



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Curso de Mestrado em Química



**ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS TÓXICAS PARA O GADO –
MASCAGNIA PUBIFLORA (MALPIGHIACEAE) E *RIEDELIELLA*
GRACILIFLORA (FABACEAE)**

Deizeluci de Fátima Pereira Zanella

**CAMPO GRANDE
Dezembro – 2007**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Curso de Mestrado em Química



**ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS TÓXICAS PARA O GADO –
MASCAGNIA PUBIFLORA (MALPIGHIACEAE) E *RIEDELIELLA*
GRACILIFLORA (FABACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

CAMPO GRANDE

Dezembro – 2007

“Vós me chamais Mestre e Senhor, e dizeis bem porque eu o sou”.

(João 13:13)

Dedico este trabalho a meus amores, Alexandre, pelo seu apoio, sua compreensão e seu amor para que mais esta etapa fosse concluída, e aos meus filhos Anelise, Ricardo e Mariana, pelo carinho e pelo incentivo na conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador professor Dr. Walmir Silva Garcez, meus sinceros agradecimentos pela orientação, pela confiança na minha capacidade em realizar este trabalho pela amizade que sem dúvida é de grande importância.

À professora Dra. Lidilhone Hamerski, pelos valiosos ensinamentos, colaboração e amizade na conclusão deste trabalho.

À professora Fernanda Rodrigues Garcez pela importante colaboração neste trabalho.

Ao professor Adilson Beatriz pelo apoio sempre oportuno e pelos experimentos de síntese orgânica.

Ao professor Joaquim Corsino, pela amizade, dedicação e interesse que demonstrou na realização deste trabalho.

À professora Carolina Silva Barbosa – UEMS, pelos testes de toxicidade realizados com os coelhos.

Ao professor Sérgio Roberto Rodrigues – UEMS, pelos testes biológicos inseticidas com *Spodoptera frugiperda* (lagarta do milho).

Aos meus pais, Pedro e Maria, e meus irmãos José Carlos e Eloísa, pelo incentivo, apoio e carinho.

À minha cunhada Camila, pela ajuda e ensinamentos no uso do computador.

À minha amiga Ana Lúcia Batista, pela amizade, dedicação e colaboração.

Aos amigos do mestrado, especialmente Vanderléa, Lilliam, Nídia, Aloísio, Edson, Ana Camila, Luciana e Denise, pelos momentos agradáveis que juntos passamos.

Aos amigos do laboratório LP1, Rodrigo, Miguita, Bruno, Marisa, Dedy, entre outros, pela agradável convivência nesses anos.

Aos técnicos Edilene Delphino Rodrigues, pelos espectros de RMN, e Luis Leonardo Viana, pela obtenção dos espectros.

Aos secretários do mestrado do DQI/UFMS, Celestino Gonçalves de Oliveira e Maria Otávia P. Vasco, pela eficiência e amizade.

Ao Fundect, à UEMS, à CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ANEXOS	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. PLANTAS TÓXICAS PARA O GADO EM MATO GROSSO DO SUL	05
3.1. Malpighiaceae e as principais espécies tóxicas para o gado em Mato Grosso do Sul	07
3.1.1. Gênero <i>Mascagnia</i>	08
3.1.1.1. <i>Mascagnia rigida</i>	08
3.1.1.2. <i>Mascagnia pubiflora</i> (cipó-prata, tingüi, corona) (Figura 2)	09
3.1.2. Gênero <i>Byrsonima</i>	10
3.1.2.1. <i>Byrsonima</i> spp.	10
3.1.3. Gênero <i>Tetrapteryx</i>	12
3.1.3.1. <i>Tetrapteryx multiglandulosa</i> (Cipó-vermelho, cipó-ferro)	12
3.1.4. Outras espécies de <i>Malpighiaceae</i>	14
3.2 Fabaceae e as principais espécies tóxicas para o gado em Mato Grosso do Sul	15
3.2.1 O gênero <i>Crotalaria</i>	15
3.2.1.1. <i>Crotalaria retusa</i> (gergelin-bravo, chocalho-de-cascavel) (Figura 9)	16
3.2.1.2. <i>Crotalaria spectabilis</i> (guizo-de-cascavel, chocalho, chocalho-de-cascavel)	17
3.2.2. O gênero <i>Indigofera</i>	18
3.2.2.1. <i>Indigofera suffruticosa</i> (anil)	20
3.2.3. O gênero <i>Riedeliella</i>	21
3.2.3.1 <i>Riedeliella graciliflora</i> (falsa-ciganinha) (Figura 14)	21
4. PARTE EXPERIEMENTAL	23

4.1 Material	23
4.2 Estudo fitoquímico de <i>Mascagnia Pubiflora</i> (Malpighiaceae)	23
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal	23
4.2.2 Obtenção e partição dos extratos	23
4.2.3 Fracionamento da fase hexânica e clorofórmica	24
4.2.4 Fracionamento da fase acetato de etila (MPAC)	25
4.2.5 Fracionamento da fração MPAC-6A	26
4.2.6 Fracionamento da fração MPAC-6A-16	27
4.2.7 Fracionamento das frações MPAC-6A-11, 12, 13, 17 e 18	28
4.2.8 Novo estudo fitoquímico do extrato etanólico de <i>M. pubiflora</i>	29
4.2.8.1. Extração alcaloídica	29
4.3 Estudo fitoquímico de <i>Riedeliella graciliflora</i> (Fabaceae)	31
4.3.1 Coleta e identificação do material vegetal	31
4.3.2 Obtenção e partição dos extratos	32
4.3.3. Fracionamento da fase hexânica de <i>R. graciliflora</i>	33
4.3.4. Fracionamento da fração RDH-A 3	33
4.3.5. Estudo fitoquímico do extrato etanólico de <i>R. graciliflora</i>	34
4.3.6. Fracionamento da fração RDAC-3	35
4.3.7. Fracionamento da fração RDAC-1	35
4.4 Ensaios biológicos	36
4.4.1 Teste de toxicidade em coelhos	36
I. Obtenção dos animais	36
II. Extratos testados	36
III. Procedimento de inoculação	37
4.4.2 Atividade inseticida	37
I. Aspectos gerais	37
II. Procedimento	38
III. Teste de preferência alimentar	38
4.4.3 Teste de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> (TAS)	39
I. Reagentes necessários	39
II. Procedimento	39
III. Controles	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

5.1. Identificação das substâncias isoladas de <i>M. pubiflora</i>	41
5.1.1. Identificação da substância 1	41
5.1.2. Identificação da substância 2	51
5.1.3. Identificação da substância 3	55
5.2. Identificação das substâncias isoladas de <i>R. graciliflora</i> (Fabaceae)	59
5.2.1. Identificação da substância 4	59
5.2.2. Identificação da substância 5	63
5.2.3. Identificação da substância 6	66
5.2.4. Identificação da substância 3	68
5.2.5. Identificação da substância 8	72
5.3. Ensaio biológico	75
5.3.1. Teste de toxicidade em coelhos	75
5.3.1.1. Toxicidade dos extratos de <i>M. pubiflora</i> em coelhos	76
5.3.1.2. Toxicidade dos extratos de <i>R. graciliflora</i> em coelhos	76
5.3.2 Inseticida	78
5.3.2.1. Atividade inseticida de <i>R. gracilifolia</i>	78
5.3.2.2. Atividade inseticida de <i>M. pubiflora</i>	78
5.3.3. Teste de toxicidade em <i>A. salina</i> (TAS)	80
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS	82
 ANEXOS	 90
ESPECTROS DE RMN DA SUBSTÂNCIA 1	91
ESPECTROS DE RMN DA SUBSTÂNCIA 2	106

RESUMO

Mascagnia pubiflora (Malpighiaceae), conhecida popularmente como cipó prata e *Riedeliella graciliflora* (Fabaceae), conhecida como falsa ciganinha, são plantas tóxicas para o gado e muito comuns em Mato Grosso do Sul. No presente trabalho foram realizados o estudo fitoquímico dos extratos etanólicos destas plantas, testes de toxicidade em *Artemia salina* (TAS) e em coelhos e o bioensaio de atividade inseticida em *Spodoptera frugiperda*. O estudo fitoquímico dos ramos e folhas de *Mascagnia pubiflora* conduziu ao isolamento de dois compostos glicosilados derivados da epicatequina inéditos na família e no gênero, e um flavonol, a quercetina-3-*O*-rutinosídeo, inédita no gênero. O extrato etanólico dessa espécie testado no TAS e em coelhos não apresentou toxicidade, porém apresentou atividade inseticida para *Spodoptera frugiperda*. O estudo fitoquímico de *Riedeliella graciliflora* conduziu ao isolamento de cinco substâncias: fitol, ficaprenol 12 e β -sitosterol, inéditas no gênero, e (+)-epicatequina e quercetina-3-*O*-rutinosídeo. O extrato etanólico dessa espécie testado no TAS e sobre *Spodoptera frugiperda* não apresentou atividade, porém apresentou atividade tóxica em coelhos.

ABSTRACT

Mascagnia pubiflora (Malpighiaceae), popularly known as “cipó prata”, and *Riedeliella graciliflora* (Fabaceae), known as “falsa ciganinha”, are plants which are toxic for the cattle and are very common in the State of Mato Grosso do Sul. The present research included the phytochemical study of crude extracts of these plants, toxicity tests in *Artemia saline* (TAS) and in rabbits and the bioassay of insecticide activity in *Spodoptera frugiperda*. The phytochemical study of the branches and leaves of *Mascagnia pubiflora* led to the isolation of two unknown catechins glucosides and one flavonol, the quercetin-3-O-ruthinoside. The crude extract of this species tested in TAS and in rabbits did not present any activity, however it presented a significant insecticide activity in *Spodoptera frugiperda*. The phytochemical study of the *Riedeliella graciliflora* led to the isolation of five substances, the phytol, phycaprenol, β -sitosterol, (+)-epicatechin and quercetin-3-O-ruthinoside. The crude extract of this species tested in TAS and on *Spodoptera frugiperda* did not present activity, however it did present toxic activity in rabbits.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetato de etila	AcOEt
Cromatografia em camada delgada analítica	CCDA
Cromatografia líquida de alta eficiência	CLAE
Correlation spectroscopy	COSY
Dubleto	d
Duplo dubleto	dd
Distortionless enhancement by polarization transfer	DEPT
Sulfóxido de dimetila deuterado	DMSO-D ₆
Etanol	EtOH
Fração	Fr.
High performance liquid chromatography	HPLC
Infravermelho	IV
Multiplete	<i>m</i>
Metila	Me
Metanol	MeOH
N- butanol	n-BuOH
Fator de retenção	R _f
Ressonância magnética nuclear de carbono	RMN ¹³ C
Ressonância magnética nuclear de hidrogênio	RMN ¹ H
Singleto	s
Triplete	t
Toxicidade sobre <i>artemia salina</i>	TAS
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul	UEMS
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul	UFMS
Ultravioleta	UV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Nafto- γ -pironas isoladas de <i>M. rígida</i>	08
Figura 2 – Detalhes dos galhos (A), sementes (B) e flores (C) de <i>M. pubiflora</i>	10
Figura 3 – Substâncias isoladas de <i>B. crassa</i>	11
Figura 4 – Substâncias isoladas de <i>B. microphylla</i>	11
Figura 5 – Substâncias isoladas de <i>B. crassifolia</i>	12
Figura 6 – Detalhes dos galhos (A), sementes (B) e folhas (C) de <i>T. multiglandulosa</i>	14
Figura 7 – Substâncias isoladas de <i>B. argente</i>	14
Figura 8 – Monocrotalina	16
Figura 9 – Flores e frutos de <i>C. retusa</i> (Fabaceae)	17
Figura 10 – Folhas e flores de <i>C. spectabilis</i> (Fabaceae). Detalhes das flores (B)	18
Figura 11 – Indospicina	19
Figura 12 – Algumas substâncias isoladas do gênero <i>Indigofera</i>	19
Figura 13 – Detalhes dos galhos (A) e como encontrada na natureza (B) de <i>I. suffruticosa</i>	21
Figura 14 – Detalhes dos galhos e flores (A) e sementes (B) de <i>R. graciliflora</i> (Fabaceae)	22
Figura 15 – Fluxograma da partição do extrato etanólico e obtenção das fases orgânicas da parte aérea de <i>M. pubiflora</i>	24
Figura 16 – Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato etanólico da parte aérea de <i>M. pubiflora</i>	25
Figura 17 – Cromatograma das frações MPAC-6A – 59-89 (CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 80:20:02)	26
Figura 18 – Cromatograma semi-preparativo da fração MPAC-6A-16 [Coluna Phenomenex, C-18, 21,6X250mm Luna, 5 μ , CH ₃ CN/H ₂ O (15:85). λ =254nm, f = 14 ml/min]	27
Figura 19 – Cromatograma semi-preparativo da fração MPAC-6A-12 [Coluna Phenomenex, C-18, 21,6X250mm Luna, 5 μ , CH ₃ CN/H ₂ O (30:70). λ =254nm, f = 14 ml/min]	28
Figura 20 – Cromatograma semi-preparativo da fração MPAC-6A-13 [Coluna Phenomenex, C-18, 21,6X250mm Luna, 5 μ , CH ₃ CN/H ₂ O (30:70). λ =254nm, f = 14	

ml/min]	28
Figura 21 – Fluxograma do fracionamento da fase alcaloídica de <i>M. pubiflora</i>	30
Figura 22 – Cromatograma analítico da fração RDAC-3-5 [Coluna Phenomenex, C-18, 4,6X250mm Luna, 5μ, CH ₃ CN/H ₂ O (20:80). λ=254nm, f = 0,7 ml/min]	31
Figura 23 – Cromatofolhas das frações alcaloídicas (MPA) [CHCl ₃ /MeOH 9:1]	31
Figura 24 – Nova partição do extrato etanólico de <i>R. graciliflora</i> com acetonitrila	32
Figura 25 – Fracionamento de RDH-A3, originadas da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>R. graciliflora</i>	34
Figura 26 – Espectro de RMN ¹ H de 1 (400 MHz, MeOD)	41
Figura 27 – Espectro de massas de 1 (ESY- modo negativo)	42
Figura 28 – Espectro de RMN ¹³ C de 1 (MeOD, 100 MHz)	42
Figura 29 – Estrutura proposta para o composto 1	51
Figura 30 – Substância obtida de <i>Banisteriopsis variabilis</i> Malpighiaceae	51
Figura 31 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 2 (400 MHz, MeOD)	52
Figura 32 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância 2 (100 MHz, MeOD)	53
Figura 33 – Espectro de Massas da substância 2 (Eletrospray- modo negativo)	53
Figura 34 – Estrutura proposta para o composto 2	54
Figura 35a – Espectro de RMN de ¹ H da substância 3 (MeOD, 300 MHz)	57
Figura 35b – Expansão de RMN de ¹ H da substância 3 de 4,5-8 ppm (MeOD, 300 MHz)	57
Figura 36 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância 3 (MeOD, 75 MHz)	58
Figura 37 – Ampliação do espectro de experimento HMBC da substância 3	58
Figura 38 – Estrutura da Quercetina-3-O-rutinosídeo	59
Figura 39 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 4 (CDCl ₃ 300MHz)	61
Figura 40 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância 4 (CDCl ₃ ; 75MHz) ...	63
Figura 41 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância 4 (CDCl ₃ , 75 MHz)	62
Figura 42 – Estrutura do Ficaprenol	60
Figura 43 – Espectro de ¹³ C da substância Fitol. (CDCl ₃ , 75MHz)	65
Figura 44 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 5 (Fitol) (CDCl ₃ ; 300MHz)	65
Figura 45 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância Fitol (CDCl ₃ , 75MHz)	66
Figura 46 – Estrutura do Fitol	64
Figura 47 – Espectro de RMN ¹ H da substância β-sitosterol (CDCl ₃ 300MHz)	68

Figura 48 – Espectro de ^{13}C da substância β -sitosterol (CDCl_3 , 75MHz)	68
Figura 49 – β -sitosterol	67
Figura 50 – Espectro de RMN ^1H da substância 7 (MeOD, 300MHz)	71
Figura 51 – Espectro de RMN ^{13}C da substância 7 (MeOD, 75 MHz)	71
Figura 52 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância 7 (MeOD, 75MHz) ...	72
Figura 53 – Deslocamento químico para quercetina, quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo e quercetina 3- <i>O</i> -glucosídeo ($\text{DMSO}-d_6$)	70
Figura 54 – Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	70
Figura 55 – Espectro de RMN ^1H da substância 8 (MeOD, 300MHz)	73
Figura 56 – Espectro de RMN ^{13}C da substância (+)-Epicatequina (MeOD, 75MHz)	74
Figura 57 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância 8 (MeOD, 75MHz) ...	75
Figura 58 – (+)-Epicatequina	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais plantas tóxicas encontradas em Mato Grosso do Sul	06
Tabela 2 – Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>M. pubiflora</i>	26
Tabela 3 – Massa das frações reunidas de MPAC-6A	27
Tabela 4 – Massas das frações obtidas do fracionamento da fase alcaloídica (MPA) ...	30
Tabela 5 – Fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>R. graciliflora</i>	33
Tabela 6 – Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>R. graciliflora</i>	35
Tabela 7 – Frações reunidas e massas das frações oriundas da RDAC-1	35
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz e HMBC (J Hz)	43
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz e HMBC (J Hz)	54
Tabela 10 – Dados de RMN da substância 3 (MeOD, 300 MHz)	56
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 4 (300 MHz, CDCl_3)	61
Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 5 (300 MHz, CDCl_3)	64
Tabela 13 – Dados de RMN ^{13}C da substância 6 (300 MHz, CDCl_3)	67
Tabela 14 – Dados de RMN da substância 7 (300 MHz, MeOH)	70
Tabela 15 – Dados de RMN da substância 8 (300 MHz, MeOH)	73
Tabela 16 – Comportamento dos coelhos após inoculação dos extratos de <i>M. pubiflora</i> e <i>R. graciliflora</i>	77
Tabela 17 – Médias ($\pm$ EP) de peso, duração e mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentada com folhas de milho tratadas com extrato de <i>M. pubiflora</i> e testemunha. Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 70% e fotofase: 14h	79
Tabela 18 – Médias ($\pm$ EP) de peso, duração e mortalidade de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentada com folhas de milho tratadas com extrato de <i>M. pubiflora</i> . e testemunha. Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 70% e fotofase: 14h	79
Tabela 19 – Quantidades médias de lagartas recém-eclodidas de <i>S. frugiperda</i> obtidas no teste de preferência alimentar de folhas de milho tratada com extrato de <i>M. pubiflora</i> e testemunha (folha tratada com água destilada) às 8 e às 24 horas após liberação em placa de Petri. Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 70% e fotofase: 14h	80

LISTA DE ANEXOS

ESPECTROS DE RMN DA SUBSTÂNCIA 1	91
Figura I – Espectro de massas de 1 (ESY- modo negativo)	92
Figura II – Espectro de RMN ^1H de 1 (400 MHz, MeOD)	92
Figura III – Espectro de RMN ^{13}C de 1 (MeOD, 100 MHz)	93
Figura IV – Expansão de RMN ^1H de 1 entre 6,5 - 7,0 ppm (400 MHz, MeOD)	93
Figura V – Expansão de RMN ^1H de 1 entre 3,4 - 5,0 ppm (400 MHz, MeOD)	94
Figura VI – Expansão de RMN ^1H de 1 entre 1,4 - 3,0 ppm (400 MHz, MeOD)	94
Figura VII – Expansão de RMN ^{13}C de 1 entre 135-155 ppm (75 MHz, MeOD)	95
Figura VIII – Expansão de RMN ^{13}C de 1 entre 114 – 122 ppm (100 MHz, MeOD)	95
Figura IX – Expansão de RMN ^{13}C de 1 entre 96 – 108 ppm (100 MHz, MeOD)	96
Figura X – Expansão de RMN ^{13}C de 1 entre 24 – 40 ppm (100 MHz, MeOD)	96
Figura XI – Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY 90° de 1 entre 1 – 7 ppm (400 MHz, MeOD)	97
Figura XII – Expansão do ^1H - ^1H COSY 90° de 1 entre 1 – 7 ppm (400 MHz, MeOD)	97
Figura XIII – ^1H - ^{13}C HSQC de 1 (400 MHz, MeOD)	98
Figura XIV – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de 1 (400 MHz, MeOD)	98
Figura XV – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de 1 (400 MHz, MeOD)	99
Figura XVI – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de 1 (400 MHz, MeOD)	99
Figura XVII – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de 1 (400 MHz, MeOD)	100
Figura XVIII – Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	100
Figura XIX – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	101
Figura XX – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	101
Figura XXI – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	102
Figura XXII – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	102
Figura XXIII – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	103
Figura XXIV – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	103
Figura XXV – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	104
Figura XXVI – Expansão do ^1H - ^{13}C HMBC de 1 (400 MHz, MeOD)	104
Figura XXVII – ^1H - ^1H NOESY de 1 (400 MHz, MeOD)	105

ESPECTROS DE RMN DA SUBSTÂNCIA 2	106
Figura A – Espectro de Massas de 2 (Eletrospray - modo negativo)	107
Figura B – Espectro de RMN de ^1H de 2 (300 MHz, MeOD)	107
Figura C – Espectro de RMN de ^{13}C de 2 (75 MHz, MeOD)	108
Figura D – Expansão de RMN ^1H de 2 entre 6,4 - 7,4 ppm (300 MHz, MeOD)	108
Figura E – Expansão de RMN ^1H de 2 entre 1,0 – 3,1 ppm (300 MHz, MeOD)	109
Figura F – Expansão de RMN ^1H de 2 entre 3,0 – 4,8 ppm (300 MHz, MeOD)	109
Figura G – Expansão de RMN ^{13}C de 2 entre 125-158 ppm (75 MHz, MeOD)	110
Figura H – Expansão de RMN ^{13}C de 2 entre 60-80 ppm (75 MHz, MeOD)	110
Figura I – Expansão de RMN ^{13}C de 2 entre 95-120 ppm (75 MHz, MeOD)	111
Figura J – $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de 2 (300 MHz, MeOD)	111
Figura K – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de 2 (300 MHz, MeOD)	112
Figura L – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de 2 (300 MHz, MeOD)	112
Figura M – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de 2 (300 MHz, MeOD)	113
Figura N – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de 2 (300 MHz, MeOD)	113
Figura O – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de 2 (300 MHz, MeOD)	114
Figura P – $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de 2 (300 MHz, MeOD)	114
Figura Q – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de 2 (300 MHz, MeOD)	115
Figura R – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de 2 (300 MHz, MeOD)	115
Figura S – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de 2 (300 MHz, MeOD)	116
Figura T – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de 2 (300 MHz, MeOD)	116
Figura U – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de 2 (300 MHz, MeOD)	117

1. INTRODUÇÃO

Denomina-se planta tóxica todo vegetal que ingerido pelo organismo do homem ou de animais seja capaz de ocasionar danos que refletem na vitalidade desses seres [OLIVEIRA, 1989].

Plantas tóxicas podem ser encontradas em diversas regiões do planeta e o índice de toxicidade depende de fatores como parte ingerida (semente, pólen, folha, raiz), clima ou solo. Em geral, as substâncias produzidas pelas plantas tóxicas atuam no mecanismo de defesa contra predadores, mas podem causar morte de animais e humanos [OLIVEIRA, 1989]. Um exemplo é a espécie *Corynocarpus laevigata* (Corynocarpaceae), cujo néctar mostrou ser tóxico para abelhas adultas e as colônias de abelhas *Apis mellifera*, quando alimentadas com néctar de *Camellia thea* (Theaceae) apresentaram mortalidade da cria [CINTRA, 2005]. Por outro lado alguns insetos descobriram maneiras de se alimentar de plantas tóxicas sem ocorrer intoxicação, como por exemplo: secando o látex antes de ingeri-lo; neste caso, o princípio ativo tóxico é transformado em compostos inativos. Há casos de insetos que desenvolveram mecanismos para sobrepujar esta defesa podendo até utilizá-los em benefício próprio através do armazenamento de tais substâncias em partes de seu corpo, tornando-se tóxico para seus predadores [REIS, 2001].

A toxidez das plantas pode ser útil no controle biológico de pragas, com a conseqüente redução do uso de inseticida pode contribuir na preservação do meio ambiente. Por exemplo, estudos realizados por HEBLING [1994] mostraram que as folhas de *Sesamum indicum* (Pedaliaceae) extinguiram os saúveiros de laboratório da espécie *Atta sexdens rubropilosa*.

Acidentes com plantas tóxicas envolvendo adultos e crianças são comuns; anualmente nos Estados Unidos causam a morte de cerca de 100 mil pessoas, segundo dados da *Food and Drug Administration* (FDA). No Brasil, levantamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS) dão conta da ocorrência de 2 mil casos de envenenamento por plantas tóxicas por ano [KALUNGA, 2006]. Além dos danos à saúde humana as plantas tóxicas causam a intoxicação de rebanhos em diversos países, gerando prejuízos à economia.

No Brasil, o número de plantas conhecidas como tóxicas para ruminantes aumenta constantemente. Atualmente são descritas pelo menos 88 espécies tóxicas, pertencentes a 50 gêneros distribuídos em famílias. No Uruguai são conhecidas 31 espécies tóxicas

pertencentes a 26 gêneros. Apesar do grande número de espécies tóxicas, as identificadas como causadoras de perdas econômicas importantes são relativamente poucas. No Rio Grande do Sul, espécies de *Senecio spp* (Fabaceae) foram responsáveis por 50,7% de todas as mortes causadas por plantas no período de 1978 a 1998 (Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas). *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae), que contém ácido fluoroacético, é uma das plantas tóxicas mais importantes do Brasil, causando perdas severas em quase todo o País [RIET-CORREA, 2005].

Entre outras plantas tóxicas para o gado pode-se destacar: a *Ateleia glazioviana* (Fabaceae) que causa abortos em ruminantes e que provoca fibrose cardíaca em bovinos é encontrada em Santa Catarina e no Noroeste do Rio Grande do Sul. *Pteridium aquilinum* (Polypodiaceae), que causa uma síndrome pancitopênica aguda, hematúria enzoótica e tumores do trato digestivo superior, é uma das plantas tóxicas mais importantes do Brasil. A invasão desta samambaia (*P. aquilinum*) afeta profundamente o ecossistema local e coloca em risco a economia da atividade agropecuária. Em Santa Catarina os carcinomas do trato digestivo superior são as principais causas de morte em bovinos adultos [CRUZ, 2004].

Algumas plantas causam "morte súbita", tais como *Mascagnia rígida*, encontrada na região Nordeste, *Arrabidaea bilabiata* (Rubiaceae) e *A. japurensis*, na região Norte. Essas plantas são responsáveis por, aproximadamente, 60% de todas as perdas causadas por plantas tóxicas no País [RIET-CORREA, 2005].

Perdas econômicas importantes são causadas em bovinos e ovinos por *Brachiaria decumbens* (Gramíneas) e outras espécies de *Brachiaria* que causam fotossensibilização, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Nos Estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo, a planta tóxica mais importante é *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) [RIET-CORREA, 2001]. No Rio Grande do Sul e Santa Catarina, estima-se que a mortalidade anual de bovinos por intoxicação por plantas é de 5% para um rebanho de 160 milhões de cabeça [HARAGUCHI, 2003].

Os rebanhos do Pantanal e toda a região Centro-Oeste registram uma perda considerável decorrente da intoxicação por plantas tóxicas. Calcula-se que 12% das mortes de bovinos são causadas por sementes, folhas ou raízes de plantas que possuem grande quantidade de substâncias químicas nocivas ao gado [AFONSO, 2001]. Entretanto, os dados disponíveis não revelam com exatidão os prejuízos econômicos causados por plantas tóxicas. Vários fatores contribuem para a incerteza dos dados, entre eles destacam-se, a

grande área territorial do país, a má informação sobre mortes causadas por plantas tóxicas, pois os sintomas são muito parecidos com os provocados por picadas de cobras e principalmente porque os sintomas das intoxicações crônicas são confundidos com outras enfermidades [HARAGUCHI, 2003].

A relevância do estudo de plantas tóxicas é indiscutível, pois elas são responsáveis por perdas econômicas em um dos setores que mais produzem neste país, o agropecuário. O estudo fitoquímico destas espécies proporcionará o conhecimento da composição química destas plantas e poderá direcionar uma maneira de tratar os animais intoxicados ou até mesmo desenvolver medicamentos que poderão impedir a ação tóxica da planta quando ingerida.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho se constitui na primeira etapa de um programa de investigação de plantas tóxicas que ocorrem em Mato Grosso do Sul.

O objetivo geral deste é realizar o estudo químico e biológico da parte aérea das espécies *Mascagnia pubiflora* (A. Juss.) Griseb. Malpighiaceae e *Riedeliella gracilifolia* Harms Fabaceae, abrangendo:

- 1) O isolamento e a identificação e/ou elucidação estrutural dos metabólitos secundários acumulados pelas plantas;
- 2) Testes biológicos de toxicidade para coelhos;
- 3) Testes biológicos de inseticida para *Spodoptera frugiperda* (lagarta do milho) de extratos, frações e substâncias puras;
- 4) Testes biológicos de citotoxicidade contra *Artemia salina* de extratos, frações e substâncias puras.

3. PLANTAS TÓXICAS PARA O GADO EM MATO GROSSO DO SUL

O estado de Mato Grosso do Sul apresenta o maior rebanho bovino de corte do Brasil ocupando as áreas de Cerrado e Pantanal [EMBRAPA, 1995].

Nas áreas de pastagens (Cerrado e Pantanal) encontram-se as forrageiras nativas e as naturalizadas, estas apresentam baixa capacidade de suporte e qualidade muito variável com a estação do ano. Porém, esses biomas possuem uma flora rica e muitas espécies são pastadas sendo algumas tóxicas [AFONSO, 2001].

Planta tóxica para o gado não é só a que mata, mas também a que provoca perturbações diretas ou indiretas na saúde do animal, às vezes pouco percebidas, como o aborto. Algumas causam sinais que podem ser confundidos com picada de cobra, raiva ou outra doença [AFONSO, 2001].

A maioria das plantas tóxicas não é palatável aos bovinos, contudo no período de seca que compreende os meses de Junho a Setembro, há escassez de pastagens para o gado. Nesse período, devido à alta adaptabilidade das plantas nativas de cerrado, há uma rebrota normal destas, destacando-se na pastagem por sua aparência verde e vigorosa e atraindo a atenção dos animais sem alimento. Outros fatores que levam o gado a ingerir essas plantas são: superlotação, queimada, mudança de pastagem, viagens e deficiência de minerais [ANDRADE, 1968].

A variedade de plantas e de princípios tóxicos, muitos ainda desconhecidos, dificulta prescrever o tratamento e não havendo antídotos, aplica-se glicose, extratos hepáticos, purgantes oleosos e repouso. De modo geral, recomenda-se a retirada dos animais, de forma lenta, e mantê-los à sombra [TOKARNIA, 2000].

Na tabela abaixo (Tabela 1) estão relacionadas algumas plantas que causam intoxicação ao gado, identificadas pelos nomes populares e científicos e alguns sinais clínicos de intoxicação.

Tabela 1 – Principais plantas tóxicas encontradas em Mato Grosso do Sul.

Nome comum e onde ocorre	Nome Científico	Sinais clínicos de intoxicação
Algodão-bravo (Pantanal, brejos)	<i>Ipomoea carnea subsp. Fistulosa</i>	Intoxicação lenta; emagrecimento, lassidão, pêlo áspero; andar desequilibrado.
Barbatimão (Pantanal, Cerrados)	<i>Stryphnodendron obovatum</i>	Baba, lágrima; rúmen lento; fezes fétidas com sangue e muco; desequilíbrio; emagrecimento; cólica, gemidos, ranger de dentes; queda de pêlos, pele solta e necrosada; fotossensibilização; aborto.
Batatarana (Pantanal)	<i>Ipomoea asarifolia</i>	Tremor, balanço da cabeça, desequilíbrio; apetite bom. Pode haver recuperação.
Braquiária-d'água ou "Tanner grass"	<i>Brachiaria subquadriflora B. radicans)</i>	Urina escuro-avermelhada e freqüente; diarréia, fraqueza, desequilíbrio; mucosas pálidas. Pode haver recuperação.
Caruru-de-espinho (geral)	<i>Amaranthus spinosus</i>	Diarréia escura fétida, edema no pescoço; emagrecimento; dificuldade de andar; pode soltar o casco.
Cipó-prata (Pantanal e serras)	<i>Mascagnia spp.</i>	Morte súbita: se correr, a rês cai morta, de ataque do coração.
Coerana (baixadas e grotas)	<i>Cestrum laevigatum</i>	Morte em um ou dois dias; rúmen pára; fezes secas, às vezes com sangue e muco; tremor, desequilíbrio; inquietação; cólica, gemidos, ranger.
Cutóbea (Pantanal e brejos)	<i>Coutobea ramosa</i>	Andar lerdo; cólica, inquietação, rúmen lento; pele fria, aceleração do coração e da respiração; agonia e morte.
Espichadeira (Pantanal)	<i>Solanum glaucophyllum</i>	Intoxicação lenta. Calcifica pulmões, veias e tendões (rigidez das pernas); apoio na ponta do casco ("espichado"), dificuldade de andar, emagrecimento, morte por fome. Ataca mais vaca nova.
Falsa-ciganinha, rideliela (cerrados)	<i>Riedeliella graciliflora</i>	Morte em horas: baba, olhos retraídos, diarréia e descoordenação; queda de lado, com agonia e hemorragia pelos orifícios.
Fava-de-anta, faveira (Pantanal, cerrados)	<i>Dimorphandra mollis</i>	Distúrbios intestinais, fezes com muco e sangue; pêlo arrepiado, timpanismo, cólica; coração fraco, emagrecimento, tremor; geme, até a morte. Favas causam aborto.
Fedegoso (geral)	<i>Senna occidentalis</i>	Diarréia, fraqueza, tremor e desequilíbrio; arrasta os cascos traseiros; no final, mais diarréia, e morte.
Guizo, guizo-de-cascavel, xiquexique (geral)	<i>Crotalaria micans e outras espécies</i>	Ataca o fígado; contrações e perturbação digestivas, desequilíbrio; excitação ou depressão; dificilmente se recupera.
Louco (Pantanal, serras)	<i>Plumbago scandens</i>	Morte em horas: boca cinza-escura, urina escuro-avermelhada; rúmen pára, empacha; cólica, balanço da cabeça, deita/levanta, gemidos; focinho seco e extremidades frias.
Mamona, mamoneira (geral)	<i>Ricinus communis</i>	Folhas: desequilíbrio, tremor; arroto e baba; dificuldade de andar longe e procura deitar. Sementes: fraqueza, tristeza e diarréia de sangue.
Maria-mole (sudeste)	<i>Senecio brasiliensis</i>	Ataca o fígado; sem apetite, rúmen pára, emagrecimento, sangue nas fezes, com ou sem diarréia; acelera coração e respiração; contração, inquietação, andar em círculos.
Vernônia (Pantanal)	<i>Vernonia rubricaulis</i>	Morte em 24 horas: ataca o fígado; focinho seco, gemidos, tremor da cabeça, contração e desequilíbrio; deita com pescoço virado; berros.
Vernônia (campos do sul)	<i>Vernonia molissima</i>	Morte em 24 h: ataca o fígado; perda de apetite, constipação, tremores, respiração difícil.
Ximbuva, timbaúva, tamboril (geral)	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	Morte em horas: diarréia amarelada fétida; olhos retraídos; pedalagem. Poucas favas já provocam aborto.
Laranjinha ou limãozinho (sul e sudeste)	<i>Polygala klotzschii</i>	Morte em um dia; forte desequilíbrio; batidas da cabeça no solo; respiração difícil; diarréia líquida.

* Fonte: [AFONSO, 2001]

Muitas das plantas relacionadas na (Tabela 1) são encontradas em outras regiões do país. Um exemplo é o da *Senna occidentalis* (Leg. Caesalpinoideae), conhecida popularmente como “fedegoso”. No Rio Grande do Sul, Estado que conta com uma população bovina de 13 milhões de cabeças, 5% desta morre anualmente, isto equivale a 650.000 animais por ano. Destes, 10% a 14% morrem devido a intoxicações por plantas, sendo a sua maioria decorrente de intoxicação por fedegoso, o que corresponde de 64 mil a 90 mil cabeças/ano. Outras espécies de *Senna* também são tóxicas para o gado. Os princípios ativos tóxicos destas plantas são os alcalóides pirrolizidínicos, os quais provocam uma lesão irreversível e progressiva no fígado daqueles que a consomem [BARROS, 1999].

No estado de Mato Grosso do Sul há ocorrência de *Senna* sp. (Tabela 1), mas este não é o gênero responsável pelo maior número de intoxicação em bovinos. Registra-se uma maior ocorrência de intoxicação por *Mascagnia pubiflora* responsável por causar a morte súbita dos animais. Outra espécie de larga ocorrência no estado é a *Riedeliella graciliflora*, que causa salivação abundante, diarreia e incoordenação motora. A morte sobrevém em poucas horas, caracterizando-se uma intoxicação aguda, dificultando o diagnóstico correto e muitas vezes não registrado como intoxicação por planta [AFONSO, 2001]. Estas espécies são responsáveis por um grande prejuízo na pecuária na região do Pantanal, e a falta de informação sobre as plantas tóxicas desta região é uma preocupação para os criadores de gado.

3.1. Malpighiaceae e as principais espécies tóxicas para o gado em Mato Grosso do Sul

A família Malpighiaceae possui cerca de 63 gêneros que abrange em média 800 espécies pantropicais. No Brasil ocorrem 32 gêneros, cerca de 300 espécies distribuídas nas diversas regiões. É representada por lianas, arbustos, subarbustos ou, raramente, árvores. Uma das características desta família está nas folhas, são pilosas com indumento de pêlos malpighiáceo. Células com cristais de oxalato de cálcio, sob a forma de cristais isolados, geminados ou em drusas. A forma de cristalização tem importância sistemática [BARROSO, 1991].

As espécies de Malpighiaceae são pouco investigadas quanto à composição

química, apenas alguns gêneros apresentam trabalhos fitoquímicos descritos na literatura, sendo que somente as espécies dos gêneros *Byrsonima* e *Mascagnia* são classificadas como tóxicas para o gado em Mato Grosso do Sul [POTT, 2006].

3.1.1. Gênero *Mascagnia*

3.1.1.1. *Mascagnia rigida*

A espécie *M. rigida* apresenta um único trabalho com estudo fitoquímico descrito na literatura [NASCIMENTO, 1995]. Esse estudo resultou no isolamento de duas nafto- γ -pironas oriundas do extrato metanólico das folhas que foi tóxico para coelhos (Figura 1). Naftoquinonas e seus derivados são amplamente investigados quanto a seus efeitos terapêuticos, mas muitas dessas substâncias são tóxicas para humanos e animais. Essas substâncias são agentes hemolíticos provocando necrose de células epiteliais tubulares [KITAGAWA, 2004; TROESTER, 2002].

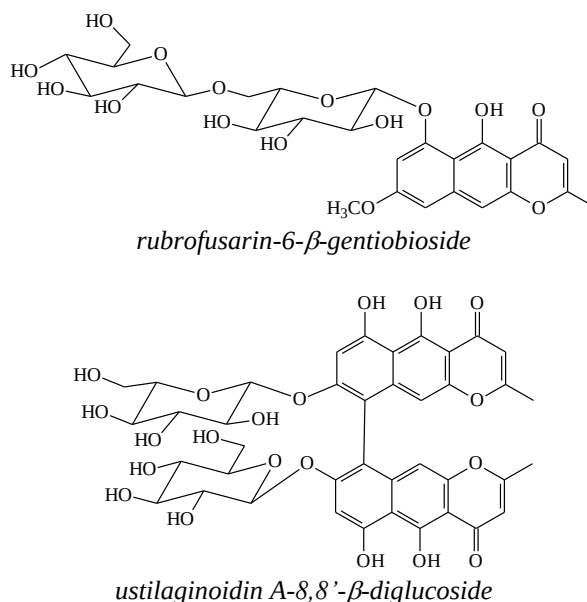


Figura 1 – Nafto- γ -pironas isoladas de *M. rigida*.

No levantamento realizado por SILVA [2006] sobre a intoxicação por plantas tóxicas em ruminantes e eqüinos, *M. rigida* foi uma das plantas mencionadas pelos criadores da região, vinte e cinco entrevistados conheciam a intoxicação em bovinos, sendo

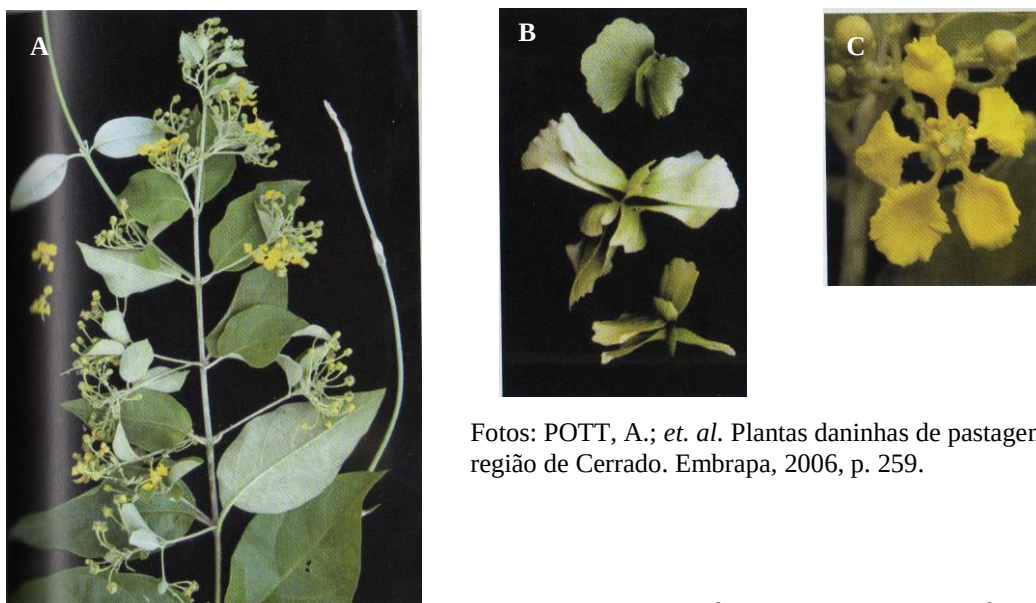
que 2 a relataram em jumentos. Um relatou que em agosto, período do início da estiagem, de 500 bovinos que foram colocados em uma área alta de serra, 75 adoeceram, destes morreram 60 e 15 se recuperaram. Foi tentado arrancar a planta pela raiz com 10 trabalhadores, por 2 meses seguidos, mas quando choveu brotou em quantidade aparentemente superior à existente anteriormente. Outro relatou que de 150 bovinos que no período de estiagem estavam sendo retirados de uma serra, 3 caíram e morreram em aproximadamente 20 minutos. Um entrevistado relatou que de 100 bovinos que estavam sendo transportados, 2 caíram, mas se recuperaram espontaneamente, após terem sido deixados no caminho.

3.1.1.2. *Mascagnia pubiflora* (cipó-prata, tingüi, corona) (Figura 2)

M. pubiflora é encontrada na região Centro-Oeste, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (margens do rio Paraná), é conhecida como cipó-prata e corona na região do Pantanal. As espécies tóxicas que ocorrem no Brasil são semi-arbustivas, com ramos em forma de lianas (cipó). Em condições naturais esta espécie causa intoxicação em bovinos. Há, porém, grande variação da toxidez das folhas de acordo com a época do ano. Em agosto/setembro, na época da seca, com a planta em brotação, floração e frutificação a dose letal das folhas frescas é de 5 g/kg [TOKARNIA, 1973].

A pecuária do Estado de São Paulo [DIAS, 1977] e de Mato Grosso do Sul tem sofrido grandes prejuízos por causa desta toxicidade, o gado alimenta-se das folhas novas onde o índice de toxidez é maior, provocando anualmente um número bastante elevado de intoxicação e morte de bovinos. Segundo Tokarnia [2000] as espécies tóxicas para o gado são *M. elegans*, *M. pubiflora* e *M. aff. Rigida*. Os sintomas são: perturbação do sistema nervoso, tremores e convulsões.

A autópsia tem mostrado congestão hepática, ocasionalmente hemorragias nos pulmões fígado e intestino e as saponinas são citadas como uma das classes de substâncias tóxicas de *M. pubiflora*. Estudo destes compostos tem interesse econômico por causa do seu sabor doce e pelo fato de serem ocasionalmente tóxicas ao gado [DIAS, 1977].



Fotos: POTT, A.; *et. al.* Plantas daninhas de pastagem na região de Cerrado. Embrapa, 2006, p. 259.

Figura 2 – Detalhes dos galhos (A), sementes (B) e flores (C) de *M. pubiflora*.

3.1.2. Gênero *Byrsonima*

3.1.2.1. *Byrsonima* spp.

Das *Byrsonima* spp. que foram estudadas quanto a sua composição química, nenhuma é considerada tóxica para o gado em Mato Grosso do Sul.

A espécie *B. crassa* é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras gástricas. Desta espécie foram isolados derivados do flavonol quercetina, o biflavonol amentoflavona (Figura 3), (-) epicatequina, (+)-epicatequina e o galato de metila. As substâncias isoladas e os extratos orgânicos obtidos de *B. crassa* apresentaram atividade antiúlcera, mas os ensaios para detectar atividade mutagênica e/ou genotóxica foram inconclusivos [SANNOMIYA, 2004].

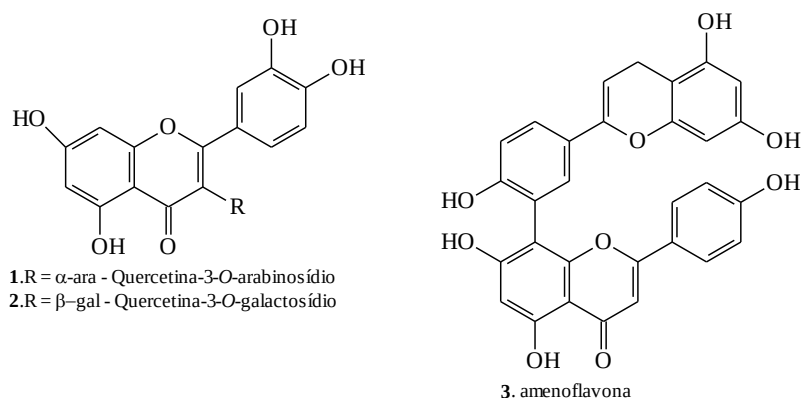


Figura 3 – Substâncias isoladas de *B. crassa*.

As outras duas espécies estudadas foram *B. microphylla* e *B. crassifolia*. Destas espécies não foram realizados ensaios para verificar atividade tóxica. De *B. microphylla* foram isolados, além das substâncias apresentadas na figura 4, triterpenos como o ácido oleanólico e lupenona, quercetina e galato de metila [ROCHA, 2006; AGUIAR, 2005].

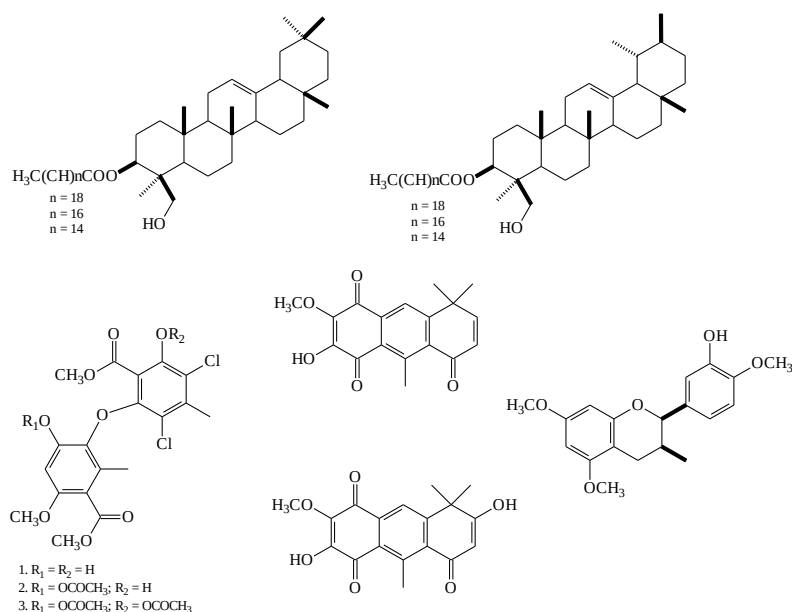


Figura 4 – Substâncias isoladas de *B. microphylla*.

A espécie *B. crassifolia* apresenta dois trabalhos descritos na literatura e não há registro quanto a estudos toxicológicos. A singularidade desses trabalhos concentra-se nas substâncias isoladas (Figura 5) que não foram descritas nos trabalhos anteriores [RASTRELLI, 1997].

