

ANA LÚCIA BATISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIRADICALAR DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DOS FRUTOS
DE *BUCHENAVIA TOMENTOSA* –EICHLER (COMBRETACEAE) E
OURATEA SPECTABILIS AUBL. (OCHNACEAE)**

CAMPO GRANDE
2011

ANA LÚCIA BATISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIRADICALAR DOS EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DOS FRUTOS
DE *BUCHENAVIA TOMENTOSA* –EICHLER (COMBRETACEAE) E
OURATEA SPECTABILIS AUBL. (OCHNACEAE)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

CAMPO GRANDE
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA LÚCIA BATISTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIRADICALAR DOS
EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS DOS FRUTOS DE *BUCHENAVIA TOMENTOSA* –
EICHLER (COMBRETACEAE) E *OURATEA SPECTABILIS* AUBL. (OCHNACEAE)**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado: Aprovada

Campo Grande (MS), 6 de Junho de 2011

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr^a Luce Maria Brandão Torres

Instituição: Instituto de Botânica de São Paulo (IBSP)

Prof.^a Dr^a Zaira da Rosa Guterres

Instituição: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS)

Prof.^a Dr^a Ana Francisca Gomes da Silva

Instituição: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS)

Prof.^a Dr^a Maria Elizabeth Cavaleiros Dorval

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Prof.^a Dr^a Edilene Delphino Rodrigues (Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos meus pais Ovídio e Eunice por me ensinaram que o melhor caminho para vencer é a educação.

Aos meus irmãos e irmãs Helena Cristina, Silvana, Edson, Luis Roberto, Roseani, Núbia, Ovídio Júnior pelo incentivo, compreensão, apoio moral e financeiro, e aos “amigos” pela paciência, assistência e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo.

Ao orientador Prof^o. Dr^o. Walmir Silva Garcez por todos esses anos de convivência, pelas oportunidades concedidas, pelo ensinamento transmitido, pela confiança, pela amizade, enfim por tudo que contribuiu para meu crescimento profissional e também pessoal.

Às co-orientadoras: Prof^a Dr^a Marilene Chang por ter disponibilizado o laboratório para realização dos ensaios e a Prof^a. Dr^a. Lidilhone Hamerski pela contribuição na organização da parte experimental.

À Prof^a. Dr^a. Lidilhone Hamerski, às alunas do Curso de Farmácia da UFMS, já graduadas Laura e Caroline Tieppo por contribuírem com meu conhecimento ensinando a realizar os testes antifúngico, antibacteriano e antioxidante.

À doutoranda Ivana M.P. Violante pelo aprendizado, amizade e companheirismo e inesgotável paciência.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Rodrigues Garcez e ao Prof^o Dr^o Joaquim Corsino pela atenção e disponibilidade para me atender.

À Débora e Fernanda pela colaboração nos trabalhos realizados no laboratório de Microbiologia.

À D. Lúcia, Débora, Fernanda, Liliane, Regina e Rita por terem me recebido com carinho no laboratório de microbiologia e pela amizade formada.

Às mestrandas Débora, Crystiane, Gabriela e Mariê pela colaboração e troca de experiências.

Às técnicas do RMN Luciana e Edilene pelo desvelo para com meu trabalho e ao Luis Leonardo pela realização dos testes de IV e Luciana pela realização do UV

À doutoranda Nídia Cristiane Yoshida e à Dr^a. Denise Bertran pela obtenção do espectro de massa e ao Prof^o. Dr^o Norberto Peporine Lopes.

Aos meus primos Rita, Luiz Eduardo, Rosana e Mateus e aos tios Leonice e João pelo incentivo e momentos de descontração.

Aos meus sobrinhos André Luis, Emmanuel, Luiz Paulo e Vinicius por me transmitirem paz e alegria.

As minhas cunhadas Luciana e Cristina pelo apoio, contribuição e incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na região Centro-oeste, Prof^o. Dr^o. Ricardo Aydos pelo esforço e dedicação para manter a qualidade do curso e aos secretários Vera e Julio pela atenção.

Ao Jodacil Lopes, Vanessa Cristina Torres pela colaboração.

Ao pessoal do LP-1 pela companhia agradável, as conversas descontraídas e a troca de experiência.

A Fundect pela concessão da bolsa de estudo.

EPÍGRAFE

“O desejo mede os obstáculos, a vontade vence-os.”

Herculano

RESUMO

BATISTA AL. Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia tomentosa* –Eichler (Combretaceae) e *Ouratea spectabilis* Aubl. (Ochnaceae). Campo Grande; 2011. [Tese – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Este trabalho apresenta o estudo biomonitorado da avaliação de atividade antimicrobiana e anti-radicalar de: *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae) e *Ouratea spectabilis*. Os compostos isolados foram identificados usando técnica de Ressonância Magnética Nuclear ^1H , ^{13}C , e bidimensional. O estudo fitoquímico levou à identificação de 23 substâncias, sete de *B. tomentosa*, ácidos fenólicos: galato etila (1), galato de metila (2), ácido gálico (3); taninos hidrolisáveis: corilagina (4), buchenavina (5) e as lignanas pinoresinol (6) e o epipinoresinol (7); dezesseis de *O. spectabilis*; biflavonoides: 7'' metil- agastiflavona (8), 6,6'bigenkwanina (9), 7,7'dimetilavolkensiflavona (10), 7,7' dimetoxiagastiflavona (11), 3,8' bipegenina (12) e o 7,7'agastiflavona (22), o isômero do pinoresinol (13A), butanolídeo: isochinosídeo A ao D, (14, 15, 19 e 20 respectivamente), seco-ochinosídeo A (16), isolinderanolídeo E (17), ochinosídeo A (18), o esteroide β -sitosterol (21) e a cumarina 7,7'hidróxi-bicumarina (23). O ensaio biológico foi realizado usando técnica de microdiluição, o extrato etanólico, as frações, subfrações e compostos isolados foram testados frente a atividade bacteriana com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. O teste antifúngico foi realizado com *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*. Para avaliação antiradicalar foi realizado ensaio com o método radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH). Os resultados mais significativos frente a atividade antibacteriana foram apresentados pelos compostos de *O. spectabilis* o 7,7' dimetoxiagastiflavona (11), seco-ochinosídeo A (16) e o isolinderanolídeo (17) contra *E. faecalis* com concentração inibitória mínima em 25 $\mu\text{g/mL}$. No ensaio antifúngico os compostos de *B. tomentosa* foram mais ativos, a corilagina (4) contra *C. parapsilosis* (1,56 $\mu\text{g/mL}$) e buchenavina (5) para *C. glabrata* (3,125 $\mu\text{g/mL}$). Quanto à atividade anti-radicalar a corilagina foi mais ativa (1,72 $\pm$ 0,09 μM). Com este resultado pode-se concluir que os frutos de *B. tomentosa*, apresentaram melhor atividade antifúngica e anti-radicalar e os frutos de *O. spectabilis* atividade antibacteriana.

Palavras-chaves: *Buchenavia*, *Ouratea*, antimicrobiana, anti-radicalar, microdiluição

ABSTRAT

BATISTA AL. evaluation of antimicrobial activity and antiradicalar extracts and substances fruit *Buchenavia tomentosa* – Eichler (Combretaceae) and *Ouratea spectabilis* Aubl. (Ochnaceae). Campo Grande; 2010. [Thesis – Center for life sciences and health da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

This thesis presents the study of bioactivity evaluation of antiradical and antimicrobial activity of two plants: *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae) and *Ouratea spectabilis*. Isolated compounds were identified using Nuclear Magnetic Resonance technique ^1H , ^{13}C , and two-dimensional. The study phytochemical study led to identification of 23 substances, seven *Buchenavia tomentosa*, phenolic acid, ethyl gallate (1), methyl gallate (2), Gallic acid (3); hydrolysable tannins: corilagina (4), buchenavina (5) and lignans pinoresinol (6) and epipinoresinol (7). Sixteen *Ouratea spectabilis*; biflavonoids: 8-chloro 7, 7' dimetilagastinoflavona (8), 6,6 ' bigenkwanina (9), 7,7' dimetilavolkensiflavona (10), 7,7' dimetoxiagastiflavona (11), 3,8' bipegénina (12) and 7,7' agastiflavona (22), the isomer of pinoresinol (13A), butanolideo: isochinosídeo A to D (14, 15, 19 and 20 respectively), seco-ochinosídeo (16), isolinderanolídeo E (17), ochinosídeo (18), the steroid β -sitosterol (21) and coumarin 7,7' hydroxy-bicumarina (23). The assay was performed using a microdilution technique, the ethanol extract, fractions, subfractions and isolated compounds were tested against bacterial activity with *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. The antifungal testing with *Candida albicans*, *Candida Krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Cryptococcus neoformans*. To evaluate antiradical test was performed with the method free radical 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH). The most significant results activity antibacterial compounds were submitted by the *O. spectabilis* 7,7' dimetoxiagastiflavona (11), seco-ochinosídeo (16) and isolinderanolídeo (17) against *E. faecalis* with minimum inhibitory concentration in 25 $\mu\text{g/mL}$. In the test antifungal compounds *B. tomentosa* were more active, the corilagina (4) against *C. parapsilosis* (1,56 $\mu\text{g/mL}$) and buchenavina (5) for *C. glabrata* (3,125 $\mu\text{g/mL}$). As for the antiradical activity was most active corilagina $1,72 \pm 0.09 \text{ uM}$. With this result we can conclude that the fruits of *B. tomentosa*, showed better antifungal and antioxidant activity and the fruits of *O. spectabilis* antibacterial activity.

Keywords: *Buchenavia*, *Ouratea*, antimicrobial, antiradical, microdilution

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos 1 e 2 (300/75MHz, Metanol- d_4)	62
Tabela 2	Dados de RMN ^{13}C do composto 3 e da literatura* (75MHz)	63
Tabela 3	Espécies de vegetais que apresentam corilagina	67
Tabela 4	Dados de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC do composto 4 comparado com os dados de ^{13}C da literatura (Metanol- d_4)	68
Tabela 5	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 5 (DMSO- d_6)	73
Tabela 6	Dados de RMN ^1H e ^{13}C do pinoresinol (6) e da literatura* (Acetona- d_6)	77
Tabela 7	Deslocamento dos $\delta^{13}\text{C}$ axial, equatorial e do composto 6 (Pinoresinol) (δ) Acetona- d_6	78
Tabela 8	Deslocamento dos ^1H , ^{13}C e do bidimensional do epipinoresinol (7) (Acetona- d_6)	79
Tabela 9	Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico (EtOH) e frações hexânica (HEX), diclorometânica (DCM), acetato de etila (AcOEt) e hidro-metanólica (MeOH/ H_2O) dos frutos de <i>B. tomentosa</i> frente às bactérias testadas	81
Tabela 10	Resultado do teste antibacteriano das subfrações provenientes da fase AcOEt dos frutos de <i>B. tomentosa</i> frente a <i>S.aureus</i> com a CIM variando de 500 a $>1000 \mu\text{g/mL}$	82
Tabela 11	Resultados da atividade antibacteriana das subfrações 35 – 49; 70 – 89 e AcOEt-II-4 frente às bactérias testadas ($\mu\text{g/mL}$)	82
Tabela 12	Atividade antibacteriana dos compostos isolados dos frutos <i>B. tomentosa</i> de acordo com a CIM ($\mu\text{g/mL}$) observada frente às bactérias testadas	83
Tabela 13	Distribuição de CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato, fração e subfrações de <i>B. tomentosa</i> de acordo com a levedura testada	86
Tabela 14	Concentração mínima inibitória dos compostos isolados dos frutos de <i>B. tomentosa</i> ($\mu\text{g/mL}$) frente às leveduras testadas	87
Tabela 15	Cl_{50} de extrato, fração e subfrações de <i>B. tomentosa</i> submetidos a ensaio antiradicalar com DPPH ($\mu\text{g/mL}$)	89
Tabela 16	Atividade antiradicalar dos compostos 3 , 4 e 5 isolados de <i>B.tomentosa</i> e do ácido cafeico (μM) em relação ao DPPH	91
Tabela 17	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC de 7'' metil-agastiflavona (8) (Acetona- d_6)	96
Tabela 18	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC de 6,6'bigenkanina (9) (Metanol- d_4)	100
Tabela 19	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC de 7,7'dimetilavolkessiflavona (10) (Metanold $_4$)	103
Tabela 20	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC de 7,7' dimetoxiagastiflavona (11) (Acetona- d_6)	107

Tabela 21	Dados de ^1H , ^{13}C e HMBC de 3,8''biapigenina (12) (Metanol- d_4) comparado com os dados de RMN ^{13}C da literatura*	110
Tabela 22	Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC de 7,7' hidroxi-bicumarina (13) Metanol- d_4	112
Tabela 23	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC do composto 13A isômero do pinoresinol	113
Tabela 24	RMN ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 14 (CDCl_3)	117
Tabela 25	Atribuições dos sinais de ^1H , ^{13}C e HMBC do composto 16 (CDCl_3), comparado com ^{13}C da literatura* (CDCl_3)	120
Tabela 26	Atribuições dos dados de RMN ^{13}C dos compostos 17 a 20 (CDCl_3)	123
Tabela 27	Dados de ^1H e ^{13}C do composto 22 (agastiflavona) comparado com a literatura* (Metanol- d_4)	128
Tabela 28	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC de 7,7' hidroxi-bicumarina (23) Metanol- d_4	130
Tabela 29	CIM ($\mu\text{g/mL}$) apresentadas pelo extrato etanólico (EtOH) e frações hexânica (HEX), diclorometânica (DCM), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (MeOH/ H_2O) dos frutos de <i>O. spectabilis</i> frente às cepas bacterianas testadas	132
Tabela 30	Testes de atividade antibacteriana das subfrações obtidas no fracionamento da fração diclorometânica de <i>O. spectabilis</i> frente às bactérias testadas. ($\mu\text{g/mL}$)	133
Tabela 31	Testes de atividade antibacteriana das subfrações obtidas no fracionamento da fração hexânica de <i>O. spectabilis</i> frente às bactérias testadas. ($\mu\text{g/mL}$)	133
Tabela 32	Atividade antibacteriana dos compostos 8 a 13/13A isolados das subfrações OSFR-17 e OSFR-18 dos frutos de <i>O. spectabilis</i> frente, a <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. faecalis</i> ($\mu\text{g/mL}$)	135
Tabela 33	Concentração inibitória mínima dos compostos 14 a 20 frente às bactérias testadas ($\mu\text{g/mL}$)	136
Tabela 34	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico, frações e subfrações do fruto de <i>O. spectabilis</i> contra <i>Candida</i> sp. e um <i>Cryptococcus neoformans</i>	139
Tabela 35	Resultado da atividade antifúngica dos compostos isolados 8 a 13 e 13A ($\mu\text{g/mL}$) frente a <i>Candida</i> sp. e <i>Cryptococcus neoformans</i>	139
Tabela 36	CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos compostos 14 a 20 frente às cepas fúngicas de <i>Candida</i> sp. e <i>Cryptococcus neoformans</i>	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Espécies pesquisa da família Combretaceae e respectivas atividades segundo dados da literatura	24
Figura 2	Frutos de <i>Buchenavia tomentosa</i>	25
Figura 3	Fruto de <i>Ouratea spectabilis</i>	29
Figura 4	Partição do extrato etanólico dos frutos de <i>B. tomentosa</i>	44
Figura 5	Fracionamento da fase acetato de etila para obtenção dos compostos 1 , 1 e 2 , 4 e 5 dos frutos de <i>B. tomentosa</i>	45
Figura 6	Fracionamento da fração AcOEt – I para obtenção do composto 3	46
Figura 7	Fracionamento para obtenção dos compostos 1 e 6 e 7 dos frutos de <i>B. tomentosa</i>	47
Figura 8	Partição do extrato etanólico dos frutos de <i>O. spectabilis</i>	47
Figura 9	Fracionamento e obtenção dos compostos da subfração OSFR- 18 de <i>O. spectabilis</i>	48
Figura 10	Obtenção dos compostos 13 e 13A	49
Figura 11	Fracionamento da subfração OSFR-I para obtenção dos compostos 14 e 15 dos frutos de <i>O. spectabilis</i>	49
Figura 12	Fracionamento e obtenção dos compostos 16 a 21 da fase hexânica de <i>O. spectabilis</i>	50
Figura 13	Fracionamento da fração AcOEt dos frutos de <i>O. spectabilis</i> e obtenção dos compostos 22 e 23	51
Figura 14	Esquema do procedimento da técnica de microdiluição na placa de 96 orifícios	54
Figura 15	Placa com resultado do teste de susceptibilidade antimicrobiana, de quatro extratos de plantas frente a <i>P. aeruginosa</i>	55
Figura 16	Foto ilustrando o sequestro de radical livre (cor amarela) pelas amostras de extratos vegetais no teste com DPPH	56
Figura 17	Resultado do ensaio antibacteriano dos 50 extratos obtidos de 37 espécies de plantas e suas respectivas partes testadas	59
Figura 18	Estrutura química dos compostos 1 e 2	62
Figura 19	Estrutura química do composto 3 - Ácido gálico	63
Figura 20	Unidade HHDP (Hexaidroxidifenil)	64
Figura 21	Estrutura do tanino hidrolisável Geranina, contendo os grupos HHDP e DHHDP	65
Figura 22	Estrutura química da corilagina (4)	67
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H da corilagina (4) (300 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	69
Figura 24	Espectro de RMN ¹³ C de corilagina (4) (75 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	69

Figura 25	DEPT 135 ⁰ de corilagina (4) (75 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	70
Figura 26	Proposta estrutural dos anéis D e E: Unidade DHHDP	71
Figura 27	Proposta estrutural do composto 5 (buchenavina)	72
Figura 28	RMN ¹ H de buchenavina (5) (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS=0)	74
Figura 29	RMN ¹³ C de buchenavina (5) (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS=0)	74
Figura 30	DEPT 135 ⁰ de buchenavina (5) (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS=0)	75
Figura 31	Estrutura química do pinoresinol (6)	77
Figura 32	Estrutura química do epipinoresinol (7)	79
Figura 33	Espectros de RMN ¹ H dos compostos 6 (pinoresinol) e 7 (epipinoresinol) (300 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , TMS=0)	80
Figura 34	Espectro de RMN ¹³ C dos compostos 6 (pinoresinol) e 7 (epipinoresinol) (75 MHz, acetona- <i>d</i> ₆ , TMS=0)	80
Figura 35	Valores da Cl ₅₀ da atividade sequestradora de radicais livres do extrato, frações e sub-frações de <i>B. tomentosa</i>	90
Figura 36	Curva da % de DPPH sequestrada pelos compostos 3, 4 e 5 e do ácido cafeico	92
Figura 37	Resultado da Cl ₅₀ dos compostos 3, 4 e 5 e do ácido cafeico	92
Figura 38	Estrutura química do composto 8 (7'' metil-agastiflavona)	96
Figura 39	RMN ¹ H de 7'' metil-agastiflavona (8) (300) MHz, Acetona- <i>d</i> ₆ , TMS=0	97
Figura 40	RMN ¹³ C de 7'' metil-agastiflavona (8) (75 MHz, Acetona- <i>d</i> ₆ , TMS=0)	97
Figura 41	Espectro bidimensional HSQC região de carbonose hidrogênios olefínicos e aromáticos de 7'' metil-agastiflavona (8) (75 MHz, Acetona- <i>d</i> ₆ , TMS= 0)	98
Figura 42	Composto 9 – Estrutura química da 6,6' bigenkanina	99
Figura 43	Expansão na faixa dos ¹ H aromáticos e o olefínico do composto 9 (6,6' bigenkanina), (300 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	100
Figura 44	Dados de RMN ¹³ C do composto 9 (6,6' bigenkanina), (75 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	101
Figura 45	Proposta estrutural para o composto 10 - 7,7' dimetilavolkesiflavona	103
Figura 46	Expansão da região de sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos e olefínicos do composto 10 (300 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	104
Figura 47	Expansão da faixa de carbonos dos anéis aromáticos e olefínicos do composto 10 (75 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	104
Figura 48	HSQC Região de ¹³ C e ¹ H aromáticos e olefínicos do composto 10 7,7' dimetilavolkesiflavona (75 MHz, Metanol- <i>d</i> ₄ , TMS=0)	105
Figura 49	Espectro de massa de 7,7' dimetilavolkesiflavona (10) (Eletrospray-negativo)	105

Figura 50	Estrutura química de 7,7' dimetoxiagastiflavona (11)	107
Figura 51	Expansão da região de sinais de hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN ^1H do composto 11 (7,7' dimetoxiagastiflavona) (300 MHz, Acetona- d_6 , TMS=0)	108
Figura 52	HSQC Expansão da região de sinais de hidrogênios e carbonos aromático e olefínicos de 7,7' dimetoxiagastiflavona (11) (75 MHz, Acetona- d_6 , TMS=0)	108
Figura 53	Estrutura química de 3,8'' biapigenina (12)	109
Figura 54	Expansão de hidrogênios aromáticos e olefínicos de 3,8'' biapigenina (12) (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	111
Figura 55	Proposta estrutural do composto 13 (7,7' hidroxibicumarina)	112
Figura 56	Estrutura química do pinoresinol (6) e o seu isômero composto (13A)	113
Figura 57	RMN ^1H dos compostos 7,7' hidroxibicumarina (13) e do isômero do pinoresinol (13A) (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	114
Figura 58	RMN ^{13}C dos compostos 7,7' hidroxibicumarina (13) e do isômero do pinoresinol (13A) (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	114
Figura 59	DEPT-135° dos compostos 7,7' hidroxibicumarina (13) e do isômero do pinoresinol (13A) (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	115
Figura 60	Proposta estrutural do isochnosídeo A (14)	117
Figura 61	RMN ^1H do composto 14 (isochnosídeo A) (300 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	118
Figura 62	RMN ^{13}C do composto 14 (isochnosídeo A) (75 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	118
Figura 63	Espectro de massa do composto 13 (Eletrospray-modo negativo)	119
Figura 64	Estrutura química do seco-ochnosídeo A (16)	120
Figura 65	RMN ^1H do composto 16 (seco-ochnosídeo A) (300 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	121
Figura 66	RMN ^{13}C do composto 16 (seco-ochnosídeo A) (75 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	121
Figura 67	Esqueleto básico dos compostos 17 a 20	123
Figura 68	RMN ^1H do composto 17 (isolinderanolídeo) (300 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	123
Figura 69	RMN ^1H do composto 18 (ochnosídeo A) (300 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	124
Figura 70	RMN ^{13}C do composto 17 (isolinderanolídeo) (75 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	124
Figura 71	RMN ^{13}C do composto 18 (ochnosídeo A) (75 MHz, CDCl_3 , TMS=0)	125
Figura 72	Estrutura química do β -sitosterol (21)	125
Figura 73	Estrutura química do composto 22 - agastiflavona	126
Figura 74	Espectro de RMN ^1H do agastiflavona (22) (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	127

Figura 76	Proposta estrutural do composto 23 7,7' hidroxi-bicumarina	129
Figura 77	Espectro de RMN ^1H do composto 23 – 7,7' hidroxi-bicumarina. (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	130
Figura 78	Espectro de RMN ^{13}C do composto 23 - 7,7' hidroxi-bicumarina (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	131
Figura 79	Espectro de DEPT-135° do composto 23 - 7,7' hidroxi-bicumarina (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0)	131

ABREVEATURAS E SIGLAS

Acetona-d₆ – Acetona deuterada
AcOEt – Acetato de etila
ACN – Acetonitrila
ATCC – “American type culture collection”
CC – Cromatografia em coluna
CCDA – Cromatografia em camada delgada analítica
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CHCl₃ – Clorofórmio
CIM – Concentração inibitória mínima
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CI₅₀ – Concentração que inibe 50% do teor do radical livre DPPH
d – duplete
DCM – Diclorometano
Dd – Duplo-duplete
Dept - Distortionless enhancement by polarization transfer
dl – duplete largo
DMSO – dimetilsulfóxido
DMSO-d₆ – dimetilsulfóxido deuterado
DPPH- **difenil**-picril- hidrazina
EM – Espectro de massa
ESI/MS – Ionização por eletrospray
EtOH – Etanol
Ext. extrato
Glc - glicose
Hex. Hexano
HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence
H₂O – água
IV - infravermelho
J – Constante de acoplamento
m – multiplete
Me – metila
Metanol-d₃ – metanol deuterado
MeOH – metanol
m/z – relação massa carga
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN – ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C
RMN -¹H - – Ressonância Magnética Nuclear de ¹H
s – singleto
Si – Sílica
Sl – singleto largo
t – tripleto
q – quarteto
δ – deslocamento químico
λ – comprimento de onda
μg –micrograma
μL –microlitro
μM –Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Família Combretaceae	21
2.2 Família Ochnaceae	25
2.3 Infecções	29
2.4 Atividade anti-radicalar	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 PARTE EXPERIMENTAL	44
4.1 Identificação e obtenção dos extratos	44
4.2 Ensaio Biológico	51
4.3 Atividade anti-radicalar-Ensaio com DPPH	55
4.4 Especificação do material utilizado	57
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	58
5.1 <i>Buchenavia tomentosa</i>	61
5.2 <i>Ouratea spectabilis</i>	93
6 CONCLUSÃO	143
7 REFERÊNCIAS	145
APÊNDICE	165

INTRODUÇÃO

A busca por substâncias com atividades antimicrobianas e anti-radicalares é uma necessidade permanente em vista do surgimento de cepas patogênicas resistentes e do aumento das doenças degenerativas. As infecções podem ser classificadas em três tipos: I- emergentes e reemergentes, que corresponde a doenças novas ou modificadas que estão aumentando ou possuem potencial para aumentar no futuro próximo. II – oportunistas, quando acometem pessoas com sistema imunológico deprimido. III - hospitalares ou nosocomiais, quando ocorrem em ambiente hospitalar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As infecções nosocomiais variam desde uma lesão cutânea até estados mais graves que podem levar ao óbito e atingem principalmente pessoas que fazem uso de catéter e que passam por longo período de internação.

Os indivíduos mais suscetíveis às infecções oportunistas são pessoas transplantadas, ou com câncer, doenças renais, diabetes, lúpus eritematoso e AIDS e aquelas que sofreram algum tipo de trauma como queimaduras e cirurgias, pois encontram-se estão com o sistema imunológico comprometido. As infecções oportunistas podem ser provocadas também pelo uso indiscriminado de antibióticos, onde a microbiota normal é reduzida e ocorre o crescimento desordenado de outro microorganismo presente no organismo. Outra forma de ocorrência destas infecções é quando o microorganismo migra do seu habitat normal para outra parte do corpo onde não são encontrados normalmente. Esta situação pode provocar doenças em pessoas com sistema imunológico debilitado, ou que estejam com a região acometida desprotegida pela microbiota específica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Entre os microorganismos que provocam as infecções oportunistas estão as bactérias e os fungos, sendo que a maior preocupação da OMS (Organização Mundial da Saúde) em relação a estas infecções, é o fato de que são provocadas por cepas resistentes. Estas são mais virulentas e não se enquadram no espectro de medicamentos atuais. De acordo com a OMS estas infecções causam 25% de mortes em todo o mundo e 45% nos países menos desenvolvidos (WANNMACHER, 2004).

A resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial atraindo atenção de órgãos governamentais e internacionais como, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), OMS, Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional. De acordo com o Ministério da Saúde, mais de 70% das bactérias que causam infecções

hospitais são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos comumente disponibilizados para o tratamento dos pacientes (OLIVEIRA; SILVA, 2008). A resistência aos antimicrobianos pode estar relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. Estudos brasileiros registram que a prescrição de antimicrobianos em hospitais de ensino foi inadequada em 25 a 50% dos casos, principalmente devido à escolha incorreta do medicamento, dose ou tempo de tratamento. Estes fatos contribuem para os altos índices de infecções hospitalares e o aumento de microorganismo resistente (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

O combate à resistência bacteriana deve ser abordado sob vários aspectos. Desde o entendimento dos processos relacionados à ação dos antibióticos até a síntese e avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes e sua posterior aplicação terapêutica, que deve ser de forma racional. Além disso, se faz necessário a adequação de normas para controle de infecções hospitalares, destacando que estes diferentes níveis de ações devem ser contínuos e interligados (SILVEIRA *et al.*, 2006).

As infecções fúngicas também constituem num problema de saúde pública. As doenças causadas por fungos oportunistas são responsáveis pela morbidade e mortalidade de pacientes imunossuprimidos e as opções terapêuticas para estes casos são limitadas, em vista da toxicidade elevada e da pouca eficiência na erradicação da infecção (MASOKO; PICARD; ELOFF, 2005a). O surgimento de cepas resistentes aos atuais medicamentos preocupa os órgãos de saúde, pois alguns antifúngicos interagem com as drogas, como os retrovirais, restringindo o espectro de antifúngicos disponíveis.

A questão do efeito colateral dos antifúngicos também é preocupante porque, em função deste, os indivíduos encerram o tratamento antes de estarem curados, podendo levar ao surgimento de cepas resistentes.

O uso indiscriminado de antifúngicos é menor em relação aos antibióticos, mas devem-se tomar os mesmos cuidados de prescrição e respeitar o tempo de tratamento. Essas atitudes podem controlar a incidência de cepas resistentes de bactérias e fungos aos novos medicamentos.

Outra preocupação mundial na atualidade é em relação aos radicais livres, que são partículas (átomo ou moléculas) altamente reativas, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica.

Quando o elétron desemparelhado está centrado no átomo de oxigênio, são denominadas ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) e, quando no nitrogênio, ERN. No organismo estas espécies estão relacionadas com a produção de energia, fagocitose, regulação

do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O aumento da produção dessas espécies está relacionado com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunção cognitiva, câncer e AIDS, podendo ser causa ou fator agravante do quadro geral destas e outras enfermidades (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Segundo Hayder *et al.*, (2008) os radicais livres no organismo provocam oxidação nos sistemas biológicos. Todos os organismos aeróbicos, inclusive os humanos, possuem defesas antioxidantes, que os protegem de danos oxidativos. As enzimas de reparo estão presentes para remover ou reparar moléculas danificadas. O mecanismo de defesa enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a transformação de radicais superóxidos em peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT), que converte H_2O_2 em oxigênio e água, e a glutatônia peroxidase, dependente do selênio (GPX), que também catalisa a degradação de H_2O_2 .

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação. Entre os radicais livres reativos estão: 1O_2 (oxigênio singlete), O_2^- (radical superóxido), $OH^\cdot$ (radical hidroxila), $NO^\cdot$ (óxido nítrico) $ONOO^-$ (peroxinitrito) e o $Q^\cdot$ (radical emiquinona) (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997 *apud* BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os radicais livres podem ser gerados por fontes endógenas e exógenas. As endógenas originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, envolvendo várias organelas celulares como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleos e retículo endoplasmático. As fontes exógenas geradoras de radicais livres abrangem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).

A formação dos radicais livres pode ser controlada por compostos conhecidos como antioxidantes, que inibem a oxidação de diversas biomoléculas.

O contexto descrito em relação as doenças antimicrobianas e degenerativas mostra a necessidade de novos compostos com atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante e a busca de novas substância nos leva a um único caminho: as plantas, que há muitos anos são fontes de medicamentos para combater diversas doenças.

Muitas plantas usadas pela população no tratamento de doenças bacterianas e fúngicas foram testadas *in vivo* e *in vitro*, sendo comprovada a eficácia das mesmas.

Atualmente existem diversas campanhas mostrando a importância de alimentos que são ricos em compostos antioxidantes, porém há plantas que não estão disponíveis para a maioria da população e são ricas nestes compostos, como as plantas do cerrado.

O cerrado é um ecossistema que ocorre em áreas relativamente restritas no Brasil e que nas últimas décadas tem sido utilizado extensivamente para práticas de agricultura e pecuária. Esforços vêm sendo realizados para manutenção e conservação dessas áreas, tendo em vista a importância da biodiversidade vegetal nela presente (SILVA *et al.*, 2006).

No presente trabalho foi realizado um estudo biomonitorado com extratos de plantas colhidas no cerrado sul-mato-grossense, com o objetivo de isolar e identificar substâncias com atividades antibacteriana, antifúngica e anti-radicalar.

Foram escolhidos dois extratos que apresentaram atividade antibacteriana mais significativa, os frutos de *Buchenavia tomentosa* (Combretaceae) e *Ouatea spectabilis* (Ochnaceae). Estas espécies são comuns no cerrado brasileiro, úteis na medicina popular e os frutos de *B. tomentosa* também são empregados na alimentação. Por serem utilizadas pela população com fins terapêuticos e alimentícios, faz-se necessário pesquisar os componentes químicos e as atividades biológicas e anti-radicalares destas plantas.

Este trabalho pode servir de referência para outras linhas de pesquisa na área de alimentos e cosméticos, visto que os frutos podem ser consumidos naturalmente ou como geleias, sucos e na cosmetologia em linhas de produtos com ação antioxidante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Família Combretaceae

A família Combretaceae abrange cerca de 20 gêneros e aproximadamente 475 espécies difundidas nas regiões tropicais. Estas espécies possuem características evolutivas avançadas, ocorrendo em diversos biomas, incluindo os ambientes especiais, como mangues e regiões áridas (BARROSO, 1991).

Essa família possui distribuição predominantemente pantropical, sendo que no Brasil ocorrem cinco gêneros nativos (*Buchenavia*, *Crombretum*, *Conocarpus*, *Terminalia* e *Thiloa*), com aproximadamente 60 espécies, e dois exóticos (*Bucida* e *Quisqualis*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

Em países dos continentes Africano e Asiático muitas espécies da família Combretaceae são usadas na medicina popular para combater diversas doenças e, por esta razão, há vários estudos sobre as mesmas a fim de confirmar suas propriedades medicinais.

O potencial medicinal de sete espécies de Combretaceae (*Combretum glutinosum*, *C. hispidum*, *C. molle*, *C. nigricans*, *Pteleopsis suberosa*, *Terminalia avennioides* e *T. mollis*) foi avaliado quanto à atividade antifúngica e todos os exemplares mostraram-se ativos frente às cepas testadas (BABA-MOUSSA; AKPAGANA; BOUCHET, 1999). Seis espécies dos gêneros *Combretum* e *Terminalia* (*C. fragans*, *C. molle*, *C. psidioides*, *C. zeyheri*, *T. kaiserana*, *T. sericea*) usadas na Tanzânia e em outros países africanos no tratamento de doenças como gonorréia, sífilis, diarreia, hipertensão e câncer demonstraram atividade antibacteriana (FYHRQUIST *et al.*, 2002).

As espécies *Anogeissus leiocarpus*, *Combretum fragrans*, *Terminalia laxiflora*, *Terminalia glaucescens* e *Terminalia macroptera* apresentaram atividade antifúngica (BATAWILA *et al.*, 2005). Estas plantas são usadas pela população togolesa no tratamento de infecções fúngicas tais como dermatoses, micoses e também são indicadas contra outros males como hipertensão, problemas gástricos, malária, eczema, astenia, gonorréia, lepra e tuberculose. As partes das plantas estudadas foram folhas, raízes e caule e as cinco espécies investigadas confirmaram as atividades antifúngicas.

Outras seis espécies de *Terminalia* (*T. prunioides*, *T. brachystemma*, *T. sericea*, *T. gazensis*, *T. mollis*, *T. sambesica*) foram avaliadas quanto à atividade antifúngica, e os resultados comprovaram que elas possuem esta atividade. Estes dados corroboram o uso

destas plantas no tratamento de várias doenças relacionadas às infecções fúngicas. Segundo os autores, membros da família Combretaceae são usados pela medicina popular para muitos fins, destacando-se o tratamento de dores lombares, dor de cabeça, resfriados, febre, infertilidade feminina, doenças cardíacas, picadas de cobras e escorpião e para purificação do sistema urinário (MASOKO; ELOFF, 2005b).

As folhas de *Guiera senegalensis* são usadas no oeste da África (Senegal, Guiana e Mali) para tratamento de resfriados, bronquite e febre, e as raízes também são usadas como medicinais. Testes realizados com cobaias (*Cavia porcellus*) confirmam o efeito antitussígeno desta espécie e de acordo com os pesquisadores este efeito é referente à codeína (BOUCHET *et al.*, 1996). As folhas de *G. senegalensis* são usadas também no combate a dores reumáticas e infecção pulmonar e as mulheres tomam chá preparado com as folhas desta planta para aumentar a lactação. Investigação farmacológica desta espécie comprovou a ação depressiva do sistema nervoso central, anti-inflamatória e antidiarréica (MAHMOUD; KHALID, 1997). Revisão bibliográfica sobre plantas do oeste da África testadas contra malária mostra que *G. senegalensis* é uma das plantas com maior potencial para uma futura droga contra esta doença, pois estudos realizados revelaram que esta planta tem acentuada ação antiplasmódica e baixa toxicidade (SOH; VICAL, 2007).

A espécie *Thiloa glaucocarpa* é nativa no Brasil e estudos realizados com o caule desta levou ao isolamento do ácido arjunólico (MILITÃO; ANDRADRE; SILVEIRA, 1993), o qual já foi isolado de outras espécies de Combretaceae. Este ácido possui ação anti-inflamatória, antinoceptiva e anticolinesterásica (FACUNDO *et al.*, 2005).

No que diz respeito à atividade anticâncer, compostos isolados de *Bucida buceras* mostraram potente atividade antitumoral para linhagens de células tumorais humanas: KB (nasofaringe e seus derivados – KB-vin, KB7d), pulmonar, mama e melanona. (HAYASHI *et al.*, 2002).

No Brasil, *Terminalia brasiliensis* é conhecida popularmente como amêndoa-brava, cerne-amarelo, capitão-do-campo entre outras e é usada no tratamento de barriga inchada e disenteria (ARAÚJO; CHAVES, 2005). O óleo extraído dos frutos de *Terminalia behuria* foi analisado quanto à potencialidade como óleo comestível e o subproduto para produção de biofertilizante, quando foi detectada a presença de taninos (BERA *et al.*, 2007). Estes possuem atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica, mostrando assim a importância desta planta para a indústria alimentícia e para a agricultura (BERLINCK *et al.*, 1995).

As diversas atividades já pesquisadas em espécies da família Combretaceae estão relacionadas na Figura 1.

2.1.1 Gênero *Buchenavia* –Eichler

O gênero *Buchenavia* ocorre na América Central e do norte da América do Sul até o estado de Santa Catarina.

Muitas espécies são conhecidas como tanimbuca [*B. capitata* (Eichler), *B. huberi* (Ducke), *B. macrophylla* (Eichler), *B. grandes* (Ducke), *B. ochropurumna* (Eichler)], e têm grande importância econômica porque possuem madeira resistente ao ataque de cupins, com cheiro agradável quando verde e imperceptível após a secagem. Por este motivo têm utilidade na construção civil. A madeira de *B. ochropurumna* também é usada na produção de energia (PAULA, 1999). Algumas espécies de *Buchenavia* são usadas em reflorestamento de áreas degradadas, para atrair dispersores de sementes (ATTANASIO *et al.*, 2006).

B. tomentosa é uma árvore nativa dos cerradões e de mata semidecíduas, possuindo a altura média de 5 a 12m e com o diâmetro do tronco de 30 a 50 cm (LORENZI, 2002). É conhecida no Pantanal como tarumarana, particularmente na região da Nhecolândia, e produz frutos no inverno e primavera (Figura 2), os quais são consumidos pelos pantaneiros (POTT; POTT, 1986). A casca é usada no tratamento de tosse pela população pantaneira (POTT, POTT, SOBRINHO, 2004).

Outras espécies de *Buchenavia* já foram estudadas quanto às propriedades medicinais, sendo que as folhas de *B. capitata* apresentaram atividade anti-HIV e citotóxica (BEUTLER *et al.*, 1992) e o extrato etanólico da raiz de *B. parviflora* apresentou atividade inibidora da enzima FAS (*Fatty Acid synthase*), (LI *et al.*, 2002).

Espécie	Atividade	Referência
<i>Anogeissus latifolia</i>	Antiúlcera e antimicrobiana	GOVINDARAJAN <i>et al.</i> , 2006
<i>Combretum leprosum</i> , <i>C. woodi</i> , <i>C. erythrophyllum</i> , <i>C. imberbe</i> , <i>C. laxum</i> , <i>C. hartmannianum</i> , <i>C. padoides</i>	Anti-inflamatória, antinoceptiva e anticolinesterásica; antibacteriana; antioxidante; antifúngica; anti-HIV; antimalárica	FACUNDO <i>et al.</i> , 2005; ELOFF, FAMAKIN, KATERERE, 2005; MARTINI, KATERERE, ELOFF 2007; ANGEH <i>et al.</i> , 2007a ; BISOLI <i>et al.</i> , 2008; ALI <i>et al.</i> , 2002; ANGEH <i>et al.</i> , 2007b
<i>Conarus erectus</i>	Antimicrobiana	ADONIZIO <i>et al.</i> , 2006
<i>Bucida burceras</i>	Antitumoral	HAYASHI <i>et al.</i> , 2003
<i>Guirea senegalensis</i>	Antimalárica, antiviral	FIOT <i>et al.</i> , 2006; LAMIEN <i>et al.</i> , 2005
<i>Terminalia catappa</i>	Antioxidante; hepatoprotetora; antidiabética	CHYAU, KO, MAU, 2006; KINOSHITA <i>et al.</i> , 2007; NAGAPPA <i>et al.</i> , 2003
<i>T. arjuna</i>	Anticâncer; desordens cardiovasculares; citotóxica; antiviral (herpes tipo 2)	KANDIL; NASSAR,1997; DWIVEDI, 2007; SAXENA <i>et al.</i> , 2007; CHENG, LIN, LIN, 2002
<i>T. macroptera</i>	Antimicrobiana, anti-helmintica	CONRAD <i>et al.</i> , 1998; SILVA <i>et al.</i> , 1997
<i>T. sericea</i>	Antifúngica, antibacteriana e citotóxica; anti-inflamatória	MOSHI; MBWAMBO, 2005; ELDEEN <i>et al.</i> , 2006; MOCHIZUKI;HASEGAWA,2007
<i>T. superba</i>	Imunossupressiva	TABOPDA, <i>et al.</i> , 2008
<i>T. chebula</i>	Antianafilática	SHIN <i>et al.</i> , 2001
<i>T. chebula</i> e <i>T. belerica</i>	Hipolipidêmica	SARAVANAN <i>et al.</i> , 2007
<i>T. avicennnoids</i>	Tripanocida	BIZIMANA <i>et al.</i> , 2006
<i>Pteleopsis suberosa</i>	Antibacteriana; anti-inflamatória, Antiúlcera, e antioxidante	LEO <i>et al.</i> , 2006; PASQUALE <i>et al.</i> , 1995; GERMANÓ <i>et al.</i> , 2008
<i>P. hylodendron</i>	Antibacteriana	NGOUNOU <i>et al.</i> , 1999
<i>Quesqualis indica</i>	Anticolinesterásica	WETWITAYAKLUNG <i>et al.</i> , 2007

Figura 1 – Espécies da família Combretaceae e respectivas atividades.

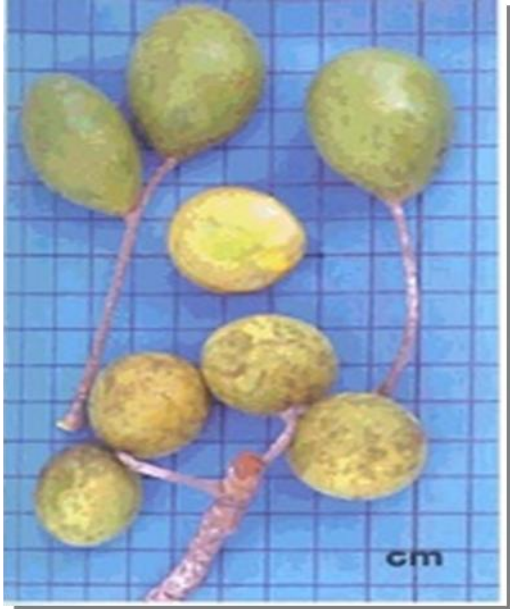


Figura 2- Frutos de *Buchenavia tomentosa*
 Fonte: LORENZI (2002)

2.2 Família Ochnaceae

O número de gêneros e espécies da família Ochnaceae diverge entre alguns autores. De acordo com Souza; Lorenzi, (2005) possui 30 gêneros e 400 espécies e no Brasil ocorrem 11 gêneros e cerca de 120 espécies.

Os gêneros nativos do Brasil são *Blastemanthus*, *Cespedesia*, *Elvasia*, *Krukoviella*, *Luxemburgia*, *Ouratea* (= *Gomphia*), *Perissocarpa*, *Philacra*, *Poecilandra*, *Sauvagesia* (= *Lavradia*, *Leitgbia*) e *Wallacea*. Os representantes das Ochnaceae são comuns no Cerrado, especialmente *Ouratea spectabilis* e *Ouratea castanaefolia* (SOUZA; LORENZI, 2005).

Ao contrário das Combretaceae, esta família tem interesse econômico restrito, com poucas espécies ornamentais. Algumas espécies de Ochnaceae são usadas na medicina popular nos continentes Africanos e Asiático, porém há poucos registros quanto a estudo fitoquímico.

Lophira alata é uma das espécies da família Ochnaceae. É usada pela população do oeste da África como analgésico, sendo explorada comercialmente e usada na medicina no sul de Camarões (TIH *et al.*, 1992). Estudos realizados “*in vitro*” com o extrato metanólico da casca desta planta, revelaram que esta espécie tem atividade antitumoral (MURAKAMI *et al.*, 1992).

Estudo realizado com a casca de *L. alata*, que é usada também como anti-inflamatória, revelou atividade antibacteriana frente a *Micrococcus luteus* (MURAKAMI *et al.* 1993), enquanto a população camaronesa utiliza as folhas de *L. alata* como cicatrizante (IBE; NWUFO, 2005).

Um levantamento sobre as espécies de plantas utilizadas pela população da Nigéria relata o uso de *L. alata* no tratamento de malária, icterícia, distúrbios gastrointestinais e tosse (KAYODE, 2006). Pesquisadores realizaram testes “*in vitro*” com dez plantas, entre elas *L. alata*, a qual mostrou atividade antibacteriana moderada (PIEME *et al.*, 2008).

Outro gênero desta família usado na medicina popular é *Ochna*. No sul da África a população faz uso de *Ochna pulchra* (SIBANDA *et al.*, 1993), enquanto na região sul da Índia *Ochna obtusata* é usada no tratamento de epilepsias, distúrbios menstruais, asma, úlceras e como antídoto contra picada de cobra (RAO *et al.*, 1997). A indicação de *Ochna afzelli* na medicina popular é para combater a icterícia, dor de dente, esterilidade feminina, problemas menstruais e disenteria (PEGNYEMB *et al.*, 2001).

Na Tailândia ocorre *Ochna integerrina*, cuja casca tem sido usada como tônico, digestivo e a raiz como anti-helmíntico (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 2001). Na Indonésia a infusão das raízes e folhas é usada pela população no tratamento de disenteria e como antipirética, sendo também utilizada como espécie ornamental (LIKHITWITAYAWUID; KAEWMATAWONG; RUANGRUNSGSI, 2005).

Pesquisa realizada com *Ochna squarrosa* revelou que esta espécie possui potente atividade analgésica e anti-inflamatória, porém é utilizada pela população no tratamento de constipação, úlceras, feridas e câncer. A casca da raiz é usada como tônico digestivo, o chá das folhas no tratamento de lumbago (dor reumática) e úlceras, e o decocto das raízes no tratamento de problemas menstruais e asma (ANURADHA *et al.*, 2006). A casca de *O. lanceolata* é usada como abortiva, no tratamento gástrico e de distúrbios menstruais (REDDY *et al.*, 2008). As atividades anti-inflamatória e analgésica podem estar relacionadas com o uso de plantas deste gênero no tratamento de distúrbios menstruais.

No Brasil, um dos gêneros estudados é o *Luxemburgia*. Estudos realizados com *L. octandra* e *L. nolis* revelaram a presença do biflavonoide 4',5,7 tri-hidroxiflavona (3'→O→4'')5'',7'' di-hidroxiflavanona, a qual mostrou atividade antitumoral (DE CARVALHO *et al.*, 2004). A atividade antitumoral de *L. octandra* foi evidenciada nos compostos 7,7'-dimetilanaraflavona, agastiflavona, 7'' metil-agastiflavona e luxenchalcona isolados desta espécie, que revelaram atividades significativas contra cinco linhagens de células tumorais: cólon, pulmão, mama, ovário e rins (DANIEL *et al.*, 2007).

2.2.1 Gênero *Ouratea* Aubl.

O gênero *Ouratea* compreende cerca de 300 espécies tropicais, ocorrendo principalmente na América do Sul. Algumas espécies deste gênero têm mostrado atividades antiviral, antimicrobiana e analgésica (DE CARVALHO; DE CARVALHO; BRAZ-FILHO, 2000). O gênero *Ouratea* é endêmico na região neotropical, e é o maior da família Ochnaceae, com aproximadamente 120 espécies (SALVADOR; CERVI; SANTOS, 2005).

Algumas espécies são usadas na medicina popular africana para o tratamento de várias doenças. Segundo MBING *et al.* (2003a), plantas deste gênero são usadas no tratamento de reumatismo e doenças gástricas. A espécie *Ouratea reticulata* é uma delas, sendo utilizada pela população camaronesa para combater diversos males; o suco das folhas ou das flores é usado contra dor de dente, enquanto o caule tem aplicação contra disenteria e tosse (MANGA; MESSANGA; SONDENGAM, 2001).

O extrato de folhas de *O. nitida* foi avaliado quanto à atividade antimalárica e estudos *in vivo* revelaram que o extrato hexânico desta espécie apresentou resultado promissor, reduzindo a parasitemia induzida. Esta planta é usada pela população como adstringente, tônica, vermífuga, contra distúrbios gástricos e reumatismo (ESTEVAM *et al.*, 2005).

O extrato das folhas de *O. sulcata* é usado no tratamento de doenças do trato respiratório superior, diarreia, dor de dente e disenteria pela população de países africanos (Camarões, Nigéria e Gabão). Os biflavonoides sulcatone A e 3 hidróxi-2,3-di-hidroapigenil [I 4':O, II 3'] di-hidrokaemferol, isolados desta espécie, revelaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, o que é compatível com o uso desta planta no tratamento de infecções (PEGNYEMB *et al.*, 2005).

Testes *in vivo* e *in vitro* realizados com o extrato hidroalcoólico bruto de *O. parviflora* evidenciaram atividade citoprotetora significativa contra danos oxidativos. No teste *in vivo* a fração hidroalcoólica mostrou-se mais efetiva que a rutina (CARBONARI, 2006).

O. nigrovilacea foi pesquisada apenas quanto à composição química, sendo isolados dois biflavonoides (ouratina A e B), que são compostos comuns neste gênero. Esta planta é usada pela população de Camarões no tratamento de reumatismo, assim como outras espécies (MBING *et al.*, 2006).

Estudo *in vitro* do extrato etanólico do caule de *O. semiserrata* evidenciou atividade vasodilatadora, produzindo vasodilatação significativa, que aponta a espécie como fonte de substâncias bioativas potencialmente úteis para o tratamento da hipertensão primária. Não há relato do uso desta planta pela população no Brasil (VALADARES *et al.*, 2003).

Outra espécie de *Ouratea* pesquisada no Brasil é a *O. multiflora*, da qual foram isolados quatro biflavonoides diméricos. Os compostos isolados das folhas desta planta foram testados frente às atividades antimicrobiana, citotóxica, anticolinesterásica e antioxidante, e os resultados revelaram que os compostos isolados foram inativos para atividade citotóxica e anticolinesterásica. Mostraram ainda fraca atividade antibacteriana e apenas um composto apresentou atividade antioxidante moderada, enquanto outros três apresentaram fraco potencial seqüestrador de radicais livres (CARBONEZI *et al.*, 2007).

Entre as espécies de *Ouratea*, a mais estudada é a *O. hexasperma*, sobre a qual há diversas publicações referentes a atividades biológicas e composição química. O extrato metanólico dos galhos desta espécie foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana e mostrou ser ativo frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e cepas fúngicas *Rhodotorula* spp e *Candida albicans* (FERNANDES *et al.*, 2008). *O. hexasperma* mostrou atividade antitumoral, citotóxica e inibidora de DNA topoisomerase (DANIEL *et al.*, 2005). Um estudo realizado com três compostos isolados das folhas desta espécie mostraram que dois (7,7'-dimetilanaraflavona e 7''-metilagastisflavona) apresentaram atividade antitumoral significativa contra cinco linhagens de células: adenocarcinoma de cólon, carcinoma de pulmão, renal, mama e adenocarcinoma de ovário (DANIEL *et al.*, 2007).

A espécie *Ouratea spectabilis* (Mart.ex.Engl.) (Figura 3) é conhecida como folha-de-serra, e é encontrada no Brasil nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (LORENZI, 2002).

Estudos realizados com quatro biflavonoides (6,6'' bigenkwanina, amenthoflavona, 7,7'' dimetoxiagastisflavona e tetradimetoxibigenkwanina) isolados das folhas de *O. spectabilis* revelaram que os compostos testados mostraram atividade inibidora contra a produção de aflatoxina B1 e B2. As aflatoxinas são metabólitos secundários de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* que são toxigênicos, carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos para diferentes espécies de animais. Evidências indicam que esta toxina pode estar envolvida na etiologia do câncer de fígado em humanos. Alguns compostos naturais atuam como preventivos contra contaminação por aflatoxina e entre estes compostos estão os flavonoides (GONÇALVES; FELICIO; PINTO, 2001).

O. spectabilis possui características alelopáticas e estudos realizados com o extrato etanólico de quinze espécies do Cerrado mostraram que quatro inibiram a germinação das sementes de alface. O extrato etanólico das espécies ativas foi particionado em hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, sendo que a atividade ficou concentrada nas fases clorofórmica e acetato de etila, visto que estas duas fases continuaram a apresentar uma

capacidade significativa de inibição da germinação das sementes. Este estudo mostra a importância da escolha de plantas para o reflorestamento no cerrado mesmo utilizando plantas típicas do ecossistema (SILVA *et al.*, 2006).



Figura 3- Frutos de *Ouratea spectabilis*
Fonte: LORENZI, 2002

2.3 Infecções

As infecções emergentes, oportunistas e hospitalares podem ser causadas por fungos e bactérias. Estes agentes de infecção podem habitar diversos locais inclusive o organismo humano, e quando ocorre uma redução da imunidade eles proliferam causando diversas doenças.

