

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM QUÍMICA**

**TESE**

**Estudo fitoquímico de *Justicia wasshauseniana*  
(*Acanthaceae*), *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera*  
*lactescens* (*Malpighiaceae*) e atividades biológicas.**

**RENATA DUARTE FERNANDES**

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo fitoquímico de *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapterys acutifolia* e *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) e atividades biológicas**

**RENATA DUARTE FERNANDES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Dr. Raimundo Braz Filho**

*E Co-Orientação dos Professores*  
**Dr. Mário Geraldo de Carvalho**  
**Dr. Luciano Ramos Suzart**

Tese submetida como  
requisito parcial para a obtenção do grau  
de **Doutor em Ciências**, no Programa de  
Pós-Graduação em Química, Área de  
Concentração em Química Orgânica

Seropédica, RJ  
Dezembro de 2016

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363e Fernandes, Renata Duarte, 1977-  
Estudo fitoquímico de *Justicia wasshauseniana*  
(Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera*  
*lactescens* (Malpighiaceae) e atividades biológicas /  
Renata Duarte Fernandes. - 2016.  
203 f.: il.

Orientador: Raimundo Braz-Filho.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, PPGQ, 2016.

1. Estudo fitoquímico. 2. *Justicia wasshauseniana*.  
3. *Tetrapteryx acutifolia*. 4. *Lophanthera lactescens*.  
I. Braz-Filho, Raimundo, 1935-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. PPGQ  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**RENATA DUARTE FERNANDES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

TESE APROVADA EM 13/12/2016

---

Dr. Luciano Ramos Suzart (PPGQ-UFRRJ)  
(Co-orientador e Presidente)

---

Dr<sup>a</sup>. Marcia Cristina de Oliveira (PPGQ-UFRRJ)

---

Dr. Cristiano Jorge Riger (PPGQ-UFRRJ)

---

Dr. Roberto Carlos Campos Martins (IPPEN-UFRRJ)

---

Dr. Leosvaldo Salazar Velozo (UERJ)

---

Dr<sup>a</sup>. Marize Maleck (USS)/ (Suplente)

---

Dr. Marco André Alves de Souza (PPGQ-UFRRJ)/(Suplente)

## DEDICATÓRIA

*A minha mãe Fátima Maria Duarte, que com certeza eu não chegaria até aqui se não fosse pela sua força, incentivo e ajuda em todos os momentos.  
Ao meu filho Pedro, que em muitas vezes estive ausente, mas sei que mesmo sendo pequeno entende que esse esforço foi por ele.*

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Raimundo Braz Filho pela orientação, ensinamentos e dedicação durante este trabalho;

Aos profs. Dr. Mário Geraldo de Carvalho e Dr. Luciano Ramos Suzart pela co-orientação ensinamentos, paciência e amizade;

À profa. Dra. Rosane Nora Castro pelas palavras de incentivo e por estar sempre pronta a ajudar no que fosse preciso;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química;

Aos amigos do LQPN-UFRRJ Ana Paula, Ilzenaide, Teresa, Queli, Eduardo (Ceará), Rafaela, Almir, Débora, Ina, Carlos, Carolina e a Mirza pela ajuda, por compartilhar das alegrias e pelos incentivos nos momentos mais difíceis, e às alunas de iniciação científica que me auxiliaram na realização deste trabalho Camila, Tarcila e Thamires;

A todos os colegas da pós-graduação;

Aos funcionários do ICE-UFRRJ Carlão, Eli, Fábio, Frances, Gil (*In memoriam*), Márcio, Maurício, Paulo, Pedro e Vitor;

À Dra. Denise Monte Braz (IB-UFRRJ) pela coleta e classificação botânica da *Justicia wasshausseniana* Profice;

Ao prof. Dr. Saulo Andrade Caldas (IV-UFRRJ) pela coleta da *Tetrapteryx acutifolia*.

Ao prof. Dr. Heber dos Santos Abreu (IF/UFRRJ) (*In memoriam*) pela coleta da *Lophantera lactescens*;

Ao prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho pelos ensaios de atividades antinoceptiva e anti-inflamatória;

Ao prof. Dr. Darí Cesarin-Sobrinho pelo ensaio de dicroísmo circular;

À doutoranda Luiza D'Oliveira Sant'ana pelos ensaios antioxidantes e flavonoides totais;

A Ari Miranda da Silva (UFRJ) e Carolina Passos Cunha pela realização dos espectros de massas de alta resolução;

À Banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas neste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro;

A todos, que de alguma forma, me ajudaram na realização deste trabalho.

***“...O essencial é invisível aos olhos.”***  
***Antoine de Saint-Exupéry***

## RESUMO

FERNANDES, Renata Duarte. **Estudo Fitoquímico de *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) e Atividades biológicas**, 2016 190f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Este trabalho descreve o isolamento e determinação estrutural de metabólitos especiais isolados de folhas e caule de *J. wasshauseniana* (Acanthaceae), vulgarmente conhecida como rabo de quati, que foi coletada no Município de Paracambi, RJ; folhas e caule de *T. acutifolia*, conhecida vulgarmente como cipó-ruão, coletado no município de Barra do Piraí-RJ e *L. lactescens* (Malpighiaceae), conhecida vulgarmente como Chuva-de-Ouro, coletado no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Campus Seropédica RJ. Realizaram-se testes de atividade biológica de extratos das duas últimas espécies.

O fracionamento cromatográfico dos extratos de folhas e caule de *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), de folhas e caule de *Tetrapteryx acutifolia* (Malpighiaceae), de folhas e cascas de *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) e análise das frações através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas conduziu ao isolamento e identificação de constituintes de diferentes classes de metabólitos especiais. Das folhas e caule de *J. wasshauseniana* foram identificados um triglicerídeo com a unidade acila insaturada, um ácido carboxílico insaturado, uma mistura dos esteróides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol) e a mistura de esteroides glicosilados, 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol e o 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-estigmasterol, um dissacarídeo,  $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo (sacarose) e os alcalóides ácido-(N-fenil-o-metileno-O-5)-3-hidroxi-5-carboxi- $\gamma$ -lactama e N(fenil-o-metileno-O-5)-3-hidroxi-5-(carboxilato de 2,3-dihidroxi-propionila)- $\gamma$ -lactama) que estão sendo descritos pela primeira vez na literatura. Dos extratos de folhas e caule de *T. acutifolia* foram isolados uma mistura dos esteroides, sitosterol, estigmasterol, 5,6-diidro-sitosterol e 5,6-diidro-20-21,22-23,24-28,25-26-octaidro-campesterol, o ácido ascórbico, além da sacarose e o ecdisteroide 2S,3R,5R,9R,10R,13R,14S,17S,20S-2,3,14,20,24,25-hexahidroxicolest-7-en-6-ona (Pinasterona), desta enona que foi convertido em 2,3,24,25-tetraacetato através de tratamento com anidrido acético e piridina. Dos extratos de folhas e cascas de *L. lactescens*, além da mistura de esteroides sitoesterol, estigmasterol e campesterol, foi isolado o *nor*-triterpeno conhecido como correolideo que, além da confirmação da correção da estrutura registrada na literatura foi proposta a estereoquímica absoluta, sendo, entretanto definida como 4R,5R,6R,7S,8S,9S,10S,13R,14S,15S,16R,17S,18R,21S,22S-friedelan-1,2-en-3-carboxi-24-O-metileno-5-[1-acetoxi-etilideno]-6,7,15,16-tetracetoxi-18-hidroxi-21,22-oxi-29-metileno-30-carboxilato de metila. As estruturas foram definidas através de análise de espectros de IV, RMN 1D e 2D, massas e dicroísmo circular e, em alguns casos da preparação de derivados. Os extratos metanólicos de caule e de folhas de *J. wasshauseniana* e os extratos metanólicos e frações do caule e folhas de *T. acutifolia* foram testados contra os radicais livres de DPPH. O extrato do caule de *J. wasshauseniana* apresentou melhor atividade do que o extrato de folhas. A fração de hexano de folhas de *T. acutifolia* não apresentou uma boa atividade antioxidante, observando-se uma maior atividade para a fração de acetato de etila de caule e folhas. Realizaram-se os testes farmacológicos do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico de cascas de *L. lactescens* e extrato metanólico de folhas de *J. wasshauseniana*, no qual apresentaram resultados positivos nas atividades testadas.

Palavras chaves: Alcaloides, esteroides, terpenoides, *J. wasshauseniana*, *T. acutifolia*, *L. lactescens*



## ABSTRACT

FERNANDES, Renata Duarte. **Phytochemical study of *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifolia* and *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) and Biological activities**, 2016 190f. Tese (Doutorado em Ciências – Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

This work describes the isolation and structural determination of special metabolites isolated from leaf and stem of *J. wasshauseniana* (Acanthaceae), popularly known as a coati tail, which was collected in the Paracambi, RJ; Leaves and stem of *T. acutifolia* (Malpighiaceae), popularly known as cipó-roão, were collected in the Barra do Pirai-RJ and leaf and bark of *L. lactescens* (Malpighiaceae), popularly known as lain of lold, was collected on the campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro Campus Seropédica RJ. Some chemical and biological activities of extracts of the last species were evaluated.

Chromatographic fractionation of leaf and stem extracts from the *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), from the leaf and stem of *Tetrapteryx acutifolia* (Malpighiaceae), and from the leaves and bark of *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) besides analysis of fractions by chromatographic and spectroscopic techniques led to the isolation and identification of constituents of different classes of special metabolites. including new alkaloids from *J. wasshauseniana*.

From the leaves and stem of *J. wasshauseniana* were identified a triglyceride with the unsaturated acyl moiety, an unsaturated carboxylic acid, a mixture of steroids ( $\beta$ -Sitosterol, estigmasterol and campesterol) and glycosyl steroids (3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylsitosterol and 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosylstgmasterol), a disaccharide ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-O- $\beta$ -D-fructofuranoside (Sucrose) and the alkaloids acid (N-fenil-o-metileno-O-5)-3-hidroxi-5-carboxy- $\gamma$ -lactam, and N(fenil-o-metileno-O-5)-3-hidroxi-5-(carboxilato de 2,3-dihidroxipropionila)- $\gamma$ -lactama), described for the first time in the literature. From the leaves and stem of *T. acutifolia* were identified a mixture of sitosterol, stigmasterol, 5,6-dihydro-sitosterol. and 5,6-dihydro-20-21,22-23,24-28,25-26-campesterol, ascorbic acid, in addition to sucrose and an ecdysteroid, 2S,3R,5R,9R,10R,13R,14S,17S,20S-2,3,14,20,24,25-hexahidroxicolest-7-en-6-ona (Pinasterone). The extracts from the leaves and barks of *L. lactescens*, besides the mixture of sitosterol, stigmasterol and campesterol, was isolated the nortriterpene known as coreolidene. Besides to confirm the structure correction proposed in the literature of this nortriterpene, the absolute stereochemistry was defined as methyl 4R,5R,6R,7S,8S,9S,10S,13R,14S,15S,16R,17S,18R,21S,22S-friedelan-1,2-en-3-carboxy-24-5- [1-acetoxy-ethylidene] -6,7,15,16-tetracetoxy-18-hydroxy-21,22-oxy-29-methylene-30-carboxylate. The structures were defined through analysis of IR, 1D and 2D NMR, mass spectra and circular dichroism besides some methyl and acetyl derivatives. The methanolic extracts from the stem and leaves of *J. wasshauseniana* and the methanolic extracts and fractions of the stem and leaves of *T. acutifolia* were tested against the free radicals of DPPH. The extract from the stem of *J. wasshauseniana* was more active than leaf extract. The fraction of hexane from the leaves of *T. acutifolia* did not present a good antioxidant activity, a greater activity was observed for the ethyl acetate fraction of stem and leaves of this plant. The pharmacological tests of the antinociceptive and anti-inflammatory potentials of the *L. lactescens* bark methanolic extract and the methanolic extract of leaves of *J. wasshauseniana* were carried out, in which they showed positive results in the tested activities.

Keywords: Alkaloids, steroids, terpenoids, *J. wasshauseniana*, *T. acutifolia*, *L. lactescens*

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1: Fotos de <i>Justicia wasshausseana</i> .....	12
Figura 2: Ocorrência de <i>Justicia wasshausseana</i> no Brasil. ....	13
Figura 3: Substâncias isoladas do gênero <i>Justicia</i> . ....	16
Figura 4: Substâncias Isoladas de <i>Justicia wasshausseana</i> Profice .....	20
Figura 5: Espectro de RMN de hidrogênio (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 1.....	27
Figura 6: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO) de 2 e 3.....	30
Figura 7: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, DMSO) de 2 e 3. ....	30
Figura 8: Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 4. ....	32
Figura 9: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 5, 6 e 7. ....	35
Figura 10: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias 5, 6 e 7. ....	36
Figura 11: Cromatograma (CG-EM) das substancias 5, 6 e 7.....	37
Figura 12: Substância 9 .....	39
Figura 13: Rota biossintética do alcaloide Vasicina.....	39
Figura 14: Rota biossintética proposta para 9. ....	40
Figura 15: Regra do quadrante para o cromóforo aromático.....	41
Figura 16: Projeção no modelo quadrante do anel aromático de 9 .....	42
Figura 17: Espectros de UV e DC de 9. ....	42
Figura 18: Espectro de I.V. de 9.....	44
Figura 19: RMN <sup>1</sup> H (500MHz, MeOD) de 9. ....	45
Figura 20: RMN DEPTQ (125MHz, MeOD) de 9.....	46
Figura 21: Espectro COSY (500MHz, MeOD) de 9. ....	47
Figura 22: Espectro HSQC (500/125MHz, MeOD) de 9. ....	48
Figura 23: Espectro HMBC (500/125MHz, MeOD) de 9. ....	49
Figura 24: Cromatograma de 9.....	50
Figura 25: Espectro de massas de alta resolução de 9.....	50
Figura 26: Reação de acetilação de 9. ....	52
Figura 27: Espectro de IV de 9A.....	54
Figura 28: RMN <sup>1</sup> H (500MHz, MeOD) de 9A.....	55
Figura 29: Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500MHz, MeOD) de 9A.....	56
Figura 30: RMN DEPTQ (100MHz, MeOD) de 9A.....	57
Figura 31: Espectro COSY (400MHz, MeOD) de 9A.....	58
Figura 32: Espectro HSQC (400/100MHz, MeOD) de 9A.....	59
Figura 33: Espectro HMBC (500/125MHz, MeOD) de 9A.....	60
Figura 34: Expansão do espectro HMBC (500/125MHz, MeOD) de 9A.....	61
Figura 35: Cromatograma de 9A.....	62
Figura 36: Espectro de massas de 9A.....	62
Figura 37: Espectro de IV de 10.....	66
Figura 38: RMN <sup>1</sup> H (500MHz, MeOD) de 10. ....	67
Figura 39: RMN DEPTQ (125 MHz, MeOD) de 10.....	68
Figura 40: Espectro de RMN de COSY (500MHz, MeOD) de 10.....	70
Figura 41: Espectro de RMN de HSQC (500/125MHz, MeOD) de 10.....	70
Figura 42: Expansão do espectro de RMN de HSQC (500/125MHz, MeOD) de 10.....	71
Figura 43: Expansão do espectro de RMN de HSQC (500/125MHz, MeOD) de 10.....	72
Figura 44: Espectro de RMN de HMBC (500/125MHz, MeOD) de 10.....	73
Figura 45: Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/125MHz, MeOD) de 10. ..	74
Figura 46: Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/125MHz, MeOD) de 10. ..	75
Figura 47: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400MHz, MeOD) de 11.....	77

Figura 48: Espectro de DEPTQ (100MHz, MeOD) de 11. ....	78
---	----

## CAPÍTULO II

Figura. 1: <i>Tetrapteryys acutifolia</i> .....	86
Figura. 2: Ocorrência de <i>T. acutifolia</i> no Brasil .....	86
Figura. 3: Substâncias isoladas de <i>Tetrapteryys mucronata</i> . ....	88
Figura 4: Substâncias isoladas de <i>Tetrapteryys acutifolia</i> . ....	89
Figura 5: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura. ....	96
Figura 6: Espectro de RMN <sup>13</sup> C (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura. ....	96
Figura 7: Cromatograma da mistura.....	97
Figura. 8: Substâncias presentes na mistura .....	97
Figura 9: Cromatograma de 5.....	98
Figura 10: Cromatograma de 6.....	99
Figura 11: Cromatograma de 12.....	100
Figura. 12: Cromatograma de 13.....	101
Figura 13: Cromatograma de 14.....	102
Figura. 14: RMN <sup>1</sup> H (400MHz, MeOD) de 11 .....	105
Figura 15: RMN <sup>13</sup> C (DEPTQ, 400MHz, MeOD <sub>4</sub> ) de 11. ....	106
Figura 16: Interações observadas no espectro de NOESY .....	108
Figura 17: Ponasterona A .....	109
Figura 18: Espectro de IV de 15.....	112
Figura 19: Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 15 (400MHz, MeOD).....	113
Figura 20: RMN DEPTQ (125 MHz, MeOD) de 15 .....	114
Figura 21: Expansão do RMN DEPTQ (125 MHz, MeOD) de 15 .....	114
Figura 22: Espectro de COSY (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15.....	115
Figura. 23: Espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15.....	116
Figura. 24: Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15.....	117
Figura 25: Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15.....	118
Figura 26: Espectro HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15 .....	119
Figura 27: Expansão do espectro de HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15.....	120
Figura. 28: Expansão do espectro de HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15.....	121
Figura 29: Expansão do espectro de HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15.....	122
Figura. 30: Espectro NOESY (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15 .....	123
Figura. 31: Espectro de UV e CD em MeOH de 15 .....	124
Figura 32: Espectro de Massas MSMS 983 (15 ev) .....	125
Figura 33: Espectro de Massas Íons totais (6ev) .....	125
Figura 34: Correlações observadas no HMBC das acetoxilas.....	126
Figura 35: RMN <sup>1</sup> H de 15A (500Mz, CDCl <sub>3</sub> ).....	129
Figura 36: Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H de 15A (500Mz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	130
Figura 37: RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do derivado acetilado 15A.....	131
Figura 38: Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15A.....	132
Figura 39: Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15A.....	132
Figura. 40: Espectro de COSY (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15A .....	133
Figura. 41: Espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15A.....	134
Figura. 42: Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15A.....	135
Figura 43: Espectro HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15A.....	136
Figura 44: Expansão do espectro HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 15A.....	137

### CAPÍTULO III

Figura 1: Ocorrência de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke no Brasil.....	143
Figura 2: Fluorescência de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke .....	143
Figura 3: Substâncias isoladas de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke .....	145
Figura 4: Substâncias isoladas de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	146
Figura 5: Espectro de IV de 16.....	156
Figura 6: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (ABREU, 1990) .....	157
Figura 7: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	157
Figura 8: Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	158
Figura 9: Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	159
Figura 10: Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	159
Figura 11: Espectro de COSY (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	160
Figura 12: Expansão do espectro de COSY (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	161
Figura 13: Espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	162
Figura 14: Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	163
Figura 15: Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	164
Figura 16: Espectro HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16. ....	165
Figura 17: Expansão do espectro HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	166
Figura 18: Expansão do espectro HMBC (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 16.....	167
Figura 19: Espectro de NOESY de 16.....	168
Figura 20: Acoplamentos <sup>13</sup> C- <sup>13</sup> C revelados como mapa de conectividade 2D obtido pela técnica INADEQUATE.....	169
Figura 21: Curvas de UV e DC (MeOH, 200uL) de 16. ....	169
Figura 22: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 5, 6 e 7. ....	171
Figura 23: Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de 5, 6 e 7.....	172
Figura 24: Cromatograma de 5, 6 e 7 .....	173

### CAPÍTULO IV

Figura 1: Curvas de % AA referentes aos extratos.....	181
Figura 2: Efeito antinociceptivo do extrato de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke no modelo de contorções abdominais.....	187
Figura 3: Efeito antinociceptivo do extrato de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice no modelo de contorções abdominais.....	188
Figura 4: Efeito antinociceptivo do extrato metanólico de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke no modelo de formalina.....	189
Figura 5: Efeito antinociceptivo do extrato de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice no modelo de formalina.....	189
Figura 6: Efeito antinociceptivo do extrato metanólico de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke no modelo de retirada da cauda. ....	190
Figura 7: Representação da área sob a curva obtida através do modelo de retirada da cauda com o extrato metanólico de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke no modelo de retirada da cauda .....	191
Figura 8: Efeito antinociceptivo do extrato de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice no modelo de retirada da cauda. ....	191
Figura 9: Representação da área sob a curva obtida através do modelo de retirada da cauda com o extrato de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice.....	192
Figura 10: Os efeitos antinociceptivo da administração oral no teste do edema da pata.. ..	193

Figura 11: Representação da área sob a curva obtida através do modelo de edema de pata com o extrato de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke. ....	194
Figura 12: Efeito antinociceptivo do extrato de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice no modelo de edema de pata.....	194
Figura 13: Representação da área sob a curva obtida através do modelo de edema de pata com o extrato de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice.....	195
Figura 14: Representação gráfica do efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de <i>Lophanthera lactescens</i> sobre a migração leucocitária no modelo de bolha de ar subcutânea. ....	196
Figura 15: Representação gráfica do efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice sobre a migração leucocitária no modelo de bolha de ar subcutânea.. ....	196
Figura 16: Efeito do extrato de <i>Lophanthera lactescens</i> sobre a performance motora no modelo de campo aberto.....	197
Figura 17: Efeito do extrato de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice sobre a performance motora no modelo de campo aberto.. ....	198

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1: Classificação botânica de <i>Justicia wasshauseniana</i> .....	13
Tabela 2: Registro dos resultados da prospecção química dos extratos de <i>Justicia wasshauseniana</i> . ....	22
Tabela. 3: Ensaio de Flavonoides totais de <i>Justicia wasshauseniana</i> .....	22
Tabela 4: Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 2 e 3 comparados com dados da literatura .....	29
Tabela 5: Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da substância 4 comparados com os dados descritos na literatura. ....	31
Tabela 6: Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 5, 6 e 7 comparados com dados da Literatura .	34
Tabela. 7: Dados de RMN de 9 e comparação com modelo da literatura .....	43
Tabela. 8: Dados de RMN de 9A e comparação com modelo da literatura .....	53
Tabela 9: Dados de RMN de 10 .....	65
Tabela. 10: Deslocamentos químicos de <sup>13</sup> C da sacarose e de 11 .....	76

### CAPÍTULO II

Tabela 1: Classificação botânica de <i>Tetrapteryx acutifolia</i> .....	87
Tabela 2: Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de <i>T. Acutifolia</i> .....	91
Tabela 3: Ensaio de Flavonóides totais de <i>Tetrapteryx acutifolia</i> .....	92
Tabela: 4: Deslocamentos químicos de <sup>13</sup> C da sacarore e de 11 .....	104
Tabela 5: Deslocamentos químicos de 15 . ....	110
Tabela: 6: Deslocamentos químicos de 15 e 15A .....	127

### CAPÍTULO III

Tabela.. 1: Classificação botânica de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke .....	143
Tabela 2: Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de <i>Lophanthera lactescens</i> . ....	148
Tabela 3: Ensaio de Flavonóides totais de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	149
Tabela.. 4: Dados de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C de 16. ....	154

#### CAPÍTULO IV

Tabela 1: Atividade antioxidante do extrato metanólico do caule de <i>Justicia wasshausseniana</i> .....	180
--	-----

### LISTA DE ESQUEMAS

#### CAPÍTULO I

Esquema 1: Partição do extrato metanólico do caule de <i>J. wasshausseniana</i> .....	24
Esquema 2: Fluxograma das frações obtidas da coluna filtrante do extrato diclorometano da folha.....	24
Esquema 3: Fracionamento do extrato metanólico das folhas de <i>J. wasshausseniana</i> .....	26
Esquema 4: Fragmentações de 9. ....	51
Esquema 5: Fragmentações de 9A.....	63

#### CAPÍTULO II

Esquema 1: Fluxograma da extração do caule e a folha da <i>Tetrapteryx acutifolia</i> .....	90
Esquema. 2: Fluxograma da cromatografia do extrato diclorometano (TAFD).....	93
Esquema 3: Partição líquido-líquido do extrato metanólico do caule (TACM).....	94
Esquema 4: Fragmentações de 5. ....	98
Esquema 5: Fragmentações de 6. ....	99
Esquema 6: Fragmentações de 12 .....	100
Esquema 7: Fragmentações de 13 .....	101
Esquema. 8: Frgmentações de 14 .....	103
Esquema 9: Fragmentações de 15. ....	125

#### CAPÍTULO III

Esquema 1: Fluxograma da preparação do extrato da madeira de <i>Lophanthera lactescens</i> . .	147
Esquema 2: Fluxograma da partição do extrato e isolamento da substância 16.....	150
Esquema 3: Proposta biogenética envolvendo precursor 3-oxofriedelano na bioformação da LLMMP-18C e o isômero correspondente à proposta estrutural anterior.....	153

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	unidimensional
2D	bidimensional
$\delta$	deslocamento químico (ppm)
$\nu$	estiramento
Ac <sub>2</sub> O	anidrido acético
AcOEt	acetato de etila
BBD	Hydrogen Band Broad Decoupled
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCP	cromatografia em camada preparativa
CDCl <sub>3</sub>	clorofórmio deuterado
CG-EM	cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
cm	centímetro
COSY	COrrrelation SpectroscopY
d	dubleto
dd	duplo dubleto
D <sub>3</sub> CCOCD <sub>3</sub>	Acetona deuterada
D <sub>3</sub> CSOCD <sub>3</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
DDPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil.
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO-d <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
EI	impacto de elétrons
EM	espectrometria de massas
EtOH	etanol
F	fração
g	gramas
HETCOR	HETeronuclear chemical shift COrrrelation
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento em hertz
kg	kilograma
m	múltiplo
M <sup>+</sup>	pico do íon molecular
MeOH	metanol
mg	miligrama
mL	mililitro
MHz	Mega Hertz
mm	milímetro
<i>m/z</i>	relação massa/carga
nm	nanómetro
NOE	nuclear overhauser effect
P.F.	ponto de fusão
Piridina-d <sub>5</sub>	piridina deuterada
ppm	parte por milhão

q	quarteto
RBR	Herbário do Instituto de Biologia da UFRRJ
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	singleto
sl	singleto largo
t	triplete
tr	tempo de retenção
TMS	tetrametilsilano

OBS: As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1. Objetivos .....	3
1.1. Gerais.....	3
1.2. Específicos.....	3
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	3
2.1. Equipamentos e Reagentes .....	3
2.2. Prospecção fitoquímica.....	5
2.3. Determinação do total de flavonoides .....	5
2.3.1. Preparo da curva analítica com quercetina .....	6
2.3.2. Acetilação com anidrido acético e piridina.....	6
2.3.3. Metilação com diazometano .....	7
3. REFERÊNCIAS GERAIS: .....	9
CAPÍTULO I.....	11
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice .....	11
1. Revisão de Literatura: .....	11
1.1. Generalidades sobre a família Acanthaceae e o gênero <i>Justicia</i> .....	11
1.2. Características morfológicas de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice .....	12
1.3. Estudos farmacológicos do gênero <i>Justicia</i> .....	13
1.4. Estudo químico do gênero <i>Justicia</i> .....	14
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	20
2.1. Substâncias isoladas de <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice .....	20
2.2. Obtenção do material vegetal: .....	21
2.3. Obtenção dos Extratos Brutos .....	21
2.4. Prospecção fitoquímica dos extratos de <i>Justicia wasshauseniana</i> .....	21
2.5. Ensaio de flavonoides totais com cloreto de alumínio .....	22
2.6. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos dos Extratos de <i>J. wasshauseniana</i> Profice. ....	23
2.6.1. Extrato de diclorometano do caule de <i>J. wasshauseniana</i> (JWCD): .....	23
2.6.2. Extrato de metanol do caule de <i>J. wasshauseniana</i> (JWCM):.....	23
2.6.3. Extrato de diclorometano das folhas de <i>J. wasshauseniana</i> Profice:.....	24
2.6.4. Extrato de metanol das folhas de <i>J. wasshauseniana</i> (JWFM):.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
3.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS de <i>J. wasshauseniana</i> : .....	27
3.1.1. Substância 1 .....	27

3.1.2.	Substâncias 2 e 3.....	28
3.1.3.	Substância 4.....	31
3.1.4.	Substâncias 5, 6 e 7.....	32
3.1.5.	Substância 8.....	37
3.1.6.	Substância 9.....	37
3.1.7.	Derivado 9A.....	51
3.1.8.	Substância 10.....	63
3.1.9.	Substância 11.....	76
4.	Conclusões sobre o estudo químico de <i>J. wasshausseniana</i> .....	79
5.	REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO I.....	80
CAPÍTULO II.....		85
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Tetrapterys acutifolia</i> .....		85
1.	Revisão de Literatura:.....	85
1.1.	Generalidades Sobre a Família Malpighiaceae e gênero <i>Tetrapterys</i> .....	85
1.2.	Características morfológicas de <i>Tetrapterys acutifolia</i> .....	85
1.3.	Estudo farmacológico do gênero.....	87
1.4.	Estudo químico do gênero <i>Tetrapterys</i> .....	87
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	89
2.1.	Substâncias isoladas de <i>Tetrapterys acutifolia</i> :.....	89
2.2.	Obtenção do material vegetal:.....	90
2.3.	Obtenção dos Extratos Brutos:.....	90
2.4.	Prospecção fitoquímica dos extratos de <i>Tetrapterys acutifolia</i> .....	91
2.5.	Ensaio de flavonóides totais com cloreto de alumínio.....	91
2.6.	Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de Folha da <i>Tetrapterys acutifolia</i> .....	92
2.6.1.	Extrato de Diclorometano de folhas de <i>Tetrapterys acutifolia</i> (TAFD).....	92
2.6.2.	Extrato metanólico do caule de <i>Tetrapterys acutifolia</i> (TACM).....	93
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO:.....	95
3.2.	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUENTES ISOLADOS de <i>Tetrapterys acutifolia</i> .....	95
3.2.1.	Mistura de Substâncias 5, 6, 12, 13 e 14.....	95
3.2.1.1.	Substância 5:.....	98
3.2.1.2.	Substância 6:.....	99
3.2.1.4.	Substância 13:.....	100
3.2.1.5.	Substância 14:.....	101
3.3.	Substância 11.....	103

3.4. Substância 15.....	106
3.5. Derivado 15A .....	126
4. Conclusões sobre o estudo químico de <i>Tetrapteryx acutifolia</i> .....	138
5. REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO II.....	139
CAPÍTULO III .....	142
ESTUDO QUÍMICO DE <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke (Malpighiaceae).....	142
1. Revisão de Literatura: .....	142
1.1. Generalidades sobre o gênero <i>Lophanthera</i> .....	142
1.2. Características morfológicas e ocorrência de <i>Lophanthera lactescens</i> Ducke.....	142
1.3. Estudos farmacológicos do gênero <i>Lophanthera</i> .....	144
1.4. Estudo químico do gênero <i>Lophanthera</i> .....	144
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	145
2.1. Substâncias isoladas de <i>Lophanthera lactescens</i> : .....	145
2.2. Material vegetal .....	147
2.3. Obtenção do Extrato Bruto .....	147
2.4. Prospecção fitoquímica dos extratos de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	148
2.5. Ensaio de flavonoides totais com cloreto de alumínio .....	148
3. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	149
3.1. Extrato metanólico da madeira de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	149
3.2. Extrato metanólico de cascas de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	150
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	151
4.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	151
4.1.1. Substância 16:.....	151
4.1.2. Substâncias 5, 6 e 7.....	170
5. Conclusões sobre o isolamento das substâncias de <i>Lophanthera lactescens</i> .....	174
6. REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO III .....	175
CAPÍTULO IV .....	177
ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	177
1. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH .....	177
1.1. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando UV.....	177
1.1.1. Análise estatística .....	177
1.1.2. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando espectrofotômetro ELISA. 178	
1.2. Resultados e discussão .....	179

1.2.1.	Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando UV.....	179
1.2.2.	Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando espectrofotômetro ELISA. 180	
2.	Potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico <i>Lophantera lactescens</i> Duckee <i>Justicia wasshauseniana</i> Profice .....	182
2.1.	Nocicepção .....	182
2.2.	Inflamação .....	183
2.3.	Animais.....	183
2.4.	Material botânico.....	183
2.5.	Modelos Experimentais .....	184
2.5.1.	Testes de atividade antinoceptiva .....	184
2.5.1.1.	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	184
2.5.1.2.	Teste da formalina .....	184
2.5.1.3.	Teste de retirada da cauda.....	185
2.5.2.	Testes de atividade antiinflamatória .....	185
2.5.2.1.	Teste do edema de pata .....	185
2.5.2.2.	Teste da bolha de ar subcutânea .....	186
2.5.3.	Análise estatística .....	186
2.6.	Resultados e discussão .....	186
2.6.1.	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	186
2.6.2.	Teste da formalina .....	188
2.6.3.	Teste da retirada de cauda.....	190
2.6.4.	Teste do edema de pata .....	192
2.6.5.	Modelo de bolha de ar .....	195
2.6.6.	Modelo de campo aberto.....	197
3.	Conclusões das atividades Biológicas.....	200
4.	REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO IV .....	201

## 1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais, mais especificamente os metabólitos secundários, notabilizados pela diversidade de tipos estruturais complexos, são substâncias essenciais ao desenvolvimento, regulação, equilíbrio e defesa dos organismos que os contêm. São também de grande utilidade para a espécie humana como fármacos, alimentos, fragrâncias, cosméticos e agroquímicos (FUNARI *et al.*, 2013).

A busca por substâncias naturais biologicamente ativas através do estudo químico em plantas contribui para o desenvolvimento de diversas áreas da ciência, tais como: Farmacologia, Botânica, Agricultura, Química, Evolução e Ecologia Química. O profundo conhecimento da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas, pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa sobre utilização de substâncias naturais para a cura de doenças ou criar produtos em benefício do bem estar do homem (VEIGA JR. *et al.*, 2005). As plantas superiores, além de serem fontes importantes de novas substâncias utilizadas como agentes medicinais também fornecem modelos para modificações estruturais e otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas, servindo, inclusive, para a inspiração de químicos orgânicos, estimulando-os para enfrentar desafios na construção sintética de novas arquiteturas moleculares naturais (BRAZ FILHO, 2010).

Paralelo ao uso medicinal, a tradição do uso de plantas deixa subentendido que as drogas de origem vegetal não representam riscos de toxicidade, isso tornou-se um fator de grande preocupação para estudiosos e pesquisadores, pois o número de casos de reações adversas a plantas medicinais e seus derivados tem aumentado não apenas no Brasil, como em todo o mundo. O Brasil apresenta uma grande dificuldade na obtenção e divulgação dos dados referentes a interações entre medicamentos e plantas medicinais ou fitoterápicos, o que gera preocupações quanto aos riscos destas associações. Tal dificuldade justifica-se por fatores como a falta de preparo dos profissionais de saúde, crença na natureza inócua das plantas medicinais e fitoterápicos e a automedicação (LEAL &TELLIS, 2015).

O conhecimento sobre aspectos da biodiversidade brasileira vem evoluindo a passos largos. Especialmente a química de produtos naturais, por ser uma área consolidada no país, pode contribuir para o desenvolvimento tecnológico nacional de

maneira significativa. O Brasil de hoje é inovador em vários aspectos, conta com uma massa crítica de pesquisadores e um setor industrial apto aos desafios de pesquisa e desenvolvimento (P&D). A nossa biodiversidade é ainda pouco explorada e seu uso racional, se estruturado em pesquisa multidisciplinar e desenvolvimento tecnológico inovador, trará grande benefício econômico e social ao país (FUNARI *et al.*, 2013).

Os metabólitos especiais também podem ser utilizados como marcadores para classificação quimiosistemática, que pode conduzir a informações importantes, pois algumas classes de substâncias são características de uma determinada família botânica ou de um gênero. O conhecimento das propriedades de determinado produto natural pode responder a questões relacionadas a uma fonte natural. Se um produto natural apresenta atividade terapêutica interessante, será possível encontrar substâncias análogas em uma espécie do mesmo gênero ou da mesma família (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Sob estes pontos de vista escolheram-se as espécies *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifolia* (Malpighiaceae) e *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae), para serem estudadas. Espécies do gênero *Justicia* são utilizadas na medicina popular para diversos fins, apresentando uma variedade de metabólitos especiais e atividades biológicas reconhecidas (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012). O gênero *Tetrapteryx* é conhecido por possuir plantas tóxicas (TOKARNIA *et al.*, 2000) e há poucos estudos químicos com espécies do gênero. O gênero *Lophanthera* é utilizado na medicina popular para baixar a febre da malária (ABREU *et al.*, 1990), da espécie *Lophanthera lactescens* foi isolado um *nor*-triterpeno que teve seu efeito leishmanicida comprovado (DANELLI *et al.*, 2009). O estudo químico desta espécie já estudada foi motivado para obtenção deste *nor*-triterpeno, além de outras substâncias que poderiam ser isoladas na espécie, a fim de obter atividades biológicas ainda não estudadas e informações adicionais a espécie. No presente trabalho, o extrato metanólico da casca do caule apresentou atividade antinoceptiva e anti-inflamatório (DOS SANTOS, *et al.*, 2015).

Este é o primeiro trabalho relacionado ao estudo químico das espécies *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae) e *Tetrapteryx acutifolia* (Malpighiaceae) e continuação do trabalho realizado com a espécie *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae).

## **1. Objetivos**

### **1.1. Gerais**

Contribuir para o conhecimento da composição química das espécies *Justicia wasshauseniana* (Acanthaceae), *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera lactescens* (Malpighiaceae) e realizar atividades biológicas de extratos, frações e substâncias isoladas.

### **1.2. Específicos**

Preparar extratos de folhas e caule de *Justicia wasshauseniana*, *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera lactescens*.

Fracionar os extratos por meio de partição com solventes imiscíveis e/ou técnicas cromatográficas.

Isolar metabólitos especiais das folhas e dos galhos de *Justicia wasshauseniana*, *Tetrapteryx acutifolia* e *Lophanthera lactescens*.

Identificar as substâncias isoladas usando métodos físicos de análise orgânica, tais como: UV, IR, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1D e 2D) e espectrometria de massas.

Preparar derivados através de reações de acetilação, metilação e outras reações que venham auxiliar na identificação das substâncias isoladas.

Avaliar atividades biológicas, dos extratos, substâncias isoladas das espécies e derivados frente ao potencial antinociceptivo e anti-inflamatório.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Equipamentos e Reagentes**

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, (incluindo experimentos bidimensionais) foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200 Advance II operando com frequências 400 e 500 MHz para <sup>1</sup>H e 100 e 125 MHz para <sup>13</sup>C. Como padrão interno foi usado tetrametilsilano ou resíduo do solvente como acetona, clorofórmio, dimetilsulfoxido, metanol e piridina. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram expressas em Hertz (Hz).

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um filme sobre cela de KBr ( $6000-600\text{ cm}^{-1}$ ) e ATR, empregando-se um espectrômetro VERTEX-70 com transformada de Fourier.

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos empregando-se um espectrômetro UV/VIS J-815, da JASCO, usando solução com metanol em célula de  $1\times 1\times 3\text{ cm}$ .

Os espectros de massas foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV; marca Varian Saturn 2000 da UFRRJ.

O espectro de massas de alta resolução foi obtido pelo instrumento: microTOF-II Bruker da UFRJ, com Fonte de ionização ESI e polaridade da ionização negativa, utilizando como solvente o metanol.

O EM foi obtido por infusão direta em espectrômetro de massas Q-TOF Synapt (Waters®) com polaridade no modo positivo. A amostra foi solubilizada em 0,1% de ácido fórmico em metanol:água (1:1).

As cromatografias em coluna aberta foram realizadas usando gel de sílica (230-400 e 70-230 mesh, Vetec) como fase estacionária ou suportadas em Sephadex LH-20 (Sigma, USA). Foram usadas placas em folha de alumínio de gel de sílica 60 PF<sub>254</sub> Silicycle para cromatografia em camada fina (CCF) e como reveladores foram utilizados, detecção por irradiação ultravioleta (254 e 366 nm), e/ou reagentes cromogênicos: Dragendorff (solução de nitrato básico de bismuto II em ácido acético diluído com iodeto de potássio) reagente para alcaloides; Liebermann Burchard (20mL de anidrido acético e 20 mL de ácido sulfúrico diluídos em 200 mL de etanol, em banho de gelo), seguido de aquecimento, reagente para terpenos e esteroides (MATOS, 1997); Soluções de  $\text{AlCl}_3\text{-EtOH}$  (1%), seguido de aquecimento, reagente para flavonoides. (VENNAT, B. et al, 1992) e Vapores de iodo que revelam a maioria das substâncias orgânicas.

Para a determinação do conteúdo total de flavonoides foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis da marca NOVA 2000UV, e as leituras realizadas a 415 e 760 nm, respectivamente, em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. Os padrões de flavonoides (quercetina, isoquercetrina, rutina e miricetina) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os solventes utilizados para os ensaios espectrofotométricos foram metanol de grau espectroscópico (VETEC) e água, obtida através de purificação com aparelho purificador Milli-Q (Millipore). O reagente utilizado foi o cloreto de alumínio hexahidratado (VETEC). Os gráficos foram confeccionados com o auxílio do



programa Origin 6.0 e/ou Microsoft Excel 2003, e os dados foram expressos mgEQC/100g para flavonoides (mg em equivalentes de quercetina por cem gramas de extrato).

Os solventes não deuterados para preparação dos extratos e purificação das substâncias isolados utilizados foram das marcas Vetec e Isotar de grau P.A.

## **2.2. Prospecção fitoquímica**

A prospecção fitoquímica, além de permitir ao químico o conhecimento preliminar da composição química dos extratos com o qual se deverá trabalhar, é também valioso instrumento utilizado na seleção de plantas. O resultado obtido pode permitir ao pesquisador a seleção de técnicas de fracionamento de extratos e isolamentos e caracterização de substâncias puras, com base na natureza dos constituintes previamente detectados, facilitando, assim, o subsequente trabalho de isolamento e purificação dos constituintes mais interessantes. (MATOS, 1997). Os testes realizados foram:

- a. Teste para saponinas (MATOS, 1997, p.52)
- b. Teste para esteroide e triterpenoides (MATOS, 1997, p.67)
- c. Teste para Alcaloides (WALL et al., 1954).
- d. Teste para flavonoides (MATOS, 1997, p.45)
- e. Teste para Antraquinonas (MATOS, 1997, p.59)
- f. Teste para cumarinas (COSTA, 1972)
- g. Teste para Taninos (MATOS, 1997, p.45)
- h. Aminoácidos não-protéicos (MATOS, 1997)
- i. Teste para Carboidratos (COSTA, 1972).
- j. Teste para Cardioativos (DOMINGUEZ, 1973)

## **2.3. Determinação do total de flavonoides**

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo adaptação da metodologia descrita na literatura (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007) utilizando como reagente o Cloreto de Alumínio. Foram preparadas soluções dos extratos metanólicos a concentração de 1,000 µg/mL, em metanol UV-HPLC/água Milli-Q (1:1). A 2,0 mL da solução dos extratos foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso as soluções foram lidas a 415 nm, utilizando

metanol como branco. A concentração dos flavonoides totais dos extratos foi determinada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para um padrão de quercetina. Os resultados foram expressos, pela medida de três determinações, em mg de equivalentes de quercetina por 100g de extrato (mgEQ/100g).

### 2.3.1. Preparo da curva analítica com quercetina

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução padrão de quercetina, em metanol (1,78 mg/mL  $\equiv$  0,0059 mM). Em seguida, alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40  $\mu$ L desta solução padrão foram misturadas 2,0 mL solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415 nm, utilizando metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0, sendo obtida a equação da reta  $Y = 0,00482 + 47,44374 \cdot X$ , onde  $Y$  é a absorbância a 415nm e  $X$  é a concentração de quercetina. O coeficiente de correlação ( $R$ ) obtido foi de 0,998.

Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonoides totais nas amostras, onde se substituiu  $Y$  pela média da absorbância de cada amostra de extratos e frações. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

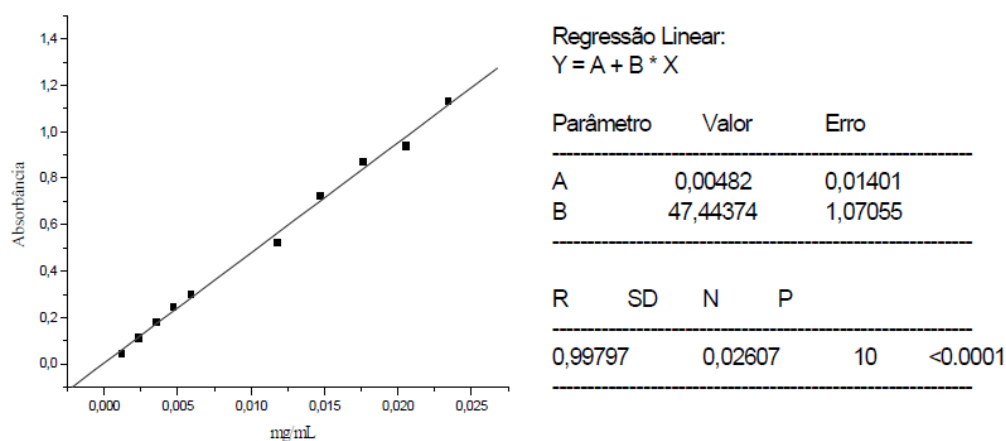


Figura 1: Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina *versus* as leituras de absorbâncias (415nm), após o ensaio com cloreto de alumínio

### 2.3.2. Acetilação com anidrido acético e piridina

A reação de acetilação foi feita utilizando-se 1,0 mL de anidrido acético e 1,0 mL de piridina para cada 10,0 mg de material. A mistura reacional foi mantida sob agitação

por 24 horas. A seguir adicionou-se água destilada gelada e extraiu-se com clorofórmio. A solução clorofórmica foi lavada com ácido clorídrico 10% e posteriormente com água destilada até o completo desaparecimento do cheiro de piridina, secou-se com sulfato de sódio anidro e após evaporação obteve-se a substância acetilada (SHRINER, 1979).

### **2.3.3. Metilação com diazometano**

A solução de diazometano foi preparada de acordo com a metodologia experimental descrita na literatura (CARVALHO *et al.* 2006). Em duas etapas, a primeira para a síntese da nitrosometilureia, foram misturados 100 ml de solução de metilamina 40 % e 97 ml de ácido clorídrico concentrado, de modo que o pH da solução se tornasse fortemente ácido. A esta solução ácida foram adicionados 50 ml de água e 75,0 g de ureia. A mistura foi aquecida vigorosamente, sob refluxo, durante 2h e 30 min., para produzir a metilureia. Deixou-se a solução resfriar à temperatura ambiente e dissolveu-se 27,5 g de nitrito de sódio para formar uma solução desse sal com metilureia que, então, foi resfriada até a temperatura de 0°C, em banho de gelo e sal. Paralelamente foi preparada uma mistura de 150,0 g de gelo picado e 15 ml de ácido sulfúrico concentrado em um becher de 1 L, cercado de banho de gelo e sal. Adicionou-se lentamente a essa solução ácida e com agitação mecânica (durante de 1 hora) a solução fria de nitrito com metilureia, de modo que a temperatura não ultrapassasse 5 °C. A haste de funil que é utilizado para adicionar a solução (metilureia + nitrito de sódio) deve ficar abaixo da superfície da solução de ácido. A nitrosometilureia é recuperada como um precipitado cristalino esponjoso na superfície da solução ácida. O precipitado foi filtrado imediatamente com sucção em funil de Buchner. Os cristais foram lavados com água fria, reduzidos a uma pasta e secados em um dessecador sob pressão reduzida

Na segunda etapa, a nitrosometilureia, 2,14 g foi solubilizada em 30,0 mL de éter etílico e colocada dentro de um balão de destilação juntamente com uma solução de KOH (0,4 g em 10,0 mL de etanol). A mistura reacional foi então destilada com aquecimento brando em banho de óleo e a solução de diazometano foi recolhida em erlenmeyer mergulhado em banho de gelo. O material a ser metilado foi completamente dissolvido em MeOH, adicionou-se a solução etérea do diazometano em excesso, observando desprendimento gasoso, a solução foi deixada em repouso para a evaporação natural dos

solventes. A ocorrência da reação foi monitorada através de comparações em CCF com as substâncias puras.

### 3. REFERÊNCIAS GERAIS:

ABREU, H. S.; FO R. B.; GOTTLIEB H. E.; SHOOLERY J. N. A Nor-triterpenoid from *Lophanthera Lactescens*. *Phytochemistry*, v. 29, n 7, 2257 – 2261, 1990.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101: 1383-1392, 2007.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 1, 229-239, 2010

CARVALHO, M. G. DE, JUNIOR, J. G. R., SUZART, L.R., CORNELIUS, M. T. F., SILVA, V. C. DA & CARDOSO, M. A. R. Determinação Estrutural de Flavonoides Usando Análise Espectrométrica de RMN 1H 1D e Reação com Diazometano. *Revista Universidade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR*, v. 25, n.1-2, 46-60, jan dez. 2006.

CORRÊA, G. M. E ALCÂNTARA, A. F. DE C. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(1): 220-238, Jan./Feb. 2012

COSTA, A.F. **Farmacognosia experimental**. Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian, 1972, 932-39 v.3

DANELLI, M.G.M.; SOARES, D.C.; ABREU, H.S.; PEÇANHA, L.M.T.; SARAIVA, E.M. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a *nor*-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry* 70 608-614, 2009.

DOMINGUEZ, X. A. **Metodos de investigación fitoquímica**. Mexico Limusa- Wiley, 1973.281p.

DOS SANTOS, G. C. M.; FERNANDES, R. D.; BARROS, T. R.; ABREU, H. S.; SUZART, L.R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R.; MARINHO, B. G. Antinoceptive and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Extract from the Stem Bark of *Lophanthera lactescens*. *Planta Medica*, v. 1, 1-9, 2015.

FUNARI, C. S., CASTRO-GAMBOA.I., CAVALHEIRO,A. J. e BOLZANI,V. da S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 10, 1605-1609, 2013

HOSTETTMANN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Ed UFSCar, 152p, 2003.

LEAL, L. R., TELLIS, C. J.M. Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, Vol, 9(4), 253-303, Out-Dez 2015

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: Editora UFC, 1997.107-111, 135p.

MEDA, A, et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*, 91, 571-577, 2005.

SHRINER, R. L. **The systematic identification of organic compounds**. 6th ed., John Wiley & Sons: Singapore, 1979. 160.

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

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova*,Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

VENNAT, B. et al. Hamamelis virginiana: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts, *Pharm. Acta Helv.*, v.67, 11-14, 1992.

WALL, J.M.; KRIDER, M.M.; KREWSON, C.F.; EDDY, C.R.; WILLAMAN, J.J.; CORELL, D.S.; GENTRY, H.S. Steroidal sapogenins VII. Survly of plants for steroidal sapogenins and other constituents. *Am. J. Pharm. Ass.*, 63: 1-7. 1954.

## CAPÍTULO I

### ESTUDO QUÍMICO DE *Justicia wasshauseniana* Profice

#### 1. Revisão de Literatura:

##### 1.1. Generalidades sobre a família Acanthaceae e o gênero *Justicia*

A família Acanthaceae possui uma distribuição predominante nas regiões tropicais do mundo, com centros de diversidade na região da Indo-Malásia, África (incluindo Madagascar), Brasil, Andes e América Central. Compreende cerca de 250 gêneros e 2500 espécies (WASSHAUSEN, 2004). No Brasil ocorrem aproximadamente 40 gêneros e 449 espécies (PROFICE *et al.*, 2016). Entre os gêneros nativos, destacam-se *Justicia* e *Ruellia* entre os mais comuns (SOUZA *et al.*, 2005). *Justicia* é o maior gênero, com aproximadamente 600 espécies que são encontradas em regiões tropicais e pantropicais (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012).

Dentro do gênero *Justicia* destaca-se a espécie *Justicia pectoralis* Jacq. que é utilizada na medicina popular para dores, febre e no tratamento de doenças do aparelho respiratório (ROCHA, 1945; BRAGA, 1976; CORREA, 1984) e é conhecida popularmente como anador, novalgina e Erva Santa (MORAIS *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2005).

Várias espécies de *Justicia* são amplamente utilizadas em medicina popular para o tratamento de doenças do aparelho respiratório e gastrointestinal, assim como inflamação, incluindo aplicações em reumatismo e artrite. As plantas são também utilizadas para efeitos sobre o sistema nervoso central, como alucinógenos, soníferos, sedativos, depressores e tratamentos para a epilepsia e outras perturbações mentais. Outras espécies são popularmente usadas no tratamento da dor de cabeça e febre, que podem ser associadas com a sua ação sedativa e analgésica (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012).

Normalmente todas as partes da planta são utilizados na medicina popular, sendo que extratos feitos a partir das folhas são os mais utilizados, seguido por aqueles extratos feitos apenas a partir das raízes. Algumas espécies são utilizadas como misturas. Por exemplo, uma mistura de pó das raízes de *Cassia occidentalis* L., Caesalpineae, *Derris brevipes* var. *coriacea*, Papilionaceae e *Justicia simplex* D. Don, Acanthaceae é usada na Índia para controlar a fertilidade. A administração desta mistura durante poucos dias

depois da menstruação impede concepção sem qualquer efeito tóxico. (BADAMI *et al.*, 2003). A decocção das folhas de *Justicia trinervia* é usada no tratamento de diabetes e para arritmia cardíaca (RAGHAVENDRA *et al.*, 2015).

Poucas espécies do gênero *Justicia* foram estudadas. Algumas espécies têm somente informações farmacológicas e poucas espécies foram quimicamente e biologicamente estudadas, principalmente na última década. As espécies mais estudadas são *Justicia pectoralis* Jacq., *Justicia procumbens* L., *Justicia gendarussa* Burm. F., e *Justicia anselliana* (Nees) T. Anderson (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012).

## 1.2. Características morfológicas de *Justicia wasshauseniana* Profice

*Justicia wasshauseniana* é uma planta arbustiva, que possui flores de coloração branca e atinge cerca de 1,5 m de altura (**Figura 1**). É vulgarmente conhecida como Rabo de Quati. A descrição botânica da *Justicia wasshauseniana* Profice encontra-se na **Tabela 1**. É uma planta endêmica na Mata Atlântica, encontrada nas regiões Nordeste (Bahia) e Sudeste (Espírito Santo, Rio de Janeiro) (**Figura 2**), (ZOTTELE e AOYAMA, 2014)



**Figura 2:** Fotos de *Justicia wasshauseniana* (BRAZ, D. M., arquivo pessoal).





**Figura 3:** Ocorrência de *Justicia wasshauseniana* no Brasil (PROFICE *et al.*, 2016).

**Tabela 1:** Classificação botânica de *Justicia wasshauseniana*

Divisão:	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe:	Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Ordem:	Scrophulariales (Limiales)
Família:	Acanthaceae
Gênero:	<i>Justicia</i>
Espécie:	<i>Justicia wasshauseniana</i>
Autor:	Profice

### 1.3. Estudos farmacológicos do gênero *Justicia*

Testes de atividades farmacológicas do gênero *Justicia* revelaram que algumas espécies apresentam atividade antitumoral contra diferentes linhas celulares de câncer, como o extrato metanólico de *J. ciliata* na inibição do carcinoma cervical humano (DAY *et al.*, 1999); o extrato de acetato de etila das folhas e caule de *J. patentiflora* na inibição do crescimento das células tumorais (SUSPLUGAS *et al.*, 2005); o extrato da planta inteira de *J. procumbens* na inibição do crescimento das células tumorais de coelhos (FUKAMIYA & LEE, 1986); das folhas de *J. rhodoptera* na inibição de câncer de ovário humano (WILLIAMS *et al.*, 2003); os extratos aquoso e etanólico das folhas e partes aéreas de *J. spicigera* apresentaram atividade antitumoral (CÁCERES-CORTÉS *et al.*, 2001; VEGA-AVILA *et al.*, 2009; ALONSO-CASTRO *et al.*, 2011).

Algumas espécies apresentam atividade antiviral, como *Justicia extensa* T. Anderson, *Justicia gendarussa* Burm. f., *J. procumbens*, *Justicia reptans* Sw. e *Justicia valida* Ridl. *in vitro* contra o HIV tipo 1 na transcriptase reversa e replicação do HIV e contra o vírus da estomatite (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012).

O extrato etanólico de *Justicia spicigera* apresentou atividade antibacteriana contra *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e antifúngica contra *Candida albicans* (VEGA-AVILA *et al.*, 2012). *J. pectoralis* também apresentou alta atividade antibacteriana contra *E. coli*, *E. faecalis* e *S. epidermidis*. Além disso, esta espécie apresenta atividade inseticida contra *Aedes aegypti* (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012) e atividade antinoceptiva (ZAPATA-MORALES *et al.*, 2016). Os extratos *J. pectoralis* também tem ação estrogênica, progestagênica e anti-inflamatória explicando o uso tradicional da planta na menopausa (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012). Os extratos metanólicos das folhas de *Justicia adhatoda* de *Justicia gendarussa* apresentaram atividade antioxidante (JHA, *et al.*, 2014; REDDY *et al.*, 2015). O extrato aquoso de *Justicia hypocrateriformis* apresentou atividade antidiarreica e antioxidante (AGBOR *et al.*, 2014).

Diferentes frações do extrato etanólico de *J. adhatoda* apresentaram atividade antimutagênica utilizando cepas de *S. typhimurium* (TA98 e TA100) e atividade antioxidante frente ao DPPH (KAUR *et al.*, 2015).

A literatura descreve o efeito alelopático de esteróides e triterpenos. Ambas as classes químicas isoladas a partir do extrato alcoólico das partes aéreas de *J. anselliana* mostrou efeito alelopático sobre feijão-caupi (KPOVIESSI *et al.*, 2006). Triterpenos isolados de *Justicia acuminatissima* apresentaram atividade antibacteriana e anti-inflamatória (CORRÊA *et al.*, 2014). O flavonoide glicosilado canferitrina apresentou atividade antidepressiva em dois modelos comportamentais em ratos (CASSANI *et al.*, 2014). Lignanas obtidas a partir de *J. pectoralis* são citotóxicas para linhas de células de leucemia e tumores sólidos (HUI *et al.*, 1986).

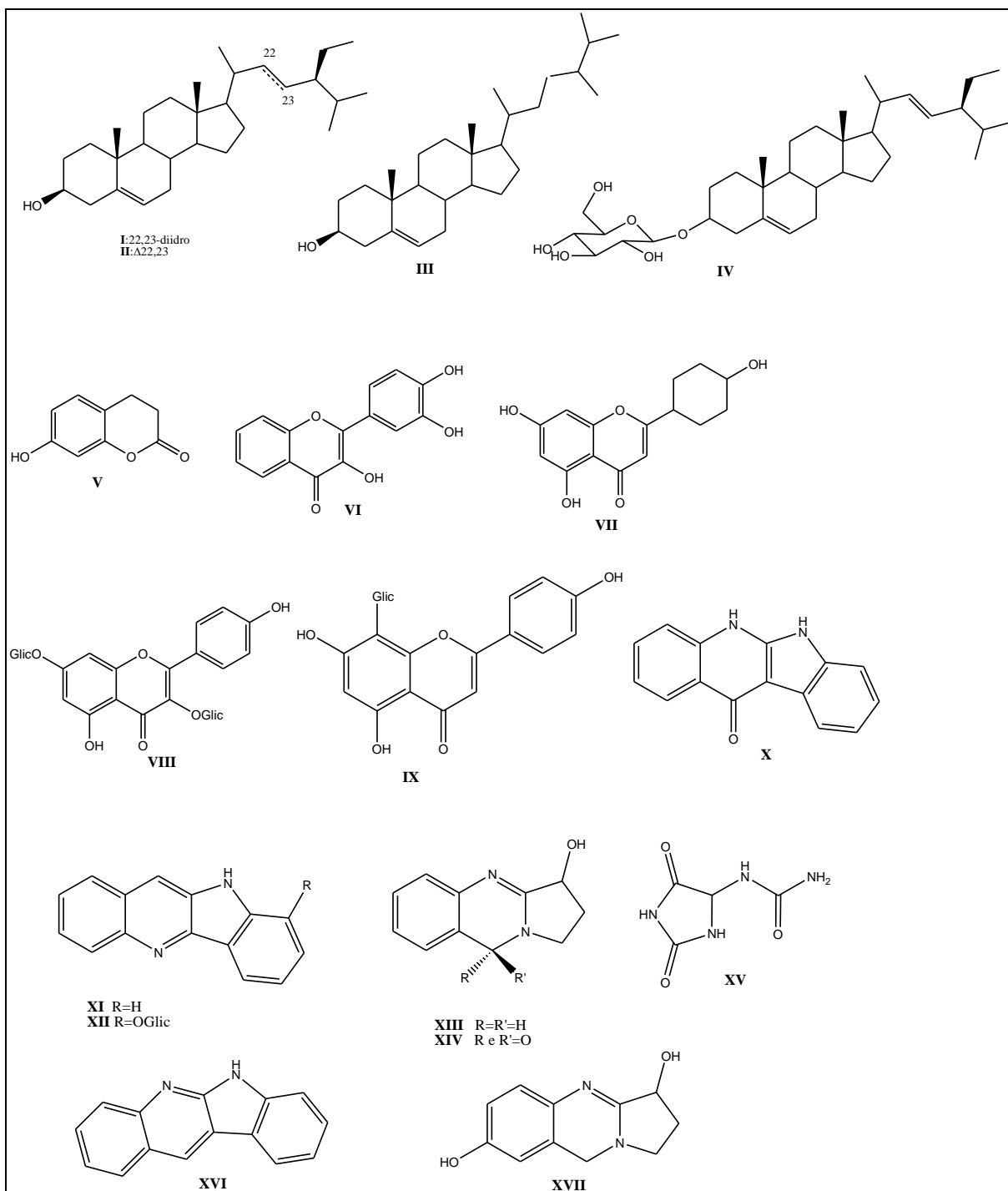
#### **1.4. Estudo químico do gênero *Justicia***

Do ponto de vista químico, a família Acanthaceae é pouco conhecida. Investigações sobre a composição química de espécies do gênero *Justicia* levaram a uma grande diversidade de classes de substâncias, principalmente alcalóides, lignanas, flavonóides e terpenóides (iridóides, diterpenos e triterpenos). Outras classes químicas foram isoladas a partir do gênero, tais como vitaminas, ácidos graxos e ácido salicílico (ANGONESE *et al.*, 1992; AL- JUAID & ABDEL-MOJIB, 2004). Os esteroides campesterol, stigmasterol, sitosterol e sitosterol-D-glucosídeo (**I-IV**) foram isolados a partir das folhas e raízes de *J. flava*, *J. spicigera* e *J. gendarussa* (OLANIYI, 1980; WAHI

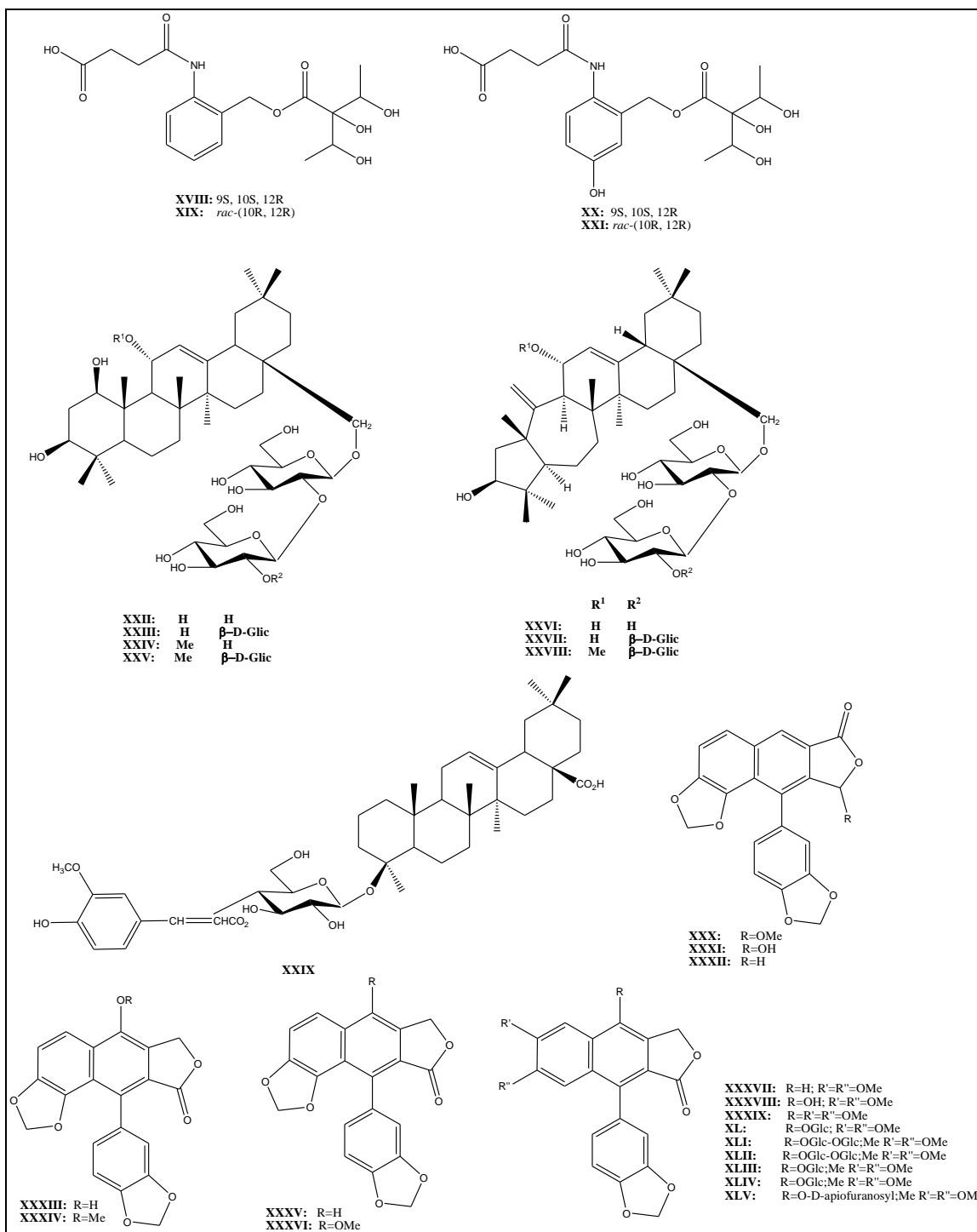
*et al.*, 1974; DOMINGUEZ *et al.*, 1990; AMBORABÉ *et al.*, 2002; DEEPAK *et al.*, 2002; RAJAKUMAR & SHIVANA, 2009).

Foram identificados no gênero uma cumarina (V) e uma pequena variedade de flavonoides (VI-IX), alcaloides (X-XXI), e triterpenos glicosilados (XXII-XXIX) (CORRÊA & ALCÂNTARA, 2012, KIREN *et al.*, 2014).

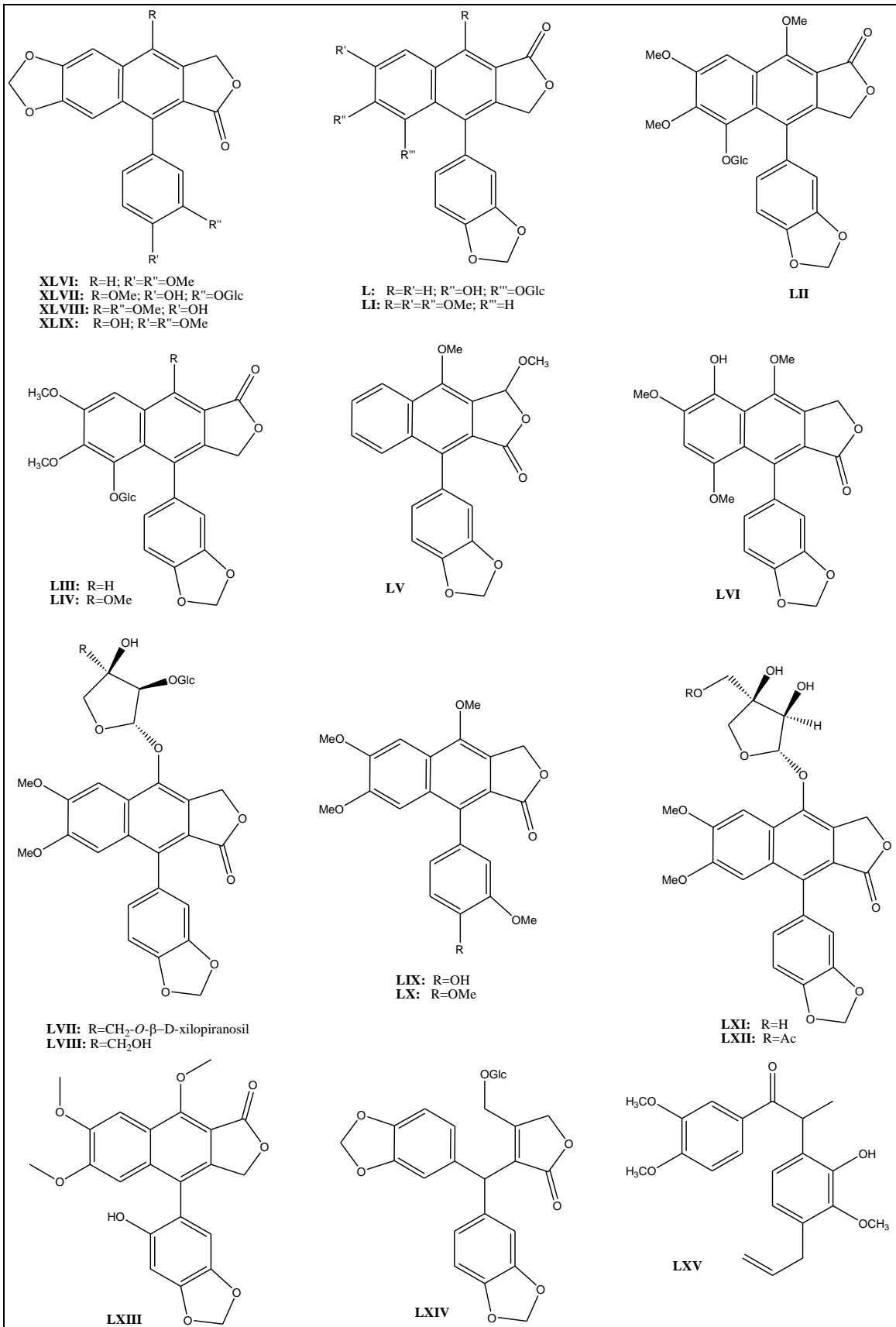
Muitas lignanas foram encontradas no gênero (RAJASEKHAR & SUBBARAJU, 2000; LUO ET AL, 2014). (XXX-LXXII). As lignanas são constituintes químicos comuns em espécies do gênero *Justicia* apresentando importância quimiotaxonômica no gênero (BABU *et al.*, 2001).



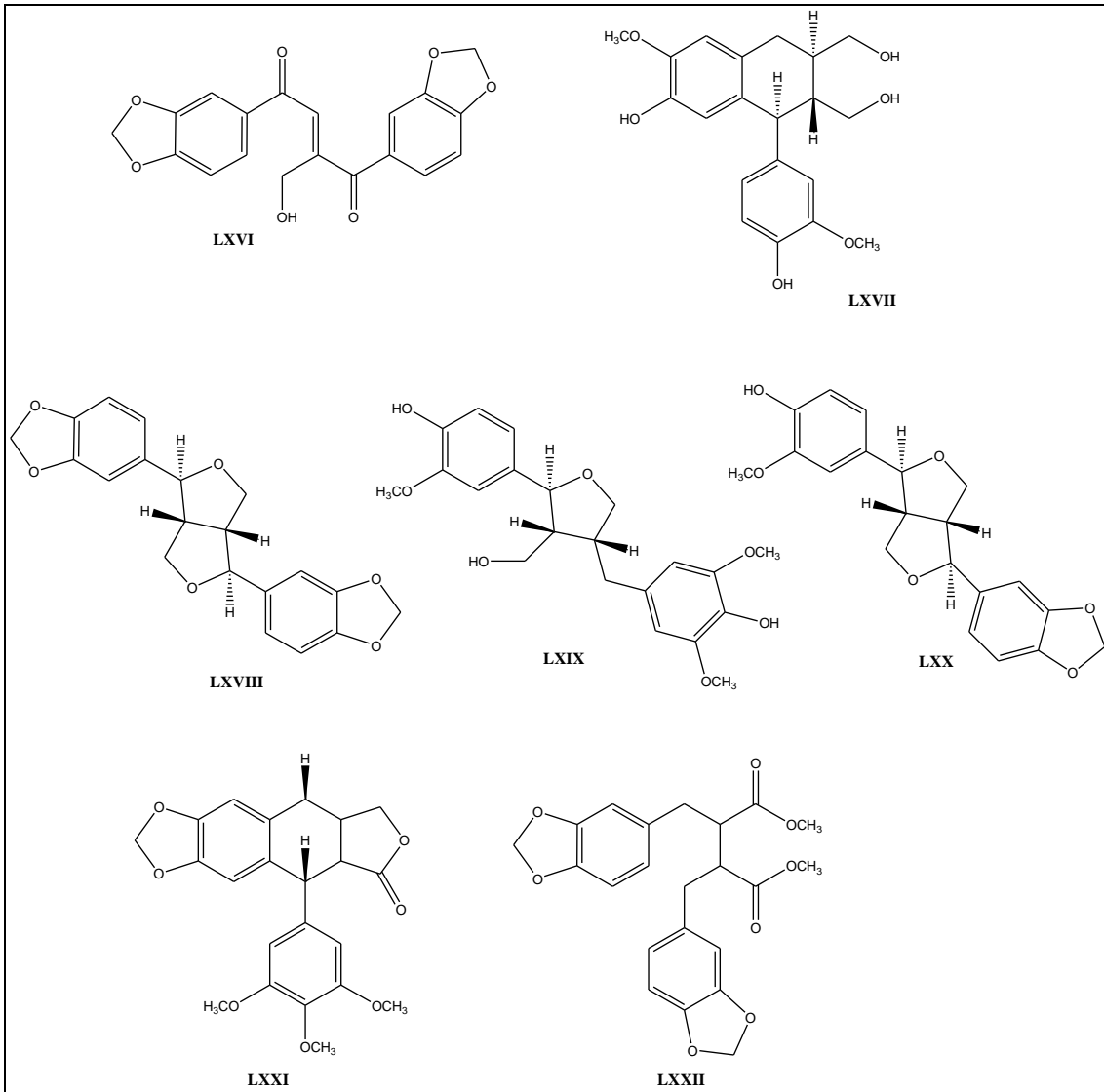
**Figura 4:** Substâncias isoladas do gênero *Justicia*.