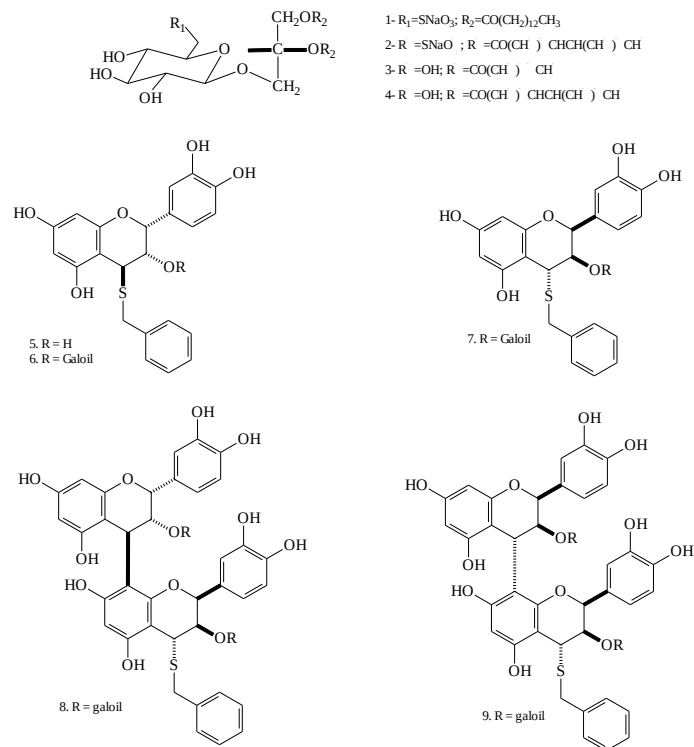


Figura 5 – Substâncias isoladas de *B. crassifolia*.

3.1.3. Gênero *Tetrapteryx*

O levantamento bibliográfico revelou que não há nenhum estudo fitoquímico com espécies pertencentes ao gênero *Tetrapteryx*. Há muitos relatos, principalmente na área da medicina veterinária, com a espécie *T. multiglandulosa*. Esta espécie causa insuficiência cardíaca em ruminantes [RIET-CORREA, 2005; CARVALHO, 2006]. No Brasil, são conhecidas três plantas tóxicas para bovinos que causam fibrose cardíaca e abortos: *Ateleia glazioviana*, *Tetrapteryx acutifolia* e *T. multiglandulosa*. As intoxicações por essas plantas são semelhantes, caracterizando-se por manifestações clínicas relacionadas ao sistema cardiovascular ("morte súbita" e insuficiência cardíaca) [TOKARNIA, 2000; GAVA e BARROS, 2001] e abortos [TOKARNIA, 1989; STOLF, 1994].

3.1.3.1. *Tetrapteryx multiglandulosa* (Cipó-vermelho, cipó-ferro)

T. multiglandulosa (Figura 6) é uma das principais plantas tóxicas para o gado de larga ocorrência em Mato Grosso do Sul. CARVALHO [2006] descreve dois surtos da intoxicação espontânea por *T. multiglandulosa* em bovinos e a reprodução experimental da

toxicose em ovinos. Em 2004 e 2005 ocorreram surtos em bovinos de Mato Grosso do Sul, de uma doença caracterizada por insuficiência cardíaca congestiva, abortos e nascimento de bezerros fracos. Os dois surtos espontâneos ocorreram na mesma fazenda localizada no município de Bataiporã – MS. O primeiro surto ocorreu entre julho e outubro de 2004 e envolveu uma população bovina de 290 vacas prenhes introduzidas em um pasto de 60 hectares, onde havia uma área de reserva legal altamente infestada por *T. multiglandulosa*. Destas, 230 vacas (79,3%) abortaram, pariram natimortos ou bezerros fracos que morreram alguns dias após o nascimento. Adicionalmente, sete vacas adultas que haviam abortado ou parido natimortos, morreram posteriormente. O segundo surto ocorreu entre setembro e outubro de 2005 em 285 novilhas de 2 anos de idade que tinham sido introduzidas no mesmo local. Morreram 9 novilhas com quadro de insuficiência cardíaca, aproximadamente 30-40 dias após terem sido introduzidas na invernada. Os casos clínicos destes surtos continuaram ocorrendo, mesmo dois meses após a retirada dos bovinos do local. Os animais consistentemente apresentavam variados graus de edema subcutâneo nas porções ventrais do corpo, acentuada letargia, caracterizada por uma espécie de sonolência e fraqueza. Os bovinos afetados relutavam em se mover e acabavam assumindo queda frontal com o queixo apoiado ao solo. O diagnóstico da intoxicação por *T. multiglandulosa* nos bovinos deste estudo foi baseado na epidemiologia, no quadro clínico, nos achados de necropsia e histopatologia e no estudo experimental em dois ovinos alimentados com as folhas secas dessa espécie.



Figura 6 – Detalhes dos galhos (A), sementes (B) e folhas (C) de *T. multiglandulosa*.

3.1.4. Outras espécies de *Malpighiaceae*

Os trabalhos que descreveram a investigação química das demais espécies de *Malpighiaceae* estudadas (*Malpighia punicifolia*, *M. corngera*, *Heteropterys umbellata*, *Hiptage madablota*) relataram a ocorrência das classes de substâncias anteriormente mencionadas. A maioria das substâncias fenólicas pertencia à classe dos flavonóides ou eram derivados da rota C6-C3. A exceção foi *Banisteriopsis argente*, sendo que a classe metabólita abundante era alcalóide do tipo indol (Figura 7).

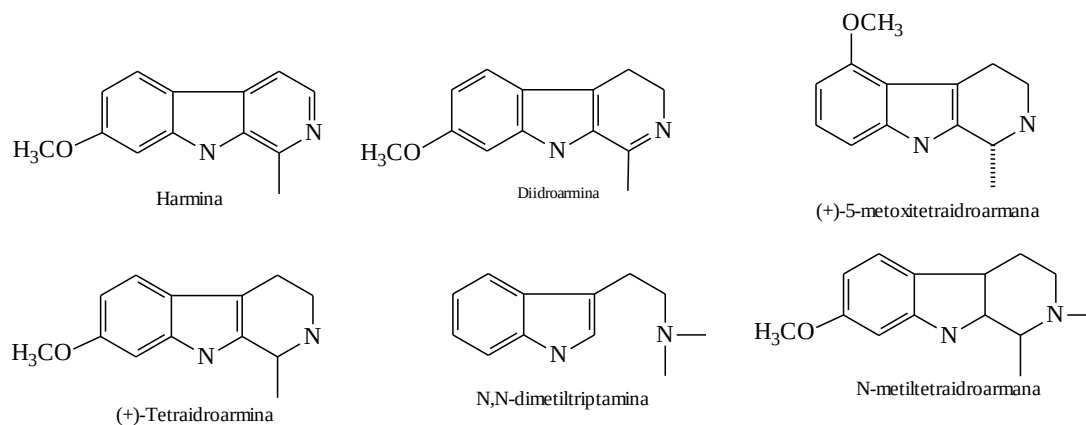


Figura 7 – Substâncias isoladas de *B. argente*.

A investigação química das espécies pertencentes a Malpighiaceae revelou uma variedade de classes metabólicas, sendo que as substâncias fenólicas foram as mais abundantes. Entre as classes de metabólitos secundários identificados nesta família, os derivados de naftoquinonas são as únicas substâncias com dados toxicológicos, [DIAS, 1977].

3.2 Fabaceae e as principais espécies tóxicas para o gado em Mato Grosso do Sul

A família Fabaceae está representada por aproximadamente 482 gêneros e 12.000 espécies de ampla distribuição [BARROSO, 1991]. Nessa família são encontradas centenas de espécies com utilidades medicinais, comestíveis, fornecedoras de madeiras, óleos, corantes, fibras, forragens, etc. Como comestíveis estão todos os legumes, a maioria constituída por plantas cultivadas. Entre elas podemos destacar: *Phaseolus* spp (feijão); *Pisum sativum* (ervilha); *Lens esculenta* (lentilha); *Medicago sativa* (alfava); *Arachis hypogaea* (amendoim) e a *Glycine max* (soja).

Os gêneros *Crotalaria* e *Dolicho* são usados na recuperação de solos empobrecidos, são plantadas e depois enterradas no solo (adubo verde) a fim de melhorar o conteúdo em compostos nitrogenados essenciais para outras culturas. Na indústria, os gêneros *Indigofera* são usados na fabricação do anil e o *Astragalus* fornece a goma-arábica. Alguns exemplares desta família são importantes no fornecimento de madeira destacando *Machaerium* spp (jacarandá). A espécie que fornece fibra é a *Crotalaria juncea*. Algumas espécies são cultivadas pelas flores, como, por exemplo, *Lethyrus* (ervilha de cheiro), *Spartium* (giesta). Muitas espécies são usadas na medicina popular, dentre elas podemos relacionar a *Boudichia nítida* (sucupira), a *Dipteryx odorata* (cumaru), a *Abrus precatorius* (jequiriti). [JOLY, 1985]. As espécies *Indigofera suffruticosa* e diversas espécies de *Crotalaria* são tóxicas para animais (bovinos, eqüinos, suínos, aves e caprinos) [NOBRE, 2004; SILVA, 2006].

3.2.1 O gênero *Crotalaria*

O gênero *Crotalaria* contém aproximadamente 600 espécies que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais. As espécies deste gênero são responsáveis por um grande número de casos de intoxicação em animais e humanos distribuídos em todas as regiões

por onde podem ocorrer. São espécies que biossintetizam um grande número de alcalóides pirrolizidínicos responsáveis pelas toxicidades hepática e cardiopulmonar [BRUNETON, 1999].

A variedade quantitativa e qualitativa dos alcalóides pirrolizidínicos neste gênero depende de cada espécie, contudo o principal princípio tóxico encontrado em *Crotalaria* sp. é o alcalóide pirrolizidínico denominado monocrotalina (Figura 8). Esse alcalóide é um éster macrocíclico de retronicina, podendo ser detectada em todas as partes da planta [BRUNETON, 1999].

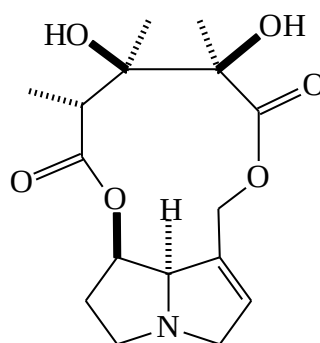


Figura 8 – Monocrotalina.

3.2.1.1. *Crotalaria retusa* (gergelin-bravo, chocalho-de-cascavel) (Figura 9)

Os casos de intoxicação por *C. retusa* em bovinos, eqüinos, ovinos, caprinos e em emas foi investigado por SILVA [2006]. Esta investigação foi realizada em campo e os dados coletados foram basicamente por relato dos criadores desses animais.

Um dos entrevistados relatou que dos 10 eqüinos do seu rebanho 6 apresentaram intoxicação e das 10 emas 3 foram encontradas mortas. Nos eqüinos a duração do quadro clínico foi de aproximadamente 90 dias, sem responder a qualquer tratamento. A intoxicação ocorreu no período de estiagem em um baixio com aproximadamente 50% da área ocupada pela planta. Nas emas foram encontradas sementes da planta no ingluvío.

De 2003 a 2004 oito casos de intoxicação de por *C. retusa* foram observados em 8 fazendas na região semi-árida da Paraíba e do Ceará. Os principais sinais clínicos foram caracterizados por encefalopatia hepática, com apatia ou hiperexcitabilidade, andar compulsivo ou em círculo e, ocasionalmente galope descontrolado e violento, decréscimo

nos reflexos dos nervos craniais, fraqueza, anorexia, perda peso, fotossensibilização e icterícia. Os dados são referentes à epidemiologia e sinais clínicos que foram colhidos junto aos proprietários dos animais, médicos veterinários e observados em visitas as propriedades afetadas pelos problemas. A evolução da doença variou de 4 a 40 dias levando á óbito todos os casos [NOBRE, 2004].



Foto: Flores de *C. retusa*
(www.producegreen.org.hk)



Foto: Frutos de *C. retusa*
(www.en.wikipedia.org)

Figura 9 – Flores e frutos de *C. retusa* (Fabaceae)

3.2.1.2. *Crotalaria spectabilis* (guizo-de-cascavel, chocalho, chocalho-de-cascavel)

Desde há muito tempo é conhecida como tóxica aos animais, sendo os suínos considerados os mais susceptíveis a esses efeitos. *C. spectabilis* (Figura 10) é comumente utilizada como adubação verde em vários países, inclusive no Brasil; devido a este fato, pode ser encontrada em plantações como milho, soja e sorgo. Nessas circunstâncias, suas sementes podem ser inadvertidamente colhidas com essas culturas e aparecerem em rações de animais. O principal princípio tóxico encontrado em *C. spectabilis* é o alcalóide pirrolizidínico denominado monocrotalina, a qual foi isolada por Neal [1935], podendo ser detectada em todas as partes da planta incluindo-se folhas e sementes [Johnson, 1985]. Segundo Mattocks [1986], a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos resulta em danos irreversíveis. Os principais achados patológicos foram úlceras gástricas, hemoperitônio, atrofia e fibrose hepáticas, fibrose renal com cistos glomerulares e pneumonia proliferativa

intersticial. Lesões microscópicas de maior valor diagnóstico foram hipertrofia de hepatócitos e de células epiteliais dos túbulos contorcidos renais, com cariomegalia. A severidade dos efeitos causados pela intoxicação por crotalária foi grandemente influenciada pela idade dos suínos. Leitões desmamados um pouco antes de receberem ração contaminada foram mais severamente afetados e apresentaram taxa de mortalidade próxima a 80%, enquanto que suínos com peso próximo a 100 kg tiveram uma mortalidade de 8% e não houve morte entre as fêmeas. [SOUZA, 1997].



Figura 10 – Folhas e flores de *C. spectabilis* (Fabaceae). Detalhes das flores (B).

3.2.2. O gênero *Indigofera*

O uso mais conhecido e antigo das indigoferas é na produção de pigmento azul (*indigo blue*) que pode ser extraído de *Indigofera tinctoria* e de cinco outras espécies. A importância econômica do pigmento fez com que a planta fosse cultivada intensamente nos países asiáticos [<http://www.embrapa.br>]. Este gênero compreende cerca de 800 espécies conhecidas, a maioria são herbáceas, anuais ou perenes, havendo espécies arbustivas e arbóreas que ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente na África. No Brasil é encontrado com maior frequência no bioma Cerrado [SOUZA BRITO e SOUZA BRITO, 1996].

No Brasil, há poucos dados que comprovem a toxicidade das espécies deste gênero. Enquanto que *I. hirsuta* é considerada forrageira para o gado, *I. truxillensis* pode ser tóxica sob certas condições [LORENZI, 2000].

Na África, a espécie *I. linnaei* é responsável pela intoxicação de vários animais, principalmente cavalos. Da espécie africana foi isolado o alcalóide indospicina (Figura 11) apontado como o principal princípio ativo tóxico.

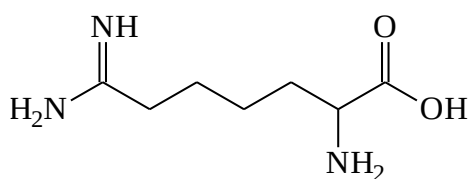


Figura 11 – Indospicina.

Outras espécies de *Indigofera*, como a *I. trictoria*, foram investigadas quanto a sua composição química, não sendo isolados alcalóides, sendo que as substâncias fenólicas foram as mais encontradas (Figura 12) [NARENDER, 2006].

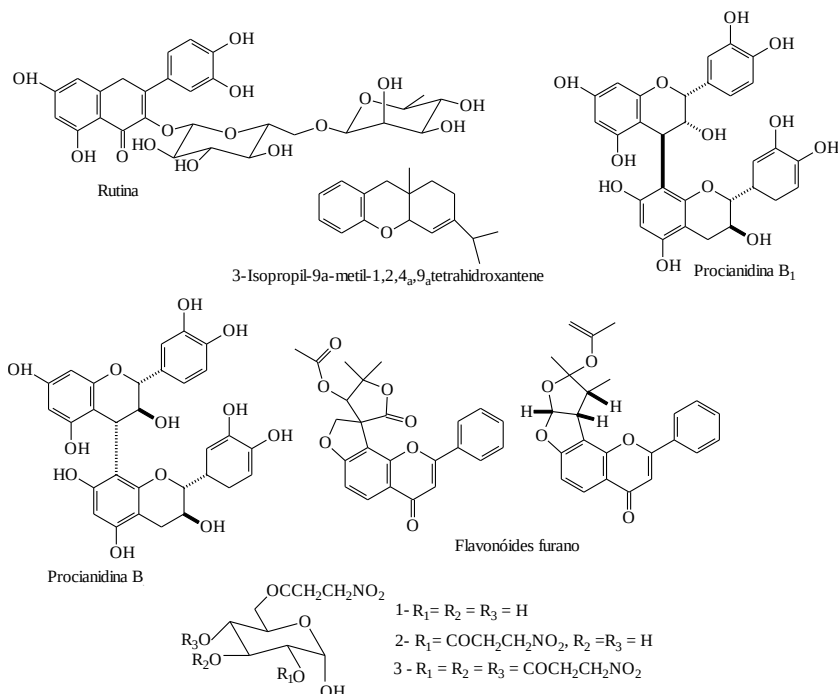


Figura 12 – Algumas substâncias isoladas do gênero *Indigofera*.

3.2.2.1. *Indigofera suffruticosa* (anil)

Estudo experimental realizado por OLIVEIRA [2001] comprovou a suspeita de criadores de gado de diversas áreas do nordeste que incriminavam as partes aéreas de *I. suffruticosa* (Figura 13) como responsável pela doença caracterizada por hemoglobinúria em bovinos. Foram experimentados seis animais e todos apresentaram sintomas de hemoglobinúria. Dois desses bovinos não apresentaram manifestações adicionais, um terceiro animal evidenciou manifestações leves, e os três outros, sintomas adicionais de intensidade moderada: apatia, mucosas visíveis de coloração esbranquiçada, pêlos arrepiados, anorexia, diminuição da frequência e intensidade dos movimentos ruminais, taquicardia, pulso venoso positivo e dispnéia. Antes da crise hemolítica a urina apresentava coloração verde azulada. Nenhum animal experimental morreu, porém um foi sacrificado durante a fase hemoglobinúrica. Na necropsia observaram-se: anemia, bexiga contendo urina cor de vinho tinto, rins aumentados de volume com coloração marrom-escura, fígado (na superfície e ao corte) de coloração azulada com lobulação perceptível. As principais alterações histológicas foram verificadas no fígado, sob forma de necrose coagulativa e tumefação e/ou microvacuolização citoplasmática dos hepatócitos, e no rim representadas por acentuada nefrose, associada a grande quantidade de filtrado e/ou hemoglobina nos espaços de Bowman dentro de túbulos e do citoplasma das células epiteliais. Não é uma doença fatal, mas o animal fica fraco, deixa de comer e acaba morrendo, pode ocasionar aborto também. SILVA [2006] fez um levantamento de plantas tóxicas para ruminantes e eqüinos e três entrevistados relataram a ocorrência de hemoglobinúria em bovinos causada por *I. suffruticosa*.



Fotos: LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil, p. 429.

Figura 13 – Detalhes dos galhos (A) e como encontrada na natureza (B) de *I. suffruticosa*.

3.2.3. O gênero *Riedeliella*

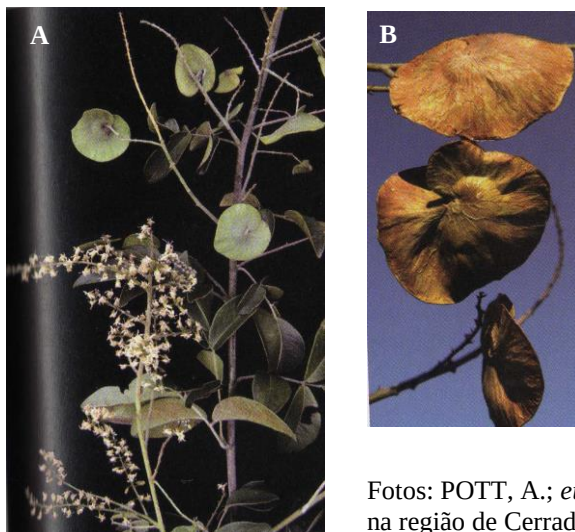
3.2.3.1 *Riedeliella graciliflora* (falsa-ciganinha) (Figura 14)

Esta espécie é encontrada na região sudeste da América do sul, cerrados, campos, caatinga, mata ciliares e capoeira. É uma planta arbustiva chegando a 2m de altura. Não há registros seguros da ocorrência de intoxicação. Um dos poucos registros foi em Jales – SP no ano de 1975 onde houve ocorrência de intoxicação e mortalidade de bovinos em regime de pastagens, e, dentre as várias espécies de plantas presentes na área, *R. graciliflora* foi identificada como a causadora da intoxicação.

O estudo biológico de *R. graciliflora* realizado com cobaias e bovinos mostrou que estes, após receberem o suco e o bagaço da planta, morreram, enquanto que os que receberam apenas o suco apresentaram somente sintomas de intoxicação e recuperaram o apetite depois de alguns dias. Isso mostra que a planta, mesmo seca, apresenta índice de toxidez. Este estudo revelou ainda que a planta seca por mais de 10 anos ainda mantinha a toxicidade quando administrada em cobaias [NOBRE, 1989].

O trabalho de HARAGUCHI [1992] mostrou que 10g de folhas/kg foram suficientes para causar congestão orgânica, edema e hemorragia no gado. Nesse experimento foi observado que o efeito tóxico dos frutos foi mais intenso. Estudo histológico de bovinos e cobaias intoxicados experimentalmente com *R. graciliflora* demonstraram que a planta causa necrose dos tecidos linfáticos [RIET-CORREA, 2001].

Estudos químicos realizados com *R. graciliflora* HARAGUCHI [1992] revelaram a presença de rutina e procianidina B₃ no extrato etnólico das folhas. Segundo KAWANO [1996], os taninos condensados procianidina B₁ e B₃ e gambirina C isolados do extrato n-BuOH apresentam atividade moluscida.



Fotos: POTT, A.; *et. al.* Plantas daninhas de pastagem na região de Cerrado. Embrapa, 2006, p. 259.

Figura 14 – Detalhes dos galhos e flores (A) e sementes (B) de *R. graciliflora* (Fabaceae).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material

- ✓ Solventes: solventes de grau P. A. (Merck, Vetec, Chemco, Synth).
- ✓ Gel de sílica do tipo 60, partículas de 63 - 200 μm e 40 - 63 μm (Merck ou Aldrich).
- ✓ Sephadex LH-20 (Pharmacia).
- ✓ Gel de sílica do tipo 60 G (5-40 μm , Merck) em camadas de 0,25 mm de espessura para cromatografia em camada delgada analítica.
- ✓ Reveladores: inspeção à luz UV (254 nm), solução a 2% de sulfato cérico em H_2SO_4 2N e/ou vapores de iodo.
- ✓ Espectros de RMN ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) foram registrados em espectrômetro Bruker DPX-300 (300 MHz).
- ✓ Solventes deuterados empregados foram CDCl_3 , CD_3OD DMSO- D_6 (Aldrich ou Merck).
- ✓ Sal marinho (Marinemix).
- ✓ Ovos de *Artemia salina* – Maramar.

4.2 Estudo fitoquímico de *Mascagnia Pubiflora* (Malpighiaceae)

4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas e os caules (parte aérea) de *M. pubiflora* foram coletados em agosto de 2003 no município de Aquidauana – MS e identificados pelo Dr. Arnildo Pott, registrada na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS em uma exsicata, n°. 5218.

4.2.2 Obtenção e partição dos extratos

A parte aérea de *M. pubiflora* foi submetida à extração com etanol e subsequente partição de acordo com o esquema apresentado abaixo (Figura 15).

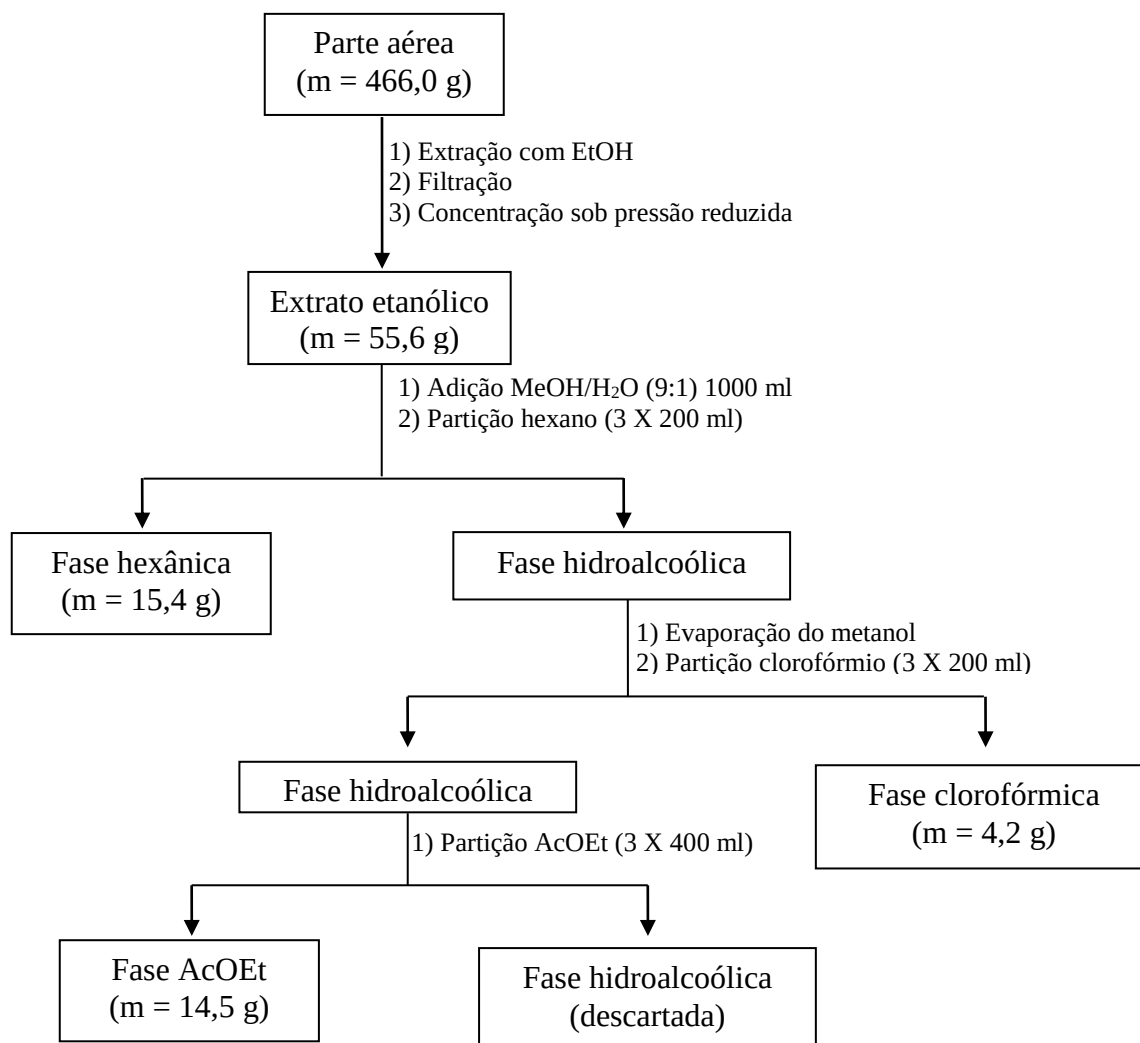


Figura 15 – Fluxograma da partição do extrato etanólico e obtenção das fases orgânicas da parte aérea de *M. pubiflora*.

4.2.3 Fracionamento da fase hexânica e clorofórmica

As fases hexânica e clorofórmica obtidas do fracionamento do extrato etanólico da parte aérea de *M. pubiflora* apresentaram o mesmo perfil cromatográfico quando analisadas por cromatografia em camada delgada; os espectros de RMN de ¹H exibiram sinais semelhantes. As fases foram reunidas e cromatografadas em coluna de sílica gel 60 (70-230 mesh, 150g) com gradiente em polaridade crescente de hexano/acetato de etila como fase móvel. Foram recolhidas 25 frações de 100-200 ml, analisadas por CCDA e reunidas segundo o perfil cromatográfico. Estas frações não foram investigadas pois os espectros indicaram presença preponderante de substâncias de natureza graxa.

4.2.4 Fracionamento da fase acetato de etila (MPAC)

A investigação inicial das fases hexânica e clorofórmica não se mostrou interessante para dar continuidade ao estudo fitoquímico. Assim deu-se início ao fracionamento da fase acetato de etila como descrito abaixo (Figura 16).

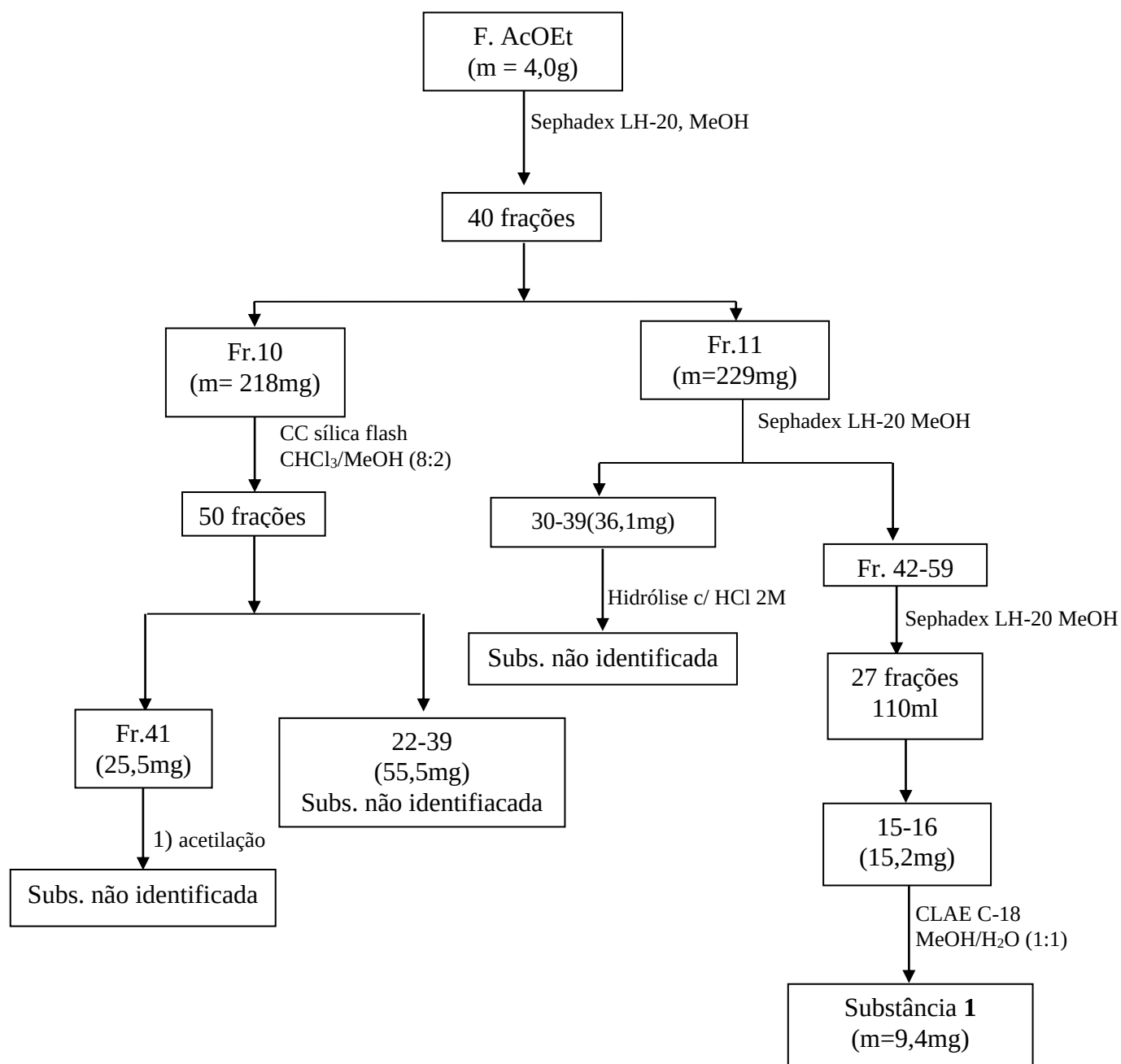


Figura 16 – Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato etanólico da parte aérea de *M. pubiflora*.

A análise por cromatografia em camada delgada comparativa indicou que a fase AcOEt era constituída por uma substância majoritária (**substância 1**). A análise preliminar dos espectros de massas indicou que esta possuía alta massa molecular. Assim, foi possível concluir que a metodologia anteriormente empregada não foi adequada para o fracionamento. Optou-se por nova metodologia para fracionamento da fase AcOEt, utilizando inicialmente o fracionamento em coluna de sílica de fase reversa C-18 (cromatografia líquida a vácuo) [HOSTETTMANN, 2003]. Pretendia-se isolar a substância **1** e outras substâncias, se possível, de estruturas semelhantes. O restante da fase AcOEt (10,5g) foi submetida à cromatografia em coluna de fase reversa, sendo obtidas 11 frações.

Tabela 2 – Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *M. pubiflora*.

Código	Eluente	Massa (mg)
MPAC-1	H ₂ O	108,5
MPAC -2	H ₂ O / MeOH (97/3)	643,9
MPAC -3	H ₂ O / MeOH (95/5)	27,8
MPAC -4	H ₂ O / MeOH (90/10)	25,6
MPAC -5	H ₂ O / MeOH (80/20)	94,0
MPAC – 6A	H ₂ O / MeOH (60/40)	667,4
MPAC - 6B	H ₂ O / MeOH (60/40)	434,9
MPAC -7	H ₂ O / MeOH (20/80)	445,7
MPAC -8	H ₂ O / MeOH (10/90)	375,8
MPAC -9	H ₂ O / MeOH (5/95)	283,4
MPAC -10	MeOH	154,1
Total		3261,1

4.2.5 Fracionamento da fração MPAC-6A

A fração MPAC-6A (667,4 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH - 20 (3/150 cm) empacotada com acetato de etila/metanol (6:4), obtendo-se 250 frações de 10 ml cada, reunidas de acordo com os perfis apresentados em CCDA, reduzindo o seu número para 22 (Figura 17, Tabela 3).

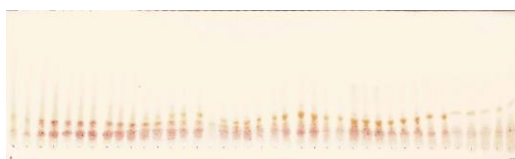


Figura 17 – Cromatograma das frações MPAC-6A – 59-89 (CHCl₃/MeOH/H₂O 80:20:02).

Tabela 3 – Massa das frações reunidas de MPAC-6A.

Fração	Frações reunidas	Massa (mg)	Fração	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 – 9	109,3	12	75 – 76	61,4
2	10 -12	55,4	13	77 – 84	74,8
3	13 -14	24,4	14	85 – 89	64,2
4	15 – 20	103,2	15	90 – 100	58,6
5	21 – 31	52,1	16	101 -114	64,8
6	32 – 40	84,6	17	115 – 120	51,5
7	41- 50	56,4	18	121 -139	12,8
8	51 – 57	92,8	19	140 -160	78,0
9	58 – 59	64,1	20	161 -170	51,0
10	60 – 62	82,7	21	171 – 179	64,5
11	63 – 74	145,0	22	180 -250	66,5

* Frações submetidas à análise via CLAE modo analítico.

4.2.6 Fracionamento da fração MPAC-6A-16

A fração MPAC-6A-16 apresentou um perfil cromatográfico simples e foi submetida à CLAE que resultou na obtenção da substância **3** (Figura 18).

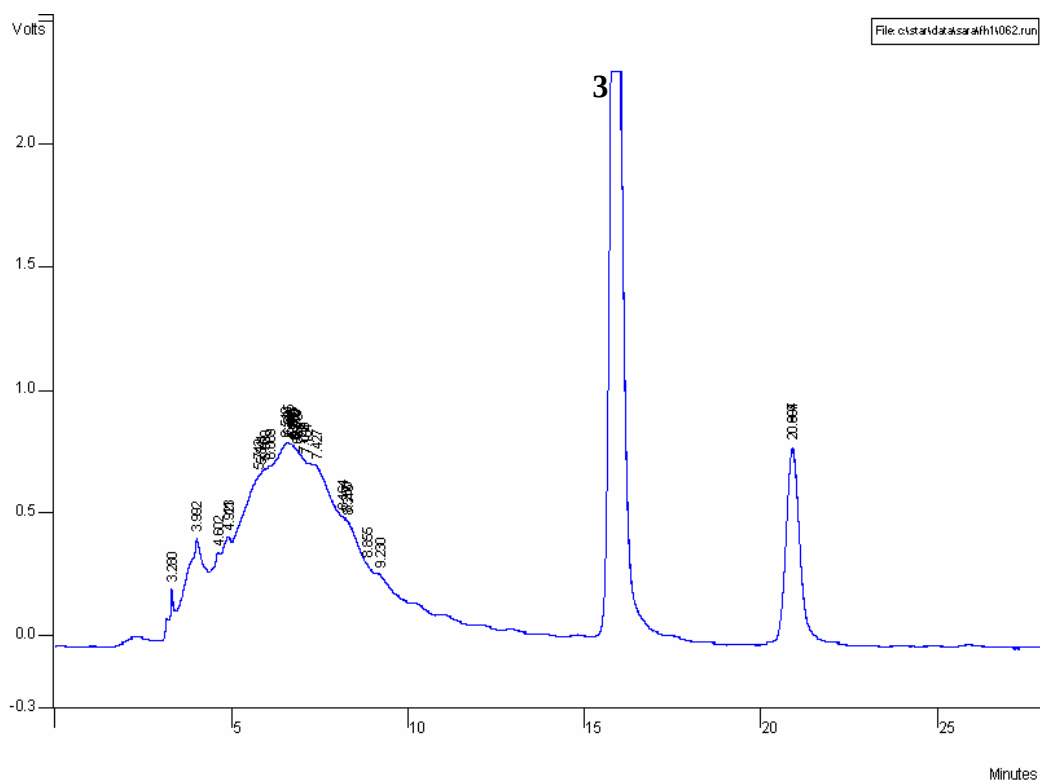


Figura 18 – Cromatograma semi-preparativo da fração MPAC-6A-16 [Coluna Phenomenex, C-18, 21,6X250mm Luna, 5 μ , CH₃CN/H₂O (15:85). λ =254nm, f = 14 ml/min].

4.2.7 Fracionamento das frações MPAC-6A-11, 12, 13, 17 e 18

As frações, MPAC-12, 13, 17 e 18 foram submetidas à análise por CLAE modo analítico; apenas as frações 11, 12 e 13 apresentaram perfil cromatográfico que viabilizava a purificação no modo semi-preparativo (Figuras 19 e 20).

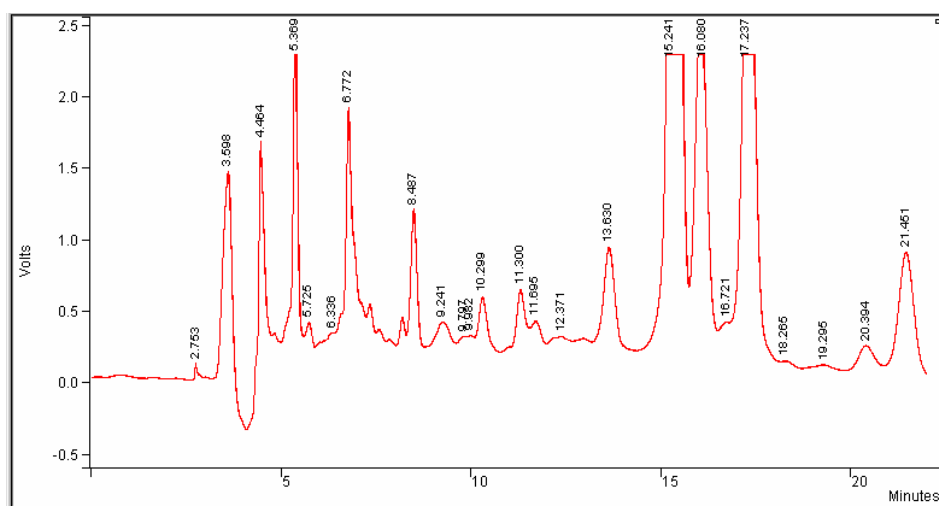


Figura 19 – Cromatograma semi-preparativo da fração MPAC-6A-12 [Coluna Phenomenex, C-18, 21,6X250mm Luna, 5 μ , CH₃CN/H₂O (30:70). λ =254nm, f = 14 ml/min].

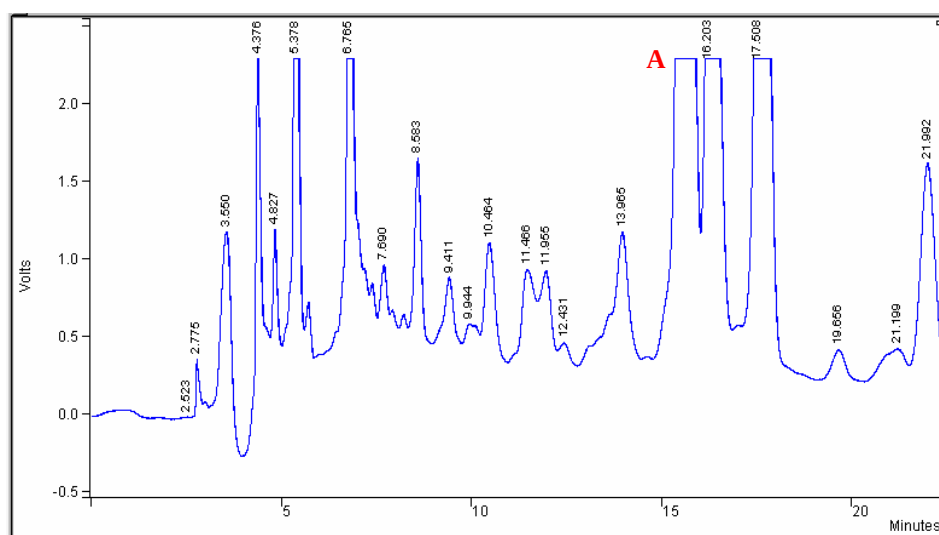


Figura 20 – Cromatograma semi-preparativo da fração MPAC-6A-13 [Coluna Phenomenex, C-18, 21,6X250mm Luna, 5 μ , CH₃CN/H₂O (30:70). λ =254nm, f = 14 ml/min].

Após a separação destas frações por CLAE semi-preparativo não foi possível identificar nenhuma das substâncias, porque todas degradaram.

4.2.8 Novo estudo fitoquímico do extrato etanólico de *M. pubiflora*

Os dados obtidos da análise dos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H e espectro de massas da substância **1** indicaram uma possível presença de um átomo de nitrogênio. De acordo com os dados da literatura, substâncias da classe dos alcalóides já foram isoladas em Malpighiaceae [DIAS, 1997]. O primeiro procedimento para averiguar a presença desta classe de substâncias no extrato etanólico de *M. pubiflora* foi por CCDA utilizando o reagente de Dragendorff. Esta primeira investigação apresentou um resultado positivo para alcalóides, confirmada pela presença de manchas alaranjadas na cromatografia em placa.

Uma nova coleta foi realizada em agosto de 2006 com a finalidade de confirmar a presença de alcalóides nesta espécie. As folhas e caule (2,8 kg) recém coletados foram triturados em liquidificador industrial, extraído em etanol por três vezes. O extrato etanólico após concentrado em pressão reduzida a uma temperatura controlada de 30°C foi submetido a uma extração alcaloídica.

4.2.8.1. Extração alcaloídica

O extrato etanólico seco (120g) foi suspenso em uma solução de ácido acético 10% (400 ml) e acetato de etila (50 ml). Esse sistema foi mantido sob agitação intensa por duas horas e transferido para um funil de separação, mantido em repouso até completa separação das fases. A fase de acetato de etila foi retirada e a fase aquosa alcalinizada a pH 8 com NH_4OH concentrado, sendo submetida à extração com acetato de etila (2X200 ml). A fase em acetato de etila foi então lavada com 100 ml de água para remover quaisquer resíduos de sal. Após evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida a fase alcaloídica resultou em uma fração com 270 mg [GARCEZ, 1991].

A fase alcaloídica foi inicialmente fracionada em coluna de sílica de fase reversa (tipo filtrante) sendo coletadas 5 frações (Tabela 4). A fração 3, denominada MPA-3, quando comparada ao padrão (substância **1**) por CCDA apresentou o mesmo fator de retenção (R_f).

Tabela 4 – Massas das frações obtidas do fracionamento da fase alcaloídica (MPA).

Fração	Massa (mg)	Condição
1	35,4	H ₂ O
2	21,8	MeOH/H ₂ O (8:2)
3	90,0	MeOH/H ₂ O (6:4)
4	58,2	MeOH/H ₂ O (4:6)
5	54,6	MeOH

A fração MPA-3 foi fracionada de acordo com o esquema abaixo (Figuras 21 e 22) sendo obtidas as substâncias **1** e **2**. As demais frações, embora tenham apresentado resultado positivo no teste com Dragendorff (Figura 23), não foram estudadas porque a análise por CCDA evidenciou que estas frações eram constituídas por mistura complexa além de pouca massa, tornando a separação e purificação pouco provável.

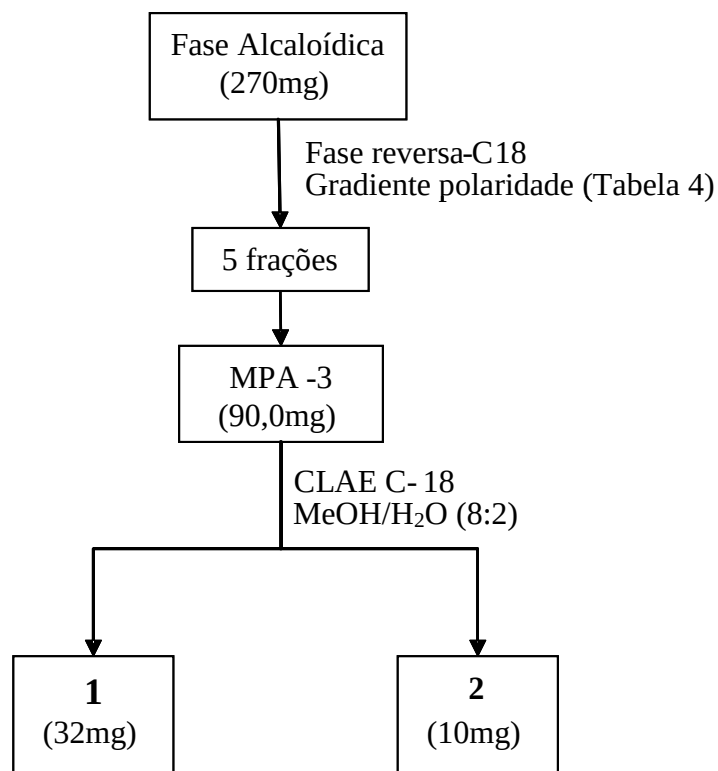


Figura 21 – Fluxograma do fracionamento da fase alcaloídica de *M. pubiflora*.

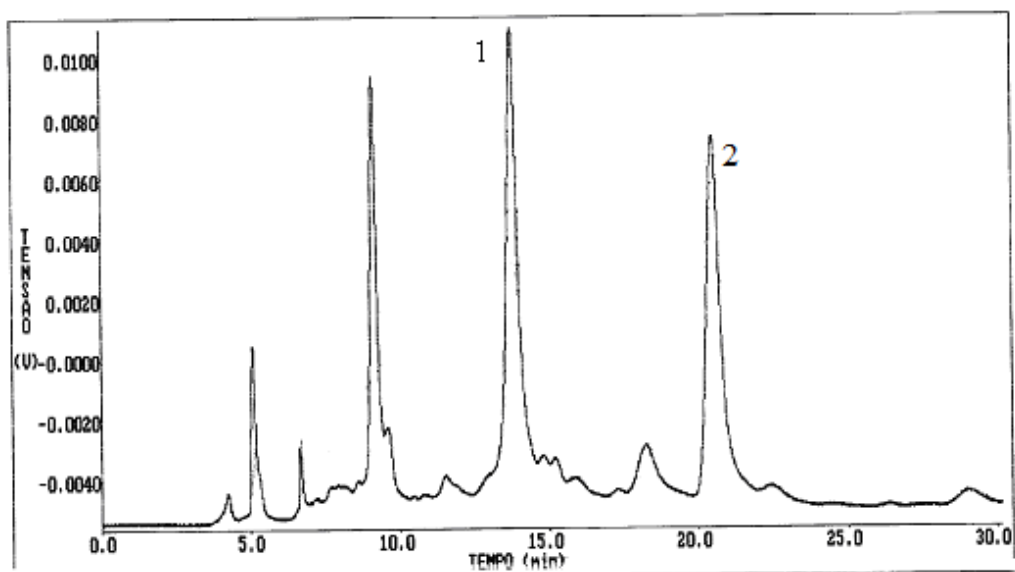


Figura 22 – Cromatograma analítico da fração RDAC-3-5 [Coluna Phenomenex, C-18, 4,6X250mm Luna, 5 μ , CH₃CN/H₂O (20:80). λ =254nm, f = 0,7 ml/min].

