



Ministério da Educação
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Departamento de Química
Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado
em Química

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM *TABEBUIA INSIGNIS* (BIGNONIACEAE)

RUTE ALVES PINTO

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química (Área: Química Orgânica).

Orientador: Prof^o. Dr. Joaquim Corssino

CAMPO GRANDE – MS
2008



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

**TERMO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DE
RUTE ALVES PINTO
“ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA EM *TABEBUIA INSIGNIS*
(BIGNONIACEAE)”**

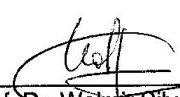
Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação – Nível de Mestrado em Química (Resolução nº 16/2008) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Química – Área de Concentração: Química Orgânica.

Aprovada Por:



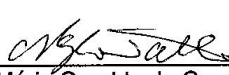
Prof. Dr. Joaquim Corsino

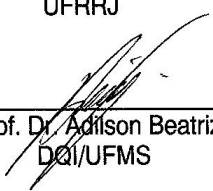
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora
DQI/UFMS



Prof. Dr. Waldir Silva Garcez

Co-orientador
DQI/UFMS



Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho
UFRRJ

Prof. Dr. Adilson Beatriz
DQI/UFMS

Campo Grande, 25 de julho de 2008.

“O temor do Senhor é o
princípio do saber...”
(Provérbios 1:7)

Ao meu querido esposo
Jonas, em quem confio,
admiro e amo!

Aos meus filhos Calebe e
Abner pelo carinho, amor e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

À minha família, Jonas, Calebe e Abner pelo amor, carinho, compreensão e incentivos dispensados ao longo do curso.

Aos meus pais, José e Delarcy pelo amor, carinho.

Ao professor Dr. Joaquim Corsino pela orientação e amizade.

Aos professores Dr. Walmir Silva Garcez e Dr. Fernanda Rodrigues Garcez pelos ensinamentos e amizade.

À professora Ubirazilda M. Rezende pela identificação da planta.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Química pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do curso pelo companheirismo e amizade.

Aos servidores, estagiários e bolsistas do Departamento de Química que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

Aos órgãos de pesquisa CNPq, FUNDECT, CAPES e PROPP/UFMS.

SUMÁRIO

Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas e esquemas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
Substâncias Isoladas de <i>Tabebuia insignis</i>	xv
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – Descrições da Família Bignoniaceae.....	03
1.2 – Gênero <i>Tabebuia</i> : Aspectos e composição química.....	06
1.3 – Alguns exemplos de substâncias isoladas do gênero <i>Tabebuia</i>	10
1.4 – <i>Tabebuia insignis</i> (Bignoniaceae).....	14
2 – OBJETIVOS.....	17
3 – MATERIAIS.....	18
4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	19
4.1- Estudo fitoquímico da casca do caule de <i>Tabebuia insignis</i>	19
4.1.2 - Fracionamento da fração diclorometânica do extrato etanólico da casca do caule.....	20
4.1.3 - Fracionamento da fração acetato de etila do extrato etanólico da casca do caule.....	21
4.1.4 - Fracionamento da fração metanólica do extrato etanólico da casca do caule.....	24
4.1.5 - Fracionamento de uma fração originada da fração hidrometanólica, do extrato etanólico das folhas de <i>T. insignis</i>	26

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 - Identificação do Iridóide - catalpol (7).....	27
5.2 - Identificações do Iridóide 6- <i>O-E-p</i> -cumaroil-catalpol (9).....	35
5.3 - Identificação do 2-(4-hidroxifenil) etanol (tirosol) (5).....	43
5.4 - Identificação do Ácido Cumárico (6).....	47
5.5 - Identificação da Substância (2).....	51
5.6 - Identificação do 2(4-hidroxifenil)etil 1- <i>O</i> - β -D-apiofuranosil-(1-6)- β - D- glicopiranosideo (8).....	56
5.7 – Identificação do Ácido Betulínico (4).....	64
5.8 - Identificações do β -Sitosterol esterificado(1).....	68
5.9 - Identificação do β -Sitosterol (3).....	72
5.10 - Identificação da Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosíde (10).....	76
6 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	83
6.1 – Ensaio antioxidante utilizando-se β -caroteno.....	83
6.1.2 - Ensaio utilizando-se 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH).....	83
7 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	87
7.1 - Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	87
7.2 - Atividade tóxica utilizando-se <i>Artemia Salina</i>	89
8 – CONCLUSÃO.....	91
9- REFERÊNCIA.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Substâncias isoladas da espécie de <i>Tabebuia insignis</i> (Bignoniaceae)....	xi
Figura 2 - Aspectos das folhas, flores e frutos de algumas espécies pertencentes à família Bignoniaceae.....	5
Figura 3 – Furanonaftoquinonas isoladas no gênero <i>Tabebuia</i>	10
Figura 4 – Iridóides isolados no gênero <i>Tabebuia</i>	11
Figura 5 - Flavonóides isolados no gênero <i>Tabebuia</i>	12
Figura 6 – Triterpenos e outros metabólitos isolados no gênero <i>Tabebuia</i>	13
Figura 7 - Ocorrência de <i>Tabebuia insignis</i> (Bignoniaceae).....	15
Figura 8 - Exemplar de <i>Tabebuia insignis</i> (Fonte - Missouri Botanical Garden).....	15
Figura 9 - Substâncias isoladas da fração diclorometano e acetato de etila oriundas da casca do caule de <i>T. insignis</i>	23
Figura 10 - Substâncias isoladas da fração metanólica da casca do caule de <i>T. insignis</i>	25
Figura 11 - Substância isolada da fração hidrometanólica das folhas <i>T. insignis</i>	26
Figura 12 - Espectro de RMN ^1H da substância 7 (CD_3OD , 300 MHz).....	30
Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 7 (CD_3OD , 75 MHz).....	30
Figura 14 - Espectro de DEPT 135° da substância 7 (CD_3OD , 75 MHz).....	31
Figura 15 – Espectro de RMN- ^1H - ^1H COSY 90° da substância 7 (CD_3OD , 300 MHz).....	32
Figura 16 - Espectro de RMN-HSQC da substância 7 (CD_3OD , 75 MHz).....	33
Figura 17 – Espectro de RMN-HMBC da substância 7 (CD_3OD , 75 MHz).....	34
Figura 18 - Espectro de RMN ^1H da substância 9 (CD_3OD , 75 MHz).....	38
Figura 19 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 9 (CD_3OD , 75 MHz).....	38

Figura 20 - Espectro de RMN de DEPT 135° da substância 9 (CD ₃ OD, 75 MHz)..	39
Figura 21 – Espectro de IV da substância 9 (Pastilha de KBr).....	39
Figura 22 – Espectro de RMN- ¹ H- ¹ H COSY 90° da substância 9 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	40
Figura 23 – Espectro de RMN-HSQC da substância 9 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	41
Figura 24 – Espectro de RMN-HMBC da substância 9 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	42
Figura 25 - Espectro de RMN ¹ H da substância 5 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	45
Figura 26 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 5 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	45
Figura 27 - Espectro de DEPT 135° da substância 5 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	46
Figura 28 – Espectro de IV da substância 5 (Pastilha de KBr).....	46
Figura 29 - Espectro de RMN ¹ H da substância 6 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	49
Figura 30 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 6 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	49
Figura 31 - Espectro de DEPT 135° da substância 6 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	50
Figura 32 - Espectro de infravermelho da substância 6 em pastilha de KBr.....	50
Figura 33 - Espectro de RMN ¹ H da substância 2 (CDCl ₃ , 300 MHz).....	53
Figura 34 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 2 (CDCl ₃ , 75 MHz).....	53
Figura 35 - Espectro de RMN de DEPT 135° da substância 2 (CDCl ₃ , 75 MHz)....	54
Figura 36 – Espectro de RMN- ¹ H- ¹ H COSY da substância 2 (CDCl ₃ , 300MHz).....	55
Figura 37 – Espectro de IV da substância 2 em pastilha de KBr.....	55
Figura 38 - Espectro de RMN ¹ H da substância 8 (CD ₃ OD, 300 MHz).....	59
Figura 39 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 8 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	59
Figura 40 - Espectro de DEPT 135° da substância 8 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	60
Figura 41 - Espectro de Infrvermelho da substância 8 (Pastilha de KBr).....	60
Figura 42 – Espectro RMN- ¹ H- ¹ H COSY 90° da substância 8 (CD ₃ OD, 300 MHz)	61
Figura 43 – Espectro de RMN-HMBC da substância 8 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	62
Figura 44 – Espectro de RMN-HSQC da substância 8 (CD ₃ OD, 75 MHz).....	63

Figura 45 - Espectro de RMN ^1H da substância 4 (CD_3OD , 300 MHz).....	66
Figura 46 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 4 (CD_3OD , 75 MHz).....	66
Figura 47 - Espectro de DEPT 135° da substância 4 (CD_3OD , 75 MHz).....	67
Figura 48 - Espectro de RMN ^1H da substância 1 (CD_3OD , 300 MHz).....	70
Figura 49 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 1 (CD_3OD , 75 MHz).....	70
Figura 50 - Espectro de DEPT 135° da substância 1 (CD_3OD , 75 MHz).....	71
Figura 51 - Espectro de RMN ^1H da substância 3 (CDCl_3 , 300 MHz).....	74
Figura 52 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 3 (CDCl_3 , 75 MHz).....	74
Figura 53 - Espectro de DEPT 135° da substância 3 (CDCl_3 , 75 MHz).....	75
Figura 54 - Espectro de RMN ^1H da substância 10 (CD_3OD , 300 MHz).....	79
Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 10 (CD_3OD , 75 MHz).....	79
Figura 56 - Espectro de DEPT 135° da substância 10 (CD_3OD , 75 MHz).....	80
Figura 57 – Espectro de RMN-HSQC da substância 10 (CD_3OD , 75 MHz).....	81
Figura 58 – Espectro de RMN-HMBC da substância 10 (CD_3OD , 75 MHz).....	82
Figura 59 – Percentual da atividade antioxidante em função da concentração do extrato etanólico do cerne, folhas, cascas e substâncias puras (tirosol, FM 5-5, rutina, <i>p</i> -cumaroilcatalpol) em <i>Tabebuia insignis</i> , utilizando-se como controle positivo ácido cafeico.....	86

ÍNDICE DE TABELAS E ESQUEMAS

Esquema 1: Extração em etanol e coluna filtrante com eluentes em polaridade crescente da casca do caule de <i>T. insignis</i>	19
Esquema 2 - Fracionamento da fração de diclorometano da casca do caule de <i>T. insignis</i>	20
Esquema 3 - Fracionamento da fração de acetato de etila da casca do caule de <i>T. insignis</i>	21
Esquema 4 – Fracionamento da fração de acetato de etila, da casca do caule de <i>T. insignis</i> utilizando-se coluna de fase reversa.....	22
Esquema 5 – Fracionamento da fração metanólica da casca do caule de <i>T. insignis</i> .	24
Tabela 1 – Aspectos representativos da família Bignoniaceae.....	04
Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) da substância 7...	29
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 75 e 300 MHz) obtidos da substância 9.....	37
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) obtidos da substância 5.....	44
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 75 e 300 MHz) obtidos da substância 6.....	48
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 75 e 300 MHz) obtidos da substância 2.....	52
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni. e bidimensionais (300 e 75 MHz) da substância 8.....	58
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) obtido da substância 4, e comparado com a literatura (Siddiqui <i>et al.</i> ; 1988).....	65
Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) obtidos para 1.....	69
Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) obtidos de 3 e comparados com a literatura (Saxena e Albert, 2005).....	73

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 75 e 300 MHz) obtidos da substância 10	78
Tabela 12 – Determinação da capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – acetato de etila

CC – cromatografia em coluna

CCDA – cromatografia em camada delgada analítica

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CD₃OD – metanol deuterado

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

d – dubleto

dd - duplo dubleto

DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer

EtOH – etanol

HMBC – heteronuclear multiple-bond connectivity

HMQC – heteronuclear multiple quantum coherence

Hz – hertz

IV – infravermelho

J – constante de acoplamento

m – multiplete

Me – metila

MeOH – metanol

MHz – megahertz

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

s – singleto

t – tripleto

APA- área de preservação ambiental

R_f – Relação entre a distância percorrida pela amostra/padrão e a distância percorrida pelo solvente/eluyente.

RESUMO

Tabebuia insignis é uma planta da família Bignoniaceae, conhecida como paratudo-branco, ipê branco. A planta coletada no APA do Guariroba em Campo Grande – MS foi identificada pela Prof. Ms. Ubirazilda Maria Rezende do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, onde uma exsicata da espécie foi depositada sob o número, 17664. O extrato etanólico da casca do caule de *T. insignis*, foi submetido à coluna cromatográfica filtrante à vácuo, utilizando-se como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. As frações obtidas foram cromatografadas em coluna de sílica gel normal e de fase reversa, Sephadex LH-20 e monitoradas através de cromatografia de camada delgada analítica.

Do fracionamento das cascas do caule obtiveram-se nove compostos: *O*-acil- β -sitosterol esterificado (1), *O*-acil-ariletanóide (2), β -sitosterol (3), ácido betulínico (4), 2-(4-hidroxifenil) etanol (5), Ácido cumárico (6), catalpol (7), 2-(4-hidroxifenil)etil *O*- β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D- glicopiranosídeo (8), 6-*O*-*E*-*p*-cumaroil-catalpol (9) e, da fração metanólica das folhas, obteve-se a 3-*O*-rutinosil quercetina (10). Estes compostos estão sendo relatados pela primeira vez em *Tabebuia insignis*.

O extrato etanólico bem como as substâncias isoladas foi avaliado quanto às atividades antioxidantes, antibacteriana, antitumoral e antifúngica. Os compostos obtidos já foram encontrados em outras plantas e apresentam importantes atividades farmacológicas. Entretanto, na espécie em questão não há registro de estudo fitoquímico na literatura sendo este o primeiro relato.

A elucidação estrutural de todas as substâncias foi realizada através da análise de espectros de IV, RMN de ^1H e ^{13}C (unidimensional e bidimensional).

ABSTRACT

Tabebuia insignis is a plant of the family Bignoniaceae typical of tropical and subtropical areas commonly known in Brazil as ipê-branco, lapacho, taheboo, and pau d' arco. The plant were collected in APA do Guariroba (Campo Grande – MS) Brazil and the identification was verified by Ms. Ubirazilda Rezende and exsiccates deposited in herbarium UFMS.

Air-dried and powdered trunk bark of *T. insignis* was extracted at room temperature with ethanol. After concentration in vacuo, the ethanol extract was successively subjected to column chromatographic separations on silica gel using themselves as eluents hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol.as well as, Sephadex LH-20 and RP-18 silica.

The study of the stem bark resulted in isolation of two steroids: β -Sitosterol with linkage not identified in C-3 (**1**), β -Sitosterol (**3**), one triterpene: betulinic acid (**4**), three aryl ethane: (**2**), 2 - (4-hydroxyphenyl)ethanol (**6**) and 2(4-hidroxifenil)etil O- β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D- glucopiranoside (**8**), two iridoids: 6-O-E-p-cumaroil-catalpol (**7**), catalpol (**8**) and one aryl propane: coumaric acid (**5**). The leaves of *T. insignis* resulted in isolation of one flanonoid: Quercetina-3-O-rutinoside (**10**).

The ethanolic extract and substances isolated of the bark was evaluated the antioxidant activity using the dpph and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida aubicans*. To evaluate the toxicity used to *Artemia salina*

The structure elucidation these substances had been identified on the basis of given spectral for NMR ^1H and ^{13}C , including 2D-NMR experiments (COSY 90°, HSQC, HMBC).

SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *TABEBUIA INSIGNIS*

No presente trabalho isolaram-se nove substâncias da casca do caule de *Tabebuia insignis* e uma substância das folhas, as quais estão relacionadas abaixo.

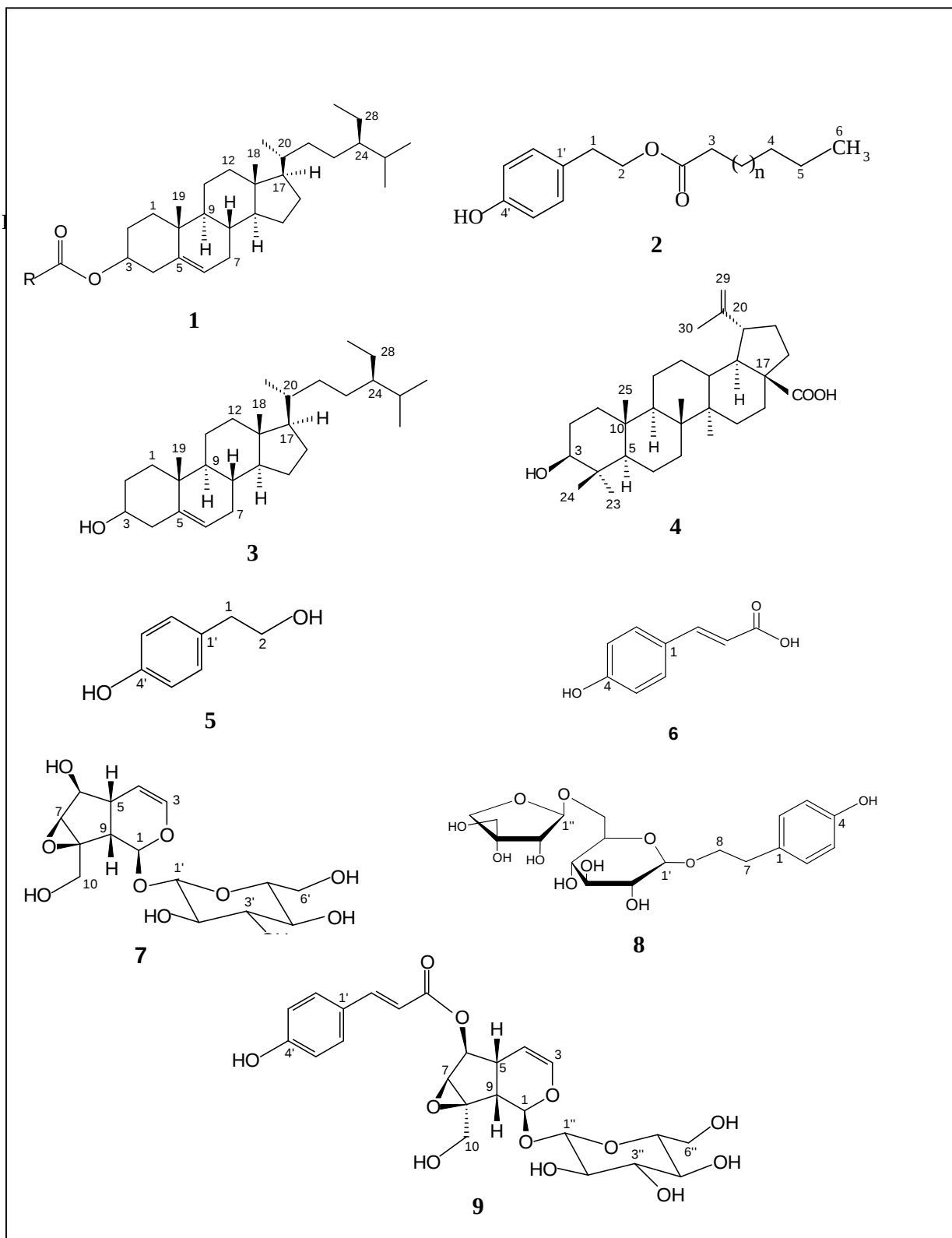


Figura 1 – Substâncias isoladas da espécie *T. insignis* (Bignoniaceae)

1- INTRODUÇÃO

A utilização de recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças, é tão antiga quanto a espécie humana. Há aproximadamente 3000 a.C. os sumérios já utilizavam receitas à base de ervas, sendo considerado o tratado mais antigo do mundo. Os sedativos já eram conhecidos pelos egípcios a 1600 a.C. e há cerca de 5000 anos os chineses já utilizavam a *Ephedra*, da qual se extrai a efedrina, substância usada para asma brônquica (VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

Gabriel Soares de Souza, cronista da história brasileira, e autor do “Tratado descritivo do Brasil”, 1576, denominava os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Nessa época, além dos remédios utilizados na terapêutica médica, os portugueses também extraíam corantes do pau-brasil, por mais de dois séculos, principal motivo da colonização do Brasil pelos portugueses (PINTO, 2002).

O desenvolvimento da fitoquímica no Brasil deve-se a Theodoro Peckolt, naturalista e farmacêutico alemão, que em 1847 estudou a botânica e morfologia de duas mil plantas, o seu uso farmacêutico e alimentar. Ele apresentou análises químicas das folhas, cascas e flores de 285 plantas (SANTOS, 2005).

O homem tem extraído diversos recursos da natureza, e com isso tem provocado várias transformações nos ecossistemas terrestres, principalmente no ecossistema florestal (Flores, 1993). Na década de 1990, cerca de 11 milhões de hectares de florestas tropicais sofrem a conversão de suas terras para a agricultura, pecuária e outros usos (GOMES-POMPA & BURLEY, 1991; FLORES, 1993).

Nas florestas tropicais encontram-se alta biodiversidade, sendo dois terços das espécies do planeta inserido neste ecossistema. Estima-se que 10 % dos 1,4 milhões de organismos conhecidos pela ciência estão no território brasileiro (ALMEIDA, 2000).

Das cinco áreas de grande abundância de plantas nativas do Brasil, destaca-se o bioma Cerrado, sendo o segundo maior em área do país, ocupando 23 % do território nacional (RIBEIRO & WALTER, 1998). Este bioma possui grande diversidade biológica, apresentando, no total, 6.671 táxons nativos, distribuídos em 170 famílias e 1140 gêneros (MENDONÇA *et al.*, 1998). Apesar dos avanços da pesquisa, acredita-se que a flora do bioma do Cerrado ainda é pouco conhecida.

A identificação de plantas úteis no Cerrado ainda é de enorme carência, tornando-se esta questão preocupante, visto que cerca de 40 % do bioma já foi devastado (RATTER *et al.*,

1997). Apenas 1,5 % do Cerrado são protegidos por lei, sendo considerado atualmente a vegetação com maior risco no país (KAPLAN *et al.*, 1994).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, sendo 120 compostos de origem vegetal obtidos de aproximadamente 90 espécies de plantas as quais são utilizadas na terapia moderna. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44 % de todas as novas drogas em consumo no mercado (CRAGG *et al.*, 1997).

Dados demonstram que cerca de 80 % da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais como fonte única de recurso terapêutico. Vários processos são executados na pesquisa sistemática para a obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica, como a síntese de novas moléculas, a modificação de substâncias naturais ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, extração, isolamento e purificação de novos compostos de fontes naturais. O caráter multidisciplinar que envolve a pesquisa com plantas medicinais faz com que haja eficiência no desenvolvimento dos trabalhos executados, assim como maior credibilidade científica e menor probabilidade de erros (DI STASI, 1996). Assim, estudos que relacionem a atividade biológica com as substâncias isoladas, por meio de estudo fitoquímico são de importância imensurável, e neste trabalho tem-se desenvolvido este tipo de estudo com a espécie *Tabebuia insignis*.

1.1 - DESCRIÇÕES DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE

A família Bignoniaceae, pertencente à ordem Lamiales, consiste de aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies (tabela 1). As espécies de *Tabebuia* pertencente a esta família, são caracterizadas como plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras. Apresentam folhas compostas raramente simples, de disposição oposta. Suas flores são grandes e vistosas, diclamídeas, hermafroditas, pentâmeras, de simetria zigomorfa (JOLY, 1975) (Figura 2). São encontradas em regiões da América do Sul e África. Plantas do gênero *Tabebuia* (Bignoniaceae) são largamente estudadas, destacando-se dentre elas, *Tabebuia impetiginosa* (KOYAMA, *et al.*, 2000), *Tabebuia avellanedae* (NAKANO, *et al.*, 1993) (Zani, *et al.*, 1991), *Tabebuia incana* (MANNERS & JURD, 1976), *Tabebuia guayacan* (KOYAMA, *et al.*, 2000; MANNERS & JURD, 1976), *Tabebuia cassinoides* (KINGSTON & RAO, 1980) e *Tabebuia ochracea* (NAKANO, *et al.*, 1993). O estudo fitoquímico destas espécies apresentou como compostos majoritários, as naftoquinonas, furanonaftoquinonas e lapachol (GORMANN *et al.*, 2003; KOYAMA *et al.*, 2000 e MANNERS & JURD, 1976), substâncias estas utilizadas na América do Sul e Norte, por muitos anos, como uma droga com atividade anticancerígena (HIRAI, *et al.*, 1999), antibacteriana (PARK *et al.*, 2005), antimalarial e antitumoral (MORAIS *et al.*, 2007). Outras substâncias têm sido isoladas, tais como ácido benzóico; derivados de benzaldeído (KOYAMA, *et al.*, 2000), iridóides glicosilados e 6-O-acil ajugol (NAKANO, *et al.*, 1993).

Devido à gama de atividades biológicas demonstradas pelas naftoquinonas e lapachol alguns grupos de pesquisa têm intensificado seus estudos com estas espécies vegetais. Contudo torna-se relevante o estudo fitoquímico da espécie *Tabebuia insignis*, por não terem sido observados, na literatura, estudo fitoquímico relacionado a esta espécie vegetal. Além disso, essa espécie tem sua distribuição mais restrita ao Cerrado do Centro-Oeste do Brasil, encontrada principalmente em áreas de veredas. É considerada uma espécie rara e tem sido procurada por fitoquímicos especialistas em espécies de Bignoniaceae por muito tempo. Recentemente, DIAS (2004), detectou durante um levantamento florístico da flora da Bacia do Guariroba (Campo Grande – MS), alguns espécimes dessa planta. Pela sua estreita distribuição, acredita-se ser relevante o estudo fitoquímico da espécie *Tabebuia insignis* e também pelo histórico de substâncias bioativas já encontradas em outras representantes da família Bignoniaceae.

Tabela 1 - ASPECTOS REPRESENTATIVOS DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE

GÊNERO	ASPECTOS REPRESENTATIVOS
<i>Anemopaegma arvense</i>	Arbusto perene, conhecido popularmente como alecrim-do-campo, catuaba, verga-teso, pau-de-resposta dentre outros, utilizada para fins medicinais contra insônia, neurastenia, nervosismo, falta de memória e para convalescença de doenças graves (ALZUGARAY, 1996). É encontrada nos cerrados do Brasil Central.
<i>Arrabidaea chica</i>	Arbusto de ramos escandentes, nativo de quase todo o Brasil. É conhecida como cajú, guagiru, cipó-cruz, cajirú, pariri, dentre outros. Utilizada para ornamentação e como medicinal para tratamento de doenças da pele como micose e herpes (TAYLOR, L., 1998), anemia, espasmos intestinais, anemia, albuminúria, psoríase e enterocolite (MORS <i>et al.</i> , 2000; CHAPMAN <i>et al.</i> , 1927; VIEIRA, L. S., 1992).
<i>Crescentia cujete</i> L.	Árvores nativas da América tropical são conhecidas como cuieira, cuieté, cuia e coité. É utilizada como utensílios domésticos e na medicina popular para hidropsia e enterite membranosa, tratamento de afecções respiratórias e anemia (MORS <i>et al.</i> , 2000; VIEIRA, L. S., 1992).
<i>Callichlamys latifolia</i>	Trepadeira típica de mata ciliar pouco alagável, solos arenosos e férteis. É encontrada na Amazônia, Mato Grosso, Rio de Janeiro (CORREA, 1926), Colômbia (GENTRY, 1992) e muito utilizada para ornamentação.
<i>Cuspidaria cf. lateriflora</i>	Gênero do Brasil com grande potencial ornamental (DIMETRI, 1972), apresenta-se como cipó e encontrada em caapão e borda de cerradão e solos arenosos (DUBS, 1993; ESTEVES, 1980).
<i>Jacaranda cuspidifolia</i>	Árvore conhecida popularmente como caroba, é comum no cerrado (GENTRY, 1982), matas (HUECK, 1972), solos arenosos ou argilosos. É encontrada no Brasil (CORREA, 1974; LORENZI, 1992), Paraguai, Argentina (DIMETRI, 1972) e Bolívia (GENTRY, 1982). Tem propriedade inseticida (Grainge <i>et al.</i> , 1985), antitérmica (CORREA, 1974) e diarreia (HOEHNE, 1923).
<i>Macfadyena unguis-cati</i>	Trepadeira conhecida como cipó-unha-de-gato, é muito utilizada na medicina popular como diurético, para febre, reumatismo, sífilis (BALBACHI, 1969) e picada de cobra. É encontrada na América tropical e subtropical do México e Argentina (BRAGA, 1976; DIMITRI, 1972; BURKART, 1979).
<i>Mansoa alliacea</i>	Trepadeira nativa em quase todas as regiões tropicais do Brasil, principalmente Amazônia. Conhecida como cipó-alho, cipó-d'alho é utilizada na medicina caseira como analgésica, antipirética e anti-reumática (REVILLA, L. 2001).
<i>Pithecoctenium crucigerum</i>	Encontrada na América tropical, México, Brasil, Paraguai e Argentina (BRAGA, 1976; SANDWICH & HUNT, 1974). Apresenta-se em forma de cipó e conhecida como pente-de-macaco, utilizada para ornamentação, artesanato e forrageira de emergência e de freqüente ocorrência no cerradão, solos arenosos e argilosos (POTT <i>et al.</i> , 1986; PRANCE <i>et al.</i> , 1982).



Crescentia cujete L



Macfadyena unguis-cati



Anemopaegma arvense



Tabebuia avellanedae



Jacaranda cuspidifolia



Melloa quadrivalvis



Tabebuia aurea



Tabebuia nodosa



Tabebuia roseo-alba

Figura 2 - Aspectos das folhas, flores e frutos de algumas espécies pertencentes à família Bignoniaceae.

Fonte: LORENZE E MATOS, 2002; POTT E POTT, 1994.

1.2- GÊNERO *TABEBUIA*: ASPECTOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Entre as plantas encontradas na família Bignoniaceae, destacam-se o gênero *Tabebuia* com aproximadamente 60 espécies. São encontradas nas regiões tropicais e conhecidas por apresentarem flores grandes, coloridas e vistosas, além de troncos tortuosos e casca espessa, sendo por isso utilizada na arborização urbana, em parques e jardins. São também utilizadas na medicina popular para a cura de várias doenças.

Algumas características gerais, localização, composição química e atividades biológicas de algumas espécies estão descritas a seguir.

- *Tabebuia heptaphylla* (sin. *T. avellanadae*)

Conhecida como piúva, piúva-do-pantanal, é encontrada em todo Pantanal, mata atlântica, da Bahia ao Rio Grande do Sul (GENTRY, 1992; LORENZI, 1992), Paraguai, Argentina e chaco úmido da Bolívia (GENTRY, 1992). Sua madeira é dura e muito utilizada para construção de pontes e curral. É ornamental (ipê-rosa) e utilizada na medicina popular como bactericida, contra câncer, problemas estomacais, e alívio de dor (RIZZINI, 1976; MARX, 1989).

Há registros na literatura de apenas três trabalhos com esta espécie. No Rio Grande do Sul o estudo químico das folhas desta planta resultou no isolamento do iridóide 6-*p*-hidroxibenzoil-6-epi-aucubina (**11**) (Figura 3, página 10) (POSER *et al.*, 2000). Da casca do caule desta espécie adquirido no Paraguai, foram isolados naftoquinonas, lignanas, prenil-naftalenos e outros compostos aromáticos (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2003).

Recentemente, Garcez e colaboradores (2007) isolaram da casca do caule de *T. heptaphylla* catorze substâncias, dentre elas a Vitexina (**29**), (-)-epicatequina (**30**) (Figura 5, página 12), os iridóide 8 α -metil-8 β -hidroxi-6 β -O-4'-hidroxi-benzoil-1 α ,3 α -dimetóxi-octaidro-ciclopenta[c]pirano (**24**), 8 α -metil-8 β -hidroxi-6 β -(3',4'-hidroxi)benzoilóxi-1 α ,3 α -dimetóxi-octaidro-ciclopenta[c]pirano (**25**) (Figura 4, página 11) e o glicosídeo fenil etanólico 1- β -(3,4-diidroxifenil)-etil-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-(4'-O-cafeoil)-glucopiranosídeo (**36**) conhecido como verbascosídeo (Figura 6, página 36). Dentre os compostos isolados a substância 8 α -metil-8 β -hidroxi-6 β -O-4'-hidroxi benzoil-1 α ,3 α -dimetóxi-octaidro-ciclopenta[c]pirano apresentou maior atividade antioxidante no ensaio com β -caroteno.

- *Tabebuia aurea* (sin. *Tabebuia caraíba*).

Árvore ornamental, com flores amarelas e comestíveis típicos da região do Cerrado, Caatinga e Pantanal Matogrossense conhecida como paratudo, caraibeira, caroba-do-campo, dentre outras. Sua madeira é empregada na confecção de cabos de ferramentas, artigos esportivos, móveis e esquadrias. Utilizada na medicina popular para hepatite, anemia, vermes, gripe, inflamações (LORENZI & MATOS, 2002).

O estudo fitoquímico das cascas, folhas e cerne desta espécie, realizado por GUERBAS (2003) resultou no isolamento de dezessete compostos pertencentes a quatro classes químicas: esteróides, flavonóides, nor-iridóides e terpenos. Foram isolados das cascas cinco triterpenos (β -amirina, olean-12-em-3-ona e os ácidos oleanóico, betulínico e siaressinóico), um sequiterpeno (ácido cóstico), um esteróide (β -Sitosterol) e dois nor-iridóides (especiosídeo e desacilespecionina). Das folhas foram isolados os triterpenos ácido ursólico, maslínico (33) (Figura 6, página 13) e 2-epi-tormêntico, e o flavonóide luteolina (27) (Figura 5, página 12). Do cerne do vegetal isolaram-se o triterpeno 2-epi-tormêntico e os nor-iridóides 6-O-3'',4''-dimetoxibenzoil ajugol, 6-O-3'',4''-dimetoxibenzoil catalpol, ajugol e especiosídeo.

O estudo fitoquímico das flores e cascas do caule de *Tabebuia caraíba* realizado por SOARES (2006) resultou no isolamento de vinte e um compostos pertencentes a cinco classes químicas: iridóides (nor-iridóides), triterpenos, ariletanóides, arilpropanóides e esteróides. Os iridóides 6-O-E-*p*-cumaroil-Jioglutina D, 6-O-E-*p*-cumaroil-1-metil-3-etil-jioglutina D, remaglutina D e 7-O-E-*p*-cumaroil-jiiofuranal, isolados das flores descritos pela primeira vez na espécie.

As folhas de *T. aurea*, também foram estudas por Blatt e colaboradores (1996) que resultou no isolamento dos flavonóides 6-hiroxiluteolina, luteolina-7-O-glucosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo (28) (Figura 5, página 12), quercetina-3-O-galactosídeo, rutina e quercetina-3-O-diglicosídeo (galactose e raminose).

- *Tabebuia impetiginosa*

Esta espécie é encontrada em matas semidecíduas, cerradão, solos arenosos ou argilosos e férteis (ALLEM, 1987; BERG, 1986; RATTER, 1997). Conhecida como ipê-roxo, é utilizada na construção civil, hidráulica e marcenaria. Na medicina popular é utilizada contra câncer, impetigo, inflamações dentre outras.

Existem vários trabalhos na literatura sobre o estudo fitoquímico desta espécie. Dentre eles, destacam-se os trabalhos realizados por Warashina e colaboradores (2004), que isolaram da casca de *T. impetiginos* dezenove substâncias, dentre elas, cita-se o 2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (**14**) (Figura 3, página 10), 2-formil-5-(3',4'-dimetoxibenzoilóxi)-3-metil-2-ciclopenteno-1-acetaldeído(**24**), 6-*O*-(4-metoxibenzoil)-5,7-bisdeoxicinancosideo (**18**), 10-*O*-(4-metoxibenzoil)-impetinosideo (**19**) e 6-*O*-*p*-(metoxibenzoil)-ajugol (**20**), 6-*O*-(3,4,5 trimetóxicibenzoil)-ajugol (**22**), 6-*O*-(3,4 dimetóxicumaroil)-ajugol (**23**) (Figura 4, página 11).

Foram descritos também, da casca de *T. impetiginosa* cinco compostos voláteis, o 4-metoxibenzaldeído, 4-metoxifenol, 5-alil-1,2,3-trimetoxibenzeno, 1-metoxi-4-(1*E*)-1-propenilbenzeno e 4-metoxibenzoil álcool (POSER *et. al.*, 2003). Os constituintes voláteis foram testados quanto à atividade antioxidante, sendo o teste positivo. A inibição do crescimento da bactéria *Clostridium paraputrificum*, encontrada no intestino humano, pelos compostos antraquinona-2-ácido carboxílico e lapachol, isoladas das cascas de *T. impetiginosa*, foram descritos por Park e colaboradores (2005).