- Infecções emergentes e reemergentes

Doenças emergentes - são doenças novas com impacto significativo: sobre o ser humano em decorrência de sua gravidade em acometer órgãos e sistemas principais, com potencialidade de deixar seqüelas limitadoras e mesmo morte; seja pelas repercussões sociais relacionadas à sua prevalência, ou reveladoras de degradação ambiental, como é o caso da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). As doenças reemergentes são as que reaparecem após período de declínio significativo, como cólera e dengue no Brasil e tuberculose em todo o mundo, ou ameaçam aumentar em futuro próximo. (PEDROSO, 1999)

Quando se trata de doenças infecciosas verificam-se alguns focos de atenção: no caso de infecção emergente - o surgimento e identificação de novos problemas de saúde, que é consequência de novos agentes infecciosos; quanto as infecções reemergentes fatores como; mudança no comportamento epidemiológico de doenças já conhecidas e introdução de agentes já conhecidos em novas populações.

Segundo a literatura um dos fatores que contribui para o aparecimento de novas doenças é a degradação ambiental (CARVALHO *et al.*, 2009).

O rápido processo de urbanização, com migrações de grandes contingentes populacionais das áreas rurais para as urbanas, associando-se à ausência de saneamento básico. O descuido com a higiene pessoal doméstica propicia terreno fértil para a propagação de doenças (PEDROSO; ROCHA, 2009).

As infecções emergentes, em sua grande maioria, são de origem viral, mas outros agentes infectantes como protozoários, fungos e bactérias proliferam neste ambiente aumentando condicionalmente o surgimento de doenças.

- Infecção oportunista

As infecções oportunistas são mais frequentes indivíduos imunocomprometidos. A imunodepressão pode ter várias causas, como por exemplo o estress, porém os casos mais preocupantes são aqueles em que a baixa imunidade é causada por condições específicas; como em pacientes transplantados, HIV positivo, pessoas em tratamento com quimio e radioterapia, doentes renais que necessitam de hemodiálise, pacientes internados em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) e outras doenças que comprometem o sistema imunológico como lúpus eritematoso sistêmico.

Estudo realizado por Macêdo *et al.* (2009) mostrou que a alta incidência de infecções oportunistas por leveduras tem sido evidenciada sob manifestações clínicas e fatores de risco relacionados à neutropenia como Diabetes mellitus, tuberculose pulmonar, lúpus eritematoso sistêmico, AIDS, uso de drogas imunossupressoras, mucosite induzida por quimioterapia ou altas doses de irradiação.

- Infecção Hospitalar

Nos últimos anos as infecções hospitalares estão causando grande preocupação mundial. Este evento adverso decorrente da hospitalização do paciente se tornou importante foco de atenção nas ultimas décadas, embora desde a antiguidade existiam relatos sobre a disseminação de doenças epidêmicas no ambiente hospitalar (GUINTA; LACERDA, 2006).

A infecção hospitalar é potencialmente determinada pela evolução tecnológica dos procedimentos diagnósticos e terapêuticos invasivos, demandados pelo modelo clínico de assistência. Além desses fatores, têm-se ainda os medicamentos imunossupressivos, principalmente os antibióticos, a maior expectativa de vida e o aumento de demanda por assistência a pacientes imunodeprimidos e com doenças crônicas-degenerativas, que aumentam os riscos das infecções hospitalares resistentes (GIUNTA; LACERDA, 2006).

As infecções hospitalares representam um grave problema de saúde pública mundial, pois está relacionada com altas taxas de morbidade e mortalidade, aumento do tempo de internação e do custo para o sistema de saúde, constituindo-se um grande desafio para medicina atual (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A preocupação com este tema é justificado por envolver aspectos jurídicos concernentes aos direitos da cidadania; e por configurar-se em um problema de saúde pública associada à prática profissional (MOURA *et al.*, 2008).

A infecção hospitalar é a principal causa de morbidade e mortalidade de recém-nascidos, principalmente nas quatro semanas de vida.

Um estudo retrospectivo do registro de 69 óbitos em hospital de ensino pediátrico (interior de São Paulo) identificou a relação da infecção hospitalar com óbitos foi realizado em 1993. As infecções que mais contribuíram ao óbito foram pneumonia, Infecção da Corrente Sanguínea (ICS) e infecção urinária, causada por *Candida sp*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A infecção hospitalar foi mais importante como causa direta do óbito nos pacientes com doença não fatal e como contribuinte ao óbito nos pacientes com doença fatal ou potencialmente fatal (TURRINI, 2002).

Em Mato Grosso do Sul, no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Campo Grande), foi realizada uma pesquisa na unidade pediátrica com 108 pacientes, no período de janeiro de 1998 a dezembro de 1999, sendo que as infecções mais comuns foram ICS e pneumonia. Os principais patógenos isolados foram *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida tropicalis* (CHANG *et al.*, 2003).

Chang *et al.* (2008) realizaram uma análise retrospectiva de casos de infecções na corrente sanguínea por *Candida* no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Campo Grande); foram diagnosticados 96 episódios de janeiro 1998 a dezembro 2006. As condições de risco mais encontradas foram tempo prolongado de internação, uso de catéter venoso central e uso prévio de antibiótico. 58 (60,4%) dos pacientes foram a óbito durante a hospitalização. A espécie prevalente foi *C. albicans* (45,8%) seguida

de *C. parapsilosis* (34,4%), *C. tropicalis* (14,6%) e *C. glabrata* (5,2%). O maior número de casos foi registrado em crianças e idosos.

Outra pesquisa realizada no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Campo Grande), foi na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). O estudo prospectivo foi realizado no período de fevereiro a julho de 2006 sendo observado um total de 118 pacientes, com taxa global de infecção de 59,3% (63/118). Os procedimentos invasivos como cateterismo venoso central, cateterismo urinário de permanência, intubação orotraqueal, traqueostomia - e a permanência prolongada, foram fatores preditivos para a ocorrência da infecção. As infecções mais comuns foram no trato urinário, respiratório e de corrente sanguínea; dentre os microorganismos isolados, houve predomínio de fungos como *C. albicans* e *C. glabrata*; e das bactérias, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As infecções, sejam elas hospitalares ou não, precisam ser controladas e, por esta razão, faz-se necessário a busca de novos medicamentos que irão auxiliar na terapia das doenças causadas por estes agentes infectantes e que tenham pouca ação tóxica para os organismos infectados.

Alguns dos agentes mais comuns em infecções foram testados neste trabalho: *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterococcus faecalis*; *Candida albicans*; *C. parapsilosis*; *C. krusei*; *C. glabrata* e *Cryptococcus neoformans*.

2.3.1 Bactérias

➤ *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria gram-positiva frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de indivíduos saudáveis. Este microorganismo pode provocar doenças que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculo e celulite) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, septicemia e outras) (SANTOS *et al.*, 2007).

Com a descoberta dos antibióticos achava-se que os problemas com as infecções estavam controlados, mas as bactérias tornaram-se resistentes aos primeiros antibióticos perpetuando aos medicamentos mais avançados como a vancomicina. A *S. aureus* tem ampla distribuição, tem o homem como principal reservatório, pode permanecer viável por longo tempo em partículas de poeira (SANTOS *et al.*, 2007).

A bactéria *S. aureus* pode causar infecções sistêmicas potencialmente fatais, sendo comum naquelas de difícil tratamento, tais como infecções ósseas, artrites sépticas e de

próteses ósseas. Em razão da resistência aos antibióticos e seu amplo potencial infectante, há necessidade urgente, já reconhecida pela OMS, da descoberta e/ou síntese de novos antibióticos para o tratamento de *S. aureus* multirresistentes (SANTOS *et al.*, 2007).

Estudos realizados em pacientes com infecção na corrente sanguínea mostraram que *S. aureus* foi a bactéria predominante em 118 episódios e destes, 66 eram resistentes a meticilina (GUILARDE *et al.*, 2007).

Já foi demonstrada a transmissão de *S. aureus* resistente a meticilina durante tratamento dentário. Em experimento realizado no período de um ano, placas de Petri com meio de cultura adequado, foram expostas ao ambiente. Os resultados revelaram uma significativa contaminação por *Staphylococcus* spp no ambiente clínico, sendo que dos 32,2% exemplares, 0,45% foi de *S. aureus*, alguns resistentes a ampicilina, eritromicina e tetraciclina, sugerindo a existência de isolados multiresistentes (BERNARDO *et al.*, 2005).

As plantas medicinais estão entre os produtos naturais de grande interesse científico devido a possibilidade de empregá-las como fitofármacos, algumas são utilizadas pela medicina popular no tratamento de doenças infecciosas e estudos com base nesse conhecimento confirmam o uso de algumas espécies.

O óleo essencial de *Lippia sidoides* (Verbenaceae) foi avaliado quanto à atividade antibacteriana para diversas cepas de *S. aureus* resistentes isolados de materiais clínicos; os testes revelaram significativa e promissora propriedade anti *Staphylococcus*, podendo esta planta, depois de avaliação quanto à toxicidade, ser usada no tratamento de doenças causadas por este agente (OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

Anacardium occidentale (Anacardiaceae) foi avaliada e obteve comprovação de atividades anti-inflamatória, antidiabética e anticolenisterásica. Os pesquisadores avaliaram a ação antimicrobiana do extrato etanólico do caule e os resultados mostraram atividade significativa “*in vitro*” sobre linhagens resistente de *S. aureus* e sensível a meticiclina (SILVA *et al.*, 2007).

➤ *Pseudomonas aeruginosa*

É outra bactéria que causa preocupação mundial devido a sua virulência e resistência aos antibióticos. Este microorganismo é um bacilo gram-negativo, que nos últimos anos tem ocupado lugar de destaque entre os patógenos hospitalares, pois é o agente de pneumonia associada à ventilação mecânica, bacteremias, endocardite, meningite, infecções do trato urinário e de pele em pacientes internados em unidade de terapia intensiva ou em terapia

imunossupressora. Na América Latina, particularmente no Brasil, este microorganismo é um dos agentes mais frequentemente associados à etiologia das infecções hospitalares, especialmente as do trato respiratório (MITSUGUI *et al.*, 2008).

Muitas amostras isoladas de pacientes têm mostrado resistência ou multirresistência, e um dos fatores para este patógeno apresentar esta característica pode estar ligado à fonte de água.

Os antibióticos e as bactérias resistentes são descartados em grandes quantidades no ambiente, como resultado do frequente uso indiscriminado de antibiótico nas práticas médicas, veterinárias e agrárias. As águas dos rios são os principais receptores desses poluentes, uma vez que recebem esgotos urbanos, industriais e hospitalares, e os rios são as fontes de água para consumo humano e animal, portanto, esta poluição pode contribuir para manutenção e até a disseminação da resistência bacteriana (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

P. aeruginosa é um dos principais microorganismos recuperados de efluentes hospitalares. É um patógeno nosocomial muito frequente, responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano. Uma das medidas que deve ser tomada para evitar esse foco da resistência, é reduzir ou evitar a liberação de material contaminado do ambiente hospitalar para o meio ambiente (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

As infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* podem apresentar mecanismo de resistência intrínseca e adquirida, à síntese de metalo- β -lactamases (MBLs) que é o mecanismo de maior relevância na atualidade. Esta resistência ocorreu devido ao uso frequente de carbapenêmicos. Na análise de 37 cepas que apresentaram resultados positivos na produção de MBLs, foi observado que 35% apresentaram multirresistência e 36% foram resistentes aos carbapenêmicos (GRÄF; FUENTEFRÍA; CORCÃO, 2008).

Pesquisadores acompanharam 131 pacientes com episódio de infecção, causada por *P. aeruginosa*, dos quais 67 (51,1%) foram a óbito. A causa das mortes não foi relacionada com a resistência antimicrobiana, mas com a terapia inicial, idade e choque séptico. A presença de cepas panresistentes foi de 87,1% nos casos onde a terapia inicial foi inadequada (PINHEIRO *et al.*, 2008).

Uma alternativa para o tratamento de infecção causada por *P. aeruginosa* é a associação de ácido ascórbico com antibiótico, o efeito desta combinação foi estudada *in vitro*. O ácido ascórbico foi combinado com seis antibióticos frente a doze isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes. Os resultados revelaram que para quatro medicamentos (cloranfenicol, canamicina, estreptomicina e tetraciclina) a combinação apresentou efeito

sinérgico, sendo que frente a uma das cepas testadas, cloranfenicol teve efeito antagônico. (CURSINO *et al.*, 2005).

A eliminação dos focos causadores de infecções oportunistas também é motivo de preocupação dos profissionais da saúde. Uma das técnicas testadas foi o uso de microondas, por ser uma alternativa econômica, viável ambientalmente e segura para o tratamento de resíduos de serviços de saúde. O teste foi realizado com cepas de *P. aeruginosa* na forma vegetativa. Os pesquisadores concluíram que o processamento com microondas em escala de laboratório, pode ser uma técnica de inativação efetiva, desde que as condições operacionais sejam bem estabelecidas (PISANI JÚNIOR *et al.*, 2008).

➤ *Enterococcus faecalis*

O gênero *Enterococcus* pode ser encontrado como comensal na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis. A crescente importância deste microorganismo pode ser atribuída a cepas resistentes encontradas em ambientes não usuais e/ou estressantes como o ambiente hospitalar (CAMARGO, 2005).

Do gênero *Enterococcus* a espécie mais isolada encontrada é a *E. faecalis*, que é um componente comum na microbiota fecal normal e dissemina-se para todo intestino, tornando fonte comum na rota de infecção. A presença deste microorganismo pode causar infecção no trato urinário, peritonite ou formação de abscesso, seguida de perfuração intestinal. Testes realizados com 97 exemplares isolados de pacientes mostraram que todos apresentaram sensibilidade ou resistência aos antibióticos analisados (SAUDERS; BODONAIK, 2006).

O surgimento de cepas resistentes dificulta a terapia das infecções causadas por este patógeno oportunista principalmente em pacientes imunodeprimidos. A resistência de *Enterococcus* a antibiótico foi registrada em pesquisa realizada por Furtado *et al.* (2005). O enterococo resistente à vancomicina (VRE) é um dos principais patógenos causadores de infecções hospitalares. A sua presença é notável em infecções urinárias, infecções de sítios cirúrgicos e bacteremias. O gênero *Enterococcus* apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos e também progressiva resistência adquirida a antimicrobiano comumente utilizados para tratar infecções enterocócicas sendo e a resistência à vancomicina mais recente (FURTADO *et al.*, 2005). Os dados da pesquisa apresentaram aumento progressivo na incidência de VRE em hospitais universitários e a melhor maneira de controlar a disseminação deste microorganismo são as orientações quanto ao uso de antimicrobianos, principalmente ao uso da vancomicina.

A resistência das bactérias às linhas de medicamentos de última geração é muito preocupante porque os médicos ficam sem alternativa na escolha de medicamentos. Por isso há necessidade da busca de novos fármacos para auxiliar no tratamento das infecções bacterianas principalmente aquelas causadas por cepas resistentes. Todavia, é necessário que os mesmos sejam menos agressivos aos pacientes e que tenham amplo espectro de ação, porém deverão ser usados de maneira racional, mantendo por mais tempo a sensibilidade da bactéria.

2.3.2 Fungos

As infecções fúngicas têm aumentado muito nos últimos anos, acometendo pessoas debilitadas que estejam passando por terapias agressivas como o tratamento da AIDS, neoplasias e transplantados.

As infecções mais comuns são causadas por *Candida sp.* podendo ocorrer a presença de mais de uma espécie, sendo a identificação do patógeno muito importante para direcionar o tratamento, tornando-o eficaz e de curta duração.

Do ponto de vista taxonômico cerca de 200 espécies de *Candida* são reconhecidas, das quais 10% podem causar infecções nos seres humanos. Destas, *C. albicans* é a espécie mais frequente descrita em casos de infecções hospitalares em vários países. No Brasil as espécies mais prevalentes são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, mas infecções por *Candida glabrata* estão aumentando, enquanto que, em outros países, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* são as mais comuns em pacientes com candidíase (MALUCHE; SANTOS, 2008).

A espécie de *Candida* assim como as bactérias, estão presentes no nosso organismo, mas tornam-se problema de saúde, quando há imunocomprometimento, ocorrendo então o aumento desordenado destas leveduras.

Os processos mais comuns que levam a infecções por *Candida sp.* incluem as várias causas de imunossupressão, como neutropenia, desnutrição, quimioterapia antineoplásica, uso prolongado de catéteres, queimaduras e cirurgias extensas. As infecções fúngicas podem evoluir para processos infecciosos graves levando á alta morbidade e mortalidade (MALUCHE; SANTOS, 2008).

➤ *Candida albicans*

Candida albicans pode ser encontrada geralmente no trato gastrointestinal, genital e cutâneo e é a mais frequente nos processos de infecção fúngica.

Estudo retrospectivo foi realizado com 620 transplantados renais, dos quais 87 apresentaram 107 episódios de candidíase. Em 50% dos casos a infecção ocorreu depois de um ano e o local mais acometido foi o trato urinário, porém houve ocorrência no trato respiratório e gastrointestinal, com 14 pacientes apresentando desfecho fatal e 3 deles diretamente pela candidíase. O uso prévio de antibiótico foi responsável por 42 episódios nos primeiros seis meses. *C. albicans* foi a mais frequente, mas ocorreram episódios com *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e outras (MOYSÉS NETO *et al.*, 1997).

As cepas *C. krusei* e *C. glabrata* são resistentes ao fluconazol, medicamento de primeira escolha para o tratamento de candidíase no trato urinário (MOYSÉS NETO *et al.*, 1997).

A candidíase vulvovaginal é um processo infeccioso e/ou inflamatório do trato geniturinário inferior feminino. Estudo foram realizados em pacientes com quadro positivo para esta infecção, correlacionando sintomas, microorganismos e a relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção, relata que as espécies de *Candida* mais frequentes foram *C. albicans* e *C. glabrata*. Os pesquisadores concluíram que os sinais e sintomas não se correlacionaram com as espécies isoladas e que os testes laboratoriais são importantes para confirmação etiológica do agente. Quanto aos parceiros sexuais eles devem ser avaliados em casos de repetição, pois a transmissão sexual ocorreu em 87% dos casos de reincidência (BOATTO *et al.*, 2007).

Outra infecção causada por *Candida* é a candidíase orofaríngea, que é a mais comum entre pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). De cem pacientes infectados pelo HIV avaliados, 58 apresentaram culturas positivas para *Candida* spp. sendo a *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada (93%). Testes *in vitro* revelaram que algumas cepas isoladas foram resistentes ao fluconazol, a droga mais usada para esta infecção, pela baixa toxicidade, boa absorção e disponibilidade para uso oral e endovenoso. Os autores ressaltam a necessidade de drogas de uso tópico no tratamento de candidíase oral (WINGETER *et al.*, 2007).

Uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas está na pesquisa de plantas; Um gel produzido com *Punica granatum*, cujo fruto é conhecido como romã, foi testado frente às cepas de *C. albicans* isoladas ou associadas com bactérias. Os resultados

comprovaram que este gel pode ser uma nova opção de tratamento em infecções orais como cáries, doença periodontal e estomatites, pois apresentou concentração mínima inibitória mais eficiente que o padrão (miconazol) (VASCANCELOS *et al.*, 2006).

➤ *Candida glabrata*

Outro agente etiológico que pode causar infecções fúngicas é *Candida glabrata*. O número de casos com resultados positivos para este agente tem aumentado nos últimos anos.

Esta levedura surge como um importante patógeno hospitalar, constituindo-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das séries de candidemia relatada nos Estados Unidos e Europa. Isolados clínicos de *C. glabrata* apresentaram menor sensibilidade ao fluconazol e menor susceptibilidade a anfotericina B. Infecções por esta cepa podem ocorrer em pacientes previamente expostos a anfotericina B. Outro aspecto interessante sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A análise de 31 cateteres urinários retirados de pacientes internados, revelaram que em oito foram obtidas culturas positivas para leveduras. Todos os pacientes receberam tratamento com antibiótico e os pesquisadores relacionaram a predisposição para candidúria ao uso de terapias antibióticas e uso de cateter. Porém, a relevância desta pesquisa foi a identificação de *C. glabrata*, espécie relacionada com o uso de mais de um tipo de antimicrobiano e uso de cateter urinário (YOSINAGA *et al.*, 2004).

A esofagite é uma infecção oportunista comum em pacientes imunossuprimidos, já tendo sido relatado dois casos desta infecção onde o agente etiológico isolado foi *C. glabrata*, a que raramente encontrado neste tipo de infecção (MACÊDO *et al.*, 2008).

➤ *Candida parapsilosis*

Infecções fúngicas na cavidade oral podem ocorrer por fatores externos como o uso de próteses ou de aparelhos ortodônticos. Pesquisadores relatam o caso de uma paciente que apresentou um quadro de candidíase atrófica crônica ou estomatite pelo uso de dentadura, causada por *C. parapsilosis*, que é raramente encontrada em infecções bucais (MOREIRA *et al.*, 2002).

Candida parapsilosis apresenta-se, desde os anos 80, como importante patógeno hospitalar de fungemias. Sua ocorrência é ainda maior em crianças e recém-nascidos

prematturos internados em unidades de terapia intensiva, onde a prevalência de candidemias por esta levedura é de 17 a 50% dos casos. Isolados clínicos desta espécie são sensíveis a anfotericina B e aos triazólicos. Em países da América Latina, *C. parapsilosis* tem sido reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Nas unhas ocorre uma infecção chamada onicomicose que pode ser determinada por diversas espécies de fungos. Na cidade de São José do Rio Preto pesquisadores analisaram 200 fragmentos de unhas com suspeita de onicomicose, encontraram 98 casos de candidíase das quais 47% das espécies isoladas foram *C. parapsilosis*. *C. albicans* ficou em segundo lugar com apenas 20% dos casos (MARTINS *et al.*, 2007).

Quatro casos de fungemia causada por *C. parapsilosis* foram observados em pacientes que estavam na unidade de cuidados intensivos e tinham doenças neurológicas. Os pesquisadores relacionaram a infecção com o uso de catéter e nutrição parental. *C. parapsilosis* é uma das espécies não *albicans* que tem apresentado aumento do número de relatos, e segundo os autores, um dos fatores pode ser o uso indiscriminado de antifúngico (DIZBAY *et al.*, 2008).

➤ *Candida krusei*

Relatos de candidíase por *C. krusei* têm aumentado nos últimos anos acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. A questão mais preocupante está na resistência deste microorganismo frente ao fluconazol, medicamento de primeira indicação em pacientes HIV positivo, que desenvolvem infecção causada por *Candida sp.* (SAMARANAYAKE, 1997).

Entre as manifestações clínicas causadas por *C. krusei* estão endoftalmite, artrite e endocardite, que ocorre frequentemente em pacientes comprometidos nos ambientes hospitalares. Samaranayake (1997) fez uma revisão de artigos publicados na década de noventa (século XX), que registrou a resistência de *C. krusei* ao fluconazol, lembra que este medicamento começou a ser usado em 1990 como antifúngico profilático em pacientes transplantados. *Candida krusei* tem-se mostrado como um patógeno hospitalar ocasional, particularmente em pacientes portadores de doenças hematológicas malignas e/ou submetido a transplante de medula óssea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Segundo Fanci *et al* (2005) um paciente com leucemia mieloide aguda. Depois de transplantado desenvolveu uma infecção causada por *C. krusei*. A terapia utilizada no tratamento foi a caspofungina, obtendo-se resultado positivo.

A análise de 27 amostras de pacientes portadores de otite externa revelou que pesquisadores isolaram uma cepa de *C. krusei*. Os fatores que levam a essa infecção não estão relacionados com debilidade graves como é o caso das outras doenças, mostrando que *C. krusei* pode ser encontrada em infecção comum (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Estudos realizados com *Psidium guajava* (goiabeira) frente às cepas *C. albicans*, *C. krusei* e outras revelaram atividade satisfatória sobre as leveduras testadas. Esta é uma planta comum no Brasil e suas folhas podem ser usadas topicamente como tratamento alternativo da candidíase oral (ALVES *et al.*, 2006).

➤ *Cryptococcus neoformans*

Como já mencionado, pacientes portadores de HIV estão mais sujeitos às infecções oportunistas, dentre elas a criptococose, que é causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, microorganismo que pode ser encontrado associado às fezes de aves.

O *C. neoformans* é patogênico para os seres humanos e a maioria dos casos de criptococose, ocorre em áreas urbanas. A inalação de *C. neoformans* inicialmente causa infecção dos pulmões que depois se dissemina através da corrente sanguínea para outras partes do corpo, incluindo cérebro e meninges, especialmente em indivíduos imunodeprimidos e pessoas que foram tratadas com esteroides. A doença geralmente se expressa como meningite crônica e quando não tratada pode levar à morte (TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

O *Cryptococcus neoformans* pode ser classificado em duas variedades de acordo com seus antígenos polissacarídeos capsulares. O *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipo A, D e AD) que é cosmopolita e tem como principal ambiente as fezes de aves, e o *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B e C) é encontrado preferencialmente no meio campestre, em regiões tropicais e subtropicais (SILVA *et al.*, 2008).

Estudo retrospectivo, no período de 1995-2005 em Mato Grosso do Sul, relatou 123 casos de criptococoses. Confirma a informações de que esta infecção é mais comum em pacientes HIV infectados, pois 84,5% (104) dos casos ocorreram nestes pacientes e 15,4% (19) em pacientes com outras condições predisponentes. Os sintomas clínicos variaram de febre a manifestações neurológicas. O estudo também mostrou que pacientes que fazem o uso adequado dos medicamentos antiretroviral estão menos sujeitos a criptococose (LINDENBERG *et al.*, 2008).

Ensaio *in vitro* com 35 amostras de *C. neoformans* isoladas de pacientes, e testadas quanto a suscetibilidade da cepa aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e cetoconazol, mostrou que, 30 cepas (85,7%) foram isoladas de pacientes HIV positivo, 4 (11,4%) de indivíduos com outras causas de imunossupressão como lipossarcoma, lúpus, transplante renal e diabetes, e um que não apresentou fatores predisponentes para criptococose. Sobre a suscetibilidade, os pesquisadores chegaram à conclusão de que a resistência aos antifúngicos convencionais ainda não é um problema significativo (SILVA *et al.*, 2008).

Apesar de não encontrar cepas de *Cryptococcus* resistentes como em *C. albicans* e não *albicans*, extratos de plantas são testados frente a estas cepas como alternativa para o tratamento da criptococose.

Testes *in vitro* realizados com extrato bruto, cera, óleo e fração de folhas de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) frente a *C. neoformans* var. *neoformans* e *gattii*. Os resultados *in vitro* mostraram que *C. brasiliensis* apresentam potente atividade antifúngica sobre os isolados *neoformans*. Esta planta produz o fruto conhecido como pequi o qual tem sido divulgado por possuir atividade antifúngica (PASSOS *et al.*, 2002).

2.4 Atividade anti-radicalar

Radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons emparelhado, sendo assim altamente reativo e capazes de atacar qualquer biomolécula e de meia vida curta, provocando doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças cardíacas, Alzheimer, e ainda os processos de envelhecimento que estão associados ao estresse oxidativo (ROESLER *et al.*, 2007). Substância que apresenta atividade anti-radicalar em teste químico, como o DPPH (2,2 difenil-1-picrilidrazila) pode ser considerada antioxidante porque reage com o radical livre.

Compostos antioxidantes protegem o sistema biológico contra os efeitos nocivos de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (RUFINO *et al.*, 2007).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências que cereais, frutas e vegetais são as principais fontes de antioxidantes fenólicos, que contribuem para baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cuja dieta inclui alta ingestão desses alimentos (ROESLER *et al.*, 2007).

Nos últimos anos a prevenção de câncer e doenças cardiovasculares tem sido associada com a ingestão de frutas frescas, vegetais ou chás ricos em compostos com atividade antioxidante (SILVA *et al.*, 2005).

Pesquisa com cinco frutas do cerrado, *Annona crassiflora* (araticum), *Solanum lycocarpum* (lobeira), *Eugenia dysenterica* (cagaita), *Caryocar brasiliensis* (pequi) e *Swartzia langsdorfii* (banha de galinha) mostrou que os extratos etanólico da semente de cagaita, semente e casca de araticum, casca de banha de galinha e extrato etanólico e aquoso da casca do pequi, possuem excelente capacidade de sequestrar radicais livres, podendo ter aplicação nos setores farmacêutico, cosmético e nutricional (ROESLER *et al.*, 2007).

Estudos realizados com o subproduto do pedúnculo do caju quanto à atividade antioxidante, revelaram atividade *in vitro* pelo sequestro do radical DPPH, e *in vivo* pela diminuição no nível de peroxidação no tecido cerebral (BROINIZI *et al.*, 2008).

Os compostos fenólicos compreendem o principal grupo de compostos antioxidantes de origem vegetal. Com este propósito, foram testados as fases hexânica, clorofórmica e acetato de etila das partes aéreas de *Mimosa paraibana* quanto a atividade antioxidante. Os resultados mostraram que a fase clorofórmica foi mais promissora em relação à atividade antioxidante, com o isolamento de compostos fenólicos que podem, estar relacionados com essa atividade (NUNES *et al.*, 2008).

As plantas além de serem fontes de princípio ativos que podem ser sintetizados possibilitando a busca de novos medicamentos, são produtoras de compostos antioxidantes, impondo o alerta para a preservação de matas nativas, tendo em vista a necessidade da pesquisa de novas substâncias (ou fármacos) em função da crescente resistência dos microorganismo aos medicamentos atualmente utilizado.

Além disso, a preservação de áreas como Cerrado e Pantanal são muito importantes, pois podem ser consideradas como reservatórios de substâncias com potencialidade de cura para diversas doenças, e muitas espécies ainda não foram estudadas no âmbito farmacológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar substâncias ou extratos de plantas dos biomas Cerrado e Pantanal com propriedades antibacteriana, antifúngica e anti-radicalar.

3.2 Objetivos específicos

- Testar 50 extratos obtidos de folhas, cascas, frutos e galhos de plantas coletadas no Cerrado e Pantanal de Mato Grosso do Sul quanto à atividade antibacteriana;
- Selecionar duas espécies vegetais que apresentarem resultados significativos nos ensaios antibacteriano realizados e submetê-las a um estudo químico guiado;
- Isolar e identificar os constituintes bioativos das espécies selecionadas.
- Avaliar a atividade anti-radicalar das espécies selecionadas pelo método de DPPH.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Identificação e obtenção dos extratos

Os 50 extratos testados são da coleção de extrato do Laboratório de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LP-1). As partes específicas das plantas depois de coletadas foram secas, moídas e extraídas em etanol à temperatura ambiente por uma semana. Após este período o extrato etanólico foi concentrado sob pressão reduzida, em aparelho evaporador rotativo até a eliminação do solvente e obtenção do extrato bruto.

Estes extratos foram submetidos a teste antibacteriano e os que apresentaram melhores resultados foram os dos frutos de *Buchenavia tomentosa* e *Ouratea spectabilis* selecionados para estudo biomonitorado.

4.1.1 Frutos de *Buchenavia tomentosa*

O material foi coletado em 16/09/2000 no município de Campo Grande-MS, na região do Córrego Guariroba. Uma exsicata deste espécime encontra-se depositada no Herbário do Laboratório de Botânica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob o número 24835, sendo identificado como *Buchenavia tomentosa* pela MSc Ubirazilda Rezende.

Os frutos (3,2 Kg) foram extraídos em etanol. O extrato etanólico foi concentrado sob pressão reduzida resultando em 109,31g de extrato bruto. Parte do extrato etanólico (30g) foi submetido à partição originando três frações: hexânica, acetato de etila e hidro-metanólica (Figura 4). As frações foram testadas quanto à atividade antibacteriana, utilizando como guia *Staphylococcus aureus*. Com base nos resultados obtidos fração acetato de etila foi selecionada para continuar o estudo.

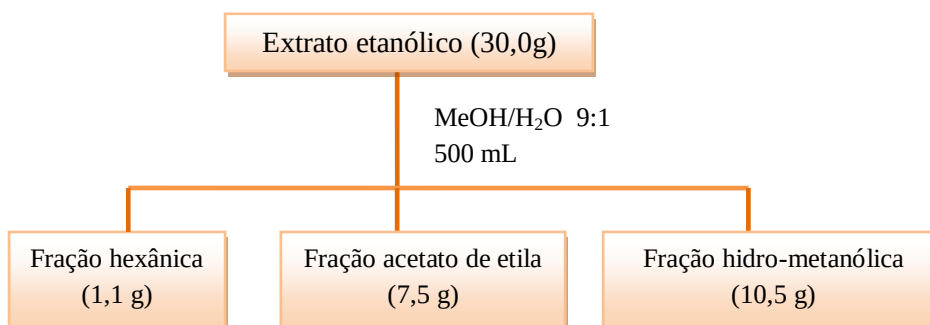


Figura 4- Partição do extrato etanólico dos frutos de *B. tomentosa*

Parte da fração acetato de etila (1,0 g) foi fracionada em Sephadex LH-20/ MeOH (d=4cm h=1,20m), sendo obtidas 116 frações. Os volumes das frações variaram da seguinte forma: a primeira com 150 mL, a segunda 50 mL e da terceira até a 112ª 10 mL, e da 113ª ao final 150 mL. As frações, após evaporação dos solventes, foram analisadas por CCDA, reunidas por semelhança e testadas quanto à atividade antibacteriana (*S. aureus*).

Da subfração 90-108 (85,2 mg) foi obtido o composto **4** e as subfrações 35-49 (153,4 mg) e 70-89 (108,4 mg) foram fracionadas novamente (Figura 5).

Os dados de CCDA e RMN ^1H e ^{13}C da subfração 35-49 indicaram a presença de metabólitos secundários. Desta subfração, 63,0 mg foram fracionadas em Sephadex LH-20 em MeOH, obtendo-se na fração 9-14 (9,4 mg) os compostos **1** e **2** em mistura (Figura 5).

Para a purificação da subfração 70-89 foi utilizada CLAE; 60,4 mg da fração foram injetadas em coluna C-18 na seguinte condição: ACN/H₂O (20:80) acidificado com ácido acético, λ 260 nm e o fluxo de 10 mL/min, sendo coletadas amostras referentes a cinco picos: dois foram identificados como sendo os compostos **1** e **5**, os outros três tinham um grau de impureza muito elevado e pouca massa o que impossibilitou a identificação (Figura 5).

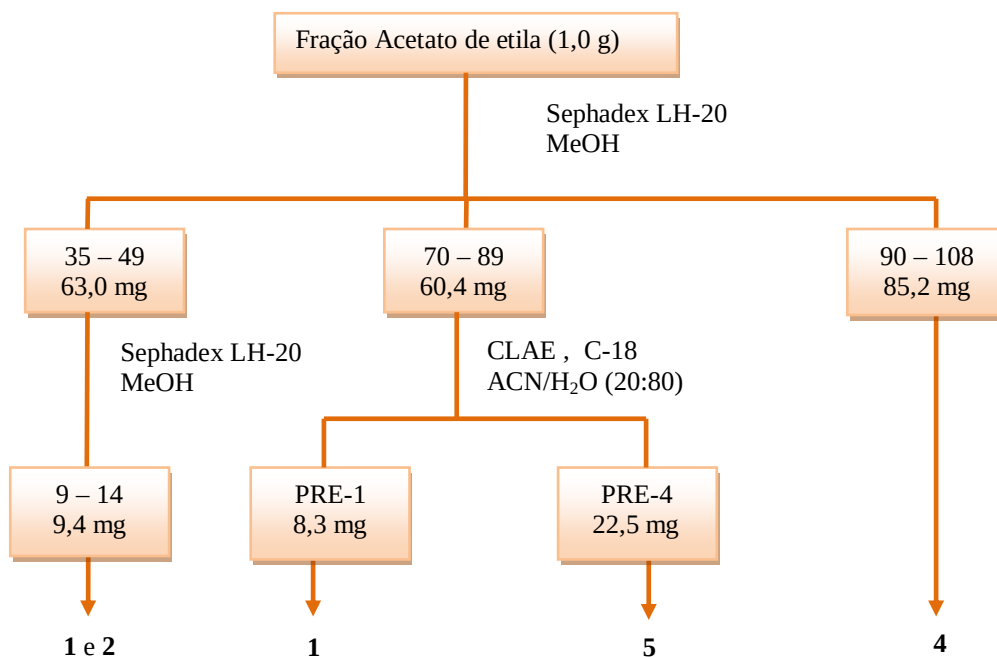


Figura 5 – Fracionamento da fase acetato de etila para obtenção dos compostos **1**, **1 e 2**, **4** e **5** dos frutos de *B. tomentosa*

Com a finalidade de se obter novos compostos, a fase acetato de etila foi fracionada novamente utilizando outros solventes.

Foram aplicados 505 mg da fase acetato de etila (AcOEt I) em coluna de Sephadex LH-20, eluída em gradiente de AcOEt/acetona 95:5 até 80:20, originando 112 frações. Neste processo isolou-se o composto **3** (Figura 6) e o **6** em mistura, e outros compostos já isolados no fracionamento anterior.

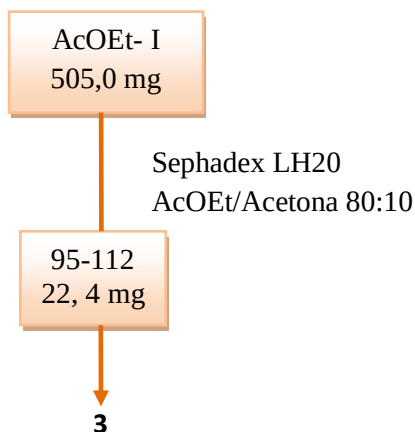


Figura 6 - Fracionamento da fração AcOEt-I para obtenção do composto **3**

Para purificar o composto **6**, (2,7 g) da fração acetato de etila (AcOEt-II) foram filtrados em sílica (70-230 mesh), em funil sinterizado de d=5cm e h=11cm, sendo eluída em hexano/acetato de etila e metanol em gradiente de polaridade crescente que variou de 20 a 100%.

Das 10 frações coletadas, a subfração 4 (AcOEt-II-4, 70,0 mg) foi injetada em CLAE-preparativa (H₂O/ACN 70:30, coluna C-18, λ 210 nm, fluxo 10mL/min) apresentando 3 picos. Foi possível identificar o composto **1** (11,2 mg) no pico 2. A subfração AcOEt-II-3 (42,8 mg) foi fracionada em Sephadex LH-20/CHCl₃/MeOH (9:1), obtendo-se 4,2 mg do composto **6** e **7** (Figura 7).

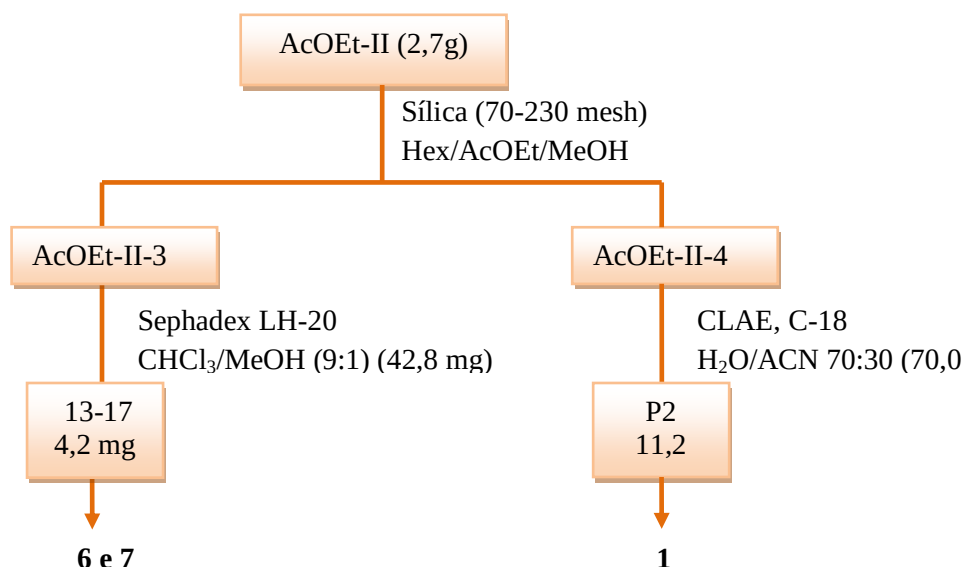


Figura 7 – Fracionamento para obtenção dos compostos **1** e **6** e **7** dos frutos de *B. tomentosa*

4.1.2 Frutos de *Ouratea spectabilis*

O material foi coletado em 03/07/2007 na Chácara dos Poderes e está depositado no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. O número da exsicata é 23422 e o espécime foi identificado pela MSc Ubirazilda Resende como sendo *Ouratea spectabilis*.

Os frutos (500 g) foram extraídos em etanol 96%. O extrato etanólico (20,8 g) foi particionado obtendo-se quatro frações: hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidro-metanólica (Figura 8). As frações foram testadas quanto à atividade antibacteriana (*S. aureus*) sendo observado que as frações diclorometânica e hexânica foram ativas e deram sequência ao estudo.

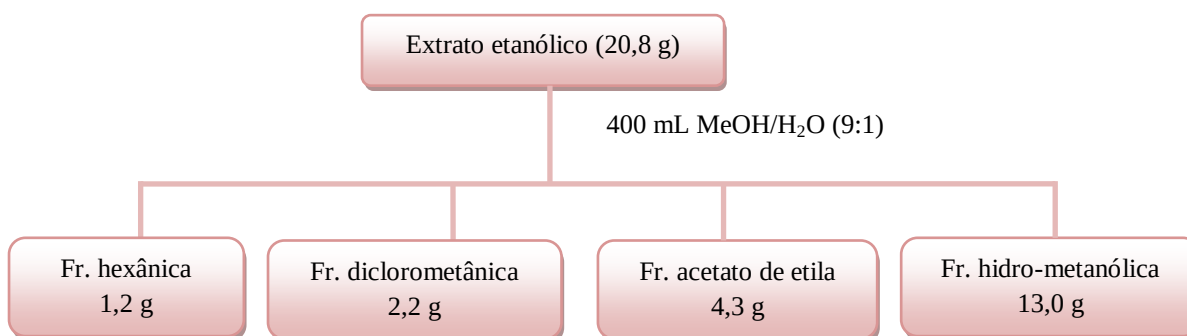


Figura 8– Partição do extrato etanólico dos frutos de *O. spectabilis*

A fração diclorometânica foi cromatografada em coluna de sílica Flash 230-400 mesh (d=4,0 cm; h=17 cm) eluída em gradiente de polaridade crescente com Hex, Hex/AcOEt, Hex/AcOEt/MeOH e finalizando com MeOH, obtendo-se 21 frações. Deste fracionamento, as subfrações OSFR-18, OSFR-17 e OSFR-I (subfrações 5 e 6 reunidas) foram selecionadas em função dos resultados obtidos no teste de atividade antibacteriana (*S. aureus*).

A subfração OSFR-18 (131,1 mg) solúvel em clorofórmio, foi fracionada em Sephadex LH-20/CHCl₃-MeOH (Figura 9), obtendo-se 290 frações as quais foram reunidas de acordo com a semelhança em CCDA. Deste fracionamento cinco compostos foram identificados, sendo detectados outros, porém em frações de pouca massa e de acordo com espectro de RMN ¹H, impuras.

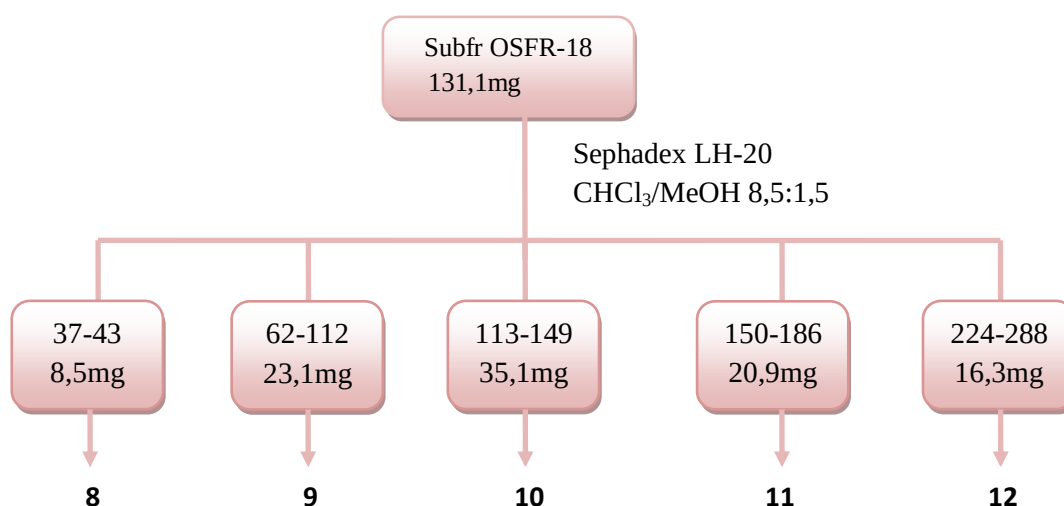


Figura 9 – Fracionamento e obtenção dos compostos da subfração OSFR- 18 de *O. spectabilis*

A segunda subfração trabalhada foi a OSFR-17 (73,8 mg), fracionada em sílica 230-400 Flash em gradiente hexano/AcOEt (2 a 45%), obtendo-se 307 frações. As frações foram aplicadas em cromatofolhas reveladas com vanilina e reunidas por semelhança. Os dados de RNM ¹H indicaram que algumas frações apresentavam os mesmos constituintes já isolados da fração 18 e outras eram misturas com pouca massa. Na fração 199-239 (17,8 mg) foram isolados os compostos **13** e **13A** (Figura 10).

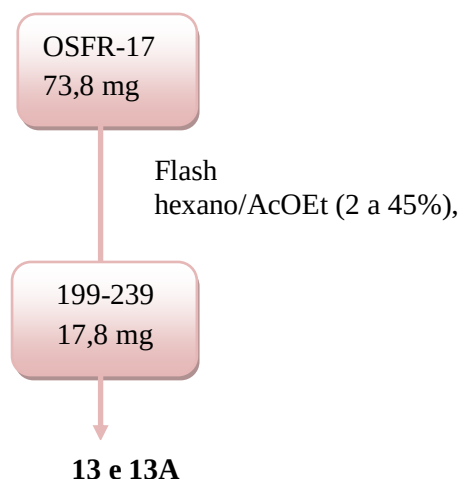


Figura 10 – Obtenção dos compostos **13** e **13A**

A subfração (OSFR-I) apresentou características diferentes das anteriores, mostrando-se oleosa e apolar. Um teste piloto revelou que a melhor maneira de purificar os compostos majoritários presentes nesta fração era com Sephadex LH-20 em clorofórmio. Com este resultado a subfração (OSFR-I, 62,0 mg) foi fracionada nas condições acima obtendo-se 25 frações. Os compostos principais concentraram-se nas frações 17-18 (**14**) e 19-25 (**15**) (Figura 11); as outras apresentaram mistura de compostos e massa insuficiente para nova purificação.

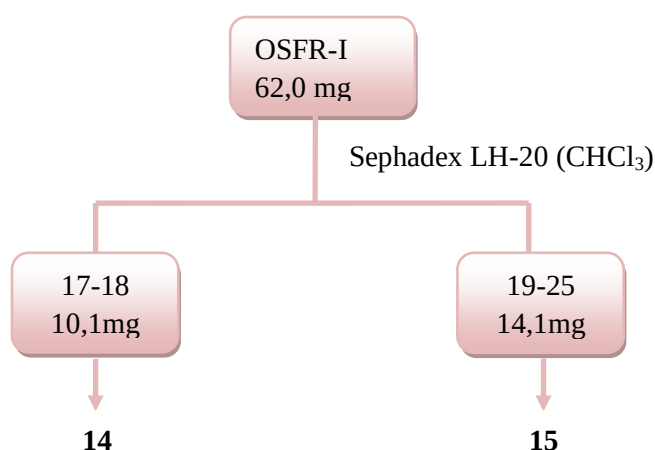


Figura 11 – Fracionamento da subfração OSFR-I para obtenção dos compostos **14** e **15** dos frutos de *O. spectabilis*

A fase hexânica (OSFR-HEX, 1,04g) foi fracionada em sílica 230-400 Mesh (Flash) eluída com diclorometano, com o objetivo de isolar outros compostos semelhantes aos obtidos da fração OSFR-I.

Neste fracionamento foram obtidas 292 frações que foram analisadas através de cromatofolhas revelada com vanilina e reunidas conforme semelhança, originando quatorze frações. As subfrações foram testadas quanto à atividade antibacteriana (*S. aureus*), onde seis

apresentaram atividade e foram encaminhadas para obtenção do espectro de RMN ^1H . Com estes resultados, três frações foram selecionadas para dar continuidade ao estudo: 32-45 (39,6 mg); 46 -50 (39,2 mg) e 50-72 (250,8 mg), visto que as outras eram ácidos graxos.

As frações foram purificadas em Sephadex LH-20 em clorofórmio, a mesma condição encontrada para purificar os compostos da subfração OSFR-I.

No fracionamento da 50-72 (97,5 mg) foram obtidas 37 frações as quais foram reunidas de acordo com CCDA, obtendo-se os compostos **16**, **17**, e **21**; da fração 32-45(16,1 mg) foi obtido o composto **18** e da 46-50 (14,6 mg) os compostos **19** e **20** (Figura 12).

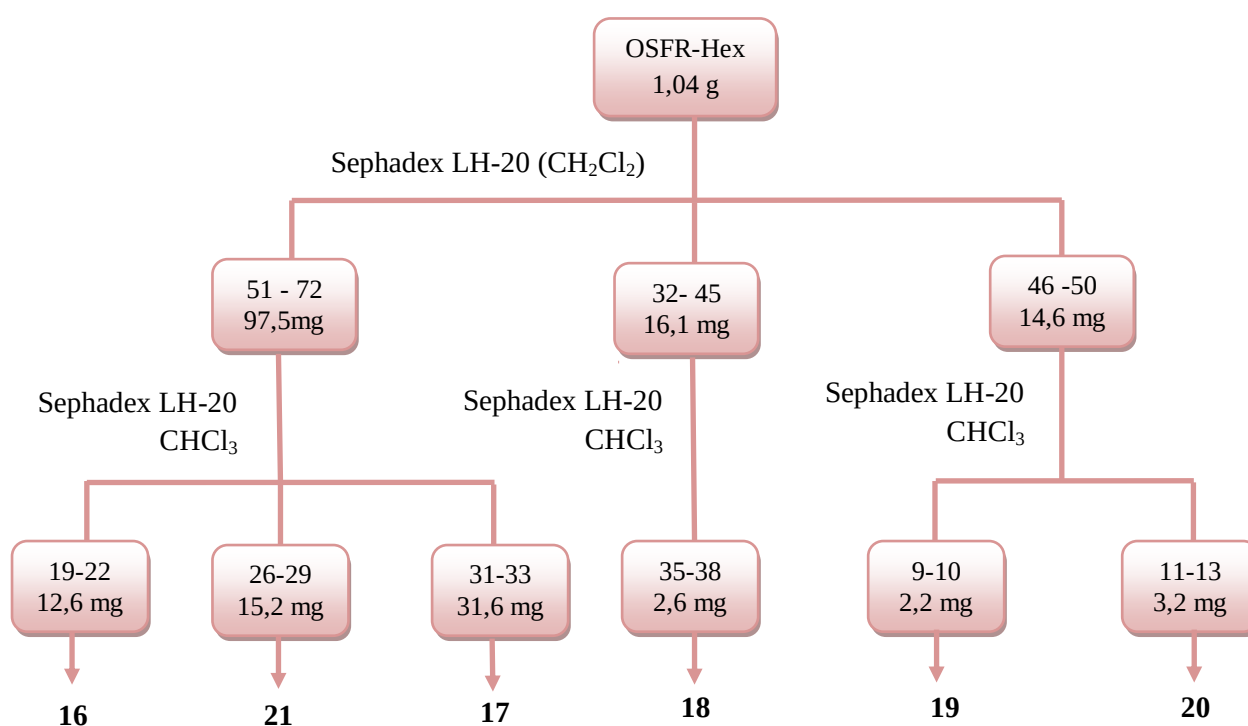


Figura 12 – Fracionamento e obtenção dos compostos **16** a **21** da fase hexânica de *O. spectabilis*

Com intuito de purificar o composto **10**, foi realizado o fracionamento com a fração acetato de etila (500 mg).

O procedimento foi realizado em coluna cromatográfica utilizando como fase sólida sílica Flash e como fase movél $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ iniciando com 10% e finalizando com $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 50%. Foram obtidas 90 subfrações de 20 mL. Deste processo duas novas substâncias foram isoladas, uma da subfração 10-26 (**23**) e outra da 60-82 (**22**) (Figura 13). As outras subfrações apresentaram características de compostos já isolados.

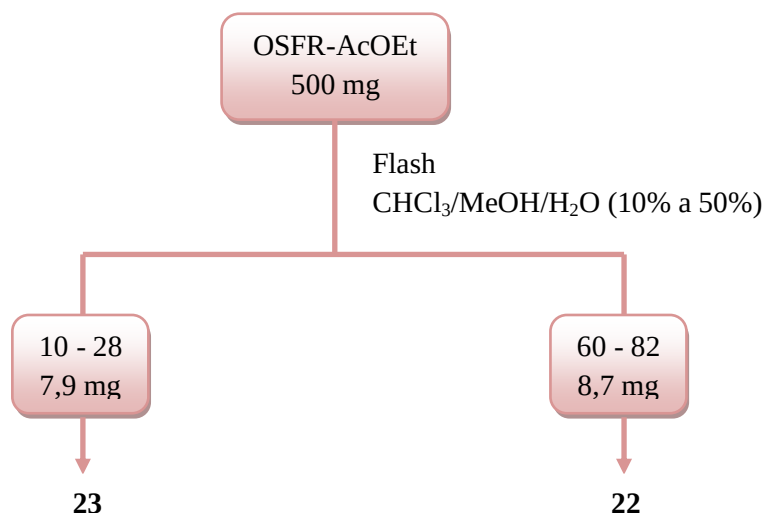


Figura 13- Fracionamento da fração AcOEt dos frutos de *O. spectabilis* e obtenção dos compostos 22 e 23

As amostras que apresentaram atividade foram submetidas a processos cromatográficos para purificação e isolamento dos compostos. As frações obtidas na partição dos extratos etanólicos e as subfrações originadas dos frutos de *B. tomentosa* e *O. spectabilis* foram testadas frente à atividade antibacteriana, utilizando como guia *S. aureus*.

4.2 Ensaio Biológico

As frações, subfrações e compostos isolados foram testados frente a outras duas cepas bacterianas *P. aeruginosa* e *E. faecalis* cinco cepas fúngicas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* e quanto à atividade anti-radicalar. Os extratos etanólicos também foram testados quanto à atividade antimicrobiana e anti-radicalar. Os resultados destes ensaios encontram-se no capítulo 5.

4.2.1 Ensaios Antimicrobianos

Para avaliação de atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas padronizadas: a) três bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25953, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* 29218, e b) cinco cepas fúngicas: *Candida albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 9030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 32045. Estes microorganismos foram cedidos pelo núcleo de

Microbiologia da seção de Análises Clínicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU/UFMS).