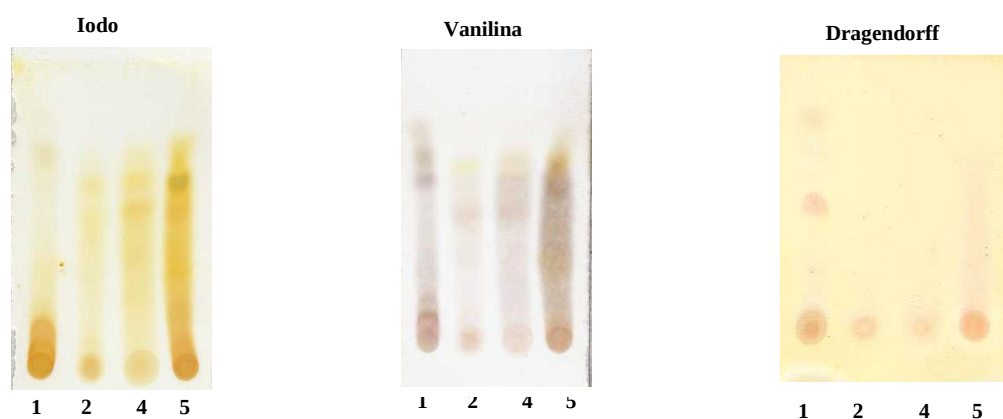


Figura 23 – Cromatofolhas das frações alcalóidicas (MPA) [CHCl₃/MeOH 9:1].

4.3 Estudo fitoquímico de *Riedeliella graciliflora* (Fabaceae)

4.3.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *R. graciliflora* foram coletadas em setembro de 2005 no município de Aquidauana – MS e identificadas pelo Dr. Arnildo Pott, registradas na Embrapa de Gado de Corte, Campo Grande – MS em uma exsicata, nº. 5936.

4.3.2 Obtenção e partição dos extratos

As folhas de *R. graciliflora* foram secas e moídas (466g), sendo em seguida submetidas à extração com etanol. Inicialmente o extrato etanólico, após concentrado e solubilizado em MeOH/H₂O (9:1), foi particionado com solventes de polaridade crescente originando as fases hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica. A fase hexânica foi selecionada para dar início ao estudo fitoquímico de *R. graciliflora*, sendo que os procedimentos adotados para a separação e purificação não resultaram no isolamento e identificação de nenhuma substância. A fase hexânica obtida no procedimento descrito anteriormente apresentou um resíduo insolúvel que concentrava 70% da massa desta fase além de uma grande porcentagem de ceras. Apesar de todas as dificuldades apresentadas, as CCDA revelaram a presença de substâncias apolares de interesse. Deste modo uma nova metodologia de partição do extrato etanólico foi empregada tendo como objetivo principal obter uma fase hexânica rica nos metabólitos de interesse e sem o resíduo insolúvel e ceras. Na literatura um procedimento muito empregado para a eliminação de ceras é o tratamento do extrato com acetonitrila [HOSTETTMANN, 2003]. O extrato etanólico de *R.graciliflora* foi inicialmente suspenso em acetonitrila e aquecido à ebulição por 2h. O material ceroso formado após o resfriamento pôde ser separado por decantação. O extrato foi então submetido a partição com hexano dando origem a uma fase em acetonitrila e outra fase hexânica (Figura 24) que foi fracionada.

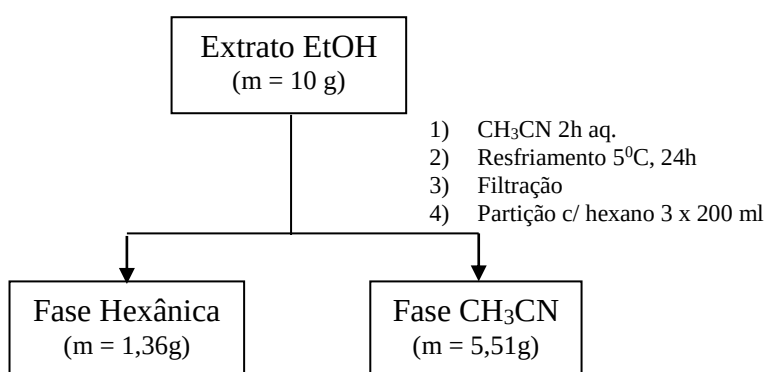


Figura 24 – Nova partição do extrato etanólico de *R. graciliflora* com acetonitrila.

4.3.3. Fracionamento da fase hexânica de *R. graciliflora*

O material presente na fase hexânica de *R. graciliflora* (1,36g) foi submetido inicialmente a uma cromatografia em coluna (Coluna A – 6 X 7 cm), utilizando-se 112g de sílica gel (230 – 400 mesh). O sistema foi eluído com hexano, hexano/acetato de etila e acetato de etila. Foram coletada nove frações de aproximadamente 370 ml (3 X volume morto da coluna) e feita análise por CCDA das frações obtidas (Tabela 5).

Tabela 5 – Fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de *R. graciliflora*.

Fração	Massa (mg)	Eluente
RDH-A 1	3,4	Hexano
RDH-A 2	4,9	Hexano
RDH-A 3	286	Hexano
RDH-A 4	143,1	Hexano
RDH-A 5	55,7	Hexano/AcOEt (98:2)
RDH-A 6	3,3	Hexano/AcOEt (95:5)
RDH-A 7	32,2	Hexano/AcOEt (9:1)
RDH-A 8	118,1	Hexano/AcOEt (8:2)
RDH-A 9	341,6	AcOEt

4.3.4. Fracionamento da fração RDH-A 3

Análise em CCDA das frações acima revelou que as substâncias de interesse estavam concentradas na fração 3. Esta fração (RDH-A3, 286 mg) foi inicialmente submetida a fracionamento cromatográfico (Figura 25) sendo obtidas as substâncias **4**, **5** e **6**. As demais frações não foram trabalhadas por apresentarem um perfil cromatográfico que evidenciava uma mistura complexa. Além disso, estas frações não indicavam a ocorrência de substâncias de classes diferentes daquelas já isoladas.

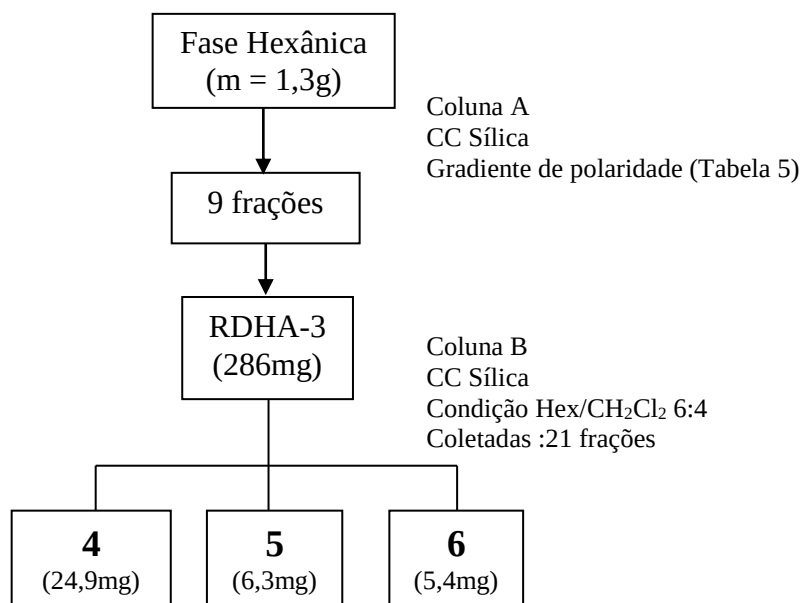


Figura 25 – Fracionamento de RDH-A3, originadas da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de *R. graciliflora*.

4.3.5. Estudo fitoquímico do extrato etanólico de *R. graciliflora*

A fase acetonitrila (5,51g) (Figura 24) não possuía massa adequada para dar continuidade ao estudo de *R. graciliflora*. A experiência em bancada do trabalho fitoquímico com esta espécie revelou que quando os extratos ou fases foram particionados, os mesmos eram constituídos por um resíduo insolúvel que quando seco possuía característica de polímero e correspondia a mais de 50 % em massa. Justificando, deste modo, a necessidade de uma nova coleta para dar continuidade à investigação química desta espécie.

As folhas de *R. graciliflora* (513, 43g) foram coletadas em agosto de 2006 no município de Aquidauna-MS. As folhas *in natura* foram moídas e extraídas com etanol em liquidificador industrial. Este processo tentava evitar a decomposição de material e a formação do resíduo. Após obter o extrato etanólico concentrado, este foi submetido a mesma metodologia já descrita anteriormente (Figura 24). A fase acetonitrila após concentração sob pressão reduzida foi suspensa em MeOH/H₂O (9:1) e particionada com AcOEt obtendo-se 11,27g da fase em acetato de etila e 10,2 da fase hidroalcoólica. A fase acetato de etila (6,5g) foi inicialmente fracionada em coluna de sílica de fase reversa C-18 obtendo-se cinco frações (Tabela 6).

Tabela 6 – Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *R. graciliflora*.

Código	Massa (mg)	Eluente
RDAC - 1	629,1	H ₂ O
RDAC -2	615,5	MeOH/H ₂ O (20/80)
RDAC – 3	1207,0	MeOH/H ₂ O (40/60)
RDAC – 4	279,0	MeOH/H ₂ O (60/40)
RDAC - 5	1000,0	MeOH

4.3.6. Fracionamento da fração RDAC-3

A fração RDAC-3 foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente MeOH/AcOEt (4:6, d = 3cm; h = 150cm). A CCDA das frações obtidas deste fracionamento revelou que esta coluna não foi eficiente na separação e purificação das substâncias.

4.3.7. Fracionamento da fração RDAC-1

A fração RDAC – 1 (629,1 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH -20 (3/150 cm) empacotada com metanol. Obtendo-se 98 frações de 10 ml cada. Após análise em CCDA usando como eluente (CHCl₃/MeOH/H₂O 80:18:2 + 0,05% CH₃COOH) as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, reduzindo o número de frações para 33 (Tabela 7).

Tabela 7 – Frações reunidas e massas das frações oriundas da RDAC-1.

Fração	Frações reunidas	Massa (mg)	Fração	Frações reunidas	Massa (mg)	Fração	Frações reunidas	Massa (mg)
1	1 - 24	55,2	12	52	23,9	23	73	16,9
2	25 - 28	69,1	13	53 - 58	22,3	24	74	13,5
3	29 - 30	34,4	14	59 - 60	29,5	25	75	18,5
4	31 - 33	29,7	15	61	10,5	26	76	14,3
5	34	19,5	16	62	13,5	27	77-81	15,5
6	35	3,1	17	63	18,6	28	82 - 86	31,4
7	36	3,6	18	64 - 65	16,8	29	87 - 88	27,6
8	37 - 39	31,2	19	66 - 69	38,7	30	89 - 92	25,5
9	40 - 42	12,2	20	70	51,0	31	93	10,4
10	43 - 45	18,4	21	71	64,5	32	94	9,5
11	46 - 51	28,4	22	72	66,5	33	95 - 98	13,1

As frações RDAC-1-13 e RDAC-1-27, de acordo com o perfil cromatográfico na CCDA, apresentaram grau de pureza suficiente para serem analisadas por RMN. Deste modo as substâncias **7** e **8** foram obtidas.

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Teste de toxicidade em coelhos

O teste de toxicidade *in vivo* pode ser realizado com várias cobaias, sendo camundongos ou coelhos as mais comuns. Estes podem ser usados como animal experimental de pequeno porte para estudos sobre a ação tóxica das plantas, bem como trabalhos de isolamento e identificação de seus princípios ativos [DOBEREINER, 1986].

Os testes de toxicidade das plantas tóxicas para o gado *M. pubiflora* e *R. graciliflora* foram realizados em coelhos.

I. Obtenção dos animais

Foram selecionados coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus* provenientes de criatório comercial. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com fornecimento de água e ração específica para a espécie e avaliados clinicamente por uma semana para garantir a inoculação em animais saudáveis.

II. Extratos testados

Todos os extratos foram solubilizados em água com concentração final 1 g/ml.

- ✓ Etanólico das folhas desidratadas de *M. pubiflora*.
- ✓ Etanólico das folhas verdes recém coletadas de *M. pubiflora*.
- ✓ Fase alcaloídica das folhas verdes recém coletadas de *M. pubiflora*.
- ✓ Etanólico das folhas desidratadas de *R. graciliflora*.
- ✓ Fase Hexânica das folhas desidratadas de *R. graciliflora*.
- ✓ Fase hidrometanólica das folhas desidratadas de *R. graciliflora*.

III. Procedimento de inoculação

Antes da inoculação, os animais foram submetidos à restrição alimentar por 12 horas, para reduzir o conteúdo gastrintestinal. Em seguida os animais foram pesados e sorteados para distribuição dos tratamentos, ou seja, um grupo controle (testemunha) e outros grupos testes, sendo cada grupo constituído por cinco coelhos. Cada animal submetido ao tratamento com extratos e fases recebeu uma dose única correspondente a 0,5% do seu peso.

Os animais durante a inoculação foram mantidos na posição de deslocamento natural da espécie, para evitar a falsa via (pulmonar). Nesse procedimento para cada animal foi utilizado uma seringa de 5 ml, acoplada à uma borracha de garrote de 10cm de comprimento, a qual foi mantida na lateral da mandíbula, para facilitar a inoculação seguido de massagem externa esofagiana para facilitar a ingestão. Após a aplicação os animais foram depositados em gaiolas individuais com fornecimento de água e ração.

O comportamento dos animais foi observado a cada 2 horas, para detectar sintomas de intoxicação.

4.4.2 Atividade inseticida

Segundo HEBLING [1994] a toxidez das plantas pode ser útil no controle biológico de pragas, e com a conseqüente redução do uso de inseticida pode contribuir na preservação do meio ambiente. Diante desta afirmação alguns extratos foram selecionados para averiguar a atividade inseticida.

I. Aspectos gerais

Neste ensaio foi utilizada a metodologia de acordo com de Roel & Vendramim [1999].

Condições de laboratório (temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR de 70% e fotofase de 14 horas).

- Lagartas de *Spodoptera frugiperda* recém-eclodidas, provenientes de criação em folhas de milho.

- Extrato etanólico de *M. pubiflora* e fase hidrometanólica de *R. graciliflora* numa proporção de 1:1(m/m).
- Soluções aquosas a 1% (1 grama dos extratos reunidos/100 ml de água destiladas).

II. Procedimento

Para realização do bioensaio, foram utilizadas folhas enxaguadas para retirada de partículas mais grosseiras e colocadas em um recipiente com água para hidratação. Em seguida, as folhas foram cortadas em pedaços de 28cm² (4X7cm aproximadamente) e distribuídas sobre papel toalha para evaporação da água superficial. As folhas secas foram imersas na solução do extrato por aproximadamente dois segundos, sendo a seguir mantidas em condição ambiente para evaporação do excesso de líquido [TORRECILLAS e VENDRAMIM, 2001; BOGORNİ e VENDRAMIM, 2005].

As folhas de milho tratadas com extrato etanólico de *M. pubiflora* e fase hidrometanólica de *R. graciliflora* e as testemunha (tratada com água) foram colocadas em tubo de vidro de 2,5 cm de diâmetro e 8,5cm de altura, onde foi acondicionada uma lagarta por tubo. As folhas foram substituídas diariamente por novas folhas tratadas [TORRECILLAS e VENDRAMIM, 2001; BOGORNİ e VENDRAMIM, 2005].

Os parâmetros avaliados foram [TORRECILLAS e VENDRAMIM, 2001]:

1. Peso de lagarta ao 10º dia de idade;
2. Duração e mortalidade diária da fase larval;
3. Duração e mortalidade da fase pupal;
4. Peso de pupa da forma.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos, envolvendo os extratos das espécies vegetais e testemunha, e cinco repetições, sendo cada uma composta por 15 lagartas totalizando 75 lagartas por tratamento. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05).

III. Teste de preferência alimentar

Neste teste, pedaços de folhas de milho (2,0cm X 1,0cm), com 30 dias de idade, foram tratados com os extratos dos vegetais em estudo e colocados de maneira sobreposta

em dois quadrantes de uma placa de Petri (8cm de diâmetro e 2cm de altura), e dois outros pedaços de folhas tratados com água foram acondicionados em dois outros quadrantes, sobre papel de filtro umedecido com água destilada. Imediatamente após, dez lagartas recém-eclodidas foram liberadas no centro das placas, estabelecendo-se dez repetições por tratamento. Foram registrados os números de lagartas sobre as folhas tratadas e as testemunha após 8 e 24 horas da liberação [BOTTON, 1998]. Os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.4.3 Teste de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS)

O teste de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS) é considerado um ensaio preliminar por apresentar correlações com atividade antitumoral e inseticida, principalmente [McLAUGHLIN, 1991; MICHAEL, 1986]. Caracteriza-se por ser de baixo custo e de considerável sensibilidade. Este teste foi realizado com extratos obtidos dos ramos e folhas de *M. pubiflora* e das folhas de *R. graciliflora*.

I. Reagentes necessários

- Solução salina (3,8 g/L, NaCl);
- Ovos de *Artemia salina*.

II. Procedimento

Preparou-se uma solução salina (3,8 g/L) e a ela se adicionou ovos de *A. salina*. Após 48 horas os ovos eclodiram e as larvas eclodidas atingiram o estágio de náuplio. As amostras foram preparadas nas concentrações finais de 1000, 500, 250 e 125 µg/ml (5 ml), todas em triplicata. A cada amostra foi adicionado 5 ml da solução salina contendo 10 microcrustáceos (*A. salina*). Após 24 horas registrou-se o número de sobreviventes. Os dados obtidos foram demonstrados por DL₅₀ (dose necessária para provocar a morte de 50% dos indivíduos submetidos à análise) por análise no programa Probitos.

III. Controles

Controle positivo: sulfato de quinidina 250, 125, 62,5e 31,25 µg/ml.

Controle negativo: solução salina com 0,2% de DMSO.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias isoladas tiveram suas estruturas determinadas principalmente por métodos espectroscópicos (RMN uni e bidimensionais) e algumas com o auxílio de métodos espectrométricos (espectrometria de massas).

5.1. Identificação das substâncias isoladas de *M. pubiflora*

5.1.1. Identificação da substância 1

A CCDA de frações do extrato etanólico da parte aérea de *Mascagnia pubiflora* mostraram a presença de um constituinte majoritário. Esta substância (**1**) foi purificada utilizando Sephadex LH-20 e HPLC. O espectro de RMN ^1H de **1** (Figura 26) apresentou um conjunto de sinais na região de hidrogênio aromáticos, na região de hidrogênio carbinólicos e, também na região de núcleos mais protegidos (outros espectros e ampliações estão inseridos no Anexo 1).

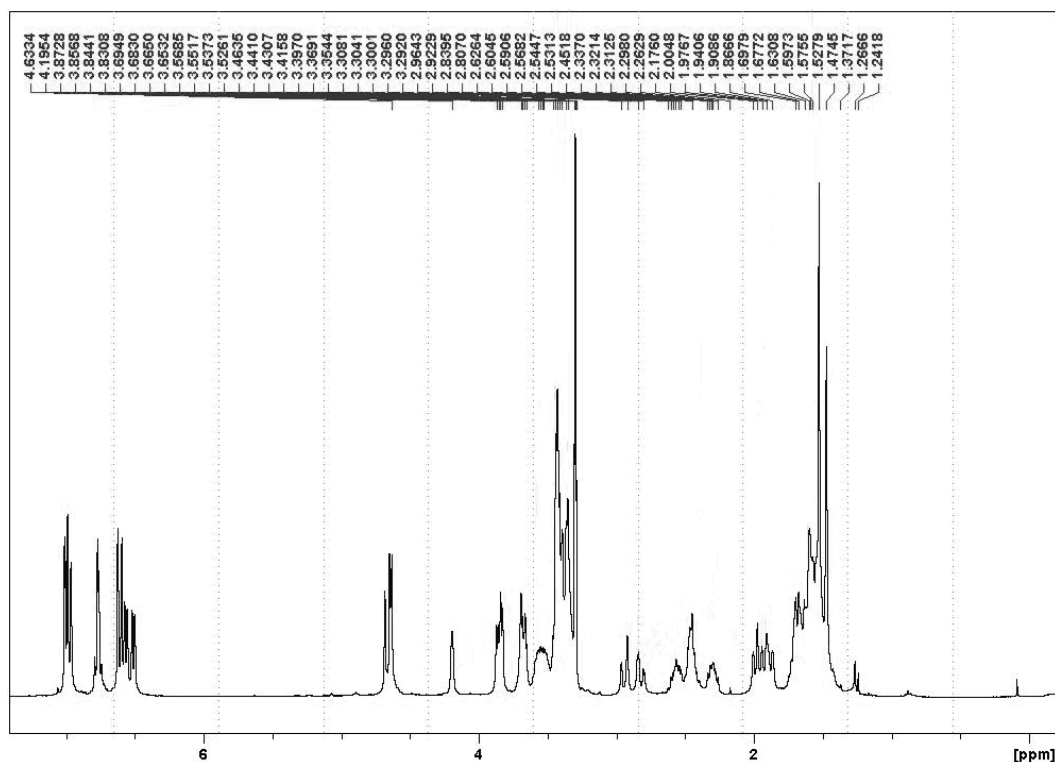


Figura 26 – Espectro de RMN ^1H de **1** (400 MHz, MeOD).

O espectro de massas (Figura 27) de **1**, obtido através de ionização por Eletrospray no modo negativo mostrou o pico molecular a 1113 uma, indicando uma estrutura grande para os padrões de um produto natural.

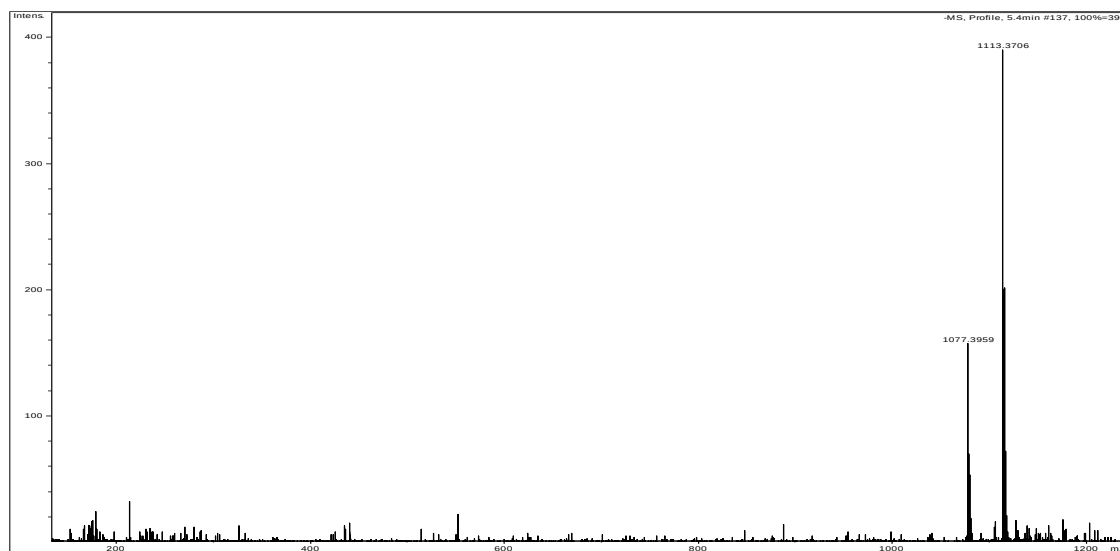


Figura 27 – Espectro de massas de **1** (ESY- modo negativo).

O espectro de RMN de ^{13}C de **1** (Figura 28) confirmou tratar-se de uma substância de estrutura complexa, podendo-se dividir o espectro em três regiões distintas: a região de carbonos aromáticos (ou sp^2), a região de carbonos carbinólicos e a região de núcleos mais protegidos, entre δ 37 e 23 (Anexo 1).

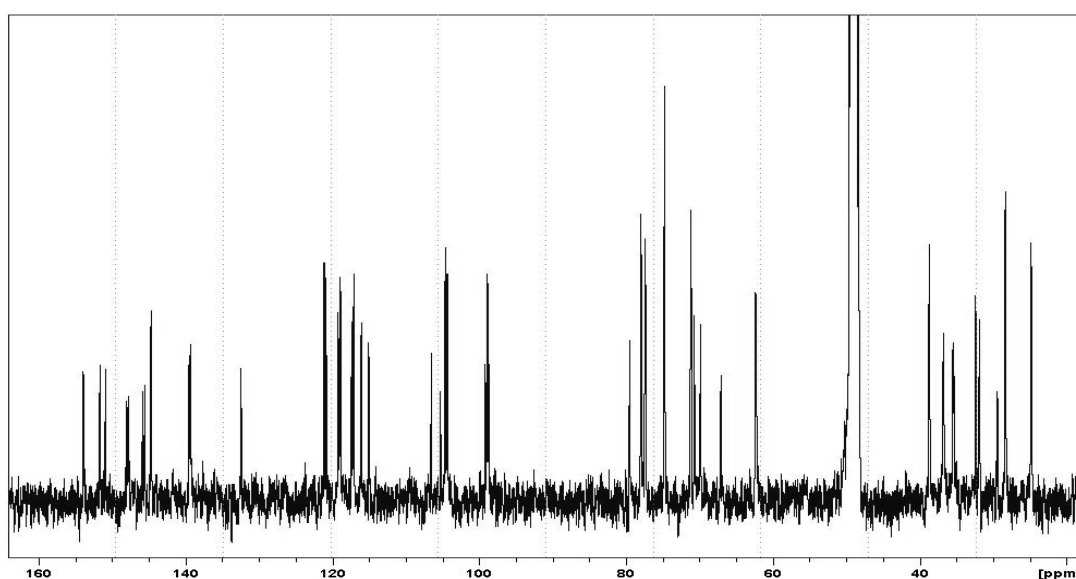


Figura 28 – Espectro de RMN ^{13}C de **1** (MeOD, 100 MHz).

Uma característica importante, observada no espectro de RMN de ^{13}C de **1** é que a maioria dos sinais se apresentou duplicada, sugerindo a presença de parcelas “simétricas” na estrutura. Entre δ 99,3 e 154,0 foram listados 28 sinais, os quais foram atribuídos a carbonos de quatro anéis aromáticos, a dois carbonos anoméricos e a outros dois carbonos acetálicos ou hemiacetálicos ou de ligação dupla. Relacionando-se estes dados com os do espectro de RMN ^1H (Tabela 8) pôde-se perceber claramente que dois dos anéis aromáticos apresentam um padrão de substituição 1, 2, 4 e que, provavelmente, estes fazem parte do setor “simétrico” da estrutura. Os valores de RMN de ^{13}C (aproximadamente em δ 144-148) sugeriram que estes anéis aromáticos possuem oxigênios vicinais como mostra a figura abaixo:

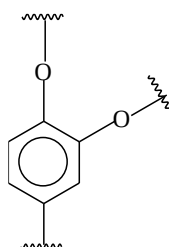


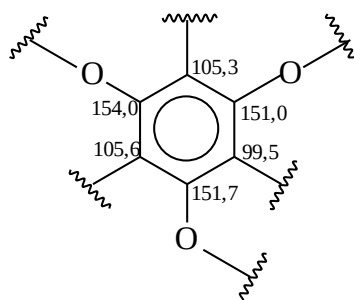
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz e HMBC (J Hz).

Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
2	79,9	4,68 sl	C1'; C2'; C6'; C3; C4
3	67,1	4,19 sl	C10
4	29,5	2,95 (dd, 16,7; 4,0) 2,82 (dl, 16,7)	C10; C5; C9 C3; C2; C10; C5; C9
5	151,7	-	
6	105,3	-	
7	154,0	-	
8	105,6	-	
9	150,9	-	
10	99,5	-	
1'	132,6	-	
2'	115,1	6,96 (d, 1,6)	C4'; C6'; C2
3'	145,9	-	
4'	145,8	-	
5'	116,4	6,78 (d, 8,2)	C3'; C1';
6'	119,3	6,75 (dd, 8,2; 1,6)	C4'; C2'; C2
1a	24,9	3,40 a 3,42 (1H sobreposto)	C2a; C5a; C6
2a	35,6	1,19 (dd, 12,4; 2,8) 1,69 (1H sobreposto)	C3a;
3a	98,9	-	
4a	28,5	1,47 (3H, s)	C3a; C2a; C1a
5a	36,8	1,88 (dl, 13,4) 1,60 (1H sobreposto)	C9a; C1a; C2a
6a	70,8	3,53 m	

Continuação da Tabela 8.			
7a	39,7	1,66 a 1,71 (1H sobreposto) 1,47 (1H sobreposto)	
8a	31,6	2,46 (2H m)	C10a; C14a; C7a; C9a;
9a	139,4	-	
10a	117,4	6,62 (d, 1,9)	C12a; C14a; C8a;
11a	148,0	-	
12a	145,9	-	
13a	119,0	7,00 (d, 8,3)	C11a; C9a
14a	121,1	6,57 (dd, 8,3; 1,9)	C10a; C12a; C8a
1b	24,9	3,42 m	C2b; C5b; C8
2b	35,6	1,92 (dd, 12,4; 208) 1,62 (1H sobreposto)	C3b
3b	98,8	-	
4b	28,5	1,52 (3H, s)	C3b; C2b
5b	36,8	1,53 (1H sobreposto) 1,64 (1H sobreposto)	C9b; C1b; C2b
6b	70,0	3,57 (1H, m)	
7b	39,7	1,66 a 1,71 (1H sobreposto)	
8b	32,2	2,30 (1H m) 2,57 (1H m)	C10b; C14b; C7b; C9b
9b	139,6	-	
10b	117,1	6,60 (1H, d, 1,9)	C12b; C14b; C8b
11b	147,8	-	
12b	144,7	-	
13b	118,9	6,99 (1H, d, 8,3)	C9b; C11b
14b	120,9	6,51(1H, dd, 8,3; 1,9)	C12b; C10b; C8b
1'	104,8/104,5	4,64/ 4,64 (d, 7,3 Hz)	
2'	74,8/74,8	3,43 m	
3'	78,1/78,0	3,33 a 3,39 m	
4'	71,3/71,2	3,35 a 3,42 m	
5'	77,5/77,4	3,43 m	
6'	62,5/62,3	3,85 m; 3,68 m	

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **1** indicaram que para os outros dois anéis aromáticos há nos espectros sinais de três CH. O padrão observado no espectro de RMN ^1H não permitiu definir inicialmente se tínhamos um anel tetrassubstituído e outro pentassubstituído ou se tínhamos um anel trissubstituído e outro totalmente substituído. Esta dúvida foi sanada obtendo-se um espectro de melhor qualidade e pela análise do experimento COSY ^1H - ^1H , (Anexo 1), os quais mostraram que um dos anéis é trissubstituído e, em consequência, o quarto anel é totalmente substituído. No espectro de RMN de ^1H de **1** (Figura 26) foi importante definir que o sinal que aparecia como singlete largo proporcional a dois hidrogênios a δ 6,76 trata-se de um dubleto de J 8,2 Hz e de um duplo dubleto de J 8,2 e 1,6 Hz, portanto vicinais na estrutura e um deles acoplando com um terceiro hidrogênio em posição *meta* (Anexo 1).

Uma vez definida que a molécula possui três anéis aromáticos trissubstituído 1, 2, 4 e um anel totalmente substituído, pôde-se atribuir os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , com auxílio dos experimentos de RMN 2D, particularmente de HMQC (ou HSQC) e HMBC (Anexo 1) conforme dados listados na Tabela 8. Os valores de RMN de ^{13}C do anel totalmente substituído mostraram que há três oxigênios ligados na posição 1, 3, 5, sugerindo uma origem polietídica, enquanto os outros três anéis aromáticos têm um padrão típico de serem originários de uma via do ácido chiquímico.



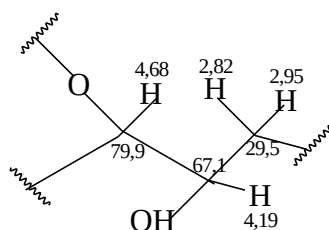
Dos 28 sinais observados do espectro de RMN de ^{13}C de **1** (Figura 28), entre δ 99,3 e 154,0, 24 são atribuídos a carbonos de anéis aromáticos, dois a carbonos anoméricos e os dois restantes (δ 98,9 / 98,8) são atribuídos a carbonos acetálicos ou hemi-acetálicos, provavelmente localizados na parte “simétrica” da estrutura.

A análise da região relativa a carbonos carbinólicos do espectro de RMN de ^{13}C (Anexo 1) permitiu visualizar claramente a presença de duas unidades de β -D-glicose na estrutura de **1**, restando ainda quatro sinais de CH: dois aparentemente em posição “simétricas” (δ 70,8/70,0) e os outros a δ 79,9 e 67,1.

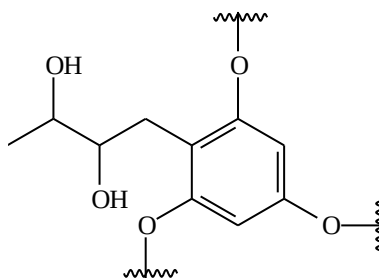
O setor do espectro de RMN de ^{13}C relativo a núcleos mais protegidos (Anexo 1) também mostrou vários sinais duplicados, evidenciando que os carbonos correspondentes encontram-se na parte “simétrica” da estrutura. Estes sinais são: δ 39,7 / 39,7; 36,8/36,8; 35,6/35,6 - (CH_2); 24,9/24,9 - (CH) e 28,5/28,5 - (CH_3). Portanto, considerando os dados mencionados anteriormente, cada unidade “simétrica” da estrutura de **1** possui: um anel aromático trissubstituído, um carbono acetálico, três CH_2 , um CH e um CH_3 .

Os valores de RMN de ^1H e ^{13}C de **1** estão listados na Tabela 8 e a atribuição dos mesmos foi realizada através da análise de dados obtidos nos experimentos HSQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H (Anexo 1). A análise detalhada dos experimentos bidimensionais permitiu listar as correlações mostradas na Tabela 8.

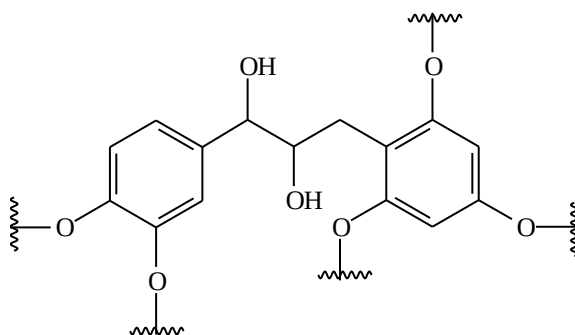
Com base nestes dados pôde-se observar o sistema mostrado abaixo:



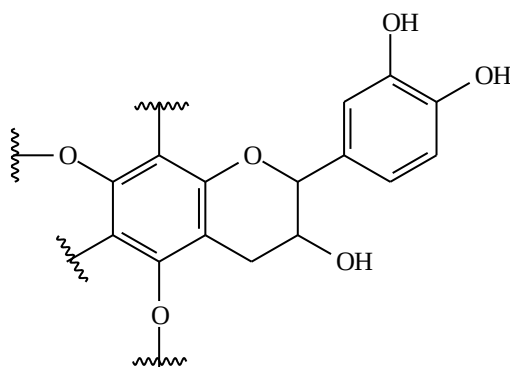
Da mesma maneira, observa-se que os hidrogênios metilênicos da estrutura parcial acima se correlacionaram no experimento HMBC com os carbonos do anel aromático de origem policetídica citado anteriormente, levando ao sistema abaixo:



Por outro lado, o experimento HMBC mostrou correlação do hidrogênio carbinólico referente ao sinal a δ 4,68 (ligado ao carbono correspondente ao sinal a δ 79,9) com os carbonos do anel aromático da parte não “simétrica” da estrutura, permitindo deduzir a estrutura parcial abaixo:

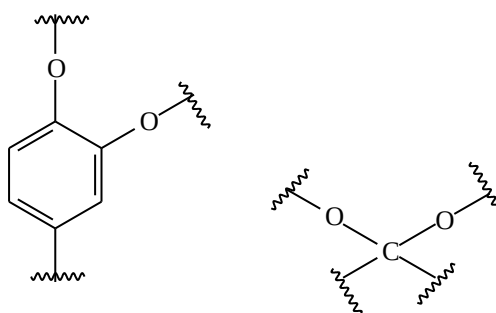


Esta estrutura parcial claramente lembra um sistema $C_6C_3C_6$, típico de flavonóides, especificamente, no caso, de uma catequina.



Desta forma, pôde-se propor que a parte não “simétrica” da estrutura de **1** trata-se de uma catequina, onde o anel A é totalmente substituído.

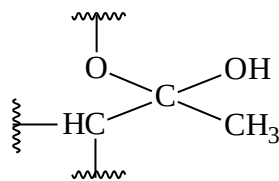
Conforme definido anteriormente, cada unidade “simétrica” de **1** é constituída de um anel aromático trissubstituído, dois carbonos acetálicos, um metino carbinólico, e na parte de núcleos mais protegidos, de três carbonos metilênicos, um carbono metínico e um metílico:



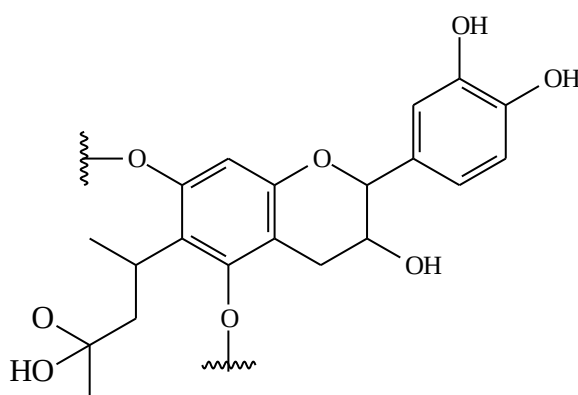
3CH_2 , 1CHOH , 1CH e 1CH_3 (unidades constituintes da parte simétrica de **1**).

No experimento HMBC observa-se que os hidrogênios da metila mencionada acima se correlacionam fortemente com o carbono acetálico, indicando a ligação destas unidades, e também com o carbono referente aos sinais a δ 35,6 (CH_2) e a δ 24,9 (CH), com intensidade decrescente.

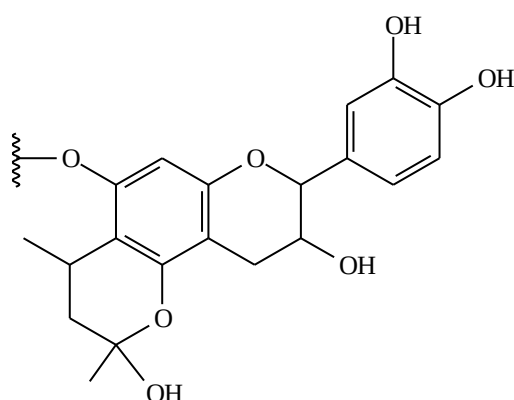
Estas observações levam ao sistema:



O sinal do hidrogênio metínico ligado ao carbono relativo ao sinal a δ 24,9 (RMN ^{13}C) encontra-se sobreposto por sinais de hidrogênio de açúcar no espectro de RMN de ^1H . Apesar disso, é possível perceber no experimento HMBC a correlação daquele hidrogênio com os carbonos do anel A da catequina (vide $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 1a na Tabela 8), permitindo assim definir parte da conexão destes grupos.

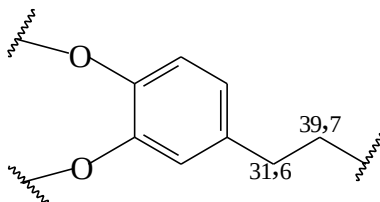


O grupo acetálico para se manter desta forma, requer a ligação de um dos oxigênios a carbono e observando-se a estrutura acima se pôde propor o arranjo mostrado abaixo:



Abordando o outro lado da parte da “simétrica” da molécula, observou-se no experimento HMBC correlações intensas entre os hidrogênios ligados ao carbono correspondente ao sinal a δ 31,6 (vide $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 8a na Tabela 8) com carbonos do anel

aromático trissubstituído e também com o carbono a δ 39,7. Estas observações levaram à estrutura parcial abaixo:

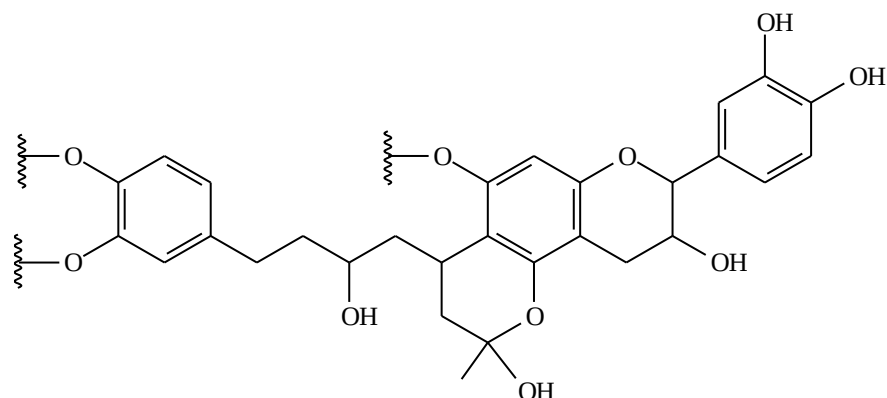


O sinal a δ 3,53 no espectro de RMN de ^1H se refere ao hidrogênio metínico carbinólico (carbono a δ 70,8 no espectro de RMN de ^{13}C) e, infelizmente, não se conseguiu observar nenhuma correlação deste hidrogênio no experimento HMBC. Outro fator complicador foi o fato de que os hidrogênios ligados aos carbonos correspondentes aos sinais a δ 35,6, 36,8 e 39,7, observados no espectro de RMN de ^{13}C , mostraram-se parcialmente superpostos (vide $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 2a, 5a e 7a na Tabela 8). A observação detalhada desta região do espectro de RMN de ^1H (δ 1,90 a 1,48) evidenciou que os sinais correspondentes a um dos hidrogênios ligados ao carbono referente ao sinal a δ 36,8 (δ 1,88 – H 5a) e a um dos hidrogênios ligados ao carbono referente ao sinal a δ 35,6 (δ 1,99 – H 2a), observados no espectro de RMN de ^{13}C , encontram-se separados do envelope.

Conforme já mencionado, o sinal no espectro de RMN de ^1H referente ao hidrogênio metínico ligado ao carbono correspondente ao sinal a δ 24,9 (1a) encontra-se sobreposto por sinais de hidrogênios de açúcar. Porém, pôde-se constatar através do experimento COSY ^1H - ^1H que o referido hidrogênio acopla com os hidrogênios referentes aos sinais supramencionados, a δ 1,88 (H 5a) e δ 1,99 (H 2a). Esta observação permitiu definir que o carbono metilênico referente ao sinal a δ 36,8 (RMN ^{13}C) encontra-se ligado ao carbono relativo ao sinal a δ 24,9 (RMN de ^{13}C).

Neste ponto, dentre os fragmentos mencionados como constituintes da parte “simétrica” da estrutura apenas a posição do carbono carbinólico não foi definida. Naturalmente, a proposta lógica é a de que se encontra ligado aos dois fragmentos definidos acima. Esta proposta é corroborada pela observação através do experimento COSY ^1H - ^1H da correlação do referido hidrogênio carbinólico (6a) com um dos hidrogênios que originam um sinal δ 1,47, presente no envelope mencionado; pela atribuição efetuada através do experimento HSQC, este hidrogênio encontra-se ligado ao carbono correspondente ao sinal a δ 39,7 observado no espectro de RMN de ^{13}C .

Sendo assim, pôde-se propor a estrutura parcial abaixo:



Ainda na parte “simétrica” da estrutura resta a unidade glicosídica a ser considerada. A localização deste grupo foi definida através do experimento HMBC, onde se observa a correlação do hidrogênio anomérico com o carbono referente ao sinal a δ 144,8, o qual corresponde ao carbono na posição 4 do anel aromático.

A fórmula molecular da estrutura proposta para a substância **1** é $C_{55}H_{70}O_{24}$, correspondendo ao peso molecular de 1114 uma. O espectro de massas da substância **1** (Figura 27), obtido através de ionização por Eletrospray no modo negativo, mostrou o pico molecular a 1113 uma, que corresponde ao $M^+ - 1$. Desta forma, os dados de RMN 1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, e o espectro de massas corroboram a estrutura proposta para a substância **1**.

A parte flavanoídica da estrutura de **1** corresponde à da epicatequina (relação *cis* entre o anel B e a hidroxila ligada a C3), em vista das constantes de acoplamento entre os hidrogênios ligados a C2 e C3, as quais não mostram acoplamento *trans* diaxial. Por outro lado, através do experimento NOESY (Anexo 1) foi possível observar correlação entre as metilas 4a/4b e H1a/1b, mostrando a relação *cis* entre estes grupos. A relação estereoquímica entre a parte flavanoídica (C2 e C3) e a parte não flavanoídica, bem como a configuração de C6a e C6b, permanecem ainda indefinidas.

Desta forma, considerando-se estas informações e a existência de uma outra unidade “simétrica” pôde-se propor para a substância **1** a estrutura mostrada na figura 29.

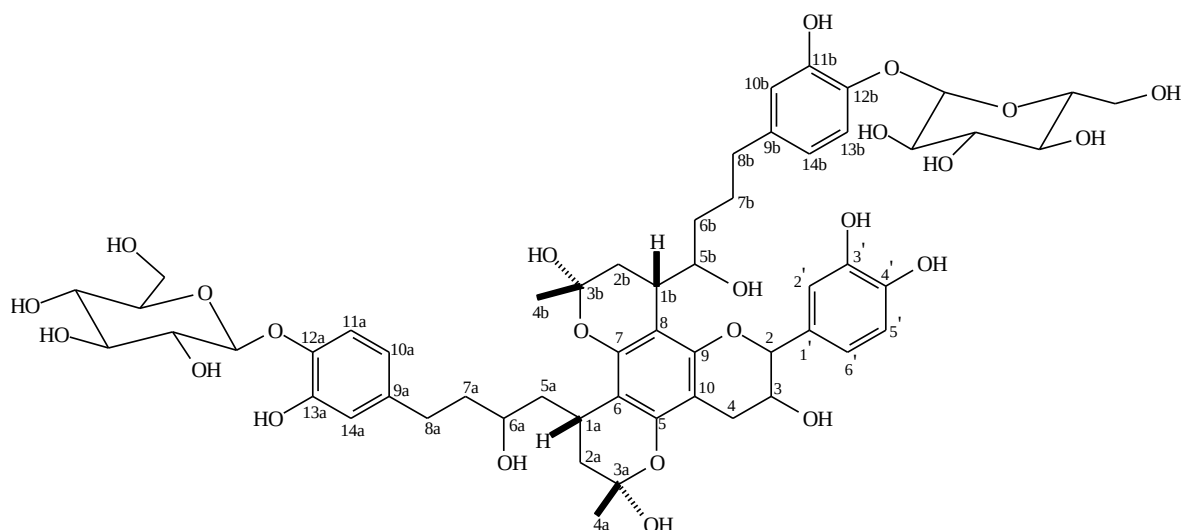


Figura 29 – Estrutura proposta para o composto **1**.

A substância **1** é inédita na literatura, havendo relato em [28ª Reunião Anual da SBQ] de uma substância com estrutura semelhante obtida de *Banisteriopsis variabilis* Malpighiaceae.

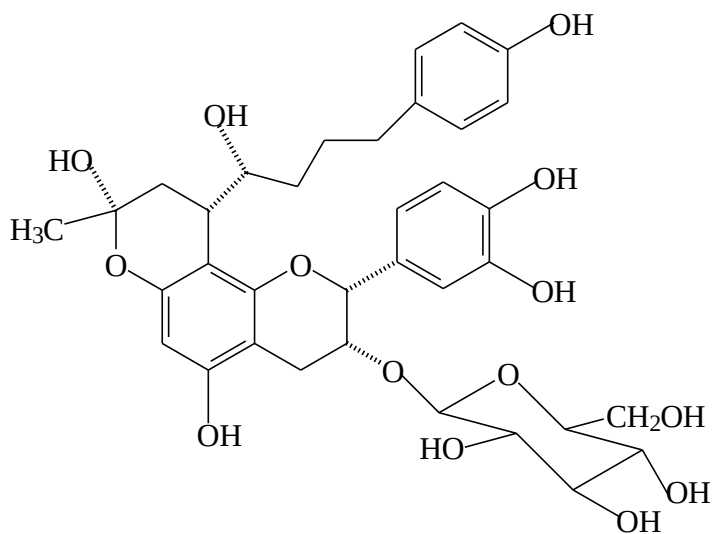


Figura 30 – Substância obtida de *Banisteriopsis variabilis* Malpighiaceae.

5.1.2. Identificação da substância **2**

A substância **2** é um constituinte minoritário obtido após processos cromatográficos usando Sephadex LH-20 e HPLC. Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 31) e RMN de ^{13}C

(Figura 32) evidenciaram de imediato uma estrutura muito semelhante a de **1**, destacando-se nestes os sinais de um anel aromático para substituído. A análise detalhada do espectro de RMN de ^1H de **2** na parte relativa aos sinais de hidrogênio aromáticos (Anexo 2) permitiu constatar a presença de três anéis aromáticos na estrutura de **2**, sendo dois com um padrão de substituição 1, 2, 4 e o terceiro 1, 4 – dissustituído. O espectro de RMN ^{13}C de **2** mostrou grande semelhança com o do composto **1**, inclusive apresentando vários sinais duplicados, o que indica a presença de partes simétricas na estrutura (Anexo 2). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C foram listados (Tabela 9), e com base nos experimentos de RMN bidimensionais HSQC e HMBC (Anexo 2) foi possível fazer as atribuições mostradas na Tabela 9. Como se pode perceber, a comparação dos dados de RMN de ^{13}C de **2** com os de **1** apresentaram uma boa correlação, estando ausente apenas os sinais relativos aos carbonos do anel B de **2**. Em lugar destes aparecem os sinais típicos do anel aromático *para* substituído. Desta forma, foi possível propor que a substância **2** difere da estrutura da substância **1** apenas no anel B da unidade catequínica. Esta proposta está de acordo com o espectro de massas obtido através de ionização por “Elektrospray” – modo negativo (Figura 33), o qual mostra um pico molecular a m/z 1097,3313. Este valor corresponde ao peso molecular menos 1, confirmando a fórmula molecular $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_{23}$.