- *Tabebuia ochracea*

Árvore ornamental (flor amarela), conhecida como piúva-cascuda, piúva-cabeluda. É comum nas matas e capões, sendo utilizada na medicina popular para doenças venéreas e rins. Sua madeira dura e pesada é utilizada em construção externa, tornearia, instrumentos musicais (MAINIERI, 1978).

O estudo fitoquímico da casca do caule desta espécie foi realizado por Zani e colaboradores (1991), resultando no isolamento do β -Sitosterol, cicoolivil, lapachol e sete furanonaftoquinonas. Diaz e Medina (1996) estudaram o extrato clorofórmico da casca do caule de *T. ochracea* e isolaram duas novas substância, 5,8 dihidroxi-2-(1'-hidroxietil) nafto [2,3-*b*] furano-4,9-diona (**11**), 2 acetil-7-metoxi-8-hidroxi-nafto [2,3-*b*] furano-4,9-diona (**12**) (Figura 3, página 10) além de outras furanonaftoquinonas conhecidas. O extrato clorofórmico desta planta mostrou citotoxicidade contra células mellanoma B16, além de atividade antimalarial *in vitro* contra *Plasmodium berghei*.

- *Tabebuia incana*

Conhecida como pau d'arco, esta espécie é encontrada na região amazônica e utilizada na medicina popular para a cura de várias doenças. Moraes e colaboradores (2007) estudaram a composição fitoquímica da casca desta espécie e isolaram em mistura as substâncias 8-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto [2,3-b] furano-4,9 diona e 5-hidroxi-2-(1-hidroxietil) nafto [2,3-b] furano-4,9 diona. Essas substâncias foram avaliadas quanto à atividade biológica e apresentaram atividade antimalárica e antitumoral *in vitro*.

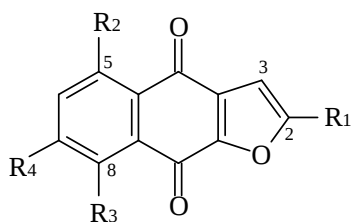
- *Tabebuia serratifolia*

Conhecida popularmente como ipê-amarelo esta espécie foi estudada fitoquimicamente por Oliveira e colaboradores (2000). O extrato etanólico do cerne resultou no isolamento de duas lignanas, olivil e 8-epi-cicoolivil, além de um epímero. Foram isolados ainda os compostos β -sitosterol, dehidro- α -lapachona, glicosídeo do β -sitosterol, ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico e lapachol. Hegnauer and Kooiman (1978) isolaram o iridóide catalpol (**26**) (Figura 4, página 11) nesta espécie.

- *Tabebuia rosea*

Coletada em Cartagena (Colômbia), Girard e colaboradores (1988) estudaram a constituição química da casca desta espécie e isolaram naftoquinona bioativas, como 2-acetil-nafto-[2,3- β] furano 4,9 diona (**13**), 2-(1-hidroxietil)-nafto-[2,3-b]-furan 4,9 diona (**15**) (Figura 3, página 10) e 5 (e 8)-hidroxi-2-(1-hidroxietil)-nafto-[2,3-b]-furan 4,9 diona, além de lapachol e dehidro- α -Lapachona. Esses derivados de lapachol foram descritos anteriormente em *Tabebuia cassinoide* por RAO & KINGSTON (1982) e mostraram significativa citotoxicidade contra cultura de células KB.

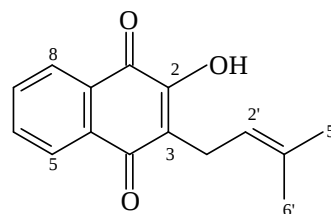
Poser e colaboradores (2000) estudaram ainda outras espécies, e isolaram os iridóides, (**16**) 6-O-*p*-hidroxibenzoil-6-epi-aucubin e 6-epi-aucubin (**17**) (Figura 4, página 11) em *Tabebuia chrysantha* e *Tabebuia alba*.

1.3 - ALGUNS EXEMPLOS DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO GÊNERO *TABEBUIA*

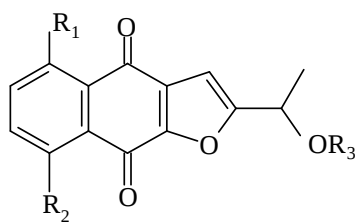
(11) R₁ = CH(OH)CH₃; R₂ = R₃ = OH; R₄ = H

(12) R₁ = COCH₃; R₂ = H; R₃ = OH; R₄ = OCH₃

(13) R₁ = COCH₃; R₂ = R₃ = R₄ = H

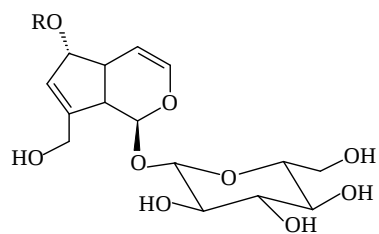


(14) Lapachol

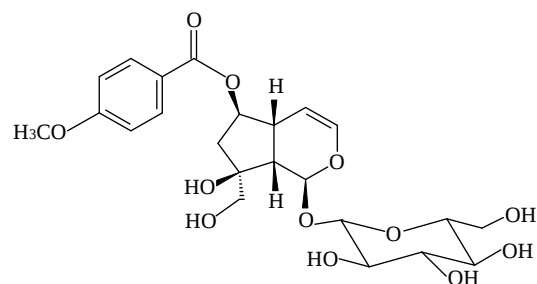


(15) R₁ = R₂ = R₃ = H

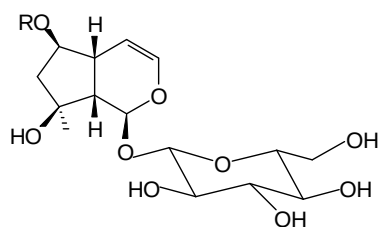
Figura 3 – Furanonaftoquinonas isoladas no gênero *Tabebuia*

(16) R = *p*-hidroxibenzoil

(17) R = H



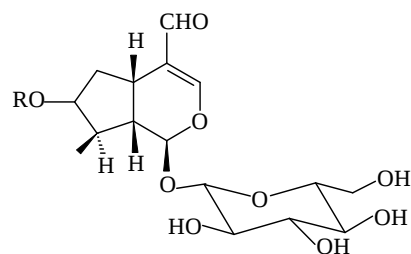
(18) bisdeoxycinancosideo

(20) R = *p*-metoxibenzoil

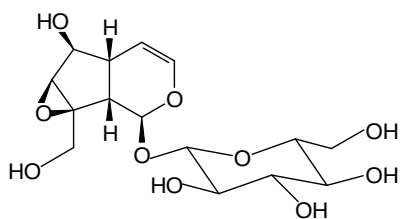
(21) R = 3, 4 dimetozibenzoil

(22) R = 3, 4, 5 trimetoxibenzoil

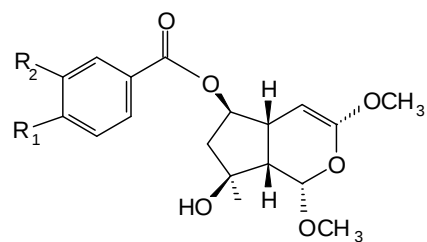
(23) R = 3,4 dimetoxicumaroil



(19) Impetinosídeo A



(26) Catalpol

(24) R₁ = OH, R₂ = H(25) R₁ = R₂ = OCH₃Figura 4 – Iridóides isolados no gênero *Tabebuia*

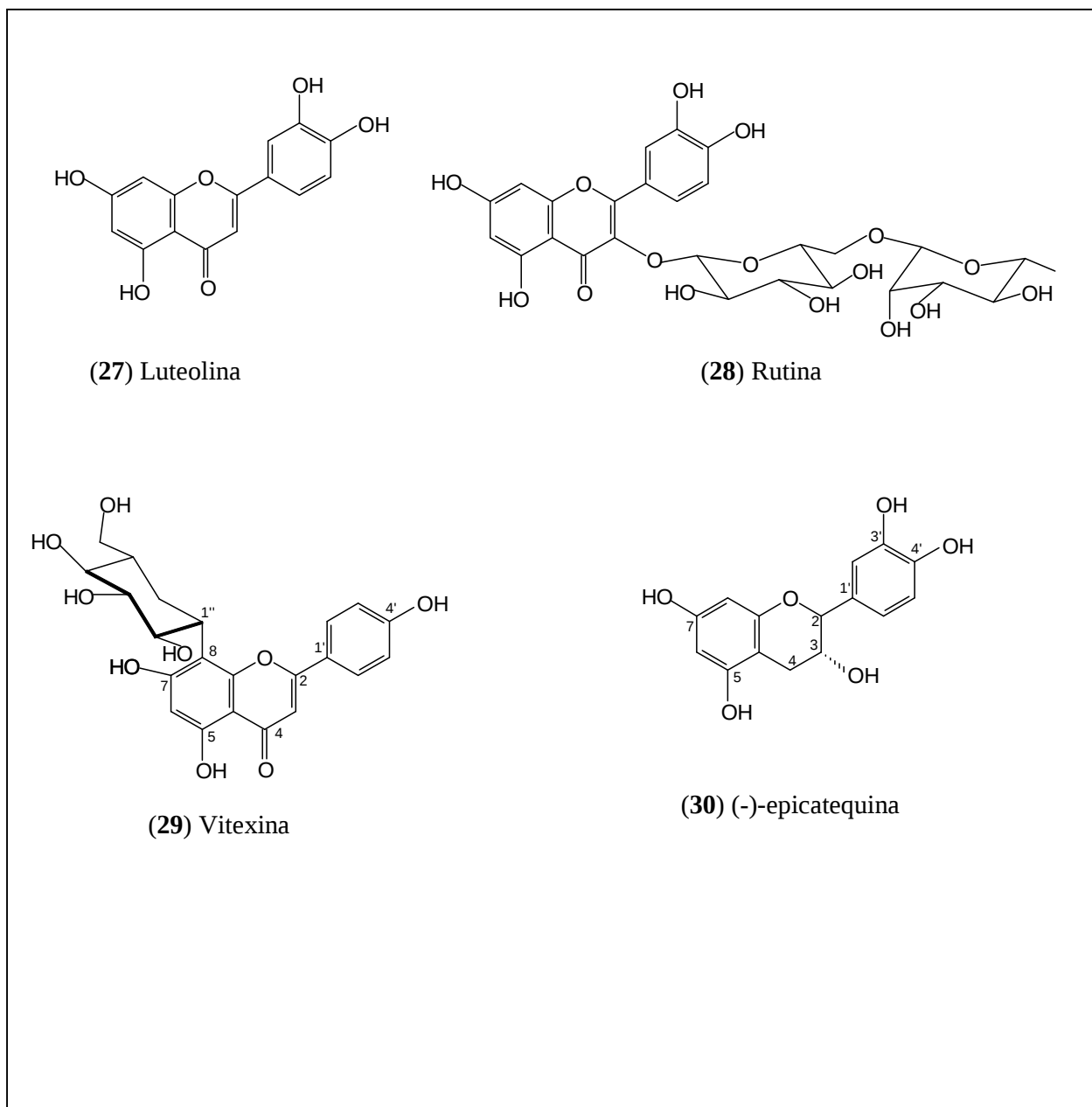
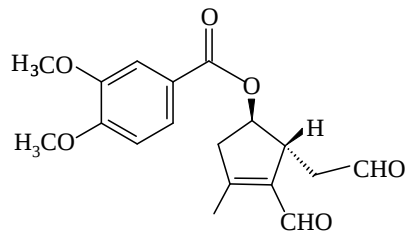
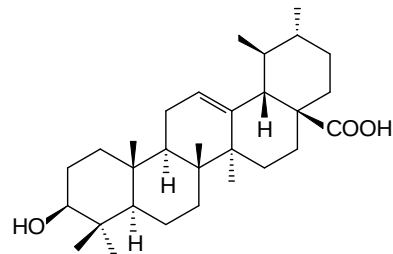


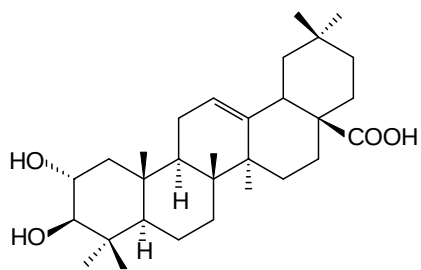
Figura 5 - Flavonóides isolados no gênero *Tabebuia*



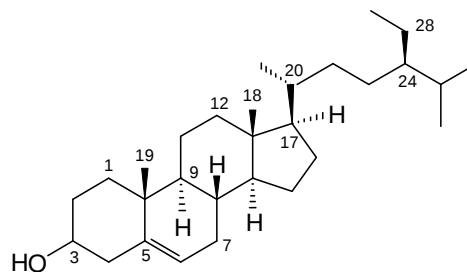
(31) dialdeído ciclopentênico



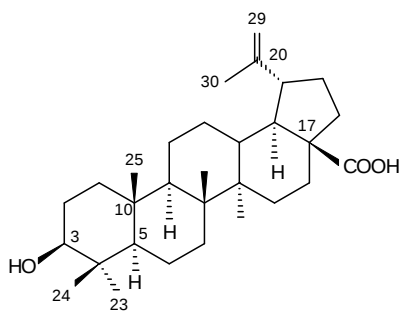
(32) ácido ursólico



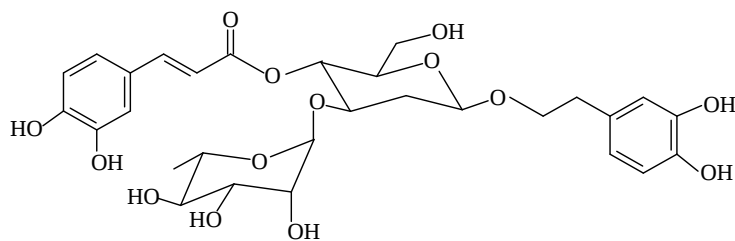
(33) Ácido maslínico



(34) β- Sitosterol



(35) ácido betulínico



(36) Verbascoídeo

Figura 6 – Triterpenos e outros metabólitos isolados no gênero *Tabebuia*.

1.4 – *Tabebuia insignis* (BIGNONIACEAE)

As espécies deste táxon encontram-se distribuídas nas regiões tropicais de todo o mundo, sendo de ocorrência freqüente no continente americano (Figura 3). Os representantes mais significativos são os ipês amarelo (*T. Alba*) e roxo (*T. avellanadae*) e jacarandás (*Jacaranda brasiliana*). Estas espécies são utilizadas na construção civil, carpintaria e construção de instrumentos musicais devido a natureza rígida da madeira. São utilizadas em urbanização, devido à beleza de sua floração. No Brasil, plantas desta família ocorrem desde o estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul; não possui habitat único, podendo ser encontradas nos Cerrados, Mata Atlântica e região Amazônica (LORENZI, 1998).

Tabebuia insignis (Miq.) Sandwith (1937), conhecida como paratudo-branco, apresenta-se como uma árvore de pequeno porte, freqüente encontrada em mata ciliar inundável e de tamanho aproximadamente 2-7 metros de altura, casca lisa, floração de setembro a outubro e com frutos de aproximadamente 22 centímetros de comprimento, possuindo apenas três folíolos no ápice. É utilizada como ornamental e pode ser cultivada em solos encharcados e jardins aquáticos. Na medicina popular é utilizada para dores estomacais, fígado, diarreia e vermes. É sensível ao fogo, que pode atingi-la em anos secos. Sua ocorrência é mais restrita ao buritizal e mata ciliar inundável ao norte e leste, solo argiloso ou siltoso-orgânico, sendo sua distribuição restrita ao pântano, Peru, Venezuela, Colômbia, da Guiana Francesa através da maior parte do Brasil até a Bolívia (POTT & POTT, 1994).

Segundo JOLY (1992), a família Bignoniaceae está situada sistematicamente dentro de sua ordem hierárquica da seguinte forma:

Ordem	-	Lamiales
Subordem	-	Personatae
Família	-	Bignoniaceae
Gênero	-	<i>Tabebuia</i>
Espécie	-	<i>Tabebuia insignis</i>

Nomes comuns - para-tudo, ipê-branco.

Parte da planta utilizada na medicina popular – Folhas, cascas e cerne.

Uso na medicina popular – anticancerígena, antifúngica, antibacteriana e antiinflamatória.



Figura 7 – Ocorrência de *Tabebuia insignis* (Bignoniaceae); Fonte: Missouri Botanical Garden.



(a)



(a)



(b)



(b)

Figura 8 – Exemplar de *Tabebuia insignis*: (a) APA do Guariroba; (b) Missouri Botanical Garden

SINONÍMIAS DE *T. INSIGNIS*

- *Bignonia* L. (1753)
- *Bignonia dura* Klotzsch ex. R. Knuth (Gentry, A. H., 1992)
- *Gelsemium insigne* (Miq.) Kuntze (1891)
- *Gelsemium* Kuntze (1891)
- *Handroanthus durus* (Bureau ex. K. Schum.) Mattos (1970)
- *Tabebuia fluviatilis* Klotzsch (Gentry, A. H., 1992)
- *Tabebuia roraimae* Oliv. (1886)
- *Tabebuia triphilla* Klotzsch (1848)
- *Tabebuia cassinoides* Shnee (Gentry, A. H., 1992)
- *Tecoma albiflora* Duck (1925)
- *Tecoma dura* Bureau ex. K. Schum (1894)
- *Tecoma insignis* Miq. (1850)
- *Tecoma leucoxylon* (L.) Marx. Ex DC. (1845)
- *Tecoma roraimae* (Oliv.) K. Schum. (1894)
- *Tecoma* Juss (1789)
- *Tabebuia* Gomes ex. DC. (1838)
- *Tabebuia dura* (Bureau ex. K. Schum) Sprague & Sandwith (1932)
- *Tabebuia insignis* (Miq) Sandwith (1937)

2 - OBJETIVOS

- Realizar o estudo fitoquímico do extrato etanólico das cascas do caule de *Tabebuia insignis*.
- Fazer a elucidação estrutural das substâncias acumuladas nesta parte da planta e avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e tóxica do extrato, frações ou substâncias isoladas.

3 – MATERIAIS

As cascas do caule de *Tabebuia insignis* foram coletadas no APA do rio Guariroba (Campo Grande – MS), em Agosto de 2006. A identificação da planta foi realizada pela Prof^a. MSc. Ubirazilda Maria Rezende sendo uma exsicata depositada no herbário CGMS/UFMS.

A casca do caule de *Tabebuia insignis* (Bignoniaceae) (1,200 Kg) foi seca ao ar livre, triturada e posteriormente extraída em etanol, sendo a extração por maceração. Após este procedimento fez-se a filtragem simples e o material sólido foi descartado.

A solução foi concentrada sob pressão reduzida, resultando em 154,92g de extrato etanólico. Deste, 80,00g foram submetidos à coluna filtrante sob pressão reduzida, sílica gel 60 (70 – 230 Mesh), utilizando-se diferentes sistemas de solventes orgânicos, obtendo-se 12 frações.

As placas para análise por CCDA foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 G em água destilada, na proporção de 1:2 (m/v) sobre as placas de vidro.

Para o fracionamento em CC foi utilizada sílica gel 60 (70 -230 Mesh e 230 – 400 Mesh), preparada pela homogeneização da sílica com o eluente apropriado, sendo posteriormente empacotada em coluna com mesmo sistema de solvente.

Os reveladores utilizados em CCDA foram vapores de iodo e solução de vanilina.

O critério de pureza foi baseado na identificação de apenas uma mancha correspondente à substância analisada em CCDA, empregando-se diferentes sistemas de eluentes.

Os solventes utilizados em CC, CCDA foram da marca Synth, Quimex e Merck. Os solventes deuterados foram da marca Cambridge e Merck.

Os extratos foram concentrados sob pressão reduzida, utilizando-se rotaevaporadores da marca Fisatom.

Os espectros na região do infravermelho foram registrados utilizando-se um espectrofotômetro Perkin Elmer.

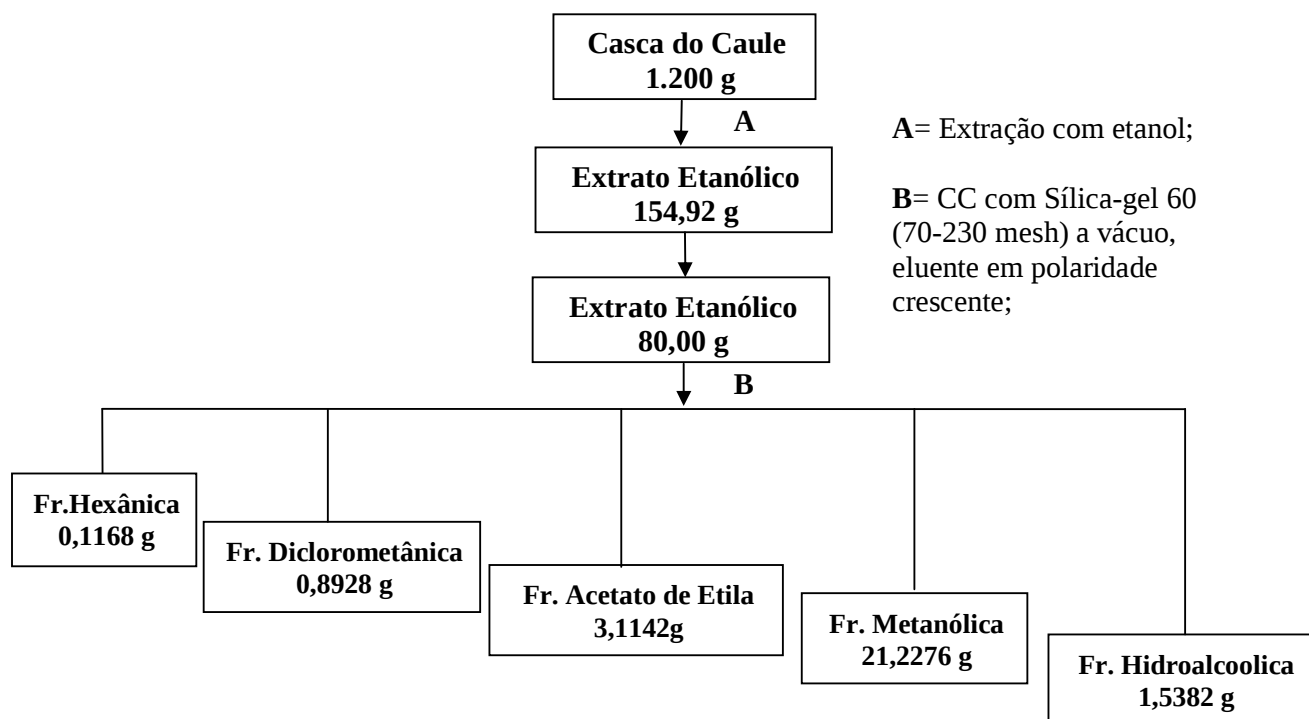
Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em aparelho da marca Bruker modelo DPX – 300, sendo os espectros de RMN ¹H a 300 MHz e os de RMN de ¹³C, a 75MHz.

4 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.

4.1 - Estudo fitoquímico da Casca do Caule de *T. insignis*

A casca do caule de *T. insignis* foi seca em temperatura ambiente, triturada em moinho e submetida à extração exaustiva em etanol durante sete dias, sob agitação esporádica. Decorrido este período, o material foi filtrado, descartando-se a parte sólida. A parte líquida foi submetida destilação sob pressão reduzida para a retirada do solvente e colocada em capela até a secagem completa do extrato, que após alguns dias foi pesado, resultando em 154,92g de extrato bruto. O extrato etanólico foi submetido à cromatografia em coluna filtrante utilizando-se como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol/água (1:1) (Esquema 1).

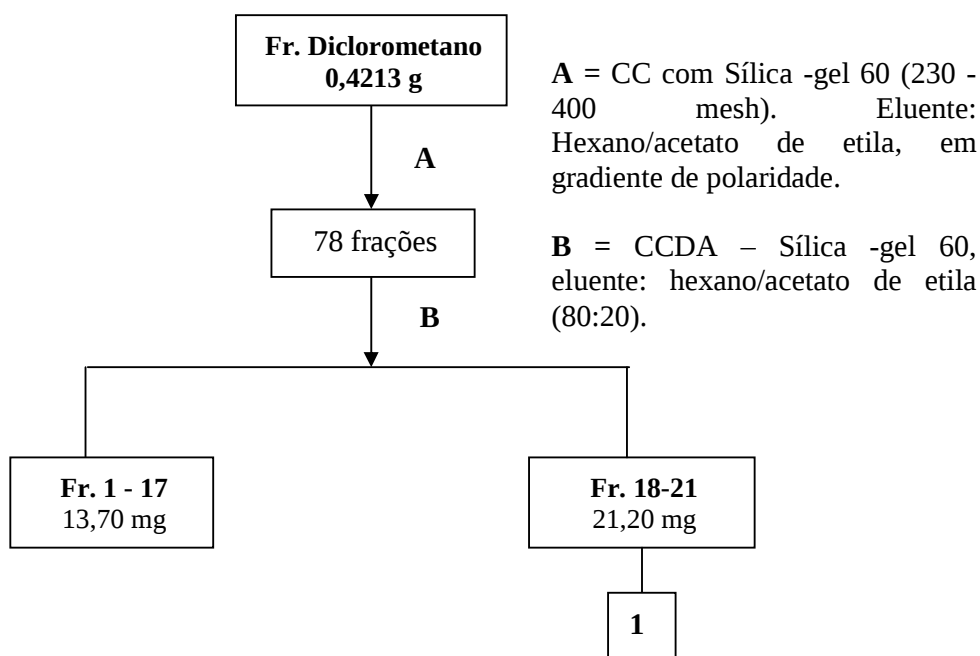
As frações foram submetidas à análise utilizando-se CCDA em diferentes sistemas de eluentes, sendo escolhido o sistema que apresentou uma melhor resolução das manchas nas placas cromatográficas. As frações diclorometânica, acetato de etila, metanólica e hidrometanólica foram submetidas à análise espectroscópica de RMN de ^1H , das quais verificou-se um perfil espectroscópico com característica de compostos alifáticos e aromáticos, optando-se assim por estudar primeiro uma dessas frações.



Esquema 1: Extração em etanol e coluna filtrante com eluentes em polaridade crescente da casca do caule de *T. insignis*.

4. 1.2 - Fracionamento da fração diclorometânica do extrato etanólico da casca do caule.

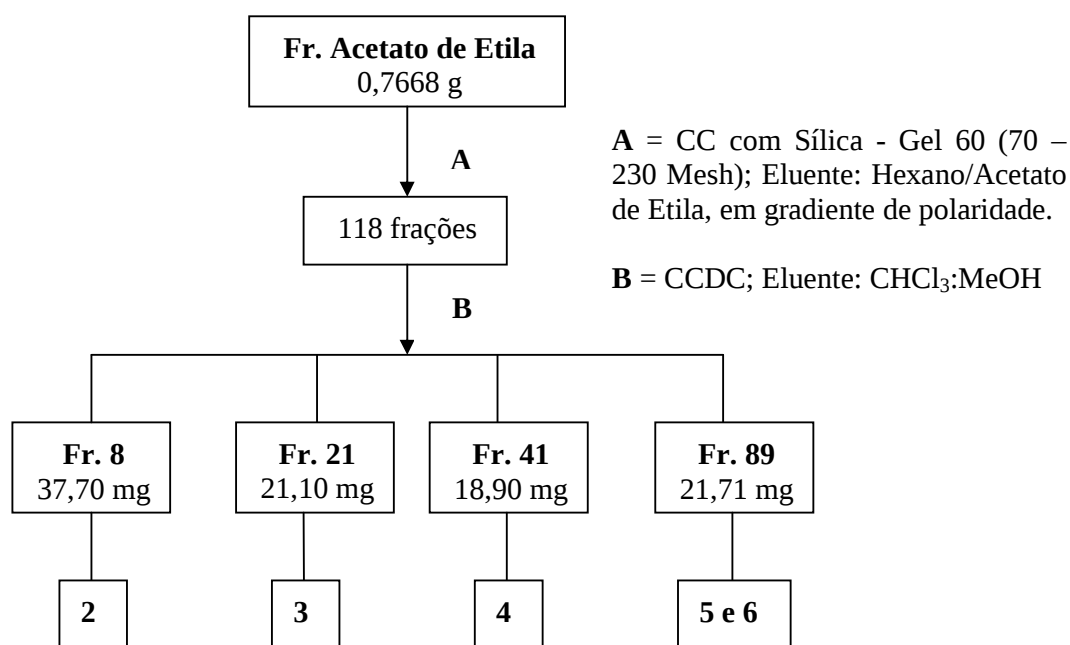
A fração de diclorometano foi cromatografada em CC, utilizando-se sílica gel 60 (230 – 400 Mesh), sendo o eluente hexano/acetato de etila em ordem crescente de polaridade. As substâncias foram monitoradas em placas cromatográficas e reunidas conforme semelhanças. Este procedimento cromatográfico permitiu o isolamento do β -sitosterol esterificado (Esquema 1).



Esquema 2 – Fracionamento da fração de diclorometano da casca do caule de *T. insignis*.

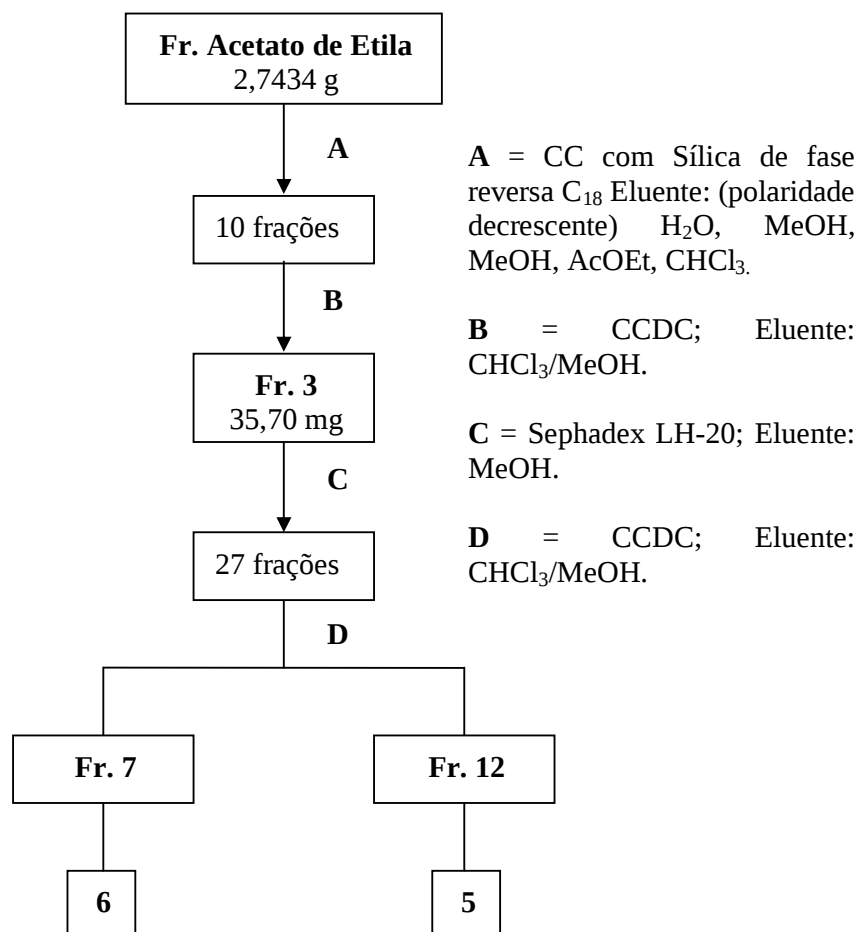
4.1.3 - Fracionamento da fração acetato de etila do extrato etanólico da casca do caule.

As frações de acetato de etila foram cromatografadas em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh), utilizando-se como eluente, hexano/acetato de etila (polaridade crescente). As frações obtidas foram acompanhadas por placas cromatográficas e reunidas de acordo com a semelhança de rfs. As frações que apresentaram uma única mancha foram encaminhadas para fazer experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , DEPT 135° ou bidimensionais para elucidação das estruturas moleculares (Esquema 1, Figura 9).



Esquema 3 – Fracionamento da fração de acetato de etila da casca do caule de *T. insignis*.

Como a fração 89 apresentou uma mistura das substâncias 5 e 6, fez-se uma coluna utilizando como suporte fase reversa para purificação da fração de acetato de etila (massa = 2,7434 g) (Esquema 4), utilizando-se como eluente água/metanol em gradiente de polaridade, sendo recolhidas 10 frações. Através da CCDA, separou-se a fração 3 por apresentar características semelhantes às substâncias 5 e 6. Dando procedimento a purificação, utilizou-se de uma coluna de Sephadex-LH – 20 onde foi possível o isolamento da substância 5 (2,4 mg) e 6 (2,0 mg).



Esquema 4 – Fracionamento da fração de acetato de etila, da casca do caule de *T. insignis*, utilizando-se coluna de fase reversa.

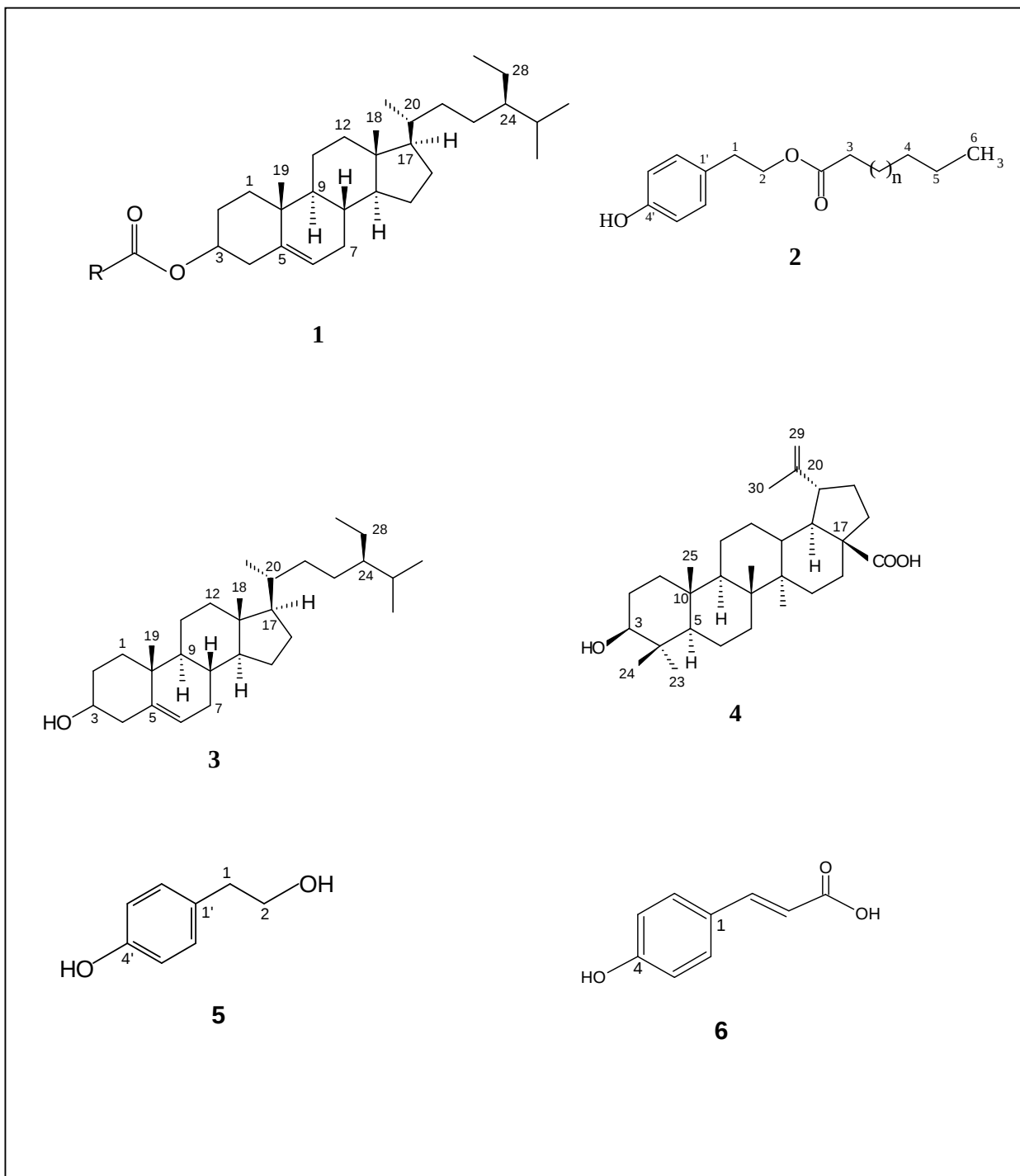
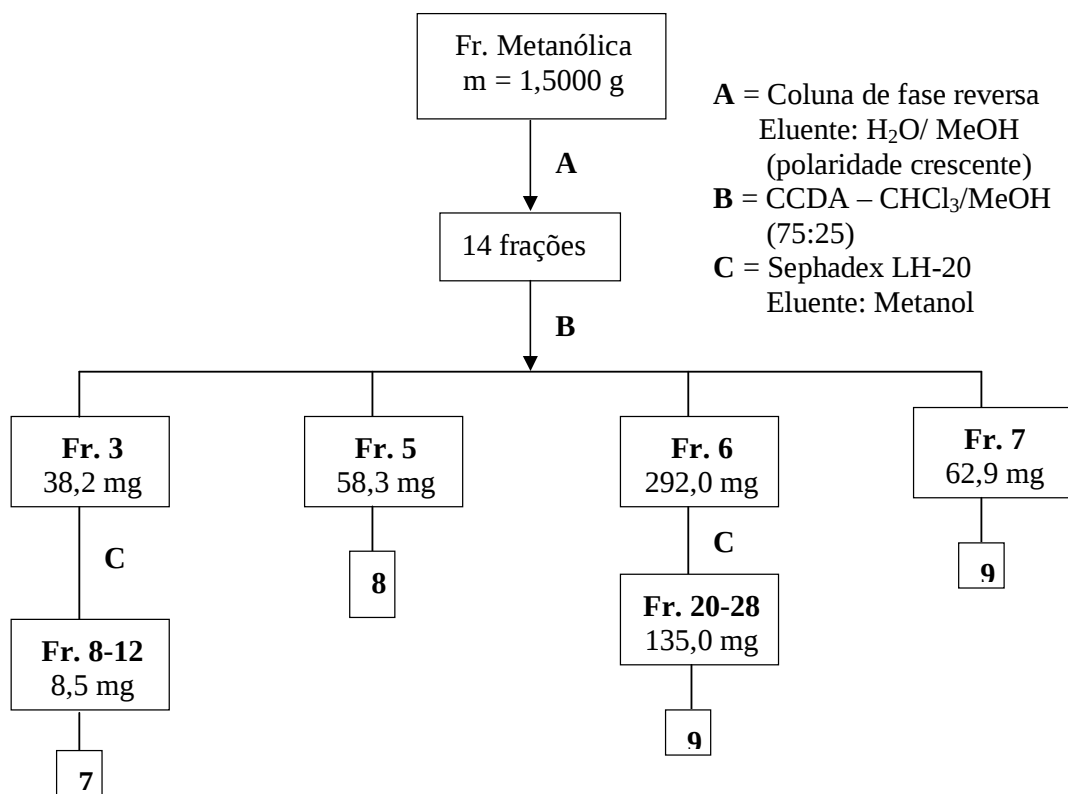


Figura 9 - Substâncias isoladas da fração diclorometano e acetato de etila oriundas da casca do caule de *T. insignis*.