Os testes foram realizados empregando a técnica de microdiluição (para determinação da concentração mínima inibitória – CIM) proposta pelo NCCLS (National–Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002 e 2003), segundo as normas do protocolo NCCLS-M27-A6 (2003) para as bactérias e NCCLS-M7-A2 (2002) para os fungos com modificações (MITSCHER *et al.*, 1972).

➤ Meio de cultura

Nos ensaios da atividade antibacteriana foi empregado o caldo Müller Hinton CAT. M391(HIMEDIA), preparado de acordo com as instruções do fabricante, à temperatura ambiente (25°C).

Para determinação da atividade antifúngica foi utilizado caldo RPMI-1640 (com glutamina, sem bicarbonato, antibiótico, antimicótico e com indicador de vermelho fenol, tamponado com uma solução de MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico] numa concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0.

➤ Preparo do inóculo (cepas bacterianas e fúngicas)

As cepas bacterianas foram mantidas em cerca de 0,5 mL de suspensão bacteriana, caldo BHI (Brain Heart Infusion), à temperatura de –20°C, transferidas do eppendorf para um tubo de ensaio contendo ágar Müller Hinton (Merck) e incubadas a 35°C por 24 horas para ativação. Após este período, alíquotas do microorganismo foram retiradas do tubo de ensaio e transferidas para uma placa de Petri com ágar Müller Hinton e incubadas a 35°C por aproximadamente 20 horas para realização dos ensaios.

Após o período de incubação, foram selecionadas 4 a 5 colônias e transferidas para um tubo contendo 10 mL de solução salina estéril (0,9%), seguido de homogeneização. A turbidez dessa suspensão foi ajustada de modo a ser semelhante à escala de solução padrão de 0,5 de McFarland, correspondente a $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida foi feito uma diluição 1:10 em caldo Müller Hinton para atingir a concentração de 10^4 UFC/mL.

As cepas de leveduras foram mantidas em BHI à temperatura de -20°C. Para reativação dessas leveduras, a partir das cepas estocadas, foi feito um repique em ASD (ágar Sabouraud dextrose) e as placas incubadas a 35°C por 24h quando se tratava de *Candida* e

48h para *Cryptococcus*. Para o preparo do inóculo foram selecionadas 4 a 5 colônias que foram suspensas em 10 mL de solução salina a 0,9% seguida de agitação. Após este processo, foi realizada uma diluição de 1:50 e depois 1:20 da suspensão padrão em meio líquido RPMI 1640, para se obter uma concentração de células de 1 a 5×10^3 UFC/mL chegando à concentração final de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

➤ Preparação da amostra vegetal

Para extratos, frações e subfrações foram utilizados 20 mg diluídos em 1000 mL de DMSO 99,9% (Dimetilsulfóxido), enquanto para as substâncias puras utilizou-se diferentes massas de amostras (mg) e volume (μ L) de DMSO. A concentração inicial dos extratos, frações e subfrações foi de 2000 μ g/mL e dos compostos isolados de 400 μ g/mL.

O teste foi realizado em placa de 96 orifícios. As amostras foram preparadas em tubo de ensaio, para obtenção das concentrações finais de: 1000 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 μ g/mL, para extratos, frações e subfrações, e 200 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 μ g/mL para substâncias puras.

Como controle positivo para os testes antibacterianos foi utilizado o antibiótico cloranfenicol [(D(-)-treo-1-(p-nitrofenil)-2,2-dicloroacetamido-1,3-propanodiol)], na concentração de 0,25-32 μ g/mg. Este antibiótico é de amplo espectro, sendo eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Para os fungos utilizou-se como controle positivo, anfotericina B com concentração variando entre 0,125-16 μ g/mL. Esse antifúngico foi selecionado por ser a droga de escolha para a maioria das infecções fúngicas sistêmicas.

As amostras foram distribuídas em placa de 96 orifícios e cada diluição feita em duplicata. Os extratos, frações, subfrações e compostos isolados podem ficar turvos ou precipitar em contato com o meio de cultura e, por esta razão, no orifício 2 foi realizado o controle de turbidez ou branco que era constituído de 100 μ L de amostra e 100 μ L de meio de cultura. O controle de esterilidade foi realizado para certificar-se de que o meio de cultura não estava contaminado e o de crescimento permitia viabilidade das cepas.

Na figura 14 encontra-se uma representação esquemática da realização do ensaio na placa, e na figura 15 a foto de uma placa com ensaio antibacteriano.

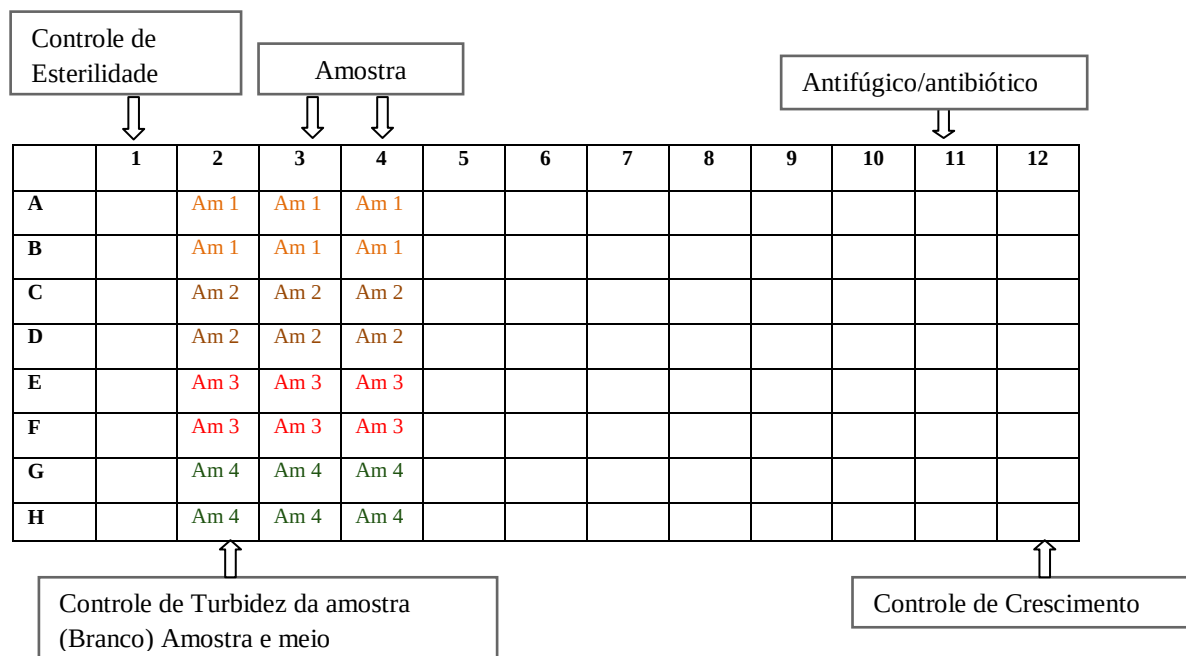


Figura 14 – Esquema do procedimento da técnica de microdiluição na placa de 96 orifícios

Os ensaios antifúngicos e antibacterianos foram realizados de acordo com o procedimento a seguir:

- O teste foi realizado em duplicata, nas letras A e B amostra 1, C e D amostra 2, E e F amostra 3 e G e H amostra 4.

- Orifícios 1 → 200 µL de meio de cultura
- Orifícios 2, 3, 4 → 100 µL de amostra
- Orifícios 2; 4 ao 10 e 12 → 100 µL de meio de cultura
- Diluições nos orifícios 4 ao 10 (desprezando 100 µL no final)
- Orifício 11 (A e B) - 100 µL de antibiótico/antifúngico
- Orifício 11 → 100 µL de meio de cultura nos orifícios B ao H
- Diluições B ao H (desprezando 100 µL no final)
- 100 µL de suspensão (antibacteriana/antifúngica) nos orifícios 3 a 12.

As placas devidamente inoculadas com o microorganismo foram incubadas a 35°C por um período de 18-20 h no teste antibacteriano, enquanto na avaliação antifúngica a incubação foi de 48h para *Candida* e 72h para *C. neoformans*. A leitura da CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi visual.

A CIM é a concentração que inibe o crescimento do microorganismo, sendo considerados inativos quando CIM > 1000 para extratos, frações e subfrações e > 200 para

compostos puros. A CIM foi observada a partir dos orifícios 3 (maior concentração) ao 10 (menor concentração).

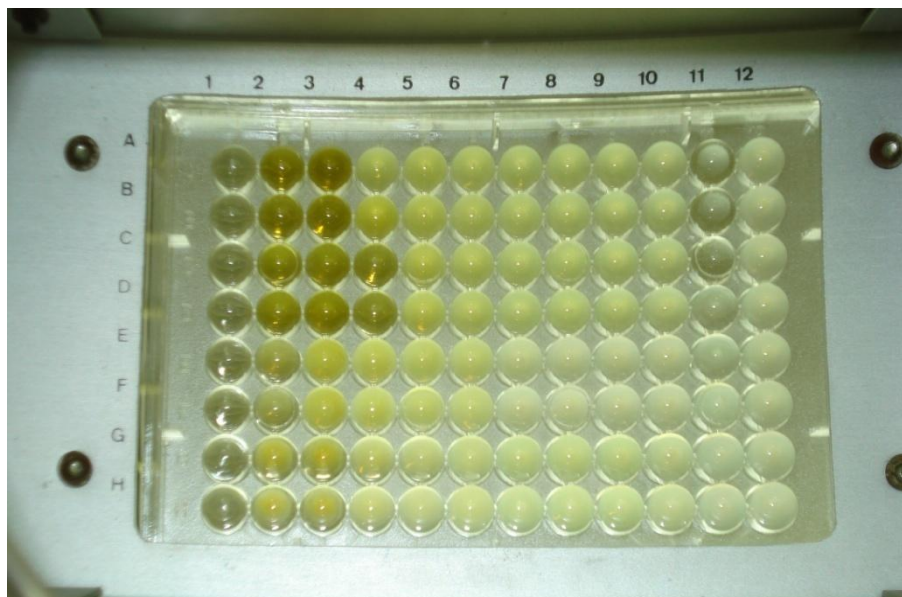


Figura 15- Placa com resultado do teste de suscetibilidade antimicrobiana de quatro extratos de plantas frente a *P. aeruginosa*

4.3 Atividade anti-radicalar - Ensaio com DPPH

A capacidade anti-radicalar foi determinada utilizando-se o radical estável 2,2 difenil-1-picrilidrazila (DPPH) pelo método da microdiluição com algumas modificações (MATSUKAWA *et al.*, 1997, ZHANG *et al.*, 2007).

A solução de DPPH foi preparada em etanol numa concentração de 200 mg/mL para os extratos, frações e subfrações, e 200 μ M para frações puras.

As amostras foram pré preparadas na proporção de 1:1 para extratos, frações, subfrações e padrão, e 2:1 para frações puras e padrão.

Os extratos, frações, subfrações e o padrão (controle positivo) do teste (ácido caféico) foram preparados na concentração de 1000 μ g/mL, enquanto as frações foram diluídas na proporção de 4:10. Para os ensaios com as frações puras, a concentração foi em μ M e a diluição em etanol variou conforme o peso molecular e o peso da amostra (mg), da mesma forma que o padrão. As concentrações na placa foram na faixa de 3,125 a 200 μ g/mL para extratos, frações, subfrações e padrão, e de 6,25 a 100 μ M para os compostos isolados e controle positivo.

Os testes de DPPH foram realizados em triplicata, conforme o procedimento abaixo:

Primeiramente preparou-se o branco, adicionando-se 200µL de EtOH (etanol) na placa de 96 orifícios e realizou-se a leitura em um espectrofotômetro de Microplaca Thermo Plate-TP-Reader (leitor de Elisa). Em seguida descartou-se o etanol e deixou-se a placa secar. Na sequência foram adicionados 100 µL da amostra a ser testada nos orifícios A e B; 100 µL de etanol nos poços B ao H (poço H- controle negativo DPPH + EtOH). Nos orifícios de B ao G fez-se a diluição (1:1) desprezando 100µL no final e em seguida adicionou-se 100 µL de solução de DPPH nos poços A ao H. A placa foi incubada por 30 minuto em temperatura ambiente (25°C) na ausência de luz. A seguir foi realizada a leitura no mesmo leitor a 517 nm.

A atividade sequestradora de radical (ASR) foi determinada de acordo com a fórmula:
$$\% = [(absorbância\ do\ controle\ negativo - absorbância\ da\ amostra) / absorbância\ do\ controle\ negativo] / 100.$$

CI₅₀ é a concentração que inibe 50% do teor de DPPH, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a CI₅₀. O cálculo foi determinado de acordo com o método de regressão linear. O mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo (ácido cafeico).

Neste teste é possível visualizar a amostra onde ocorre o sequestro do radical livre porque torna-se amarela, enquanto na amostra que não reage ao DPPH permanece com a cor lilás (Figura16).

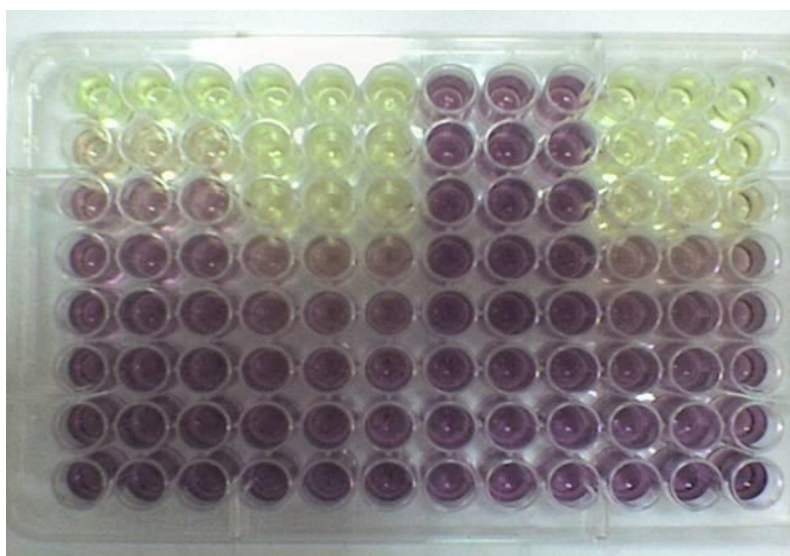


Figura 16- Foto ilustrando o sequestro de radical livre (cor amarela) pelas amostras de extratos vegetais no teste com DPPH

4.4 Especificação do material utilizado

- Para extração, partição por solventes, CC, CCDA, CLAE (analítico e preparativo), foram utilizados solventes analíticos da marca Merck, Synth, Vetec e Tedia.

- Para cromatografia em coluna utilizou-se: “Flash” Si-60 (230-400) da Merck; Sephadex LH-20 (25-100 μ) Sigma e sílica gel 60 (70-230) da Merck.

- As separações por CLAE semi-preparativa foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LC-6AD, empregando-se coluna fase reversa C-18 Phenomenex Luna 25x250, partícula 5 μ m.

- Cromatografia em camada delgada cromatoplas Sílica gel PF₂₅₀, da marca Whatman.

- As revelações das cromatoplas foram feitas com vapores de iodo ou utilizando reveladores como sulfato de cérico e vanilina, utilizou-se também irradiação de lâmpada ultravioleta (254 nm).

- Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com o espectrofotômetro Bomem Michelson MB série, na forma de filme, utilizando janela de NaCl ou disco pressado em KBr.

- Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetro Brucker Advance DPX- 300 operando respectivamente a 300 e 75 MHz, utilizando como solventes e padrões de referência interna CDCl₃, Metanol-*d*₄, DMSO-*d*₆, Acetona-*d*₃ da marcas Merck, Aldrich e Sigma.

- O espectro de massa foi obtido em espectrômetro Esquire 3000 Plus de alta resolução da Universidade de São Paulo- Ribeirão Preto.

- Rotação específica foi medida em polarimêtro digital Perkin-Elmer 341 filtro de Na (589 nm) em cela de 1dm.

Para a realização do teste antioxidante utilizou-se como padrão ácido caféico da Fukla, DPPH da Aldrich, EtOH da Synth; a leitura dos dados foi realizada a 517 nm em espectrofotômetro de microplacas Thermo Plate –TP reader.

Para realização do teste antibacteriano foram utilizados os seguintes meios de culturas: caldo Müller Hinton (Himedia), ágar Müller Hinton (Merck) o meio de manutenção das cepas foi o BHI (Merck). Para o teste antifúngico utilizou o caldo RPMI-1640 da Cultilab e o ágar Sabouraud da Fluka. O antibiótico foi o cloranfenicol (INLAB[®]) e antifúngico foi a anfotericina B (Sigma).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 50 extratos de plantas, catalogados no laboratório de química LP1, localizado no Departamento de Química da UFMS. Estes extratos foram provenientes de 37 espécies de plantas selecionadas de acordo com o projeto de bioprospecção do LP1. As diversas partes (folhas, casca, frutos e galhos) das plantas foram testadas frente à atividade antibacteriana, com intuito de selecionar os extratos com resultados mais promissores (Figura 17). Os extratos selecionados foram os de frutos de *Buchenavia tomentosa* e *Ouratea spectabilis*.

A investigação fitoquímica monitorada pelo ensaio antibacteriano do extrato etanólico, frações e subfrações dos frutos de *Buchenavia tomentosa* e *Ouratea spectabilis*, conduziu ao isolamento de 23 substâncias, as quais foram numeradas por ordem de identificação.

Os compostos **1** a **7** foram isolados da fração acetato de etila de *B. tomentosa*, e as substâncias de **8** a **13** da fração diclorometânica, **14** a **21** da hexânica e **22** e **23** da acetato de etila de *O. spectabilis*. A identificação ou elucidação estrutural dessas substâncias foi efetuada com base na análise de dados de IV, EM, RMN em uma e duas dimensões, e pela comparação com dados da literatura. O extrato, frações, subfrações e compostos isolados também foram testados quanto à atividade antibacteriana, antifúngica e anti-radicalar.

			Atividade antibacteriana (µg/mL)		
Família	Espécies	Partes da planta	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Euphorbiaceae	<i>Arrabidaea brachypoda</i>	folha	1000	>1000	1000
Sapindaceae	<i>Magonia pubescens</i>	folha	>1000	>1000	>1000
Lauraceae	<i>Aiouea trinervis</i>	folha	>1000	>1000	>1000
	<i>Aiouea trinervis</i>	fruto	>1000	>1000	>1000
	<i>Ocotea vellosiana</i>	casca do caule	>1000	1000	>1000
	<i>Ocotea minarum</i>	casca do caule	500	>1000	500
	<i>Ocotea minarum</i>	folha	>1000	>1000	>1000
	<i>Ocotea minarum</i>	fruto	1000	1000	>1000
	<i>Ocotea suaveolens</i>	galhos	>1000	>1000	>1000
Fabaceae	<i>Indigofera hirsuta</i>	fruto	>1000	>1000	>1000
	<i>Andira cuiabensis</i>	folha	>1000	>1000	>1000
Lythraceae	<i>Lafoensia densiflora</i>	casca do caule	500	>1000	>1000
	<i>Lafoensia densiflora</i>	flor	250	>1000	500
Leguminosae	<i>Albizia polyanta</i>	galhos	1000	1000	>1000
	<i>Diptychandra aurantiaca</i>	casca	>1000	>1000	>1000
Vochysiaceae	<i>Callisthene fasciculata</i>	folha	>1000	>1000	1000
	<i>Qualea parviflora</i>	folha	>1000	>1000	>1000
Rubiaceae	<i>Alibertia sessilis</i>	partes aéreas	>1000	>1000	>1000
	<i>Psycotria carthagenensis</i>	folha	500	>1000	>1000
Burseraceae	<i>Protium spruceanum</i>	folha	>1000	>1000	>1000
Combretaceae	<i>Buchenavia tomentosa</i>	folha	500	>1000	1000
	<i>Buchenavia tomentosa</i>	galhos	250	500	1000
	<i>Buchenavia tomentosa</i>	fruto	1000	>1000	1000
	<i>Terminalia fagifolia</i>	galhos	500	1000	>1000
	<i>Terminalia fagifolia</i>	folha	250	>1000	>1000
Araliaceae	<i>Dendropanax cuneatum</i>	casca	>1000	>1000	>1000
	<i>Dendropanax cuneatum</i>	folha	1000	1000	>1000

Figura 17 - Resultado do ensaio antibacteriano dos 50 extratos, obtidos de 37 espécies de plantas e suas respectivas partes testadas

continuação

Lacistemataceae	<i>Lacistema hasslerianum</i>	ramos	>1000	>1000	>1000
Anacardiaceae	<i>Tapirira guianensis</i>	folha	>1000	1000	>1000
Bignoniaceae	<i>Tabebuia heptaphylla</i>	casca	>1000	>1000	>1000
	<i>Tabebuia avellaneda</i>	casca	>1000	>1000	>1000
	<i>Tabebuia avellaneda</i>	casca	>1000	>1000	>1000
Caesalpinaceae	<i>Copaifera langsdorfii</i>	folha	500	>1000	>1000
	<i>Copaifera langsdorfii</i>	partes aéreas	1000	1000	>1000
Meliaceae	<i>Trichilia catigua</i>	folha	>1000	1000	>1000
	<i>Trichilia catigua</i>	galhos	1000	>1000	>1000
	<i>Guarea kunthiana</i>	fruto	>1000	>1000	>1000
Verbenaceae	<i>Lantana camara</i>	folha	>1000	>1000	>1000
	<i>Lantana camara</i>	caule	>1000	>1000	>1000
Miristicaceae	<i>Virola sebifera</i>	partes aéreas	500	>1000	>1000
Sterculiaceae	<i>Melochia parvifolia</i>	casca	>1000	>1000	>1000
	<i>Melochia parvifolia</i>	caule	>1000	>1000	>1000
Rutaceae	<i>Zanthoxylum sp</i>	casca	>1000	>1000	>1000
	<i>Zanthoxylum sp</i>	folha	>1000	>1000	>1000
Euphorbiaceae	<i>Sebastiania hispida</i>	folha	1000	>1000	>1000
Mimosaceae	<i>Inga uruguensis</i>	folha	1000	>1000	>1000
Verbenaceae	<i>Vitex cymosa</i>	folha	>1000	>1000	>1000
	<i>Vitex cymosa</i>	galhos	>1000	>1000	>1000
Ochnaceae	<i>Ouratea spectabilis</i>	fruto	1000	1000	>1000
	<i>Ouratea spectabilis</i>	pedúnculo	250	500	1000

Figura 17- Resultados dos ensaios de atividade antibacteriana dos 50 extratos, obtidos de 37 espécies de plantas e suas respectivas partes

5.1 *Buchenavia tomentosa*

5.1.1 Compostos isolados

➤ Compostos fenólicos

O fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila dos frutos de *B. tomentosa* resultou no isolamento de seis compostos fenólicos (três ácidos fenólicos, dois taninos e uma lignana).

Compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas no reino vegetal, em particular nos frutos e folhas (SOARES *et al.*, 2008) e englobam uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos e ligninas) (SOARES, 2002).

➤ Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxilas e/ou metoxila na molécula (SOARES, 2002). Dentro deste conjunto foram isolados dos frutos de *B. tomentosa* o galato de etila (**1**), galato de metila (**2**) e o ácido gálico (**3**).

Composto 1 - Galato de Etila

Da fração OSFR-II-4 foi isolado o composto **1**. Os dados de RMN ^1H de **1** (Tabela 1) revelaram três sinais: um singleto em 7,04 δ (H_2 e H_6), um quarteto em 4,26 δ (H_8) e um tripleto em 1,34 δ (H_9), característicos de um grupo etila de éster. O espectro de ^{13}C (Tabela 1) apresentou quatro sinais correspondentes aos carbonos de anel aromático em 109,9 δ (C_2 e C_6), 146,5 δ (C_3 e C_5), 139,7 δ (C_4) e o 121,7 δ (C_1), dois sinais de carbonos alifáticos 61,6 δ (C_8) e 14,6 δ (C_9) além de um sinal de carbonila em 168,5 δ (C_7) (Figura 18). Estes dados de RMN ^1H e ^{13}C indicam que a substância **1** corresponde ao galato de etila, o que foi confirmado por comparação com dados da literatura (CERUKS *et al.*, 2007).

Composto 2 - Galato de Metila

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da subfração 9-14 apresentaram sinais correspondentes à mistura dos compostos **1** e **2**. O espectro de RMN ^1H (Tabela 1) apresentou um sinal intenso em 7,02 δ referente aos hidrogênios H₂ e H₆ dos compostos **1/2**. Os sinais 4,26 δ (metilênico) e 1,34 δ (metila) correspondem ao composto **1** e o 3,73 δ (metoxila) ao composto **2** (Figura 18).

Quanto ao espectro de RMN ^{13}C (Tabela 1) os picos que diferem uma substância da outra são os 61,6 δ (metilênico) e 14,6 δ (metila) relativo ao composto **1** e o 50,2 δ relativo à metoxila do composto **2**. Os dados indicam, portanto, que o composto **2** se trata do galato de metila, neste caso, em mistura com galato de etila (**1**). Os dados de RMN ^1H e de ^{13}C mostraram-se compatíveis com os observados na literatura (CERUKS *et al.*, 2007) para estas substâncias.

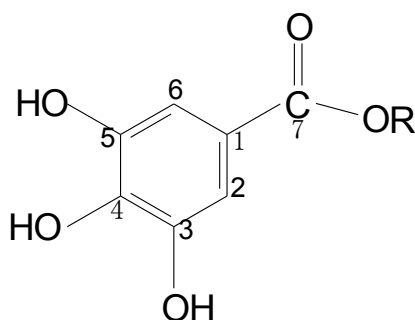


Figura 18 - Estrutura química dos compostos **1** e **2**

R = CH_2CH_3 - Galato de etila (**1**)

R = CH_3 - Galato de metila (**2**)

Tabela 1 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos **1** e **2** (300/75MHz, Metanol- d_4).

C/H	Composto 1		Composto 2	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	121,7		120,3	
2	109,9	7,04	108,6	7,02
3	146,4		145,1	
4	139,7		138,3	
5	146,4		145,1	
6	109,9	7,04	108,6	7,02
7	168,5		167,1	
8	61,6	4,26	50,2	3,73
9	14,6	1,34		

Composto 3 - Ácido Gálico

Da fração 95-112 proveniente do fracionamento cromatográfico da fase acetato de etila foi isolado o composto **3**, uma substância solúvel em MeOH. O espectro de RMN ^1H de **3** apresentou um singlete em 7,04 δ , correspondente aos hidrogênios H_2 e H_6 . O espectro de RMN ^{13}C (Tabela 2) apresentou cinco sinais, onde dois estão duplicados [109,2 δ (C_2 e C_6) e o 145,2 δ (C_3 e C_5)], indicando haver um total de sete carbonos na estrutura de **3**. Estes dados permitem propor $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ como fórmula molecular do composto e a estrutura correspondente ao ácido gálico (Figura 19), o que foi confirmado por comparação com os dados de RMN ^{13}C constantes na literatura (WAWER; ZIELINSKA, 1997) (Tabela 2). A presença das hidroxilas, do anel benzênico e do ácido carboxílico são características para classificar este composto como ácido fenólico.

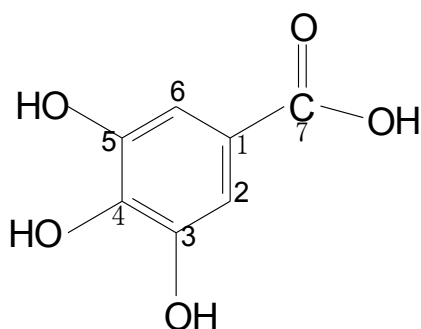


Figura 19 - Estrutura química do composto **3** - Ácido gálico.

Tabela 2 - Dados de RMN ^{13}C do composto **3** e da literatura* (75MHz).

^{13}C (δ)	Composto 3 (Metanol- d_4).	*Literatura (DMSO- d_6)
1	121,1	120,5
2	109,2	108,8
3	145,2	145,3
4	137,7	137,9
5	145,2	145,3
6	109,2	108,8
7	167,1	167,4

* WAWER; ZIELINSKA, 1997

➤ Taninos hidrolisáveis.

Outros dois compostos fenólicos isolados de *B. tomentosa* foram classificados como taninos porque apresentaram características químicas desta classe.

Os taninos representam o quarto mais abundante constituinte vegetal depois da celulose, da hemicelulose e da lignina. Atuam como parte do mecanismo de defesa dos vegetais contra microorganismos, herbívoros e condições ambientais hostis (PINTO *et al.*, 2005).

Os taninos são substâncias polifenólicas de estruturas variadas, sendo sua principal característica o sabor adstringente. São classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Taninos hidrolisáveis contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliídrico esterificado com ácido gálico ou elágico (SOARES, 2002). Os taninos isolados de *B. tomentosa* pertencem a este grupo.

Para serem considerados taninos é necessário que pelo menos três grupos de hidroxila da molécula de glicose estejam esterificados (PINTO *et al.*, 2005) o que é observado nos compostos 4 e 5.

Os taninos hidrolisáveis são divididos em galotaninos e elagitaninos, os compostos 4 e 5 pertencem à segunda classe.

Os elagitaninos são formados por um ou mais grupos hexaidroxidifenil (HHDP, Figura 20); a glicose e uma unidade de galoil está frequentemente adicionada ao HHDP (BERLINCK *et al.*, 1995).

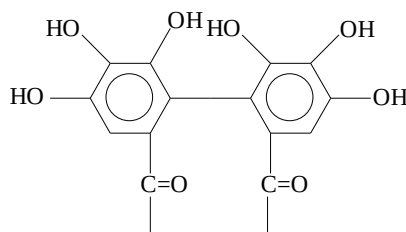


Figura 20 - Unidade HHDP (Hexahidroxidifenil).

O grupo HHDP é formado por duas unidades de galoil ligadas através dos seus carbonos aromáticos formando uma unidade com ligação axial (KHANBABAEE; VAN REE, 2001).

Em muitos taninos hidrolisáveis, além do grupo HHDP, outro grupo une-se à molécula de glicose, o diidro-hexaidroxidifenil (DHHDP), que é uma modificação oxidativa semelhante ao grupo HHDP. Estes taninos têm sido isolados de várias plantas e sendo classificados como di-hidroelagitaninos e são metabólitos dos elagitaninos. A geranina (Figura 21) é o mais notável membro desta classe porque foi a primeira desta categoria, definindo as características dos taninos hidrolisáveis (BERLINCK *et al.*, 1995).

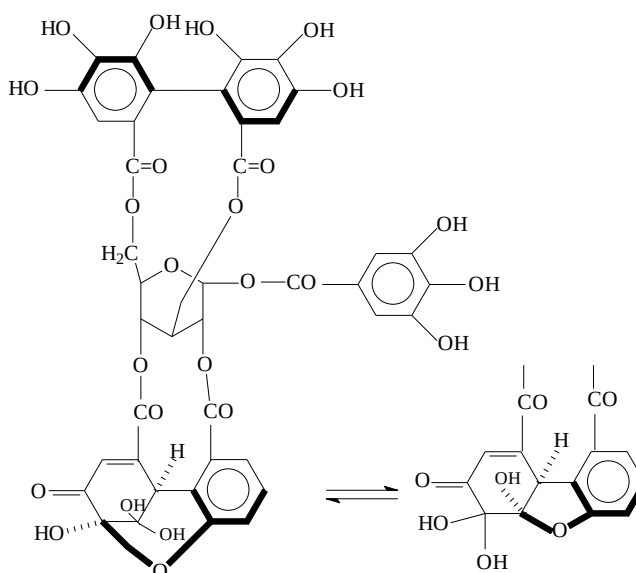


Figura 21 - Estrutura do tanino hidrolisável Geranina, contendo os grupos HHDP e DHHDP

Os compostos fenólicos agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênios ou elétrons, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, os quais protegem contra a oxidação de vários ingredientes dos alimentos, particularmente de ácidos graxos e óleos (SOARES *et al.*, 2008).

A utilização de taninos é feita desde a antiguidade (cerca de 1500 a.C.) e atualmente tem ampla aplicação na medicina e indústria de alimento. Na Ásia (Japão e China) extratos de plantas que contêm taninos são usados como adstringente contra diarreia, como diurético, contra tumores estomacais e duodenais e também como anti-inflamatório e antisséptico (KHANBABAEE; VAN REE, 2001).

Na indústria são usados como corantes na produção de tintas, inclusive para tintura de tecidos. Na indústria alimentícia são usados como estabilizadores de vinho e cerveja e clarificadores de suco de frutas. Testes biológicos realizados com esta classe de compostos

mostraram que os taninos são antivirais, antibacterianos e especialmente antitumorais; alguns são seletivamente inibidores da replicação do HIV (KHANBABAE; VAN REE, 2001).

A presença de compostos da classe dos taninos em *B. tomentosa* revela a importância desta espécie, uma vez que esses compostos possuem diversas atividades biológicas e são amplamente utilizados nas indústrias.

Composto 4 – Corilagina

Entre as frações obtidas do fracionamento da fase AcOEt, o grupamento de frações 90-108 (85,2 mg) apresentou-se como um material de cor marrom, inodoro e solúvel em metanol.

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 3 - Figura 23) apresentou seis sinais entre 3,93 δ e 6,35 δ , característicos de hidrogênios de açúcar, e quatro singletos entre 6,65 δ e 7,12 δ correspondentes a hidrogênios ligados a anel aromático.

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 4 - Figura 24) mostrou sinais que indicam a presença de três carbonilas de éster conjugadas com anel aromático (166,8 δ ; 168,6 δ ; 170,4 δ), nove carbonos de anel aromático oxigenados, quatro CH aromático e seis sinais referentes a um açúcar, que foram confirmados no espectro do DEPT 135° (Figura 25).

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (desacoplado e DEPT 135°), mostrados na tabela 4, permitiram definir para o composto **4** a fórmula molecular $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$ (Figura 22). Nos experimentos de RMN bidimensionais HMBC e HSQC foram observadas as correlações constantes na tabela 4. A análise destes dados permitiu propor que o composto **4** trata-se de um tanino hidrolisável contendo uma unidade HHDP e uma unidade galoil.

A comparação dos dados de **4** com os de compostos encontrados na literatura (HE, XIA, CHEN, 2008) permitiu identificar esta substância como sendo a corilagina (Figura 22).

A corilagina é parte residual da geranina, sendo resultado da hidrólise parcial do derivado fenazina em água quente (BERLINCK *et al.*, 1995).

Quando os carbonos da unidade HHDP, C_7 do anel B e C_7 do anel C, acoplam com açúcar nos carbonos C-6 e C-3, respectivamente, conferem à estrutura a configuração *R*. Com base nestes dados pode-se alegar que o composto **4** possui configuração *R* (KHANBABAE; VAN REE, 2001).

Os valores atribuídos aos carbonos C-3 e C-6 na molécula de açúcar do composto **4**, estão diferentes do registrado na literatura como pode ser observado na tabela 4, mas estão de

acordo com as informações obtidas com os experimentos DEPT 135⁰ (Figura 24) e com HMBC.

A corilagina já foi isolada de outras espécies, sendo encontrada em diferentes órgãos das plantas, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 - Espécies de vegetais que apresentam corilagina.

Família	Espécie	Parte da Planta	Autor/Ano
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus emblica</i>	Raíz	ZHANG <i>et al.</i> (2004)
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus amarus</i>	Folhas	NOTKA, MEIER, WAGNER (2004)
Combretaceae	<i>Terminalia cattapa</i>	Folhas	KINOSHITA <i>et al.</i> (2007)
Euphorbiaceae	<i>Phyllanthus niruri</i>	Folhas	COLOMBO <i>et al.</i> (2009)
Burseraceae	<i>Canarium album</i>	Frutos	HE <i>et al.</i> (2008)
Sapindaceae	<i>Dimocarpus longan</i>	Sementes	ZHENG <i>et al.</i> (2009)

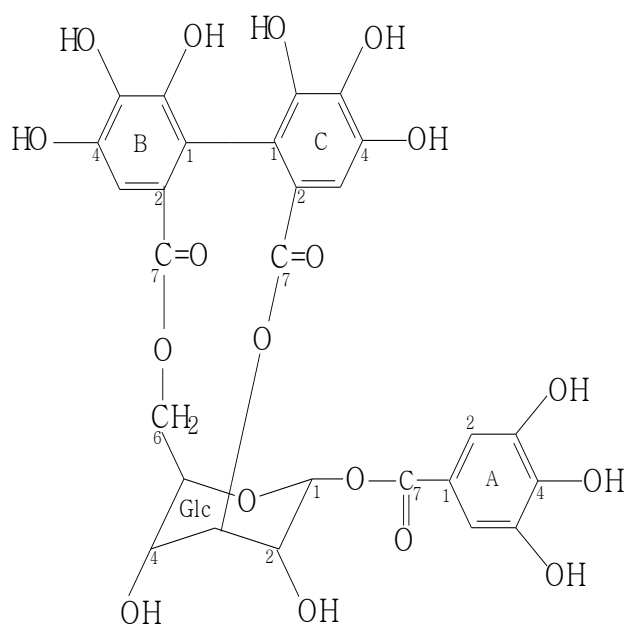


Figura 22 - Estrutura química da corilagina (4).

Tabela 4- Dados de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC do composto **4** (Metanol- d_4) comparado com os dados de ^{13}C da literatura* (Metanol- d_4).

Composto 4					* Literatura		
	C/H	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	HMBC	C/H	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$
Glc	1	6,35	95,0	H ₅	1	6,35	95,3
	2	3,98	69,4		2	4,03	69,0
	3	4,46	62,4	H ₄	3	4,83	65,1
	4	4,80	71,6	H ₅	4	4,47	71,5
	5	4,52	76,2	H _{6b}	5	4,50	76,3
	6	4,15 (a) 4,95 (b)	65,0	H ₅	6	4,12 4,93	62,2
Galoil (A)							
	1	7,05	120,6	H ₂	1		121,0
	2		110,6		2	7,08	110,8
	3		146,4	H ₂	3		146,4
	4		140,4	H ₂ / H ₆	4		140,4
	5		146,4		5		146,5
	6	7,05	110,6	H ₂	6	7,08	111,5
	7		166,7		7		166,9
HHDP (B)							
	1		125,4		1		125,9
	2		116,8	H ₃	2		117,4
	3	6,65	108,3		3	6,71	108,8
	4		138,2	H ₃	4		138,3
	5		146,0	H ₃	5		146,0
	6		145,6		6		145,5
	7		170,1	H ₃	7		169,5
HHDC (C)							
	1		125,4		1		125,8
	2		117,2	H ₃	2		116,8
	3	6,69	110,1		3	6,74	108,9
	4		137,7	H ₃	4		137,8
	5		145,4	H ₃	5		145,3
	6		146,0		6		145,5
	7		168,5	H ₃	7		168,7

* (HE; XIA;CHEN, 2008)

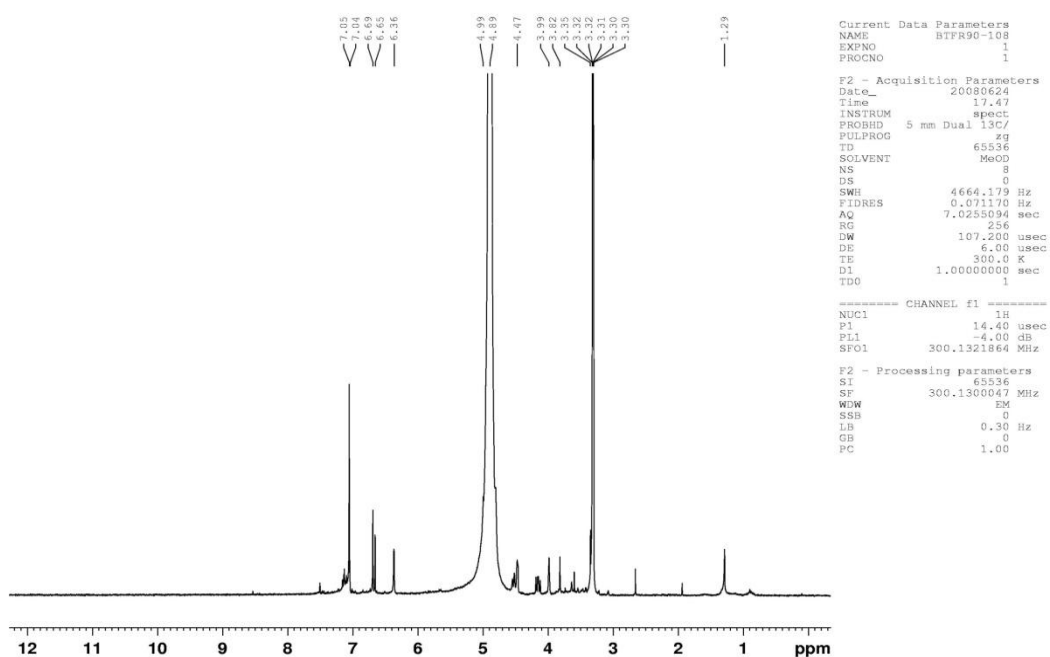


Figura 23– Espectro de RMN ^1H da Corilagina (4) (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$)

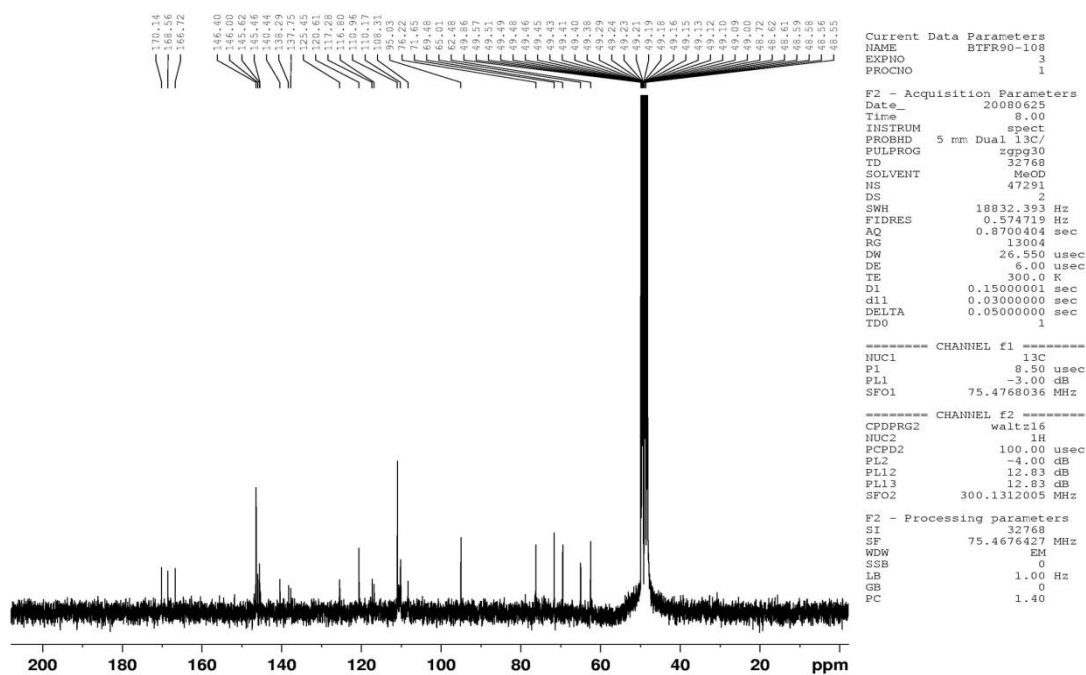


Figura 24 – Espectro de RMN ^{13}C da Corilagina (4) (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$)

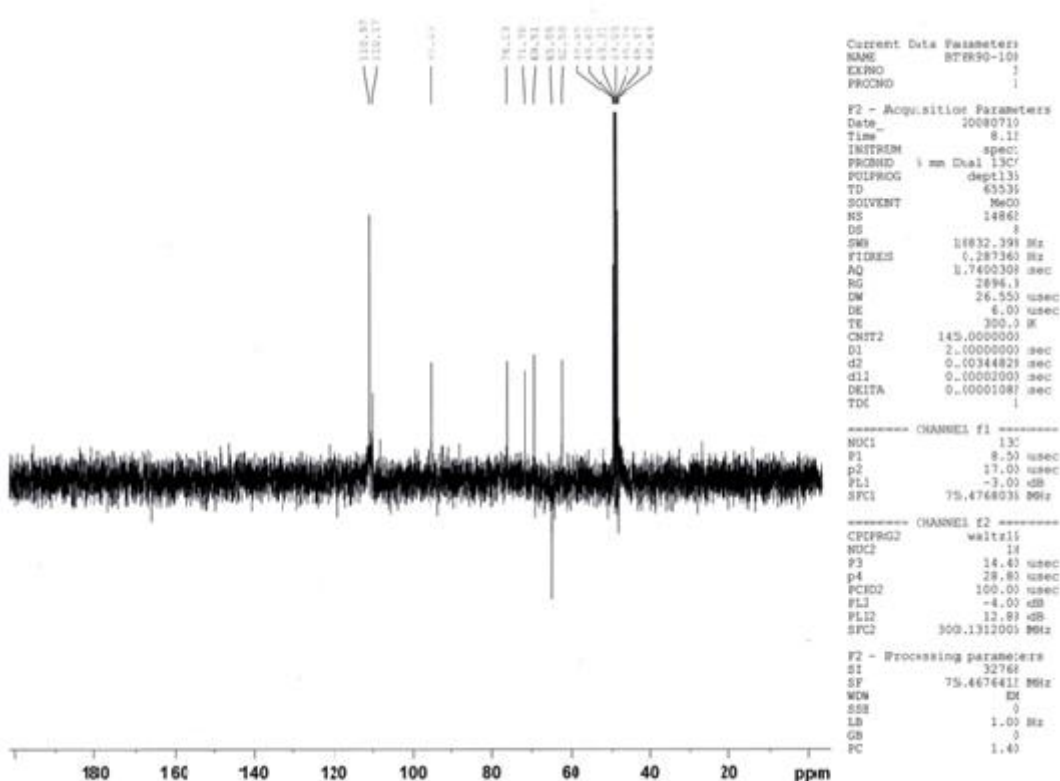


Figura 25 – Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° da corilagina (4) (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

Composto 5 – Buchenavina

A fração 70 – 89 foi obtida no fracionamento da fração acetato de etila, e a partir dela foi isolado o composto 5 (20,9 mg), uma substância, marrom e inodora.

O espectro de RMN ^1H do composto **5** (Tabela 5, Figura 28) apresentou sinais referentes a hidrogênio de açúcar: cinco singletos em 6,29 δ , 5,29 δ , 5,62 δ , 4,97 δ e 4,75 δ , um tripleto em 4,50 δ e o multipletto em 4,21 δ .

Além dos sinais do açúcar este espectro apresentou sinais em 6,45δ e 6,70δ que podem ser atribuídos a hidrogênio do sistema HHDP e um sinal em 7,01δ correspondente aos hidrogênios do sistema galoil (H₂ e H₆). Com auxílio do espectro de HSQC foi confirmada a presença de mais quatro hidrogênios, um no anel D 7,39δ (s; H₃) e três pertencentes ao anel E 4,75δ (*sl*; H₂), 2,00δ (*mt*; H₃), 4,79δ (*d*; H₄), indicando a presença do sistema DHHDP.

Os dados de RMN de ^{13}C (Tabela 5, Figura 29), DEPT 135 0 (Figura 30) e HMBC foram determinantes para a identificação estrutural do composto **5**. No espectro de RMN de ^{13}C além dos sinais atribuídos à molécula de hexose e do sistema HHDP, restaram quatorze sinais que foram atribuídos à unidade DHHDP. No DEPT 135 0 foram observados além dos

sinais do açúcar, do galoil e da unidade HHDP, dois carbonos metínicos, 40,75 δ (C_2) e 65,0 δ (C_4), e um metilênico 30,7 (C_3) pertencente ao anel E, e o metino em 115,6 (C_3) do anel D da unidade DHHDP.

Com os dados apresentados pelo espectro de HMBC foi possível correlacionar os sinais pertencentes à unidade DHHDP (Tabela 5). No anel D, a carbonila em 164,7 δ (C_7), o carbono aromático em (145,9 δ) interage com 7,39 δ (H_3), e no anel E foram registradas as correlações da carbonila 169,5 δ (C_7) com 4,75 δ (H_2), a outra carbonila em 172,9 δ com 2,00 δ (H_3) e o carbono C_2 (40,3 δ) com 4,79 (H_4). De acordo com as informações foi possível sugerir uma proposta para os anéis D e E (Figura 26).

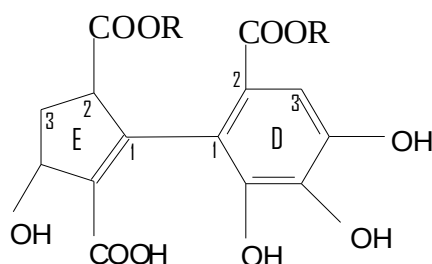


Figura 26- Proposta estrutural para os anéis D e E do composto 5: Unidade DHHDP.

Esta unidade DHHDP é um dos radicais que se une ao açúcar aumentando a variedade estrutural dos taninos hidrolisáveis. Os dados foram comparados com os da literatura (LATTÉ; KOLODIEZJ, 2000) onde a estrutura descrita é semelhante à proposta para o composto **5** com algumas diferenças nos anéis D e E.

O composto **5** (Figura 27) nomeado buchenavina, é, portanto, formado pela glicose, o galoil (A), uma unidade de HHDP (A e B) e uma unidade de DHHDP (D e E), com fórmula molecular $C_{41}H_{30}O_{26}$.

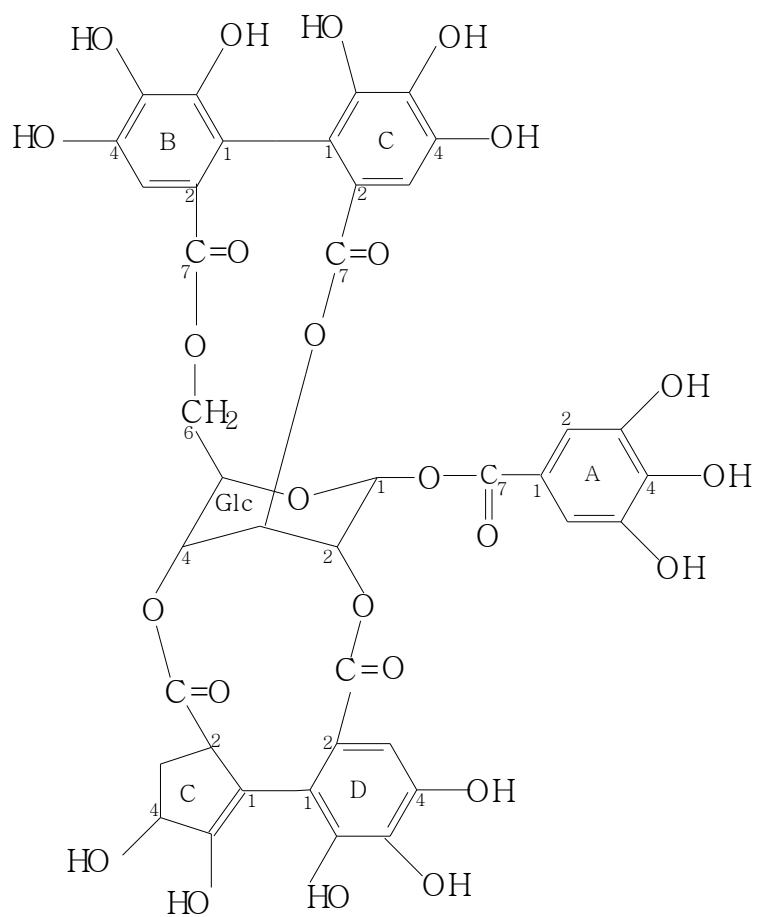


Figura 27 – Proposta estrutural para o composto 5 (buchenavina).

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC do composto 5 (DMSO- d_6).

	C/H	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	HMBC		C/H	$\delta(^1\text{H})$	$\delta(^{13}\text{C})$	HMBC
Glc					HHDP (C)				
	1	6,29	91,2	H ₅		1		122,4	H ₃
	2	5,29	71,9			2		114,9	
	3	5,62	62,0			3	6,45	106,4	
	4	4,97	66,0			4		143,9	
	5	4,75	73,9			5		135,4	H ₃
	6	4,21	63,3			6		143,9	H ₃
		4,50				7		167,5	H ₃
Galoil (A)					DHHDP (D)				
	1		117,8			1		114,7	H ₃
	2	7,01	109,2			2		123,1	
	3		145,7	H ₂		3	7,39	115,6	
	4		139,5	H ₂		4		145,9	
	5		145,7			5		139,5	H ₃
	6	7,01	109,2			6		145,9	H ₃
	7		164,5	H ₂		7		164,7	H ₃
HHDP (B)					DHHDP (E)				
	1		122,4	H ₃		1		140,3	H ₂
	2		116,3			2	4,75	40,3	
	3	6,70	107,3			3	2,00	30,7	H ₄
	4		144,2			4	4,79	65,0	H ₂
	5		136,3	H ₃		5		117,8	
	6		144,2	H ₃		6		172,9	H ₃
	7		165,5	H ₃		7		169,5	H ₂

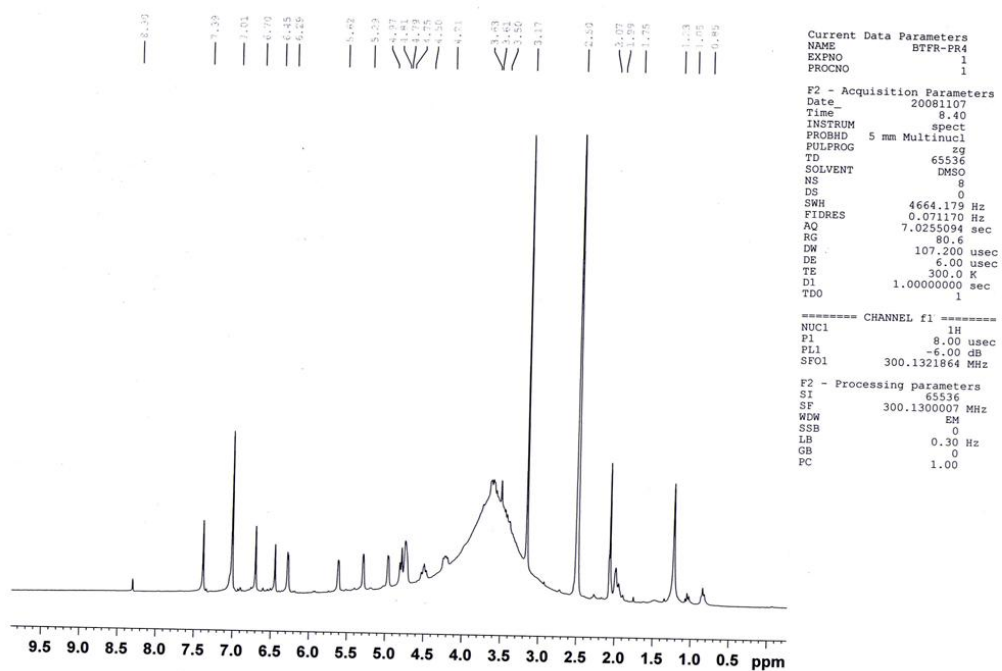


Figura 28 – RMN de ^1H da buchenavina (5) (300 MHz, DMSO- d_6 , TMS $\delta=0$).

