ 24,69) e destes com C-3 (δ 80,65 $\rightarrow \delta_H$ 2,92), C-4 (δ 42,19) e C-5 (δ 141,20). Por sua vez, o sinal atribuído ao **H-3** (δ 2,92) mostrou correlações com C-1 (δ 33,31 $\rightarrow \delta_H$ 1,85 e 1,01), C-2 (δ 70,56 $\rightarrow \delta_H$ 3,55), C-4, C-5 e com Me-18 e Me-19. Estas correlações, além de evidenciarem a relação de proximidade entre as metilas do C-4 (Me-18 e Me-19) com o carbono oximetínico (C-3) e com uma ligação dupla entre C-5 (δ 141,20) e C-6 (δ 118,80 $\rightarrow \delta_H$ 5,73), definiram também as posições dos grupos hidroxilas em C-2 e C-3. O valor da constante de acoplamento entre H-2 e H-3 ($J = 9,3$ Hz) sugeriram configurações relativas de *2\beta,3\alpha-equatorial* para estes grupos.

Por outro lado, as correlações entre **H-6** (δ 5,73) com C-8 (δ 43,31 $\rightarrow \delta_H$ 2,18) e com C-10 (δ 34,08 $\rightarrow \delta_H$ 2,40) e de **H-8** (δ 2,18) com um carbono não hidrogenado (δ_C 45,13) e um dihidrogenado (δ_C 50,26 $\rightarrow \delta_H$ 2,24 e 2,05) e com a metila que absorve em δ 19,54 ($\rightarrow \delta_H$ 1,16), além de C-6, permitiram inferir um grupo metila em C-9 e sugerir, portanto, para **ChRD-6** estrutura de um **diterpeno** com esqueleto do tipo **rosano**, contendo uma parte do esqueleto [19(10 \rightarrow 9 β)abeo-10 α -lanostano (cucurbitano)].

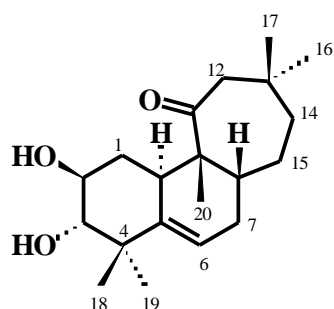


Anéis A e B de ChRD-6

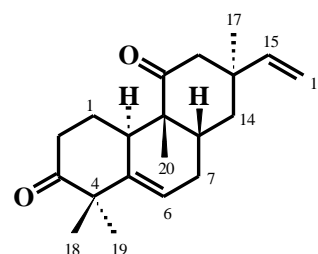
Adicionalmente, o sinal correspondente ao grupo metila que absorve em δ 0,99 ($\rightarrow \delta_C$ 24,29) mostrou correlações com um carbono não hidrogenado [δ 44,51 (C-13)] e dois dihidrogenados (δ_C 45,85 $\rightarrow \delta_H$ 3,17 e 2,34 e δ_C 50,14 $\rightarrow \delta_H$ 2,59 e 1,97) e as duas metilas que absorvem em δ 1,16 ($\rightarrow \delta_C$ 19,54 e δ_C 20,14), além de C-8 e C-10, com dois carbonos não hidrogenados [δ 44,51 e δ 45,13 (C-9)] e um dihidrogenado (δ_C 50,26 $\rightarrow \delta_H$ 2,24 e 2,05) (Tabela 16, p. 119). Estas correlações, associado à ausência de sinais com multiplicidade para hidrogênios de um grupo etila ou de hidrogênios e carbonos nos espectros de RMN para um grupo vinil terminal (-CH=CH₂), sugeriram para **ChDR-6** a estrutura de um diterpeno com esqueleto rosano rearranjado.

Considerando as correlações de H-8, dos grupos metilas que absorvem em δ 0,99 [dois carbonos dihidrogenados (δ 45,85 e δ 50,14) e um não hidrogenado (δ 44,71)] e em δ 1,16 [dois carbonos não hidrogenados (δ 44,71 e δ 45,13) e um dihidrogenado (δ 50,26)], bem como as demais correlações dos hidrogênios dos carbonos dihidrogenados, deduziu-se que dois destes grupos se encontram ligados a um mesmo carbono. Deste modo, foi proposto para **ChRD-6** a

estrutura de um novo diterpeno, cujo anel C contém sete átomos de carbonos sustentando um grupo carbonila em C-11 (δ 212,32), como em **ChRD-5** e **ChRD-7**.



ChRD-6



5,15-Rosadieno-3,11-diona

Esta proposta estrutural foi apoiada principalmente pela proteção observada para o C-9 (δ 45,13) de **ChRD-6**, quando comparado com o carbono correspondente de **ChRD-5** (δ 50,35), de **ChRD-7** (δ 48,39), da **25-Acetoxi-23,24-Diidrocucurbitacina F** (δ 48,29) (Reguero & Mata, 1987), do **Khekadaengosídeo L** (δ 50,5), bem como de outros diterpenos de esqueleto rosano, como em **5,15-Rosadieno-3,11-diona** (δ 49,4) (Feld *et al.*, 2003), que contém grupo carbonila em C-11 em um anel de seis membros (Tabela 17, p. 120).

Com base na análise conjunta dos dados espectrais discutidos e comparação com dados da **ChRD-5**, **ChRD-7** descritas anteriormente e de outros diterpenos de mesmo esqueleto descritos na literatura contendo grupo carbonila em C-11 e em C-12 (Garcia-Alvarez *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 2000; Feld *et al.*, 2003) foi proposta para **ChRD-6** a estrutura **2 β ,3 α -diidroxii-11-oxo-5-roseno**. Entretanto, para uma confirmação definitiva desta proposta estrutural espectros de massas, COSY e NOESY ainda deverão ser obtidos.

Alguns *ent*-rosano diterpenóides têm apresentado, entre outras, atividade antitumoral (Xu *et al.*, 1991) e antibacteriana frente a *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus mutans* (Liu *et al.*, 2006). No presente trabalho, nos ensaios qualitativos, a substância codificada de **ChRD-6** inibiu a enzima acetilcolinesterase. Entretanto, para confirmação desta atividade ensaios quantitativos complementares ainda serão necessários.

Tabela 16. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) do composto **ChRD-6** e comparação com dados de **ChRD-5** e de **ChRD-7**.

<i>Posição</i>	ChRD-6			ChRD-5	ChRD-7
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	HMBC	δ_{C}	δ_{C}
1	33,31	1,85 m 1,02 m	C-2, C-3, C-10 C-10	33,54	33,04
2	70,57	3,55 m		70,71	70,65
3	80,65	2,92 (d, $J = 9,3$)	C-1, C-2, C-4, C-5, Me-18, Me-19	80,85	80,61
4	42,19			42,42	41,90
5	141,20			141,43	140,79
6	118,53	5,73 (dl, $J = 9,3$)	C-4, C-8, C-10	118,73	118,99
7	24,24	2,53 e 1,94 m		24,39	23,65
8	43,31	2,18 (d, $J = 7,8$)	C-6, C-9, C-10, C-15, Me-20	43,52	42,57
9	50,14			50,35	48,39
10	34,08	2,40 m	C-9, C-15, Me-20 C-13, Me-20	34,26	33,76
11	212,32			212,72	213,80
12	45,85	3,17 (d, $J = 14,6$) 2,34 (d, $J = 14,6$)	C-12, Me-16 C-9, C-13, C-14, Me-16	50,43	48,67
13	44,51			46,02	48,18
14	45,12	2,59 m 1,97 m	C-13, Me-16 C-13, C-14, Me-16	44,71	50,57
15	50,26	2,24 (d, $J = 17,6$)		45,33	45,36
16		2,05 (d, $J = 17,6$)		218,24	70,49
17				49,50	57,72
16 (30)	24,29	0,99 s	C-12, C-13, C-14	(24,39)	18,82
17 (19)	20,14	1,16 s	C-8, C-9, C-10, C-15, C-13	(20,22)	(20,07)
18 (28)	24,69	0,95	C-3, C-4, C-5, Me-19	(21,67)	(21,50)
19 (29)	21,56	1,19	C-3, C-4, C-5, Me-18	(24,80)	(24,41)
20 (18)	19,39	1,16 s	C-8, C-9, C-10, C-15, C-13	(19,54)	(19,71)

Tabela 17. Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, δ , Hz) do composto **ChRD-6** e comparação com dados de **5,15-Rosadieno-3,11-diona** (CDCl_3).