4. 1.4 - Fracionamento da fração metanólica do extrato etanólico da casca do caule.

A fração de metanólica foi cromatografada em CC, utilizando-se fase reversa, sendo o eluente água/metanol em ordem decrescente de polaridade. As substâncias foram monitoradas em placas cromatográficas e reunidas conforme semelhanças. Este procedimento cromatográfico permitiu o isolamento das substâncias **7**, **8** e **9** (Esquema 5; Figura 10).



Esquema 5 – Fracionamento da fração metanólica da casca do caule de *T. insignis*.

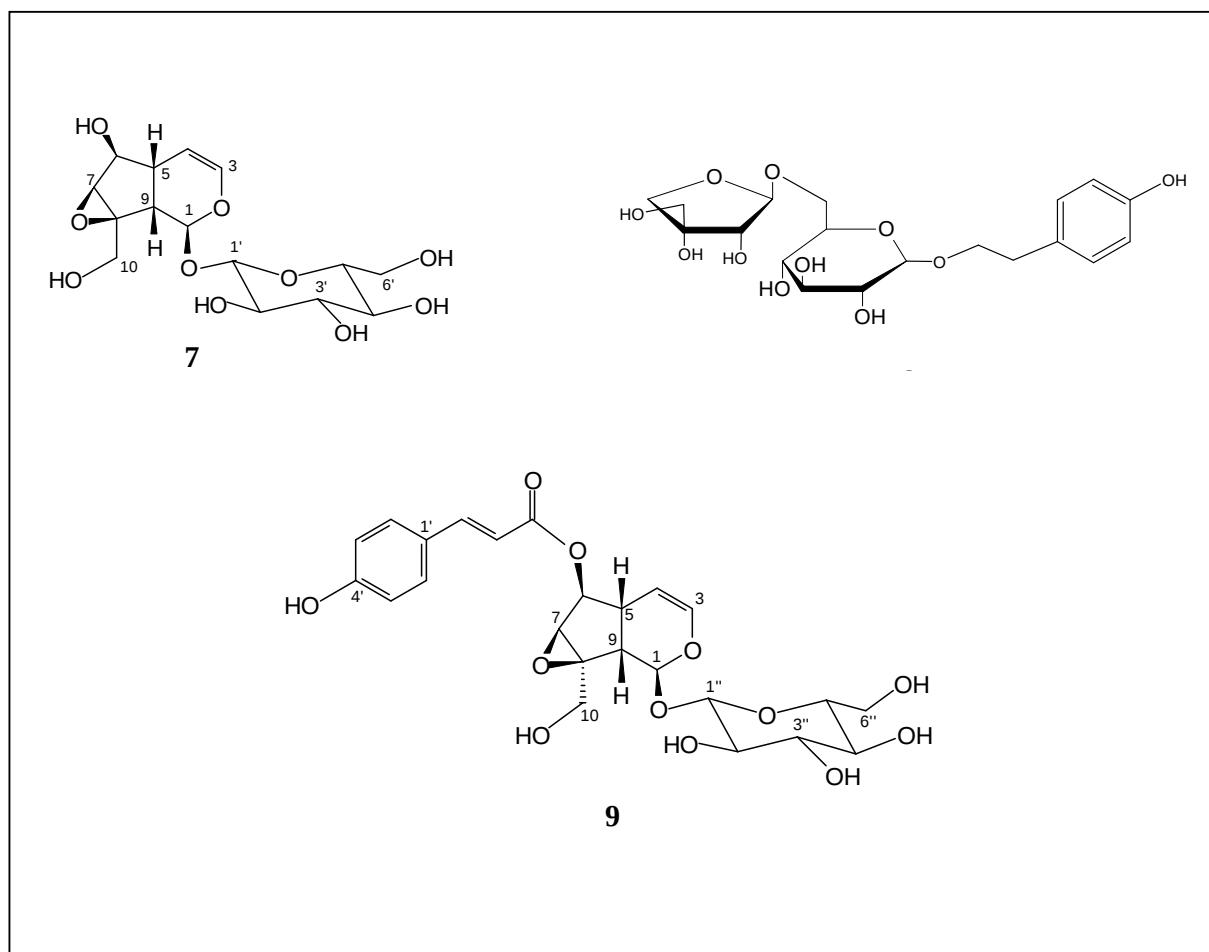


Figura 10 - Substâncias isoladas da fração metanólica da casca do caule de *T. insignis*.

4.1.5 - Fracionamento de uma fração originada da fração hidrometanólica, do extrato etanólico das folhas de *T. insignis*.

A fração hidrometanólica das folhas de *Tabebuia insignis*, obtida de uma partição líquido-líquido do extrato etanólico da mesma parte desta espécie, originou várias frações. Assim esta foi cromatografada em coluna utilizando como suporte Sephadex LH-20 e o eluente empregado foi metanol, obtendo-se 78 frações. As frações foram comparadas em CCDA e reunidas de acordo com as semelhanças de rfs. As frações 51-58 apresentou uma mancha única, de coloração amarela, que permaneceu com a mesma coloração quando revelada com vanilina. Este procedimento cromatográfico resultou no isolamento da substância **10**.

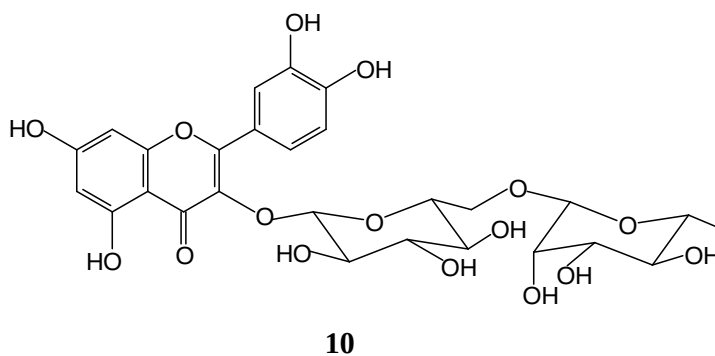


Figura 11 - Substância isolada da fração hidrometanólica das folhas *T. insignis*.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Identificação do Iridóide - Catalpol (7)

A substância **7**, obtida da fração metanólica da casca do caule de *T. insignis* (Esquema 5), apresentou-se como cristais de coloração amarelada, que ao ser revelado com vanilina, em placa de CCDA, forneceu a mesma coloração.

O espectro de RMN ^1H de **7** mostrou um sinal em 6,39 ppm (1H, d, $J = 6,0$ Hz), sinais entre 5,38 e 4,73 ppm e um conjunto de sinais entre 4,30 e 3,20 ppm, indicativos da presença de açúcar na estrutura.

O espectro de RMN de ^{13}C de **7**, confrontado com o espectro de RMN DEPT 135⁰, mostrou um sinal de CH em 141,76 ppm e dois conjuntos de sinais, sendo o primeiro composto de três sinais de CH entre 104,02 e 95,30 ppm e o segundo de nove sinais, seis CH e dois CH₂, entre 79,56 e 61,57 ppm, além de dois sinais de CH em 43,58 e 39,09 ppm. Entre os sinais relativos aos carbonos carbinólicos pode-se verificar um conjunto compatível com os da β -D-glicose. Levando-se em conta os seis sinais desta unidade, restam nove outros sinais. Considerando-se o número de carbonos, as características espectrais da substância e as classes de compostos que ocorrem em *Tabebuia*, pôde-se propor como uma possibilidade para **7** a estrutura de um nor-iridóide. Assim, os sinais em 6,39 ppm (1H, d, $J = 6,0$ Hz) e 5,16 ppm (1H, d, $J = 9,0$ Hz), no espectro de RMN de ^1H , bem como os sinais em 141,76 e 104,02 ppm, no espectro de RMN de ^{13}C , são indicativos de uma ligação dupla C3-C4. O sinal em 95,20 ppm deve corresponder ao carbono acetálico C-1, enquanto os sinais a 43,58 e 39,09 ppm se referem aos carbonos da junção C-9 e C-5, respectivamente. Os quatro sinais restantes, com deslocamentos entre 60 e 80 ppm, devem pertencer aos outros carbonos do anel de seis. Os valores de deslocamento químico destes sinais indicam estarem os carbonos correspondentes sob algum tipo de desproteção, provavelmente ligados a oxigênio. O sinal de CH₂ a 62,58 ppm indica que C-10 se encontra sob forma de CH₂-OH, enquanto os sinais a 60,43(CH) e 66,20 (C) ppm são compatíveis com uma função epóxido em C7-C8; resta, assim, o sinal a 79,56 ppm, correspondente a C-6 na forma de carbono carbinólico. Os experimentos de RMN COSY 90⁰ [Figura 15] evidenciaram os acoplamentos entre H-3 e H-4, H-5 e H-9, H-1 e H-9 e entre H-1' (hidrogênio anomérico) e H-2', conforme mostrado na Tabela 2.

Foram realizados também os experimentos de RMN bidimensionais HSQC e HMBC [Figuras 16 e 17]. Através do primeiro foi possível confirmar a conectividade entre os carbonos e hidrogênios diretamente ligados, conforme mostrado na Tabela 2, destacando os

hidrogênios da ligação dupla, o C/H anoméricos, C/H-1 e C/H-6. Já o espectro de RMN HMBC permitiu confirmar a localização da unidade glicosídica na estrutura da substância 7 através da correlação entre o hidrogênio anomérico H-1' (4,73 ppm) e C-1 (95,30 ppm). Observou-se ainda a correlação entre o hidrogênio olefínico H-3 (6,39 ppm) com os carbonos C-1 (95,30 ppm), C-4 (104,02 ppm) e C-5 (39,09 ppm), assim como também a correlação entre o hidrogênio olefínico H-4 (5,16 ppm) e os carbonos C-3 (141,76 ppm), C-5 (39,09 ppm) e C-9 (43,58 ppm) [Figura 17].

Estes dados permitiram, portanto, propor a estrutura abaixo para a substância 7. A busca desta estrutura na literatura levou à localização de um iridóide denominado catalpol (Swiatek *et al.* 1993); a comparação dos dados da substância 7 com os dados do catalpol mostraram boa correlação (Tabela 2) permitindo concluir que se trata da mesma substância.

A identidade dessas substâncias tornou desnecessário a realização de experimentos voltados para a definição da estereoquímica da estrutura; no entanto, deve-se destacar que as pequenas diferenças de deslocamento químico observadas foram atribuídas ao fato de terem sido utilizados solventes diferentes para a obtenção dos espectros.

O catalpol já foi encontrado em outras espécies de plantas como *Verbascum lasianthum* (Scrophulariaceae) (Kupeli *et al.*, 2007) e *Gmelina arborea* (Kawamura e Ohara, 2005) apresentando atividades anti-inflamatória e antifúngica respectivamente.

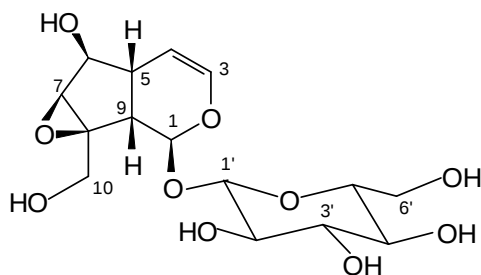


Tabela 2 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) da substância **7** e Catalpol (Boros e Stermitz, 1991) (D_2O , 300 e 60 MHz).

		7		6-O-E-<i>p</i>-cumaroil-Catalpol	
		δ H (J = Hz)	δ C	δ H (J = Hz)	δ C
1	CH	5,32 (1H, d, 9,0)	95,30	5,59 (1H, d, 9,0)	93,20
3	CH	6,39(1H, d, 6,0)	141,76	6,49 (1H, dl, 5,8)	140,20
4	CH	5,00(1H, d, 9,0)	104,02	5,12 (1H, dd, 5,8 e 4,1)	103,20
5	CH	2,25 (1H, m)	39,09	2,90 (1H, m)	36,60
6	CH	5,38 (1H, d, 6,0)	79,56	5,34 (1H, dl, 7,2)	76,30
7	CH	4,17 (1H, dl)	60,43	4,02 (1H, dl)	60,60
8	C	-	66,20	-	64,70
9	CH	2,51 (1H, dd)	43,58	2,63 (1H, m)	42,00
10	CH₂	sobreposto	62,58	sobreposto	58,90
1'	CH	4,73 (1H, d, 9,0)	99,71	5,50 (1H, d, 7,8)	97,70
2'	CH	sobreposto	74,86	sobreposto	73,30
3'	CH	sobreposto	78,62	sobreposto	77,30
4'	CH	sobreposto	71,78	sobreposto	70,10
5'	CH	sobreposto	77,72	sobreposto	77,10
6'	CH₂	sobreposto	61,57	sobreposto	61,20

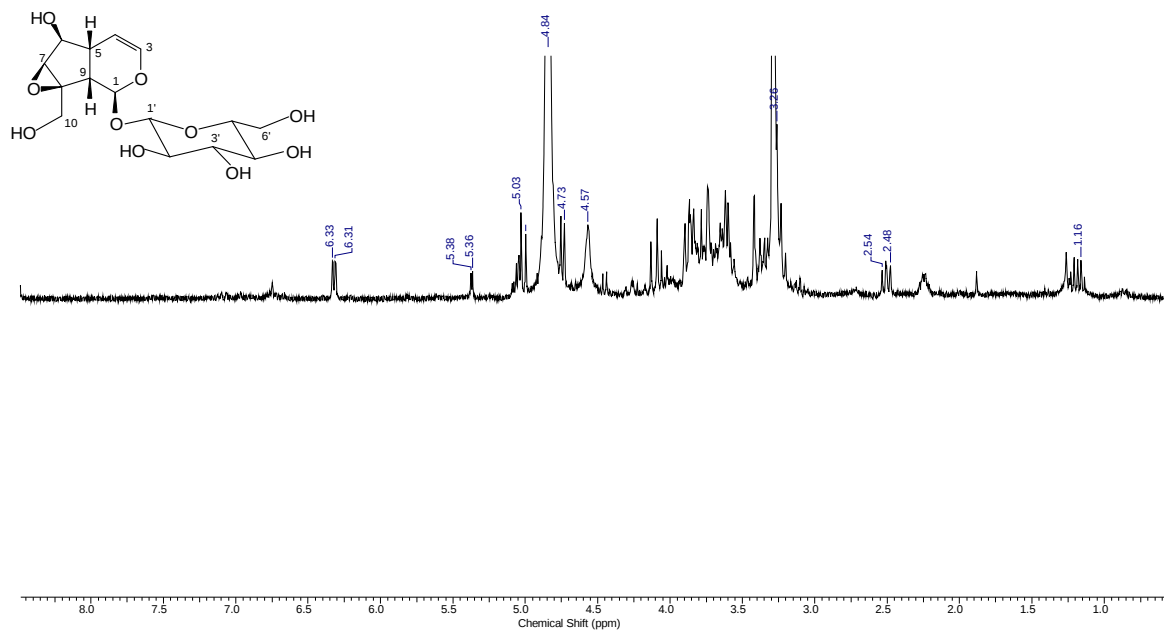


Figura 12 - Espectro de RMN ^1H da substância 7 (CD_3OD , 300 MHz)

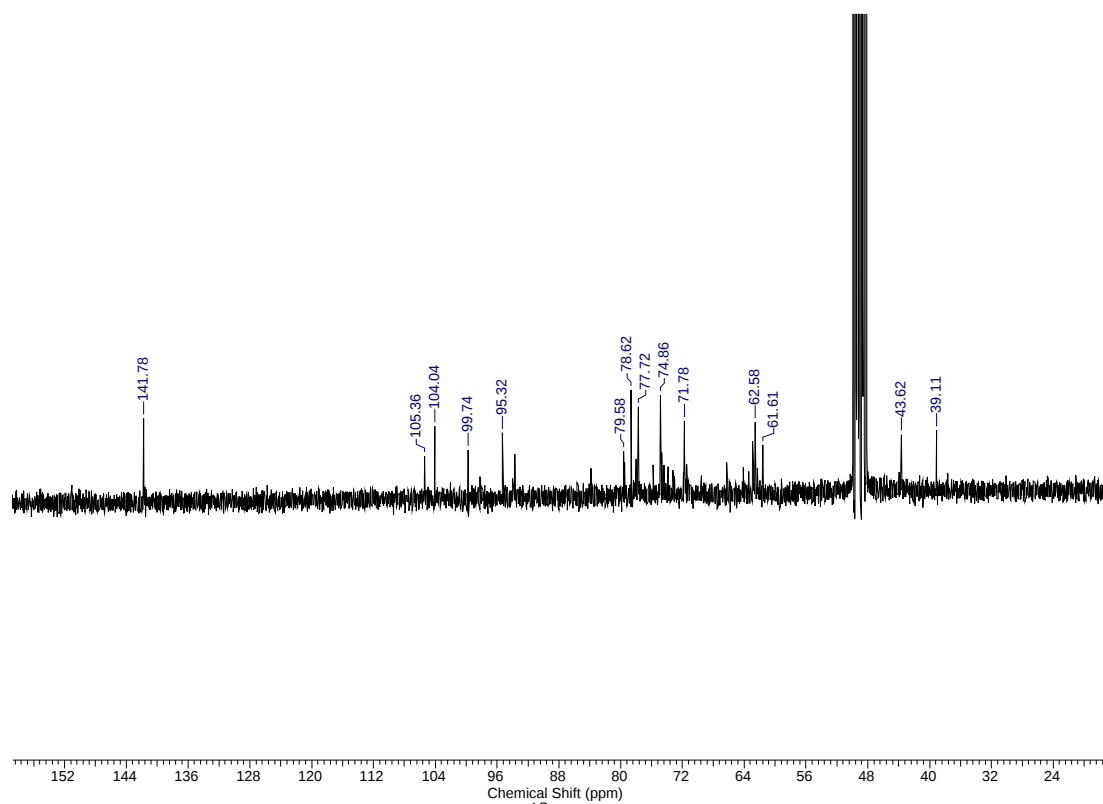


Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 7 (CD_3OD , 75 MHz)

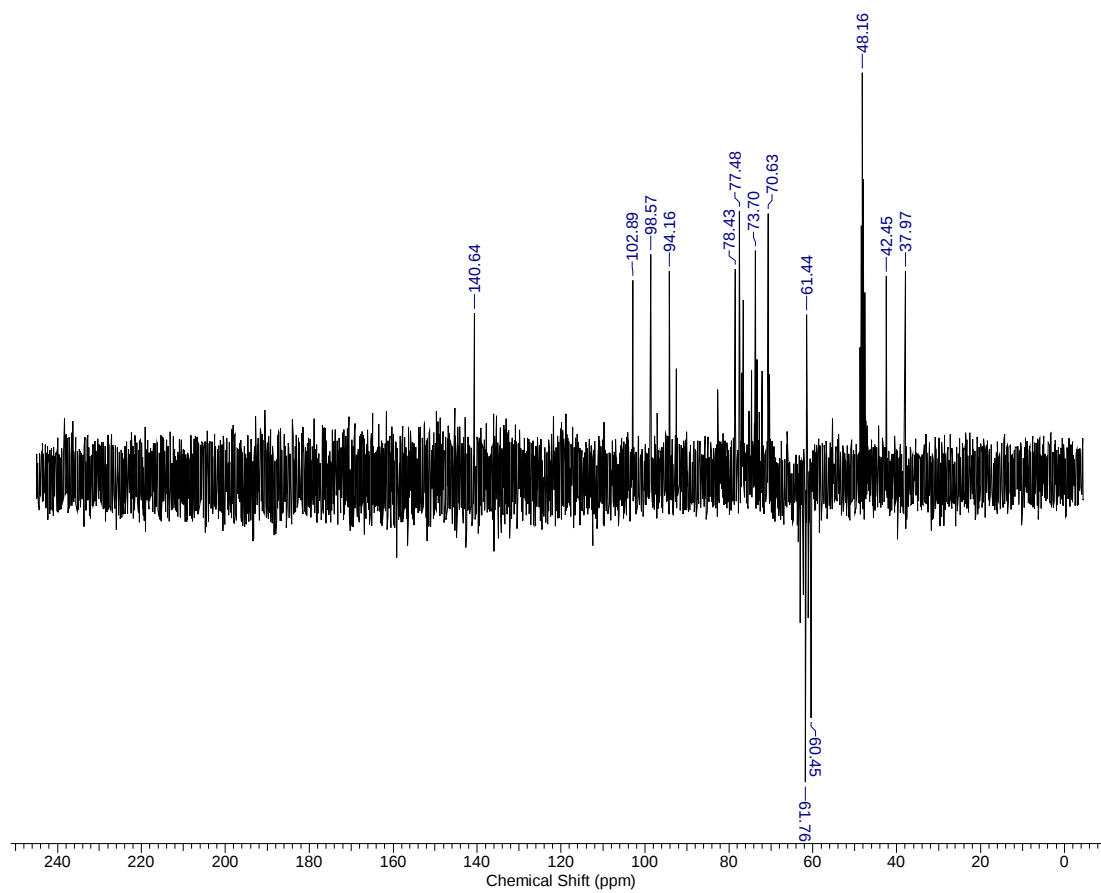


Figura 14 - Espectro de DEPT 135° da substância 7 (CD₃OD, 75 MHz)

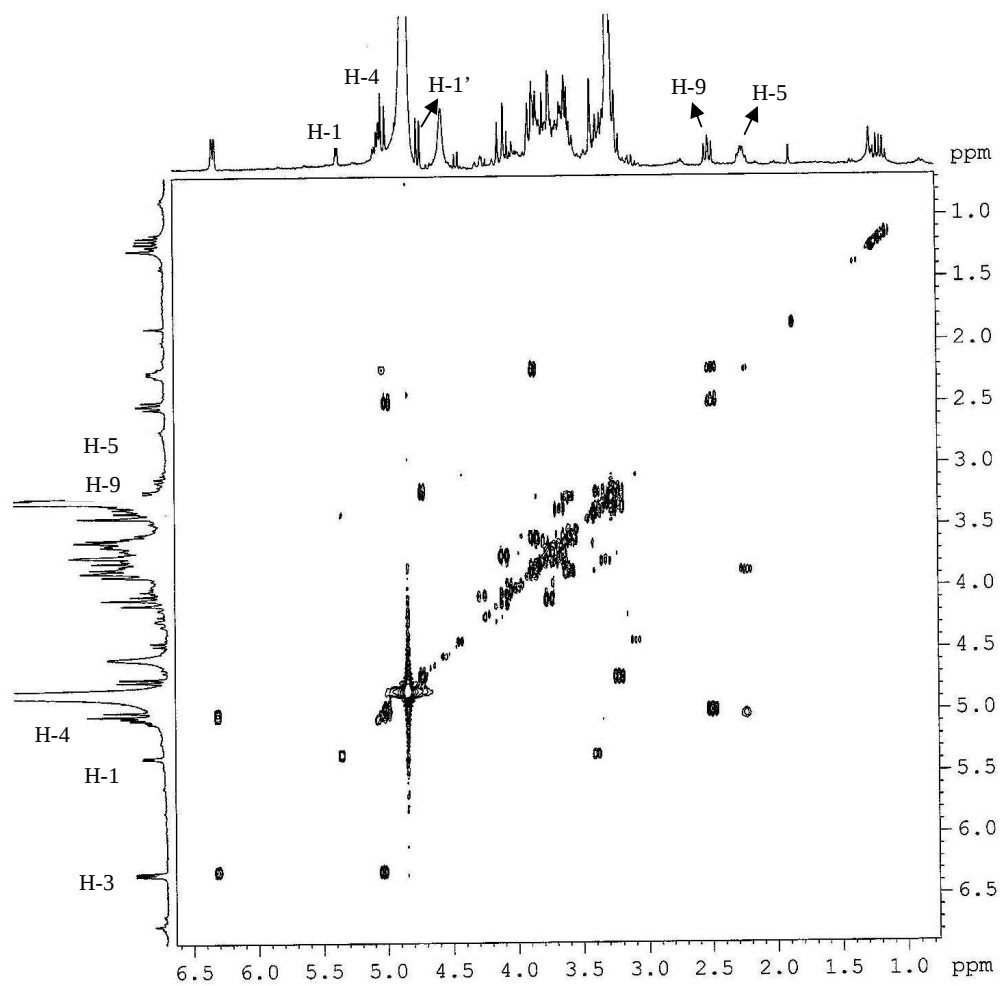


Figura 15 – Espectro de RMN- ^1H - ^1H COSY 90° da substância 7 (CD_3OD , 300 MHz)

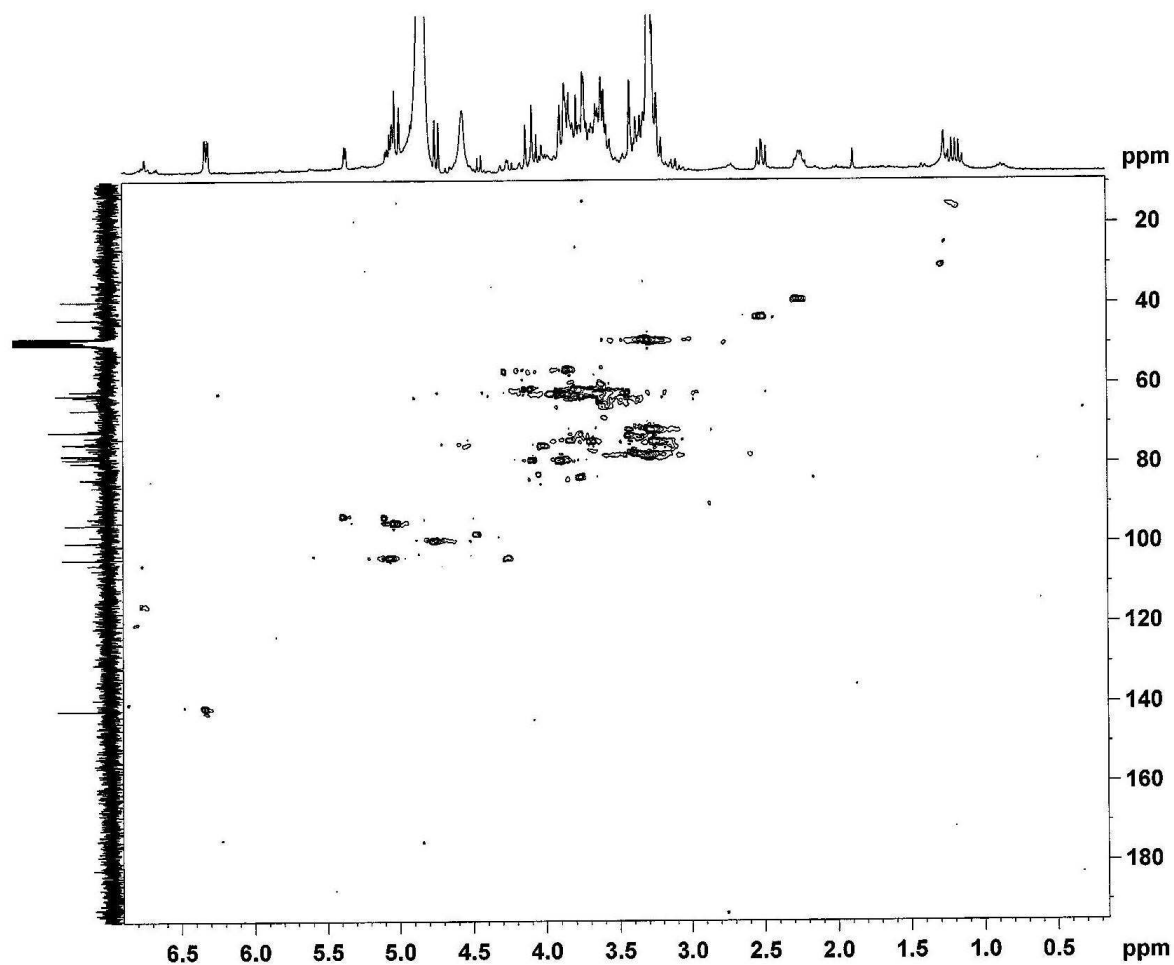


Figura 16 - Espectro de RMN-HSQC da substância 7 (CD₃OD, 75 MHz).

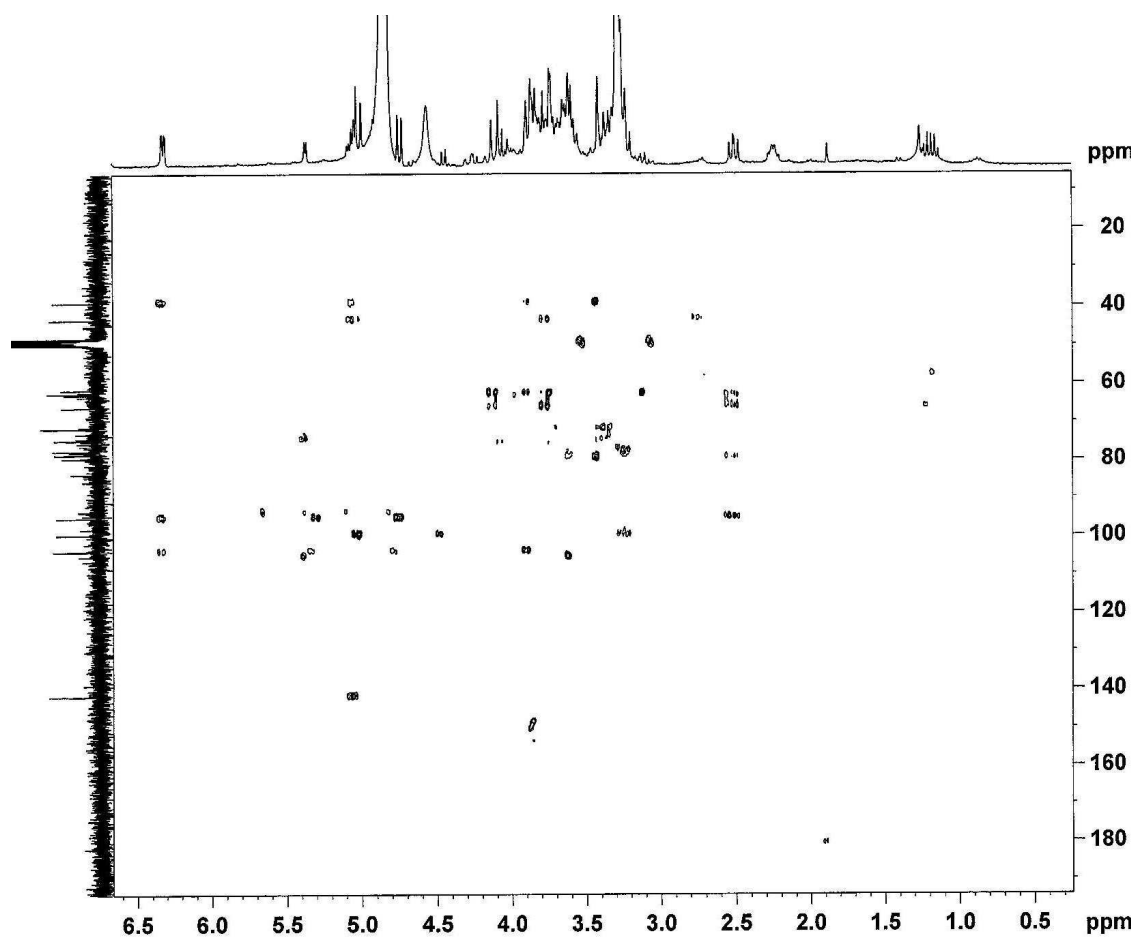


Figura 17 – Espectro de RMN-HMBC da substância 7 (CD_3OD , 75 MHz)

5.2 – Identificação do Iridóide 6-O-E-*p*-cumaroil-Catalpol (9).

A substância **9**, oriunda da coluna cromatográfica de fase reversa da fração metanólica (Esquema 5), apresentou-se como um sólido amarelo, dando coloração amarela escuro em CCDA quando revelada com vanilina. Seu espectro de RMN ^1H mostrou um conjunto de sinais na região de hidrogênios em anel aromático, destacando-se dois dubletos de maior intensidade em 7,46 ppm (2H, d, $J = 9,0$ Hz) e em 6,79 ppm (2H, d, $J = 9,0$ Hz), sugestivo de um anel aromático *para* substituído. O par de dubletos em 7,65 ppm (1H, d, $J = 15,0$ Hz) e em 6,36 ppm (1H, d, $J = 15,0$ Hz) é característico de hidrogênios de olefina orientados em *trans*. Observam-se também sinais entre 5,16 e 4,78 ppm e entre 4,17 e 3,23 ppm, indicativos da presença de açúcar na estrutura, além de um sinal complexo em 2,60 ppm. [Tabela 3; Figura 18].

O espectro de RMN ^{13}C , confrontado com espectro DEPT 135° , apresentou dois sinais de CH com maior intensidade, 131,33 e 116,91 ppm, compatíveis com o anel aromático *para* substituído. O sinal em 168,99 ppm foi atribuído a uma carboxila α - β insaturada, a qual, associada aos sinais em 114,61(CH) e 147,27 (CH) ppm, e ao anel aromático *para* substituído sugere um sistema *p*-cumaroila na estrutura. Os sinais em 161,45 (C) e 127,09 (C) completariam este sistema. Entre os sinais de ^{13}C observados há nove sinais na região de carbonos carbinólicos e dentre estes pode-se destacar um conjunto atribuído a uma unidade de β -D-glicose (78,65; 77,72; 74,87; 71,78; 62,9) incluindo o CH em 99,7 ppm. Além dos sinais correspondentes ao sistema *p*-cumaroila e à β -D-glicose, restam no espectro nove sinais. Dentre estes sinais há dois de ligação dupla (142,39 e 102,97 ppm, ambos CH), dois CH em 43,22 e 36,68 ppm, quatro na região de carbonos ligados a oxigênio e dois acetálicos. Estes sinais são muito semelhantes aos observados para a substância **7** e a comparação dos mesmos mostra uma boa correlação.