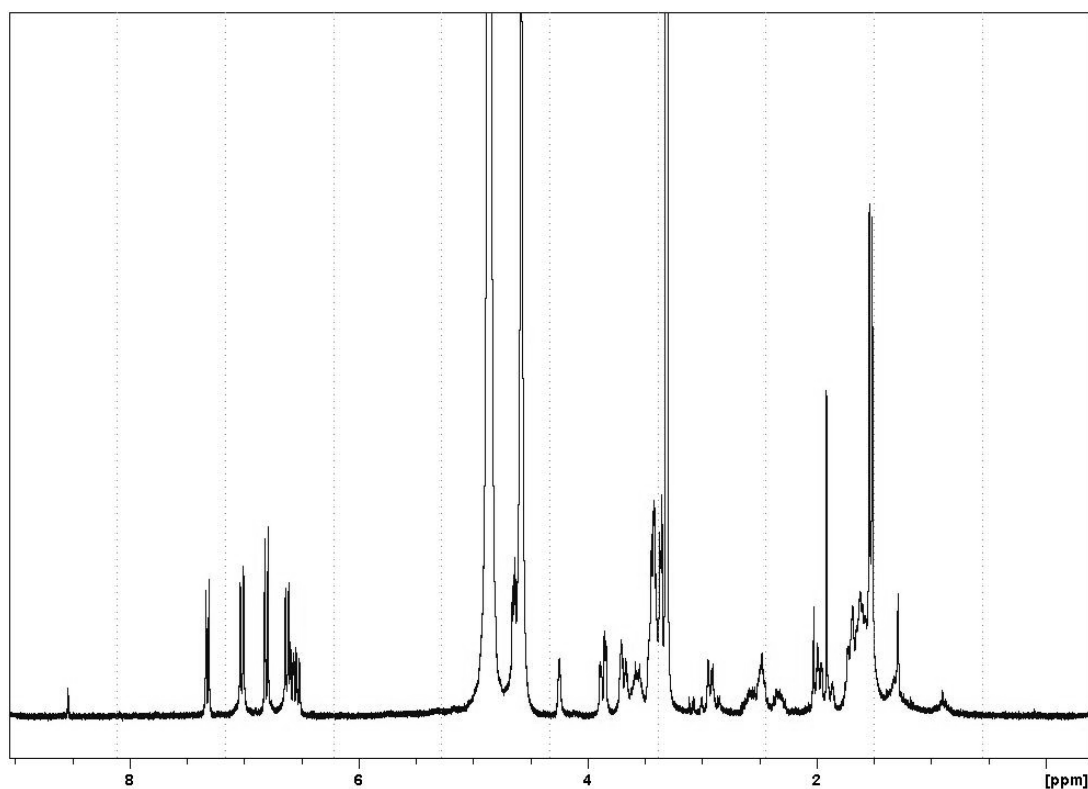


Figura 31 – Espectro de RMN de ^1H da substância 2 (400 MHz, MeOD).

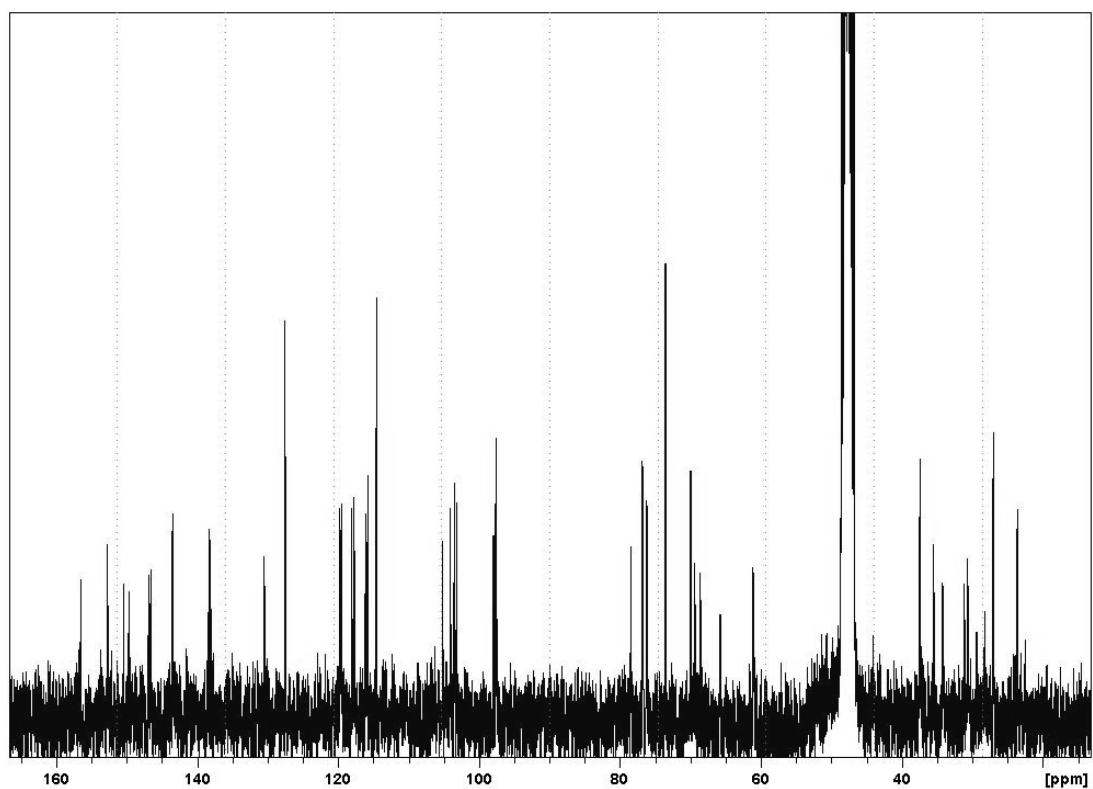


Figura 32 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 2 (100 MHz, MeOD).

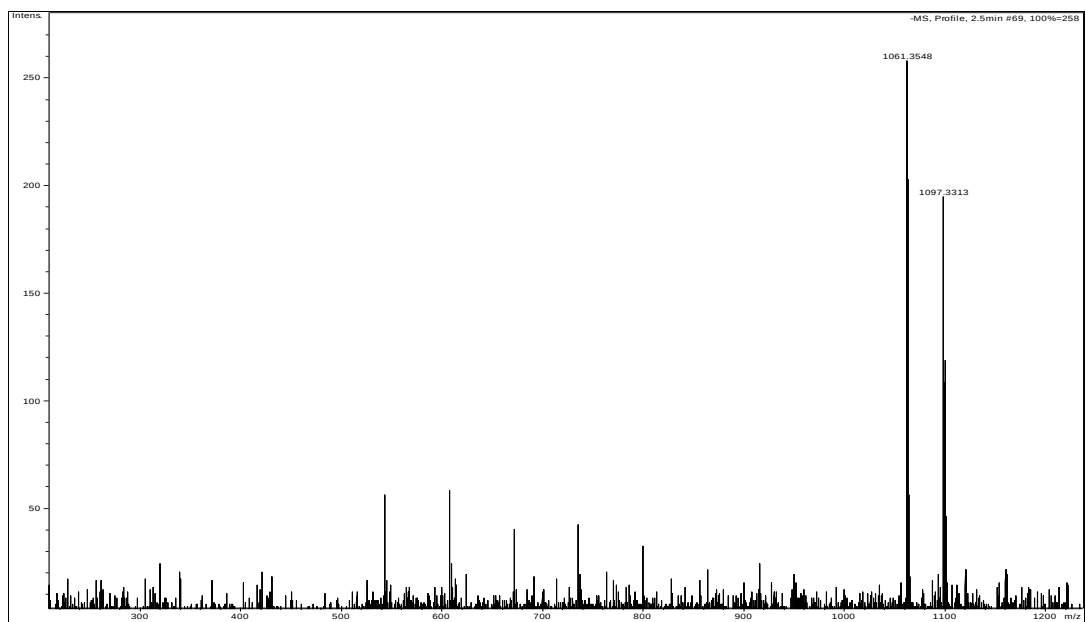


Figura 33 – Espectro de Massas da substância 2 (Eletrospray- modo negativo).

Nos espectros de RMN de **2** pôde-se confirmar a presença de duas unidades de O-β-D-glucose, os quais se encontram ligados aos carbonos numerados como 12a e 12b (correspondentes aos carbono “4” dos anéis aromáticos das unidades “simétricas”), conforme evidencia o espectro HMBC (Anexo 2).

Desta forma foi possível propor a estrutura da substância **2** como sendo a mostrada na Figura 34.

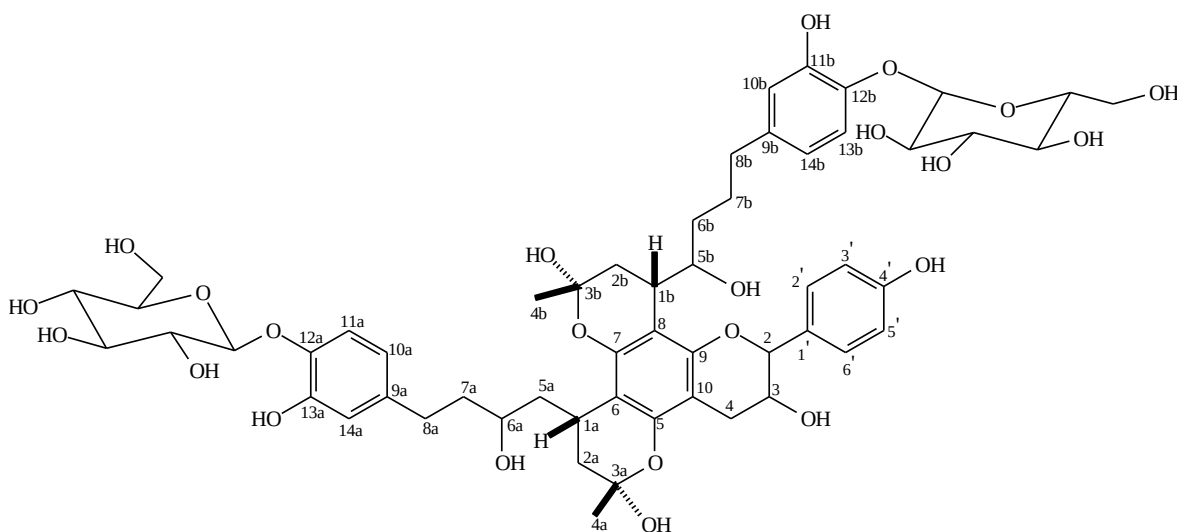


Figura 34 – Estrutura proposta para o composto **2**.

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz e HMBC (J Hz).

Nº	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
2	79,8	4,68 sl	C1'; C2';
3	67,2	4,25 (t, J 3,0)	
4	29,6	2,88 (dd, 17,0; 4,5) 2,96 (dd, 17,0; 2,8)	C10; C5; C9 C5; C9; C3; C10
5	151,8	-	
6	106,5	-	
7	154,1	-	
8	105,5	-	
9	151,1	-	
10	99,3	-	
1'	131,8	-	
2'	128,9	7,32 (d, 8,7 2H)	C4'; C6'; C2; C5
3'	115,9	6,80 (d, 8,7 2H)	C1'; C4'; C5'
4'	157,9	-	
5'	115,9	6,78 (d, 8,2)	C3'; C1';
6'	128,9	7,31 (d, 8,2)	C4'; C2'; C2
1a	25,0	3,43 (1H sobreposto)	C2a; C5a
2a	35,6	1,97 m; 1,70 (1H sobreposto)	C3a; C6
3a	98,8	-	
4a	28,4	1,54 (3H, s)	C3a; C2a;
5a	36,9	1,60 a 1,88 m	

Continuação da Tabela 9.			
6a	69,9	3,59 m	
7a	38,8	1,60 a 1,69 (1H sobreposto)	
8a	32,5	2,59 m/2,33m	
9a	139,7	-	
10a	117,4	6,64 (d, 2,0 1H)	C12a; C14a; C8a;
11a	148,3	-	
12a	144,9	-	
13a	119,5	7,00 (d, 8,2)	C12a; C11a; C9a
14a	121,1	6,58 (dd, 8,2; 2,0 1H)	C10a; C12a;
1b	24,9	3,43 m	
2b	35,6	1,97 m / 17,0 (1H sobreposto)	C3b; C10; C8;
3b	99,0	-	
4b	28,3	1,51 (3H, s)	C3b; C2b
5b	36,8	1,53 (1H sobreposto) 1,64 (1H sobreposto)	C9b; C1b; C2b
6b	70,7	3,55 m	
7b	39,7	1,66 a 1,71 (1H sobreposto)	
8b	32,0	2,41 (1H sobreposto)	
9b	139,5	-	
10b	117,2	6,61 (d 2,0 1H,)	C12b; C11b C14b; C8b
11b	148,0	-	
12b	144,8	-	
13b	119,1	7,01 (d, 8,2 1H)	C9b; C11b; C12b
14b	120,9	6,53 (dd, 8,2; 2,0 1H)	C12b; C10b;
1'''	104,9/104,6	4,65/ 4,64 (d, 7,5 Hz)	C12a; C12b
2'''	74,9/74,9	3,43 m	
3'''	78,1/78,2	3,35 a 3,35 m	
4'''	71,3/71,4	3,36 m	
5'''	77,5/77,6	3,42 m	
6'''	62,5	3,87 (dd, 11,8; 3,9) 3,87 (dd, 11,8; 4,5)	

5.1.3. Identificação da substância 3

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135 da substância **3** apresentaram sinais característicos para flavonóides glicosilados. O espectro de RMN de ^1H (Figuras 35a e 35b) exibiu sinais em δ 6,20 (d, $J = 1,8$) e 6,03 (d, $J = 1,8$) indicando um acoplamento *meta*. Neste espectro foi possível observar ainda na região para átomos de hidrogênio aromático os sinais em δ 7,51 (dd, $J = 1,8; 8,3$), 6,75 (d, $J = 8,3$) e 7,55 (d, $J = 1,8$), caracterizando um anel *trisubstituído*. A análise desses dados (Tabela 10) permitiu identificar a aglicona como o flavonol quercetina. O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda os sinais em δ 4,98 (d, $J = 7,3$) e 4,42 (s) característicos para hidrogênio anomérico. A constante de acoplamento observada para o hidrogênio em δ 4,98 indica que a hidroxila no C-1 deste açúcar está na posição β , enquanto que o outro apresenta esta hidroxila na

posição α . Neste espectro também foram observados um conjunto de sinais entre δ 3,00 a 3,80 típico para hidrogênio ligado a carbono carbinólico e um sinal em δ 1,04 (d, $J = 6,2$). Estes sinais comprovaram a presença de duas unidades de açúcares. Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 36) em δ 102,4 (CH), 75,7 (CH), 78,2 (CH), 71,4 (CH), 77,2 (CH) e 68,5 (CH_2) corroboraram com os valores de deslocamento químico para os átomos de carbono de uma unidade de β -D-glucose esterificada em C-6. A outra unidade de açúcar foi identificada como a α -L-rhamnose. A presença deste açúcar foi evidenciado principalmente pelo sinal no espectro de RMN de ^1H em δ 1,04 (d, $J = 6,2$) e pelo sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ 17,9, característicos para a metila do C-6 e por comparação com a literatura. Assim, a estrutura em discussão é um flavonóide monodesmosídeo formado pelos açúcares α -L-rhamnose (1 $\rightarrow$ 6) β -D-glucose. Este açúcar poderia estar esterificado com o flavonol no C-3, C-7, C-3' ou C-4'. A posição do açúcar no C-3 foi evidenciada no espectro de experimento HMBC (Figura 37) pela correlação entre o H-1 da β -D-glucose (δ 4,98) com o C-3 (δ 135,5). Assim a substância **3** foi identificada como o flavonol quercetina-3-O-rutinosídeo (Figura 38).

Tabela 10 – Dados de RMN da substância **3** (MeOD, 300 MHz).

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	158,5 (C)	-
3	135,5 (C)	-
4	178,0 (C)	-
5	161,0 (C)	-
6	99,9 (CH)	6,20 (d, $J = 1,8$)
7	162,0 (C)	-
8	95,7 (CH)	6,03 (d, $J = 1,8$)
9	158,6 (C)	-
10	105,2 (C)	-
1'	123,5 (C)	-
2'	116,1 (CH)	7,55 (d, $J = 1,8$)
3'	145,8 (C)	-
4'	145,9 (C)	-
5'	117,5 (CH)	6,75 (d, $J=8,3$)
6'	124,7 (CH)	7,51 (dd, $J = 1,8; 8,3$)
1''	102,4 (CH)	4,98 (d, $J = 7,3$)
2''	75,7 (CH)	3,00-3,80 m
3''	78,2 (CH)	3,00-3,80 m
4''	71,4 (CH)	3,00-3,80 m
5''	77,2 (CH)	3,00-3,80 m
6''	68,6 (CH_2)	3,00-3,80 m
1'''	- (CH)	4,42 s
2'''	72,1 (CH)	3,00-3,80 m
3'''	72,2 (CH)	3,00-3,80 m
4'''	73,3 (CH)	3,00-3,80 m
5'''	69,7 (CH)	3,00-3,80 m
6''	17,9 (CH_3)	1,04 (d, $J=6,2$)

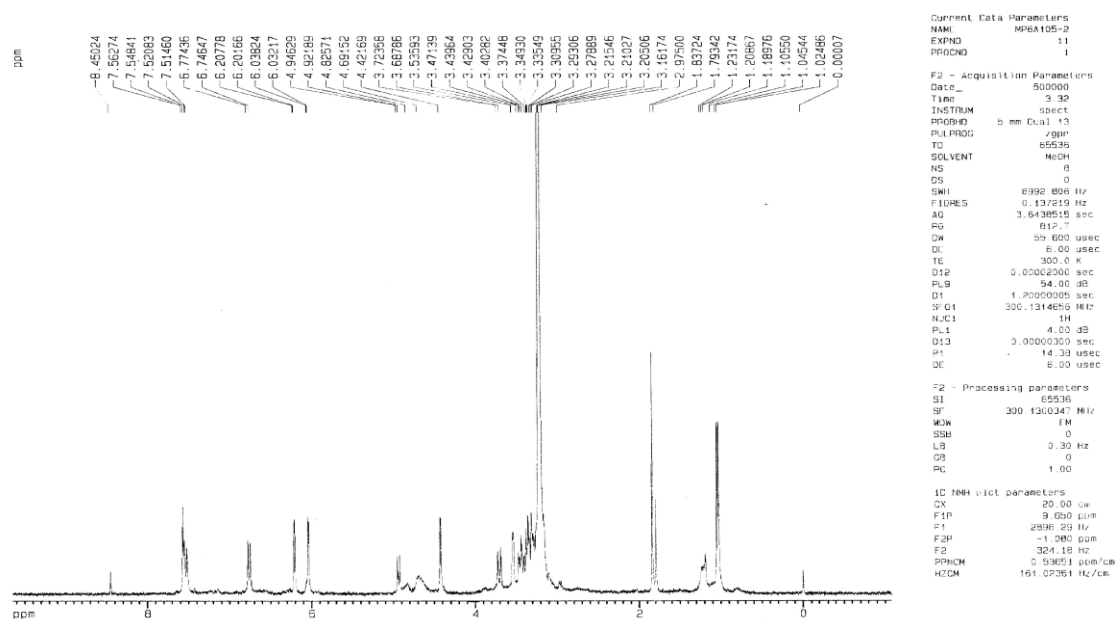


Figura 35a – Espectro de RMN de ^1H da substância **3** (MeOD, 300 MHz).

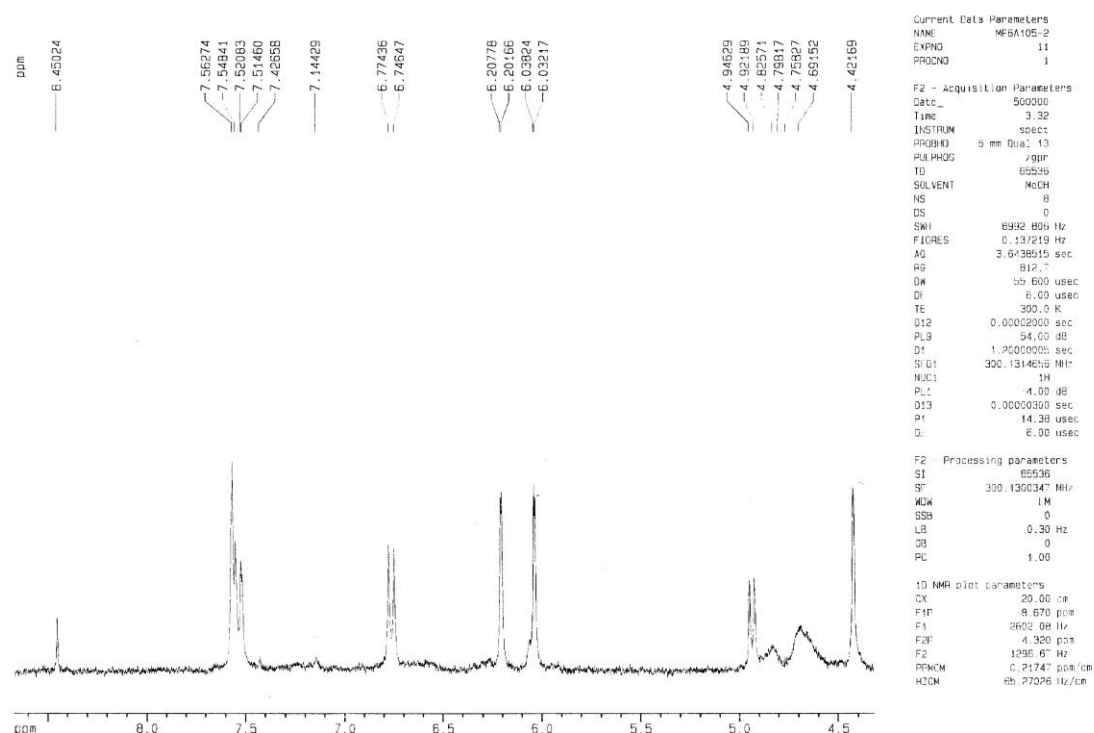


Figura 35b – Expansão de RMN de ^1H da substância **3** de 4,5-8 ppm (MeOD, 300 MHz).

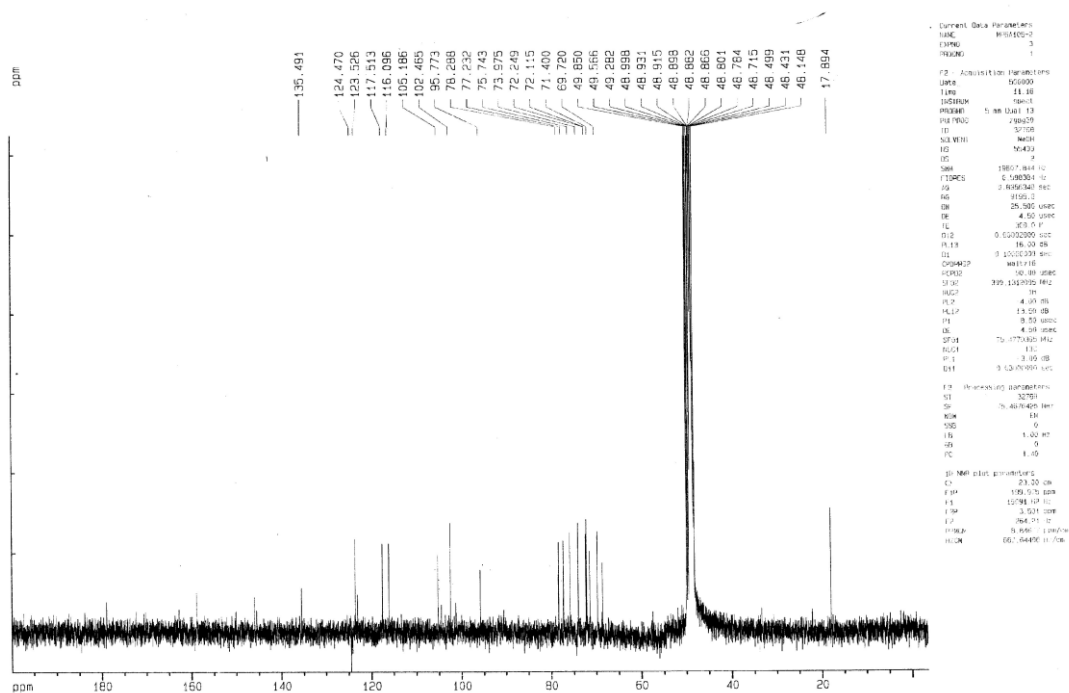


Figura 36 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 (MeOD, 75 MHz).

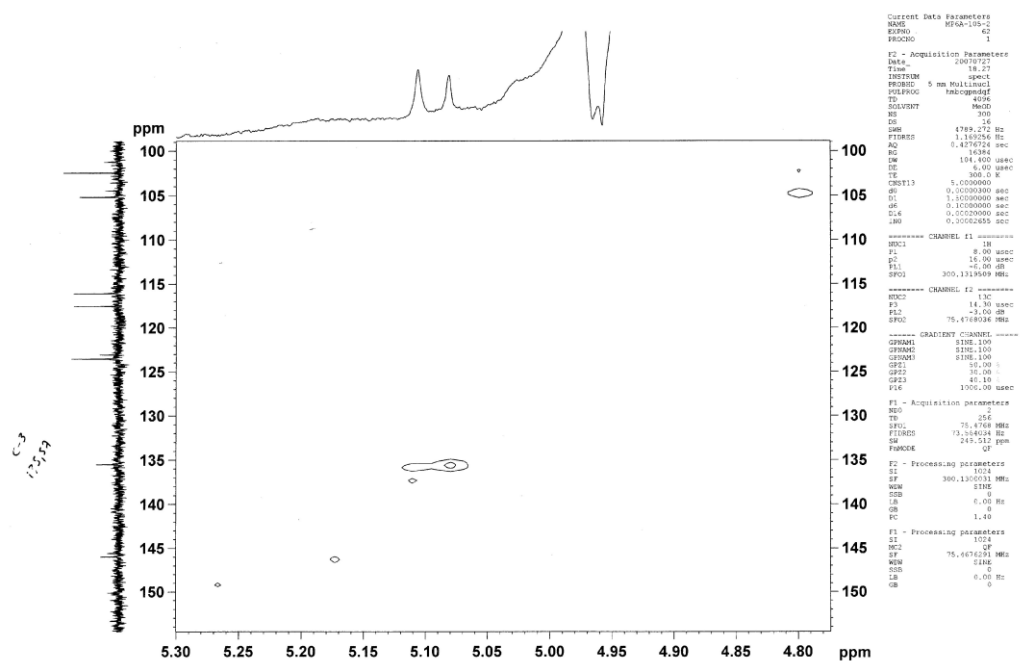


Figura 37 – Ampliação do espectro de experimento HMBC da substância 3.

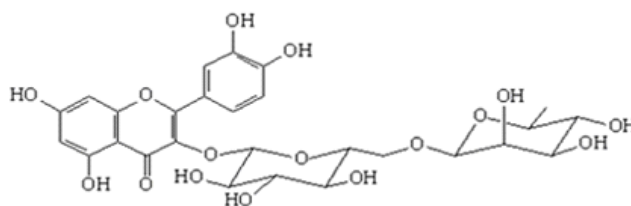


Figura 38 – Estrutura da Quercetina-3-O-rutinosídeo.

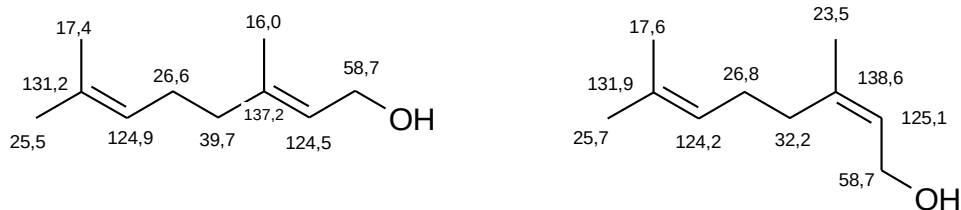
5.2. Identificação das substâncias isoladas de *R. graciliflora* (Fabaceae)

5.2.1. Identificação da substância 4

O espectro de RMN ^1H (Figura 39) e DEPT 135° (Figura 40) de **4** apresentou 3 singletos em δ 1,74, 1,67 e 1,59 sugestivos de grupos metílicos ligados a carbonos olefínicos e dois singletos largos em δ 2,03 e 5,11. Apresentou também um dubleto largo em δ 4,07 ($J = 7,1$ Hz) e um tripleto em δ 5,43 ($J = 7,1$ Hz) proporcionais a dois e um hidrogênio, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 41) de **4** apresentaram além de dois conjuntos de sinais relativos a carbonos olefínicos [um na região de δ 124,1 a 125,0 (CH) e outro na região δ 131,2 a 136,5 (C)], um sinal em δ 59,0 correspondente a um grupo metileno carbinólico (compatível com o sinal em δ 4,07 no espectro de RMN ^1H) e sinais referentes a grupos metila ligadas aos átomos de carbono olefínicos entre δ 16,0 e 25,7 e aos átomos de carbonos metilênicos entre δ 26,3 e 39,7. Essas informações sugeriram para o composto **4** uma estrutura isoprenóide acíclica.

Com relação à estereoquímica destas unidades isoprênicas, verificou-se que tanto ligações duplas trissubstituídas *Z* como *E* ocorriam na estrutura de **4**, uma vez que foram observados sinais para átomos de carbono metílicos na região de δ 23,3 e para átomos de carbono metilênicos alílicos vizinhos ao carbono metilado na região de δ 32,2 (indicativos de ligação dupla *Z*). Foram observados ainda os sinais para metilas na região de δ 16,0 e átomos de carbono metilênicos em torno de δ 39,7 (indicativos de ligação dupla *E*), conforme exemplificado pelos valores de deslocamento químico dos átomos de carbono nos monoterpenos abaixo [WEHRL, s/d].



Com base, principalmente, no número de sinais de carbonos olefínicos, como também na integração dos sinais no espectro de RMN ^1H de **4**, conclui-se que este composto possuía em sua estrutura vários resíduos isoprênicos contendo ligações duplas (Z) e (E) e um grupo hidroximetilênico terminal. Substâncias com esse tipo de esqueleto são denominadas poliprenóis, os quais podem ser obtidos de plantas superiores e também de animais e microrganismos [AOKI, 1997].

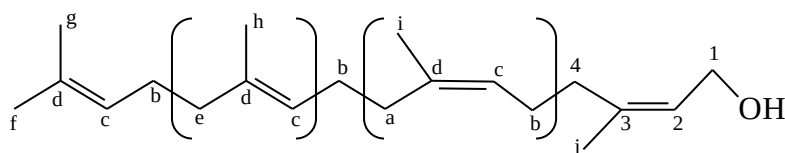


Figura 42 – Estrutura do Ficaprenol 12.

Poliprenóis de origem vegetal apresentam uma grande diversidade quanto ao tamanho da cadeia isoprenica. Em geral, poliprenóis encontrados em folhas de angiospermas possuem cadeias com 8 a 15 ou até mais unidades isoprênicas, sendo os mais comuns os que contêm resíduos de 10 a 12 destas unidades [AOKI, 1997].

No espectro de RMN de ^1H de **4** observa-se que há uma predominância de resíduos isoprênicos com geometria Z em relação aos de geometria E, conforme demonstrado pela integração dos sinais em δ 1,58 e 1,67 – 1,74, referentes às metilas dos resíduos isoprênicos internos E e Z, respectivamente. Esses sinais também representam as metilas do resíduo isoprênico terminal W com orientação cis e trans, respectivamente, em relação à cadeia principal e à metila do resíduo isoprênico terminal α .

As informações fornecidas pela integração desses e dos demais sinais presentes no espectro de RMN ^1H sugeriram a presença de 12 unidades isoprênicas na estrutura de **4**, compreendendo: sete resíduos isoprênicos Z três E, além de um resíduo terminal W e um terminal α (Z), contendo um grupo hidroximetilênico. Esta substância, que é classificado como Ficaprenol (Figura 42), foi obtida anteriormente de *Arachis hypogea*, observando-se

uma boa correlação dos valores de RMN ^{13}C das duas substâncias. [AOKI, 1997].

Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **4** (300 MHz, CDCl_3).

Posição	$\delta\ ^1\text{H}$	$\delta\ ^{13}\text{C}$	$\delta\ ^1\text{H}^*$	$\delta\ ^{13}\text{C}^*$
1	4,07 dl (J=7,1)	59,0(CH_2)	4,02	59,0
2	5,43 t (J=7,1)	125,0(CH)	5,41	126,0
3	-	139,9(C)0	-	138,4
4	2,03 sl	32,0(CH_2)	2,03	32,5
a	2,03 sl	32,2(CH_2)	2,11 – 2,18	32,4 – 32,6
b	2,03 sl	26,3 – 26,7(CH_2)	2,10 – 2,20	26,9 – 27,2
c	5,11 sl	124,1 – 125(CH)	5,16 – 5,31	124,7 – 125,6
D	-	131,2 – 136,1(C)	-	131,1 – 135,8
E	2,03 sl	39,7(CH_2)	2,10 – 2,12	40,2
F	1,67 s	25,7(CH_3)	1,68	25,9
G	1,59 s	17,7(CH_3)	1,57	17,8
H	1,59 s	16,0(CH_3)	1,61 -1,63	13,1
I	1,74 s	23,4(CH_3)	1,72 -1,75	23,6 – 23,7
J	1,66 s	23,3(CH_3)	1,65	23,5

* Dados literatura em CDCl_3 , 300 MHz [AOKI, 1997].

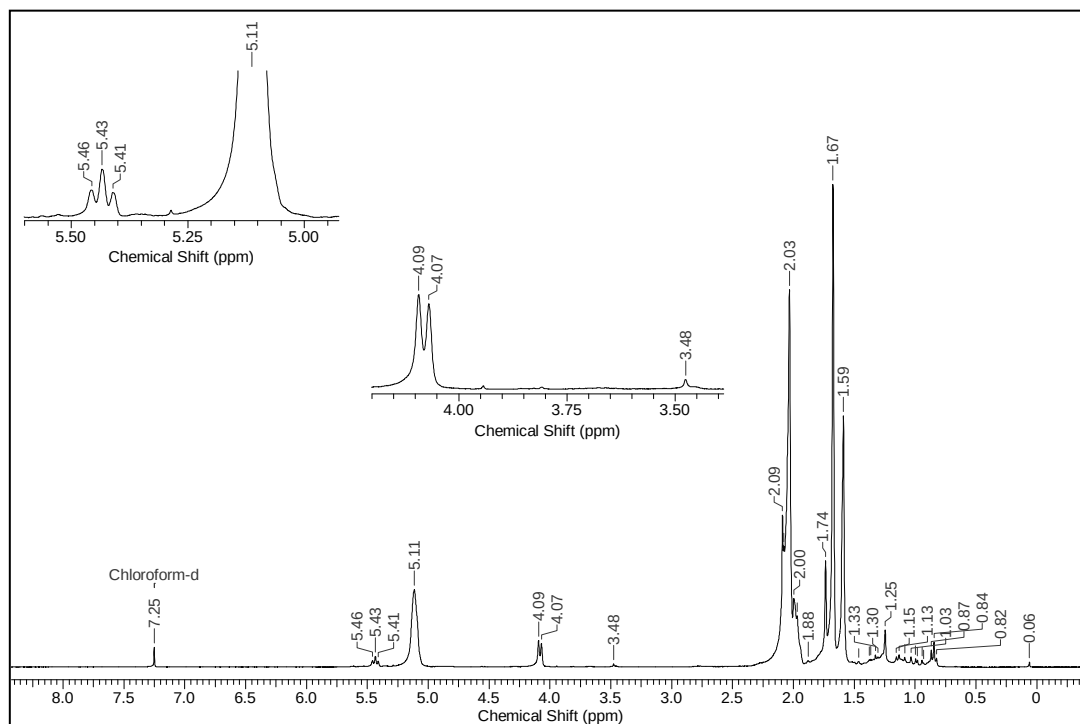


Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H da substância **4** (CDCl_3 300MHz).

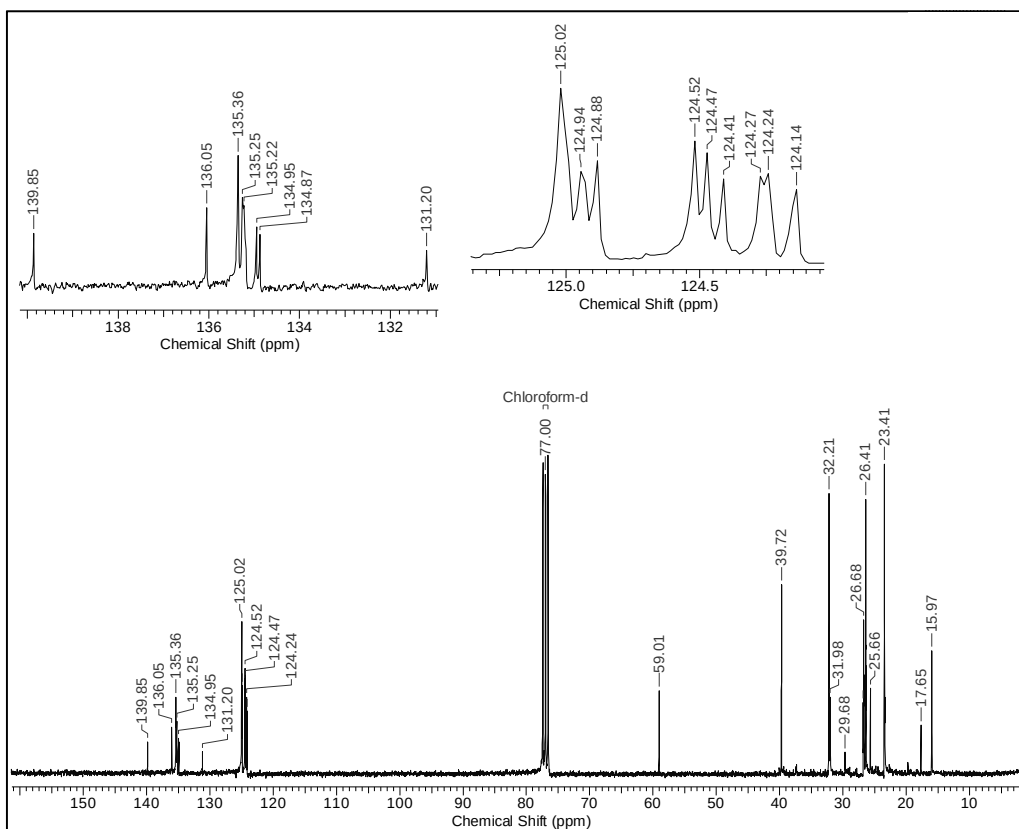


Figura 41 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **4** (CDCl_3 , 75 MHz).

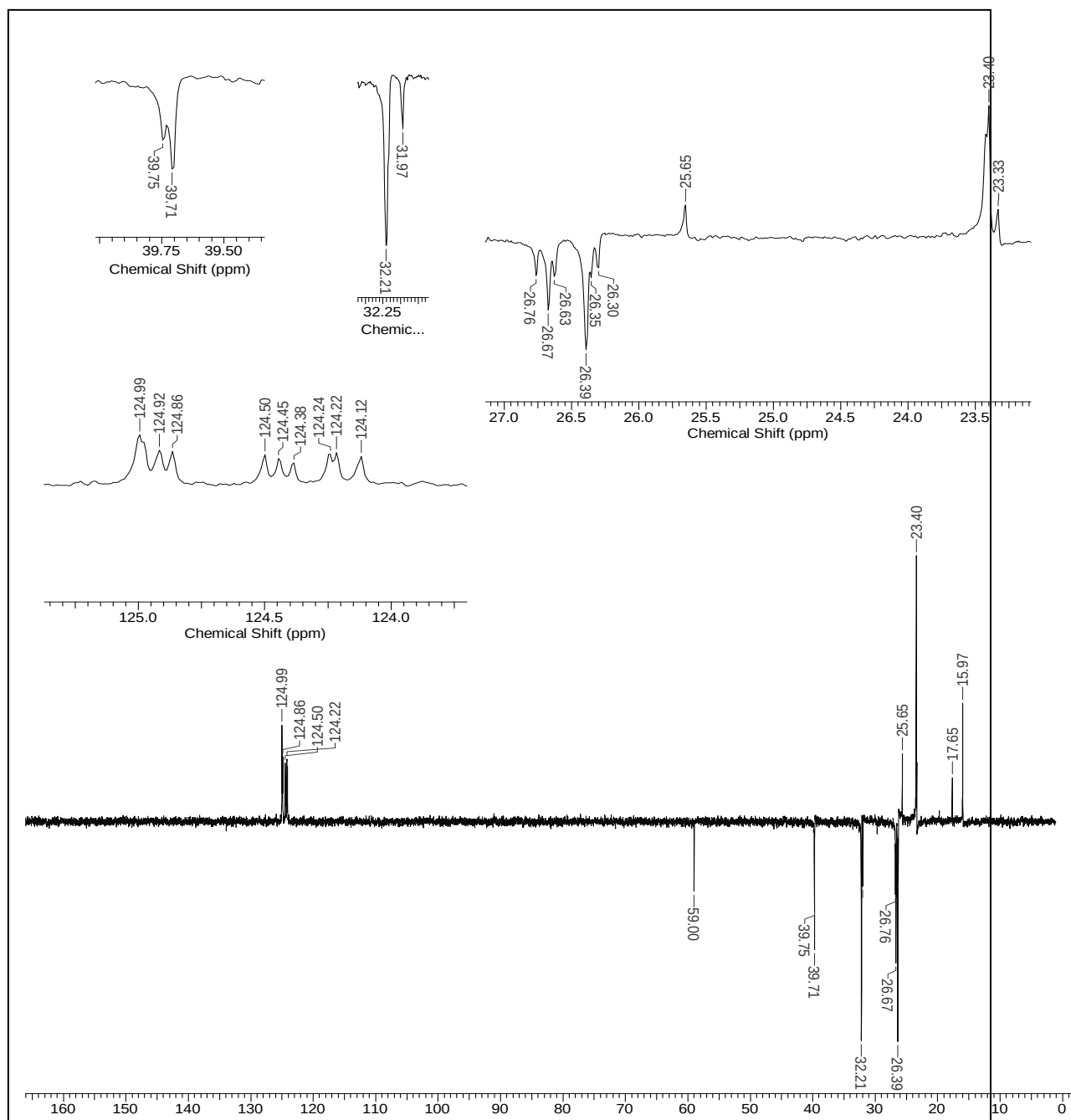


Figura 40 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância 4 (CDCl₃; 75MHz).

5.2.2. Identificação da substância 5

A substância 5 (11,7 mg) foi isolado das frações 26 e 27 da fase hexânica, proveniente do extrato etanólico das folhas de *R. graciliflora*, através de cromatografia em coluna de sílica (230-400 mesh).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 43) de **5** apresentou vinte sinais, listados na Tabela 12. Entre eles os relativos aos átomos de carbono oximetilênico, indicando a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$. Estes dados sugeriram tratar-se de um álcool diterpênico alicíclico e, portanto, levaram a pensar no fitol, um produto comum nos vegetais, particularmente nas folhas e que faz parte da estrutura da clorofila. Os dados de RMN ^1H (Figura 44), ^{13}C e DEPT 135° (Figura 45) são coincidentes com os dados do fitol. Assim a substância **5** foi identificada como fitol (Figura 46).

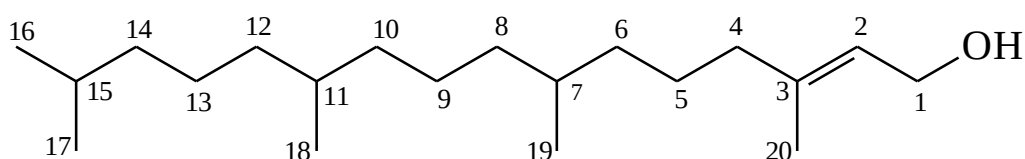


Figura 46 – Estrutura do Fitol.

Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **5** (300 MHz, CDCl_3).

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}^*$
1	59,4 (CH_2)	4,10	59,4
2	123,0 (CH)	5,43	123,1
3	140,3 (C)		140,3
4	39,9 (CH_2)	1,96	39,9
5	25,2 (CH_2)		25,1
6	36,8 (CH_2)		36,7
7	32,8 (CH)		32,8
8	37,4 (CH_2)		37,3
9	24,5 (CH_2)		24,5
10	37,4 (CH_2)		37,4
11	32,8 (CH)		32,7
12	39,4 (CH_2)		37,4
13	24,4 (CH_2)		24,8
14	39,4 (CH_2)		39,3
15	27,9 (CH)		28,0
16	22,7 (CH_3)		22,7
17	22,6 (CH_3)		22,6
18	19,7 (CH_3)		19,7
19	19,7 (CH_3)		19,7
20	16,2 (CH_3)	1,68	16,2

* Dados literatura em CDCl_3 , 300 MHz [CHAVES, 1996].

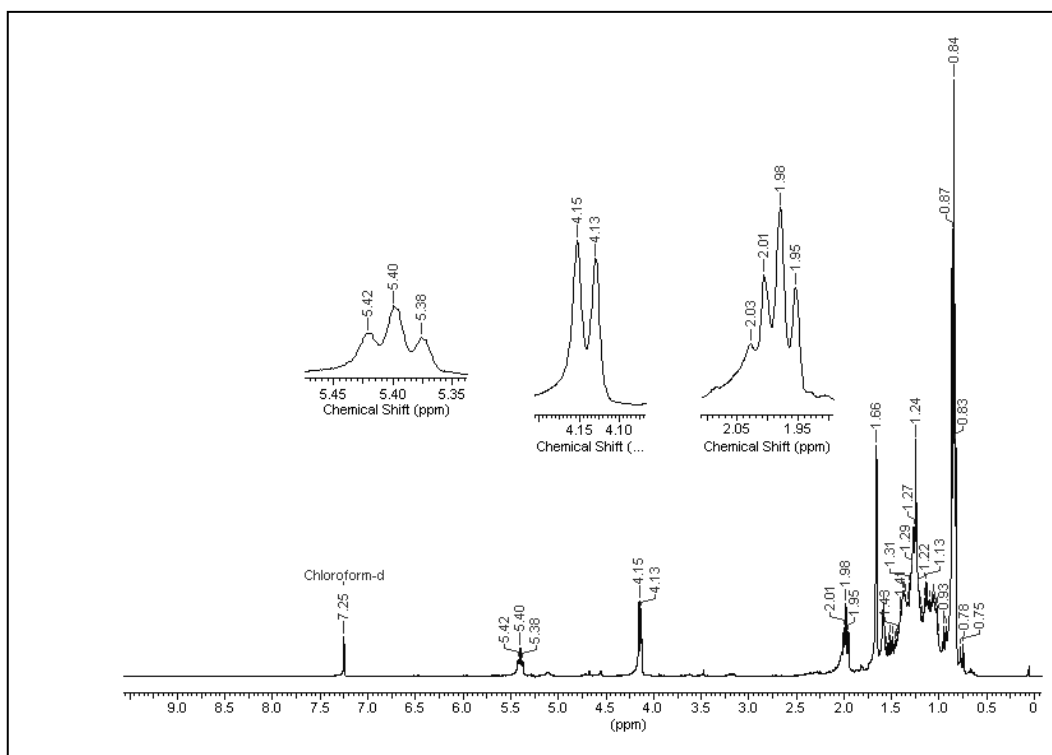


Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H da substância 5 (Fitol) (CDCl_3 ; 300MHz).