<i>Posição</i>	ChRD-6		ChRD-5	ChRD-7	5,15-Rosadieno-3,11-diona	
	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}/\text{HSQC}$	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}
1	33,31	1,02 e 1,85 m	33,54	33,04	25,2	2,20 dddd
2	70,57	3,55 m	70,71	70,65	37,8	2,31 e 2,69 ddd
3	80,65	2,92 (d, $J = 9,3$)	80,85	80,61	214,6	
4	42,19		42,42	41,90	51,0	
5	141,20		141,43	140,79	144,2	
6	118,53	5,73 (dl, $J = 9,3$)	118,73	118,99	118,2	5,59 ddd
7	24,24		24,39	23,65	29,0	1,96 m
8	43,31	2,18 (d, $J = 7,8$)	43,52	42,57	38,2	1,88 m
9	50,14		50,35	48,39	49,4	
10	34,08		34,26	33,76	38,6	3,02 m
11	212,32		212,72	213,80	214,4	
12	45,85	2,34 e 3,17 (d, $J = 14,6$ cada)	50,43	48,67	48,5	1,98 e 2,74 d
13	44,51		46,02	48,18	41,6	
14	45,12	1,97 e 2,59	44,71	50,57	38,4	1,37 e 1,74
15	50,26	2,05 e 2,24 (d, $J = 17,6$ cada)	45,33	45,36	147,7	5,82 dd
16 (30)	24,29	0,99 s	(24,39)	18,82	110,3	4,94 e 4,96 dd
17 (19)	20,14	1,16 s	(20,22)	(20,07)	23,5	0,98 s
18 (28)	21,56	0,95	(21,67)	(21,50)	22,8	1,22 s
19 (29)	24,69	1,19	(24,80)	(24,41)	29,4	1,26 s
20 (18)	19,39	1,16 s	(19,54)	(19,71)	12,0	1,01 s

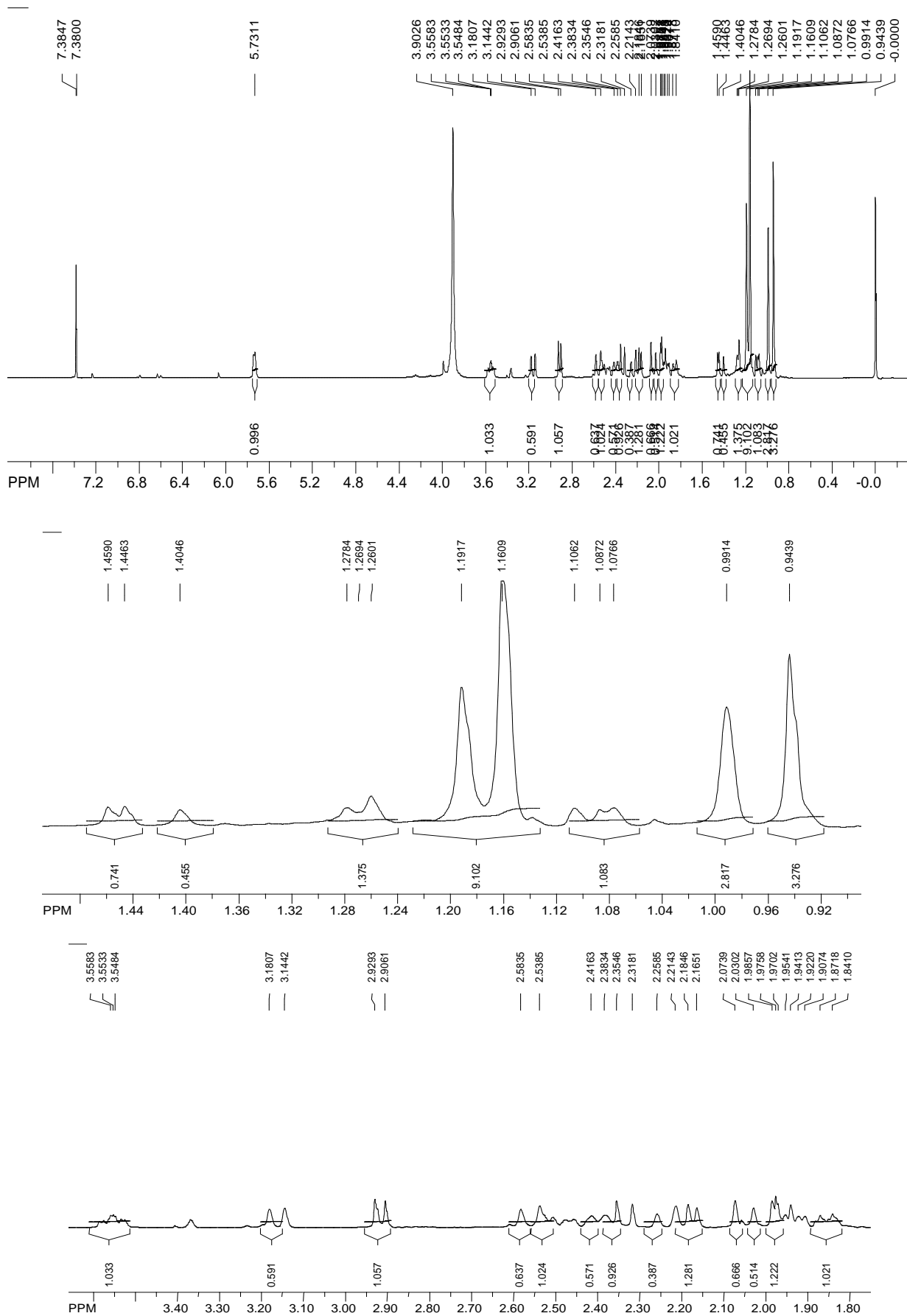


Figura 43. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto ChRD-6.

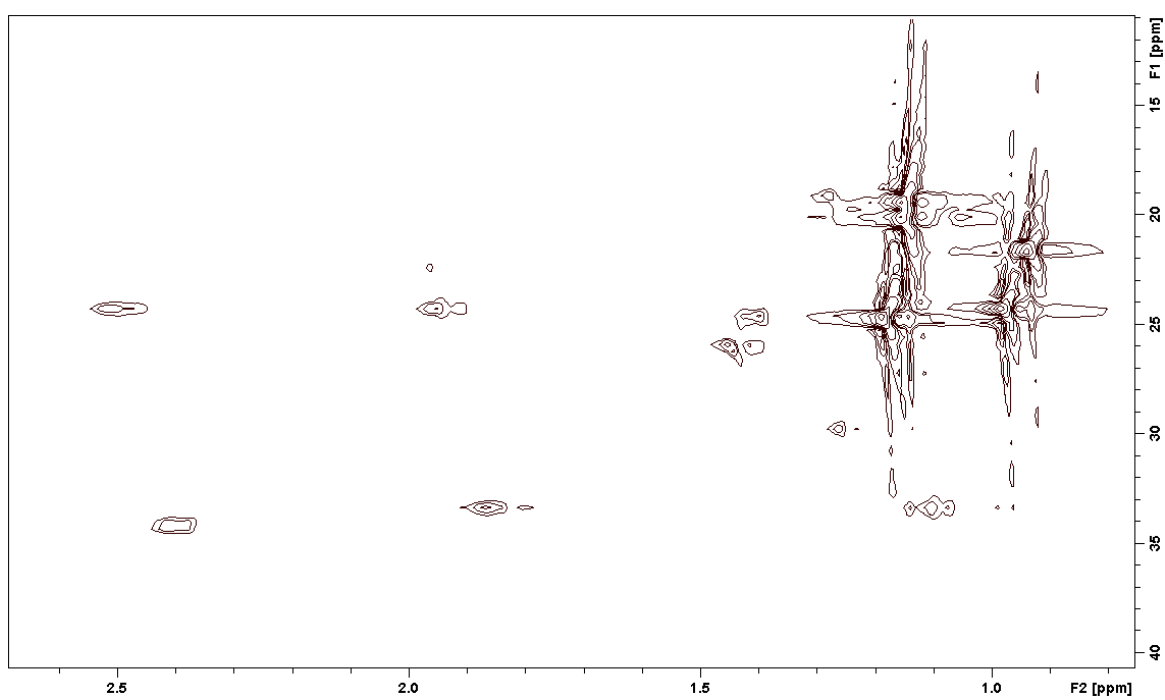
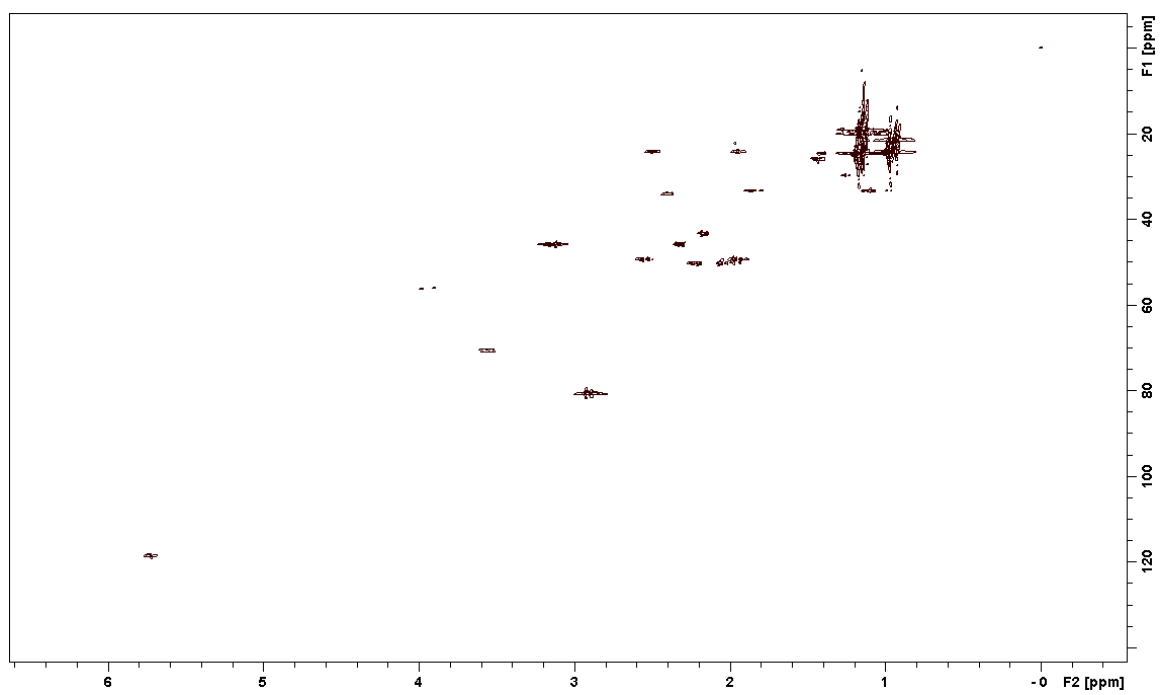


Figura 44. Espectro HSQC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto **ChRD-6**.