Foi obtido ainda o espectro de RMN COSY 90° no qual foram observados alguns acoplamentos, destacando-se os seguintes: entre os hidrogênios do anel aromático H2- 6 (7,46 ppm, $J = 9,0$ Hz) e H3- 5 (6,79 ppm, $J = 9,0$ Hz); entre os hidrogênios olefínicos H_α (6,36 ppm, $J = 15,0$) e H_β (7,65 ppm, $J = 15,0$ Hz); entre H4 (5,04 ppm,) e H-3 (6,39 ppm, sobreposto a H_α); entre H-9 (2,61 ppm – parcialmente sobreposto com H-5) e H-1 (5,16 ppm, $J = 9,0$ Hz); e entre os hidrogênios H-5 (2,63 ppm – parcialmente sobreposto com H-9) e H-4 (5,04 ppm, $J = 9$ Hz) [Figura 22].

O espectro HSQC [Figura 23] permitiu confirmar as atribuições definidas acima, destacando-se a definição da conectividade direta entre os carbonos e hidrogênios

correspondentes aos sinais em δC 102,97/5,16 (C/H-4); 95,13/5,16 (C/H-1); 99,74 4,76 (C/H anoméricos) e 81,34/5,16 (C/H-6).

Entre as correlações observadas através do experimento HMBC [Figura 24] destaca-se:

- A localização da unidade glicosídica, confirmada através da correlação do hidrogênio anomérico H-1' (4,76 ppm) com o carbono C-1 (95,13 ppm).
- A localização do grupo p-cumaroíla, confirmada através da correlação do hidrogênio H-6 (5,04 ppm) com o carbono carboxílico (168,99 ppm).
- O hidrogênio olefínico H_β (7,65 ppm) correlaciona-se com os carbonos do anel aromático C-2' (131,33 ppm), C-3' (116,91 ppm), e com o carbono da carbonila (168,99 ppm).
- Na estrutura do iridóide o hidrogênio H-3 (6,39 ppm) correlaciona-se com os carbonos C-5 (36,78 ppm) e C-1 (95,13 ppm).

Dados de infravermelho foram analisados, podendo-se destacar os estiramentos em: 3395 cm^{-1} (ν C-OH), 2920 cm^{-1} (ν C-H), 1704 cm^{-1} (ν C=O), 1515 e 1604 cm^{-1} (ν C=C), 1072 cm^{-1} (ν C-O), 833 cm^{-1} (ν C-H) [Figura 21].

Os dados acima descritos levaram à estrutura abaixo para a substância 9. Uma busca na literatura permitiu a identificação desta substância como sendo o 6-O-E-p-cumaroil-catalpol. Esta substância foi descrita pela primeira vez por El-Naggar e colaboradores em 1980, sob o nome de especiosídeo. Na família Bignoniaceae, esta substância foi isolada e identificada por Soares (2006) e por Guerbis (2003) em *Tabebuia caraiba* e *Tabebuia aurea*, respectivamente.

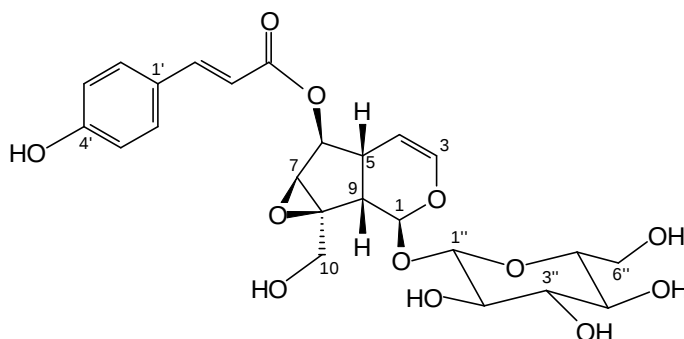


Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 75 e 300 MHz) obtidos da substância **9** e do 6-O-E-p-cumaroil-catalpol (GUERBAS NETO, 2003) (300/75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$).

		9		6-O-E-p-cumaroil-catalpol	
		$\delta \text{ H (J = Hz)}$	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ }^1\text{H (J = Hz)}$	$\delta \text{ C}$
COO	C	-	168,99	-	168,00
	CH	6,36 (1H, d, 15,0)	114,61	6,56 (1H, d, 15,9)	113,80
β	CH	7,65 (1H, d, 15,0)	147,27	7,91 (1H, d, 15,9)	146,70
1''	C	-	127,09	-	126,20
2'', 6''	CH	7,46 (1H, d, 9,0)	131,33	7,61 (1H, d, 7,6)	130,60
3'', 5''	CH	6,79 (1H, d, 9,0)	116,91	7,24 (1H, d, 7,6)	116,60
4''	C	-	161,45	-	160,10
1	CH	5,16 (1H, d, 9,0)	95,13	5,59 (1H, d, 9,0)	94,60
3	CH	6,39 (1H, 6,0)	142,39	6,49 (1H, dl, 5,8)	141,50
4	CH	4,96 (1H, d, 9,0)	102,97	5,12 (1H, dd, 5,8 e 4,1)	102,40
5	CH	2,63 (1H, m)	36,78	2,90 (1H, m)	35,70
6	CH	4,96 (1H, 9,0)	81,34	5,34 (1H, dl, 7,2)	80,20
7	CH	3,60 (1H, dl)	60,31	4,02 (1H, dl)	59,60
8	C	-	66,88	-	66,10
9	CH	2,61 (1H, d)	43,22	2,95 (1H, m)	42,20
10	CH₂	10a (4,17); 10b(3,84)	61,29	Sobreposto	61,70
1'	CH	4,76 (1H, d, 9,0)	99,74	5,50 (1H, d, 7,8)	99,00
2'	CH	Sobreposto	74,87	Sobreposto	73,70
3'	CH	Sobreposto	78,65	Sobreposto	77,10
4'	CH	Sobreposto	71,78	Sobreposto	70,20
5'	CH	Sobreposto	77,72	Sobreposto	76,60
6'	CH₂	Sobreposto	62,93	Sobreposto	60,80

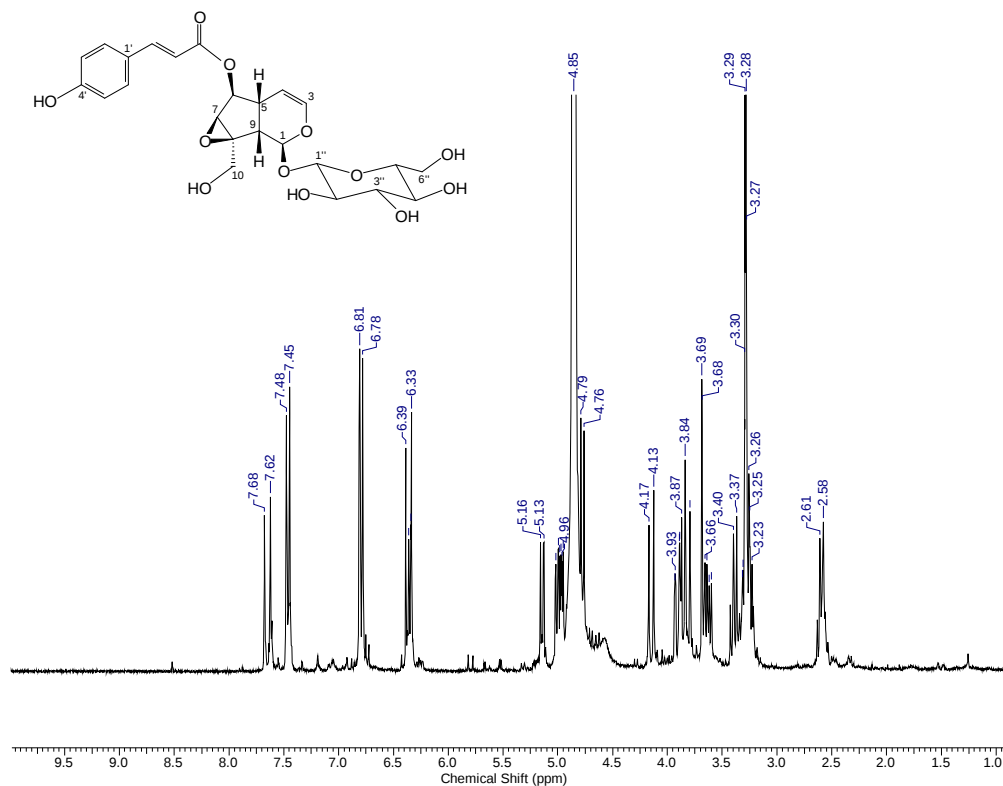


Figura 18 - Espectro de RMN ^1H da substância **9** (CD_3OD , 75 MHz)

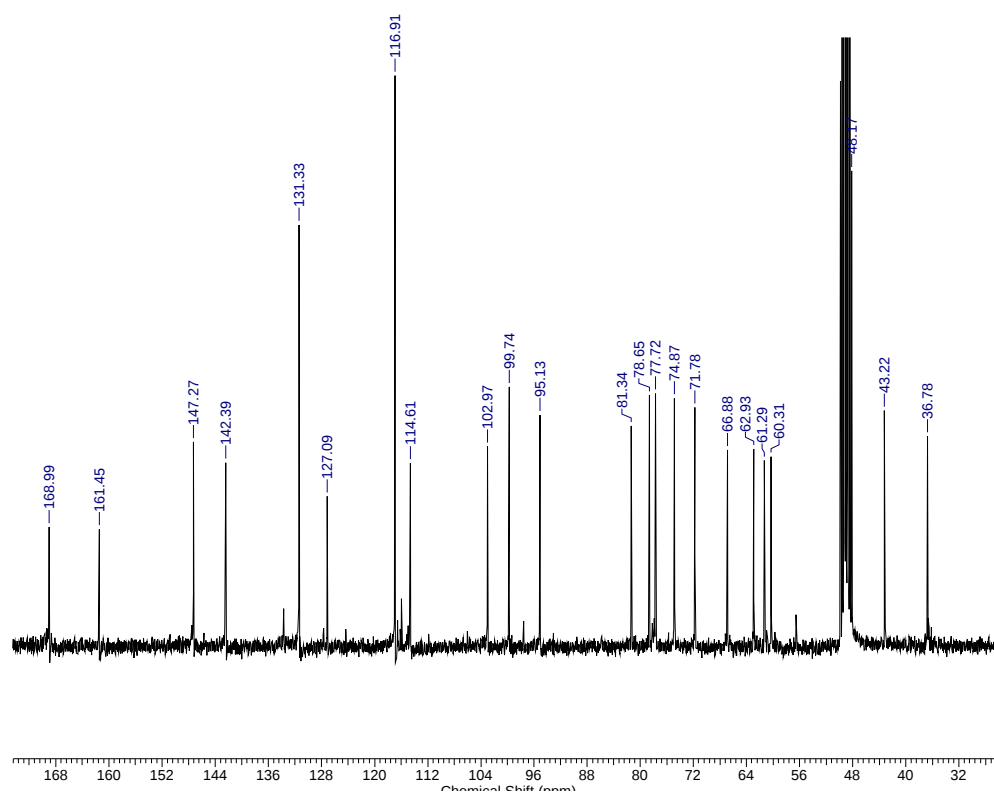


Figura 19 – Espectro de RMN ^{13}C da substância **9** (CD_3OD , 300 MHz).

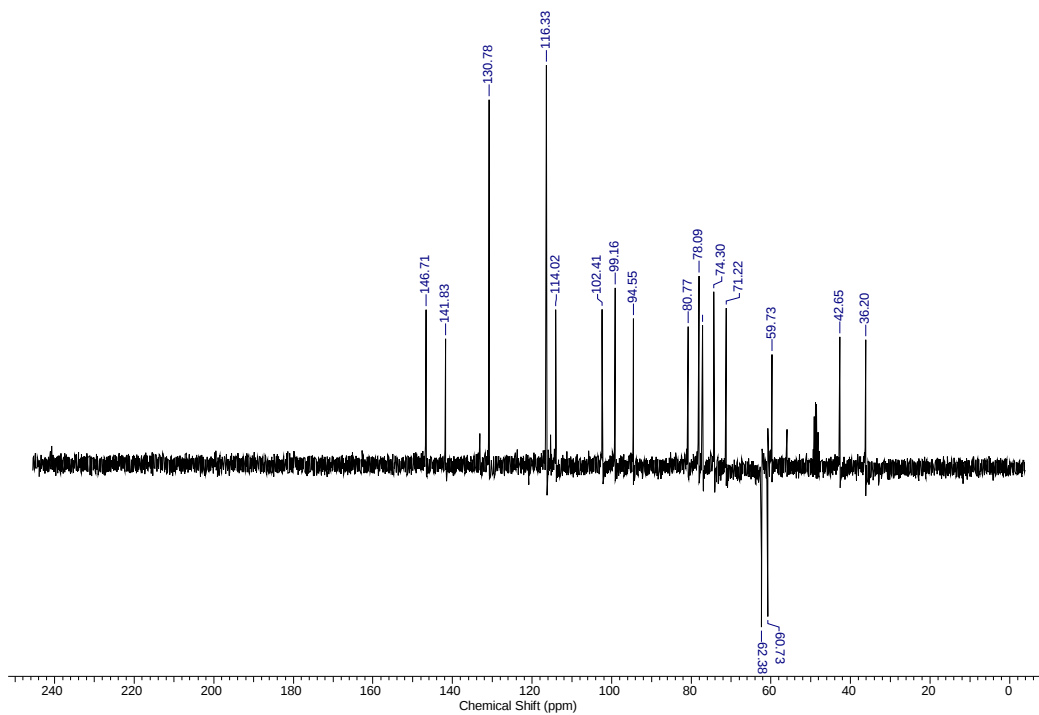


Figura 20 - Espectro de RMN de DEPT 135° da substância **9** (CD₃OD, 75 MHz).

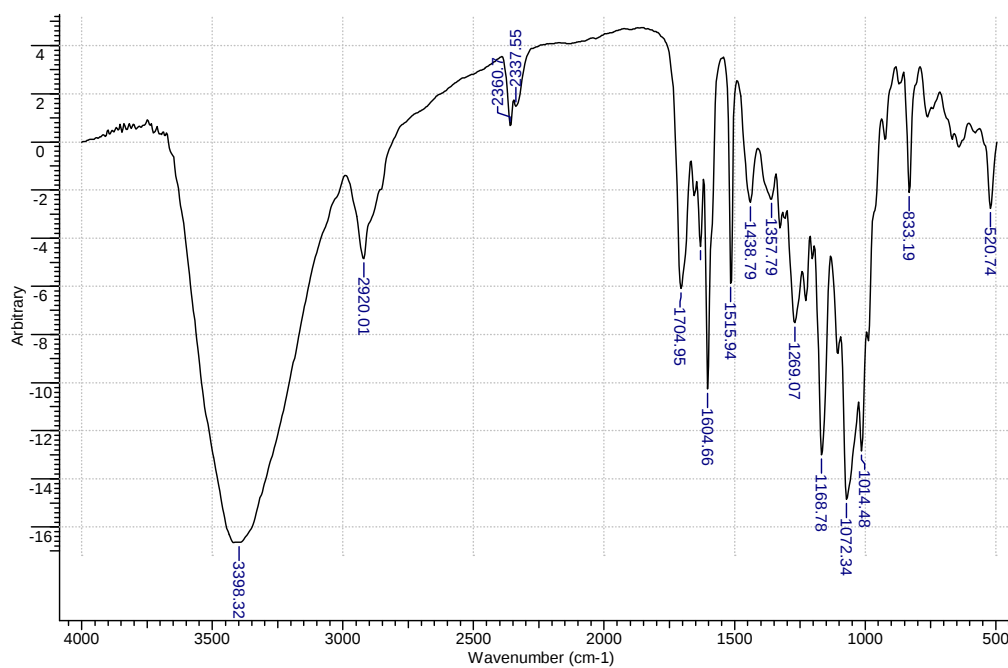


Figura 21 – Espectro de IV da substância **9** (Pastilha de KBr).

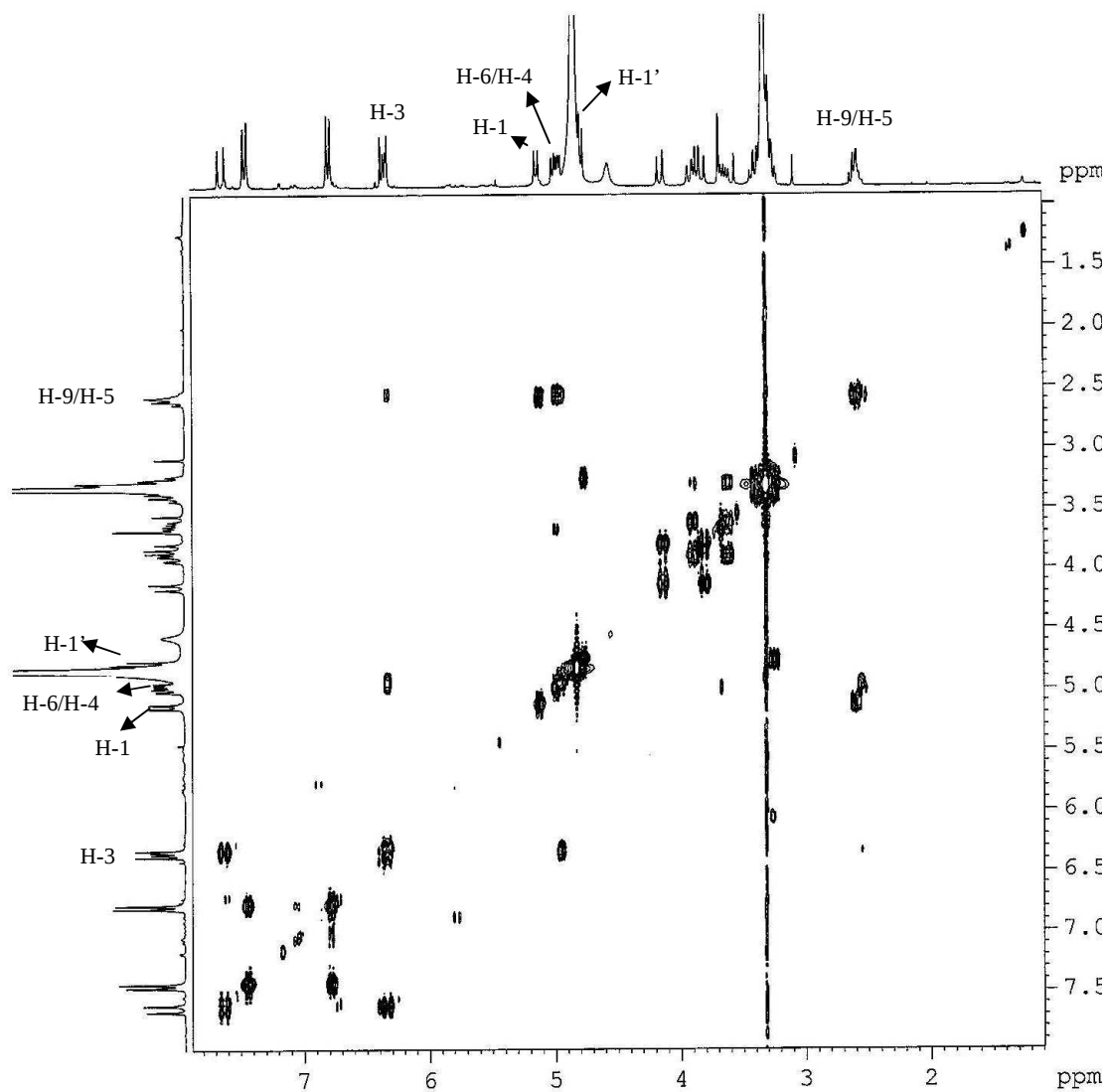


Figura 22 – Espectro de RMN- ^1H - ^1H COSY 90° da substância **9** (CD_3OD , 300 MHz)

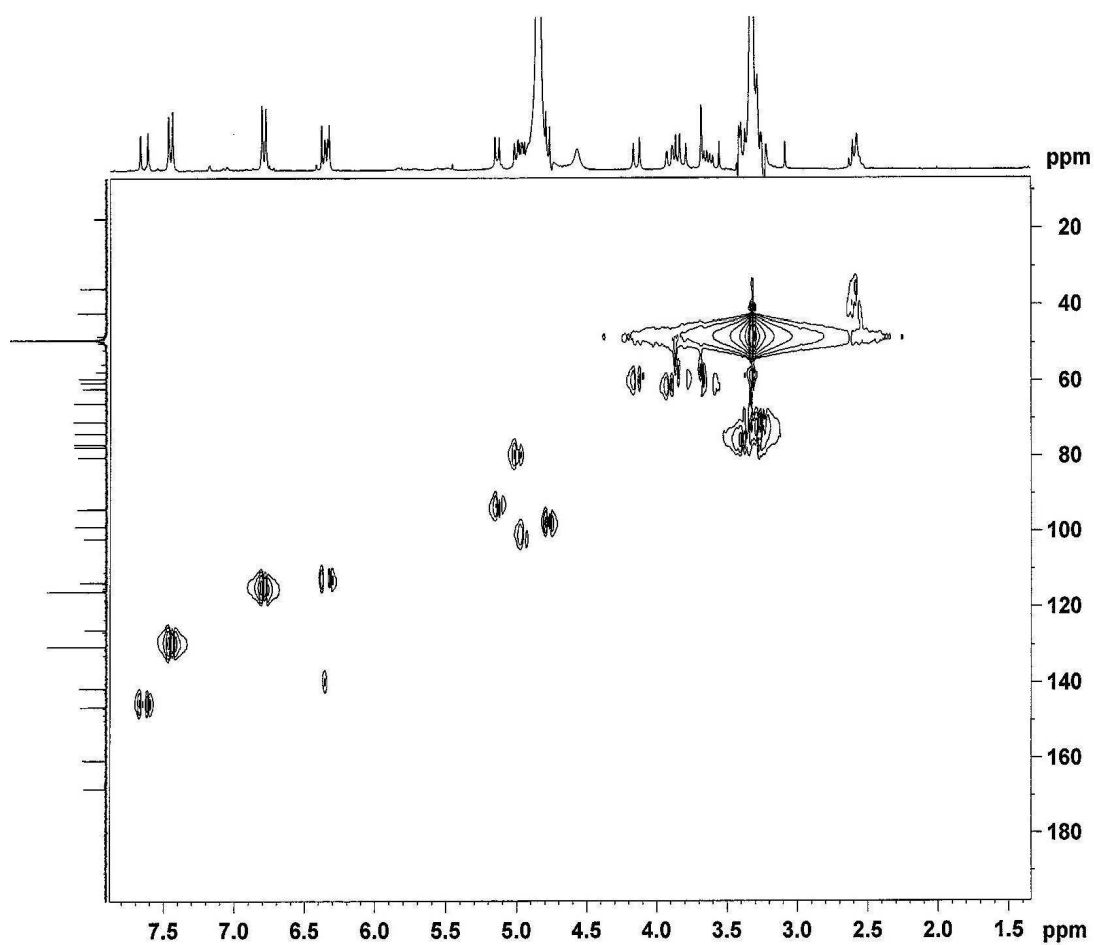


Figura 23 – Espectro de RMN-HSQC da substância **9** (CD_3OD , 75 MHz).

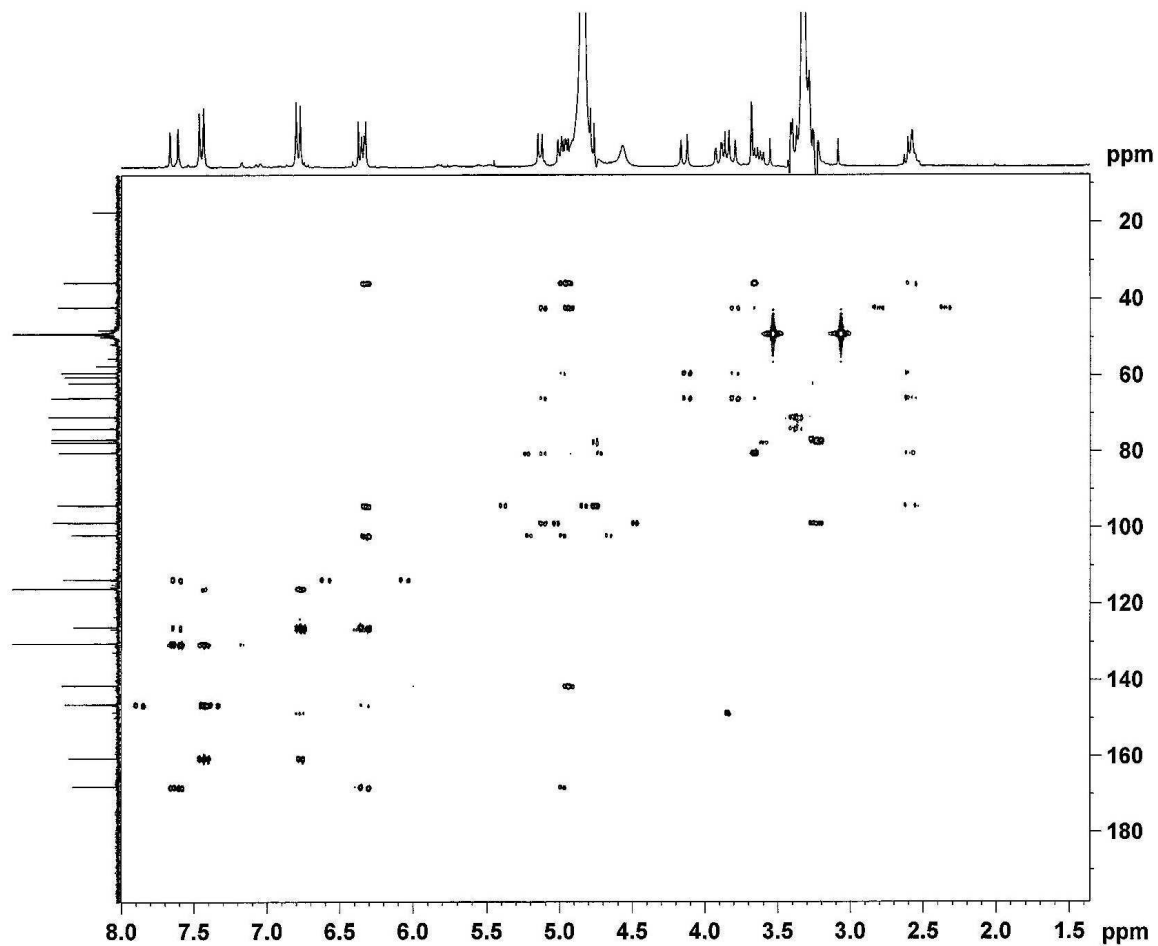


Figura 24 – Espectro de RMN-HMBC da substância **9** (CD₃OD, 75 MHz).

5.3 - Identificação de 2-(4-hidroxifenil) etanol (tirosol) (5).

A substância **5**, oriunda da coluna cromatográfica em fase reversa da fração de acetato de etila (Esquema 4), apresentou-se como cristais brancos, passando à coloração roxa em CCDA, quando revelada com vanilina. Seu espectro de RMN de ^1H mostrou dois dubletos na região de hidrogênios em anel aromático, sendo um sinal em 7,02 ppm (2H, $J=8,4$ Hz) e o outro sinal em 6,69 ppm (2H, $J=8,4$ Hz). O mesmo valor de acoplamento para os dois sinais é sugestivo de anel aromático *para*-substituído. Observa-se ainda, dois tripletos em 3,68 ppm (2H, $J=7,3$ Hz) e em 2,71 ppm (2H, $J=7,3$ Hz), característicos de hidrogênios metilênicos vicinais [Tabela 4; Figura 25].

O espectro de RMN de ^{13}C , confrontado com o espectro de DEPT 135°, apresentou sinais em 130,85 ppm e 116,16 ppm, referentes aos carbonos metínicos do anel aromático (C-2', C-6') e (C-3', C-5'), respectivamente; os sinais em 131,85 e 156,76 ppm foram atribuídos aos carbonos não hidrogenados do anel aromático C-1' e C-4', sendo este último ligado a oxigênio [Tabela 4; Figura 26]. Também foram observados sinais relativos a carbonos metilênicos da parte alifática desta estrutura em 64,59 ppm (C-2) e 39,41 ppm (C-1), sendo o primeiro relativo a uma unidade oximetilênica [Tabela 4; Figura 27].

Dados de infravermelho foram analisados, podendo-se destacar os estiramentos em: 3421 cm^{-1} (ν C-OH), 2923 cm^{-1} (ν C-H), 1515 cm^{-1} (ν C=C), 1099 cm^{-1} (ν C-O), 820 cm^{-1} (ν C-H) (Figura 28).

Por meio destes dados foi possível propor para a substância **5** a estrutura do 2-(4-hidroxifenil)-etanol, conhecido como tirosol. Esta substância tem importantes propriedades, tais como inibidora do crescimento de *Cândida albicans* (CHEN, 2004) e atividade antifúngica *in vitro* sobre *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium* (ROCHA, 2004). Ela também pode ser produzida por bactérias gram-negativas e age como fungicida *in vivo* contra *Callinectes fungus* na superfície de embriões de lagosta americana (*Homarus americana*) (GIL-TURNES, 1992). Na família Bignoniaceae, Soares (2006) isolou tirosol de *Tabebuia caraíba*, porém, este é o primeiro relato desta substância na espécie *Tabebuia insignis*.

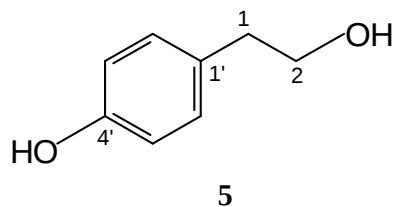


Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 300 e 75 MHz) obtidos da substância 5 e do tirosol (GIL-TUNES, 1992).

		5		Tirosol	
		$\delta \text{ H (J = Hz)}$	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H (J = Hz)}$	$\delta \text{ C}$
1	CH_2	2,71 (t)	39,41	2,70 (t)	39,10
2	CH_2	3,68 (t)	64,59	3,70 (t)	63,80
1'	C	-	131,07	-	131,00
2' – 6'	CH	7,02 (2H, d, 8,6)	130,85	7,00 (2H, d, 8,6)	130,00
3' – 5'	CH	6,69 (2H, d, 8,4)	116,16	6,60 (2H, d, 8,4)	115,40
4'	C	-	156,76	-	155,00

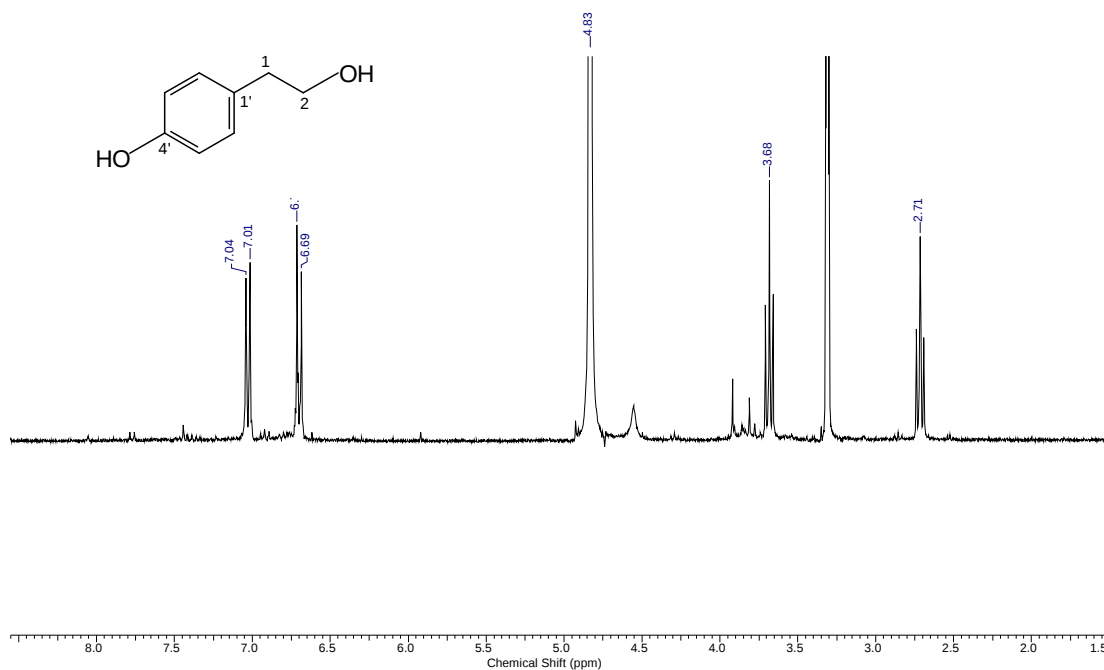


Figura 25 - Espectro de RMN ^1H da substância 5 (CD_3OD , 300 MHz).

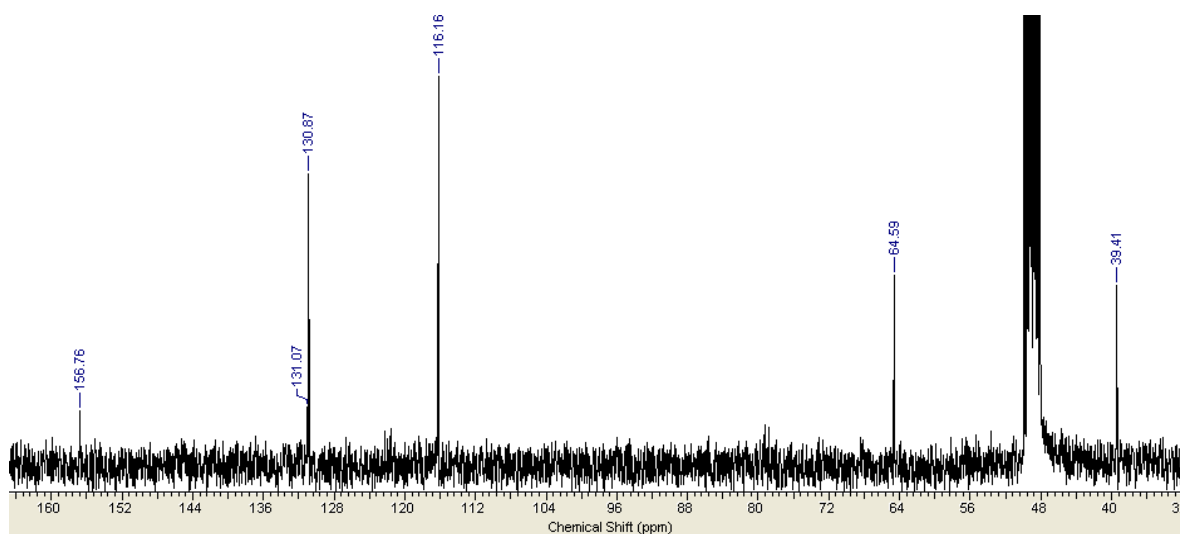


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 5 (CD_3OD , 75 MHz).