**Figura 3:** Substâncias isoladas do gênero *Justicia* (Continuação).



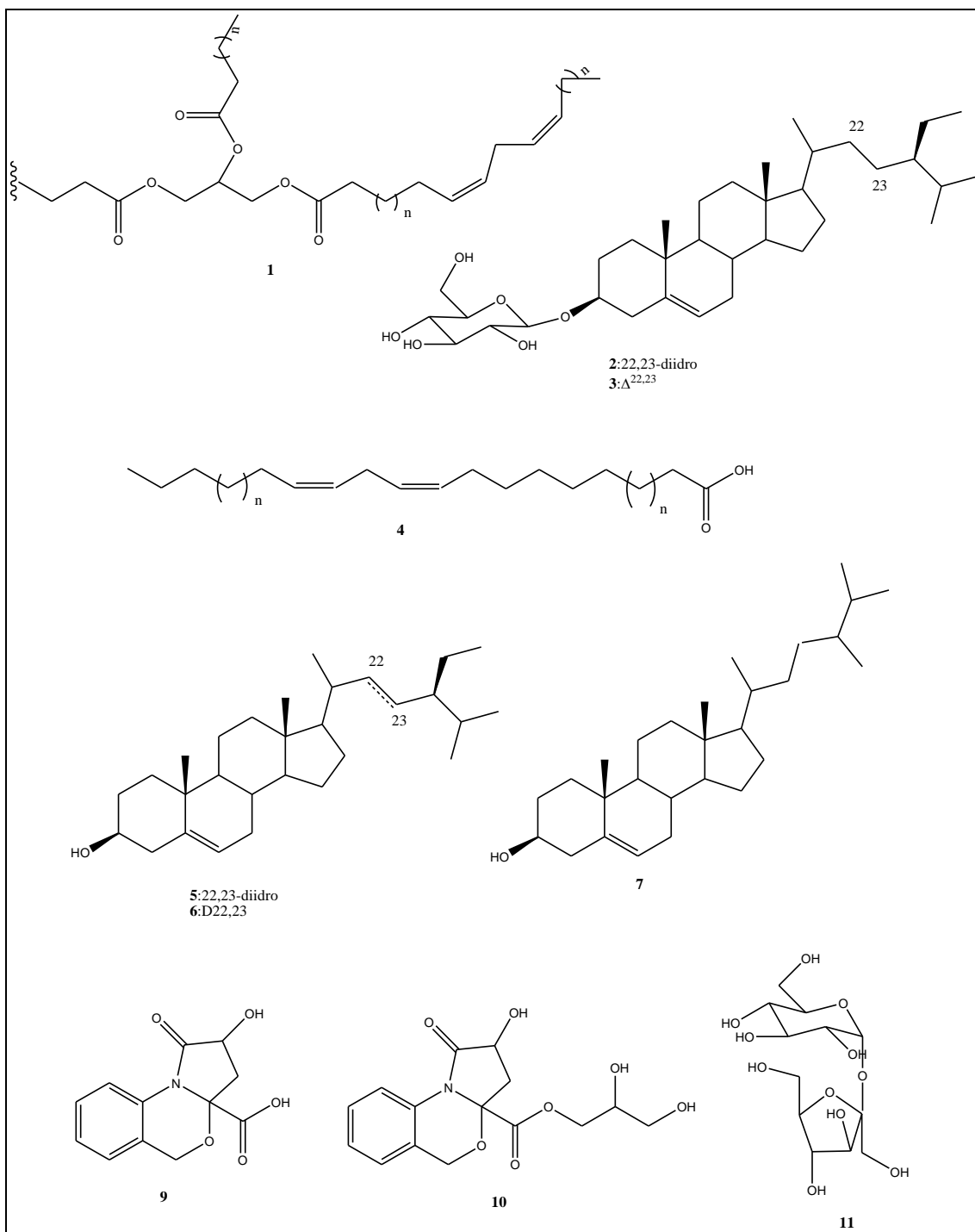
**Figura 3:** Substâncias isoladas do gênero *Justicia* (Continuação).



**Figura 3:** Substâncias isoladas do gênero *Justicia* (Continuação).

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Substâncias isoladas de *Justicia wasshauseniana* Proffice



**Figura 5:** Substâncias Isoladas de *Justicia wasshauseniana* Proffice



## **2.2.Obtenção do material vegetal:**

O material vegetal da espécie *J. wasshausseniana* Profice foi coletado no Parque Natural Municipal do Curió, Município de Paracambi, RJ, em trecho remanescente de Floresta Atlântica. A planta foi coletada pela professora Dra. Denise Monte Braz (IB-UFRRJ) em de março de 2008 e setembro de 2009 e depositadas no herbário como D.M.Braz 168 (RBR) e D.M.Braz 274 (RBR), respectivamente.

## **2.3.Obtenção dos Extratos Brutos**

O caule e a folha da *Justicia wasshausseniana* Profice, foram secos a temperatura ambiente por sete dias e moídos em moinho de facas, obtendo-se 453,37 g de caule e 657,36 g das folhas.

O material pulverizado do caule e das folhas foi submetido separadamente à extração através de maceração contínua a temperatura ambiente com solventes: diclorometano e metanol. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório a partir de 40 °C sob pressão reduzida e, após o uso de ar quente para retirar o resíduo de solventes, obteve-se os resíduos denominados: **JWCD** (*J. wasshausseniana* Caule Diclorometano) - 2,39g; **JWFD** (*J. wasshausseniana* Folha Diclorometano) - 20,64g; **JWCM** (*J. wasshausseniana* Caule Metanol) - 44,79g e **JWFM** (*J. wasshausseniana* Folha Metanol) - 55,09g.

## **2.4. Prospecção fitoquímica dos extratos de *Justicia wasshausseniana***

Uma pequena parte dos extratos foi utilizado para a realização da avaliação da classe dos constituintes presentes, através da prospecção fitoquímica. A **tabela 2** demonstra os resultados da prospecção fitoquímica dos extratos de *Justicia wasshausseniana* que revelou em alguns extratos testes positivos para as classes de metabólitos especiais: saponinas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, flavonóides, cumarinas, aminoácidos não protéicos, carboidratos e cardioativos.

**Tabela 2:** Registro dos resultados da prospecção química dos extratos de *Justicia wasshausseniana*.

Prospecções	JWCD	JWCM	JWFD	JWFM
Saponinas	-	+	-	-
Esteróides e triterpenóides	+	-	+	-
Alcalóides	-	+	-	+
Flavanonóides	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Cumarinas	+	+	+	+
Taninos	-	-	-	-
Aminoácidos não-protéicos	-	+	-	-
Carboidratos	+	+	+	+
Cardioativos	+	+	+	+

### 2.5. Ensaio de flavonoides totais com cloreto de alumínio

Foi feita a avaliação da quantidade de flavonoides das amostras dos extratos de *Justicia wasshausseniana* pelo método espectrofotométrico utilizando o cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ).

Os valores de absorvância das amostras e os teores de flavonoides totais dos extratos de *Justicia wasshausseniana* (**JWCM** – *J. wasshausseniana* caule metanol e **JWFM** - *J.wasshausseniana* folha metanol encontram-se listados na **Tabela 3**. Os extratos de *Justicia wasshausseniana* apresentaram um valor médio relativamente baixo em total de flavonoides (JWCM – 10,46 mg/g extrato e JWFM – 11,39mg/g extrato).

**Tabela. 3:** Ensaio de Flavonoides totais de *Justicia wasshausseniana*

Amostra	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>méd.</sub>	mg/g extrato	mg/g extrato	mg/g extrato	MÉDIA	Desvio Padrão
<b>JWCM</b>	0,248	0,255	0,256	<b>0,253</b>	10,25	10,55	10,59	<b>10,46</b>	<b>± 0,184</b>
<b>JWFM</b>	0,267	0,278	0,275	<b>0,273</b>	11,05	11,52	11,39	<b>11,32</b>	<b>± 0,240</b>

## **2.6. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos dos Extratos de *J. wasshauseniana* Profice.**

### **2.6.1. Extrato de diclorometano do caule de *J. wasshauseniana* (JWCD):**

Cerca de 2,23g do extrato de diclorometano do caule da *J. wasshauseniana* (JWCD) foi submetido a cromatografia em coluna aberta usando como fase estacionária sílica gel 60 (0,04mm-0,063mm e 230-400mesh) e eluída em diclorometano e mistura de diclorometano/metanol aumentando gradativamente a polaridade até metanol 100% e foram obtidas 58 frações. Essas frações foram analisadas em CCF (cromatografia em camada fina) e reunidas em grupos de acordo com sua semelhança.

A subfração (JWCD-5, 20,0 mg) quando eluída com diclorometano e clorofórmio separadamente, apresentou somente uma mancha nas CCFs, esta amostra foi enviada para a análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , cujo espectro permitiu identificar a substância **1**, solúvel em clorofórmio.

Na subfração (JWCD-31, 30,0 mg) obteve-se um precipitado que foi purificado em acetona, obteve-se um cristal em forma de placas, solúvel em DMSO, que através de análise por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi identificado como uma mistura das substâncias **2** e **3**.

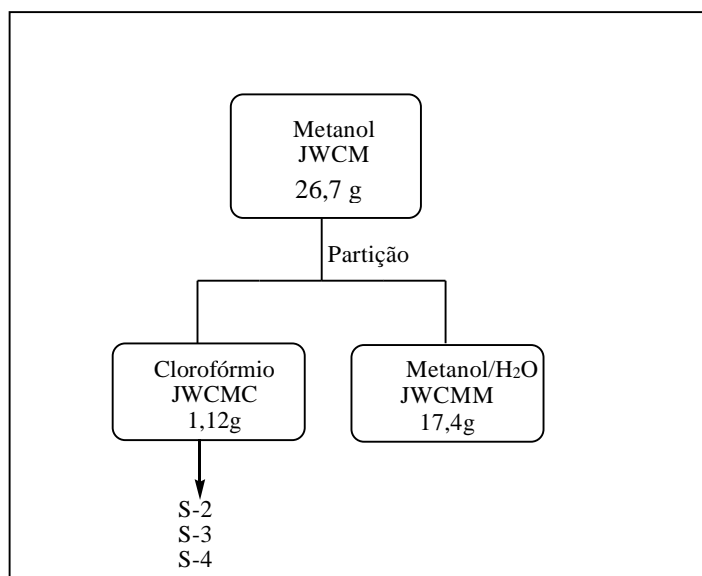
### **2.6.2. Extrato de metanol do caule de *J. wasshauseniana* (JWCM):**

Separou-se 26,27 g do extrato JWCM e dissolveu-o em metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (8:2). A solução foi submetida a processo de partição com clorofórmio. Obtendo-se, após destilação dos solventes, 17,14g da partição metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (JWCMM) e 1,12g da partição clorofórmio (JWCMC) (**Esquema 1**).

Foi realizada uma cromatografia em coluna de sílica gel com 1,03g da fração JWCMC eluída com diclorometano e metanol seguindo gradiente de polaridade crescente, obtendo-se 26 frações.

A subfração (JWCMC-1, 19,0 mg) da coluna cromatográfica forneceu um sólido branco solúvel em clorofórmio que foi identificado como substância **4**.

Na subfração (JWCMC-4, 30,0 mg) ocorreu a formação de um precipitado, que foi recristalizado em metanol, obtendo-se cristais em forma de placas, solúveis em DMSO, que foi identificado novamente como uma mistura das substâncias **2** e **3**.

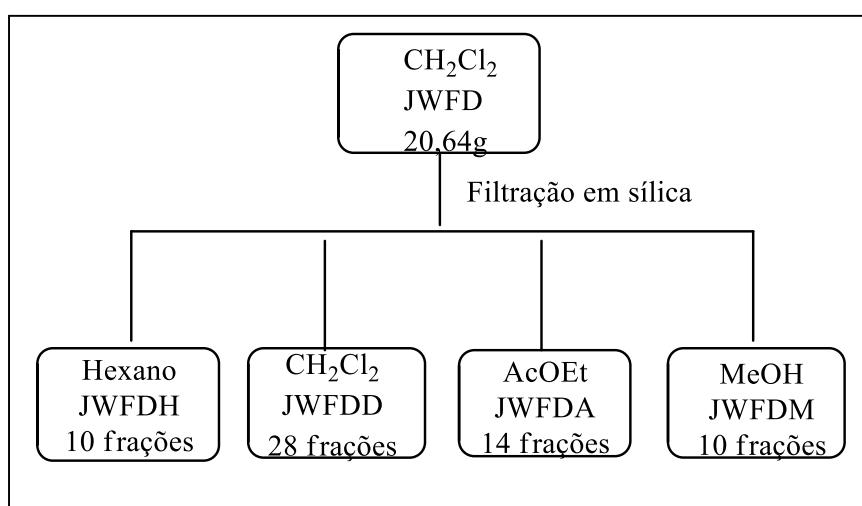


**Esquema 1:** Partição do extrato metanólico do caule de *J. wasshausseana*

### 2.6.3. Extrato de diclorometano das folhas de *J. wasshausseana* Profice:

O extrato de diclorometano de folhas de *J. wasshausseana* (18 g) foi submetido a processo de filtração seletiva em funil de separação utilizando como meio filtrante a sílica gel e como eluentes os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

Obtendo as frações hexano (**JWFDH**), diclorometano (**JWFDD**), acetato de etila (**JWFDA**) e metanol (**JWFDM**) (**Esquema -2**)



**Esquema 2:** Fluxograma das frações obtidas da coluna filtrante do extrato diclorometano da folha.

A fração diclorometano (**JWFDD**) foi submetida a cromatografia em coluna com sílica gel e eluída com diclorometano e metanol aumentando gradativamente a polaridade até metanol 100%, obtendo 121 frações. As quais após análise por CCF foram reunidas de acordo sua semelhança cromatográfica.

Na subfração (**JWFDD19-30**, 65mg) observou-se a formação de um precipitado branco em forma de agulhas, que foi recristalizado em MeOH, solúvel em clorofórmio, que foi identificado como uma mistura das substâncias **5**, **6** e **7**.

Na fração obtida com acetato de etila (**JWFDA**), verificou-se a formação de um precipitado, que foi recristalizado em metanol, obteve-se um cristal em forma de placas, solúvel em DMSO, que foi identificado novamente como uma mistura das substâncias **2** e **3** (63,0 mg).

#### **2.6.4. Extrato de metanol das folhas de *J. wasshausseniana* (JWFM):**

Com o extrato metanólico (**JWFM**, 36,15g), foi realizado partição com clorofórmio (3 x 250mL) e resuspensão em água. Obtendo as frações clorofórmio (**JWFMC**) e água (**JWFMA**).

A partição clorofórmio (**JWFMC**) foi concentrada em evaporador rotatório, obtendo 12,39g e foi então realizada uma segunda partição utilizando metanol/água 9:1 e hexano, obtendo-se então as frações: Hexano (**JWFMCH**, 1,149g), Metanol (**JWFMC**, 2,368g) e o que restou da partição clorofórmio (**JWFMC**, 8,185g).

A fração aquosa (**JWFMA**), foi lavada com acetato de etila (4 x 250mL) e butanol (4x 250ml). As frações foram concentradas e obtiveram-se as frações acetato de etila (**JWFMAAc**, 0,900g) e butanol (**JWFMAB**, 5,517g), o resíduo da partição água ao ser concentrado formou um precipitado, que foi recristalizado com Metanol/Acetona e apresentou característica de um sal, substância **8** (**JWFMAp**, 4,229g) e o resíduo aquoso (**JWFMA**, 14,294g). (**Esquema 3**).

Com 3,082g da fração butanol (**JWFMAB**) foi realizada cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando os solventes hexano/acetato de etila/metanol em ordem crescente de polaridade até metanol 100% como eluentes, obtendo-se 29 subfrações.

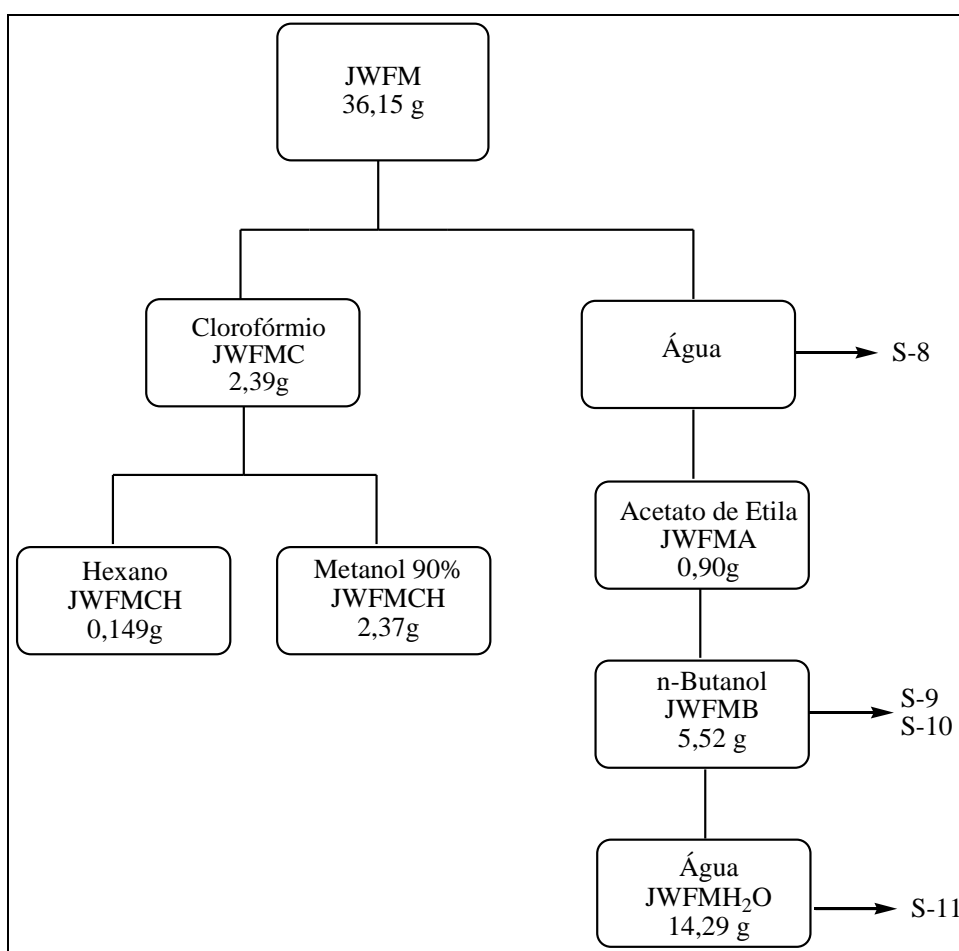
Após análise em CCF, as subfrações 1-2, 3-7 e 15-18 foram submetidas a cromatografia por exclusão em Sephadex LH-20 eluídas com metanol.

Através de filtração de 1-2 (456,0 mg) obteve-se 20 subfrações, as subfrações 2-4 foram reunidas, com o código **JWFMBM2,4** e identificada como a substância **9** (85,0 mg).

As subfrações 3-7 (357,0 mg) forneceram 8 subfrações, nas subfrações 3-5 (**JWFMBM3,3**, 23,0mg) e foi possível identificar a substância **10** e na subfração 8 (**JWFMBM3,8**, 10mg), também a presença da substância **9**.

Foi realizado reação de acetilação com anidrido acético e piridina com a substância **9** fornecendo a substância acetilada **9A**. Com a substância **9** também foi realizado metilação com diazometano, no qual foi observado a ocorrência da reação através da análise de CCF.

Com a subfração 6 ocorreu a formação de um precipitado e a água mãe (**JWFMH<sub>2</sub>O-6A**) foi submetida a cromatografia em Sephadex LH-20 eluídas com metanol. A subfração 4 (**JWFMH<sub>2</sub>O-6A4**, 36,0 mg) forneceu um sólido branco que foi identificado como substância **11**.



**Esquema 3:** Fracionamento do extrato metanólico das folhas de *J. wasshausseiana*

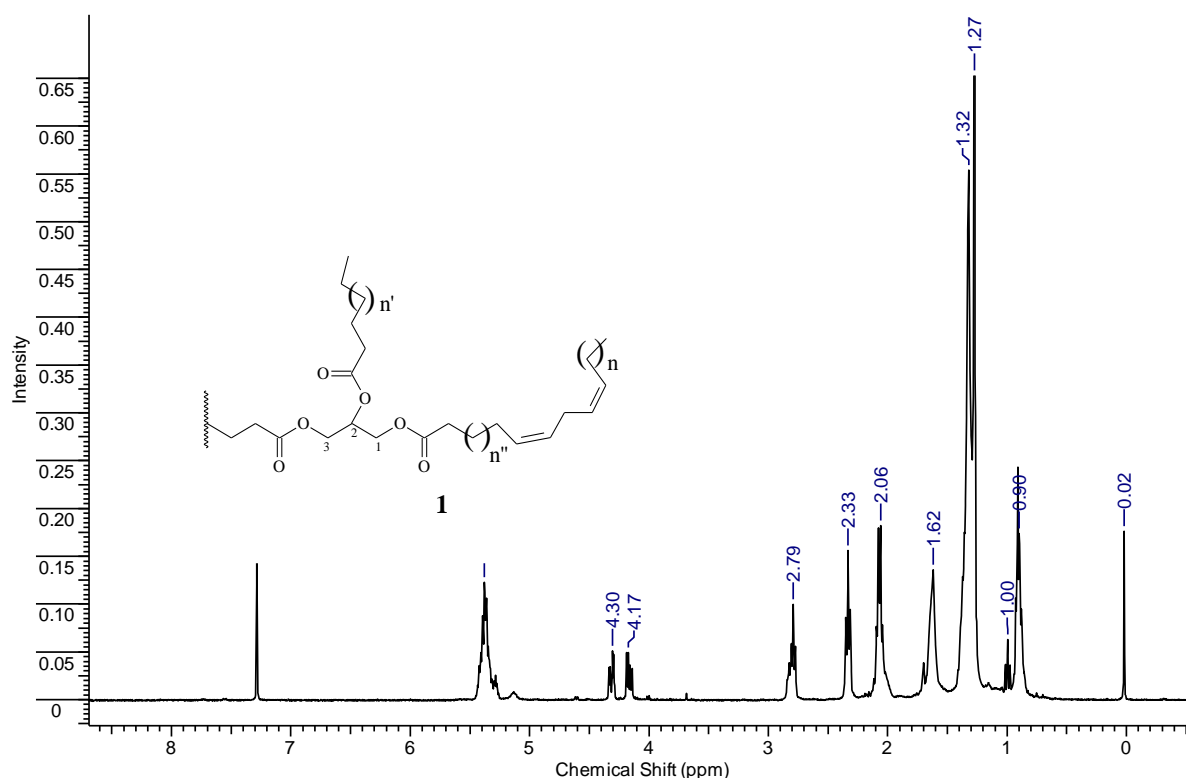
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS de *J. wasshauseniana*:

##### 3.1.1. Substância 1

A amostra (**JWCD-5**, 20,0 mg) substância **1**, solúvel em clorofórmio, foi obtida na forma de cristais, a partir do extrato em diclorometano do caule de *J. wasshauseniana*. A elucidação estrutural de **JWCD-5** foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Os sinais presentes no espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância **1** (**Figura 5**) podem ser atribuídos a sinais correspondentes a metilas em  $\delta_{\text{H}}0,90$ , de  $\text{CH}_2$  em 1,27 e 1,32; 1,62; 2,06 de  $\text{CH}_2\alpha$  a carbonila; 2,33 de  $\text{CH}_2$  alílicos; o sinal em 2,79 de metileno entre duas ligações duplas além dos duplo dubletos em  $\delta_{\text{H}}4,17$  e  $\delta_{\text{H}}4,30$  correspondem aos quatro hidrogênios dos carbonos 1 e 3 da unidade triglicerídica, o sinal  $\delta_{\text{H}}5,30$  corresponde ao hidrogênio do carbono metínico e o sinal em  $\delta_{\text{H}}5,38$  aos hidrogênios olefínicos. Esses dados permitiram propor a estrutura de um triglicerídeo com a unidade acila insaturada.



**Figura 6:** Espectro de RMN de hidrogênio (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **1**.

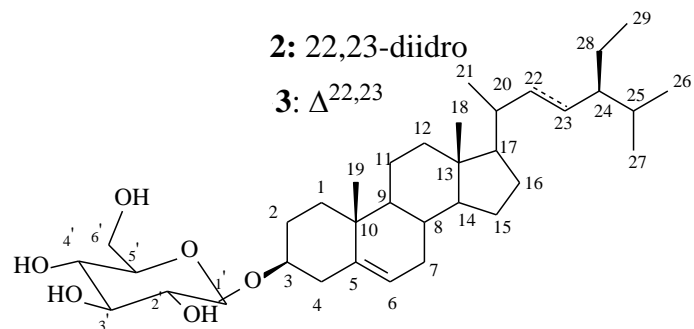
### 3.1.2. Substâncias 2 e 3

A amostra **JWCD-31**. Substâncias **2** e **3**, solúvel em DMSO, foi obtida na forma de cristais em placas, a partir do extrato de diclorometano do caule de *J. wasshausseniana*. A elucidação estrutural de JWCD-31 foi realizada a partir da análise de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  seguida da comparação com dados descritos na literatura (VELANDIA, 2002).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **2** e **3** (**figura 6**) mostrou diversos sinais presentes na região  $\delta_{\text{H}}$  (0,65 a 2,28 ppm) correspondentes a hidrogênios de grupos metílicos, metilênicos e metínicos; multipeto em  $\delta_{\text{H}}$  3,63 compatível com hidrogênio ligado a carbono carbinólico (H-3), um singleto largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,32 típico de hidrogênio olefínico H-6; duplos dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  5,17 (dd, H-22) e  $\delta_{\text{H}}$  5,02 (dd, H-23) sugerindo a amostra ser uma mistura dos fitosteroides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. É observado ainda sinais na região  $\delta_{\text{H}}$  3,45- 2,88 característico de açúcar ligado a estrutura.

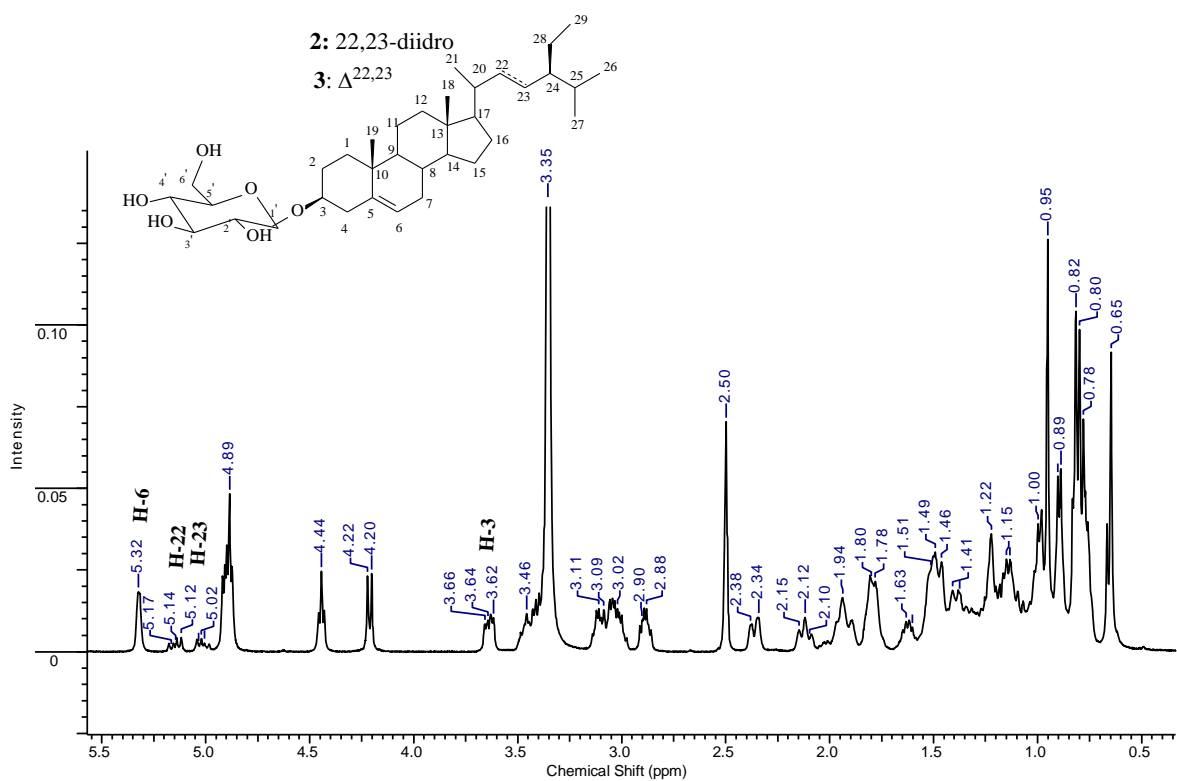
No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **2** e **3** (**Figura 7**) foram observados quatro valores atribuídos a carbonos olefínicos sendo os deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  140,09 e  $\delta_{\text{C}}$  121,66 ppm referentes aos carbonos C-5 e C-6 da ligação dupla atribuída aos esteroides e em  $\delta_{\text{C}}$  138,51 e 129,29 referentes aos carbonos C-22 e C-23 do estigmasterol. Outros sinais sugeriram a presença de uma unidade de açúcar,  $\delta_{\text{C}}$  101,25 ppm do carbono anomérico C-1', quatro sinais de carbonos metínicos oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  70,54, 73,52, 77,20 e 77,21 ppm e um sinal de carbono metilênico em  $\delta_{\text{C}}$  61,54 ppm atribuído ao carbono C- da glicose. A comparação dos valores dos deslocamentos químicos de carbonos e hidrogênios com os da literatura (VELANDIA, 2002) confirmou a amostra como sendo uma mistura de esteroides glicosilados: **2** O esteroide 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol e **3** o 3-O-  $\beta$ -D-glicopiranosil-estigmasterol (**tabela 4**).



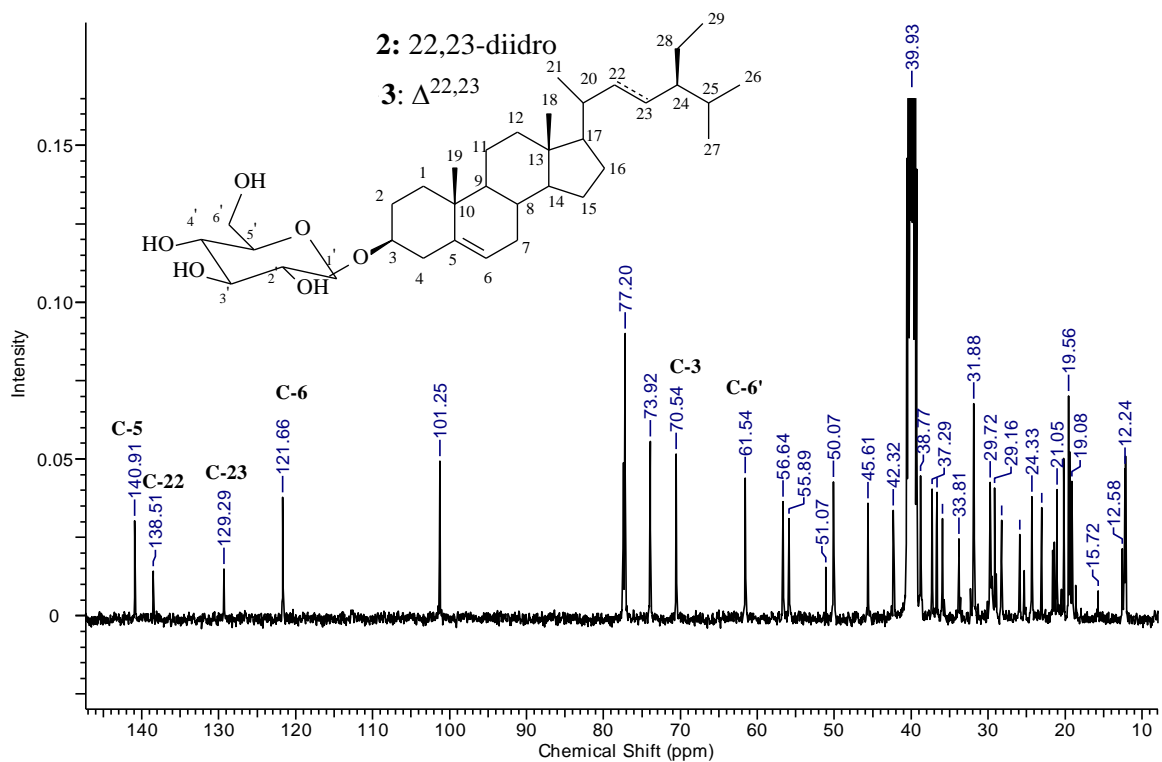


**Tabela 4:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **2** e **3** comparados com dados da literatura (VELANDIA, 2002)

	<b>2</b>	<b>3</b>	Literatura
<b>C</b>	<b><math>\delta\text{C}</math></b>	<b><math>\delta\text{C}</math></b>	<b><math>\delta\text{C}</math></b>
1	36,7	36,7	37,3
2	32,2	32,2	31,6
3	70,5	70,5	71,8
4	41,8	41,8	42,3
5	140,4	140,4	140,8
6	121,0	121,0	121,7
7	31,2	31,2	31,9
8	31,3	31,3	31,9
9	49,5	49,5	50,2
10	36,1	36,1	36,5
11	22,6	22,6	21,1
12	39,2	39,2	39,8
13	41,7	41,7	42,3
14	56,1	56,1	56,9
15	25,5	25,5	24,3
16	27,6	27,6	28,9
17	55,4	55,4	56,1
18	11,5	11,5	11,9
19	19,5	19,5	19,4
20	35,3	38,8	36,1/40,5
21	18,8	18,8	18,8
22	33,3	129,29	33,9/129,3
23	28,7	138,51	26,1/138,3
24	45,1	51,07	45,8/51,2
25	29,2	31,9	29,2/31,9
26	18,9	21,1	19,8/21,2
27	18,8	18,8	19,0
28	23,7	25,2	23,1/25,4
29	12,2	12,2	12,2
1'	103,4	103,4	101,4
2'	74,8	74,8	73,3
3'	77,8	77,8	76,5
4'	71,9	71,9	70,3
5'	75,4	75,4	73,7
6'	65,0	65,0	64,4



**Figura 7:** Espectro de RMN de H (400 MHz, DMSO) de 2 e 3

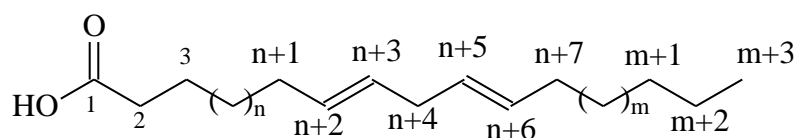


**Figura 8:** Espectro de RMN de C (100 MHz, DMSO) de 2 e 3.

### 3.1.3. Substância 4

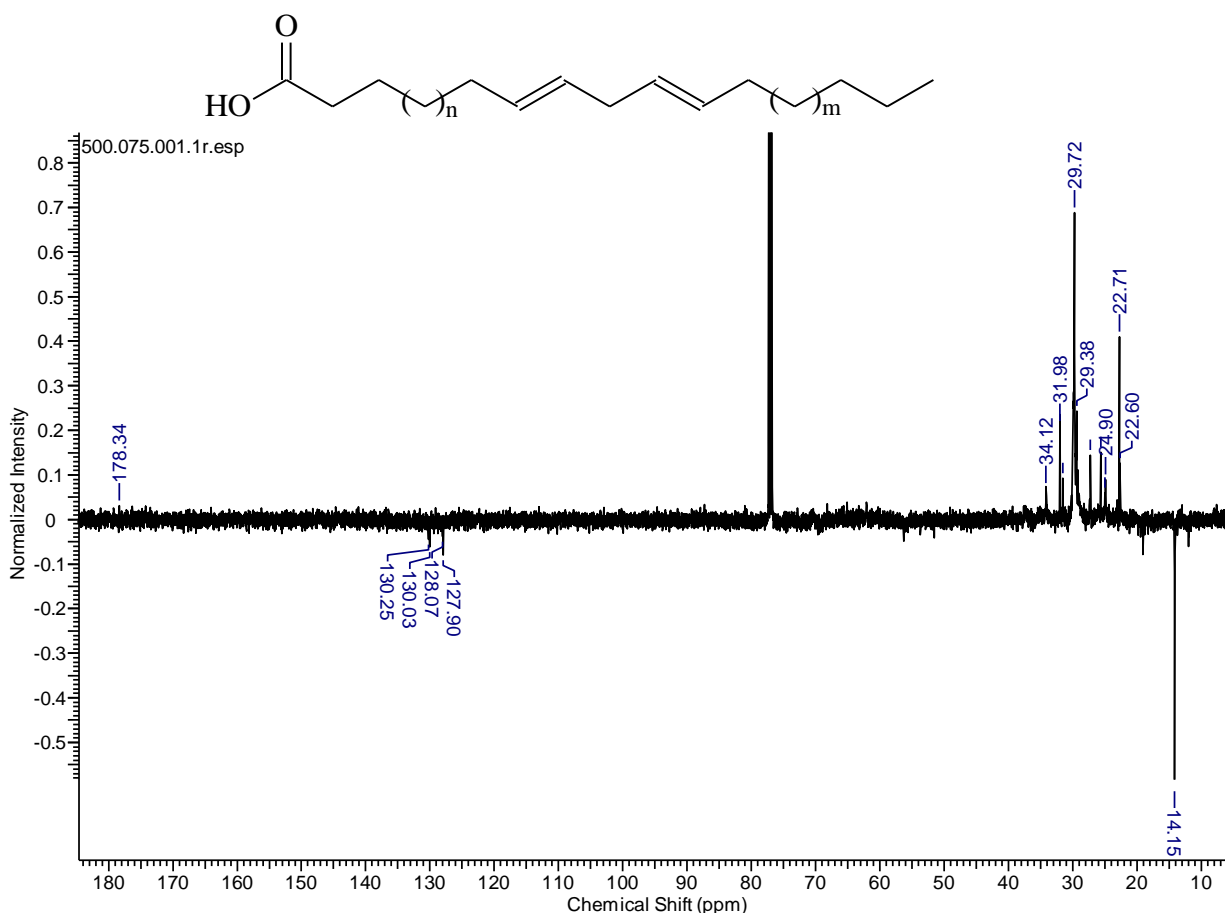
A amostra **JWCMC-1**, substância **4** (30,0 mg, P.F 290-292 °C), foi obtida na forma de um sólido branco solúvel em clorofórmio, a partir do fracionamento do extrato de diclorometano do caule de *J. wasshausseana*. A elucidação estrutural de **JWCMC-1** foi realizada a partir da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  seguida da comparação com dados descritos na literatura (POUCHERT AND BEHNKE, 1993).

Observando o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) da amostra (**Figura 8**) destacam-se os sinais com  $\delta_c$  14,15 ppm indicando presença de grupo metílico, deslocamentos químicos na região 22,60 a 34,12 ppm compatíveis com carbonos metilênicos e quatro sinais em  $\delta_c$  127,90; 128,07; 130,03 e 130,25 ppm correspondentes ao carbono metínicos além do  $\delta_c$  178,34 adequado a C=O de ácidos carboxílicos. Essas observações nos levou a sugerir que a amostra trata-se de um ácido graxo com duas insaturações. Observações com dados da literatura. (POUCHERT AND BEHNKE, 1993) levou a conclusão de tratar-se de um ácido semelhante ao linoleico.



**Tabela 5:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **4** comparados com os dados descritos na literatura do ácido linoleico. (POUCHERT AND BEHNKE, 1993)

		Substância 4	Ácido Linoleico
	C	$\delta_c$	$\delta_c$
CH <sub>3</sub>	m+3	14,07	14,15
	m+2	22,58	22,71
CH <sub>2</sub>	3	24,66	25,63
	n+4	27,19	27,20
	n/m	29,03-29,58	29,13-29,72
	m+1	31,53	31,94
	2	34,12	-
	CH	n+2	127,84
CH	n+3	128,01	128,07
	n+5	129,96	130,03
	n+6	130,16	130,25
	C=O	1	180,07



**Figura 9:** Espectro de DEPTQ (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **4**.

### 3.1.4. Substâncias 5, 6 e 7.

A amostra **JWFDD19-30**, substâncias **5**, **6** e **7** (65mg, P.F 120-122°C), foi obtida na forma de cristais brancos solúveis em clorofórmio, a partir do fracionamento do extrato de diclorometano das folhas de *J. wasshausseiana*. A elucidação estrutural de **JWFDD19-30** foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) seguida da comparação com dados descritos na literatura (JAIN & BARI, 2010).

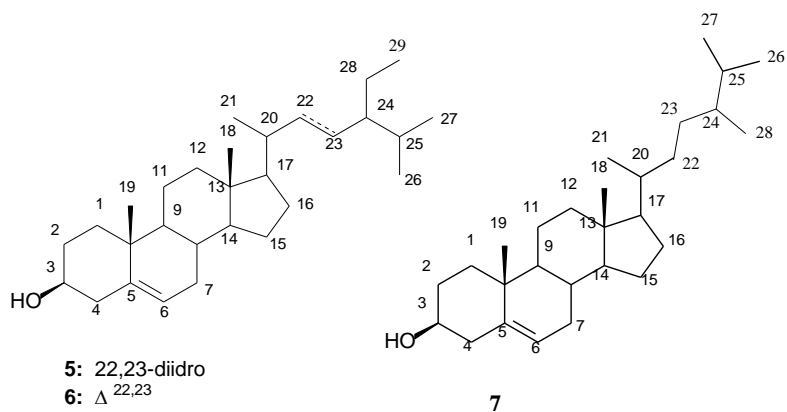
As substâncias **5**, **6** e **7** foram identificadas como os esteróides  $\beta$ -sitosterol (**5**), estigmasterol (**6**) e campesterol (**7**), com base na comparação com dados espectrais de amostra autêntica, envolvendo espectros de RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e CG-EM e CCF.

O espectro de RMN $^1\text{H}$  da amostra (**Figura 9**) da mistura de **5**, **6** e **7** mostrou sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  0,65 e 1,86 correspondentes aos átomos de hidrogênio metílicos, multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,53 atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, um singletos largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,36 atribuído

ao hidrogênio olefínico H-6 e os dubletos de dubletos (dd) em  $\delta_H$  5,04 e 5,15 representantes dos hidrogênios H-22 e H-23 de **6**.

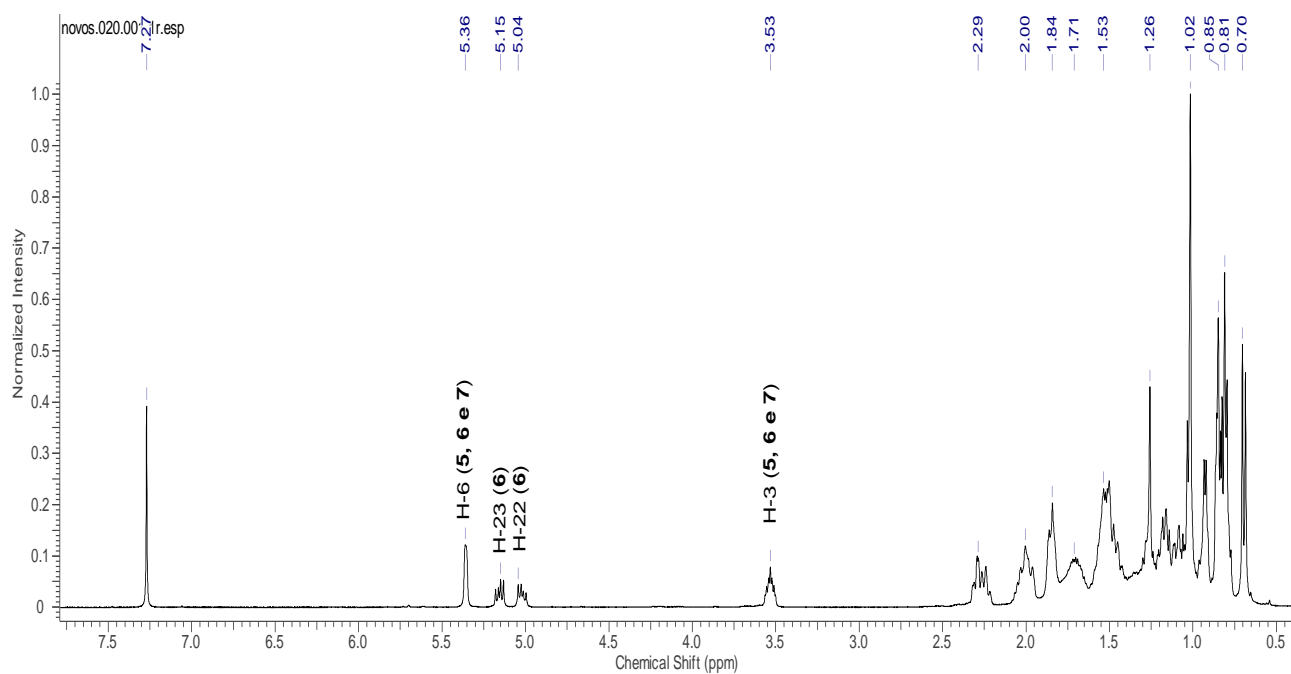
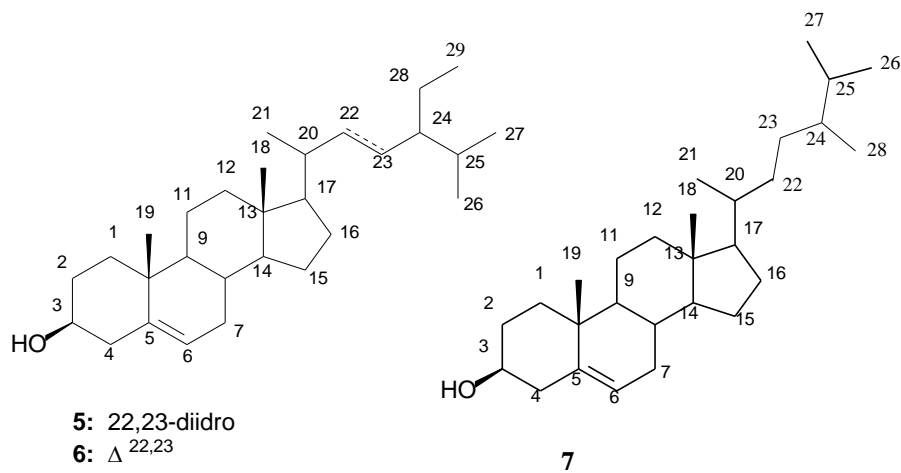
O espectro RMN<sup>13</sup>C (**Figura 10**) revelou a presença de sinais de carbonos olefínicos em  $\delta_{CH}$  121,73 e 140,75, que foram atribuídos aos carbonos C-5 e CH-6, dos três componentes, em  $\delta_{CH}$  138,34 e 129,26, correlacionados com os carbonos metínicos CH-22 e CH-23 de **7** e em  $\delta_{CH}$  71,83 do carbono carbinólico CH-3 também representante dos três esteróides.

A análise GC/EM (**Figura 11**) assumiu importância significativa, já que os espectros de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dessa mistura não garantem definitivamente a presença dos três esteróides, uma vez que a multiplicidade dos sinais na região de grupos metílicos não permite distinguir as possíveis ramificações da cadeia lateral dos esteróides com relativa facilidade. Assim, a análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) permitiu caracterizar a mistura dos três esteróides **5**, **6** e **7**, através dos picos correspondentes aos íons moleculares [M]<sup>+</sup> em *m/z* 400 (campesterol - **7**), 412 (estigmasterol - **6**) e 414 ( $\beta$ -sitosterol - **5**), com os tempos de retenção  $T_R$  19,124; 19,673 e 29,927 minutos, respectivamente, com maior porcentagem do estigmasterol (**6**), cerca de 50%.

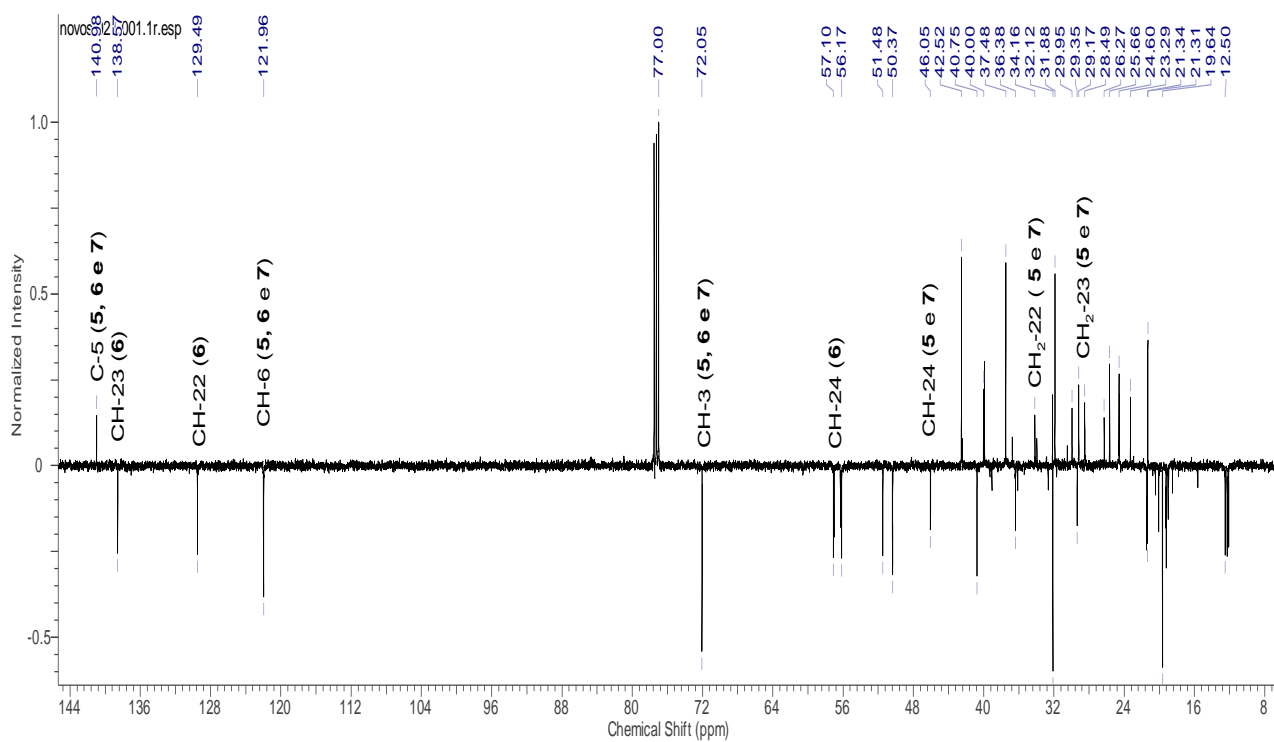
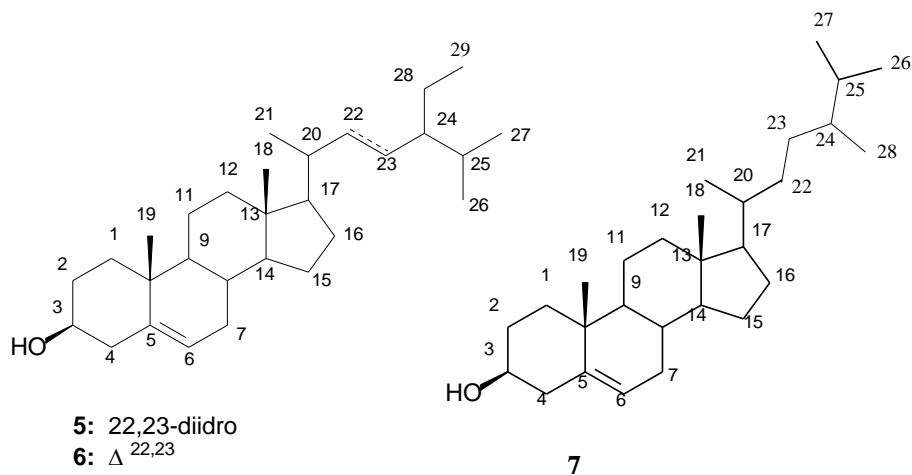


**Tabela 6:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **5**, **6** e **7** comparados com dados da Literatura (JAIN & BARI, 2010)

	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	Literatura
<b>C</b>		<b><math>\delta\text{C}</math></b>	<b><math>\delta\text{C}</math></b>	<b><math>\delta\text{C}</math></b>
5	140,98	140,98	140,98	140,80
10	36,74	36,74	36,74	37,40
13	42,52	42,52	42,52	42,28
<b>CH</b>				
3	72,05	72,05	72,05	71,60
6	121,96	121,96	121,96	121,80
8	32,12	32,12	32,12	31,71
9	50,37	50,37	50,37	50,10
14	56,87	56,87	56,87	58,10
17	57,10	57,10	57,10	56,10
20	36,38	40,75	36,38	36,10/40,28
22	-	129,49	-	130,10
23	-	138,57	-	138,30
24	46,05	51,48	46,05	45,80/52,10
25	29,35	32,12	29,35	29,20/31,90
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	37,48	37,48	37,48	37,30
2	31,88	31,88	31,88	31,60
4	42,52	42,52	42,52	42,28
7	31,88	31,88	31,88	31,90
11	21,31	21,31	21,31	21,10
12	39,91	39,91	39,91	39,80
15	24,60	24,60	24,60	24,10
16	28,49	28,49	28,49	28,40
22	33,93	-	33,93	33,40
23	26,27	-	26,27	26,10
28	23,29	23,29	-	23,10
<b>CH<sub>3</sub></b>				
18	12,10	12,10	12,10	11,90
19	19,26	19,26	19,26	19,10
21	19,01	19,01	19,01	18,80
26	19,64	21,12	19,64	19,80/21,80
27	19,01	19,01	19,01	19,00
28	20,07	20,07	20,07	20,30
29		12,50	-	12,80



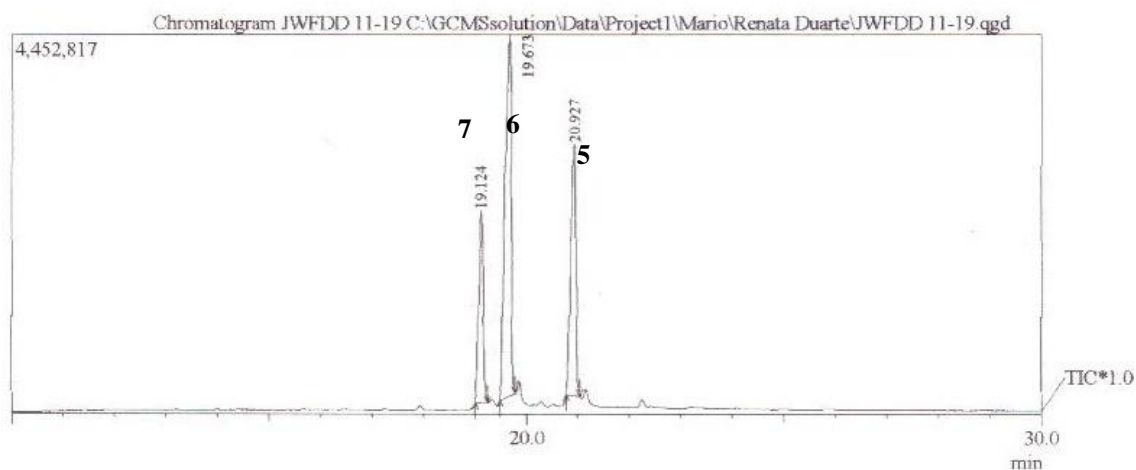
**Figura 10:** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **5**, **6** e **7**.



**Figura 11:** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) das substâncias **5**, **6** e **7**.



Peak Report TIC			
Peak#	R. Time	Area	Area%
1	19.124	13463696	19.24
2	19.673	34985570	50.00
3	20.927	21517739	30.75
		69967005	100.00



**Figura 12:** Cromatograma (CG-EM) das substâncias **5**, **6** e **7**.

### 3.1.5. Substância 8

A amostra **JWFMAp** (4,229g), substância **8**, foi obtida sob a forma de cristais insolúvel em solvente orgânico e sem conclusão de seu ponto de fusão, sendo assim, propôs-se tratar de um sal inorgânico. Fizeram-se testes de caracterização de cátions e ânions, para o teste do cátion foi realizado o teste de chama, onde foi observado a cor violeta e para o ânion teste de precipitação. (VOGEL, 1981). Concluiu-se que a substância **8** é o sal cloreto de potássio (KCl), que é comum em folhas de plantas.

### 3.1.6. Substância 9

A amostra **JWFMBM2,4**, substância **9** (85mg), foi obtida sob a forma de um sólido amorfo de cor marrom, solúvel em metanol, a partir do fracionamento do extrato de metanol das folhas de *J. wasshausseniana*. A proposta de elucidação estrutural de **JWFMBM2,4** foi realizada a partir da análise dos dados de UV, IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D), EM, CD e comparação com dados de análogos estruturais descritos na literatura (JHA, *et. al.*, 2013; ZHOU, *et. al.*, 2010).

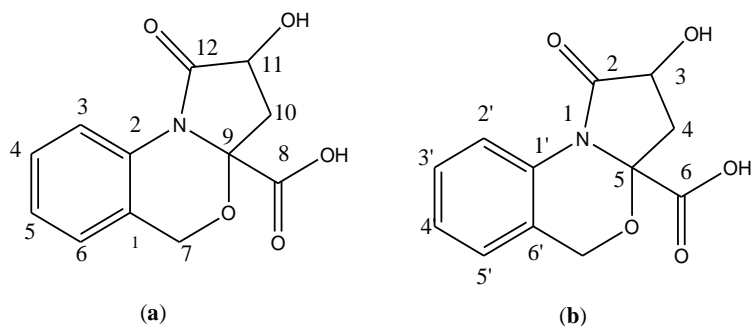
As absorções na região do IV (**Figura 18**) revelou absorções ( $\nu_{\max}$   $\text{cm}^{-1}$ ) de estiramento em  $3402,32 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{O-H}}$ ); em  $1637,51 \text{ cm}^{-1}$  de grupo carbonila ( $\nu_{\text{C=O}}$ ); em  $767,64 \text{ cm}^{-1}$  e  $703,99 \text{ cm}^{-1}$  típicos de anel aromático com substituição em orto e em  $1384,84 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-N}}$ ) de grupo amida.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 19**) apresentou quatro sinais com deslocamentos distintos na região de hidrogênios aromáticos: duplete  $\delta_{\text{H}} 7,11$ ; tripleto  $\delta_{\text{H}} 7,13$ ; multiplete  $\delta_{\text{H}} 7,27$  e duplete em  $\delta_{\text{H}} 8,36$  caracterizando a presença de um anel aromático 1,2-dissubstituído. Ainda no espectro de núcleos de hidrogênio é possível observar hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos como os dubletos  $\delta_{\text{H}} 5,28$  e  $\delta_{\text{H}} 4,85$ ; duplo dublete  $\delta_{\text{H}} 4,57$  e hidrogênios alifáticos como os duplos dubletos  $\delta_{\text{H}} 2,83$  e  $\delta_{\text{H}} 2,07$ . O espectro de COSY (**Figura 21**) apresentou os acoplamentos entre os hidrogênios H-3( $\delta_{\text{H}} 8,36$ )/H-4( $\delta_{\text{H}} 7,27$ ); H-4( $\delta_{\text{H}} 7,27$ )/H-5 ( $7,13$ ); H-7a ( $5,28$ )/H-7b ( $\delta_{\text{H}} 4,85$ ); H-11 ( $\delta_{\text{H}} 4,57$ )/H-10a ( $\delta_{\text{H}} 2,83$ ) e H-10b ( $\delta_{\text{H}} 2,07$ ) e H-10a/H-10b. Através do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPTQ (**Figura 20**) foi possível observar a presença de 11 átomos de carbonos sendo: quatro carbonos metínicos  $sp^2$  ( $\delta_{\text{C}} 118,67$ ;  $126,30$ ;  $124,13$ ;  $123,90$  ppm) e um  $sp^3$  ( $\delta_{\text{C}} 68,17$ ); quatro quaternários dos quais dois  $sp^2$  aromáticos  $\delta_{\text{C}} (123,94$ ;  $132,88)$  e dois  $sp^2$  referentes a carboxilas além de dois metilênicos  $sp^3$  um carbinólico e dois alifáticos.

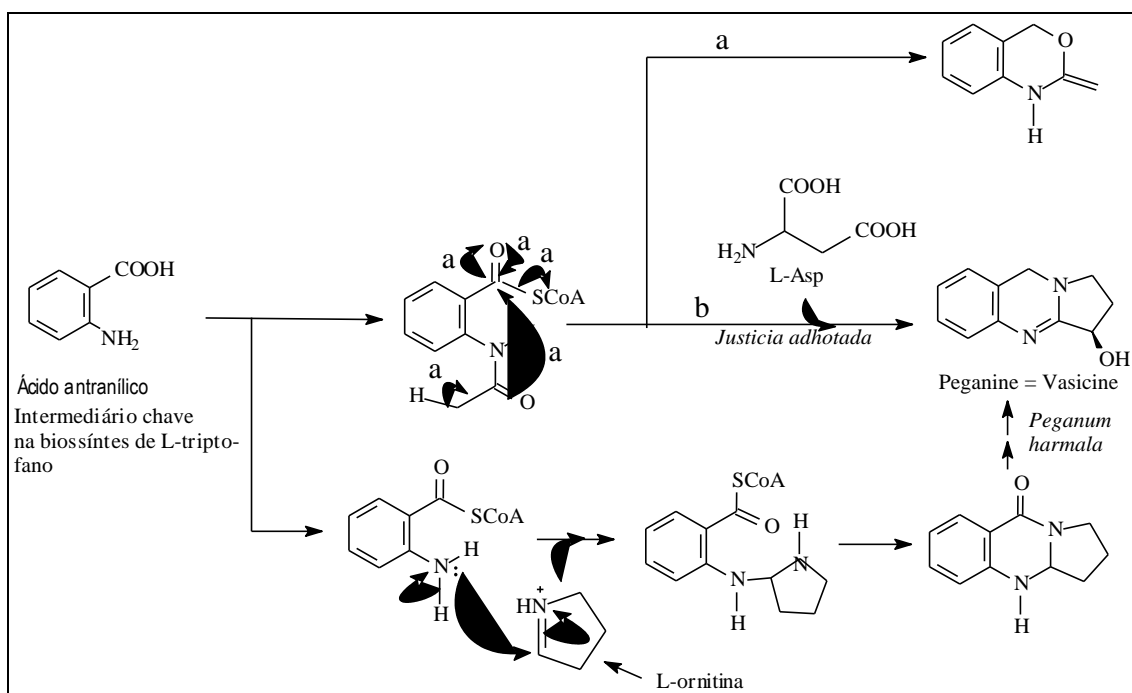
O espectro de massas de alta resolução operado em modo negativo (**Figuras 24 e 25**) apresentou  $m/z = 248,0564$  referente a íon molecular M-H (**Esquema 4**). Juntamente com a análise dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  DEPTQ permitiram propor a fórmula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_5$ . O mapa de contorno HSQC (**Figura 22**) permitiu observar as correlações de  $^1J_{\text{CH}}$ . Nos espectros de HMBC (**Figura 23**) é possível observar os acoplamentos de  $2\text{H}-7$  ( $\delta_{\text{H}} 4,85$ ;  $5,28$ )  $^2J$  com C-1 ( $\delta_{\text{C}} 123,94$ );  $^3J$  C-6 ( $\delta_{\text{C}} 123,90$ ) indicando que H-7 está diretamente ligado ao anel, observado ainda correlação  $^3J$  com o carbono quaternário C-9 ( $\delta_{\text{C}} 88,69$ ). Os hidrogênios 2H-10 ( $\delta_{\text{H}} 2,07$ ;  $2,83$ ) apresentaram correlação  $^2J$  com C-9 ( $\delta_{\text{C}} 88,69$ ) assim como  $^3J$  com a carboxila C-12 ( $\delta_{\text{C}} 174,70$ ). Ainda é observada correlação  $^2J$  do H-11 ( $\delta_{\text{H}} 4,57$ ) C-10 ( $\delta_{\text{C}} 40,17$ ) e  $^3J$  com C-12 ( $170,70$ ). Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e HMBC estão na **Tabela 7**. Diante das observações espectrais observadas, incluindo as propostas de fragmentações de massas (**Esquema 4**), e comparação com modelo análogo da literatura (JHA, *et. al.*, 2013; ZHOU, *et. al.*, 2010) permitiu definir um esqueleto de alcaloide quinolínico, cuja numeração utilizada seguiu a da estrutura utilizada como modelo (**Figura 12a**). Com o objetivo de definir a

nomenclatura deste novo composto utilizou-se a numeração da lactama com os respectivos substituintes (**Figura 12 b**) e propor a estrutura do Ácido-(N-fenil-o-metileno-O-5)-3hidroxi-5-carboxi- $\gamma$ -lactama, denominada pelo nome comum Rosamaron. A confirmação da estrutura se deu com a preparação do seu derivado acetilado, afim de definirmos quantidade e posição da hidroxila.

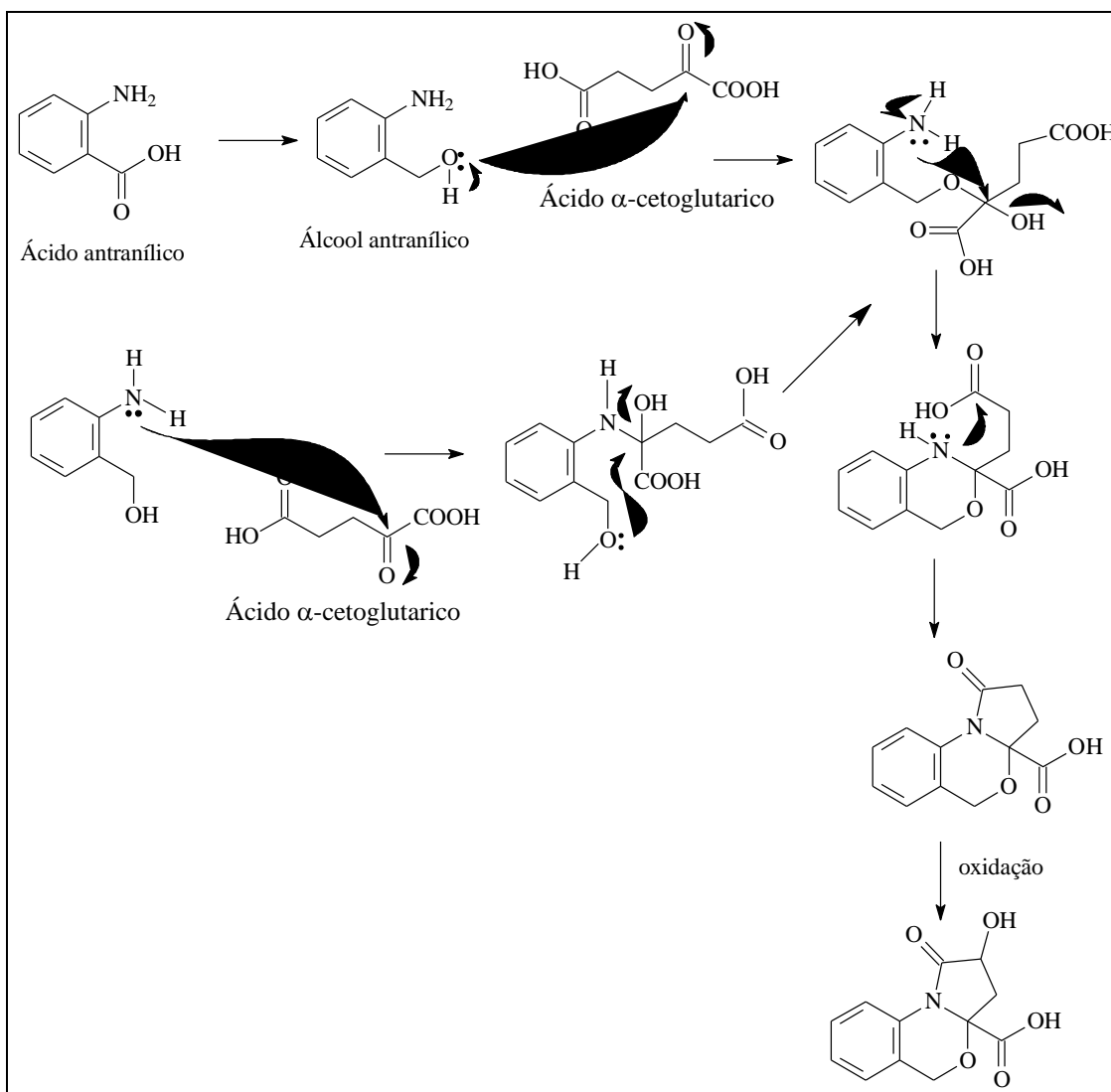
Considerando a importância das noções de biossíntese de produtos naturais na proposta de elucidação estrutural de substâncias, propomos uma rota de biogênese para a substância **9** (**Figura 14**) a partir da rota biossintética do alcaloide Vasicina (**Figura 13**), isolado de *Justicia adhatoda* (JOHNE *et. al.*, 1973). A biossíntese proposta também consiste em um alcaloide derivado do ácido antranílico (DEWICK, 2001).



**Figura 13: Substância 9**



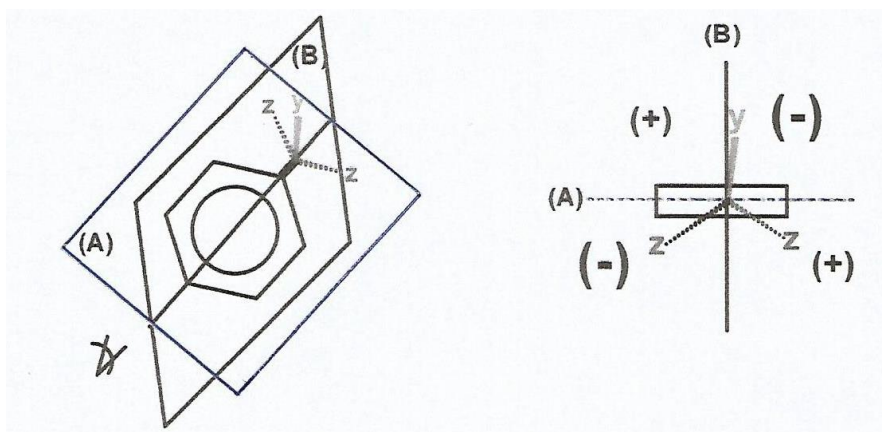
**Figura 14: Rota biossintética do alcaloide Vasicina (JOHNE *et. al.*, 1973).**



**Figura 15:** Rota biossintética proposta para **9**.

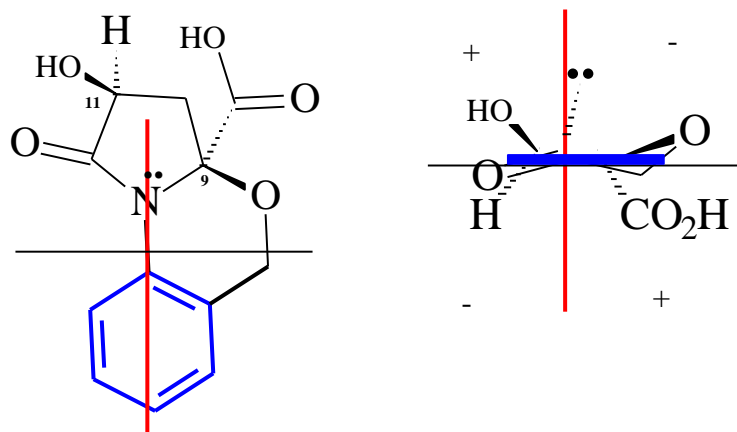
A configuração absoluta do alcaloide foi determinada com o auxílio de análise de dicroísmo circular e utilização de regras empíricas de projeção porque não foram encontrados padrões semelhantes para comparação de propriedades quirópticas. Para este caso pode ser empregada a regra do quadrante para aromático.