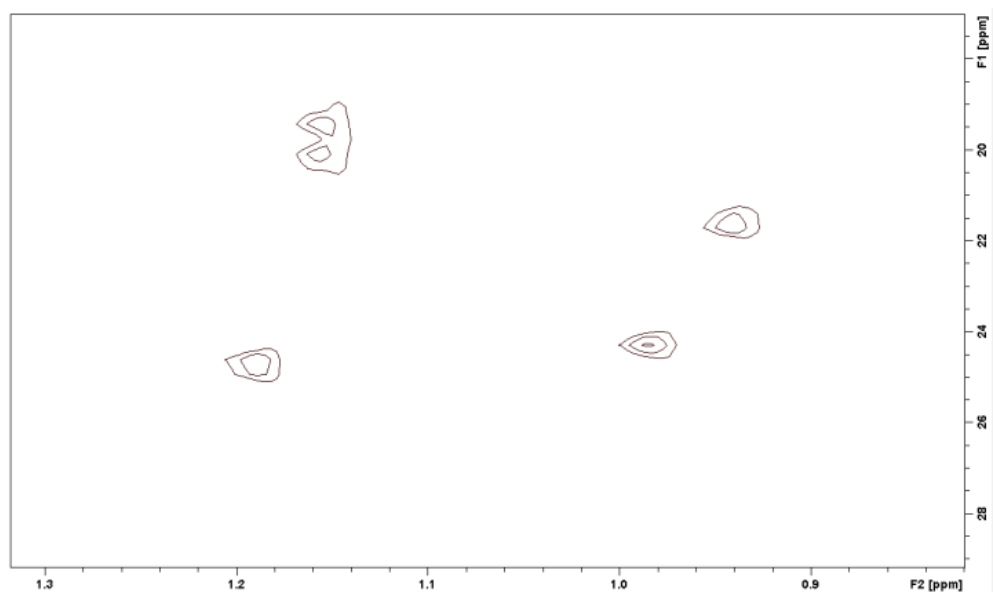
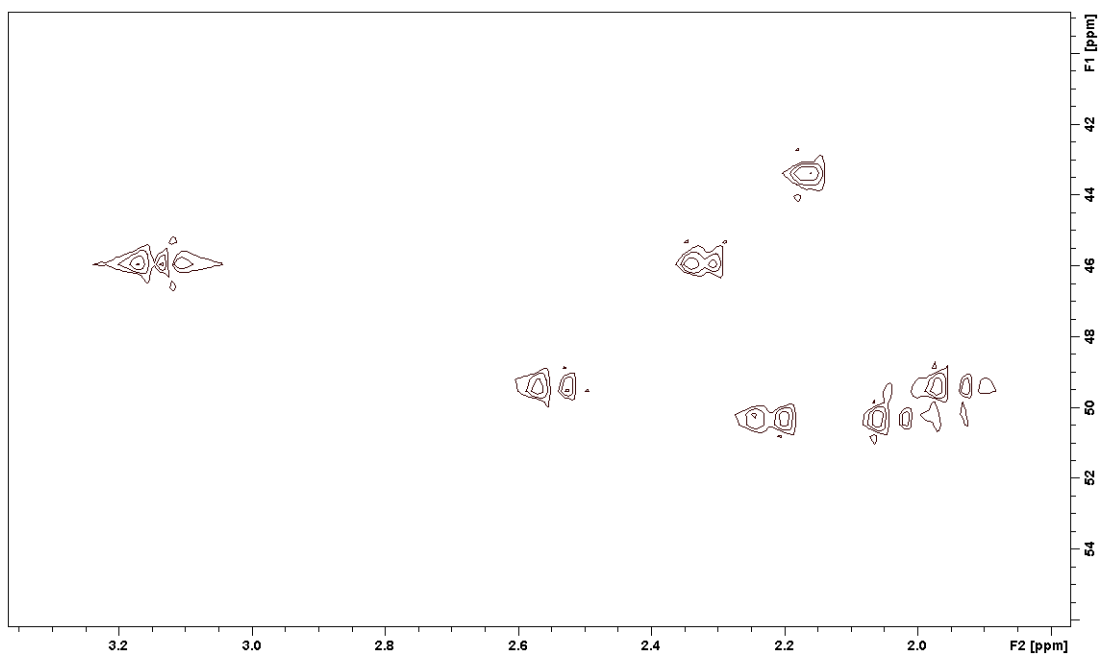


Figura 45. Expansão do espectro HSQC do composto **ChRD-6**.

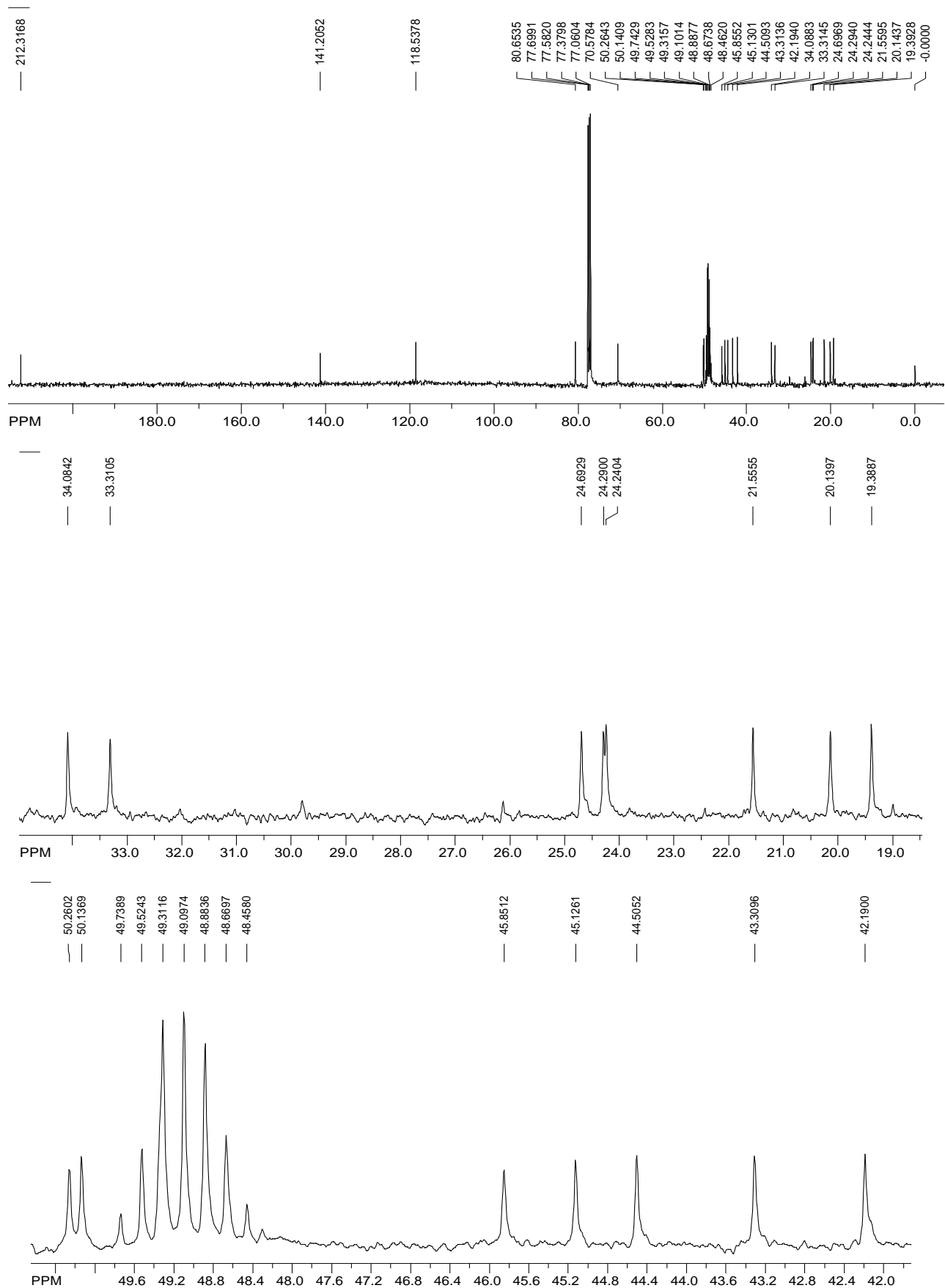


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto **ChRD-6**.