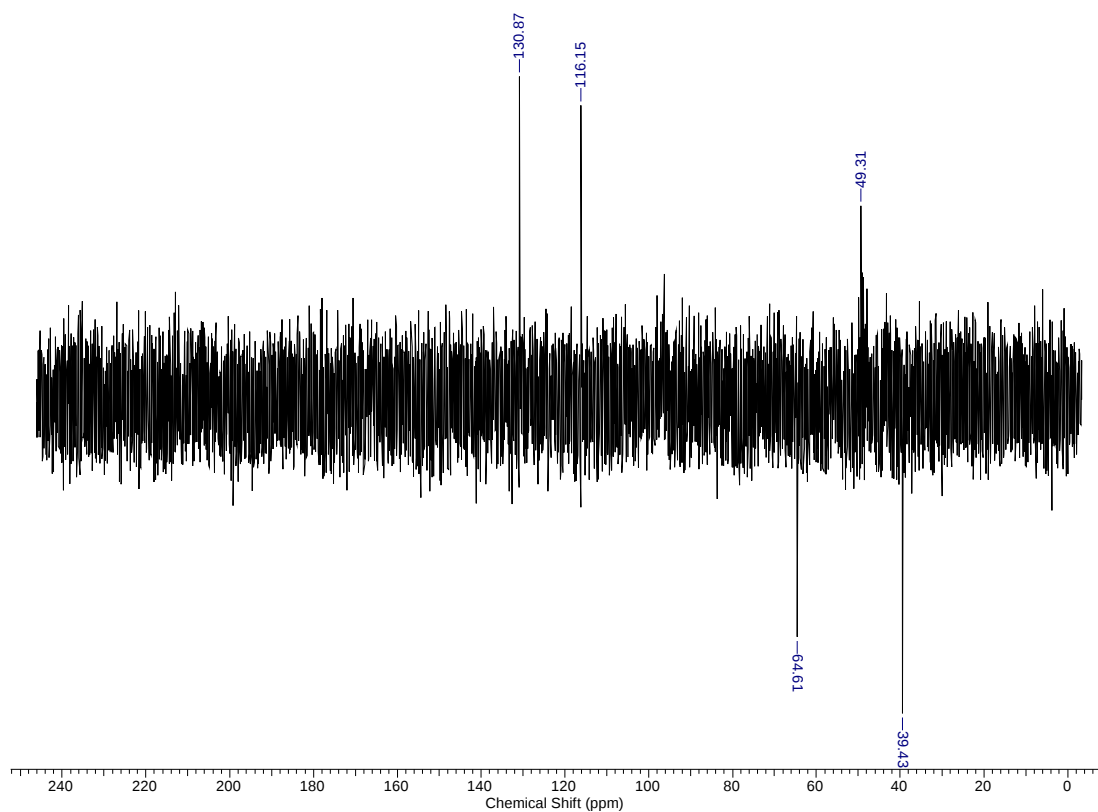


Figura 27 - Espectro de DEPT 135° da substância 5 (CD₃OD, 75 MHz).

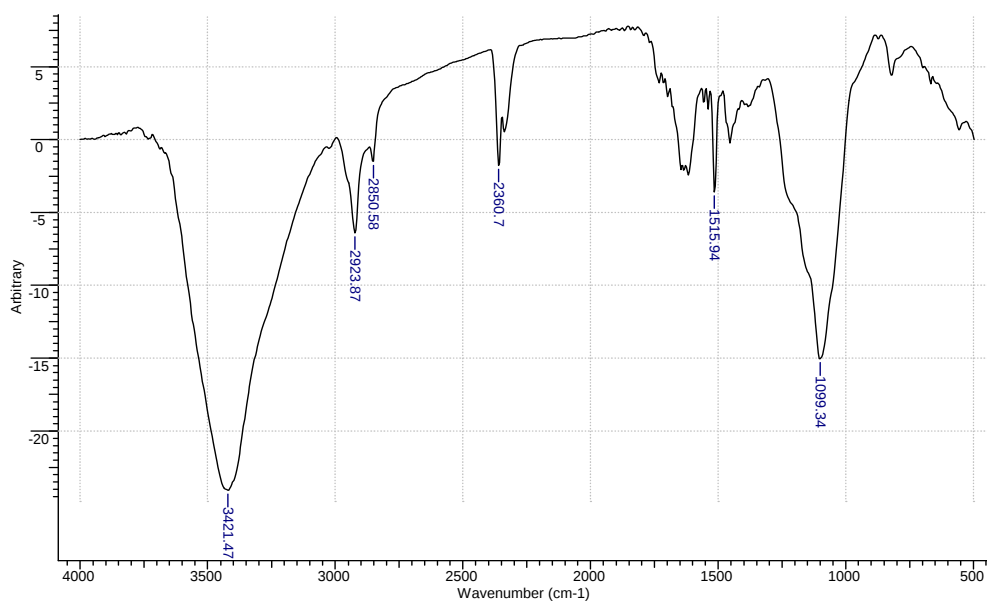


Figura 28 – Espectro de IV da substância 5 (Pastilha de KBr).

5.4 - Identificação do ácido cumárico (6).

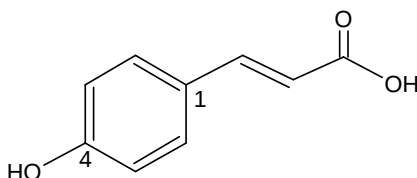
A substância **6**, oriunda da coluna de fase reversa da fração de acetato de etila (Esquema 4), apresentou-se como um sólido de coloração branca, que ao ser revelado com vanilina em placa de CCDA, apresentou coloração rósea.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos de hidrogênios de anel aromáticos *para*-substituído em 7,39 ppm (2H, d, $J=8,7$ Hz) e em 6,78 ppm (2H, d, $J=8,7$ Hz); também apresentou sinais de hidrogênios de dupla olefínica com padrão de substituição *trans* em 7,42 ppm (1H, d, $J = 15,9$ Hz) e 6,32 ppm (1H, d, $J = 15,9$ Hz) [Tabela 5; Figura 29].

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais de carbonos metínicos em 130,36 e 116,61 ppm, sugestivos de carbonos de anel aromático. Os sinais em 121,09 e 142,67 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos ligados ao anel aromático. Observou-se ainda, sinais de carbonos não ligados a hidrogênio, sendo o sinal em 160,11 ppm (C-4) atribuído a carbono fenólico, o sinal em 128,40 ppm relativo ao carbono C-1 do anel aromático e em 174,68 ppm sinal característico de carbonila α - β -insaturada [Tabela 5; Figura 30].

Dados de infravermelho foram analisados, podendo-se destacar os estiramentos em: 3413 cm^{-1} (ν C-OH), 2920 cm^{-1} (ν C-H), 1604 cm^{-1} (ν C=O), 1554 cm^{-1} (ν C=C), $1107 - 1245\text{ cm}^{-1}$ (ν C-O), 833 cm^{-1} (ν C-H) [Figura 32].

Os dados mencionados acima permitiram caracterizar a substância **6** como sendo o ácido cumárico (Soares, 2006). Esta substância pertence à classe de compostos fenólicos, tipo C6-C3, que são comuns em plantas e responsáveis por importantes atividades biológicas, como por exemplo, as atividades antibacteriana, antiinflamatória, cicatrizante, antioxidante, antiviral, dentre outros (CASTRO *et al.*, 2007). No gênero *Tabebuia*, o ácido cumárico foi descrito por Soares (2006) em *Tabebuia caraíba*.



6

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CD_3OD , 75 e 300 MHz) obtidos da substância **6** e comparado com a literatura (SOARES, 2006).

		6		Ácido cumárico	
		$\delta \text{ H } (J = \text{Hz})$	$\delta \text{ C}$	$\delta \text{ H } (J = \text{Hz})$	$\delta \text{ C}$
COO	C	-	174,68		175,30
α	CH	6,32 (1H, d, 15,9)	121,09	6,28 (1H,15,9)	119,70
β	CH	7,42 (1H, d, 15,9)	142,67	7,43 (1H, d,15,9)	142,50
1	C	-	128,40	-	130,90
2, 6	CH	7,39 (2H, d, 8,7)	130,36	7,27 (2H, d, 7,9)	129,50
3, 5	CH	6,78 (2H, d, 8,7)	116,61	6,66 (2H, d, 7,9)	115,17
4	C	-	160,11	-	159,20

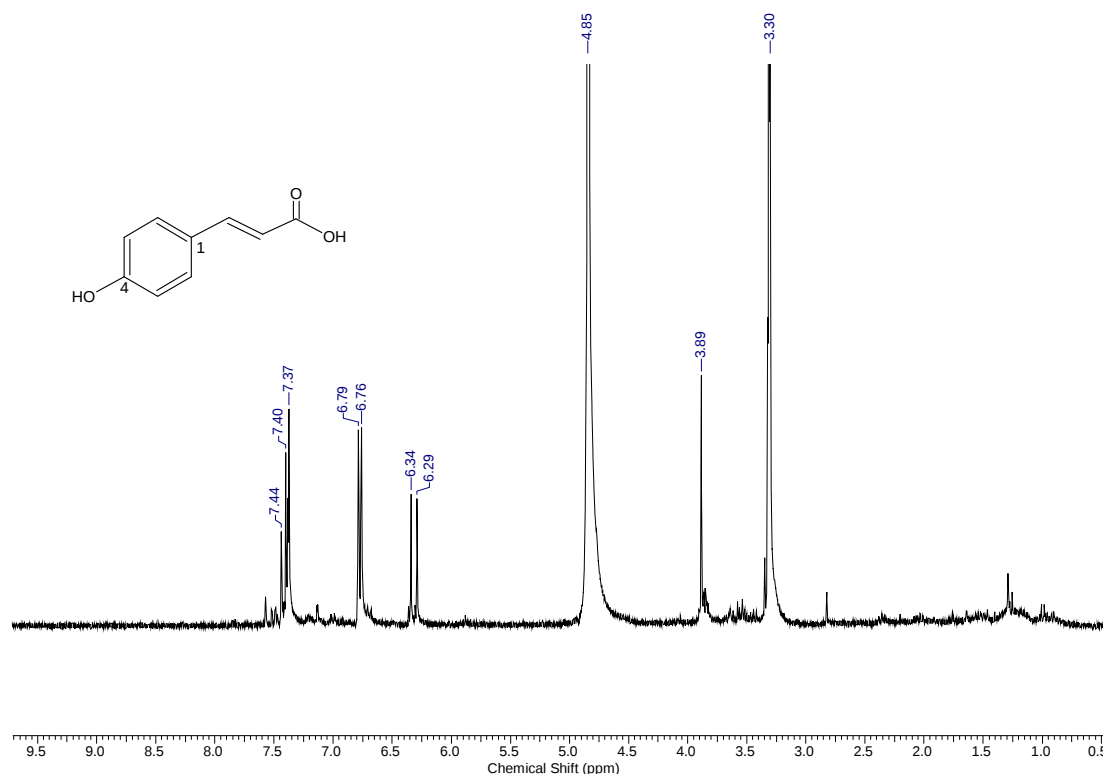


Figura 29 - Espectro de RMN ¹H da substância **6** (CD₃OD, 300 MHz).

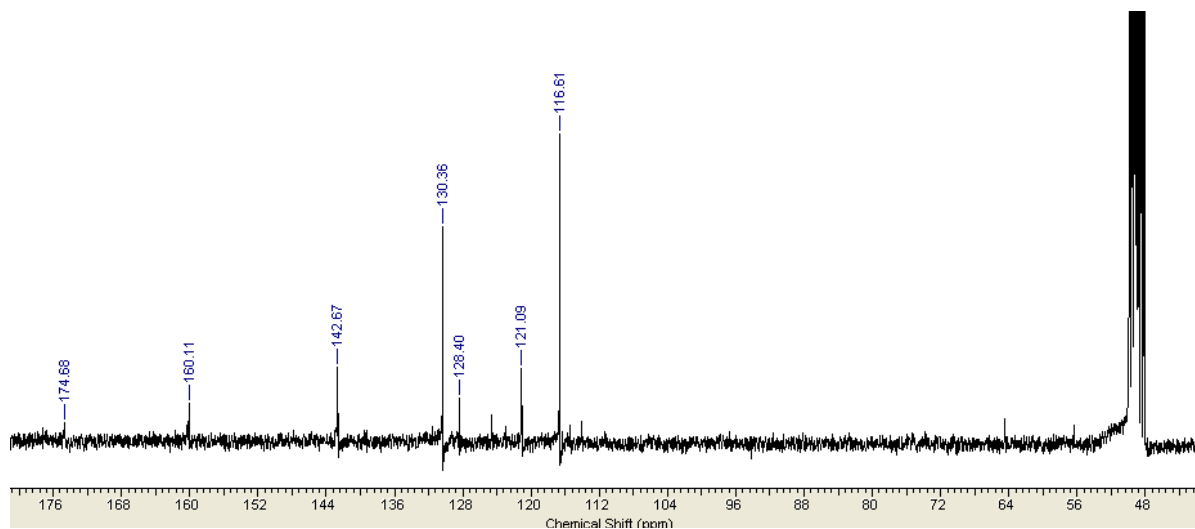


Figura 30 - Espectro de RMN ¹³C da substância **6** (CD₃OD, 75 MHz).

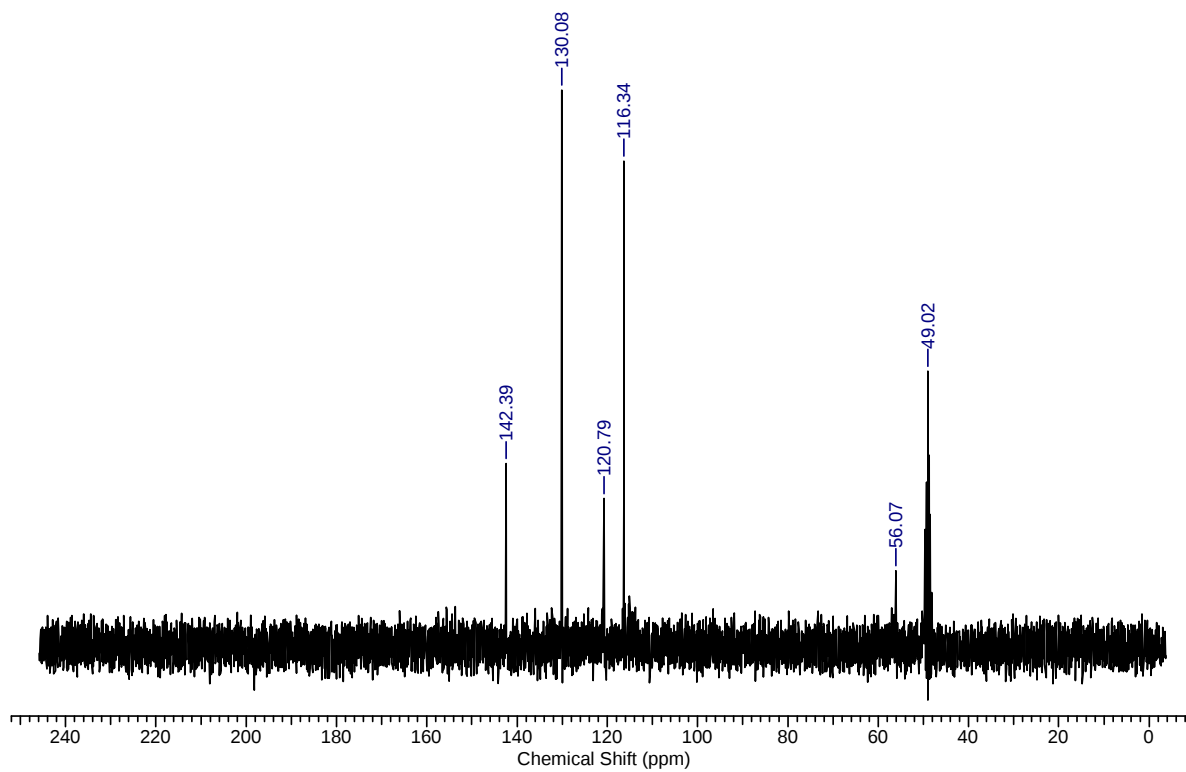


Figura 31 - Espectro de DEPT 135° da substância **6** (CD₃OD, 75 MHz)

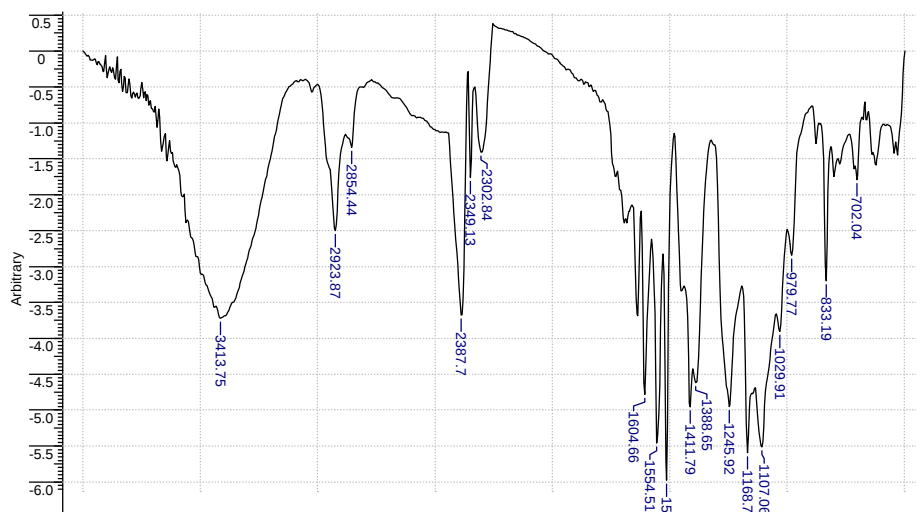


Figura 32 - Espectro de infravermelho da substância **6** em pastilha de KBr.

5.5 - Identificação da Substância (2)

A substância **2**, obtida da fração acetato de etila, apresentou-se como um sólido branco, que ao ser revelado com vanilina em placa de CCDA apresentou coloração rósea.

O espectro de RMN ^1H da substância **2** apresentou sinais a 6,78 ppm (2H, $J = 8,4$ Hz) e 7,09 ppm (2H, $J = 8,4$ Hz), característicos de hidrogênios de anel aromático de um anel *para*-substituído. Este espectro apresentou, também, três tripletos entre 2,00 e 4,50 ppm, sendo que dois deles, a 4,25 e 2,85 ppm, com o mesmo valor de constante de acoplamento ($J=7,5$ Hz). Estes sinais correspondem a dois metilenos vicinais, sendo que o valor do deslocamento a 4,25 ppm é indicativo um metileno de éster. O acoplamento entre os hidrogênios correspondentes a estes sinais foi confirmado através do espectro de RMN-COSY 90° [Figura 36]. Outros sinais observados foram um tripleto a 2,30 ppm, um sinal intenso a 1,23 ppm e outro sinal a 0,90 ppm (típico de metila terminal de uma cadeia longa), cujo conjunto é característico de um ácido graxo [Tabela 6; Figura 33].

O espectro de RMN de ^{13}C , confrontado com espectro DEPT 135° [Figura 35] possibilitou a verificação de um sinal em 173,91 ppm, referente a uma carbonila de éster, de sinais de carbonos metínicos em 130,03 ppm (C-2, C-6) e 115,34 ppm (C-3, C-5), compatíveis com o anel aromático acima mencionado, além de sinais de carbonos sem hidrogênio em 154,29 ppm (C-4) e 130,16 ppm (C-1). Esses sinais são compatíveis com anel aromático *para*-substituído por uma hidroxila e um grupo alquila. Os sinais relativos aos grupos metilenos foram observados em 29,71 ppm (sinal intenso) e em 31,94 (C-3), 24,98 (C-4) e 22,69 (C-5) além do sinal de metila em 14,12 ppm. Estes dados confirmam a proposta da cadeia acíclica [Tabela 6; Figura 34]. Os sinais adicionais de carbonos oximetilênicos em 64,95 (C-2) e metilênico em 34,39 (C-1) ppm foram atribuídos à unidade alcoila do éster.

Dados de infravermelho foram analisados, podendo-se destacar os estiramentos em: 3394 cm^{-1} (v C-OH), 2920 cm^{-1} (v C-H), 1735 cm^{-1} (v C=O), 1461 cm^{-1} (v C=C), 1053 - 1275 cm^{-1} (v C-O), 721 cm^{-1} (v C-H) [Figura 37].

A análise do conjunto dos dados mencionados acima permitiu propor que a substância **2** corresponde ao tirosol esterificado com um ácido graxo saturado.



Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 75 e 300 MHz) obtidos da substância 2.

		2		
		δH (J = Hz)	δH - ^1H , Cosy 90°	δC
1'	C	-		130,03
2', 6'	CH	7,09 (2H, J = 8,4)	3', 5'	130,03
3', 5'	CH	6,78 (2H, J = 8,4)	2', 6'	115,34
4'	C	-	-	154,29
COO	C	-	-	173,91
1	CH₂	2,88 (2H, J = 7,05)	1-2	34,39
2	CH₂	4,26 (2H, J = 7,05)	2-1	64,94
3	CH₂	2,30 (2H, J = 7,5)	-	31,94
CH₂n	CH₂	1,23 (s)	(CH ₂)n - 6	29,71
4	CH₂	-	-	24,98
5	CH₂	-	-	22,69
6	CH₃	0,90 (3H, s)	6 - (CH ₂)n	14,12

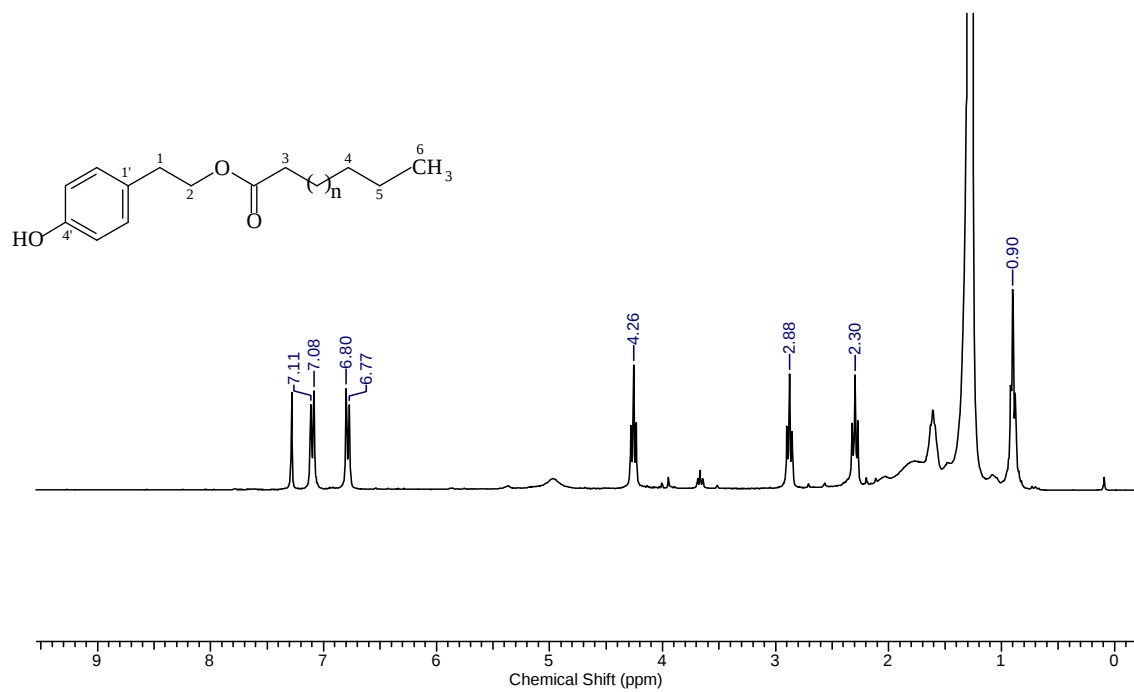


Figura 33 - Espectro de RMN ¹H da substância 2 (CDCl₃, 300 MHz).

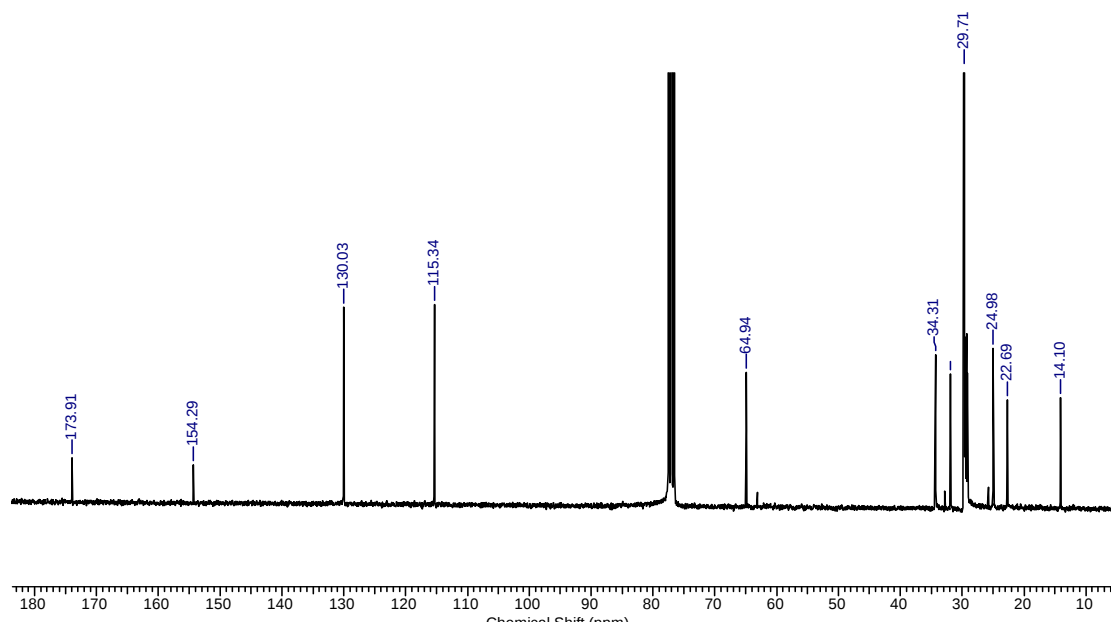


Figura 34 - Espectro de RMN ¹³C da substância 2 (CDCl₃, 75 MHz).

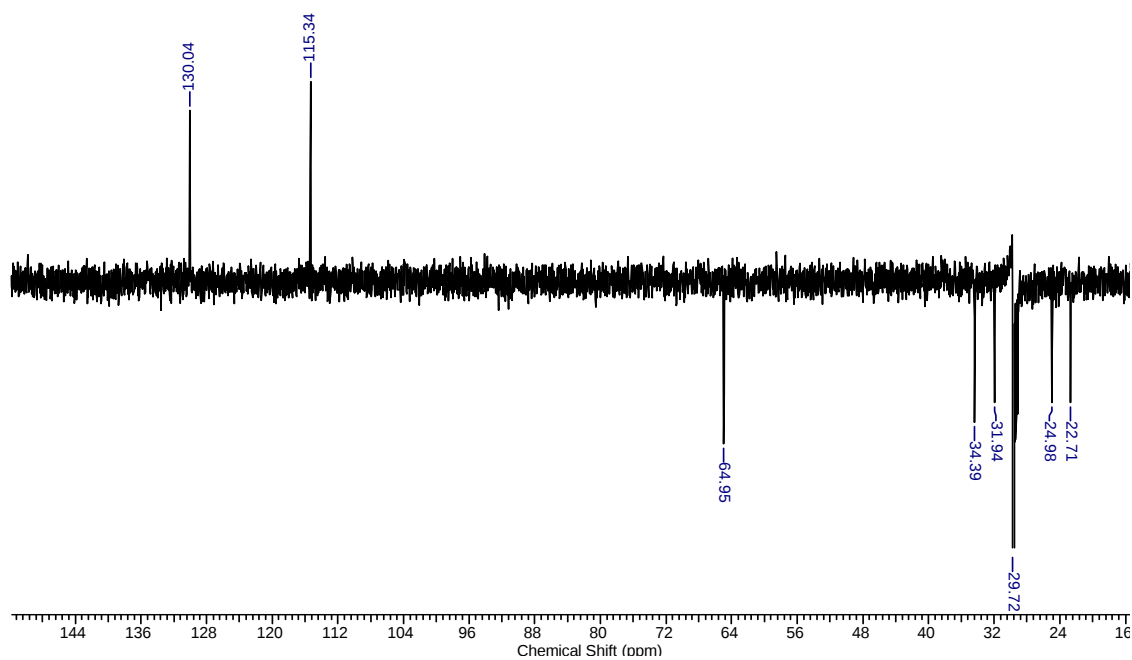


Figura 35 - Espectro de RMN de DEPT 135° da substância 2 (CDCl₃, 75 MHz).

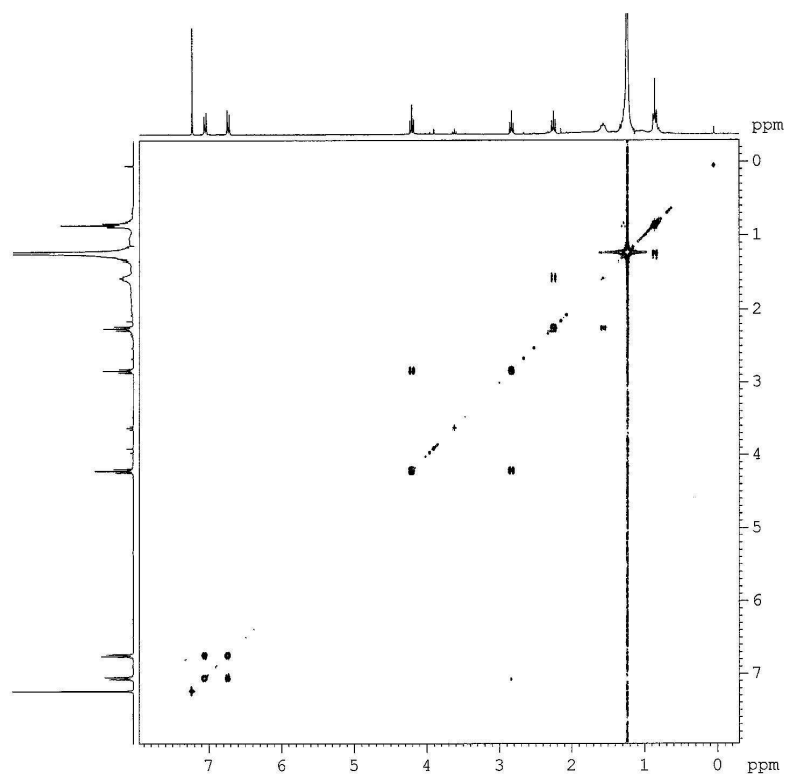


Figura 36 – Espectro de RMN- ^1H - ^1H COSY 90° da substância 2 (CDCl_3 , 300 MHz).

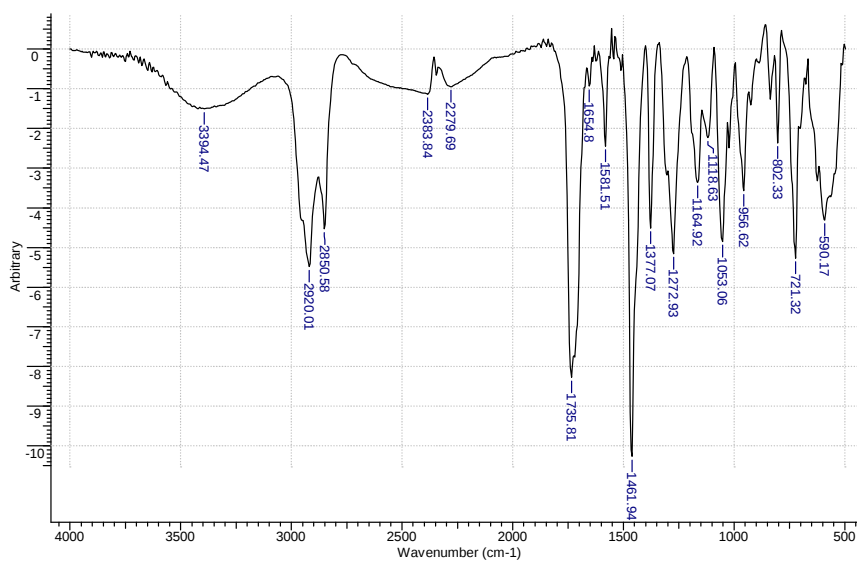


Figura 37 – Espectro de IV da substância 2 em pastilha de KBr.

5.6 - Identificação de 2(4-hidroxifenil)etil 1-O- β -D-apiofuranosil-(1-6)- β -D- glicopiranosídeo (**8**).

A substância **8**, oriunda da coluna cromatográfica de fase reversa da fração metanólica (Esquema 5), apresentou-se como um sólido de coloração amarelada, que ao ser revelado com vanilina em CCDC forneceu coloração rósea.

O espectro de RMN ^1H da substância **8** apresentou sinais na região típica de hidrogênios de anéis aromáticos com padrão de substituição *para* em 7,06 (1H, d, $J=9,0$ Hz) e 6,70 (1H, d, $J=9,0$ Hz) e um conjunto de sinais entre 3,00 e 4,00 ppm relativos à hidrogênios carbinólicos, sugerindo a presença de açúcares. Os sinais em 4,28 ppm (1H, $J=9,0$ Hz) e 5,02 ppm (1H, $J=2,0$ Hz) sugerem a presença de hidrogênios anoméricos [Tabela 7; Figura 38].

Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C em 130,80 (C-1), 130,90 (C-2, C-6), 116,10 (C-3, C-5), e 156,60 (C-4) são característicos da estrutura molecular do tirosol, conforme discutido para a estrutura 5. Os sinais em 104,40 e 110,70 ppm foram atribuídos aos carbonos anoméricos de dois açúcares, enquanto os que ocorrem entre 65 e 83 ppm são referentes aos outros carbonos de carboidratos. Observa-se neste espectro um total de onze sinais que podem ser atribuídos a carbonos de uma hexose e uma pentose na estrutura de **8**. A presença de um carbono carbinólico em 80,62 ppm não hidrogenado, aliado ao fato de que um dos açúcares ser uma pentose, levou à proposta da presença de apiofuranose na estrutura da molécula. O conjunto dos outros seis sinais não compatíveis com os deslocamentos de carbonos da β -D-glicose. [Tabela 7; Figura 39].

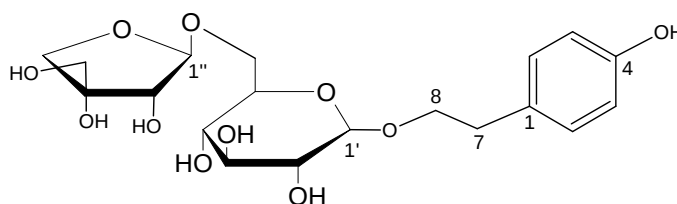
Por meio do espectro de RMN de DEPT 135° foi possível observar sinais de carbonos metilênicos vicinais em 36,36 e 72,18 ppm referente à C-7 e C-8, respectivamente, e sinais em 65,34 e 74,56 ppm relativos à C-5'' e C-4'', respectivamente. O sinal em 68,37 ppm foi atribuído ao C-6' da glicose, sendo que esta forte desproteção foi atribuída ao fato de a unidade de apiofuranose estar ligada nesta posição [Tabela 7, Figura 40].

Foram realizados também os experimentos de RMN bidimensional (COSY 90° , HMBC e HSQC) [Figuras 41, 42 e 43]. O espectro de HSQC possui sinais de correlação direta entre H-1', δ_{H} 4,28 (d, $J=9,0$ Hz) com o C-1' em 104,31 ppm; também confirmou a correlação direta entre o H-1'' δ_{H} 5,01 (d, $J=3,0$ Hz) e o C-1'' em 110,80 ppm da apiofuranose [Tabela 7, Figura 43]. Por meio do espectro de HMBC observou-se a correlação do hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 5,02) da apiofuranose com o carbono C-6 (δ_{C} 68,63) da glicose, bem como a correlação do hidrogênio anomérico da glicose com o carbono metilênico C-8 (δ_{C} 72,18), pertencente à unidade tirosol. Estas informações contribuíram

para a localização dos açúcares apiofuranose e glicopiranosídeo na estrutura da substância **8** [Tabela 11, Figura 42].

Dados de infravermelho foram analisados, podendo-se destacar os estiramentos em: 3367 cm^{-1} (ν C-OH), 2927 cm^{-1} (ν C-H), 1604 e 1515 cm^{-1} (ν C=C), 1053 cm^{-1} (ν C-O), 833 cm^{-1} (ν C-H) [Figura 44].

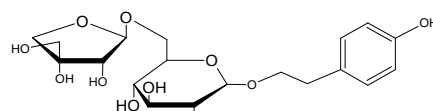
Todos esses dados corroboraram para propor a estrutura da substância **8**, como sendo o 2(4-hidroxifenil) etil-O- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosídeo. Esta substância foi relatada pela primeira vez em *Osmanthus asiaticus* (SUGIYAMA *et al*, 1993). Não é uma classe de substâncias comum, porém foi descrita em duas espécies da família Bignoniaceae, *Tabebuia incana* (POHLIT *et. al.*, 2007) e *Tabebuia impetiginosa* (WARASHINA *et. al.*,2004).



8

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais (300 e 75 MHz) da substância **8** e 2(4-hidroxifenil) etil O- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D- glicopiranosideo (WARASHINA *et. al.*,2004).