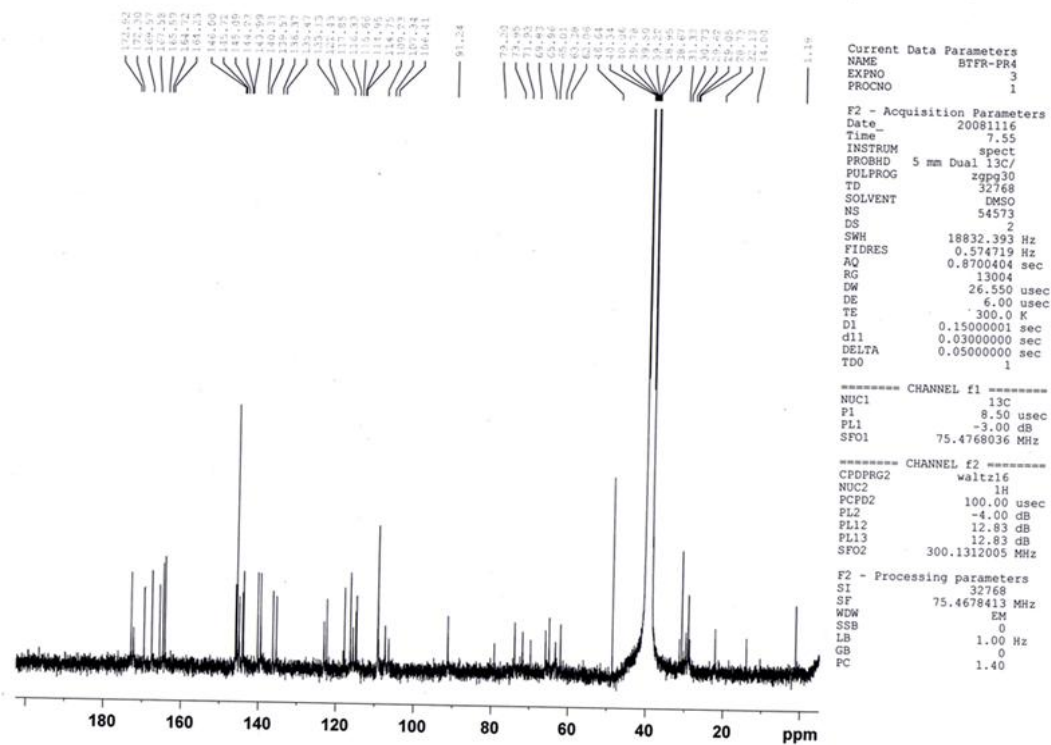


Figura 29 – RMN de ^{13}C da buchenavina (5) (75 MHz, DMSO- d_6 , TMS $\delta=0$).

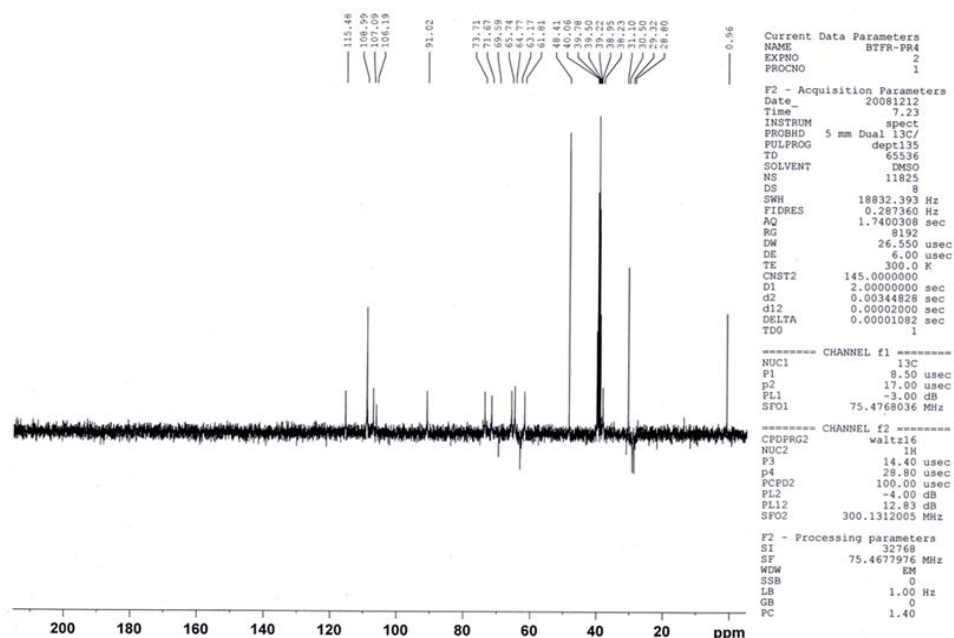


Figura 30 – Espectro de RMN ^1H - DEPT 135⁰ da buchenavina (**5**) (75 MHz, DMSO- d_6 , TMS $\delta=0$).

➤ Lignanas

O composto **6 e 7 (em mistura)** e **13A** pertencem à classe das lignanas que são encontradas em plantas vasculares e compreendem um grande grupo de metabólitos secundários (SCHROEDER *et al.*, 2006).

Esta categoria é caracterizada pela ligação $\beta - \beta'$ ou C-8 – C-8' de duas unidades $\text{C}_6\text{-C}_3$, que podem sofrer outros acoplamentos gerando vários tipos de esqueletos (AGRAWAL; THAKUR, 1985).

As lignanas são moléculas geralmente quirais. O sinal da rotação óptica de uma lignana pode variar conforme a planta da qual foi isolada. Portanto, o mecanismo da estereoquímica envolvida na biossíntese das lignanas pode ser diferente entre as várias espécies de plantas que as produzem (OKUNISHI, UMEZAWA, SHIMADA, 1997).

Muitas lignanas têm atividades farmacológicas como anticâncer, anti-HIV, entre outras (CHU *et al.*, 1993). Estas substâncias formam a base de uma nova classe de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças como asma, doenças inflamatórias, artrite reumática, além de possui atividade hipolipidêmica, hepatoprotetora e antioxidante (WARD, 1995).

Segundo a literatura Ward (1995) por ser uma classe com uma diversidade estrutural ampla é dividida em sete subclasses: entre elas a 2,6-diaril-3,7 dioxabicyclo [3,3.0] octano onde encontra-se a série furofurânica à qual pertencem os compostos **6** e **7** e o **13A**, (este último isolado dos frutos de *Ouratea spectabilis*).

Composto **6** e **7** pinoresinol/epipinoresinol

A fração 13-17 (4,2 mg) apresentou-se como uma substância viscosa e incolor, solúvel em acetona. O espectro de RMN de ^{13}C indicou a presença de duas substâncias, identificadas como os compostos **6** e **7**.

Composto **6** - Pinoresinol

No espectro de RMN de ^1H (Tabela 6, Figura 33) foi observada a presença de um anel benzênico tri-substituído 1,3,4, evidenciados pelos sinais 6,99 δ (H-2-2'), 6,77 δ (H-5-5') e 6,82 δ (H-6-6'); observou-se também sinais correspondentes ao esqueleto furofurano: 4,67 δ (2H, d, J=3Hz, 7-7'); multiplete em 3,08 δ (H-8-8') e duplo duplete em 4,23 (2H-9a-9a') e 3,89 δ (2H-9b-9b') e da metoxila em 3,84 δ (DE CARVALHO *et al.*, 2006a).

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 6, Figura 34) mostrou dez sinais, sendo seis carbonos de anel aromático, um oximetínico, um oximetilênico, um metínico alifático e uma metoxila. A intensidade dos sinais indicam que estão duplicados. Este conjunto de sinais são compatíveis com uma estrutura constituída de duas partes, gerando uma molécula simétrica e indicando tratar-se de uma lignana. Os valores de RMN de ^{13}C de **6** foram comparados com dados de literatura (ALMEIDA *et al.*, 2005), permitindo identificá-lo como pinoresinol, que contém como substituinte o grupo guaiacila (Figura 31).

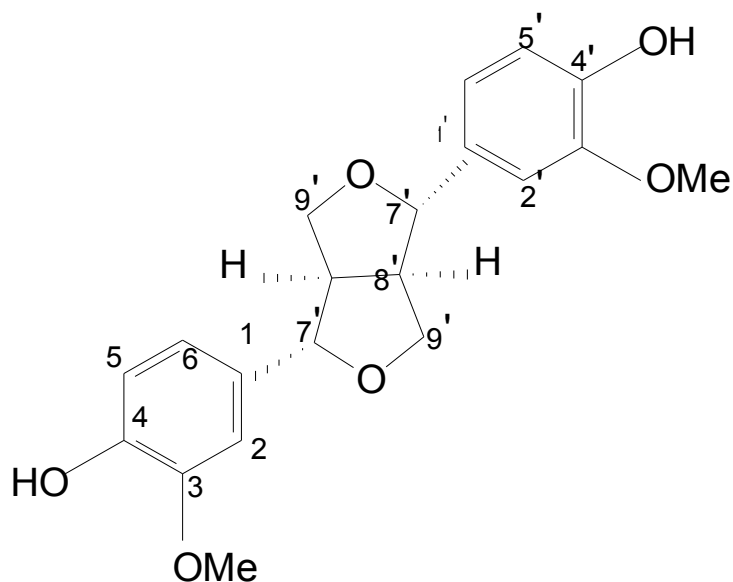


Figura 31- Estrutura química do pinosresinol (**6**)

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do pinosresinol (**6**) e da literatura* (Acetona- d_6).

C/H	Composto 6		Pinosresinol (literatura*)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1,1'	133,34		134,2	
2,2'	109,74	6,99	110,7	6,99
3,3'	147,47		148,4	
4,4'	146,01		146,9	
5,5'	114,67	6,77	115,7	6,79
6,6'	118,88	6,82	119,7	6,83
7, 7'	85,74	4,67	86,7	4,67
8,8'	54,31	3,08	55,3	3,08
9,9'	71,30	4,2 – 3,80	72,3	4,19 -3,79
OCH_3	55,34	3,84	56,3	3,83

*(ALMEIDA *et al.*, 2005)

Nesta lignana furofurânica simétrica os anéis aromáticos podem estar na posição axial ou equatorial.

Pelos dados de RMN de ^{13}C foi possível determinar a estereoquímica do composto **6**, visto que os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos 1,1'; 7,7'; 8,8' e 9,9' (Tabela 7) são característicos para uma orientação equatorial dos anéis aromáticos (AGRAWAL; THAKUR, 1985), confirmando a presença do pinioresinol.

Tabela 7 – Deslocamentos químicos dos carbonos nos sistemas furofurânico com substituintes em axial e equatorial e do composto **6** (pinioresinol); (δ), Acetona- d_6 .

C	Axial	Equatorial	Composto 6
1,1'	132,6	134,9-135,6	133,3
7,7'	83,9	85,3-85,9	85,7
8,8'	49,5	53,7-54,4	54,3
9,9'	68,7	71,3-72,0	71,3

Composto 7- Epipinioresinol

O composto **7** apresentou nos espectros de RMN de ^1H (Figura 33) e de ^{13}C (Figura 34) sinais diferentes dos observados para o composto **6**. Estes sinais indicavam tratar de uma estrutura não simétrica e a diferença foi observada nos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos 7,8 e 9: H-7 e H-7' (4,82 δ e 4,37 δ); H-8 e H-8' (3,38 δ e 2,95 δ) e H-9 e H-9' (4,8 e 3,17- 3,77); C-7 e C- 7' (82,75 e 88,56); C-8 e C-8' (50,93 e 55,61) e o C-9 e C-9' (71,55 e 70,11). As atribuições foram confirmadas com os experimentos HSQC e HMBC. A intensidade do sinal referente à metoxila indicou que este grupo se encontra presente nas estruturas dos compostos **6** e **7**. Estes dados indicaram que o composto **7** corresponde ao epipinioresinol (Figura 32). Os dados foram comparados. Os valores mostraram boa correlação com os constantes na literatura (SWAIN, BROWN e BRUTON, 2004), apesar de pequenas diferenças de deslocamento químico dos carbonos dos anéis aromáticos (Tabela 8).

A diferença do pinioresinol e do epipinioresinol está na posição do substituinte guaiacila. No pinioresinol os substituintes estão na posição equatorial. Enquanto no epipinioresinol o anel 1 está na posição axial e 1' na equatorial.

No espectro de infravermelho foram registradas bandas em: 3407 cm^{-1} , correspondente grupo OH, 2923 cm^{-1} , referente ao grupo metilênico, 1267 cm^{-1} , da metoxila e 1035 cm^{-1} e em 1515 cm^{-1} , C=C aromático.

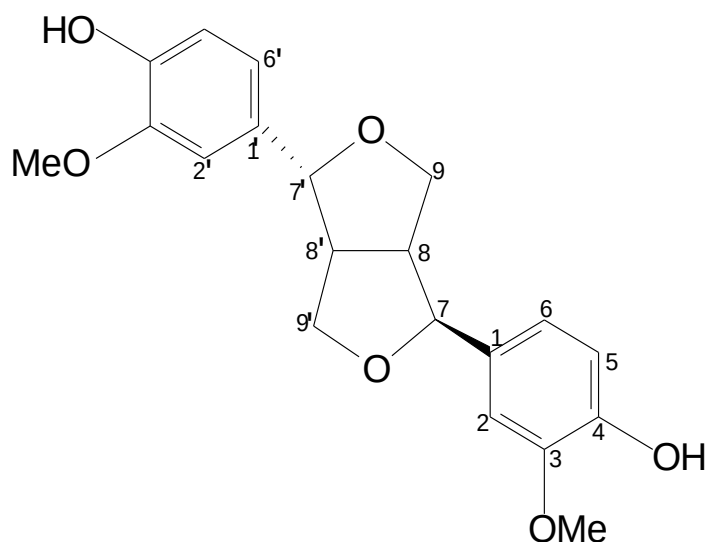


Figura 32- Estrutura química do epipinoresinol (7).

Tabela 8 –Deslocamentos químicos dos ^1H e ^{13}C do epipinoresinol (7) e correlações observadas nos experimentos bidimensionais (Acetona- d_6).

C/H	Composto 7			C/H	Composto 7		
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	HMBC
1	134,20		H ₅ ; H ₆	1'	134,20		H _{5'} ; H _{6'}
2	110,69	6,99	H ₇ ; H ₅ ; H ₈	2'	110,69	6,99	
3	148,00		H ₂ ; H ₅ ; H ₉	3'	148,00		H _{2'} ; H _{5'} ; H _{9'}
4	146,86		H ₂	4'	146,86		H _{2'}
5	115,57	6,79		5'	115,57	6,79	
6	119,12	6,82		6'	119,12	6,82	
7	82,75	4,82	H ₂	7'	88,56	4,37	H _{9'}
8	50,93	3,38	H ₉	8'	55,56	2,95	H _{9'}
9	71,55	4,08		9'	70,11	3,17 -3,77	
OCH ₃	55,34	3,84		OCH ₃	56,34	3,83	

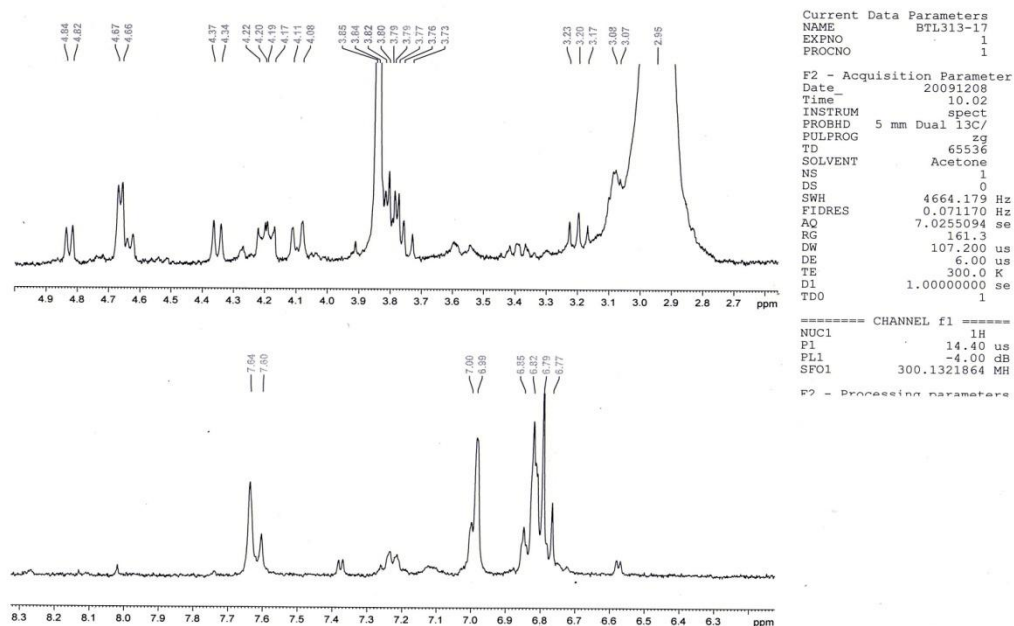


Figura 33- Espectros de RMN de ^1H dos compostos **6** (pinoresinol) e **7** (epipinoresinol) (300 MHz, acetona- d_6 , TMS $\delta=0$).

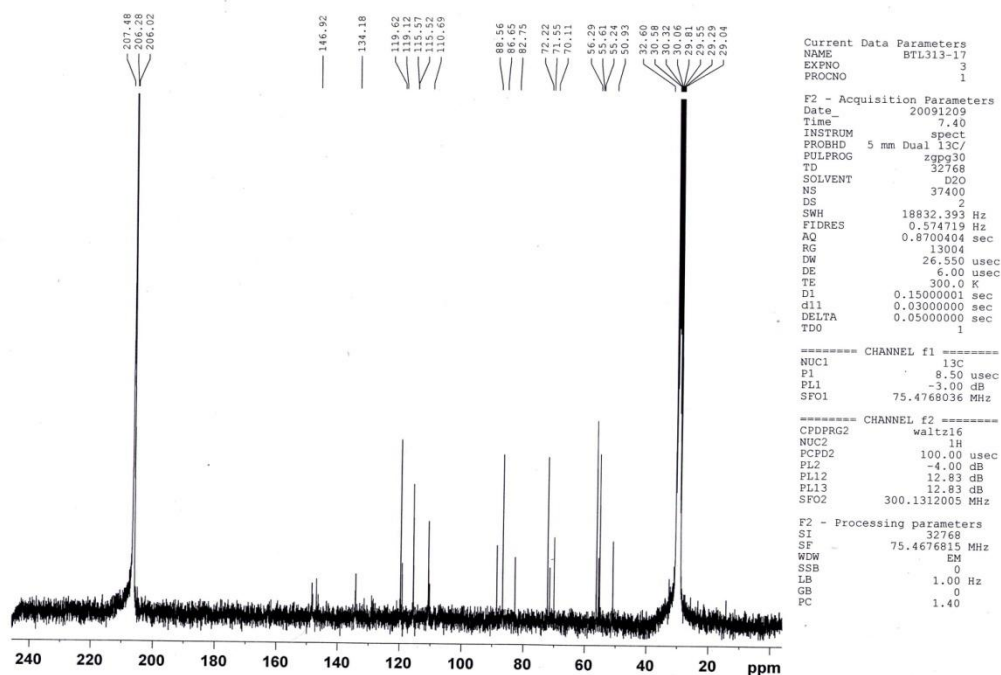


Figura 34- Espectro de RMN de ^{13}C dos compostos **6** (pinoresinol) e **7** (epipinoresinol) (75 MHz, acetona- d_6 , TMS $\delta=0$).

5.1.2 Atividade antibacteriana – *Buchenavia tomentosa*

➤ Extrato, frações e subfrações

Os resultados observados para o extrato etanólico dos frutos de *Buchenavia tomentosa* e frações frente às três cepas bacterianas (Tabela 9) mostraram que o mesmo apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas *S. aureus* (Gram positiva) e *P. aeruginosa* (Gram negativa). A única fração ativa para *S. aureus* foi a acetato de etila (AcOEt). Para *P. aeruginosa* o resultado obtido com o extrato etanólico não foi reproduzido nas frações, possivelmente em decorrência do antagonismo entre os compostos que, quando separados nas diferentes polaridades, foram inativos.

A fração hexânica apresentou bom resultado para *E. faecalis* e o mesmo não ocorreu com o extrato etanólico, indicando que este microorganismo é mais sensível aos compostos menos apolares.

Tabela 9 – Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico (EtOH) e frações hexânica (HEX), diclorometânica (DCM), acetato de etila (AcOEt) e hidro-metanólica (MeOH/H₂O) dos frutos de *B. tomentosa* frente às bactérias testadas.

Bactérias	Extrato		Frações			Padrão
	EtOH	HEX	DCM	AcOEt	MeOH/H ₂ O	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	1000	> 1000	> 1000	1000	> 1000	1
<i>P. aeruginosa</i>	1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	8
<i>E. faecalis</i>	> 1000	500	> 1000	> 1000	> 1000	0,5

De acordo com a proposta do trabalho, a fração selecionada para dar continuidade foi a AcOEt. Esta fração foi cromatografada em Sephadex LH-20, obtendo-se 116 subfrações que foram reunidas de acordo com similaridade e testadas apenas frente ao microorganismo *S. aureus* (Tabela 10). O critério utilizado para selecionar as amostras que originaram o estudo foi: atividade antibacteriana, quantidade de massa e grau de pureza das amostras.

Tabela 10 – Resultado do teste antibacteriano das subfrações provenientes da fase AcOEt dos frutos de *B. tomentosa* frente a *S.aureus* com a CIM variando de 500 a >1000 µg/mL.

Bactéria	Subfrações								Padrão
	1 - 27	28-44	35-49	50-54	55-59	60-69	70-89	109-116	
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	500	1000	> 1000	1000	500	> 1000	1

Algumas amostras apresentaram atividade antibacteriana, mas não foi possível isolar e identificar os compostos. A presença de dois compostos do tipo tanino justifica esta complexidade porque estes compostos são conhecidos não só pela diversidade biológica e variedade estrutural, mas também pela dificuldade de purificação.

Nas outras frações não foi possível identificar as substâncias presentes. Os espectros de RMN não foram suficientes para informar se os dados apresentados eram de mistura de composto ou de uma estrutura complexa. Por esta razão, a fração AcOEt foi submetida a outros processos cromatográficos, obtendo-se as subfrações AcOEt-II-3 e AcOEt-II-4, para as quais os resultados do teste antibacteriano estão registrados na Tabela 11.

As frações com atividade inibidora para *S.aureus*, foram testadas frente as outras duas cepas bacterianas (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados da atividade antibacteriana das subfrações 35 – 49; 70 – 89; AcOEt-II-3; AcOEt-II-4 frente às bactéria (µg/mL).

Bactérias	Subfrações				Padrão
	35 - 49	70 -89	AcOEt-II-3	AcOEt-II-4	
<i>S. aureus</i>	500	500	500	1000	1
<i>P. aeruginosa</i>	1000	1000	1000	1000	8
<i>E. faecalis</i>	1000	> 1000	125	500	0,5

A CIM apresentada pelas três subfrações foi alta em relação ao padrão, porém os resultados observados nas subfrações 35 – 49, AcOEt-II-3 e AcOEt-II-4 são considerados promissores, uma vez que mostraram atividade antimicrobiana para Gram positivos (*S. aureus* e *E. faecalis*) e Gram negativo (*P. aeruginosa*). A subfração 70 – 89 também apresentou atividade para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Destaca-se o resultado da AcOEt-II-3 contra *E. faecalis*.

As subfrações passaram por processos cromatográficos possibilitando obtenção dos compostos **1 e 2** em mistura (35 – 49), o **5** (70 – 89), o **6 e 7** em mistura (AcOEt-II-3) e o **1** (AcOEt-II-4). Os compostos **3 e 4** foram isolados puros da fração Acetato de etila.

➤ Compostos isolados

Os compostos isolados de *B. tomentosa* assim como as subfrações das quais foram isolados, apresentaram a CIM alta, com as concentrações variando de > 200 a 100 µg/mL (Tabela 12).

Tabela 12 - Atividade antibacteriana dos compostos isolados dos frutos *B. tomentosa* de acordo com a CIM (µg/mL) observada frente às bactérias testadas.

Bactérias	Compostos isolados						Padrão
	1	1 / 2	3	4	5	6 e 7	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	200	>200	200	200	>200	> 200	1
<i>P. aeruginosa</i>	200	>200	>200	200	>200	>200	8
<i>E. faecalis</i>	>200	>200	100	>200	>200	>200	0,5

O galato de etila (**1**) puro apresentou atividade para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, assim como a subfração 35– 49 da qual foi isolado. A mistura dos compostos **1 e 2** (galato de etila e galato de metila) não inibiu o crescimento das bactérias testadas na concentração mais alta, 200µg/mL, resultado indicativo que a atividade pode ser causada pelo composto **1**.

O fato da mistura de compostos não ter apresentado atividade para todas as cepas e a subfração 35 – 49 apresentar atividade, pode estar relacionado com a quantidade dos compostos na subfração. Na mistura, o componente majoritário é o composto **2** e na fração 35 – 49 é o composto **1**.

Outro fator que pode ter influenciado, originando o resultado não promissor para a mistura de compostos, é o antagonismo dos compostos onde um pode inibir a ação do outro.

O composto **3** (ácido gálico) apresentou atividade para as bactérias Gram positivas, *S. aureus* e *E. faecalis*. A ocorrência de cepas resistentes de *S. aureus* e *E. faecalis* mostra ser necessário a busca de novos medicamentos. Acredita-se que o ácido gálico (**3**) pode ser uma substância alternativa que poderá ser utilizada em formulações farmacêuticas no combate a doenças causadas por estes agentes.

Os compostos **1** e **3** já foram testados quanto à atividade antineoplásica e os testes realizados *in vitro*, com sete linhagens de células cancerígenas (leucemia, ovário, cérebro, renal, pulmonar, cólon e melanoma) revelaram moderada atividade para todas as células testadas, indicando atividade antineoplásica destes compostos (PETTIT *et al.*, 1996).

A corilagina (**4**) apresentou atividade contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, que são dois microorganismos comuns em infecções oportunistas e com alto índice de cepas resistentes. A corilagina, assim como o galato de etila, foram os únicos compostos deste fracionamento a apresentarem atividade frente a uma bactéria gram-negativa. A corilagina, o galato de etila e o ácido gálico presentes em *B. tomentosa* não são inéditos, mas este resultado revela significativa atividade antibacteriana destes compostos.

O composto **4** já foi isolado de outras plantas e possui diversas atividades biológicas: antileishmania (KOLODZIEJ; RADTKE; KIDERLEN, 2008), antiproliferativa (ZHANG *et al.*, 2004), anti-inflamatória (ZHAO *et al.*, 2008) e anti-HIV (NOTKA; MEIER; WAGNER 2004).

Segundo Zhao *et al.* (2008), a corilagina tem atividade antibacteriana contra *S. aureus* meticiclina-resistente e também é um potente trombolítico, hipertensivo, hepatoprotetor e antioxidante.

A presença de corilagina em *B. tomentosa* ressalta a importância do estudo das espécies do cerrado e o isolamento de um composto com tantas propriedades farmacológicas valoriza a espécie estudada visto que o processo de obtenção desta substância é simples e apresenta bom rendimento.

No presente estudo, observou-se que embora a fração 70-89 tenha apresentado atividade antibacteriana, o composto **5** da qual foi isolado, mostrou-se inativo frente às bactérias testadas. Tal fato pode ser justificado pelo antagonismo que ocorre entre os compostos que inibem a ação de alguns microorganismos e que quando isolados não possuem a mesma capacidade de inibição da subfração de origem.

O pinoresinol (**6**) e o epipinoresinol (**7**) identificados em mistura apresentaram resultados diferente da fração de origem. Os compostos foram inativos frente às três bactérias, enquanto a fração que levou ao isolamento destas substâncias mostrou atividade para as três cepas, inclusive com o melhor resultado contra *E. faecalis*. Este resultado também pode ser justificado pelo antagonismo de substâncias ou o composto responsável pela atividade não foi isolado e identificado.

Pesquisa realizada com quatro lignanas: pinoresinol, lariciresinol, secoisolariciresinol e matairesinol, e duas enterolignanas: a (enterodiol e a enterolactona) em mulheres na pós

menopausa, mostrou que dieta rica em lignana previne o câncer de mama (TOUILLAUD *et al.*, 2007). O pinoresinol previne câncer colo-retal (FINI *et al.* 2008) e também tem ação inseticida (SCHROEDER *et al.* 2006; ARAÚJO *et al.*, 2009).

Há necessidade de se desenvolver novos medicamentos para combater o aumento de casos de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos. As plantas têm sido há séculos usadas para o tratamento de doenças infecciosas e atualmente é uma das fontes de novas substâncias com ação antibacteriana.

B. tomentosa entra neste cenário, pois os compostos ativos dela isolados, apesar de não serem inéditos, foram ativos para bactérias Gram positiva e Gram negativa.

A presença deste composto em *B. tomentosa* indica outras potencialidades desta espécie, abrindo caminho para novas pesquisas, visto que é o primeiro relato dos seus componentes químicos na literatura.

5.1.3 Atividade antifúngica de *B. tomentosa*

➤ Extrato, frações e subfrações

Os resultados do extrato, fração e subfrações relacionados na tabela 13 mostraram melhor atividade antifúngica “*in vitro*” que a atividade antibacteriana.

Os testes foram realizados com cinco cepas fúngicas (quatro espécies de *Candida* e uma de *Cryptococcus*) e os resultados apresentados na tabela 13 mostram que a CIM variou de 7,81 a 1000 µg/mL, sendo que os resultados mais significativos estão representados pelo extrato etanólico, fração AcOEt e sub-fração 70 – 89 contra *C. glabrata*.

O extrato etanólico (EtOH) e a fração AcOEt apresentaram maior CIM frente a *C. albicans* (1000 µg/mL) e a menor contra *C. glabrata* (7,81 µg/mL). Frente a *C. neoformans* o extrato etanólico foi mais expressivo que as frações e subfrações com CIM em 125 µg/mL.

Os testes realizados com as subfrações 35-49, 70-89, AcOEt-II-3 e AcOEt-II-4 mostraram que a fração 70-89 apresentou menor CIM para todas as espécies de *Candida*, em especial para *C. glabrata* (7,81 µg/mL). Este mesmo resultado também foi registrado para o extrato etanólico e fração acetato de etila, sugerindo que o composto mais ativo para esta levedura está presente nesta fração. Quanto à fração 35 – 49, a CIM que se destaca é a aquela contra *C. glabrata* (15,62 µg/mL).

A fração AcOEt-II-4 apresentou resultado pouco promissor, com CIM mais significativa contra *C. glabrata* (62,50 µg/mL). Portanto, o resultado menos significativo foi

apresentado pela subfração AcOEt-II-3 com CIM em 1000 e >1000. Contra *Cryptococcus neoformans* não foi realizado teste com esta amostra porque não tinha quantidade suficiente de massa.

Tabela 13 – Distribuição de CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato, fração e subfrações de *B. tomentosa* de acordo com a levedura testada.

Leveduras	Extrato	Fração	Subfrações				Padrão
	EtOH	AcOEt	35-49	70-89	AcOEt-II-3	AcOEt-II-4	Anfotericina B
<i>Candida albicans</i>	1000	1000	500	31,25	1000	1000	0,25
<i>C. krusei</i>	31,25	15,62	250	15,62	1000	1000	1
<i>C. glabrata</i>	7,81	7,81	15,62	7,81	>1000	62,5	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	15,62	15,62	125	15,62	>1000	500	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	125	250	250	250	NT	1000	0,25

N.T: Não testadas

Os resultados contra *C. glabrata* sugerem novas possibilidades de encontrar substâncias que podem ser utilizadas em formulações terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por esta levedura, que tem emergido nas últimas décadas como importante agente de infecção na corrente sanguínea (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A levedura *C. albicans* é a mais comum em infecções fúngicas oportunistas e a comparação dos resultados da CIM em relação às outras cepas testadas, revela a dificuldade de se encontrar substância com atividade contra esta espécie de agente infeccioso.

➤ Compostos isolados

Todas as substâncias isoladas dos frutos de *B. tomentosa* mostraram atividade antifúngica (Tabela 14). A CIM variou de 50 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *C. albicans*, de 6, 25 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *C. krusei* e de 3,12 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *C. glabrata*. Para *C. parapsilosis* a CIM variou de 1,56 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exceto para os compostos **1** e **1 e 2** (mistura) que revelaram CIM superior a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Em relação ao *C. neoformans* a CIM ficou entre 25 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os resultados estão apresentados na tabela 14, destacando-se os compostos **3**, **4** e **5** por apresentarem resultados mais promissores frente às cepas testadas.

Tabela 14 - Concentração mínima inibitória dos compostos isolados dos frutos de *B. tomentosa* ($\mu\text{g/mL}$) frente às leveduras testadas

Leveduras	Compostos Isolados						Padrão
	1	1/2	3	4	5	6/7	Anfotericina B
<i>C. albicans</i>	200	200	100	50	200	100	0,25
<i>C. krusei</i>	200	200	100	12,5	6,25	200	1
<i>C. glabrata</i>	100	50	50	6,25	3,12	200	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	>200	>200	100	1,56	3,12	100	0,5
<i>C. neoformans</i>	200	100	100	25	25	200	0,25

Os compostos fenólicos **1** e **2** (galato de etila/galato de metila) e **3** (ácido gálico)); apresentaram resultado relevante contra *C. glabrata* (50 $\mu\text{g/mL}$) este é um bom resultado pois tratar-se de uma levedura presente em muitos casos de infecções oportunistas. O ácido gálico (**3**) apresentou atividade antifúngica frente às espécies de *Candida* e ao *Cryptococcus*. Este composto está presente em muitas plantas que apresentam diversas propriedades medicinais, e entre elas, atividade antifúngica (BERNARDES; FERREIRA, 2007).

O resultado mais promissor foi apresentado pelo composto **4** (corilagina), cuja CIM variou de 1,56 a 50 $\mu\text{g/mL}$, destacando o resultado para *C. parapsilosis* (1,56 $\mu\text{g/mL}$), uma levedura que tem apresentado aumento no número de casos nos últimos anos.

Os testes mostraram que a cepa menos sensível à corilagina foi *C. albicans*, o que era esperado por apresentar alto grau de virulência. De todos os compostos testados, a melhor CIM frente a *C. albicans* foi para o composto **4** (50 $\mu\text{g/mL}$). Deve-se destacar, também, os resultados obtidos para *C. krusei* (12,5 $\mu\text{g/mL}$), *C. glabrata* (6,25 $\mu\text{g/mL}$) e *C. neoformans* (25 $\mu\text{g/mL}$), mostrando que a corilagina apresenta potencial antifúngico.

Outro composto que teve destaque no ensaio antifúngico foi o **5**; com exceção de *C. albicans*, que apresentou pouca sensibilidade a este composto (200 $\mu\text{g/mL}$), as outras espécies de *Candida* e *Cryptococcus* foram sensíveis a este tanino, destacando se *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (3,12 $\mu\text{g/mL}$).

No ensaio com *C. glabrata* a concentração das subfrações 70-89 e AcOEt-II-4 e dos compostos **4** e **5** variou de 125 a 0,97 $\mu\text{g/mL}$ e de 50 a 0,39 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Para estas amostras foi necessário diminuir a concentração inicial, uma vez que não foi possível determinar a CIM nas concentrações padronizadas nesta pesquisa, o que mostra a potencialidade destas amostras frente a este microorganismo.

As substâncias **4** e **5** são estruturalmente relacionadas com a geranina, segundo a literatura (GOHAR, LAHLOUB, NIWA, 2003). Esta possui atividades antifúngica e antibacteriana, o que está de acordo com o bom desempenho destes dois compostos frente às cepas antifúngicas testadas.

Os resultados apresentados pela fração AcOEt e subfrações 35-49 e 70-89 contra *C. glabrata* podem ser atribuídos aos compostos **3**, **4**, **1** e **2** e **5**, obtidos das respectivas frações e subfrações.

A mistura de lignanas pinoresinol/epipinoresinol (**6** e **7**) apresentou atividade para todas as cepas testadas sendo o resultado menos promissor, com CIM (200 e 100 µg/mL), assim como a fração de origem AcOEt-II-3. Porém são resultados relevantes por tratar-se de microorganismo responsável por diversas enfermidades.

A atividade antifúngica dos compostos isolados mostram que os resultados mais promissores foram os compostos **4** e **5**, classificados como taninos.

Os taninos ao precipitarem proteínas, propiciam um efeito antibacteriano e antifúngico. Outro mecanismo de toxicidade que pode envolver esta classe, deve-se ao fato deles complexarem-se com facilidade a íons metálicos. Sistemas biológicos, incluindo microorganismos, necessitam de íons metálicos como cofatores enzimáticos (MONTEIRO *et al.*, 2005). Estes fator podem justificar os resultados apresentados pelos compostos **4** e **5**.

A parede celular fúngica é relativamente rígida, porém dinâmica, participa de vários processos biológicos essenciais às células inclusive adesão e reprodução, sendo por isso necessária para o crescimento e desenvolvimento dos fungos (FUKUDA *et al.*, 2009). Por esta razão, é possível que os compostos **4** e **5** ao interagirem com a parede celular fúngica sejam responsáveis por uma “desorganização” estrutural, reduzindo o crescimento dos fungos que apresentaram mais sensibilidade a estes compostos (**4** e **5**), como ocorreu com o composto **4** frente a *C. parapsilosis*.

Com os resultados descritos acima pode-se atribuir a *B. tomentosa* atividade antibacteriana e antifúngica, pois os extratos, frações, subfrações e compostos isolados mostraram atividade frente às cepas bacterianas e fúngicas.

5.1.4 Atividade anti-radicalar de *B. tomentosa*

Os extratos, frações, subfrações e compostos isolados foram testados quanto à atividade sequestradora de radical livre. As substâncias que têm facilidade em sequestrar radicais livres têm propriedades antioxidantes. O teste foi realizado com DPPH e ácido caféico como padrão positivo.

No ensaio com DPPH avaliada a capacidade de uma substância em sequestrar o radical estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila. Os resultados apresentados na tabelas 15 e 16 foram determinados de acordo com os valores obtidos no cálculo de potência e no desvio padrão. Os valores de CI_{50} são calculados usando a fórmula da equação da reta, e quanto menor o valor, maior a atividade, portanto, $CI_{50} = \text{Potência} \pm \text{Desvio Padrão}$. Os resultados ≥ 200 foram considerados inativos. Em relação às porcentagens de DPPH sequestrado, quanto mais próximo este valor for de 100% mais ativa é a amostra, ou seja, maior é a capacidade de sequestrar radicais livre.

➤ Extrato, frações e subfrações

As informações da tabela 15 revelam que todas as amostras apresentaram atividade anti-radicalar, destacando-se a subfração 70 – 89 com CI_{50} em $5,50 \pm 0,54$, resultado melhor que o padrão. Comparando-se os resultados do extrato etanólico, das frações e das subfrações o mais significativo foi o da subfração 70 – 89 e o menos significativo foi o da ACOET-II-4, com CI_{50} superior ao extrato etanólico. Estes dados indicam que a fração 70 – 89 tem a maior capacidade em sequestrar radical livre e ACOET-II-4 a menor.

Tabela 15– CI_{50} de extrato, fração e subfrações de *B. tomentosa* submetidos a ensaio anti-radicalar com DPPH ($\mu\text{g/mL}$).

Amostra		CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Extrato	EtOH	$23,8 \pm 1,00$
Fração	AcOEt	$10,7 \pm 0,65$
	35-49	$15,6 \pm 0,83$
	70-89	$5,28 \pm 0,54$
	AcOEt-II-3	$24,3 \pm 0,52$
Subfração	AcOEt-II-4	$29,0 \pm 0,62$
	Ác.cafeico	$8,32 \pm 0,26$

Na figura 35 os dados estão representados de acordo com os valores da CI_{50} , comprovando que a subfração 70 – 89 possui mais ação antioxidante que as demais, o que indica que os compostos com maior atividade antioxidante podem estar presentes nessa fração.

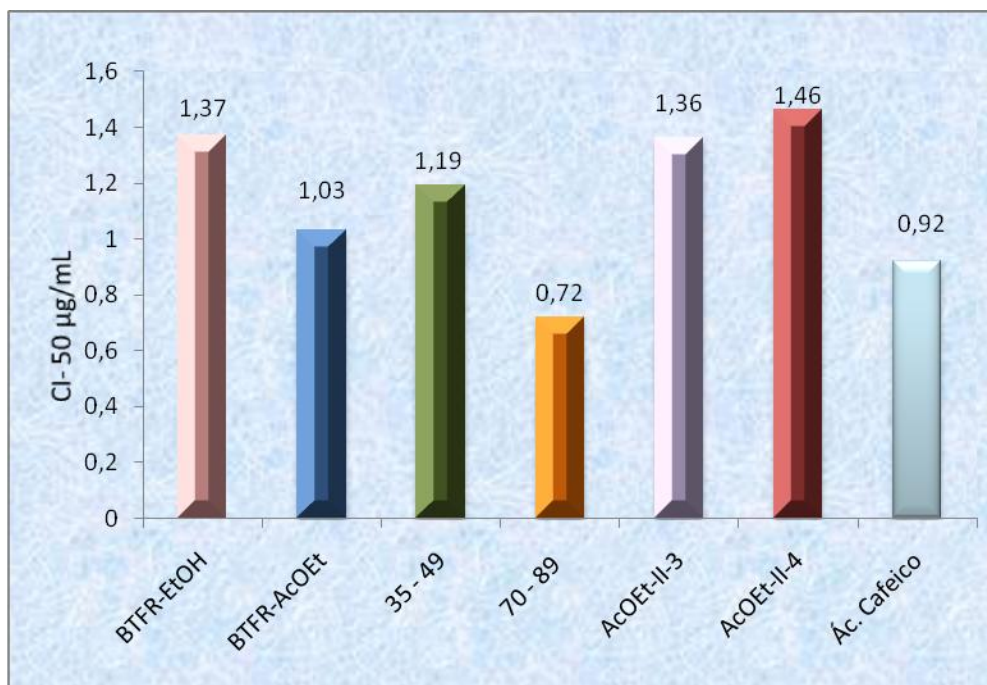


Figura 35 – Valores da CI_{50} para atividade sequestradora de radicais livres do extrato, frações e subfrações de *B. tomentosa*.

➤ Compostos isolados

A mistura de compostos galato de etila e galato de metila (1/2) foi mais eficiente na captação dos radicais livres do que o composto **1** (galato de etila), com CI_{50} em $8,4 \pm 0,13$ µM. Enquanto o composto **1** apresentou CI_{50} $14,3 \pm 0,46$ µM, a mistura dos dois compostos foi mais eficiente que o padrão ácido caféico ($11,7 \pm 0,18$ µM). A mistura dos dois compostos fenólicos aumentou a capacidade receptora de radicais livres tornando a mistura mais eficiente que o composto isolado.

Os resultados indicam que os dois compostos, galato de etila (**1**) e galato de metila (**2**), são antioxidantes, o que é coerente com a literatura (CERUKS *et al.*, 2007), que registra a ação antioxidante dos dois compostos isoladamente.

Os dados apresentados na tabela 16 mostram que os compostos **3**, **4** e **5** também têm ação anti-radicalar. A CI_{50} dos compostos **4** e **5** são inferiores a do padrão, destacando o **4**

(Corilagina) onde a CI_{50} foi $1,72 \pm 0,09$, e revelando que este composto possui maior capacidade de sequestrar radical livre nos ensaios com DPPH.

Tabela 16 – Atividade anti-radicalar dos compostos **3**, **4** e **5** isolados de *B.tomentosa* e do ácido cafeico (μM) em relação ao DPPH.

Compostos isolados		CI_{50} (μM)
	3	$17,1 \pm 0,24$
	4	$1,72 \pm 0,09$
	5	$10,4 \pm 0,24$
Padrão	Ácido cafeico	$13,1 \pm 0,21$

A atividade antioxidante do composto **3** (ácido gálico) já foi registrada na literatura sendo inclusive usado como padrão na avaliação de testes antioxidantes (SOUZA *et al.*, 2007). A presença de hidroxila fenólica garante a este composto o bom desempenho nos testes para avaliação anti-radicalar com DPPH.

A corilagina (**4**) apresentou resultado mais significativo que o padrão (Figura 36) onde a porcentagem de DPPH sequestrado foi elevada mesmo nas concentrações mais baixas. KINOSHITA *et al.* (2007) identificaram a corilagina como um dos principais antioxidante de *Terminalia catappa* (Combretaceae) e citam também a ação hepatoprotetora deste composto. Os compostos **1**, **3** e **4** foram avaliados quanto à atividade sequestradora de radical (ZHENG *et al.*, 2009) e os resultados confirmam a ação antioxidante destes compostos.

O composto **5** (buchenavina) foi isolado da fração 70 – 89 e exibiu excelente atividade anti-radicalar, assim como a fração da qual foi purificado. Os compostos **4** e **5** mostraram porcentagem de DPPH sequestrado superior ao padrão em todas as concentrações (Figura 36), evidenciando a capacidade sequestradora de radical destes compostos. Este é o primeiro relato do composto **5** na literatura.

A mistura dos compostos **6** e **7** (pinoresinol/epipinoresinol) foi inativa quanto à ação sequestradora de radicais livres.

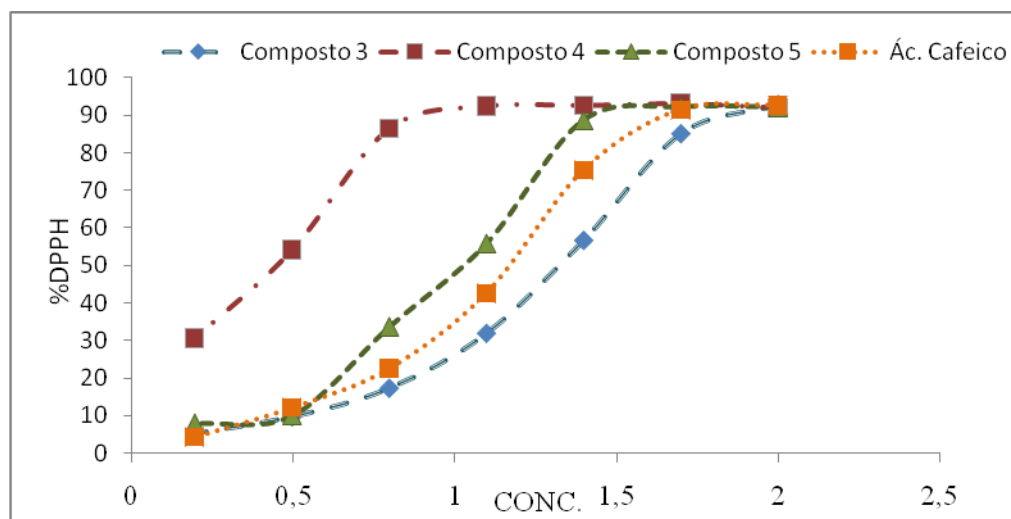


Figura 36 – Curva da % de DPPH sequestrada pelos compostos **3**, **4** e **5** e do ácido cafeico

Comparando os valores de CI_{50} (Figura 37) observa-se que os valores dos compostos **3**, **4** e **5** variaram de 0,68 a 1,23 (μM) em ordem decrescente de ação anti-radicalar, temos **4** > **5** > **3**, ou seja, os taninos hidrolisáveis **4** e **5** apresentaram melhor capacidade de sequestrar radical livre que o ácido gálico (**3**) e o padrão.

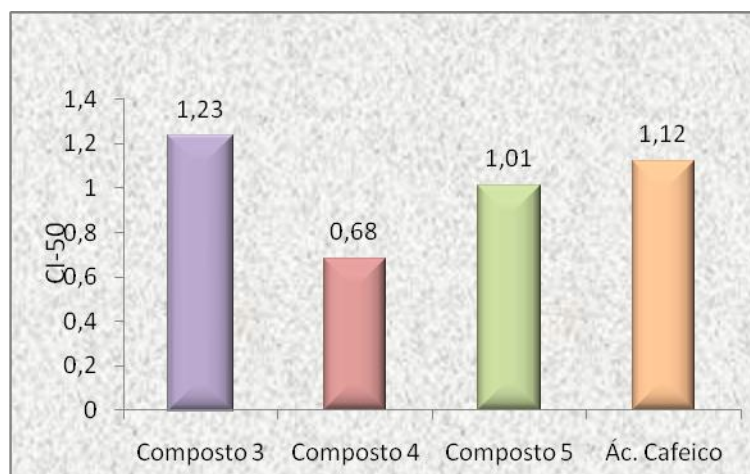


Figura 37 – Resultado da CI_{50} dos compostos **3**, **4** e **5** e do ácido cafeico

Comparando-se a atividade dos compostos isolados com os das frações dos quais foram obtidos, os resultados foram coerentes. Os compostos **3** e **4** obtidos puros no fracionamento da fração AcOEt, foram mais ativos que o **1** presente na subfração AcOEt-II-4 e **1** e **2** isolados da subfração 35 – 49, que foi menos ativa que a AcOEt.

Entre os compostos presentes nas subfrações, o que apresentou melhor atividade anti-radicalar foi o composto **5**, isolado da subfração 70-89, que apresentou melhor índice de CI_{50} (0,72 $\mu\text{g/mL}$), enquanto que os compostos **6** e **7** não foi ativo, e foi isolado da fração ACOEt-II-3 que mostrou valor de CI_{50} elevado em 1,36 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35).

Os vegetais são fontes de antioxidantes naturais como tocoferóis, vitamina C, carotenoides e compostos fenólicos. A maioria dos compostos antioxidantes possui uma base molecular semelhante, ou seja, pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os ácidos fenólicos, flavonoides e isoflavonoides, ésteres de galato, taninos hidrolisáveis, etc. (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

Compostos antioxidantes protegem o sistema biológico do efeito nocivo de radicais livres, que podem causar oxidação das células fisiológicas. Alimentos ricos em compostos antioxidantes podem inibir, prevenir ou retardar a deterioração pela oxidação, atuando na redução dos radicais livres.

Os frutos de *B. tomentosa* são consumidos pela população pantaneira, e este estudo permitiu sugerir os benefícios desta fruta para a saúde desta população, tendo em vista sua atividade anti-radicalar. Este constitui o primeiro relato da composição química e ação biológica dos frutos desta espécie.

5.2 *Ouratea spectabilis*

5.2.1 Compostos Isolados

O fracionamento do extrato etanólico dos frutos de *O. spectabilis* conduziu ao isolamento de 16 substâncias pertencentes a cinco classes diferentes de compostos: flavonoides, lignanas, butanolídeos, terpenos e cumarinas.

➤ Flavonoides

Os flavonoides são um dos mais diversos e difundidos grupos de produtos naturais, ocupando proeminente posição entre os fenóis naturais (AGRAWAL; MARKHAM, 1989). Esta classe é dividida em subclasses e uma delas é a dos biflavonoides na qual estão incluídos cinco compostos isolados dos frutos de *O. spectabilis*.

Os biflavonoides ocorrem naturalmente e caracterizam-se pela ligação carbono-carbono ou carbono-oxigênio-carbono entre unidades de flavonoides.

Estas ligações podem existir entre duas unidades de flavanonas, flavonas ou isoflavonas, ou entre unidades diferentes: flavanona e flavona; flavonol e flavanonol, isoflavona e flavona. São poucas as combinações encontradas na natureza: I6- II6; I6-II8; I3-II6; I3'-II8; I8-II8; I3-II8; I6'-II8; I5'-II5 e I3-II3 (AGRAWAL; BANSAL, 1989).

As espécies da família Ochnaceae são capazes de biossintetizar flavonoides e biflavonoides, sendo os gêneros mais representativos *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira*. A frequência e diversidade estrutural dos biflavonoides em espécies desses gêneros permitem que sejam utilizados como marcadores taxonômicos (SUZART; DANIEL; DE CARVALHO, 2007).

O biflavonoide lophirona A é comum nos gêneros *Lophira* e *Ochna*, e os biflavonoides semelhantes a amentoflavona aparecem normalmente como marcadores taxonômicos de *Ouratea* (ZINTCHEM *et al.*, 2007). Neste gênero também foi isolado lophirona A (MBING *et al.*, 2003b), enquanto a ochnaflavona já foi isolada de *Ouratea* e *Ochna* (ZINTCHEM *et al.*, 2007), e das folhas de *Cespedesia* (LOBSTEIN *et al.*, 2004).

Naturalmente, os biflavonoides possuem como substituintes grupos de hidroxilas/metoxilas em diferentes posições, e por esta razão, teoricamente podem existir numerosos biflavonoides. Contudo, plantas que contêm biflavonoides como constituinte majoritário não são muito comuns, sendo os biflavonoides encontrados em poucas espécies. Estes compostos possuem uma grande diversidade de atividade biológica: anticancer, antiviral, inclusive anti-HIV; anti-inflamatória e analgésica (KIM *et al.*, 2008).

O gênero *Ouratea* tem tendência de metabolizar com mais frequência os dímeros de flavonas, e a ligação mais abundante entre seus monômeros são: I3-II8 e I6-II8 apresentando uma variação no padrão de metilação (SUZART; DANIEL; DE CARVALHO, 2007).

De acordo com os dados obtidos nos espectros de RMN, os biflavonoides isolados de *O. spectabilis* são dímeros de flavona e a ligação entre seus monômeros foi de três tipos; I3-II8, I6 -II6 e I6-II8.

Os compostos **8** a **12** foram isolados da fração diclorometânica, todos da subfração OSFR-18 e o **22** da fração acetato de etila.

Composto 8 - 7''metil - agastiflavona

A sub-fração 37– 49 apresentou-se como um pó amarelo inodoro. O espectro de RMN de ^1H (Tabela 17, Figura 39) apresentou sinais típicos de biflavonoides: quatro singletos em 6,55 δ ; 6,65 δ ; 6,69 δ e 6,78 δ , quatro dubletos em 6,80 δ (1H, $J=9,0$); 7,01 δ (1H, $J=9,0$); 7,61 δ (1H, $J=9,0$) e 7,95 δ (1H, $J=9,0$), que correspondem ao sistema AA'BB' e um singlete em 3,85 δ indicando a presença de uma metoxila.