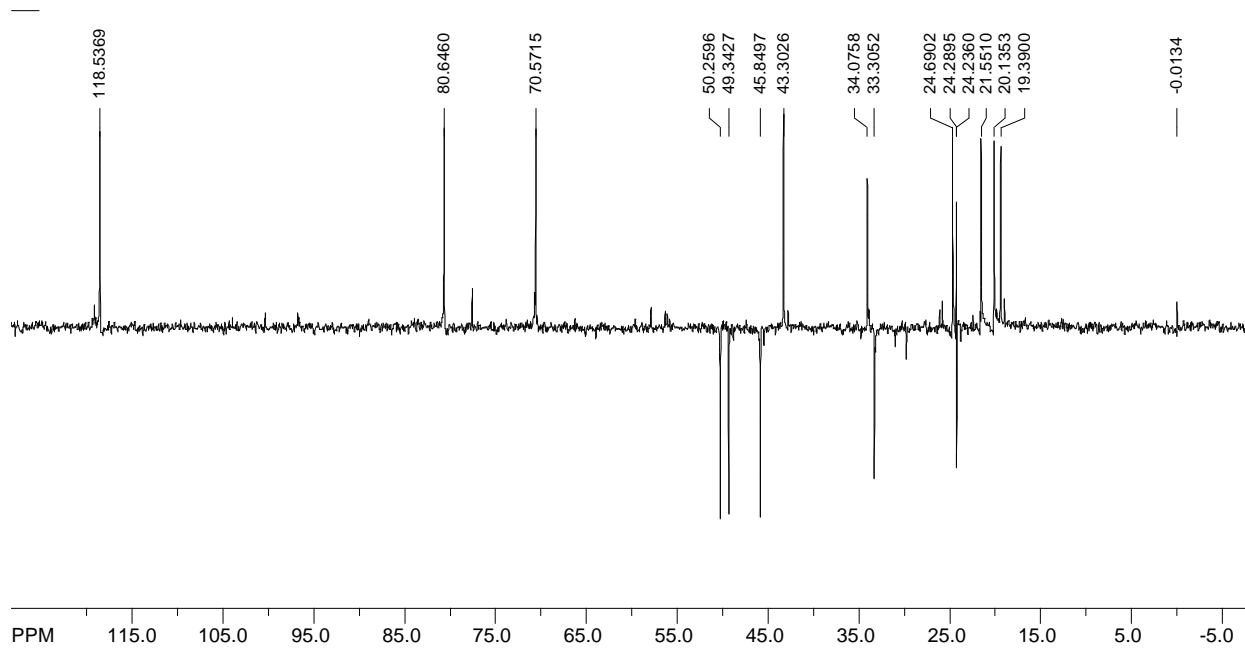


Figura 47. Espectro DEPT (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto **ChRD-6**.

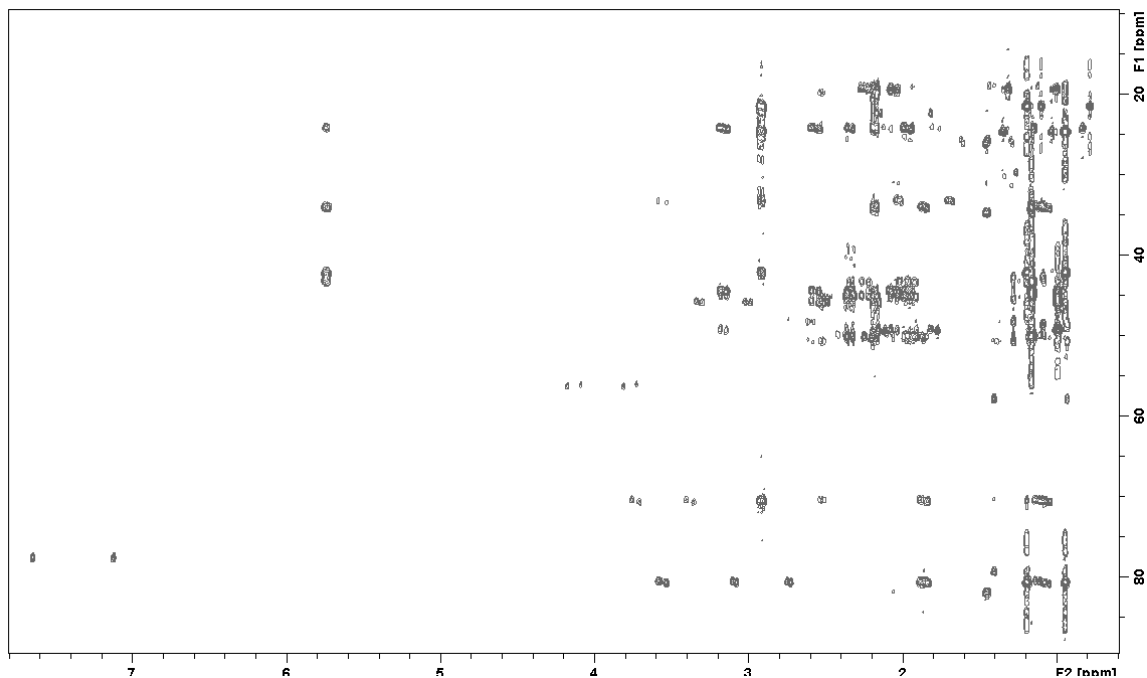


Figura 48. Espectro HMBC (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do composto **ChRD-6**.

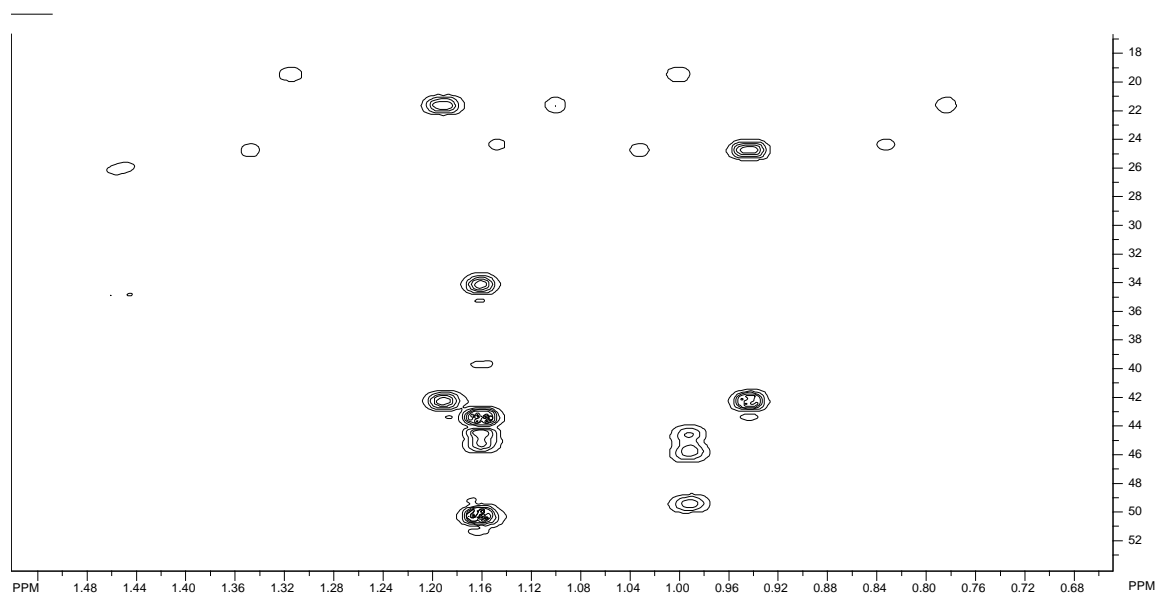
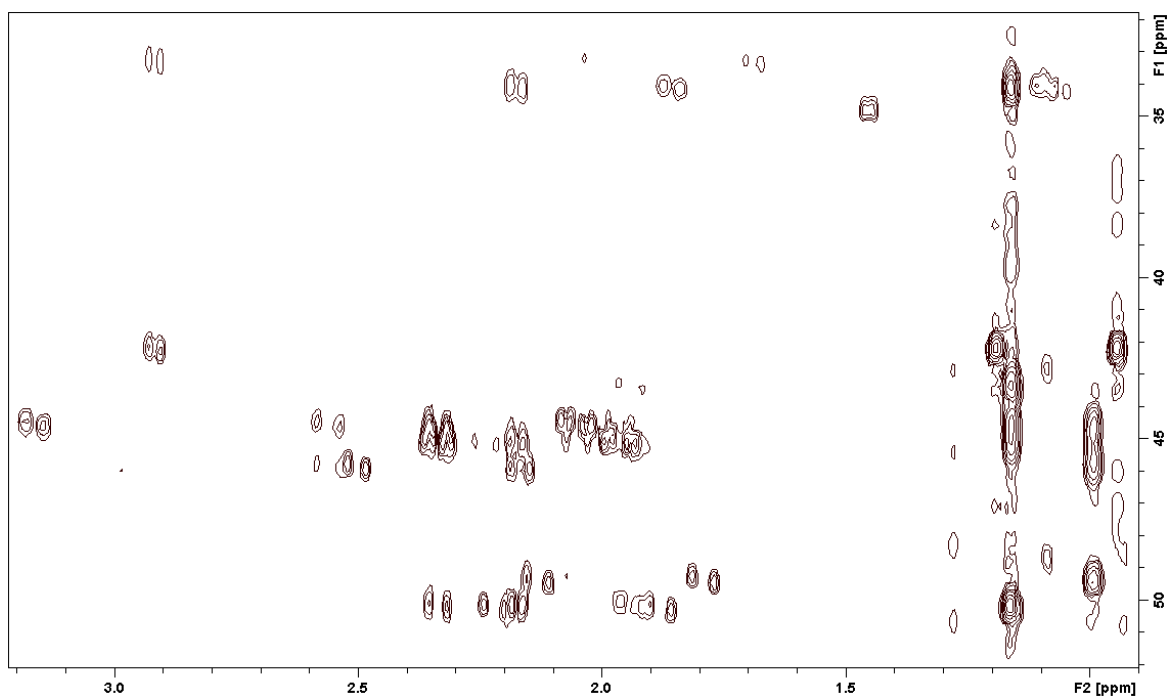


Figura 49. Expansão do espectro HMBC do composto **ChRD-6**.