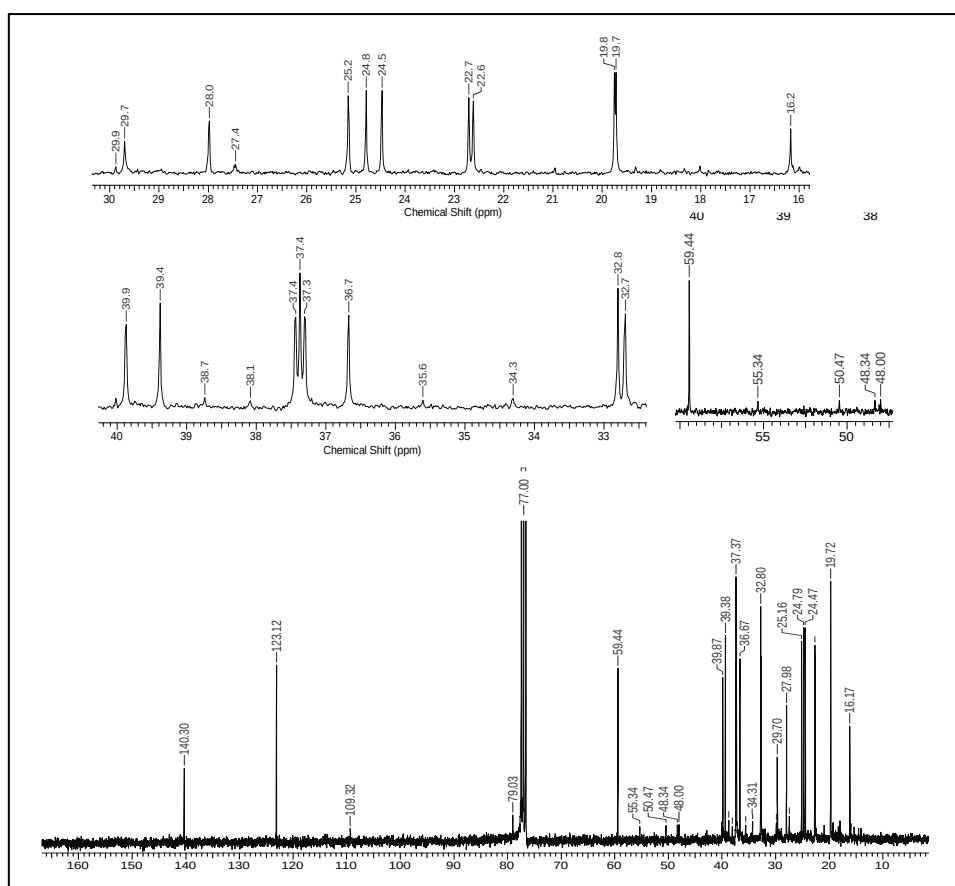


Figura 43 – Espectro de ^{13}C da substância Fitol. (CDCl_3 , 75MHz).

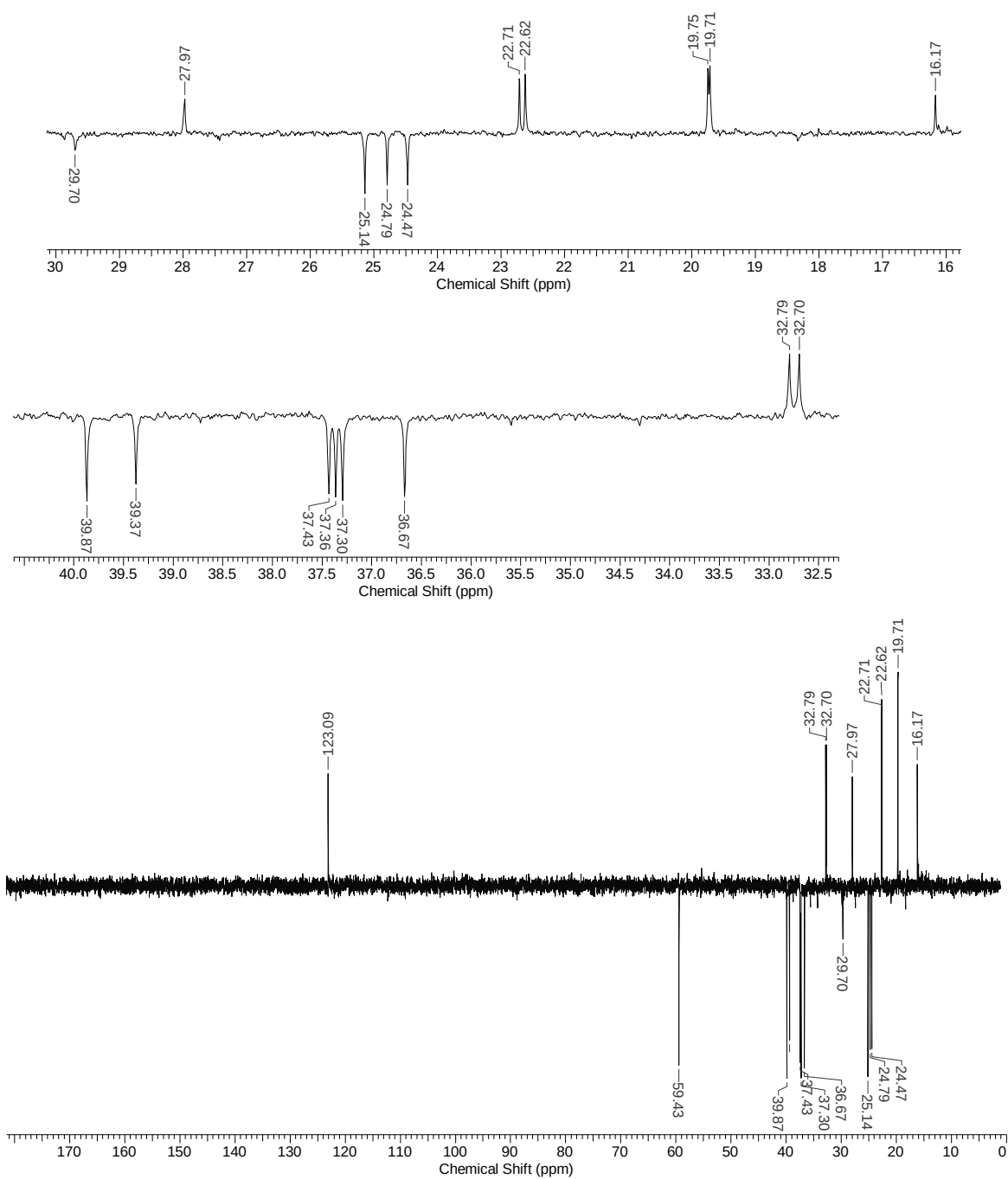


Figura 45 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância Fitol (CDCl₃, 75MHz).

5.2.3. Identificação da substância 6

A análise dos espectros de RMN de ¹H (Figura 47) e ¹³C (Figura 48) de **6**, listada na Tabela 13, indicou que esta substância pertencia à classe dos esteróides (Figura 49). No espectro de RMN de ¹³C os sinais em δ 12,2 (CH₃), 121,9 (CH) e 140,7 (C) indicaram que

esta substância poderia ser sitosterol. Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os da literatura e corroboraram para o esteróide β -sitosterol (Figura 49).

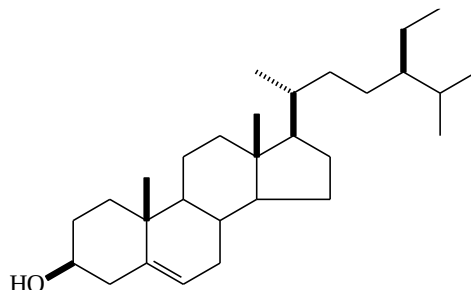


Figura 49 – β -sitosterol.

Tabela 13 – Dados de RMN ^{13}C da substância **6** (300 MHz, CDCl_3).

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ substância X	$\delta^{13}\text{C}$ Literatura
1	37,1 (CH_2)	37,1
2	31,7 (CH_2)	31,7
3	71,3 (CH)	71,8
4	41,9 (CH_2)	42,3
5	140,6 (C)	140,8
6	121,3 (CH)	121,7
7	32,0(CH_2)	31,7
8	31,7 (CH)	31,9
9	49,9 (CH)	50,2
10	35,5 (C)	36,2
11	20,9 (CH_2)	21,1
12	39,5 (CH_2)	39,8
13	42,1 (C)	42,3
14	56,5 (CH)	56,8
15	24,1 (CH_2)	24,1
16	28,0 (CH_2)	28,2
17	55,8 (CH)	56,0
18	11,6 (CH_3)	11,9
19	19,6 (CH_3)	19,4
20	35,9 (CH)	36,3
21	19,1 (CH_3)	18,8
22	33,8 (CH_2)	33,9
23	26,1 (CH_2)	26,2
24	45,6 (CH)	45,9
25	28,9 (CH)	29,2
26	20,9 (CH_3)	19,8
27	19,1 (CH_3)	19,1
28	23,2 (CH_2)	23,1
29	11,6 (CH_3)	12,0

* Dados literatura em CDCl_3 , 300 MHz,[RIBEIRO, 1999]

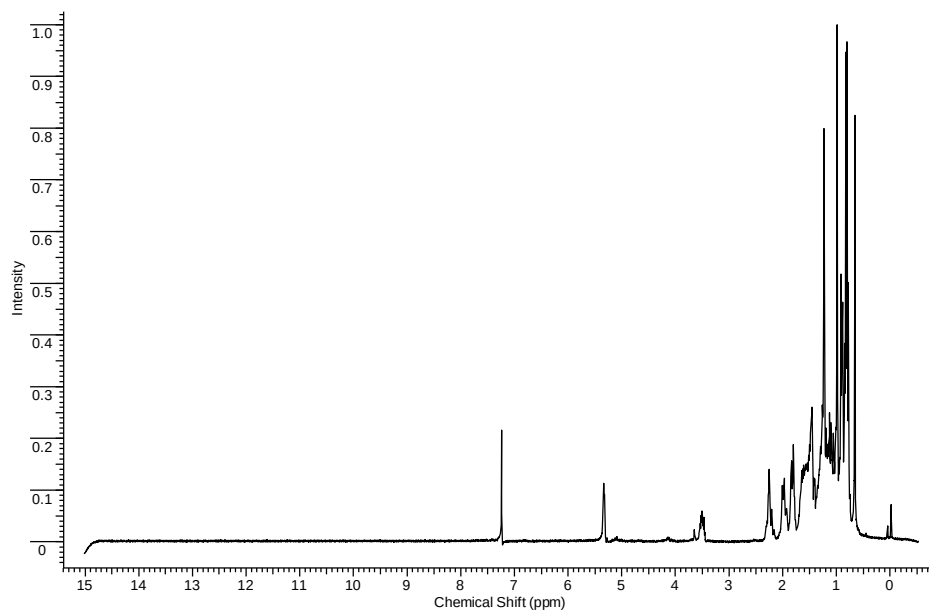


Figura 47 – Espectro de RMN ^1H da substância β -sitosterol (CDCl_3 300MHz).

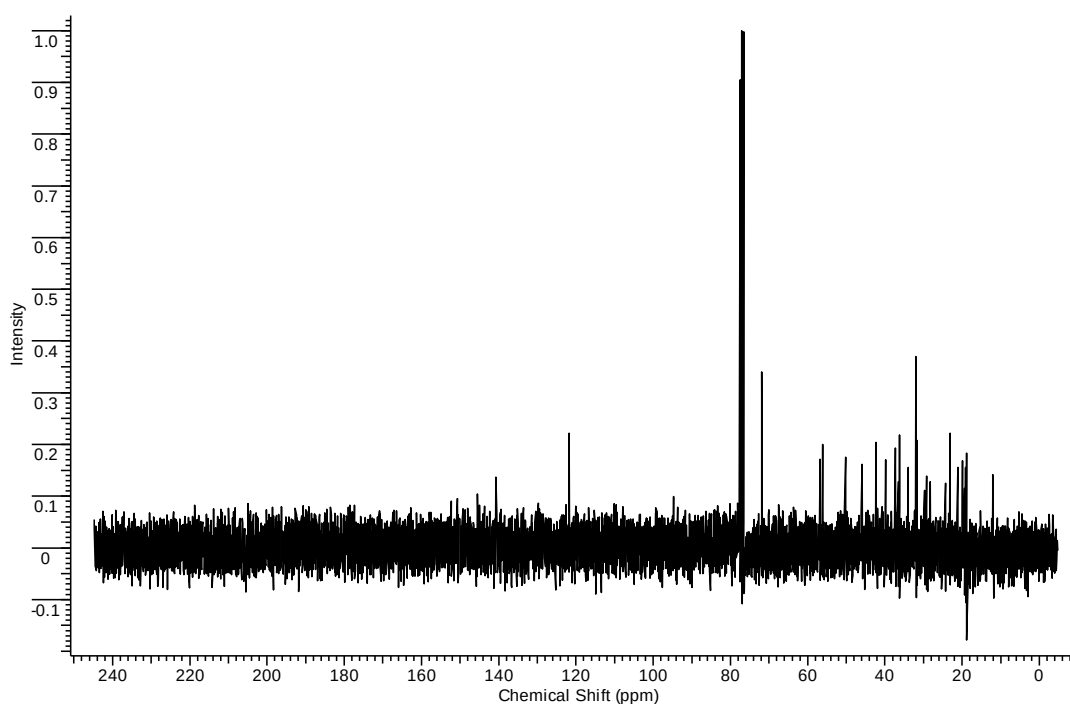


Figura 48 – Espectro de ^{13}C da substância β -sitosterol (CDCl_3 , 75MHz).

5.2.4. Identificação da substância 3

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 50), ^{13}C (Figura 51) e DEPT 135° (Figura 52) da substância 7 apresentaram sinais característicos para flavonóides glicosilados, conforme

mostra a Tabela 14. O espectro de RMN de ^1H exibiu sinais em δ 6,40 (d, $J = 2,0$) e 6,21 (d, $J = 2,0$) indicando um acoplamento *meta*. Neste espectro foi possível observar ainda na região para átomos de hidrogênio aromático os sinais em δ 7,62 (dd, $J = 2,0; 8,0$), 6,88 (d, $J = 8,0$) e 7,66 (d, $J = 2,0$), caracterizando um anel *trisubstituído*. No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 foram observados os sinais em δ 158,5 (C), 135,6 (C), 179,4 (C) atribuídos respectivamente aos átomos de carbono na posição 2, 3 e 4 do anel C de um flavonóide. A análise desses dados permitiu identificar a aglicona como o flavonol quercetina. O espectro de RMN de ^1H mostrou ainda os sinais em δ 5,10 (d, $J = 7,5$) e 4,51 (s) característicos para hidrogênio anomérico. A constante de acoplamento observada para o hidrogênio em δ 5,10 indica que a hidroxila no C-1 deste açúcar está na posição β , enquanto que o outro apresenta esta hidroxila na posição α . Neste espectro também foram observados um conjunto de sinais entre δ 3,00 a 3,80 típico para hidrogênio ligado a carbono carbinólico e um sinal em δ 1,11 (d, $J = 6,0$). Estes sinais comprovaram a presença de duas unidades de açúcares. Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C em δ 102,4 (CH), 75,7 (CH), 78,2 (CH), 71,4 (CH), 77,2 (CH) e 68,5 (CH_2) corroboraram com os valores de deslocamento químico para os átomos de carbono de uma unidade de β -D-glucose esterificada em C-6. A outra unidade de açúcar foi identificada como a α -L-rhamnose. A presença deste açúcar foi evidenciado principalmente pelo sinal no espectro de RMN de ^1H em δ 1,11 (d, $J = 6,1$) e pelo sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ 17,8, característicos para a metila do C-6 e por comparação com a literatura. Assim, a estrutura em discussão é um flavonóide monodesmosídeo formado pelos açúcares α -L-rhamnose (1 $\rightarrow$ 6) β -D-glucose. Este açúcar poderia estar esterificado com o flavonol no C-3, C-7, C-3' ou C-4'. A posição do açúcar no C-3 foi determinada de acordo com o valor do deslocamento químico observado para o C-2 (δ 158,5), C-3 (δ 135,6) e C-4 (δ 179,4). De acordo com a literatura os flavonols-3-O-glicosilados apresentam para o C-2 uma variação no deslocamento químico de $9,5 \pm 0,4\text{ppm}$ (blindado) e para o C-3 e C-4 esta variação entre 1,2 e 3,0 ppm (Figura 53). Deste modo a substância 7 foi identificada como o flavonol quercetina-3-O-rutinosídeo (Figura 54).

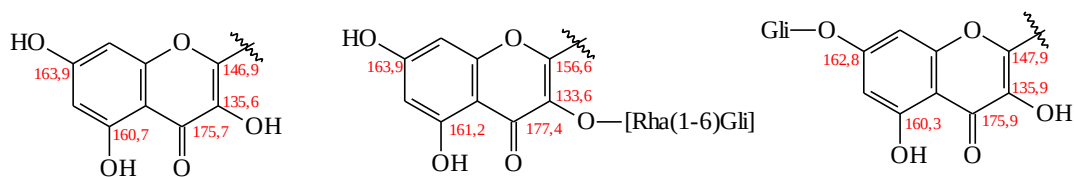


Figura 53 – Deslocamento químico para quercetina, quercetina-3-O-rutinosídeo e quercetina-3-O-glucosídeo (DMSO- d_6).

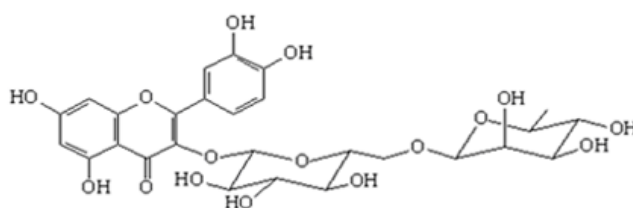


Figura 54 – Quercetina-3-O-rutinosídeo.

Tabela 14 – Dados de RMN da substância 7 (300 MHz, MeOH).

POSIÇÃO	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}^*$
2	158,5 (C)	-	159,5
3	135,6 (C)	-	135,8
4	179,4 (C)	-	179,5
5	163,0 (C)	-	163,0
6	99,9 (CH)	6,40 (d, J=2,0)	100,0
7	166,1 (C)	-	166,0
8	94,9 (CH)	6,21 (d, J=2,0)	94,8
9	159,3 (C)	-	158,5
10	105,6 (C)	-	105,7
1'	123,1 (C)	-	123,2
2'	117,7 (CH)	7,66 (d, J=2,0)	117,5
3'	145,6 (C)	-	149,9
4'	149,8 (C)	-	149,8
5'	116,0 (CH)	6,88 (d, J=8,4)	115,9
6'	123,5 (CH)	7,62 (dd, J=2,0; 8,4)	123,4
1''	104,7 (CH)	5,10 (d, J=7,5)	104,5
2''	75,7 (CH)	3,00-3,80 m	75,7
3''	78,2 (CH)	3,00-3,80 m	78,0
4''	71,4 (CH)	3,00-3,80 m	71,4
5''	77,2 (CH)	3,00-3,80 m	75,6
6''	68,5 (CH ₂)	3,00-3,80 m	64,4
1'''	102,4 (CH)	4,51 s	
2'''	72,1 (CH)	3,00-3,80 m	
3'''	72,2 (CH)	3,00-3,80 m	
4'''	73,9 (CH)	3,00-3,80 m	
5'''	69,7 (CH)	3,00-3,80 m	
6'''	17,8 (CH ₃)	1,11 (d, J=6,1)	

* Deslocamento químico para quercetina-3-O-glucosídeo-6-acetato em MeOH [AGRAWAL, 1989].

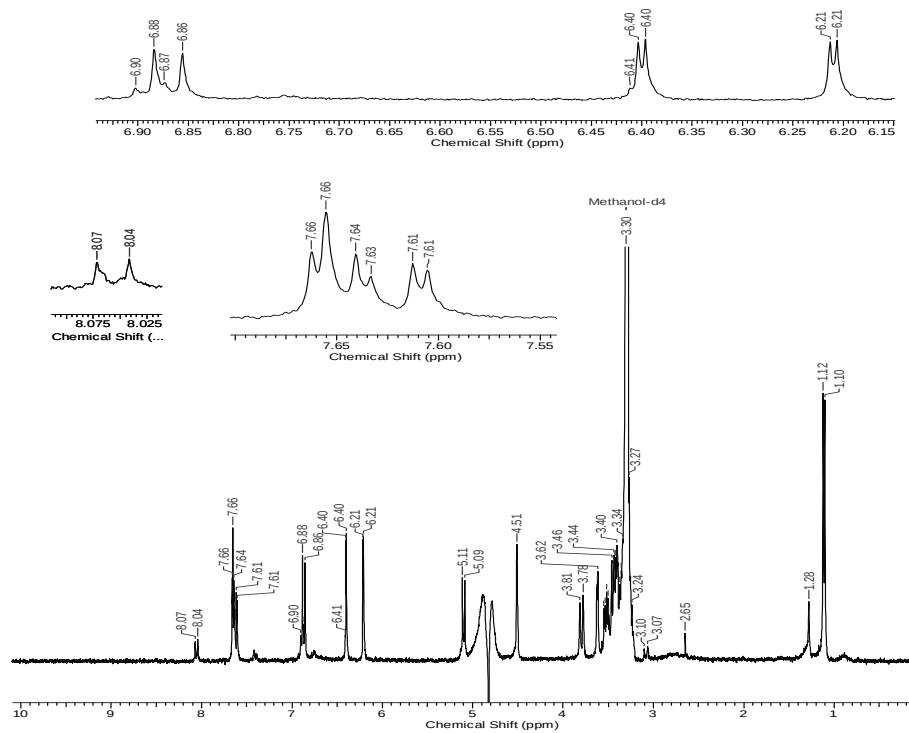


Figura 50 – Espectro de RMN ^1H da substância 7 (MeOD, 300MHz).

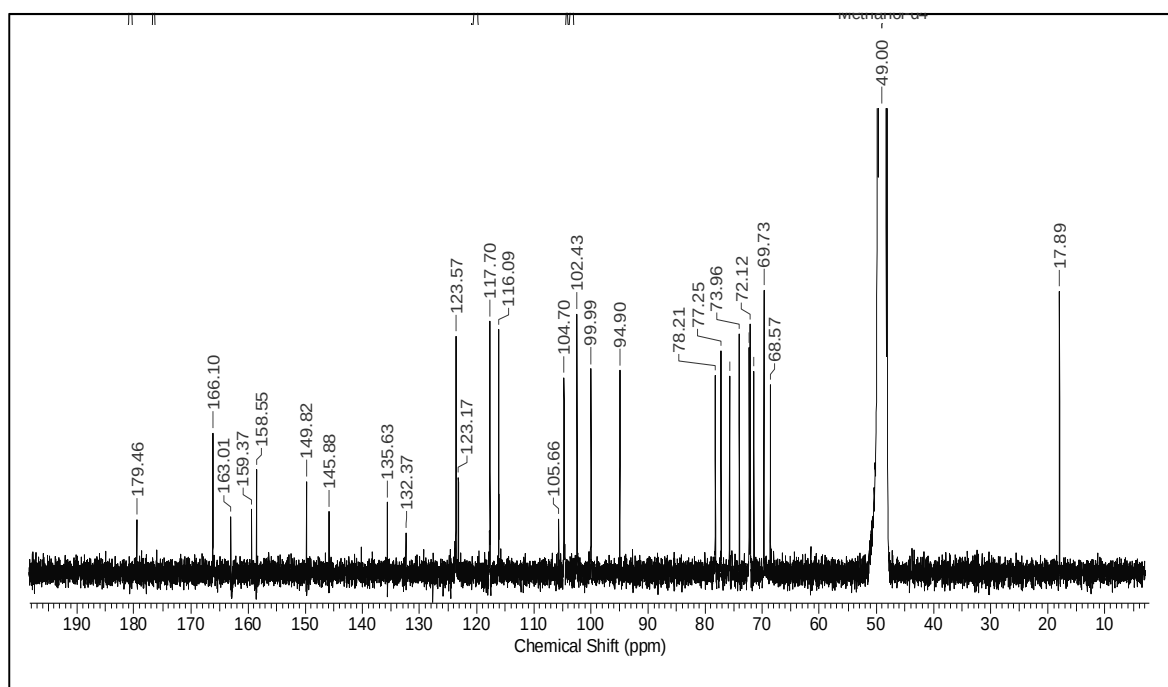


Figura 51 – Espectro de RMN ^{13}C da substância 7 (MeOD, 75 MHz).

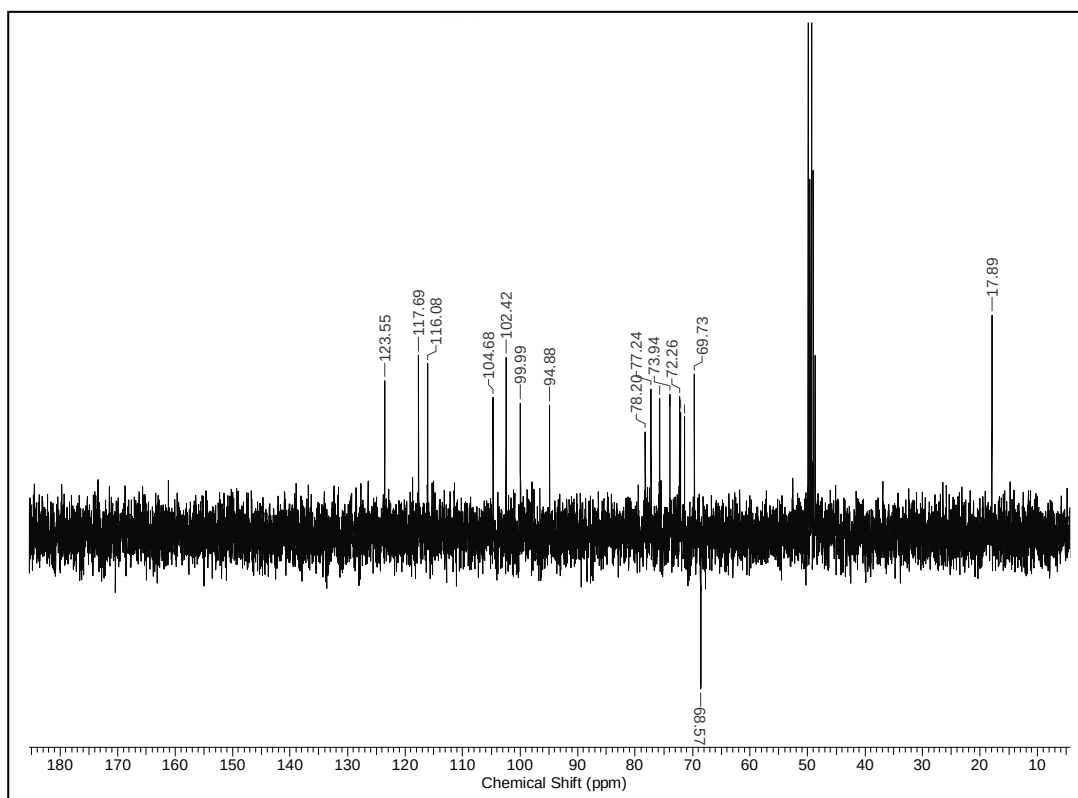


Figura 52 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância **7** (MeOD, 75MHz).

5.2.5. Identificação da substância **8**

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 55), ^{13}C (Figura 56) e DEPT 135° (Figura 57) da substância **8** exibiram sinais característicos para uma catequina, conforme a Tabela 15. No espectro de RMN de ^1H foram observados dois dubletos em δ 5,87 ($J = 2,1$) e 5,94 ($J = 2,1$) atribuído aos átomos H-6 e H-6, respectivamente. Este espectro também exibiu os sinais em δ 6,83 (d, $J = 1,8$), 6,74 (d, $J = 8,1$) e 6,71 (dd, $J = 1,8; 8,1$) atribuídos aos H-2', H-5' e H-6' do anel B, respectivamente. No espectro de RMN de ^1H foi possível visualizar ainda os sinais dos átomos de hidrogênio da parte alifática da catequina. Esse espectro mostrou um dubleto em δ 4,55 ($J = 7,5$) atribuído ao H-2, um duplo tripleto em δ 3,97 ($J = 7,8$) referente ao H-3, e dois duplos dubletos em δ 2,49 ($J = 8,0; 16,0$) e 2,85 ($J = 5,7; 16,0$). O valor da constante de acoplamento observado para o H-2 ($J = 7,5$) permitiu identificar a substância **8** como a (+) – epicatequina (Figura 58).

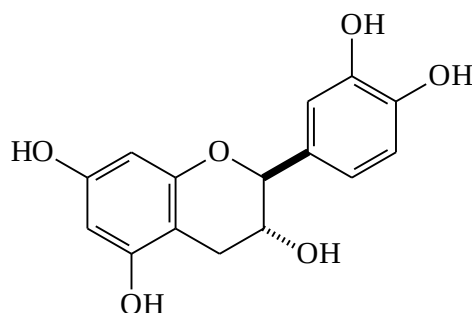


Figura 58 – (+)-Epicatequina.

Tabela 15 – Dados de RMN da substância **8** (300 MHz, MeOH).

Posição	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^{13}C *
2	4,55 (d, $J=7,5$)	82,8	82,85
3	3,97 (t, $J=7,8$)	68,8	68,82
4 _{ax}	2,49 (dd, $J=8,0; 16,0$)	28,5	28,49
4 _{eq}	2,85 (dd, $J=5,7; 16,0$)		
5	-	157,6	157,58
6	5,87 (d, $J=2,1$)	96,4	96,37
7	-	157,5	157,82
8	5,94 (d, $J=2,1$)	95,6	95,58
9	-	156,9	156,93
10	-	100,9	100,89
1'	-	132,2	132,25
2'	6,83 (d, $J=1,8$)	115,3	115,29
3'	-	146,2	146,23
4'	-	146,2	146,25
5'	6,74 (d, $J=8,1$)	116,1	116,15
6'	6,71 (dd, $J=1,8; 8,1$)	120,1	120,09

* Deslocamento químico para (+)-Epicatequina em MeOH [KHALLOUKI,2007].

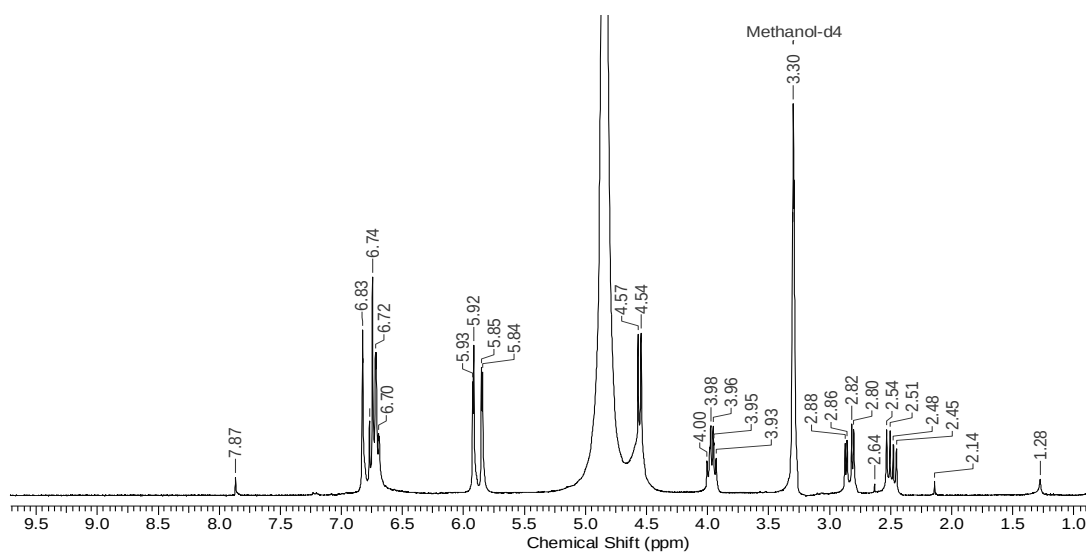


Figura 55 – Espectro de RMN ^1H da substância **8** (MeOD, 300MHz).

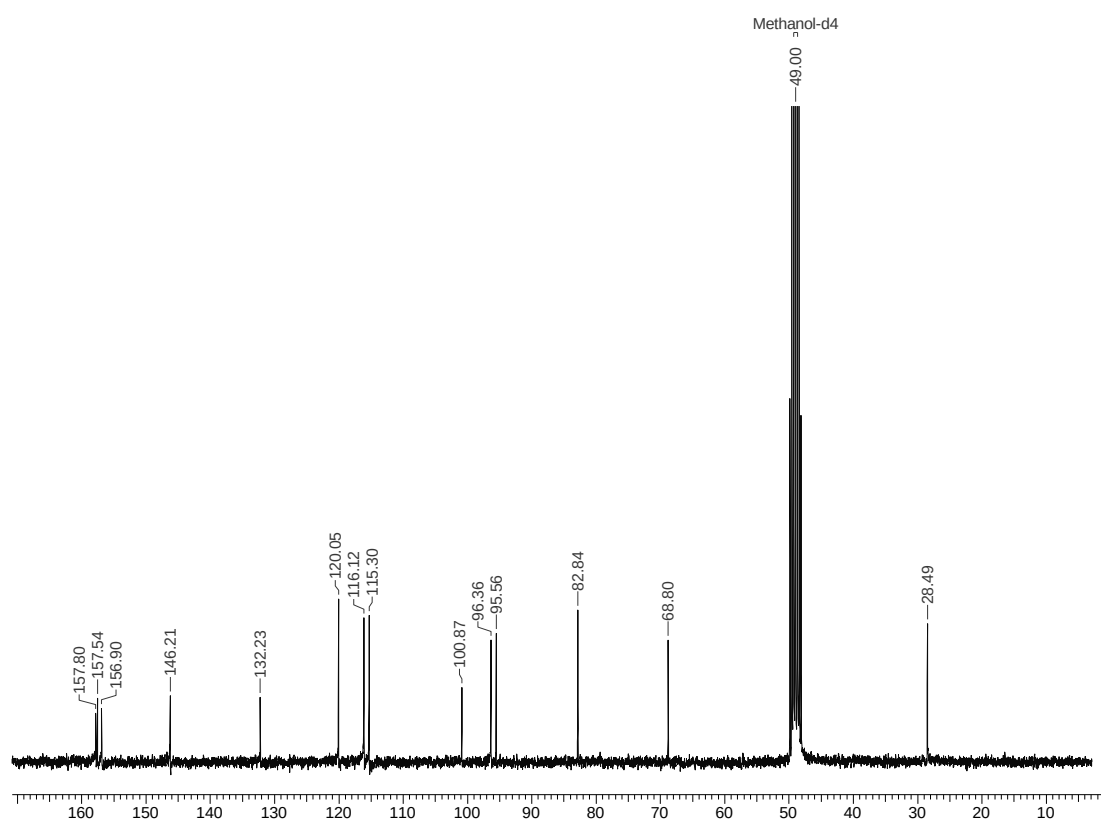


Figura 56 – Espectro de RMN ^{13}C da substância (+)-Epicatequina (MeOD, 75MHz).

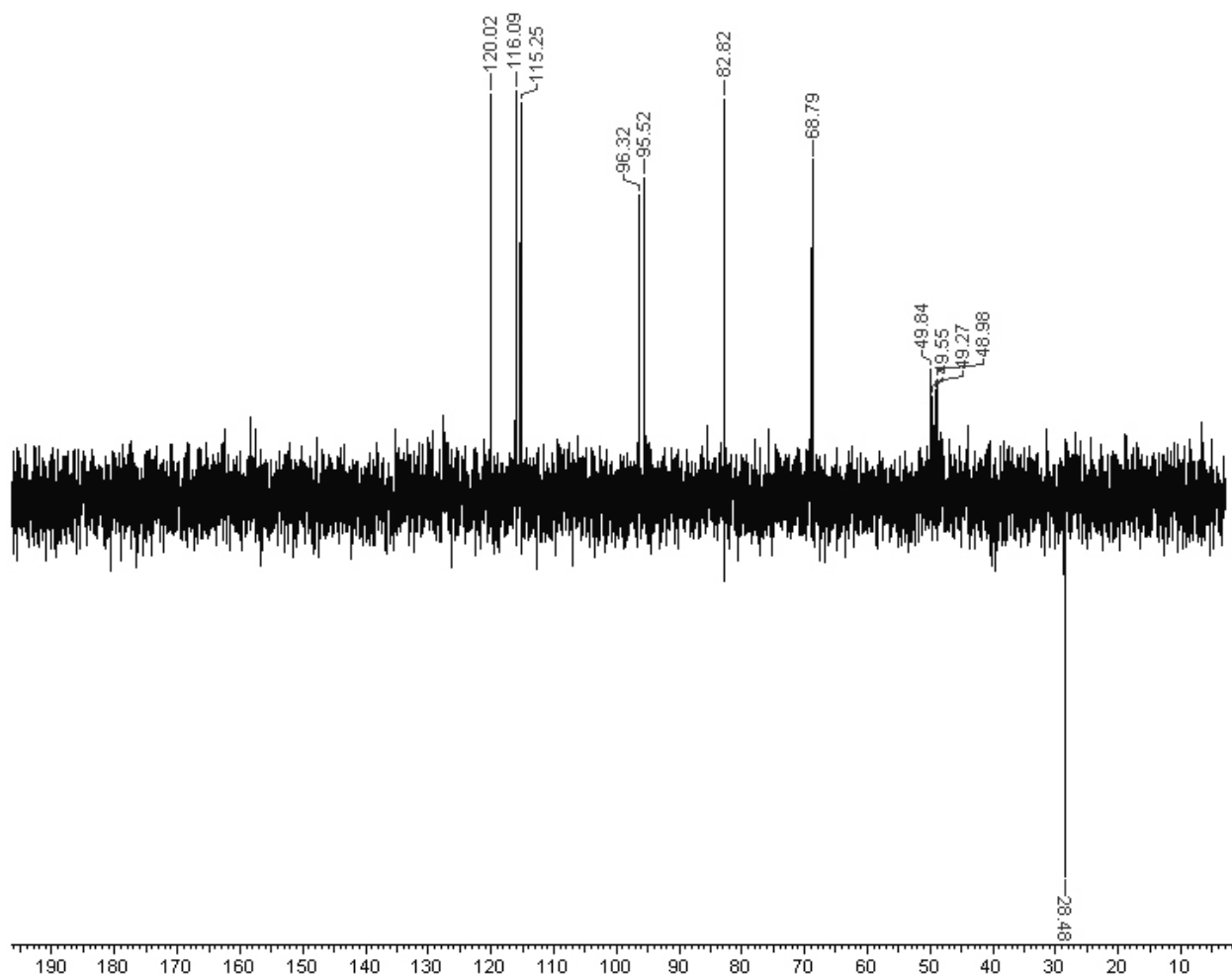


Figura 57 – Espectro de experimento DEPT 135° da substância **8** (MeOD, 75MHz).

5.3. Ensaio biológico

5.3.1. *Teste de toxicidade em coelhos*

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul na Unidade de Aquidauana, sob a responsabilidade da Prof^a. Carolina Silva Barbosa.

Para conhecer os volumes a serem ministrados foi consultado o Prof. Dr. Scapinello, especialista em coelhos da Universidade Estadual de Maringá, que recomendou um volume máximo de 5 ml de solução para animais adultos, com massa aproximadamente de 2 kg.

Os trabalhos começaram em torno das 08:00 h e o último coelho foi inoculado em torno das 12:00 h. Após o procedimento os grupos devidamente identificados foram colocados em gaiolas providas de ração e água.

5.3.1.1. Toxicidade dos extratos de *M. pubiflora* em coelhos

No experimento realizado, os animais inoculados com as soluções dos extratos etanólico das folhas frescas e alcaloídico de *M. pubiflora* (Tabela 16), ingeriram água e ração normalmente. Cerca de nove horas após a inoculação, verificou-se o estado dos coelhos que foram inoculados com os extratos de *M. pubiflora* e estes não apresentaram nem os mais leves sintomas de intoxicação.

O ensaio para averiguar a intoxicação experimental pelos extratos de *M. pubiflora* em coelhos apresentou resultado semelhante àquele observado para este ensaio com as folhas dessecadas ou frescas apresentados na literatura [DÖBEREINER, 1986]. No experimento realizado com os extratos, os animais permaneceram vivos, sendo observado neste período um aumento da apatia. Enquanto que nos demais experimentos observou-se a morte dos animais em menos de 48h. Essa disparidade pode ser atribuída pela diferença na administração do extrato e/ou na concentração do extrato. É importante ressaltar que as folhas de *M. pubiflora* utilizadas para este estudo e o descrito na literatura [DÖBEREINER, 1986] foram coletadas em agosto e setembro, respectivamente. Portanto, não há uma diferença significativa decorrente da variabilidade sazonal. Porém, no trabalho realizado por TOKARNIA [1973] um dos experimentos consistiu em alimentar semanalmente, cinco vezes, um bovino com a metade da dose letal das folhas dessecadas, a planta não mostrou efeito cumulativo e não provocou tolerância no animal, morrendo este após a última administração da planta correspondente a uma dose letal (5 g/kg).

5.3.1.2. Toxicidade dos extratos de *R. graciliflora* em coelhos

Os animais inoculados com a fase hexânica das folhas desidratadas ingeriram água e ração normalmente sem apresentar sinais de anormalidades após a inoculação. Aqueles que receberam solução de extratos etanólico das folhas desidratadas de *R. graciliflora*, apresentaram em seguida dificuldade respiratória e ingeriram somente água e foram a óbito em aproximadamente 5 horas. Os que receberam a fase hidrometanólica das folhas

desidratadas de *R. graciliflora*, após a inoculação apresentaram elevação dos movimentos respiratórios, mas ingeriram alimento e água com dificuldades e após 3 horas foram a óbito (Tabela 16).

Aproximadamente às 17:00 h do mesmo dia foi verificado que as soluções dos extratos etanólico das folhas desidratadas e a fase hidrometanólica de *R. graciliflora*, provocaram 100% de mortalidade. É importante ressaltar que quando foi verificada a mortalidade dos animais após 5 horas da aplicação, estes apresentaram *rigor mortis* (corpo totalmente rígido) o que indica que a letalidade do concentrado aconteceu poucas horas após a administração.

Tabela 16 – Comportamento dos coelhos após inoculação dos extratos de *M. pubiflora* e *R. graciliflora*.

Extrato	0h	3hs	5hs	9hs
EtOH-folhas secas de <i>M. pubiflora</i>	Normal	Normal	Normal	Normal
EtOH-folhas verdes de <i>M. pubiflora</i>	Normal	Normal	Normal	Normal
Fase alcaloídica de <i>M. pubiflora</i>	Normal	Normal	Normal	Normal
EtOH.-folhas desidratadas de <i>R. graciliflora</i>	Dificuldade respiratória e ingestão de água	Dificuldade respiratória	Óbito	-
Fase hex.-folhas desidratadas de <i>R. graciliflora</i>	Normal	Normal	Normal	Normal
Fase MeOH/H ₂ O-folhas desidratadas <i>R. graciliflora</i>	Dificuldade respiratória e ingestão de água e alimento (com dificuldade)	Óbito	-	-

Os coelhos tratados com extratos de *R. graciliflora* que vieram a óbito, foram encaminhados à sala de necropsia para verificar se durante o procedimento de inoculação houve a falsa via. Após o procedimento observou-se que o aparelho respiratório encontrava-se intacto. Quanto ao conteúdo estomacal no grupo que foi inoculado com extrato etanólico das folhas desidratadas de *R. graciliflora* foi encontrado somente água, e no grupo que recebeu fase hidrometanólica das folhas desidratadas de *R. graciliflora*, foram encontrados ração e água em grande quantidade.

A literatura apresenta vários relatos de estudo toxicológico com *R. gracilifolia*, incluindo estudo histológico de bovinos, camundongos, ratos e coelhos [RIET-CORREA, 2001] quando tratados com folhas *in natura* ou desidratadas, nenhum trabalho menciona o estudo com os extratos. O ensaio realizado para averiguar a toxicidade dos extratos de *R. gracilifolia* mostrou que apenas os extratos de média e alta polaridade são tóxicos,

enquanto que o extrato hexânico das folhas desidratadas não apresentou toxicidade para os animais testados.

5.3.2 Inseticida

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul na Unidade Universitária de Aquidauana, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Sérgio Roberto Rodrigues.

5.3.2.1. Atividade inseticida de *R. gracilifolia*

A fase hidrometanólica de *R. gracilifolia* não apresentou atividade inseticida sobre as lagartas de *S. frugiperda*.

5.3.2.2. Atividade inseticida de *M. pubiflora*

As lagartas *S. frugiperda* que foram alimentadas com folhas de milho tratadas com extrato etanólico de *M. pubiflora* apresentaram peso médio superior quando comparado à testemunha (Tabela 17). Os maiores pesos larvais obtidos indicaram aparentemente uma adequação nutricional ao alimento fornecido, entretanto, ao se analisar a duração da fase larval de *S. frugiperda*, nota-se que o extrato promoveu redução na duração da fase larval, em relação à testemunha (Tabela 17). Esse fato pode indicar que o alimento não estava adequado para o desenvolvimento das lagartas, e nesse caso, a redução dessa fase poderia ser uma forma utilizada por *S. frugiperda* para compensar as condições inadequadas da fonte de alimento, empupando em menos tempo. No experimento observou-se um aumento de peso nas lagartas tratadas com *M. pubiflora*, provavelmente originado pela indução de aumento no consumo de alimento.

O extrato apresentou mortalidade larval superior à testemunha (Tabela 17) e provocou lento efeito de mortalidade sobre lagartas *S. frugiperda*. Ao 6º dia de avaliação verificou-se 12% de mortalidade ocorrendo grande aumento a partir do 10º dia, tanto que 32% de mortalidade foram obtidos aos 15º dia de avaliação.

Tabela 17 – Médias ($\pm$ EP) de peso, duração e mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* alimentada com folhas de milho tratadas com extrato de *M. pubiflora* e testemunha.

Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 70% e fotofase: 14h.

Tratamento	Peso lagartas com dez dias (mg)	Duração larval (dias)	Mortalidade (%)
<i>M. pubiflora</i>	$74,7 \pm 2,18 \text{ a}^1$	$15,2 \pm 0,10 \text{ a}$	$32,0 \pm 0,11 \text{ a}$
Testemunha	$46,9 \pm 4,95 \text{ b}$	$16,8 \pm 0,19 \text{ b}$	$17,0 \pm 0,06 \text{ b}$

¹Letras distintas na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade.

Em relação ao peso de pupas de *S. frugiperda*, verificou-se que o tratamento da testemunha não diferenciou do tratamento com extratos de *M. pubiflora* (Tabela 18), quanto à mortalidade pupal, este extrato provocou mortalidade de 13,2% (Tabela 18). Os maiores efeitos de mortalidade foram verificados na fase larval. Segundo Torrecilas e Vendramin [2001] é nessa fase que o inseto se alimenta, tornando-o mais exposto aos possíveis aleloquímicos presentes em plantas inseticidas.

Tabela 18 – Médias ($\pm$ EP) de peso, duração e mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* alimentada com folhas de milho tratadas com extrato de *M. pubiflora*. e testemunha.

Temp.: $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR 70% e fotofase: 14h.

Tratamento	Peso de pupas (mg)	Duração pupal (dias)	Mortalidade (%)
<i>M. pubiflora</i>	$185,9 \pm 2,77 \text{ a}$	$8,2 \pm 0,14 \text{ a}$	$13,2 \pm 0,50 \text{ a}$
Testemunha	$189,9 \pm 1,74 \text{ a}$	$8,2 \pm 0,13 \text{ a}$	$4,8 \pm 0,01 \text{ b}$

¹Letras distintas na mesma coluna diferem entre si a 5% de probabilidade.

Analisando o efeito do extrato de *M. pubiflora* observa-se que as lagartas apresentaram preferência por folhas de milho não tratadas (Testemunha), tanto às 8 quanto às 24 horas após liberação (Tabela 19). Desta forma, os componentes químicos presentes nesse extrato podem estar agindo sobre as lagartas, inibindo sua alimentação e induzindo-as a procurar as folhas não tratadas para alimentação.

Tabela 19 – Quantidades médias de lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda* obtidas no teste de preferência alimentar de folhas de milho tratada com extrato de *M. pubiflora* e testemunha (folha tratada com água destilada) às 8 e às 24 horas após liberação em placa de petri. Temp.: 26± 1°C, UR 70% e fotofase: 14h.

Tratamento	8:00 h	24:00 h
<i>M. pubiflora</i>	1,43 a ¹	1,55 a
Testemunha	2,92b	1,98b
cv (%)	15,06	5,69

cv (%) – coeficiente de variação

A avaliação da atividade inseticida do extrato etanólico da parte aérea de *M. pubiflora*, apesar de alguns resultados significativos, mostrou um baixo potencial biológico deste extrato como inseticida.

5.3.3. Teste de toxicidade em *A. salina* (TAS)

Os extratos etanólicos das espécies estudadas neste trabalho foram submetidos ao ensaio com *A. salina* para averiguar a presença de uma possível atividade citotóxica. Esses extratos foram testados nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/ml (triplicata). Os resultados obtidos foram analisados no programa Probitos e a DL₅₀ calculada foi maior que 1000 µg/ml para ambos os extratos. O valor dessa DL₅₀ caracteriza os extratos etanólicos de *M. pubiflora* e *R. graciliflora* como inativos no bioensaio com *A. salina*. É importante salientar que o resultado foi o mesmo tanto para os extratos de material seco como para os extratos de material verde.

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da parte aérea (ramos e folhas) de *Mascagnia pubiflora* Malpighiaceae conduziu ao isolamento de duas substâncias derivadas da epicatequina, constituídas de duas unidades C6-C8 “simétricas” e glicosiladas condensadas ao núcleo flavanoídico que são inéditas na literatura e um flavonol, a quercetina-3-O-rutinosídeo. Na avaliação da toxicidade do extrato etanólico dessa espécie testado em TAS e em coelhos não foi constatada atividade significativa sobre coelhos e no ensaio de “Toxicidade para *Artemia salina* – TAS”, porém apresentou boa atividade inseticida sobre *Spodoptera frugiperda*. O estudo fitoquímico de *Riedeliella graciliflora* conduziu ao isolamento de cinco substâncias: o fitol, ficaprenol 12, β -sitosterol, (+)-epicatequina e quercetina-3-O-rutinosídeo. O extrato etanólico dessa espécie testado no TAS e sobre *Spodoptera frugiperda* não apresentou atividade, porém apresentou atividade tóxica para coelhos.

As atividades biológicas descritas no presente trabalho possibilitaram a formulação de hipóteses para o entendimento da toxicidade dessas espécies na biota, podendo seu comportamento como plantas tóxicas receber a contribuição de um ou do somatório dos fatores descritos.