As propriedades quirópticas de várias substâncias aromáticas rígidas, que contêm um centro assimétrico adjacente a um anel aromático podem ser discutidas através da regra do quadrante (**Figura 15**), que permite prever a configuração absoluta de tais compostos. O anel benzênico pode dividir-se mediante planos através dos orbitais p. O plano A passa através das seis formas dos orbitais  $\pi$  do anel aromático. O plano B é o plano de simetria. (CRABEÉ, 1974)

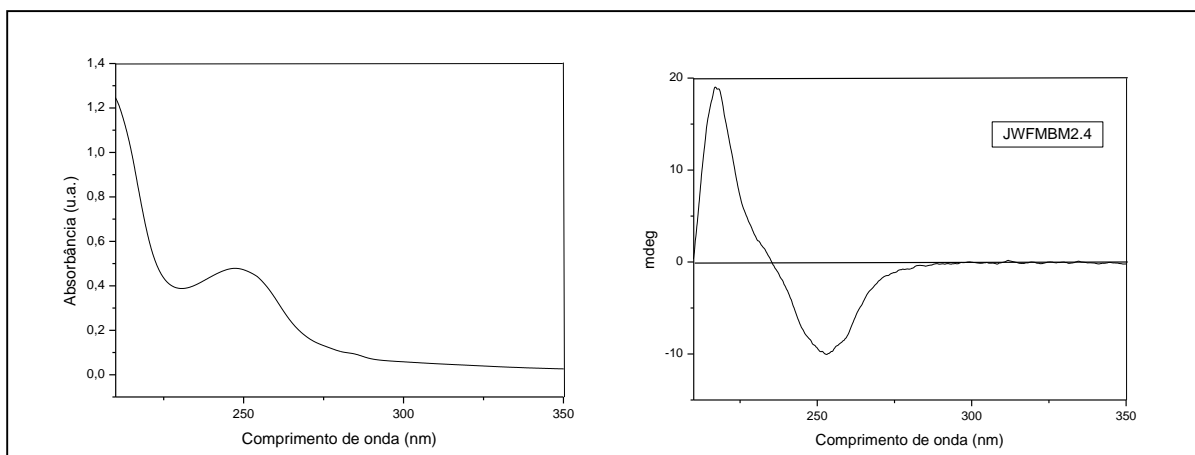
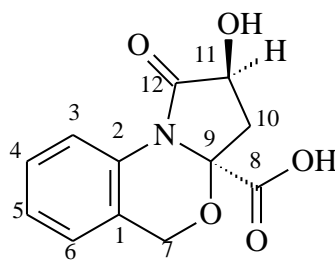


**Figura 16:** Regra do quadrante para o cromóforo aromático (CRABEÉ, 1974)

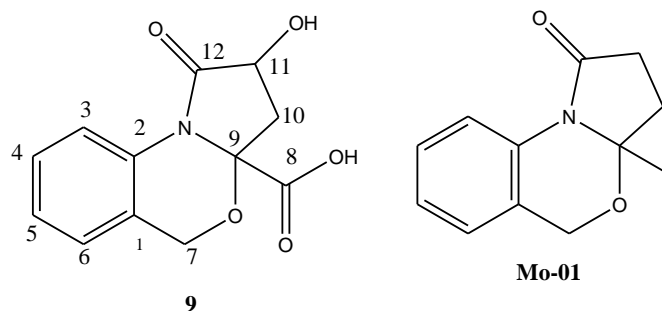
A **Figura 16** mostra a projeção no modelo quadrante do anel aromático da substância **9** e o Dicroísmo Circular com máximo de absorção dicróica diferencial nos correspondentes máximos do espectro UV. A **Figura 17** mostra os espectros UV e DC de **9**. A representação espacial da estrutura permite o entendimento da disposição dos grupos funcionais em relação ao plano do anel. Comparando-se com modelos utilizados por CRABEÉ (1974) para a definição da regra do quadrante em que apresentam EC negativo no primeiro máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$  285 nm) e positivo no segundo máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$  240 nm), pode-se fazer a mesma relação com os máximos de **9**. Sendo o primeiro máximo em 250 nm e o segundo em torno de 220 nm. Sendo assim, nesta projeção, para ficar de acordo com o sinal negativo e positivo, respectivamente no primeiro e segundo máximos observados na curva de DC de **9** (300  $\mu\text{L}$ , MeOH), **Figura 17**,  $[\theta]_{250} = -33000$  e  $[\theta]_{220} = +62700$ , deve-se definir a configuração do centro quiral **9** como S, o que dispõe o grupo carboxílico no quadrante positivo e a configuração S do centro quiral **11**, também faz a contribuição do OH para EC positivo. Os demais grupos ficam dispostos nos planos de projeção. Desta forma, ficam definidos os centros assimétricos de **9** 9S,11S.



**Figura 17:** Projeção no modelo quadrante do anel aromático de **9** (Ácido-(N-fenil-*o*-metileno-*O*-5)-3hidroxi-5-carboxi- $\gamma$ -lactama)

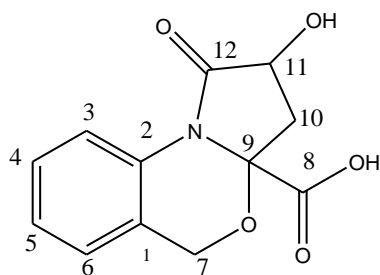


**Figura 18:** Espectros de UV e DC de **9**.

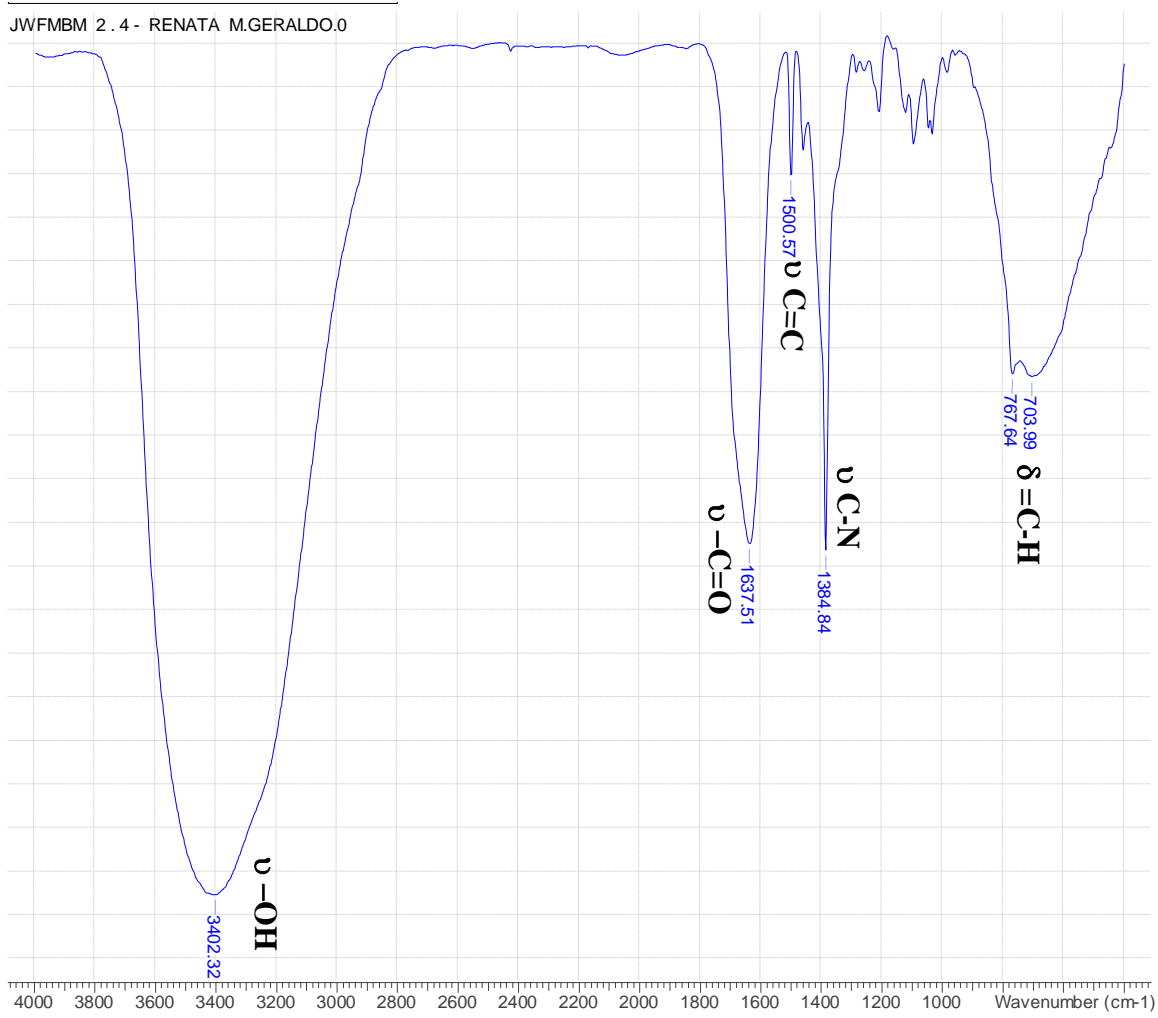


**Tabela. 7:** Dados de RMN de **9** e comparação com modelo da literatura (JHA, *et. al.*, 2013; ZHOU, *et. al.*, 2010)

	<b>JWMBM-2-4</b>				<b>Mo-01, em CDCl<sub>3</sub></b>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>C</b>						-
1	123.94	-	2H-7	H-3; H-5	123.0	-
2	132.88	-	H-3	H-4; H-6; 2H-7	132.8	-
8	172.69	-		2H-10	-	-
9	88.69	-	2H-10	2H-7	90.0	-
12	174.70		H-11	H-10a	171.3	-
Ac-11	-	-	-	-	-	-
<b>CH</b>						
3	118.67	8.36 (d, 8.2)		H-5	120.4	8.31 (d, 7.6)
4	126.30	7.27 (m)			127.5	7.20-7.00 (m)
5	124.13	7.13 (t)			124.1	7.20-7.00 (m)
6	123.90	7.11 (d)			124.0	7.30
11	68.17	4.57 (dd, 9.6, 8.3)	2H-10		-	-
<b>CH<sub>2</sub></b>						
7	64.17	5.28 (d, 15.6) 4.85 (d, 16.6)		H-6	62.8	5.03 (d, 15.2) 4.86 (d, 15.2)
10	40.17	2.83 (dd, 12.5, 8.3) 2.07 (dd, 12.5, 9.6)	H-11		30.2	2.23 (m)
11	-	-	-	-	33.0	2.60 (m)
<b>CH<sub>3</sub></b>						
8	-	-	-	-	21.2	1.43 (s)
AcO-11	-	-	-	-	-	-

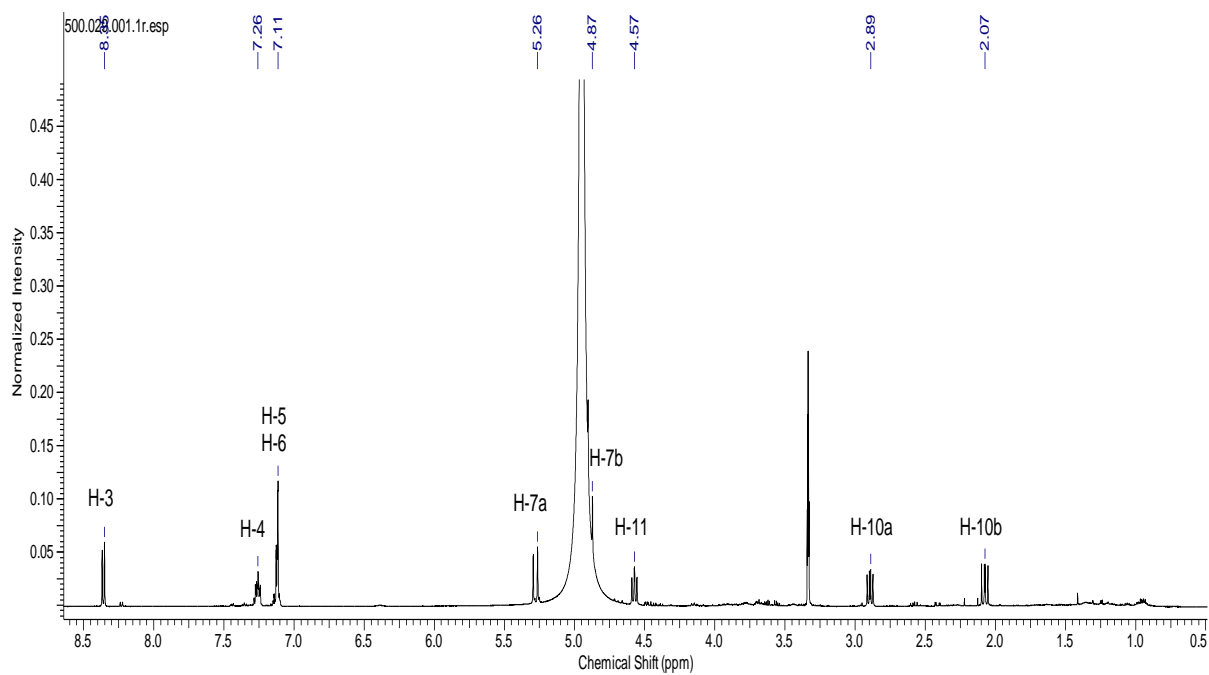
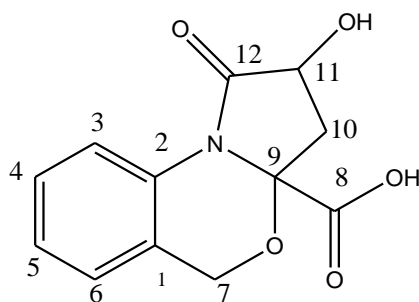


JWFMBM 2.4 - RENATA M.GERALDO.0

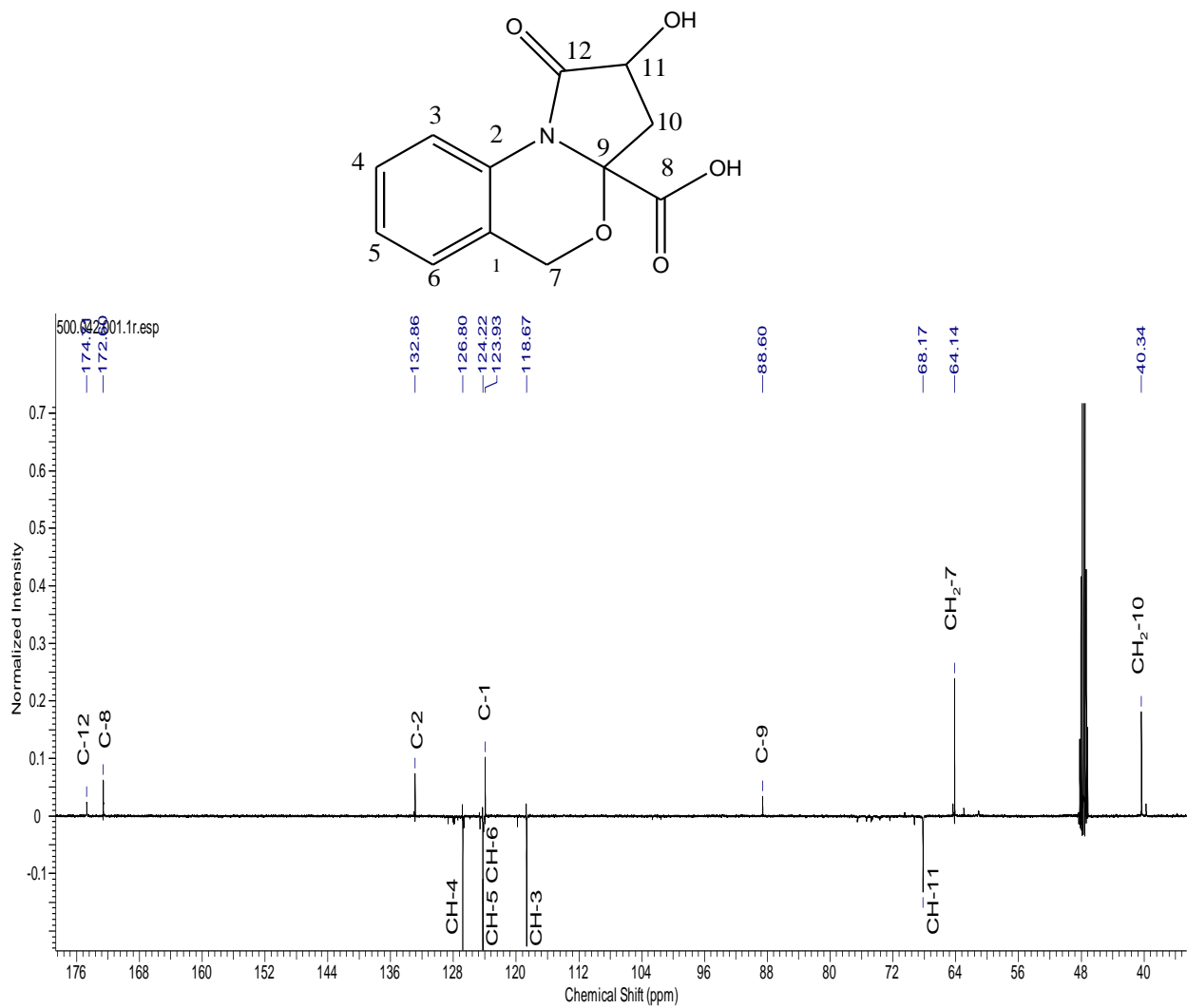


**Figura 19:** Espectro de I.V. de **9**.

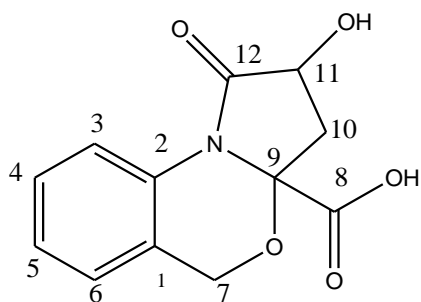




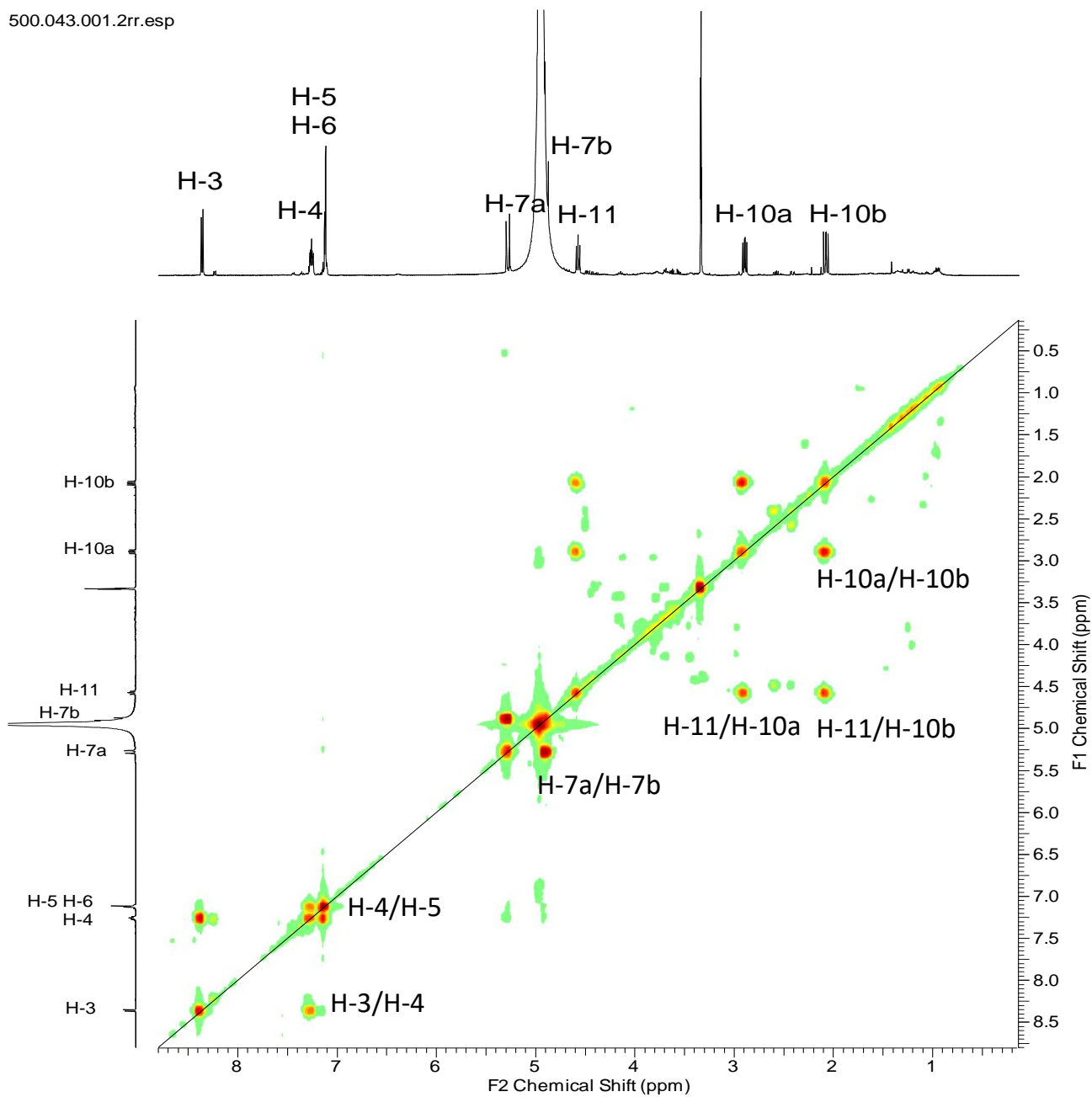
**Figura 20:** RMN de  $^1\text{H}$  (500MHz, MeOD) de **9**.



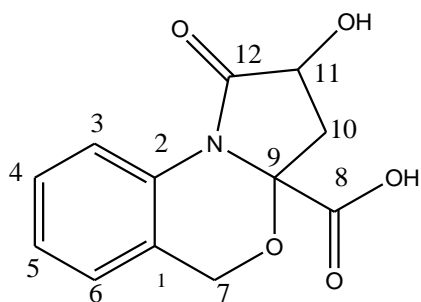
**Figura 21:** RMN DEPTQ (125MHz, MeOD) de **9**.



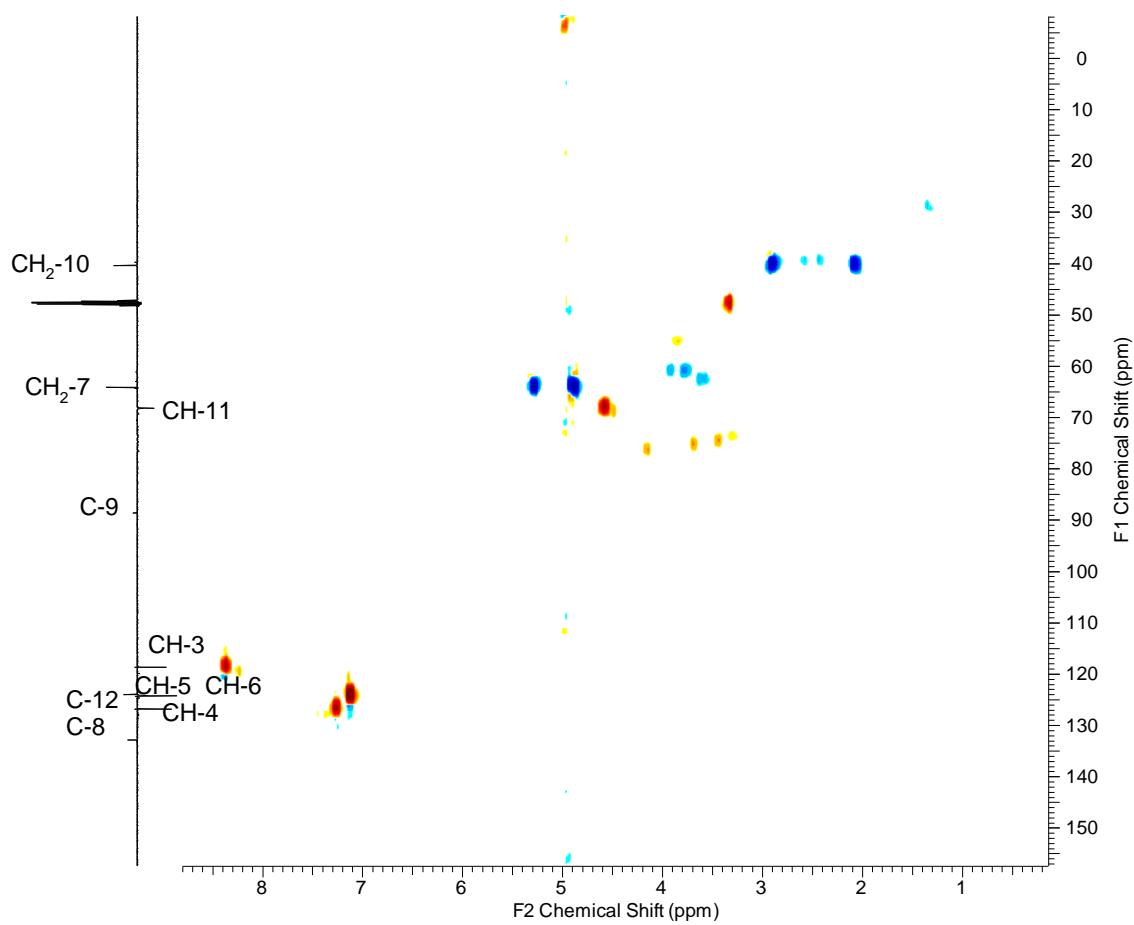
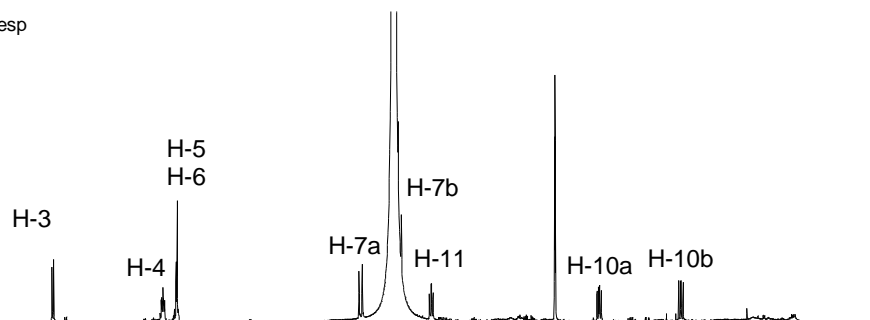
500.043.001.2rr.esp



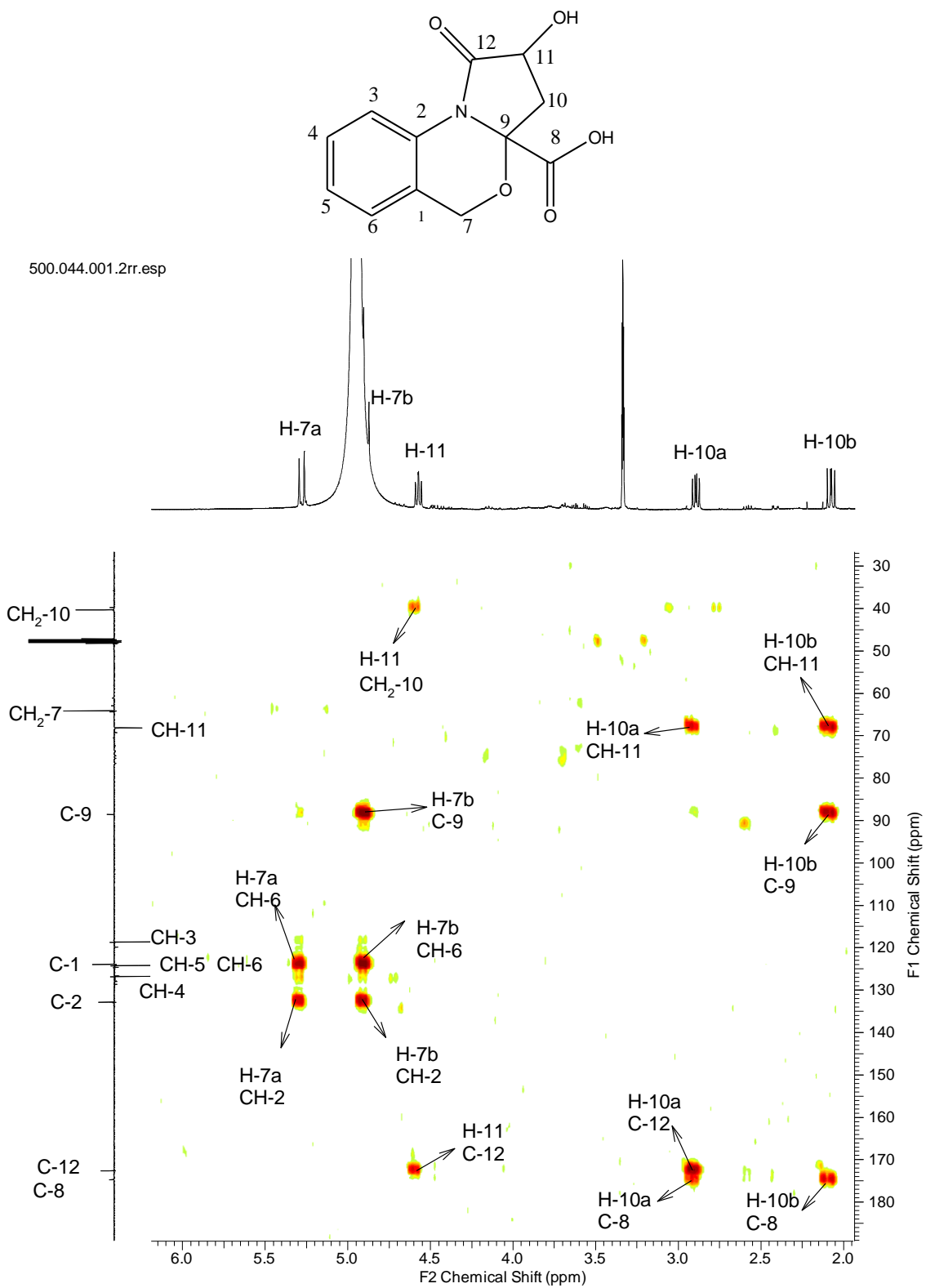
**Figura 22:** Espectro COSY (500MHz, MeOD) de **9**.



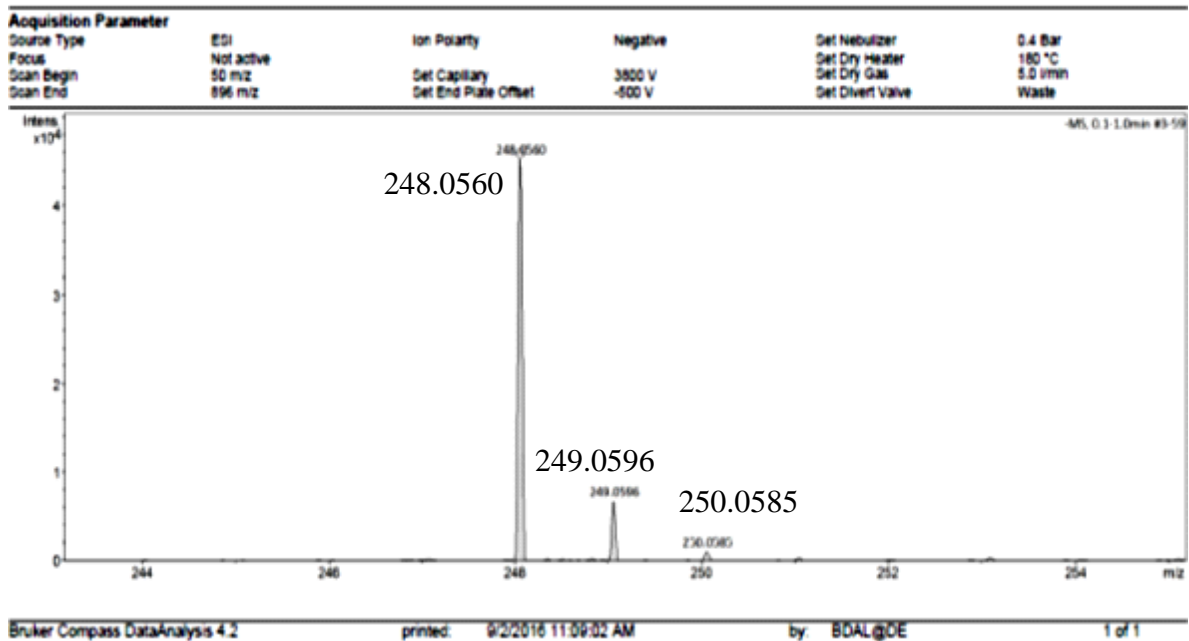
500.045.001.2rr.esp



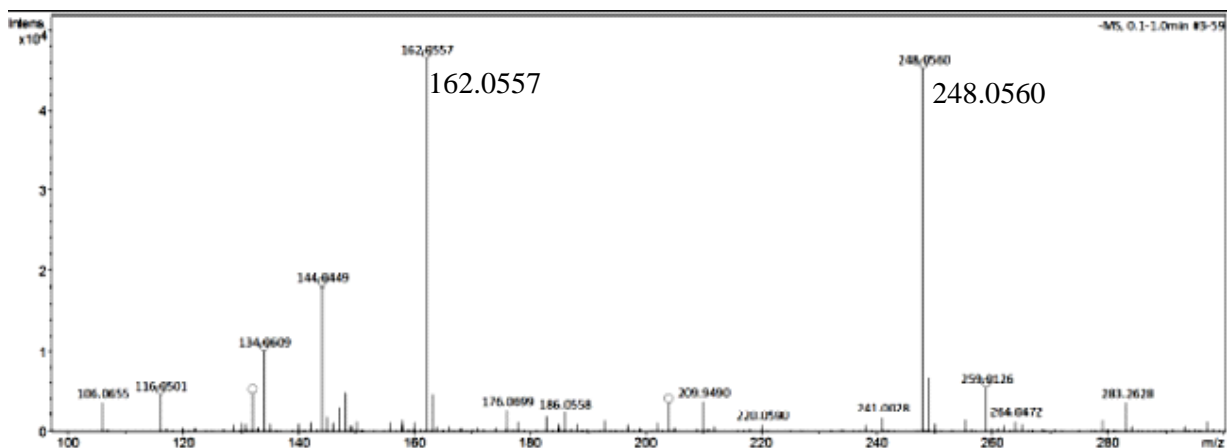
**Figura 23:** Espectro HSQC (500/125MHz, MeOD) de **9**.



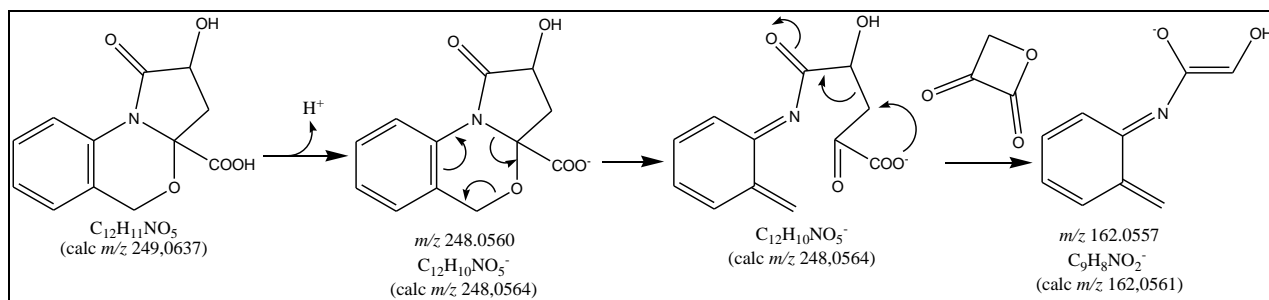
**Figura 24:** Espectro HMBC (500/125MHz, MeOD) de 9.



**Figura 25:** Cromatograma de **9**.



**Figura 26:** Espectro de massas de alta resolução de **9**.



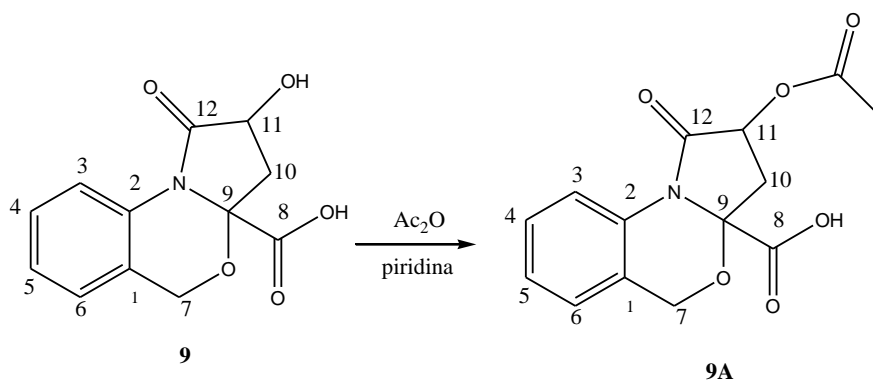
**Esquema 4:** Fragmentações de **9**.

### 3.1.7. Derivado 9A

Com a substância **9** foi realizada reação de acetilação com anidrido acético e piridina (**Figura 26**) a fim de confirmar a quantidade e posição de hidroxilas presentes na molécula. Através dos espectros de IV, RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (1D e 2D) foi possível observar a ocorrência da reação.

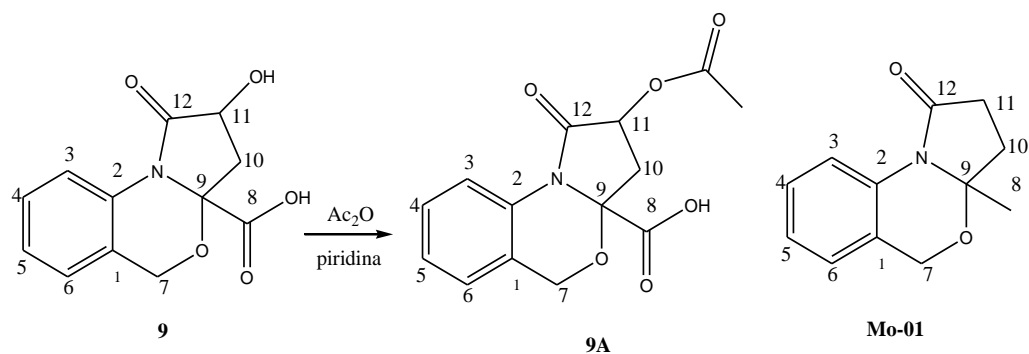
O espectro no IV (**Figura 27**) revelou absorções ( $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ ) em 2919,89( $\nu_{C-C}$ ); 2851,42( $\nu_{C-H}$ ); 1459,94 ( $\delta_{C-C}$ ); 1374,12 ( $\delta_{C-H}$ ) referentes aos grupos  $CH_2$  e  $CH_3$ ; em 1719,34 ( $\nu_{C=O}$ ) referente aos grupos carbonilas; 1497,55( $\nu_{C=C}$ ) e 759,86 ( $\delta_{C-H}$ ) de anel aromático com substituição em orto.

No espectro de RMN $^1H$  (**Figuras 28 e 29**) foi observado o sinal adicional, quando comparado com a amostra original, de um singlete em  $\delta_H$  2,17 ppm atribuído ao carbono metílico de grupo acetato. O espectro de DEPTQ (**Figura 30**) apresentou sinais adicionais em  $\delta_C$  21,57 pertencente ao carbono metílico do grupo acetato e  $\delta_C$  170,32 atribuído ao carbono de carboxila do grupo acetato, foi também observado a mudança de valor do deslocamento químicos de  $\delta_C$  40,77 ( $CH_2$ -10) da amostra original para  $\delta_C$  37,77 na amostra acetilada devido a efeito estérico de proteção da metila. Através do espectro de HSQC pode-se observar as correlações  $^1J$  entre os carbonos e hidrogênios. (**Figura 32, Tabela 8**). O mapa de contorno de HMBC (**Figuras 33 e 34**) apresentou a correlação  $^3J$  entre o H-11( $\delta_H$  5.62) e a carbonila do grupo acetato (Ac-11,  $\delta_C$  167.29) e correlação  $^2J$  entre a Metila (AcO-11,  $\delta_H$  2.18) e a carbonila do grupo acetato. Através do espectro de massas obtido no CG-EM (**Figuras 35 e 36**) foi possível observar as fragmentações confirmando a sua estrutura (**Esquema 5**).



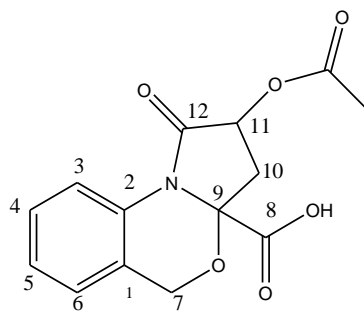
**Figura 27:** Reação de acetilação de **9**.





**Tabela 8:** Dados de RMN de **9A** e comparação com modelo da literatura (JHA, *et. al.*, 2013; ZHOU, *et. al.*, 2010)

C	JWMBM-2-4				JWMBM-2-4 - A				Mo-01, em CDCl <sub>3</sub>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	123.94	-	2H-7	H-3; H-5	124.36	-	2H-7	H-3; H-5	123.0	-
2	132.88	-	H-3	H-4; H-6; 2H-7	131.85	-		H-4; H-6; 2H-7	132.8	-
8	172.69	-		2H-10	170.32	-		H-10a	-	-
9	88.69	-	2H-10	2H-7	86.96	-	H-10b	H-7b	90.0	-
12	174.70		H-11	H-10a	171.86	-		2H-10	171.3	-
Ac-11	-	-	-	-	167.29	-	Me/Ac	H-11	-	-
<b>CH</b>										
3	118.67	8.36 (d, 8.2)		H-5	119.53	8.36 (d, 8.2)		H-5	120.4	8.31 (d, 7.6)
4	126.30	7.27 (m)			127.84	7.31 (t, 8.2)		H-6	127.5	7.20-7.00 (m)
5	124.13	7.13 (t)			125.19	7.16 (t, 8.2)			124.1	7.20-7.00 (m)
6	123.90	7.11 (d)			124.36	7.05 (d, 8.2)		H-4; 2H-7	124.0	7.30
11	68.17	4.57 (dd, 9.6, 8.3)	2H-10		68.53	5.62 (t, 8.4)	2H-10		-	-
<b>CH<sub>2</sub></b>										
7	64.17	5.28 (d, 15.6) 4.85 (d, 16.6)		H-6	64.83	5.29 (d, 15.6) 4.98 (d, 15.6)		H-6	62.8	5.03 (d, 15.2) 4.86 (d, 15.2)
10	40.17	2.83 (dd, 12.5, 8.3) 2.07 (dd, 12.5, 9.6)	H-11		37.77	3.13 (dd, 13.3, 8.5) 2.28 (dd, 13.3, 9.4)			30.2	2.23 (m)
11	-	-	-	-	-	-	-	-	33.0	2.60 (m)
<b>CH<sub>3</sub></b>										
8	-	-	-	-	-	-	-	-	21.2	1.43 (s)
AcO-11	-	-	-	-	20.74	2.18 (s)			-	-



9A

JWFMBM2-4 A RENATA DUARTE - RAIMUNDO BRAZ

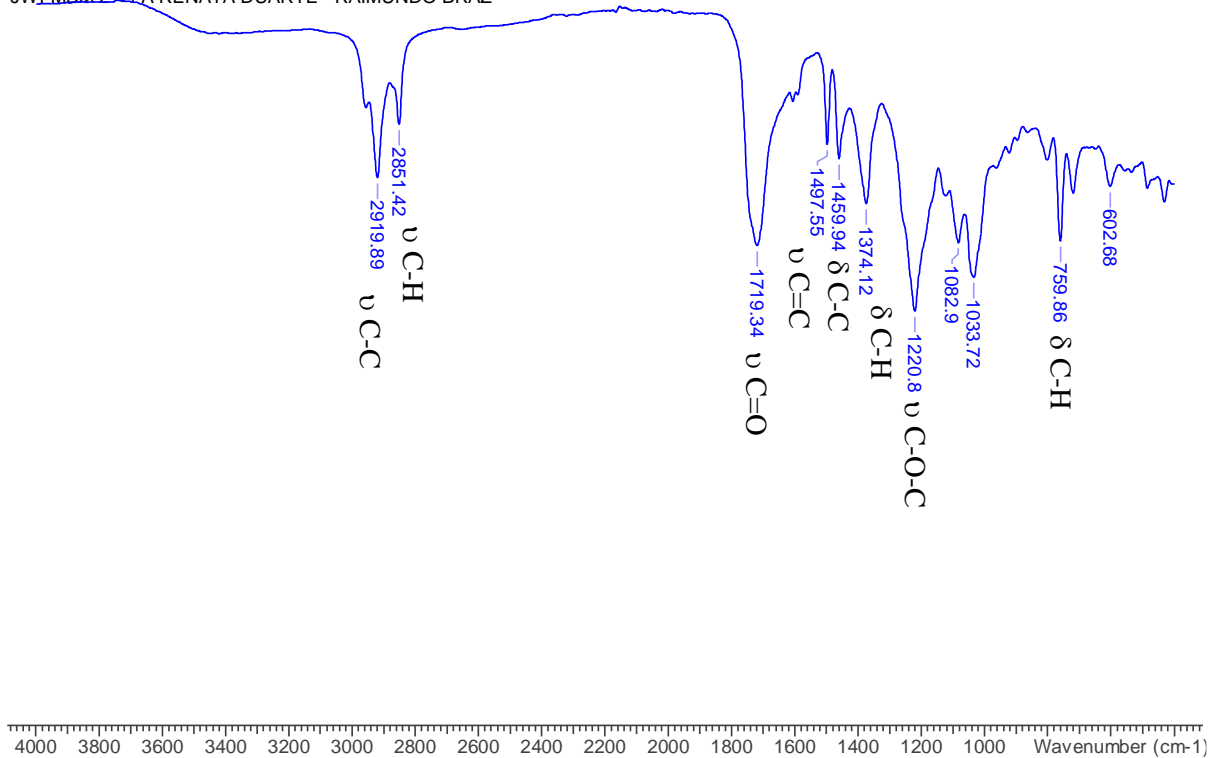
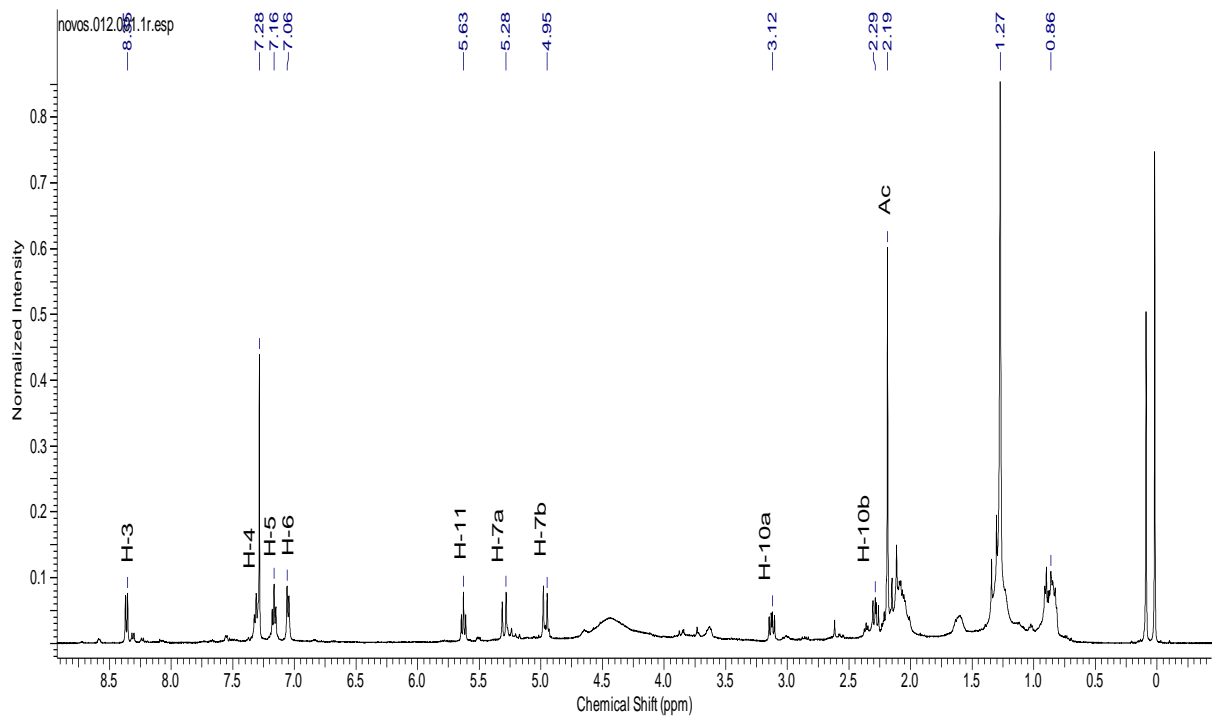
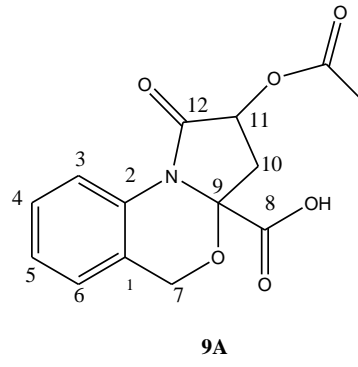
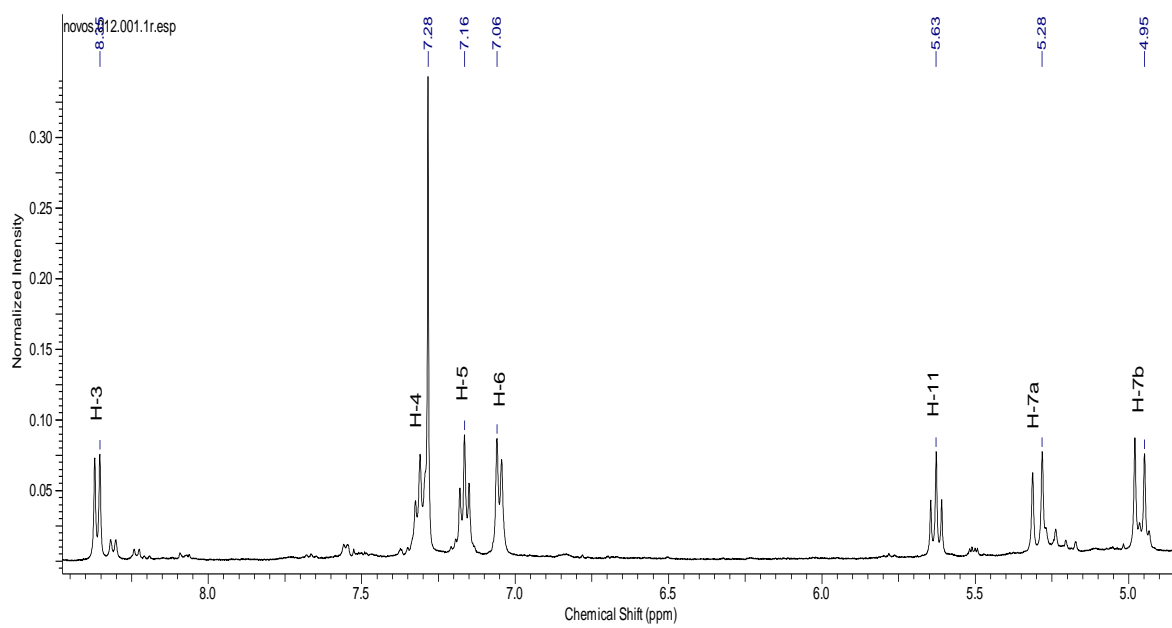
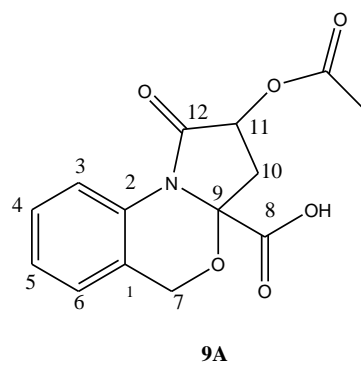


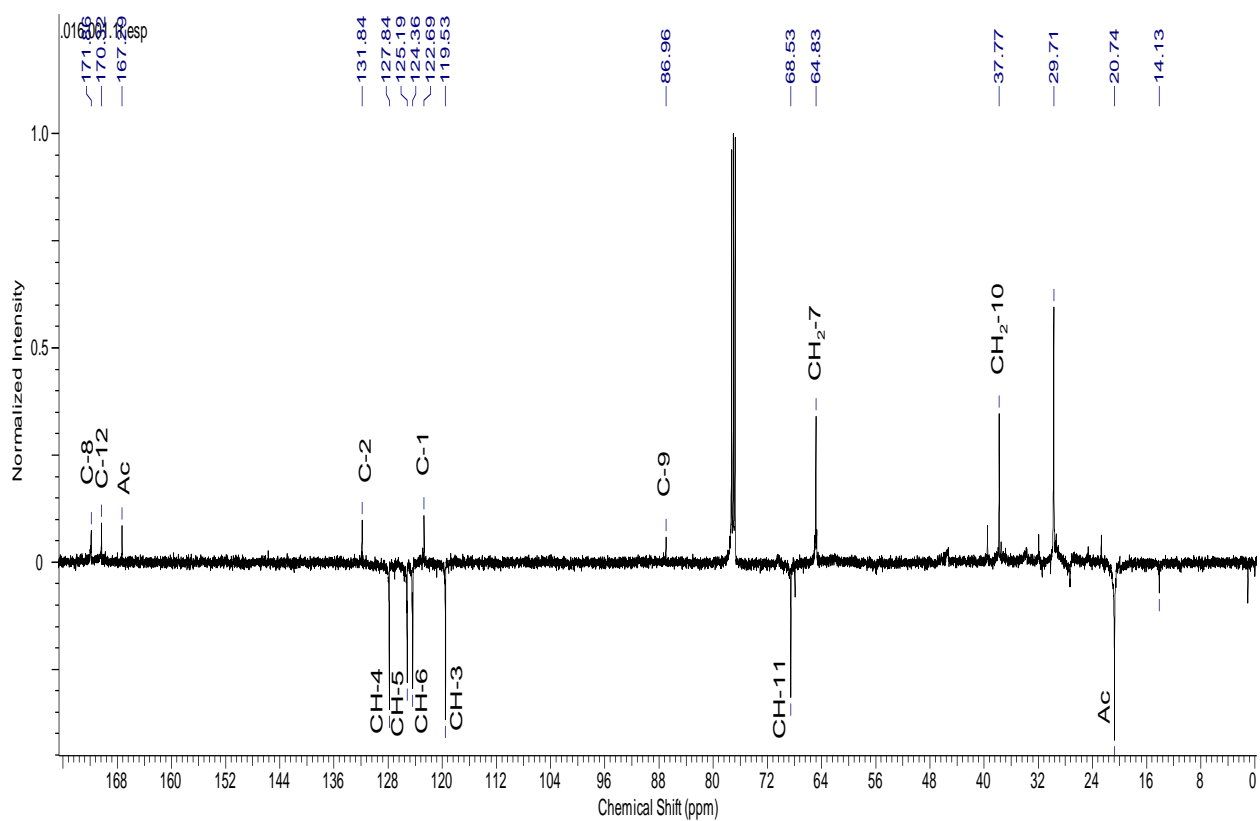
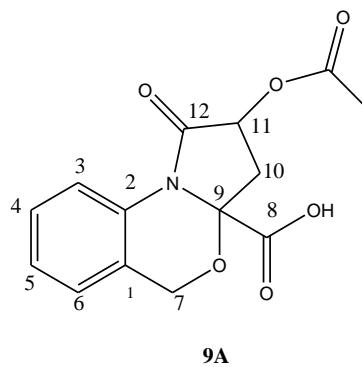
Figura 28: Espectro de IV de 9A.



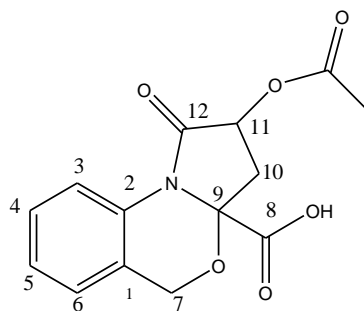
**Figura 29:** RMN de  $^1\text{H}$  (500MHz, MeOD) de **9A**.



**Figura 30:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500MHz, MeOD) de 9A.



**Figura 31:** RMN DEPTQ (100MHz, MeOD) de **9A**.



9A

novos.013.001.2rr.esp

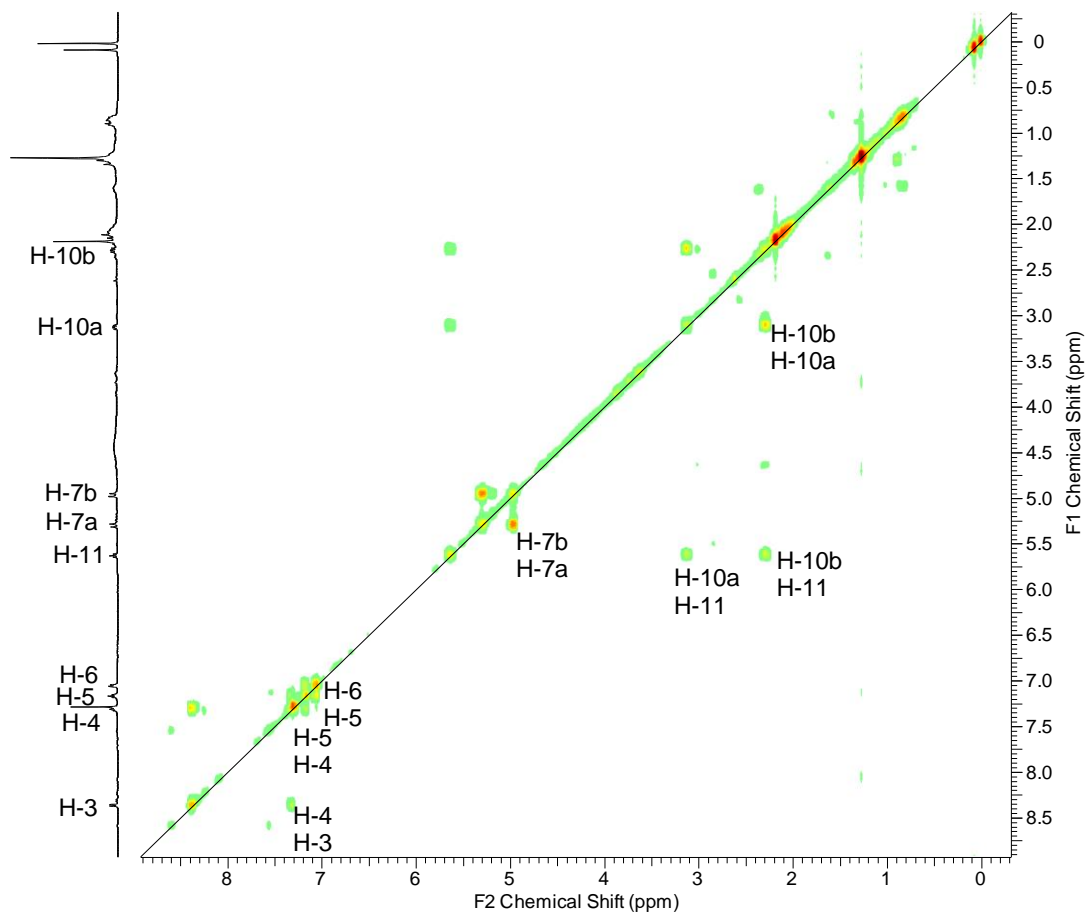
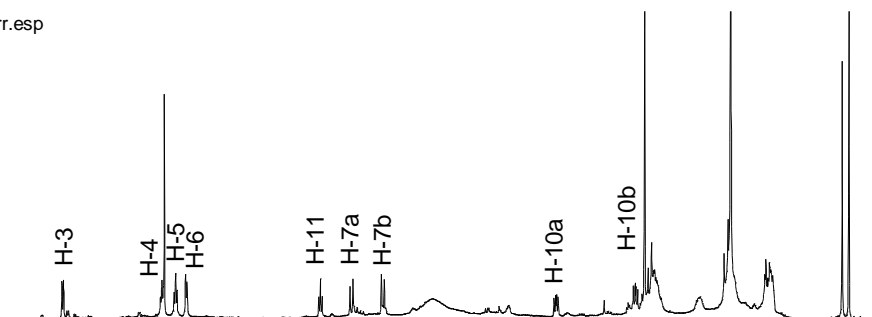
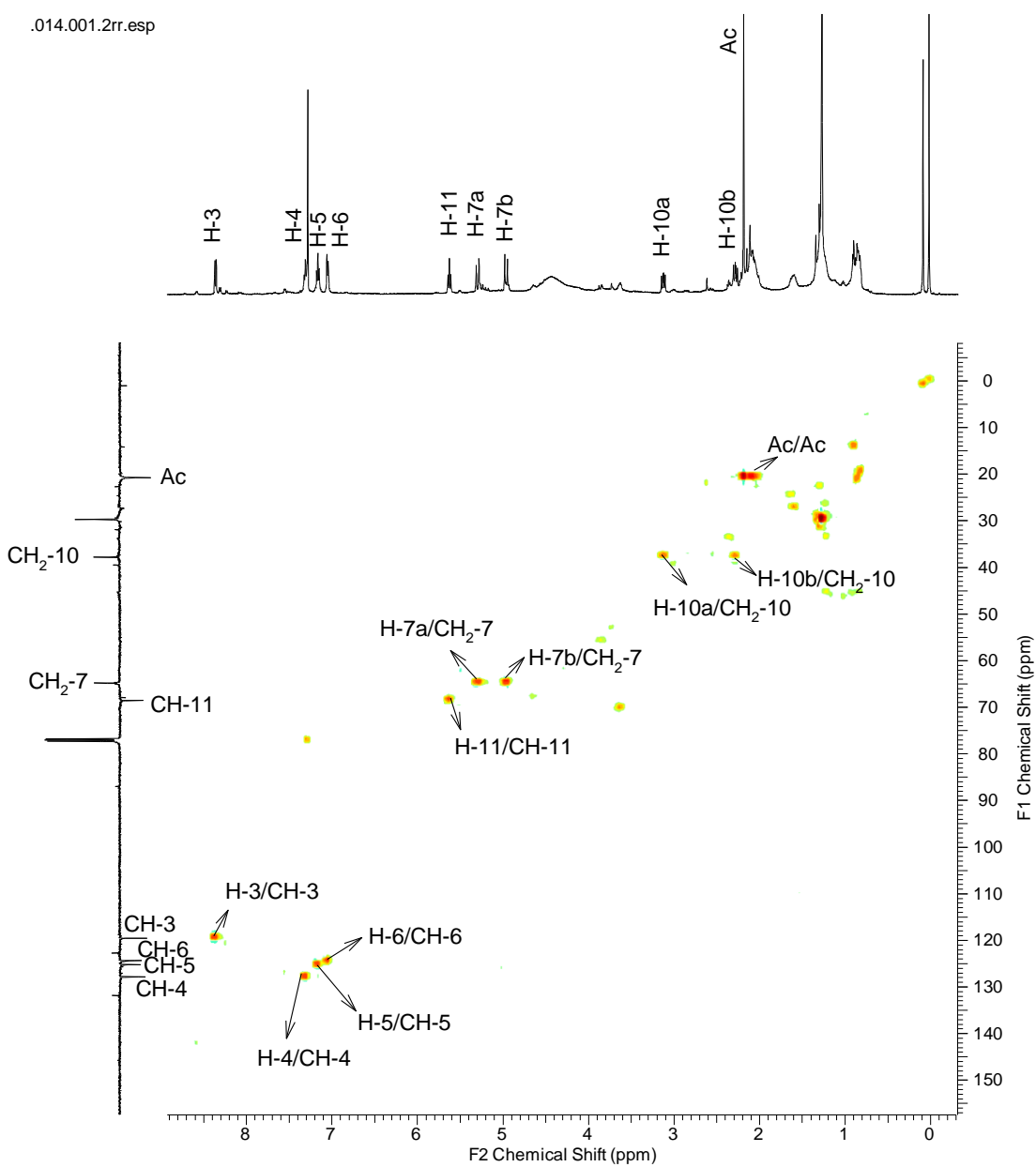
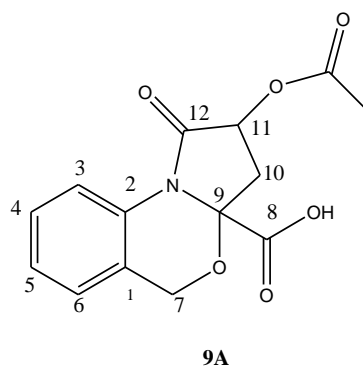
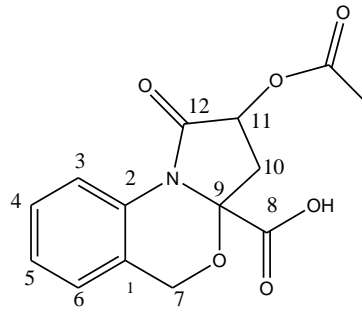


Figura 32: Espectro COSY (400MHz, MeOD) de 9A.



**Figura 33:** Espectro HSQC (400/100MHz, MeOD) de **9A**.



9A

.015.001.2rr.esp

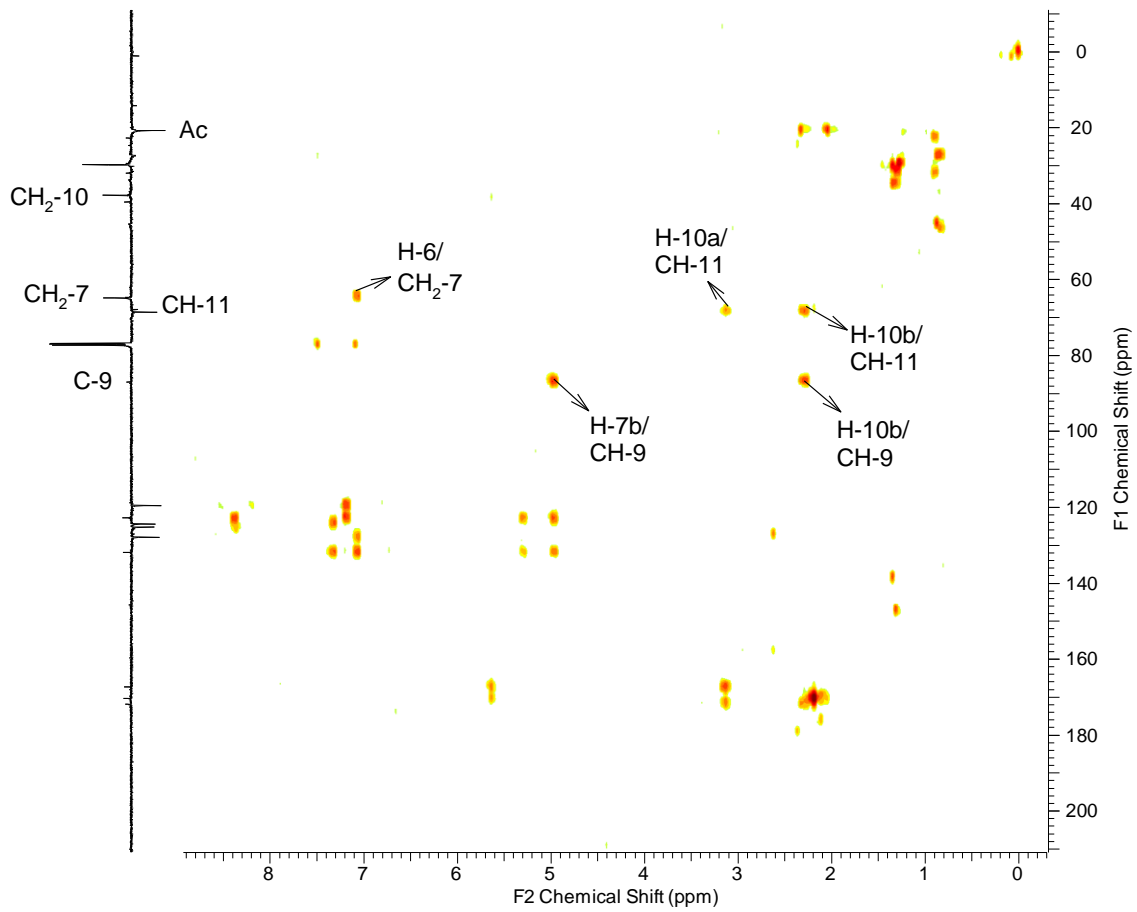
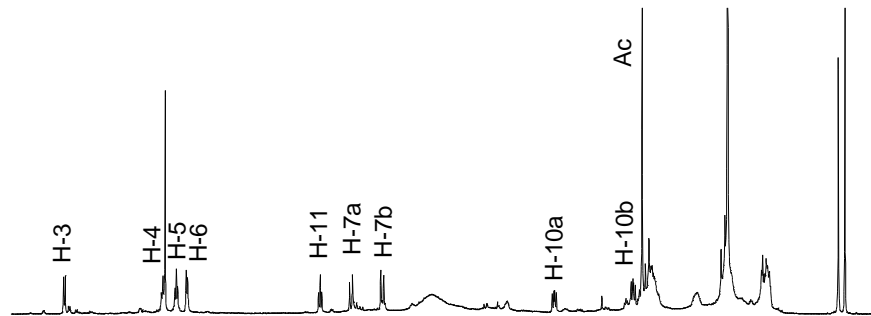
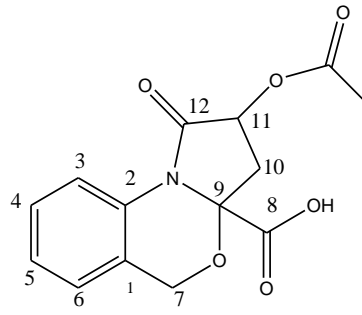


Figura 34: Espectro HMBC (500/125MHz, MeOD) de 9A.





9A

.015.001.2rr.esp

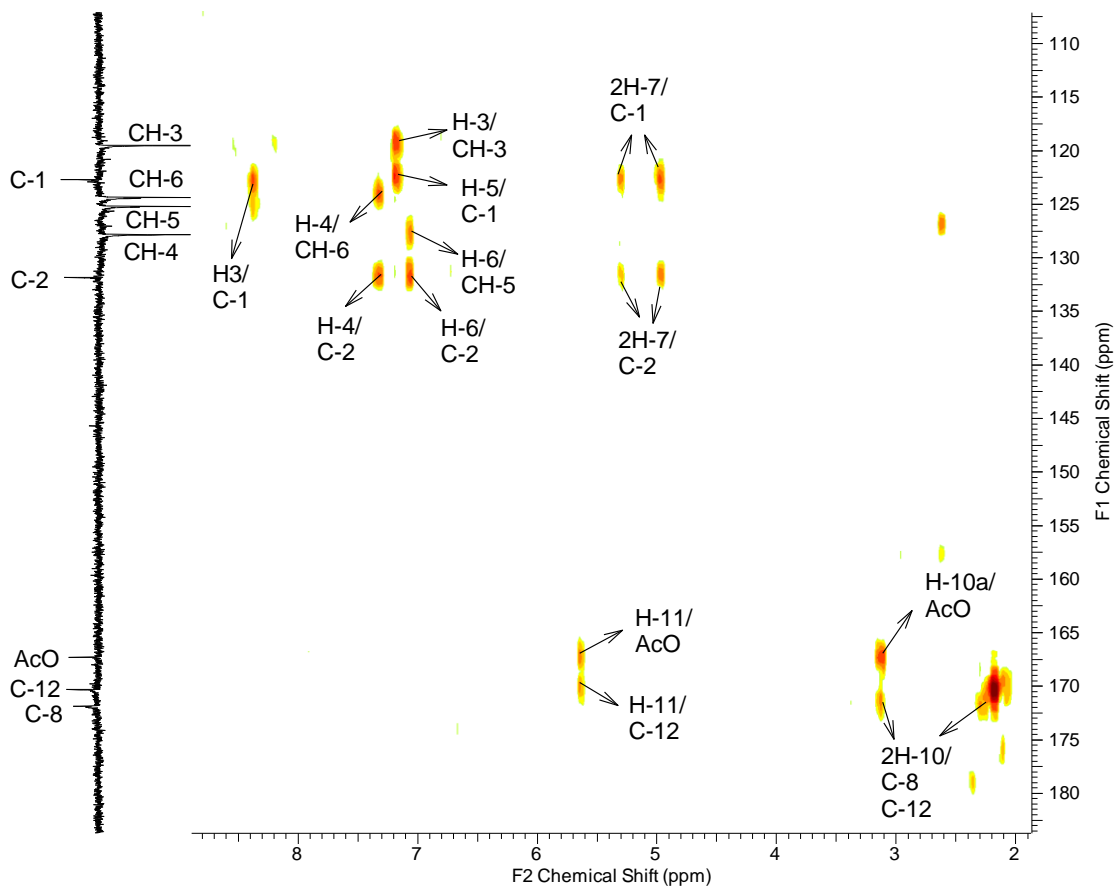
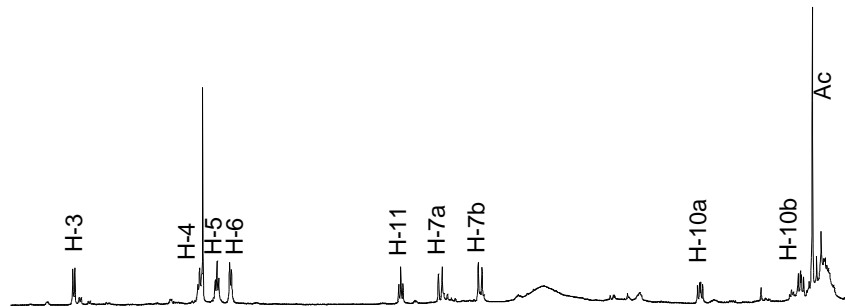


Figura 35: Expansão do espectro HMBC (500/125MHz, MeOD) de 9A.