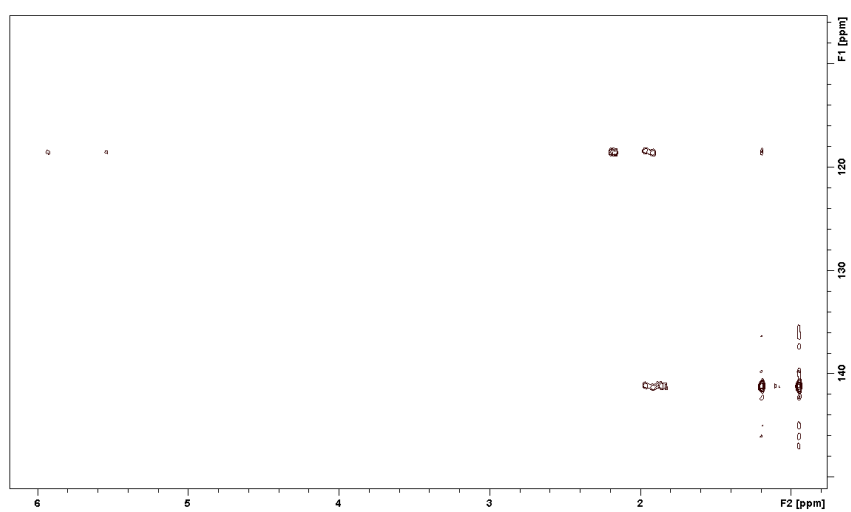
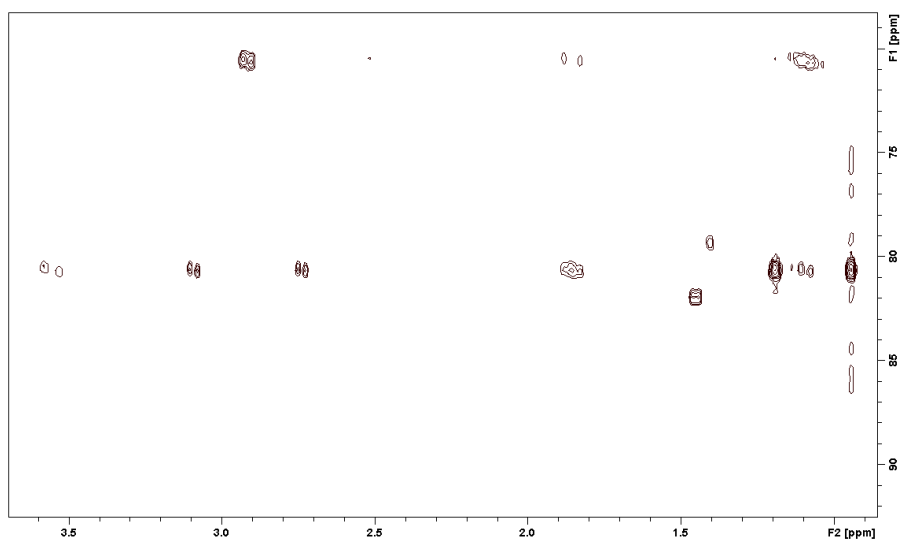
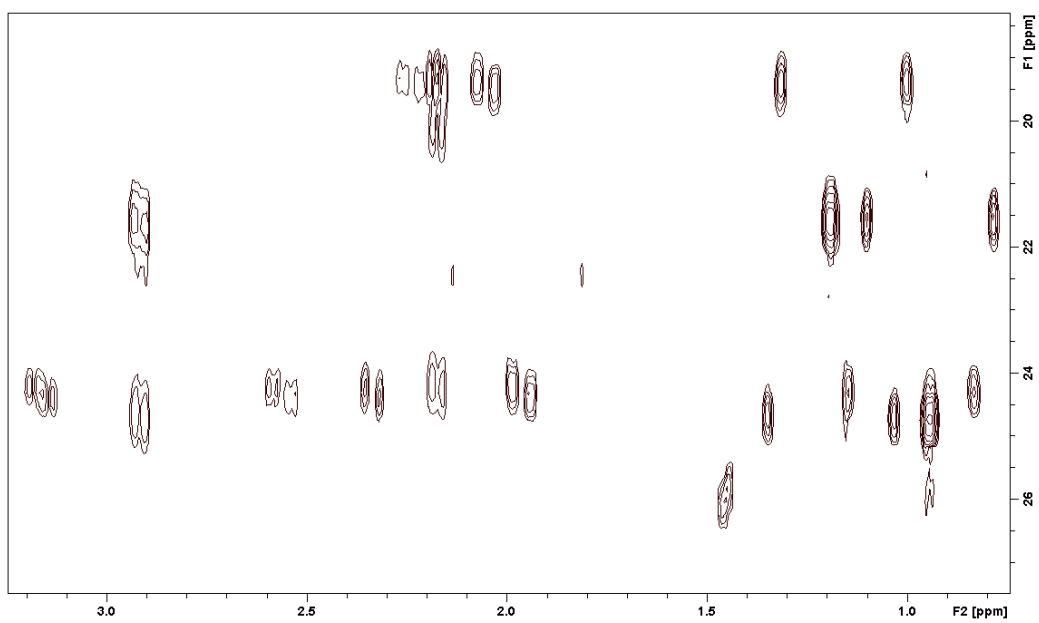


Figura 50. Expansão do espectro HMBC do composto **ChRD-6**.

6. Considerações Finais

Os estudos químicos e biológicos (antioxidante, anticolinesterásico e antiinflamatório) de extratos e frações, bem como de algumas das substâncias isoladas das raízes de *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) permitiram relacionar as seguintes considerações:

- ◆ O extrato em EtOH das **cascas do caule** de *C. hexandra* apresentou um alto teor de fenóis totais e moderada atividade antioxidante nos ensaios quantitativos frente ao DPPH e de oxidação total; enquanto que os extratos e frações de filtração em gel de sílica das **raízes e folhas** foram bem mais eficientes em seqüestrar radicais livres e em inibir a formação de peróxido durante a peroxidação do ácido linoléico. Nestes ensaios, de moderada a forte correlação entre o conteúdo de fenóis totais, CI_{50} frente ao DPPH e oxidação total foi observado, especialmente para extratos e frações das raízes e folhas;
- ◆ Alguns extratos e frações das raízes seqüestraram radicais livres e inibiram a ação da enzima acetilcolinesterase e o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton;
- ◆ O estudo químico de alguns dos extratos das raízes, com resultados promissores nos ensaios efetuados, conduziu ao isolamento de três fitoesteróides, um diterpeno, dois triterpenos e cinco derivados 4-fenilcumarínicos, compatível com o perfil químico do gênero estudado, especialmente pela presença de derivados 4-fenilcumarínicos;
- ◆ Dentre os terpenóides isolados, o triterpeno *2 β ,3 α -diidroxido-11,16-dioxo-5-eno-octanor-cucurbitacina* (**ChRD-5**) e o diterpeno *2 β ,3 α -dihidroxido-11-oxo-ros-5-eno* (**ChRD-6**) estão sendo relatados pela primeira vez. Assim sendo, o isolamento dessas substâncias irá servir para ampliar o conhecimento químico deste gênero;
- ◆ O diterpeno *2 β ,3 α -diidroxido-11-oxo-ros-5-eno* (**ChRD-6**), em ensaios preliminares, inibiu a ação da enzima acetilcolinesterase. No entanto, ensaios quantitativos serão necessários para uma possível confirmação desta atividade;
- ◆ Dentre os cinco derivados 4-fenilcumarínicos isolados, a *5-hidroxido-7-metoxido-4-(p-hidroxido-fenil)cumarina* (**ChRD-4**) está sendo relatada pela primeira vez de fonte natural e a *5,7,8-trimetoxido-4-(3,4-dihidroxifenil)cumarina* (**ChRD-8**) está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Coutarea*. Nos ensaios frente ao DPPH, tanto a substância **ChRD-4** ($43,70 \pm 0,21$

$\mu\text{g/mL}$) quanto **ChRD-8** ($20,85 \pm 0,53 \mu\text{g/mL}$) seqüestraram radicais livres com valores de CI_{50} comparáveis aos do ácido ascórbico e do ácido gálico, respectivamente;

- ◆ As substâncias codificadas de **ChRD-1** (*5,7-dimetoxi-4-(p-metoxifenil)cumarina*), **ChRD-3** (*5,7-dimetoxi-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)cumarina*), de **ChRD-4** (*5-hidroxi-7-metoxi-4-(p-hidroxifenil)cumarina*) e **ChRD-7** (*25-acetato de 23,24-diidrocurbitacina F*), na dose de 0,6 mg/orelha, inibiram o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton por cerca de 35,0%, 19,0%, 67,0% e 30%, respectivamente.

- ◆ A literatura não relata uso etnomedicinal ou biológico no gênero *Coutarea* com possível atividade anticolinesterásica. Portanto, este é o primeiro relato de extratos de espécies deste gênero com uma possível propriedade anticolinesterásica.

- ◆ O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho contribuiu com a ampliação do perfil quimiotaxonômico do gênero *Coutarea* e são promissores uma vez que alguns extratos, frações e compostos isolados foram ativos nos ensaios efetuados, estimulando a continuidade na perspectiva de isolar e caracterizar compostos ativos como antioxidantes, anticolinesterásicos e antiinflamatórios.