		8			2(4-hidroxifenil) etil O-β-apiofuranosil-(1$\rightarrow$6)- βglicopiranosideo	
		δH (J=Hz)	HSQC δC	HMBC (J H-C)	δH (J=Hz)	δC
1	C	-	130,80	-	-	-
2 – 6	CH	7,06 (1H, d, 9,0)	130,90	116,15; 130,80 e 156,60	7,00 (1H, d, 8,0)	7,00 (1H, d, 8,0)
3 – 5	CH	6,70 (1H, d, 9,0)	116,15	130,80; 130,91 156,60	6,67 (1H, d, 8,0)	6,67 (1H, d, 8,0)
4	C	-	156,60	-	-	-
7	CH₂	2,83 (t, 7,5 Hz)	36,36	71,92 130,80	2,78 (2H, m)	2,78 (2H, m)
8	CH₂	4,00 (t, 7,6Hz)	72,18	-	3,94	3,94
1'	CH	4,28 (d, 9,0 Hz)	104,31	71,92	4,27 (1H, d, 8,0 Hz)	4,27 (1H, d, 8,0 Hz)
2'	CH	3,20 (d, 9,0 Hz)	75,00	78,10 e 104,31	3,19 (t, 8,0 Hz)	3,19 (t, 8,0 Hz)
3'	CH	3,92 (d, 9,0 Hz)	78,10	-	3,34 (t, 8,0 Hz)	3,34 (t, 8,0 Hz)
4'	CH	3,36 (d, 6,0 Hz)	71,66	-	3,28 (t, 8,0 Hz)	3,28 (t, 8,0 Hz)
5'	CH	Sobreposto	76,70	-	3,40 (m)	3,40 (m)
6'	CH₂	Sobreposto	68,63	110,61	4,01 (dd, 11,5, 2,0) 3,63 (dd, 11,5, 6,0)	4,01 (dd, 11,5, 2,0) 3,63 (dd, 11,5, 6,0)
1''	CH	5,01 (d, 3,0 Hz)	110,80	-	5,05 (d, 2,0 Hz)	5,05 (d, 2,0 Hz)
2''	CH	3,92 (d, 3,0 Hz)	77,95	-	4,01 (d, 2,0 Hz)	4,01 (d, 2,0 Hz)
3''	C	-	80,62	-	4,09 (d, 10 Hz)	4,09 (d, 10 Hz)
4''	CH₂	3,79 (d, 9,0 Hz)	74,90	-	3,88 (d, 10,0 Hz)	3,88 (d, 10,0 Hz)
5''	CH₂	3,79 (d, 9,0 Hz)	65,61	-	4,37 (d, 11,5) 4,36 (d, 11,5)	4,37 (d, 11,5) 4,36 (d, 11,5)



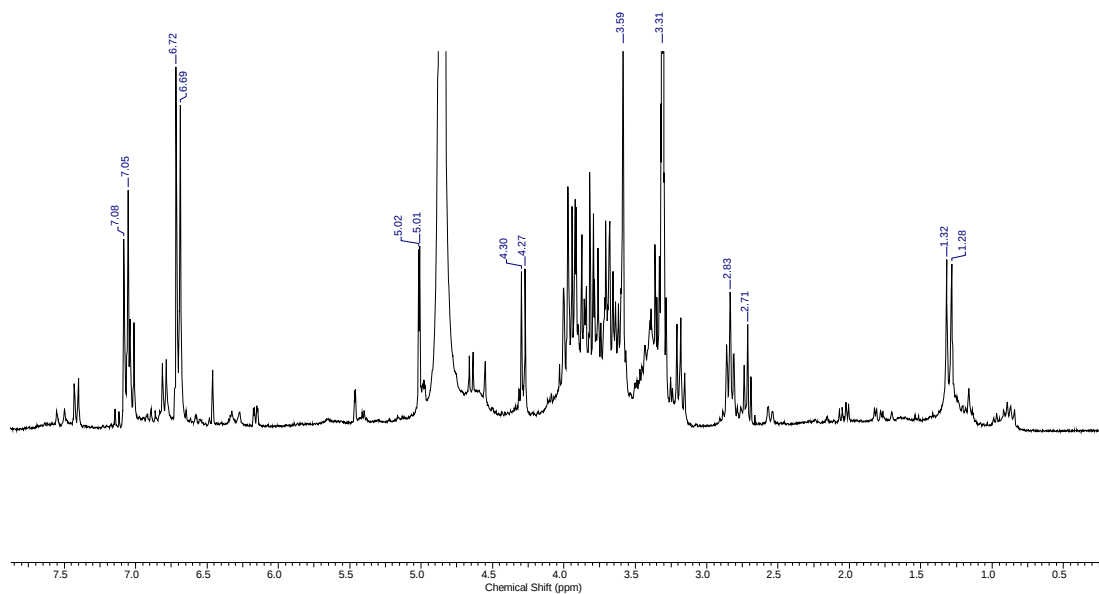


Figura 38 - Espectro de RMN ^1H da substância **8** (CD_3OD , 300 MHz).

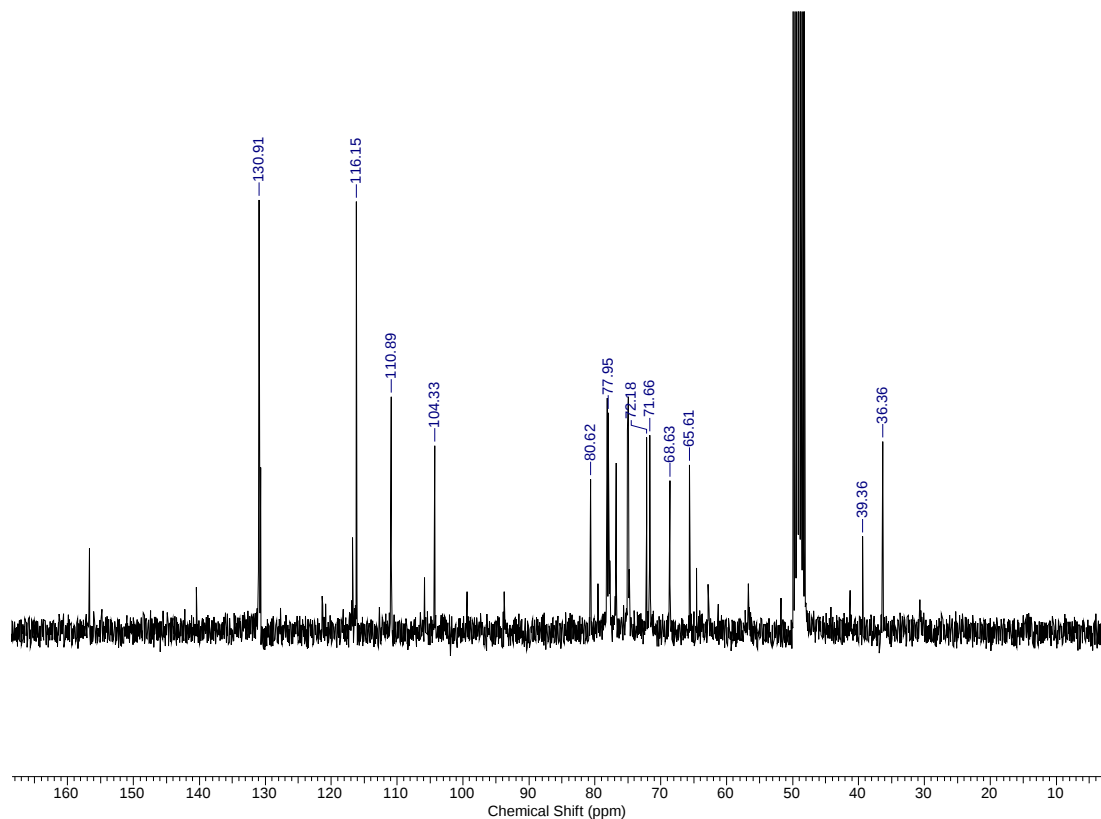


Figura 39 - Espectro de RMN ^{13}C da substância **8** (CD_3OD , 75 MHz).

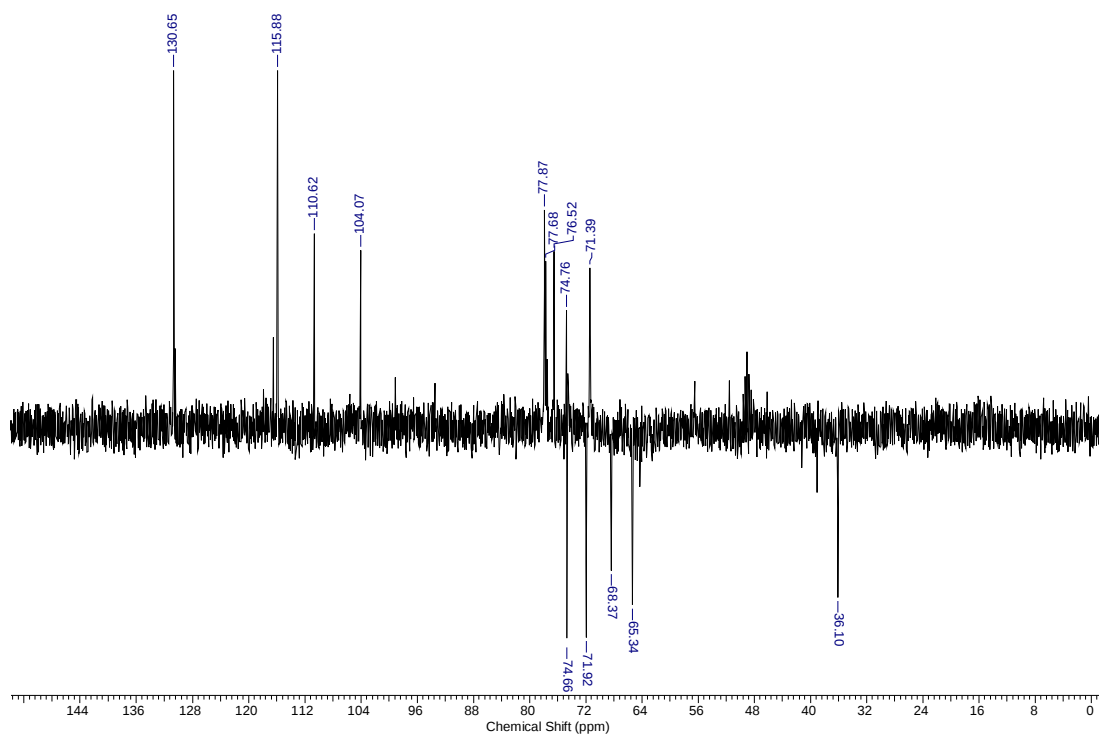


Figura 40 - Espectro de DEPT 135° da substância **8** (CD₃OD, 75 MHz).

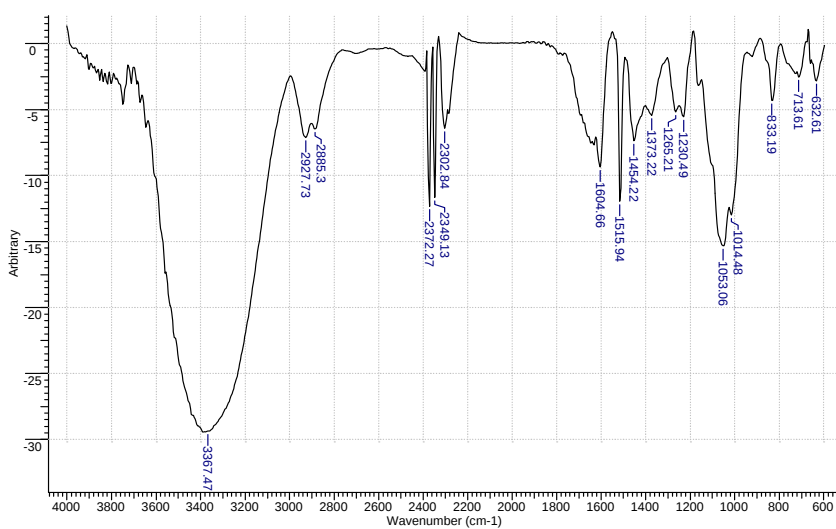


Figura 41 - Espectro de Infrvermelho da substância **8** (Pastilha de KBr)

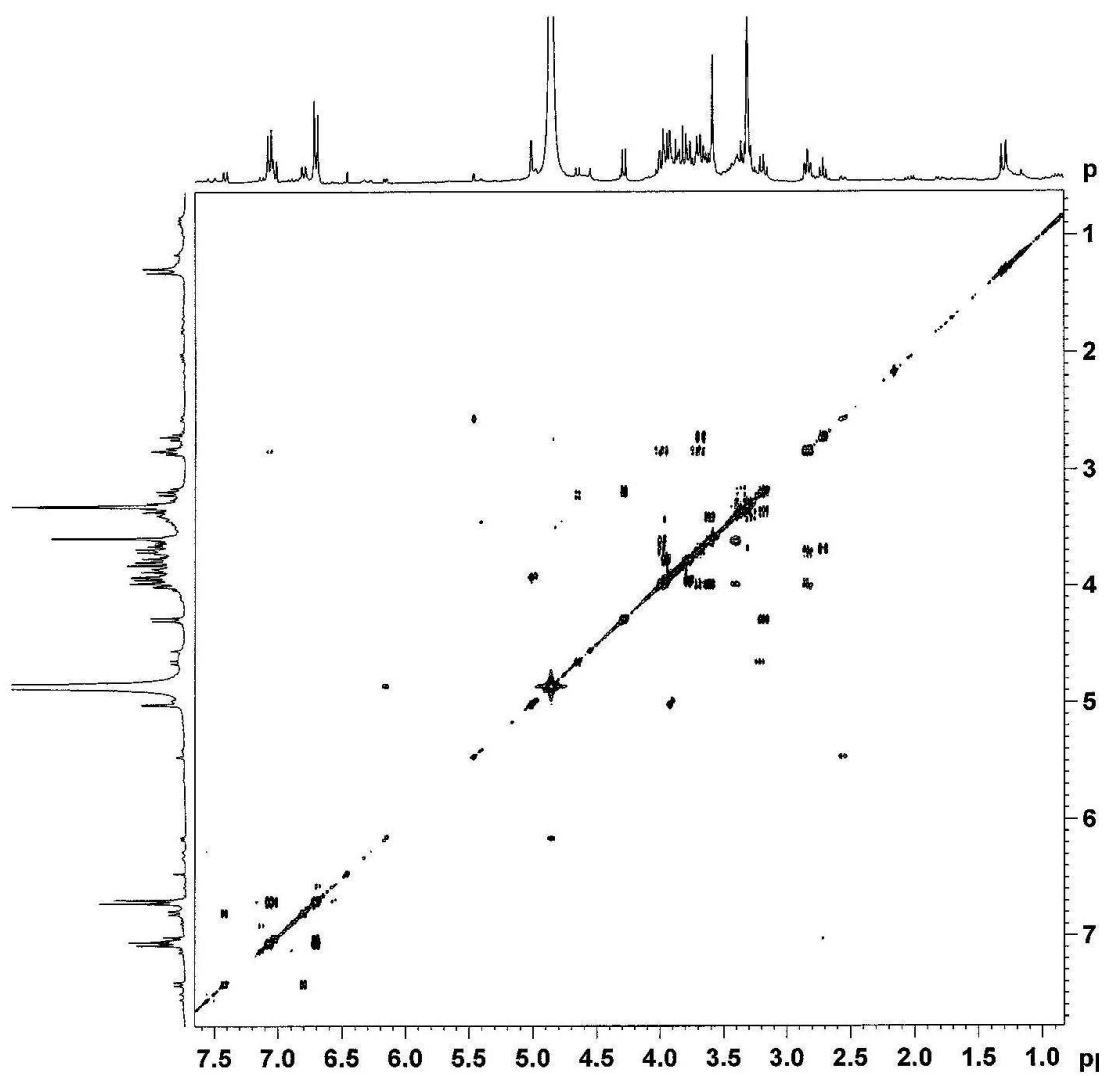


Figura 42 – Espectro RMN- ^1H - ^1H COSY 90° da substância **8** (CD_3OD , 300 MHz).

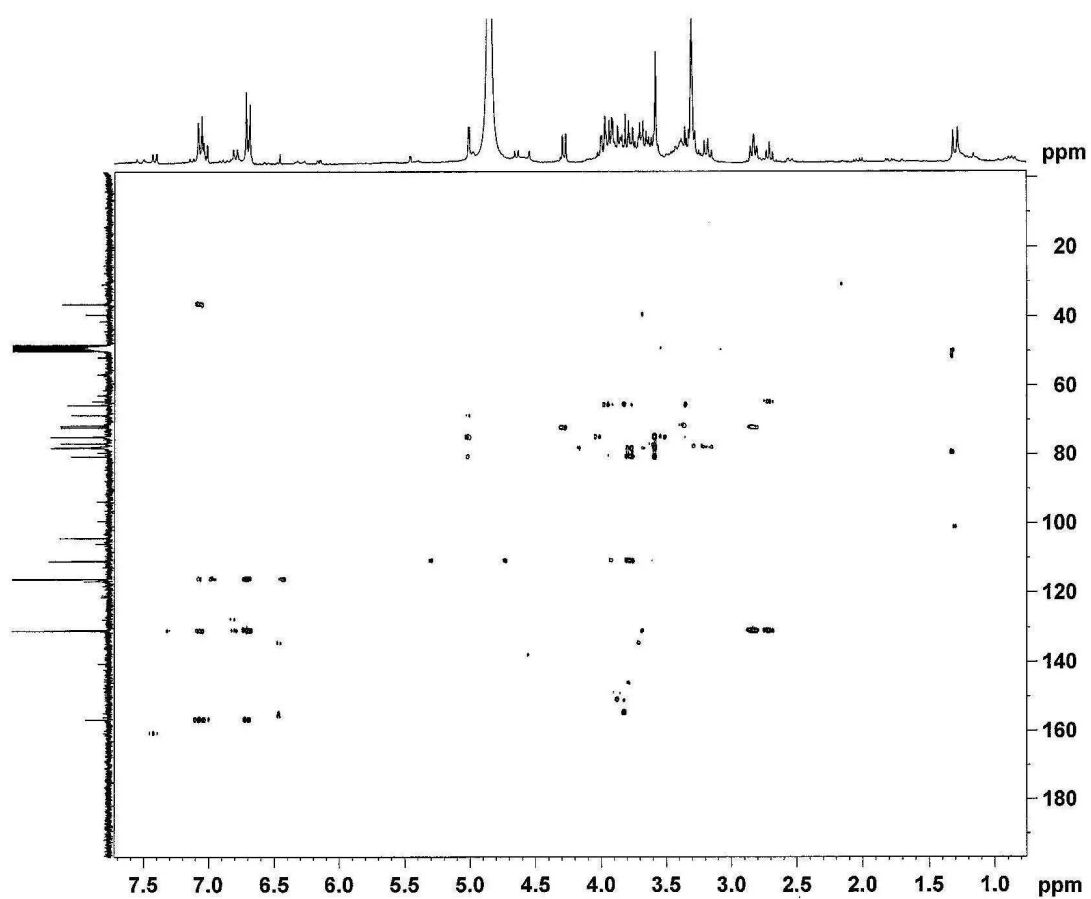


Figura 43 – Espectro de RMN-HMBC da substância **8** (CD₃OD, 75 MHz)

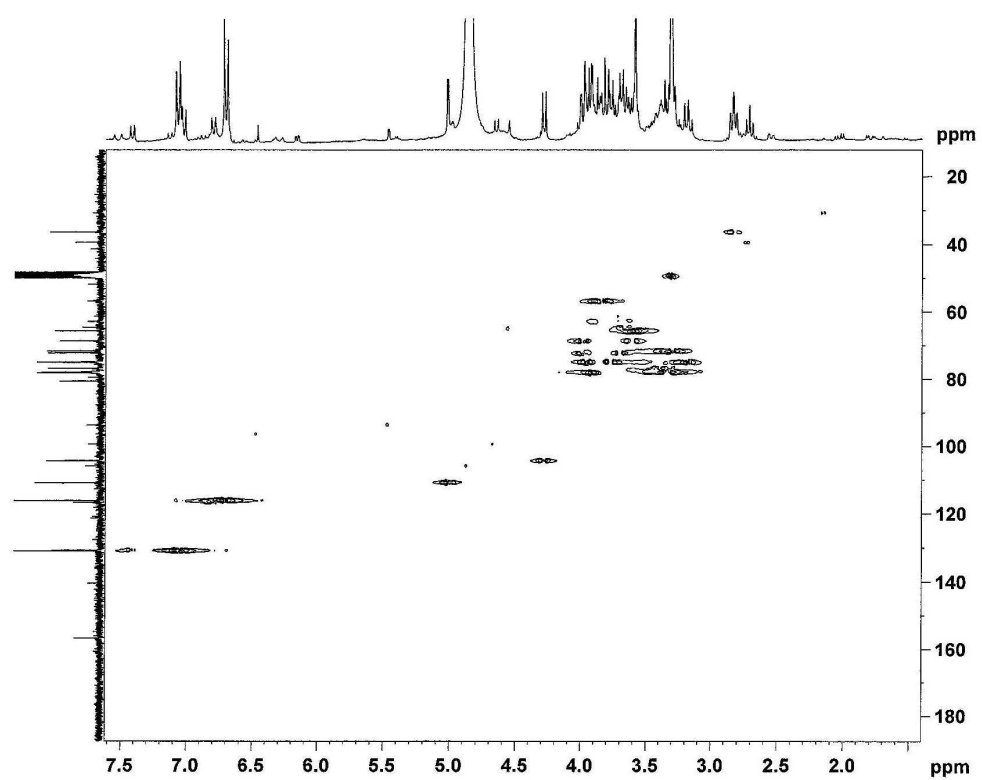


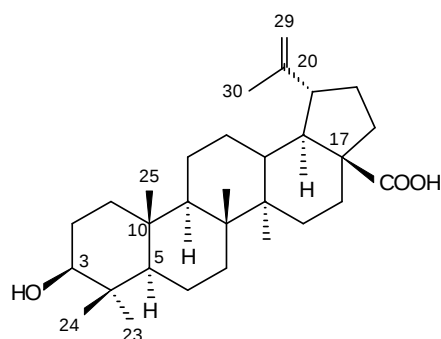
Figura 44 – Espectro de RMN-HSQC da substância **8** (CD₃OD, 75 MHz)

5.7 – Identificação do Ácido Betulínico (4)

A substância **4**, procedente da fase acetato de etila, apresentou-se como um sólido de coloração branca, com alteração da coloração para rósea quando revelada com vanilina em CCDA. Seu espectro de RMN de ^1H mostrou seis singletos na região entre 0,71 – 1,65 ppm atribuíveis a grupos metilas, sendo o sinal em 1,65 ppm referente à metila ligada a carbono sp^2 , dois singletos em 4,67 e 4,55 ppm pertencentes a dois hidrogênios vinilidênicos [Tabela 8; Figura 45].

O espectro de RMN de ^{13}C mostrou trinta sinais de carbonos, destacando-se, dentre eles, os sinais em 110,13 ppm (C-29), 151,68 ppm (C-20) e 79,58 ppm (C-3), característicos de carbonos de esqueleto lupano (Olea e Roque, 1990). O sinal em 179,97 ppm (C-28) foi relacionado à carbonila de ácido carboxílico [Tabela 8; Figura 46]. As informações fornecidas pelo espectro de DEPT 135°, possibilitaram a verificação de sinais de carbonos metílicos em 28,56 (C-23), 15,20 (C-24), 16,06 (C-25), 16,71 (C-26), 15,19 (C-27), 19,65 (C-30) ppm, carbonos metilênicos em 38,00 (C-1), 27,31 (C-2), 19,25 (C-6), 35,32 (C-7), 21,85 (C-11), 26,63 (C-12), 30,54 (C-15), 31,52 (C-16), 27,31 (C-21), 37,99 (C-22), 110,10 (C-29) ppm. Os sinais de carbonos metínicos aparecem em 79,58 (C-3), 56,65 (C-5), 51,77 (C-9), 39,44 (C-13), 48,21 (C-18), 50,28 (C-19) [Tabela 8, Figuras 47]. Estas informações sugerem que a substância **4** é de um triterpeno pentacíclico de esqueleto lupano. Ao comparar os dados com a literatura, observou-se uma correlação entre os dados obtidos e da literatura (Siddiqui *et al.*; 1988), permitindo definir a substância como sendo o triterpeno ácido betulínico.

Dentre as atividades biológicas relatadas para o ácido betulínico, destacam-se ação inibitória frente à xantina oxidase, efeito antiinflamatório, diminuição da propulsão intestinal e diminuição dos níveis da pressão sanguínea (AURICCHIO *et al.*, 2003). O ácido betulínico é bastante conhecido na família Bignoniaceae, sendo relatada, dentre outros, em *Tabebuia heptaphylla* (GARCEZ, *et al.*, 2007), *Tabebuia caraíba* (SOARES, 2006) e *Tabebuia aurea* (GUERBAS, 2003).



4

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) da substância **4**, e do ácido betulínico (SIDDQUI *et al.*; 1988).

	δ C				δ C		
	4	Ácido betulínico			4	Ácido betulínico	
1	38,74	38,70	CH_2	16	32,16	32,10	CH_2
2	27,31	27,40	CH_2	17	57,28	56,30	C
3	79,29	78,90	CH	18	46,89	46,80	CH
4	39,64	38,80	C	19	50,54	49,20	CH
5	55,62	55,30	CH	20	151,68	150,30	C
6	19,28	18,30	CH_2	21	29,71	29,70	CH_2
7	34,35	34,30	CH_2	22	37,23	37,00	CH_2
8	39,78	40,7	C	23	28,00	27,90	CH_3
9	51,77	50,50	CH	24	15,35	15,30	CH_3
10	38,10	37,20	C	25	16,04	16,00	CH_3
11	20,88	20,80	CH_2	26	16,14	16,10	CH_3
12	26,63	25,50	CH_2	27	14,71	14,70	CH_3
13	39,43	38,40	CH	28	179,97	180,50	C
14	40,72	42,40	C	29	109,96	109,60	CH_2
15	30,56	30,50	CH_2	30	18,30	19,40	CH_3

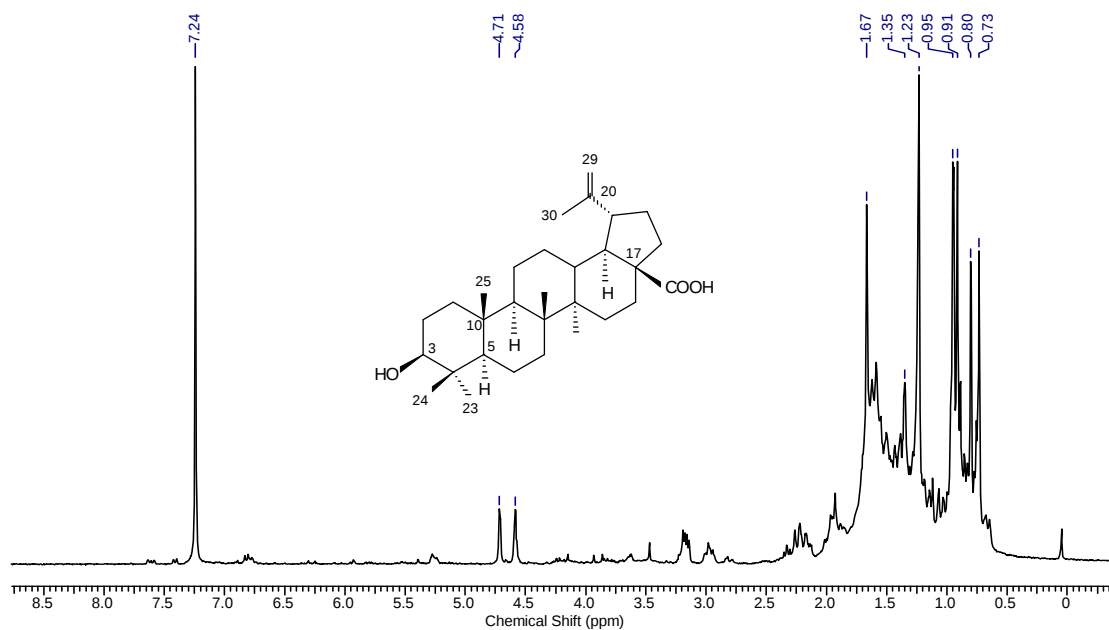


Figura 45 - Espectro de RMN ^1H da substância 4 (CD_3OD , 300 MHz)

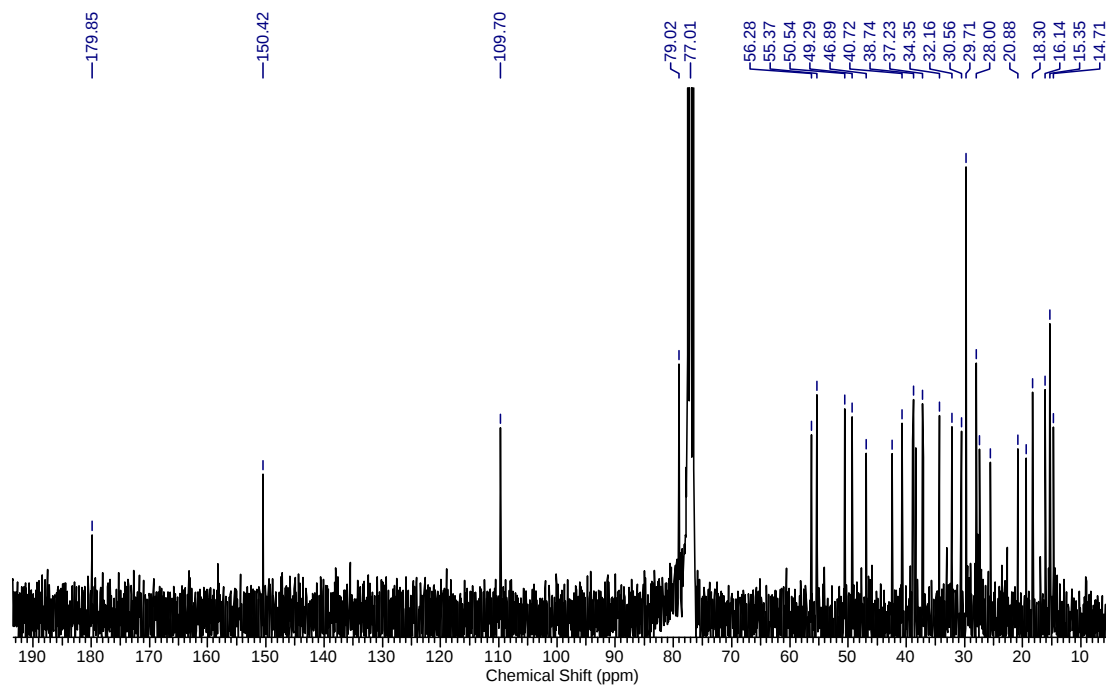


Figura 46 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 4 (CD_3OD , 75 MHz)

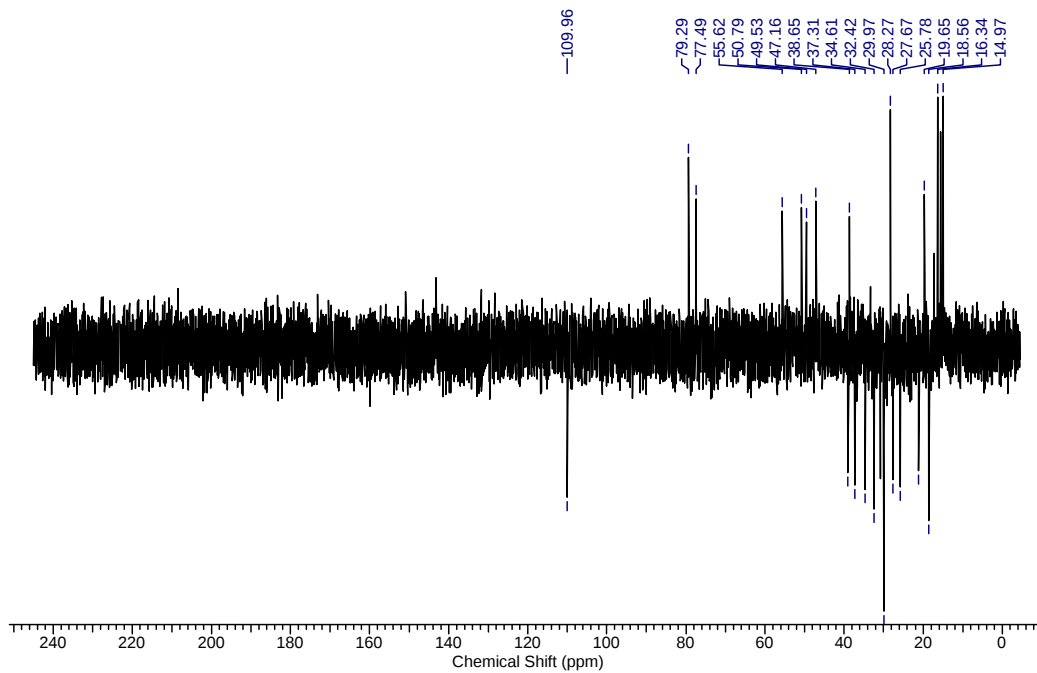
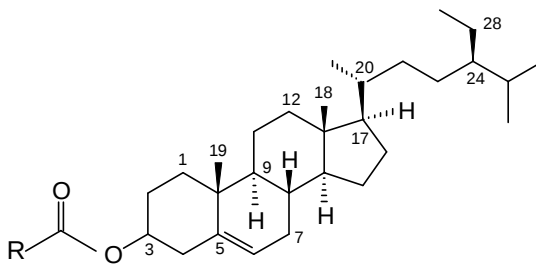


Figura 47 - Espectro de DEPT 135° da substância **4** (CD₃OD, 75 MHz)

5.8 - Identificações do β -sitosterol esterificado (**1**)

A substância **1**, oriunda da fração diclorometânica, apresentou-se na forma de um sólido amorfo. Seu espectro de RMN ^1H apresentou sinais entre 0,66 e 1,06 ppm característicos de absorção de grupos metílicos de esqueleto esteroidal, e um dubleto em 5,30 ppm (1H, $J = 5,4$ Hz) referente a hidrogênio olefínico [Tabela 9; Figura 48].

O espectro de RMN de ^{13}C de **1** mostrou, entre outros os sinais em 139,73 e 122,57 ppm referentes a carbonos de ligação dupla e dois sinais em 11,90 e 11,80 ppm referentes a carbono de metila. Este conjunto de sinais é sugestivo de tratar-se de um esteróide com ligação dupla $\text{C}_5\text{-C}_6$, que sugere a estrutura molecular do β -sitosterol [Tabela 9; Figura 49]. Os dados de RMN de ^{13}C observados para **1** foram comparados com a literatura, observando-se uma boa correlação com a maioria dos carbonos (SAXENA & ALBERT, 2005). No entanto, observam-se no espectro de RMN de ^{13}C , sinais em 29,6 ppm (CH_2), 14,08 ppm (CH_3) e 173,24 ppm (C), típicos de ácidos graxos. Outro aspecto observado foi o deslocamento químico do carbono (C-3) a 73,83 ppm, que corresponde a uma desproteção de 2,0 ppm em relação ao β -sitosterol. Além disto, o R_f em CCD da substância **1** não coincide com o do Sitosterol. Todos estes dados indicam que a substância **1** corresponde ao β -sitosterol esterificado com um ácido graxo, conforme mostrado abaixo.



1

Tabela 9 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) obtidos para **1**, e do β -sitosterol (SAXENA & ALBERT, 2005).