7. REFERÊNCIAS

AFONSO, E.; POTT, A. **Plantas no Pantanal tóxicas para bovinos**. 1. ed. Brasília: EMBRAPA, v. 1, 50p, 2001.

AGRAWAL, P. K. **Carbono-13 NMR of Flavonoids**. Elsevier Science Publishers B. V., 1989.

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phyt.**, v. 66, p. 2388-2392, 2005.

ANDRADE, S. O.; MATTOS, J. R. Plantas Tóxicas no Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo: Edanee, 1968.

AOKI, T.; MATSUO, K.; SUGA, T.; OHTA, S. Arachisprenols: Polyprenols possessing a geranyl residue from *Arachis hypogaeae*. **Phyt.**, v. 46 (4), p. 715-720, 1997.

BARROS, C. S. L.; ILHA, M. R. S.; LANGOHR, I. M.; KOMMERS, G. D. Intoxicação por *Senna occidentalis* (Leg. Caesalpinoideae) em bovinos em pastoreio. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 19 (2), p. 68-70, 1999.

BARROSO, M. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa, UFV, v. 2, 1991.

BOGORNÍ, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neot. Ent.**, Londrina, v. 34, p. 311-317, 2005.

BOTTON, M.; CARBONARI, J. J.; GARCIA M. S.; MARTINS, J. F. S. Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 27, p. 207-212, 1998.

- BRITO, A. R. M. Souza; BRITO, A. A. Souza. Medicinal plant research in Brazil: data from regional and national meetings. In: BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A. **Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health**. New York : Columbia University Press, p. 386-401, 1996.
- BRUNETON, J. **Toxic plants dangerous to humans and animals**. Paris : Lavoisier Publishing, 545 p., 1999.
- CARVALHO, N. M.; CUNHA, T. G.; RAVEDUTTI, J.; BARROS, C. S. L.; LEMOS, R. A. A. Intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26 (3), p. 139-146, 2006.
- CHAVES, M. H. **Estudo Químico da *Porcelia macrocarpa* (Warm.) R. E. Fries (Annonaceae)**. Tese de Doutorado, v. 1, Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, 1996.
- CINTRA, P.; MALASPINA, O.; BUENO, O. C. Plantas tóxicas para abelhas. **Arq. Inst. Biol.** v. 72, n. 4, p. 547-551, 2005.
- CRUZ, G. D.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Role of bracken fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn) in animal and human health. **Sem.: Ciênc. Agr.**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 249-258, 2004.
- DIAS, S. M. C. Constituição química e aspectos farmacológicos da família Malpighiaceae. **Arq. Inst. Biol.**, v. 4 (1/2), p. 15-26, 1977.
- DOBEREINER, J.; GAVA, A.; CONSORTE, L. B.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação Experimental por *Mascagnia pubiflora* (Malpighiaceae) em coelhos. **Pesq. Vet. Bra.** v. 6 (2), p. 51-57, 1986.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. **Rel. Téc. An.**, p. 1087, 1995.

- GARCEZ, W. S. **Constituintes Químicos de *Ocotea vellosiana* (Meissn.) Mez Lauraceae**. Tese de Doutorado, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1991.
- GAVA, A.; BARROS, C. S. L.; PILATI, C.; BARROS, S. S.; MORI, A. M. Intoxicação por *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** v. 2, p. 49-59, 2001.
- HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 37-39, 2003.
- HARAGUCHI, M.; DAGLI, M. L. Z.; RASPANTINI, P. C.; GORNIK, S. L. The effects of low doses of *Senna occidentalis* seeds on broiler chickens. **Vet. Res. Com.**, Glasgow, v. 27, p. 321-328, 2003.
- HARAGUCHI, M.; NOBRE, D.; GUIMARÃES, R. de B.; MARIA, H. S. Occurrence of procyanidin in toxic fraction from *Riedeliella graciliflora*. **Rev. Lat. Am. de Quím.**, v. 23 (1), p. 34-36, 1992.
- HEBLING, M. J. A. Derivados de plantas tóxicas como alternativa potencial para o controle de formigas cortadeiras. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO NO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS, 3., PCMIP/IPEF, **Anais** 8-10 ago. 1994.
- HIGA, C. K.; PAULETTI, P. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Novo derivado fenólico de *Banisteriopsis variabilis* (Malpighiaceae). **28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ**.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Paulo: EdUFSCar, v. IV, 152p, 2003.
- JOHNSON, A. E.; MOLYNEUX, R. J.; MERRILL, G. B. Chemistry of toxic range plants: variation in pyrrolizidine alkaloid content of *Senecio*, *Amsinckia* and *Crotalaria* species. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 33 (1), p. 50-55, 1985.

JOLY, A. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, p. 777, 1985.

KALUNGA. **Cuidado, Jardim!**. n. 182, mar. 2006. Disponível em:
<http://www.kalunga.com.br/revista/revista_mar06_10.asp>. Acesso em: 01 set. 2007.

KARAM, F. S. C.; MENDEZ, M. C.; JARENKOW, J. A.; CORREA, F. R. Fenologia de quatro espécies tóxicas de *Senecio* (Asteraceae) na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 22 (1); p. 33-39, 2002.

KAWANO, T.; YAMAMOTO, M. M.; YOUNG, M. C. M.; CHU, E. P.; HARAGUCHI, M.; HIROKI, K. Molluscicidal activity of three Brazilian plant species. **Fit.**, v. LXVII, n. 1, p. 59-62, 1996.

KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. A New Cytotoxic Naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 52 (12), p. 1487-1488, 2004.

KHALLOUKI, F.; HAUBNER, R.; HULL W. E.; ERBEN, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H.; OWEN, R.W. Isolation, purification and identification of ellagic acid derivatives, catechins, and procyanidins from the root bark of *Anisophyllea dichostyla* R. Br. **Food and Chem. Tox.**, p. 472-485, 2007.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, tóxicas e medicinais. 3. ed. Nova Odessa : Plantarum, 608 p., 2000.

MATTOCKS, A. R. **Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids**. Orlando : Ac. Press, p. 48, 447-450, 1986.

McLAUGHLIN, J. L. Grown-Gall tumours on potato discs and Brine Shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. **Met. in Plant Biochem.**, London: K. Hostettman, v. 6, p. 1-32, 1991.

MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. **Sci.**, v. 123, p. 646, 1986.

NARENDER, T.; KHALIQ, T.; PURI, A.; CHANDER, R. Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. **Bioorg. & Med. Chem. Let.**, v. 16, p. 3411-3414, 2006.

NASCIMENTO, M. S. Two naphto-y-pyrone glycosides from *Mascagnia rígida*. **Fit.**, v. LXVI, n. 6, 1995.

NEAL, W. M.; RUSOFF, L. L.; AHMANN, C. F. The isolation and some properties of an alkaloid from *Crotalaria spectabilis* roth. **Phyt.**, v. 572, p. 2560-2561, 1935.

NOBRE, D.; CAPPELLARO, C. E. M. P. D. M.; SOUZA, A. C. *Riedeliella graciliflora*: estudos toxicológicos em cobaias e ruminantes. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 56, n. 1/2, p. 39-42, 1989.

NOBRE, V. M. T.; FILHO, J. M. B.; DANTAS, A. F. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS, J. S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em eqüinos no semi-árido da Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 24, n. (3), p. 132-143, 2004.

OLIVEIRA, F. de; AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, p. 222, 1989.

OLIVEIRA, C. M. C.; PEIXOTO, P. V.; BARBOSA, I. B. P.; ÁVILA, S. C.; TOKARNIA, C. H. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21 (1), p. 18-22, 2001.

POTT, A.; AFONSO, E. **Plantas tóxicas para bovinos em Mato Grosso Do Sul**. Campo Grande: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, EMBRAPA, 2001.

POTT, A.; POTT, V. J. **Falsa-ciganinha – *Riedeliella graciliflora* Harms.** Fauna e Flora do Cerrado. Campo Grande, jun. 2004. Disponível em:

<<http://www.cnpqg.embrapa.br/~rodiney/series/falsaciganinha/falsacigana.htm>>. Acesso em: 15 out. 2006.

POTT, A.; POTT, V. J.; SOUZA, T. W. **Plantas Daninhas de Pastagens na Região de Cerrados.** Campo Grande: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, EMBRAPA, p. 336, 2006.

RASTRELLI, L.; TOMMASI, N. de; BERGER, I.; CÁCERES, A.; SARAIVA, A.; SIMONE, F. de. Glicolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phyt.**, v. 45, n. 4, p. 647-650, 1997.

REIS, B. L.; FERREIRA, D. C.; DIAS, R. R.; RIBAS, C. R. Por que os insetos podem alimentar-se de plantas tóxicas? **Acad. Insecta**, v. 1 (2), p. 5-7, 2001.

RIBEIRO, J. S. A. **Benzofenona, triterpenos e esteróides da *Clausia obdeltifolia* (Clusiaceae).** Tese de Mestrado, Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, 1999.

RIET-CORREA, F.; GÓRNIK, S. L.; HARAGUCHI, M.; DAGLI, M. L. Z. Histological changes caused by *Riedeliella graciliflora* (Leg. Papilionoideae) poisoning in cattle and laboratory animals. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 5-7, 2001.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicação por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e risco para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 1, p. 35-37, 2005.

ROCHA, J. H. C.; CARDOSO, M. P.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. A novel chlorinated diphenyl ether from *Byrsonima microphylla* (Malpighiaceae). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70 (11), p. 2759-2761, 2006.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). **Sci. Agric.** v. 56, p. 581-586, 1999.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A. da; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C. dos; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Jour. of Eth.**, v. 97, p. 1-6, 2004.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26 (4), p. 223-236, 2006.

SOUZA, A. C.; HATAYDE, M. R.; BECHARA, G. H. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae) **Pesq. Vet. Bras.** v. 17(1), p.12-18, 1997.

STOLF, L.; GAVA, A.; VARASCHIN, M. S.; NEVES, D. S.; MONDADORI, A. J.; SCOLARI, L. S. Aborto em bovinos causado pela ingestão de *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 14, p. 15-18, 1994.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação por *Mascagnia pubiflora* em bovinos em Mato Grosso. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. (8), p. 61-68, 1973.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, p. 19-61, 2000.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J.; CONSORTE, L. B.; GAVA, A. *Tetrapteryx* spp (Malpighiaceae), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por alterações cardíacas. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 9, p. 23-44, 1989.

TORRECILLAS, S. M.; VENDRAMIM, J. D. Extratos aquosos de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. **Sci. Agric.** v. 58, p. 27-31, 2001.

TROESTER, M. A.; LINDSTROM, A. B.; WAIDYANATHA, S.; KUPPER, L. L.; RAPPAPORT, S. M. Stability of hemoglobin and albumin adducts of naphthalene oxide, 1,2-naphthoquinone, and 1,4-naphthoquinone. **Tox. Sci.**, v. 68 (2), p. 314-321, 2002.

WEHRL, F. W.; NISHIDA, T. The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy em *Natural Products Chemistry*. HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY, G. **W. Fort. der Chem. Org. Nat.** v. 36, p. 1-229, s/d.

ANEXOS

ESPECTROS DE RMN DA SUBSTÂNCIA 1

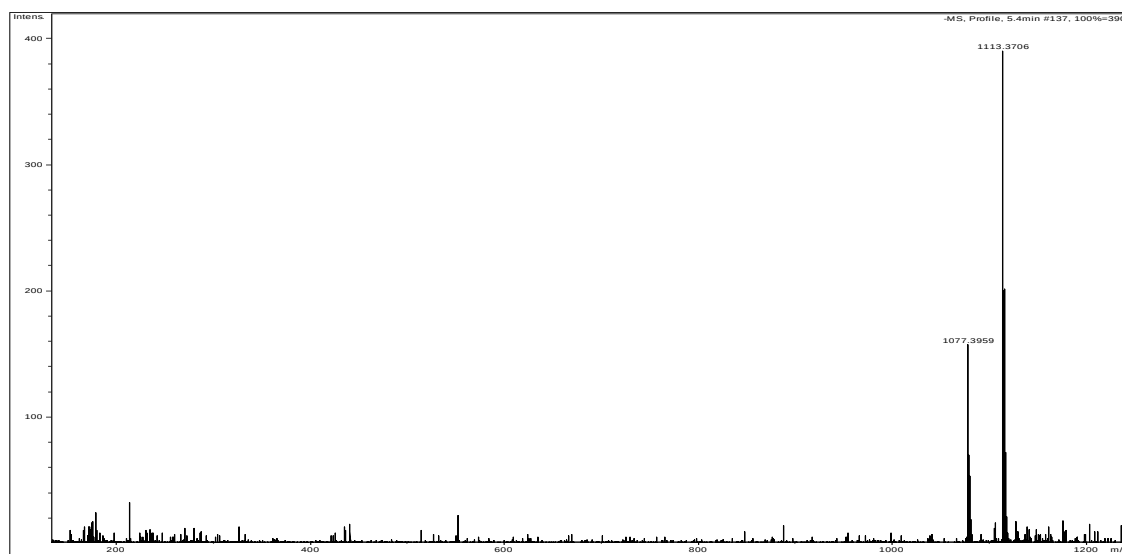


Figura I – Espectro de massas de **1** (ESI- modo negativo).

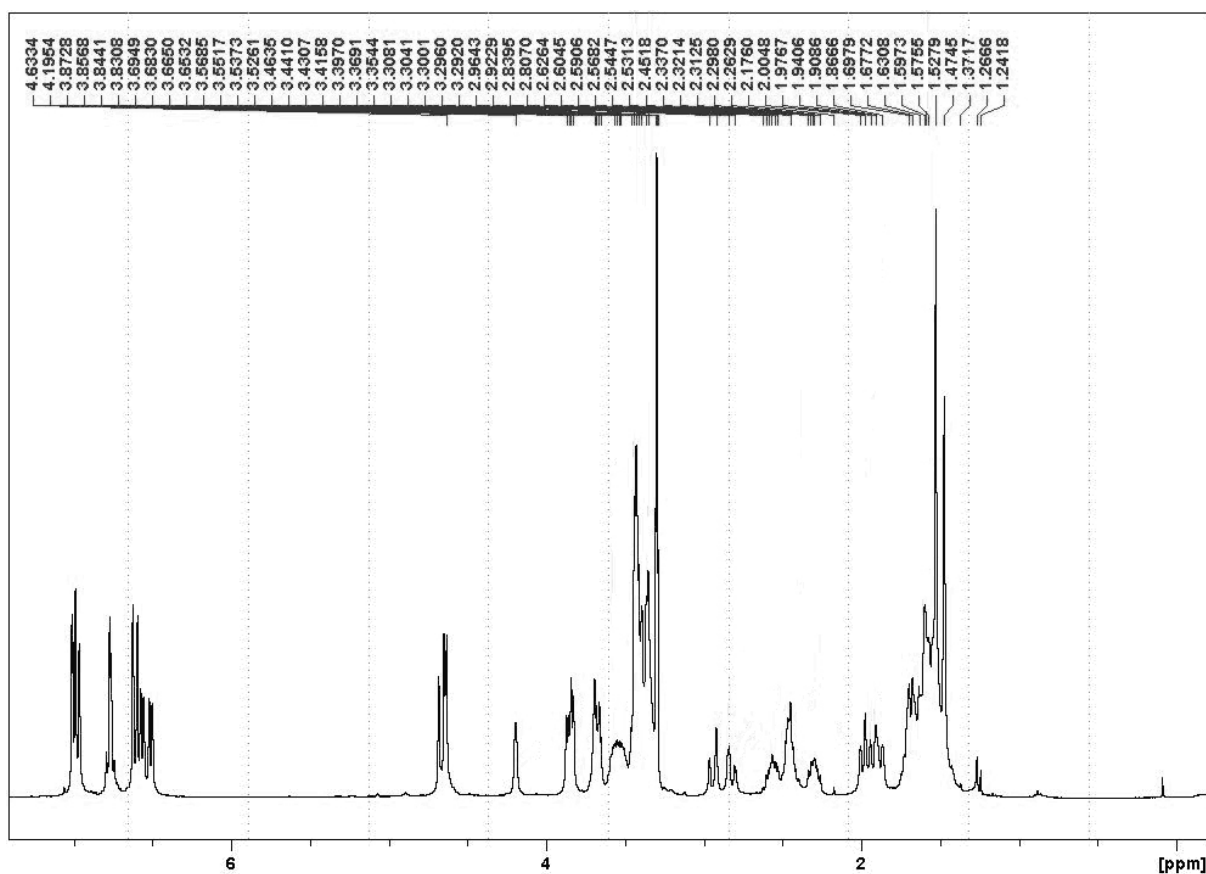


Figura II – Espectro de RMN ^1H de **1** (400 MHz, MeOD).

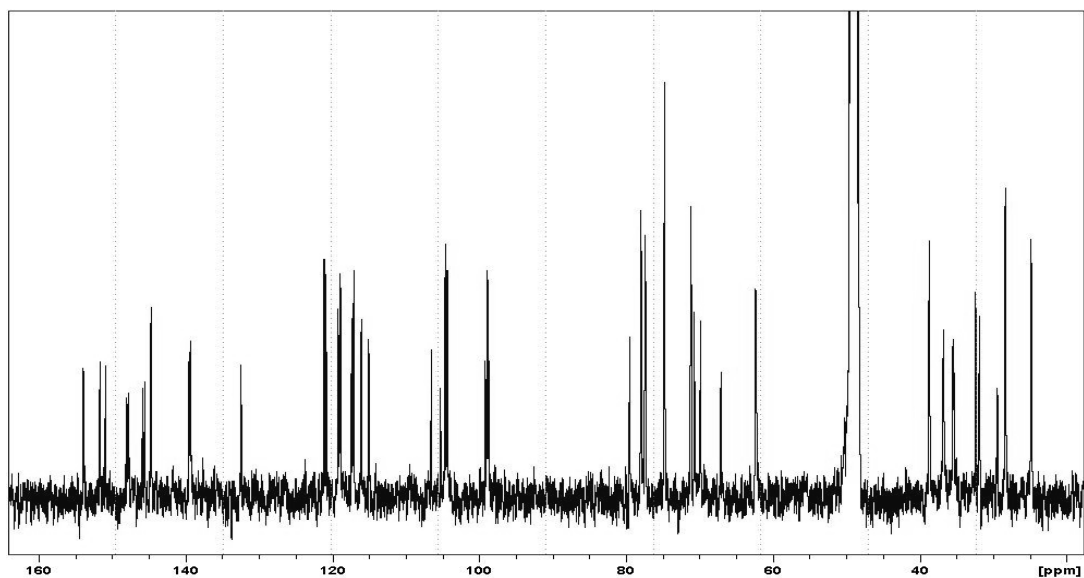


Figura III – Espectro de RMN ^{13}C de **1** (MeOD, 100 MHz).

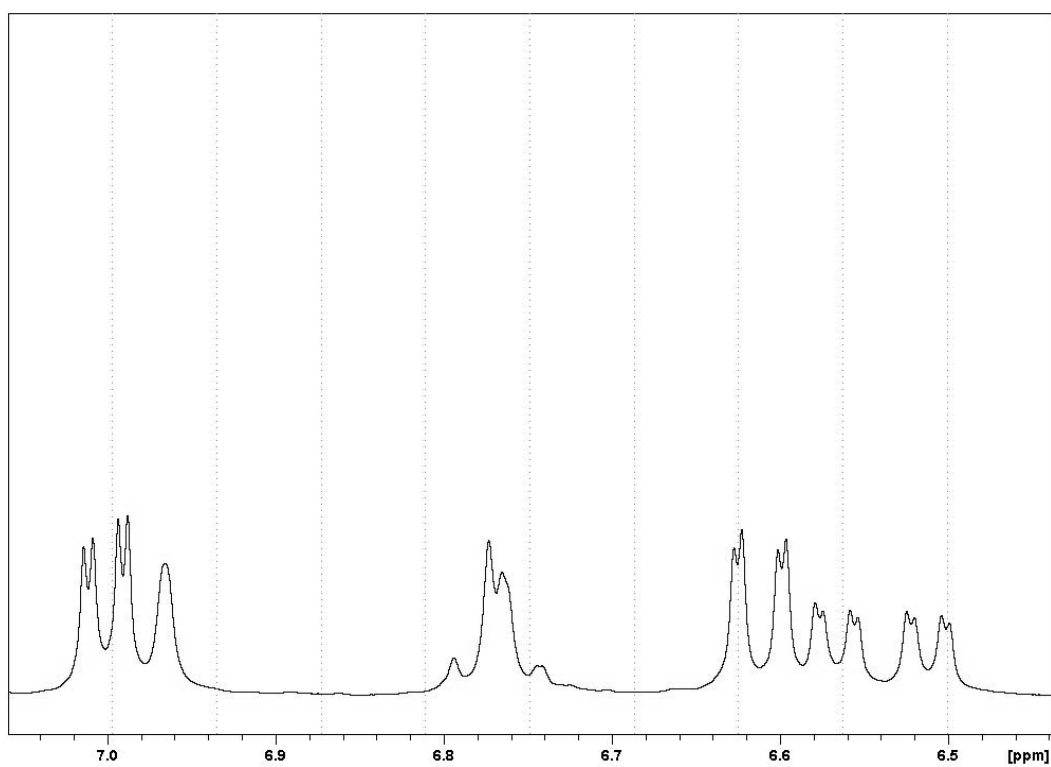


Figura IV – Expansão de RMN ^1H de **1** entre 6,5 - 7,0 ppm (400 MHz, MeOD).

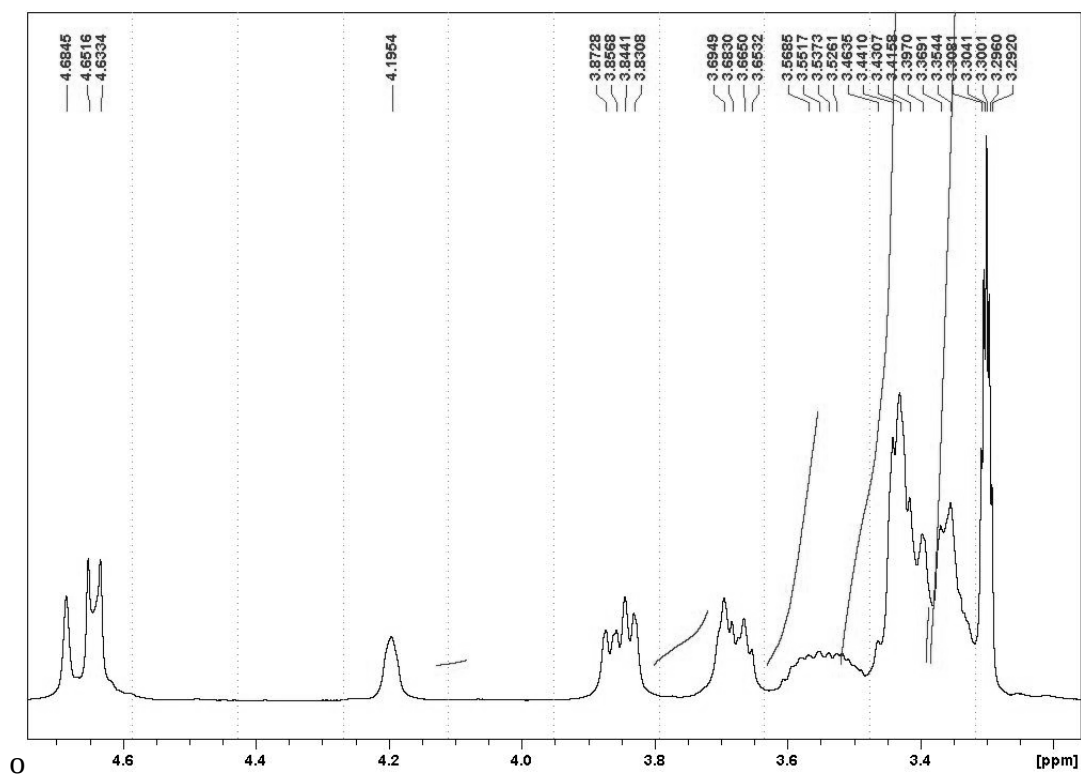


Figura V – Expansão de RMN ^1H de **1** entre 3,4 - 5,0 ppm (400 MHz, MeOD).

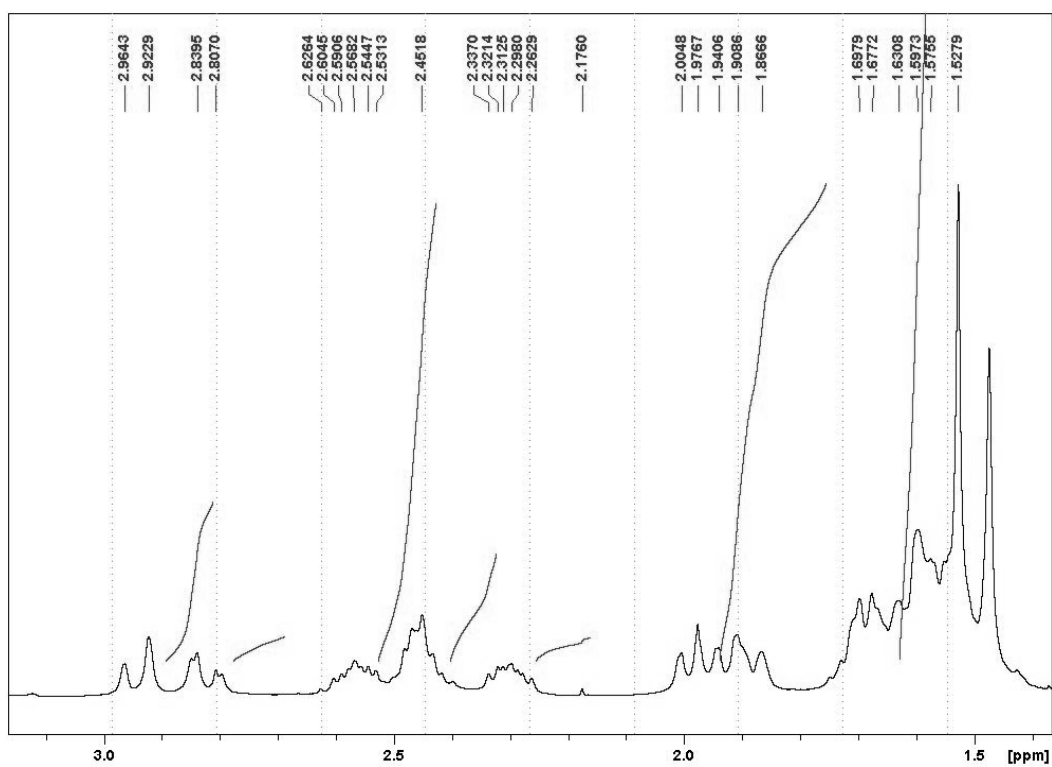


Figura VI – Expansão de RMN ^1H de **1** entre 1,4 - 3,0 ppm (400 MHz, MeOD).

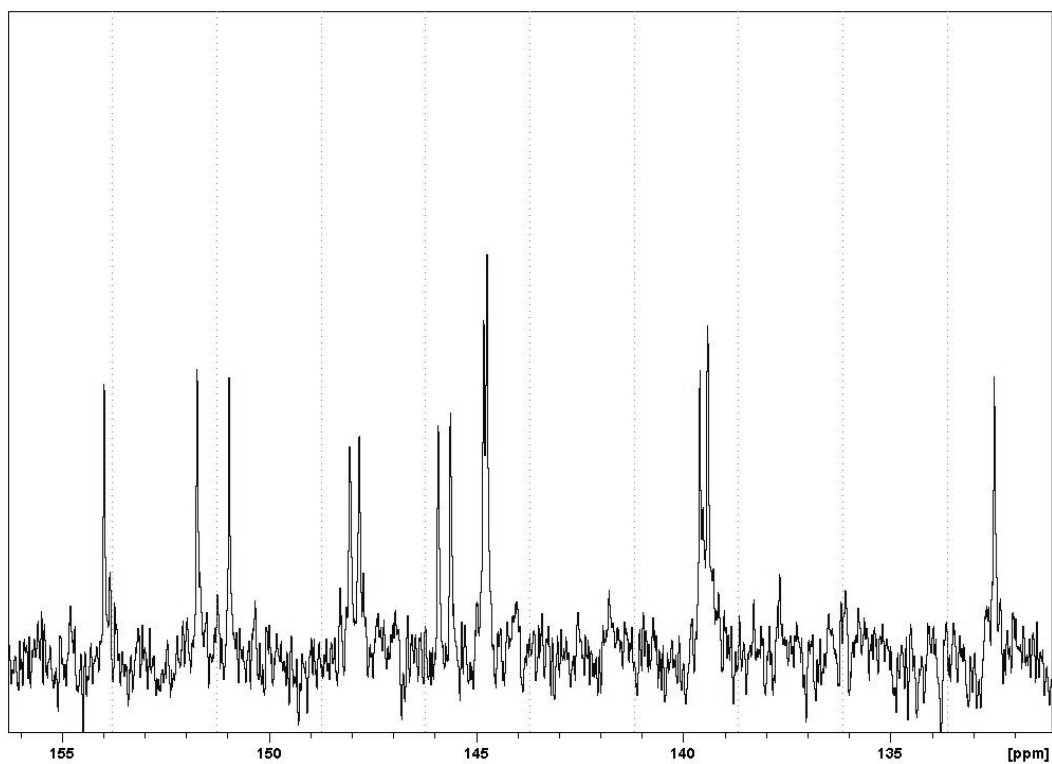


Figura VII – Expansão de RMN ^{13}C de **1** entre 135-155 ppm (75 MHz, MeOD).

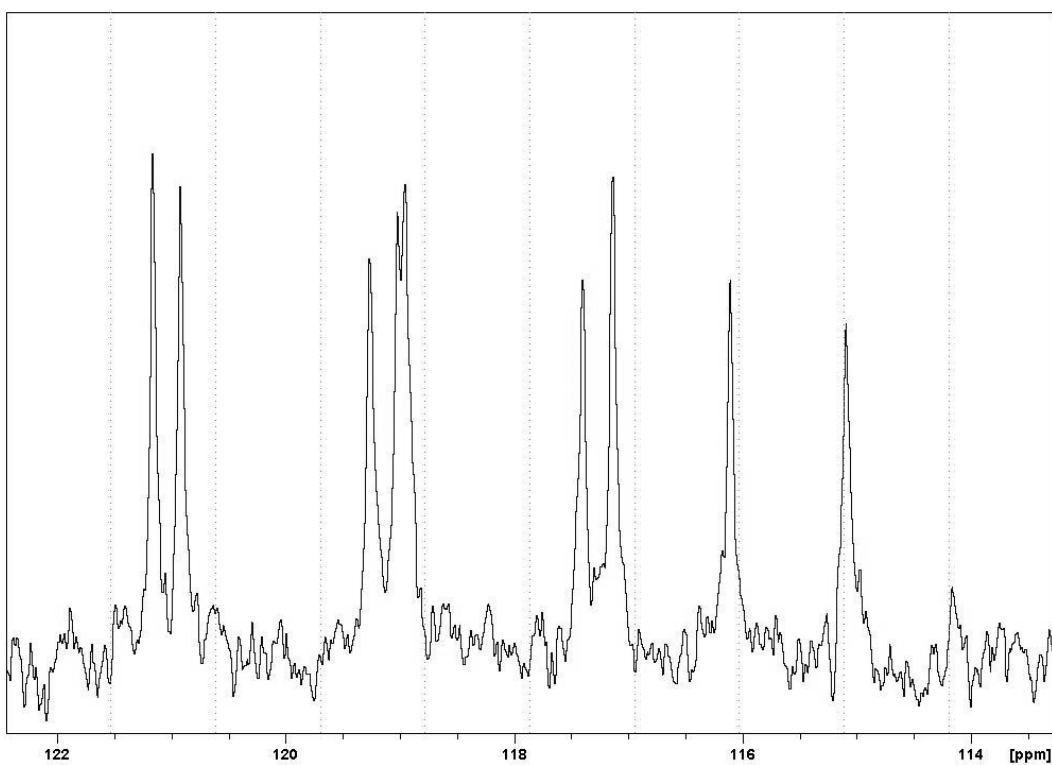


Figura VIII – Expansão de RMN ^{13}C de **1** entre 114 – 122 ppm (100 MHz, MeOD).

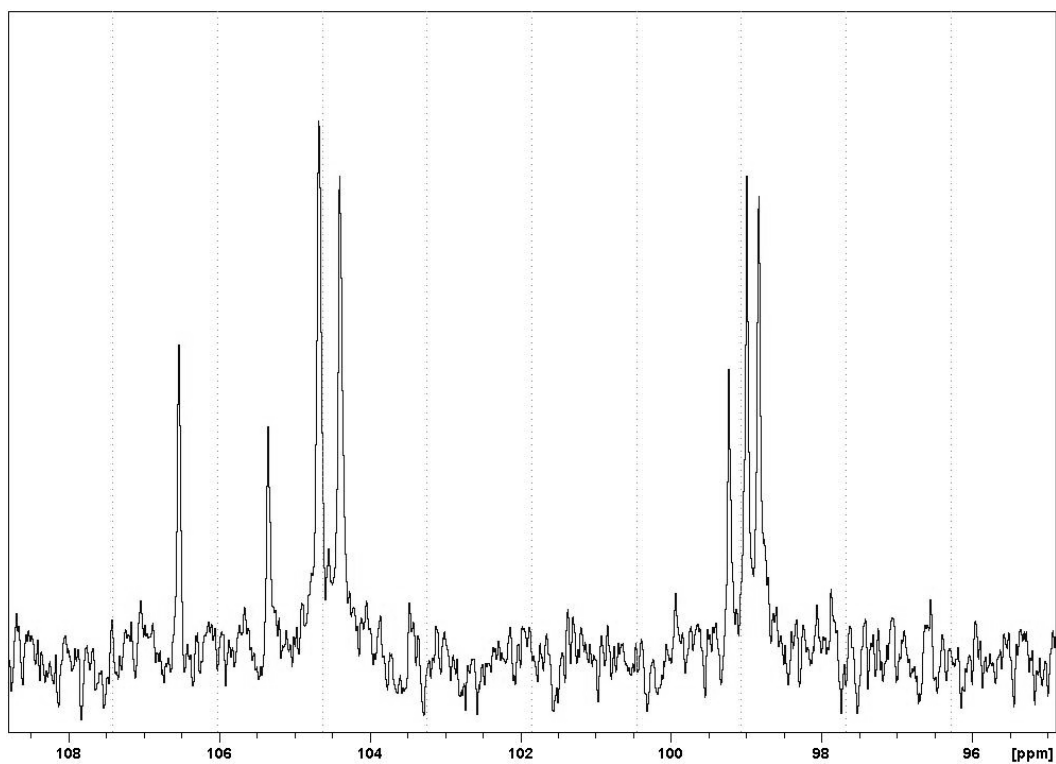


Figura IX – Expansão de RMN ^{13}C de **1** entre 96 – 108 ppm (100 MHz, MeOD).

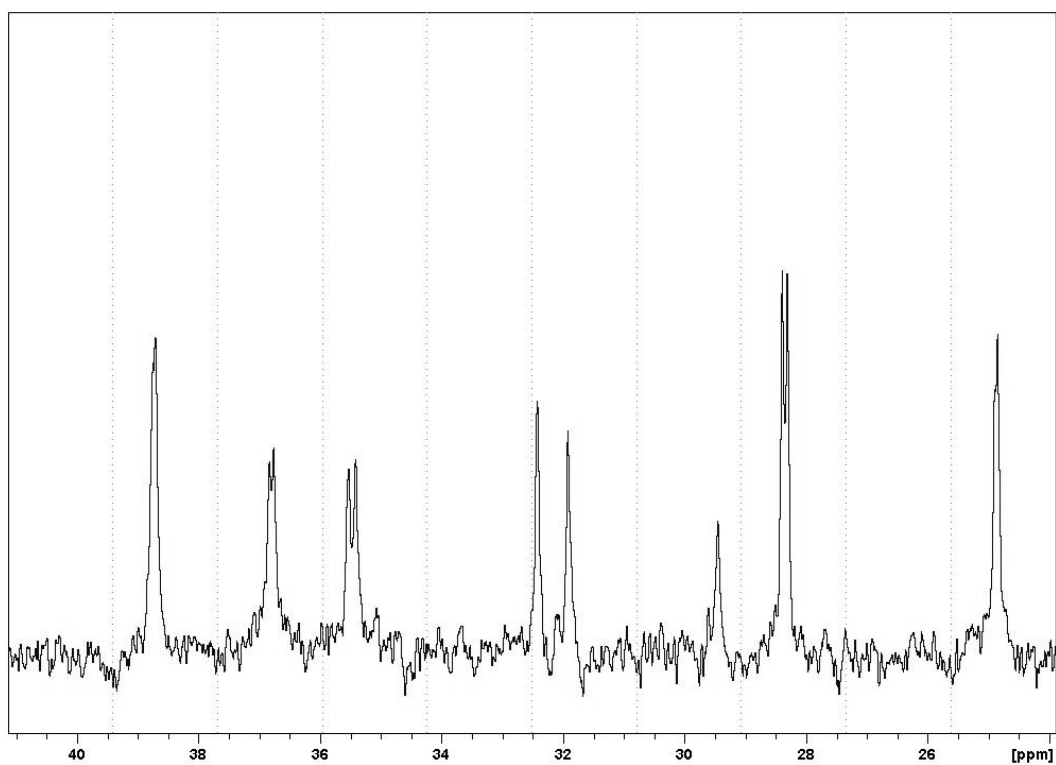


Figura X – Expansão de RMN ^{13}C de **1** entre 24 – 40 ppm (100 MHz, MeOD).

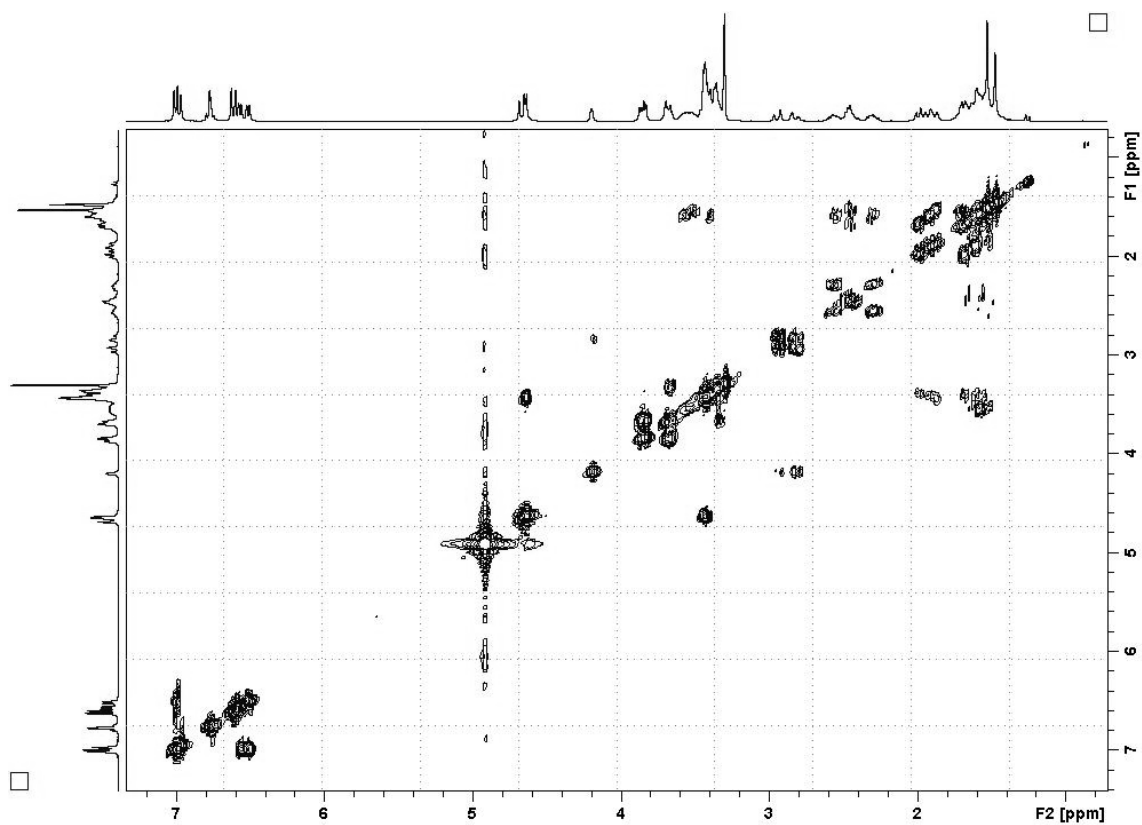


Figura XI – Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY 90° de **1** entre 1 – 7 ppm (400 MHz, MeOD).

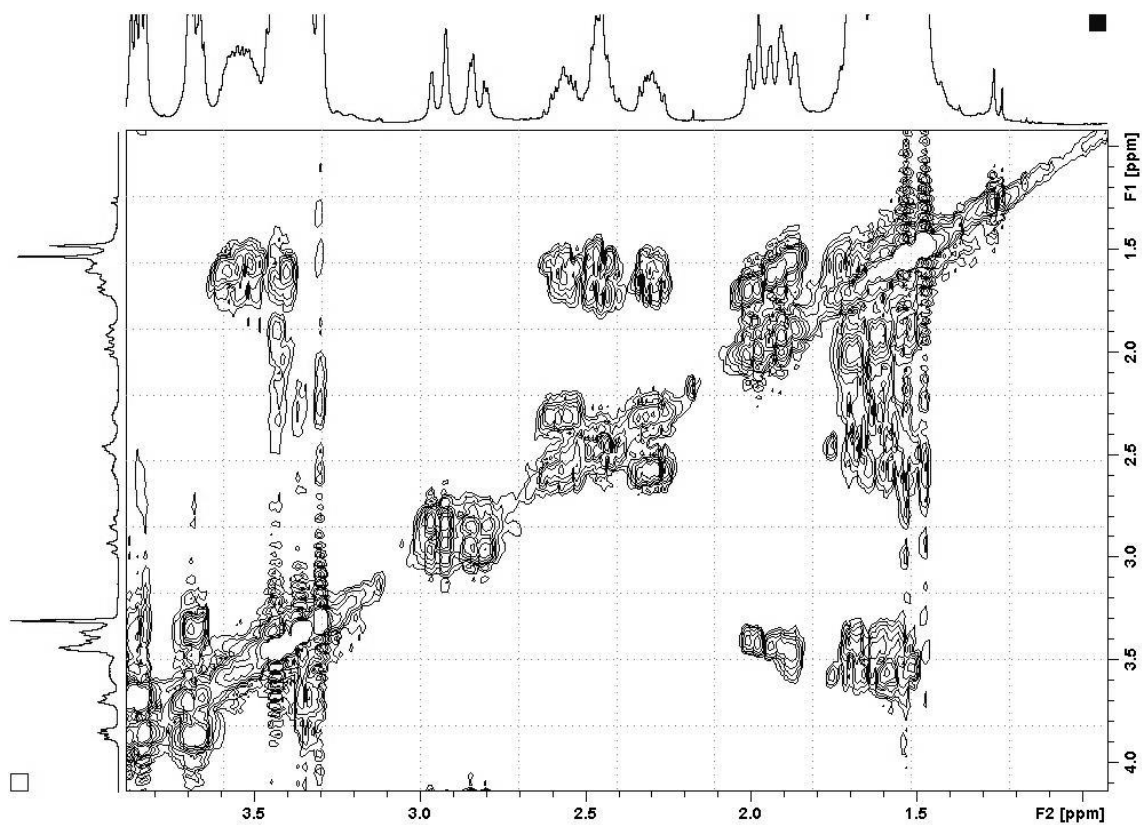


Figura XII – Expansão do ^1H - ^1H COSY 90° de **1** entre 1 – 7 ppm (400 MHz, MeOD).

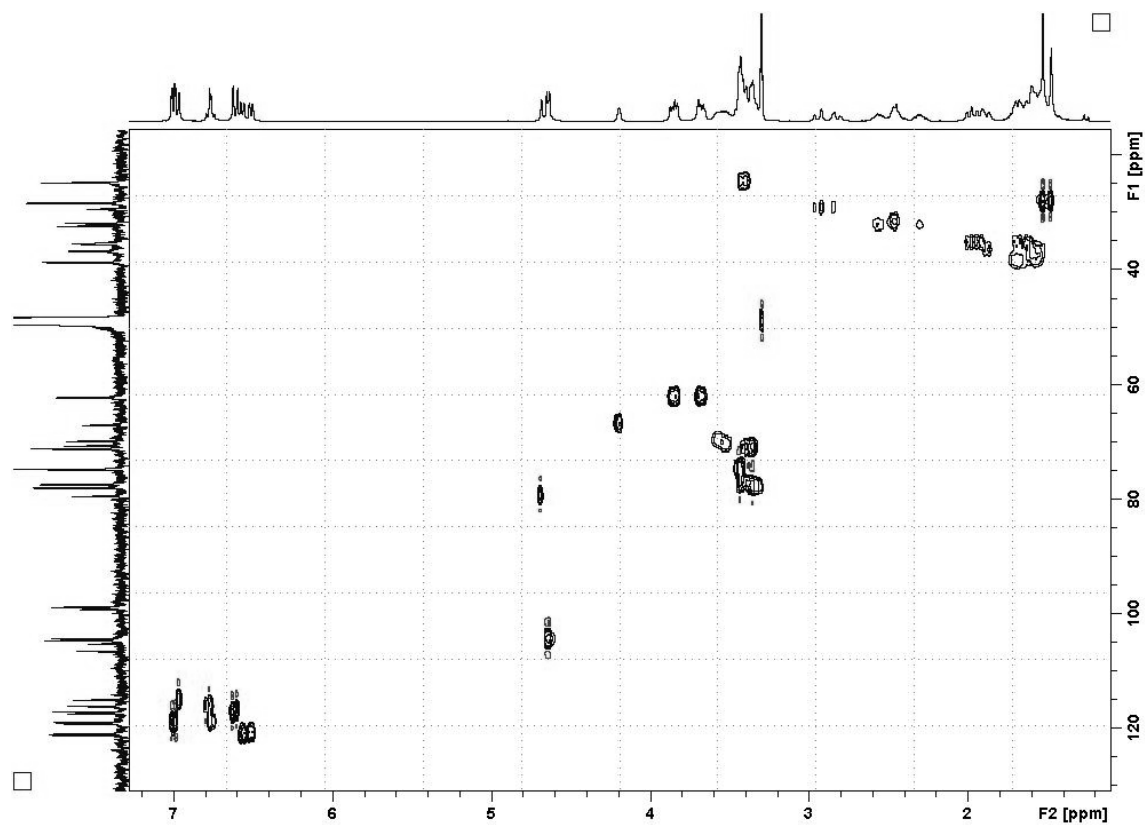


Figura XIII – ^1H - ^{13}C HSQC de **1** (400 MHz, MeOD).

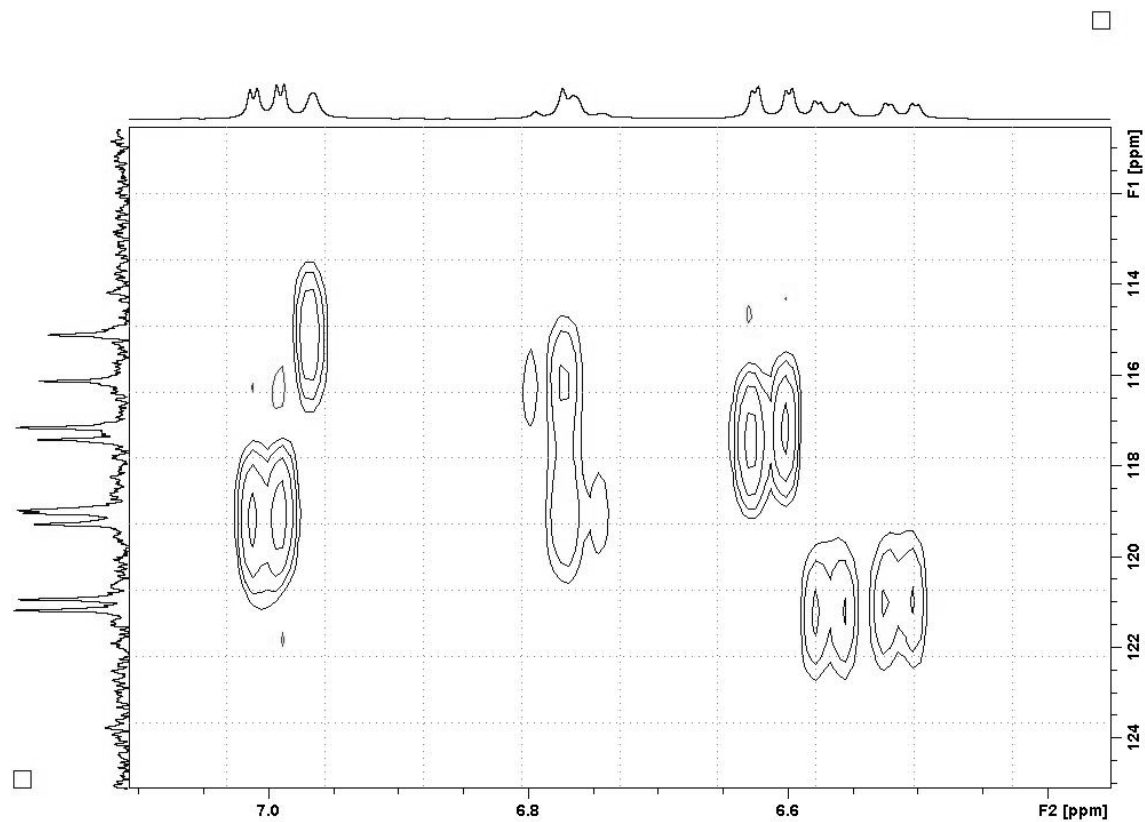


Figura XIV – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de **1** (400 MHz, MeOD).