7. Referências Bibliográficas

- Abner, C.; Fernando, R.M.; Ariane, L.P. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasiliensis de Martius. *Rodriguésia* v. 55, pp. 47-57, 2004.
- Afef, A.; Inês, B.; Ines S.; Kita, V.; Malika K.; Pascal, G.; R´egine, S.; Anne-marie, M.; Kamel, G.; François, L.; Marie-geneviève, D.; Leila C. Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biological Interactions* v. 165, pp. 1-13, 2007.
- Agra, M.F.; França, P.F.; Barbosa-Filho, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 17, pp. 114-140, 2007.
- Albuquerque U.P.; Hanazaki, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16 (Supl), pp. 678-689, 2006.
- Alexandre R.F.; Bagatini F.; Simões C.M.O. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 18, pp. 117-126, 2008.
- Almeida, F.R.C.; Rao, V.S.N.; Gadelha, M.G.T.; Matos, F.J.A. Estudo sobre a atividade antifertilizante de *Coutarea hexandra* Schum. em ratos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 71, pp. 69-71, 1990.
- Aquino, R.; D'agostino, M.; De Simone, F.; Pizza, C. 4-Arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry* v. 27, pp. 1827-1830, 1988.
- Andersson, L. A provisional checklist of neotropical Rubiaceae. *Scripta Botanica Belgica* v. 1, pp. 1-199, 1992.
- Araújo, C.C., Paula, M.Q., Maia, R.F., Lima, E.O. Avaliação da atividade antimicrobiana do composto 5,7,2',5' tetraacetoxi-4-fenilcumarina obtido a partir de *Coutarea hexandra* (Rubiaceae) *Revista de Microbiologia* v. 19, pp. 177-179, 1988.
- Azzi, A.; Oxidative stress: A dead end or a laboratory hypothesis? *Biochemical Biophysical Research Communications* v. 362, pp. 230-232, 2007.

Barbosa-filho, J.M.; Vasconcelos, T.H.C.; Alencar, A.A.; Batista, L.M.; Oliveira, R.A.G.; Guedes, D.N.; Falcão, H.S.; Moura, M.D.; Diniz, M.F.F.M.; Modesto-filho, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North América with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 15, pp. 392-413, 2005.

Barbosa-filho, J.M.; Vasconcelos, T.H.C.; Alencar, A.A.; Batista, L.M.; Oliveira, R.A.G.; Guedes, D.N.; Falcão, H.S.; Moura, M.D.; Diniz, M.F.F.M.; Modesto-filho, J. Produtos naturais inibidores da enzima acetilcolinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16, pp. 258-285, 2006.

Barroso, G.M.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F.; Costa, C.G.; Guimarães, E.F. Rubiáceas. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária de Viçosa, Brasil, v. 3, pp. 189-228. 1991.

Biavatti, M.W.; Marensi, V.; Leite, S.N.; Reis, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 17, pp. 640-653, 2007.

Boller, S. atividade antiinflamatória tópica do extrato e compostos isolados da *baccharis illinita* dc, (*asteraceae*) em camundongos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná. pp. 42-60, 2007.

Bolzani, V.S.; Young, M.C.M.; Furlan, M.; Cavalheiro, A.J.; Araújo, A.R.; Silva, D.H.S.; Lopes, M.N. Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species: Chemotaxonomical and biological significance. *Recent Research Development Phytochemistry* v. 5, pp. 19-31, 2001.

Bose, P.; Banerji, J. Synthesis of 4-phenylcoumarins. *Indian Journal Chemical B* v. 29, pp. 422-424, 1990.

Brandao, M.G.L.; Grandi, T.S.M.; Rocha, E.M.M.; Sawyer, D.R.; Krettli, A.U. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal Ethnopharmacology* v. 36, pp. 175-182, 1992.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, v. 28, pp. 25-30, 1995.

Bringmann, G.; Ochse, M.; Wolf, K.; Kraus, J.; Peters, K.; Peters, E.M.; Herderich, M.; Assi, L.A.; Tayman, F.S.K. 4-Oxonicotinamide-1-(1'-β-D-ribofuranoside) from *Rothmannia longiflora* Salisb. (Rubiaceae). *Phytochemistry* v. 51, pp. 271-276, 1999.

Bye JR, R.A. Medicinal plants of the Sierra madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Journal Economic Botany* v. 40, pp. 103-124, 1986.

Calixto, J.B.; Otuki, M.F.; Santos, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor KB (NF-KB). *Planta Medica* v. 69, pp. 973-983, 2003.

Calixto, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. *Journal of Ethnopharmacology* v. 100, p. 131-134, 2005.

Camargo, M.T.L.A. *Plantas Medicinais e de Rituais Afro-brasileiros II*, São Paulo: Ícone editora. 1998.

Carbonezi, C.A.; Martins, D.; Young, M.C.M.; Lopes, M.N.; Furlan, M.; Rodrigues Filho, E.; Bolzani, V.S. Iridoid and *seco*-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). *Phytochemistry* v. 51, pp. 781-785, 1999.

Carlini, E.A.; Rodrigues, E.; Mendes, F.R.; Tabach, R.; Gianfratti, B. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16, pp. 690-695, 2006.

CEEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná. 2003. Disponível em: <http://bip.ufpr.br/unidades/ceea/index.htm>. Acesso em: 06 Maio, 2006.

Cerutti, P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet London* v. 344, pp. 862-863, 1994.

Cicerale, S.; Conlan, X.A.; Sinclair, A.J.; Keast, R.S. Chemistry and health of olive oil phenolics." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* v. 49, p. 218-36, 2007.

Coelho, V.P.M.; Agra, M.F.; Barbosa, M.R.V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16, pp. 170-177, 2006.

Cordeiro C.H.G.; Chung M.C.; Sacramento L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. Revista Brasileira de Farmacognosia v. 15, pp. 272-278, 2005.

D'agostino, M.; Defeo, V.; Desimone, F.; Pizza, C. 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. Phytochemistry, v. 28, pp. 1773-1774, 1989a.

D'agostino, M.; De Feo, V.; De Simone, F.; Pizza, C. 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. Phytochemistry v. 28, pp. 1773-1774, 1989b.

D'agostino, M.; De Feo, V.; De Simone, F.; Vincieri, F.F.; Pizza, C. Isolation of 8-Hydroxy-5,7,3'4'-Tetramethoxy-4-Phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. Planta Medica v. 55, pp. 578-578, 1989c.

D'agostino, M.; De Simone, F.; Dini, A.; Pizza, C.; Isolation of 8,3'-dihydroxy-5,7,4'-trimethoxy-4-phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. Journal Natural Products v. 53, pp. 161-162, 1990.

De Almeida, E.R.; De Santana, C.F.; De Mello, J.F. Anti-inflammatory activity of *Coutarea hexandra*. Fitoterapia source was an original research paper. Instituto de Antibioticos, Univ. Fed. Pernambuco Recife, v. 62, pp. 447-448, 1991.

De Oliveira, P. E. S.; Conserva, L. M.; Brito, A. C.; Lemos, R. P. L. Coumarin derivatives from *Esenbeckia grandiflora* and its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. Pharmaceutical Biology, v. 43, pp. 53-57, 2005.

Decker, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? Nutrition Reviews, New York, v. 55, pp. 396-407, 1997.

Della Greca, M.; Monaco P.; Previtera L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. Journal Natural Products v. 53, pp. 1430-1435, 1990.

Delle monache, G.; Botta, B.; Neto, A.S.; Delima, R.A. 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. Phytochemistry v. 22, pp. 1657-1658, 1983.

Delle monache, G.; Botta, B.; Alves de Lima, R. A 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. Phytochemistry v. 23, pp. 1813-1813, 1984.

Delle monache, G.; Botta, B.; Menichini, F.; Pinheiro, R.M. Isolation from *Coutarea hexandra* and Synthesis of exostemin and its methyl ether. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* v. 1, pp. 65-70, 1987.

Delle monache, G.; Botta, B.; Vinciguerra, V.; Gacs-baitz, E. A new neoflavonoid from *Coutarea hexandra*. *Heterocycles* v. 29, pp. 335-357, 1989.

Delle monache, G.; Botta, B.; Vinciguerra, V.; Moura Pinheiro, R. 4-Arylcoumarins from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry* v. 29, pp. 3984-3986, 1990.

Dias-santagata, D.; Fulga, T.A. Duttaroy, A.; Feany, B. Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, pp. 236-245, 2007.

Di Stasi, L.C.; Hiruma-Lima, C.A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: UNESP, v. 2, p. 604, 2002.

Dongmo, A.B.; Kamanyi, A.; Dzikouk, G.; Nken, B.C.A.; Tan, P.V.; Nguielefack, T.; Nole, B.M.; Wagner, H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) Aubrév. & Pellegr. *Journal of Ethnopharmacology* v. 84, pp. 17-21, 2003.

Ellmann, G.L.; Courtney, K.D.; Andres JR, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colotimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* v. 7, pp. 88-90, 1961.

Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 15, pp. 381-391, 2005.

Feld, H.; Zapp, J.; Becker, H. Secondary metabolites from the liverwort *Tylimanthus renifolius*. *Phytochemistry*, v. 64, pp. 1335-1340, 2003.

Firestein, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. Goldman, L. e Ansello, D. *Textbook of Medicine*, v. 22, p. 227, 2004.

Fox, L.P. Farmacologia dermatológica. In: Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L. Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica ed. Rio de Janeiro:McGrawHill, v. 11, pp. 1534-1537, 2006.

Gàbor, M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

Gàbor, M. Models of acute inflammation in the ear. In: Wilnyard, P.G. e Willoughby, D.A. Inflammation protocols, New Jersey: Humana Press, pp. 129-131, 2003.

Garcia-Alvarez, M.C.; Rodriguez, B.; Valverde, S.; Fraga, B.M.; González, A.G. Carbon-13 NMR spectra of some *ent*-rosane diterpenoids. *Phytochemistry* v. 20, 167-169, 1981.

Giordani, R.B.; Pagliosa, L.B.; Henriques, A.T.; Zuanazzi, J.A.S.; Dutilh, J.H.A. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) *Química Nova* v. 31, pp. 2042-2046, 2008.

Giral, F.; Aguilar, M.D. Vitamin C content of medicinal drugs. II. Barks, roots and rhizomes – *Ciência (Mexico)* information coded from an abstract. *Chemical Abstracts* v. 12, pp. 283-285, 1953; 48: 4177d.