==== Analytical Line 1 =====

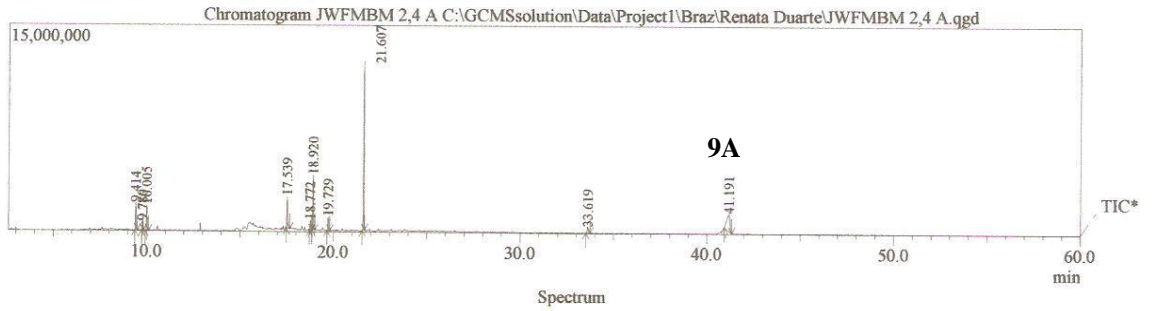
[GC-2010]

Column Oven Temp. : 70.0 °C  
Injection Temp.: 250.00 °C  
Injection Mode : Split  
Column Flow: 1.00 mL/min  
Oven Temp. Program  
Rate Temperature(°C) Hold Time(min)  
- 70.0 1.00  
10.00 290.0 40.00

Peak Report TIC			
Peak#	R.Time	Area	Area%
1	9.414	3663114	5.17
2	9.780	1171361	1.65
3	10.005	5005670	7.07
4	17.539	7116575	10.05
5	18.772	2385511	3.37
6	18.920	9913745	14.00
7	19.729	2263394	3.20
8	21.607	23600198	33.33
9	33.619	2117147	2.99
10	41.191	13560732	19.15
		70797447	100.00

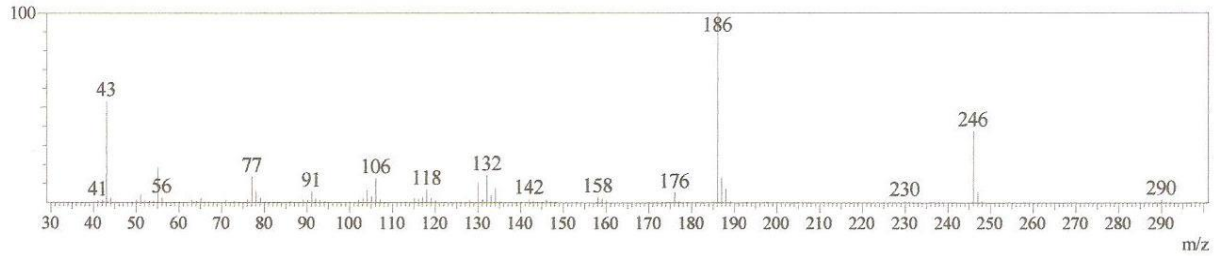
[GCMS-QP2010 Plus]

IonSourceTemp :250.00 °C  
Interface Temp. :310.00 °C  
Solvent Cut Time :2.50 min

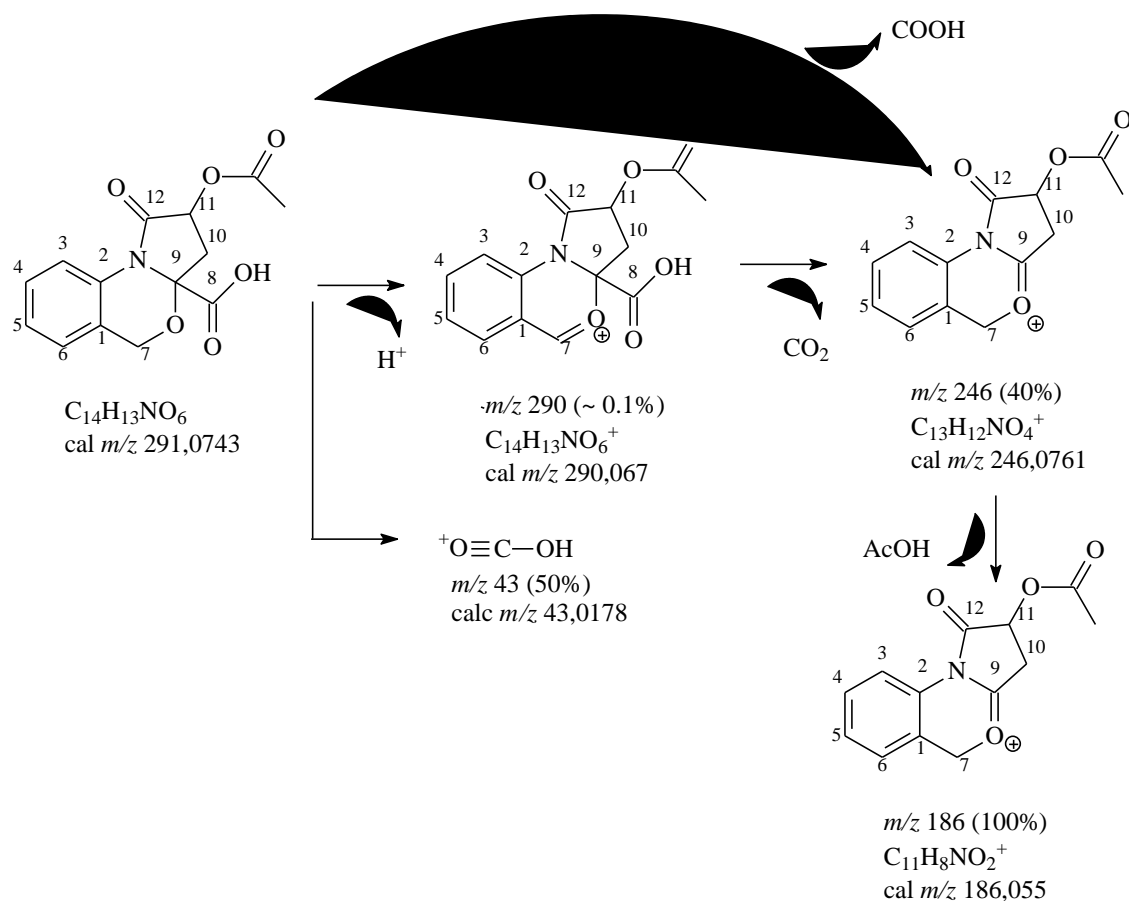


**Figura 36:** Cromatograma de 9A.

Line#:10 R.Time:41.2(Scan#:4644)



**Figura 37:** Espectro de massas de 9A.



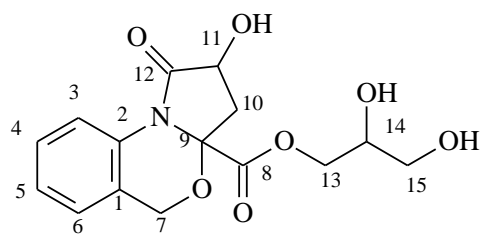
**Esquema 5:** Fragmentações de **9A**.

### 3.1.8. Substância 10

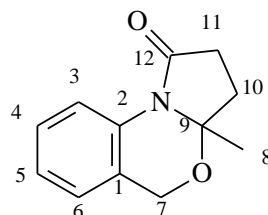
A amostra **JWFMBM3,8**, substância **10** (10mg), foi obtida sob a forma de um sólido viscoso de cor marrom, solúvel em metanol, a partir do fracionamento do extrato de metanol das folhas de *J. wasshausseniana*. A proposta de elucidação estrutural de **JWFMBM3,8** foi realizada a partir da análise dos dados de UV, IV, RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (1D e 2D), EM, CD e comparação com dados de análogos estruturais descritos na literatura (JHA, *et. al.*, 2013; ZHOU, *et. al.*, 2010).

O espectro de IV (**Figura 37**) revelou absorções ( $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ ) em 3402,32( $\nu_{O-H}$ ); em 2925,92 ( $\nu_{C-C}$ ) e 2858,41 ( $\nu_{C-H}$ ) de carbono metilênico; 1639,44 ( $\nu_{C=O}$ ) referente ao grupo carbonila; 1456,21 ( $\nu_{C=C}$ ) e 763,79 ( $\delta_{C-H}$ ) de anel aromático e em 1384,84 ( $\nu_{C-N}$ ) referente ao grupo amida. O espectro de RMN  $^1H$  (**Figura 38**) da substância **10** apresentou-se com bastante similaridade nos deslocamentos químicos e feições dos sinais

dos núcleos de hidrogênio da substância **9**, tendo apenas acrescentado o surgimento dos deslocamentos  $\delta_H$  3,71, 3,62 e 3,57 sugerindo um aumento da cadeia lateral. O espectro de DEPTQ (**Figura 39**) da substância **10** apresentou 3 sinais de carbonos a mais que a substância **9**, perfazendo um total de 15 átomos de carbono, sendo um átomo de carbono  $sp^2$  quaternário de carbonila em  $\delta_C$  174,76 (C-13), dois átomos de carbono  $sp^3$  sendo um metínico (C-14) e outro metilênico (C-15) coerentes com os valores de deslocamento de carbonos carbinólicos  $\delta_C$  72,40 e  $\delta_C$  62,96. O espectro de COSY (**Figura 40**) apresentou os acoplamentos entre os hidrogênios H-14 ( $\delta_H$  3,71) e H-15a e H-15b ( $\delta_H$  3,62 e 3,57). O mapa de contorno HMBC (**Figuras 44-46**) apresentou a correlação  $^2J$  entre H-14 ( $\delta_H$  3,71) e C-15 ( $\delta_C$  62,96). Através destes dados pode-se identificar a substância **10** como N-(fenil-*o*-metileno-O-5)-3hidroxi-5-(carboxilato de 2,3-dihidroxiopropionila)- $\gamma$ -lactama). A **Tabela 9** mostra as correlações obtidas no espectro de HSQC (**Figuras 41-43**) e HMBC e comparação com o modelo da literatura (JHA, *et. al.*, 2013; ZHOU, *et. al.*, 2010).



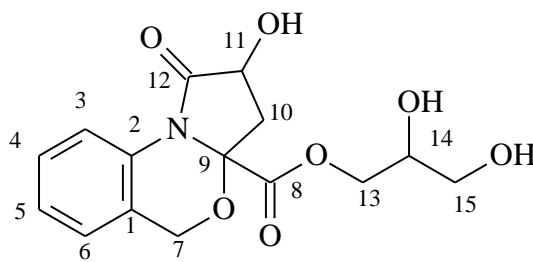
**10**



**Mo-01**

**Tabela 9:** Dados de RMN de **10** (JHA, *et. al.*, 2013; ZHOU, *et. al.*, 2010)

	JWMBM-3.3					Mo-01, em CDCl <sub>3</sub>	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^1H-^1H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
<b>C</b>							
1	123.91	-		H-6 2H-7	H-3 H-5	123.0	-
2	132.87	-		H-3	H-4 2H-7	132.8	-
8	174.75	-			2H-10	-	-
9	88.55	-		2H-10	H-7b	90.0	-
12	172.58	-		H-11	2H-10	171.3	-
<b>CH</b>							
3	118.65	8.35 (d, 8.3)	H-4	H-4	H-5	120.4	8.31 (d, 7.6)
4	126.79	7.26 (m)	H-3	H-3 H-5		127.5	7.20-7.00 (m)
5	124.19	7.13 (m)	H-6	H-4 H-6	H-3	124.1	7.20-7.00 (m)
6	123.91	7.11 (m)	H-5	H-1 H-5	H-4 2H-7	124.0	7.30
11	68.16	4.57 (dd, 9.9, 8.2)	2H-10	2H-10		-	-
14	72.40	3.71	H-15	2H-13 2H-15		-	-
<b>CH<sub>2</sub></b>							
7	64.13	5.30 (d, 15.6) 4.87	H-7b H-7a		H-6	62.8	5.03 (d, 15.2) 4.86 (d, 15.2)
10	40,33	2,89 (dd 12.5, 8.2) 2,09 (dd, 12.5, 9.9)	H-11	H-11		30.2	2.23 (m)
11	-	-		-	-	33.0	2.60 (m)
13	64,13	3.62 (dd, 11.2, 4.7) 3.57 (dd, 11.2, 6.1)	H-14	H-14 H-15		-	-
15	62.96	3.62 (dd, 11.2, 4.7) 3.57 (dd, 11.2, 6.1)	H-14	H-14		-	-
<b>CH<sub>3</sub></b>							
8	-	-		-	-	21.2	1.43 (s)



10

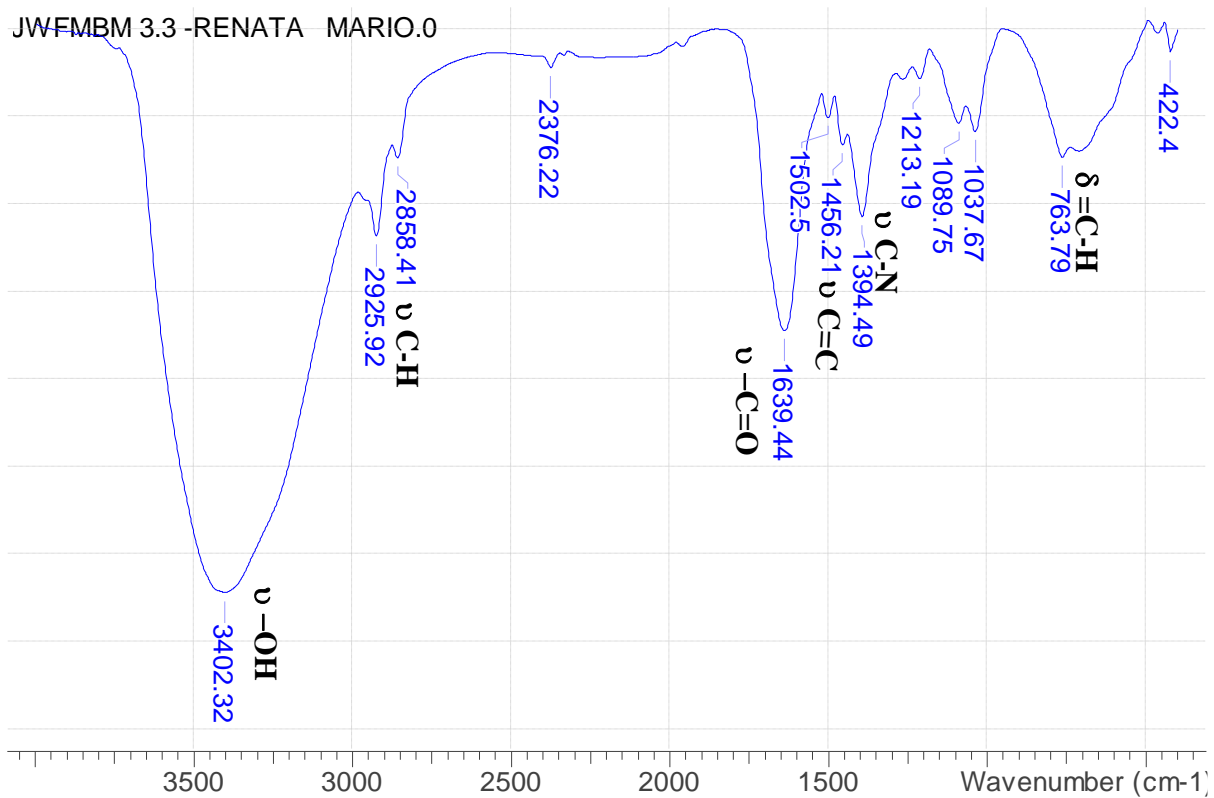
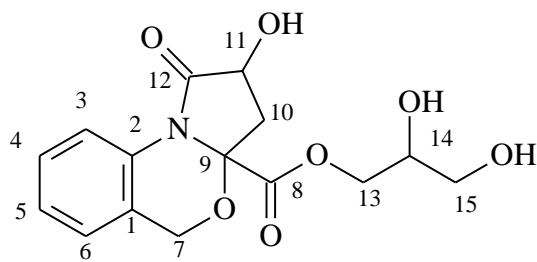
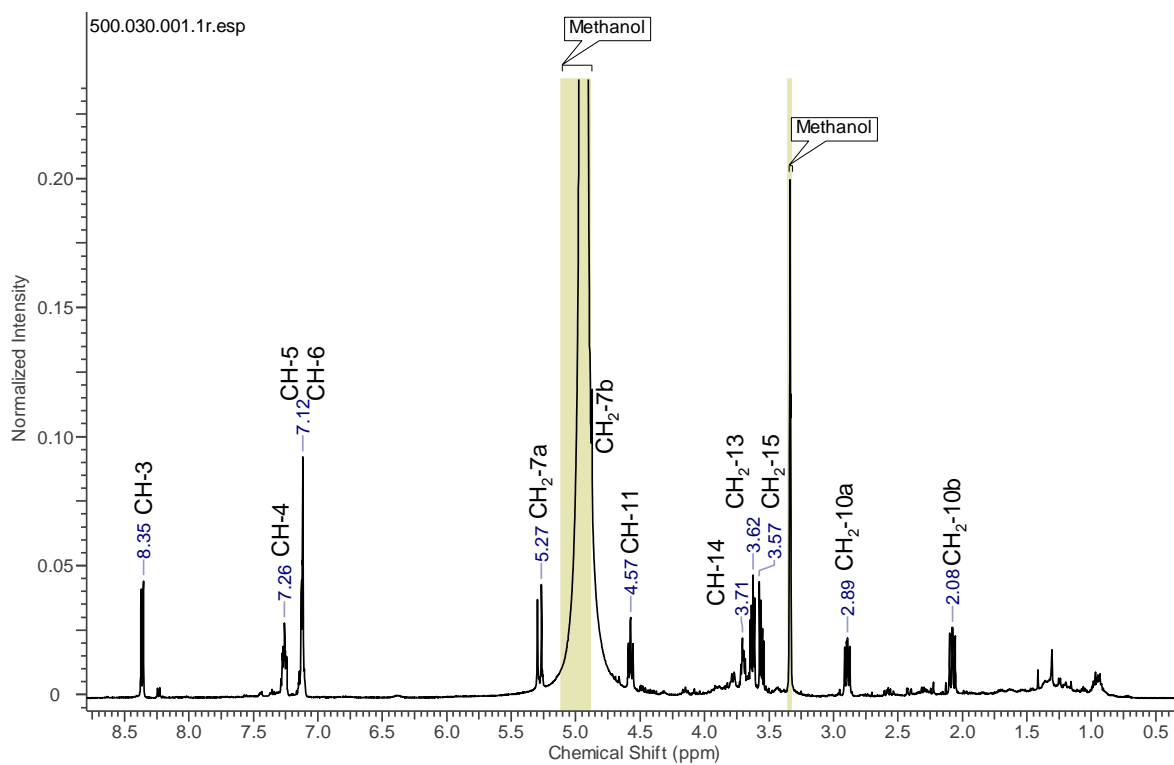


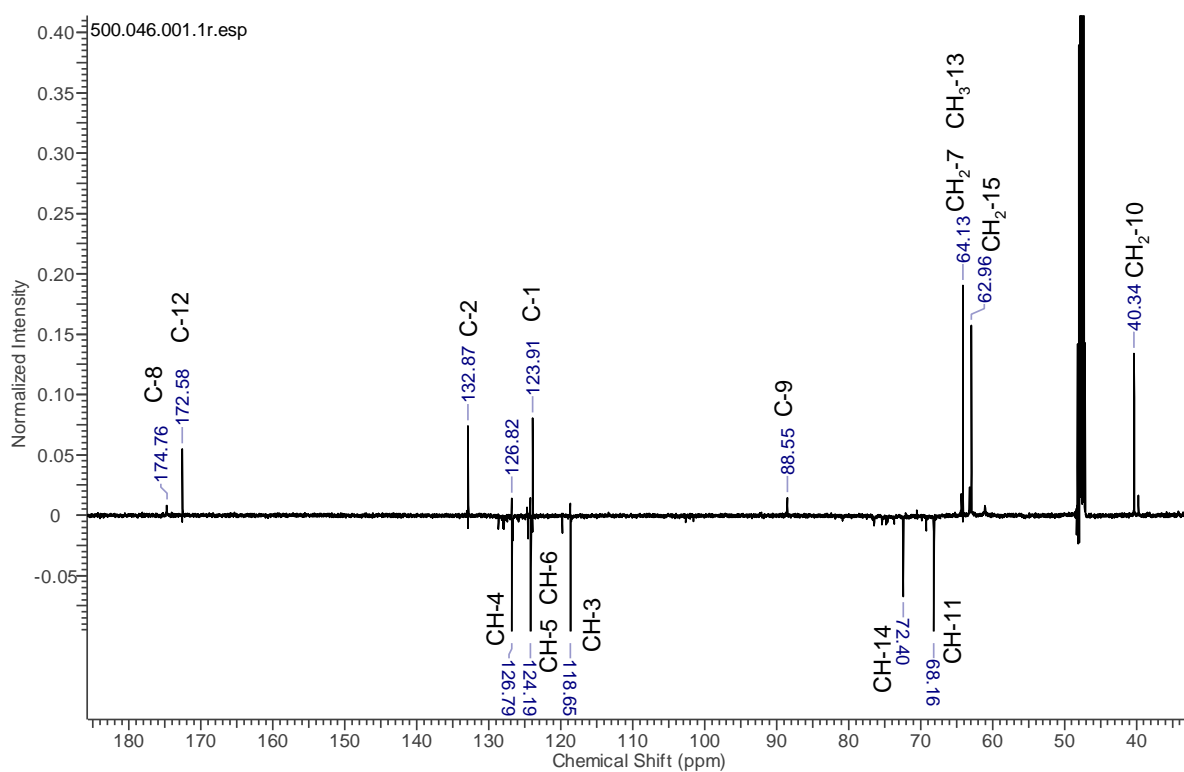
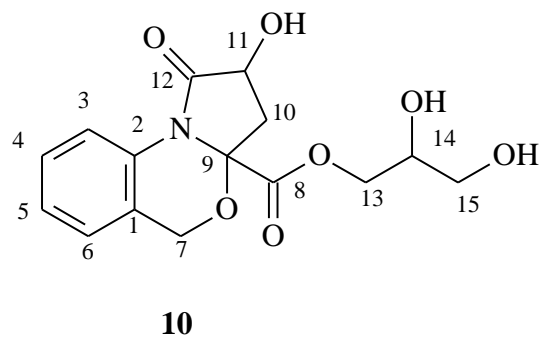
Figura 38: Espectro de IV de 10.



**10**

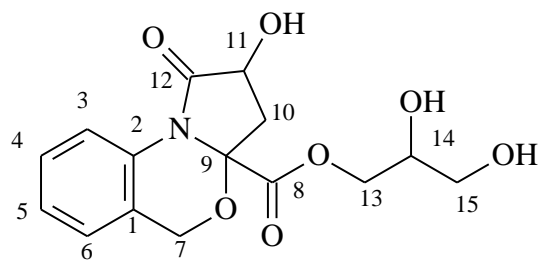


**Figura 39:** RMN de  $^1\text{H}$  (500MHz, MeOD) de **10**.



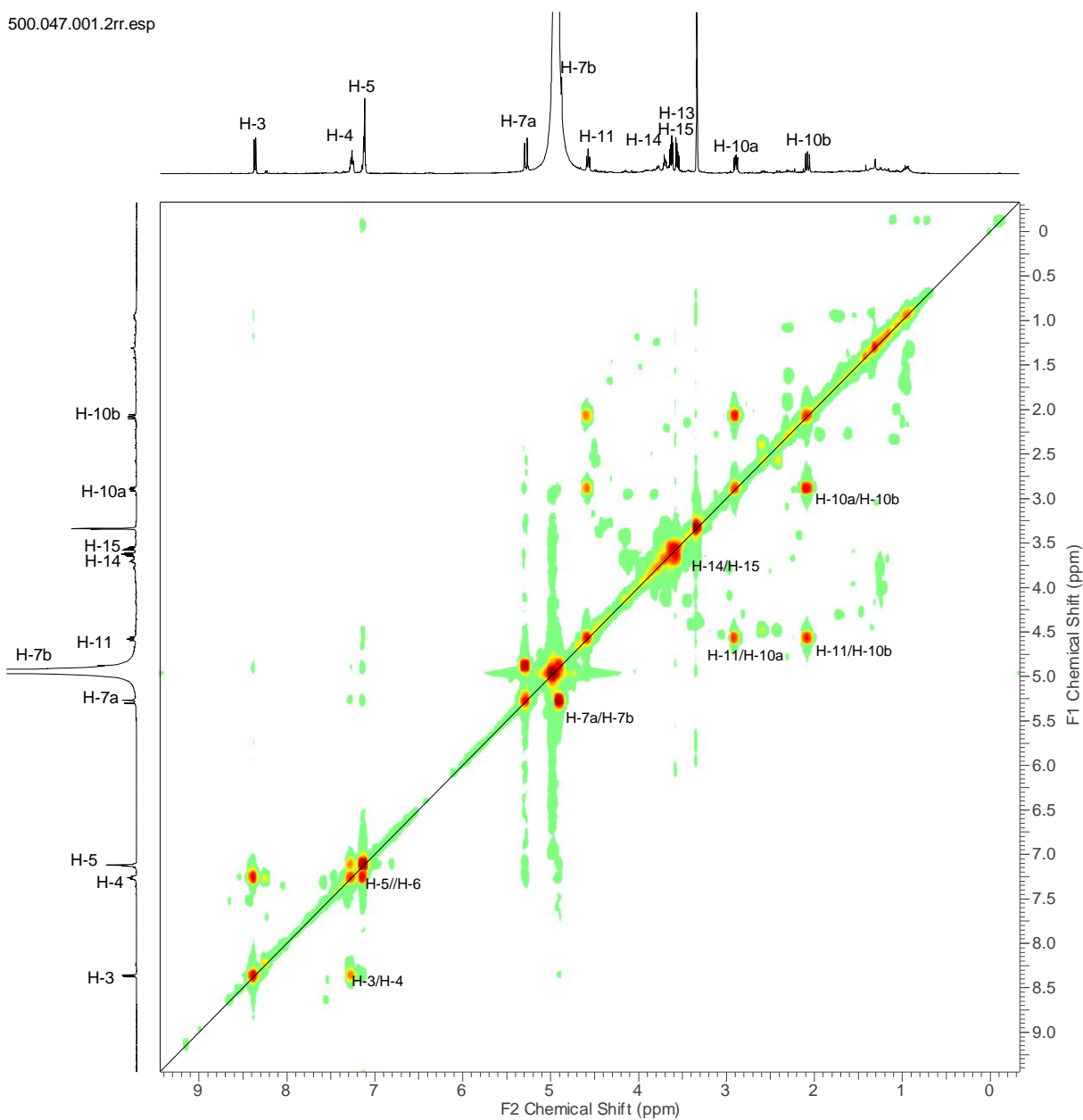
**Figura 40:** RMN DEPTQ (125 MHz, MeOD) de **10**.



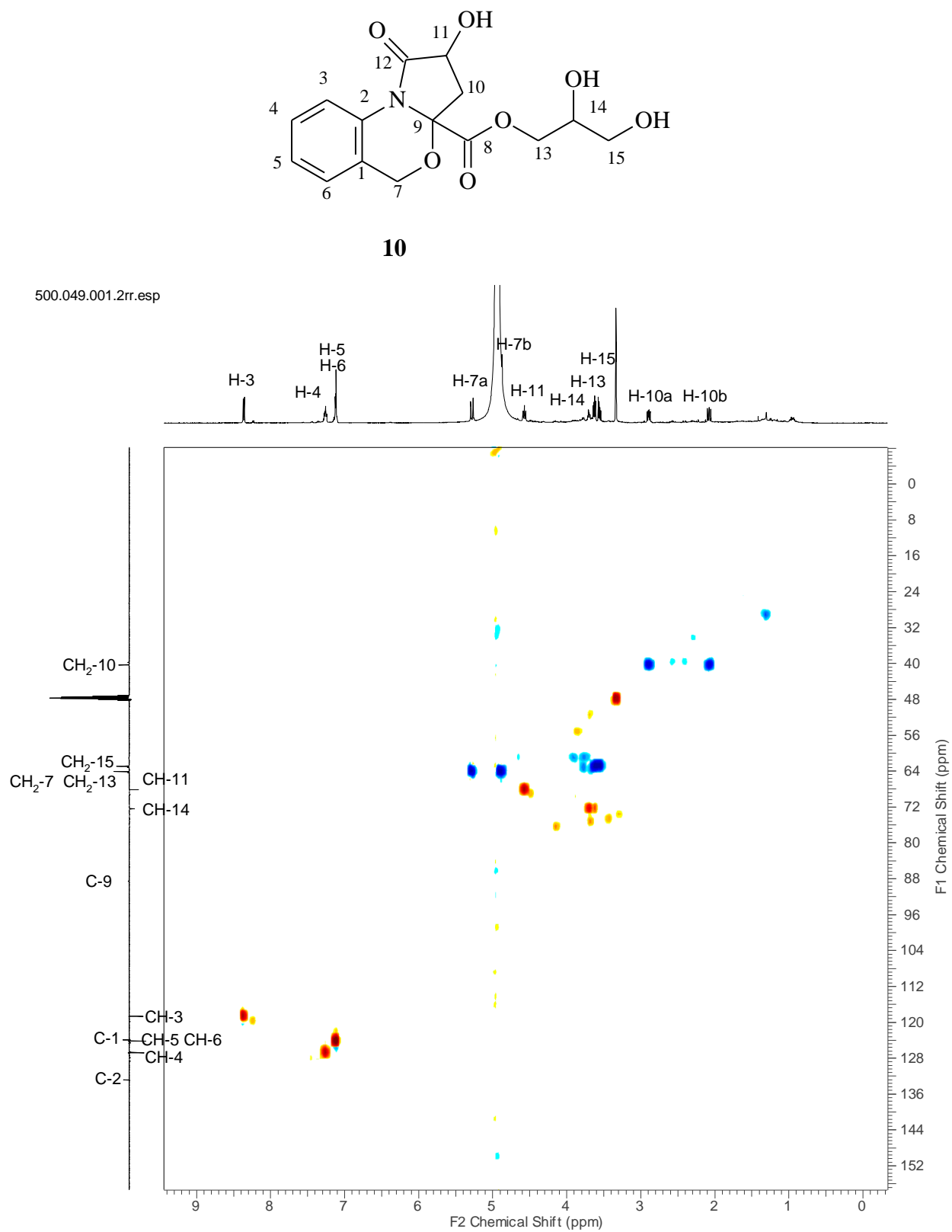


**10**

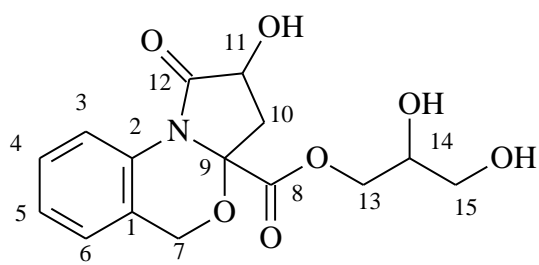
500.047.001.2rr.esp



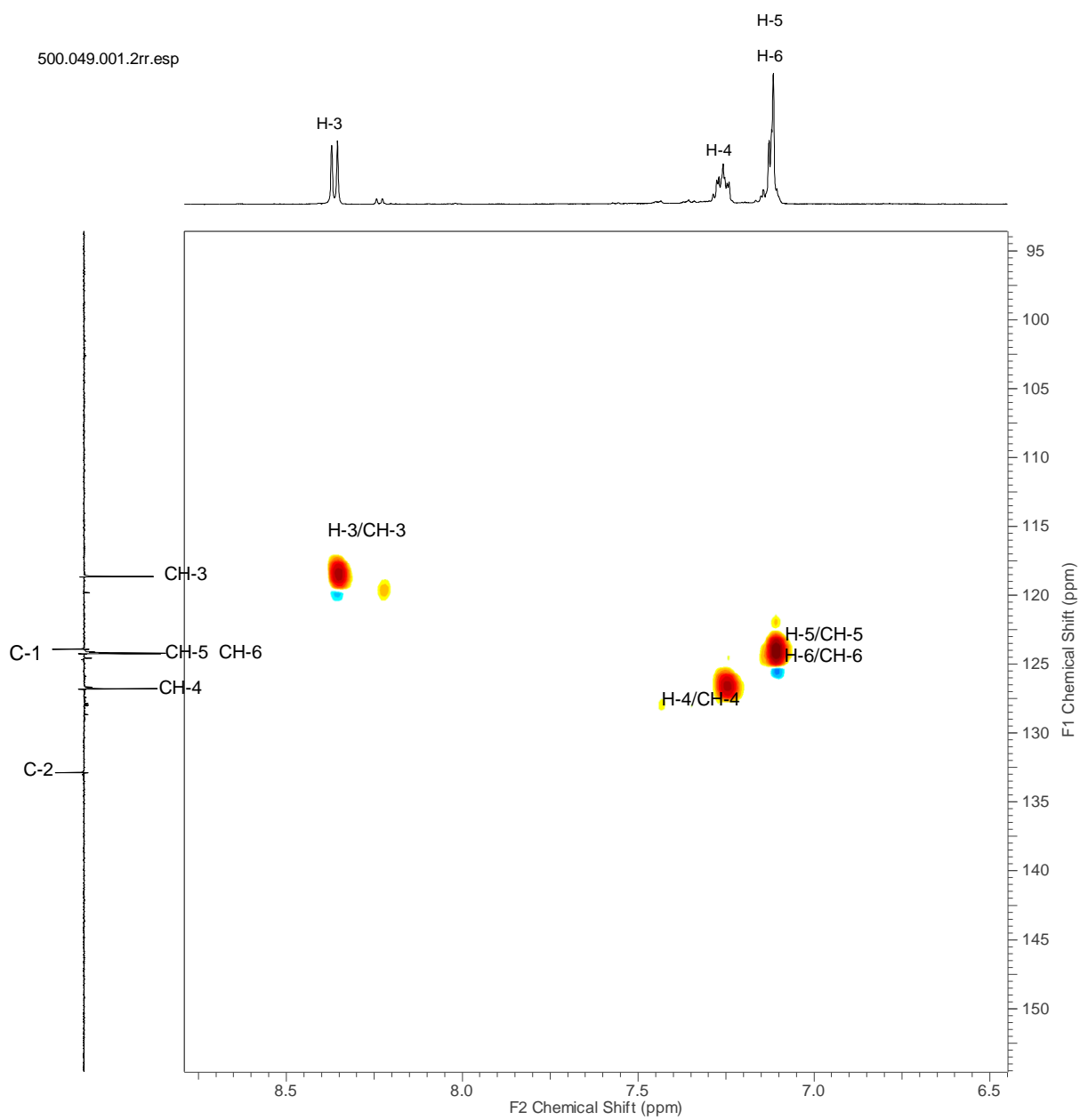
**Figura 41:** Espectro de RMN de COSY (500MHz, MeOD) de **10**.



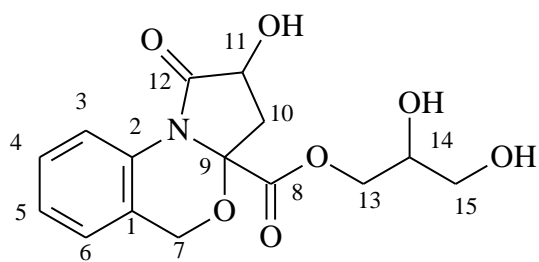
**Figura 42:** Espectro de RMN de HSQC (500/125MHz, MeOD) de **10**.



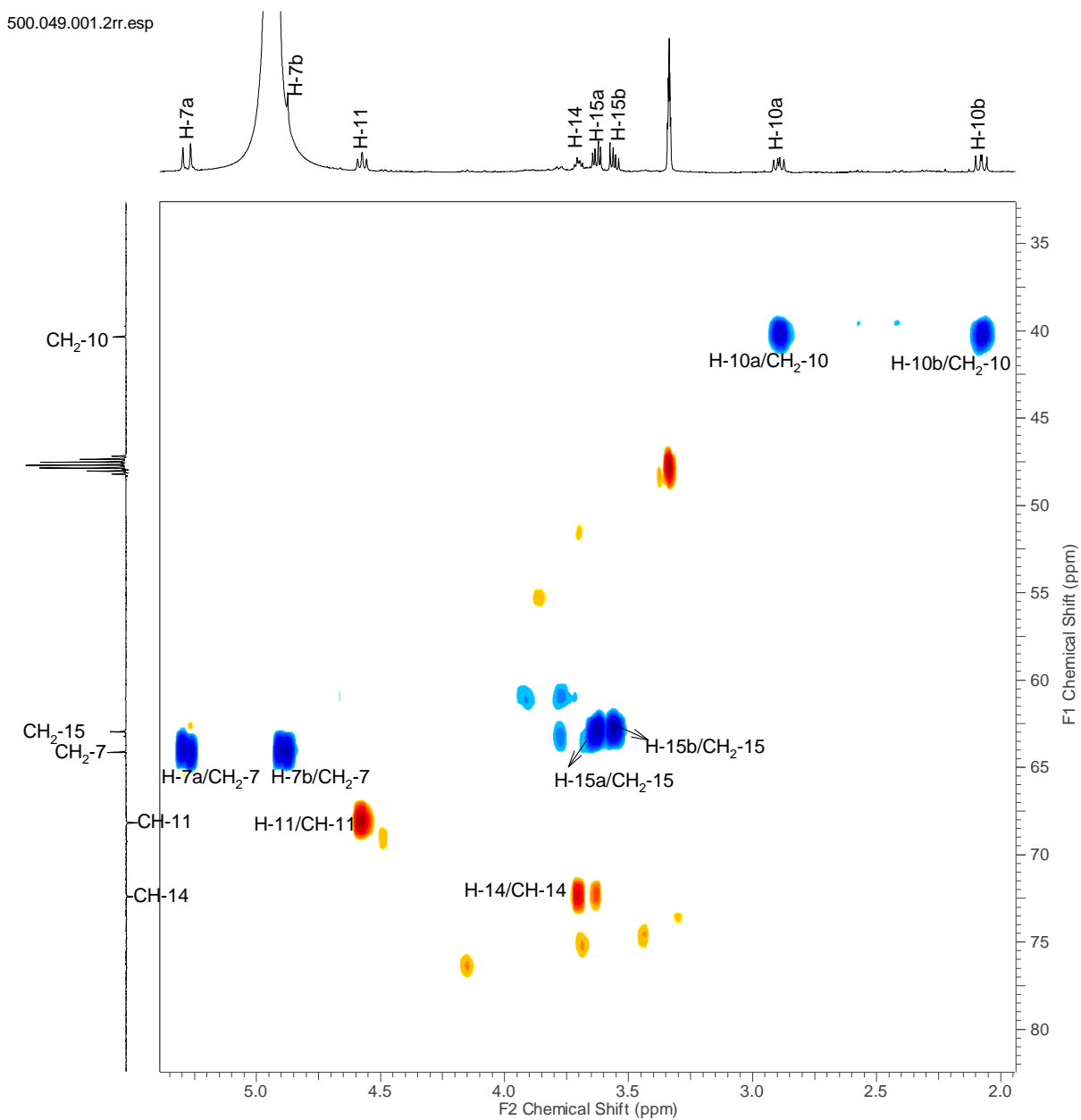
**10**



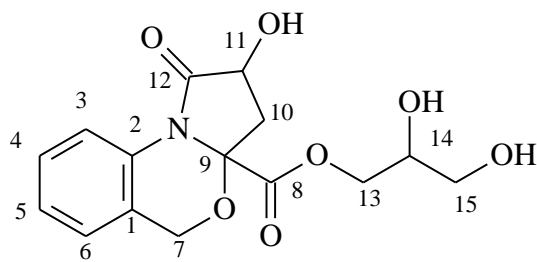
**Figura 43:** Expansão do espectro de RMN de HSQC (500/125MHz, MeOD) de **10**.



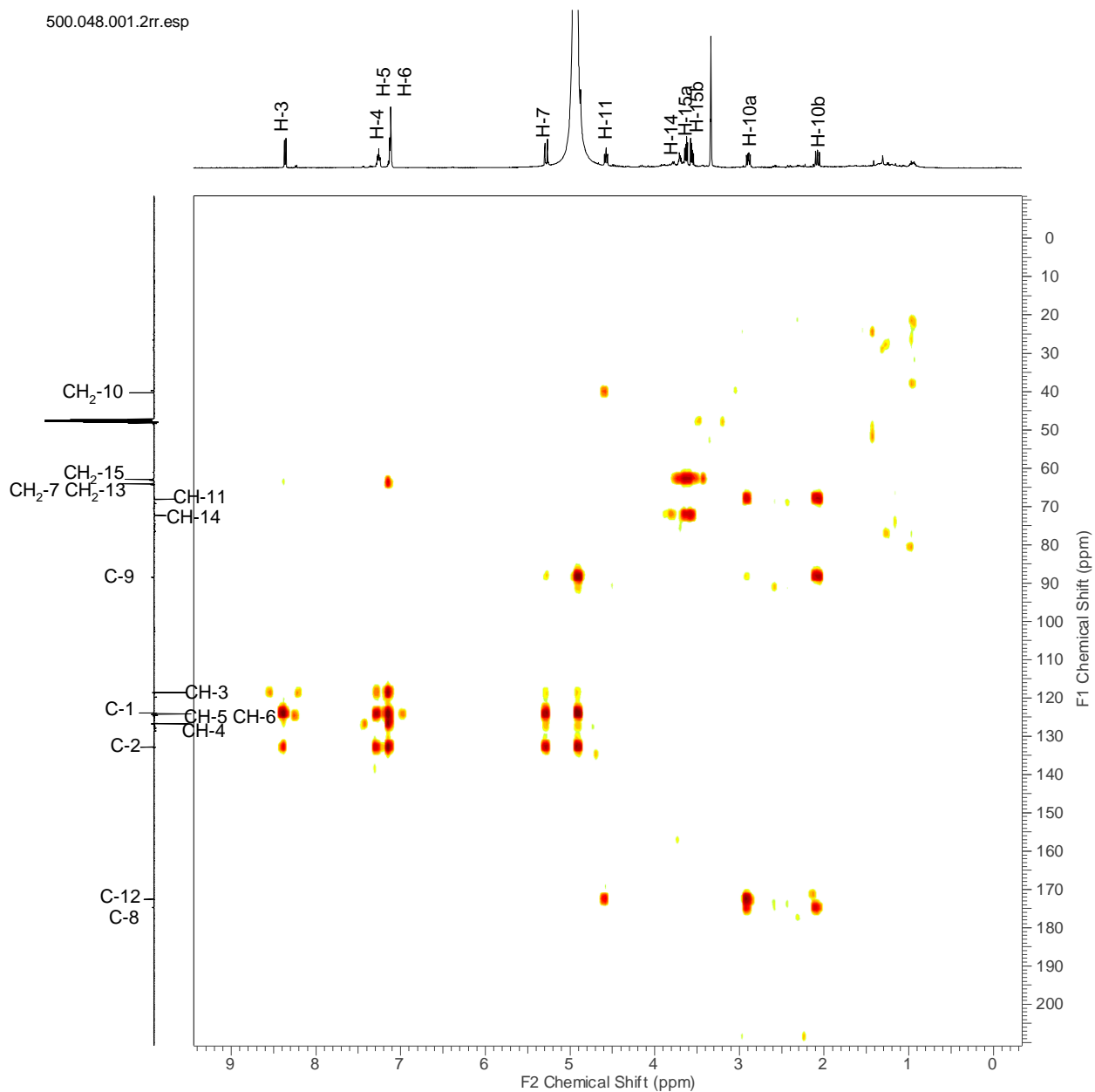
**10**



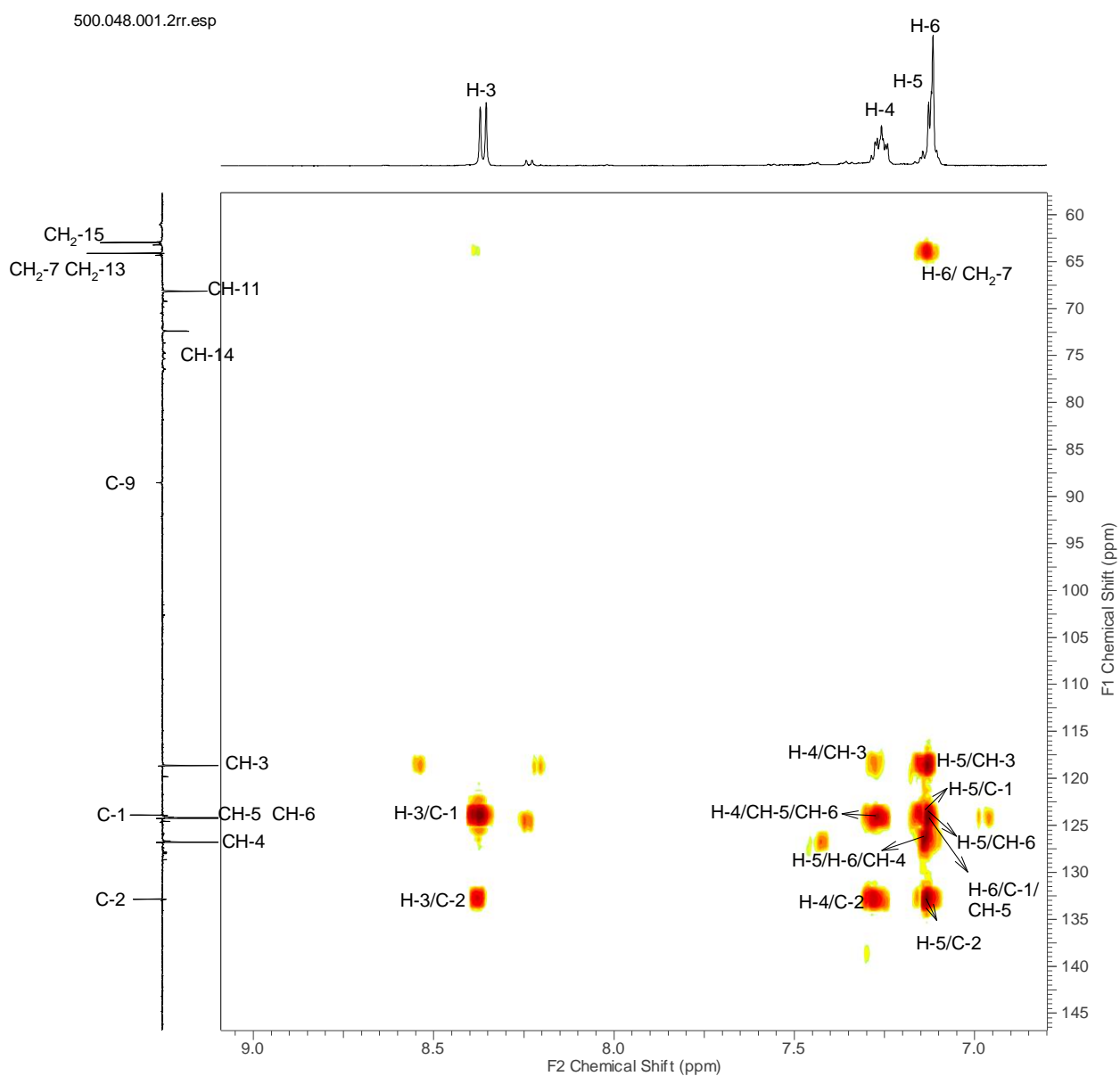
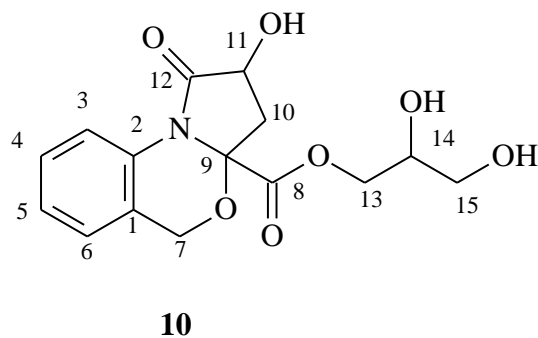
**Figura 44:** Expansão do espectro de RMN de HSQC (500/125MHz, MeOD) de **10**.



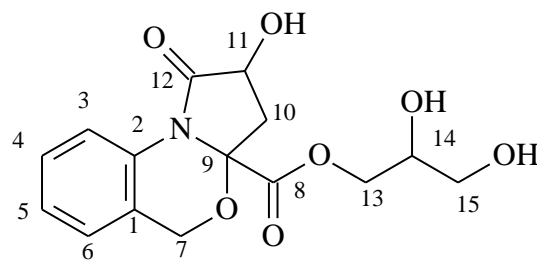
**10**



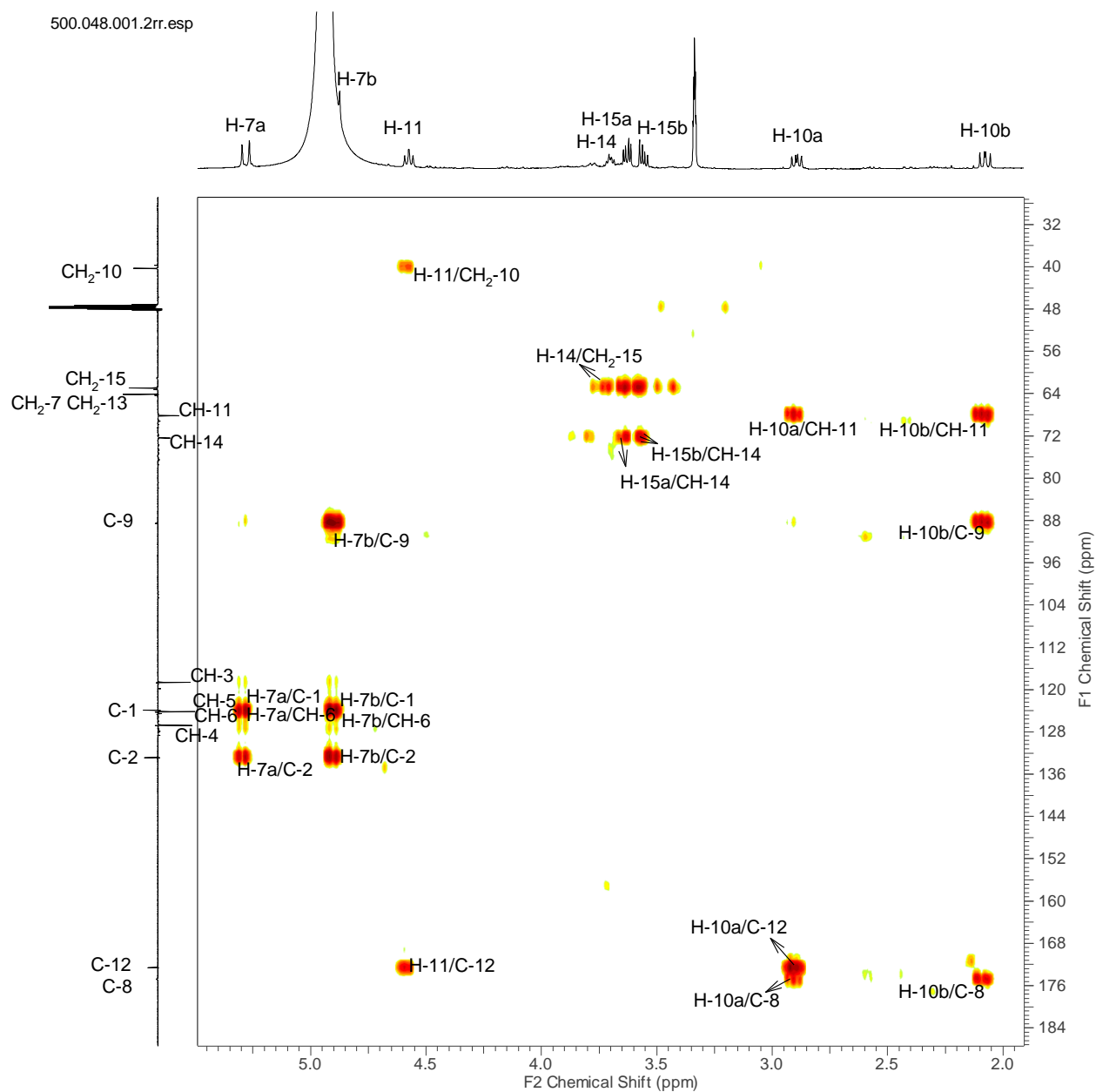
**Figura 45:** Espectro de RMN de HMBC (500/125MHz, MeOD) de **10**.



**Figura 46:** Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/125MHz, MeOD) de **10**.



**10**

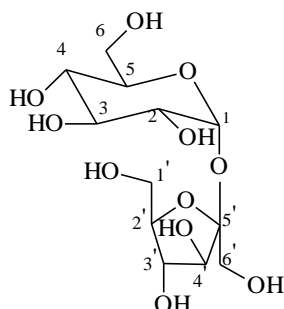


**Figura 47:** Expansão do espectro de RMN de HMBC (500/125MHz, MeOD) de **10**.

### 3.1.9. Substância 11

A amostra **JWFMH<sub>2</sub>O-6A**, substância **11** (36,0 mg), foi obtida sob a forma de cristais brancos, solúvel em metanol, a partir do fracionamento do extrato de metanol das folhas de *J. wasshausseniana*. A proposta de elucidação estrutural de JWFMH<sub>2</sub>O-6A foi realizada a partir da análise dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e comparação com dados descritos na literatura (MOCCELINI et. al., 2009)

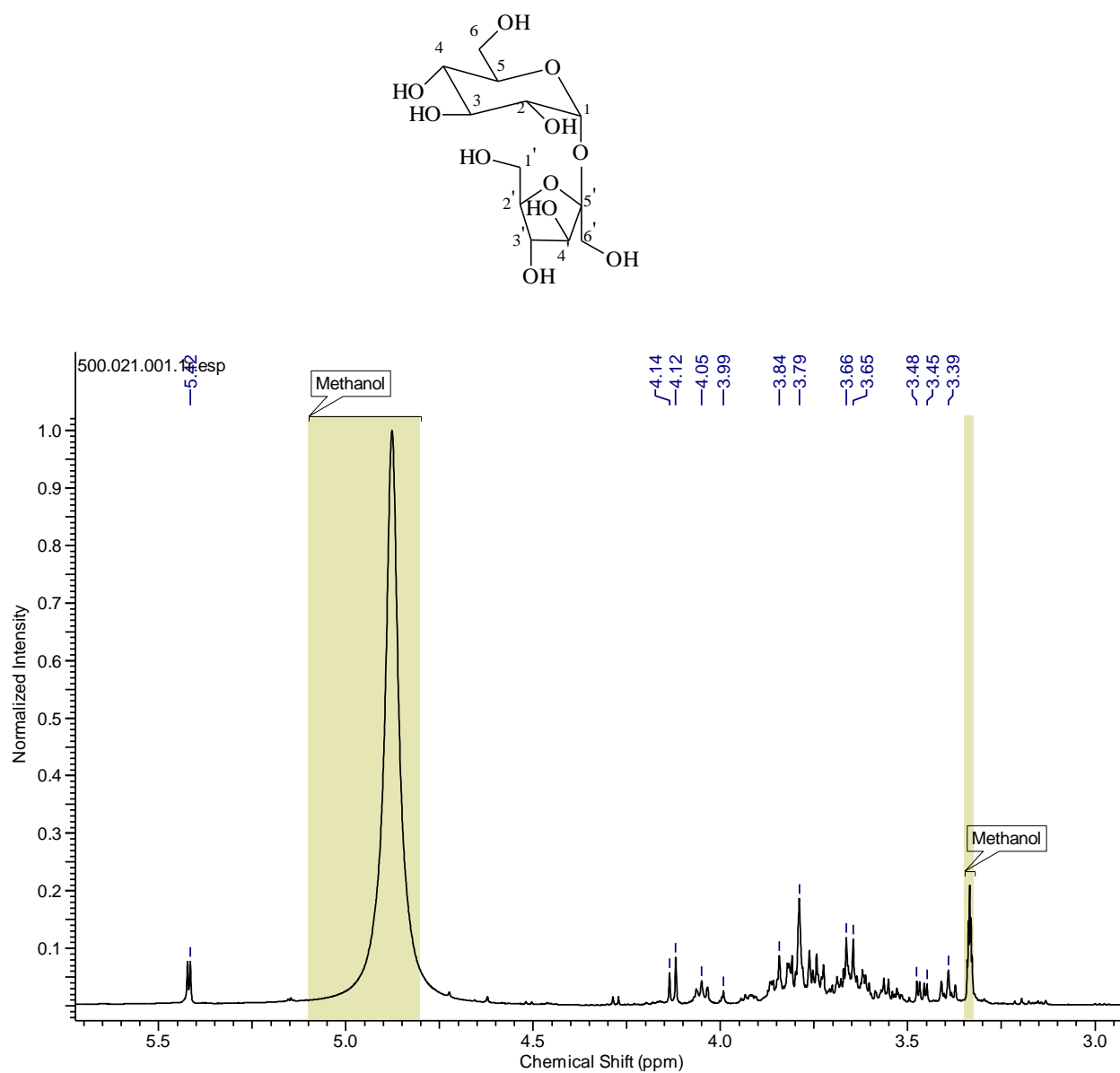
A identificação da substância **11** foi realizada com base nos dados de RMN de <sup>1</sup>H (**Figura 47**) e <sup>13</sup>C (DEPTQ) (**Figura 48**) e comparação com os valores registrados na literatura (Tabela 10) (MOCCELINI et. al., 2009). Analisando o espectro de RMN <sup>1</sup>H, verificou-se sinais na região de açúcar entre  $\delta_H$  3,2 e 4,14, além do sinal atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico em  $\delta_H$  5,2 (*d*, *J* 3,8 Hz). No DEPTQ observam-se 12 sinais de carbono, sendo três sinais atribuídos aos carbonos metilênicos  $\delta_{CH_2}$  62,05 (C-6), 60,79 (C-1') e 62,61 (C-6') e um quaternário em  $\delta_C$  103,91 (C-2'), que é compatível com a estrutura do dissacarídeo sacarose ou  $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo (sacarose).



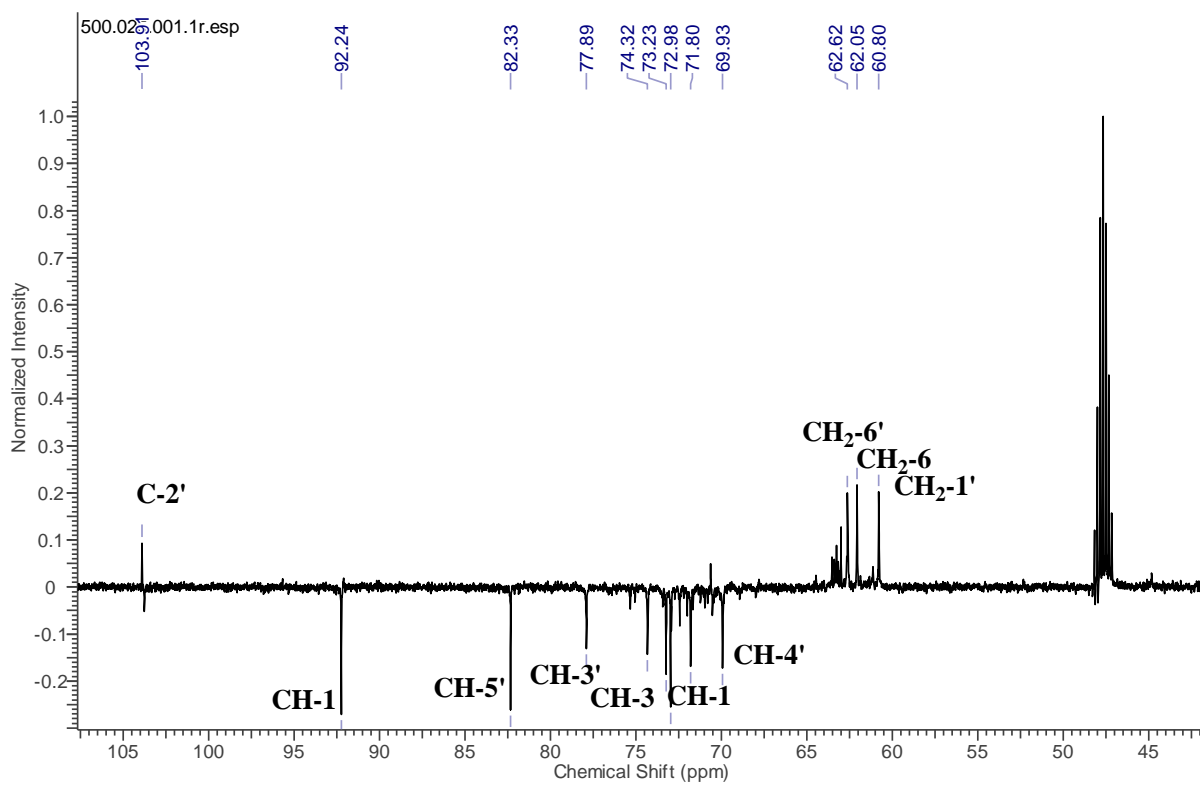
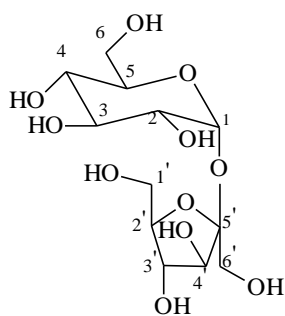
**Tabela. 10:** Deslocamentos químicos de <sup>13</sup>C da sacarose e de **11**

	C	<b>11</b>	Sacarose
		$\delta^{13}C$	$\delta^{13}C$
C	2'	103,91	103,7
CH	1	92,24	92,2
	2	72,98	72,5
	3	74,32	74,1
	4	71,80	71,2
	5	73,23	72,7
	3'	77,89	76,5
	4'	69,93	69,4
CH <sub>2</sub>	5'	82,33	81,05
	6	62,05	61,5
	1'	60,80	60,03
	6'	62,62	62,5





**Figura 48:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz, MeOD) de **11**.



**Figura 49:** Espectro de DEPTQ (100MHz, MeOD) de 11.

#### 4. Conclusões sobre o estudo químico de *J. wasshausseniana*

Este foi o primeiro estudo químico de *Justicia wasshausseniana* Profice no qual foi realizada testes de prospecção fitoquímica dos extratos de diclorometano e metanol das folhas e caule de *Justicia wasshausseniana*, os extratos de diclorometano revelaram testes positivos para esteróides e triterpenóides, cumarinas, carboidratos e cardioativos e os extratos de metanol revelaram testes positivos para saponinas, alcaloides, cumarinas, carboidratos e cardioativos, no qual foi confirmada a presença de esteroides, saponinas, carboidrato e alcaloides através do isolamento desses metabólitos nos extratos estudados. Também foi realizado avaliação da quantidade de flavonoides das amostras dos extratos metanólicos das folhas e caule da espécie e os extratos de *Justicia wasshausseniana* apresentaram um valor médio relativamente baixo em total de flavonoides, metabólito que não foi isolado neste estudo fitoquímico, confirmando o resultado da prospecção.

Através do isolamento dos metabólitos de folhas e galhos da espécie, foi possível identificar onze metabolitos especiais e um sal. Os metabólitos isolados foram um triglicérideo com a unidade acila insaturada, um ácido carboxílico insaturado, uma mistura dos esteróides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol) e de esteroides glicosilados (3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-sitosterol e o 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-estgmasterol); dissacarídeo  $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D frutofuranosídeo (sacarose) e os dois alcalóides descritos pela primeira vez na literatura. Através do isolamento dessas confirmou-se alguns resultados obtidos na prospecção fitoquímica e demonstrou-se que o gênero é bioprodutor de alcaloides.

## 5. REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO I

AGBOR, G. A.; LONGO, F.; MAKONG, E. A. AND TARKANG, P. A. Evaluation of the antidiarrheal and antioxidant properties of *Justicia hypocrateriformis*. *Pharm Biol.*; 52(9): 1128–1133, 2014

AL-JUAID, S.S.; ABDEL-MOJIB, M.A. A novel podophyllotoxin lignan from *Justicia heterocarpa*. *Chem Pharmaceut Bull* 52: 507-509. 2004

ALONSO-CASTRO, A.J.; VILLARREAL, M.L.; SALAZAR-OLIVO, L.A.; GOMEZ-SANCHEZ, M.; DOMINGUEZ, F.; GARCIA-CARRANCA, A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol* 133: 945-972. 2011.

ANGONESE, M.T.; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C, Perfil químico da família acanthaceae. *Bol Mus Biol Mello Leitão* 1: 3-6. 1992

BABU, G. V. R.; KAVITHA, J.; SUBBARAJU, G. V. *Justicia* lignans: Part 8 – Lignans from *Justicia orbiculata* Wall. *Indian Journal of Chemistry* Vo. 40B, pp 864-866. September 2001

BADAMI, S.; ANEESH, R.; SANKAR, S.; SATHISHKUMAR, M.N.; SURESH, B.; RAJAN, S. Antifertility activity of *Derris brevipes* variety coriacea. *J Ethnopharmacol* 84: 99-104. 2003

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. Imprensa Oficial, 3ª edição, Fortaleza, 1976.

CABREÉ, P. **Actividad optica, dispersion rotatória optica y dicroísmo circular em química orgânica**. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de la Organización de los Estados Unidos Americanos. Washington, C.C., 1974

CÁCERES-CORTÉS, J.R.; CANTÚ-GARZA, F.A.; MENDOZA-MATA, M.T.; CHAVEZ-GONZÁLEZ, M.A.; RAMOS-ANDUJANO, G.; ZAMBRANO-RAMÍREZ, I.R. Cytotoxic activity of *Justicia spicigeris* inhibited by bcl-2 proto-oncogene and induces apoptosis in a cell cycle dependent fashion. *Phytother Res* 8: 691-697. 2001

CASSANI, J.; DORANTES-BARRÓN, A. M.; NOVALES, L. M.; REAL, G. A.; AND ESTRADA-REYES, R. Anti-Depressant-Like Effect of Kaempferitrin Isolated from *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae) in Two Behavior Models in Mice: Evidence for the Involvement of the Serotonergic System. *Molecules* 19, 21442-21461; 2014

CORREA, P. M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento, Florestal, Brasil 5, pag. 474-475, 1984.

CORRÊA, G. M. E ALCÂNTARA, A. F. DE C. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(1): 220-238, Jan./Feb. 2012

CORRÊA, G. M.; ABREU, V. G. DA C.; MARTINS, D. A. DE A.; TAKAHASHI, J. A.; FONTOURA, H. DE S.; CARA, D. C.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. DE C. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of steroids and triterpenes isolated from aerial parts of *Justicia acuminatissima* (Acanthaceae). *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 6, Issue 6, 75-81, 2014

DAY, S.; CHIU, N.; WON, S.; LIN, C. Cytotoxic lignans of *Justicia ciliata*. *J Nat Prod* 62: 1056-1058. 1999

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach* (Second Edition), John Wiley & Sons Ltd, 2001.

FUKAMIYA, N. & LEE, K. Antitumor agents, 81. Justicidin-A and diphyllin, two cytotoxic principles from *Justicia procumbens*. *J Nat Prod* 49: 348-350. 1986

HUI, H.Y.; CHANG, C.J.; MCLAUGHLIN, J.L.; POWELL, G.P. Justicidin B, a bioactive trace lignan from the seeds of *Sesbania drummondii*. *J Nat Prod* 49: 1175-1176. 1986

JAIN, P.S. AND BARI, S.B. Isolation of Lupeol, Stigmasterol and Campesterol from Petroleum Ether Extract of Woody Srem of *Wrightia tinctoria*. *Asian Journal of Plant Sciences* 9 (3): 163-167, 2010

JHA, A.; NAIDU, A. B. AND ABDELKHALIK, A. M. Transition metal-free one-pot cascade synthesis of 7-oxa-2-azatricyclo[7.4.0.0<sup>2,6</sup>]trideca-1(9),10,12-trien-3-ones from biomass-derived levulinic acid under mild conditions *Org. Biomol. Chem.*, 11, 7559-7565. 2013

JHA, D. K.; PANDA, L.; RAMAIAH, S. AND ANBARASU, A. Evaluation and Comparison of Radical Scavenging Properties of Solvent Extracts from *Justicia adhatoda* Leaf Using DPPH Assay. *Appl Biochem Biotechnol* 174:2413–2425. 2014

JOHNE, S.; WAIBLINGER, K.; GROEGER, D. Biosynthesis of quinazoline alkaloid peganine in *Adhatoda vasica*. *Pharmazie* (1973), 28, (6), 403-6.

KAUR, A.; KAUR, D. AND ARORA, S. Evaluation of antioxidant and antimutagenic potential of *Justicia adhatoda* leaves extract. *African Journal of Biotechnology* Vol. 14(21), pp. 1807-1819, 27 May, 2015

KIREN, Y.; DEGUCHI, J.; HIRASAWA, Y.; MORITA, H. AND PRAJOGO, B. Justidrusamides A–D, new 2-aminobenzyl alcohol derivatives from *Justicia gendarussa*. *J Nat Med.* 68:754–758, 2014

KPOVIESSI, S.; GBAGUIDI, F.; GBENOU, J.; ACCROMBESSI, G.; HADDAD, M., MOUDACHIROU, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Allelopathic effects on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant and cytotoxic activities of sterols and triterpenes isolated from *Justicia anselliana* (NEES) T. Anders. *Electron J Nat Subs* 1: 12-19. 2006.

MARTINS, L. G. S.; SENNA-VALLE, L. e PEREIRA, N. A. Princípios ativos e atividades farmacológicas de oito plantas popularmente conhecidas por nome de medicamentos comerciais. *Revista Bras. PL. Med.* Butucatu, Vol. 7, nº2, pag.: 73-76, 2005

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D'ARC P.; SILVA, A. R. A. e MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Revista Brasileira de Farmacognosia. Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Vol.15, nº2, pág. 169-177, Abr./Jun. 2005

POUCHERT, C. AND BEHNKE, J. **Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT-NMR Spectra** volume I-III. USA: Wisconsin. Aldrich Chemical Co 23,392-7. 1993

PROFICE, S.R.; KAMEYAMA, C.; CÔRTEZ, A.L.A.; BRAZ, D.M.; INDRIUNAS, A.; VILAR, T.; PESSOA, C.; EZCURRA, C.; Wasshausen, D. Acanthaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB33>> Acesso em: 02 Fev. 2016

RAGHAVENDRA, M. P.; PRASAD, A. G. DEVI AND SHYMA, T. B. Investigations on anti-diabetic medicinal plants used by tribes of Wayanad District, *Kerala IJPSR*; Vol. 6(8): 3617-3625., 2015

REDDY, Y. S.; CHINNALA, K. M.; NATH, K. V. S.; MOHAN, E. M.; PREETHI, B. AND NARENDER, B. *In vitro* evaluation of anti-oxidant activity of different extracts of *Justicia gendarussa* leaf. *Der Pharma Chemica*,7(8):21-24. 2015

ROCHA, D. **Formulário terapêutico de plantas medicinais cearenses, nativas e cultivadas**. Progresso, Fortaleza, 1945.

SOUZA, V. C. e LORENZI H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**, baseado em APGII/Vinicius Castro Souza, Harri Lorenzi – Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2005.

SUSPLUGAS, S.; VAN HUNG, N.; BIGNON, J.; THOISON, O.; KRUCZYNSKI, A.; SÉVENET, T.; GUÉRITTE, F. Cytotoxic aryl-naphthalene lignans from a Vietnamese acanthaceae, *Justicia patentiflora*. *J Nat Prod* 68: 734-738. 2005

VEGA-AVILA, E.; ESPEJO-SERNA, A.; ALARCON-AGUILAR, F.; VELAZCO-LESAMA, R. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *P W Pharmacol Soc* 52: 78-82. 2009

VELANDIA. J. R.; CARVALHO. M. G. de; BRAZ-FILHO. R.; WERLE. A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. *Phytochem. Anal.*, 13, 283-292, 2002.

VOGEL, A.I. **Química Analítica Qualitativa**. 5ª Ed. Revisada por G. Svehla. – São Paulo: Mestre Jou, 1981.

WASSHAUSEN, D.C. & WOOD, J.R.I. Acanthaceae of Bolivia. Contributions from the United States. *National Herbarium* 49: 1-152. 2004.

ZAPATA-MORALES, J. R.; ALONSO-CASTRO, A. J.; DOMMINGUEZ, F.; CARRANZA-ALVAREZ, C.; CASTELLANOS, L. M. O.; MARTINEZ-MEDINA, R. M. and PEREZ-URIZAR, J. Antinociceptive Activity of an Ethanol Extract of *Justicia spicigera* *Drug development research* 77 : 180–186 (2016)

ZHOU, Y.; ZHAI, Y.; JI, X.; LIU, G.; FENG, E.; YE, D.; ZHAO, L.; JIANG, H. AND LIU, H. Gold(I)-Catalyzed One-Pot Tandem Coupling/Cyclization: An Efficient Synthesis of Pyrrolo-/Pyrido[2,1-*b*]benzo[*d*][1,3]oxazin- 1-ones. *Advanced Synthesis & Catalysis* Volume 352, Issue 2-3, pages 373–378, February 15, 2010

ZOTTELE, L. & AOYAMA, E.M. Morfoanatomia e enraizamento de estacas caulinares de *Justicia wasshauseniana* Profice (Acanthaceae). *Natureza on line* 12 (4): 179-184.2014



## CAPÍTULO II

### ESTUDO QUÍMICO DE *Tetrapterys acutifolia*

#### 1. Revisão de Literatura:

##### 1.1. Generalidades Sobre a Família Malpighiaceae e gênero *Tetrapterys*

A família Malpighiaceae possui uma distribuição tropical e subtropical, incluindo cerca de 77 gêneros e 1300 espécies (DAVIS & ANDERSON, 2010). No Brasil ocorrem 44 gêneros e aproximadamente 561 espécies (MAMEDE et. al., 2016). A família é facilmente reconhecida pela presença de nectários extraflorais dispostos aos pares na base das sépalas da quase totalidade das espécies (SOUZA & LORENZI, 2008). Os gêneros *Banisteriopsis*, *Heteropterys* e *Tetrapterys* apresentam um grande número de espécies e são comuns ao longo de todo o Brasil, especialmente nas bordas de florestas. (SOUZA & LORENZI, 2008).