C	^{13}C (δ)			C	^{13}C (δ)		
	1	β - sitosterol			1	β -sitosterol	
1	37,32	37,30	CH_2	16	28,40	28,90	CH_2
2	31,92	31,60	CH_2	17	56,73	56,10	CH
3	73,69	71,70	CH	18	11,86	11,90	CH_3
4	38,19	42,30	CH_2	19	19,32	19,40	CH_3
5	139,73	140,80	C	20	36,17	36,20	CH
6	122,57	121,60	CH	21	18,70	18,80	CH_3
7	31,92	31,90	CH_2	22	34,40	34,00	CH_2
8	29,71	31,90	CH	23	26,18	26,10	CH_2
9	50,07	50,20	CH	24	45,88	45,90	CH
10	36,62	36,50	C	25	29,23	29,20	CH
11	21,06	21,10	CH_2	26	19,80	19,80	CH_3
12	39,76	39,80	CH_2	27	19,06	19,10	CH_3
13	42,33	42,30	C	28	22,69	23,10	CH_2
14	56,73	56,80	CH	29	12,00	12,30	CH_3
15	25,06	24,30	CH_2				
COO-	173,24						

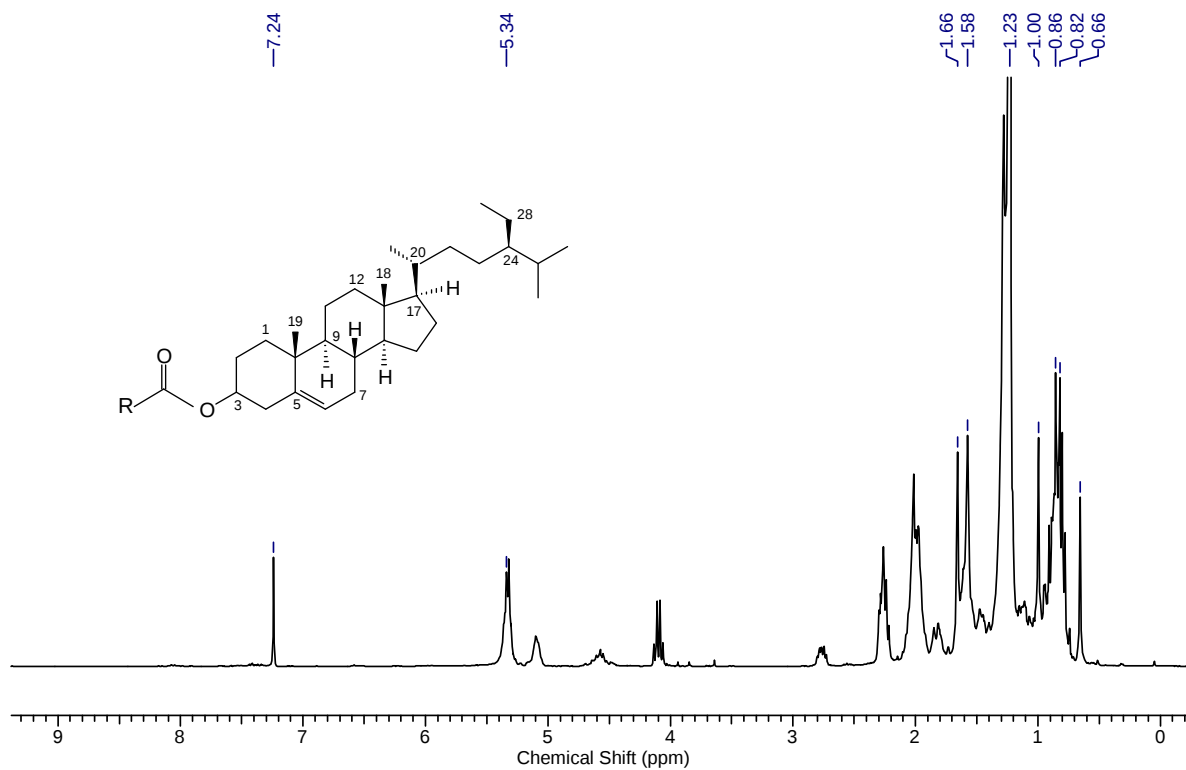


Figura 48 - Espectro de RMN ^1H da substância **1** (CDCl_3 , 300 MHz).

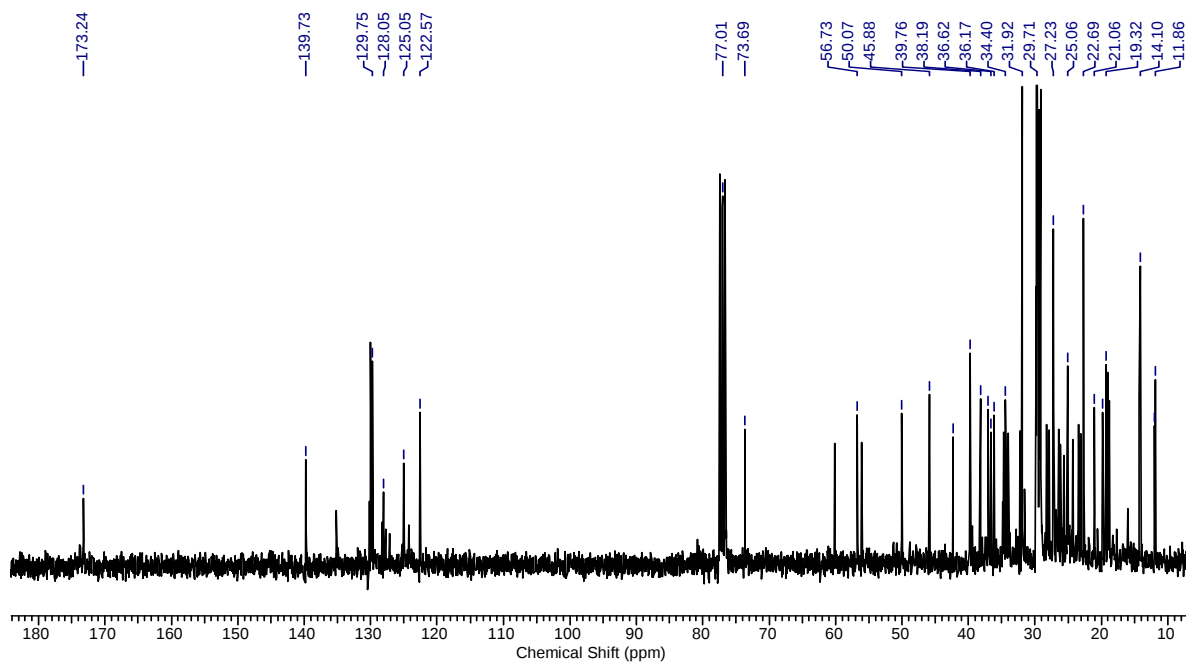


Figura 49 - Espectro de RMN ^{13}C da substância **1** (CDCl_3 , 75 MHz)

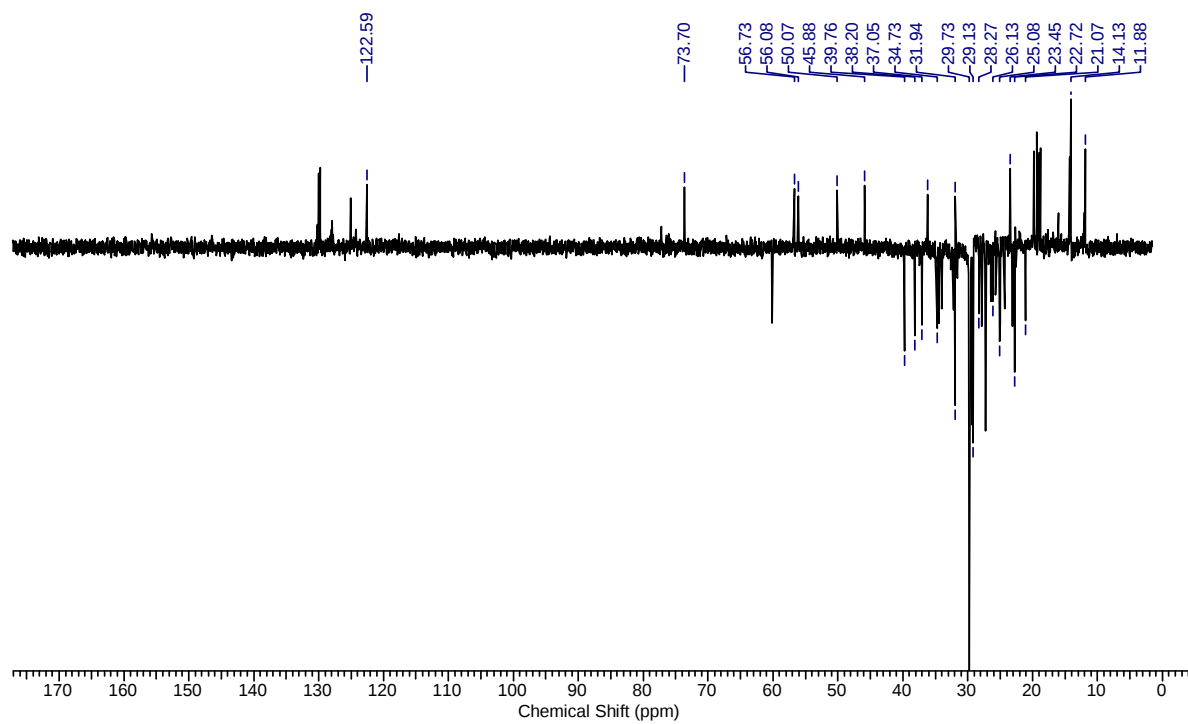


Figura 50 - Espectro de DEPT 135° da substância **1** (CDCl₃, 75 MHz)

5.9 - Identificação do β -sitosterol (**3**)

Os espectros da substância **3**, originária da fração acetato de etila, apresentou-se como um sólido amorfo, de coloração roxa, quando revelada com vanilina em CCDA. Seu espectro de RMN ^1H , mostrou sinais de grupos metílicos de esteróides entre 0,66 e 1,06 ppm. O sinal em δH 5,30 (1H, $J = 5,4$ Hz) é característico de hidrogênio olefínico [Tabela 10; Figura 51].

No espectro de RMN ^{13}C e DEPT 135° foram identificados 29 sinais de maior intensidade, incluindo sinais em 11,99 e 14,08 ppm referentes à metilas, e sinais em 140,76 e 121,73 ppm, referentes aos carbonos da ligação dupla. O δCH 71,83 corresponde ao deslocamento de carbono metínico carbinólico, sugerindo a presença de uma hidroxila, este valor é característico dos esteróides [Tabela 10; Figura 52 e 53].

O β -sitosterol é uma substância comum em plantas e bastante conhecida. Virtuoso e colaboradores (2005) isolaram esta substância de *Erythrina velutina* testando a sua atividade antibacteriana em *E. coli* e *S. aureus*, mostrando-se ativa contra essas bactérias.

Com base nos dados espectrais e da literatura (Saxena e Albert, 2005), constatou-se que a substância é um esteróide, denominado β -sitosterol (**3**).

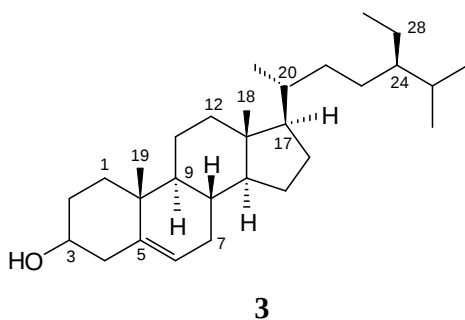


Tabela 10 - Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) obtidos de **3** e comparados com a literatura (SAXENA E ALBERT, 2005).

C	^{13}C (δ)			C	^{13}C (δ)		
	3	β -sitosterol			3	β -sitosterol	
1	37,31	37,30	CH_2	16	28,28	28,90	CH_2
2	29,24	31,60	CH_2	17	56,12	56,10	CH
3	71,86	71,70	CH	18	11,89	11,90	CH_3
4	38,19	42,30	CH_2	19	19,84	19,40	CH_3
5	140,80	140,80	C	20	36,18	36,20	CH
6	121,76	121,60	CH	21	18,82	18,80	CH_3
7	31,96	31,90	CH_2	22	33,99	34,00	CH_2
8	29,70	31,90	CH	23	26,18	26,10	CH_2
9	50,19	50,20	CH	24	45,90	45,90	CH
10	36,63	36,50	C	25	29,23	29,20	CH
11	21,00	21,10	CH_2	26	19,80	19,80	CH_3
12	39,82	39,80	CH_2	27	19,06	19,10	CH_3
13	42,35	42,30	C	28	23,12	23,10	CH_2
14	56,82	56,80	CH	29	14,30	12,30	CH_3
15	24,33	24,30	CH_2				

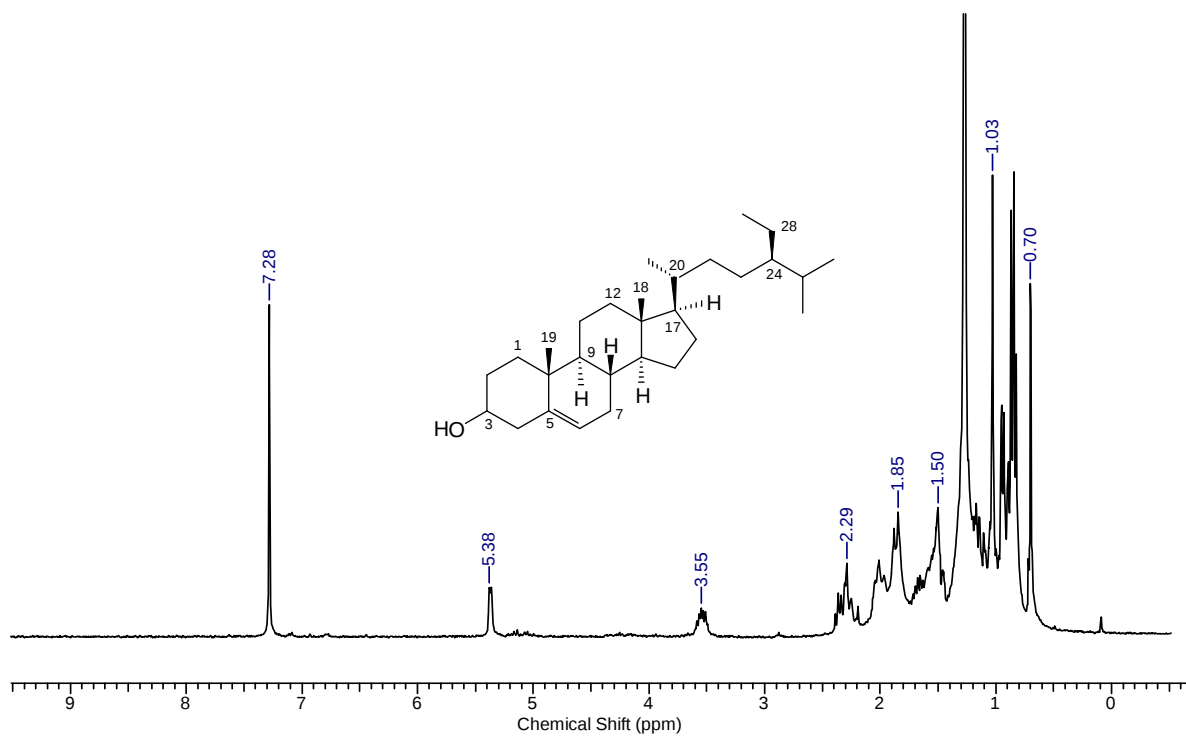


Figura 51 - Espectro de RMN ^1H da substância **3** (CDCl₃, 300 MHz).

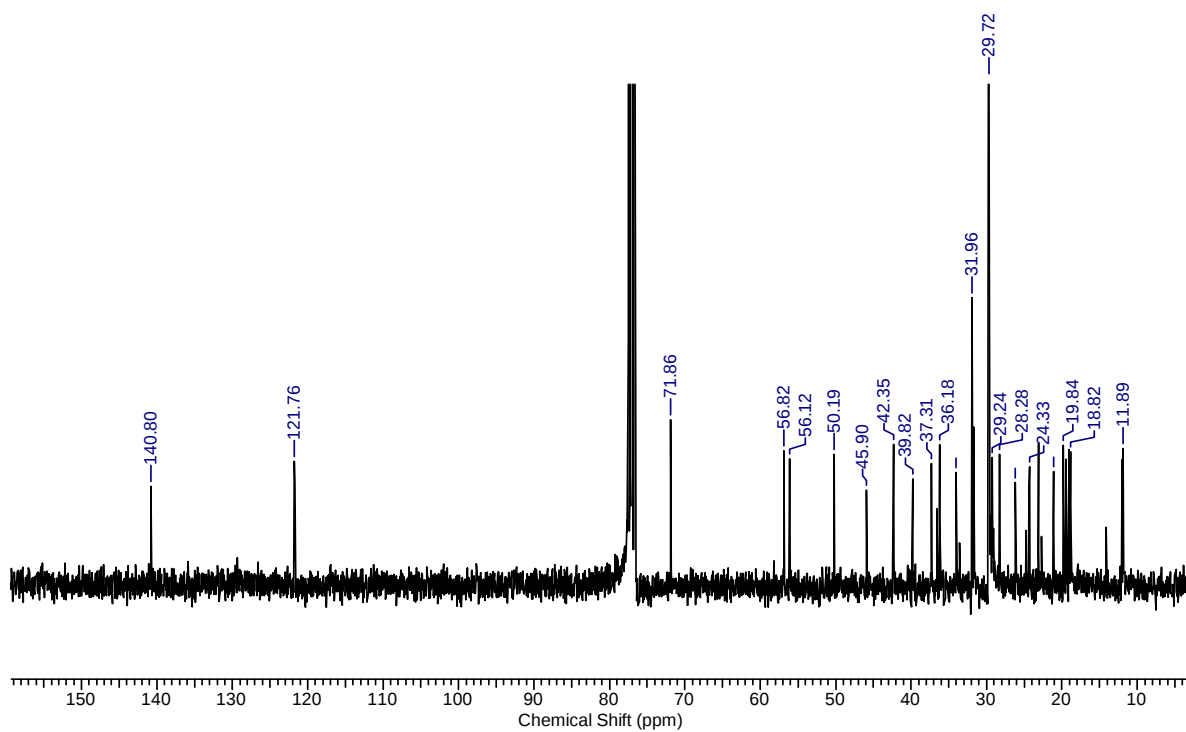


Figura 52 - Espectro de RMN ^{13}C da substância **3** (CDCl₃, 75 MHz).

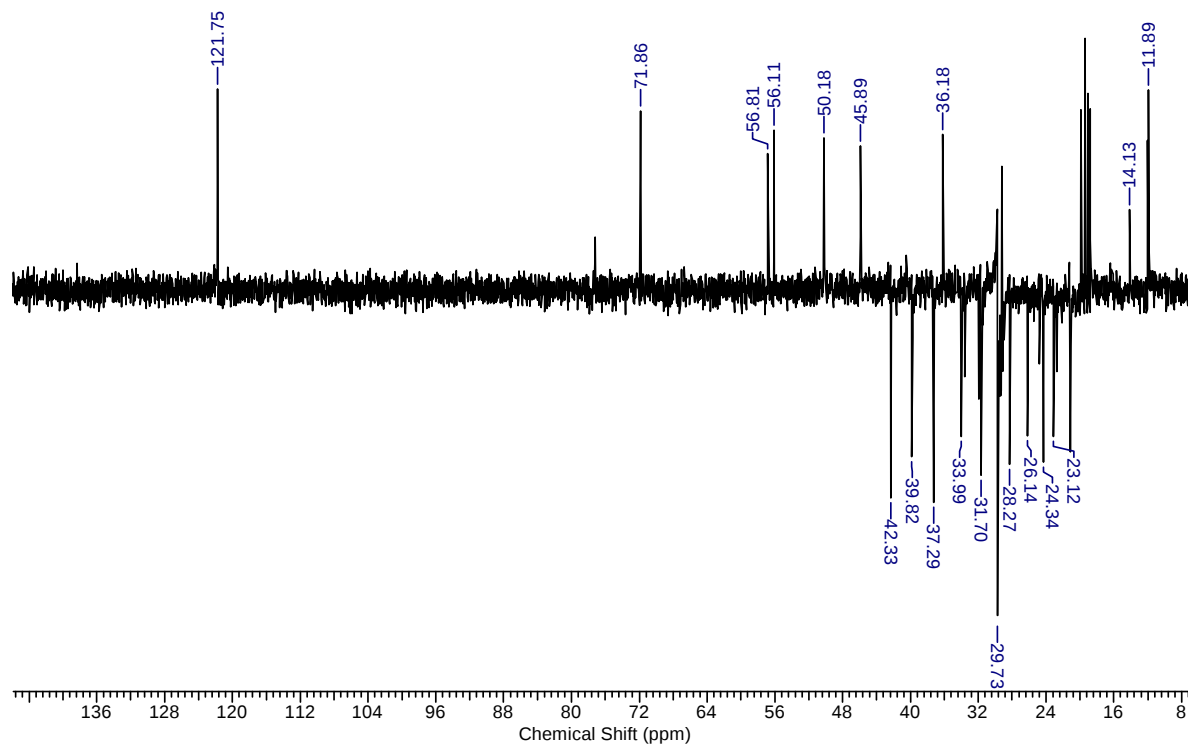


Figura 53 - Espectro de DEPT 135° da substância **3** (CDCl_3 , 75 MHz).

5.10 - Identificação da quercetina-3-O-rutinosídeo (**10**).

A substância **10**, obtida da fração metanólica das folhas de *T. insignis*, apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarela, passando a laranja quando revelada com vanilina. Seu espectro de RMN de ^1H mostrou, dentre outros, sinais na região de hidrogênios em anéis aromáticos, bem como sinais na região de açúcares, sugerindo uma natureza flavanoídica para **10**. Os singletes largos em 6,13 e 6,33 ppm foram atribuídos aos dois átomos de hidrogênio, H-6 e H-8, respectivamente, que mantém entre si, uma relação *meta*. [Tabela 11; Figura 54].

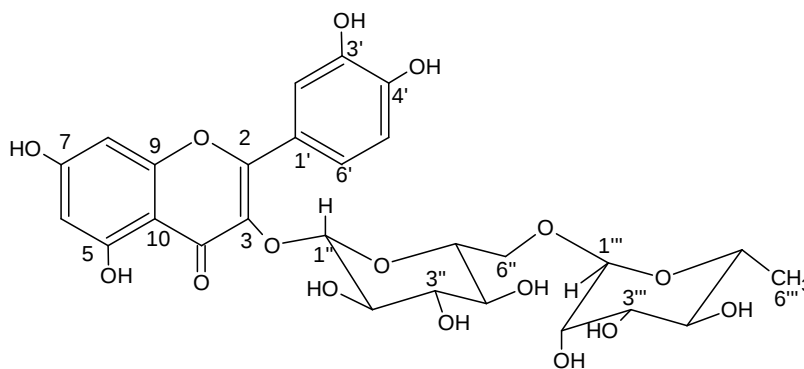
Os sinais relativos ao anel B indicam a presença de três hidrogênios, sendo que um deles, em 6,82 ppm (1H, d, $J = 8,5$ Hz), mostra um padrão de acoplamento *orto*. Os dois outros sinais aparecem em 7,56 ppm (1H, dd, $J = 2,0$ e $8,5$ Hz), portanto acoplando *orto* e *meta*, e em 7,62 ppm (1H, d, $J = 2,0$ Hz). Estes sinais indicam um padrão de substituição 1,2,4 para o anel B. Destacam-se ainda os sinais em 5,00 ppm (1H, d, $J = 7,5$ Hz), em 4,56 ppm (1H, sl) e em 1,07 ppm (3H, d, $J = 6,0$ Hz), sugerindo este último a presença de ramnose na estrutura. Este conjunto de sinais sugere que a substância **10** tratar-se de uma unidade de quercetina ligada a duas unidades de açúcar [Tabela 11; Figura 54].

O espectro de RMN ^{13}C apresentou 17 sinais com valores de deslocamento químico entre 90,0 e 180,0 ppm, sendo estes sinais atribuídos a carbonos de uma flavonóide e a dois carbonos anoméricos. Observa-se ainda, o sinal em 179,25 ppm, sugerindo tratar-se de uma flavona, e quatro sinais de carbonos de anéis aromáticos ligados à oxigênio, com deslocamentos em 162,75 (C-5), 165,98 (C-7), 145,66 (C-3'), 149,69 (C-4') ppm. Estes sinais, juntamente com os outros observados nesta faixa do espectro são compatíveis com a proposta de que a substância **10** contém na sua estrutura uma unidade quercetina. Os sinais atribuídos ao açúcar glicopiranosil foram 75,55 (C-2''), 78,03 (C-3''), 71,06 (C-4''), 77,06 (C-5'') e 68,55 (C-6'') ppm, enquanto que os sinais em 71,29 (C-3'''), 73,83 (C-4'''), 69,63 (C-5''') e 17,84 (C-6''') ppm foram relacionados ao açúcar ramnosil. Os deslocamentos químicos em 104,74 e 102,32 ppm são referentes aos carbonos anoméricos da ramnose (C-1''') e glicose (C-1''), respectivamente [Tabela 11; Figuras 55 e 56].

A correlação à longa distância observada no espectro de HMBC, entre o hidrogênio anomérico H-1'' da glicose (5,00 ppm, d, $J = 7,5$ Hz) e carbono C-3 (135,58 ppm), permitiu definir a ligação 3-O- β -D-glicopiranosila. A correlação heteronuclear do hidrogênio de carbono anomérico H-1'' (4,56 ppm, singlete largo, posição equatorial) da ramnose define que esta unidade está ligada ao carbono C-6 da glicose, visto que o sinal do grupo

hidroximetilênico livre de uma unidade glicopiranosila aparece em torno de 62,00 ppm [Figura 58].

Os flavonóides são compostos fenólicos que constituem uma classe de substâncias naturais e que apresentam atividade biológica diversificada, sendo a atividade antioxidante uma das principais. No metabolismo celular os flavonóides atuam como seqüestradores de radicais livres através de reações de transferência de elétrons, inibindo a peroxidação lipídica. Foram também relatadas várias atividades biológicas importantes, como antitumorais, antiulcerogênica, estrogênica, antiinflamatória, dentre outras (MANTLE *et al.*, 1999; DI CARLO *et al.*, 1999; HARBONE E WILLIAMS, 2000; RAJNARAYANA *et al.*, 2001).



10

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos da substância **10** (CD_3OD , 75 e 300 MHz) e comparados com valores da rotina (DMSO-d_6) (HARBONE, 1982).

		10		Rutina	
		$\delta\text{H J em Hz}$	δC	$\delta\text{H J em Hz}$	δC
2	C		159,25	-	156,60
3	C		135,58	-	133,30
4	C		179,25	-	177,40
5	C		162,74	-	161,20
6	C	6,13 sl	99,99	6,17 d	98,80
7	C		165,96	-	163,90
8	CH	6,33 sl	94,90	6,82 d	93,60
9	C		158,37	-	156,40
10	C		105,55	-	104,20
1'	C		123,58	-	121,6
2'	CH	7,62 d, 2,0	117,69	7,51 d	115,30
3'	C		145,65	-	144,60
4'	C		149,68	-	148,30
5'	CH	6,82 d, 8,5	116,03	6,82 d	116,50
6'	CH	7,56 dd, 8,5 e 2,0	123,03	7,54 dd	121,60
1''	CH	5,00, d, 7,5	104,74	5,32 t	101,50
2''	CH	Sobreposto	75,55	3,20 d	74,20
3''	CH	Sobreposto	78,03	3,06 t	76,80
4''	CH	Sobreposto	71,06	3,25 d	70,80
5''	CH	Sobreposto	77,06	3,20 d	76,10
6''	CH₂	3,75 d	68,55	3,69 d b 3,30 d a	67,10
1'''	CH	4,56 , sl	102,32	4,37	100,70
2'''	CH	3,42 d	71,98	3,40 dd	70,40
3'''	CH	Sobreposto	71,29	3,30 dd	70,40
4'''	CH	Sobreposto	73,83	3,06 t	72,20
5'''	CH	Sobreposto	69,63	3,30 t	68,20
6'''	CH₃	1,07 d	17,84	0,97 d	17,50

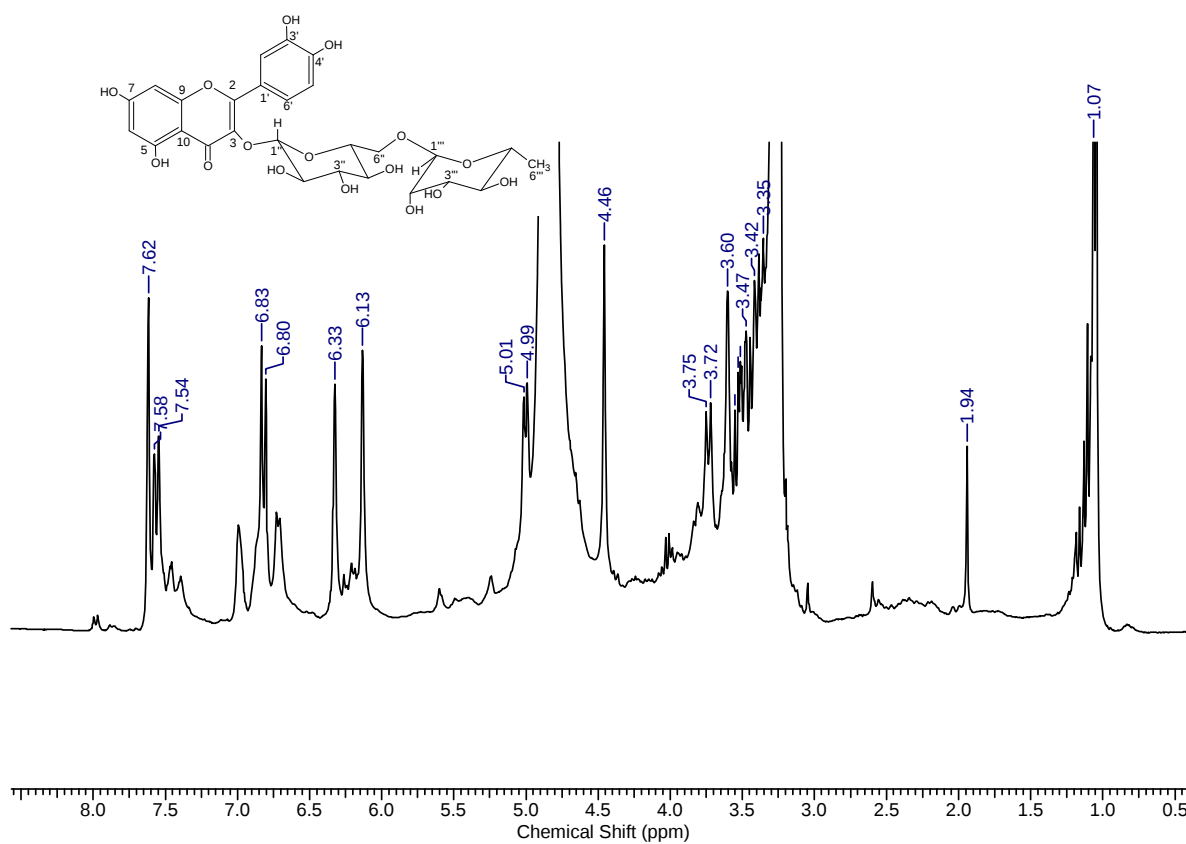


Figura 54 - Espectro de RMN ^1H da substância **10** (CD_3OD , 300 MHz)

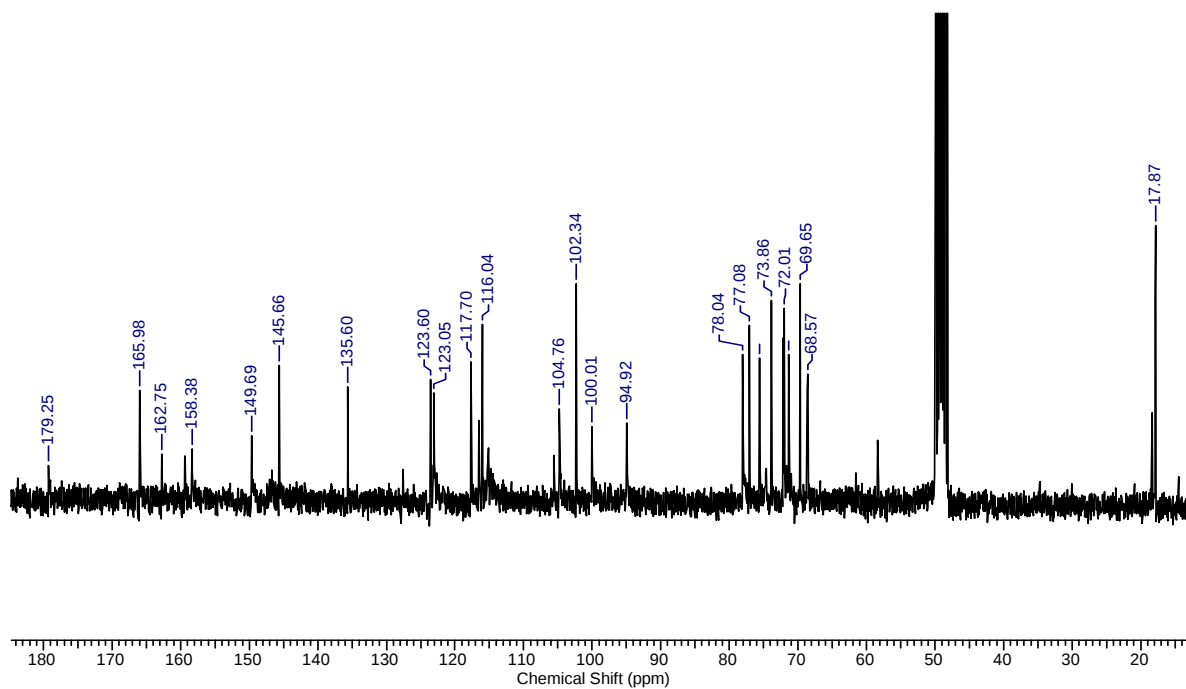


Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C da substância **10** (CD_3OD , 75 MHz)

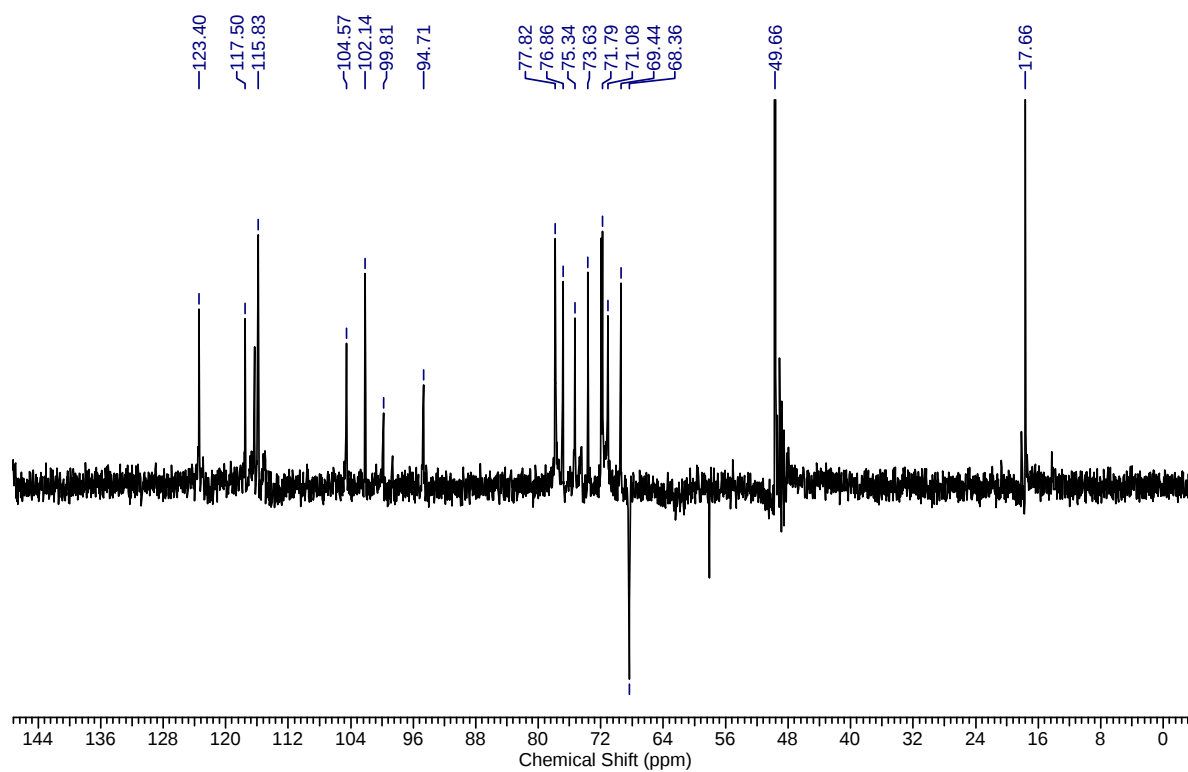


Figura 56 - Espectro de DEPT 135° da substância **10** (CD₃OD, 75 MHz).