Gomes, M. Rubiaceae. In: Lima, M.P.M.; Guedes-Bruni, R.R. (Org.). Reserva ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo – RJ: Aspectos florísticos das espécies vasculares. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, v. 2, pp. 345-426, 1996.

Gottlib, A.B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. *Journal of American Academy Dermatology* v. 53, pp. 3-16, 2005.

Guerra, F. The pharmacology of Mexican antidiabetic plants. II. Action of *Coutarea latiflora* on normal and diabetic blood-sugar levels. *Chemical Abstracts* v. 8, pp. 29-38, 1947.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Lölinger, J., Aruoma, O.I. The characterization on antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford v. 33, pp. 601-617, 1995.

Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, New York v. 52, pp. 253-265, 1994.

Hamilton, C.W. A revision of mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae), part I: introduction and species 1-16. *Annals of the Missouri Botanical Garden* v. 76, 67-111; part II:

Species 17-47. *Annals of the Missouri Botanical Garden* v. 76, 386-429; part III: Species and appendices 48-61. *Annals of the Missouri Botanical Garden* v. 76, pp. 886-916, 1989.

Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, New York v. 16, pp.845-850, 1994.

Hansen, J.M.; Go, Y.M.; Jones, D.P. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* v. 46, pp. 215-234, 2006.

Harbone, J.B. *The flavonoids: advances in research since 1986*. New York : Chapman & Hall, p. 676, 1993.

Hecker, E.; Schmidt, R. Phorbol esters: the irritants and co-carcinogens of *Croton tiglium* L. *Fortschr Chem Organ Naturstoffe*, v. 31, pp. 377-467, 1974.

Henkel, T. Therapeutic innovation. *Drugs* v. 2, pp. 403-404, 1999.

Henriques, A.T.; Lopes, S.O.; Paranhos, J.T.; Gregianini, T.S.; Poser, G.L.V.; Fett-Neto, A.G.; Schripsema, J. N- β -D-Glucopyranosyl vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. *Phytochemistry* v. 65, pp. 449-454, 2004.

Hiroyuki, T.; Takeda, Y.; Hiroshi, N.; Kanomi, A.; Okuda, T.; Puff, C. Chemotaxonomic studies of Rubiaceae plants containing iridoid glycosides. *Phytochemistry* v. 27, pp. 2591-2598, 1988.

Hosny & El-Fattah. Structure revision of cucurbitacin-Q₁. *Phytochemistry* v. 36, pp. 159-161, 1994.

Hu, Y.; Xu, J.; Hu, Q. Evaluation of antioxidant potential of *Aloe vera* (*Aloe bardadensis* Miller) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 51, pp. 7788-7791, 2003.

Iinuma, M.; Tanaka, T.; Hamada, K.; Mizuno, M.; Asai, F.; Reher, G.; Kraus, L. Revised structure of neoflavone in *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry* v. 26, pp. 3096-3097, 1987.

Ilef, L.A.; Jihed, B.; Mohamed, B.S.; Ines, S.; Wissem, B.; Aicha, N.; Soumaya, K.; Ines, B.; Kamel, G.; Leila, C.G. Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species *Journal of Ethnopharmacology* v. 125, pp. 183 -202, 2009.

Ito, A.; Chai, H.B.; Shin, Y.G.; García, R.; Mejía, M.; Gao, Q.; Fairchild, C.R.; Lane, K.E.; Menendez, A.T.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. Cytotoxic constituents of the roots of *Exostema acuminatum*. *Tetrahedron* v. 56, pp. 6401-6405, 2000.

Jenett-Siems, K.; Kohler, I.; Kraft, C.; Beyer, G.; Melzig, M. F.; Eich, E. Cytotoxic constituents from *Exostema mexicanum* and *Artemisia afra*, two traditionally used plant remedies. *Pharmazie*, v. 57, pp. 351-352, 2002.

Kabashima, K.; Miyachi, Y. Prostanoids in the cutaneous immune response. *Journal of dermatological science* v. 34, pp. 177-184, 2004.

Kanchanapoom, T.; Kasai, R.; Yamasaki, K. Iridoid and phenolic diglycosides from *canthium berberidifolium*. *Phytochemistry* v. 61, pp. 461-464, 2002.

Kim, J. Radical scavenging capacity and antioxidant activity of the E vitamer fraction in rice bran. *Food Chemistry and Toxicology* v. 70, pp. C208-C213, 2005.

Knekt P.; Järvinen, R.; Seppänen, R.; Heliövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology* v. 146, pp. 223-230, 1997.

Kohler, I.; Siems, K.J.; Mockenhaupt, F.P.; Siems, K.; Jakupovic, J.; González, J.C.; Hernández, M.A.; Ibarra, R.A.; Berendsohn, W.G.; Bienzle, U.; Eich, E. *In vitro* antiplasmodial activity of 4-phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*. *Planta Medica* v. 67, pp. 89-91, 2001.

Leung, D.Y.M.; Boguniewicz, M.; Howel, M.D.; Nomura, I. Hamud, Q. A. New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 113, pp. 651-657, 2004.

Ling, S.K.; Komorita, A.; Tanaka, T.; Fujioka, T.; Mihashi, K.; Kouno, I. Sulfur-containing bis-iridoid glucosides and iridoid glucosides from *Saprosma scortechinii*. *Journal of Natural Products* v. 65, pp. 656-660, 2002a.

Ling, S.K.; Komorita, A.; Tanaka, T.; Fujioka, T.; Mihashi, K.; Kouno, I. Iridoids and anthraquinones from the Malaysian medicinal plant, *Saprosma scortechinii* (Rubiaceae) *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* v. 50, pp. 1035-1040, 2002b.

Liu, X.T.; Pan, Q.; Shi, Y.; Williams, I.D.; Sung, H.H.Y.; Zhang, Q.; Liang, J.Y.; Ip, N.Y.; Min, Z.D. *ent*-Rosane and labdane diterpenoids from *Sagittaria sagittifolia* and their antibacterial activity against three oral pathogens. *Journal of Natural Products* v. 69, pp. 255-260, 2006.

Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum v. 1-2, p. 368, 1998.

Lozya, X. Balance Between man and Nature. *World health 1977 Folklore, Ethnomedical* v. 11, p. 8, 1977.

Lucena, J.E.X.; Bispo, M.D.; Nunes, R.S.; Cavalcanti, S.C.H.; Teixeira-Silva, F.; Marçal, R.M.; Antonioli, A.R. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16, pp. 67-72, 2006.

Mabberley, D.J. *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press, Cambridge. 1997.

Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga Jr., V.F.; Echevarria, A.; Grynberg, N.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* v. 25, pp. 429-438, 2002.

Macari, P.A.T.; Emerciano, V.P.; Ferreira, Z.M.G.S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* triana através de análise por microcomputador. *Química Nova* v. 13, pp. 260-262, 1990.

Maloney, K.N.; Fujita, M.; Eggert, U.S.; Schroeder, F.C.; Field, C.M.; Mitchison, T.J.; Clardy, J. Actin-aggregating cucurbitacins from *Physocarpus capitatus*. *Journal Natural Product*, v. 71, pp. 1927-1929, 2008.

Marques, V.L.L. *Derivados dicromenoxantônicos e terpenoídicos das raízes de Tovomita brasiliensis (Guttiferae)*. Maceió, p. 70. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas. 2001.

Marks, F.; Furstenberger, G. The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 11, p. 2085-92, 1990.

Mata, A.T.; Proença, C.; Ferreira, A.R.; Serralheiro, M.L.M.; Nogueira, J.M.F.; Araújo, M.E.M. Antioxidant and acetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry* v. 103, pp. 778-786, 2007.

Mata, R.; del Rayo Camacho, M.; Cervera, E.; Bye, R.; Linares, E. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* v. 29, pp. 2037-2040, 1990.

Mcdoweel, T.; Volovsek, M.; Manos, P. Biogeography of *Exostema* (Rubiaceae) in the Caribbean region in light of molecular phylogenetic analyses. *Systematic Botany* v. 28, pp. 431-441, 2003.

Mendonça, L.B.; Anjos, L. Flower morphology, nectar features, and humming bird visitation to *Palicourea crocea* (Rubiaceae) in the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* v. 78, pp. 45-57, 2006.

Mendoza, H.; Bernardo, R.; Ramírez, P.; Jiménez, L.C. Rubiaceae de Colômbia: guía ilustrada de géneros. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexandre von Humboldt p. 351, 2004.

Monte, F.J.Q.; Papa, S.M.A.; Kintzinger, J.P.; Braz-Filho, R. Total assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of two isomeric cucurbitane triterpenoids. *Magnetic Resonance Chemistry* v. 38, pp. 809-812, 2000.

Montoro, P.; Tuberoso, C.I.G.; Piacente, S.; Perrone, A.; De Feo, V.; Cabras, P.; Pizza, C. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* v. 41, pp. 1614-19, 2006.

Mueller, M.M. Inflammation in epithelial skin tumors: Old stories and new ideas. *European Journal of Cancer* v. 42, pp. 735-744, 2006.

Mukherjee, J., Sarkar, D., Sharma, A. Effects of dietary consumption of black tea infusion alone and in combination with known clastogens on mouse bone marrow chromosomes in vivo. *Food Chemical Toxicology, Oxford* v. 35, pp. 657-661, 1997.

Muhammad A.S.; Theeshan B.; Vidushi S.N.; Kreshna G.; Okezie L.A. Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae,

Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants. *Toxicology in Vitro* v. 22, pp. 45-56, 2008.

Murakawa, M.; Yamaoka, K.; Tanaka, Y.; Fukuda, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochemical Pharmacology* v. 71, pp. 1331-1336, 2006.