O gênero *Tetrapterys* apresenta 90 espécies distribuídas nas regiões tropicais, na América Central e América do Sul (QUEIROZ et al., 2014). No Brasil, plantas do gênero *Tetrapterys* como *Tetrapterys acutifolia* e *T. multiglandulosa*, aparecem como plantas tóxicas que causam “morte súbita”, insuficiência cardíaca crônica, associada a lesões degenerativas e fibrosantes acentuadas no miocárdio bovino (KELLERMAN et al. 1988; TOKARNIA et al. 1990, TOKARNIA et al. 2000; PEIXOTO et al. 1995). Abortos também são descritos devido às intoxicações por *T. acutifolia* e *T. multiglandulosa*. (TOKARNIA et al. 1989; STOLF et al. 1994; RIET-CORREA, G. et al., 2005). A videira *Tetrapterys mucronata* Cav. é de particular interesse porque é usada ocasionalmente na preparação de "Ayahuasca", uma decocção de plantas com efeitos psicotrópicos que tem uma longa história cultural no Brasil. (QUEIROZ et al., 2014)

##### 1.2. Características morfológicas de *Tetrapterys acutifolia*

*Tetrapterys acutifolia* é conhecida vulgarmente como cipó-ruão, cipó-vermelho, ou cipó-preto. É uma liana, ou seja, trepadeira lenhosa, as folhas são inteiras, alternas e opostas, são pilosas (**Figura 1**). Normalmente tem pecíolos articulados e estípulas inter ou intrapeciolares, livres ou concrecidas entre si. (WATSON. L & DALLWITZ , 1992). A Classificação botânica de *Tetrapterys acutifolia* encontra-se na **Tabela 1**. Não é uma

planta endêmica do Brasil com Distribuição Geográfica no Norte, Nordeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul (Paraná, Santa Catarina) (**Figura 2**). (MAMEDE *et. al.*, 2016)



**Figura. 1:** *Tetrapteryx acutifolia* (TOKARNIA *et. al.*, 2000)



**Figura. 2:** Ocorrência de *T. acutifolia* no Brasil (MAMEDE *et. al.*, 2016)

**Tabela 1:** Classificação botânica de *Tetrapteryx acutifolia*

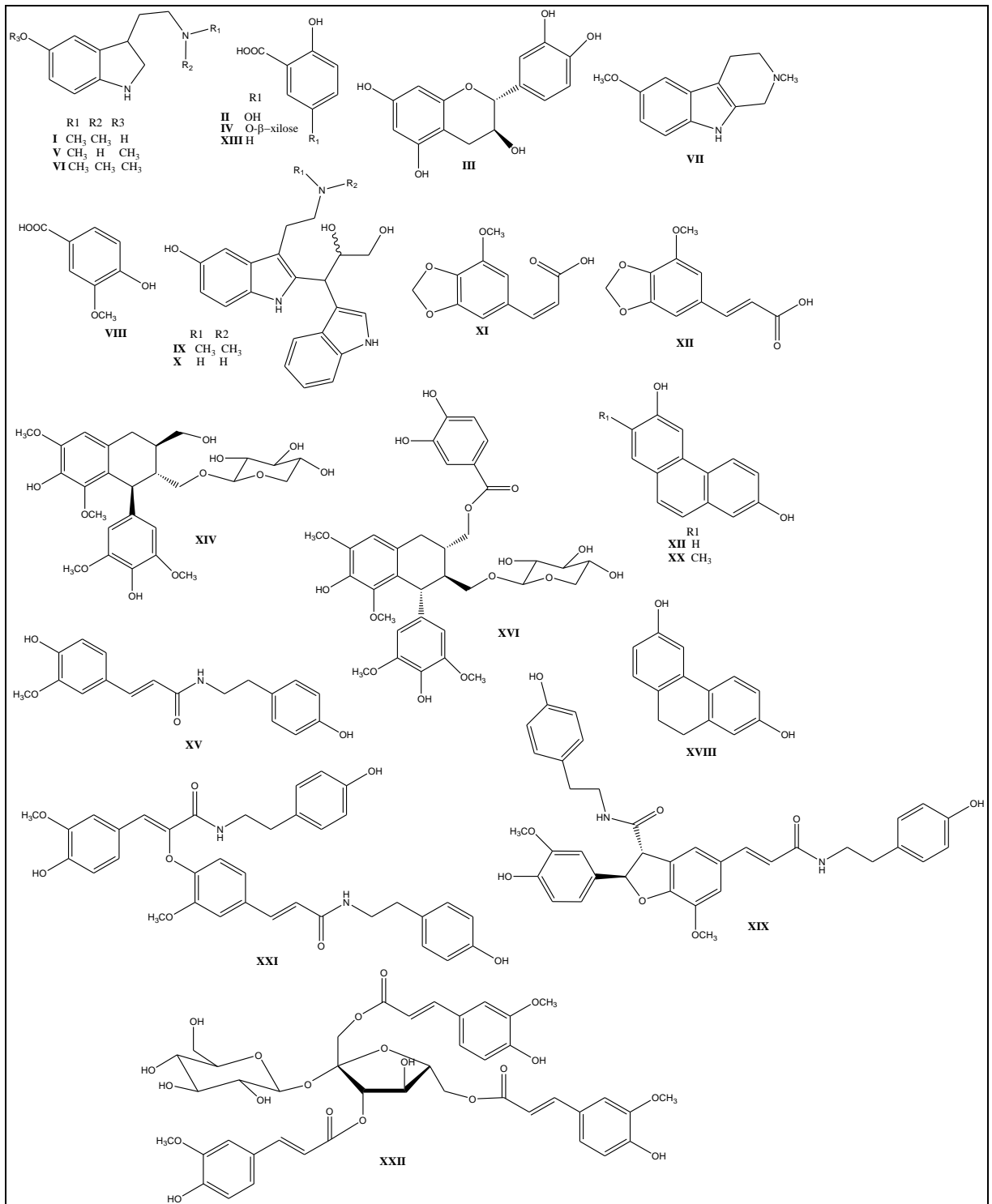
Divisão:	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe:	Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Ordem:	Polygalales(Malpighiales)
Família:	Malpighiaceae
Gênero:	<i>Tetrapteryx</i>
Espécie:	<i>T. acutifolia</i> ou <i>sp.</i>

### 1.3. Estudo farmacológico do gênero

*Tetrapteryx mucronata* Cav é uma planta conhecida por agir no sistema nervoso central e seu extrato etanólico apresentou atividade de inibição da acetilcolinesterase, uma enzima alvo para o tratamento da doença de Alzheimer (QUEIROZ *et al.*, 2014). *Tetrapteryx methystica* é uma planta psicoativa, nativa da floresta amazônica (SCHULTES, 1954).

### 1.4. Estudo químico do gênero *Tetrapteryx*

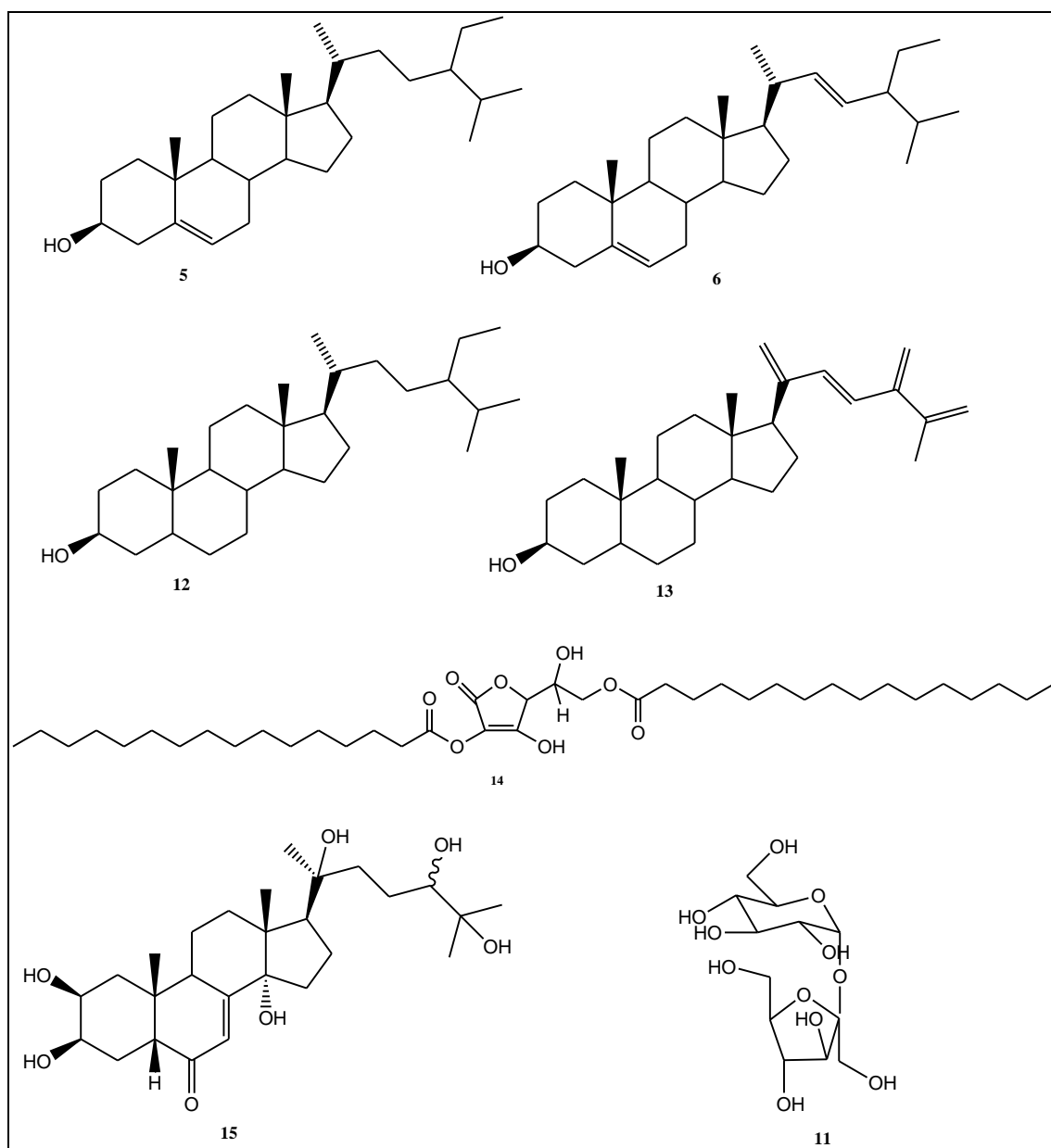
Em estudo de triagem fitoquímica feito com a *Tetrapteryx multiglandulosa*, foram detectadas as seguintes substâncias: flavonoides glicosilados, esteróides, polifenóis, taninos condensados e alcalóides. (MELO & DANTAS-BARROS, 1999). Na investigação fitoquímica da casca do caule de *Tetrapteryx mucronata* Cav. (Malpighiaceae), foram identificados 22 metabólitos: 5-hidroxi-*N*, *N*-dimetiltriptamina (bufotenina) (I), ácido gentísico (II), (+)-Catequina(III), ácido gentísico 5-O- $\beta$ -xilósido (IV), 5-metoxi-*N*-metiltriptamina (V), 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (VI), 2-metil-6-metoxi-1,2,3,4-tetra-hidro- $\beta$ -carbolina (VII), ácido vanílico (VIII), alcalóides diméricos indólicos mucronatin A (IX): mucronatin B (X), ácido cinâmico (Z)-3-metoxi-4,5-(metilenodioxí) (XI), ácido cinâmico (E) -3-metoxi-4,5-(metilenodioxí)(XII), ácido salicílico (XIII), lionísido (XIV), trans-*N*-feruloiltiramina (XV), ácido Nudipósido-9'-di-hidroxibenzóico (XVI), 2,6-Fenantrenediol (XVII), 2,6-di-hidroxi-9,10-diidrofenantreno (XVIII), grossamida (XIX), 7-Metil-2,6-fenantrenediol (XX), canabisina F (XXI), esmilásido L (XXII) (QUEIROZ *et al.*, 2014). (**Figura 3**).



**Figura. 3:** Substâncias isoladas de *Tetrapteryx mucronata*.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Substâncias isoladas de *Tetrapterys acutifolia*:



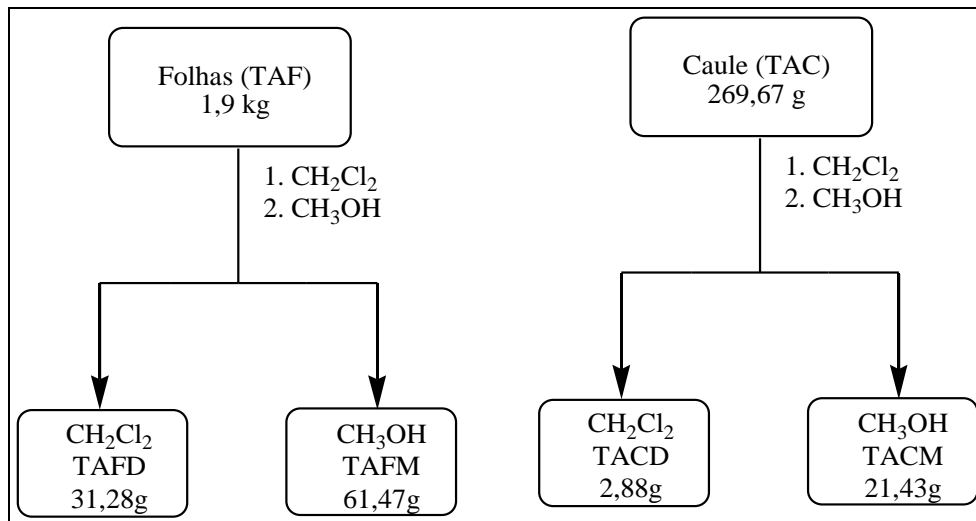
**Figura 4:** Substâncias isoladas de *Tetrapterys acutifolia*.

## 2.2. Obtenção do material vegetal:

O material vegetal, caule e folhas de *Tetrapteryx acutifolia*, foi coletado por Saulo Andrade Caldas em novembro de 2009 no município de Barra do Piraí-RJ, Sítio Santo Antônio - Km 47 - Estrada do Piraí, Valença. A espécie foi identificada pelo Dr. William R. Anderson, University of Michigan Herbarium com o registro: Döbereiner & Tokarnia 1846, 1847.

## 2.3. Obtenção dos Extratos Brutos:

Caule (269,67 g) e a folhas (1,9 kg) da *Tetrapteryx acutifolia*, após secas e moídas, foram extraídas separadamente com os solventes orgânicos diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e metanol (MeOH), através da maceração contínua em temperatura ambiente. As soluções obtidas foram destiladas a pressão reduzida em evaporador rotatório. Com o caule, obteve-se 2,88 g do extrato de diclorometano (**TACD**) e 21,43 g do extrato metanólico (**TACM**). Com as folhas obteve-se 31,28 g do extrato de diclorometano (**TAFD**) e 61,47g do extrato metanólico (**TAFM**) (**Esquema 1**).



**Esquema 1:** Fluxograma da extração do caule e a folha da *Tetrapteryx acutifolia*.

#### 2.4. Prospecção fitoquímica dos extratos de *Tetrapteryx acutifolia*.

Foi realizado a prospecção fitoquímica com os extratos de diclorometano e metanol do caule (TACD e TACM) e das folhas (TAFD e TAFM) de *Tetrapteryx acutifolia*. A **tabela 2** demonstra os resultados da prospecção química do extrato metanólico, que revelou em alguns extratos testes positivos para as classes de metabólitos especiais: saponinas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, flavonóides, antraquinonas, cumarinas, aminoácidos não protéicos, carboidratos e cardioativos.

**Tabela 2:** Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de *T. Acutifolia*

Prospecções	TACD	TACM	TAFD	TAFM
Saponinas	-	+	-	+
Esteróides e triterpenóides	+	-	+	-
Alcalóides	-	+	-	+
Flavanonóides	-	+	-	+
Antraquinonas	-	+	-	+
Cumarinas	+	+	+	+
Taninos	-	+	-	+
Aminoácidos não-protéicos	-	+	-	-
Carboidratos	+	+	+	+
Cardioativos	+	+	+	+

#### 2.5. Ensaio de flavonóides totais com cloreto de alumínio

Foi feita a avaliação da quantidade de flavonoides das amostras dos extratos e frações de *Tetrapteryx acutifolia*

Os valores de absorbância das amostras e os teores de flavonoides totais dos extratos de *Tetrapteryx acutifolia* (**TACM** – *T.acutifolia*caule metanol e **TAFM** – *T.acutifolia*folhametanol) e frações do extrato metanólico do caule: **TACMH** (Hexano), **TACMD** (Diclometano), **TACMA** (Acetato) e **TACMM** (Metanol) e frações do extrato metanólico das folhas: **TAFMH** (Hexano), **TAFMD** (Diclometano), **TAFMA** (Acetato) e **TAFMM** (Metanol) encontram-se na **Tabela**, onde observou-se que o extrato de folhas (TAFM – 38,30 mg/g extrato) e as frações de folhas (TAFMD – 54,78mg/g extrato, TAFMA – 41,12mg/g extrato e TAFMB – 62,10 mg/g extrato) apresentaram um valor

médio maior que o caule (TACM – 10,04 mg/g extrato e TACMD – 22,80mg/g extrato). Os valores obtidos no ensaio estão na **tabela 3**.

**Tabela 3:** Ensaio de Flavonoides totais de *Tetrapteryx acutifolia*

Amostra	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>méd.</sub>	mg/g extrato	mg/g extrato	mg/g extrato	MÉDIA	Desvio Padrão
TACM	0,246	0,241	0,242	<b>0,243</b>	10,17	9,96	10,00	<b>10,04</b>	± <b>0,112</b>
TACMH	0,338	0,329	0,338	<b>0,335</b>	14,05	13,67	14,05	<b>13,92</b>	± <b>0,219</b>
TACMD	0,532	0,552	0,553	<b>0,546</b>	22,22	23,07	23,11	<b>22,80</b>	± <b>0,499</b>
TACMA	0,359	0,363	0,370	<b>0,364</b>	14,93	15,10	15,39	<b>15,14</b>	± <b>0,235</b>
TACMM	0,164	0,168	0,167	<b>0,166</b>	6,71	6,88	6,84	<b>6,81</b>	± <b>0,088</b>
TAFM	0,916	0,908	0,916	<b>0,913</b>	38,41	38,07	38,41	<b>38,30</b>	± <b>0,195</b>
TAFMH	0,604	0,619	0,635	<b>0,619</b>	25,26	25,89	26,57	<b>25,90</b>	± <b>0,654</b>
TAFMD	1,292	1,328	1,293	<b>1,304</b>	54,26	55,78	54,30	<b>54,78</b>	± <b>0,864</b>
TAFMA	0,980	0,970	0,991	<b>0,980</b>	41,11	40,69	41,57	<b>41,12</b>	± <b>0,443</b>
TAFMM	0,232	0,233	0,235	<b>0,233</b>	9,58	9,62	9,70	<b>9,63</b>	± <b>0,064</b>
TAFMB	1,504	1,481	1,478	<b>1,488</b>	63,20	62,23	62,10	<b>62,51</b>	± <b>0,600</b>

## 2.6. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de Folha da *Tetrapteryx acutifolia*

### 2.6.1. Extrato de Diclorometano de folhas de *Tetrapteryx acutifolia* (TAFD)

O extrato **TAFD** (2,0g) da folha da *Tetrapteryx acutifolia* foi submetido a processo de filtração seletiva em funil de separação utilizando sílica gel 70-230 Mesh como meio filtrante e como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, (**Esquema 2**) obtendo-se as frações hexano (**TAFDH**, 0,13g), diclorometano (**TAFDD**, 0,81g), acetato de etila (**TAFDA**, 0,29g) e metanol (**TAFDM**, 0,42g) (**Esquema 2**).

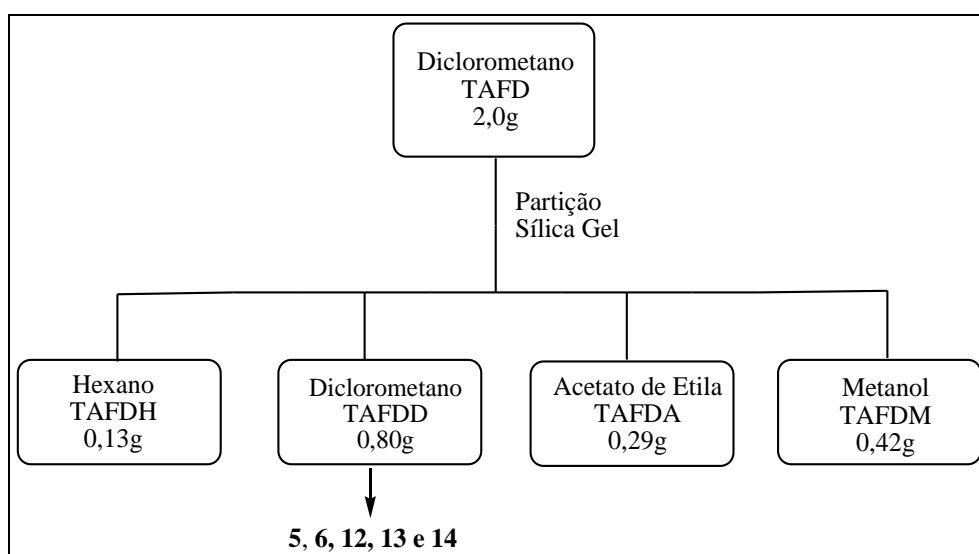
A fração diclorometano (**TAFDD**) foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel, usando-se como eluente inicial hexano e em seguida misturas binárias de hexano, diclorometano, clorofórmio e metanol em gradiente crescente de polaridade até 100% metanol, obtendo-se 13 frações.

As frações recolhidas foram analisadas através de CCF (cromatografia em camada fina) e, de acordo com os resultados, essas frações foram reunidas em grupos para procedimentos adicionais de purificação.

A subfração 3-5, formou precipitado em forma de cristais brancos. Foi feita uma recristalização com metanol e o material com o código **TAFDD1**, 25,0mg, foi analisada através de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas



(CG-EM), com essas análises foi possível atestar que a amostra trata-se de uma mistura composta pelas substâncias **5**, **6**, **12**, **13** e **14**.

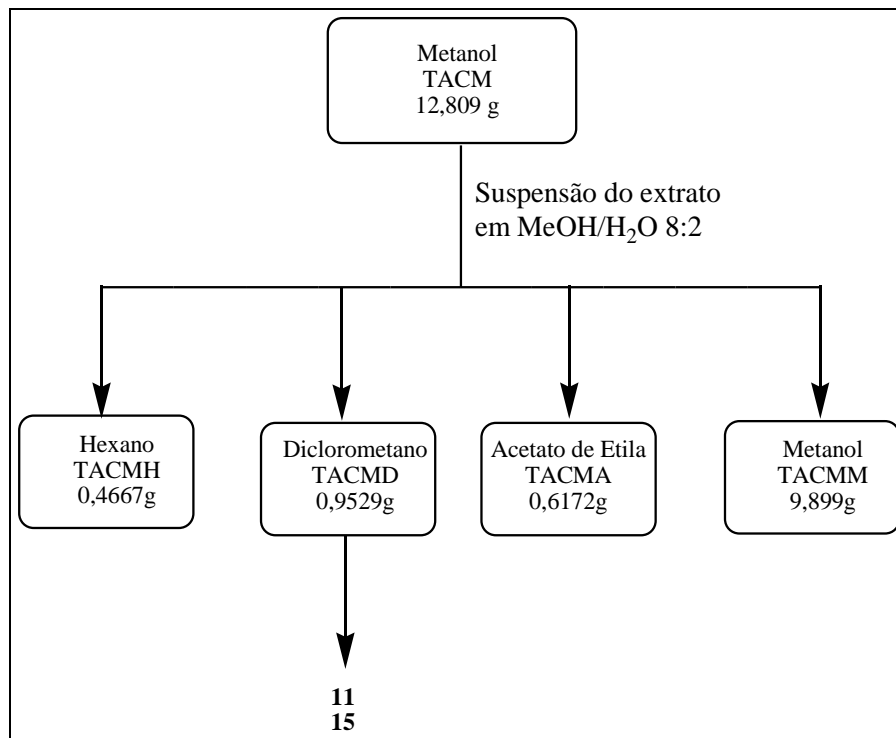


**Esquema. 2:** Fluxograma da cromatografia do extrato diclorometano (**TAFD**)

### 2.6.2. Extrato metanólico do caule de *Tetrapteryx acutifolia* (**TACM**)

Com 12,809g do extrato metanólico do caule de *Tetrapteryx acutifolia* (**TADM**) foi realizada partição líquido-líquido, no qual dissolveu-se o extrato em 100mL de solução metanol/água 8:2 e foi realizada a partição em um funil de separação com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano e acetato de etila) sendo recolhidas cada fração e efetuada a evaporação de seu respectivo solvente, obtendo as frações: Hexano (**TACMH**, 0,466g), diclorometano (**TACMD**, 0,953g), acetato de etila (**TACMA**, 0,617g) e o resíduo metanol/água (**TACMM**, 9,899). (**Esquema 3**).

Com a fração de diclorometano (**TACMD**) foi realizado cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluentes diclorometano, mistura dos solventes diclorometano e metanol, aumentando gradativamente a polaridade até metanol 100%, recolhendo-se 42 frações. As frações recolhidas foram analisadas através de CCF e, reunidas de acordo com os resultados observados, As frações 21-32 foram reunidas e foi realizada outra cromatografia em coluna de sílica, as subfrações as frações 5-7 forneceram um sólido branco solúvel em metanol que após recristalização forneceu a substância **11** (**TACMD 21-5.7**; 21mg). As frações 11 e 12 forneceram um precipitado em forma de cristais brancos que foram recristalização em metanol foi identificada a substância **15** (**TACMD 21-11.12**; 42mg),



**Esquema 3:** Partição líquido-líquido do extrato metanólico do caule (TACM).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

#### 3.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS de *Tetrapteryx acutifolia*

##### 3.2.1. Mistura de Substâncias 5, 6, 12, 13 e 14

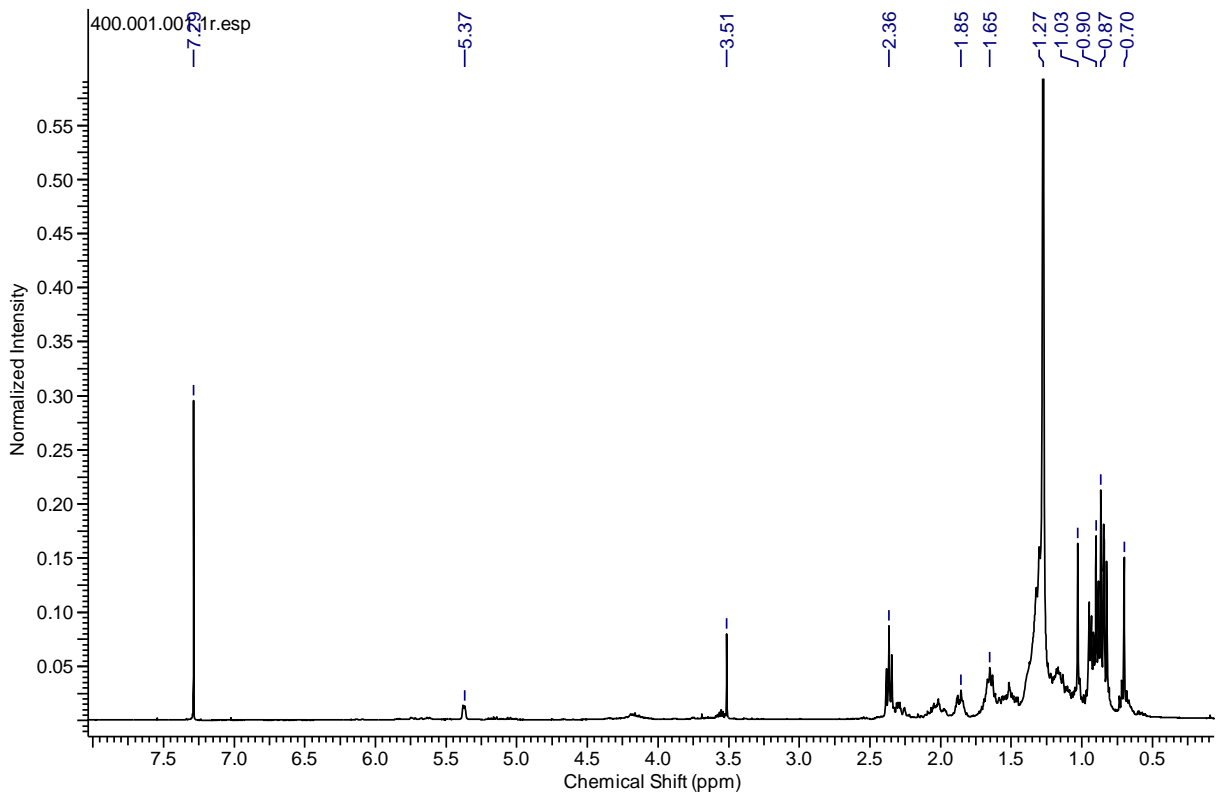
A amostra **TAFDD1**, mistura das substâncias **5, 6, 12, 13 e 14** (25,0mg), foi obtida sob a forma de cristais brancos, solúvel em clorofórmio, a partir do fracionamento do extrato de diclorometano das folhas de *Tetrapteryx acutifolia*. A proposta de elucidação estrutural dos constituintes da mistura foi realizada a partir da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e CG-EM.

Com a análise por RMN $^1\text{H}$  (**Figura 5**) e RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 6**) da amostra, observou-se a presença de uma mistura de esteróides  $\beta$ -sitosterol (**5**) e o estigmasterol (**6**) anteriormente isolados neste trabalho na espécie *J. wasshausseniana*. e de um éster. Os sinais típicos de esteróides comuns às plantas estão entre  $\delta_{\text{H}}$  0,65 e 1,86 correspondentes aos átomos de hidrogênio metílicos, multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,55 atribuído ao hidrogênio carbinólico H-3, um singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,38 atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e os dubletos de dubletos (*dd*) em  $\delta_{\text{H}}$  5,05 e 5,14 representantes dos hidrogênios H-22 e H-23 do estigmasterol. Os esteroides e os demais componentes da mistura foram possíveis de identificar através da análise por CG-EM. (**Figura 7**)

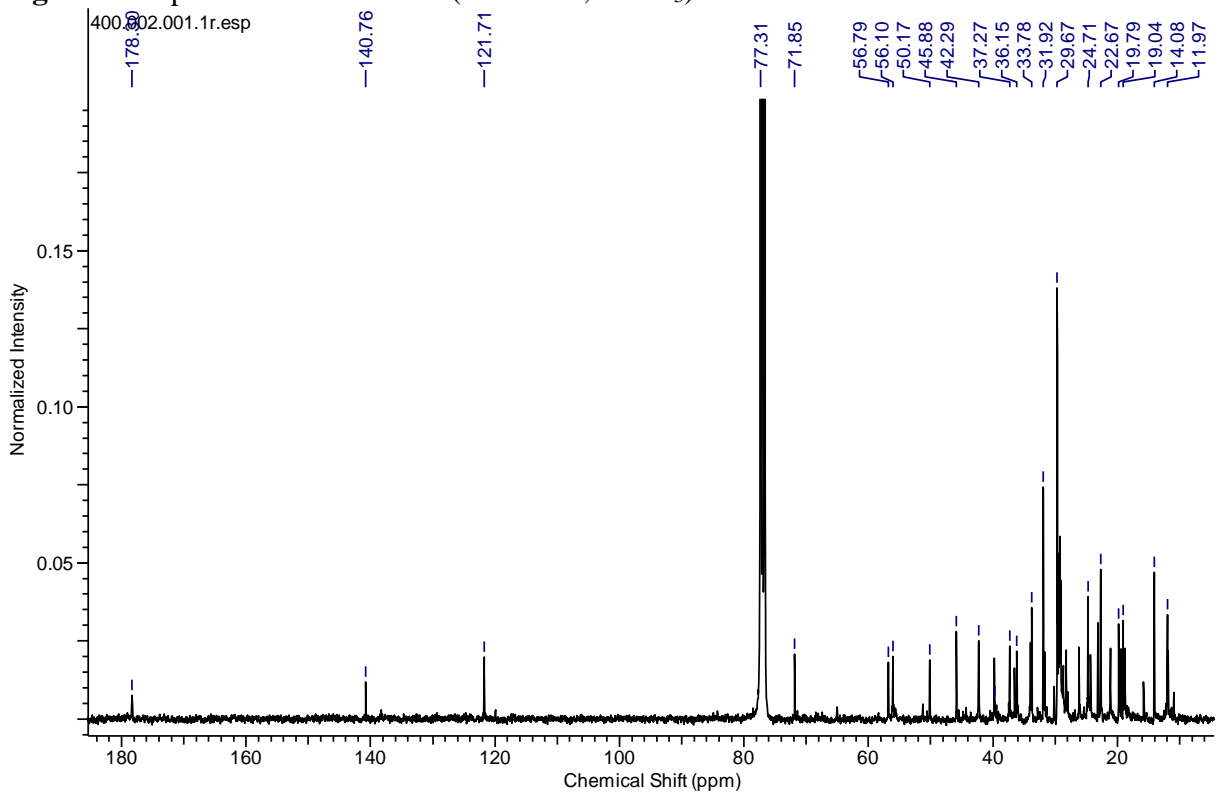
O espectro RMN $^{13}\text{C}$  revelou a presença de sinais de carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{CH}}$  121,80 e 140,90, que foram atribuídos aos carbonos C-5 e C-6, em  $\delta_{\text{CH}}$  138,29 e 129,47, correlacionados com os carbonos metínicos CH-22 e CH-23 do estigmasterol e em  $\delta_{\text{CH}}$  71,68 do carbono carbinólico CH-3.

Os sinais do RMN de C em  $\delta_{\text{CH}}$  32,33 corresponde a carbono  $\alpha$ -carbonila de éster e em  $\delta_{\text{CH}}$  76,89, substância **14**.

A análise por CG-EM confirmou a presença dos componentes na mistura através do cromatograma com seus respectivos tempos de retenção (**Figura 7**) e dos picos de fragmentações das substâncias na amostra. (**Figura 8**)



**Figura 5:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura.



**Figura 6:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura.

==== Analytical Line 1 =====

[GC-2010]

Column Oven Temp.: 150.0 °C  
Injection Temp.: 250.0 °C  
Injection Mode: Split  
Column Flow: 1.00 mL/min  
Oven Temp. Program  
Rate Temperature(°C) Hold Time(  
- 150.0 1.00  
10.00 290.0 40.00

[GCMS-QP2010 Plus]

IonSourceTemp :250.00 °C  
Interface Temp. :310.00 °C  
Solvent Cut Time :2.50 min

Peak#	R.Time	Area	Area%
1	6.958	2095826	1.68
2	7.842	579954	0.47
3	9.090	34290644	27.50
4	10.996	2278158	1.83
5	11.835	3921193	3.14
6	19.334	1441399	1.16
7	20.243	11740607	9.42
8	21.068	1797738	1.44
9	23.078	2455265	1.97
10	23.592	10874702	8.72
11	25.110	49735823	39.89
12	25.372	3474439	2.79
		124685748	100.00

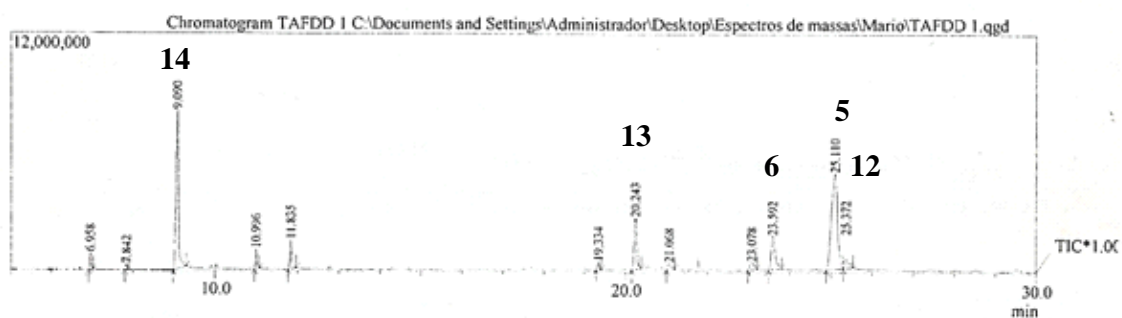


Figura 7: Cromatograma da mistura

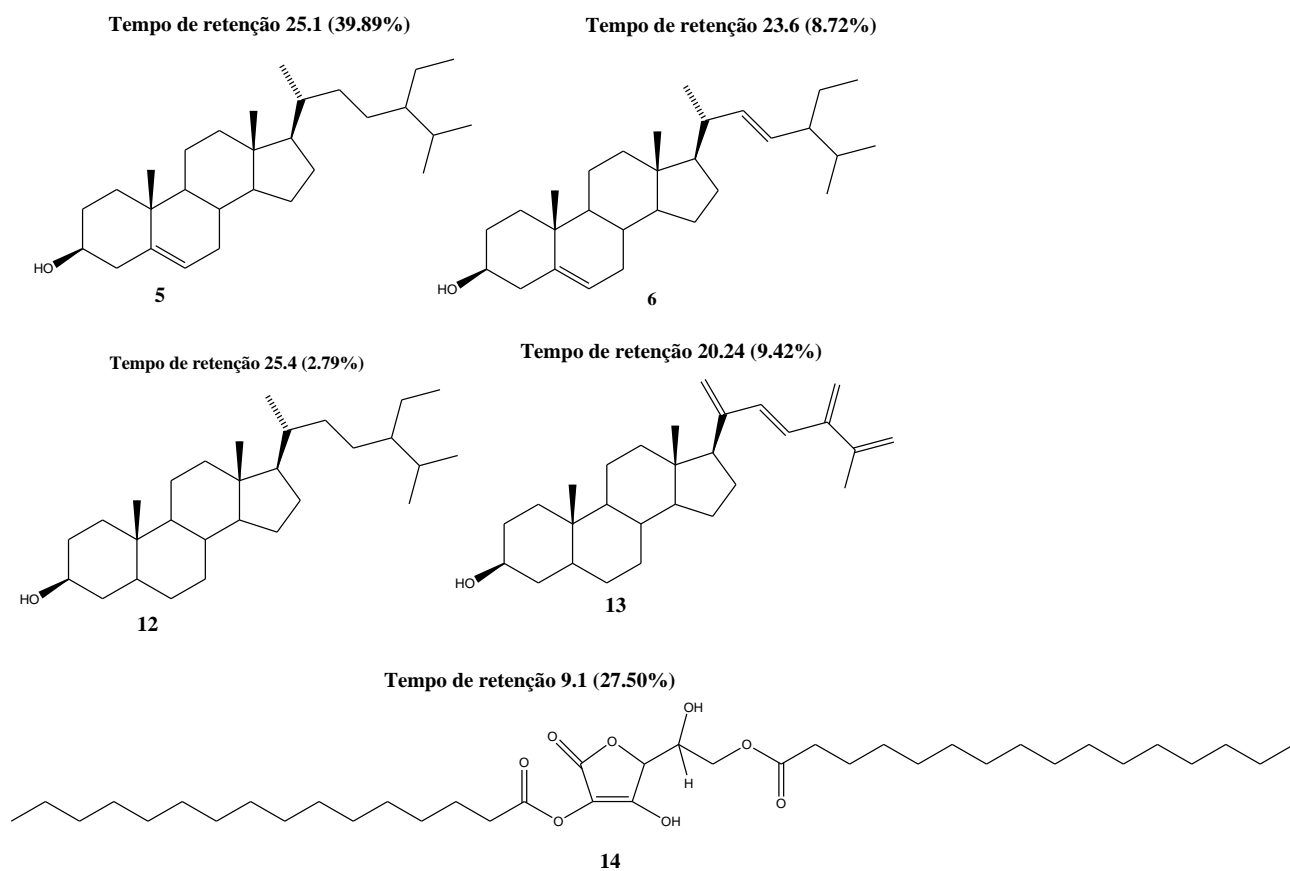
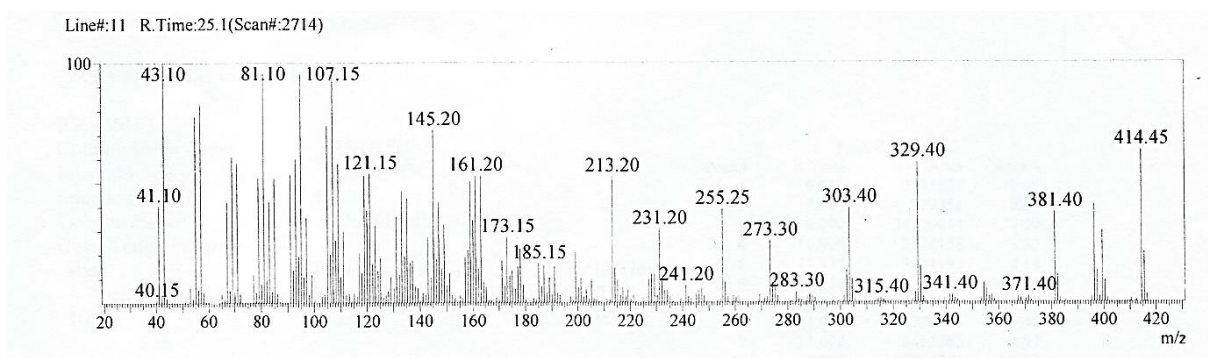


Figura. 8: Substâncias presentes na mistura

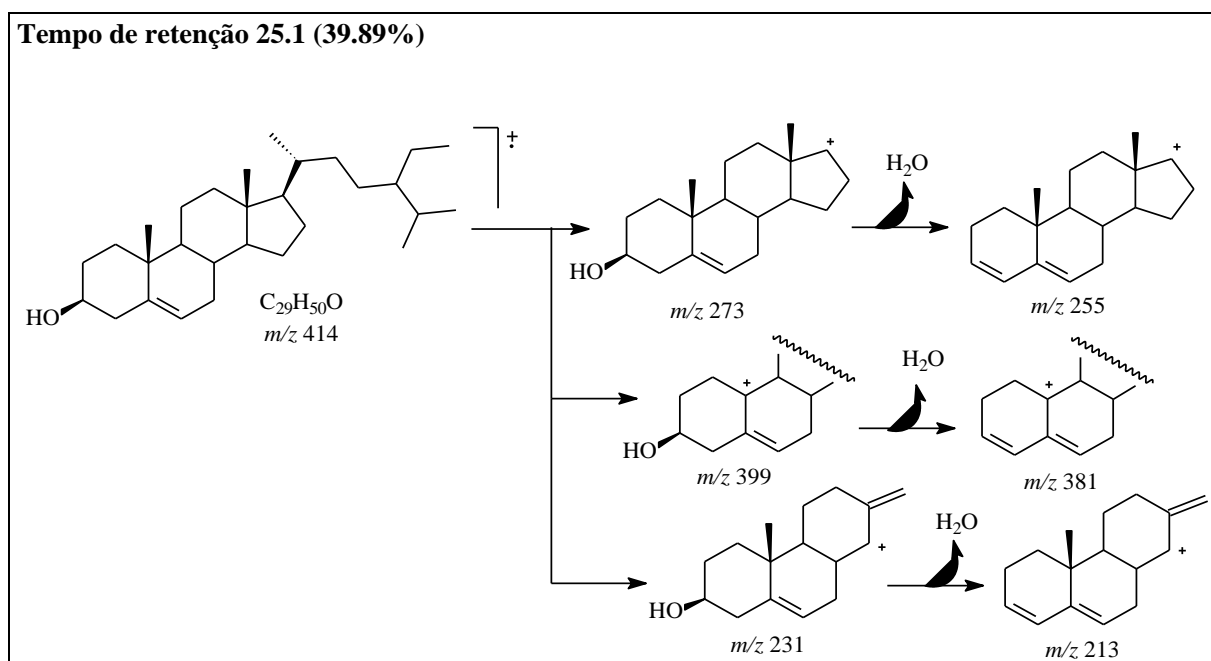
### 3.2.1.1. Substância 5:

De acordo com ion molecular  $m/z=414,45$  e os valores das fragmentações detectados pelo CG-EM (**Figura 9**), concluiu-se que a substância **5** ( $\beta$ -sitosterol) está presente na mistura.

O esquema abaixo (**Esquema 4**) mostra o tempo de retenção correspondente a substância e suas fragmentações.



**Figura 9:** Cromatograma de 5.

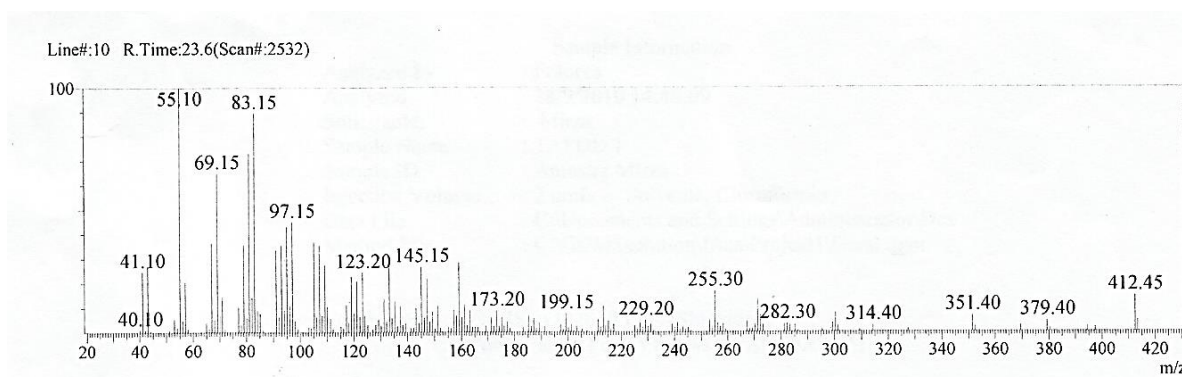


**Esquema 4:** Fragmentações de 5.

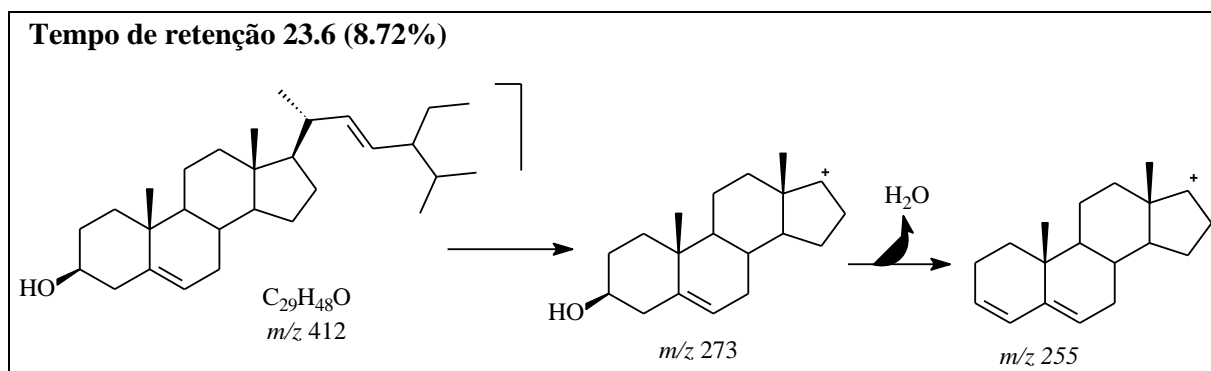
### 3.2.1.2. Substância 6:

De acordo com o ion molecular  $m/z=412,45$  e os valores das fragmentações detectados pelo CG-EM (**Figura 10**), concluiu-se que a substância **6 (estigmasterol)** está presente na mistura.

O **Esquema 5** mostra o tempo de retenção correspondente a substância e suas fragmentações.



**Figura 10:** Cromatograma de **6**

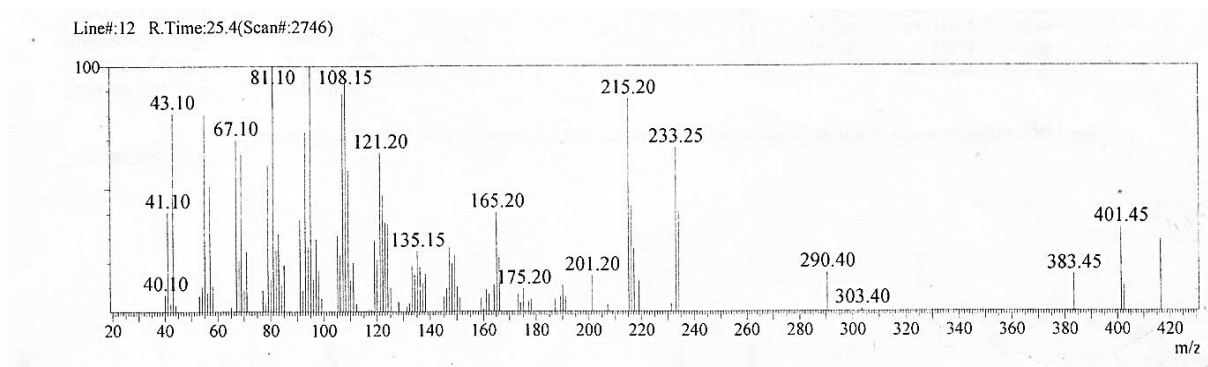


**Esquema 5:** Fragmentações de **6**.

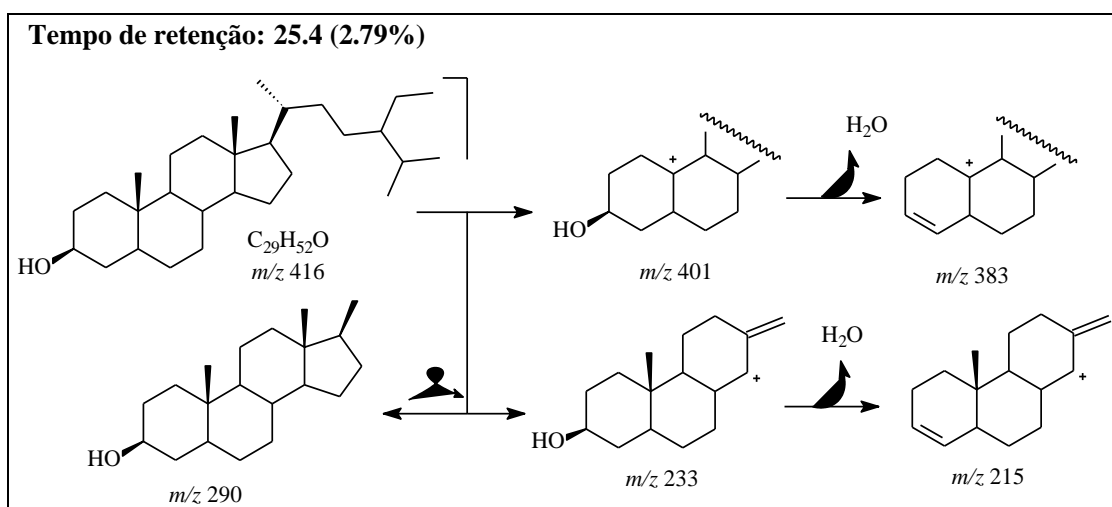
### 3.2.1.3. Substância 12:

De acordo com os valores das fragmentações detectados pelo CG-EM (**Figura 11**), concluiu-se que a substância **12 (5,6-diidro-sitesterol)** está presente na mistura.

O **Esquema 6** mostra o tempo de retenção correspondente a substância e suas fragmentações.



**Figura 11:** Cromatograma de **12**.

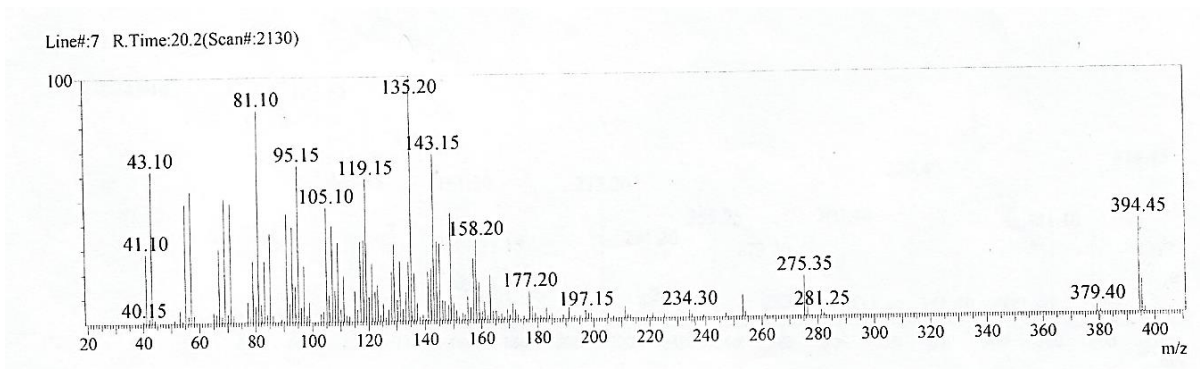


**Esquema 6:** Fragmentações de **12**

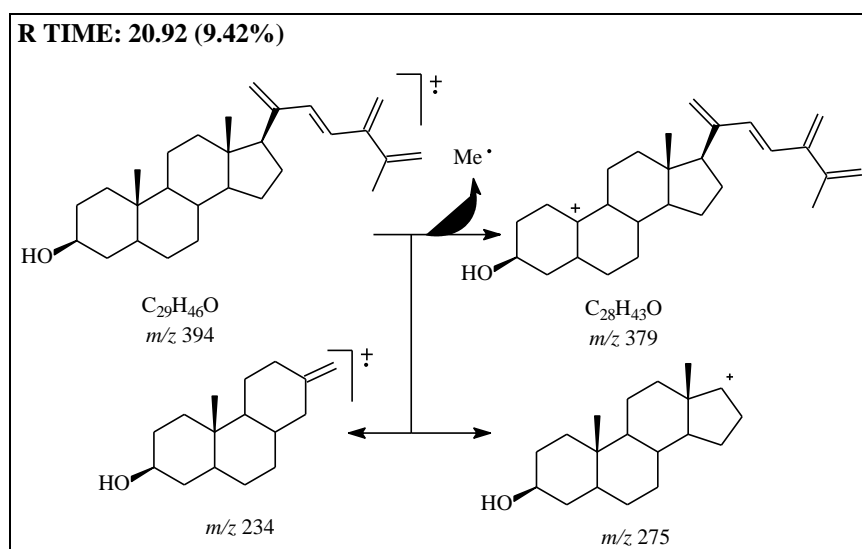
### 3.2.1.4. Substância 13:

De acordo com o pico do íon molecular  $m/z = 394,45$  e os valores das fragmentações detectados pelo CG-EM (**Figura 12**), concluiu-se a substância **13** (**hexadecahidro-10,13-dimetil-17-((E)-6-metil-5-metilenehepta-1,3,6-trien-2-il)-1H ciclopenta[a]fenantren-3-ol**) está presente na mistura. O **Esquema 7** mostra o tempo de retenção correspondente à substância e suas fragmentações.





**Figura. 12:** Cromatograma de 13.



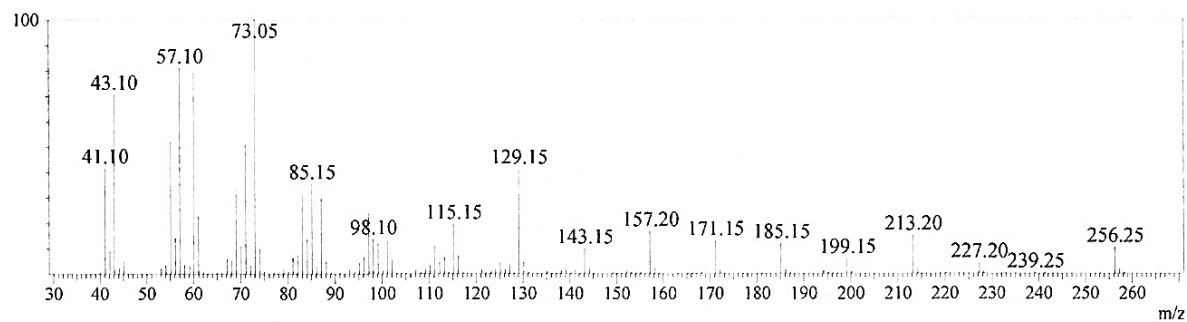
**Esquema 7:** Fragmentações de 13

### 3.2.1.5. Substância 14:

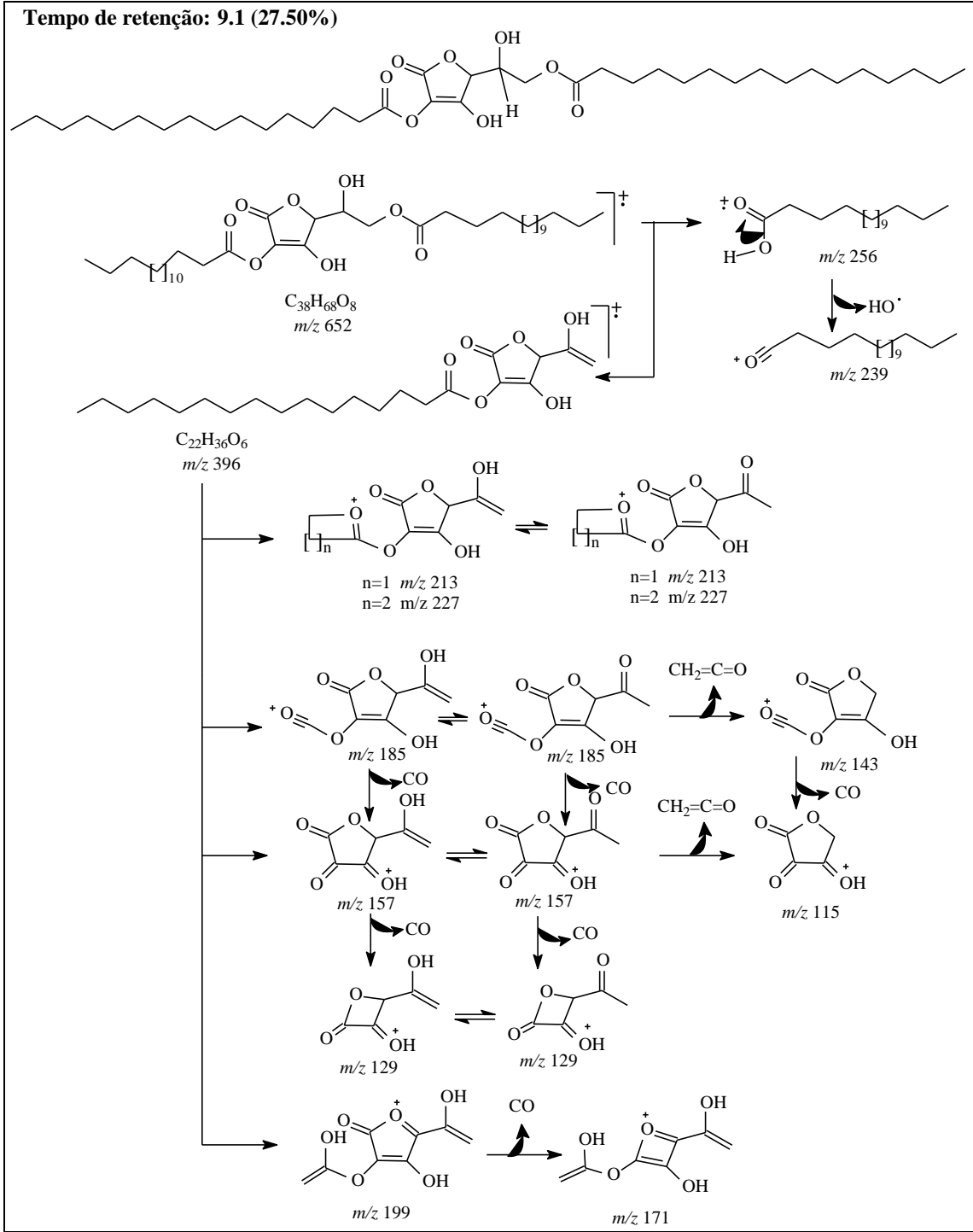
De acordo com os valores das fragmentações detectados pelo CG-EM (**Figura 13**), concluiu-se que o ácido ascórbico esterificado com o ácido palmítico nas hidroxilas 2 e 6, o **ácido ascórbico 2,6 dipalmitato (14)** está presente na mistura.

O esquema a seguir (**Esquema 8**) mostra o tempo de retenção correspondente a substância e suas fragmentações.

Line#:3 R.Time:9.1(Scan#:792)



**Figura 13:** Cromatograma de **14**



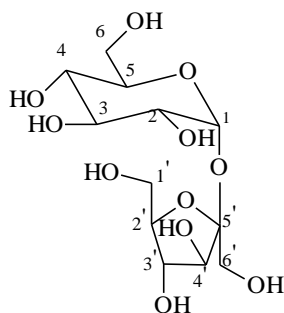
**Esquema. 8:** Fragmentações de **14**

### 3.3. Substância 11

A amostra **TACMD 21-5.7**, substância **11** (21mg), foi obtida sob a forma de cristais brancos, solúvel em metanol, a partir do fracionamento do extrato de metanol do caule de *Tetrapteryx acutifolia*. A proposta de elucidação estrutural de **TACMD 21-5.7**

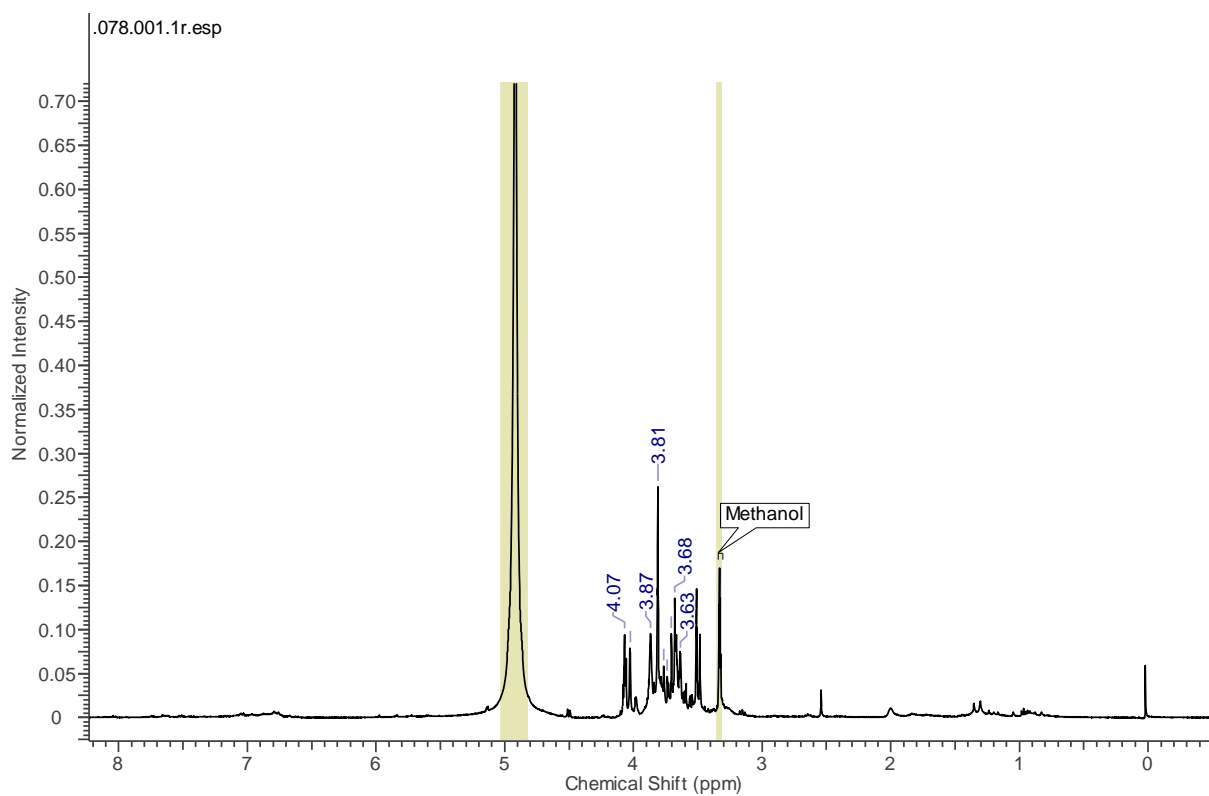
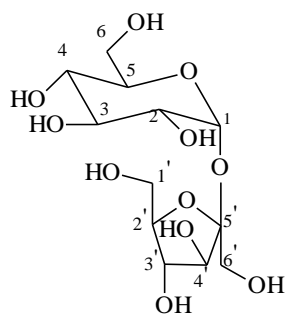
foi realizada a partir da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados descritos na literatura (MOCCELINI et. al., 2009)

A identificação da substância **11** foi realizada com base nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 14**) e DEPTQ (**Figura 15**) e comparação de seus dados espectroscópicos com os registrados na literatura (**Tabela 4**). (MOCCELINI et. al., 2009). Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$ , verificou-se sinais na região de açúcar entre  $\delta_{\text{H}}$  3,2 e 4,14, além do sinal atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  5,2 (*d*, *J* 3,8 Hz). No DEPTQ, observam-se 12 sinais de carbono, sendo três sinais atribuídos aos carbonos metilênicos  $\delta_{\text{CH}_2}$  62,05 (C-6), 60,79 (C-1') e 62,61 (C-6') e um quaternário em  $\delta_{\text{C}}$  103,91 (C-2'), que é compatível com a estrutura do dissacarídeo sacarose ou  $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo (sacarose).

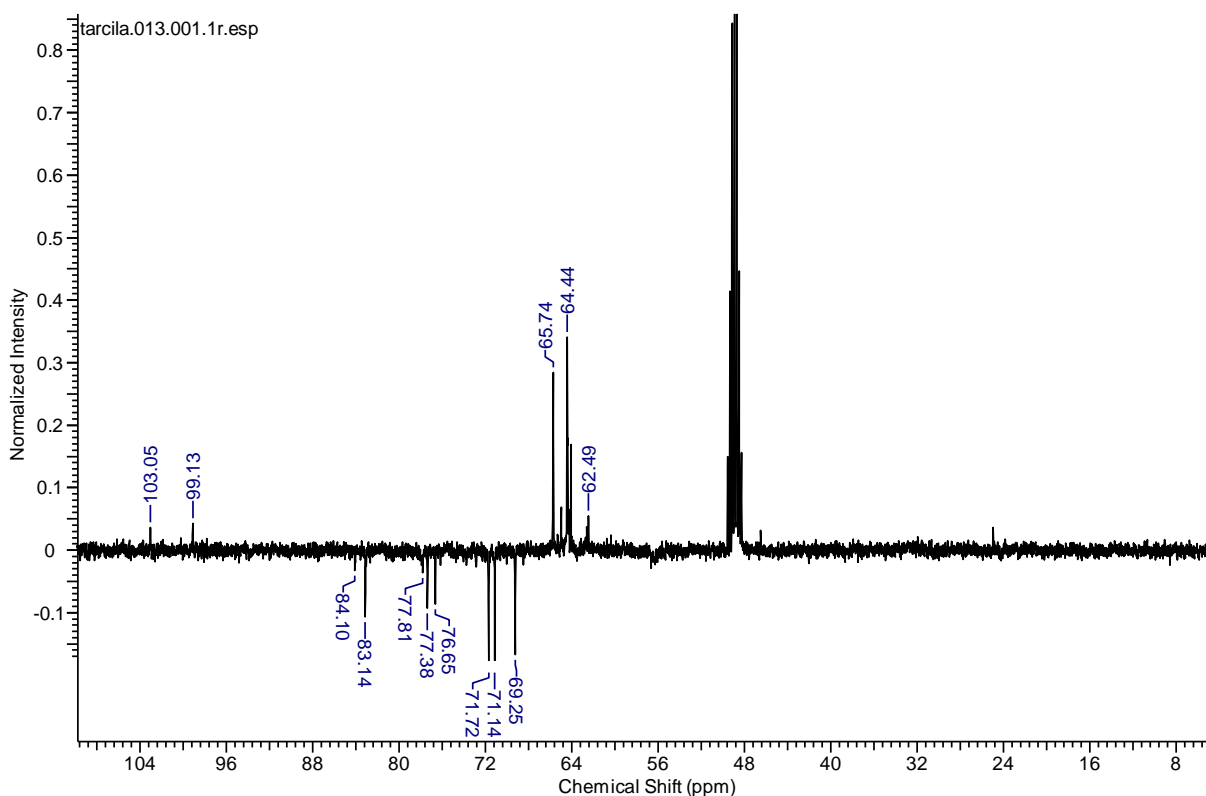


**Tabela 4:** Deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  da sacarose (MOCCELINI et. al., 2009) e de **11**

	SACAROSE (MOCCELINI et. al., 2009)		<b>11</b>	
	C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
C	2'	103,7		103,91
CH	1	92,2	3,86	94,10
	2	72,5	3,81	71,72
	3	74,1	4,07	77,38
	4	71,2	3,87	71,14
	5	72,7	4,03	76,65
	3'	76,5	3,76	77,81
	4'	69,4	3,87	69,25
	5'	81,05	3,63	83,14
CH <sub>2</sub>	6	61,5	3,68	64,44
	1'	60,03	3,74	64,09
	6'	62,5	3,70 3,64	65,74



**Figura. 14:** RMN de Hidrogênio (400MHz, MeOD) de **11**



**Figura 15:** RMN  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ, 400MHz,  $\text{MeOD}_4$ ) de **11**.

### 3.4. Substância 15

A amostra **TACMD 21(11-12)**, substância **15** (42mg), foi obtida sob a forma de cristais brancos, solúvel em metanol, a partir do fracionamento do extrato metanólico do caule de *Tetrapteryx acutifolia*. A elucidação estrutural de TACMD 21(11-12) foi realizada a partir da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D), EM, CD, preparação do derivado acetilado e comparação com dados descritos na literatura (SUKSAMRARN *et. al.*, 2002).

Analisando o espectro de IV (**Figura 18**), revelou absorções ( $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$ ) de estiramento em  $3402,3 \text{ cm}^{-1}(\nu_{\text{O-H}})$ ; em  $2962,56 \text{ cm}^{-1}(\nu_{\text{C-H}})$  e  $2873,84(\nu_{\text{C-H}})$ ; banda de estiramento de carbonila conjugada ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) em  $1639,44 \text{ cm}^{-1}$ ; banda de deformação angular de ligação  $\text{CH}_2$  em  $1461,99 \text{ cm}^{-1}(\nu_{\text{C-H}})$  e bandas de estiramento de ligação C-O em  $1058,89 \text{ cm}^{-1}(\nu_{\text{C-O}})$ .

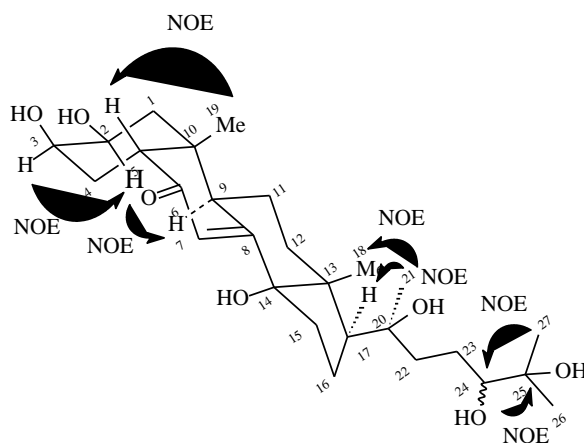
O espectro de RMN $^1\text{H}$  (**Figura 19**) apresentou cinco singletos com deslocamentos químicos característicos de núcleos de hidrogênios metílicos ( $\delta_{\text{H}}$  0,88; 0,98; 1,17; 1,20;

1,30) os sinais em  $\delta_H$  3,86 e 3,99 foram atribuídos aos hidrogênios carbinólicos H-2 e H-3, um dubleto em  $\delta_H$  5,84 atribuído ao hidrogênio olefínico H-7.

O espectro DEPTQ (**Figuras 20 e 21**) apresentou sinais para 27 núcleos de carbonos levando-se a sugerir a estrutura de um esteroide. Dentre esses núcleos é possível destacar a presença de dois carbonos olefinicos em  $\delta_C$  120,70 e 166,96; quatro carbinolicos em  $\delta_C$  67,30 (CH-2), 67,13 (CH-3), 84,26 (C-14), 74,53 (C-20), 78,81 (CH-24) e 72,62 (C-25) e presença de uma carbonila com deslocamento característico de um grupo cetona  $\delta_C$  205,46.

Assinaladas as correlações entre os núcleos de hidrogênio e carbono a uma ligação através do experimento de HSQC (**Figuras 23-25**) passou-se a analisar o mapa de contorno HMBC (**Figuras 26-29**) no qual são observadas as correlações:  $^2J$  H-5 ( $\delta_H$  50,37) e C-6 ( $\delta_C$  205,43);  $^2J$  H-9 ( $\delta_H$  3,16) e C-8 ( $\delta_C$  166,96);  $^2J$  3H-26 ( $\delta_H$  23,57)/3H-27 ( $\delta_H$  24,36) e CH-25 ( $\delta_C$  72,62);  $^3J$  3H-19 ( $\delta_H$  23,03) e CH-5 ( $\delta_C$  50,37). O deslocamento inequívoco dos demais hidrogênios foi efetuado através das correlações homonucleares observados no experimento COSY (**Figura 22**) dos quais podemos destacar H-1 ( $\delta_H$  1,85) e H-2 ( $\delta_H$  3,86); 2H-4( $\delta_H$  1,75) e  $\delta_H$  H-5 ( $\delta_H$  2,39); H-16 ( $\delta_H$  1,95) e H-17 2,32); H-23 ( $\delta_H$  1,72) e H-24 ( $\delta_H$  3,22).

Através das correlações observadas no espectro de RMN  $^1H$  NOESY (**Figuras 16 e 30**) foi possível estabelecer a configuração relativa da molécula. Neste experimento é observado correlação espacial entre os hidrogênios H-3 e H-2 além do efeito NOE entre H-2 e o H-9 levando-nos a conclusão de que os grupos hidroxilas estão em posição *cis*. Correlação entre a metila-19 e o H-5 indica junção *cis* entre os anéis A/B. Ainda são observados Noe entre metila-21 com H-20 e metila -18 assim como metila-27 e H-24 como também H-24 e metila-26. (**Figura 16**).



**Figura 16:** Interações espaciais observadas no espectro de NOESY da substância **15**

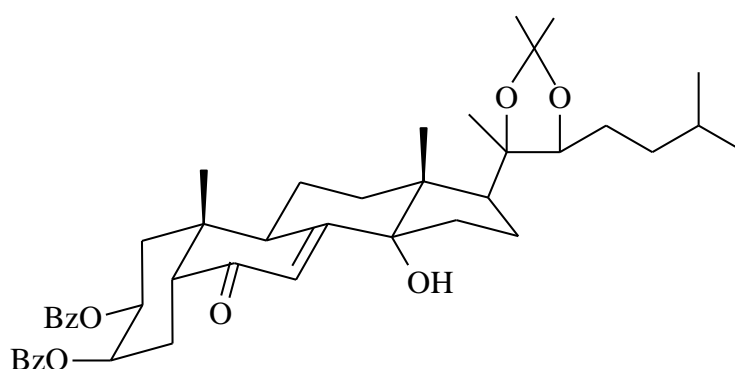
O espectro de massas de alta resolução (**Figuras 29 e 30**) apresenta pico em  $m/z$  983,5852, o qual, ao ser selecionado para nova fragmentação (EM-EM) gera o pico em  $m/z$  503,2879. O pico  $m/z$  983,5852 corresponde a aduto formado por duas unidades da molécula com o ion  $\text{Na}^+$ . Ao ser refragmentado apresenta o pico íon *quase molar*  $[\text{M}+\text{Na}^+]$  em  $m/z$  503,2879 compatível com formula molecular  $(\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NaO}_7, \text{cal. } m/z$  503,2985). O fragmento em  $m/z$  445,2881 corresponde a clivagem entre C-24 e C-25 levando a confirmação da posição de um grupo hidroxila. Os demais grupos hidroxilícos tiveram suas posições confirmadas através da preparação do derivado acetilado (**15A**) deste ecdisteroide **15** (item 4.4, a seguir).