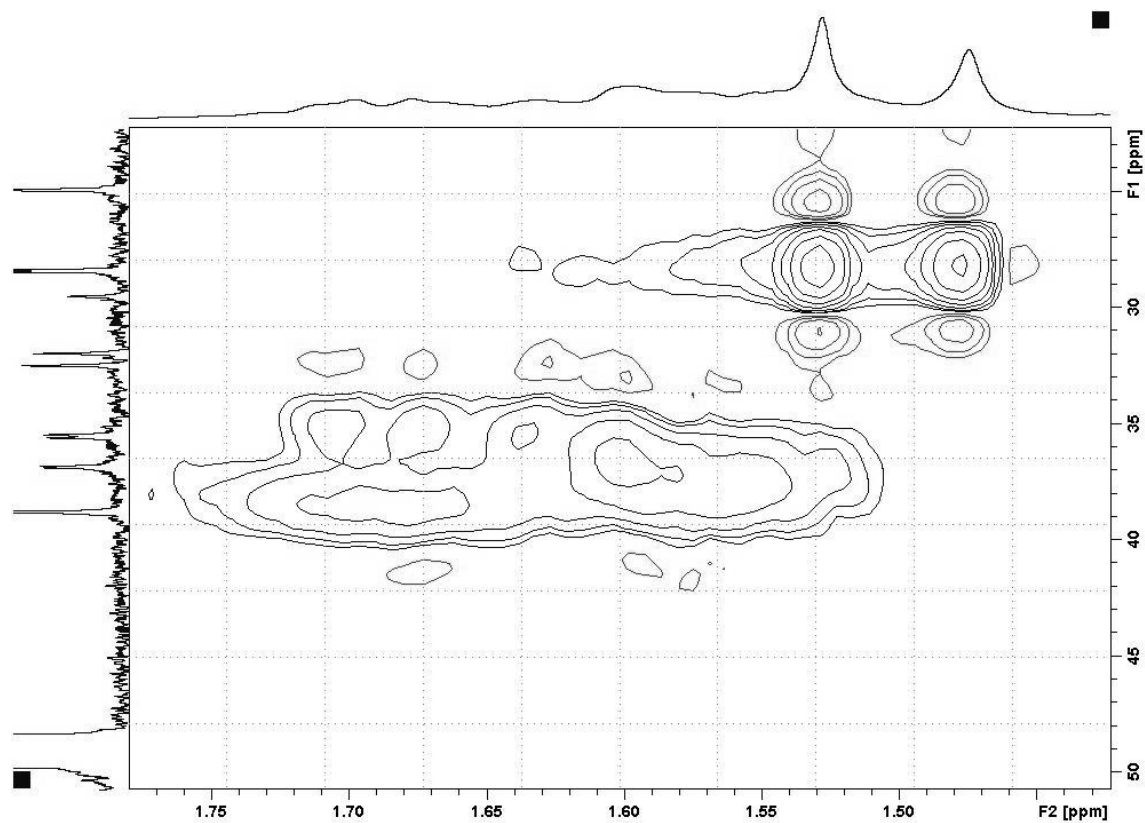


Figura XV – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de **1** (400 MHz, MeOD).

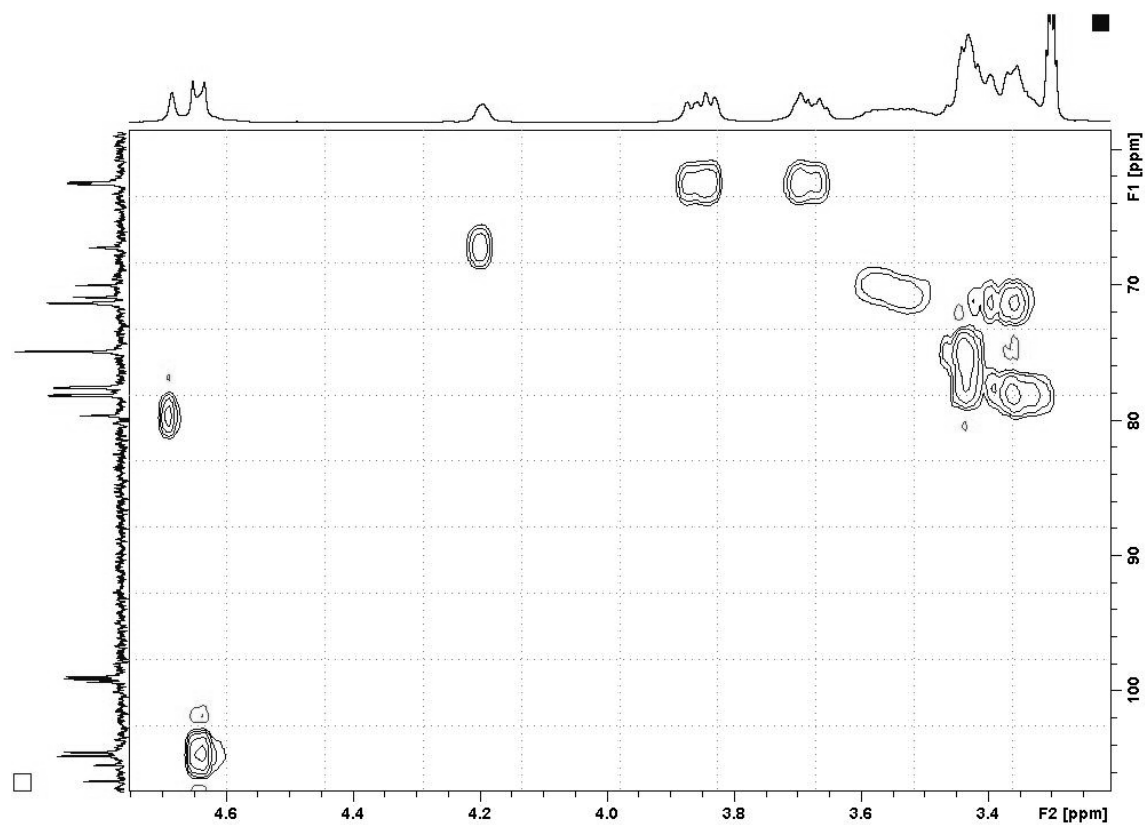


Figura XVI – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de **1** (400 MHz, MeOD).

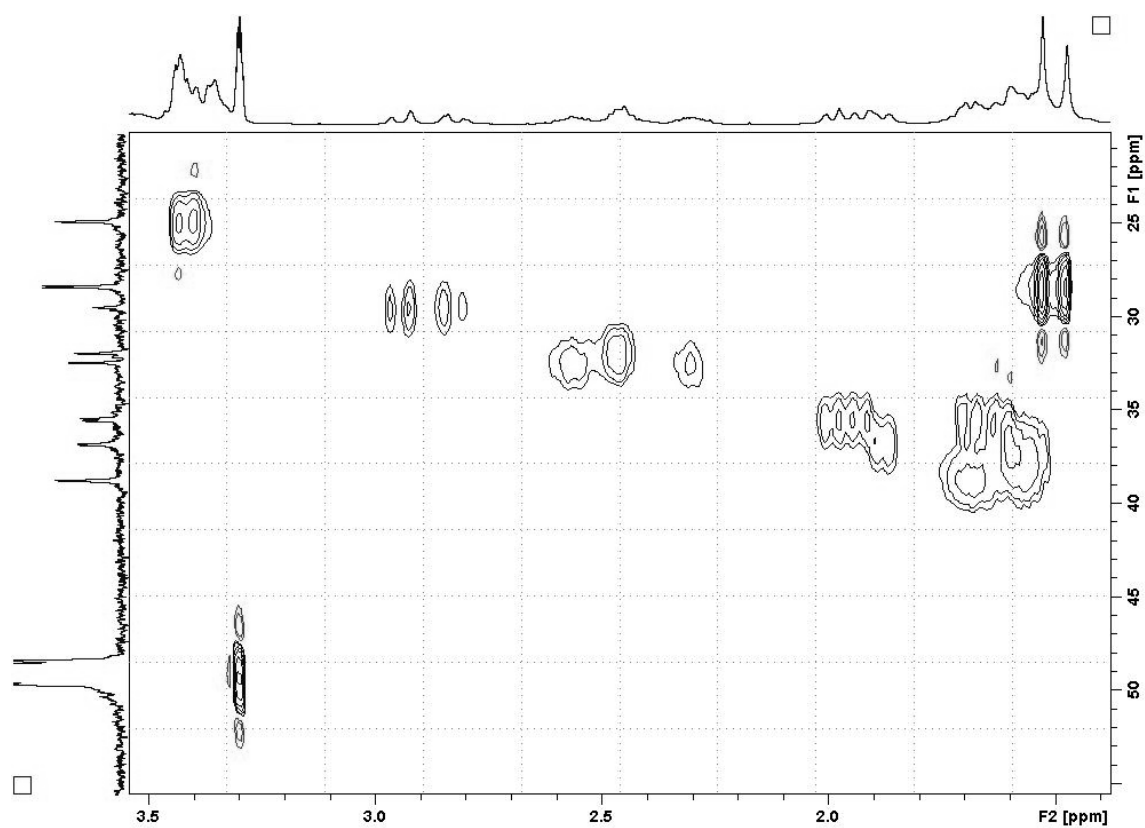


Figura XVII – Expansão do ^1H - ^{13}C HSQC de **1** (400 MHz, MeOD).

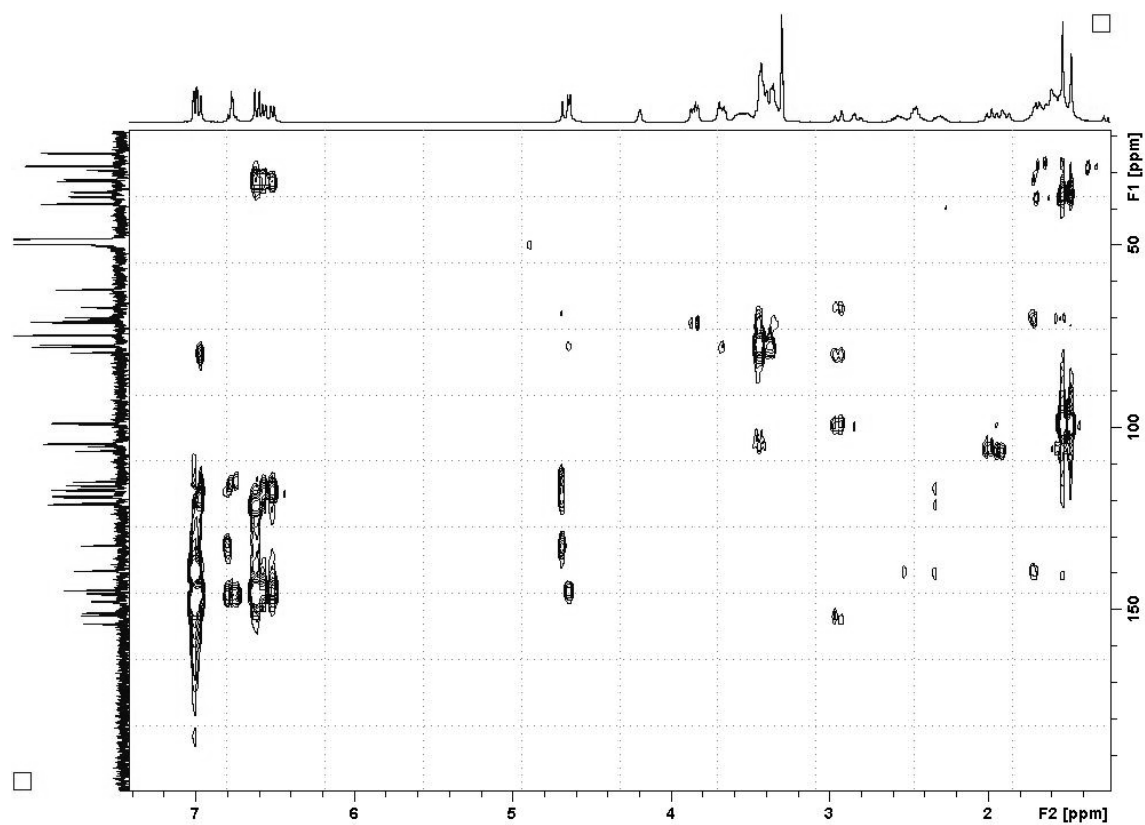


Figura XVIII – Espectro de ^1H - ^{13}C HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

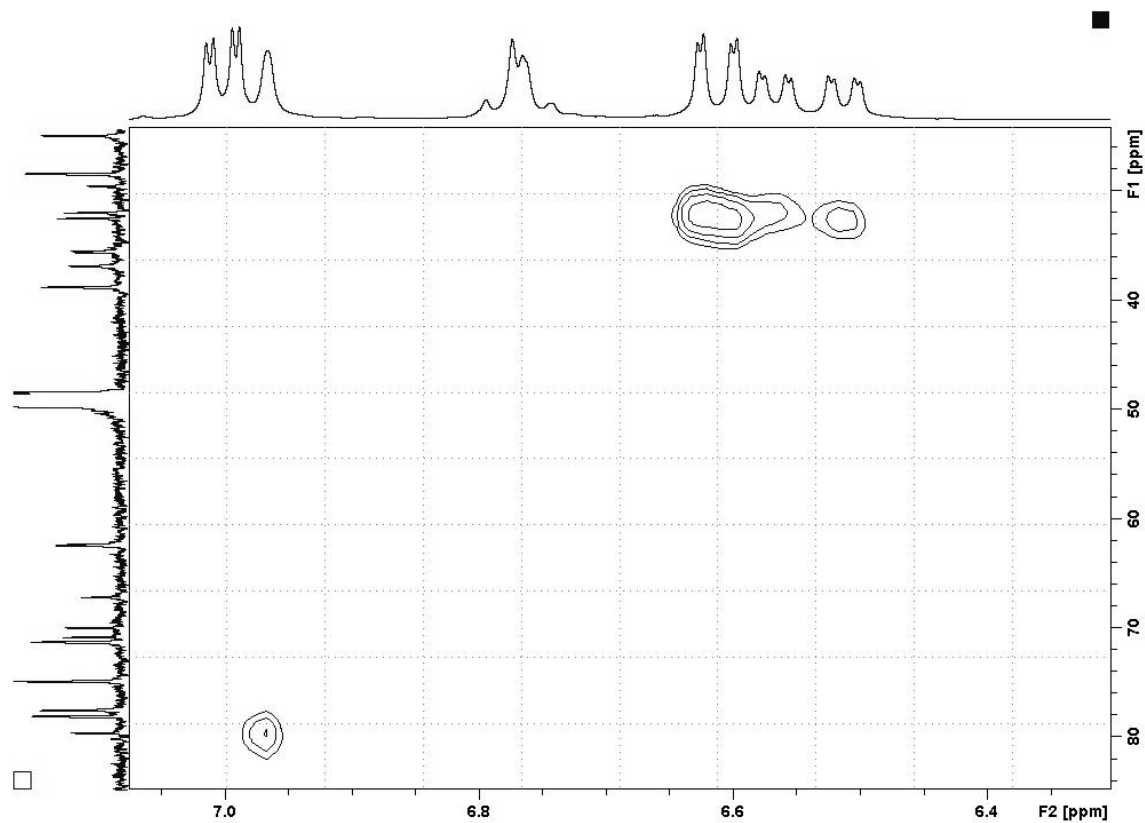


Figura XIX – Expansão do H-¹³C HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

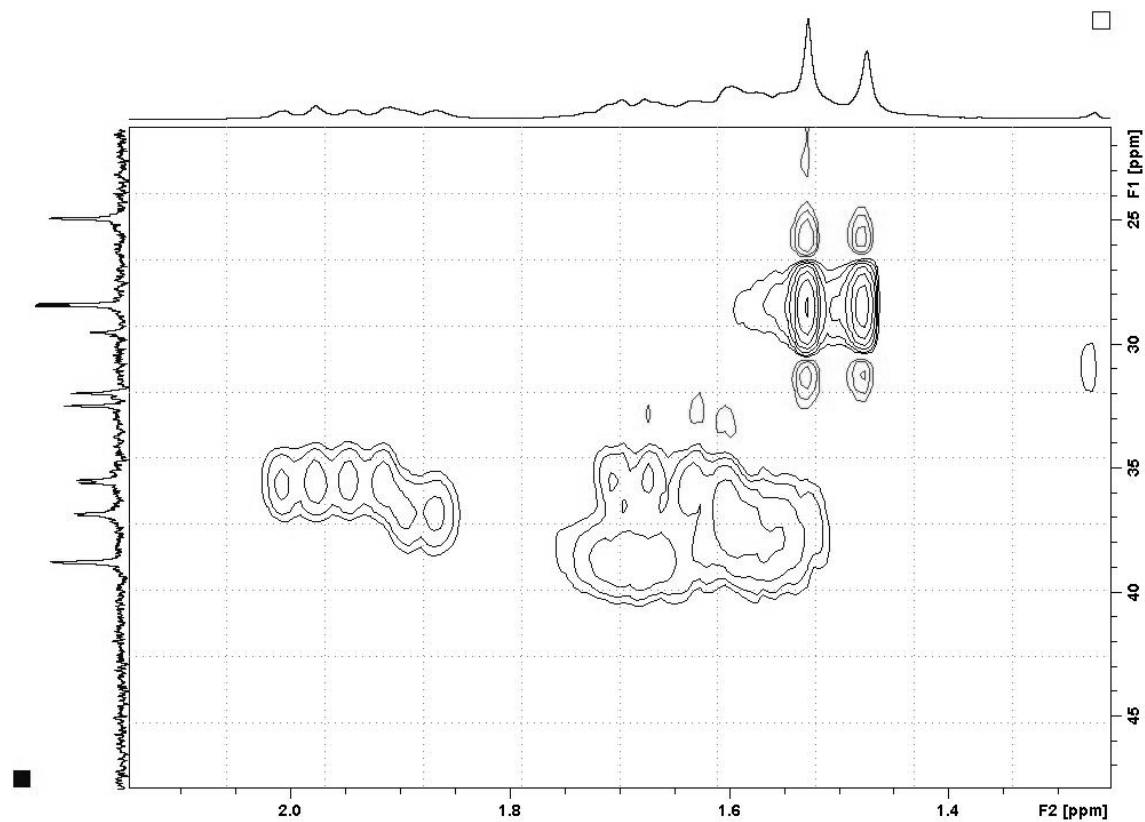


Figura XX – Expansão do H-¹³C HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

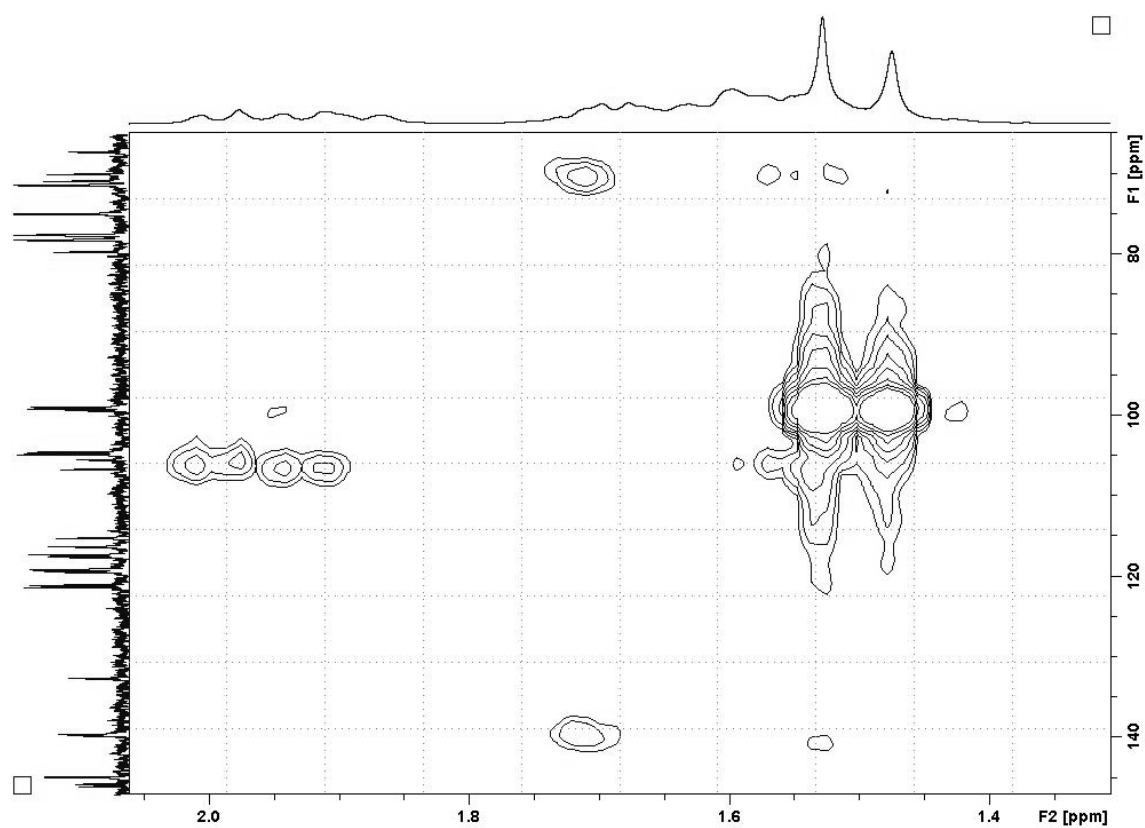


Figura XXI – Expansão do H-¹³C HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

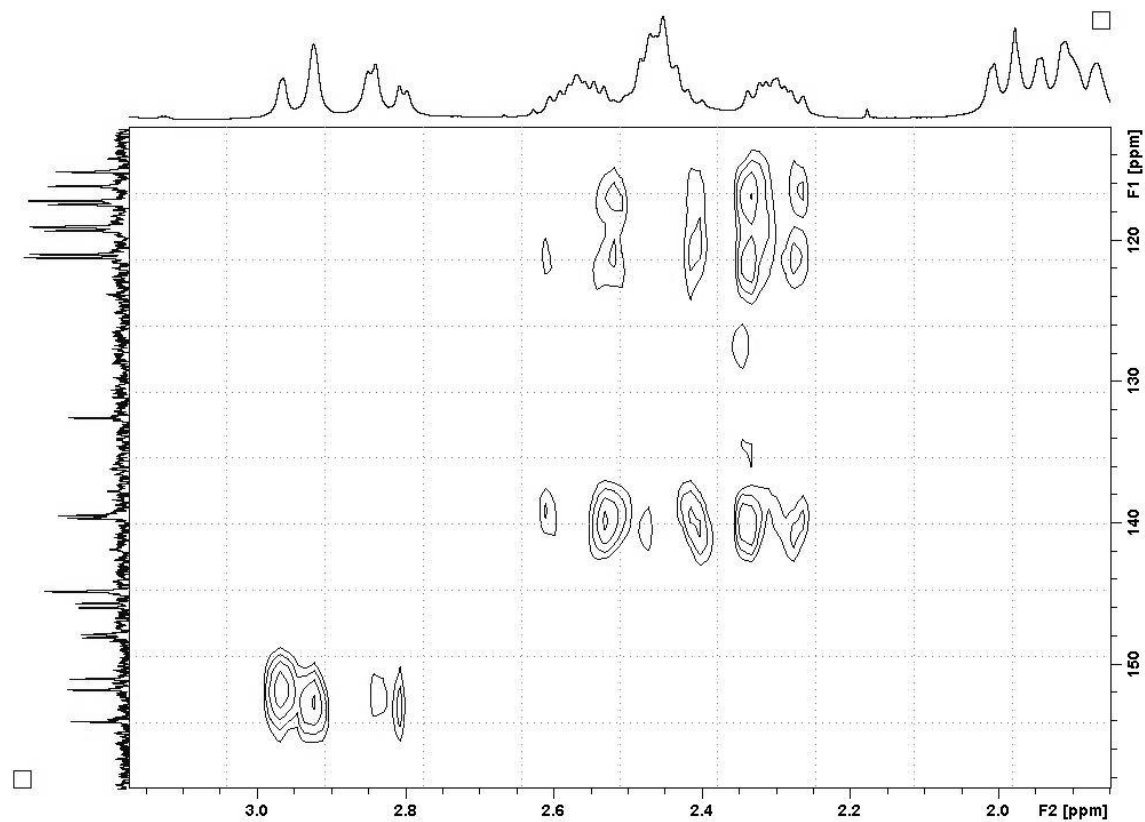


Figura XXII – Expansão do H-¹³C HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

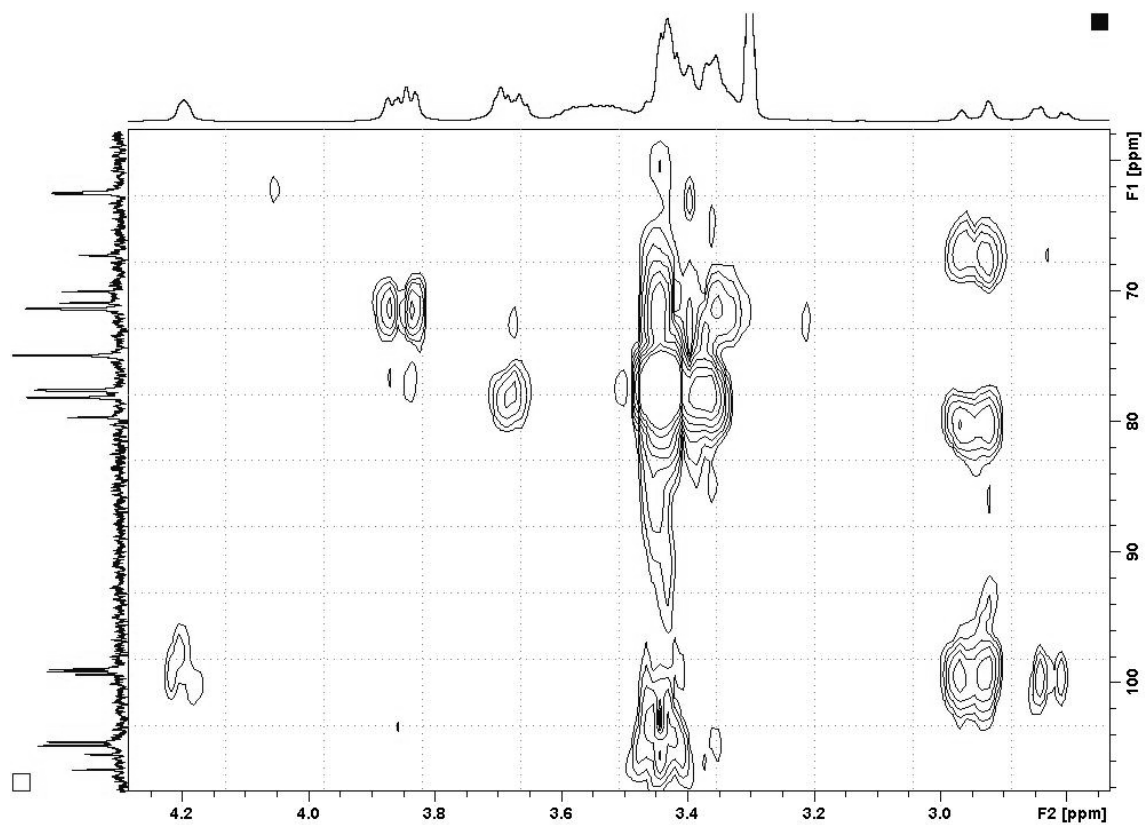


Figura XXIII – Expansão do $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

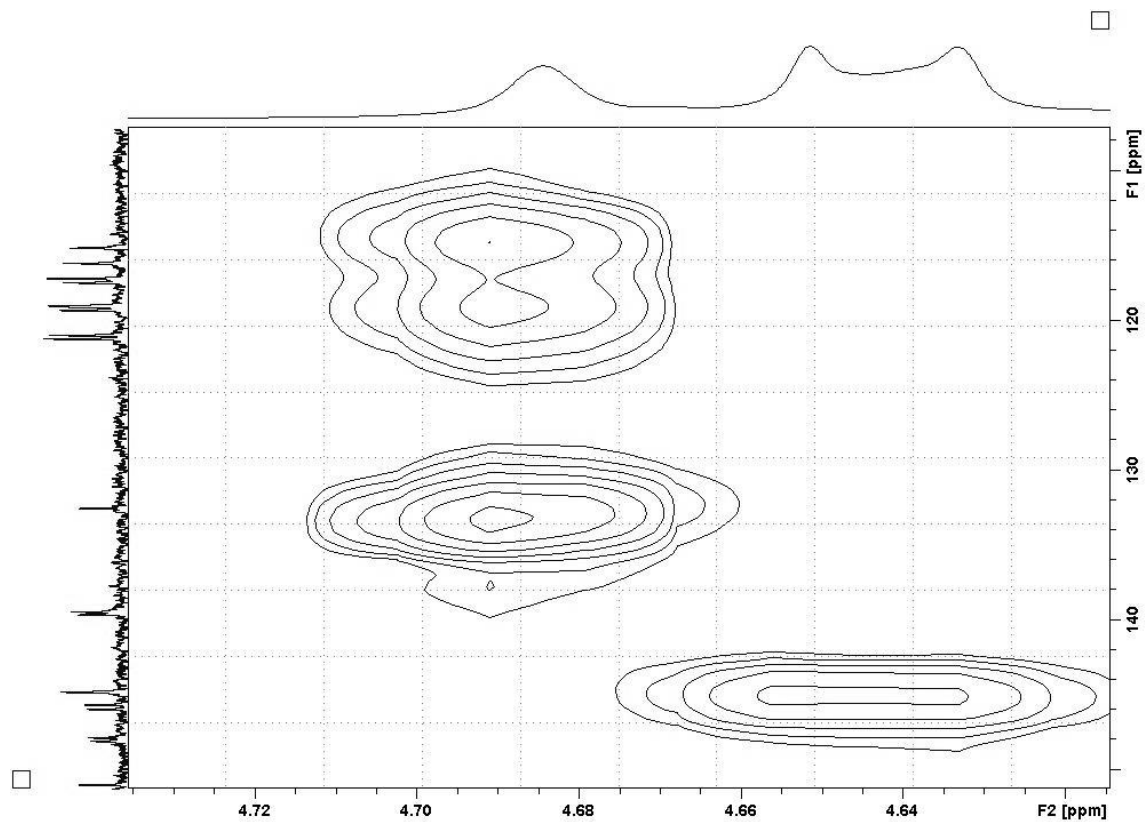


Figura XXIV – Expansão do $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

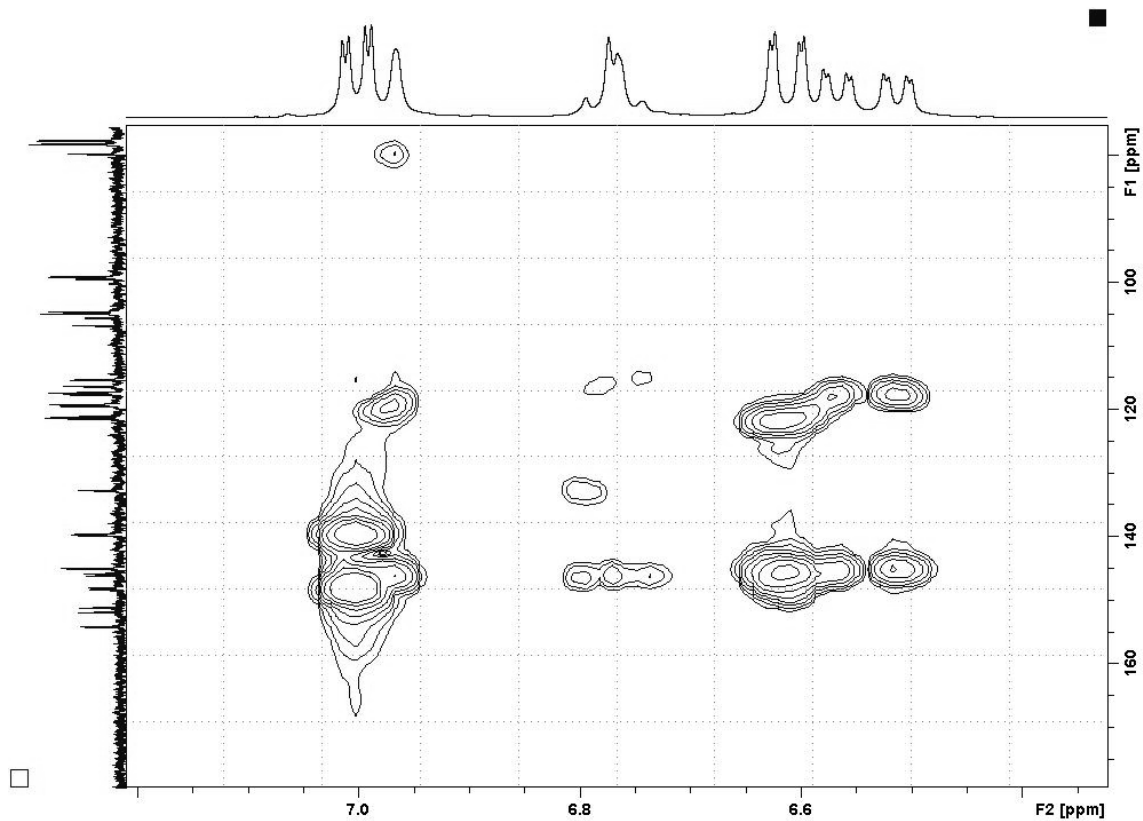


Figura XXV – Expansão do $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

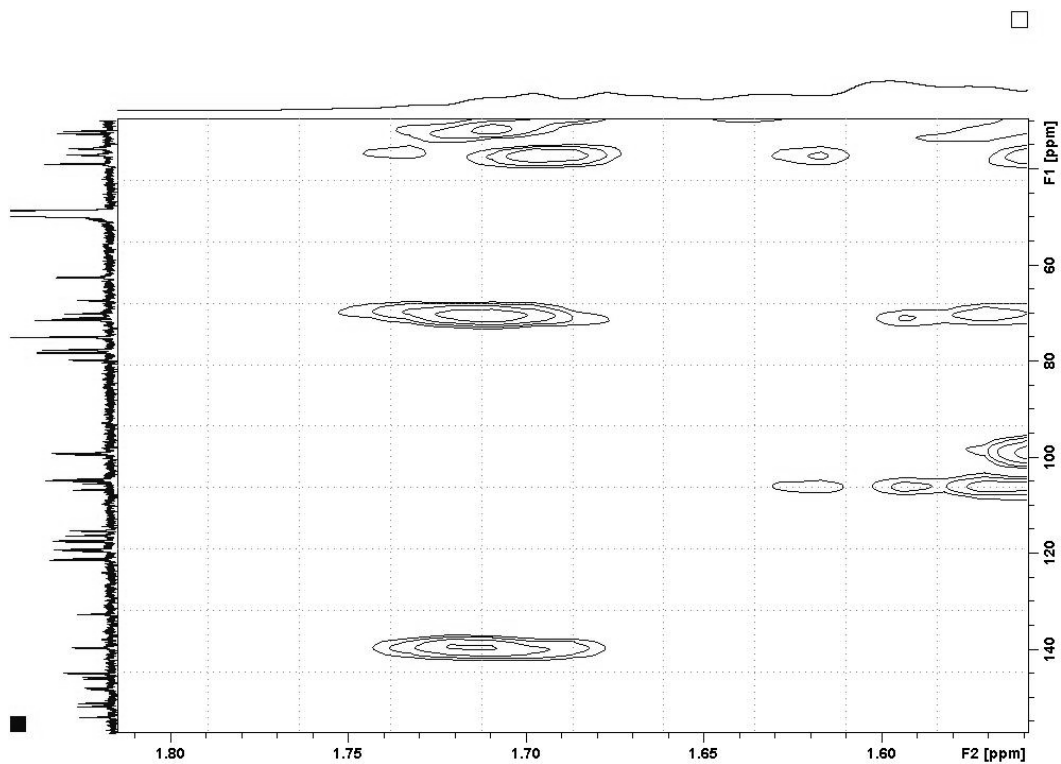


Figura XXVI – Expansão do $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de **1** (400 MHz, MeOD).

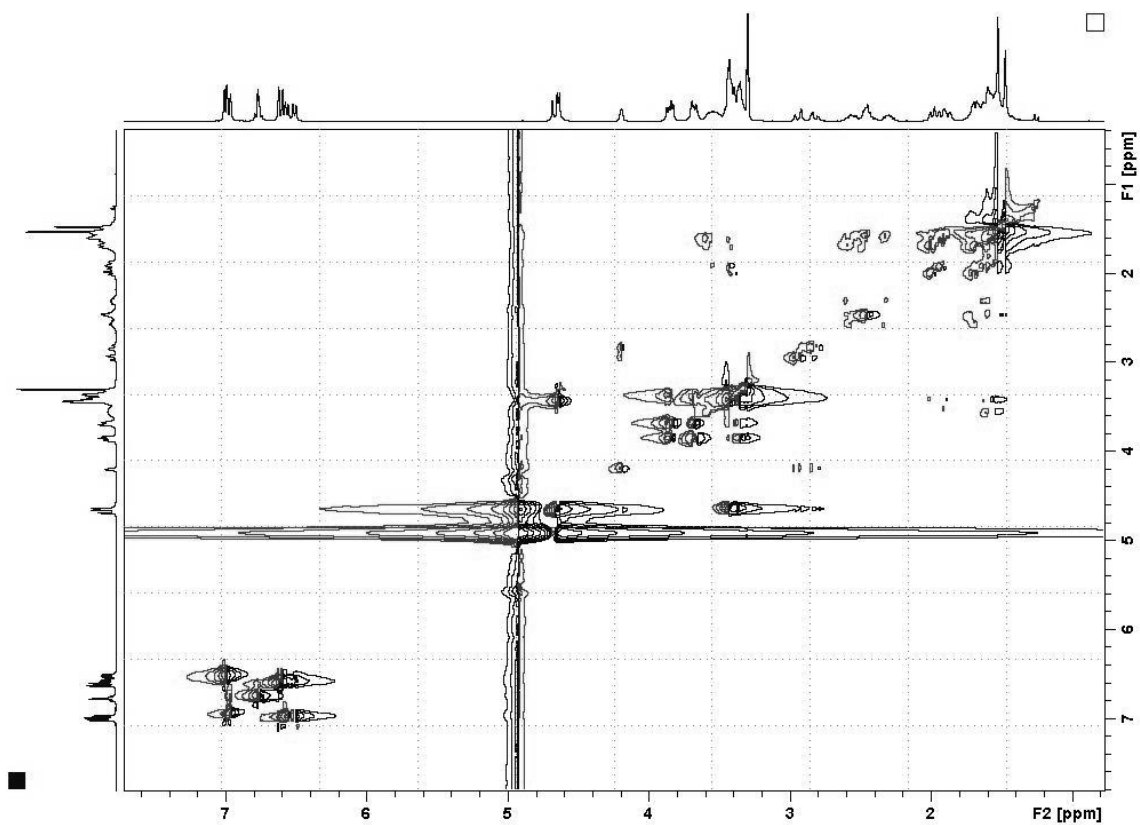


Figura XXVII – ^1H - ^1H NOESY de **1** (400 MHz, MeOD).

ESPECTROS DE RMN DA SUBSTÂNCIA 2

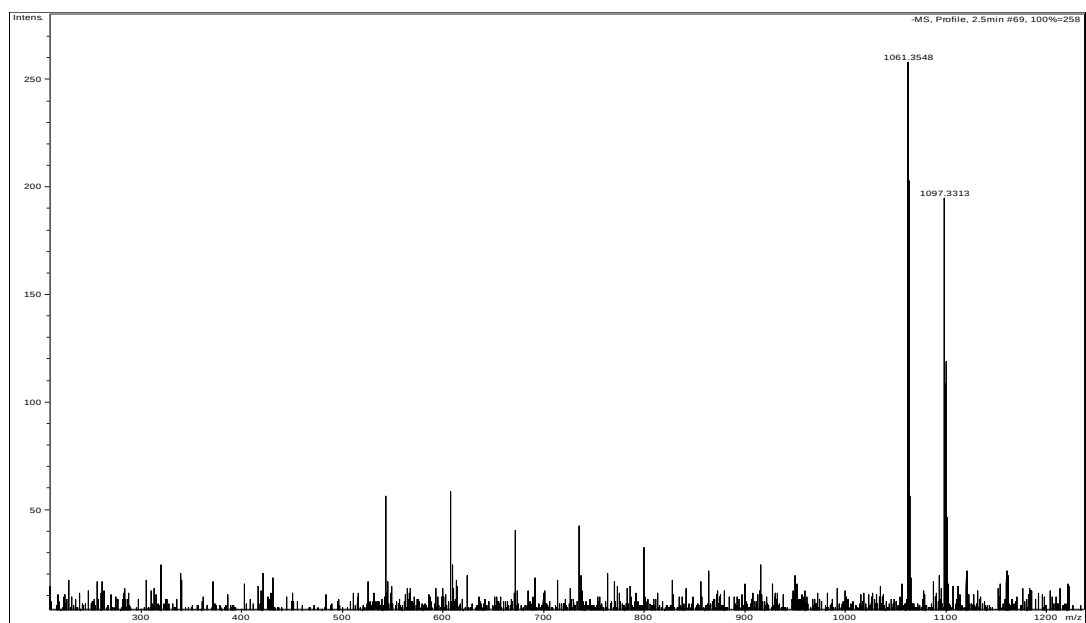


Figura A – Espectro de Massas de 2 (Eletrospray- modo negativo).

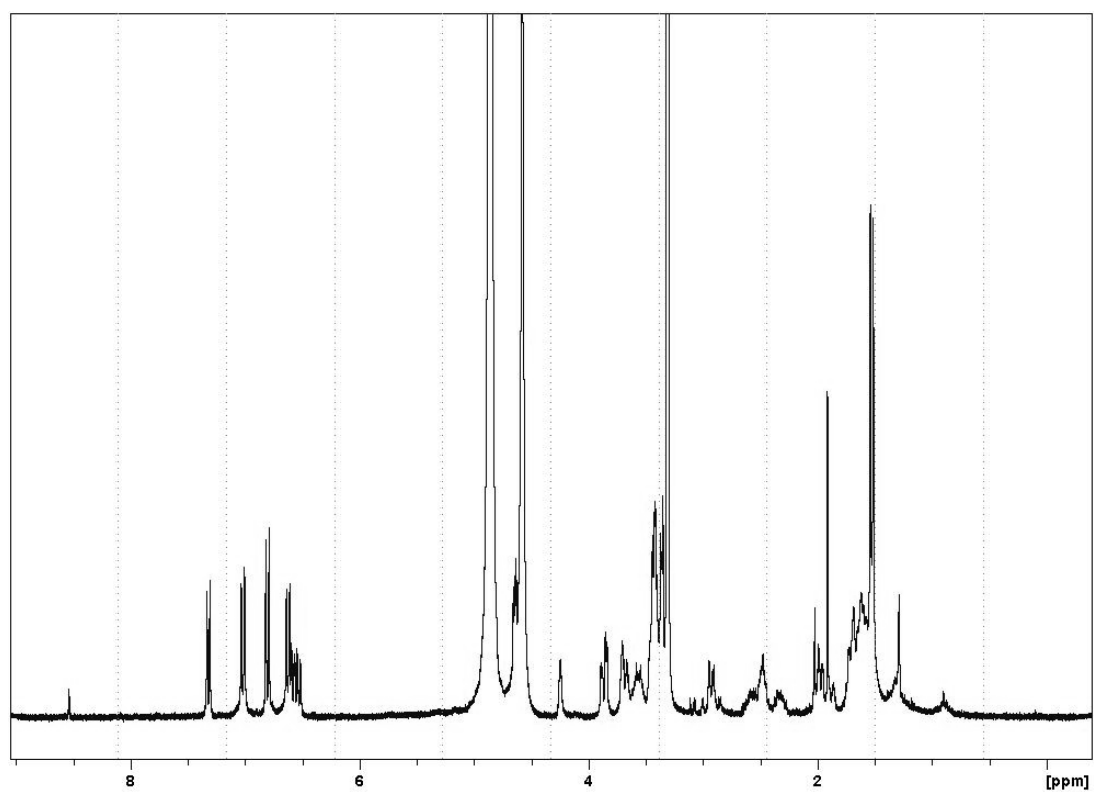


Figura B – Espectro de RMN de ^1H de 2 (300 MHz, MeOD).

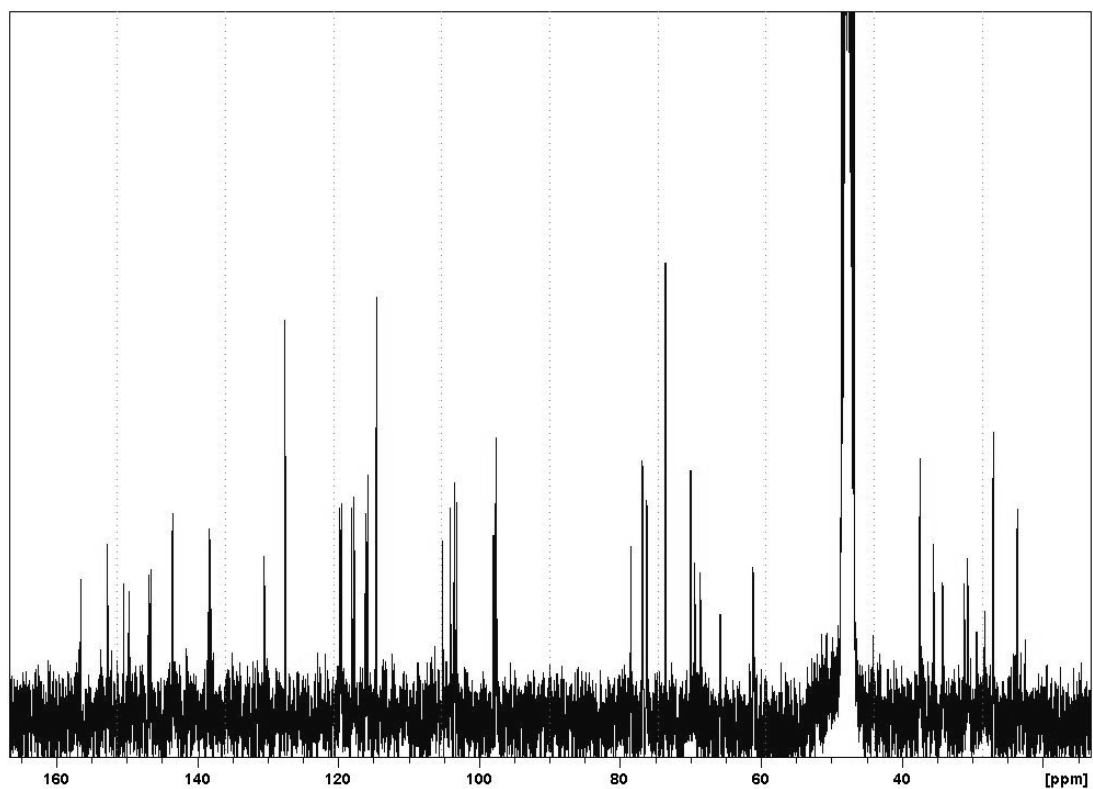


Figura C – Espectro de RMN de ^{13}C de 2 (75 MHz, MeOD).

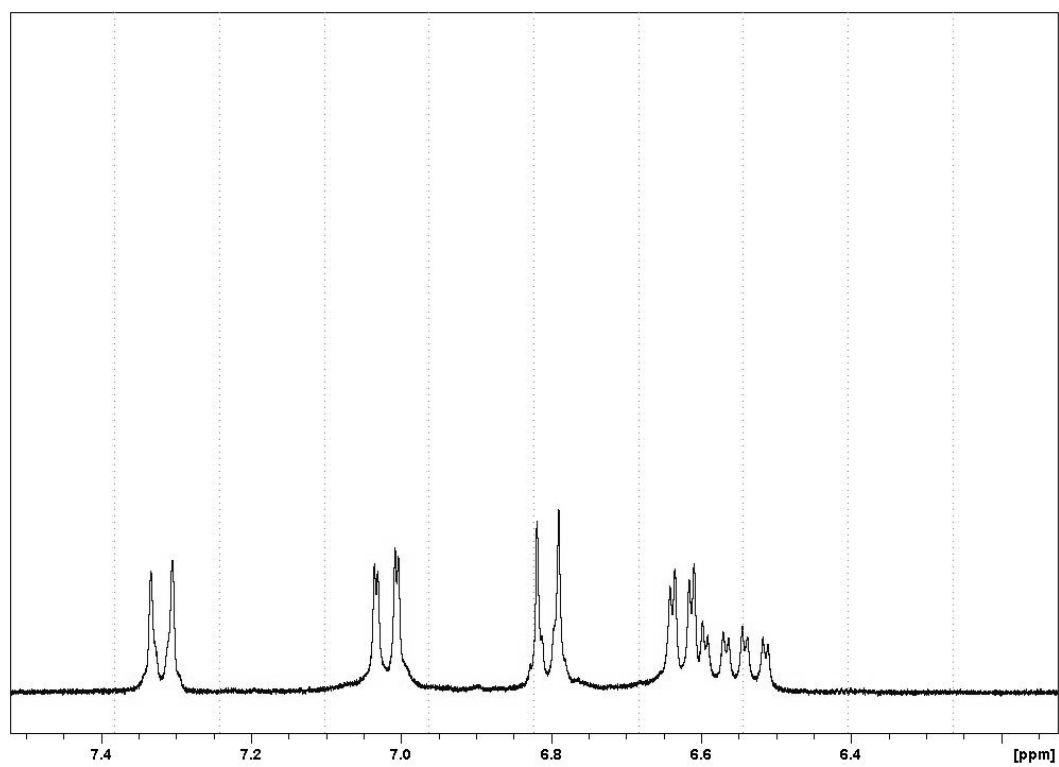


Figura D – Expansão de RMN ^1H de 2 entre 6,4 - 7,4 ppm (300 MHz, MeOD).