O composto é constituído por 31 carbonos, conforme observado no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 17, Figura 40). Os sinais em 116,87 δ (I-3' e 5'), 129,14 δ (I-2' e 6'), 116,74 δ (II-3' e 5'), 129,02 δ (II-2' e 6') correspondem a carbonos do anel B para-dissubstituído, enquanto o sinal em 165,12 δ foi atribuído a C₂ da unidade I e o 165,52 δ ao C₂ da unidade II.

Com base no experimento HSQC (Figura 41) foi possível correlacionar os sinais em 103,62 δ e 103,26 δ (I-3, II-3) com os sinais de hidrogênios em 6,69 δ e 6,65 δ respectivamente, o C₈ (94,40 δ) com o H₈ e (6,78 δ) de C₆ (95,99 δ) com H₆ (6,55 δ), e o da metila em 3,85 δ com o sinal em 56,65 δ , estas e as outras correlações observadas são mostradas na tabela 17.

No experimento HMBC foram observadas as correlações entre o sinal de C₂ (165,12 δ) e C₄ (183,11 δ) com o de H₃ (6,65 δ); C₅ (162,97 δ), C₈ (101,35 δ e C₉ (155,42 δ) com H₆ (6,55 δ) e C₇ (164,72 δ) com H₆ (6,55 δ) e a metoxila (3,85 δ). A metoxila foi observada apenas na unidade II. As outras correlações observadas neste espectro estão registradas na tabela 17. Os dados apresentados pelos espectros uni e bidimensionais confirmam tratar-se de um biflavonoide formado por dímeros de flavona com ligação do tipo C₆→C₈, com fórmula molecular C₃₁H₂₀O₁₀.

O espectro de massa apresentou pico molecular $m/z = 551$ que corresponde a $[\text{M}^+ - \text{H}]^-$, o peso molecular calculado é $m/z = 552,1026$. No espectro de infravermelho as bandas que se destacaram foram 3411 cm^{-1} de OH, em 2923 cm^{-1} , estiramento C-H, em 1647 cm^{-1} , de carbonila, e a banda de C=C de aromático em 1600 cm^{-1} .

Todos os dados foram comparados com a literatura (MOREIRA *et al.*, 1999), assim o composto 8 foi identificado como 7'' metil-agastiflavona . Esta substância já foi isolada das folhas de *O. hexasperma* (DANIEL *et al.*, 2005) e ramos e folhas de *O. microdonta* (DE CARVALHO *et al* 2008).

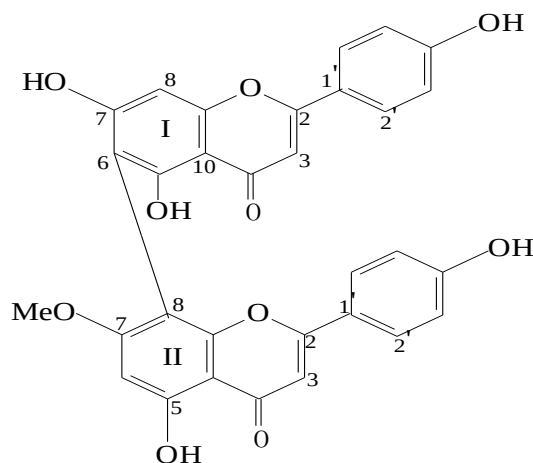


Figura 38 – Estrutura química do composto **8** (7'' metil- agastiflavona)

Tabela 17- Dados de RMN ^1H e de ^{13}C e HMBC de 7'' metil-agastiflavona (**8**) (Acetona- d_6) .

	I			II		
	$^1\text{H}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$	HMBC	$^1\text{H}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$	HMBC
2		165,12	H ₃		165,52	H ₃
3	6,69	103,62		6,65	103,26	
4		183,11	H ₃		183,64	H ₃
5		160,93			162,97	H ₆
6		104,29	H ₃ ;H ₈	6,55	95,99	
7		164,05	H ₈		164,72	H ₆ ; OCH ₃
8	6,78	94,40			101,35	H ₆
9		158,20	H ₈		155,42	H ₆
10		104,58	H ₃ ; H ₈		105,38	H ₃ ; H ₆
1'		122,62			122,67	
2'	7,91	129,14		7,51	129,02	H ₆ '
3'	6,76	116,87		6,80	116,74	
4'		162,24	H ₂ '/H ₆ ' H ₃ '/H ₅ '		162,35	H ₂ '/H ₆ ' H ₃ '/H ₅ '
5'	6,76	116,87		6,80	116,74	
6'	7,91	129,14	H ₂ '	7,51	129,02	
-	-	-		3,85	56,65	

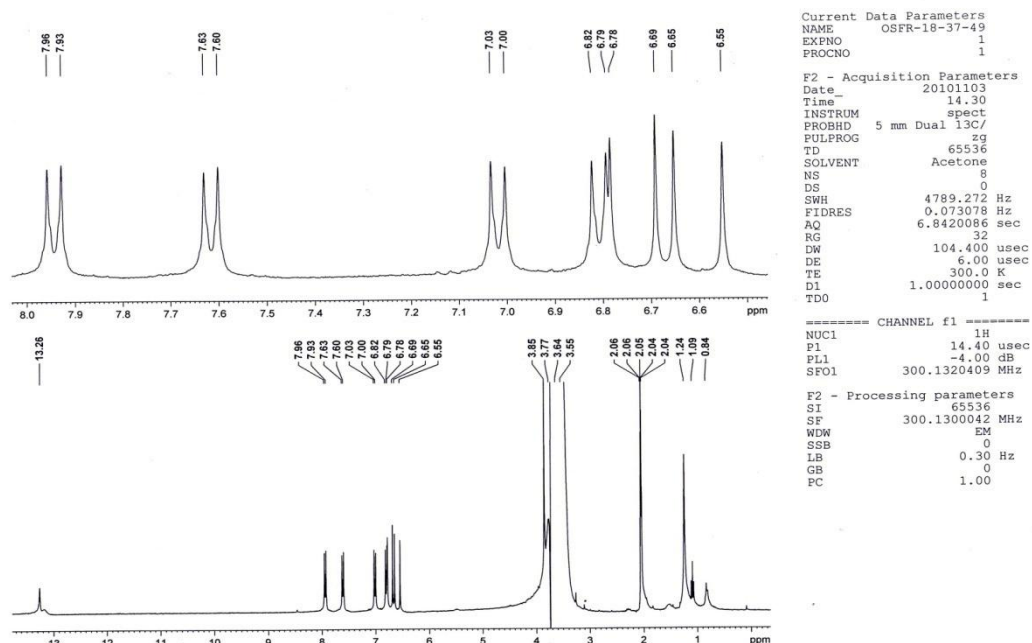


Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de 7'' metil-agastiflavona (**8**) (300) MHz, Acetona- d_6 , TMS $\delta=0$).

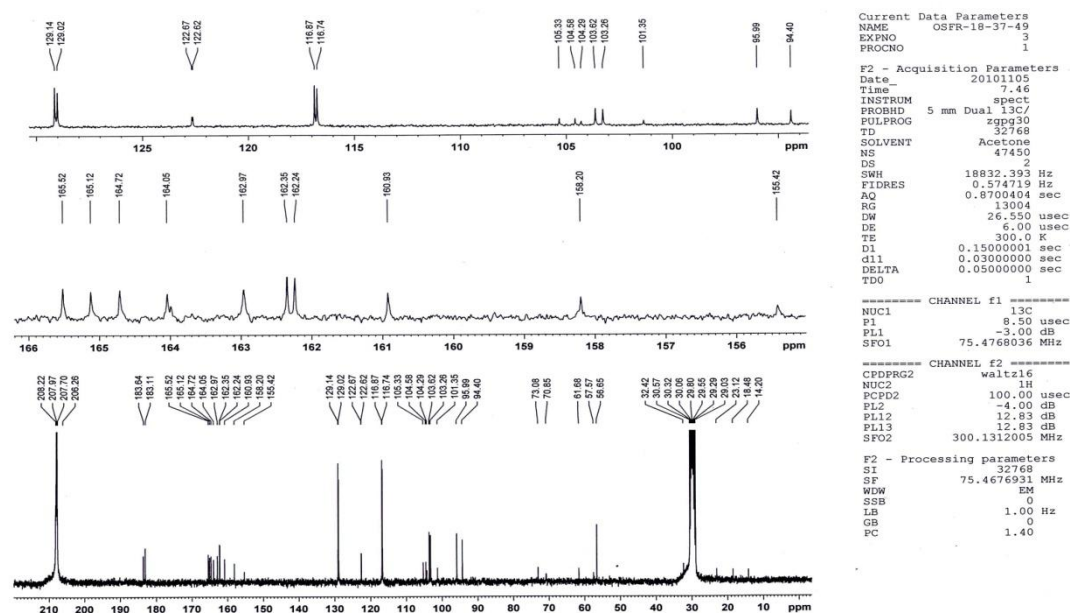


Figura 40- Espectro de RMN de ^{13}C de 7'' metil- agastiflavona (**8**) (75 MHz, Acetona- d_6 , TMS $\delta=0$).

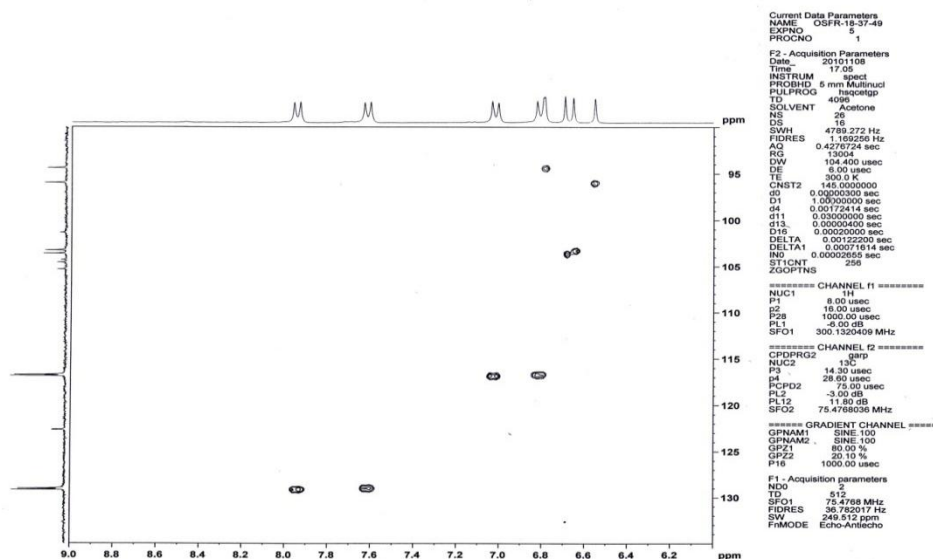


Figura 41-Experimento HSQC – ampliação da região de carbonos e hidrogênios olefínicos e aromáticos de 7'' metil-agastiflavona (**8**) (75 MHz, Acetona- d_6 , TMS $\delta=0$).

Composto **9** - 6,6' bigenkanina

O composto **9** presente na subfração 62-112 foi identificado com base nos dados dos espectros de RMN de ^1H de ^{13}C (1D e 2D) (Tabela 18). No espectro de RMN de ^1H (Figura 43) de **9** destacam-se os seguintes sinais: dois singletos largos (1 H cada) em 6,54 δ e 6,56 δ e quatro dupletos em 6,72 δ (1H, $J=9,0\text{Hz}$), 6,92 δ (1H, $J=9,0\text{Hz}$), 7,53 δ (1H, $J=9,0\text{Hz}$) e 7,83 δ (1H, $J=9,0\text{Hz}$) correspondentes a hidrogênios de anéis aromáticos e um singlete em 3,86 δ correspondente às metoxilas.

No espectro de RMN ^{13}C (Figura 44, Tabela 18), quatro sinais estão com intensidade duplicada (162,80 δ , 160,53 δ ; 103,74 δ , 122,85 δ), e são correspondentes aos carbonos C_2 , C_5 , C_6 e $\text{C}_{1'}$ das unidades I e II. Os carbonos em 129,19 δ (C_2' , C_6'); 117,00 (C_3' , C_5') da unidade I e 129,25 δ (C_2' , C_6'); 117,15 δ (C_3' , C_5') da unidade II, são característicos de anel monossustituído. As correlações no experimento HSQC mostraram que os carbonos 95,6 δ e 96,1 δ têm coincidência nos valores de seus hidrogênios (6,54 δ), e na ampliação deste espectro observou-se que o hidrogênio 6,56 δ corresponde aos hidrogênios dos carbonos 103,00 δ e 103,20 δ , o que justifica o singlete largo.

As informações indicam que o composto **9** diferencia-se do composto **8** e tais características foram observadas no HMBC (Tabela 18) onde o C_6 correlaciona com H_8 nas duas unidades, e no composto **8** esta correlação a com H_8 na unidade II.

As bandas no infravermelho que corroboram com a estrutura são: 3421 cm^{-1} , do grupo hidroxila, 2921 cm^{-1} , de estiramento C-H, em 1650 cm^{-1} , da carbonila do C₄, e das ligações entre carbonos dos anéis aromáticos, em 1594 cm^{-1} .

Este conjunto de informações corresponde ao biflavonoide com fórmula estrutural C₃₂H₂₂O₁₀. A proposta para o composto **9** foi definida como pertencente à subclasse biflavona com combinação I6-II6, (Figura 42). Este composto já foi isolado das folhas de *O. spectabilis* (VALADARES *et al.*, 2003) e é conhecido como 6,6' bigenkanina.

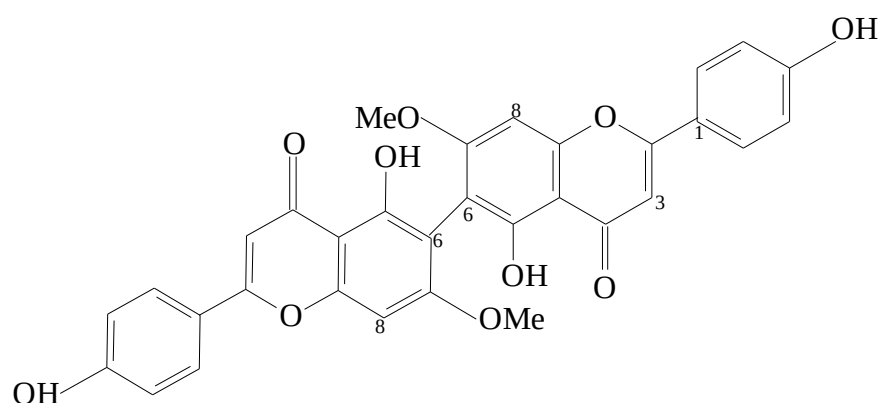


Figura 42 – Estrutura da 6,6' bigenkanina (**9**).

Tabela 18 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de 6,6'bigenkanina (**9**) (Metanol- d_4) .

I			II		
$^1\text{H}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$	HMBC	$^1\text{H}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$	HMBC
2	162,81	H ₃		162,80	H ₃
3	6,56	103,00	6,56	103,23	
4	183,23			184,41	
5	160,53			160,53	
6	103,74	H ₈		103,74	H ₈
7	165,23	H ₈ , OCH ₃		165,58	H ₈ , OCH ₃
8	6,54	96,27	6,54	95,68	H ₆
9	159,08			156,02	
10	105,78			105,78	H ₃
1'	122,85	H _{3'} , H _{5'}		122,85	H _{3'} , H _{5'}
2'	7,53	129,19	7,83	129,25	
3'	6,72	117,00	6,92	117,15	
4'	163,12	H _{2'} /H _{6'}		163,12	H _{6'} /H _{2'}
5'	6,72	117,00	6,92	117,15	
6'	7,53	129,19	7,83	129,25	
OCH ₃	3,86	56,66	3,86	56,66	

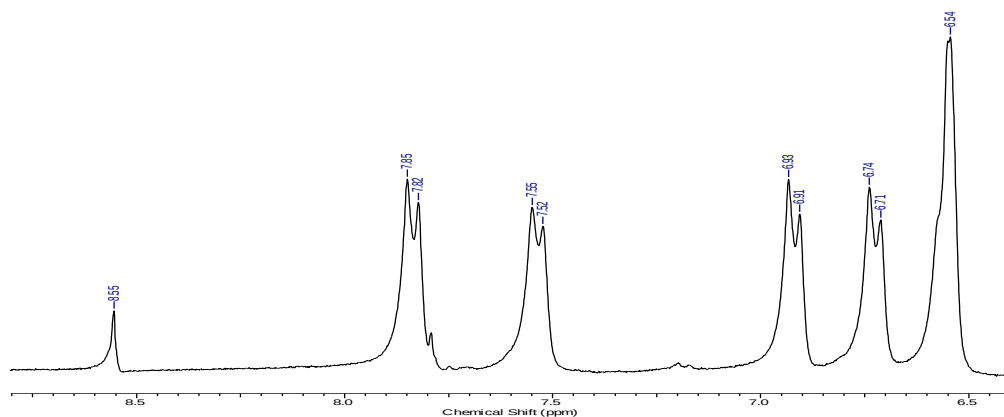


Figura 43- Espectro de RMN ^1H - Expansão na faixa dos ^1H aromáticos e o olefínico do composto **9** (6,6' bigenkanina) (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$)

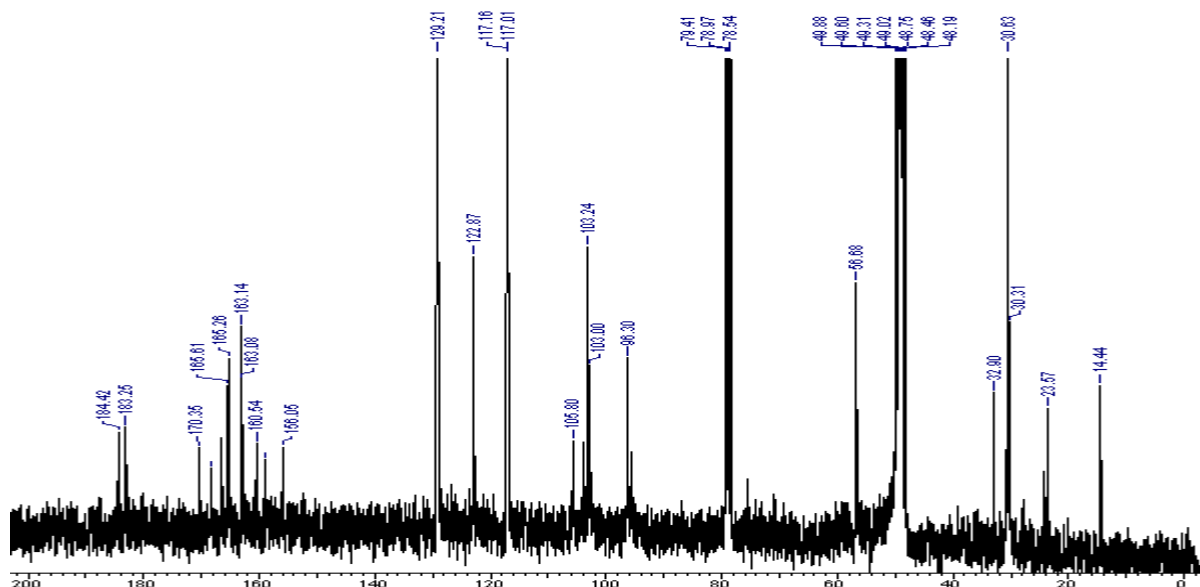


Figura 44 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **9** (6,6' bigenkanina), (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

Composto **10** -7,7' dimetilavolkessiflavona

Nas frações 113-149 isolou-se o composto **10** que apresentou-se como pó amarelo e inodoro. No espectro de RMN de ^1H (Tabela 19, Figura 46) foram observados sinais majoritários sugestivos de biflavonoides. A Comparação dos dados de RMN ^1H do composto **10** com os dos compostos **8** e **9** revelou que tratava-se também de um biflavonoide. Os quatro dupletos de hidrogênio de anel aromático em 6,55 δ ; 6,77 δ ; 7,49 δ ; 7,75 δ , apresentaram o mesmo valor de constante de acoplamento ($J=9,0\text{Hz}$).

Os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (Tabela 19, Figura 47) são vinte e sete, onde apenas cinco são duplicados. Estes correspondem aos mesmos carbonos nas duas unidades: C_5 (162,34 δ); C_6 (101,47 δ); C_7 (165,46 δ); C_4 (160,11 δ) e a da metoxila (56,25 δ). A não coincidência dos sinais, como por exemplo, os referentes aos carbonos de carbonila (184,60 δ – C_4I e 182,32 δ – C_4II), sugere que as duas unidades não se ligam de maneira simétrica.

Com as informações do experimento HSQC (Figura 48) foi possível correlacionar os hidrogênios em 6,39 δ ; 6,48 δ e 6,51 δ com os carbonos 101,47 δ_{C} , 101,32 δ_{C} e 96,22 δ_{C} , respectivamente, indicando que o C_8 (97,51 δ_{C}) não se encontra ligado a hidrogênio.

A estrutura química do composto **10** foi definida comparando-se os dados de RMN de ^{13}C deste composto com os dados de compostos constituídos de unidades semelhantes com ligações I6-II8 e I3-II8 e que se diferem apenas pela ausência de metoxila (AGRAWAL; BANSAL, 1989). A diferença entre os dois tipos de ligação reflete nos carbonos C_3 e C_6 .

O deslocamento químico do carbono C_3 -I, na combinação I3-II8 está em torno de 110,1δ e é um carbono tetrasubstituído, enquanto na I6-II8 este é um carbono metínico, cujo valor é 103,1δ, aproximadamente. Quanto aos carbonos C_6 em I3-II8, tem praticamente o mesmo valor nas duas unidades, variando de 99 a 100δ e ambos referem-se a CH. Na combinação I6-II8 os valores do carbono C_6 são diferentes, na unidade I é 103,6δ (C), na II 98,9δ (CH).

No espectro de carbono RMN de ^{13}C do composto **10**, o sinal 107,24δ (C) foi atribuído ao C_3 -I e o sinal em 101,47δ (CH) foi atribuído a C_6 nas duas unidades I e II. Diante do que foi exposto anteriormente, o composto **10** possui a ligação entre as unidades I e II do tipo I3-II8. Outra evidência são os deslocamentos químicos de C_{10} nas unidades I e II, 104,72δ e 105,80δ, respectivamente, que são compatíveis com o deslocamento de C_{10} na combinação I3-II8.

Outra diferença refletida pelo tipo de ligação entre as unidades é a correlação entre a carbonila com H_3 . Na ligação I6-II8 a carbonila C_4 correlaciona-se com H_3 nas duas unidades, enquanto na ligação I3-II8, a carbonila só se relaciona com H_3 da unidade I. Os dados obtidos do experimento HMBC (Tabela 19) do composto **10** mostram as correlações entre: C_4 -I (184,60δ) e H_8 -II (6,51δ); C_4 -II (182,49δ) e H_3 -II (6,48δ), indicando que a ligação entre as flavonas realmente ocorre no C_3 -I e o C_8 -II.

Deste modo, a substância **10** foi identificada como uma biflavona com combinação I3-II8 e fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ [5,5'-dihydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)-7,7'-dimethoxy-4*H*,4'*H*-3,8'-bichromene-4,4'-dione (7,7 dimetila-volkesiflavona)].

O peso molecular calculado foi $m/z = 566$, e no espectro de massas foi registrado o pico molecular a m/z 551, correspondente a perda de 15uma (CH_3) (figura 49). No espectro de IV foram observadas bandas que estão de acordo com a proposta estrutural do composto: em 3520 cm^{-1} (OH); 1614 (C=C, olefinico); 1406 (C=C, aromático) e 1198 (C-O).

A proposta para o composto **10** (Figura 45) difere da estrutura já existente na literatura (AGRAWAL; BANSAL, 1989) pela presença da metoxila no carbono C_7 (I e II), não sendo encontrada nenhuma substância com estas características, sendo, portanto, uma substância inédita.

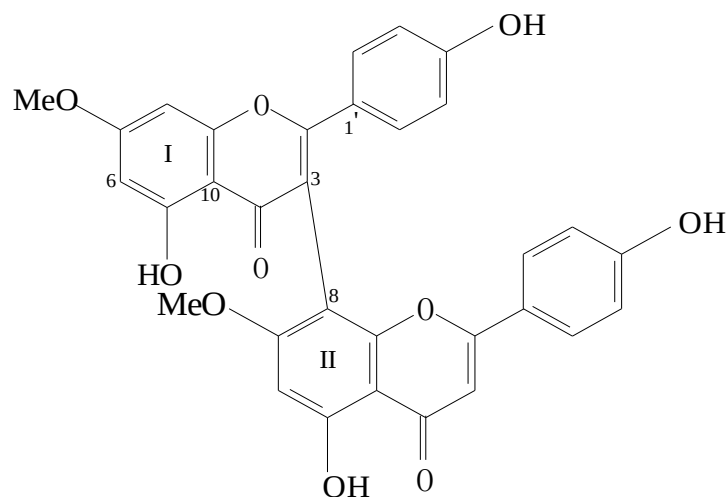


Figura 45 – Proposta estrutural para o composto **10** - 7,7'-dimetilavolkesiflavona .

Tabela 19- Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 7,7'-dimetilavolkesiflavona (**10**) e correlações observadas no experimento HMBC (Metanol- d_4).

		I		II	
	$^1\text{H}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$	HMBC	$^{13}\text{C}(\delta)$	HMBC
2		167,75	H ₈ , H ₂ '/H ₆ '	165,68	OCH ₃ /H ₂ '/H ₆ '
3		107,24		101,32	H ₆
4		184,60	H ₈	182,32	H ₃
5		162,34	H ₈	162,34	
6	6,39	101,47		101,47	H ₂
7		165,45		165,68	H ₆
8	6,51	96,22		97,51	H ₃
9		159,84	H ₈	156,31	
10		105,80		104,72	H ₃
1'		120,37	H ₃ , H ₅ '	120,37	H ₃ , H ₅ '
2'	7,49	129,62		129,07	
3'	6,77	118,92		118,87	H ₃
4'		160,11	H ₂ '/H ₆ '	160,11	
5'	6,77	118,92		118,87	
6'	7,49	129,62	H ₂	129,07	
OCH ₃	3,85	56,25		56,25	

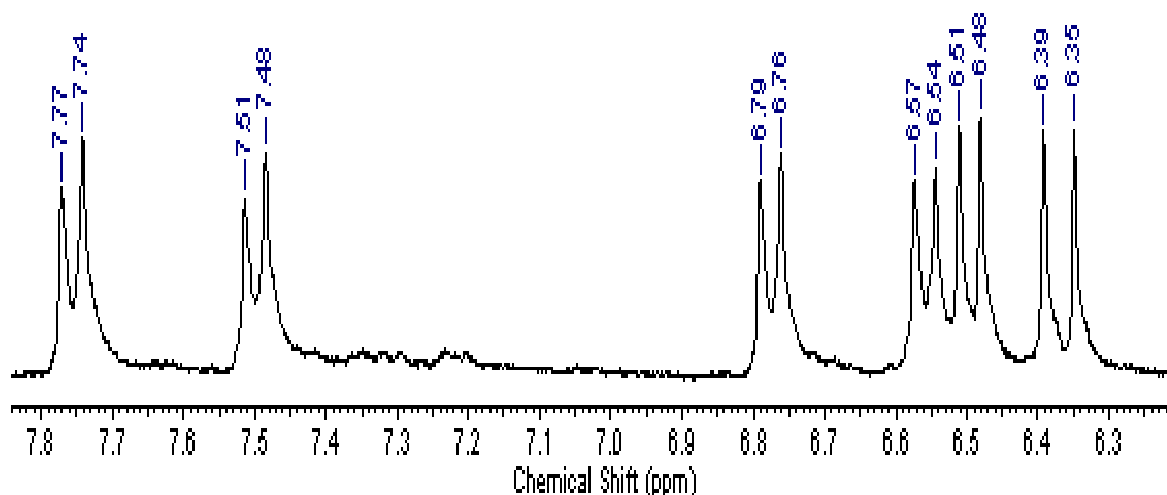


Figura 46– Expansão do espectro de RMN ^1H , região de sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos e olefínicos, de 7,7'-dimetilavolkensiflavona (**10**), (300 MHz, Metanol- d_4 TMS $\delta=0$).

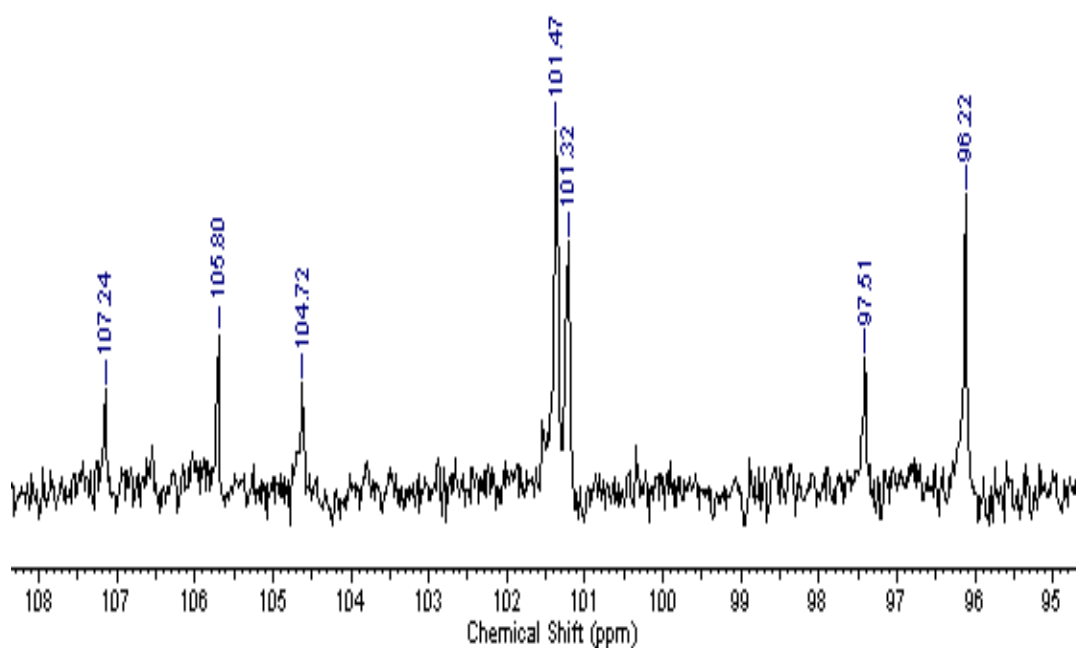


Figura 47- Espectro de RMN ^{13}C - Expansão da faixa de carbonos dos anéis aromáticos e olefínicos, de 7,7'-dimetilavolkensiflavona (**10**), (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

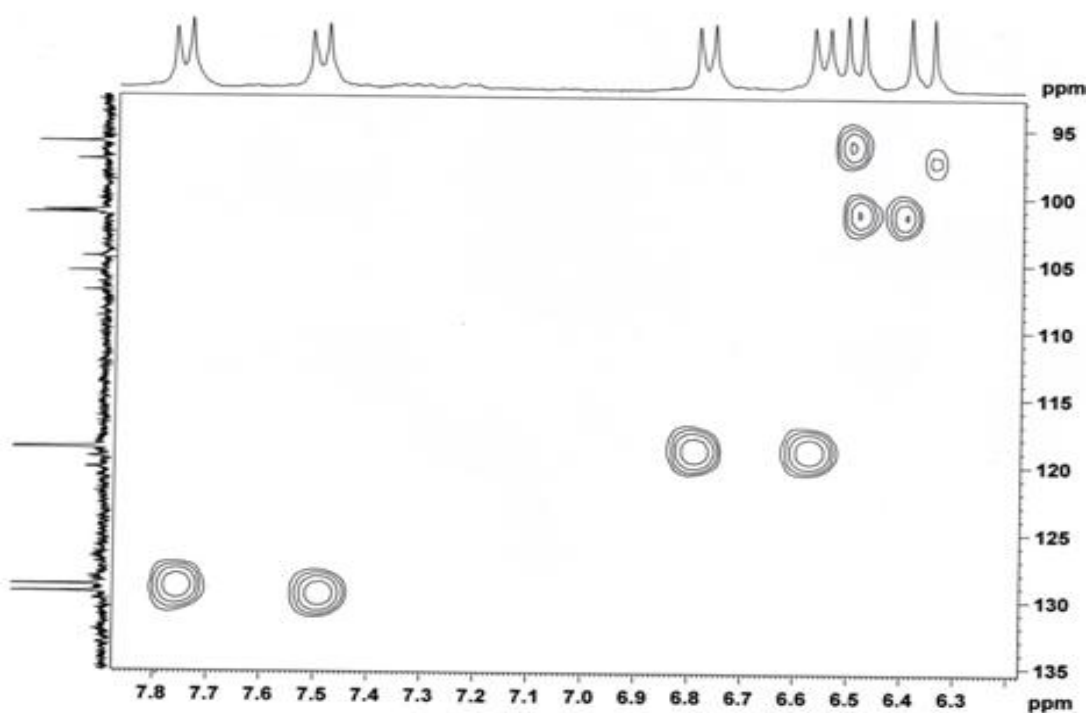


Figura 48- Experimento HSQC - Região de ^{13}C e ^1H aromáticos e olefínicos de 7,7'-dimetilavolkesiflavona (**10**) (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

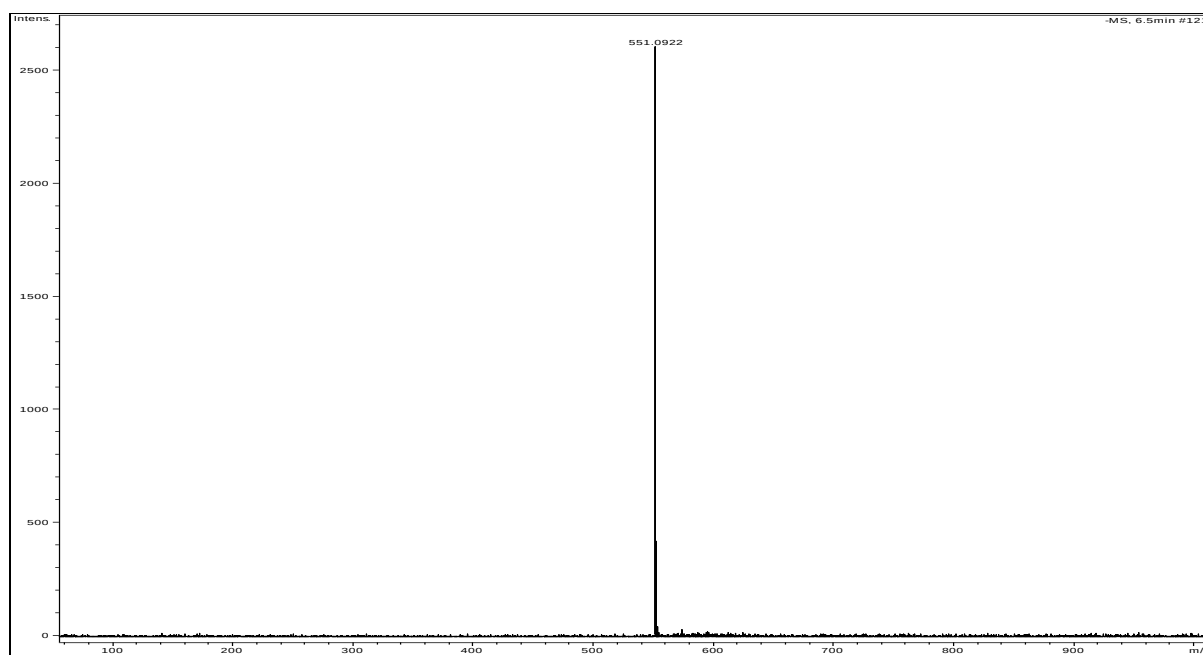


Figura 49 – Espectro de massas de 7,7'-dimetilavolkesiflavona (**10**) (Eletrospray- modo negativo).

Composto **11** - 7,7' dimetoxiagastiflavona

Da subfração 150-189 foi isolado o composto **11**, uma substância sólida e amarela. O espectro de RMN de ^1H (Tabela 20, Figura 51) do composto **11**, apresentou grande semelhança com os biflavonoides discutidos anteriormente, destacando-se quatro singletos na região de 6,39 a 6,50 δ . Ainda neste espectro foram registrados quatro dupletos, 7,55 δ (*d*, 9,0 Hz); 6,84 δ (*d*, 8,0 Hz); 7,78 δ (*d*, 8,0 Hz) e 6,65 δ (*d*, 8,0 Hz). Com auxílio do experimento HSQC (Figura 52) foi possível definir a ligação dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos, conforme mostra a tabela 20.

Observa-se, por exemplo, que o sinal em 102,33 δ se correlaciona com sinais de hidrogênios (6,50 δ_{H} e 6,43 δ_{H}), que o sinal em 6,50 δ_{H} se refere a dois hidrogênios ligados aos carbonos correspondentes aos sinais a 102,33 δ_{C} e 96,30 δ_{C} .

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 20), os oito sinais a seguir referem-se a carbonos de um sistema AA'BB' 105,52 δ ; 95,93 δ ; 129,30 δ ; 117,37 δ ; 96,30 δ , 102,41 δ , 128,87 δ e 117,44 δ .

As correlações observadas no experimento HMBC mostram que as metoxilas se encontram ligadas aos carbonos referentes aos sinais em 164,84 δ (II-C₇) e 165,05 δ (I-C₇). O sinal do hidrogênio H₈-I (6,46 δ) apresenta correlação com C₇-I (165,05 δ) e o de H₃-I(6,50 δ) com C₂-I (166,36 δ). Os sinais dos carbonos das carbonilas 184,05 δ (C₄-I) e 182,14 δ (C₄-II) se correlacionam com os hidrogênios H₃-I (6,50 δ) e H₃-II (6,43 δ) respectivamente. Estes dados permitem propor para o composto **11** a estrutura mostrada na Figura 50, que corresponde a uma biflavona com ligação I6-II8.

O composto **11** é semelhante aos biflavonoides isolados em outras espécies de *Ouratea* (MOREIRA *et al.*, 1999; FELICIO *et al.*, 2001; DE CARVALHO *et al.*, 2006b, 2008a).

Este biflavonoide já foi isolado das folhas de *O. spectabilis* e é conhecido como 7,7' dimetoxiagastiflavona (VALADARES *et al.*, 2003).

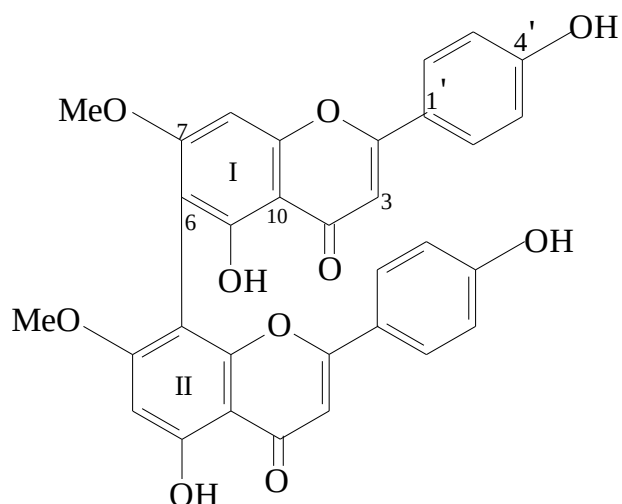


Figura 50- Estrutura de 7,7' dimetoxiagastiflavona (**11**)

Tabela 20- Dados de RMN de ^1H de ^{13}C e correlações observadas no experimento
HMBC de 7,7' dimetoxiagastiflavona (**11**), (Acetona- d_6) (300/75 MHz).

	I		II	
^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC	^1H (δ)	^{13}C (δ)
2	166,36	H ₃ , H ₂ '/H ₆ '		166,36
3	102,33		6,43	102,33
4	184,05	H ₃		182,14
5	162,22			159,16
6	105,52		6,50	96,30
7	165,05	OCH ₃ /H ₈		164,84
8	95,93			102,41
9	155,82			155,82
10	106,04			106,04
1'	121,52			121,86
2'	129,30		7,78 <i>d</i> (J=8,0)	128,87
3'	117,37		6,84 <i>d</i> (J= 8,0)	117,44
4'	164,47			164,54
5'	117,37		6,84 <i>d</i> (J= 9,0)	117,44
6'	129,30		7,78 <i>d</i> (J= 8,0)	128,87
OCH ₃	56,40		3,79	56,40

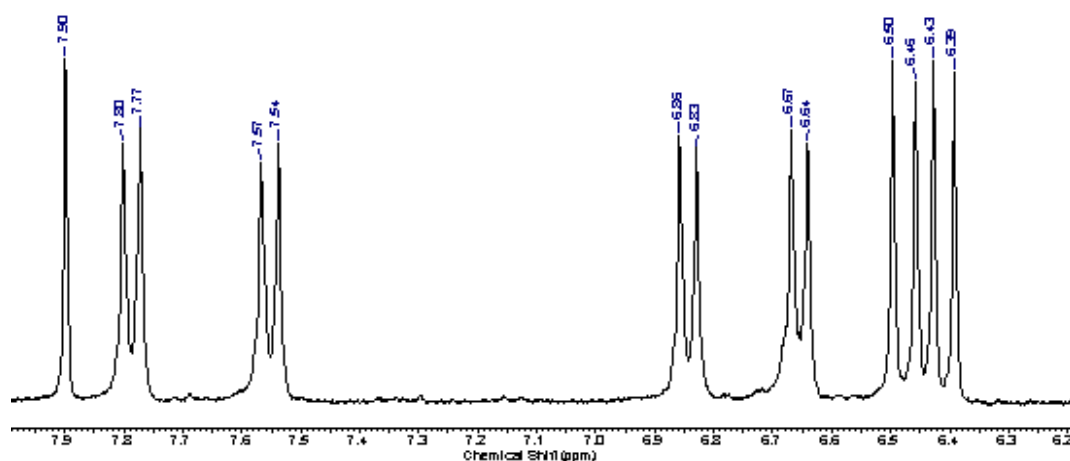


Figura 51- Expansão da região de sinais de hidrogênios aromáticos e olefínicos do espectro de RMN ^1H do composto **11** (7,7' dimetoxiagastiflavona) (300 MHz, Acetona- d_6 , TMS=0)

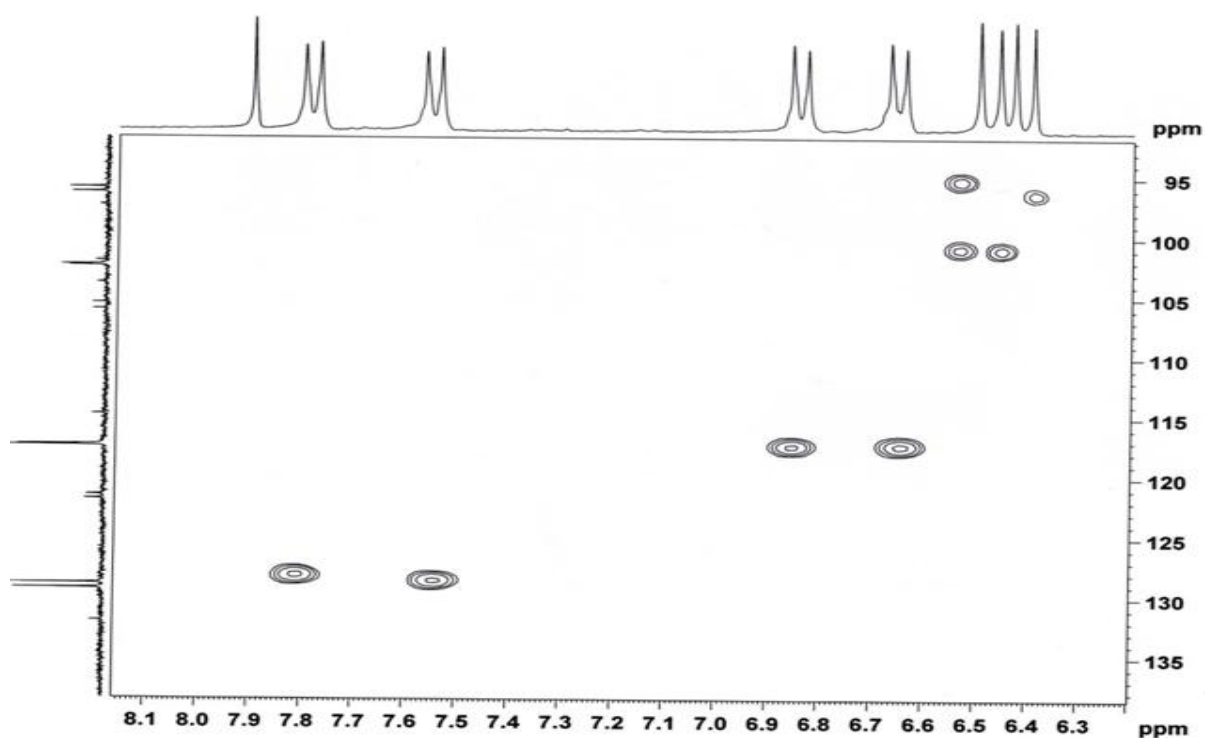


Figura 52- Experimento HSQC - Expansão da região de sinais de hidrogênios e carbonos aromáticos e olefínicos - de 7,7' dimetoxiagastiflavona (**11**) (300/75 MHz, Acetona- d_6 , TMS=0)

Composto 12- 3,8'' biapigenina

Na subfração 224-288 (16,3mg) foi isolado o composto **12**, cujo padrão apresentado nos seus respectivos espectros de RMN ^1H e ^{13}C indicou que tratava-se de um biflavonoide.

No espectro de RMN ^1H (Tabela 21, Figura 54), os dubletos na faixa de 6,53 δ a 7,82 δ correspondem aos hidrogênios 2'e 6', e 3'e 5' do anel B. Pelo experimento HSQC foi possível identificar os prótons dos anéis A e C; os singletos em 6,53 δ ($\text{H}_6\text{-I}$ – $\text{H}_6\text{-II}$) e 6,53 δ ($\text{H}_8\text{-I}$) pertencem ao anel A e sinal em 6,47 ($\text{H}_3\text{-II}$) ao C. Este singlete, em 6,50 δ , apresenta intensidade para dois hidrogênios.

O espectro de RMN de ^{13}C de registrou sinais para vinte e quatro carbonos, sendo que destes, seis são coincidentes nas duas unidades I e II (Tabela 21). A estrutura do composto **12** foi proposta de acordo com informações observadas no experimento HMBC, que mostra as correlações dos carbonos $\text{C}_4\text{-I}$ (183,43 δ) com $\text{H}_6\text{-I}$ (6,53 δ) e o $\text{C}_4\text{-II}$ (184,10 δ) com $\text{H}_3\text{-II}$ (6,50 δ), além de $\text{C}_5\text{-I}$ e $\text{C}_5\text{-II}$ (159, 03; 158,98 δ) com $\text{H}_6\text{-I}$ e $\text{H}_6\text{-II}$ (6,53 δ), respectivamente.

A diferença entre os compostos **10** e **12** é a ausência da metoxila no C_7 . Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com dados da literatura (AGRAWAL; BANSAL, 1989), mostrando boa correlação e que trata-se da biflavona conhecida como 3,8'' biapigenina, com ligação tipo I3-II8. Este composto é comum no gênero *Hypericum* (CAKIR *et al.*, 2003; TATSIS *et al.*, 2007; DEMIRKIRAN *et al.*, 2009).

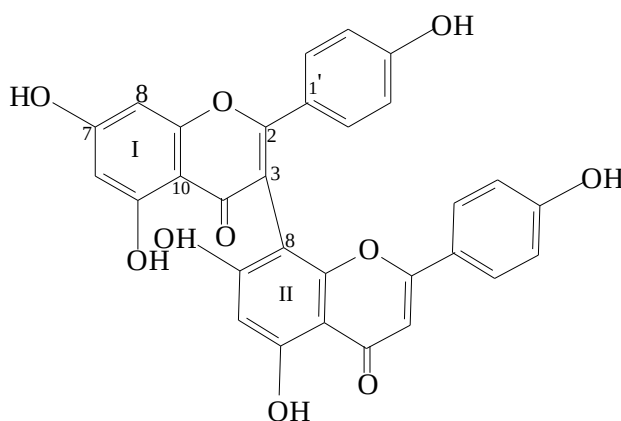


Figura 53- Estrutura de 3,8'' biapigenina (**12**)

Tabela 21-Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de 3,8''biapigenina (**12**) e correlações observadas no experimento HMBC (Metanol- d_4) e dados de RMN ^{13}C da literatura*.

	I			II			I*	II*
	^1H (δ)	^{13}C	HMBC	^1H (δ)	^{13}C	HMBC	^{13}C (δ)	^{13}C (δ)
2		167,42			168,88		165,9	166,9
3		108,87	H ₆	6,50	101,53		112,1	103,9
4		183,43			184,10	H ₃	183,9	182,8
5		159,03	H ₆		158,96		162,7	161,2
6	6,53	101,63		6,53	101,63		100,4	100,5
7		166,53	H ₆		166,59	H ₆	165,9	165,3
8	6,53	97,62			103,23	H ₆	95,1	101,2
9		156,61			156,61		159,6	156,9
10		104,46			104,30		104,7	105,3
1'		120,70			119,83		125,2	123,2
2'	7,54	129,39		7,80	129,33		131,0	129,1
3'	6,61	118,37		6,81	119,00		116,1	117,0
4'		160,33			161,82		163,4	163,1
5'	6,61	118,38		6,81	119,00		116,1	117,0
6'	7,54	129,39		7,80	129,33		131,0	129,1

* AGRAWAL; BANSAL, 1989

Este é o primeiro registro dos composto **12** (Figura 53) em *O. spectabilis*, sendo que esta substância já foi isolada em *O. hexasperma* (SUZART; DANIEL, DE CARVALHO, 2007).

A família Ochnaceae caracteriza-se por ser umas das principais fontes de biflavonoides, sendo representada principalmente pelos gêneros *Ouratea*, *Ochna* e *Lophira* (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

A identificação de biflavonoides em *O. spectabilis* reforça a concepção de que estes compostos são marcadores químicos da família Ochnaceae. O composto **10** esta sendo descritos pela primeira vez. E os compostos **8** e **12** é o primeiro registro em *Ouratea spectabilis*.

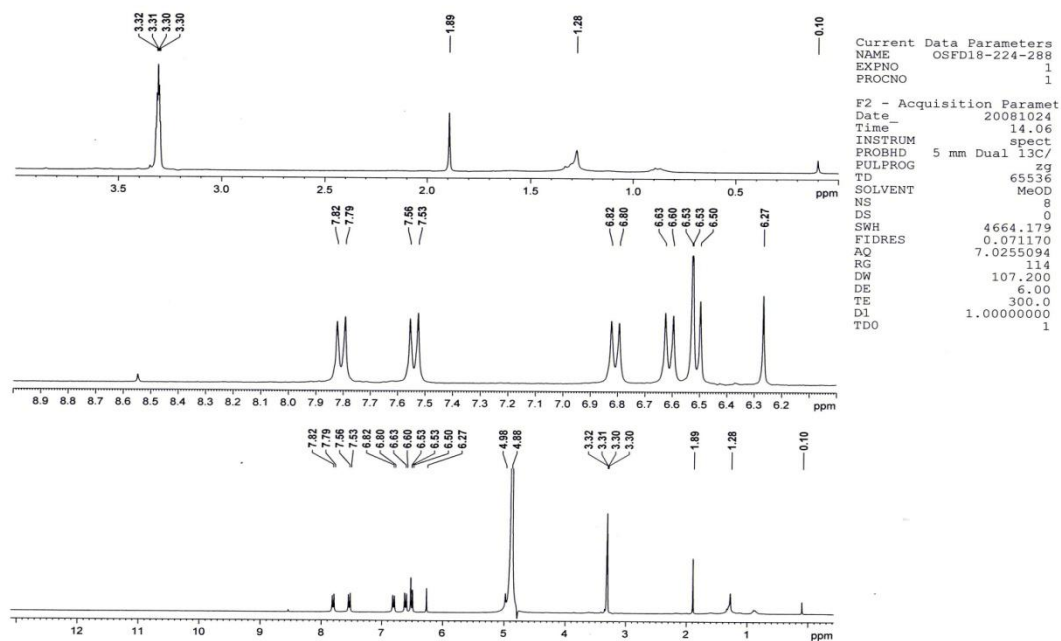


Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H - Expansão do região de hidrogênios aromáticos e olefínicos - de 3,8'' biapigenina (**12**), (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS=0).

Composto **13** e **13A**- 7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina / isômero do pinoresinol

A subfração OSFR-17-199-239 apresentou uma mistura de composto de classes diferentes, uma cumarina (**13**) e uma lignana (**13A**)

A princípio a substância isolada nesta subfração foi identificada como um representante da classe das lignanas tetraidrofurânicas, mas, com o isolamento da substância **23** da fração acetato de etila (a subfração 10-26), comprovou-se tratar de uma mistura. Observou-se que os compostos **13** (contido na subfração OSFR-17-199-239) e **23** são idênticos. Os sinais majoritários no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57) foram atribuídos ao composto **13**, que é igual ao composto **23**, e os minoritários ao composto **13A**, uma lignana. As correlações observadas nos experimentos HSQC e HMBC confirmam tratar-se de uma mistura.

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC (Tabela 22) das duas frações foram comparados e as informações confirmam tratar-se da mesma substância, uma di-hidrocurmarina. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez na literatura e está descrita detalhadamente na elucidação do composto **23** (página 130),

Com esta informação a proposta para o composto **13A** (Figura 56), foi a de um isômero do pinoresinol, com a formação diferente dos anéis furofurânicos. Este composto foi obtido em mistura no processo cromatográfico em sílica 230-400 (Flash), portanto não é resultado de reação química direcionada para a produção de isômeros.

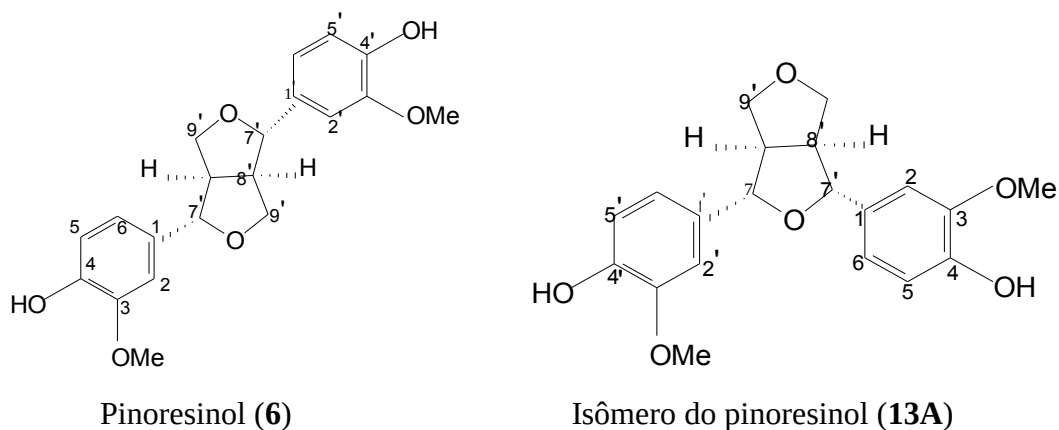


Figura 56 – Estrutura do pinoresinol (**6**) e o seu isômero, composto **13A**.

Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **13A** e correlações observadas no experimento HMBC.

H/C	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
1,1'	6,95	133,77	H ₅ ,H ₆
2,2'		110,97	H ₇
3,3'		149,11	OCH ₃
4,4'		147,29	H ₂ ,H ₅ ,H ₆
5,5'	6,78	116,08	
6,6'	6,80	120,05	
7,7'	4,70	87,50	H ₂ ,H ₆ ,H ₉
8,8'	3,32	55,32	H ₇ ,H ₉
9,9'	3,82	72,60	H ₇
	4,25		
OCH ₃	3,85	56,42	

Os espectros de RMN de ^1H (Figura 57), e de ^{13}C (Figura 58) e DEPT 135° (Figura 59) da mistura dos compostos **13** e **13A** confirmam os dados registrados nas tabelas dos dois compostos.

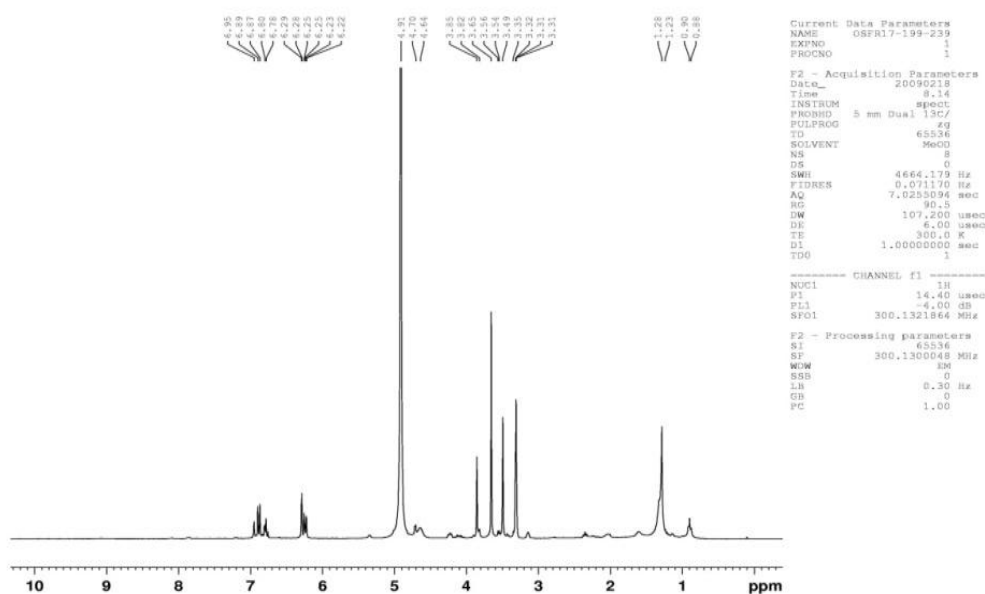


Figura 57 – Espectro de RMN de ^1H dos compostos 7,7' hidróxi-bicumarina (**13**) e **13A** (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

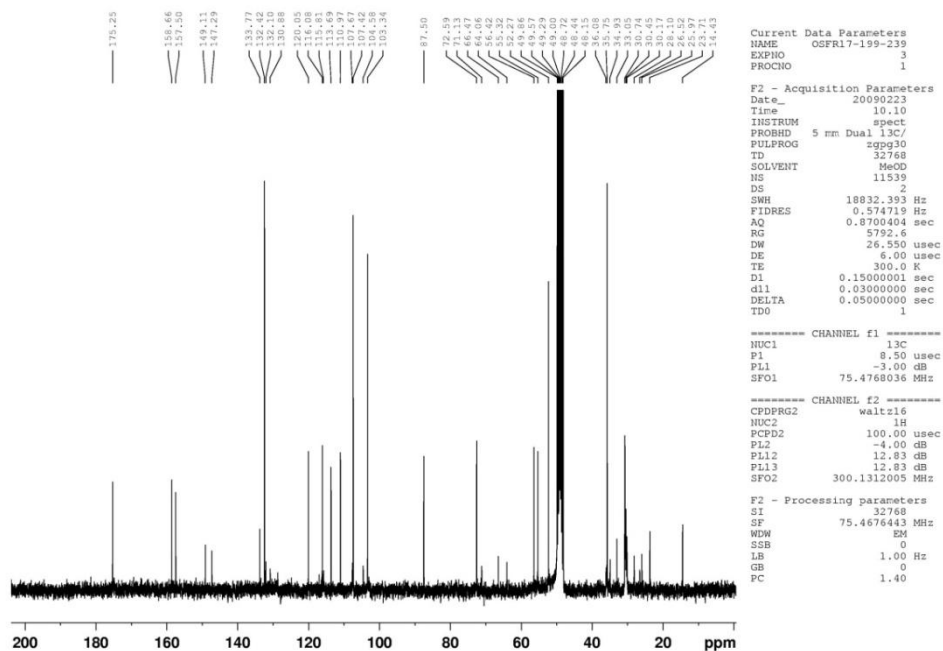


Figura 58- Espectro de RMN de ^{13}C dos compostos 7,7' hidróxi-bicumarina (**13**) e **13A** (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

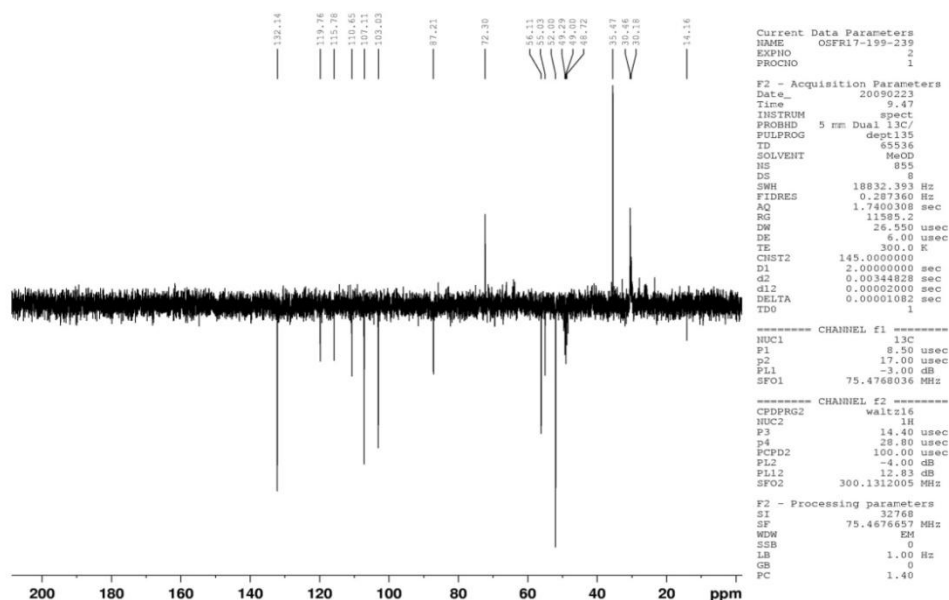


Figura 59- Espectro DEPT-135° dos compostos 7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina (**13**) e **13A** (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$) .

➤ Butanolídeos

Os compostos **14** a **20** pertencem à classe dos butanolídeos, que são substâncias formadas por uma lactona e uma cadeia lateral ligada no carbono 1 e que possuem diversas atividades biológicas (SEKI *et al.*, 1995; KUO *et al.*, 2008).

As diferenças entre as substâncias residem no tamanho da cadeia, na configuração (*cis* ou *trans*), na saturação ou insaturação da cadeia e no substituinte exocíclico, que pode ser metilênico ou metílico. A diversidade estrutural também está relacionada com a configuração dos isômeros. A configuração *R* ou *S* para a hidroxila do carbono 4 é determinada de acordo com o resultado obtido no $[\alpha]_D$, sendo que valores positivos indicam configuração *R* e negativos a configuração *S* (KUO *et al.*, 2008). Compostos com este esqueleto já foram isolados de outras plantas, mas é o primeiro registro na família Ochnaceae. Os dados de RMN indicam que os compostos **14** a **20**, com exceção do **16** são formados por dois carbonos tetrassubstituídos (C-3 e C-5); um carbono carbinólico (C-4); uma carbonila de éster (C-2); dois carbonos exocíclicos, o metilênico (C-6) e o metínico (C-1'), além da cadeia alifática.

Compostos **14** - isochinosídeo A e **15** -isochinosídeo B

Os compostos **14** e **15** foram isolados da subfração OSFR-I da fração diclorometânica de *O. spectabilis* e foram enquadrados nesta classe porque os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C são característicos deste grupo.

Os sinais de RMN de ^1H e de ^{13}C são iguais nas duas estruturas sendo que a diferença está nos números de carbonos metilênicos alifáticos. O espectro de RMN de ^1H (Tabela 24, Figura 61) registrou os seguintes sinais: 0,87 δ (3H, t, $J=6$); 1,23 δ sl e 1,50 – 2,74 δ , correspondentes aos prótons da cadeia alifática; 4,93 e 4,70 δ (dd), atribuídos a hidrogênios olefínicos exocíclicos; 5,24 δ (1H, sl, H-4), hidroximetínico, e o de um hidrogênio de ligação dupla tri-substituída em 7,06 δ (H-1'). Estes deslocamentos são referentes ao esqueleto da lactona β -hidróxi- γ -metilênica- α,β insaturada, com geometria E, pois segundo a literatura os compostos com geometria E apresentam o valor de H-1 em 7,06 δ (KUO *et al.*, 2008).

O espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 24, Figura 62) apresentou onze sinais definidos, incluindo um CH_3 (14,09 δ) e $(\text{CH}_2)_n$ da cadeia alifática (22,67-31,90 δ). Os sinais de RMN ^{13}C que confirmam a configuração *trans* são os carbonos metínicos C-4 (66,44 δ) e C-6 (91,31 δ). O espectro de massas do composto **14** apresentou pico $m/z=391$, correspondente ao $\text{M}^+ - 1$ (Figura 63), que é coerente com a fórmula molecular proposta para o composto **14** ($\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}_3$). Estes dados permitiram definir o número de carbonos da cadeia linear e a proposta formulada para a estrutura (Figura 60) é compatível com dados da literatura (SEKI *et al.*, 1995).

A posição dos grupos foi estabelecida com base nos dados do experimento HMBC, que mostram a correlação entre os hidrogênios olefínicos exocíclicos (H-6) e o carbono quaternário C-5(157,68) e o metínico C-4 (66,44 δ).

O composto **14** mostrou rotação óptica específica positiva $\{[\alpha]^{20} + 21,5^\circ \text{ c} = 0,22, (\text{acetona})\}$, da mesma maneira que o composto **15** $\{[\alpha]^{20} + 49^\circ \text{ c} = 0,25, (\text{acetona})\}$ e, portanto, possuem a configuração *R*.

No espectro de infravermelho as bandas atribuídas ao composto **14** foram: 3420 cm^{-1} - OH livre; 2912 e 2836 cm^{-1} - estiramento C-H; 1712 cm^{-1} , de C=O e 1616 cm^{-1} , de C=C; para o composto **15** foram observadas bandas em: 3452 cm^{-1} , de OH; 2908 e 2836 cm^{-1} - estiramento C-H, 1728 cm^{-1} , de C=O e 1612 cm^{-1} , de C=C.

O composto **14** foi nomeado de isochinosídeo A, sendo considerado inédito, pois não há registro na literatura sobre o mesmo, e o **15** foi nomeado provisoriamente de isochinosídeo

B, apesar da não obtenção ainda dos dados de espectrometria de massas para estabelecer o tamanho da cadeia lateral e, conseqüentemente, a identificação correta deste composto.

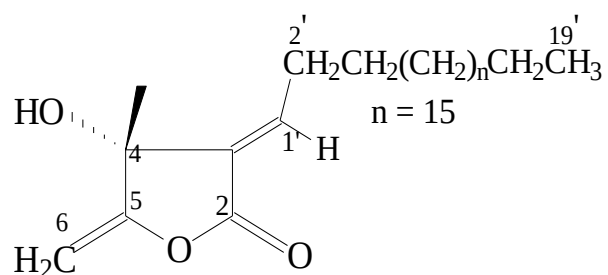


Figura 60 –Proposta estrutural para o isochnosídeo A (**14**)

Tabela 24 - RMN ^1H , ^{13}C e HMBC isochnosídeo (**14**), (CDCl_3).

H/C	^1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC
2		166,63	$\text{H}_{1'}$
3		127,30	$\text{H}_{3'}$
4	5,24	66,44	H_6 , $\text{H}_{1'}$
5		157,68	H_6
6	4,93 H_a 4,70 H_b	91,31	
1'	7,06	150,18	
2'	2,48	29,68	
3'	2,36	28,30	
4'-17'	1,23	28,20-31,90	
18'	1,23	22,67	
19'	0.85	14,09	

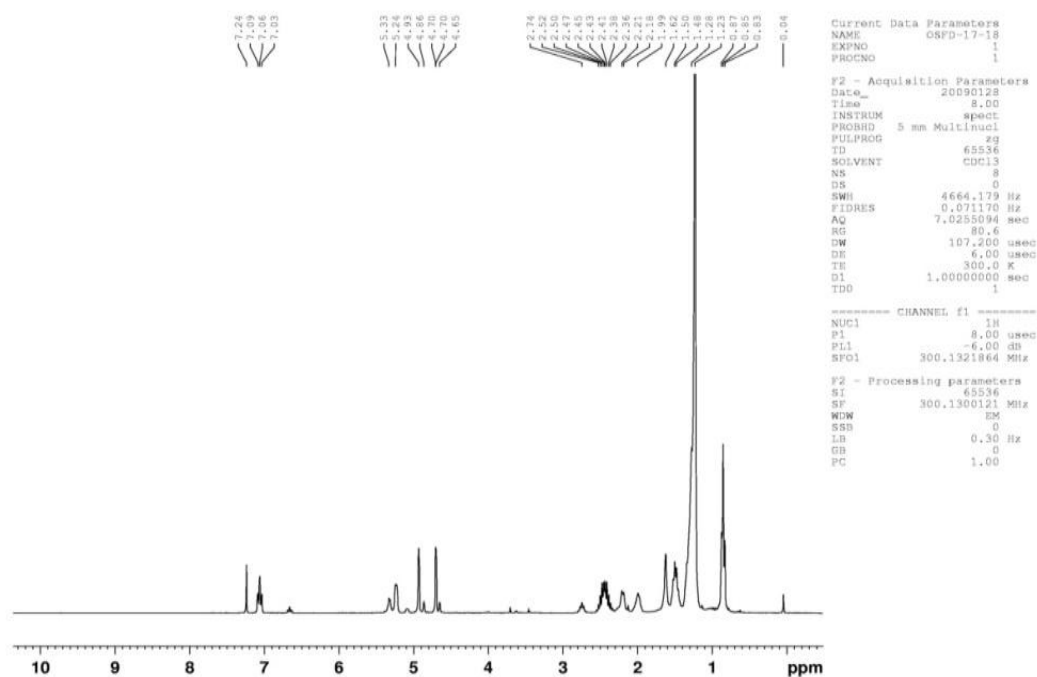


Figura 61- RMN de ^1H do composto **14** (isochnosídeo A) (300 MHz, CDCl_3 , TMS $\delta=0$).

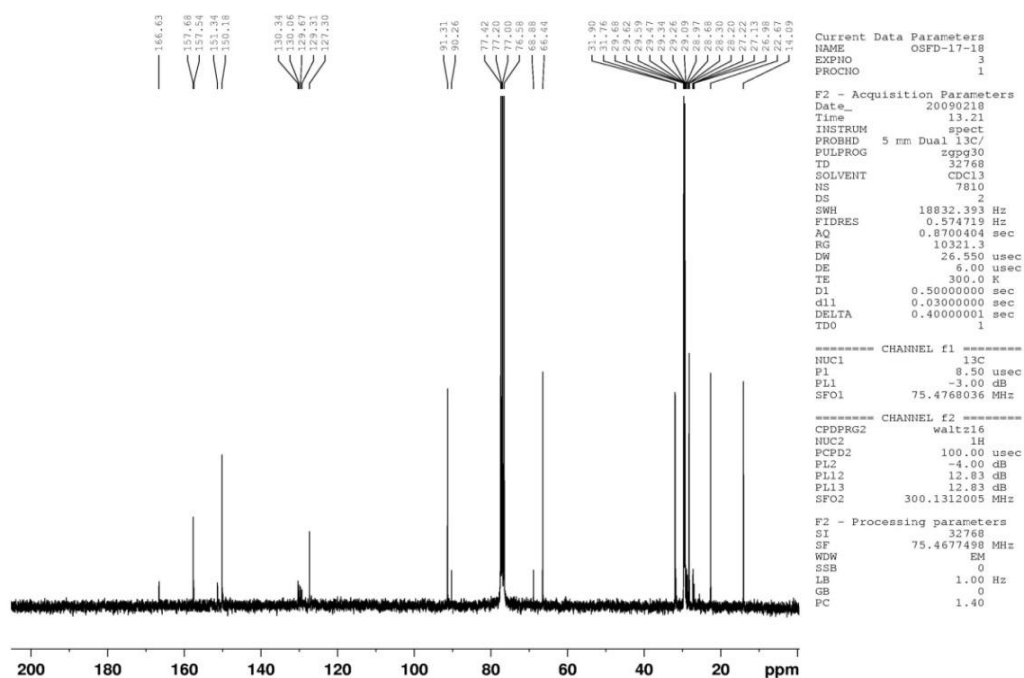


Figura 62 – RMN de ^{13}C do composto **14** (isochnosídeo A) (75 MHz, CDCl_3 , TMS $\delta=0$).

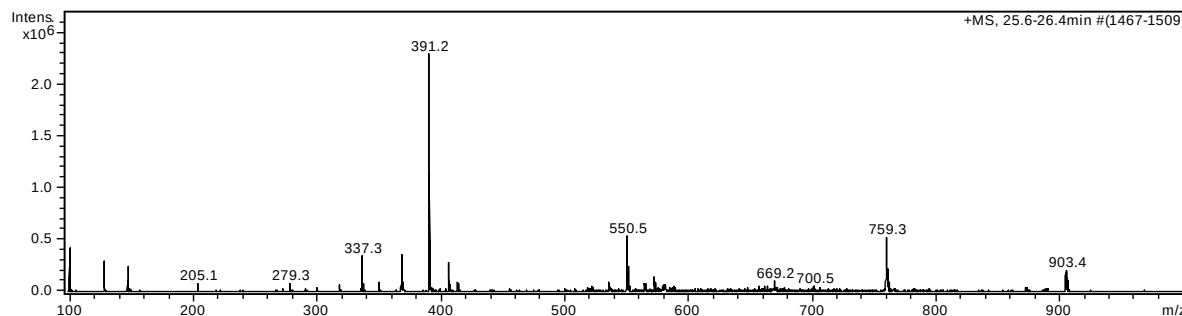


Figura 63 – Espectro de massas do composto **14** (Eletrospray-modo negativo).

Composto **16** – seco-ochnosídeo A

O composto **16** foi isolado da fração hexânica e apresentou-se como uma substância oleosa e incolor. Seu espectro de RMN de ^1H (Tabela 25, Figura 65) apresentou dois sinais de metilas diferenciados dos observados para os compostos **14** e **15**: singletos em 2,13 δ (3H, s, H-3')–metila α à carbonila, e 3,71 δ (3H, s), de metoxila.

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 25, Figura 66) os sinais que caracterizam o composto **16** são: 73,35 δ (C-1'), 206,35 δ (C-2'), 24,48 δ (C-3') e da metoxila em 52,03 δ . Portanto, a diferença entre o composto **16** e os outros butanolídeos isolados em *O. spectabilis* pode ser caracterizada no espectro de RMN de ^{13}C , nos deslocamentos dos carbonos C-1', C-2', C-3'.

No experimento HMBC foram observadas as interações do C₁ (166,05 δ) com a metoxila (3,71 δ) e com H₃ (7,08 δ); do C₂ (206,35 δ) com H₃ (2,13 δ), com C₁ (73,35 δ) e com H₃ (2,13 δ). Segundo a literatura (KUO *et al.*, 2008) o deslocamento químico do hidrogênio (H₃) em 7,08 δ confere à estrutura a configuração *trans* (E), pois quando é a configuração *cis* (Z) este valor é menor (núcleo mais protegido), aproximadamente em 6,34 δ .

Com base nestes dados foi possível propor para o composto **16** uma estrutura correspondente à abertura do anel lactônico, e a consequente conversão tautomérica do enol em cetona, e a metilação da carboxila originada na abertura do anel. Esta substância foi denominada como seco-ochnosídeo A, porém falta ainda determinar o peso molecular para definir o tamanho da cadeia e a identificação definitiva do composto (Figura 64).

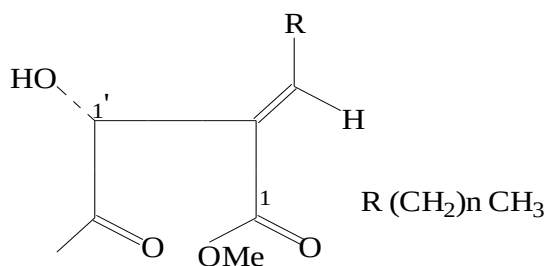


Figura 64- Estrutura do seco-ochonosídeo A (**16**).

Tabela 25 - Dados de RMN de 1H e de ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC do composto **16** ($CDCl_3$) e dados da literatura* ($CDCl_3$).

H/C	1H (δ)	^{13}C (δ)	HMBC	^{13}C (Literatura)*
1		166,05	H_3, OCH_3	166,5
2		129,68		129,5
3	7,08	149,17		149,4
1'	4,87	73,35	$H_3,$	74,1
2'		206,35	$H_3,$	206,3
3'	2,13	24,48		24,4
OMe	3,71	52,03		52,2
Me	0,85	14,11		14,1

*(KUO *et al.*, 2008)

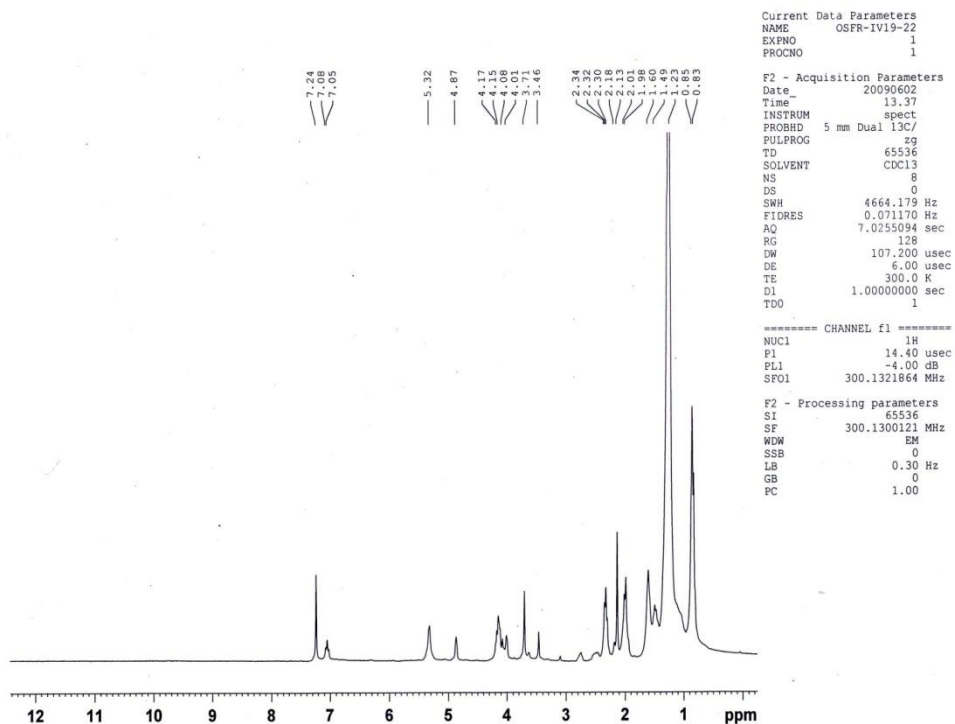


Figura 65 – espectro de RMN de ^1H do composto **16** (seco-ochnosídeo A), (300 MHz, CDCl_3 , TMS $\delta=0$).

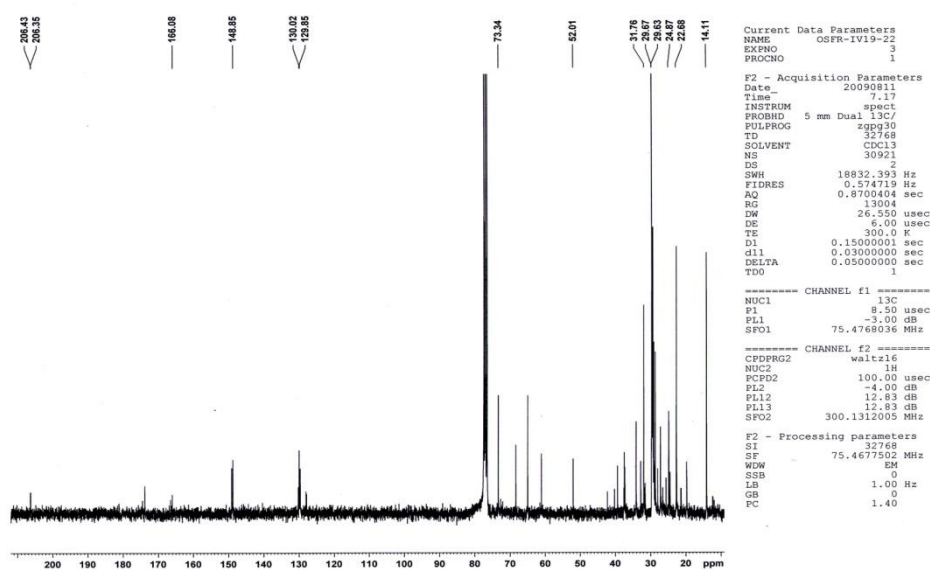


Figura 66 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **16** (seco-ochnosídeo A), (75 MHz, CDCl_3 , TMS $\delta=0$).

Compostos 17 ao 20

Os compostos **17** ao **20** pertencem à classe do butanolídeos e com exceção do composto **18**, apresentaram características semelhantes aos compostos **14** e **15**.

Os espectros de RMN de ^1H dos quatro compostos (17 a 20) (tabela 26, Figuras 68 e 69) apresentaram sinais de hidrogênios metilênicos alifáticos entre 1,23 e 2,77 δ e sinal de metila em 0,85 δ , indicando que os quatro compostos possuem cadeia alifática semelhante.

A diferença entre eles foi detectada nos sinais de H-1', H-4 e H-6. Os compostos **17**, **19** e **20** apresentaram os seguintes deslocamentos de hidrogênios; H-1' [1H, 7,09, t, $J=7,5$ Hz (**17**) e 7,10, t, $J=7,5$ Hz (**19** e **20**)]; H-4 (1H, 5,33 δ) e H-6 (2H, 4,94 e 4,70 δ), enquanto para o composto **18** foram atribuídos os seguintes sinais H-1': (1H, 6,67 δ , t, $J=7,5$); H-4 (1H, 5,08 δ) e H-6 (2H, 4,87- 4,65 δ). Estes valores conferem aos compostos **17**, **19** e **20** configuração *trans* e para o composto **18** *cis* (KUO *et al.*, 2008).

O espectro de RMN de ^{13}C dos compostos **17** (Tabela 26, Figura 70), **19** e **20** apresentou sinais idênticos em: 166,81 δ (C-2), 66,35 δ (C-4), 91,36 δ (C-6) e 150,23 δ (C-1') e os sinais do composto **18** (Tabela 26, Figura 71) são: 165,24 δ (C-2), 68,93 δ (C-4), 90,25 δ (C-6) e 151,32 δ (C-1'). Estes valores de deslocamentos dos carbonos caracterizam a diferença entre as substâncias, sendo *trans* os compostos **17**, **19** e **20** e *cis* o composto **18**. Os valores de carbonos alifáticos nos quatro compostos ficaram na faixa 22,66 – 31,89 δ , e as metilas em 14,10 δ também permaneceram comuns para os quatro compostos. Os deslocamentos de carbono registrados na Tabela 26 foram comparados com a literatura (KUO *et al.*, 2008; ANDERSON *et al.*, 1992).

Com as informações dos experimento bidimensionais HSQC e HMBC foi possível correlacionar os dados e determinar a estrutura parcial dos compostos **17** a **20**.

No espectro de IV as bandas que caracterizam os compostos são as mesmas já registradas para os compostos **14** e **15**. Os valores das rotações ópticas específicas foram positivas variando de $\{[\alpha]^{20} + 3,5^\circ \text{ a } 49^\circ (c = 0,025, \text{ acetona})\}$, indicando configuração *R*. Os dados do espectro de massas do composto **17** (Figura 67) apresentou pico molecular $m/z = 335$, que corresponde ao $M^+ - 1$. As informações obtidas foram comparadas com a literatura (ANDERSON *et al.*, 1992) e indicaram tratar-se da substância isolinderanolídeo, com fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_3$. Os compostos **18** ao **20** receberam nomes provisórios: **18** (ochnosídeo A), o **19** (isochnosídeo C) e o **20** (isochnosídeo D), por falta de dados do espectro de massas para identificação definitiva dos compostos (Figura 67).

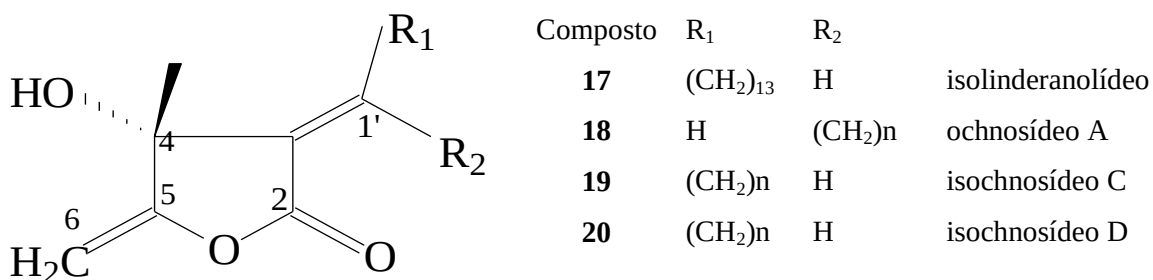


Figura 67 – Esqueleto básico dos compostos **17** a **20**

Tabela 26 - Dados de RMN de ¹³C dos compostos **17** a **20** (CDCl₃).

C	Compostos (δ)			
	17	18	19	20
2	166,81	165,24	166,81	166,81
3	127,27	127,33	127,27	127,27
4	66,35	68,93	66,35	66,35
5	157,65	157,6	157,65	157,65
6	91,36	90,25	91,36	91,36
1'	150,23	151,32	150,23	150,23
2'	22,66 -31,89	22,66-31,89	22,66 -31,89	22,66 -31,89
CH ₃	14,10	14,09	14,10	14,10

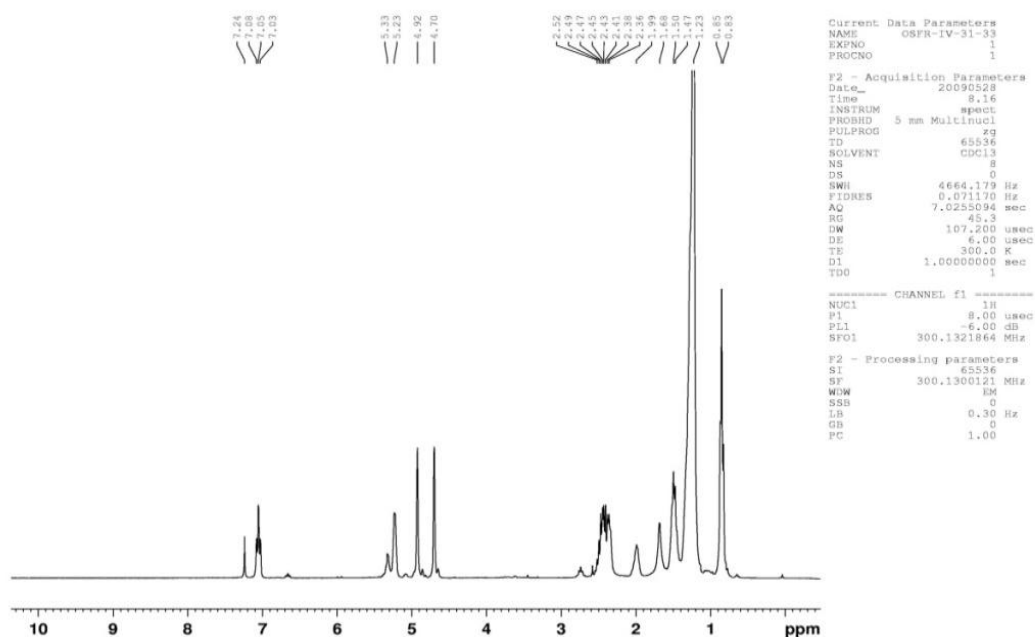


Figura 68- Espectro de RMN ¹H do composto **17** (isolinderanolídeo) (300 MHz, CDCl₃ TMS δ=0).

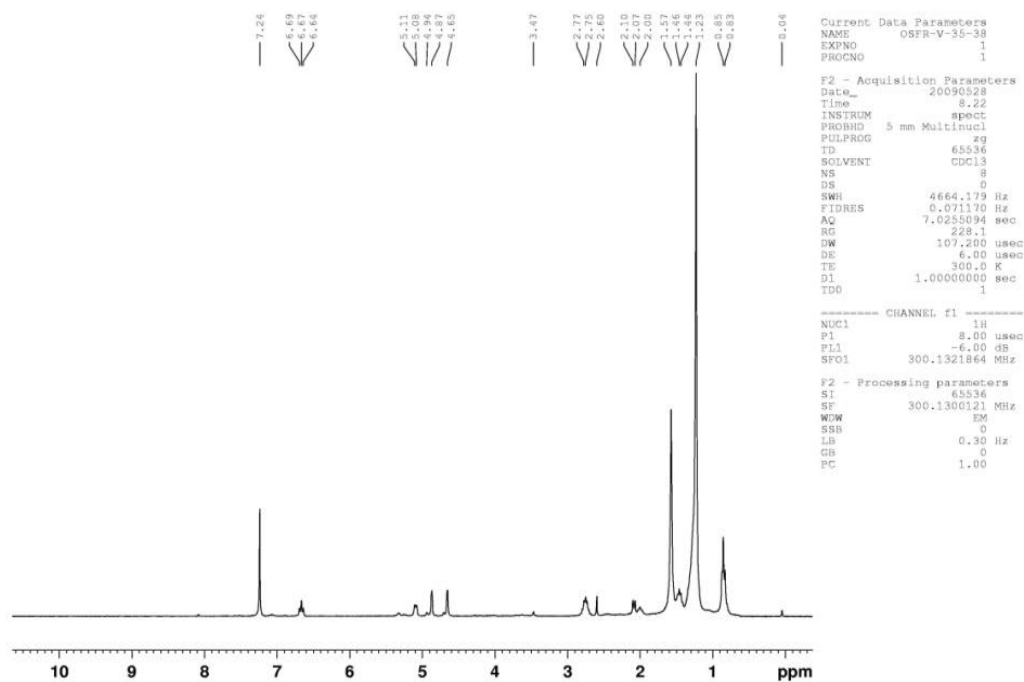


Figura 69 – Espectro de RMN de ^1H do composto **18** (ochnosídeo A) (300 MHz, CDCl_3), TMS $\delta=0$).

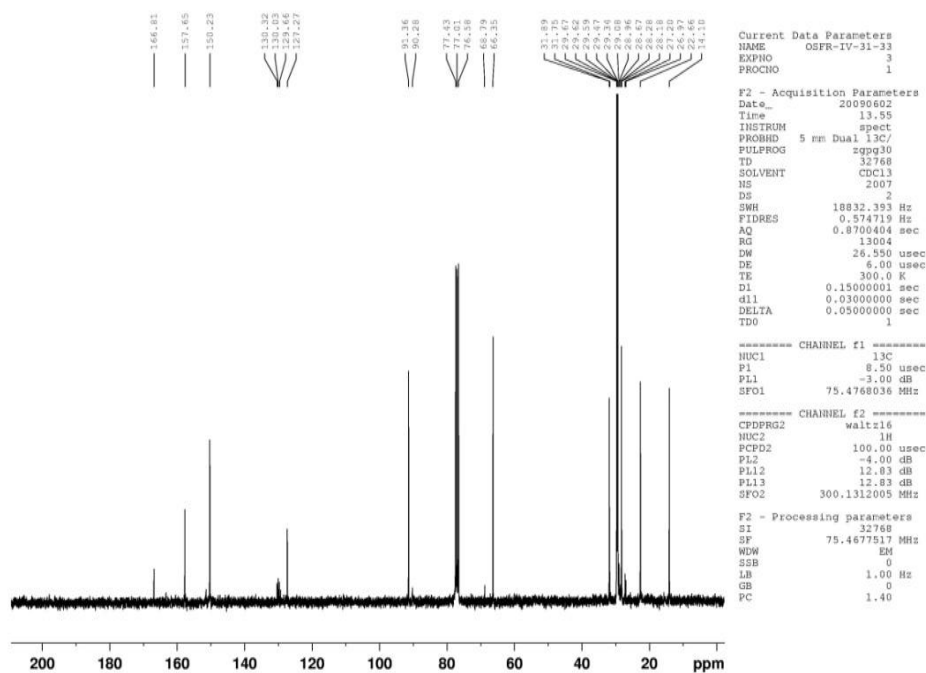


Figura 70 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto **17** (isolinderanolídeo) (75MHz, CDCl_3 ,TMS $\delta=0$).

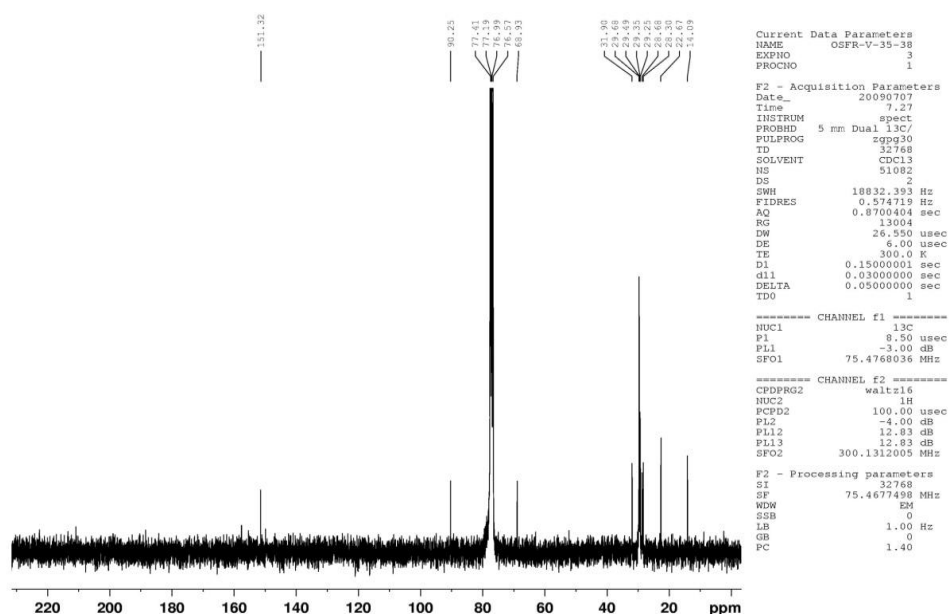


Figura 71 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **18** (ochonosídeo A), (75MHz, CDCl_3 , TMS $\delta=0$).

Composto 21- β -sitosterol

O composto **21** pertence à classe dos terpenoides e trata-se do esteroide β -sitosterol (Figura 72). Este composto já foi isolado de muitas espécies de plantas e sua presença foi confirmada por comparação com o padrão em CCD e dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C com os da literatura (BATISTA, 2001).

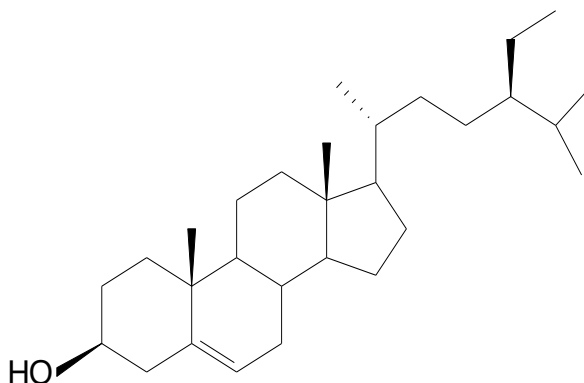


Figura 72 - Estrutura do β - sitosterol (**21**).

Os compostos **22** e **23** foram isolados da fração acetato de etila, o composto **22** é um biflavonoide e o **23** é uma cumarina do tipo dihidrocumarina.

Composto 22 – agastiflavona

O composto **22** foi isolado da subfração 60-82 da fração acetato de etila, apresentando-se como uma substância amarela, sólida e solúvel em metanol, e seus dados de RMN de ^1H e de ^{13}C indicaram que tratava de um biflavonoide.

O espectro de RMN ^1H (Figura 74) apresentou, entre outros, sinais correspondentes a quatro singletos (6,37 δ ; 6,59 δ , 6,67 δ e 6,69 δ) e quatro dupletos [6,74 δ (d ; 9,0 Hz); 6,95 δ (d ; 9,0 Hz); 7,55 δ (d ; 6,0 Hz) e 7,90 δ (d , 9,0 Hz)], conforme mostrado na tabela 27.

No espectro de RMN ^{13}C de **22** (Figura 75) foram relacionados 26 sinais (Tabela 27), sendo que quatro destes estão duplicados: 115,46 δ ; 127,82 δ ; 115,66 δ e 128,09 δ , correspondentes aos carbonos 3,5,2 e 6 do anel B das unidades I e II, respectivamente.

Estes dados levaram à proposição de que o composto **22** trata-se da biflavona com ligação I6-II8, conhecida como agastiflavona (Figura 73), a qual já foi isolada de outras espécies de *Ouratea* (DE CARVALHO, *et al.* 2008b; DANIEL *et al.*, 2005 e MOREIRA *et al.*, 1999).

As informações obtidas dos experimentos bidimensionais HSQC e HMBC, bem como os dados da literatura (AGRAWAL;BANSAL, 1989) confirmaram a proposição. Da fração diclorometânica de *O. spectabilis* foi isolada a 7,7' dimetóxi-agastiflavona (composto **11**) (Figura, 49), que difere de **22** apenas pela presença de uma metoxila adicional no carbono 7 nas unidades I e II no anel A do composto **11**.

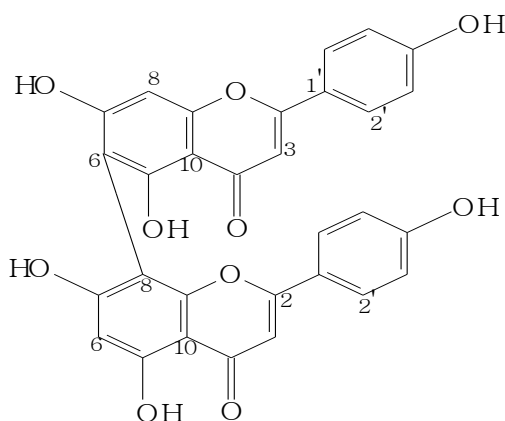


Figura 73- Estrutura da agastiflavona (**22**).

Tabela 27- Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto 22 (agastiflavona) e da literatura* (Metanol- d_4).

	Composto 22 I (δ)	Literatura* I (δ)	Composto 22 II (δ)	Literatura* II (δ)
C-2	164,67	165,03	164,80	165,20
C-3	102,49	104,04	101,98	103,56
C-4	182,92	183,54	182,55	183,14
C-5	161,18	161,29	161,38	163,14
C-6	103,63	104,08	98,71	96,03
C-7	163,12	163,08	163,52	164,82
C-8	93,46	94,50	99,26	101,00
C-9	157,66	158,18	163,52	155,50
C-10	103,91	105,12	104,10	105,55
C-1'	121,89	123,16	122,01	123,16
C-2'	128,09	129,25	127,82	129,08
C-3'	115,66	116,75	115,46	116,75
C-4'	161,11	161,81	161,11	161,81
C-5'	115,66	116,75	115,46	116,75
C-6'	128,09	129,25	127,82	129,08
H-3	6,67	6,65	6,59	6,60
H-6	-	-	6,37	6,54
H-8	6,69	6,80	-	-
H-2',6'	7,90	7,94	7,55	7,62
H-3',5'	6,95	7,05	6,74	6,83

* MOREIRA *et al.*, 1999

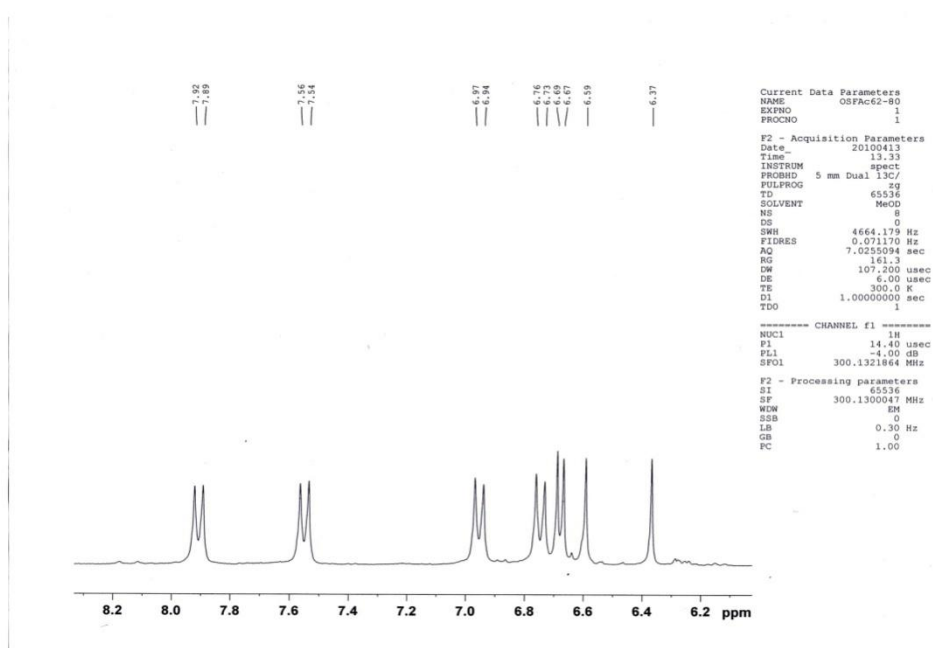


Figura 74 - Espectro de RMN de ^1H da agastiflavona (22), (300MHz, Metanold $_4$, TMS $\delta=0$).

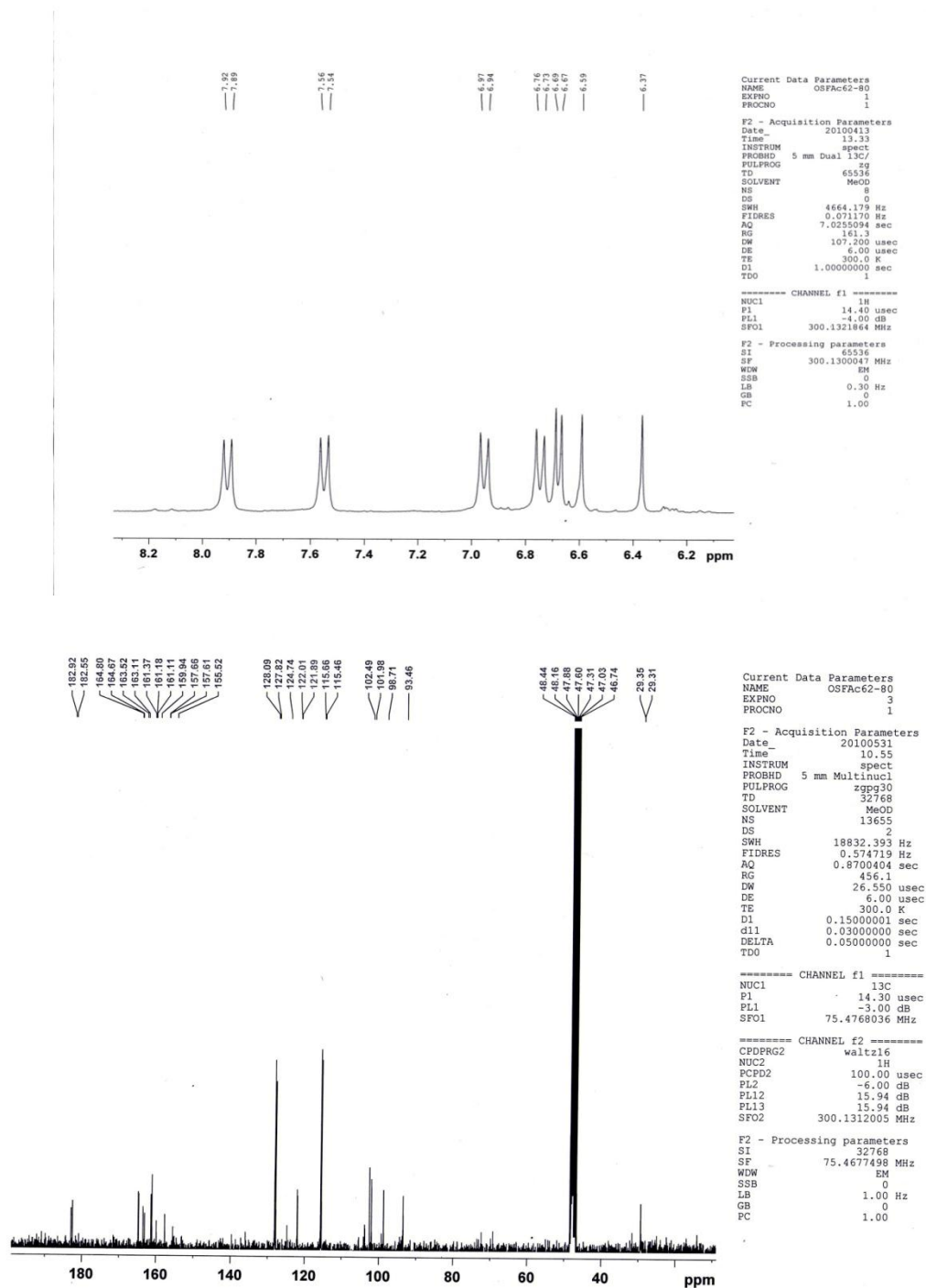


Figura 75- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **22** – agastiflavona, (75 MHz ,Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

➤ Cumarinas

As cumarinas são benzo-derivados da pirona, de ocorrência natural ou sintética, amplamente distribuídas no reino vegetal (mais de 1300 estruturas), podendo ser encontradas também em fungos e bactérias (MIRANDA, 2001). As cumarinas ocorrem em diversas famílias de angiospermas e em diferentes partes da planta, incluindo raízes, flores e frutos, (RIBEIRO; KAPLAN, 2002).

Em 1940, a FDA (Food and Drug Administration, USA) proibiu o uso como aditivo alimentício da substância que dá o nome a esta classe, a cumarina, devido à sua potencial hepatotoxicidade. No entanto, as aplicações desses compostos estão superando os aspectos negativos. Às cumarina são atribuídas uma grande variedade de atividades biológicas, tais como ação antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antioxidante (MIRANDA, 2001).

O composto **23** é uma cumarina do tipo diidroocumarina, que se caracterizam por apresentarem um anel aromático de seis membros e uma lactona (UENISHI, SUDO, ENDO, 2009).

Composto **23** -7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidroocumarina

composto **23** apresentou-se como uma substância sólida alaranjada, solúvel em MeOH. O espectro de RMN de ^1H (Figura 77) apresentou poucos sinais; na região de hidrogênios alifáticos, dois singetos em 3,49 δ e 3,66 δ , e na região de hidrogênios aromáticos foram registrados os dupletos em 6,28 δ e 6,88 δ e o duplo-dupletos em 6,22 δ (Tabela 28).

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 78) apresentou nove sinais, os quais, com auxílio do espectro DEPT-135° (Figura 79), foram identificados como: carbonos alifáticos, CH_2 (35,74 δ) e CH (52,24 δ); carbonos de anel aromático, três CH em 103,78 δ , 107,39 δ e 132,40 δ . Os outros carbonos que completam a estrutura da substância são quatro tetrassubstituídos em 113,78 δ ; 157,52 δ ; 158,68 δ e um carbonílico em 175,23 δ (Tabela 28).

Os dados observados no experimento bidimensional HMBC mostram as correlações do carbono carbonílico C-1 com os hidrogênios alifáticos correspondentes aos sinais em 3,49 δ e 3,66 δ e outras correlações apresentadas na tabela 28.

No espectro de infravermelho a banda em 1764 cm^{-1} está de acordo com a lactona de seis membros com o oxigênio ligado a carbono sp^2 , apresentada pelo composto **23**.

Com estas informações foi possível sugerir que o composto **23** pertence a classe das diidroocumarinas. Como os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C registraram apenas um CH_2 , e um CH alifáticos, nenhuma metoxila ou metila a proposta para esta substância foi a de que se

trata de um dímero, cujas unidades encontram-se unidas pelos carbonos C-3 e C-3'. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C sugerem a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_6$ e que os anéis aromáticos apresentam hidroxilas em C-7 e C-7'. Esta substância é denominada 7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina (Figura 76) e é inédita na literatura.

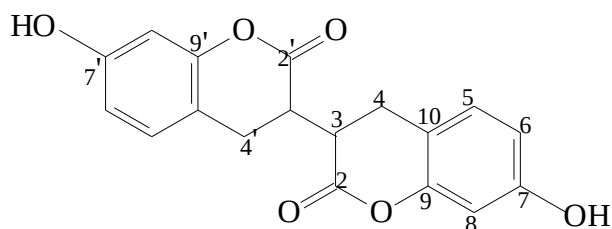


Figura 76 – Estrutura do composto **23** (7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina).

Tabela 28 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e correlações observadas no experimento HMBC de 7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina (**23**), Metanol- d_4 .