A **tabela 5** apresenta os valores de deslocamento químico de **15**, comparados com os epímeros registrados na literatura isolada de *Vitex scabra* (SUKSAMRARN *et. al.*, 2002),

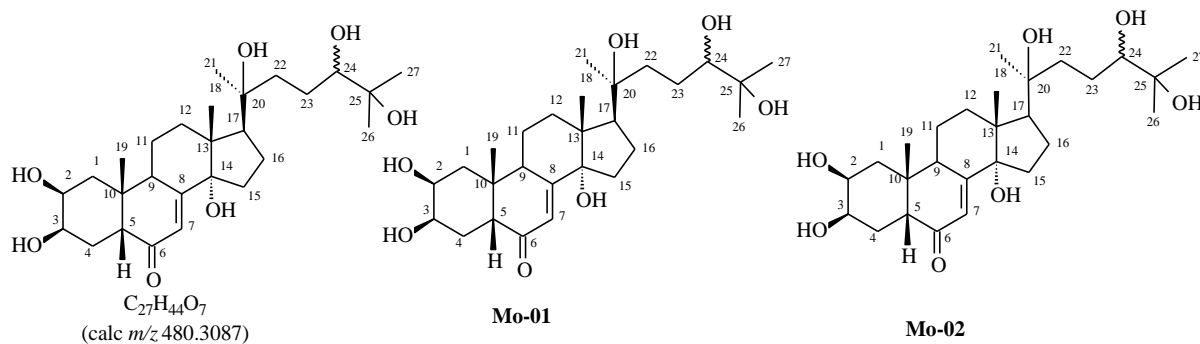
A análise do espectro de Dicroísmo Circular (CD) (**Figura 31**) e comparação com dados descritos na literatura para análogos estruturais (HARADA and NAKANISHI, 1969) permitiu fazer a proposta da estereoquímica absoluta de **15**. A curva de DC do padrão usado nesta análise, Ponasterona A 20,22-acetonideo-2,3-dibenzoato (**Figura 17**). apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 327 (+1,8), 248 (-3,9), 235 (-14,5) e 218 (+15,9) em etanol (HARADA and NAKANISHI, 1969) A curva de DC de **15** apresentou  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\Delta\epsilon$ ): 325 (+15), 250 (-35), 225 (+20).  $[[\theta]_{325} = + 49.500, [\theta]_{250} = - 115.500$  e  $[\theta]_{225} = +66.000$  (200 $\mu\text{L}$ , metanol)]. Considerando a principal absorção da enona em torno de 250 nm com EC negativo, pode-se considerar este direcionamento quiral para **15**, mantendo a mesma



configuração absoluta dos centros assimétricos ligados a esse cromóforo. Sendo assim tendo a configuração relativa, conforme representação anterior, **Figura 16**, pode-se definir a configuração absoluta de **15** como: 2*S*,3*R*,5*R*,9*R*,10*R*,13*R*,14*S*,17*S*,20*S*-2,3,14,20,24,25-hexahidroxicolest-7-en-6-ona (Pinatasterona), isolada anteriormente de *Vitex pinnata* (SUKSAMRARN AND SOMMECHAI, 1993), *Trillium tschonoskii* (ZHANG *et. al.*, 2013), *Paris polyphylla* (NEGI *et. al.*, 2014), *Vitex leptobotrys* (TRINH *et. al.*, 1999), *Vitex pinnata* (SUKSAMRARN *et. al.*, 1993) e *Vitex scabra* (SUKSAMRARN *et. al.*, 2002).



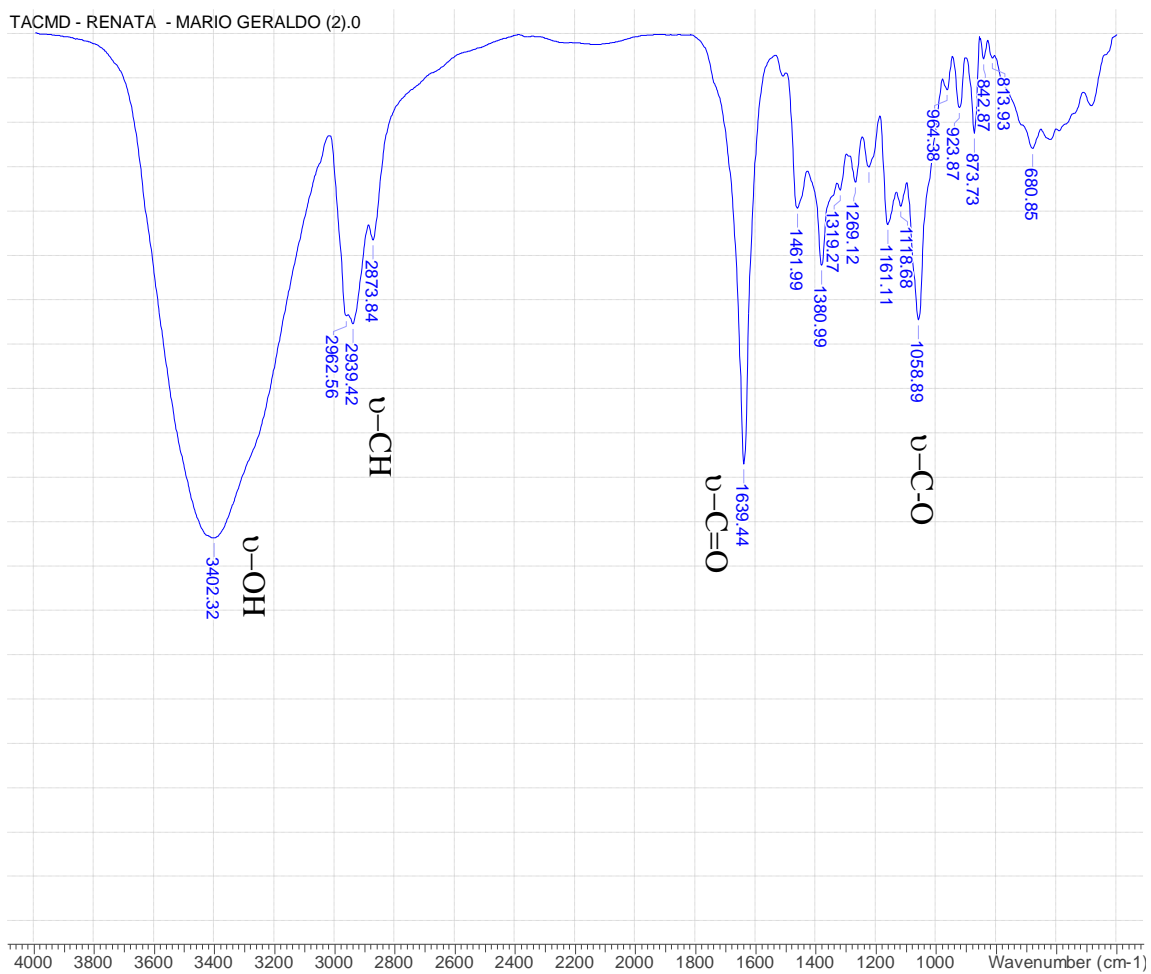
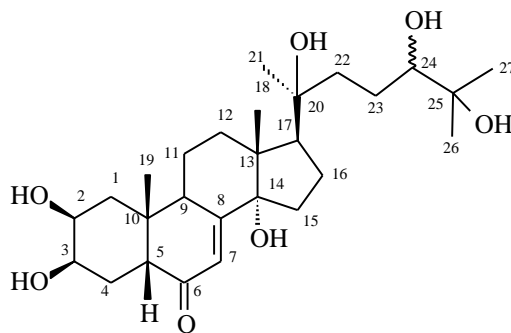
**Figura 17:** Ponasterona A 20,22-acetonideo-2,3-dibenzoato



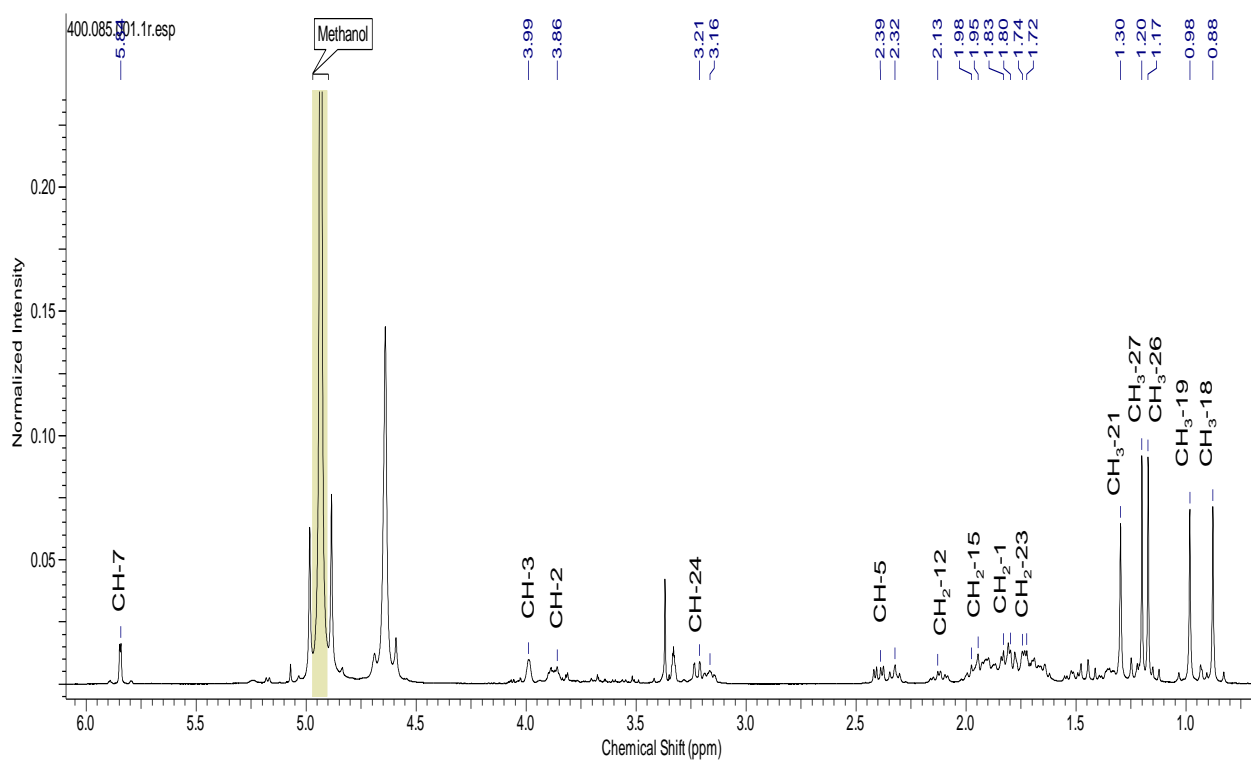
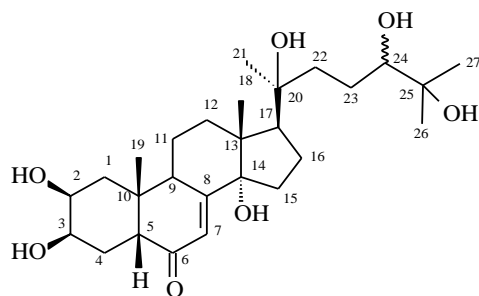
**Tabela 5:** Deslocamentos químicos de **15** em comparação com **Mo-01**(SUKSAMRARN *et. al.*, 1995) e **Mo-02** (SUKSAMRARN *et. al.*, 2002).

	TACMD-21(11-12), em MeOH- $d_4$				Mo-01, em Py- $d_5$		Mo-02, em Py- $d_5$	
	HSQC		HMBC		$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$				
<b>C</b>								
6	205.43	-	H-5		203.6	-	203.5	-
8	166.96	-	H-9		166.3	-	166.3	-
10	37.87	-	H-1b; H-5; 3H-19	2H-4	38.5	-	38.8	-
13	46.71	-	H-12a; H-17; 3H-18		47.4	-	47.4	-
14	84.26	-		H-7; 3H-18	84.3	-	84.3	-
20	74.53	-	3H-21		74.4	-	74.2	-
25	72.62	-	H-24; 3H-26; 3H-27		72.7	-	72.7	-
<b>CH</b>								
2	67.30	3.86 (dt, 11.3)	H-1b	2H-4	68.0	4.15 (m)	68.0	4.19 (m)
3	67.13	3.99 (sl)	2H-4	H-1b	67.9	4.23 (br s)	67.9	4.25 (br s)
5	50.37	2.39 (dd, 13.3, 4.6)	2H-4	H-3; H-7; 3H-19	51.3	2.96 (dd, 13.1, 3.6)	51.2	3.04 (dd, 13.0, 4.0)
7	120.70	5.84 (d, 2.3)			121.6	6.19 (d, 2.1)	121.5	6.26 (d, 2.5)
9	33.66	3.16 (td, 8.2)		H-1b; H-5; H-7; 3H-19	34.2	3.56 (m)	34.2	3.61 (m)

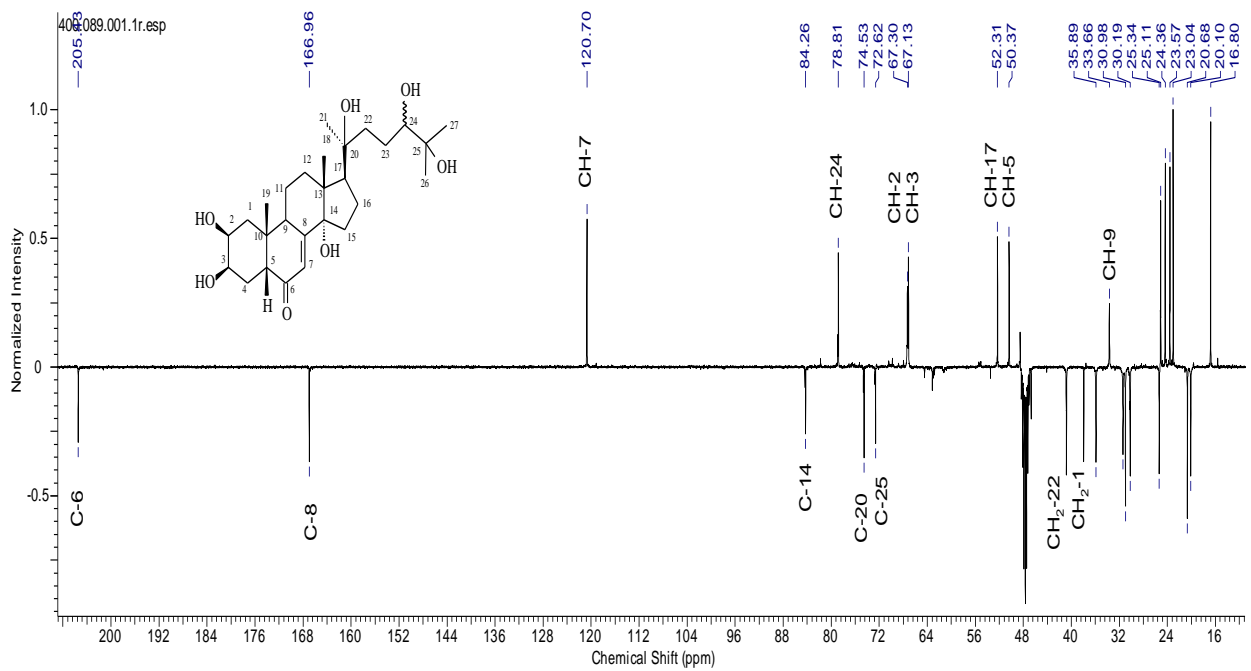
17	52.30	2.32 (t, 10.3)		3H-18; 3H-21	53.5	2.90 (t, 9.3)	53.6	2.93 (t, 9.0)
24	78.81	3.22 (d, 10.3)		3H-26; 3H-27	79.9	3.76 (br d, 8.8)	79.8	3.77 (br d, 8.5)
<b>CH<sub>2</sub></b>								
1	35.95	1.85, 1.44 (t, 12.8)		H-5; 3H- 19	37.7		37.6	
4	31.39	1.75	H-5		32.3		32.3	
11	20.16	1.85, 1.75			20.9		20.9	
12	30.98	2.13 (td, 14.4, 4.4) 1.90		3H-18	31.7		31.7	
15	30.19	1.98, 1.68			31.4		31.4	
16	20.67	1.95			21.8		21.9	
22	40.81	1.80, 1.52 (td)		H-24; 3H-21	42.6		42.3	
23	25.34	1.72, 1.35			26.8		26.6	
<b>CH<sub>3</sub></b>								
18	1680	0.88 (s)		H-17	17.8	1.08 (s)	17.8	1.17 (s)
19	23.03	0.98 (s)		H-5	24.2	1.00 (s)	24.3	1.09 (s)
21	25.34	1.30 (s)			26.8	1.55 (s)	27.0	1.61 (s)
26	23.57	1.17 (s)		3H-27	25.9	1.42 (s)	25.9	1.47 (s)
27	24.36	1.20 (s)		3H-26	25.7	1.46 (s)	25.8	1.51 (s)



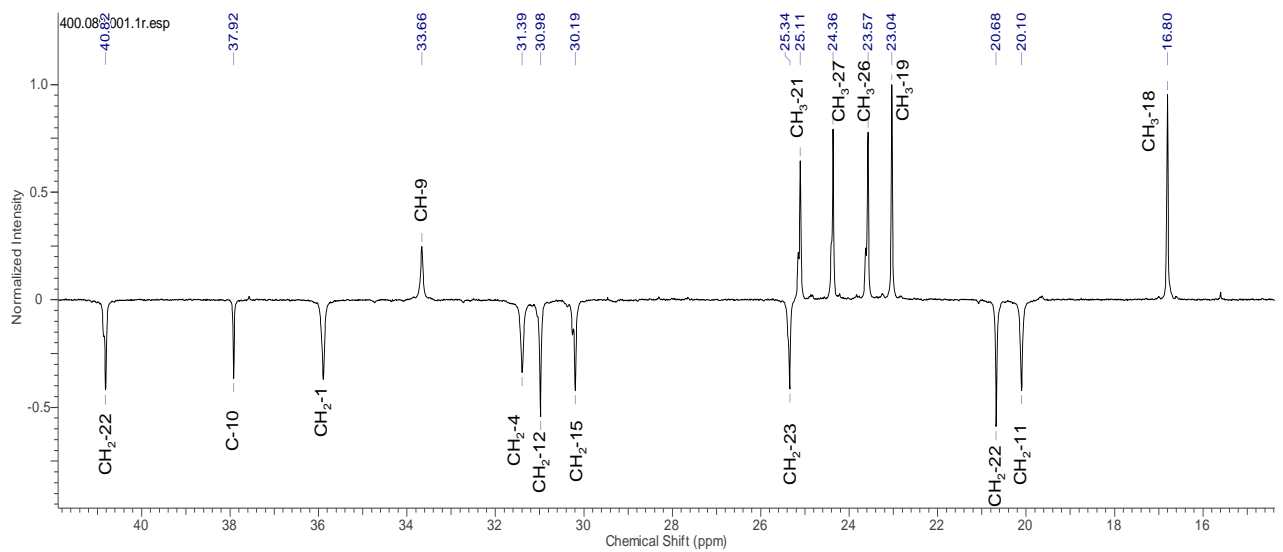
**Figura 18:** Espectro de IV de 15.



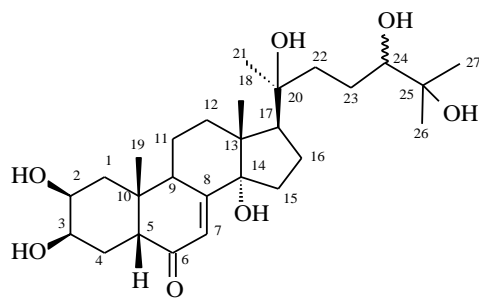
**Figura 19:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **15** (400MHz, MeOD)



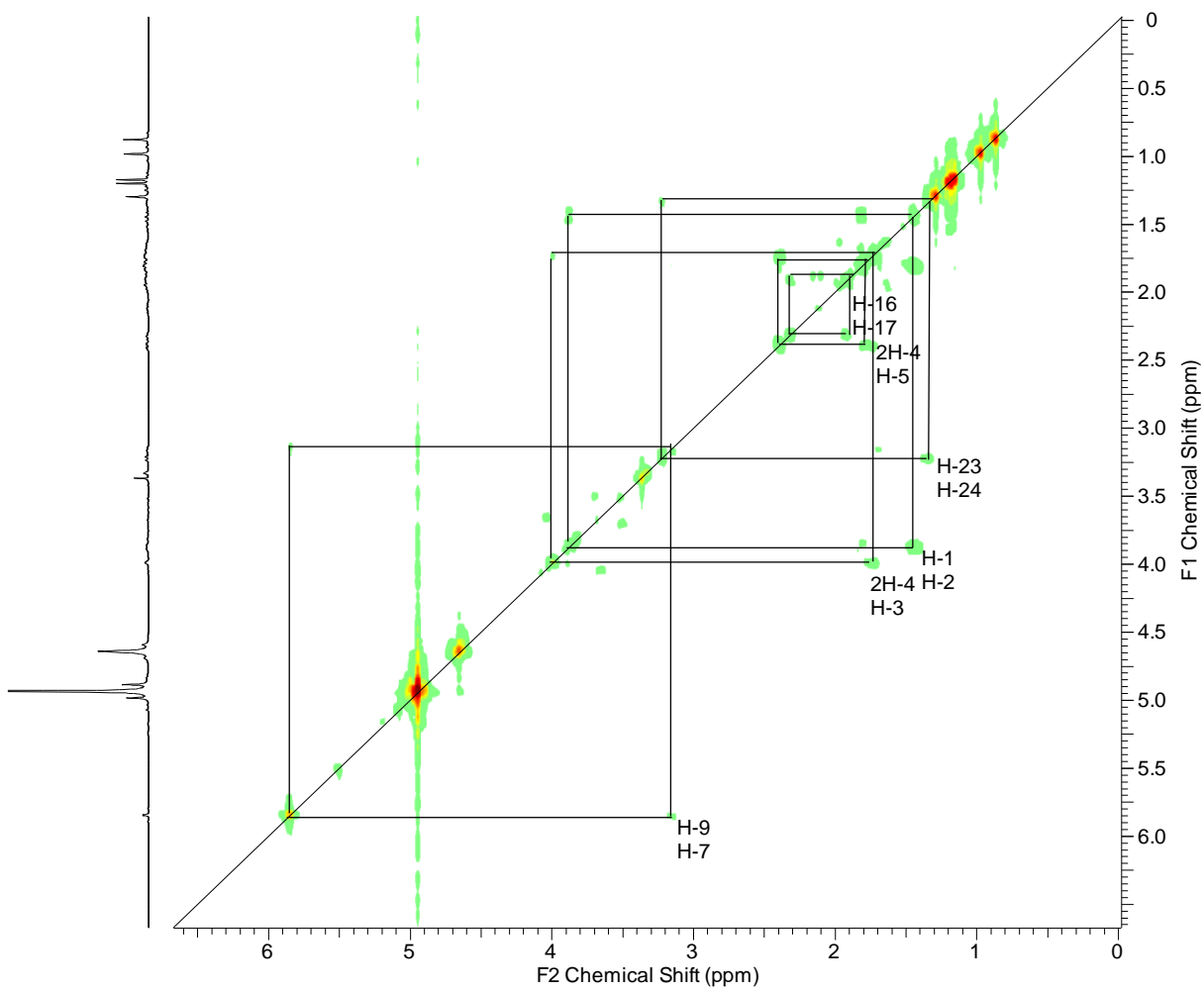
**Figura 20:** RMN DEPTQ (125 MHz, MeOD) de 15



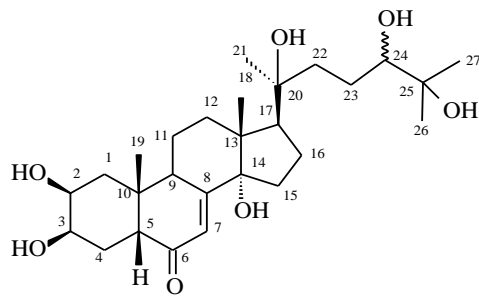
**Figura 21:** Expansão do RMN DEPTQ (125 MHz, MeOD) de 15



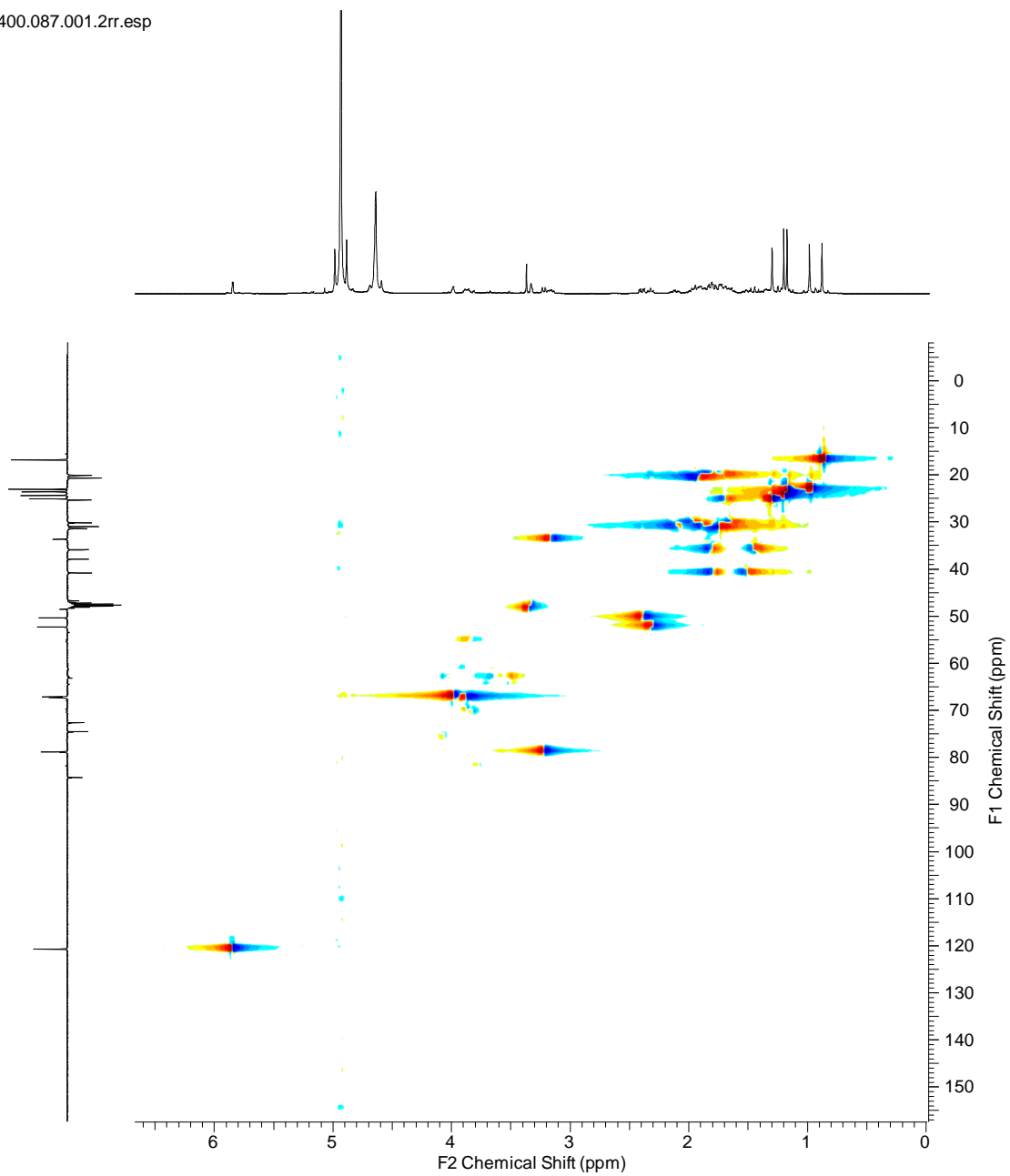
400.086.001.2rr.esp



**Figura 22:** Espectro de COSY (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **15**.

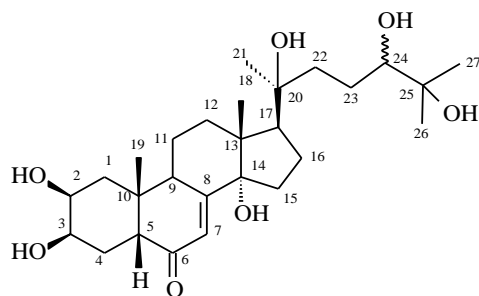


400.087.001.2rr.esp

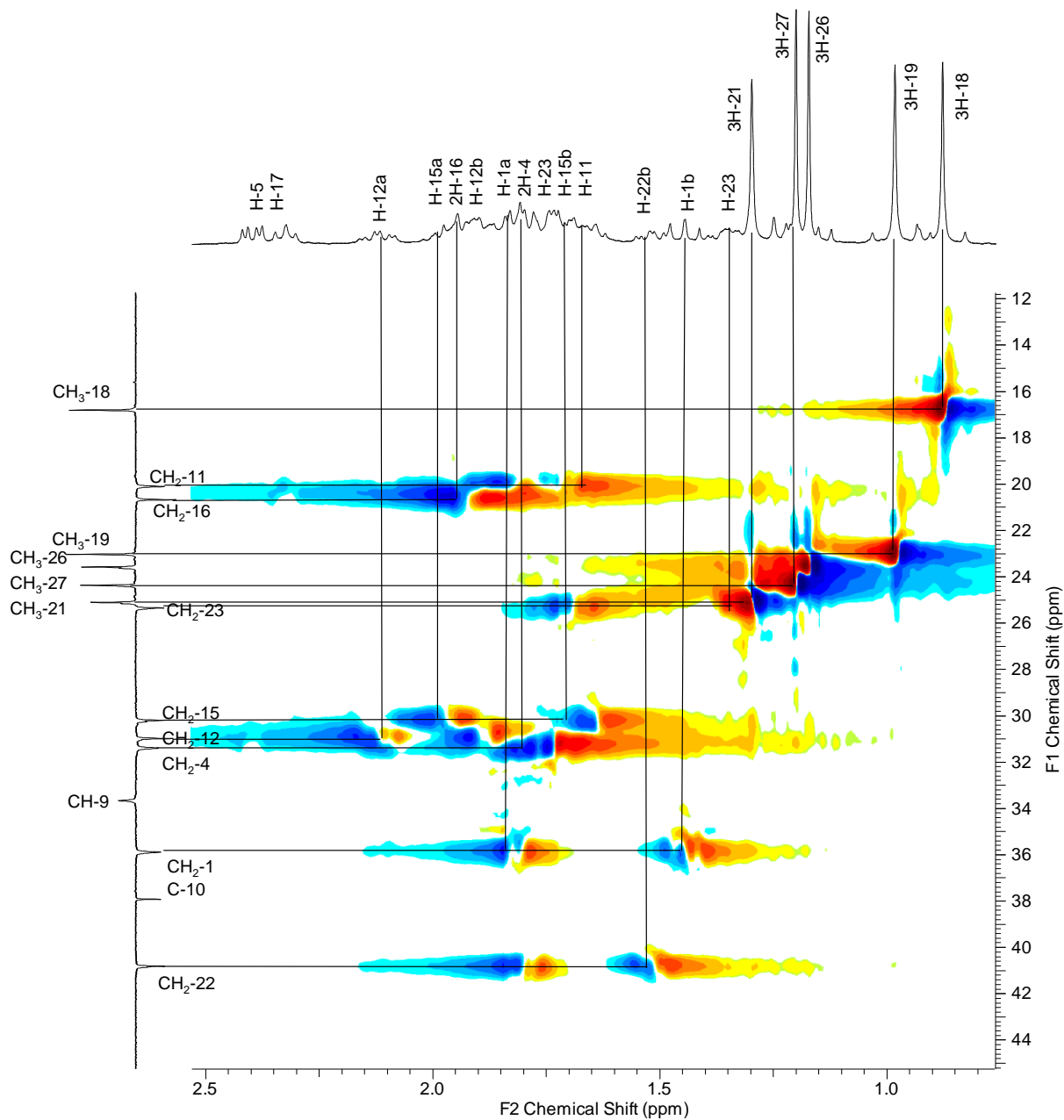


**Figura. 23:** Espectro HSQC (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **15**.

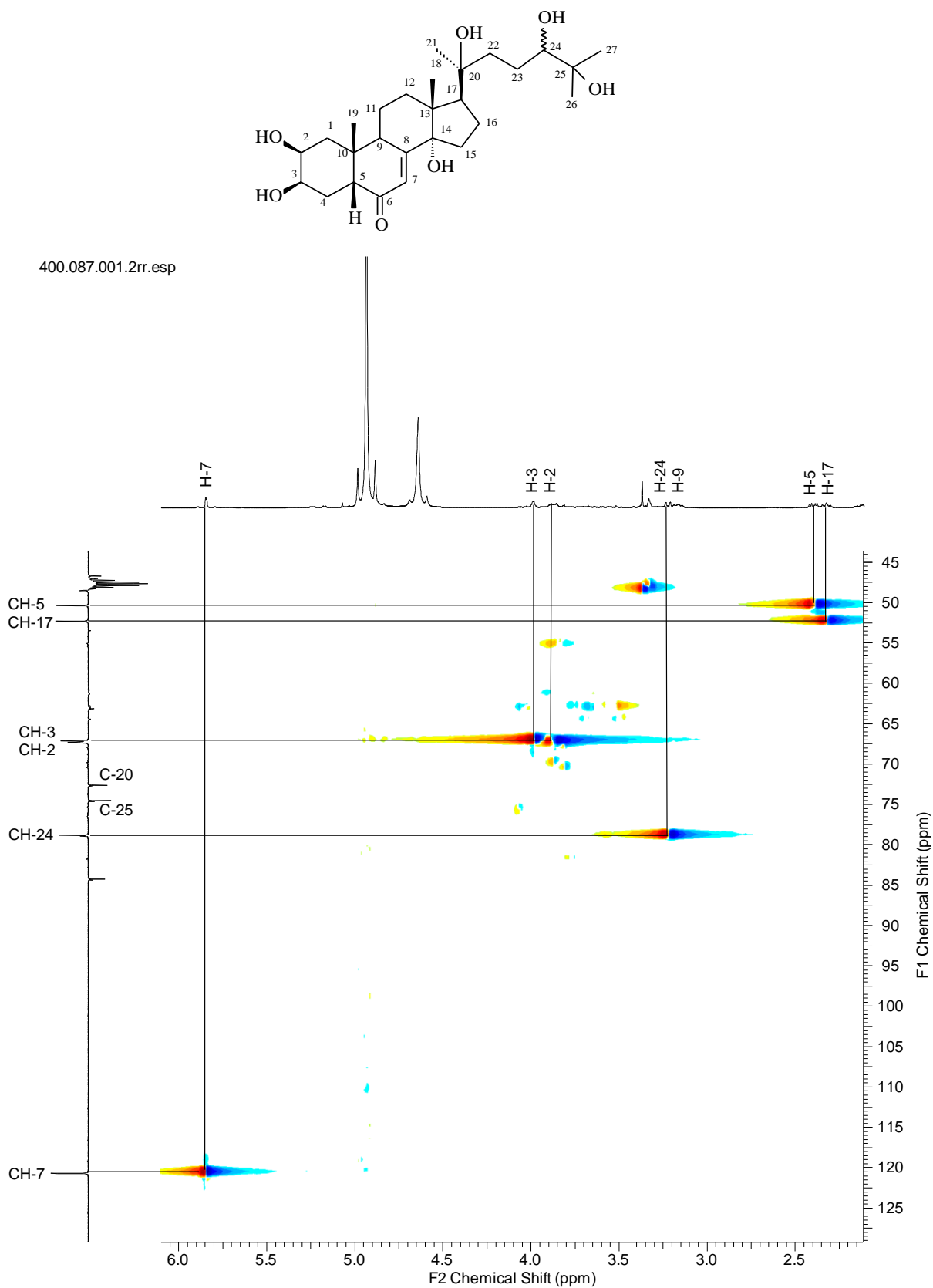




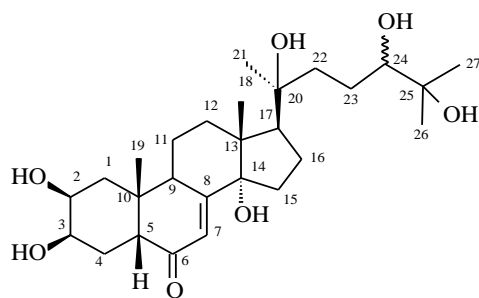
400.087.001.2rr.esp



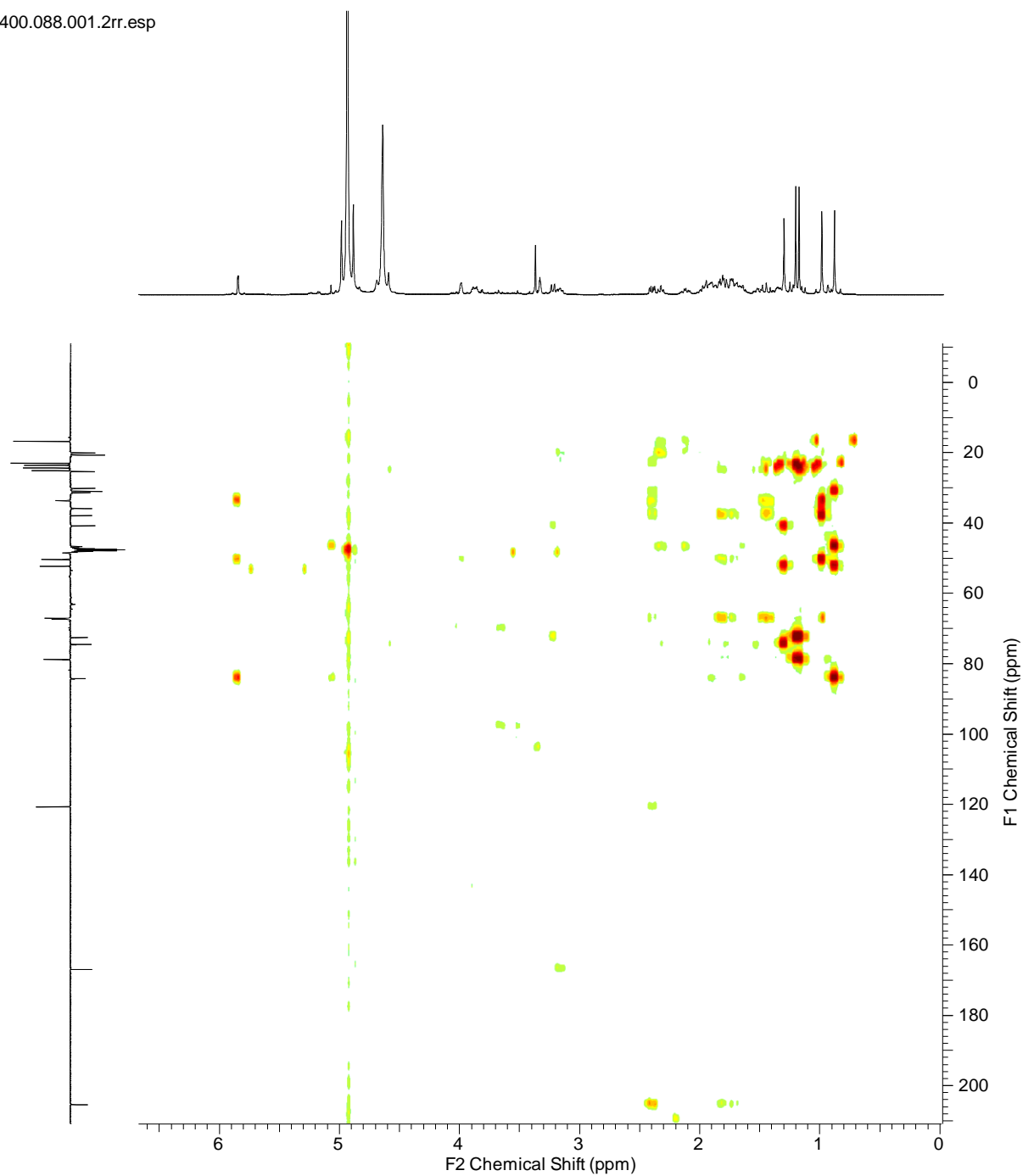
**Figura. 24:** Expansão do espectro HSQC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **15**.



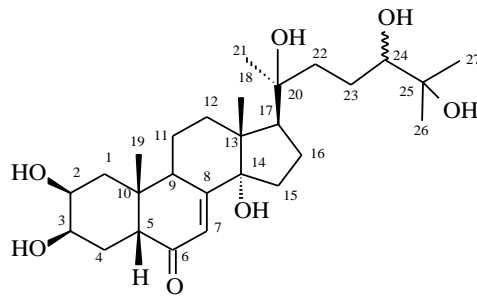
**Figura 25:** Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 15.



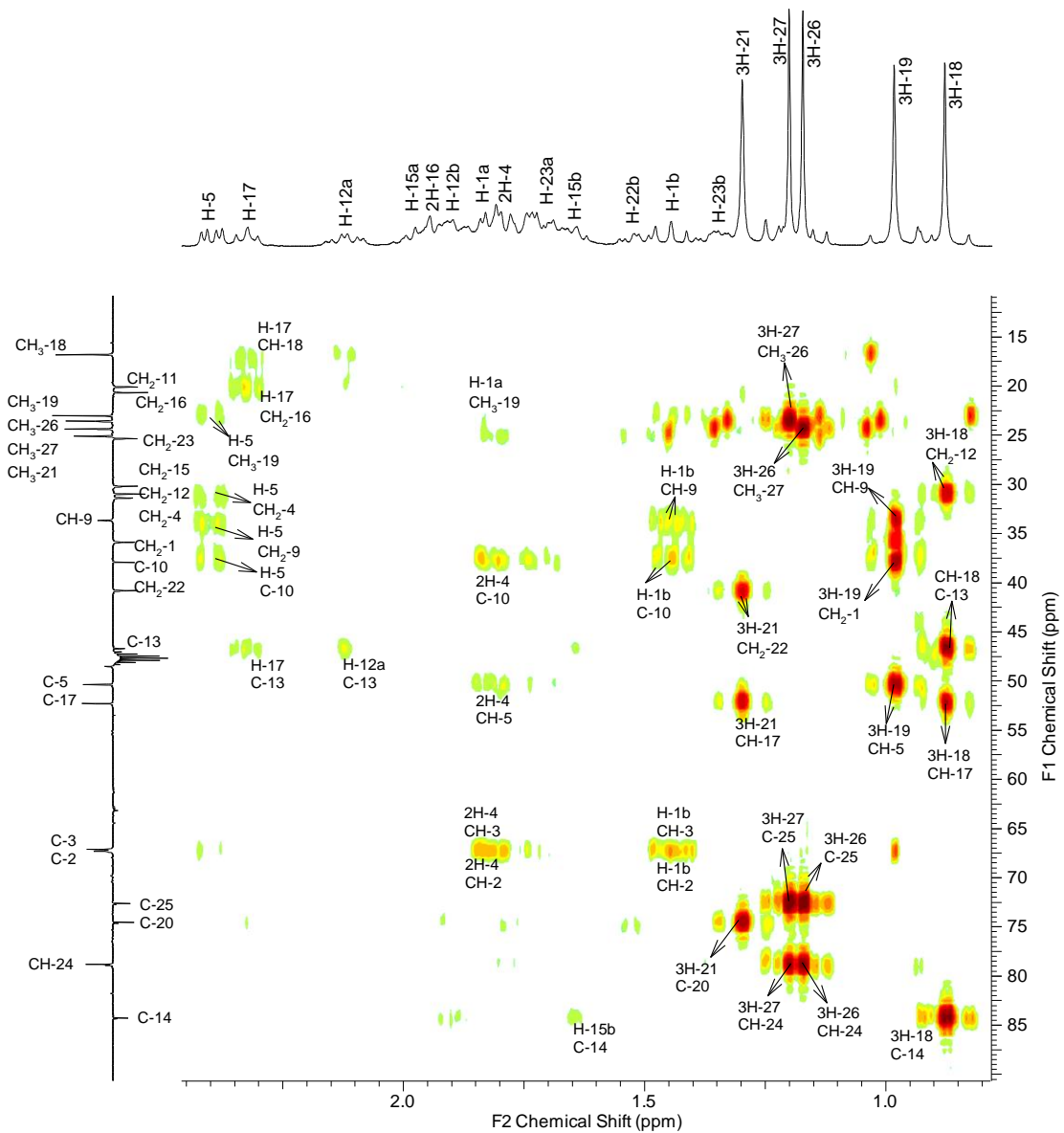
400.088.001.2rr.esp



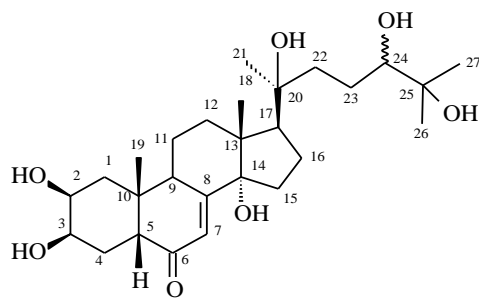
**Figura 26:** Espectro HMBC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **15**



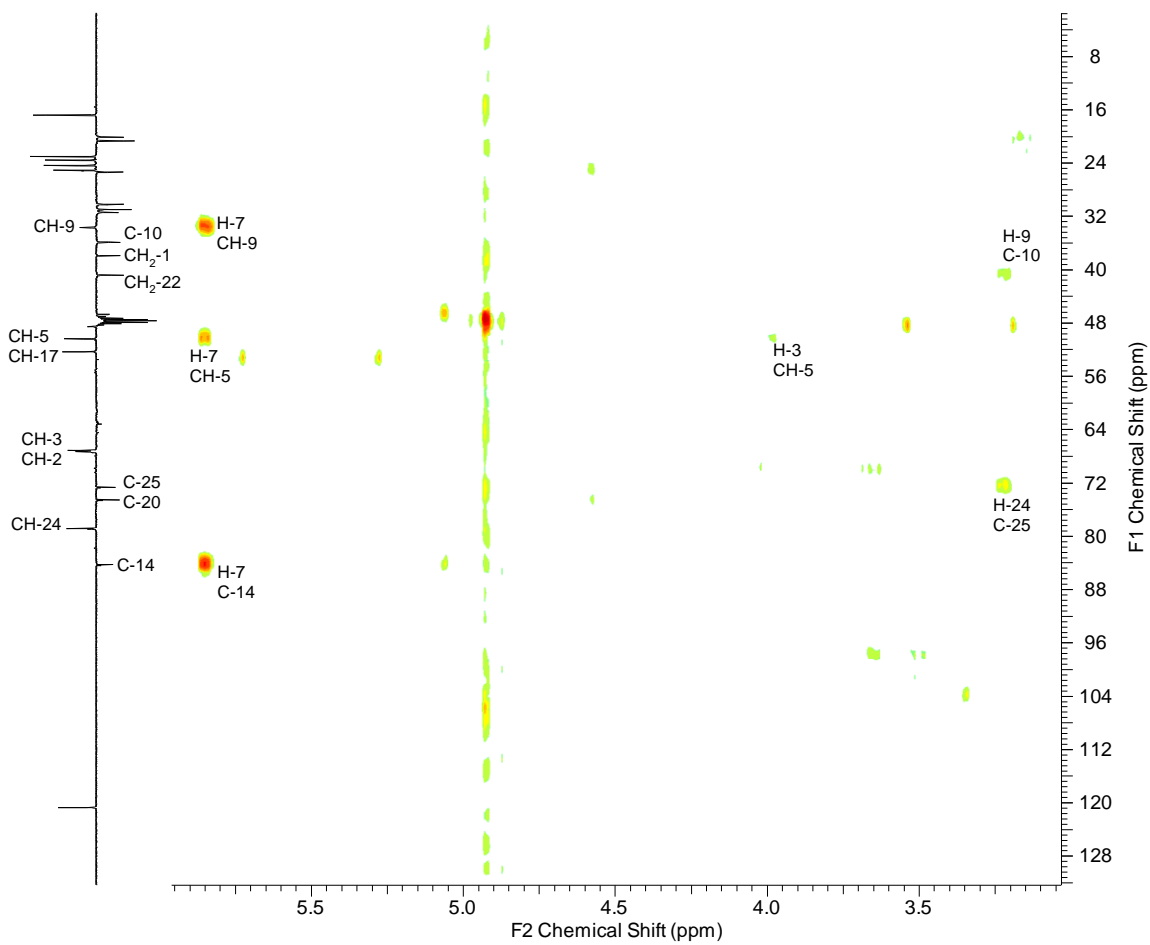
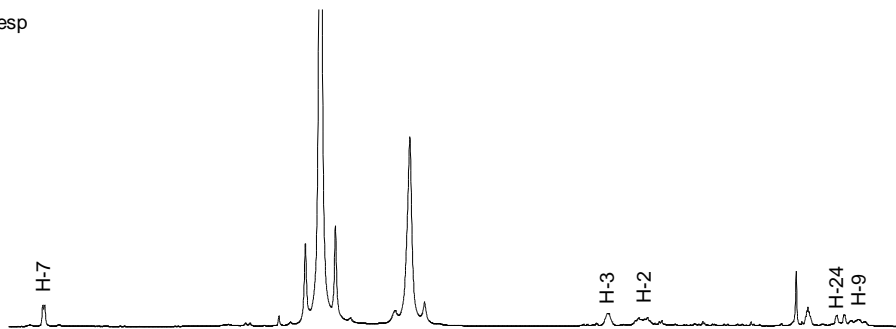
400.088.001.2rr.esp



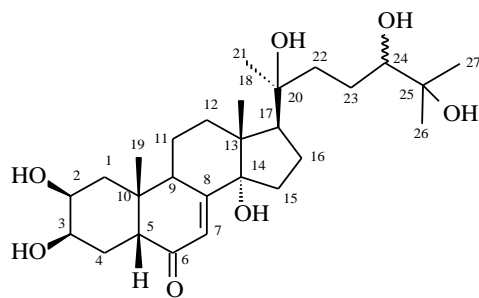
**Figura 27:** Expansão do espectro de HMBC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **15**



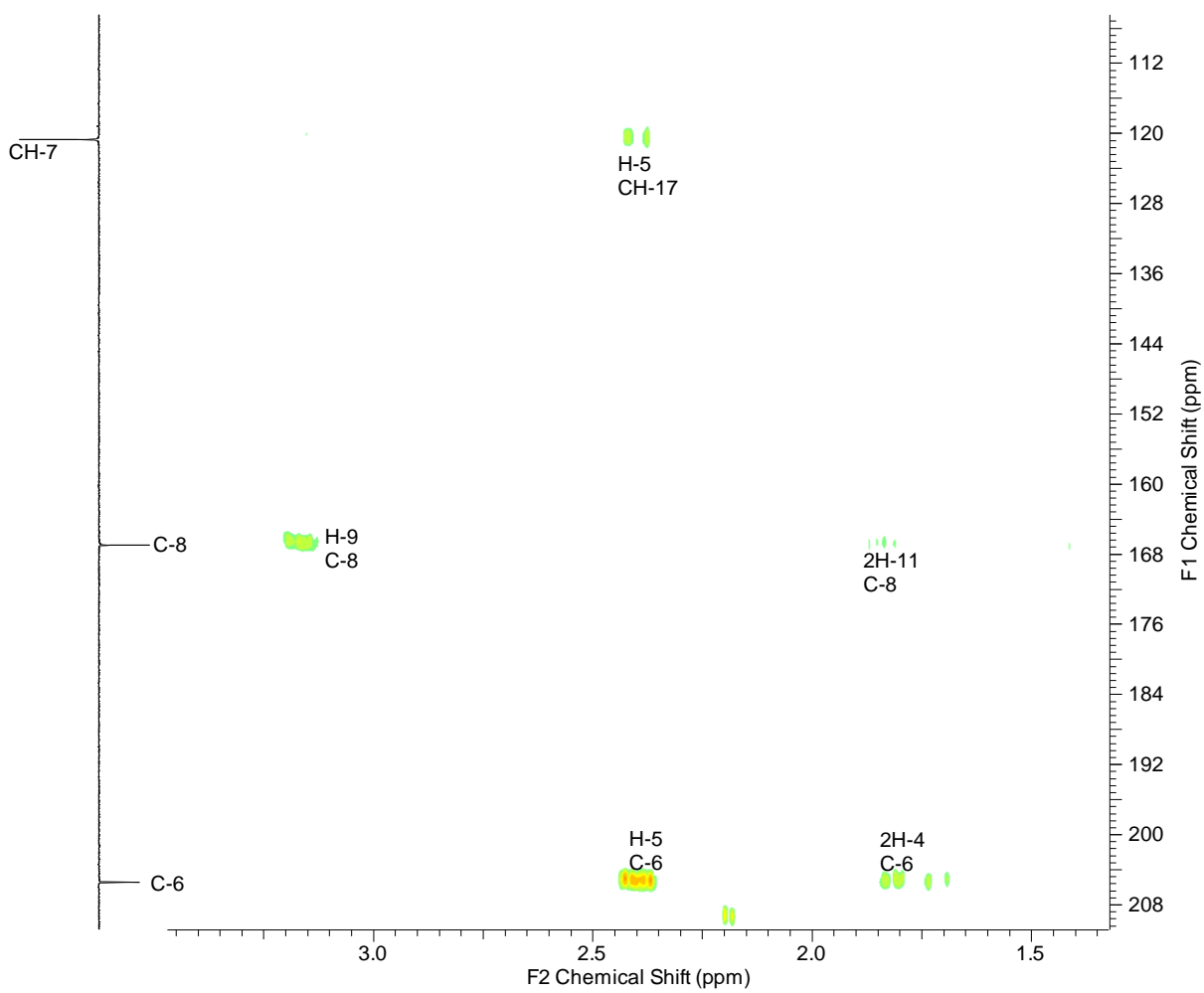
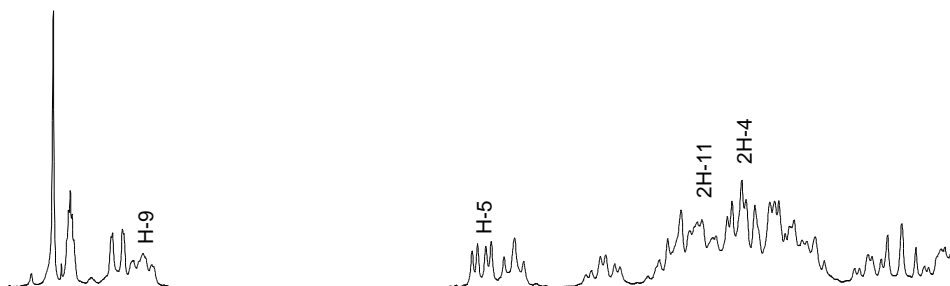
400.088.001.2rr.esp



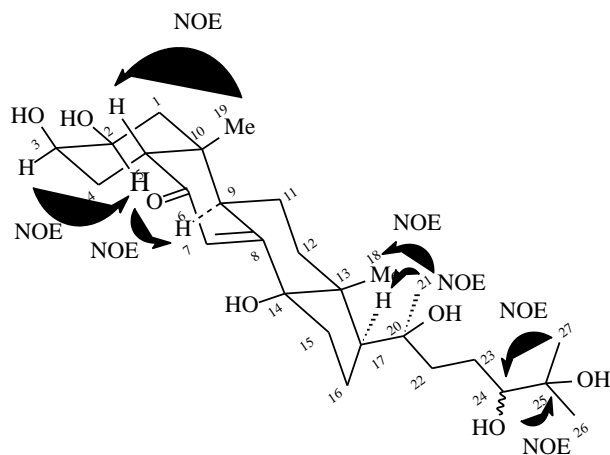
**Figura. 28:** Expansão do espectro de HMBC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **15**



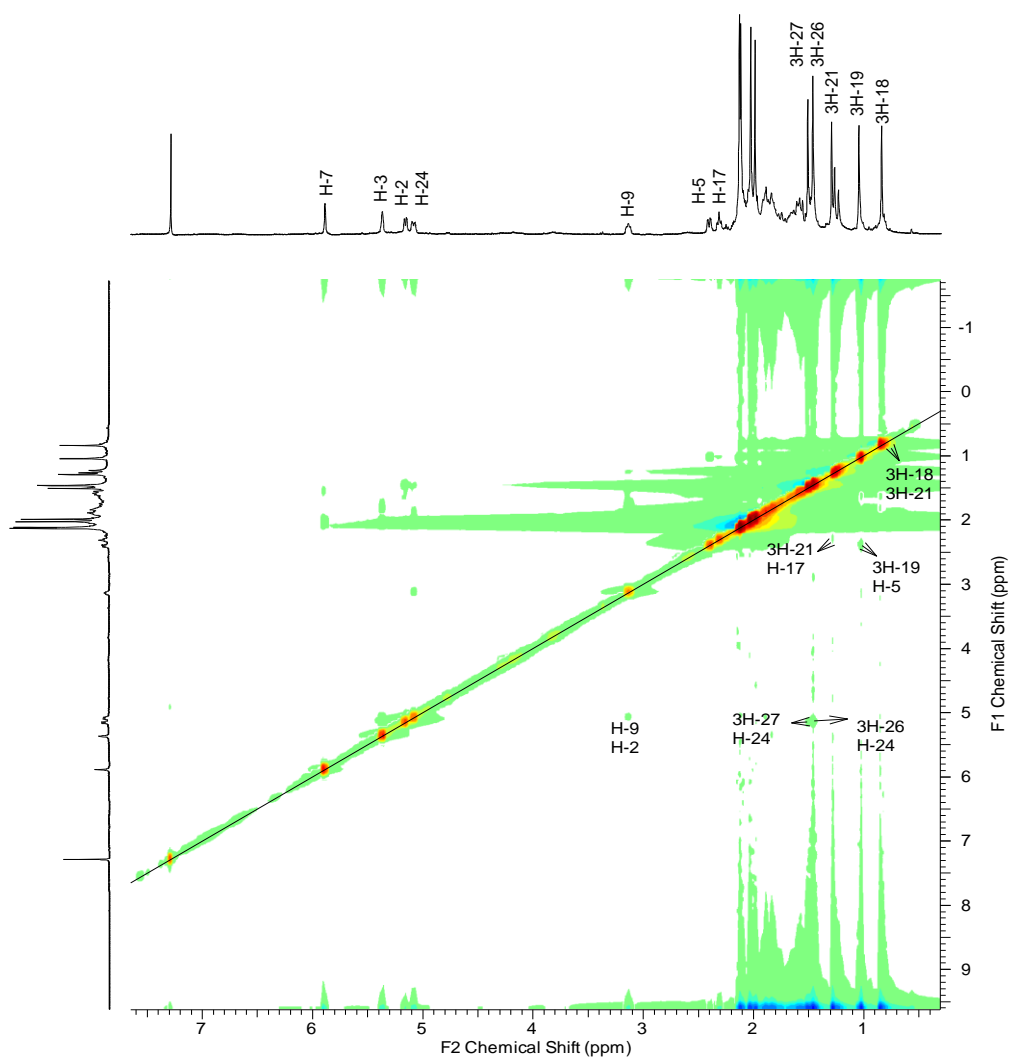
400.088.001.2rr.esp



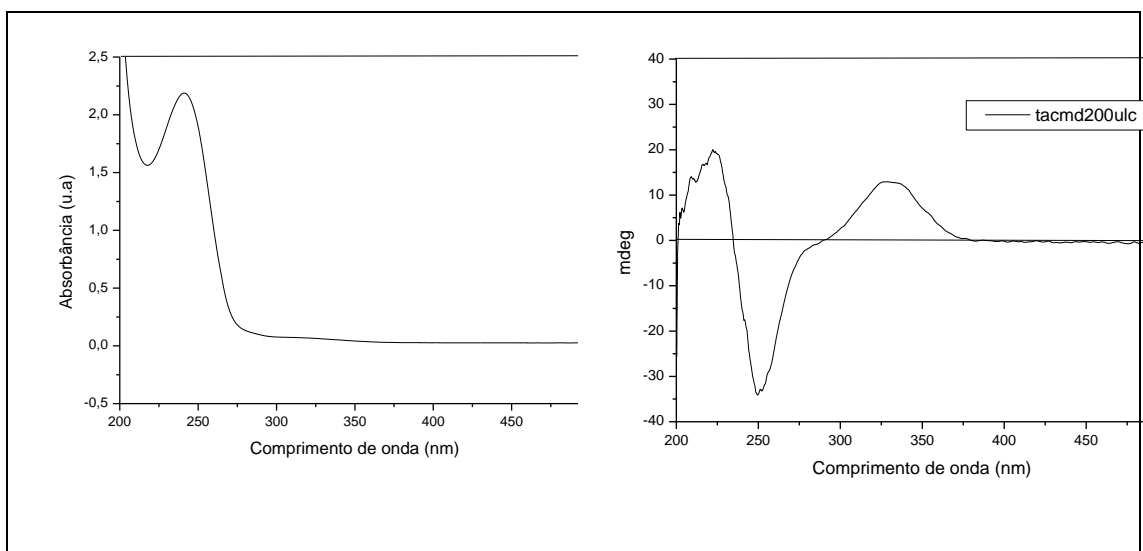
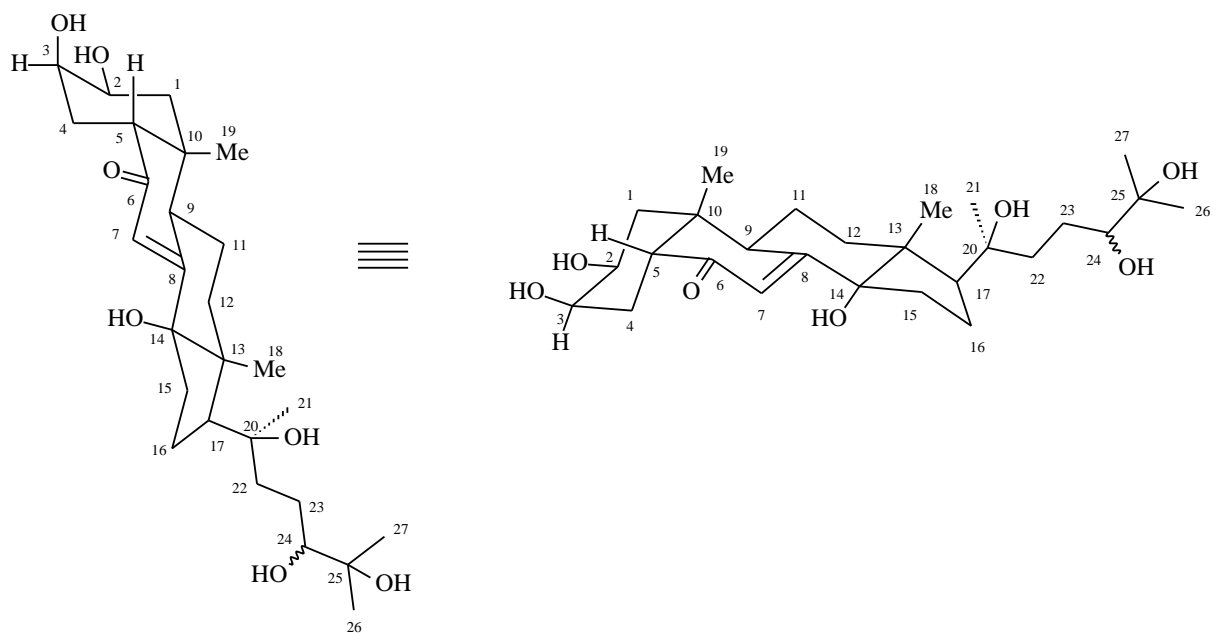
**Figura 29:** Expansão do espectro de HMBC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **15**



novos.023.001.2rr.esp

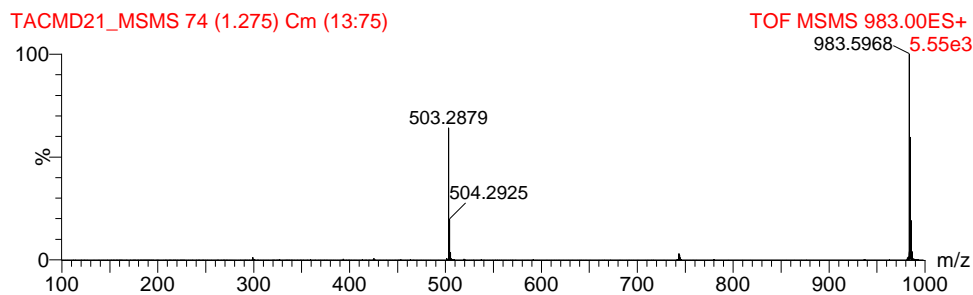


**Figura. 30:** Espectro NOESY (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **15**

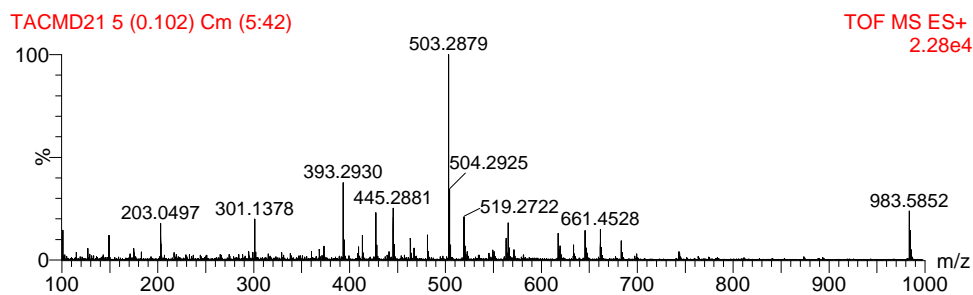


**Figura. 31:** Espectro de UV e CD em MeOH de (2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,24R)-2,3,14,20,24,25-Hexahidrocolest-7-en-6-ona

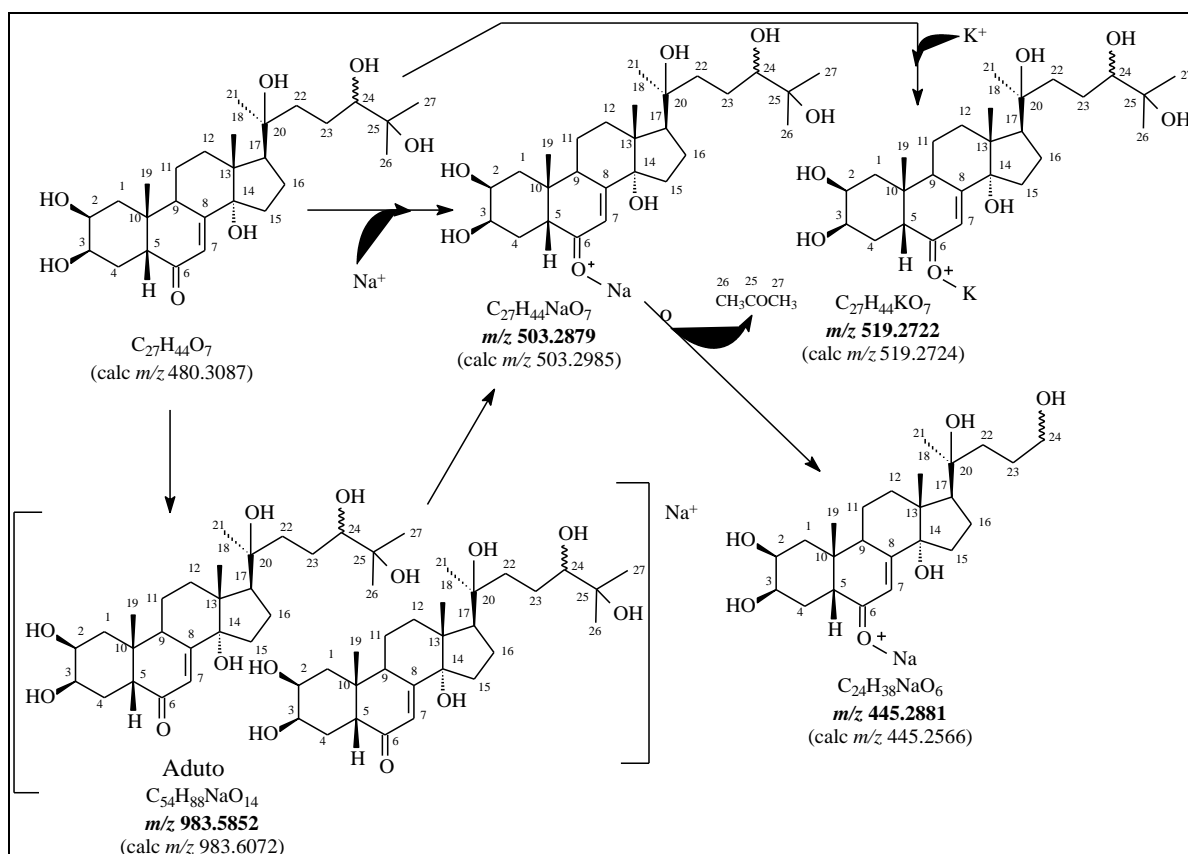




**Figura 32:** Espectro de Massas MSMS 983 (15 ev)



**Figura 33:** Espectro de Massas Íons totais (6ev)

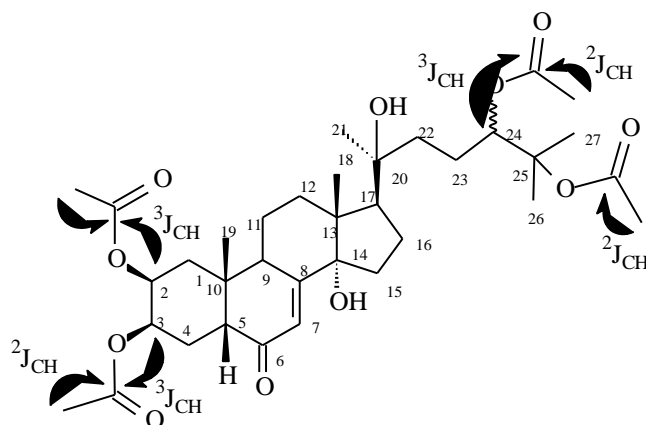


**Esquema 9:** Fragmentações de 15.

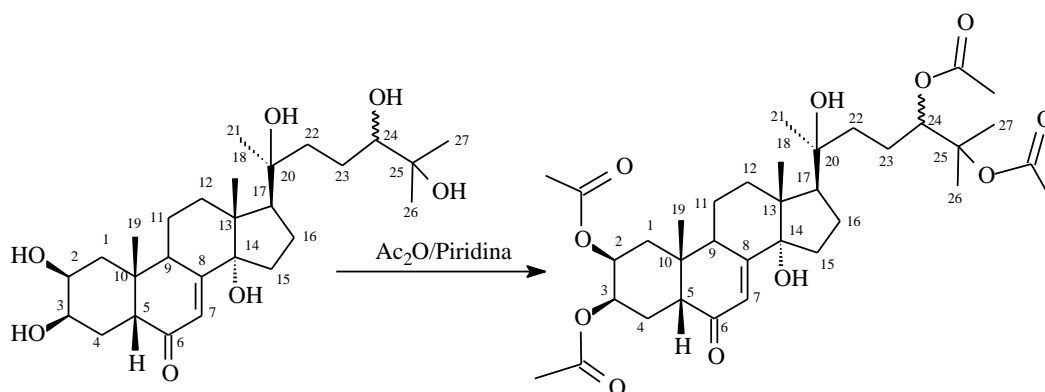
### 3.5. Derivado 15A

Com a substância **15** foi realizada reação de acetilação usando anidrido acético e piridina, a fim de confirmar o número e posições das hidroxilas presentes na substância. De acordo com os sinais obtidos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , DEPTQ, COSY (**Figura 40**), HSQC (**Figuras 41 e 42**) e HMBC e espectrometria de massas CG-EM, foi observado a ocorrência da reação. Em comparação com o espectro da substância **15**, foi observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figuras 35 e 36**), 4 singletos adicionais, em  $\delta_{\text{H}}$  1,98, 2,02, 2,10 e 2,12 ppm que foram atribuídos aos carbonos metílicos dos grupos acetatos. O espectro de DEPTQ (**Figuras 37-39**) apresentou sinais adicionais em  $\delta_{\text{C}}$  21,02, 21,08, 21,14 e 22,41 ppm pertencentes aos carbonos metílicos dos grupos acetatos, também obsevou-se 4 sinais adicionais em, 170,22; 170,28, 170,57 e 170,74 ppm atribuídos aos carbonos das carbonilas dos grupos acetatos. O mapa de contorno HMBC (**Figuras 43 e 44**) apresenta a correlação,  $^3J_{\text{H-2}}$  ( $\delta_{\text{H}}$ 5,07) com a carboxila AcO-2 ( $\delta_{\text{C}}$  170,58);  $^3J_{\text{H-3}}$  ( $\delta_{\text{H}}$  5,36) com a carboxila AcO-3 ( $\delta_{\text{C}}$  170,29);  $^3J_{\text{H-24}}$  ( $\delta_{\text{H}}$  5,15) com a carboxila AcO-24 ( $\delta_{\text{C}}$  170,76); confirmando a posição dos grupos hidroxilas em C-2, C-3, C-24 as hidroxilas em C-14 e C-20 não sofreram reação de acetilação. (**Figura: 34**)

Na **tabela 6** encontra-se os valores das correlações obtidas no HSQC ( $^1J_{\text{CH}}$ ) e HMBC ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) da substância original e acetilada.