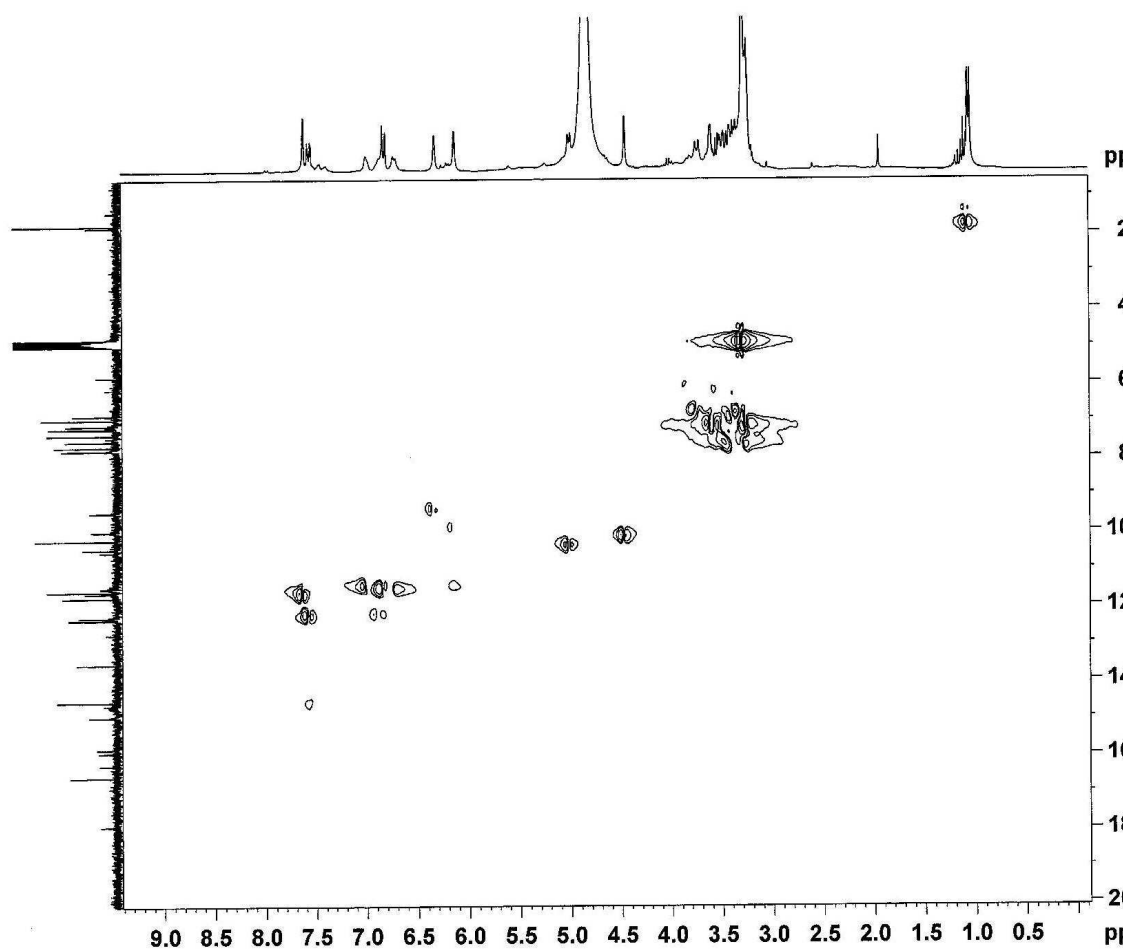


Figura 57 – Espectro de RMN-HSQC da substância **10** (CD₃OD, 75 MHz).

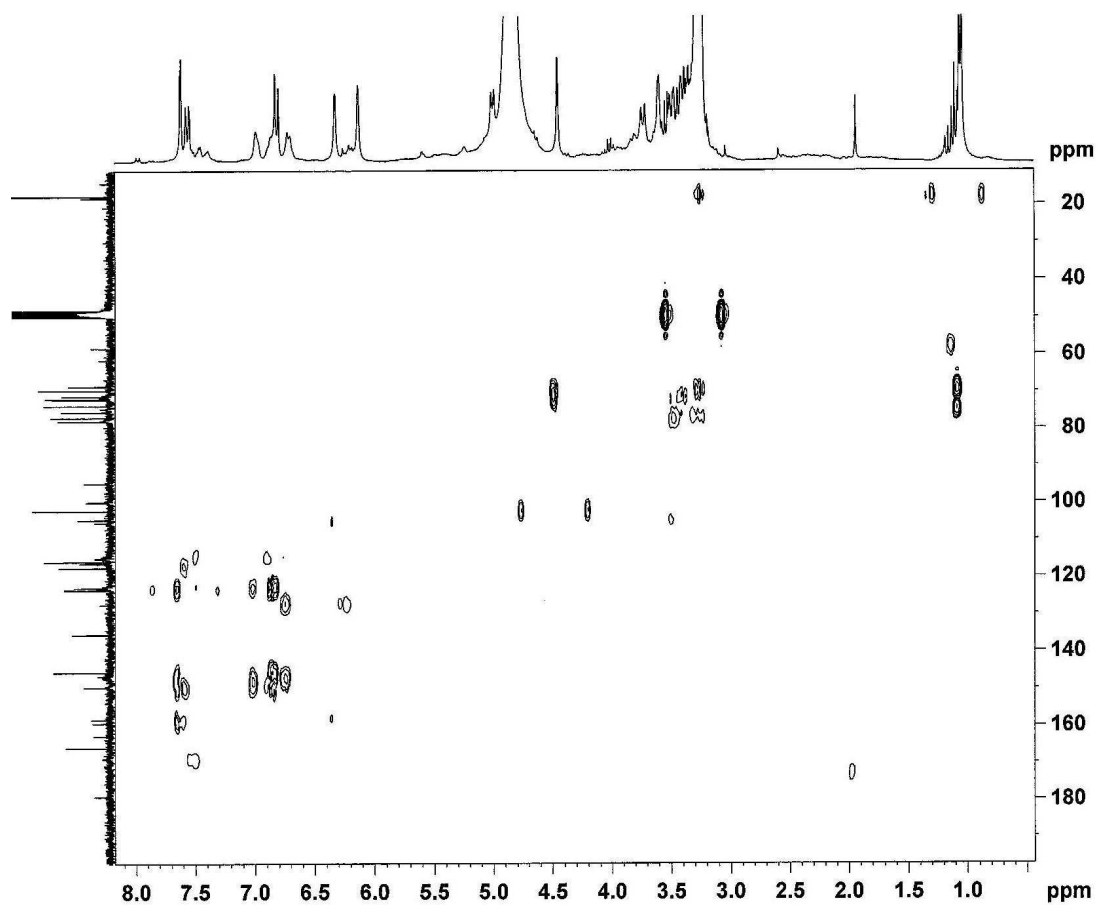


Figura 58 – Espectro de RMN-HMBC da substância **10** (CD₃OD, 75 MHz).

6 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

6.1 – Ensaio antioxidante utilizando-se β -caroteno

O teste biológico utilizando-se β -caroteno constitui-se de um ensaio preliminar de simples execução para determinação da atividade antioxidante. As substâncias isoladas da casca do caule de *Tabebuia insignis* [10 mg/mL] foram depositadas em placa de cromatografia em camada delgada (CCD) e eluídas com um sistema de solvente apropriado. Após a secagem, a cromatoplaça foi vaporizada com uma solução de β -caroteno (0,05% em diclorometano), e em seguida a placa foi colocada sob luz ultravioleta (254 nm) até o fundo tornar-se descolorido. As atividades antiradicalares aparecem na forma de manchas amareladas sobre o fundo branco [PRATT, 1984].

O teste de atividade antioxidante para as substâncias isoladas da casca do caule de *Tabebuia insignis*, utilizando solução de β -caroteno (0,05% em diclorometano), foi positivo para os extratos da casca, folha e cerne, assim como também para as substâncias ariletanóide api-glucosídeo, p-cumaroil catalpol, tirosol e ácido cumárico, isoladas da casca do caule.

6.1.2 - Ensaio utilizando-se 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH)

O radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade antioxidantes naturais em sequestrar radicais livres. A partir dos extratos etanólico da casca do caule, cerne, folha e substâncias isoladas das casca do caule, soluções etanólicas com diferentes concentrações foram preparadas pela adição de DPPH (0,004% m.v⁻¹).

A concentração dos extratos e substâncias isoladas nas cubetas foi de 200, 100, 50, 25,00, 12,50, 6,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Cada amostra foi incubada 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. O controle foi preparado conforme o procedimento acima, sem adição do extrato e etanol foi usado para correção como linha de base. A solução de DPPH foi preparada no dia do ensaio, colocado em fraco âmbar e mantido à temperatura de 4 °C até o momento das determinações. O percentual de decréscimo da absorbância foi medido em cada concentração e a capacidade de sequestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorbância observada. Mudanças na absorbância da amostra foram acompanhadas a 517 nm.

A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{DPPH}})*100$$

Onde A_{DPPH} é a absorbância da solução de DPPH e A_{amostra} é a absorbância do extrato ou substância em solução. A_{amostra} foi calculada com base na diferença da absorbância da solução da amostra em teste com o seu branco. O valor de CI_{50} é definido com a concentração final $\mu\text{L.mL}^{-1}$ do extrato seco presente na cubeta, requerido para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 %. O experimento foi realizado em triplicatas com cinco concentrações diferentes do extrato etanólico da casca, caule e folha de *Tabebuia insignis* além de cinco substância isoladas da casca do caule.

As substâncias antioxidantes reagem com DPPH que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril hidrazina. O decréscimo na absorvidade molar expressa o potencial antioxidante da amostra teste que é representada por uma curva da concentração pela porcentagem da variação da absorvidade molar (ΔA) [YAMAGUSHI, 1998]. Uma amostra que apresenta alto potencial de sequestrar radicais livres possui baixo valor de IC_{50} .

O valor de CI_{50} para o extrato etanólico das folhas de *T. insignis* foi de $45,31 \mu\text{L.mL}^{-1}$. Das substância isoladas da casca do caule de *T. insignis* a que apresentou maior potencial de sequestrar radicais livres foi *p*-cumaroilcatalpol com valor de IC_{50} $37,24 \mu\text{M}$. A rutina, substância isolada da fração metanólica da folha de *T. Insignis* apresentou CI_{50} igual a $15,81 \mu\text{L.mL}^{-1}$.

Tabela 12 – Determinação da capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH).

Extrato Etanólico	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Substâncias Isoladas das folhas e Cascas	CI ₅₀ (µM)
Folha	45,31	Rutina	15,18
Casca	inativo	FM-5-5	298,56
Cerne	inativo	Tirosol	inativo
		<i>p</i> -cumaroil catalpol	37,24
Controle positivo para o extrato etanólico: ácido cafeico (10,64 µg.mL ⁻¹)			
Controle positivo para as substâncias isoladas: ácido cafeico (23,93µM)			

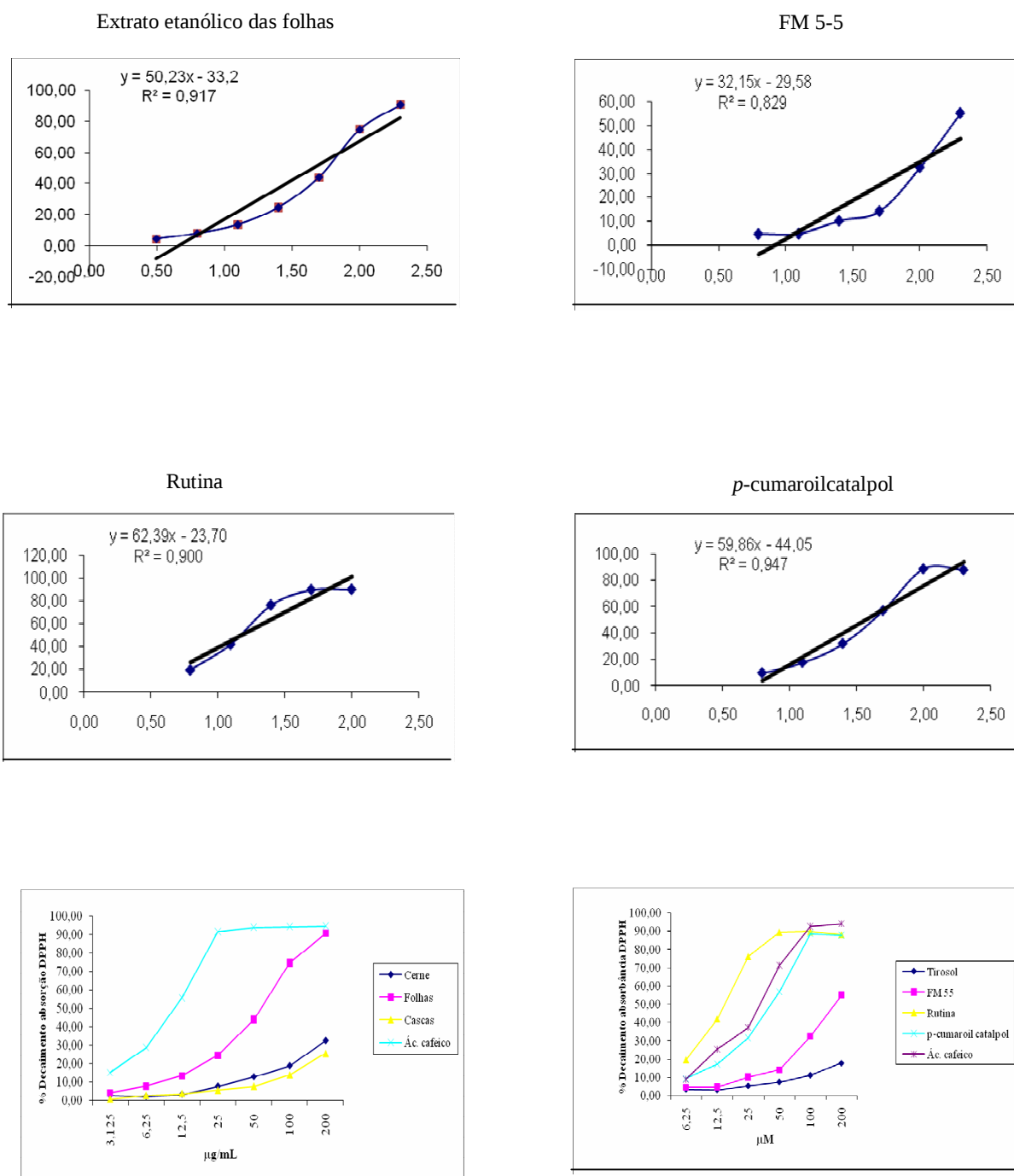


Figura 59 – Percentual da atividade antioxidante em função da concentração do extrato etanólico do cerne, folhas, cascas e substâncias puras (tirosol, FM 5-5, rutina, *p*-cumaroilcatalpol) em *Tabebuia insignis*, utilizando-se como controle positivo ácido cafeico.

7 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS

7.1 - Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para os bioensaios da atividade antimicrobiana foram empregadas cepas padronizadas originárias da American Type Culture Collection (ATCC), disponíveis no Núcleo do Hospital Universitário, Divisão de Farmácia-Bioquímica, Seção de Análises Clínicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. No teste da atividade antibacteriana foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e para os ensaios da atividade antifúngica foram usadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028).

No ensaio da atividade antibacteriana foi empregado o meio caldo de Mueller-Hinton (MH) preparado de acordo com as instruções do fabricante. O pH utilizado foi de 7,2 a 7,4, à temperatura ambiente (25°C). Foi realizado de acordo com a metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada – Sexta Edição (Normas do CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute) (NCCLS, 2003).

Cada cepa bacteriana foi transferida do meio de manutenção para um tubo contendo caldo de cérebro e coração (Brain Heart Infusion – BHI) (Merck) e mantida a 35°C por 18 horas, para ativação. Para o isolamento de colônias jovens, alíquotas foram transferidas para uma placa de Petri com Agar Muller Hinton (Merck) e incubadas a 35°C, por aproximadamente 24 horas.

Após o período de incubação, foram selecionadas de 4 a 5 colônias e transferidas para um tubo contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%), seguido de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos.

A turvação da suspensão celular foi ajustada de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ células/mL. Esta solução foi então diluída (1:10) para obter o inóculo com concentração de 10^7 células/mL. Quando cada poço da microplaca receber o inóculo, a concentração final estará entre 5×10^5 e $7,5 \times 10^5$ células/mL (NCCLS, 2003).

Os meios de cultura utilizados para atividade antifúngica foram Sabouraud e RPMI-1640 líquido (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador de vermelho de fenol),

tamponado com uma solução tampão de MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] numa concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0.

Foi realizado de acordo com o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição (Normas do CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute) (NCCLS, 2002).

O fungo, *Candida albicans*, foi repicado em Agar Sabourad dextrosado (Merck), por pelo menos duas vezes para assegurar a pureza e viabilidade das culturas jovens e em seguida, incubados a 37°C, por 24 horas.

Para o preparo do inóculo foram selecionadas entre 4 a 5 colônias de levedura, de aproximadamente 1 mm de diâmetro. As colônias foram suspensas em 5mL de solução salina a 0,85%, seguidas de agitação vigorosa. Após este período, foi realizada uma diluição de 1:50 e depois de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, para se obter uma concentração de células de 1 a 5×10^3 UFC/mL. O inóculo foi então diluído a 1:1 quando os poços foram inoculados, chegando-se à concentração final desejada de inóculo (0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL) [NORMA M27-A2, 2002].

Utilizou-se a técnica de microdiluição para avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana (ZAPANTIS *et al.*, 2005). O método consiste em preparar diluições sucessivas da amostra a ser testada (extrato e frações), em meio de cultura líquida, semear a bactéria e o fungo em estudo e, após incubação, fazer a leitura para se determinar a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do microrganismo (CIM).

O extrato etanólico da casca do caule, caule e folha (20mg) e as substância isoladas da casca do caule (10mg), foram inicialmente dissolvidas em 1000µL dimetilsulfóxido (DMSO), seguida de uma segunda diluição na proporção de 1:10 (1 parte da amostra em 900µL de meio). As amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços e diluídas para obtenção das concentrações finais no interior dos poços de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125µg/mL. Em seguida foram adicionados 100µL da suspensão do inóculo, com exceção no poço de número 1, onde foram adicionados apenas a amostra e o meio em questão, para observação de uma possível turbidez ou precipitação provocada pela amostra. No poço 11 fez-se o controle positivo que pode ser feito com cetoconazol ou anfotericina B. No poço 12 fez-se o controle negativo (fungo sem amostra). As placas foram incubadas a 35,0 °C e após período de incubação fez-se a leitura para determinar o CIM (concentração inibitória mínima).

O bioensaio utilizando o extrato etanólico e as substâncias puras da casca do caule de *Tabebuia insignis* foram negativas frente à atividade antimicrobiana, utilizando-se cepas do fungo *Candida albicans* (ATCC 90028) e cepas da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

7.2 - Atividade Tóxica utilizando-se *Artemia Salina*

A determinação de toxicidade aguda de substâncias com *Artemia salina* é simples, barata e eficiente. Este micro crustáceo é utilizado em estágio larval, muito dependente do meio onde se encontra e, portanto, sensível a bioensaios. A técnica e sua utilização sistemática, como meio de se obterem substâncias ativas de extratos vegetais, são descrita por Meyer e colaboradores (1982).

Extratos com $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ são apropriados para o biomonitoramento utilizando-se este teste. Substâncias cuja DL_{50} estiverem na faixa de $80 \mu\text{g/mL} < DL_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$ podem apresentar atividade tripanomicida, por outro lado, substâncias com toxicidade $DL_{50} < 145 \mu\text{g/mL}$ podem apresentar atividade antitumoral (DOLABELA, 1997).

Os extratos etanólico da casca do caule, folha e cerne de *Tabebuia insignis* foram dissolvidos em DMSO, em uma concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ (solução salina com 2 % de DMSO) e testados segundo a metodologia proposta por Meyer et al. (1982) e McLaughlin (1991).

Ovos de *Artemia salina* adquiridos comercialmente foram colocados em um recipiente contendo água marinha artificial (38g NaCl/1000mL H₂O) e deixados em temperatura ambiente por 48 horas.

As amostras foram então diluídas em concentrações diferentes, que variaram de 0,5 a $1000 \mu\text{g/mL}$ sendo distribuídas em tubos contendo água do mar artificial até completar um volume final de 10 mL.

Dez larvas de *A. salina* foram transferidas para os tubos de ensaios contendo a amostra a ser testada e novamente deixados em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período, o número de microcrustáceos vivos e mortos em cada diluição (concentração) foi contado, com auxílio de um microscópio binocular.

Como controle positivo foi sulfato de quinidina e negativo solução salina com 2 % de DMSO.

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os valores expressos em $\mu\text{g/mL}$, como a concentração necessária para matar 50% das larvas (DL_{50}). Para o cálculo final da DL_{50} e seu respectivo intervalo de confiança de 95% foi utilizado o método estatístico de análise Probitos. As amostras foram consideradas ativas quando DL_{50} foi inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Os extratos etanólicos da casca, cerne e folhas de *Tabebuia insignis* não apresentaram atividade tóxica frente *Artemia salina*.

8 - CONCLUSÃO

O estudo químico das cascas do caule de *T. insignis* coletado na Área de Preservação Ambiental (APA) do rio Guariroba, Campo Grande, MS, resultou no isolamento de dez substâncias, compreendendo dois iridóides, dois esteróides, três ariletanóides, um fenilpropanóide, um triterpeno. Da fração metanólica da folha foi isolado um flavonóide.

Da fração de diclorometano foi isolado o β -Sitosterol esterificado (1), e da fração de acetato de etila o β -Sitosterol (3), ácido betulílico (4), ariletanóide esterificado (2), tirosol (5) e o ácido cumárico (6). Foram isolados ainda os iridóides catalpol (7), ariletanóide apiosilglucosídeo (8) e o *p*-cumaroil-catalpol (9) da fração metanólica. O flavonóide rutinosídeo (10) foi isolado da fração hidrometanólica das folhas de *T. insignis*.

O teste de atividade antioxidante utilizando solução de β -caroteno (0,05% em diclorometano), foi positivo para as substâncias *p*-cumaroil-catalpol, tirosol, ácido cumárico, isoladas da casca do caule de *Tabebuia insignis* e para a quercetina rutinosídeo isolada do extrato hidrometanólico das folhas.

O ensaio para averiguação da atividade redutora utilizando o teste *in vitro* com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) foi positivo para o flavonóide quercetina rutinosídeo isolada do extrato metanólico, para o iridóide *p*-cumaroilcatalpol isolado da fração metanólica das cascas, e para o extrato etanólico das folhas de *T. insignis*.

Os extratos etanólicos da casca do caule, folha e cerne de *T. insignis* foram avaliados quanto a toxicidade *in vivo* frente à *Artemia salina*, sendo o resultado da DL₅₀ superior a 1000 µg/mL, não apresentando com isso atividade tóxica. As atividades antifúngicas e antibacteriana foram negativas para o extrato etanólico e substâncias isoladas frente à *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

8- REFERÊNCIAS

ALLEM, A. C.; VALLS, J. F. M. *Recursos forrageiros nativos do Pantanal*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1987. 339 p. il. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 8).

ALMEIDA, D. S. *Recuperação Ambiental da Mata Atlântica*. Ihéus: Editus, 2000.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. *Plantas que curam*. Volume 2. Editora Três. São Paulo, 1996.

AURICCHIO, M. T., E BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. Rev.Inst. Adolfo Lutz. **2003**, 62(1): 55 - 61.

BALBACH, A. *A flora nacional na medicina doméstica*. São Paulo: A Edificação do Lar, **1969**.

BERG, M. E. VAN DEN. Formas atuais e potenciais de aproveitamento das espécies nativas e exóticas do Pantanal Mato-Grossense. In: *Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal*, **1984**, Corumbá. Brasília: EMBRAPA-DDT, 1986. p. 131-136. (EMBRAPA-CPAP. Documentos, 5).

BRAGA, R. *Plantas do Nordeste , especialmente do Ceará*. 3. ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976.

BOROS, C. A.; STERMITZ, F. R. Iridoids an update review. Part I. *Journal Natural Products*. **1991**, 53, 1055

BURKART, A. *A flora ilustrada de entre os rios* (Argentina). Dicotiledôneas Metaclamídeas (Gamopétalas), A: Primulales a Plantaginales. Buenos Aires: INTA, 1979. (tomo 6, parte 6).

CHEN, H.; FUGITA, M.; FENG, Q.; CLARDY, J.; FINK, G. R. Tirosole is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0401416101>, acessado em 16/09/2007.

CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R. The coloring matter of carajura. *Journal Chemical of Society*. **1927**, 3015-3041.

CORREA, M. P. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro. Vol. II, 1926.

CORREA, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro. Ministério da Agricultura, Vol. V, 1974.

CRAGG, G.M. ; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal Natural Products* **1997**, 60, 52-60.

DIAS, L. S. O.; ROCHA, G. A.; BARROS, E. V. A.; MAIA, P. H. P. Utilização do Radar Interferométrico para Delimitação Automática de Bacias Hidrográficas. Salvador – BA. Bahia *Análises & Dados*. **2004**, 14 (2) 265-271.

DÍAZ, F.; MEDINA, J. D. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* ssp. *Neochrysantha*. *Journal Natural Products*. **1996**, 59, 423-424.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A. and Capasso, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*. **1999**, 65: 337 – 353.

DIMETRI, M. J. *Enciclopédia Argentina de Agricultura y Jardineira*. 2 ed. Buenos Aires: ACME, V.1, 1972.

DI STASI, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência*. Um guia de estudo Interdisciplinar. Ed. UNESP. São Paulo, 1996.

DOLABELA, M F. *Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-t. cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas*. [Dissertação] Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 1997.

DUBS, B. *Catalogue of flowering plants from Mato Grosso and Mato Grosso do Sul, Brasil, represented in the Herbarium collection of the Institute of Systematic Botany, University of Zürich (Z) and the Regnellian Herbarium at Stockholm (S)*. Küsnacht: Betrona Verlag, 1993.

EL-NAGGAR, S. F.; DOSKOTCH, R. W.. Specioside: a new iridóid glicoside from *Catalpa speciosa*. *Journal Natural Products*. **1980**, 43, 524-526.

ESTEVEZ, G. L. *Contribuição ao conhecimento da vegetação da restinga de Maceió*. Maceió: Secretaria do Planejamento, 1980.

FLORES, E. J. M. *Potencial produtivo do manejo sustentável de um fragmento de mata atlântica secundária*. [Tese] Viçosa, Minas Gerais, Universidade Federal de Viçosa, 1993.

GARCEZ, R. F.; GARCEZ, W. S.; MAHMOUD, T. S.; FIGUEIREDO, P. O. Novos Constituintes Químicos das Cascas de *Tabebuia heptaphylla*. *Química Nova*, **2007**, 30 (8) 1887 – 1891.

GENTRY, A. H. *Bignoniaceae-Part II* (Tribe Tecomae). In: *Flora Neotropica*. New York: New York Botanical Garden, 1992.

GENTRY, A. H. The cultivated species of *Tabebuia* with notes on other cultivated Bignoniaceae. *Proceedings of the 3rd. Annual Conference*, **1982**, 52-79.

GIL-TURNES, M. S.; FENICAL, W. Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bactéria. *Biological Bulletin*. **1992**, 182, 105-108.

GOMES-POMPA, A.; BURLEY, F. W. *The management of natural tropical florest*. Rain Florest Regeneration and Management. Paris: UNESCO. **1991**, 3-18.

GORMANN R.; KALOGA M.; LIB, X.-C.; FERREIRA, D.; BERGENTHAL, D.; KOLODZIEJ, H. *Phytochemistry*. **2003**, 64, 1-5.

GUERBAS, P. N. *Estudo Químico da casca, folhas e cerne de um espécime de Tabebuia aurea (Bignoniaceae) coletado no Pantanal*. [Dissertação] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2003.

HARBONE, J.B. *Phytochemical Methods* (second ed), Chapman & Hall, London, 1982.

HARBONE, J. B Y WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. A review. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 481–504.

HOEHNE, F. C. *Phytophysionomia do Estado de Mato Grosso e ligeiras notas a respeito da composição e distribuição da sua flora: estudo preliminar*. São Paulo: Nacional, 1923.

HEGNAUER, R., & KOOIMAN, P.. Die systematische Bedeutung von iridoiden Inhaltstoffen in Rahmen von Wettsteins's Tubiflorae. *Planta Médica*. **1978**, 33, 1-33.

HIRAI, K.I, KOYAMA J, PAN J.H, SIMAMURA E, SHIMADA H, YAMORI T, SATO S, TAGAHARA K, TSURUO T. *Câncer Detection And Prevention*. **1999**, 23 (6): 539-550.

HOEHNE, F. C. *Phytophysionomia do Estado de Mato Grosso e ligeiras notas a respeito da composição e distribuição da sua flora: estudo preliminar*. São Paulo: Graphicals, 1923. 355p. il.

HUECK, K. *Florestas da América do Sul*. São Paulo: Polígono, 1972.

JOLY, A. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 2ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1975.

KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R. & GOTTLIEB, O. R. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **1994**, 66, 50-55.

KAWAMURA, F.; OHARA, S. Antifungal activity of iridoid glycosides from the heartwood of *Gmelina arborea*. *Holzforschung*. 2005, 59, 153–155.

KINGSTON, D.G.I, RAO M.M. *Planta Medica*. **1980**, 39 (3): 230-231,.

KOYAMA, J.; MORITA I.; TAGAHARA K.; HIRAI K.-I. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry*. **2000**, 53 (8): 869-872.

KUPELI, E.; TATLI, I. I.; AKDEMIR, Z.S.; YESILADA, E. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive glycoterpenoids from the flowers of *Verbascum lasianthum* Boiss.ex Benth. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 110, 444–450.

LORENZI, H.; *Árvores Brasileiras 1*, Instituto Plantarum de Estudo da Flora LTDA: Nova Odessa, 1988.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras*. São Paulo. Ed. Plantarum, vol.1. 1992

LORENZI, H.; Matos, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAINIERI, C; CHIMELO, J. P. *Fichas e características das madeiras brasileiras*. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1978

MCLAUGHLIN JL. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) *Methods in Plant Biochemistry*. New York: Academic Press. **1991**,1-32.

MANNERS, G. D., JURD, L. *Phytochemistry*. **1976**, 15 (1): 225-226.

MANTLE, D., FALKOUS, G., PERRY, E. K. Effect of flavonoids on protease activities in human skeletal muscle tissue in vitro. *Clinical Chemical Acta*. **285**: 13-20, 1999.

MARX, R. B.; TABACOW, J.; ALCÂNTARA, A. *Árvores, Minas Gerais*. Rio de Janeiro: AC & M, 1989.

MENDONÇA, R. C. ; FELIPE, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C.; RESENDE, A. V.; FIGUEIRAS T. S & NOGUEIRA, P. E. *Flora vascular do Cerrado*. Pp. 287 -556. In: Sano & S. P. Almeida (eds). CERRADO: Ambiente e Flora. Embrapa Cerrado Planaltina, 1998.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. *Planta Médica*, **1982** (45) 31-36.

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

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T. & PEREIRA, N. A. *Medicinal Plants of Brasil*. Reference Publications, Inc. Alganac, Michigan, 2000.

NAKANO, K, MARUYAMA K, MURAKAMI K, TAKAISHI Y, T. Iridoids From *Tabebuia Avellanadae*. *Phytochemistry*. **1993**, 32 (2): 371-373.

NCCLS (National Committee for clinical Laboratory Standards) - Performance Standards for antimicrobial susceptibility Testing: Twelfth Informational Supplement M100-S12, vol.22, Nº 1. Wayne, Pennsylvania, 2002

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).- MIC testing: supplemental tables. Wayne; 2003. (NCCLS document M100-S13 (M7).

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, T. Ç. G.; SEGUNDO, T. A.; BRAZ-FILHO, R. *23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. **2000**, PN-859/2.

PARK, B. S.; KIM, J.R.; LEE, S. E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y. J.; KIM, K. S. Selective Growing-Inhibiting Effects of Compounds Identified in *Tabebuia impetiginosa* Inner Bark on Human Intestinal Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 1152-1157.

PINTO, A. C.; SILVIA, D H S.; BOLZANE, V, S.; LOPES N. P; EPIFANIO R. A. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. *Química Nova*. **2002**, 25., supl 1. São Paulo.

POHLIT, A. M.; SILVA, S. G.; TADEI, W. P.:(PQ), COELHO, B.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Isolamento e caracterização de um novo apiosil-glicopiranosídeo de *Tabebuia incana*. *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. **2007**, São Paulo.

POTT, A.; POTT. V. J. *Plantas do Pantanal*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. Corumbá, MS: EMBRAPA-SPI, 1994.

POTT. V. J.; POTT, A.; RATTER, J. A.; VALLS, J. F. M. *Flora da fazenda Nhumirim, Nhecolândia, Pantanal*. Corumbá, EMBRAPA-CPAP, 1986.

PRANCE, G. T. SCHALLER, G. B. *Preliminary study of some vegetation types of the Pantanal, Mato Grosso, Brasil*. Brittonia, v. 34, 1982.

PRATT, D. E.; MILLER, E.E. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts. *Journal of the American Oil Chemist's Society*.**1984**, 61 (6): 1064-1068.

RAJNARAYANA, K., REDDY, M.S. AND CHALUVADI, M.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian. Journal of Pharmacology*. **2001**, 33: 2-16.

RAO, M. M & KINGSTON, D. G. I. Plant anticancer agents. XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinines from *Tabebuia cassinoides*. *Journal of Natural Products*. 1982, 45 (5): 600-604

RATTER, J. A. ; RIBEIRO, J. F. & BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. *Annals of Botany*. **1997**, 80, 223-230.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁNEZ, S.; RIOS, J. L. Structural considerations of the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Médica*. **1994**, 60: 234.

REVILLA, J. *Plantas da Amazônia – Oportunidades econômicas e sustentáveis*. Co-edição SEBRAE/INPA. Manaus, 2001.

RIBEIRO, J. F. & WALTER, B. M. T. *Fitofisionomias do Bioma Cerrado*. In: Sano, S. M. e Almeida, S.P. Cerrado: Ambiente e Flora. Planaltina, DF: Embrapa, CPAP, 1998.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. *Botânica econômica brasileira*. São Paulo: EPU/EDUSP, 1976.

ROCHA, A. D.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. de.; LOMBARDI, J. A.; LOMBARD, J. D. de. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytotherapy Research*. **2004**, 18(6), 463.

SANDWITH, N. Y. HUNT, D. R. *Bignoniaceas*, In: Reitz, R. (ed). Itajaí, Flora Ilustrada Catarinense, 1974.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PAPASTERGIOU, F.; Z. *NATURFORSCH.*, C. Naphthoquinone derivatives and lignans from the Paraguayan crude drug "tayĩ pytá" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Journal of Biosciences*. **2003**, 58, 495.

SANTOS, N. P.; Theodoro Peckolt: *A produção científica de um pioneiro da fitoquímica no Brasil*. Hist. Ciênc. Saúde-Manguinhos. **2005**, 12(2): 513-33.

SOARES, A. O. *Estudo Fitoquímico das Flores e Casca do Caule de um espécime de Tabebuia caraiba (Bignoniaceae) Coletado na Região do Cerrado em MS.*[Dissertação] Campo Grande: Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.

SAXENA, V. K.; ALBERT, S.; β -sitosterol-3-O- β -D-xylopyranoside from the flowers of *Tridax procumbens* Linn. *Journal of Chemical Sciences*. **2005**, 117(3): 263.

SIDDIQUI, S.; HAFEEZ, F.; BEGUM, S. E SEDDIQUI, B. S. *Journal Natural Products*, **1988**, 51, 229 – em Mahato e Kundu, 1994.

SUGIYAMA, M.; NAGAYAMA, E. AND KIKUCHI, M. Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Osmanthus asiaticus*. *Phytochemistry*. **1993**, 33, 1215-1219.

TAYLOR, L. *Herbal secrets of the rainforest*. Prima Publishing, Inc. Rocklin, 1998.

WARASHINA, T, NAGATANI, T AND NORO, T. Constituents from the Bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry*, **2004**, 65, 2003-2011.

VIEGAS JR. C.; BOLGANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. **2006**,. 29 (2): 326-337, São Paulo.

VIEIRA, L. S.; *Fitoterapia da Amazônia - manual das plantas medicinais*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1992.

VIRTUOSO, S.; DARVET, A.; DIAS, J. FG.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D; OLIVEIRA, A. B. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erytrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacologia*. **2005**, 15(2): 137-142.

VON POSER, G. L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, R. S. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2000**, 28, 351-366.

YAMAGUSHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC Method for Evaluation of the Free Radical-scavenging Activity of Foods by Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **1998**, 62 (6): 1201-1204.

ZANI, C.L, DE OLIVEIRA A.B, DE OLIVEIRA G.G. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. *Phytochemistry*. **1991**, 30 (7): 2379-2381.

ZAPANTIS, A.; LACY, M. K.; HORVAT, R. T.; GRAUER, D.; BARNES, B. J.; O'NEAL, B.; COULDRY, R. Nationwide Antibigram Analysis Using NCCLS M39-A Guidelines. *Journal of Clinical Microbiology*. **2005**, 43, 2629.