H/C	$^1\text{H}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$	M	J (Hz)	HMBC
2,2'		175,23			H ₃ ;H ₄
3,3'	3,66	52,24	S		
4,4'	3,49	35,75	S		H ₅
5,5'	6,88	132,40	D	6,0	H ₄
6,6'	6,28	103,32	D	3,0	H ₅ ; H ₈
7,7'		158,68			H ₅
8,8'	6,22	107,39	dd	3,0; 3,0	H ₆
9,9'		157,52			H ₄ ; H ₅
10,10'		113,67			H ₄ ; H ₆ ; H ₈

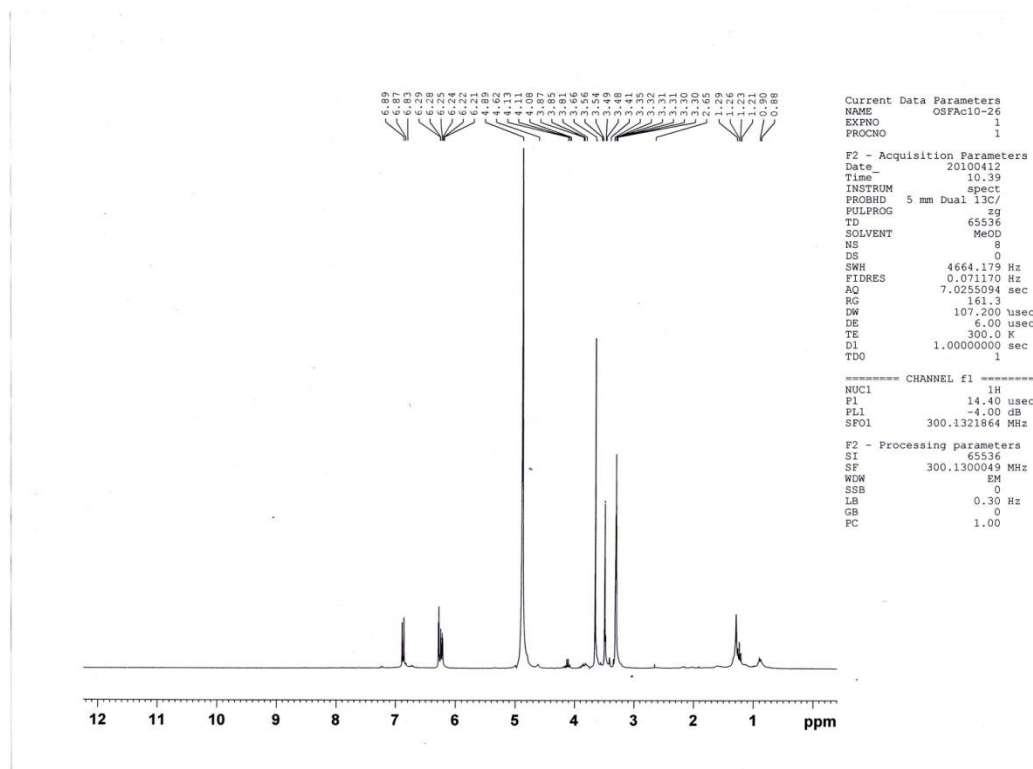


Figura 77- Espectro de RMN de ^1H do composto **23** – 7,7' hidroxi-bicumarina, (300 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$).

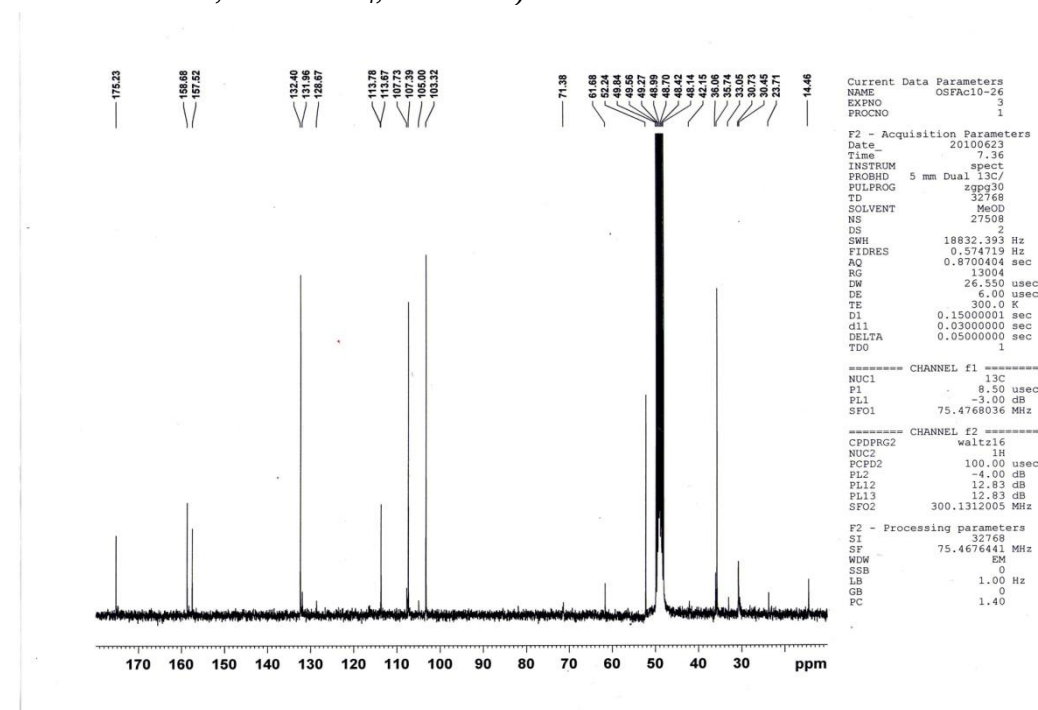


Figura 78- Espectro de RMN de ^{13}C do composto **23** - 7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina, (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$)

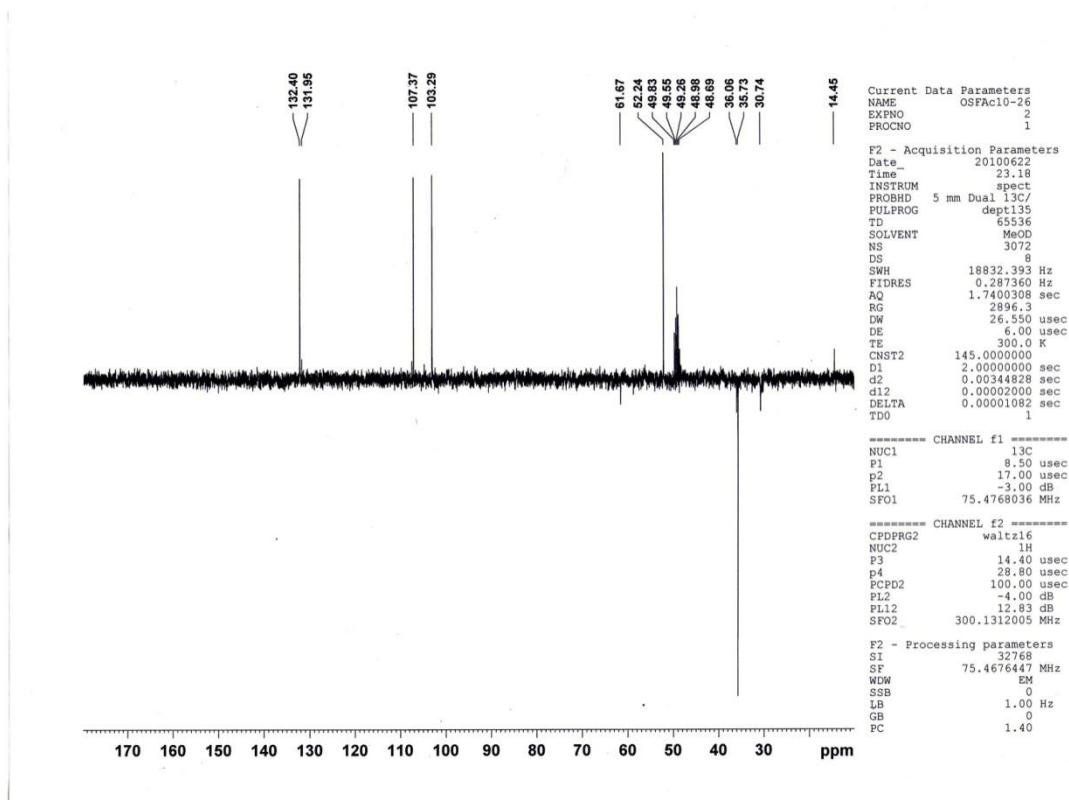


Figura 79- Espectro de DEPT-135° do composto **23** - 7,7'-diidróxi-3,3'-bi diidrocurmarina, (75 MHz, Metanol- d_4 , TMS $\delta=0$)

5.2.1 Atividade antibacteriana de *O. spectabilis*

➤ Extratos, frações e subfrações

O extrato etanólico dos frutos, assim como, as frações e subfrações apresentaram CIM >1000 para *P. aeruginosa* (Tabela 29). As frações diclorometânica e hexânica apresentaram resultados mais significativos frente a *E. faecalis*. Os resultados apresentados na tabela 29 mostram que os compostos menos polares apresentaram atividade antibacteriana mais promissora.

Tabela 29- CIM ($\mu\text{g/mL}$) apresentada pelo extrato etanólico (EtOH) e frações hexânica (HEX), diclorometânica (DCM), acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (MeOH/H₂O) dos frutos de *O. spectabilis* frente às cepas bacterianas testadas

Bactérias	Extrato		Frações			Padrão
	EtOH	HEX	DCM	AcOEt	MeOH/ H ₂ O	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	1000	1000	1000	>1000	>1000	1
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	8
<i>E. faecalis</i>	1000	250	500	>1000	>1000	0,5

As subfrações OSFR-I, OSFR-17 e OSFR-18 apresentaram concentração inibitória mínima entre 125 a >1000 (Tabela 30). A OSFR-I apresentou melhor resultado, pois mostrou atividade antibacteriana frente as três cepas, indicando que o fracionamento cromatográfico foi eficiente na separação dos compostos e consequentemente na seletividade antibacteriana.

As subfrações da fase diclorometânica apresentaram CIM elevada, o resultado mais significativo foi apresentado pela subfração OSFR-I frente a *E. faecalis* (125 $\mu\text{g/mL}$). Em relação a *S. aureus*, duas amostras, OSFR-I e OSFR-18, apresentaram CIM em 250 $\mu\text{g/mL}$, resultado satisfatório por tratar-se de uma bactéria que expressa pouca sensibilidade à fármacos.

Tabela 30- Testes de atividade antibacteriana das subfrações obtidas no fracionamento da fração diclorometânica de *O. spectabilis* frente às bactérias testadas. ($\mu\text{g/mL}$)

Bactérias	Subfrações			Padrão
	OSFR-I	OSFR-17	OSFR-18	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	250	500	250	1
<i>P. aeruginosa</i>	1000	>1000	>1000	8
<i>E. faecalis</i>	125	1000	500	0,5

A fração hexânica foi fracionada com o objetivo de obter os compostos responsáveis pela atividade contra *E. faecalis*. As subfrações foram testadas quanto à atividade bacteriana sendo selecionadas as subfrações 32-45; 46-50 e 51-72, que ainda foram testadas frente às outras duas cepas.

O resultado foi idêntico para as três amostras, 1000 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*, >1000 $\mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosa* e contra *E. faecalis* 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 31) apresentaram CIM mais expressivo, da mesma forma que a fração hexânica.

Comparando-se os resultados das subfrações provenientes da fração hexânica com as da diclorometânica, observou-se que *S. aureus* foi mais sensível às subfrações oriundas da fração diclorometânica, enquanto que *E. faecalis* apresentou maior sensibilidade às subfrações da fração hexânica.

Tabela 31- Testes de atividade antibacteriana das subfrações obtidas no fracionamento da fração hexânica de *O. spectabilis* frente às bactérias testadas ($\mu\text{g/mL}$).

Bactérias	Subfrações			Padrão
	32-45	45-50	51-72	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	1000	1000	1000	1
<i>P. aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	8
<i>E. faecalis</i>	62,5	62,5	62,5	0,5

➤ Compostos isolados

Os compostos **8**, **9** e **11** isolados da subfração OSFR-18 mostraram atividade antibacteriana pelo menos para uma cepa testada. O composto **12** apresentou resultado positivo frente as três cepas. Os compostos **10** (7,7' dimetilavolkessiflavona) e **13** e **13A** (pinoresinol/epipinoresinol) apresentaram CIM >200 para as três bactérias (Tabela 32).

O composto **8** (7'' metil- agastiflavona) não apresentou atividade frente a *S. aureus*, mas apresentou atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e *E. faecalis* não seguindo o mesmo padrão da fração OSFR-18, da qual foi isolado, este resultado é relevante uma vez que mostra atividade contra duas bactérias de grande importância no cenário mundial de infecções.

O composto **9** (6,6'bigenkwanina) apresentou atividade contra *S. aureus* (200 $\mu\text{g/mL}$) e o **11** (7,7' dimetoxiagastiflavona) CIM promissora contra *E. faecalis* (25 $\mu\text{g/mL}$). Estes dois compostos já foram isolados das folhas de *O. spectabilis*.

Os biflavonoides **9** e **11** foram testados quanto à atividade inibidora de aldose redutase (enzima relacionada com o início da formação de catarata em diabéticos) Os dois compostos apresentaram atividade, porém o **9** (6,6'bigenkwanina) foi três vezes mais ativo que o flavonoide quercetina, usado como controle positivo (FELICIO *et al.*, 1995).

Os referidos compostos foram avaliados quanto à atividade citotóxica e o resultado indicou que as concentrações que causam inibição no crescimento de células SIRC (em 50%) são muito maiores do que as concentrações necessárias para a atividade de aldose redutase. Isto é, a concentração que inibe a atividade da aldose redutase não é tóxica para as células (SIMONI *et al.*, 2002)

O resultado mais promissor dos compostos isolados da fração OSFR-18 foi registrado para composto **12** (I-3-II-8 biapegenina), e embora tendo uma CIM elevada (200 µg/mL), foi o único que apresentou atividade para as três cepas. Este composto está presente em *Hypericum perforatum* e possui atividade antidepressiva (ISACCHI *et al.*, 2009). Esse resultado vem aumentar o arsenal de substâncias com ação antibacteriana disponíveis para novos medicamentos.

Tabela 32 - Atividade antibacteriana dos compostos **8** a **13** e **13A** isolados das subfrações OSFR-17 e OSFR-18 dos frutos de *O. spectabilis* frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (µg/mL).

Bactérias	Compostos isolados						Padrão
	8	9	10	11	12	13 e 13A	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	>200	200	>200	>200	200	>200	1
<i>P. aeruginosa</i>	200	>200	>200	>200	200	>200	8
<i>E. faecalis</i>	200	>200	>200	25	200	>200	0,5

As substâncias isoladas da subfração OSFR-I **14** e **15** (isochonosídeo A e B, respectivamente) apresentaram resultados diferentes. Para *E. faecalis* o **14** apresentou resultado mais relevante, com CIM em 50 µg/mL e para as cepas *P. aeruginosa* e *S. aureus* apresentou CIM elevada (200 µg/mL), enquanto o **15** apresentou os mesmos valores de CIM (200 µg/mL) para as três cepas (Tabela 33). São resultados importantes visto que estes dois compostos podem auxiliar nas formulações de novas drogas contra infecções causadas por estas bactérias.

Os compostos seco-ochonosídeo A (**16**) e isolinderanolídeo (**17**) isolados da subfração (51-72) originárias da fração hexânica apresentaram os seguintes resultados: concentração inibitória mínima > 200 para *S. aureus*, contra *E. faecalis* (25 µg/mL) e para *P. aeruginosa* o resultado do composto 17 foi mais promissor o **16** (200 µg/mL) e o **17** (100 µg/mL).

Estes resultados confirmam a CIM promissora para *E. faecalis* da mesma forma que a subfração de origem (51-72), mas difere no resultado para as outras bactérias, porque os compostos **16** e **17** inibiram o crescimento nas concentrações mais alta (200 e 100 µg/mL) de *P. aeruginosa* enquanto na subfração 51-72 a bactéria não mostrou sensibilidade. Quanto a *S. aureus* esta cepa bacteriana mostrou-se resistente aos compostos (**16** e **17**), e a para subfração apresentou pouca sensibilidade.

O composto **18** (ochonosídeo A) apresentou CIM elevada para *S. aureus* e *P. aeruginosa* (200 µg/mL) e >200 para *E. faecalis*, resultado que difere da subfração 32 – 45, que apresentou atividade antibacteriana frente a *E. faecalis*.

Os compostos **19** (isochonosídeo C) e **20** (isochonosídeo D) mostraram os seguintes resultados: ambos apresentaram CIM elevada frente *S. aureus* (200 µg/mL), e em relação a *E. faecalis*, **19** apresentou CIM >200 µg/mL e **20** CIM em 200 µg/mL. O composto **19** não foi avaliado contra *P. aeruginosa*. O composto **20** apresentou resultado igual ao da subfração 46-50 com atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *E. faecalis* e em relação a *P. aeruginosa*, a bactéria não foi sensível às amostras testadas.

Tabela 33 – Concentração inibitória mínima dos compostos **14** a **20** frente às bactérias testadas (µg/mL).

Bactérias	Compostos Isolados (µg/mL)							Padrão
	14	15	16	17	18	19	20	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	200	200	>200	>200	200	200	200	1
<i>P. aeruginosa</i>	200	200	200	100	200	NT	>200	8
<i>E. faecalis</i>	50	200	25	25	>200	>200	200	0,5

NT- não testada

O composto **22** (agastiflavona) apresentou CIM >200 frente as três bactérias assim como a fração AcOEt, enquanto o **23** (7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina) foi inativo frente a *S.aureus* e *P. aeruginosa* e mostrou CIM em 200 µg/mL contra *E. faecalis*.

Os resultados obtidos com os compostos isolados de *O. spectabilis* foram promissores, principalmente para *E. faecalis*. Dos nove compostos que apresentaram atividade para esta cepa, quatro (**14;11;16 e17**) mostraram CIM expressiva entre 50 e 25 µg/mL. Este resultado é importante visto que, os órgãos competentes na área da saúde têm manifestado grande preocupação em relação às infecções causadas por *E. faecalis*, uma vez que o número de infecções provenientes de tal bactéria tem aumentado consideravelmente com casos de cepas resistentes aos antibióticos.

Quanto à *P. aeruginosa* os resultados descritos foram bons, todavia o composto **17** apresentou CIM mais significativo. É um resultado relevante tendo em vista que este microorganismo é um patógeno oportunista, responsável por infecções graves em pacientes imunocomprometidos e a busca de novas substâncias que tenham ação contra este microorganismo se faz necessário.

O resultado menos promissor foi contra *S. aureus*, microorganismo muito mais comum em infecções, e caracterizado pela elevada resistência aos antibióticos. Os compostos que apresentaram atividade antibacteriana a esta cepa, abrem novos caminhos na busca de substância com atividade contra este microorganismo.

Os compostos **12** (I-3-II-8 biapegenina) e **22** (agastiflavona) possuem o mesmo tipo de ligação I6-II8 e apresentaram resultados diferentes no teste antibacteriano, o **12** mostrou atividade para as três cepas e o **22** foi inativo. A diferença dos dois compostos está no tipo de ligação o **12** é I3-II8 e o **22** I6- II8, este fator pode influenciar nos resultados na atividade antibacteriana.

Os compostos **14** a **20**, com exceção do **16**, possuem o mesmo esqueleto básico diferindo um do outro pelo tamanho da cadeia e configuração *cis* ou *trans*. Estudos realizados com esta classe de compostos revelaram atividade citotóxica dos mesmos (ANDERSON *et al.*, 1992, CHENG *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2008). De acordo com Cheng *et al.*, (2001), a atividade citotóxica dos butanolídeos é atribuída provavelmente à presença da lactona α , β insaturada.

Chen *et al.* (2007) investigaram quatro compostos pertencentes à classe dos butanolídeos, inclusive um composto com esqueleto semelhante ao do composto **16** (seco-chinosídeo A), quanto ao efeito no DNA em linhagem de células de câncer colorretal em humanos. Os quatro compostos mostraram atividade, pois provocaram danos no DNA das células testadas.

Os resultados apresentados pelos compostos isolados dos frutos de *O. spectabilis* são relevantes. No entanto, estes compostos devem ser investigados quanto as suas atividades tóxicas ou efeitos colaterais. Há urgência de novas substâncias com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e compostos isolados de plantas, após testes laboratoriais poderão ser usados no tratamento de infecções causadas por estes microorganismos.

Estes resultados mostram que os frutos de *O. spectabilis* apresentam variedade estrutural de compostos, pois foram isoladas 16 substâncias pertencentes a quatro classes diferentes: flavonoides, lignana, butanolídeos e cumarina, todos com exceção dos compostos **10**, **13/13A** e **22** apresentaram atividade antibacteriana.

5.2.2 Atividade Antifúngica de *O. spectabilis*

➤ Extrato, frações e subfrações

Os resultados registrados na tabela 34 mostram que a CIM variou de 62,5 a >1000 µg/mL, a fração hexânica mostrou resultado mais relevante, porque apresentou atividade antifúngica contra as cinco cepas fúngicas, enquanto o extrato etanólico e a fração diclorometânica contra três cepas.

Analizando os resultados do extrato etanólico, das frações hexânica e diclorometânica, para cada cepa, o mais significativo foi apresentado pela fração diclorometânica frente a *C. krusei* (62,5µg/mL). A fração acetato de etila apresentou resultado menos promissor, 1000 µg/mL contra *C. albicans* e *C. parapsilosis* e >1000 µg/mL para *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. neoformans*.

As subfrações obtidas da fração diclorometânica OSFR-I, OSFR-17 e OSFR-18 mostraram resultados mais relevantes do que a fração de origem. A que respondeu melhor ao ensaio foi a OSFR-17, com CIM < 500 µg/mL frente a três cepas fúngicas, *C. krusei*, *C. parapsilosis* (250 µg/mL) e *C. neoformans* (125 µg/mL).

A fração OSFR-18 apresentou resultados significativos contra *C. glabrata* (125 µg/mL). A OSFR-I apresentou o resultado menos promissor, mostrando CIM >1000 contra *C. krusei* e elevada para as outras cepas (1000 µg/mL).

Os resultados das subfrações foram melhores do que os obtidos na fração diclorometânica, pois apresentaram atividade antifúngica contra as cepas *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Todos os resultados são importantes, porém destaca-se a CIM da subfração OSFR-18 frente a *C. albicans*, que apresentou o melhor resultado para esta cepa entre as subfrações obtidas no fracionamento da fração diclorometânica.

Quanto às subfrações da fração hexânica (32-45; 46-50; 51-72), a mais significativa foi a 32-45 que apresentou atividade antifúngica frente às cinco cepas testadas.

O resultado menos expressivo foi apresentado pela fração 51-72, que foi ativa para apenas duas cepas, com melhor resultado contra *C. glabrata* (250 µg/mL). As frações 32-45 e 46-50 apresentaram atividade relevante contra *C. albicans*, assim como a fase hexânica.

A levedura *C. glabrata* foi sensível às três subfrações da fase hexânica, enquanto o *C. neoformans* mostrou sensibilidade apenas à subfração 32-45.

Tabela 34 – Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato etanólico, frações e subfrações do fruto de *O. spectabilis* contra *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans*.

		Leveduras				
		<i>Candida albicans</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida. parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus. neoformans</i>
Extrato	EtOH	1000	250	>1000	>1000	250
Frações	DCM	1000	62,5	>1000	>1000	1000
	HEX	500	500	1000	1000	1000
	AcOEt	1000	>1000	>1000	1000	NT
	OSFR-I	1000	>1000	1000	1000	1000
	OSFR-17	1000	250	500	250	125
Subfrações	OSFR-18	500	1000	125	1000	1000
	32-45	500	1000	250	1000	1000
	46-50	500	1000	500	1000	>1000
	51-72	1000	>1000	250	>1000	>1000
Padrão	Anfotericina B	0,25	1	0,5	0,5	0,25

➤ Compostos Isolados

Os resultados de atividade antifúngica dos compostos **8** a **13** e **13A**, isolados das subfrações OSFR-17 e OSFR-18 são apresentados na tabela 35 e mostraram-se promissores, principalmente para *C. glabrata*.

Tabela 35 - Resultado da atividade antifúngica dos compostos isolados **8** a **13** e **13A** ($\mu\text{g/mL}$) frente a *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans*.

Leveduras	Compostos Isolados						Padrão
	8	9	10	11	12	13/13A	Anfotericina B
<i>C. albicans</i>	100	200	200	100	>200	200	0,25
<i>C. krusei</i>	100	200	200	200	50	200	1
<i>C. glabrata</i>	50	50	100	100	6,25	100	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	200	>200	200	200	>200	200	0,5
<i>C. neoformans</i>	200	25	200	200	200	200	0,25

A cepa menos sensível a estes compostos foi a de *C. parapsilosis*, pois não sofreu nenhum efeito dos compostos **9** e **12** (CIM >200), e para os outros compostos (**8**, **10**, **11** e **13/13A**) apresentou CIM elevado (200 $\mu\text{g/mL}$). A levedura mais sensível foi *C. glabrata*, observando-se atividade dos compostos entre 6,25 a 100 $\mu\text{g/mL}$. O melhor resultado foi

mostrado pela substância isolada da subfração OSFR- 18, o biflavonoide I3-II8 biapigenina (**12**) com CIM em 6,25 µg/mL.

A maioria dos compostos mostrou atividade antifúngica (200 µg/mL) para *Cryptococcus neoformans*, com exceção do composto **9** (6,6' biagenkwanina), que apresentou CIM promissora (25 µg/mL).

Em relação à cepa de *C. albicans*, os melhores resultados foram apresentados pelos compostos **8** (7'' metil- agastiflavona) e **11** (7,7''dimetoxi-agastiflavona) com concentração inibitória mínima em 100 µg/mL, enquanto para o composto **12** (I-3-II-8 biapigenina) a cepa não mostrou sensibilidade. Os outros compostos (**9**, **10**, **12**, **13** e **13A**) apresentaram atividade com CIM em 200 µg/mL.

Comparando os resultados dos biflavonoides (tabela 35), isolados da subfração OSFR-18 observou-se que a atividade antifúngica variou entre uma amostra e outra, mesmo nos compostos com estrutura semelhante. É o caso dos compostos **8** (7'' metil- agastiflavona) e **11** (7,7''-dimetoxi-agastiflavona), **10** (7,7 dimentilavolkessiflavona), e **12** (I-3-II-8 biapigenina). Isto indica que os substituintes podem ter papel fundamental na atividade biológica dos compostos.

A mistura **13/13A** (pinoresinol/epipinoresinol) apresentou bom desempenho nos resultados mais significativos contra *C. glabrata*, enquanto a subfração de origem OSFR-17 foi mais significativa contra *C. neoformans*.

Os compostos **9** (6,6'bigenkwanina) e **11** (7,7'dimentoxi-agastiflavona) anteriormente foram testados quanto à atividade antifúngica e os resultados revelaram que estes compostos inibem a produção de Aflatoxina B1 e B2 produzidas pelo *Aspergillus flavus* (GONÇALVES; FELICIO; PINTO, 2001).

Os compostos **14** a **20** apresentaram resultados similares, sendo que a concentração mínima inibitória variou de 50 a 200µg/mL (Tabela 36).

Os fungos apresentaram pouca sensibilidade a estes compostos. Contra *C. neoformans* o melhor resultado entre os compostos **14** a **20** foi apresentado pelo **20** com CIM em (100 µg/mL). A levedura *C. parapsilosis* apontou o mesmo resultado para todos os compostos testados (200 µg/mL). Os compostos **18** (ochinosídeo A) e **19** (isochinosídeo C) não foram testados por não apresentarem massa suficiente para realização de todos os testes.

O microorganismo que apresentou maior sensibilidade foi *C. glabrata* para o composto **17** (isolinderanolídeo) com CIM em 50 µg/mL. Para os compostos **16** (seco-ochinosídeo A), **18** (ochinosídeo A) e **20** (isochinosídeo D) os resultados foram em 100 µg/mL.

Para a cepa *C. krusei*, os resultados mais promissores foram registrados pelos compostos **18** (ochinosídeo A), **19** (isochnosídeo C) e **20** (isochnosídeo D) em 100 µg/mL.

O resultado mais significativo contra *C. albicans* foi apresentado pelos compostos **14** (iso-ochnosídeo A), **18** (ochnosídeo A), **19** (isochnosídeo C) e **20** (isochnosídeo D), com o CIM em 100 µg/mL. As outras substâncias apresentaram CIM em 200 µg/mL.

Comparando os resultados dos compostos (**14** a **20**) frente às cepas fúngicas *Candida* sp e *Cryptococcus*, o **20** (isochinosídeo D) apresentou resultado mais promissor, enquanto o **15** (isochinosídeo B) foi o resultado menos significativo, porque apresentou concentração mínima inibitória elevada para todas as cepas. Comparando os resultados dos compostos *cis* o ochnosídeo A (**18**) com os outros compostos que são *trans*, foi observado que não houve diferença entre eles. O resultado variou independente da configuração estrutural apresentada pelas substâncias.

Tabela 36 – CIM (µg/mL) dos compostos **14** a **20** frente às cepas fúngicas de *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans*.

Leveduras	Compostos isolados							Padrão
	14	15	16	17	18	19	20	Anfotericina B
<i>C. albicans</i>	100	200	200	200	100	100	100	0,25
<i>C. krusei</i>	200	200	200	200	100	100	100	1
<i>C. glabrata</i>	200	200	100	50	100	200	100	0,5
<i>C. parapsilosis</i>	200	200	200	200	NT	NT	200	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	200	200	200	200	200	200	100	0,25

Os compostos **22** (agastinoflavona) e **23** (7,7' hidroxí-bicumarina) oriundos da fração acetato de etila, mostraram resultados promissores, pois foram ativos para todos os fungos testados. O composto **22** apresentou atividade moderada com CIM em 100 µg/mL para todas as cepas com exceção da *C. glabrata* que apresentou sensibilidade significativa com CIM em 6,25. Em relação ao **23** *C. albicans* e *C. neoformans* apresentaram mais sensibilidade com CIM em 100 µg/mL, as outras espécies foram menos sensíveis, apresentando CIM em 200 µg/mL. Os resultados apresentados pelas substâncias isoladas no fracionamento dos frutos de *O. spectabilis* foram satisfatórios, pois nenhuma amostra foi inativa a todas cepas testadas.

Os dados mostram que as cepas fúngicas foram mais sensíveis, pois o número de amostras com concentração inibitória mínima >1000 para extrato, e frações >200 para os

compostos isolados, foi inferior aos relacionados no teste antibacteriano tanto para *B. tomentosa* quanto para *Ouratea spectabilis*. O resultado mostra que as cepas bacterianas são mais resistentes e por esta razão há dificuldade em encontrar substância com atividade antibacteriana para estes microorganismos.

5.2.3 Atividade anti-radicalar de *O. spectabilis*

O estudo químico dos frutos de *O. spectabilis* levou ao isolamento de seis biflavonas, uma lignana da série furofurânica, sete butanolídeos, um esteróide e uma diidrocurmarina.

O extrato etanólico dos frutos de *O. spectabilis*, assim como as frações, subfrações e compostos isolados foram avaliados em ensaio antioxidante usando o método do DPPH.

Embora sejam considerados compostos fenólicos, os biflavonoides (**8** a **12** e **22**), as lignanas (**6**, **7**, **13A**) e a curmarina (**23**) não mostraram atividade sequestradora de radical livre. Em relação aos butanolídeos a explicação pode estar na ausência da hidroxila fenólica e por serem compostos de baixa polaridade.

O biflavonoide I3–II8 biapigenina apresentou atividade inibitória de oxigênio reativo (DEMIRKIRAN *et al.*, 2009); esta substância também foi avaliada quanto atividade antioxidante pelo método de DPPH e apresentou o melhor resultado entre os seis compostos fenólicos testados (CAKIR *et al.*, 2003).

No entanto, assim como no presente trabalho esta mesma substância, a I3-II8 biapigenina, em ensaio antioxidante, usando método do DPPH, foi inativa (SILVA; MALVA; DIAS, 2008),

6 CONCLUSÃO

O estudo do extrato etanólico, frações, subfrações dos frutos de *B. tomentosa* e *O. spectabilis* conduziu ao isolamento de vinte e três compostos, que apresentaram atividade antibacteriana, antifúngica e anti-radicalar.

Do extrato etanólico do fruto de *B. tomentosa* foram isolados ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis e lignana furofurânica e de *O. spectabilis*, biflavonoides, lignana furofurânica, butanolídeos, esteroide e diidrocurmarina.

No fracionamento dos frutos de *B. tomentosa* foram isoladas sete substâncias, destas o composto **5** (buchenavina) está sendo relatado pela primeira vez na literatura.

A pesquisa com os frutos de *O. spectabilis* conduziu ao isolamento de dezesseis compostos, e destes, três são inéditos: o **10** (7,7' dimetilavolkensiflavona), o **14** (isochinosídeo A) e o **23** (7,7'-diidróxi-3,3'-bi-diidrocurmarina).

Alguns compostos são inéditos na espécie ou na família: o pinoresinol (**6**) e o epipinoresinol (**7**) em *B. tomentosa*, e em *O. spectabilis* foi registrado pela primeira vez o composto **8** (7'' metil- agastiflavona), o I-3-II-8 biapigenina (**12**) e o isômero do pinoresinol (**13**). Quanto aos butanolídeos, estes estão sendo relatados pela primeira vez na família Ochnaceae, o composto **17** (isolinderanolídeo), já foi isolado em Lauraceae.

Os compostos fenólicos isolados da fração acetato de etila de *B. tomentosa* foram mais significativos no ensaio antifúngico, enquanto que na atividade antibacteriana foram os menos polares isolados da fração diclorometânica e hexânica de *O. spectabilis*.

Os resultados mais significativos frente à atividade antibacteriana foram registrados para os compostos isolados de *O. spectabilis* contra a bactéria *E. faecalis*. Os compostos 7,7''-dimetoxi-agastiflavona (**11**); seco-isochinosídeo (**16**) e isochinosídeo (**17**) apresentaram CIM de 25µg/mL.

Quanto à atividade antifúngica, substâncias de *B. tomentosa* foram mais promissoras, sendo que se destacaram a corilagina (**4**) com CIM em 1,56 µg/mL contra *C. parapsilosis* e a buchenavina (**5**) com atividade de 3,12 µg/mL frente a *C. glabrata*.

No teste anti-radicalar somente *B. tomentosa* apresentou atividade destacando o resultado da subfração 70-89 ($5,28 \pm 0,54$ µg/mL) e dos compostos isolados; a mistura de galato de etila e galato de metila (**1/2**) com Cl_{50} em $8,4 \pm 0,13$ µM, a buchenavina (**5**) ($Cl_{50} = 10,4 \pm 0,24$), e a corilagina (**4**) que foi mais eficiente com Cl_{50} em $1,72 \pm 0,09$ µM, oito vezes mais baixo que o padrão.

O composto mais significativo foi o **4** (corilagina), com excelentes atividades antifúngica (CIM variando entre 50 a 1,56 $\mu\text{g}/\text{M}$) e anti-radicalar (Cl_{50} em $1,72 \pm 0,09\mu\text{M}$).

O composto inédito buchenavina (**5**) também apresentou resultado promissor para atividade antifúngica com exceção de *C. albicans*, encontrando-se os valores de CIM entre 25 a 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e anti-radicalar com Cl_{50} em $10,4 \pm 0,24$ abaixo portanto, do observado para o controle positivo.

Na atividade antibacteriana nenhum composto se destacou, em razão das cepas serem mais resistentes. Os resultados variaram de um excelente CIM a inativo ou moderado para o mesmo composto.

A cepa mais resistente foi a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* com 58% das amostras inativas, e a menos resistente foi o fungo *Cryptococcus neoformans* com apenas 6% de amostras inativas.

Pode-se considerar que os produtos dos frutos de *B. tomentosa* foram mais significativos por apresentarem atividade antimicrobiana e anti-radicalar (DPPH) enquanto os de *O. spectabilis* apenas atividade antimicrobiana.

As atividades biológicas de *B. tomentosa* e *O. spectabilis* evidenciaram a possível utilização destas espécies do cerrado na medicina popular, determinando a importância das mesmas no cenário farmacológico.

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento dos metabólitos secundários e das atividades biológica e química de duas espécies do cerrado, sendo que algumas substâncias são inéditas, os compostos **5**, **10**, **14** e o **23** e outras são pela primeira vez obtidas nas duas espécies.

REFERÊNCIAS

- ADONIZIO AL, DOWNUM K, BENNETT BC MATHEE K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plant in southern Florida. J. Ethnopharmacol. 2006; 105: 427-435.
- AGRAWAL PK, THAKUR RS. ¹³C NMR spectroscopy of Lingnan and Neolignan derivatives. Magn. Reson. chem. 1985; 26(6): 389 – 418.
- AGRAWAL PK, MARKHAM KR. Introduction. In: AGRAWAL PK. Studies in Organic Chemistry: Carbon -13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier: v.39;1989. p.1-39.
- AGRAWAL PK, BANSAL M. Other flavonoids In: Studies in Organic Chemistry: Carbon - 13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier: v.39; 1989. p. 237-280.
- ALI H, KÖNIG GM, KHALID SA WRIGHT AD, KAMINSKY R. Evalution of selected Sudanenes medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. J. Ethnopharmacol. 2002; 83: 219 – 228.
- ALMEIDA SCX de, LEMOS TLG de, SILVEIRA ER, PESSOA ODL. Constituintes Químicos voláteis e não voláteis de *Cochlospermum vitifolium* (Willidenow) Sprengel. Quim. Nova. 2005; 28(1): 57-60.
- ALVES PM, LEITEHAS, PEREIRA JV, PEREIRA LF, PEREIRA MSV, HIGINO JS, LIMA OE. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. Rev. Bras. Farmacog. 2006; 16(2): 192-196.
- ANDERSON JE, WENWEN M, SMITH DL, CHANG CJ, McLAUGH JL. Biologically activie γ -lactone and metylcetoalkenes from *Lindera Benzoin*. J. Nat. Prod. 1992; 55(1): 71-83.
- ANGEH JE, HUANG X, SATTTLER I, SWAN GE, DAHSE H, HÄRTL A, ELOFF JN. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of four known and one new triterpenoid from *Combretum imberbe* (Combretaceae). J. Ethnopharmacol. 2007a; 110: 56-60.

ANGEH EJ, HUANG X, SWAN GE, MÖLLMAN U, SATTLER I ELOFF JN. Novel antibacterial triterpenoids from *Combretum padoides* (Combretaceae). Arkivoc. 2007b; (ix): 113 -120.

ANURADHA VG, SRINIVAS PV, RAO RR, MANJULATHA K, PUROHIT MG, RAO JM. Isolation and synthesis of analgesic and anti-inflammatory compound from *Ochna squarosa* L. Bioorg. Med. Chem. 2006; 14: 6820 -6826.

ATTANASIO CM, RODRIGUES RR, GANDOLFI S, NAVE AG. A degradação ambiental de propriedades rurais recuperação de áreas degradadas, restauração de matas ciliares [Apostila]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”-Universidade de São Paulo; 2006.

ARAÚJO SAC, TEIXEIRA MFS, DANTAS MFS, DANTAS TVM , MELO VSP, LIMA FGS, RICARTE ARF et al. Usos potenciais de *Melia azedarach* L. (Meliaceae): Um levantamento. Arq. Inst.Biol. 2009; 76(1): 141- 148.

ARAÚJO DS, CHAVES, MH. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. Quim. Nova. 2005; 28(6): 996-999.

BABA-MOUSSA F, AKPAGANA K, BOUCHET P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. J. Ethnopharmacol.1999; 66: 335-338.

BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim. Nova. 2006; 29: 113-123.

BARROSO GM. Sistemática de angiosperma do Brasil: Viçosa, UFU Editora; vol.2: 1991.

BATAWILA K, KOKOU K, KOUMAGLO K, GBEASSOR M, FOUCAULT B de, BOUCHET PH, AKPAGANA K. Antifungal activities of five Combretaceae used in Togolose tradicional medicine. Fitoterapia. 2005; 76: 264-268.

BATISTA AL. Estudo fitoquímico das folhas e casca de *Nectandra cuspidata* (Ness) Lauraceae. [Dissertação de Mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- Departamento de Química; 2001.

BERA D, LAHURI D, LEONARDIS A de; DE KB, NAG A. Biotechnological applications in agriculture: A new source of edible oil and production of bio fertilizer and antioxidant from its by – products. J. Food Eng. 2007; 81: 688- 692.

BERLINCK RGS, HATANO T, OKUDA T, YOSHIDA T. Hidrolyzable tannins and related Polyphenols. In: Zechmeister L, Herz W, editors. Prog. Chem. Organ. Nat. Prod. 1995; 66: 1-102.

BERNARDES PS, FERREIRA DT. Química de plantas psicotrópicas místicas. [Homepage na Internet]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2007; 2: 1-14. [Acesso em julho/2009] Disponível em: <http://www2uel.brrevista/afroatitudeana>.

BERNARDO WL de C, BARIOLLO MFG, GONCALVEZ RB, HÖFLING JF. *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the odontological clinic environment. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 2005; 47(1): 19 – 24.

BEUTLER JA, CARDELLINA II, JH, McMAHON JB, BOYD MR. Anti – HIV and cytotoxic alkaloids from *Buchenavia capitata*. J. Nat. Prod. 1992; 55(2): 207 -213.

BIANCHI MLP, ANTUNES LMG. Radicais Livres e os principais antioxidantes a dieta Rev. Nutr. 1999; 12(2): 123-130.

BISOLI E, GARCEZ WS, HARMERSKI L, TIEPPO C, GARCEZ FR. Bioactive pentacyclic triterpenes from stem the of *Combretum laxum*. Molecules. 2008; 13: 2717-2728.

BIZIMANA N, TIETJEN U, ZESSIN K, DIALLO D, DJIBRIL C, MELZIG MF, CLAUSEN P. Evaluation of medicinal plants from Mali for their in vitro and vivo trypanocidal activity. J. Ethnopharmacol. 2006; 103: 350-356.

BOATTO HF, MORAES MS de, MACHADO AP, GRÃO MJBC, FISCHMAN O. Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2007; 29 (2): 80-84.

BOUCHET N, LEVESQUE J, BLOND A, BODO B, POUSET J. 1,3-DI-O-Galloylquinic acid from *Guiera senegalensis*. Phytochemistry. 1996; 42(1): 189 -190.

BROINIZI PRB, ANDRADE-WARTHA ERS de, SILVA AM de O e, TORRES RP, AZEREDO HMC, ALVES RE, MANCINI-FILHO J. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a liporeoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. Rev. Bras. Ciênc. Farm. 2008, 44(4): 773-781.

CAKIR A, MAVI A, YILDIRIM A, DURU ME, HARMADAN M, KAZAZ C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. J. Ethnopharmacol. 2003; 87: 73 – 83.

CAMARGO ILBC. Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* sp isolados no Brasil. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2005.

CARBONARI KA. Avaliação do efeito citoprotetor do extrato bruto e frações de plantas contra danos oxidativos. [Resumo expandido] Fórum Internacional: Integração de cidadania; Santo Ângelo: Universidade Regional Integrada do alto Uruguai e das Missões; 2006: p.3.

CARBONEZI CA, HAMERSKI L, GUNATILAKA AAL, CAVALHEIRO A, CASTRO-GAMBA I, SILVA DHS. et al. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). Rev. Bras. Farmacog. 2007; 17(3): 319 -324.

CARVALHO JA DE, TEIXEIRA SRF, CARVALHO MP DE, VIEIRA V, ALVES FA. Doenças emergentes: uma análise sobre a relação do homem com o seu ambiente. Rev. Práxis. 2009; 1(1): 19-23.

CERUKS M, ROMOFF P, FÁVERO OA, LAGO JH. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Quim. Nova. 2007; 30(3): 597- 599.

CHANG MR, CARVALHO NC, OLIVEIRA AL, MONCADA PM, MORAES BA, ASENÍ MD. Surveillance of pediatric infections in a teaching hospital in Mato Grosso do Sul. Braz. J. Infect. Dis. 2003; 7(2): 149-60.

CHANG MR, CORREIA FP, COSTA LC, XAVIER PCN, PALHARES DB, TAIRA DL. et al *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. 2008; 50(5): 265-268.

CHEN CY, CHEN CH, LO YC, WU BN, WANG HM, LO LW. et al. Anticancer activity of Isoobtusilactone A from *Cinnamomum kotoense*: Involvement of apoptosis, cell – cycle dysregulation, mitochondria regulation, and reactive oxygen species. J. Nat. Prod. 2008; 71(6): 923- 940.

CHEN CY, CHEN CH, WONG CH, LIU YW, LIN YS, WANG YD, HSIU YR. Cytotoxic constituents of the stems of *Cinnamomum subaveniun*. J. Nat. Prod. 2007; 70: 103 – 106.

CHENG H, LIN WY, CHANG YD, KUO HL , TSAI L, CHEN HS. New Cytotoxic butanolides from *Litsea acutivena* J. Nat. Prod. 2001; 64(12): 1502 – 1505.

CHENG H, LIN C, LIN T. Antiherpes simplex virus types 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. Antivir. Res. 2002; 55: 447-455.

CHU A, DINKOVA A, DARVIN LB, BEDGA DL, LEWIS NG. Stereospecificity of (+) – Pinoresinol and (+)- Lariceresinol reductase from *Forsythia intermedia* J. Biol. Chem. 1993; 268(36): 27026-27033.

CHYAU C, KO P, MAU J. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. Food Sci. Technol-LEB. 2006; 39: 1099 - 1108.

COLOMBO AL; GUIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; 36: 599-607.

COLOMBO R, BATISTA AN de, TELES HL, SILVA GH, BOMFIM GCC, BURGOS RCR. et al. Validated HPLC method for the standardization of *Phyllanthus niruri* (Herb and commercial extract) using corilagin as a phytochemical marker. Biomed. Chromatogr. 2009; 23: 573-580.

CONRAD J, VOGLER B, KLAIBER I, ROOS G, WALTER U, KRAUS W. Two Triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. Phytochemistry. 1998; 48(4): 647-650.

CURSINO L, SOUZA EC, NASCIMENTO AMA. Synergic interaction between ascorbic acid and antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*. Braz. Arch. Biol. Techn. 2005; 48(3): 379 -384.

DANIEL JF de S, CARVALHO MG de, CARDOSO R da S, AGRA M de F, EBERLIN, MN. Other flavanoides from *Ouratea Hexaperma* (Ochnaceae) J. Braz Chem. Soc. 2005; 16(38): 634 -638.

DANIEL JF de, ALVES CCF, GRIVICICH I, ROCHA AB da, DE CARVALHO MG. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouratea* and *Luxemburgia* on human câncer cell lines. Indian J. Pharmacol. 2007; 39 (4): 184 -186.

DE CARVALHO MG de, ALBUQUERQUE LRM de, MENDES L de S, GUILHON GMSP, RODRIGUES ST. Biflavonoids and Terpenoids isolated from the leaves of *Ouratea microdonta* Engl. (Ochnaceae). Rev. Latinoamer. Quim. 2008a; 36(3): 71- 75.

DE CARVALHO MG de, ALVES CCF, SILVA KGS da, EBERLIN MN, WERLE AA. Luxenchalcone, a new bichalcone and other constituents from *Luxemburgia octandra*. J. Braz. Chem. Soc. 2004; 15(1): 146 – 149.

DE CARVALHO MG de, ALVES CCF, WERLE AA, BRAZ-FILHO R. Metabólitos especiais isolados de *Losengue ereta* (Apocynaceae). Rev. Bras. Farmacog. 2006a; 16(4): 497-500.

DE CARVALHO MG, CARVALHO GJA, BRAZ-FILHO R. Chemical constituents from *Ouratea floribunda*: Complete ¹H and ¹³C assignments of atranorin and its new acetyl derivative. J. Braz. Chem. Soc. 2000; 11(2): 143-147.

DE CARVALHO MG de, GOMES MS do R, PEREIRA AHF, DANIEL JF de S, SCHRIPISEMA J. Carbon-13 and próton NMR assignmentes of a new agasthisflavone derivative. Magn. Reson. Chem. 2006b; 44: 35- 37.

DE CARVALHO MG de, SUZART LR, CAVATTI LC, KAPLAN MAC. New Flavonoids and other constituents from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). J. Braz. Chem. Soc. 2008b; 19(7): 1423-1428.

DEMIRKIRAN O, MESAİK MA, BEYNEK H, ABBASKHAN A, CHOUDHARY MI. Celular reative oxygen species inhibitory constituents of *Hypericum Thaxium* Griseb. Phytochemistry. 2009; 70: 244-249.

DIZBAY M, KALBAMCI A, SEZER BE, AKTAS F, AYDOGAN S, FIDAN I et al. Molecular investigation of fungemia outbreak due to *Candida parapsilosis* in an intensive care unit. Braz. J. Infect. Dis. 2008; 12(5): 395 – 399.

DWIVEDI, S. *Terminalia arjuna* wight & Arn- A useful drug for cardiovascular disorders. J. Ethnopharmacol. 2007; 114: 114-129.

ELDEEN IMS, ELGORASHI EE, MULHOLLAND DA, STADEN JV. Anolignan B: A bioactive compound from the roots of *Terminalia sericea*. J. Ethnopharmacol. 2006; 103:135-138.

ELOFF JN, FAMAKIN JO, KATERERE DRP. *Combretum woodii* (Combretaceae) leaf extracts have activity agaist gram-negative and gram-positive bacteria. Afr. J. Biotechnol. 2005; 4(10): 1161-1166.

ESTEVAM CS, OLIVEIRA FM, CONSERVA LM, LIMA LDFCO, BARROS ECP, BARROS ACP et al. Constituintes químicos e avaliação preliminar “in vivo” da atividade antimalárica de *Ouratea nitida* Aubl. (Ochnaceae). Rev. Bras. Farmacogn. 2005; 15(3): 195-198.

FACUNDO VA, RIOS KA, MEDEIROS CM, MILITÃO JST, MIRANDA ALP, EPIFANIO R de A. et al. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential mult-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorder: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities. J. Braz. Chem. Soc. 2005; 16(6B): 1309-1312.

FANCI R, GUIDI S, BONOLIS M, BOSI A. *Candida krusei* fungemia in an unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplant patient successfully treated with caspofungin Bone Marrow Transpl. 2005; 35: 1215 – 1216.

FELICIO JD, GONÇALVEZ E, BRAGGIO MM; CONSTANTINO L, ALBASINI A, LINS AP. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. Planta Med. 1995; 61: 217 – 220.

FELICIO J D, ROSSI M H, PARK H R, GONÇALVEZ E, BRAGGIO MM, DAVID J M, CORDEIRO I. Bioflavonoids from *Ouratea multiflora*. Fitoterapia. 2001; 72: 453- 455.

FERNANDES RD, NEPOMUCENO D de D, SOUZA MMS de, BARONI F de A, CAMPOS SG de, AGRA M de F. et al. Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica do extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* Var. *planchonii* Engl. In: XII INIC, VII EPG, II INC Jr. Anais; 2008; Jacaré, São Paulo: INIC, VII EPG, II INC Jr; 2008. p.4.

FINI L, HOTCHKISS E, FOGLIANO V, GRAZIANI G, ROMANO M, UOL E B de et al. Chemopreventive properties of pinoresinol- rich. Olive oil involve a selective activation of the ATM- p. 53 cascade in colon cancer cell line. Carcinogenesis. 2008; 29(1): 139- 146.

FIOT J, SANON S, AZAS N, MAHIOU V, JANSEN O, ANGHNOT L. Phytochemical and pharmacological study of root and leaves of *Guirea senegalensis*, J.F. Gmel (Combretaceae). J. Ethnopharmacol. 2006; 106: 173 -178.

FUENTEFRÍA DB, FERREIRA AE, GRÄF T, CORCÃO G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana: disseminação de resistência antimicrobiana em efluentes hospitalar e água superficial. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2008; 41(5): 470 -473.

FUKUDA EK, VASCONCELOS AFD, MATIAS AC, BARBOSA A de M, DEKKER RF H, SILVA M de LC. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization Ciênc. Agrárias. 2009; 30(1): 117- 134.

FURTADO GHC, MARTINS ST, COUTINHO AP, SOARES GMM, WEY SB, MEDEIROS EAS. Incidência de enterococcus resistente à vancomicina em hospitais universitários no Brasil. Rev. Saúde Pública. 2005; 39(1): 41-46.

FYHRQUIST P, MWIASUMBI L, HAEGGSTRÖM CA, VUORELA H, HILTUNEN R, VUORELA P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. J. Ethnopharmacol. 2002; (79): 169-177.

GERMANÓ MP, D'ANGELO V, BIASINI T, MIANO TC, BRACA A, DE LEO M de. et al. Anti-ulcer, anti-inflammatory and antioxidant activities of the n-butanol fraction from *Pteleopsis suberosa* stem bark. J. Ethnopharmacol. 2008;115: 271-275.

GOHAR AA, LAHLOUB MF, NIWA M. Antibacterial polyphenol from *Erodium glaucophyllum* Z. Naturforsch 2003; 58c : 670- 674.

GONÇALVEZ E, FELICIO JD, PINTO MM. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. Braz J. Med Biol Res. 2001; 34(11): 1453-1456.

GOVINDARAJAN R, VIJAYAKUMA M, SINGH M, RAO CV, SHIRWAIKAR A, RAWAT AKS, PUSHPANGADAN P. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. J. Ethnopharmacol. 2006; 106: 57-61.

GRÄF T, FUENTEFRÍA DB, CORCÃO G. Ocorrência de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes produtoras de metalo- β -lactamase blaSPM-1 em amostras clínicas. Rev.Soc. Bras. Med. Trop. 2008; 41(3): 306 – 308.

GUILARDE AO, TURCHI MD, MARTELLI CMT, PRIMO MGB, BATISTA LJ de A. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. Rev. Assoc. Med. Bras. 2007; 53 (1): 34-38.

GUINTA A do PN, LACERDA RA. Inspeção dos programas de controle de infecção hospitalar dos serviços de saúde pela vigilância sanitária: diagnóstico da situação. Rev. Esc. Enferm. USP. 2006; 40(1): 64-70.

HAYASHI KI, NAKANISH Y, BASTOW KF, CRAGG G, NOZAKI H, LEE KH. Antitumor agent. 221. Buceracidins A and B, two flavanones from *Bucida buccera*. J. Nat. Prod. 2003; 66(1): 125 -127.

HAYASHI KI, NAKANISH Y, BASTOW KF, CRAGG G, NOZAKI H, LEE KH. Antitumor agent. Part. 212: Bucidasins A C, three new cytotoxic clerodane diterpenes from *Bucida bucceras*. Bioorg. & Med.Chem. Lett. 2002; 12: 345- 348.

HAYDER N, BOUHLEL I, SKANDRANI I, KADRI M, STEIMAN R, GUIRAUD P. et al. “In vitro” antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray.Toxicol “in Vitro”. 2008; 22(3); 667-581.

HE Z, XIA W, CHEN J. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds in Chinese olive (*Canarium album* L) fruits. Eur. Food Res. Technol. 2008; 226:1191-1196.