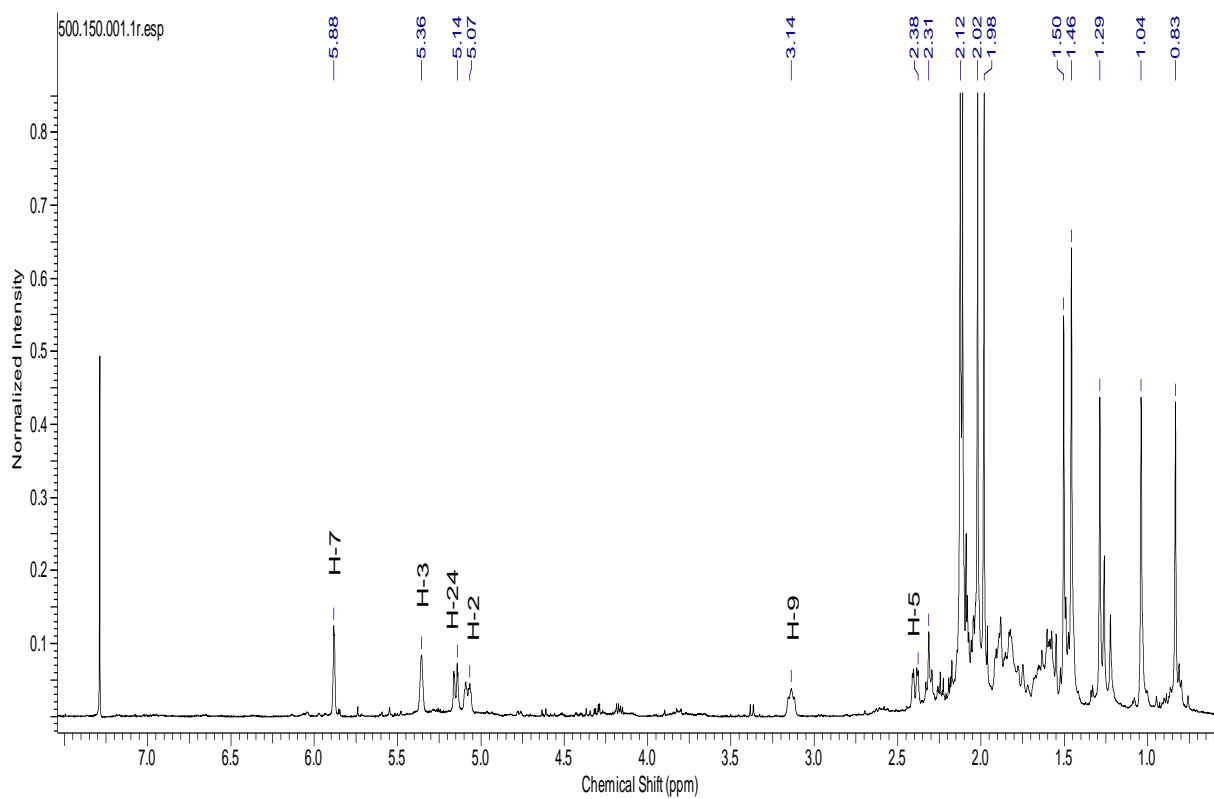
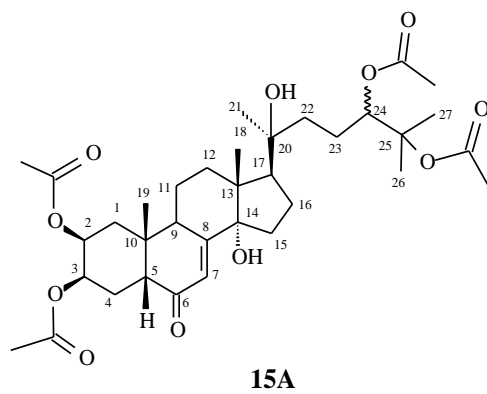
**Figura 34:** Correlações observadas no HMBC das acetoxilas.



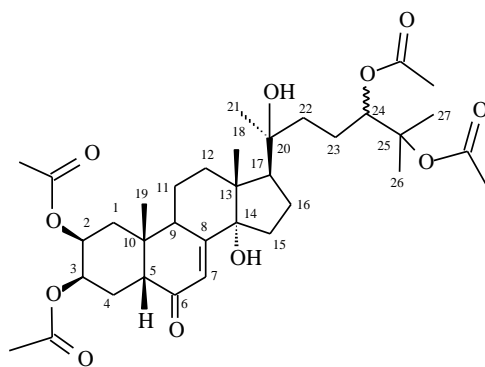
**Tabela: 6:** Deslocamentos químicos de **15** e **15A**

	TACMD-21(5'-6'), em MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>				TACMD-21(5'-6')Ac			
	HSQC		HMBC		HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
<b>C</b>								
6	205.43	-	H-5		202.20	-	H-5	
8	166.96	-	H-9		164.72	-		
10	37.87	-	H-1b; H-5; 3H-19	2H-4	38.34	-	2H-1; 3H-19	
13	46.71	-	H-12a; H-17; 3H-18		46.81	-	H-17; 3H-18	
14	84.26	-		H-7; 3H-18	84.73	-		H-17; 3H-18
20	74.53	-	3H-21		74.63	-	3H-21	
25	72.62	-	H-24; 3H-26; 3H-27		82.69	-	H-24; 3H-26; 3H-27	
AcO-2	-	-	-	-	170.58	-	CH <sub>3</sub> - $\delta_H$ 2.02	H-2
AcO-3	-	-	-	-	170.29	-	CH <sub>3</sub> - $\delta_H$ 1.98	H-3
AcO-24	-	-	-	-	170.76	-	CH <sub>3</sub> - $\delta_H$ 2.10	H-24
AcO-25	-	-	-	-	170.22	-	CH <sub>3</sub> - $\delta_H$ .2.12	
<b>CH</b>								
2	67.30	3.86 (dt, 11.3)	H-1b	2H-4	68.63	5.07 (dt, 12.3, 3.3)	2H-1	
3	67.13	3.99 (sl)	2H-4	H-1b	67.02	5.36 (sl)		2H-1
5	50.37	2.39 (dd, 13.3, 4.6)	2H-4	H-3; H-7; 3H-19	50.95	2.39 (dd, 13.0, 3.1)		H-1a; H-7; 3H-19
7	120.70	5.84 (d, 2.3)			121.53	5.87 (d, 1.9)		
9	33.66	3.16 (td, nb8.2)		H-1b; H-5; H-7; 3H-19	33.55	3.14 (tl)		H-1b; H-7; H-5; 3H-19
17	52.30	2.32 (t, 10.3)		3H-18; 3H-21	52.41	2.31 (t, 8.9)		

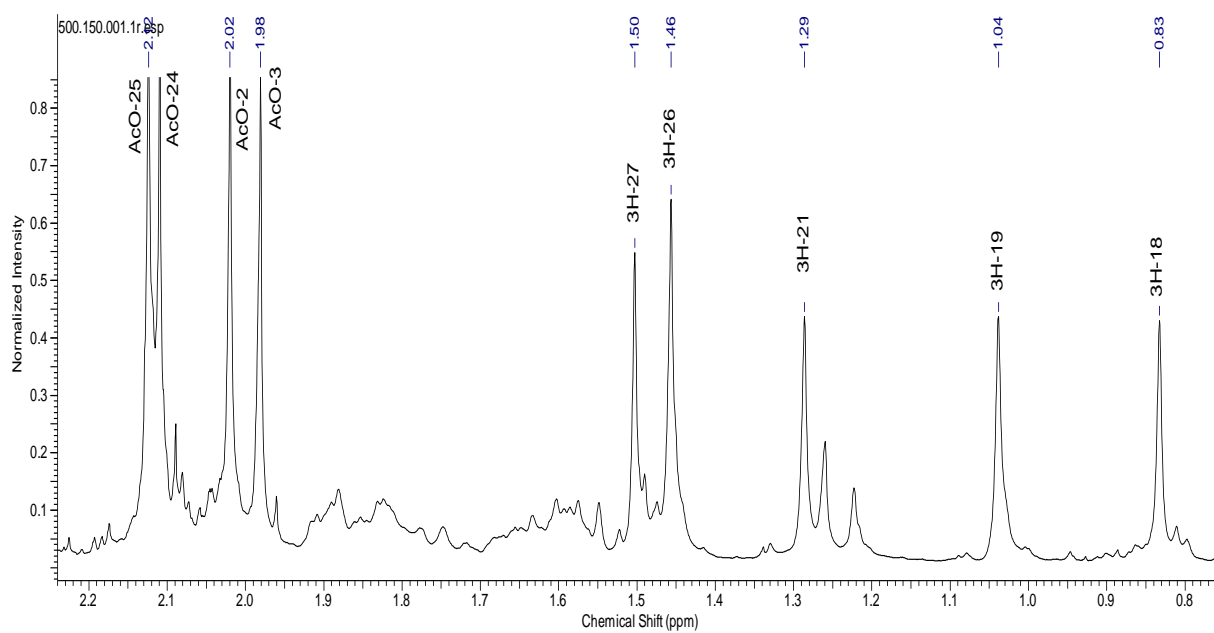
24	78.81	3.22 (d, 10.3)		3H-26; 3H-27	77.49	5.15 (dd, 10.1, 2.2)		3H-26; 3H-27
<b>CH<sub>2</sub></b>								
1	35.95	1.85, 1.44 (t, 12.8)		H-5; 3H- 19	33.97	1.95, 1.56		H-5; 3H-19
4	31.39	1.75	H-5		39.18	1.86	H-5	
11	20.16	1.85, 1.75			20.34	1.80, 1.60		
12	30.98	2.13 (td, 14.4, 4.4) 1.90		3H-18	30.84	2.18, 1.85		3H-18
15	30.19	1.98, 1.68			31.42	2.05, 1.60		
16	20.67	1.95			20.78	2.10, 1.90	H-17	
22	40.81	1.80, 1.52 (td)		H-24; 3H-21	39.72	1.48		3H-21
23	25.34	1.72, 1.35			23.55	1.90, 1.58	H-24	
<b>CH<sub>3</sub></b>								
18	16.80	0.88 (s)		H-17	17.48	0.83 (s)		H-17
19	23.03	0.98 (s)		H-5	23.85	1.03 (s)		H-5
21	25.34	1.30 (s)			26.27	1.28 (s)		
26	23.57	1.17 (s)		3H-27	22.24	1.45 (s)		3H-27
27	24.36	1.20 (s)		3H-26	22.24	1.49 (s)		3H-26
AcO-2	-	-	-	-	21.08	2.02 (s)		
AcO-3	-	-	-	-	22.41	1.98 (s)		
AcO-24	-	-	-	-	21.02	2.10 (s)		
AcO-25	-	-	-	-	21.14	2.12 (s)		



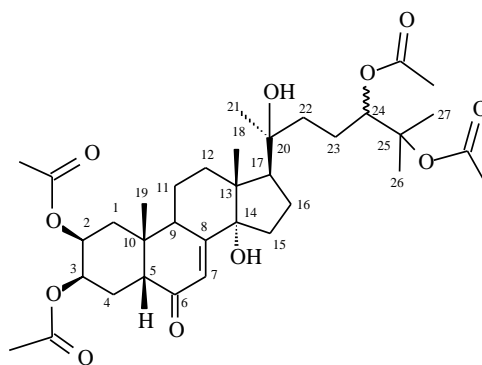
**Figura 35:** RMN de H de 15A (500Mz, CDCl<sub>3</sub>)



**15A**



**Figura 36:** Expansão do espectro de RMN de H de 15A (500Mz,  $\text{CDCl}_3$ )



15A

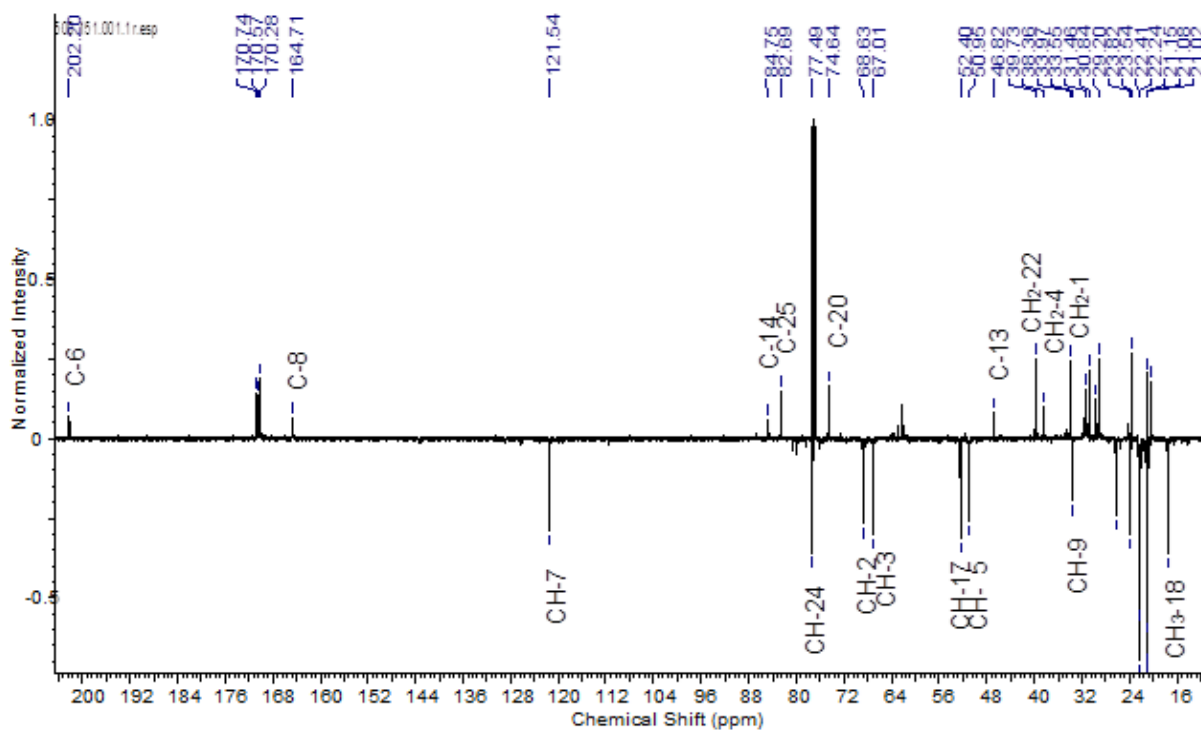
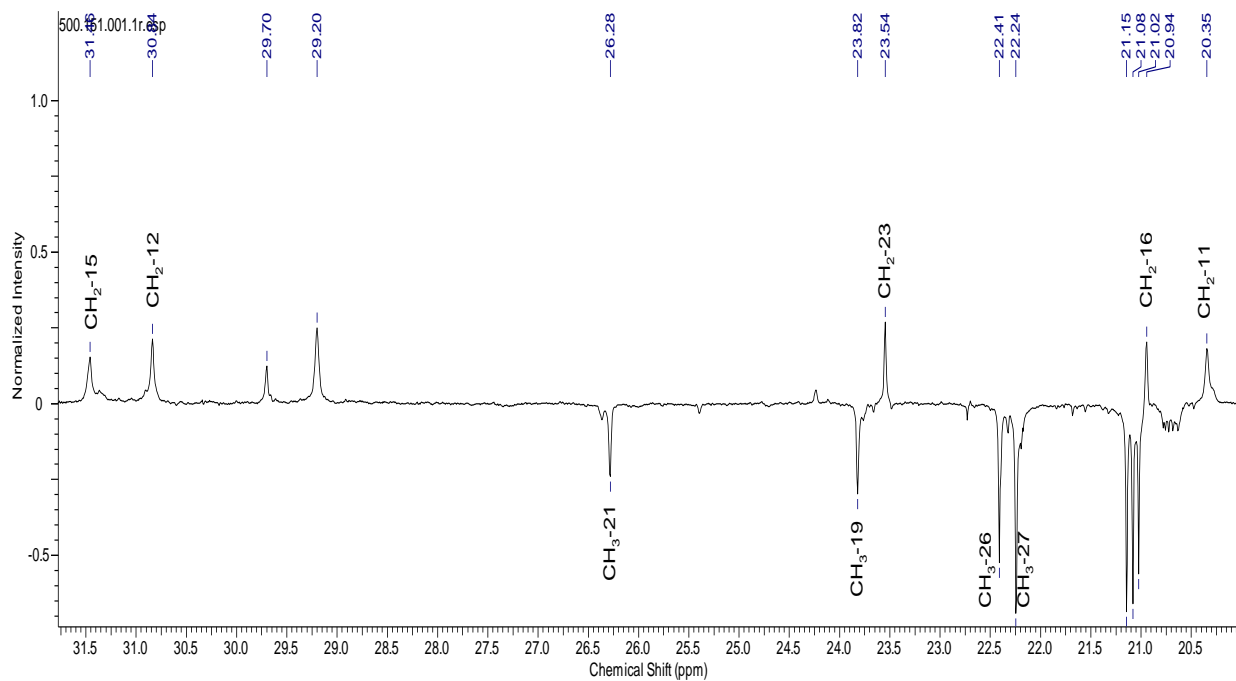
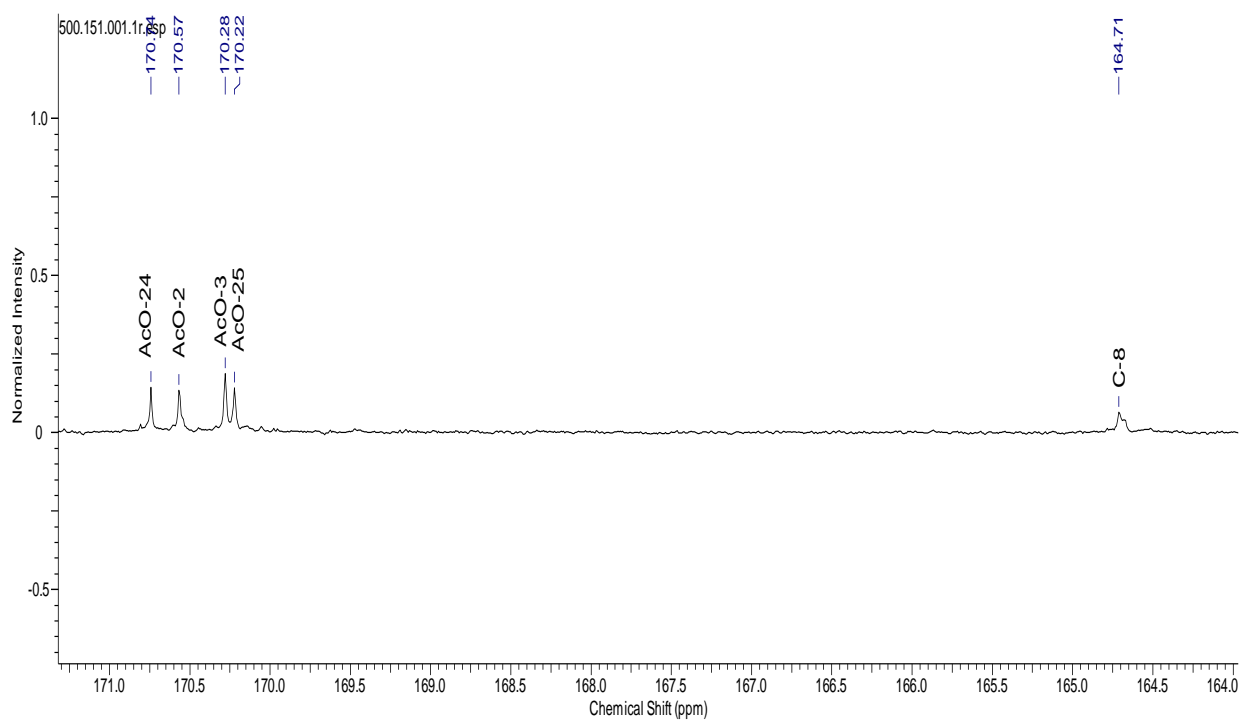


Figura 37: RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do derivado acetilado 15A.

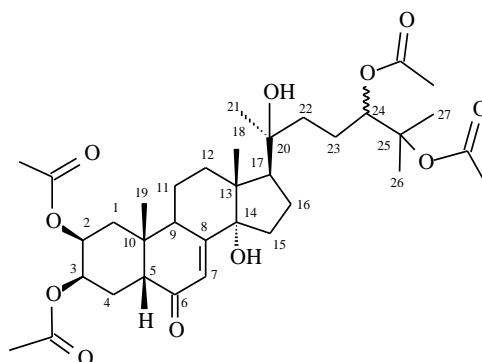


**Figura 38:** Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do derivado acetilado **15A**



**Figura 39:** Expansão do espectro de RMN DEPTQ (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do derivado acetilado **15A**





15A

500.152.001.2rr.esp

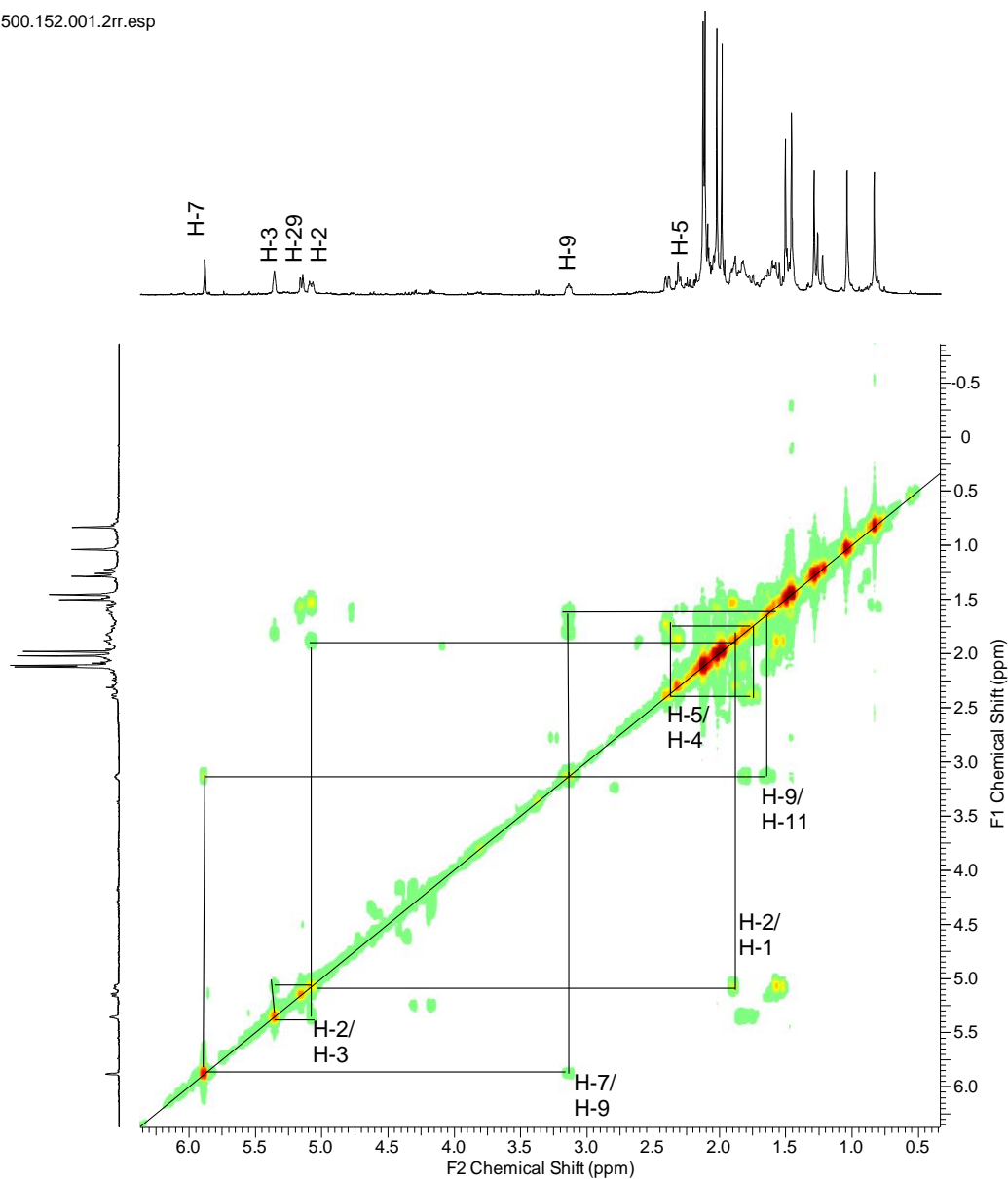
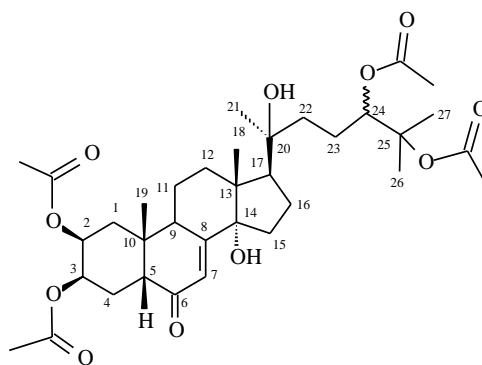


Figura. 40: Espectro de COSY (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 15A



15A

500.153.001.2rr.esp

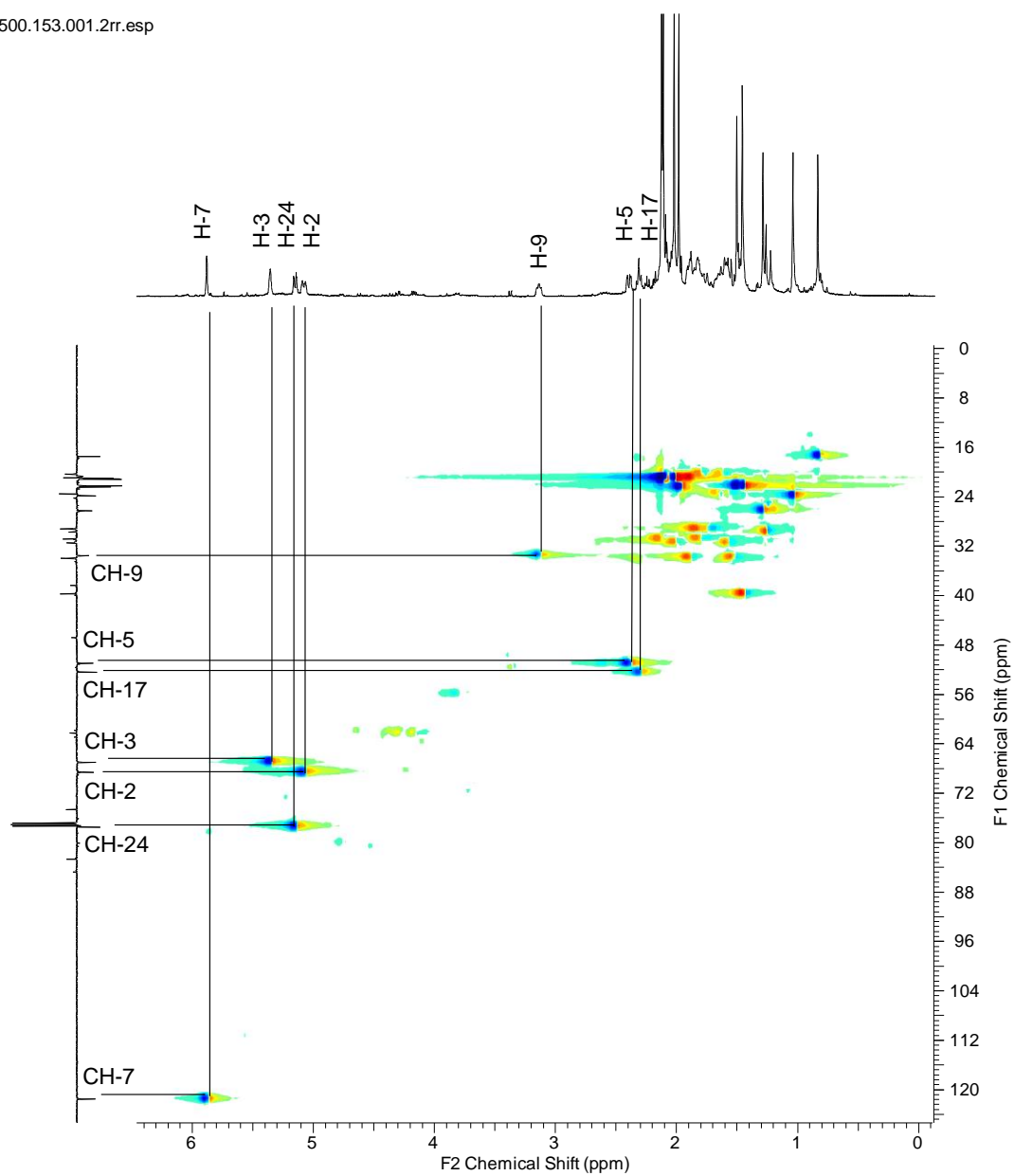
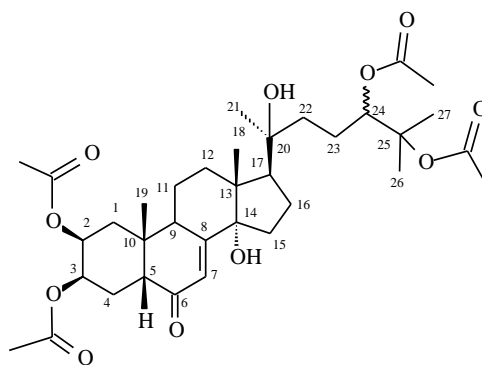


Figura. 41: Espectro HSQC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 15A



15A

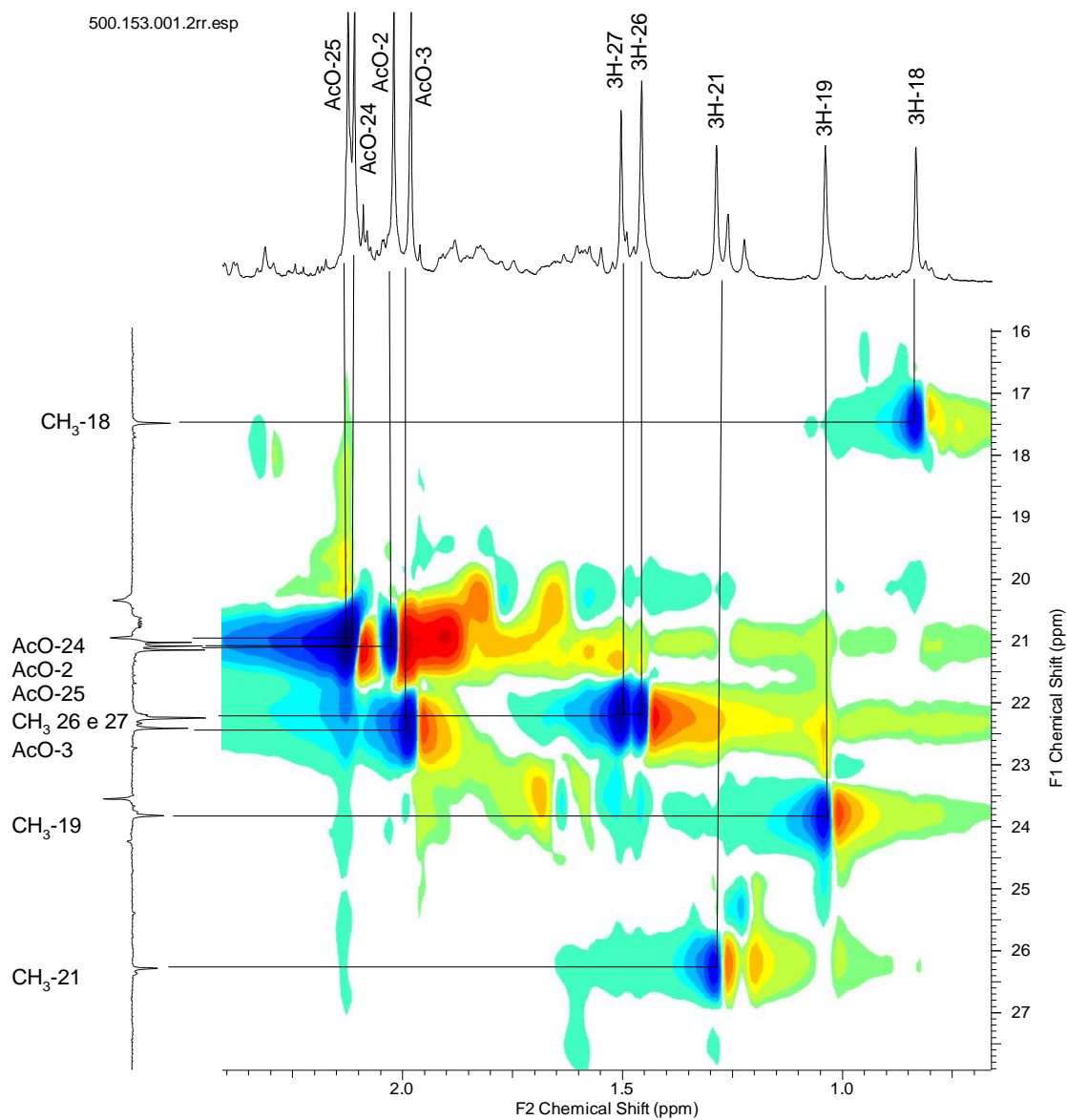
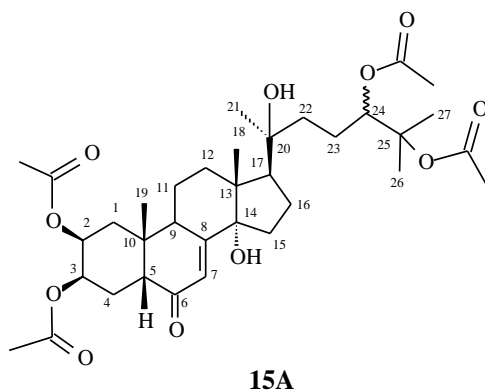
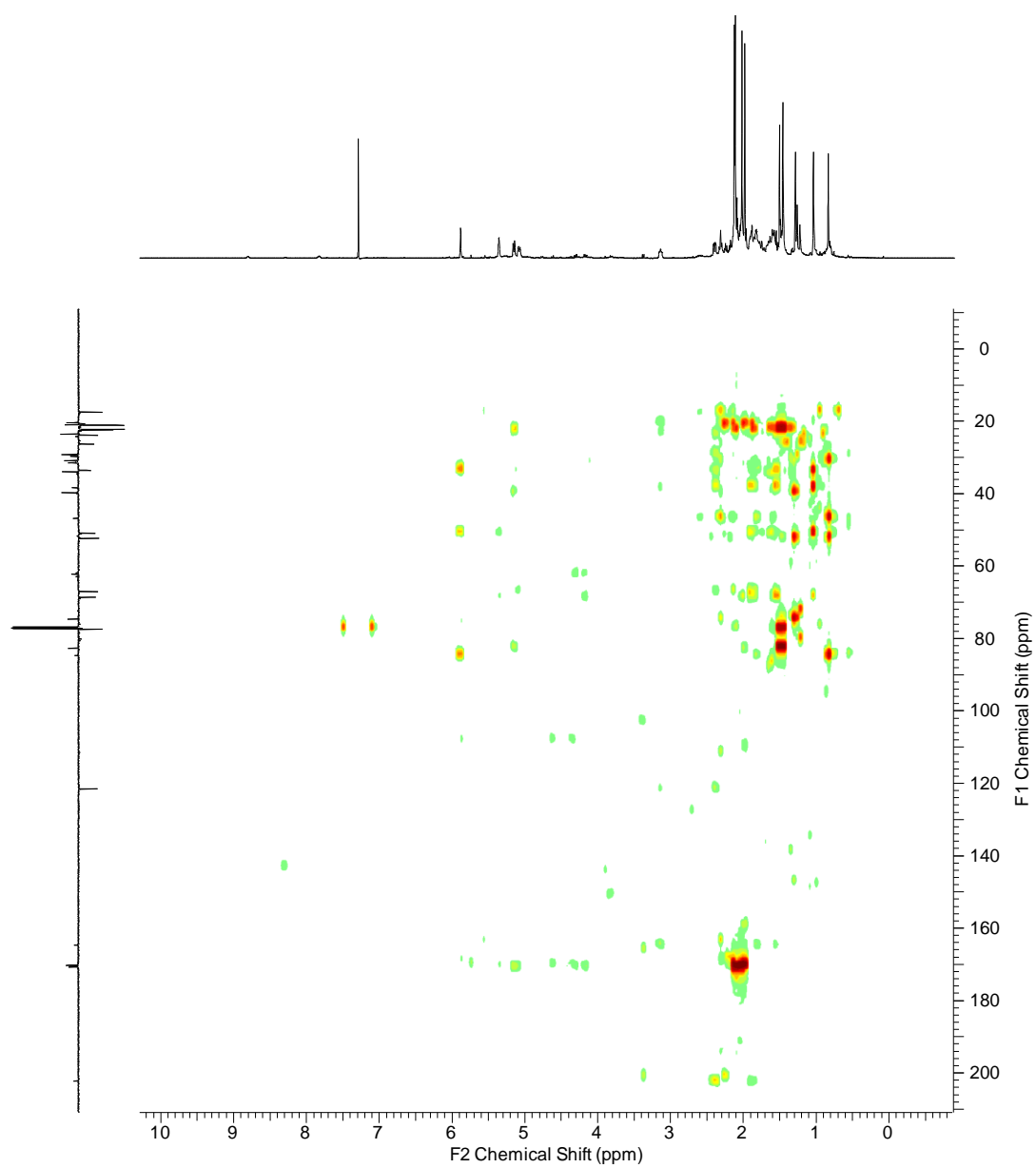


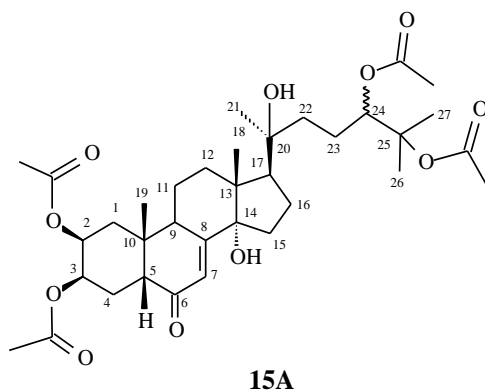
Figura. 42: Expansão do espectro HSQC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 15<sup>a</sup>



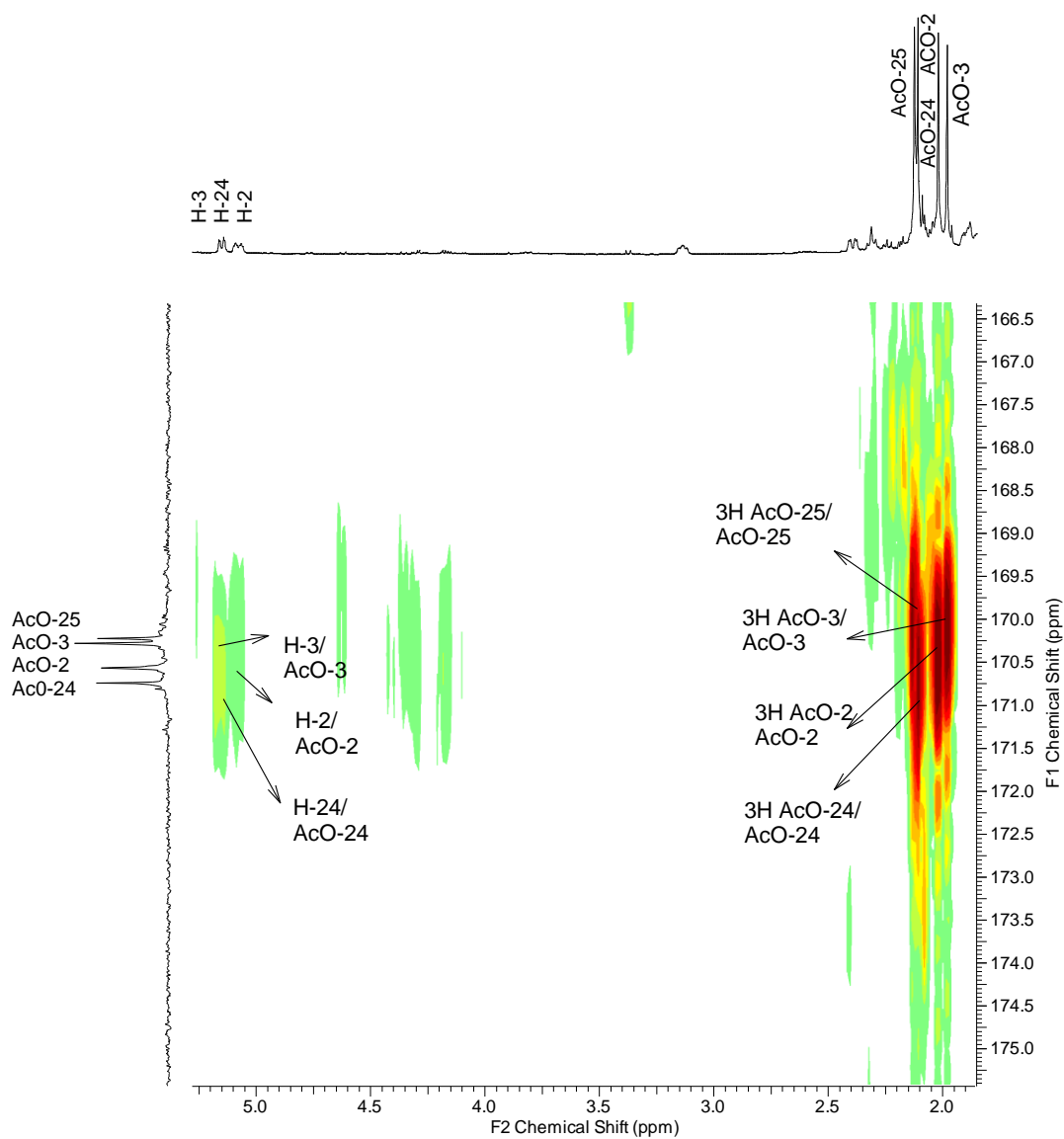
500.154.001.2rr.esp



**Figura 43:** Espectro HMBC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **15A**.



500.154.001.2rr.esp



#### 4. Conclusões sobre o estudo químico de *Tetrapteryx acutifolia*

Este foi o primeiro estudo químico de *Tetrapteryx acutifolia*. Foi realizado a prospecção fitoquímica com os extratos de diclorometano e metanol do caule e de folhas. Com os extratos metanólicos observou-se testes positivos para saponinas, alcaloides, flavonoides, antraquinonas, cumarinas, taninos, aminoácidos não proteicos, carboidratos e cardioativos e com os extratos de diclorometano observaram-se testes positivos para esteróides e triterpenóides, cumarinas, carboidratos e cardioativos. Apesar destas indicações de presença destas classes de metabolitos somente os esteroides foram isolados neste trabalho. Também foi realizada avaliação da quantidade de flavonoides das amostras dos extratos metanólicos de folhas e caule da espécie, onde observou-se que os extratos e frações de folhas apresentaram um valor maior que os do caule.

Este estudo contribuiu para o conhecimento da composição química de espécies de *Tetrapteryx*, com o isolamento e identificação de sete substâncias, sendo uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitoesterol, estigmasterol, 5,6-dihidro-  $\beta$ -sitoesterol e hexadecahidro-10,13-dimetil-17-((E)-6-metil-5-metilenehepta-1,3,6-trien-2-il)-1H ciclopenta[a]fenantren-3-ol o ácido ascórbico 2,6 dipalmitato além da sacarose e o ecdisesteróide(2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,24R)-2,3,14,20,24,25-Hexahidroxicolest-7-en-6-ona, identificado pela primeira vez no gênero *Tetrapteryx*.

## 5. REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO II

DAVIS, C. C.; ANDERSON, W. R. A complete generic phylogeny of Malpighiaceae inferred from nucleotide sequence data and morphology. *Am. J. Bot.*, 97, 2031–2048. 2010

HARADA, N. and NAKANISHI, K. A Method for Determining the Chiralities of Optically Active Glycols. *Journal of the American Chemical Society* 91:14 July 2, 1969.

KELLERMAN, T. S.; COETZER, J. A. E NAUDÉ, T. W. Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa. *Oxford University Press, Cape Town*, pag. 83-130, 1988.

KOREEDA, M.; HARADA, N.; NAKANISHI, K. Exciton Chirality Method as Applied to Conjugated Enones, Esters, and Lactones. *Journal of the American Chemical Society* / 96:1 J January 9, 1974

KRISHNA, K.L.; MRUTHUNJAYA, K. and PATEL, J. A. Antioxidant and hepatoprotective activity of leaf extract of *Justicia gendarussa* Burn. *International Journal of Biological Chemistry* 3 (3): 99-110, 2009.

MAMEDE, M.C.H., SEBASTIANI, R., ALMEIDA, R.F., FRANCENER, A., AMORIM, A.M.A. Malpighiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB155>>. Acesso em: 18 Jan. 2016

MELO, M. M.; DANTAS-BARROS, A. M. Pharmacology study of *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Toxicologia* 12, (2), 55-62. Editor: (Sociedade Brasileira de Toxicologia,) CODEN: RBTOFW ISSN: 1415-2983. 1999

MOCCELINI, S. K.; DA SILVA, V.C.; NDIAYE, E.A.; SOUZA JR., P.T. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae) *Quim. Nova* V. 32 n1, 131-133, 2009

NEGI, J. S.; BISHT, V. K.; BHANDARI, A. K.; BHATT, V. P.; SINGH, P.; SINGH, N. *Paris polyphylla*: Chemical and Biological Prospectives From Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 14(6), 833-839. 2014

PEIXOTO P.V., LORETTI A.P. & TOKARNIA C.H. Doença do peito inchado, *Tetrapterys* spp poisoning, brisket disease and St. George disease: a comparative study. *Pesq. Vet. Bras.* Nº 15, pag.: 43-50, 1995

QUEIROZ, M. M. F.; QUEIROZ, E. F.; ZERAIK, M. L.; EBRAHIMI, S. N.; MARCOURT, L.; CUENDET, M.; CASTRO-GAMBOA, I.; HAMBURGER, M.; BOLZANI, V. DA S.; AND WOLFENDER, J. L. Chemical Composition of the Bark of *Tetrapterys mucronata* and Identification of Acetylcholinesterase Inhibitory Constituents. *J. Nat. Prod.*, 77, 650–656, 2014

RIET-CORREA, G.; TERRA, F. F.; SCHILD, A. L.; RIET-CORREA, F. e BARROS, S. S. Intoxicação experimental por *Tetrapterys multiglanulosa* (Malpighiaceae) em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Vol.25, nº2, pag.: 91-96, 2005.

SCHULTES, R. E. *Plantae Austro-Americanae IX: Plantarum Novaum vel Natbium Notal bivrsae. Botanical Museum Laflets* 16 (8). 179-228, 1954.

SOUZA, V. C. & H. LORENZI. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II: 1-704. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 2008

STOLF, L.; GAVA, A.; VERASCHIN, M. S.; NEVES, D. S.; MONDADORI, A. J. e SCOLARI, L. S. Aborto em bovinos causado pela ingestão de *Ateleia glazioviana* (Leg. Papilionoideae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, vol. 14, pag.: 15-18, 1994.

SUKSAMRARN, A. AND SOMMECHAI, C. Ecdysteroids from *Vitex pinnata*. *Phytochemistry*, 32(2),303-6. 1993

SUKSAMRARN, A.; SOMMECHAI, C.; CHARULPONG, P.; CHITKUL, B. Ecdysteroids from *Vitex canescens*. *Phytochemistry* Volume 38, Issue 2, January 1995, Pages 473-476

SUKSAMRARN, A.; KUMPUN, S.; YINGYONGNARONGKUL B.E. Ecdysteroids of *Vitex scabra* stem bark. *J Nat Prod.* Nov;65(11):1690-2, 2002.



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

TOKARNIA, C.H., PEIXOTO, P.V. & DOEBEREINER, J. Poisonous plants affecting heart function of cattle in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 10:1-10, 1990.

TOKARNIA, C. H., DÖBEREINER, J. e PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil.** Editora Helianthus, Rio de Janeiro, pag.19-61. 2000.

TRINH, T. T.; TRAN, V. S.; PORZE, A.; RIPPERGER, H.; ADAM, G. Study on chemical constituents of *Vitex leptobotrys*. I. The ecdysteroids *Tap Chi Hoa Hoc*, 37, (1), 16-22. 1999

WATSON, L. e DALLWITZ, M. J. **The families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, Information Retrieval**, 1992. Site: <http://delta-intkey.com/angio/> acessado em 16 de janeiro de 2010.

ZHANG, Z. L.; ZUO, Y. M.; CAI, M. T.; WANG, Y. Y. Chemical constituents in roots and rhizomes of *Trillium tschonoskii* (II) *Zhongcaoyao*, 44, (20), 2808-2811. 2013

## CAPÍTULO III

### ESTUDO QUÍMICO DE *Lophanthera lactescens* Ducke (Malpighiaceae)

#### 1. Revisão de Literatura:

##### 1.1. Generalidades sobre o gênero *Lophanthera*

O gênero *Lophanthera* apresenta 4 espécies com ocorrência no Norte do Brasil, *Lophanthera lactescens* Ducke, *Lophanthera longifolia* (Kunth) Griseb., *Lophanthera pendula* Ducke e *Lophanthera spruceana* Nied. São espécies arbóreas que podem alcançar até 10-20 m de altura (MAMEDE, 2015).

##### 1.2. Características morfológicas e ocorrência de *Lophanthera lactescens* Ducke

Dentre este gênero, *Lophanthera lactescens* Ducke, conhecida vulgarmente como Lofanthera-da-Amazônia, Chuva-de-Ouro ou lanterneira, é uma espécie arbórea, característica da floresta pluvial equatorial da região Amazônica (**Figura 1**). Esta espécie ocorre principalmente no interior da mata primária densa e nas formações secundárias. Sua floração se dá no período de fevereiro a maio e maturação dos frutos entre setembro e outubro, produzindo anualmente grande quantidade de sementes férteis (LORENZI, 1992). Devido ao seu valor como planta ornamental, esta espécie está sendo bastante difundida no sudeste do país, onde é empregada na arborização urbana, no plantio em áreas degradadas e também é empregada na construção civil, marcenaria e carpiaria (PAOLI, 1997). A **Figura 2** representa a inflorescência em detalhes de *Lophanthera lactescens* Ducke. Sua classificação botânica encontra-se na **Tabela 1**.



**Figura 1:** Ocorrência de *Lophanthera lactescens* Ducke no Brasil (MAMEDE, 2015)



**Figura 2:** Inflorescência de *Lophanthera lactescens* Ducke (<http://plantas-ornamentais.blogspot.com.br/2011/08/lofantera-da-amazonia-lophanthera.html>-acesso em 09/11/16)

**Tabela 1:** Classificação botânica de *Lophanthera lactescens* Ducke

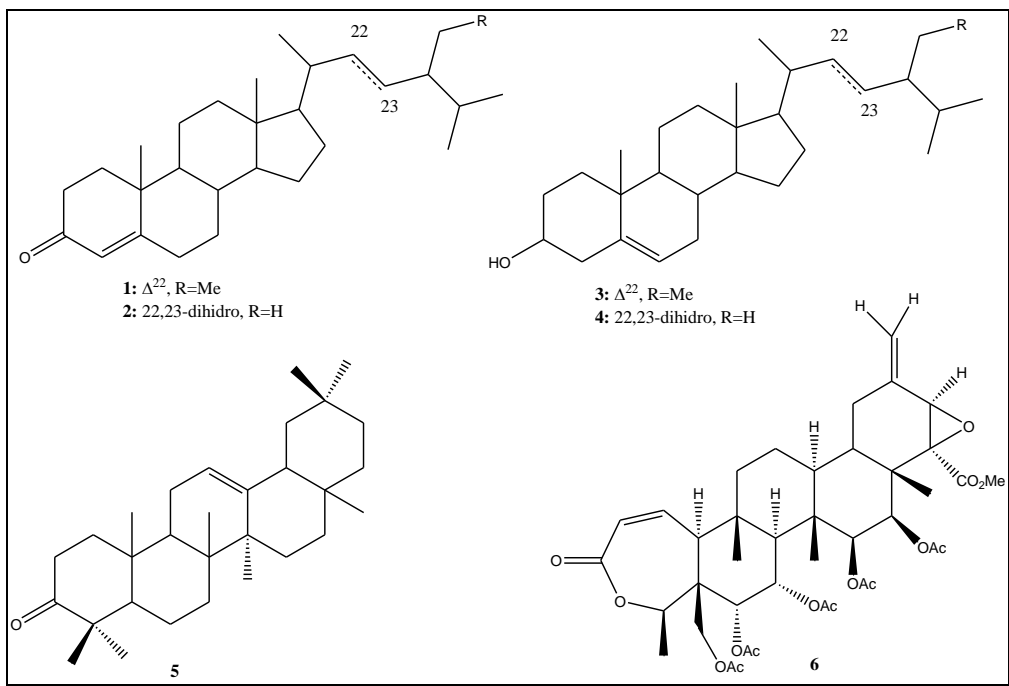
Divisão:	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe:	Magnoliopsida (Dicotyledoneae)
Ordem:	Polygalales (Malpighiales)
Família:	Malpighiaceae
Gênero:	<i>Lophanthera</i>
Espécie:	<i>Lophanthera lactescens</i>
Autor:	Ducke

### 1.3. Estudos farmacológicos do gênero *Lophanthera*

O interesse despertado pela espécie *Lophanthera lactescens* Ducke, foi impulsionado por alguns aspectos adicionais, podendo-se destacar a sua característica como uma espécie endêmica da Amazônia, com importância na medicina popular local, índios da região têm usado infusão a partir de folhas e cascas desta planta para baixar a febre da malária (ABREU *et al.*, 1990). Um *nor*-triterpeno isolado a partir do caule de *Lophanthera lactescens* teve seu efeito leishmanicida comprovado (DANELLI *et al.*, 2009), havendo um grande interesse de empresas multinacionais como a Merck por exemplo, que publicou e registrou patente tendo como referência o trabalho de ABREU (1990). O extrato metanólico da casca do caule apresentou atividade antinoceptiva e anti-inflamatória. (DOS SANTOS, *et al.*, 2015)

### 1.4. Estudo químico do gênero *Lophanthera*

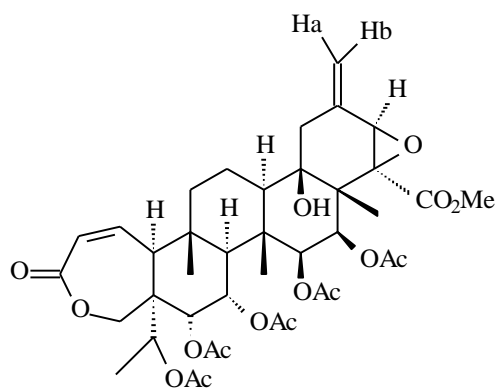
Estudos realizados com a madeira de *Lophanthera lactescens* Ducke revelou a presença de quatro esteróides: estigmasta-4,22-dien-3-ona(1), ergost-4-en-3-ona (2), estigmasterol (3), ergost-5-en-3-ol (4) e dois triterpenos: -amirenona (5) e o *nor*-triterpeno 6,7,15,24-pentacetoxi-22-carbometoxi-21,22-epoxi-18-hidroxi-27,30-bis*nor*-3,4-secofriedela-1,20(29)-dien-3,4*R*-olideo (6) (ABREU, 1985). **Figura 3.**



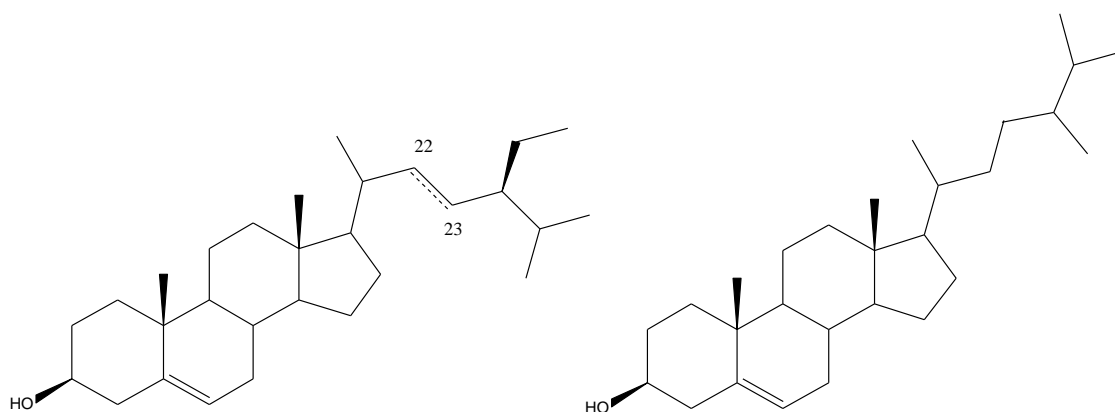
**Figura 3:** Substâncias isoladas de *Lophanthera lactescens* Ducke

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Substâncias isoladas de *Lophanthera lactescens*:



16



5:22,23-diidro  
6:D22,23

7

**Figura 4:** Substâncias isoladas de *Lophanthera lactescens*

## 2.2. Material vegetal

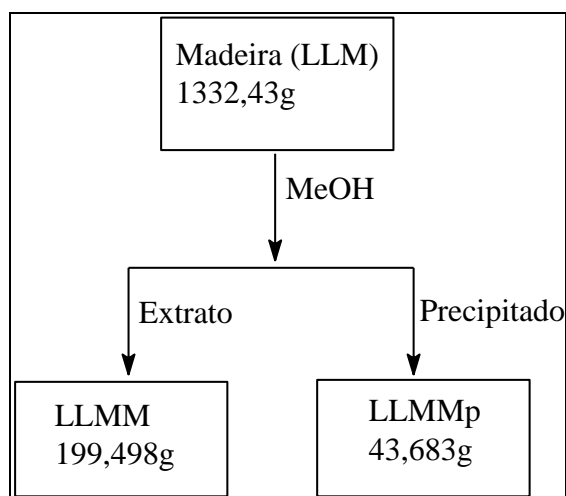
O material da *Lophanthera lactescens* foi coletado no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Km 47 da antiga Rio-São Paulo (Km 07 da BR 465) Seropédica – Rio de Janeiro, Brasil, em dezembro de 2010 pelo Professor Heber dos Santos Abreu (IF/UFRRJ) com o número do depósito 1419 RBR registrado no herbário da UFRRJ e identificado pela professora Ariane Luna Peixoto (IB/UFRRJ).

## 2.3. Obtenção do Extrato Bruto

Foram preparados os extratos brutos com metanol da madeira e cascas de *Lophanthera lactescens*.

A madeira de *Lophanthera lactescens*, após seca e moída (1.332,43g), foi extraída com o solvente orgânico metanol (MeOH), através da maceração em temperatura ambiente. A solução obtida foi destilada pressão reduzida em evaporador rotatório. No momento da destilação ocorreu a formação de um precipitado o qual foi recolhido, obtendo-se então 199,498 g do extrato da madeira com MeOH (LLMM) e 43,683 g do precipitado (LLMM<sub>p</sub>). O fluxograma está apresentado no esquema 1.

As cascas de *Lophanthera lactescens*, após secas e moídas (573,32 g) foram extraídas com MeOH a temperatura ambiente e o extrato destilado sob pressão reduzida fornecendo o extrato bruto das cascas (LLCM; 35,33 g).



**Esquema 1:** Fluxograma da preparação do extrato da madeira de *Lophanthera lactescens*.

## 2.4. Prospecção fitoquímica dos extratos de *Lophanthera lactescens*

Foi realizada a prospecção fitoquímica do extrato metanólico bruto da madeira (**LLMM**), do precipitado recolhido a partir do extrato metanólico (**LLMM<sub>P</sub>**) e do extrato metanólico bruto das cascas (**LLCM**), foram realizados os testes para a detecção de: saponinas, antraquinonas, esteroides e triterpenoides, alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, aminoácidos não-protéicos, carboidratos. O resultado se encontra na **tabela 2** de acordo com o grau de intensidade da presença do metabólito no teste (+++ Forte, ++ Moderado, + Fraco e – ausente).

**Tabela 2:** Registro dos resultados da prospecção química do extrato metanólico de *Lophanthera lactescens*.

Classe de metabólitos especiais	LLMM	LLMM <sub>P</sub>	LLCM
Saponinas	+++	+	+++
Antraquinonas	+++	+++	++
Esteroides e Triterpenoides	++	++	+++
Alcaloides	+	-	-
Flavonoides	+	+++	+
Cumarinas	++	++	++
Taninos	+++	++	++
Aminoácidos não-protéicos	++	+++	+
Carboidratos	+++	+	+++

## 2.5. Ensaio de flavonoides totais com cloreto de alumínio

Foi feita a avaliação da quantidade de flavonoides das amostras dos extratos e frações de *Lophanthera lactescens* pelo método espectrofotométrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>).

Os valores de absorvância das amostras e os teores de flavonoides totais dos extratos de *Lophanthera lactescens* (**LLCM** – *L. lactescens* cascas metanol e **LLMM** – *L. lactescens* madeira metanol) frações do extrato metanólico das cascas: **LLCMC** (Clorofórmio), **LLCMA** (Acetato) e **LLCMM** (Metanol) e frações do extrato metanólico da madeira: **LLMMC** (Clorofórmio) e **LLMMM** (Metanol) estão descritos na **Tabela 3**, onde observou-se que o extrato e frações das cascas apresentaram maior valor médio



(LLCM – 13,34 mg/g extrato e LLCMM – 22,56 mg/g extrato ) maior que a madeira (LLMM – 9,11 mg/g extrato e LLMMM – 13,38 mg/g extrato).

**Tabela 3:** Ensaio de Flavonoides totais de *Lophanthera lactescens*

Amostra	y <sub>1</sub>	y <sub>2</sub>	y <sub>3</sub>	y <sub>méd.</sub>	mg/g extrato	mg/g extrato	mg/g extrato	MÉDIA	Desvio Padrão
<b>LLCM</b>	0,322	0,320	0,322	<b>0,321</b>	13,37	13,29	13,37	<b>13,34</b>	± <b>0,049</b>
<b>LLCMC</b>	0,263	0,261	0,265	<b>0,263</b>	10,88	10,80	10,97	<b>10,88</b>	± <b>0,084</b>
<b>LLCMA</b>	0,456	0,466	0,467	<b>0,463</b>	19,02	19,44	19,48	<b>19,31</b>	± <b>0,256</b>
<b>LLCMM</b>	0,543	0,540	0,537	<b>0,540</b>	22,69	22,56	22,43	<b>22,56</b>	± <b>0,126</b>
<b>LLMM</b>	0,222	0,223	0,221	<b>0,222</b>	9,16	9,20	9,11	<b>9,16</b>	± <b>0,042</b>
<b>LLMMC</b>	0,136	0,135	0,135	<b>0,135</b>	5,53	5,49	5,49	<b>5,50</b>	± <b>0,024</b>
<b>LLMMM</b>	0,323	0,321	0,323	<b>0,322</b>	13,41	13,33	13,41	<b>13,38</b>	± <b>0,049</b>

### 3. Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos de *Lophanthera lactescens*

#### 3.1. Extrato metanólico da madeira de *Lophanthera lactescens*

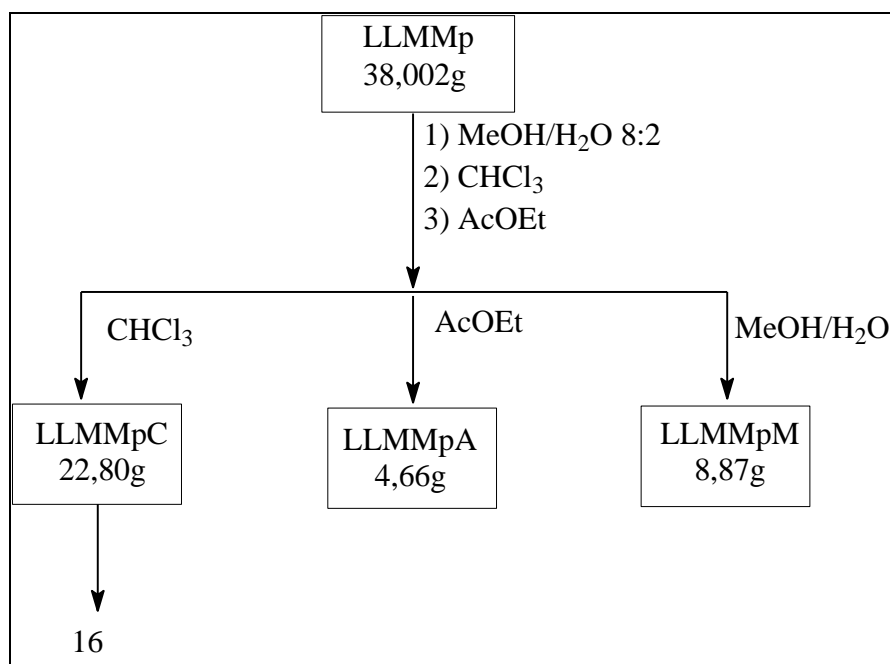
O precipitado do extrato metanólico da madeira da *Lophanthera lactescens* (LLMM<sub>P</sub>), 5,681g foi submetido a fracionamento cromatográfico em uma coluna cromatográfica de sílica gel, utilizando os eluentes: hexano, acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e MeOH/H<sub>2</sub>O, aumentando a polaridade gradativamente até mistura de metanol (MeOH) / água (H<sub>2</sub>O) em proporção de 9:1, no qual foi possível obter um total de 53 frações.

A análise comparativa das frações recolhidas por CCF permitiu reuni-las em grupos para posterior purificação. Com as frações 9 a 19 ocorreu a formação de um precipitado e após recristalização com o solvente orgânico acetato de etila, forneceu uma amostra com cristais brancos, que foi identificado com o código **LLMp-18c** e feito análise dos sinais de deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1D e 2D) e CG-EM e comparação com a literatura (ABREU *et. al.*, 1990 e GOETZ *et. al.*, 1998), a substância foi identificada como substância **16** (442,0 mg, PF **295° C**).

Foi realizado uma partição com o precipitado do extrato da madeira utilizando-se 38,00g do precipitado em 100 mL de uma mistura de metanol (MeOH)/água(H<sub>2</sub>O) 8:2, extraído 3 vezes com 100 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e em seguida de acetato de etila

(AcOEt), obtendo três partições: Clorofórmio (LLMpC, 22,80g), acetato de etila (LLMpA, 4,66g) e o resíduo metanol/água (LLMpM, 8,87g).

A partir da partição de clorofórmio (LLMC) foram obtidos precipitados, que em seguida passaram por um processo de recristalização com metanol (MeOH) (LLMCM). A partir da fração LLMCM obteve-se a mesma substância isolada anteriormente **16**, 56,0 mg. **Esquema 2**.



**Esquema 2:** Fluxograma da partição do extrato e isolamento da substância **16**.

### 3.2. Extrato metanólico de cascas de *Lophantera lactescens*

Com 34,0 g do extrato metanólico de cascas de *Lophantera lactescens* (LLCM) foi realizada extração com solventes, o extrato foi dissolvido em uma solução MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2) e a solução extraída com CHCl<sub>3</sub> e depois com AcOEt, obtendo-se as frações clorofórmio e acetato de etila, que após a destilação dos solventes, forneceram a LLCMC (4,86 g) e LLCMA (3,27g), respectivamente, além do resíduo LLCMM (16,34 g) da solução metanol/água remanescente após a destilação do solvente.

4,70g da fração LLCMC foi submetida a coluna cromatográfica de sílica gel utilizando como eluentes os solventes orgânicos diclorometano e solução diclorometano/metanol aumentando gradualmente a polaridade até metanol 100%, obtendo um total de 39 frações. As frações 4 a 6 foram reunidas após análise de cromatografia de camada fina e recromatografada em coluna de sílica gel para purificação

de seus componentes, obtendo-se as subfrações 3-6 e 11-14 como cristais brancos, às quais foram atribuídos os códigos **LLCMC-4-3.6** (32,0 mg) e **LLCMC-11-14** (35,0 mg). A fração 11-14 forneceu quantidade adicional da substância **16**.

Após análise dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e CG-EM da fração 4-3.6 foram identificados como as substâncias **5, 6 e 7**.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES ISOLADOS de *Lophantera lactescens*

#### 4.1.1. Substância 16:

A amostra **LLMMP 18C**, substância **16** (442mg, PF 295° C), foi obtida sob a forma de cristais brancos, solúvel em clorofórmio, a partir do fracionamento do extrato de metanol da madeira e do extrato das cascas de *Lophantera lactescens* (LLCMC-11-14; 35,0 mg). A elucidação estrutural da substância **16** foi realizada a partir da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D), EM, CD e comparação com dados descritos na literatura (ABREU *et. al.*, 1990 e GOETZ *et. al.*, 1998).

No espectro de I.V. (**Figura 5**) observou-se absorções de estiramento de ligação -OH em 3552,77  $\text{cm}^{-1}$ , estiramento de carboxila de éster e/ou lactona em 1743,6  $\text{cm}^{-1}$  e -C-O em 1249,83 $\text{cm}^{-1}$  e 1022,24 $\text{cm}^{-1}$ .

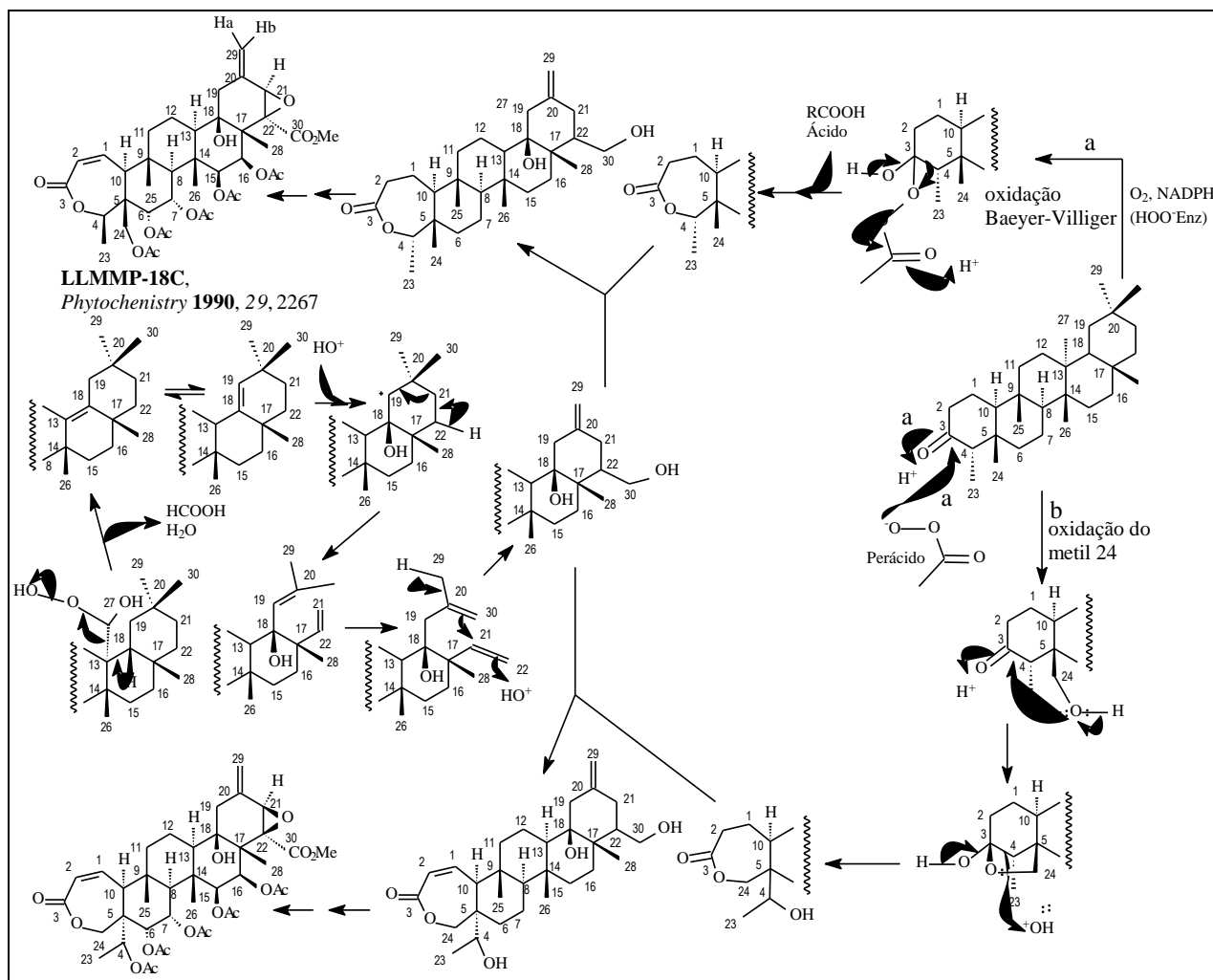
A análise do espectro de RMN $^1\text{H}$  (**Figura 7**) permitiu observar sinais que foram atribuídos a prótons metílicos de cinco grupos acetoxila ( $\delta_{\text{H}}$  2,12, 2,11, 2,01, 1,98 e 1,81) e de um grupo carbometoxi ( $\delta_{\text{H}}$  3,92). O espectro do DEPTQ (**Figura 8-10**) apresentou sete sinais entre  $\delta_{\text{CH}}$  170,94 e 167,22 que foram correlacionados com os carbonos carboxílicos de cinco grupos acetoxila, de uma carboxila de um anel lactônico. A presença das acetoxilas foi confirmada pelos sinais em  $\delta_{\text{CH}}$  21,99, 21,57, 21,57, 20,94 e 20,66. O sinal em 53,31 confirmou a existência de grupo carbometoxi. Os outros sinais foram definidos através dos deslocamentos  $\delta_{\text{CH}}$  138,45 (C  $sp^2$ ), dois carbonos  $sp^3$  ligados a oxigênio  $\delta_{\text{CH}}$  (74,77 e 65,66). Os dados das correlações obtidos nos espectros de COSY (**Figuras 11 e 12**) apresentou acoplamento entre o H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  5,45) e 3H-23 ( $\delta_{\text{H}}$  1,24), H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  5,71) e CH-8 ( $\delta_{\text{H}}$  1,76) e do CH-1 ( $\delta_{\text{H}}$  6,35) com o H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  2,40). São apresentados os espectros obtidos por Abreu e col (1990) (**Figura 6**) e comparação com os obtidos

neste trabalho. O espectro de HSQC (**Figuras 13-15**) registrado para a amostra obtida neste trabalho serviu para fazer a completa atribuição dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto.