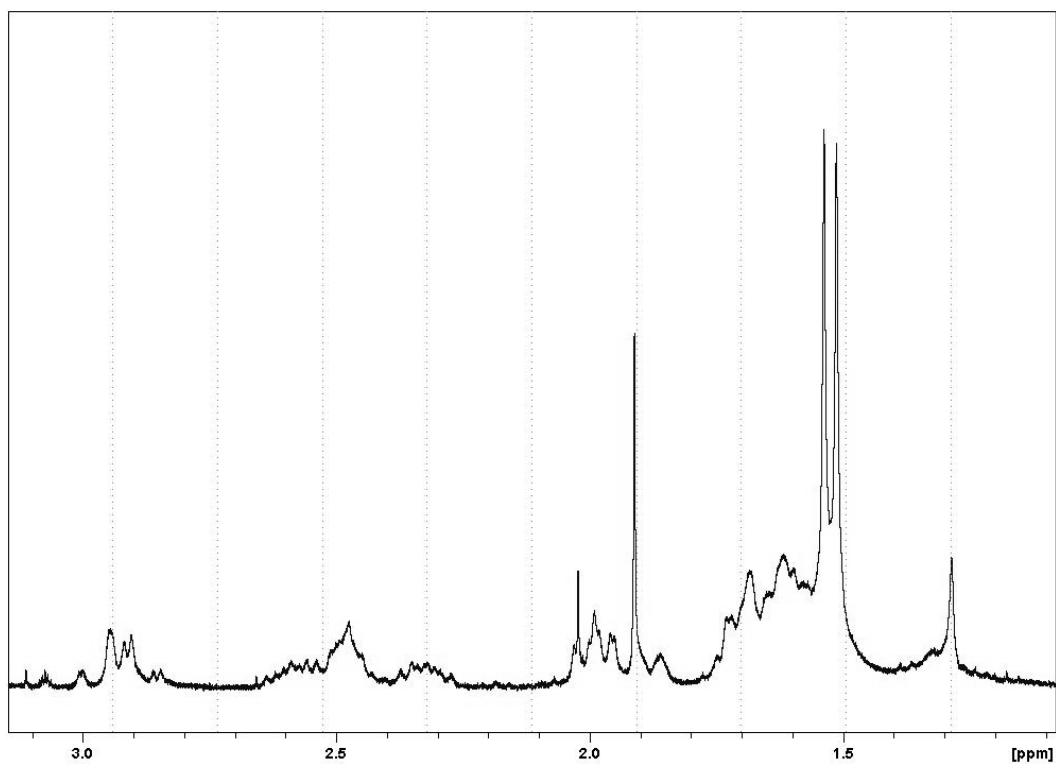


Figura E – Expansão de RMN ^1H de **2** entre 1,0 – 3,1 ppm (300 MHz , MeOD).

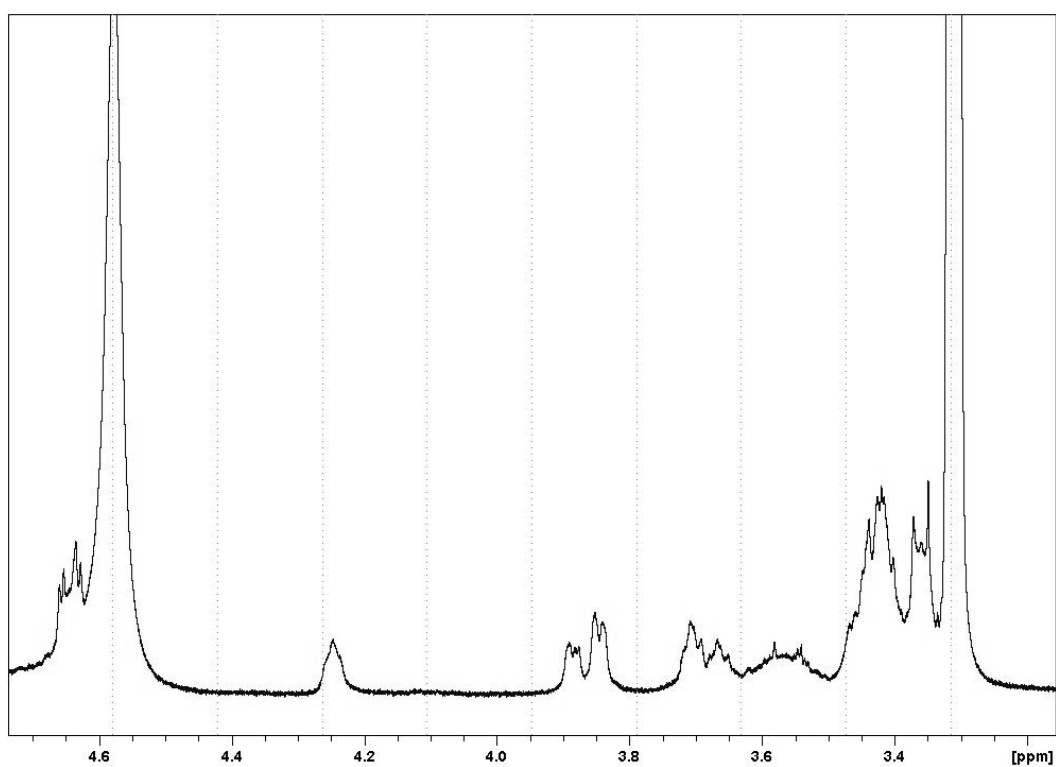


Figura F – Expansão de RMN ^1H de **2** entre 3,0 – 4,8 ppm (300 MHz , MeOD).

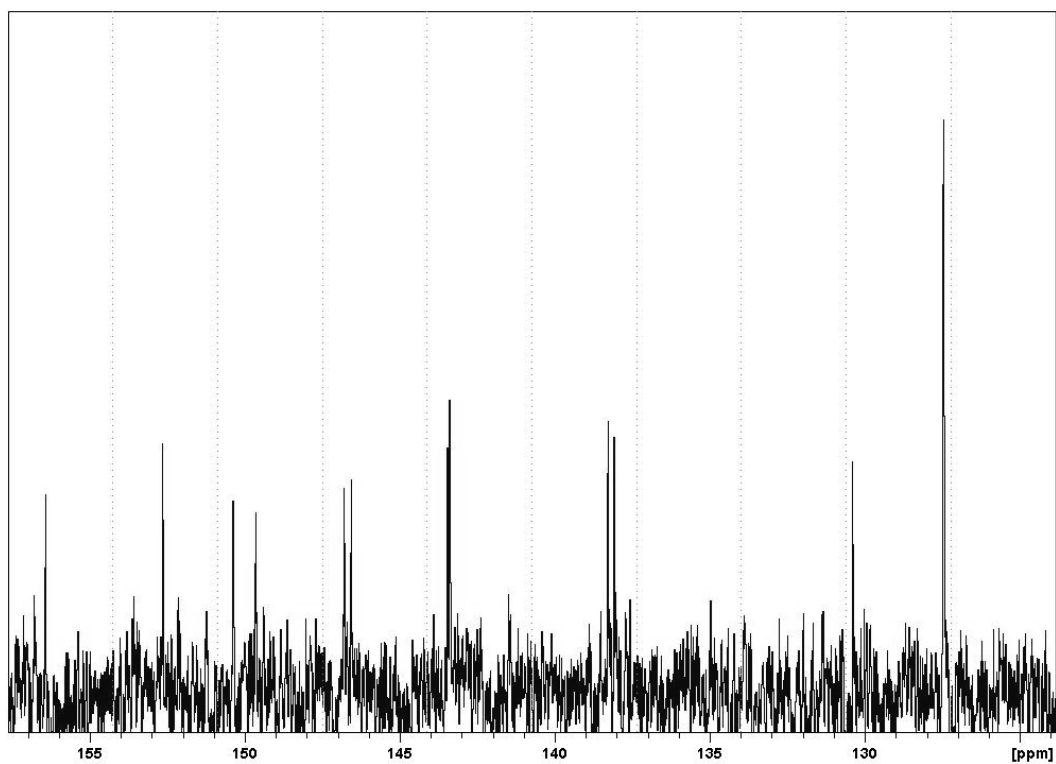


Figura G – Expansão de RMN ^{13}C de **2** entre 125-158 ppm (75 MHz , MeOD).

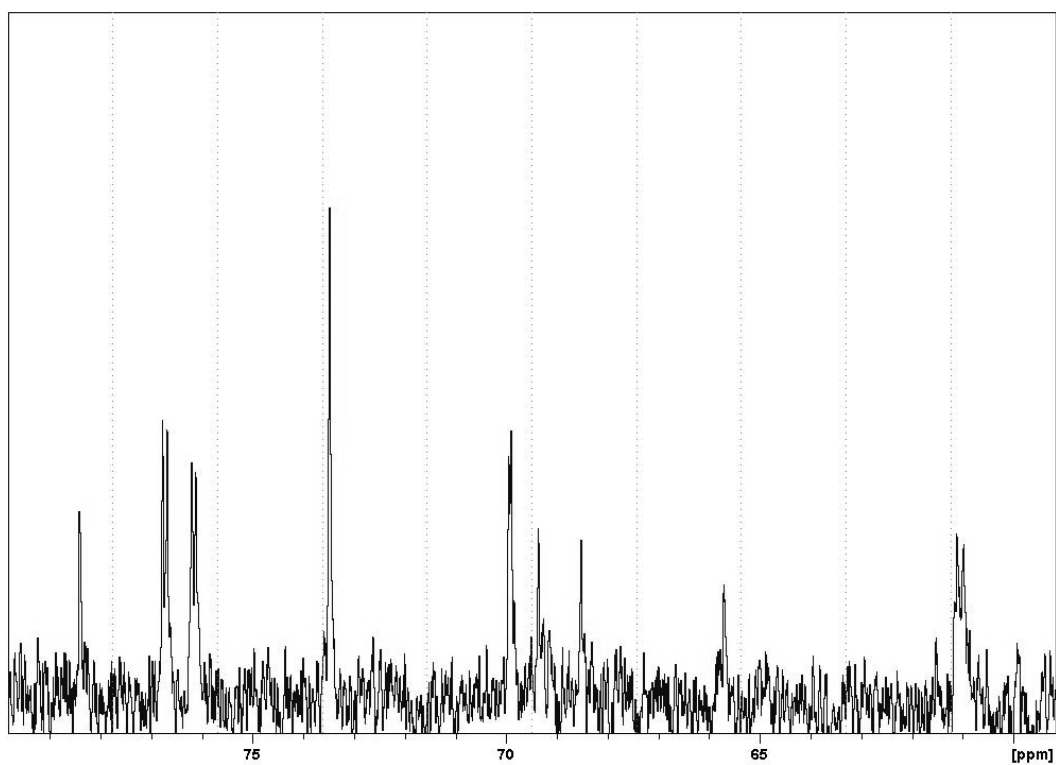


Figura H – Expansão de RMN ^{13}C de **2** entre 60-80 ppm (75 MHz , MeOD).

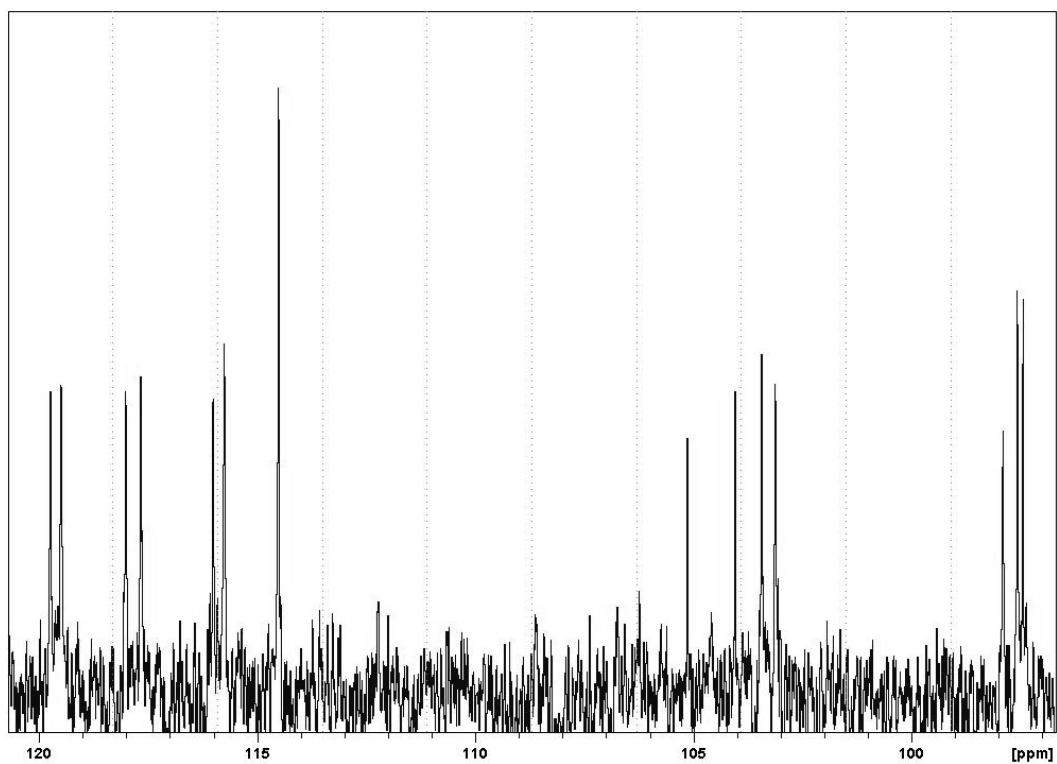


Figura I – Expansão de RMN ^{13}C de **2** entre 95-120 ppm (75 MHz , MeOD).

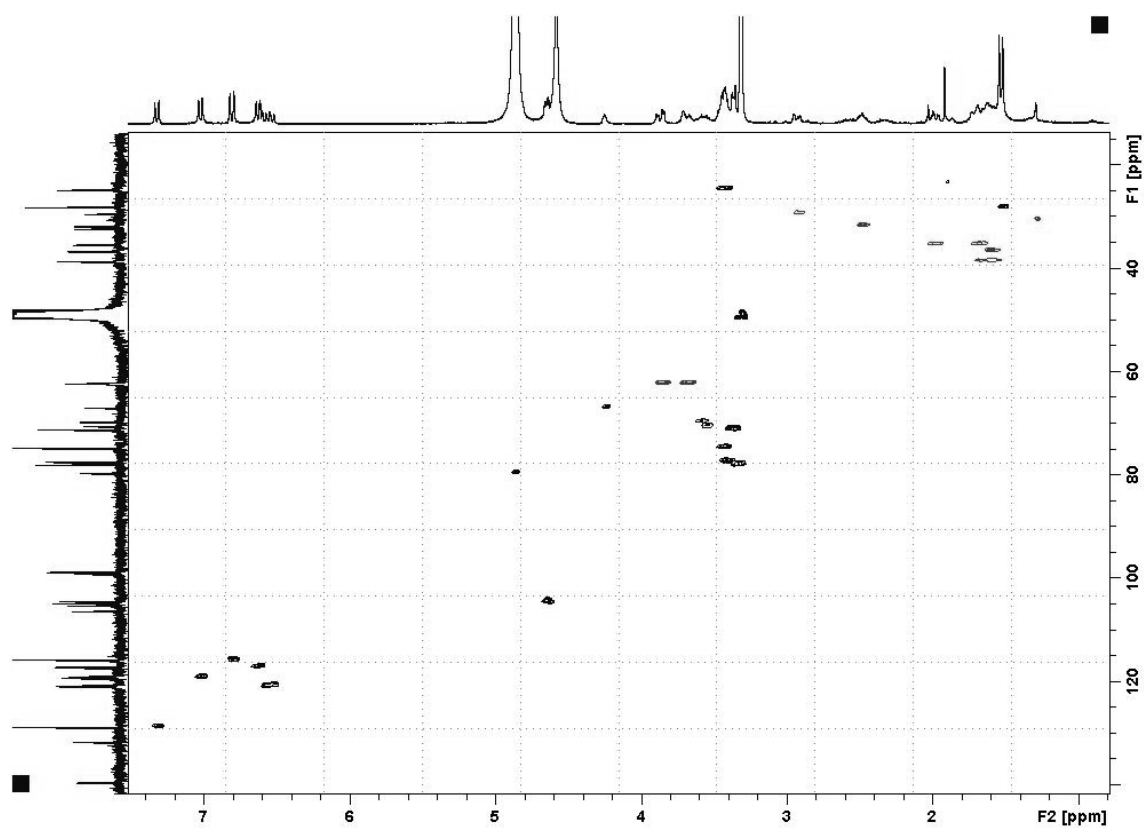


Figura J – ^1H - ^{13}C HSQC de **2** (300 MHz , MeOD).

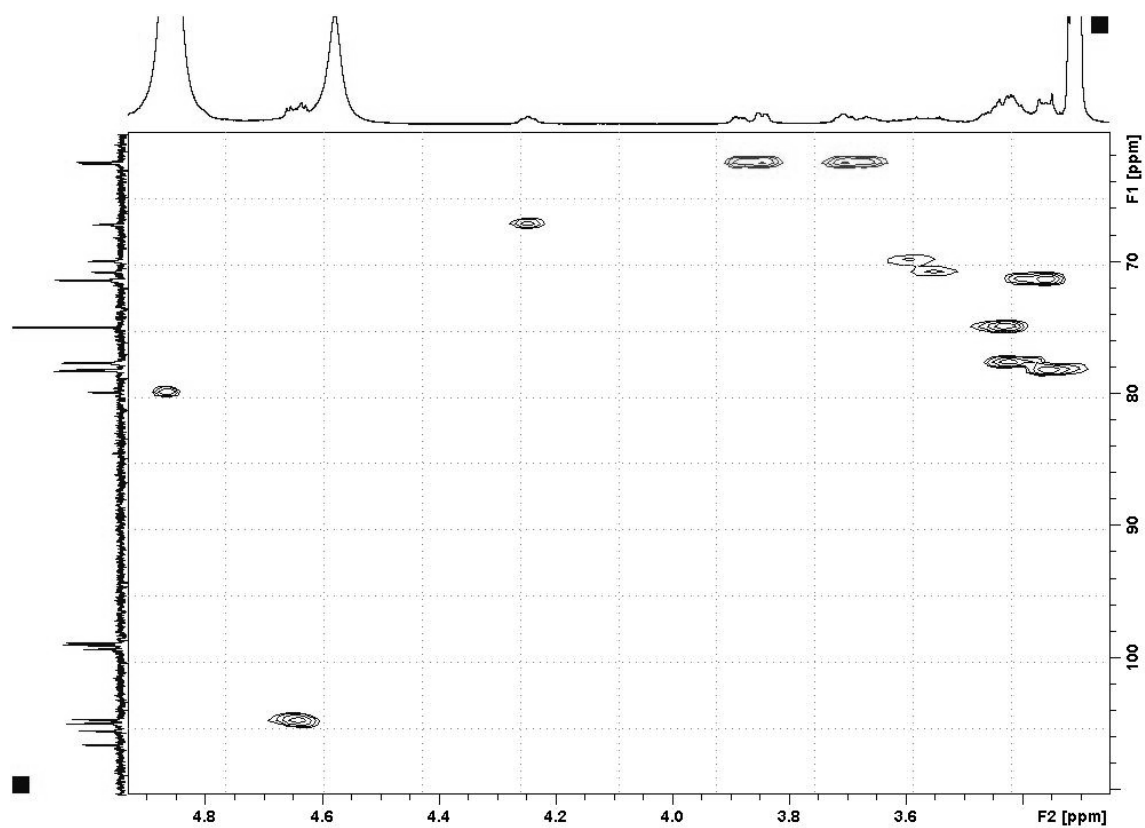


Figura K – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de 2 (300 MHz , MeOD).

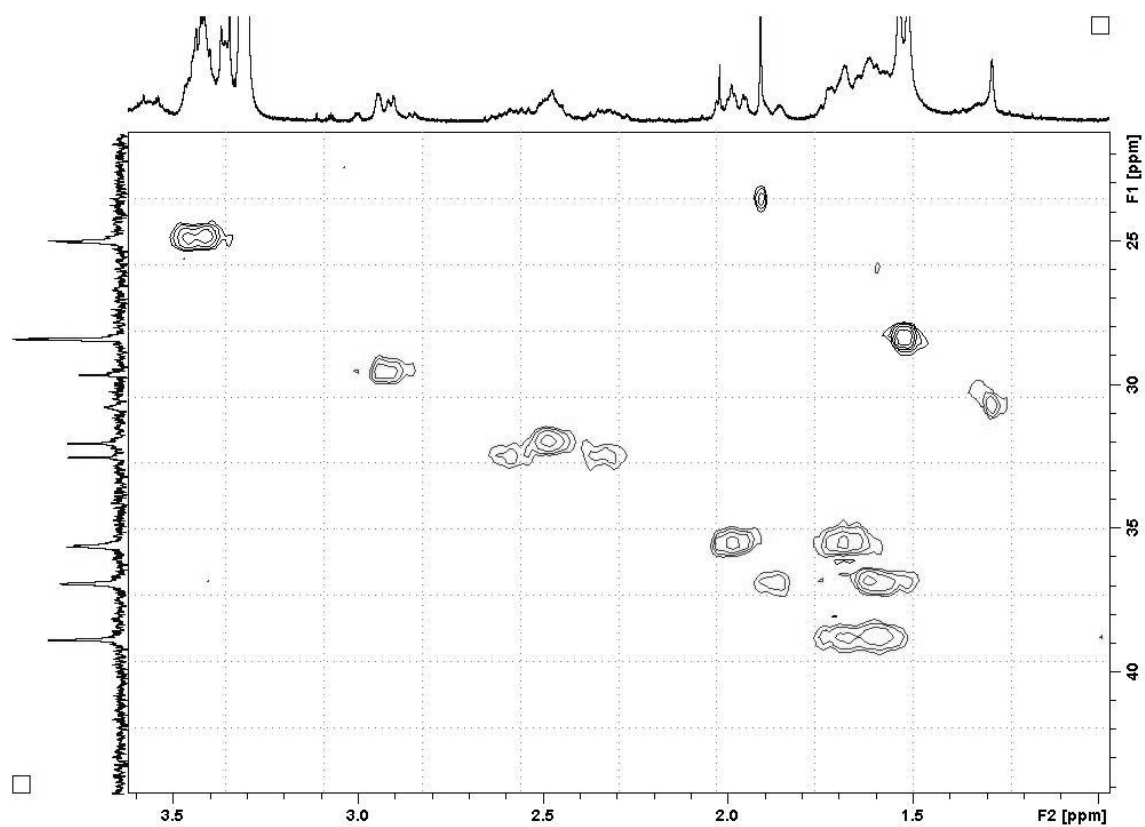


Figura L – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de 2 (300 MHz , MeOD).

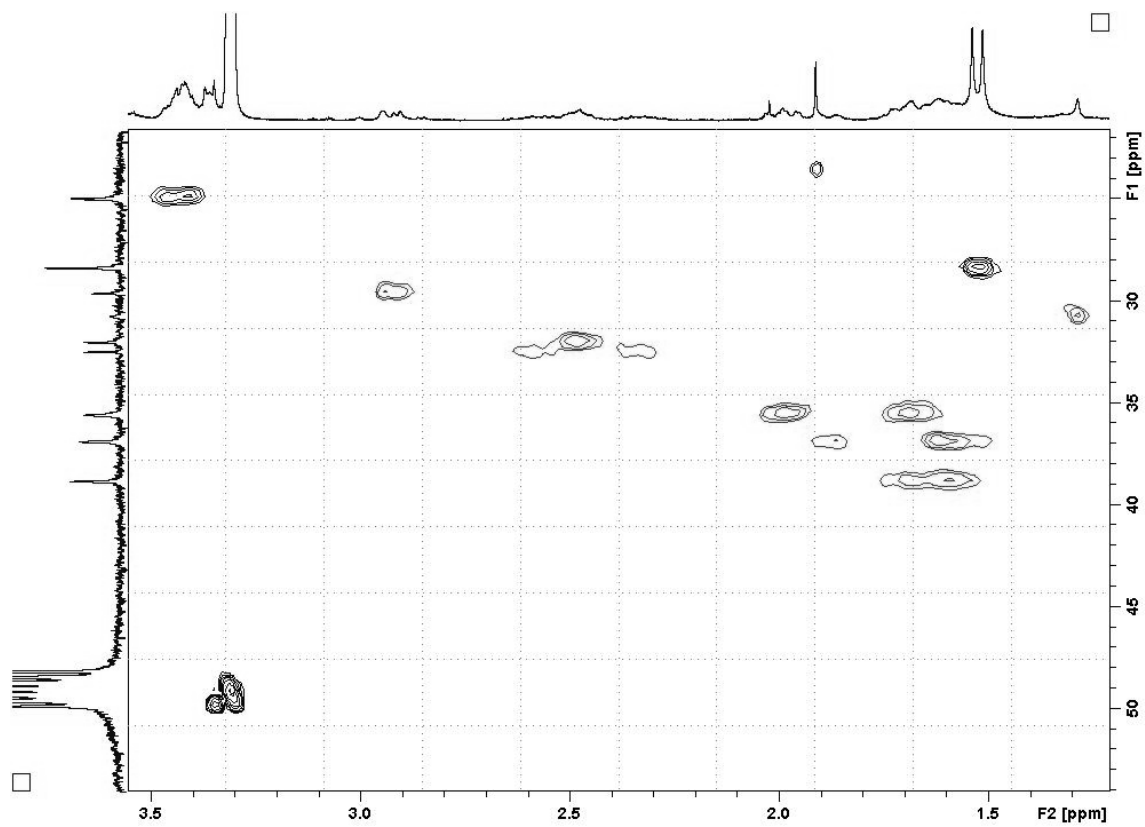


Figura M – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de **2** (300 MHz , MeOD).

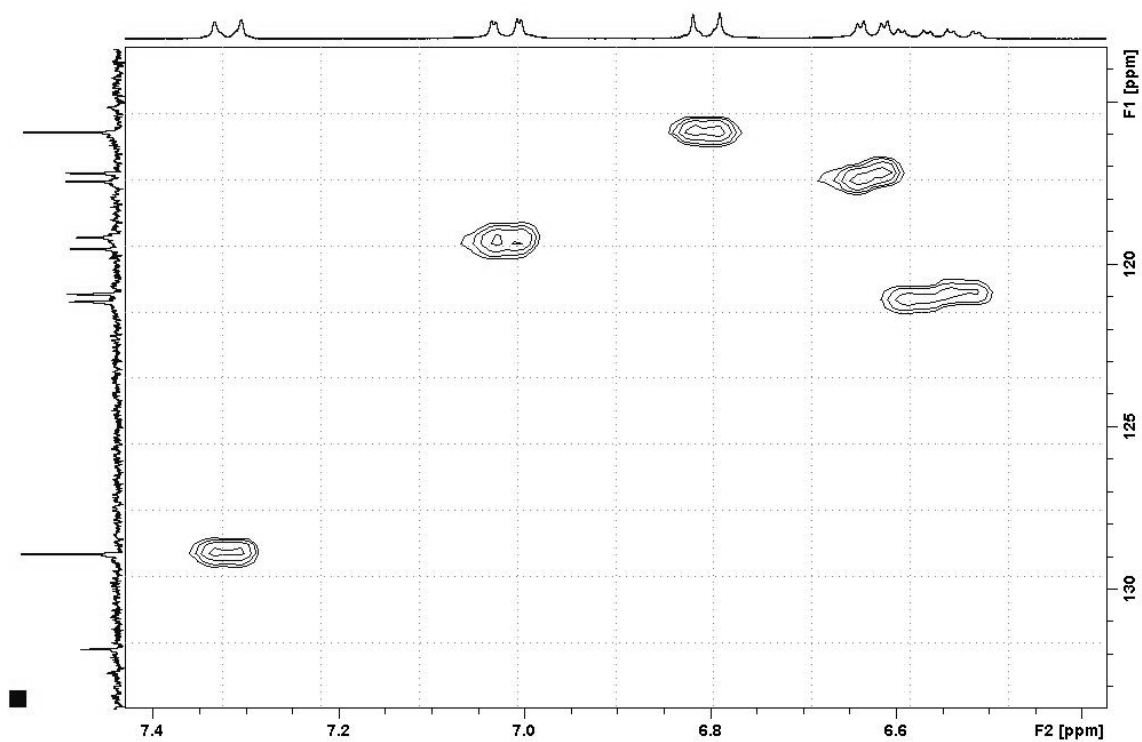


Figura N – Expansão $\text{H-}^{13}\text{C}$ HSQC de **2** (300 MHz , MeOD).

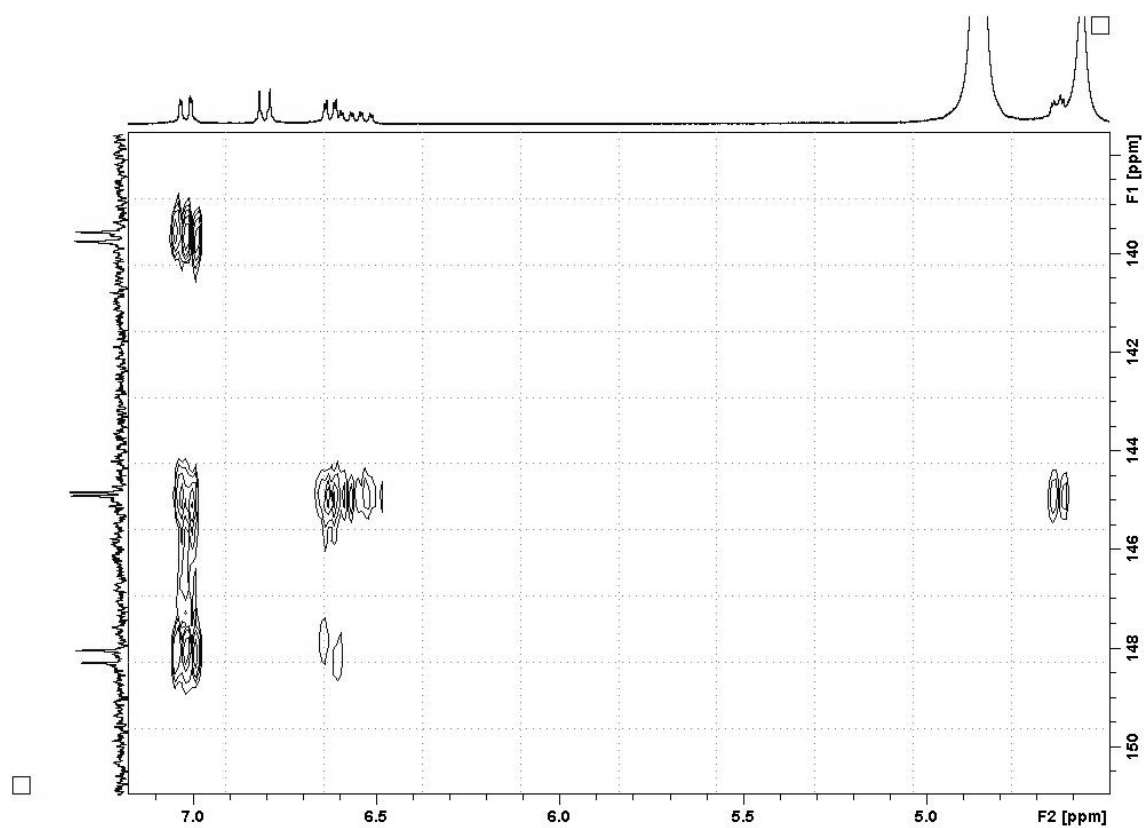


Figura O – Expansão H-¹³C HMBC de 2 (300 MHz , MeOD).

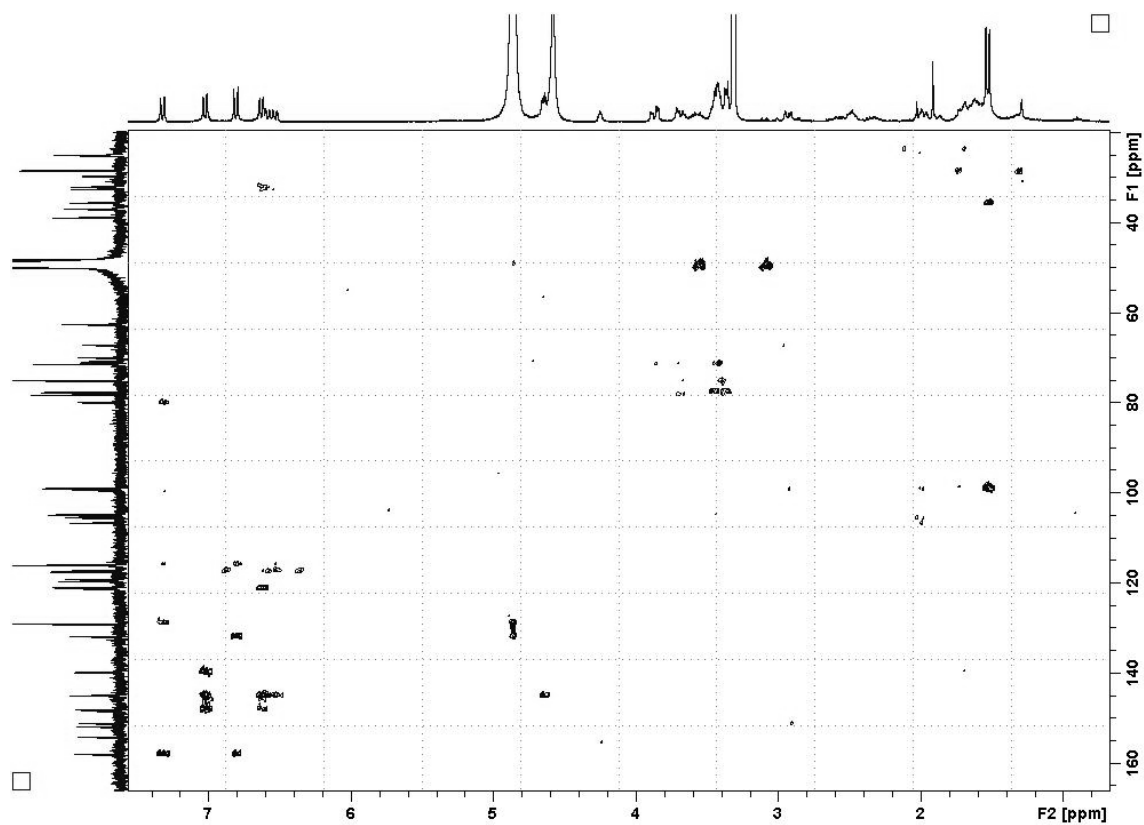


Figura P – H-¹³C HMBC de 2 (300 MHz , MeOD).

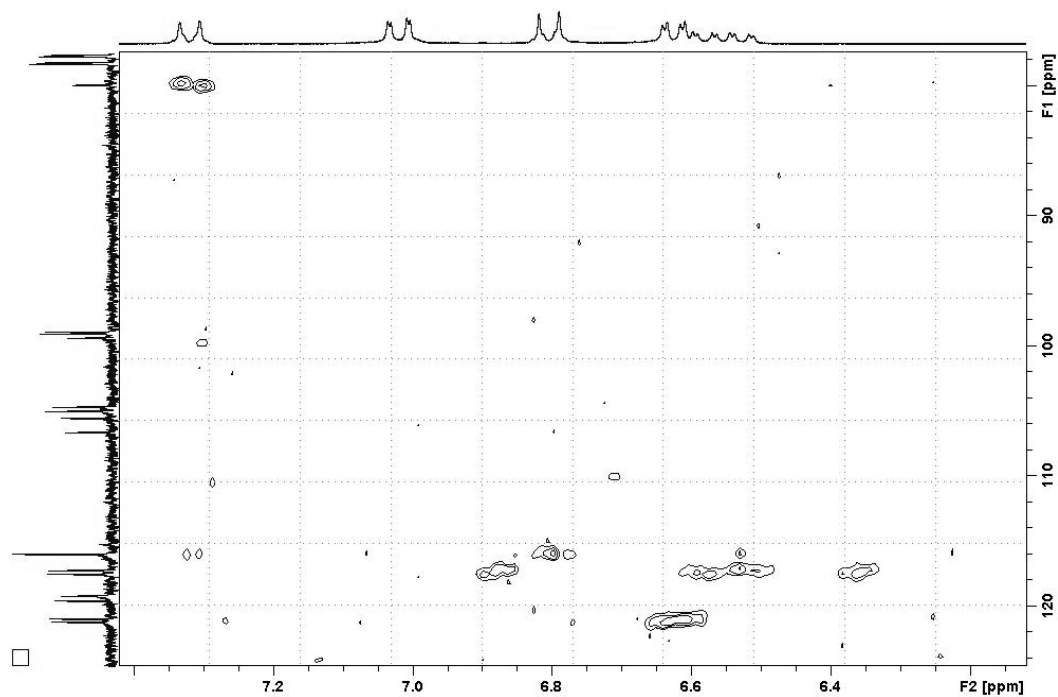


Figura Q – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de **2** (300 MHz , MeOD).

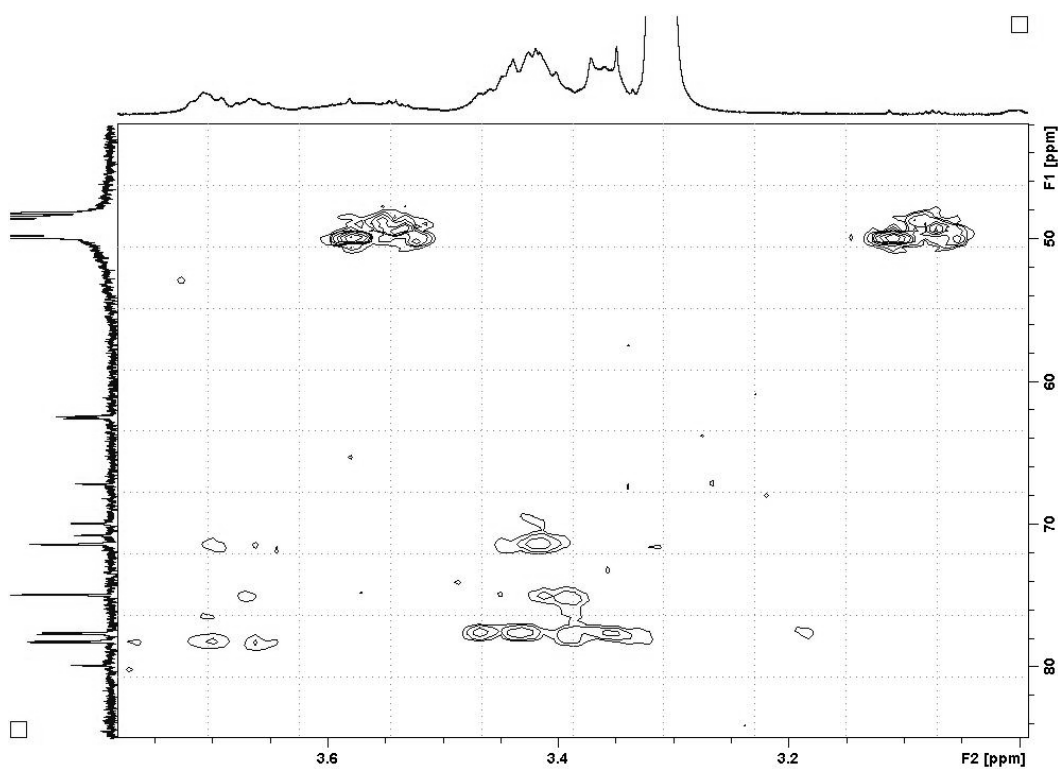


Figura R – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de **2** (300 MHz , MeOD).

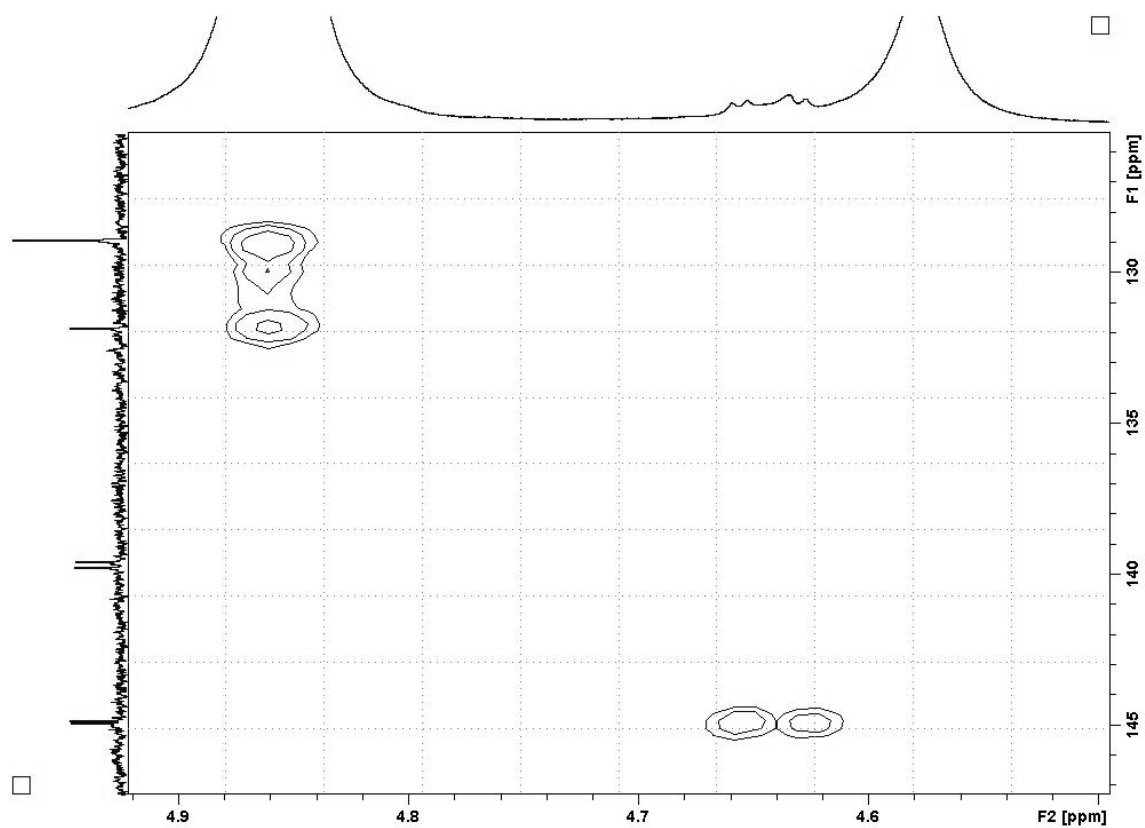


Figura S – Expansão de H-¹³C HMBC de **2** (300 MHz , MeOD).

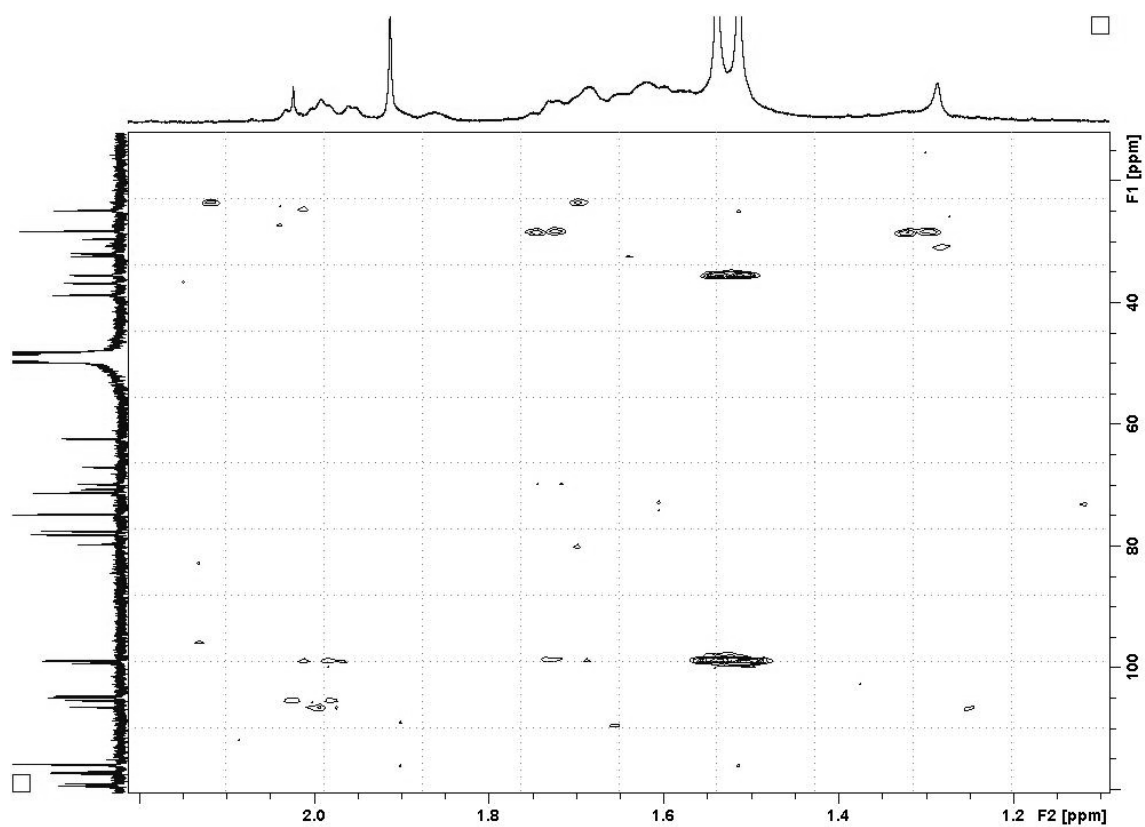


Figura T – Expansão de H-¹³C HMBC de **2** (300 MHz , MeOD).

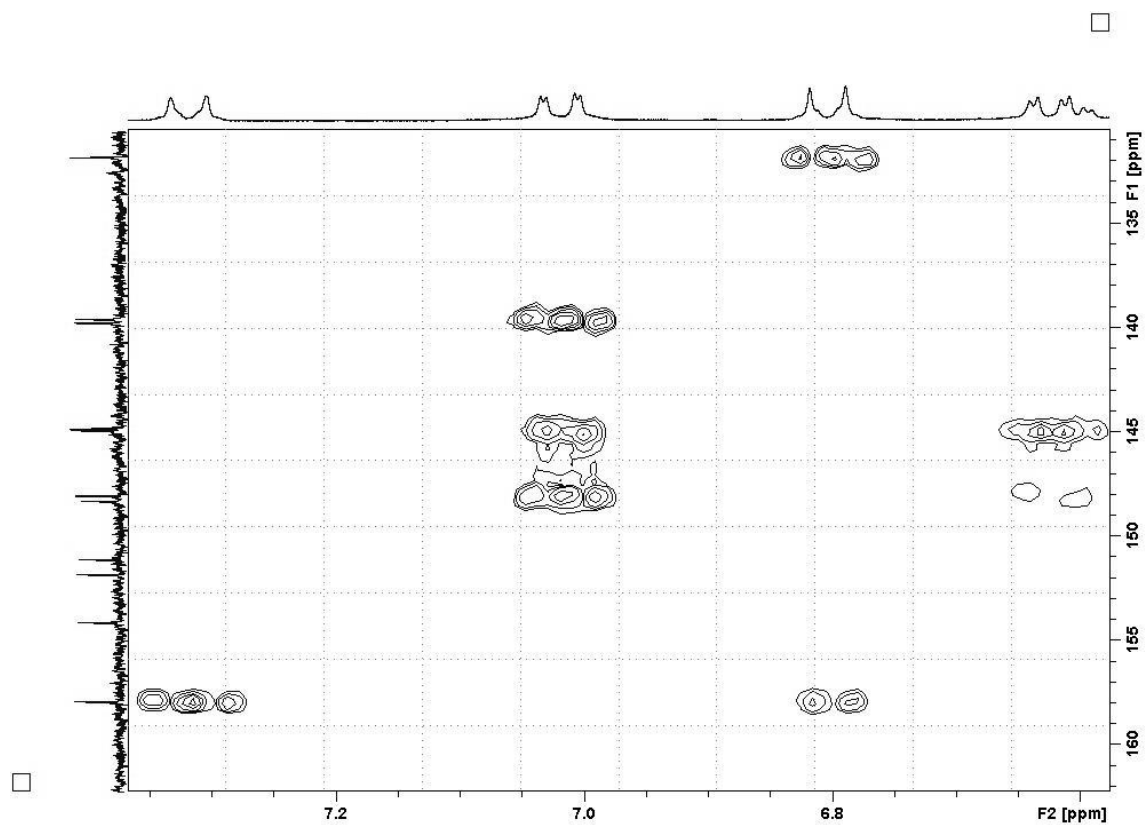


Figura U – Expansão de $\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC de **2** (300 MHz , MeOD).