Nascimento, S.C.; Mello, J.F.; Chiappeta, A.D.A. Cytotoxic agents. Experiments with KB cells. *Revista do Instituto de Antibioticos, Univ Fed Pernambuco, Recife*, v. 22, pp. 19-26, 1985.

Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 338, PP. 668–676, 2005.

Noorozi, M.; Angerson, W.J.; Lean, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition* v. 67, pp. 1210-1218, 1998.

Noster, S.; Kraus, L.J. In Antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema Caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica* v. 56, pp. 63-65, 1990.

Oliveira, R.B.; Godoy, S.A.P.; Costa, F.B. Plantas tóxicas: conhecimentos básicos e prevenção de acidentes. *Ribeirão Preto: HOLOS* p. 64, 2003.

Olmedo, D.; Rodriguez, N.; Vasquez, Y.; Solis, P.N.; Lopez-Perez, J.L.; San Feliciano, A.; Gupta, M.P. A new coumarin from the fruits of *Coutarea hexandra*. *Natural Product Research, Part B: Bioactive Natural Products* v. 21, pp. 625-631, 2007.

Otuki, M.F.; Pietrovski, E.F.; Cabrini, D.A. Topical simvastatin: Preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. *Journal of Dermatological Science* v. 44, pp. 45-47, 2006.

Otuki, M.F.; Vieira-Lima, F.; Malheiros, A.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and β -amyryn pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* v. 507, pp. 253-259, 2005.

Parmar, V.S.; Jain, R.; Singh, S. Synthesis of New Naturally Occurring 4-phenyl-2H-1-benzopyran-2-ones. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* v. 61, pp. 2277-2279, 1988.

Pascual, G.; Glass, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 17, pp. 321-328, 2006.

Patente PI0201219-7. Marçal, Q.P. Uso de *Coutarea hexandra* Schum no tratamento de infecções virais. 04-11-2003.

Pereira, G.F. A família Rubiaceae *Juss.* na vegetação ripária de um trecho do alto Rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermacoceae. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá-PR, 2007.

Pereira, M.S.; Barbosa M.R.V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae1. *Acta Botanica Brasilica* v. 18, pp. 305-318, 2004.

Perez, R.M.; Ocegueda, G.A.; Munoz, J.L.; Avila, J.G.; Morrow, W.W. A study of the hypoglycemic effect of some Mexican Plants. *Journal Ethnopharmacology* v. 12, pp. 253-262, 1984.

Phillipson, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry* v. 68, pp. 2960 -2972, 2007.

Phuong, N.M.; Sung, T.V.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Merzweiler, K.; Adam, G. β -Carboline alkaloids from *Hedyotis capitellata*. *Phytochemistry* v. 52, pp. 1725-1729, 1999.

Pietrovski, E.F.; Magina, M.D.A.; Gomig, F.; Pietrovski, C.F.; Mücke, G.A.; Barcellos, M.; Pizzolatti, M.G.; Cabrini, D.A.; Brighente, I.M.C.; Otuki, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, pp. 479-487, 2008.

Piscitelli, S.C.; The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. *Clinical Infectious Diseases* v. 34, pp. 234-238, 2002.

Pompella, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* v. 67, pp. 289-297, 1997.

- Porto, M.L.; Callegari Jacques, S.M.; Sfoggiamiotto, S.T.; Waechter, J.L.; Detoni, M. Tribo Spermaceae. Rubiaceae I. In: Homrich, M.H. (Coord.). Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul. Boletim do Instituto Central de Biociências. Porto Alegre: Série Botânica 5 v. 35, p. 114, 1977.
- Poser, G.L.; Mentz, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2004.
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R.J. Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, v. 6, 2007.
- Rao, V.S.N.; Menezes, A.M.S.; Gadelha, M.G.T.; Antifertility Screening of some indigenous plants of Brazil. Fitoterapia v. 59, pp. 17-20, 1988.
- Rauh, L.K. Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam.) persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos. Dissertação de Mestrado em Farmacologia. 2008.
- Reguero, M.T.; Mata, R.; Bye, R.; Linares, E.; Delgado, G.; Chemical studies on Mexican Plants used in traditional medicine. II. Cucurbitacins from *Hintonia latiflora*. Journal Natural Product v. 50, pp. 315-316, 1987.
- Reher, G.; Kraus, L.J.; Sinnwell, V.; König, W. A. A neoflavonoid from *Coutarea hexandra* (Rubiaceae). Phytochemistry v. 22, pp. 1524-1525, 1983.
- Reher, G.; Kraus, L. New Neoflavonoids from *Coutarea latiflora*. Journal Natural Product v. 47, pp. 172-174, 1984.
- Rhee, I.K.; Van de Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination bioactivity staining. Journal of Chromatography A, v. 915, pp. 217-223, 2001.
- Rios, J.L.; Escandell, J.M.; Recio, M.C. New insights into the bioactivity of cucurbitacins. Studies in Natural Products Chemistry, (Bioactive Natural Products (Part L)), v. 32, pp. 429-469, 2005.
- Robbrecht, E. Tropical woody Rubiaceae. Opera Botanica Belgica v. 1, pp. 1-271, 1988.
- Roca, B. Rhabdomyolysis and hemolysis after use of *Coutarea latiflora*. American Journal of Medicine v. 115, pp. 677-677, 2003.

Sahpaz, S.; Gupta, M.P. Hostettmann, K. Triterpene saponins from *Randia formosa*. *Phytochemistry* v. 54, pp. 77-84, 2000.

Sánchez-Moreno, C.; Larrari, J.A.; Saura-calixto, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, pp. 270-276, 1998.

Sensch, K.H.; Zoukas, T. Process of manufacturing an extract from Copalchi bark and use of neoflavonoids there from for diabetes treatment. *Patent Eur, Chemical Abstracts* v. 950, pp. 15, 1998.

Silva, C.S.; Carvalho, J.C.T. Inflamação. Carvalho, J.C.T. In: *Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. São Paulo: Tecmedd, 2004.

Silva M.I.G.; Gondim A.P.S.; Nunes I.F.S.; Sousa F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 16, pp. 455-462, 2006.

Silva, M.J.M.; Pinheiro de Sousa, M.; Rouquayrol, M.Z. Molluscicidal activity of plants from Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 52, pp. 117-123, 1971.

Simmons, D.L. What makes a good anti-inflammatory drug target? *Drug Discovery Today* v. 11, pp. 210-219, 2006.

Skinner, R. Role of topical therapies in the management of cutaneous disease. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* v. 8, pp. 22-31, 2005.

Soares, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição* v. 15, pp. 71-81, 2002.

Soler-Rivas, C.; Espín, J.C.; Wichers, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* v. 11, pp. 1-9, 2000.

Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-JR, G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H. Fenóis totais e atividade de cinco plantas medicinais. *Química Nova* v. 30, pp. 351-355, 2007.

Souza, V.C.; Lorenzi, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

Subramanian, M.; Sreejayan; Rao M.N.A.; Devasagayam T.P.A; Singh, B.B. Diminution of singlet oxygen-induced damage by curcumin and related antioxidants. *Mutation Research* v. 311, pp. 249- 255, 1994.

Suffness, M.; Abbott, B.; Statz, D.W.; Wonilowicz, E.; Spjut, R. The utility of P388 leukemia compared to B16 melanoma and colon carcinoma 38 for *in vivo* screening of plant extracts. *Phytotherapy research* v. 2, pp. 89-97, 1988.

Suksamrarn, A.; Tanachatchairatana, T.; Kanokmedhakul, S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *Journal of Ethnopharmacology* v. 88, pp. 275-277, 2003.

Thomas, S.; Balasubramanian, K.A. Complications: involvement of free radicals. *Free Radical Biology & Medicine* v. 36, pp. 745-756, 2004.

Trevisan, M.T.S.; Macedo, F.V.V.; Van de Meent, M.; Rhee, I.K.; Verpoorte, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, v. 26, pp. 301-304, 2003.

Uchi, H.; Terao, H.; Koga, T.; Furue, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of Dermatological Science*, v. 24, pp. 29-38, 2000.

Valdir, F.V.J. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 18, pp. 308-313, Abr./Jun. 2008.

Valente, L.M.M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. *Química Nova* v. 27, pp. 944-948, 2004.

Veiga JR. V.F.; Maciel M.A.M.; Pinto A. C. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova* v. 28, pp. 519-528, 2005.

Viegas Junior, C; Bolzani, V.S.; Furlan, M.; Fraga, C.A.M.; Barreiro, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. *Química Nova* v. 27, pp. 655-660, 2004.

Vendruscolo, G.S.; Rates, S.M.K.; Mentz, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia* v. 15, pp. 361-372, 2005.

Xu, R-S.; Tang, Z-J.; Feng, S-C.; Yang, Y-P.; Lin, W-H.; Zhong, Q-X.; Zhong, Y. Studies on bioactives components from Chinese medicinal plants. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 86, Suppl. II, pp. 55-59, 1991.

Young, J.M.; De Young, L.M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. In: Chang, J.Y.; Lewis, A.J. (Eds.). Modern methods in pharmacology 5. Pharmacological methods in the control of inflammation. Alan R. Liss, New York, NY. pp. 215-231, 1989.

Winkelman, M. Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. Journal Ethnopharmacology v. 18, pp. 109-131, 1986.

Winkelman, M. Ethnobotanical treatments of diabetes in Baja California Norte. Medical anthropology v. 11, pp. 255-268, 1989.

Wilnyard, P.G. e Willoughby, D.A. Inflammation protocols, New Jersey: Humana Press, pp. 129-131, 2003.

Wurm, M.; Kacani, L.; Laus, G.; Keplinger, K.; Dierich, M.P. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factor. Planta Medica v. 64, pp. 701-704, 1998.