IBE AE, NWUFO MI. Identification, collection and domestication of medicinal plants in Southeastern Nigeria. Afr. Dev. 2005; 30(3): 66 -77.

ISACCHI B, GALEOTTI N, BERGONZI MC, GHELARDINI C, BILIA AR, Vinceri Pharmacological in vivo test to Evaluate the Bioavailability of some St. John’s wort Innovative Oral Preparations. Phytotherapy Res. 2009; 23: 197- 205.

KANDIL FE, NASSAR MI. A Tannin anti-cancer promoter from *Terminalia arjuna*. Phytochemistry. 1997; 47(8): 1567-1568.

KAYODE J, Conservation of indigenous medicinal botanical in Ekiti State, Nigeria. J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2006; 7(9): 713 – 718.

KHANBABAEE K; VAN REE T. Tannins: classification and definition. Nat. Prod. Rep. 2001; 18: 641-649.

KIM HP, PARK H, SON SH, CHANG HW, KANG SS. Biochemical pharmacology of Biflavonoids: Implications for anti-inflammatory actions. Arch. Pharm. Res. 2008; 31(3) 265-273.

KINOSHITA S, INOUE Y, NAKAMA S, ICHIBA T, ANIYA Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. *Phytomedicine*. 2007; 14: 755- 762.

KOŁODZIEJ H, RADTKE OA, KIDERLEN AF. Stimulus (polyphenol, IFN- γ , LPS)-dependent nitric oxide production and antileishmanial effects in RAW 246.7 macrophages *Phytochemistry*. 2008; 69: 3103- 3110.

KUO S, HSIEH T, WANG Y, LO W, HSUI Y, CHEN C. Cytotoxic constituents from the leaves of *Cinnamomum subavenium*. *Chem Pharm. Bull.* 2008; 56 (1): 97-101.

LAMIEN CE, MEDA A, MANS J, ROMITO M, NACOUUMA OG, VILJOEN GJ. Inhibition of fowlpox virus by an aqueous acetone extract from galls of *Guiera senegalensis*. J.F. Gmel (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.* 2005; 96: 249-253.

LATTÉ KP, KOŁODZIEJ H. Pelargoniins, new ellagitannins from *Pelargonium reniforme*. *Phytochemistry*. 2000; 54: 701-08.

LEO M de, TOMMASI N de, SANOGO R, D'ANGELO V, GERMANÓ MP, BISIGNANO G, BRACA A. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochemistry*. 2006; 67: 2623-2629.

LI X, JOSHI AS, ELSOHL Y HN, KHAN SI, JACOB MR ZHIZHING Z. et al. Fatty acid synthase inhibitors from plants: Isolation, structure elucidation and SAR studies. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 1909-1914.

LIKHITWITAYAWUID K, KAEWMATAWONG R, RUANGRUNSGSI N. Mono- and biflavonoids of *Ochna integerrima*. *Biochem. System. Ecol.* 2005; 33: 527 – 536.

LIKHITWITAYAWUID K, RUNGRUERICHAI IR, RUANGRUNSGSI N, PHANDUNGCHAROEN T. Flavonoids from *Ochna integerrima*. *Phytochemistry*. 2001; 57: 579 -586.

LINDENBERG A de SC, CHANG MR, PANIAGO AMM, LAZÉRA M dos S, MONCADA PMF, BONFIM G.F. et al. Clinical and epidemiological feature of 123 cases of Cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2008; 50(2): 75-78.

- LOBSTEIN A, WENIGER B, UM BH, VONTHRON C, ALZATE F, ANTON R. Polyphenols from *Cespedesia spathulata* and *Cespedesia macrophylla* (Ochnaceae). *Bioch. Syst. Ecol.* 2004; 32: 229 - 31.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2º Ed. Nova Odessa. Instituto Plantarum; vol 2: 2002.
- MACÊDO DPC, SILVA VKA DA, FARIA AM DE A, MELO LRB DE, WILLEIM AB, NEVES RP. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management. *Brasilian. J. Microbiol.* 2008; 39: 279-281.
- MACÊDO DPC, FARIAS AM DE A, LIMA NETO RG DE, SILVA VKA DA, LEAL AFG, NEVES RP. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos aentes etiológicos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009; 42(2): 189-191.
- MAHMOUD EN, KHALID SA. 5-Methyldihydro flavasperone, a dihydronaphtopyra, from *Guirea senegalensis*. *Phytochemistry.*1997; 46(4): 793-794.
- MALUCHE ME, SANTOS JI dos. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. *Rev.Bras. Anal. Clin.* 2008; 40(1): 65 – 67.
- MANGA SSE, MESSANGA BB, SONDENGAM BL. 7,8 Dihydrobenzofuranones from *Ouratea reticulata*. *Fitoterapia.* 2001;72: 706 – 708.
- MARIUTTI LRB, BRAGAGNOLO N. Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae. Aplicação em Produtos alimentícios. *Braz J. Food Technol* 2007; 10(2): 96- 103.
- MARTINI ND, KATERERE DRP, ELOFF JN. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.* 2007; 93: 207-212.
- MARTINS EA, GERRER LV, CUNHA KC, SOARES MMCN, ALMEIDA MTG de, Onicomiose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007; 40(5); 596-598.
- MASOKO P, PICARD, J, ELOFF, JN. Anti fungal activities of six South African Terminalia species (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol.* 2005a; 99: 303- 308.

- MASOKO P, ELOFF JN. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (combretaceae) determined by bioautography. African J. Biotechnol. 2005b; 4(12) 1425 -1431.
- MATSUKAWA R, DUBINSKY Z, KISHIMOTO E, MASAKI P, MASUDA Y, TAKEUCHI T. et al. A Comparison of screening methods for Antioxidant Activity in seaweeds. J. Appl. Phycol. 1997; 9: 29–35.
- MBING JN, BASSOMO MY, PEGNYEMB DE, TIH RG, SONDEGAM BL, BLOND A, BODO B. Constituents of *Ouratea flava*. Bioch. Syst. Ecol. 2003b; 31: 215- 217.
- MBING JN, PEGNYEMB DE, TIH R G, SONDEGAM BL, BLOND A, BODO B. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. Phytochemistry. 2003a; 63: 427- 431.
- MBING JN, ENGUEHARD-GUEIFFIER C, ATACHADÉ A DE T, ALLOUCHI H, GANGOUÉ-PIÉBOJI J, MBAFOR JT. Two biflavonoids from *Ouratea nigrovilaceae*. Phytochemistry. 2006; 67: 2666-2670.
- MILITÃO JSLT, ANDRADE CHS, SILVEIRA ER. Investigação química de *Thiloo glaucocarpa* e *Combretum* sp. Quím. Nova. 1993; 16(1): 35-39.
- MIRANDA JA. Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas [Dissertação de Mestrado]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2001.
- MITSCHE LA, BEAL JL, BATHALA MS, WU WN, WHITE R, LEU RP. Antimicrobial agents from higher - Plant 1. Introduction, rationale and methodology. Lloydia. 1972; 35(2): 157-161.
- MITUGUI CS, LOGNE MCB, CARRARA-MARRONE FE, GARCIA LB. Efeito antimicrobiano “in vitro” da associação de polimixina B e ceftazidina em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Ciênc. Cuid. Saude. 2008; 1 (Supl 7): 76 -81.
- MOCHIZUKI M, HASEGAWA N. Anti-inflammatory effect of extract of *Terminalia Sericea* Roots in an experimental model of colitis. J. Health Science. 2007; 53(3): 329-331.
- MONTEIRO JLM, ALBUQUERQUE ULP DE, ARAÚJO E DE L. Taninos uma abordagem da química à ecologia. Quím. Nova. 2005; 28(5): 892 -896.

- MOREIRA ACA, FALCÃO AFP, ANDRADE AP, SOUZA ER. Isolamento de *Candida parapsilosis* em pacientes com diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica. Rev. Cienc. Med. Biol. 2002; 1(1): 124 – 128.
- MOREIRA IC, CARVALHO MG de, BASTOS ABFO, BRAZ-FILHO R. A flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. Phytochemistry. 1999; 51: 833- 838.
- MOSHI MJ, MBWAMBO ZH. Some pharmacological properties of extracts of *Terminalia sericea* roots. J. Ethnopharmacol. 2005; 97: 43-47.
- MOURA MEB, RAMOS MN, SOUZA CMM de, SILVA AO, ALVES M DO S da CF. Infecção hospitalar no olhar de enfermeiros portugueses: Representações sociais. Texto Contexto Enferm. 2008;17(4): 743-9.
- MOYSÉS NETO M, COSTA RS, REIS MA, GARCIA TMP, FERRAZ AS, SABER LTS et al. Candidíase em pacientes transplantados renais. Rev. Soc. Bras. Med. Tropic. 1997; 30(6): 485-491.
- MURAKAMI A, OHIGASHI H, TANAKA S, HIROTA M, IRIE R, TAKEDA N et al. Bitter cyanoglucosides from *Lophira alata*. Phytochemistry. 1993; 32 (6): 1461-1466.
- MURAKAMI A, TANAKA S, OHIGASHI H, HIROTA M, IRIE R, TAKEDA N et al. Possible anti-tumour promoters: Bi- and tetraflavonoids from *Lophira alata*. Phytochemistry. 1992; 31(8): 2689 – 2693.
- NAGAPPA AN, THAKURDESAI PA, RAO NV, SINGHI J. Antidiabetic activity of *Terminalia Catappa* Linn. fruits. J. Ethnopharmacol. 2003; 88: 45-50.
- NCCLS- National –Committee for Clinical Clinical Laboratory Standards. Método de referência para teste de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma aprovada 2º Ed. Norma M27 A2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2002; 22(15): p.44.
- NCCLS- National –Committee for Clinical Clinical Laboratory Standards. NCCLS. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: Norma aprovada 6ª Ed. M7-A6. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2003; 23(2): p.81.

- NGOUNOU FN, RAHAMAN A, CHOUDHARY MI, MALIK S, ZAREEN S et al. Two saponins from *Pteleopsis hylodendron*. *Phytochemistry*. 1999; 52: 917-921.
- NOGUEIRA JCR, DINIZ M De FFM, LIMA EO, LIMA ZN. Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de microorganismo obtido de otite externa aguda. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2008; 74(4): 526-30.
- NOTKA F, MEIER G, WAGNER R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Research*. 2004; 64: 93-102.
- NUNES XP, MESQUITA RF, SILVA da, LIRA DP, COSTA VCO, SILVA MVB et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barney (Mimosaceae). *Rev. Bras. de Farmacog.* 2008; 18 (Supl.): 718-723.
- OKUNISHI T, UMEZAWA T, SHIMADA M. Stereochemistry of lignan biosynthesis in *Wikstroemia sikokiana*. *Wood Research*. 1997; 84: 25 – 26.
- OLIVEIRA AC de, SILVA RS DA. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev. Eletrônica e Enferma.* 2008; 10(1): 189 -197.
- OLIVEIRA FP de, LIMA E de O, JÚNIOR, JP de S, SOUZA EL de, SANTOS BHC, BARETO, HM. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbanaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strain isolated from clinical material. *Rev. Bras. Farmacog.* 2006; 16(4): 510-516.
- OLIVEIRA MCC de, CARVALHO MG de, SILVA CJ da, WERLE A. New biflavonoid and other constituents from *Luxemburgia nobilis* (Eichl) J. *Braz Chem. Soc.* 2002; 13(1): 119-123.
- OLIVEIRA AO, OLIVEIRA ALL, PONTES ERJC, OLIVEIRA SMVL, CUNHA RV. Epidemiologia da infecção hospitalar em unidades de terapia intensiva. *Rev. Panam Infectol.* 2009; 11(1): 32-7.
- PASQUALE R de, GERMANÓ MP, KEITA A, SANOGO R, IAUK L. Antiulcer activity of *Pteleopsis suberosa* J. *Ethnopharmacol.* 1995; 47: 55 – 58.
- PASSOS XS, SANTOS S da C, FERRI PH, FERNANDES, O de FL, PAULA T de F. et al. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35(6): 623 -627.

PAULA JE. Caracterização anatômica de madeiras nativas do cerrado com vista à produção de energia. *Cerne*. 1999; 5(2): 26- 40.

PEDROSO ERP, ROCHA MO DA C. Infecções emergentes e reemergentes. *Rev. Med. Minas Gerais*. 2009; 19 (2): 140-150.

PEDROSO ERP. Doenças emergentes reemergentes. *Rev. Med. Minas Gerais*. 1999; 9 (4): 153-160.

PEGNYEMB DE, TIH RG, SONDENGAM BL, BLOND A, BODO, B. Biflavonoids from *Ochina afzelii*. *Phytochemistry*. 2001; 57: 579 -586.

PEGNYEMB ED, MBING JN, ATCHADÉ A de T, TIH RG, SONDENGAN BL BLOND A, BODO B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. *Phytochemistry*. 2005; 66:1922 – 1926.

PETTIT GR, HOARD MS, DOUBEK DL, SCHMIDT JM, PETTIT RK, TACKETT LP, CHAPUIS J. Antineoplastic agents 338.The cancer cell growth inhibitory constituents of *Terminalia arjuna* (Combretaceae). *J. Ethnopharmacol*. 1996; 53: 57-63.

PIEME CA, DZOYEM JP, KECHIA FA, ETOA FX, PENLAP V. “In vitro” antimicrobial activity of extratcts from some Cameroonian medicinal plants *J. Biol. Sci*. 2008; 8(5): 902 - 907.

PINHEIRO MRS, LACERDA HR, MELO RGL, MACIEL MA. *Pseudomonas aeruginosa* infections: factors relating to mortality with emphasis on resistance pattern and antimicrobial treatment. *Bras. J. Infec. Dis*. 2008; 12(6): 509 -515.

PINTO GAS, COUR S, LEITE SGF, BRITO ES. Tanase: conceitos, produção e aplicação. *Bol. Cent. Pesq. Proc. Alim*. 2005; 23(2): 435-462.

PISANI JUNIOR R, TONUCCI LR da S, INNOCENTINI MD de M. Inativação de *Pseudomonas aeruginosa* em resíduos de serviços de saúde por microondas. *Eng. Sanit. Ambient*. 2008; 13 (3): 284-290.

POTT A, POTT, VJ, SOBRINHO, ABB. Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal. IV simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal. Corumbá/MS. 2004; Nov: 23-26. Corumbá. Brasil. Mato Grosso do Sul. p.1-18.

POTT A, POTT, VJ. Plantas comestíveis e medicinais da Nhecolândia, Pantanal. Relatório. Embrapa. 1986; Set (4): 1-7.

RAO KV, SREERAMUU K, RAO CV, GUNASEKAR D, MARTIN MT, BODO B. Two new biflavonoids from *Ochina obtusata*. J. Nat. Prod. 1997; 60 (6): 632 -634.

REDDY BAK, REDDY NP, GUNASEKAR D, BLOND A, BODO B. Biflavonoids from *Ochna lanceolata*. Phytochemistry Letters. 2008; 1: 27 -30.

RIBEIRO CVC, KAPLAN MAC. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. Quim. Nova. 2002; 25(4): 533-8.

ROESLER R, MALTA LG, CARRASCO LC, HOLANDA RB, SOUZA CAS, PASTORE GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Cienc. Tecnol. Aliment. 2007; 27(1): 53 - 60.

RUFINO M do SM, ALVES RE, BRITO ES de, MORAIS SM de, SAMPAIO C de G, JIMÉNEZ JP, CALIXTO FDS. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura de Radical livre DPPH. Comunicado técnico. Embrapa. 2007; 127: 1- 4.

SAMARANAYAKE LP, *Candida krusei* infections and fluconazole therapy. Hong Kong Med. J. 1997; 3(3): 312-314.

SANTOS AL dos, SANTOS DO, FREITAS CC de, FERREIRA BLA, AFONSO LF, RODRIGUES CR, CASTRO HC. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. J.Bras. Patol. Med. Lab. 2007; 43(6): 413-423.

SARAVANAN S, SRIKUMAR R, MANIKANDAN S, PARTHASARATHY NJ, DEVI RS. Hypolipidemic effect of triphala in experimentally induced hypercholesteremic rats. Yakugaru zasshi-J. Pharm. Soc. Japan. 2007; 127(2): 385-388.

SAUDERS GL, BODONAIK NC, Resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* encountered at the University Hospital of the West Indies, Jamaica West. Indian Med. J. 2006; 55(3): 194-196.

SAXENA M, FARIDI U, MISHIRA R, DAROKAR M.P, SRIVASTAVA SK. Cytotoxic agents from *Terminalia arjuna*. Planta Med. 2007; 73: 1486-1490.

SCHROEDER FC, CAMPO ML del, GRANT JB, WEILBEL DB, SMEDLEY SR, BOLTON KL et al. Pinoresionol: A lignol of plant origin serving for defense in a Caterpillar. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006; 103(42): 15497- 15501.

SEKI K, SAZAKI T, WANO S, HAGA K, KANEKO R, Linderanolides and isolideranolides, ten butanolides from *Lidera glauca*. Phytochemistry. 1995; 40 (4): 1175-1181.

SHIN TY, JEON HJ, KIM DK, KIM SH, LEE JK, KIM DK. Inhibitory action of water soluble fractions of *Terminalia chebula* on systemic and local anaphylaxis. J. Ethnopharmacol. 2001; 74: 133-140.

SIBANDA S, NYANYIRA C, NICOLETTI M, GALEFF C. Vismiones L and M from *Ochna pulchra*. Phytochemistry. 1993; 34 (6): 1650 –1652.

SILVA BA, MALVA JO, DIAS, ACP. ST. JOHN’S wort (*Hypericum perforatum*) extract and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. Food chem. 2008; 110: 661-619.

SILVA JG da, SOUZA IA, HIGINO JS, SIQUEIRA-JUNIOR JP, PEREIRA JV, PEREIRA M do SV. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn em amostra multiresistente de *Staphylococcus aureus*. Rev. Bras. Farmacog. 2007; 17(4): 572-577.

SILVA O, DUARTE A, PIMENTAL M, VIEGAS S, BARROSO H, MACHADO J. et al. Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. J. Ethnopharmacol. 1997; 57: 203-207.

SILVA CG, HERDEIRO RS, MATHIAS CJ, PANEK AD, SILVEIRA CS, RODRIGUES VP. Evaluation of antioxidant activity of brazilian plants. Pharmacol. Res. 2005; 52: 229-233.

SILVA G.B, MARTUM L, SILVA CL DA, YOUNG MCM, LADEIRA AM. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do cerrado. Hoehnea 2006; 33(3): 331-338.

SILVA PR da, RABELO RA de S, TERRA APS, TERIXEIRA DNS. Suscetibilidade a antifúngicos de variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes em hospital universitário. Rev. Bras. Med. Trop. 2008; 41(2): 158–162.

SILVEIRA GP, NOME F, GESSER JC, SÁ MM. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. Quim. Nova. 2006; 29(4): 844-855.

SIMONI IC, FELICIO JD, GONÇALVES E, ROSSI MH. Avaliação da citotoxicidade de biflavonoides isolados de *Ouratea spectabilis* (Ochinaceae) em células de córnea de coelho SIRC. Arq. Inst. Biol. 2002; 69(4): 95- 97.

SOARES M, WELTER L, KUSKOSKI EM, GONZAGA L, FETT R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. Rev. Bras. Frutic. 2008; 30(1): 59–64.

SOARES SE. Ácidos fenólicos como antioxidante. Rev. Nutr. 2002; 15(1): 71 -81.

SOH PN, VICAL FB. Are west African plants a source of future antimalarial drugs? J. Ethnopharmacol. 2007; 114: 130 -140.

SOUZA VC, LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira. Baseado em APGII, Nova Odessa S.P, Instituto Plantarum, 2005, 465 p.

SOUZA TM, SEVERI JA, SILVA VYA, SANTOS E, PIETRO RCLR. Bioprospeccção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). Rev.Ciênc. Bas. Aplic. 2007; 28(2): 221-26.

SUZART LR, DANIEL JF de S, DE CARVALHO MG. Biodiversidade Flavonoica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochinaceae). Química Nova. 2007; 30 (4): 984-987.

SWAIN NA, BROWN RCD, BRUTON G. A versalite stereoselective synthesis of endo, exo-furofuranones: Application to the enantioselective synthesis of furofuran lignans. J. Org. Chem. 2004; 69:122-9.

TABOPDA TK, NGOUPAYO J, LIU J, ALI MS, KHAN SN, NGADJUI BT, LUU, B. α -glucosidase inhibitors ellagic acid and derivatives with immunoinhibitory properties from *Terminalia superba*. Chem. Pharm Bull. 2008; 56(6): 847-850.

TATSIS EC, BOEREN S, EXARCHOU V, TROGANIS AN, VERVOORT J, GEROTHANASSIS, IP. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/ SPE/ NMR and / or LC/ MS. Phytochemistry. 2007; 68: 383 -393.

TIH A, MARTIM M, TIH RG, VUIDEPOT I, SONDEGAM B, BODO B. Lophiroflavans B and C, tetraflavonoids of *Lophira alata*. Phytochemistry. 1992; 31(10): 3595–3599.

TORTORA GI, FUNKE BR, CASE AL. Princípio de doença e epidemiologia. In: Microbiologia. 8º ed. Porto Alegre; Editora Armed; 2005; 408-433.

TOUILLAUD MS, THIEBAUT ACM, FOURNIER A, NIRAVONG M, BOUTRON-RUALT M, CLAVEL-CHAPELON F. Dietary Lignan intake and postmenopausal breast cancer risk by estrone and progesterone receptor status J. Natl. Cancer Inst. 2007; 99: 475-486.

TURRINI RNT. Infecção hospitalar e mortalidade. Rev. Esc. Enferm. USP. 2002; 36(2): 177-83.

UENISHI K, SUDO A, ENDO T. Anionic alternating copolymerization behavior of bifunctional six-membered lactone and glycidyl phenyl ether. Polymer Chem. 2009; 47: 3662-68.

VALADARES YM, OLIVEIRA AB de, CORTES SF, LOMBARDI JA, BRAGA FC, Atividade vasodilatadora “in vitro” de espécie de *Ouratea* (Ochnaceae) e de frações de *Ouratea semiserrata* (Mat.) Engl. Rev. Bras. Ciênc. Farm. 2003; 39(1): 83-91.

VASCONCELOS LC de S, SAMPAIO FC, SAMPAIO MCC, FERREIRA M do SV, HIGINO JS, PEIXOTO MHP. Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (Pomegranate) Gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. Braz. Dent. J. 2006; 17 (3): 223-227.

VELANDIA JR, DE CARVALHO MG, BRAZ-FILHO R. Ácido Ent-16 α , 17 Diidroxicauran 19 óico isolado de *Ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C4 e C16. Quim. Nova. 1998; 21(4): 397-404.

WANNMACHER L, Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? Uso Racional de Medicamentos. 2004; 1(4) s/p.

WARD, R Lignans, neolignans and related compounds. Nat. Prod. Rep. 1995; 12(183): 43 - 74.

WAWER I, ZIELINSKA A. ¹³C CP-MAS-NMR studies of flavonoids. I solid-state conformation of quercetin, quercetin 5'-sulphonic acid and some simple polyphenols. Solid State Nucl. Mag. Res. 1997; 10: 33-38.

WINGETER MA, GUILHERMETTI E, SHINOBU CS, TAKAKI I, SVINDZINSKI IS. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isolada da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2007; 40(3): 272-276.

WETWITAYAKLUNG P, LIMMATVAPIRAT C, PHAECHAMUD T, KEOKITICHA S. Kinetics of acetylcholinesterase inhibition of *Quisqualis indica* Linn flower extract. Siepakorn U Sci. & tech J. 2007; v.1(2): 1-9.

YOSINAGA EL, SHINOBU CS, SVIDZINSKI AE, SVIDINSKI TIE. Um estudo preliminar sobre colonização por fungos em cateteres urinários. Arq. Apadec, 2004; 8(8): 1-6.

ZHANG Y, NAGAO T, TANAKA, T, YANG C, OKABE H, KOUNO I. Antiproliferative activity of the main constituents from *Phyllanthus emblica*. Biol. Pharm. Bull. 2004; 27(2): 251-255.

ZHANG X, XU JK, WANG J, WANG NL, KURIHARA H, KITANAKA S, YAO XS. Bioactive bibenzyl derivatives and fluorenones from *Dendrobium nobile*. J. Nat. Prod. 2007; 70(1): 24-8.

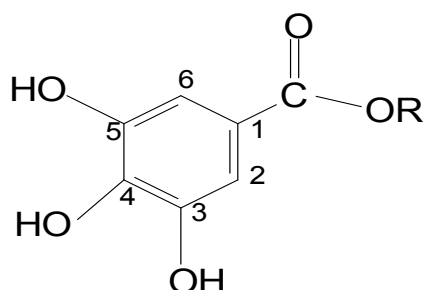
ZHAO L, ZHANG S, TAO J, PANG R, JIN F, GUO Y et al. Preliminary exploration on anti-inflammatory mechanism of corilagina (beta – 1 O-galloyl-3,6-(R)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose in vitro. Inter. Immopharmacol. 2008; 8: 1059 – 1064.

ZHENG G, XU L, WU P, XIE H, JIANG Y, CHEN F, WEI X. Polyphenols from longan seeds and their radical- scavenging activity. Food chem. 2009; 116: 433- 436.

ZINTCHEM AAA, ATCHADÉ A de T, TIH RG, MBAFOR JT, BOND A, PEGNYEMB D E, BODO B. Flavonoids from *Ouratea staudtii* Van Tiegh(ex keay) Ochnaceae. Bioch. 2007; 35: 255- 256.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Estruturas químicas e dados físicos e espectrais dos compostos isolados dos frutos de *Buchenavia tomentosa* e *Ouratea spectabilis*



Compostos **1**, **2** e **3**

1- R = CH₂CH₃ - Galato de etila

2- R = CH₃ - Galato de metila

3-R = OH – Ácido gálico

Composto **1** – Galato de etila

Sólido amorfo marrom

RMN ¹H - 300MHz, Metanol-*d*₄, δ: 1,34; 4,26; 7,04.

RMN ¹³C - 75 MHz Metanol-*d*₄, δ: 14,6; 61,6; 109,9; 121,7; 146, 4; 168,5.

Composto **2** – Galato de metila

Sólido amorfo marrom

RMN ¹H - 300MHz, Metanol-*d*₄, δ: 3,75; 7,02.

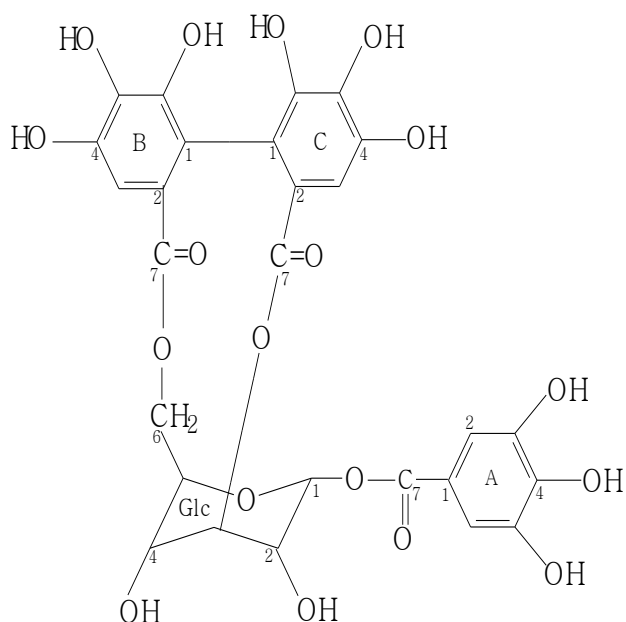
RMN ¹³C - 75 MHz Metanol-*d*₄, δ: 50,2; 108,6; 120,3; 138,3; 145,1; 167,1.

Composto **3** – Ácido gálico

Sólido amorfo marrom

RMN ¹H - 300MHz, Metanol-*d*₄, δ: 7,14

RMN ¹³C - 75 MHz, Metanol-*d*₄, δ: 109,1; 121,1; 137, 7; 145; 167,1.



Composto 4 – Corilagina

Sólido, amorfo, marrom

RMN ^1H – 300 MHz, Metanol- d_4 , δ : Glc - 3,98; 4,15; 4,46; 4,52; 4,80; 4,95; 6,35. Galoíl – 7,05.

HHDP (B) - 6,65. HHDP (C) – 6,69.

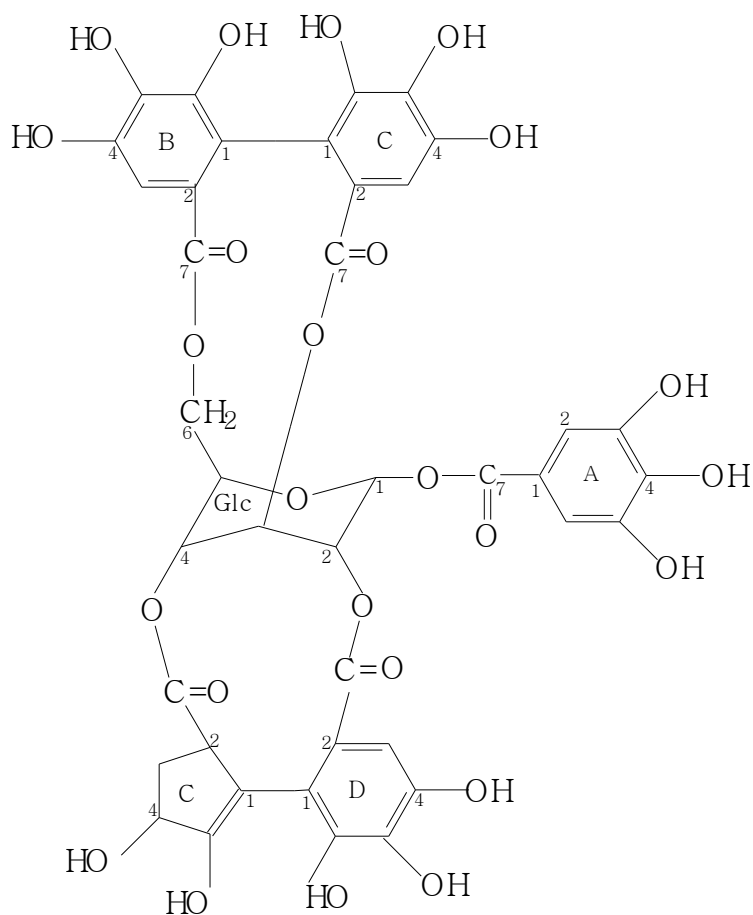
RMN ^{13}C – 75MHz, Metanol- d_4 δ : Glc – 62,4; 65,0; 69,4; 71,6; 76,2; 95,0. Galoíl – 110,6; 120,6;

140,4; 146,4; 166,7. HHDP (B) – 108,3; 116,8; 125,4; 137,7; 145,6; 146,0; 170,1. HHDP

(C) – 110,1; 117,2; 125,4; 138,2; 145,4; 146,0; 168,5.

IV (KBr) cm^{-1} = 3244, 2322, 1638, 1552, 1376, 1266

$[\alpha]_D^{20}$ - 92,70° MeOH



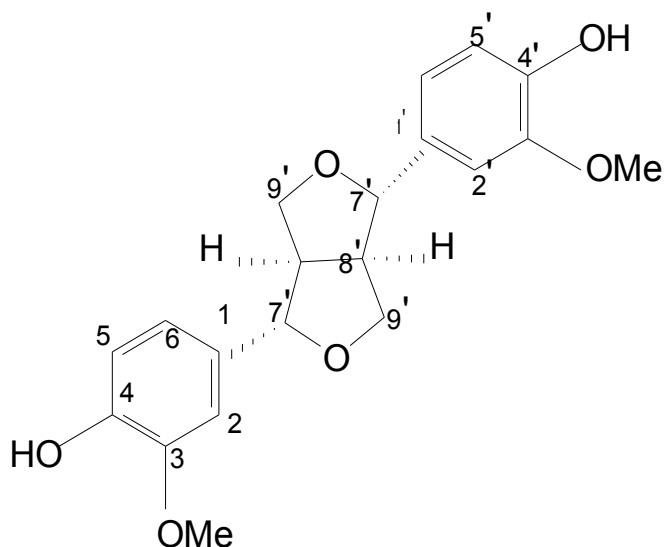
Composto 5 – Buchenavina

Sólido, amorfo, marrom

RMN ^1H – 300MHz, Metanol- d_4 , δ : Glc- 4,21, 4,50; 4,75; 4,97; 5,29; 5,62:6,29. Galoil – 7,01. HHDP (B) – 6,70. HHDP (C) – 6,45. HHDP (D) – 7,39. HHDP (E) – 2,00;4,75;4,79.

RMN ^{13}C – 75MHz, Metanol- d_4 , δ :Glc- 62,0;63,3; 66,0; 71,9;73,9;91,2. Galoil – 109,2; 117,8; 139,5; 145,7, 164,5. HHDP (B) – 107,3; 116,3; 122,4; 144,2; 145,5; 165,5. HHDP(C) – 106,4; 114,9; 122,4; 135,4; 143,9; 167,5. HHDP (D) – 114,7; 115,6; 123,1;139,5;145,9; 164,7. HHDP (E) – 30,7; 40,3; 65,0; 117,8; 140,3;169,5;172,9.

IV(KBr) cm^{-1} = 3388, 2908, 2324, 1674, 1552, 1264,1132



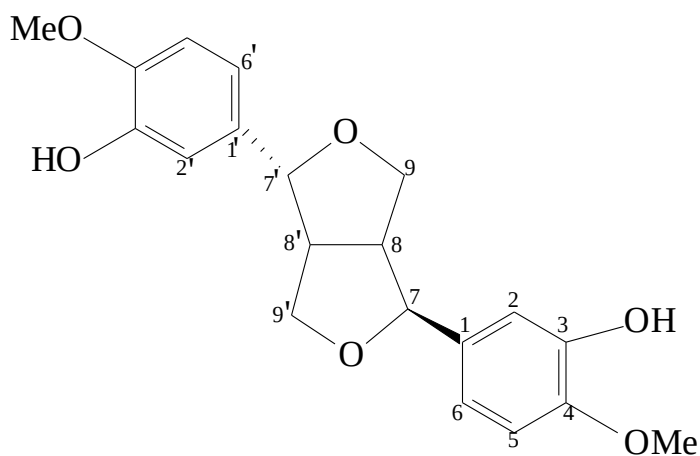
Composto **6** - Pinoresinol

Viscosa, incolor

RMN ^1H – 300MHz, Acetona- d_6 , δ : 3,08; 3,80; 3,84; 4,2; 4,67; 6,82; 6,77; 6,99.

RMN ^{13}C – 75MHz, Acetona- d_6 , δ : 55,33; 54,31; 71,30; 85,74; 109,74; 114,67; 118,88; 133,34; 146,01; 147,47.

IV (KBr) cm^{-1} = 3532, 3016, 2940, 1768, 1648, 1468, 1408.



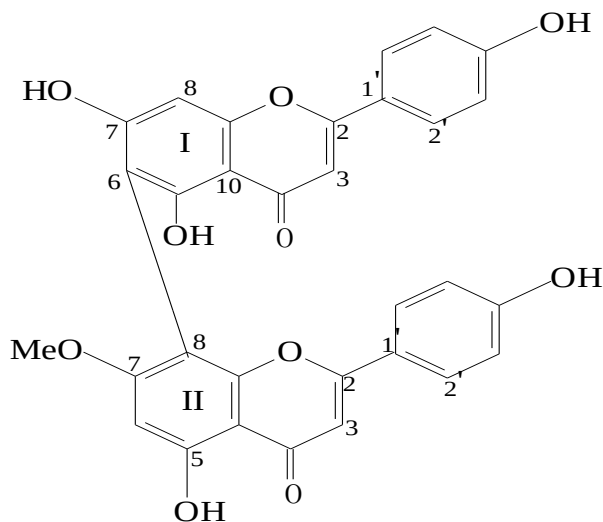
Composto **7** - Epipinoresinol

Viscosa, incolor

RMN ^1H – 300MHz, Acetona- d_6 , δ : 2,95; 3,17; 3,38; 3,77; 3,83; 4,08; 4,37; 4,82; 6,69; 6,79; 6,82.

RMN ^{13}C – 75MHz, Acetona- d_6 , δ : 50,93; 55,34; 55,56; 56,34; 70,11; 71,55; 82,75; 88,56; 110,69; 115,57; 134,20; 146,86; 148,00.

IV (KBr) cm^{-1} = 3532, 3016, 2940, 1768, 1648, 1468, 1408.



Composto **8** – 7” metil- agastiflavona

Sólido, amorfo, amarelo

RMN ^1H – 300MHz, MeOD, δ : 3,87; 6,58;6,61; 6,63;6,73; 6,76;6,94 6,97;7,55;7,58;7,89;7,92.

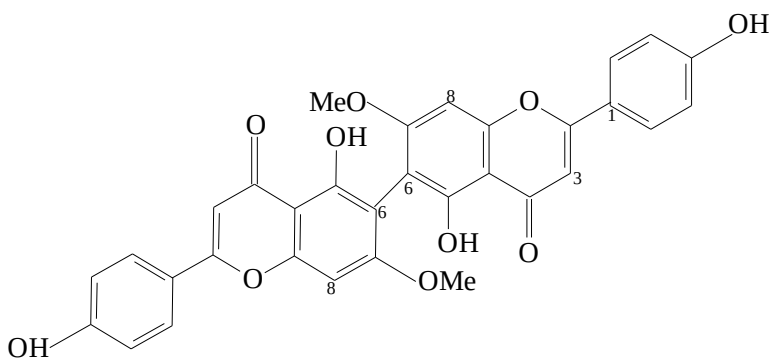
RMN ^{13}C – 75 MHz, MeOD, δ : 56,77;95,13;96,35;102,22;103,24;103,63;104,47; 105,42;

108,81;116,98;117,16;123,20;129,35;129,45;156,17;159,07; 160,93; 163,25;

162,93;163,03;165,47; 166,03;166,52;183,68;184,58.

IV(KBr) cm^{-1} = 3411, 2923,1617,1600, 1174.

m/z = 552



Composto **9** – 6,6’ Bigenkanina

Sólido, amorfo, amarelo

RMN ^1H – 300MHz, Metanol- d_4 , δ : 3,86; 6,54;6,56;6,71;6,74;6,91;6,93;7,52;7,55;7,82;7,85

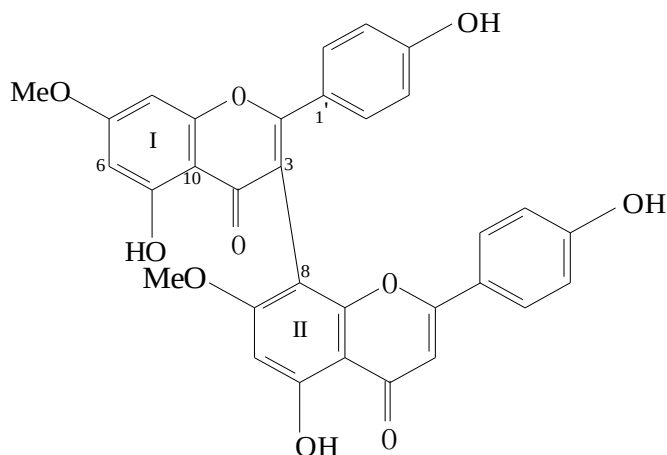
RMN ^{13}C – 75 MHz, Metanol- d_4 , δ : 56,66; 96,27; 96,69; 103,00;103,23; 103,74; 105,78;117,00;

117,15; 122,85; 129,19; 159,02;159,08; 129,25;160,53; 162,80;162,81;163,12; 165,23;

165,58; 183,23;184,41.

IV (KBr) cm^{-1} = 3421, 2921, 2850, 1650, 1594, 1215.

$[\alpha]_D^{20}$ - 130,4° MeOH



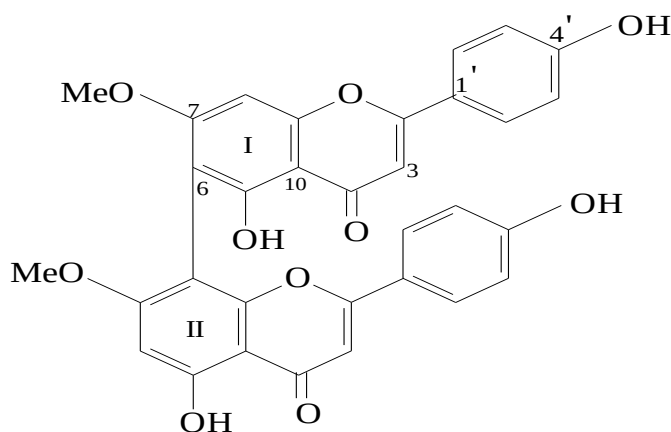
Composto **10** -7,7'dimetilavolkensiflavona

Sólido, amorfo, amarelo

RMN ^1H – 300MHz, Metanol- d_4 , δ : 3,85;6,39;6,48;6,51; 6,54;6,57; 6,76; 6,79; 7,48; 7,51; 7,74;
7,77

RMN ^{13}C – 75 MHz, Metanol- d_4 , δ :56,25;96,22;97,51;101,32; 101,47; 104,72; 105,80;107,24;
118,87;118,92;120,37;129,07;129,62;156,31;159,84;160,11;162,34;165,45;165,68;167,75
;182,32;184,60.

IV (KBr) cm^{-1} = 3520, 3012, 1614, 1450, 1406, 1198.



Composto **11** – 7,7' dimetoxiagastiflavona

Sólido, amorfo, amarelo

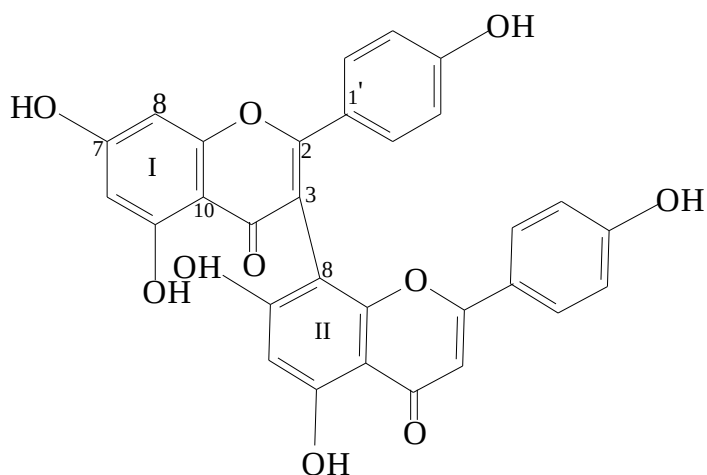
RMN ^1H – 300MHz, Acetona- d_6 , δ :3,79;6,43;6,46;6,50;6,64;6,67;6,83;6,86;7,54;7,57;7,80;7,80.

RMN ^{13}C – 75 MHz, MeOD, δ : 56,40; 95,93;96,30;102,33;102,41;105,52;106,04; 117,37; 117,44;
121,52; 121,86; 128,87; 129,30; 155,82; 159,16; 162,22; 164,84; 165,05; 166,36; 182,14;
184,05.

IV(KBr) cm^{-1} = 3224,3012,1696,1620,1424,1404,1198,1038.

$[\alpha]_D^{20}$ -16,1° MeOH

m/z 566

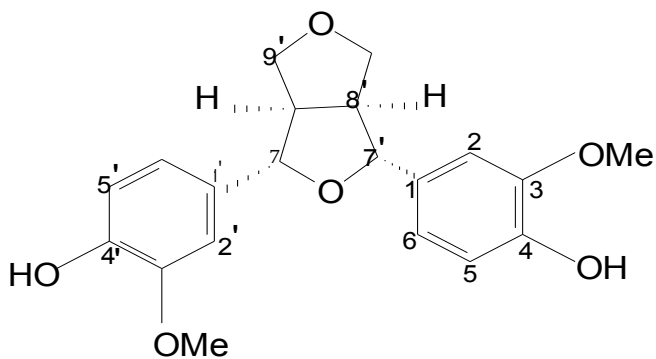


Composto 12 – 3,8' Biapegenina

Sólido, amorfo, amarelo

RMN ^1H – 300MHz, Metanol- d_4 , δ : 6,50;6,53;6,60;6,63;6,80;6,82;7,53;7,56;7,79;7,82

RMN ^{13}C – 75 MHz, Metanol- d_4 , δ : 97,62;101,53; 101,63;103,23; 104,30; 104,46; 108,87; 118,37
 119,00;119,83 120,70;129,33;129,39;156,61; 158,96; 159,03; 160,33; 161,82. 166,53;
 166,59;183,43;184,10.

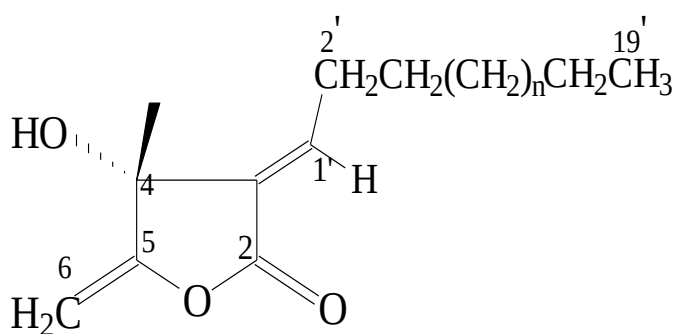
IV(KBr) cm^{-1} = 3502, 3012, 2938,1688,1608,1596,1406,1198 $[\alpha]_D^{20}$ -16,1° MeOHComposto **13A** – Isômero do pinoresinol

Viscosa, marrom

RMN ^1H – 300MHz, Metanol- d_4 , δ : 3,32; 3,82;3,85; 4,25;4,70;6,78;6,80;6,95.

RMN ^{13}C – 75 MHz, Metanol- d_4 , δ :55,32; 56,42; 72,59; 87,50; 110,97; 116,08; 120,05;133,77;
 147,29;149,11.

IV(KBr) cm^{-1} = 3346, 2923,2852,1716,1606,1515,1458,1166



Composto **14** – Isochnosídeo A

Oleosa, incolor

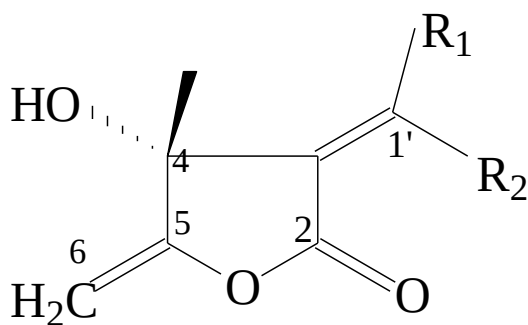
RMN ^1H – 300MHz, CDCl_3 , δ : 0,85; 1,23;2,36;2,48;4,70;4,93;5,24

RMN ^{13}C – 75 MHz, CDCl_3 , δ :14,09; 22,67; 28,20; 28,30; 29,68; 31,90; 66,44; 91,31; 127,30;
150,18;157,68;166,63.

IV (KBr) cm^{-1} = 2912,2836,2324,1712,1616,1396,1188

$[\alpha]_D^{20} +22,5^\circ$ (Acetona)

Massa m/z = 391 ($M^+ - 1$)



Composto **15** – Isochnosídeo B

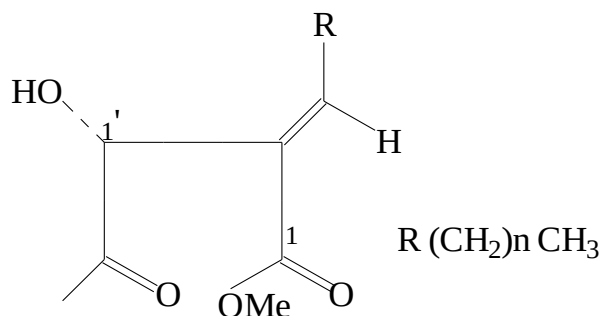
Oleosa, incolor

RMN ^1H – 300MHz, CDCl_3 , δ : 0,85; 1,23;2,36;2,48;4,70;4,93;5,24.

RMN ^{13}C – 75 MHz, CDCl_3 , δ :14,09; 22,67; 28,20; 28,30; 29,68; 31,90; 66,44; 91,31; 127,30;
150,18;157,68;166,63.

IV (KBr) cm^{-1} = 2908,2836,1728,1612,1396,1196.

$[\alpha]_D^{20} +49,0^\circ$ (Acetona)

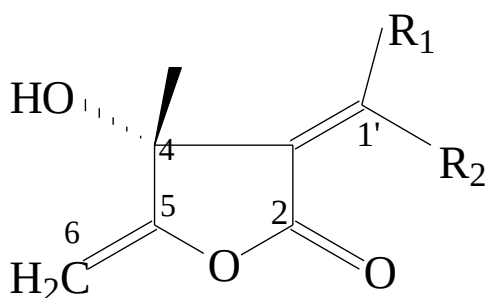


Composto 16 – Seco-ochnosídeo A

Oleosa, incolor

RMN 1H – 300MHz, $CDCl_3$, δ : 0,85; 2,13;3,71;4,87;7,08

RMN ^{13}C – 75 MHz, $CDCl_3$, δ : 14,11; 24,48; 29,63; 29,67; 52,03;73,35; 129,68; 149,17; 166,05
206,35.



Composto	R ₁	R ₂	
17	(CH ₂) ₁₃	H	isolinderanolídeo
18	H	(CH ₂) _n	ochnosídeo A
19	(CH ₂) _n	H	isochnosídeo C
20	(CH ₂) _n	H	isochnosídeo D

Composto 17 – isolinderanolídeo

Oleosa, incolor

RMN 1H – 300MHz, $CDCl_3$, δ : 0,85; 1,23;1,60; 4,70; 4,93;5,23; 7,09.

RMN ^{13}C – 75 MHz, $CDCl_3$, δ :14,10;22,66;31,89;66,35;91,36; 127,27;150,23;166,81.

IV(KBr) cm^{-1} = 2912, 2836,2324,1712,1616,1396,1188

Massa - m/z = 335(M^+ - 1)

$[\alpha]_D^{20} +3,5^\circ$ Acetona

Composto 18 - ochinosídeo A

Oleosa, incolor

RMN 1H – 300MHz, $CDCl_3$, δ : 0,85;1,23;1,57;2,76;4,65;4,87;5,08; 6,67.

RMN ^{13}C – 75 MHz, $CDCl_3$, δ : 14,09;22,66;31,89;68,93;90,25;127,33;151,32;157,61;165,24.

IV(KBr) cm^{-1} =2904,2836,1716,1612,1396,1196

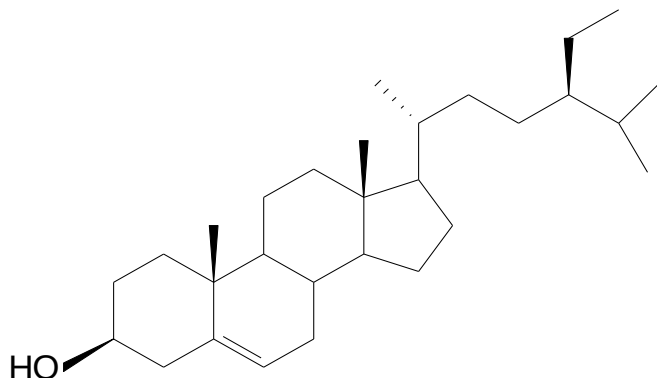
Composto 19 - isochnosídeo C e 20 – isochnosídeo D

Oleosa, incolor

RMN 1H – 300MHz, $CDCl_3$, δ : 0,85;1,23;1,58; 4,70; 4,94;5,33; 7,10.

RMN ^{13}C – 75 MHz, CDCl_3 , δ : 14,10;22,66;31,89;66,35;91,36;127,27;150,23;166,81.

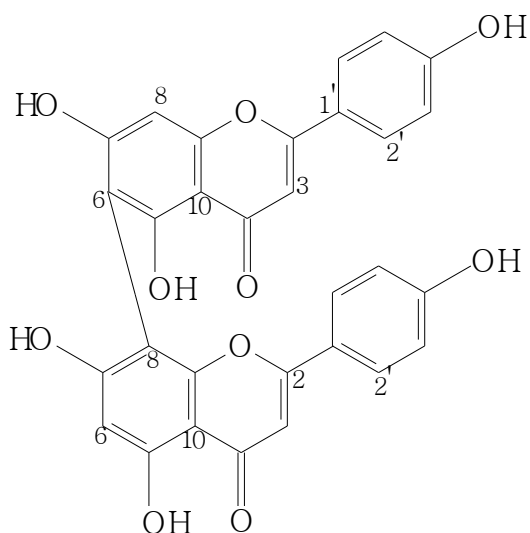
IV(KBr) cm^{-1} = 2904,2832;1728,1616,1396,1020 (Isochnosídeo C)



Composto **21**- β - sitosterol

Cristalino, branco

RMN ^{13}C – 75 MHz, CDCl_3 , δ : 11,7;18,9;19,2;19,6;20,9;21,0;22,9;24,1;25,9;28,1;28,9;31,4;
31,8;33,9;36,0;36,3;37,1;39,6;42,0;42,2;45,7;50,0;55,9;56,6;121,6;140,6.



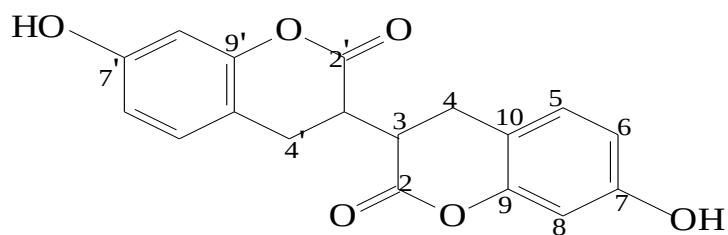
Composto **22** – Agastinoflavona

Sólido, amarelo

RMN ^1H – 300MHz, Metanol- d_4 δ : 6,37;6,59;6,67;6,69;6,73;6,76;6,94;6,97;7,54;7,56;7,92;7,92.

RMN ^{13}C – 75 MHz, Metanol- d_4 , δ : 93,46;98,71; 99,26;101,98;102,49;103,63;103,91; 104,10;
115,46; 121,89;122,01; 127,82; 128,09;115,66;155,53;157,66; 161,11; 161,18; 161,38;
163,12;163,52; 164,67;164,80; 182,55; 182,92.

IV(KBr) cm^{-1} = 3544, 3016,1692,1652,1548,1496.



Composto **23** – 7,7' hidroxibicunarina

Viscosa, marrom

RMN ^1H – 300MHz, MeOD, δ : 3,49;3,66;6,21;6,22;6,24;6,25;6,28;6,29;6,87;6,89.

RMN ^{13}C – 75 MHz, MeOD, δ : 35,75;52,24;103,32; 107,39; 113,67; 132,40; 157,52; 158,68; 175,23.

IV(KBr) cm^{-1} = 3512, 3016, 1764;1664;1560,1496,1240,1196