A estereoquímica do átomo de carbono C-5 foi reformulada com base nos espectros HMBC (**Figuras 16-18**), repetição que revelou a interação do carbono carbonílico C-3 com o H-24b ( $\delta_{\text{H}}$  4.13, d,  $J=12.3$  Hz, Figuras 16-18 e **Tabela 4**) e NOESY (**Figura 19**), que revelou interação dipolar de H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  5.45, m) com H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  1.76, d,  $J=5.3$  Hz) e H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  2.40, d,  $J=8.7$  Hz). Assim, com a reformulação do C-5 a estrutura da LLMMP-18C foi caracterizada como idêntica a Coreolideo (GOETZ *et al.*, 1998; BAO *et al.*, 2002). Esta estereoquímica do C-5 atendeu também os acoplamentos  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  revelados pelo espectro 2D obtido pela técnica INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment – 2D NMR method for establishing C-C connectivities) a 100 MHz (**Figura 20**). Na estrutura **16** foi destacada a nova estereoquímica do C-5 ao lado da anterior (ABREU *et al.*, 1990) observando-se a manutenção estereoquímica dos demais átomos de carbono quirais. Outras interações espaciais dipolar-dipolar foram inseridas na estrutura **16**.

Foi realizado com a amostra o Dicroísmo circular (**Figura 21**) no qual apresentou Efeito Cotton negativo detectado a  $\lambda_{\text{máx}}$  251 nm que pode ser gerado pelo centro assimétrico (C-10) vizinho à lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada e, assim, usado para a proposta como 10S. Seguindo a configuração relativa definida com dados de RMN pode-se definir a estrutura do triterpeno como: 4R,5R,6R,7S,8S,9S,10S,13R,14S,15S,16R,17S,18R,21S,22S-friedelan-1,2-en-3-carboxi-24-O-metileno-5-[1-acetoxi-etilideno]-6,7,15,16-tetracetoxi-18-hidroxi-21,22-oxi-29-metileno-30-carboxilato de metila, conhecido como Correolideo. Apesar deste triterpeno ter sua estrutura definida anteriormente (GOETZ *et al.*, 1998) esta é uma nova informação sobre esse composto isolado. Análises adicionais com dicroísmo circular vibracional (DCV) servirão para confirmar a estereoquímica proposta.

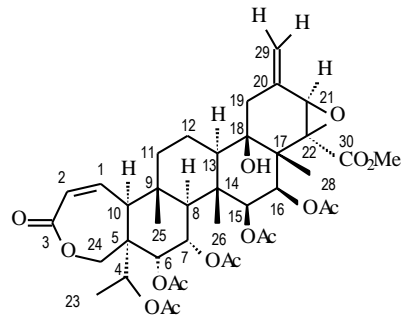
As rotas biogénicas (DEWICK, 2001) resumidas no **Esquema 3** revelam propostas estruturais de *nor-seco*-friedalanos envolvendo biomodificações de precursor 3-oxofriedelano na formação de dois tipos de anel lactônico de sete membros **A** e **B**, que aparecem em outras substâncias naturais descritas na literatura (*e. g.* CAMACHO *et al.*, 2002; TAKETA *et al.*, 2004)



**Esquema 3:** Proposta biogênica envolvendo precursor 3-oxofriedelano na bioformação da substância **16** e o isômero correspondente à proposta estrutural anterior (ABREU e outros, 1990).



13	47.15	1.36 (dd, 10.7, 2.6)		H-19a; 3H-26	47.00	1.33 (dd, 11.3, 3.0)	47.5	1.34 (dd, 2.9, 12.1)
15	75.02	4.76 (d, 3.6)	H-16	3H-26	74.87	4.74 (d, 4.0)	75.6	4.75 (d, 3.9)
16	73.73	5.73 (d, 3.6)	H-15	3H-28	73.36	5.72 (d, 4.0)	73.9	5.68 (d, 3.9)
21	63.14	4.04 (s)		H-19b; H-29a	62.92	4.02 (s)	63.5	4.00 (s)
<b>CH<sub>2</sub></b>								
11	43.35	β 1.57 (s) α 1.07 (s)		H-8; 3H-25	43.21	β 1.54 (dt, 12.8, 4.0) α 1.05 (dt, 12.8, 4.5)	43.6	1.56 (br m), β
12	16.50	1.80-1.70m			16.28	1.70 (m), 1.63 (m)	16.8	~1.71 (m, 2H)
19	35.19	α 2.28 (d, 15.1) β 2.15 (d, 15.1)		H-21; 2H-29	35.07	α 2.27 (dt, 15.0, 2.0) β 2.13 (d, 15.0)	35.6	2.24 (dt, 14.7, 1.9) β 2.13 (br d, 14.7) α
24	66.20	4.47 (d, 12.3) 4.13 (d, 12.3)		H-4; H-10	66.04	α 4.44 (br d, 12.5) b 4.12 (d, 12.5)	66.7	4.44 (br d, ~12.10) 4.09 (d, 12.5)
29	119.19	α 5.56 (s) β 5.26 (s)		2H-19; H-21	118.86	α 5.53(br s) β 5.23(br s)	119.4	5.47 (br s) 5.24 (br s)
<b>CH<sub>3</sub></b>								
23	17.10	1.24 (d)			16.87	1.23 (br d, 6.0)	17.1	1.23 (br d, 6.0)
25	20.39	1.10 (s)		H <sub>8</sub>	20.21	1.08 (s)	20.7	1.05 (br s)
26	15.14	1.48 (s)		H-8; H-15	14.87	1.46 (s)	15.2	1.46 (s)
28	14.88	1.31 (s)			14.66	1.30 (s)	15.0	1.27 (s)
<u>MeO-30</u>	53.30	3.93 (s)			53.02	3.91( )s	53.5	3.91 (s)
AcO-4	21.57	2.00 (s)			21.78	1.81 (s)		
AcO-6	21.57	2.11 (s)			20.43	2.09 s	20.9	2.10 (s)
AcO-7-	20.94	2.02 (s)			21.34	2.08 s	21.1	2.00 (s)
AcO-15	22.00	1.83 (s)			21.34	1.98 s	21.8	1.96 (s)
AcO-16	20.66	2.12 (s)			20.71	2.01 s	22.2	1.79 (s)



16

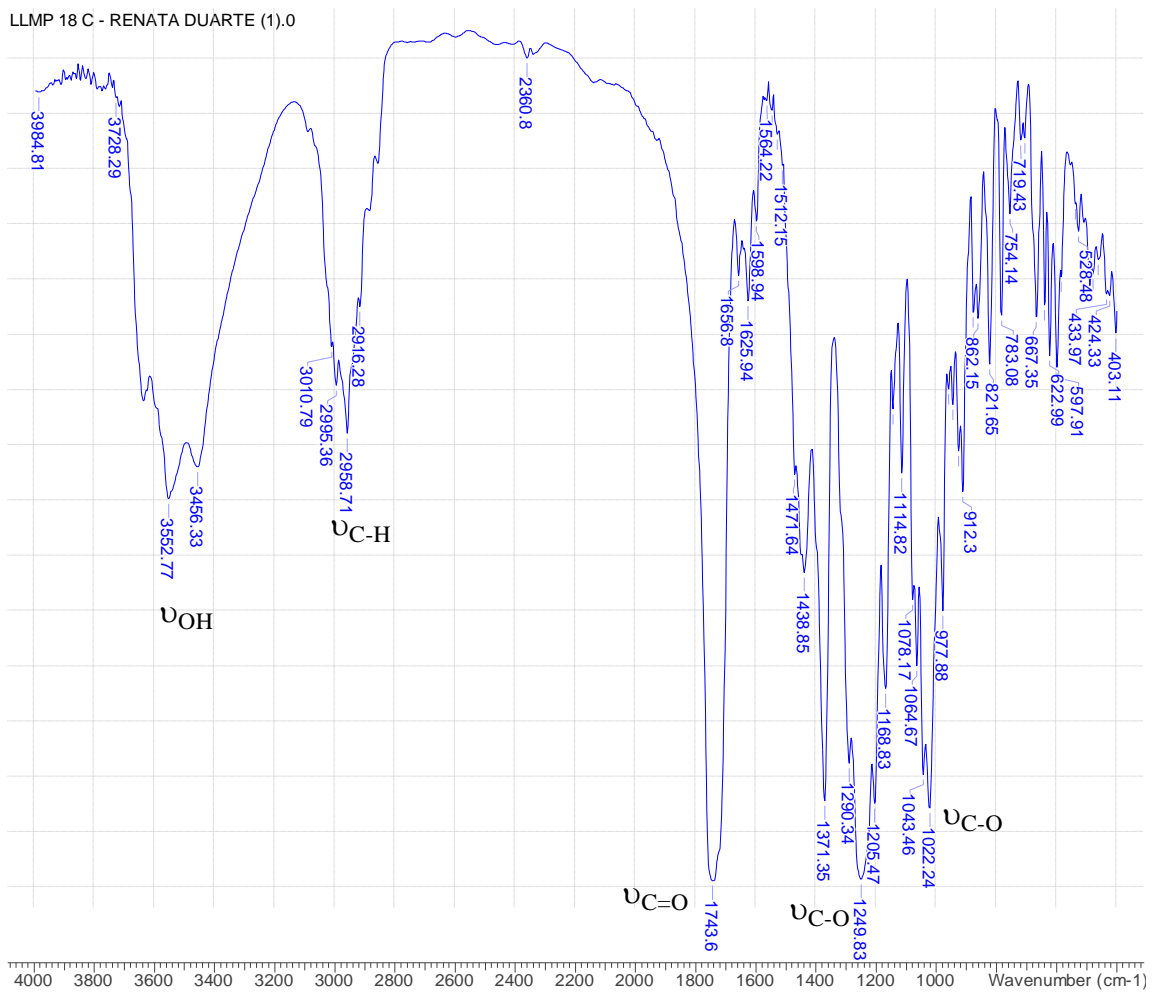


Figura: 5: Espectro de IV de 16.



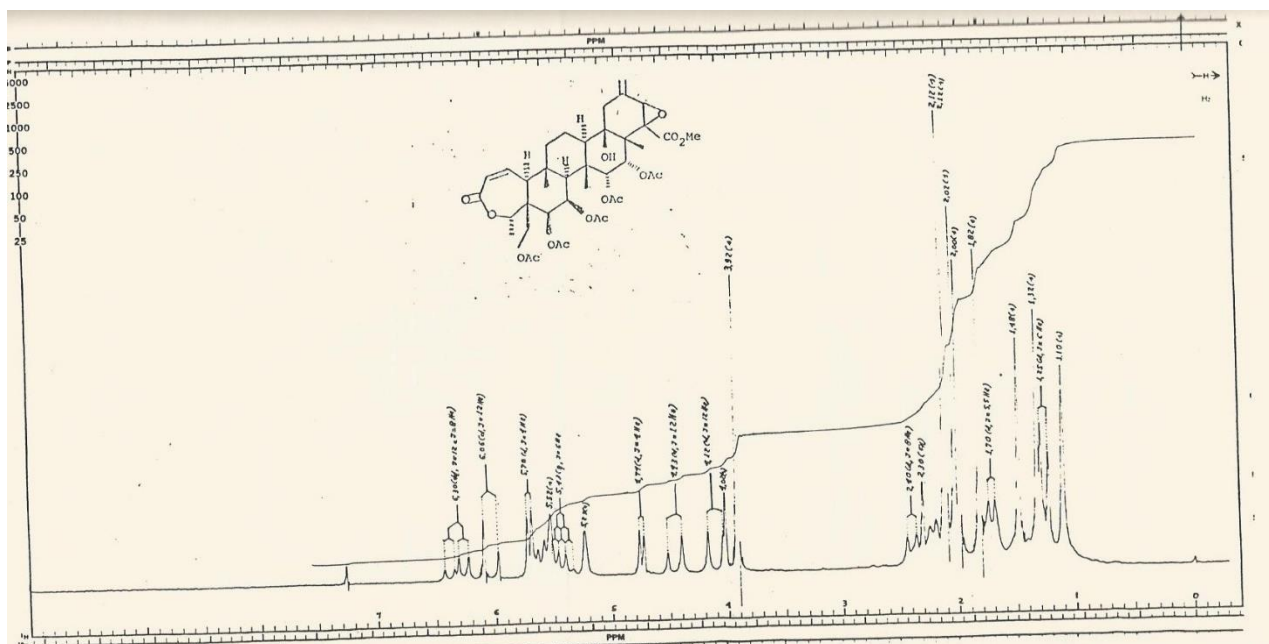


Figura 6: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (ABREU, 1990)

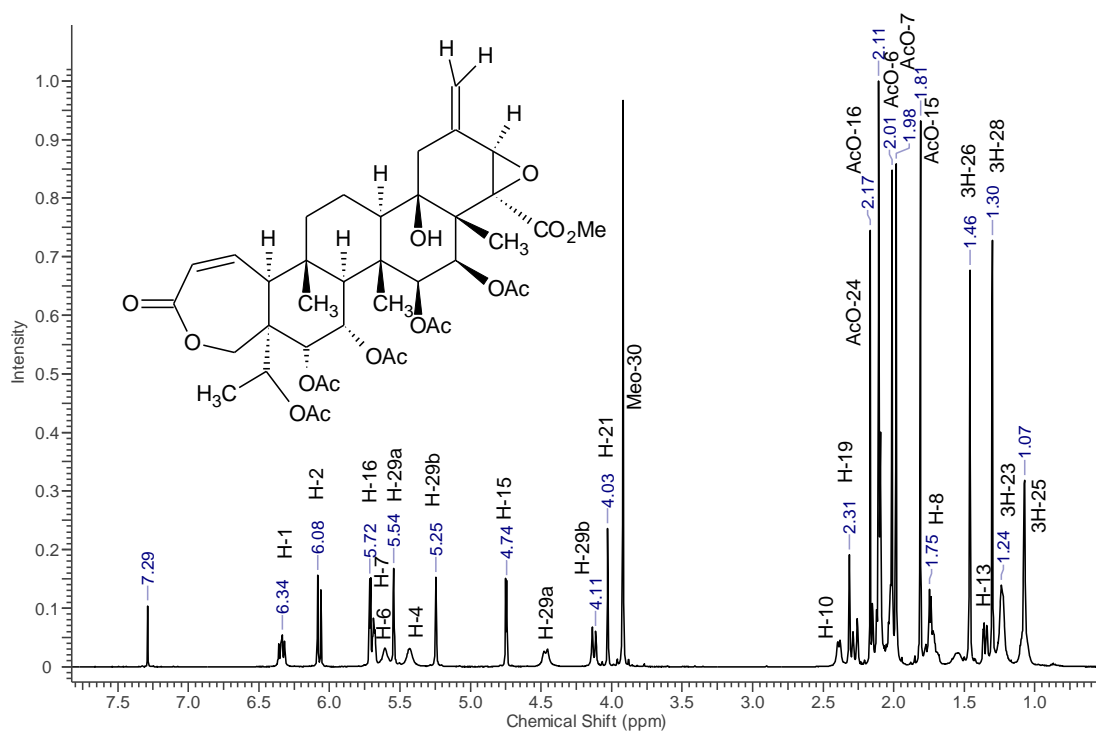
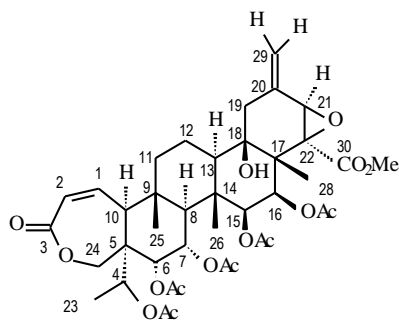


Figura 7: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 16.



16

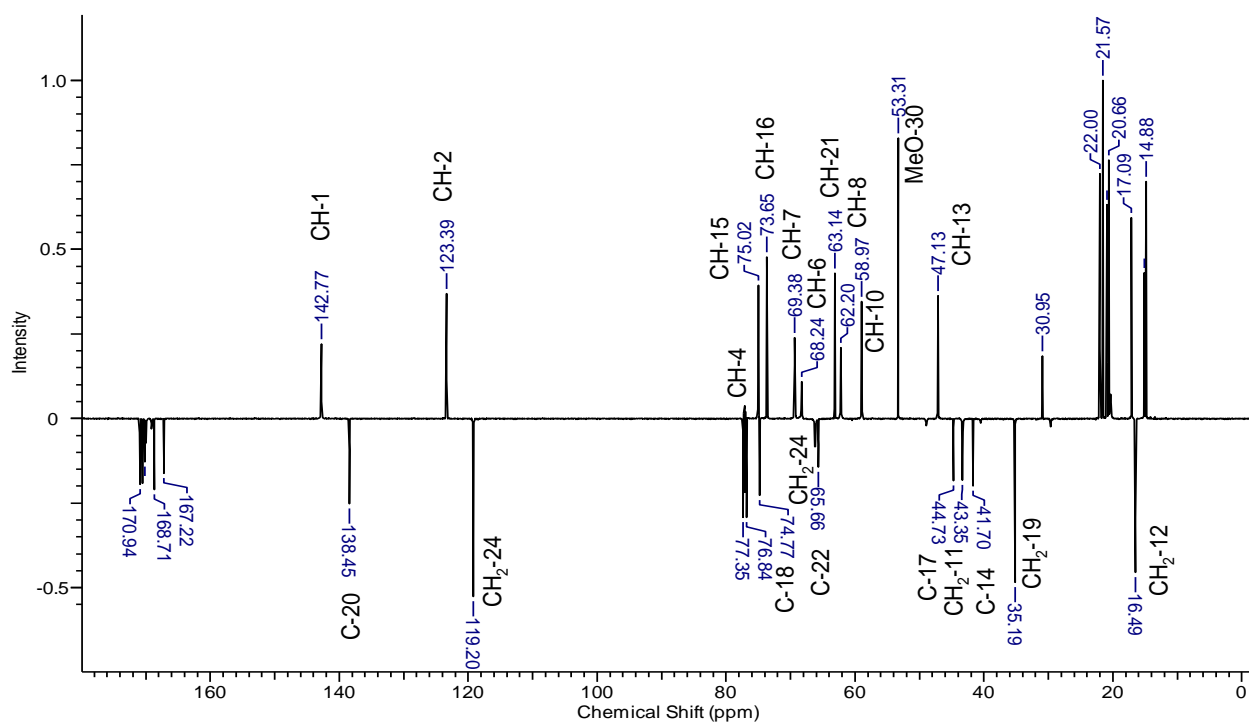
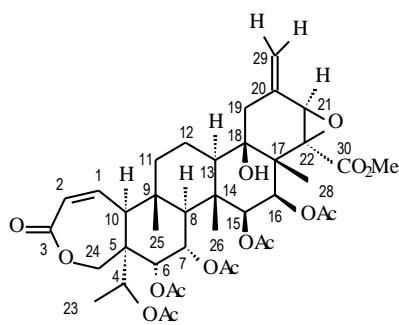
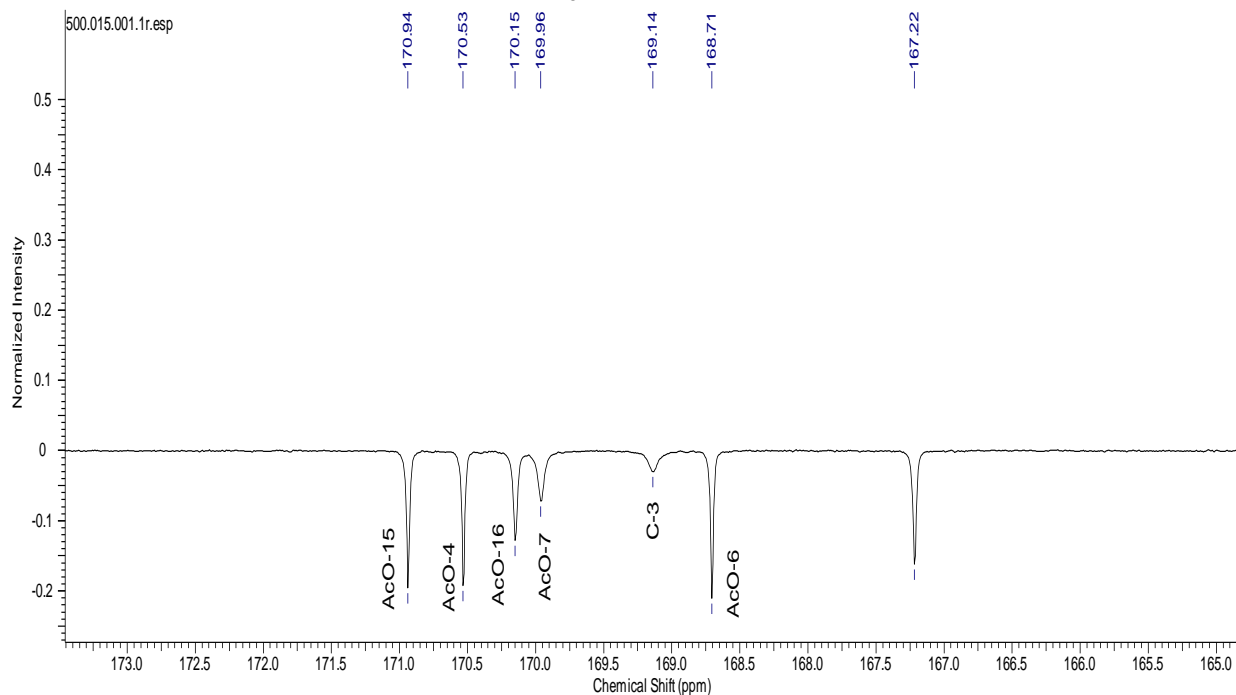


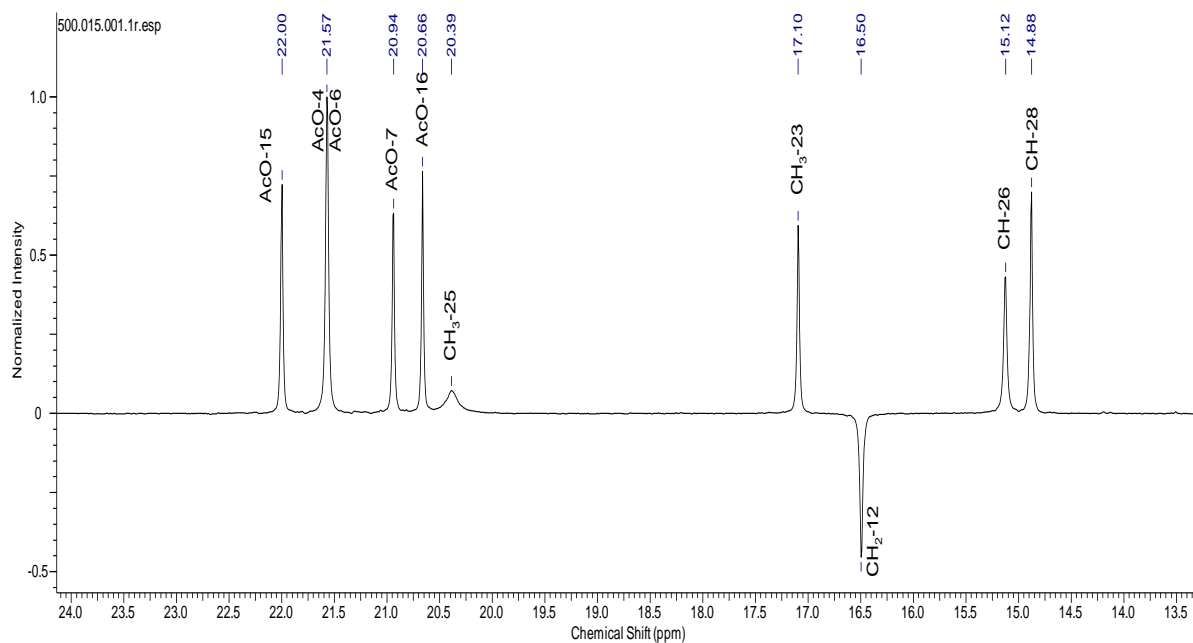
Figura 8: Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 16.



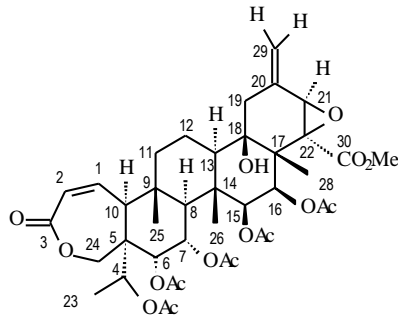
**16**



**Figura 9:** Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **16**.



**Figura 10:** Expansão do espectro de DEPTQ (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **16**.



16

500.012.001.2rr.esp

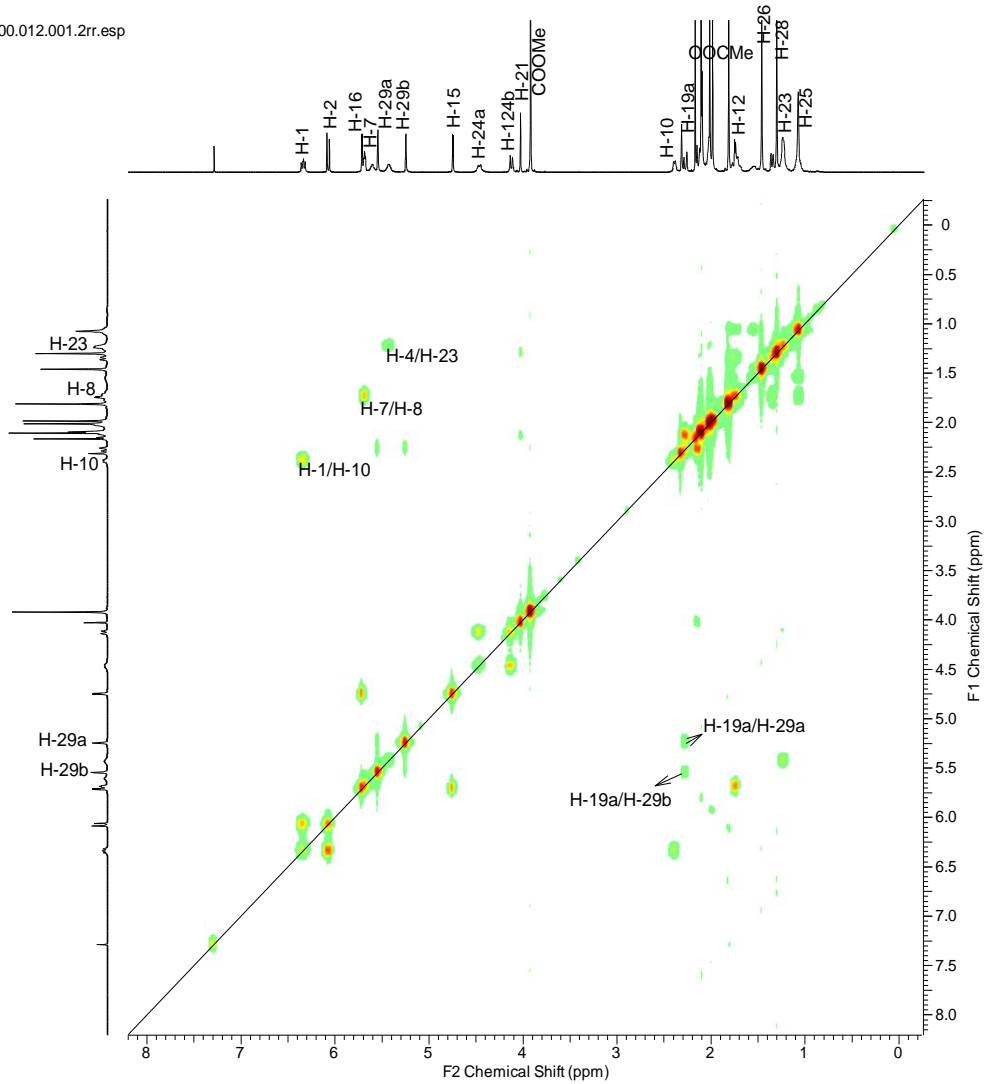
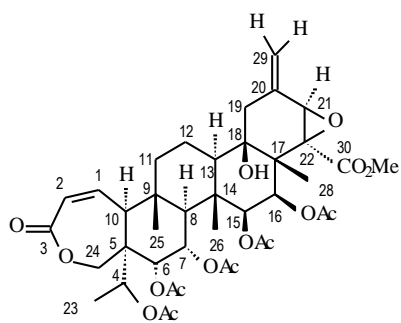
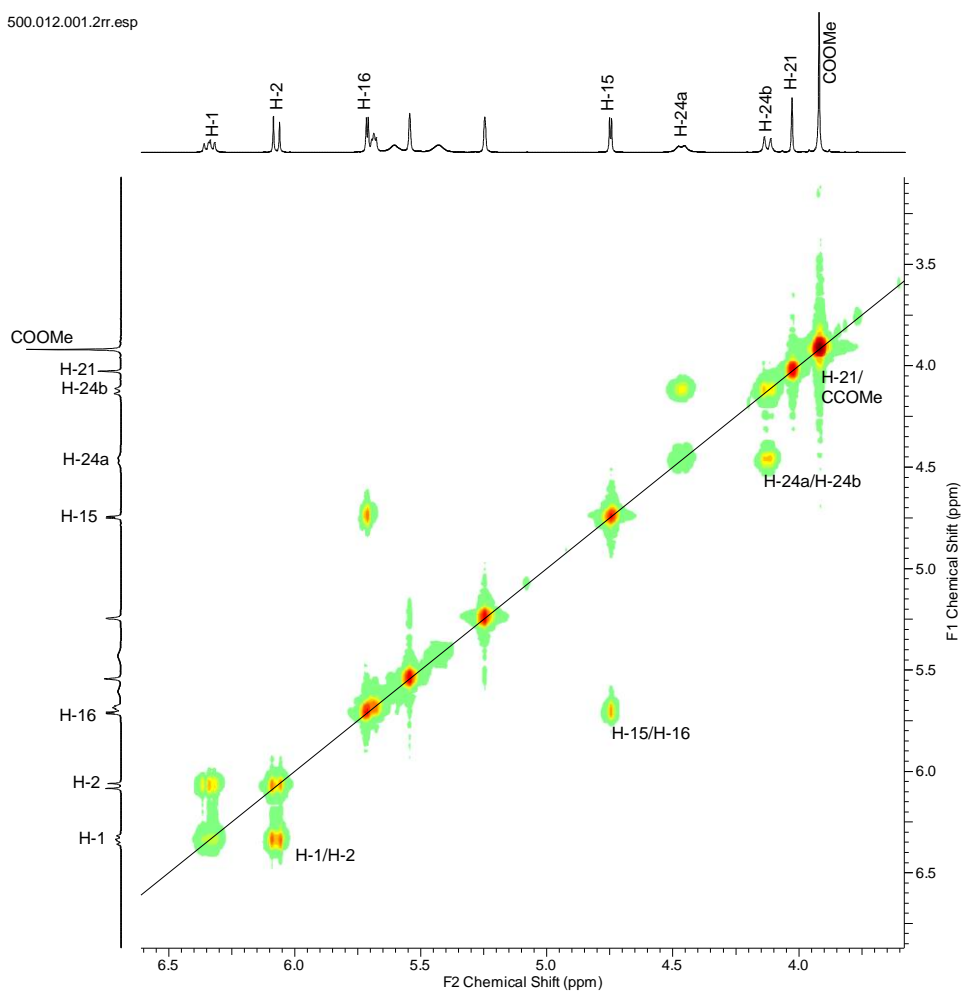


Figura: 11: Espectro de COSY (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 16.

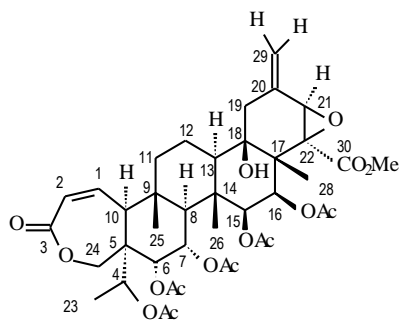


**16**

500.012.001.2rr.esp



**Figura: 12:** Expansão do espectro de COSY (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **16**.



16

500.014.001.2rr.esp

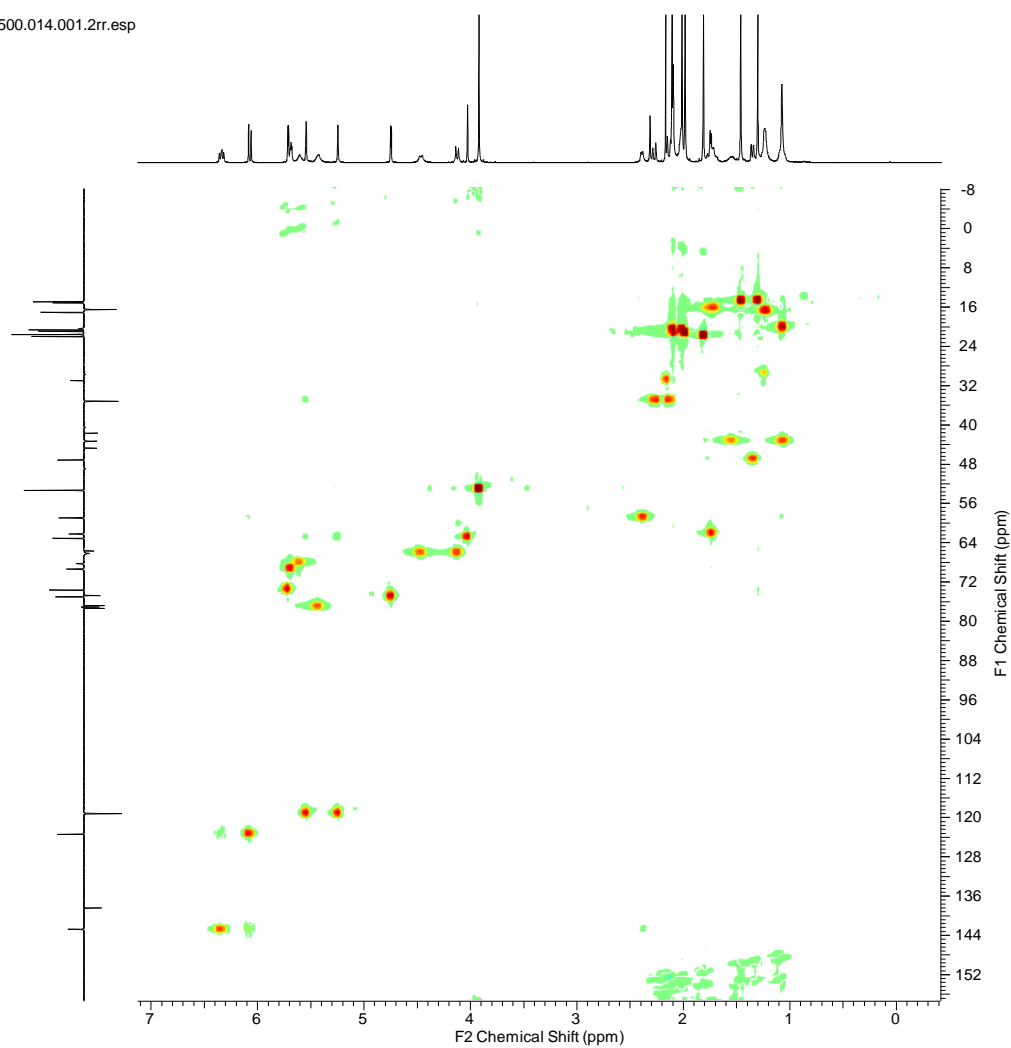
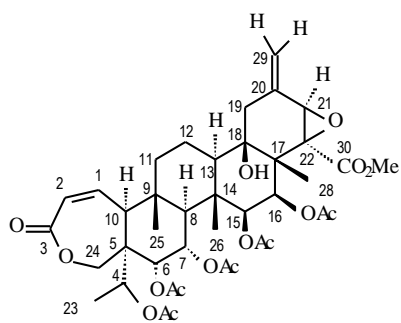


Figura 13: Espectro HSQC (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 16.



16

500.014.001.2rr.esp

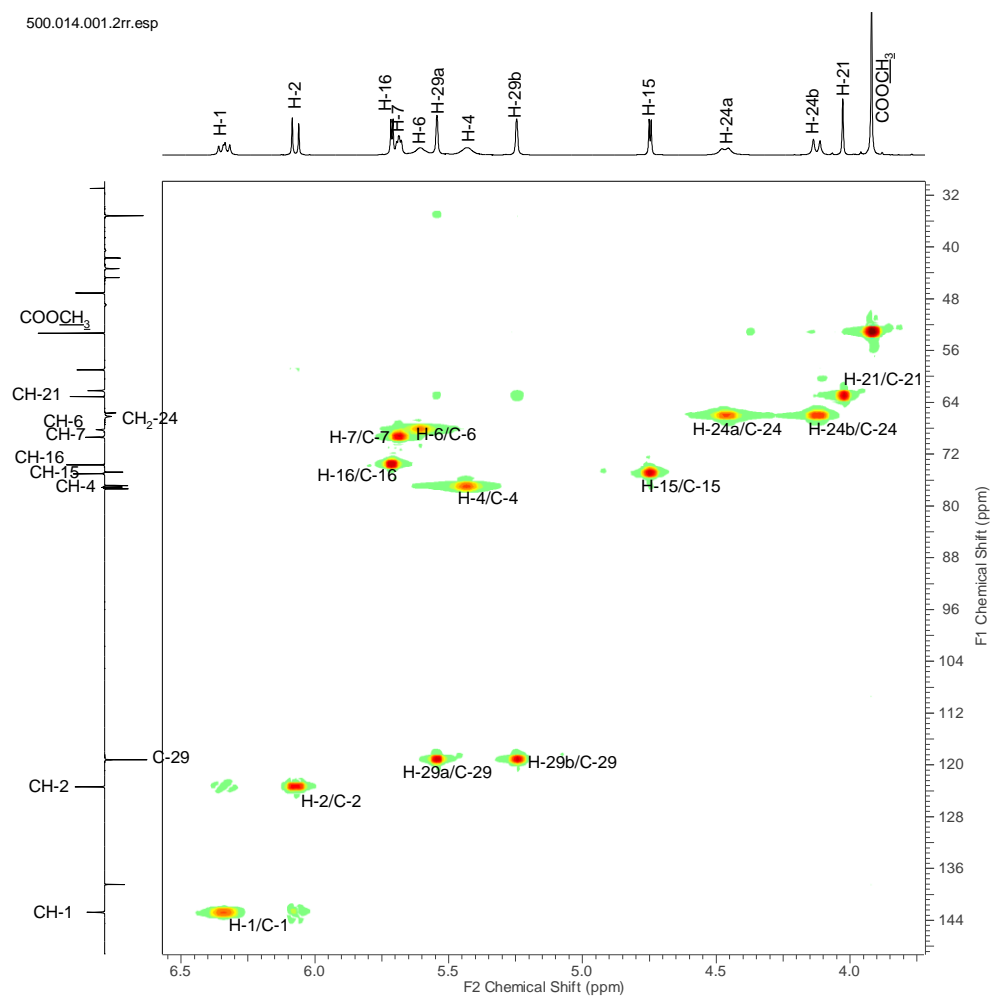
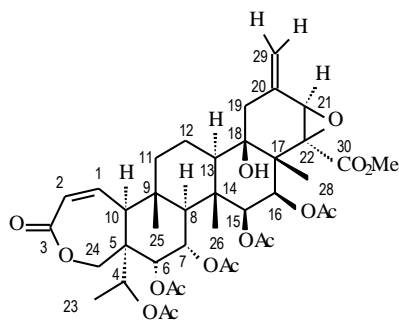


Figura 14: Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 16.



16

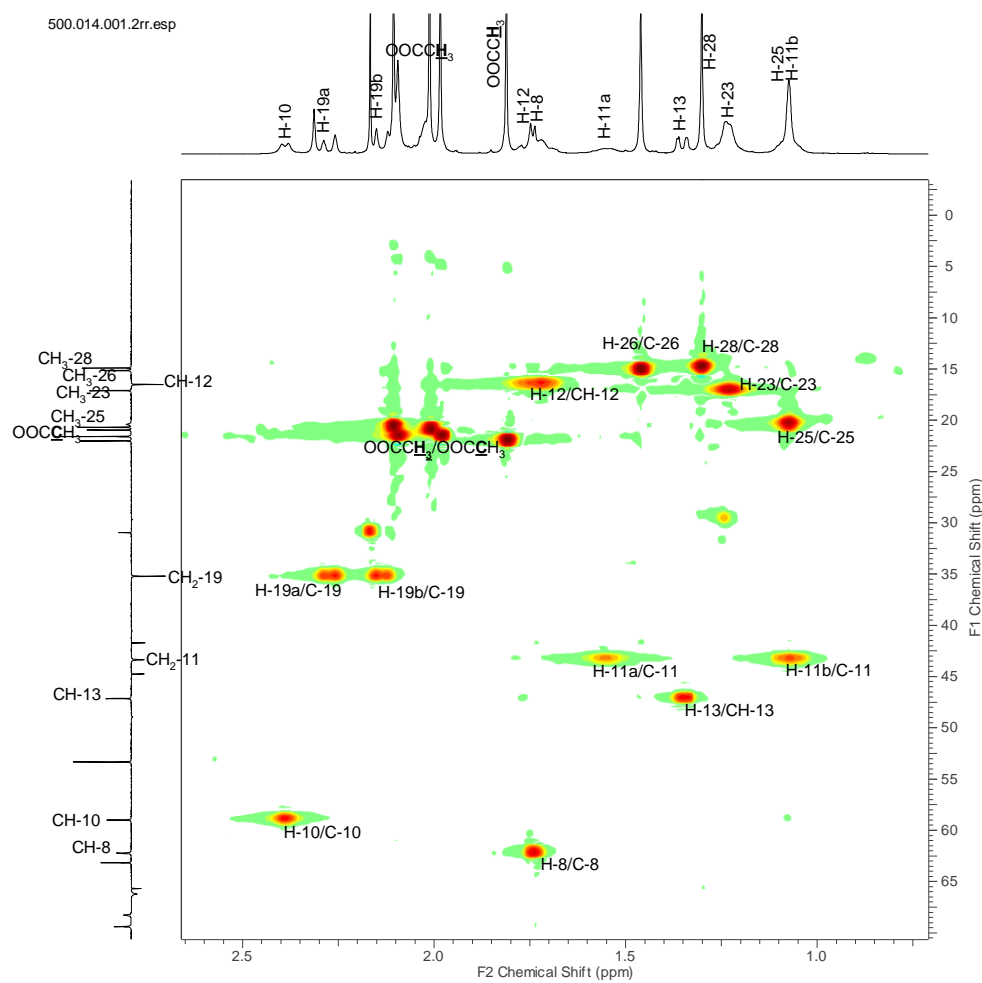
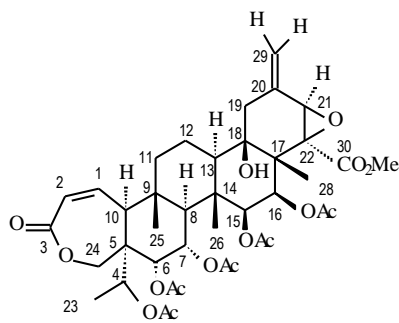


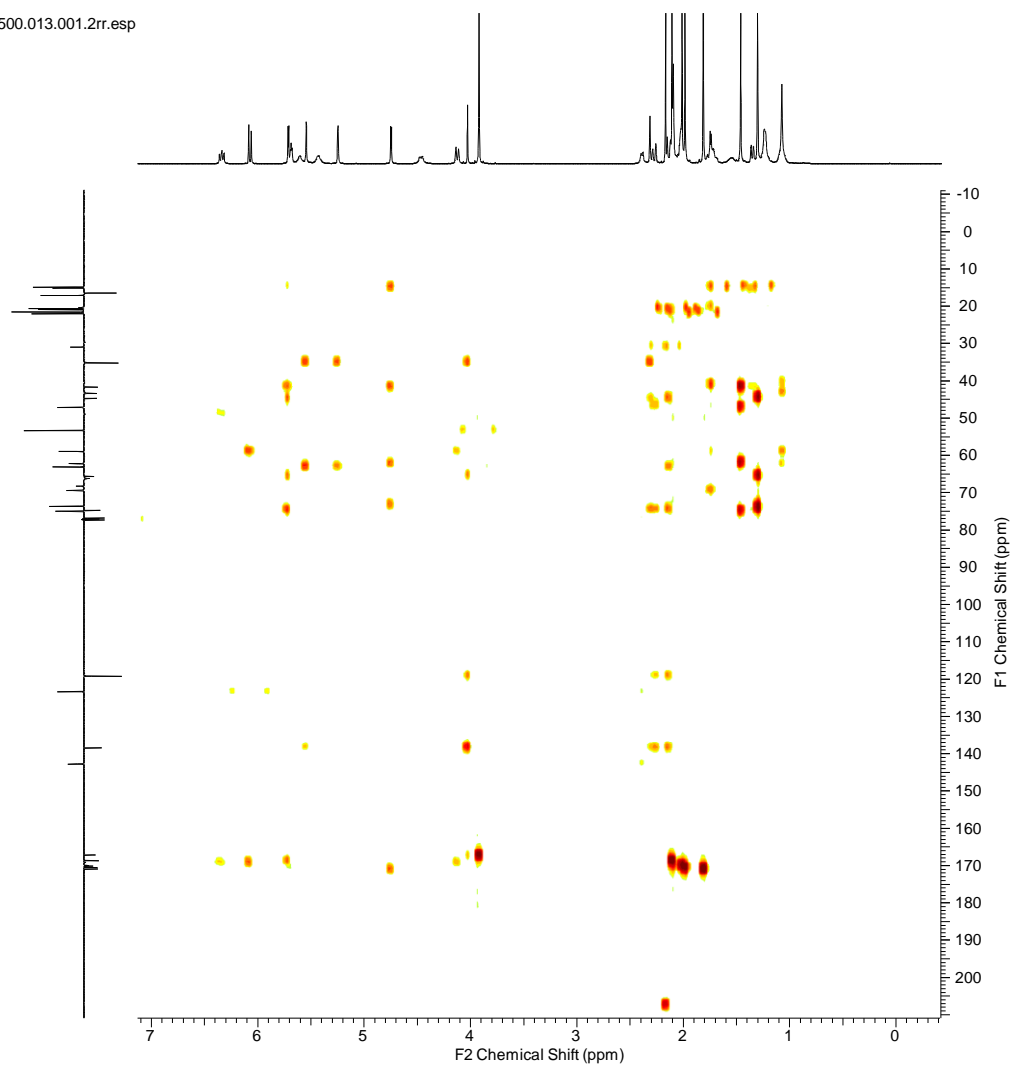
Figura 15: Expansão do espectro HSQC (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de 16.



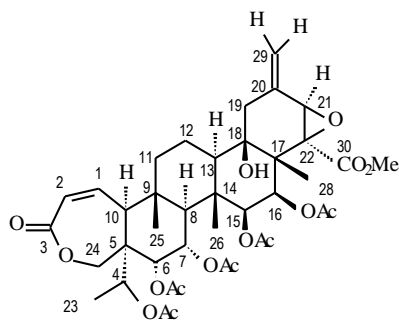


**16**

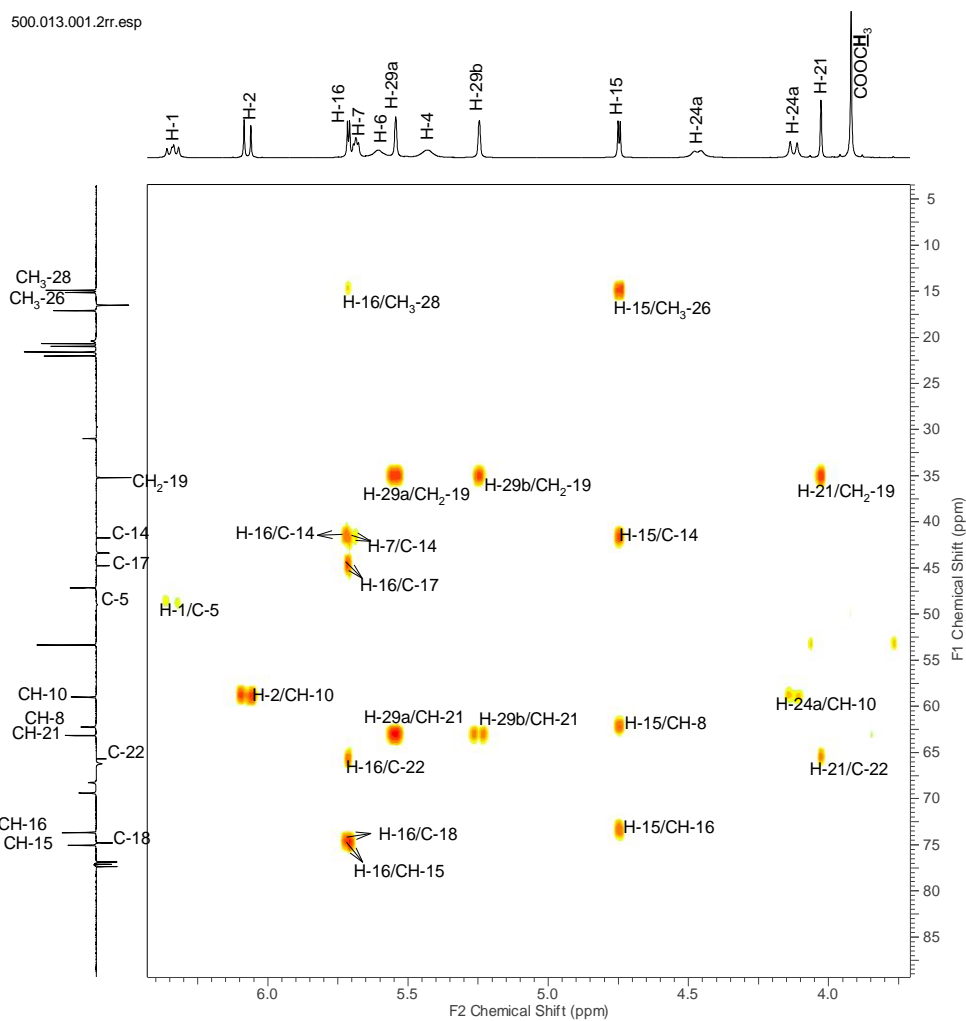
500.013.001.2rr.esp



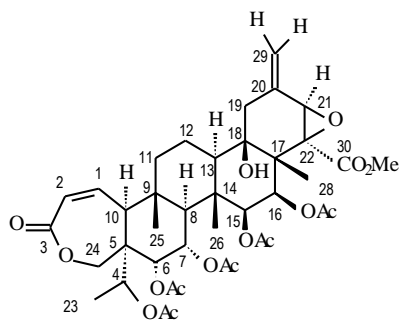
**Figura: 16:** Espectro HMBC (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **16**.



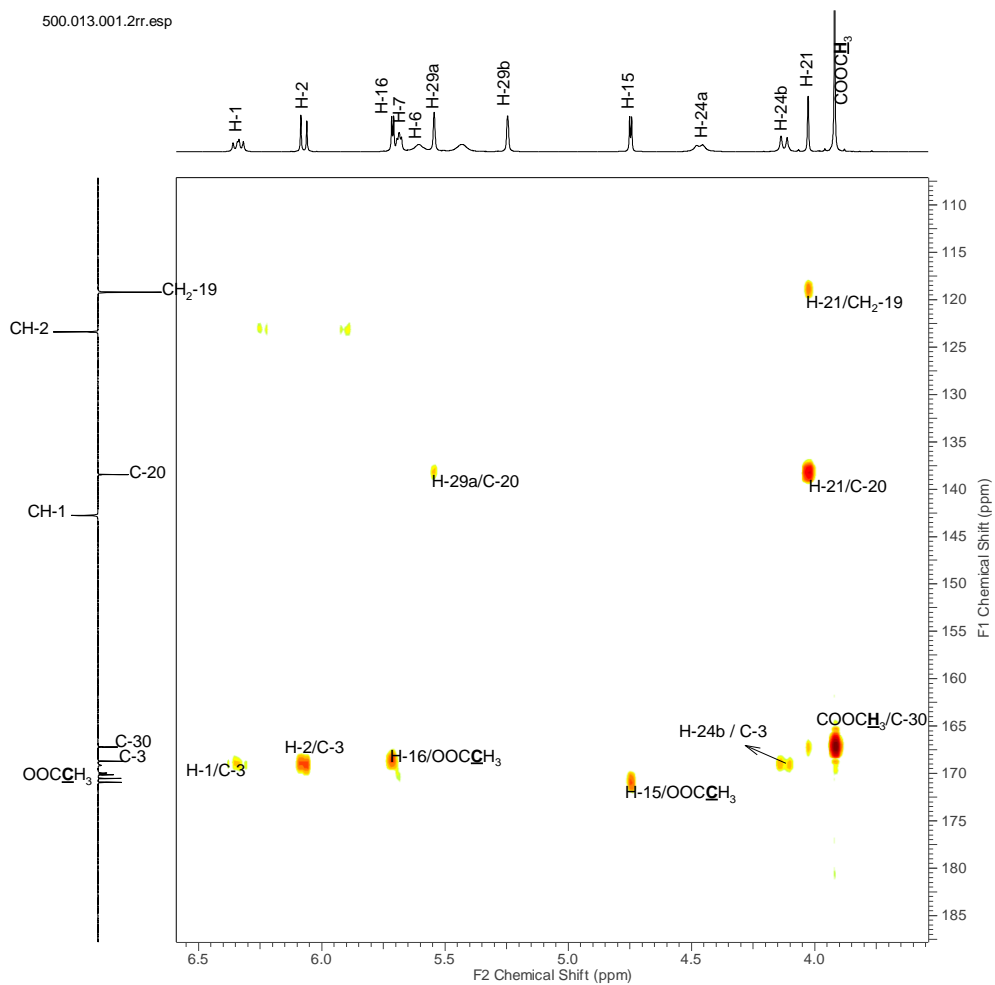
**16**



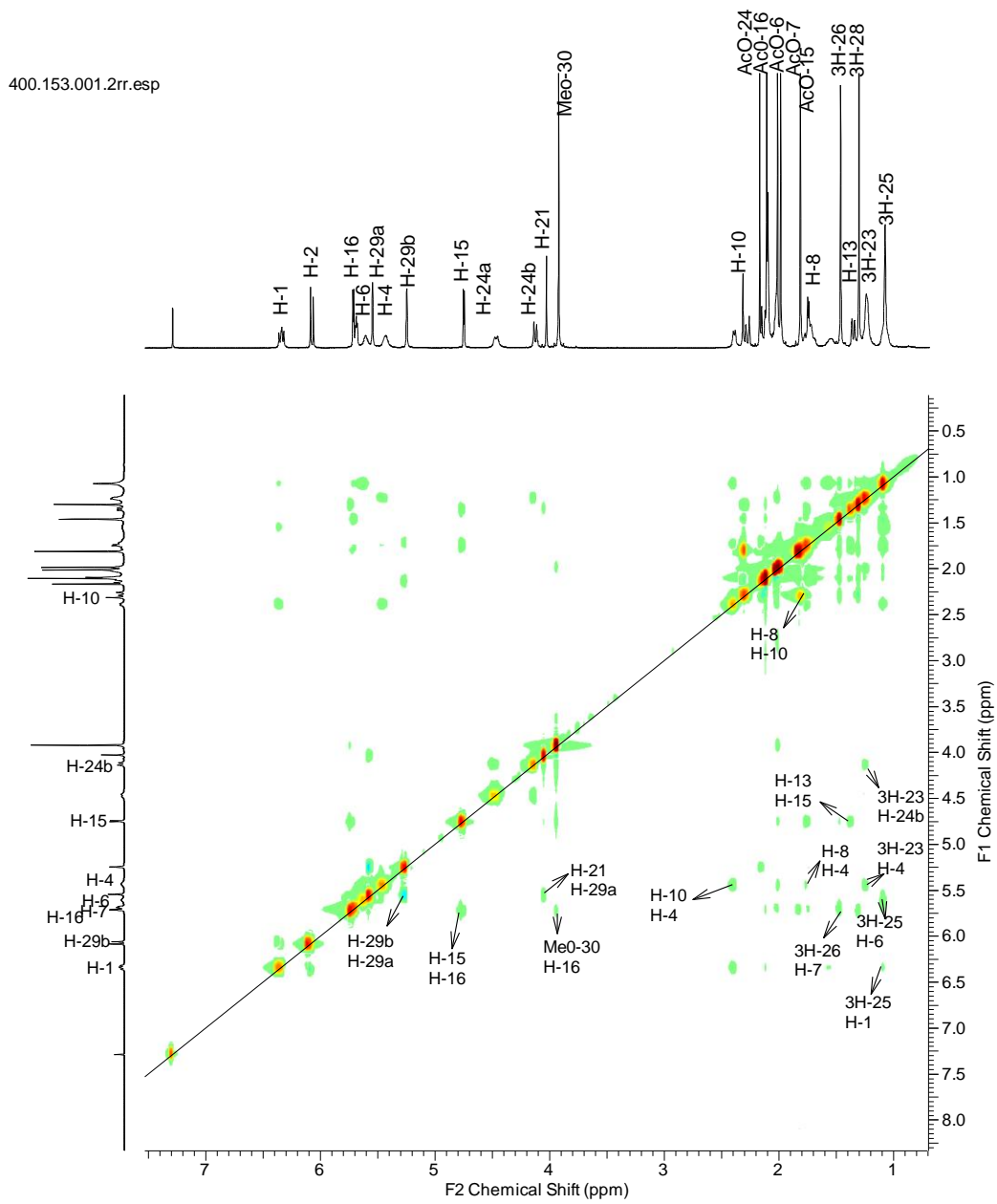
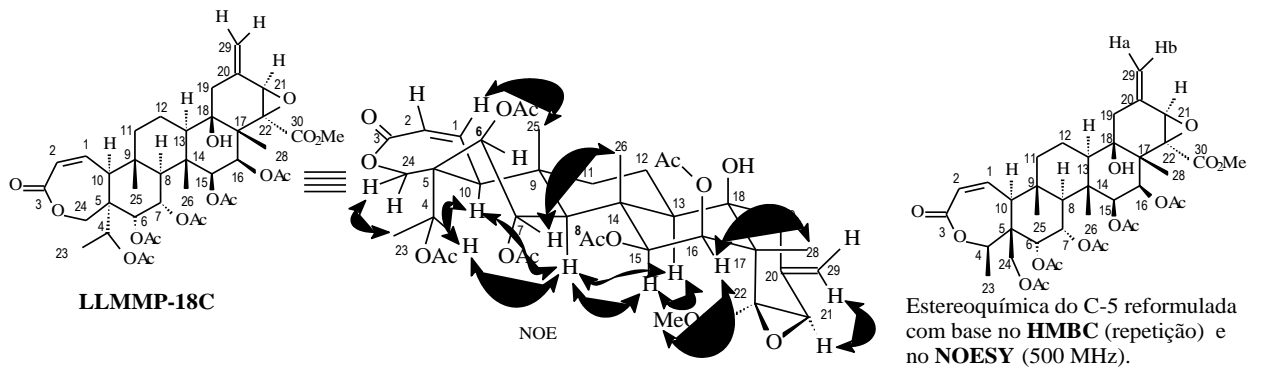
**Figura 17:** Expansão do espectro HMBC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **16**.



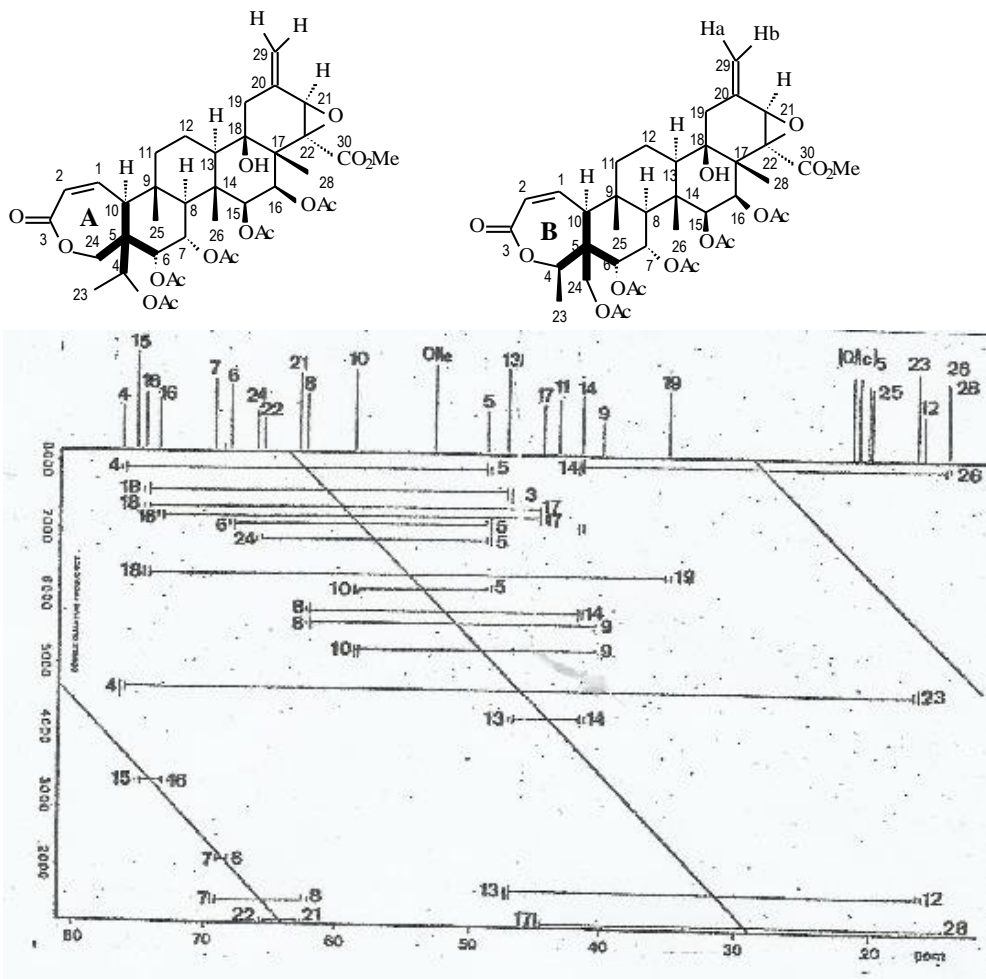
**16**



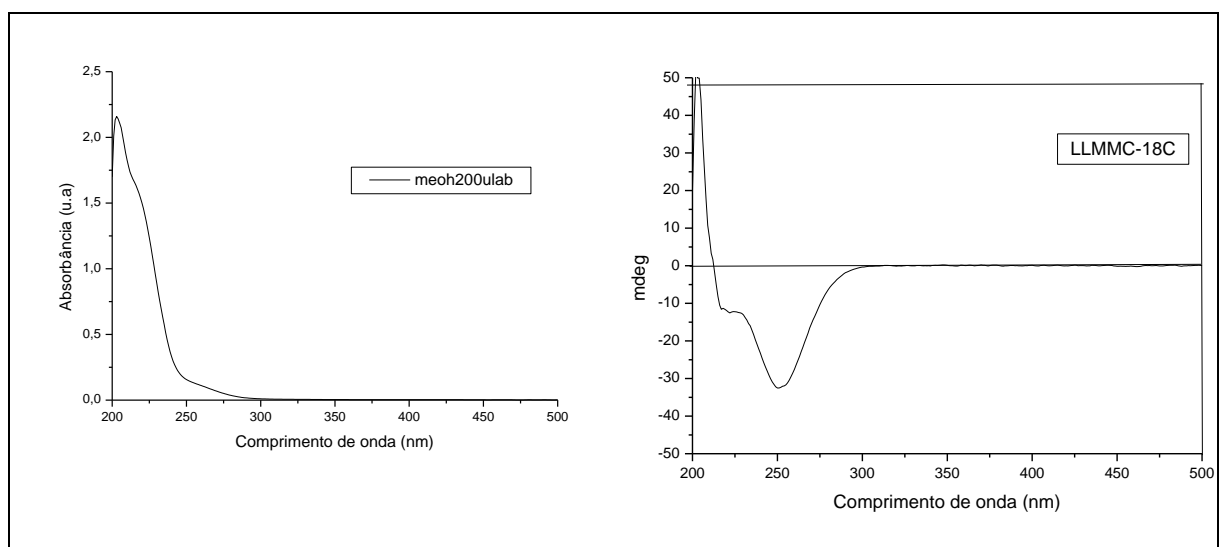
**Figura 18:** Expansão do espectro HMBC (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **16**.



**Figura 19:** Espectro de NOESY de 16



**Figura 20:** Acoplamentos  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  revelados como mapa de conectividade 2D obtido pela técnica INADEQUATE



**Figura 21:** Curvas de UV e DC (MeOH, 200uL) de 16.

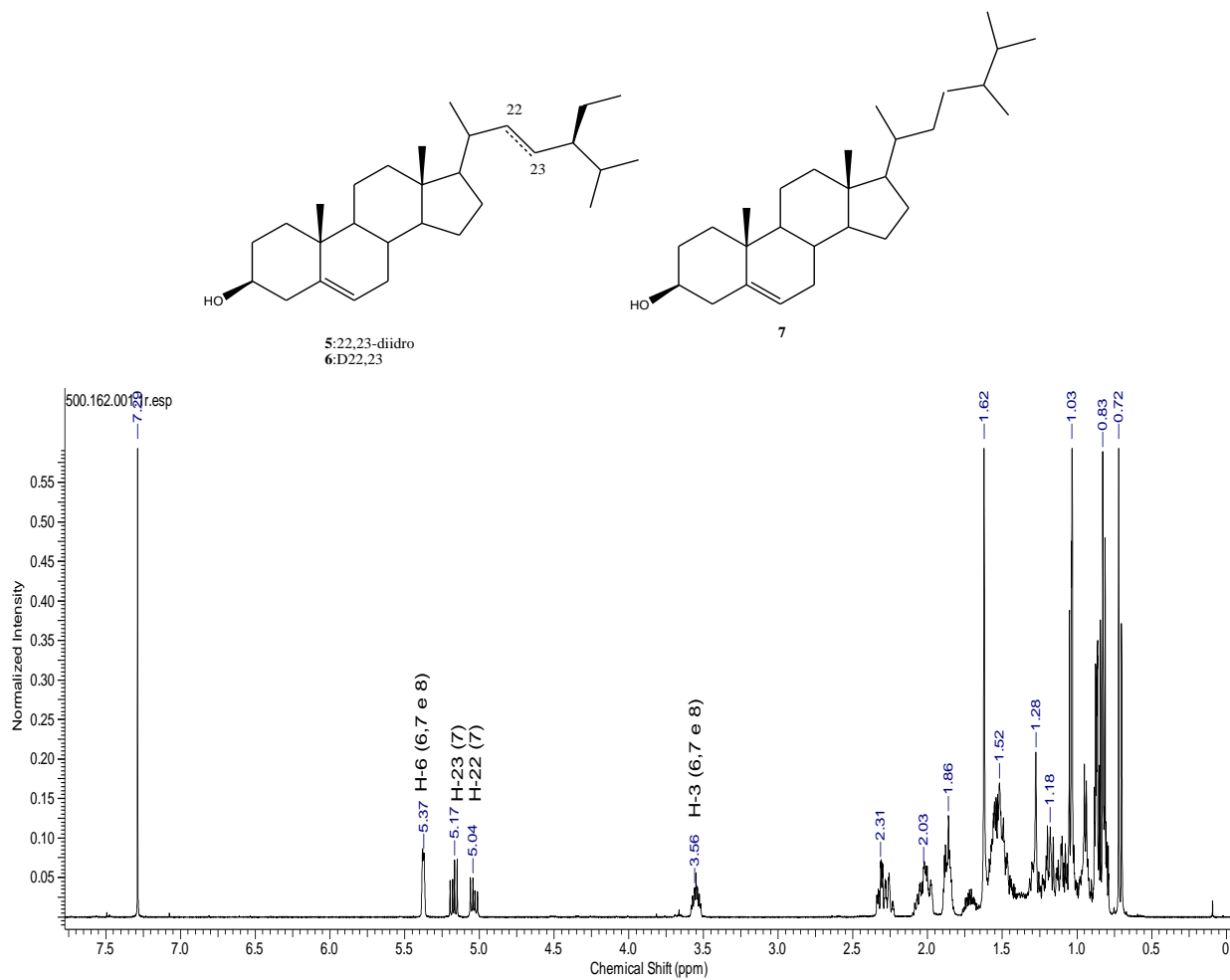
#### 4.1.2. Substâncias 5, 6 e 7.

A amostra **LLCMC 4-3.6**, substâncias **5, 6 e 7** (32mg, P.F 120-122°C), foi obtida sob a forma de cristais brancos, solúvel em clorofórmio, a partir do fracionamento do extrato de metanol das cascas de *Lophantera lactescens*. A elucidação estrutural das substâncias 6, 7 e 8 foi realizada a partir da análise dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (DEPTQ) e EM e comparação com dados descritos na literatura (JAIN & BARI, 2010).

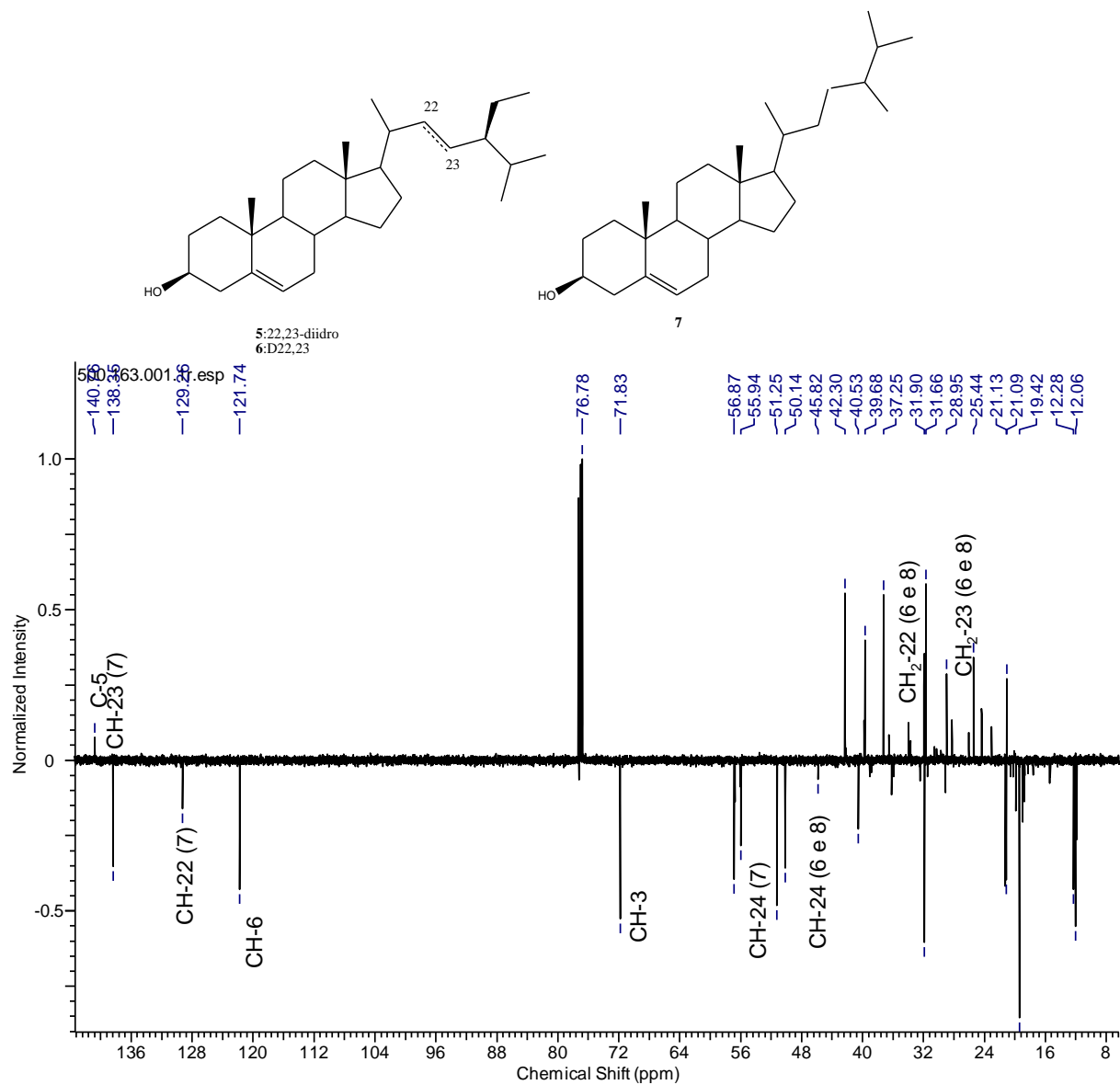
Com a análise por RMN $^1\text{H}$  (**Figura 22**) observou-se a presença de sinais atribuídos a prótons metílicos entre 0,72 ppm e 1,62 ppm. Os multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,55 ppm são atribuídos aos hidrogênios carbinólicos, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,38 ppm atribuídos aos hidrogênios olefínicos e os dubletos de dubletos (dd) em  $\delta_{\text{H}}$  5,05 pps e 5,14 ppm representantes dos hidrogênios típicos dos esteróides.

O espectro DEPTQ (**Figura 23**) revelou a presença de sinais de carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{CH}}$  121,80 e 140,90, que foram atribuídos aos carbonos C-5 e CH-6, dos três componentes, em  $\delta_{\text{CH}}$  138,29 e 129,47, correlacionados com os carbonos metínicos CH-22 e CH-23 de **5** e em  $\delta_{\text{CH}}$  71,68 do carbono carbinólico CH-3 também representante dos esteróides.

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) permitiu caracterizar a mistura dos três esteróides **5, 6 e 7** (**Figura 24**), através dos picos correspondentes aos ions moleculares  $[\text{M}]^{+}$  em  $m/z$  400 (**5**), 412 (**6**) e 414 (**7**), com os tempos de retenção  $T_{\text{R}}$  25,558; 26,184 e 27,135 minutos, respectivamente, com maior porcentagem do estigmasterol (**6**), com 45,71%.



**Figura 22:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **5**, **6** e **7**.



**Figura: 23:** Espectro de DEPTQ (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **5, 6 e 7**



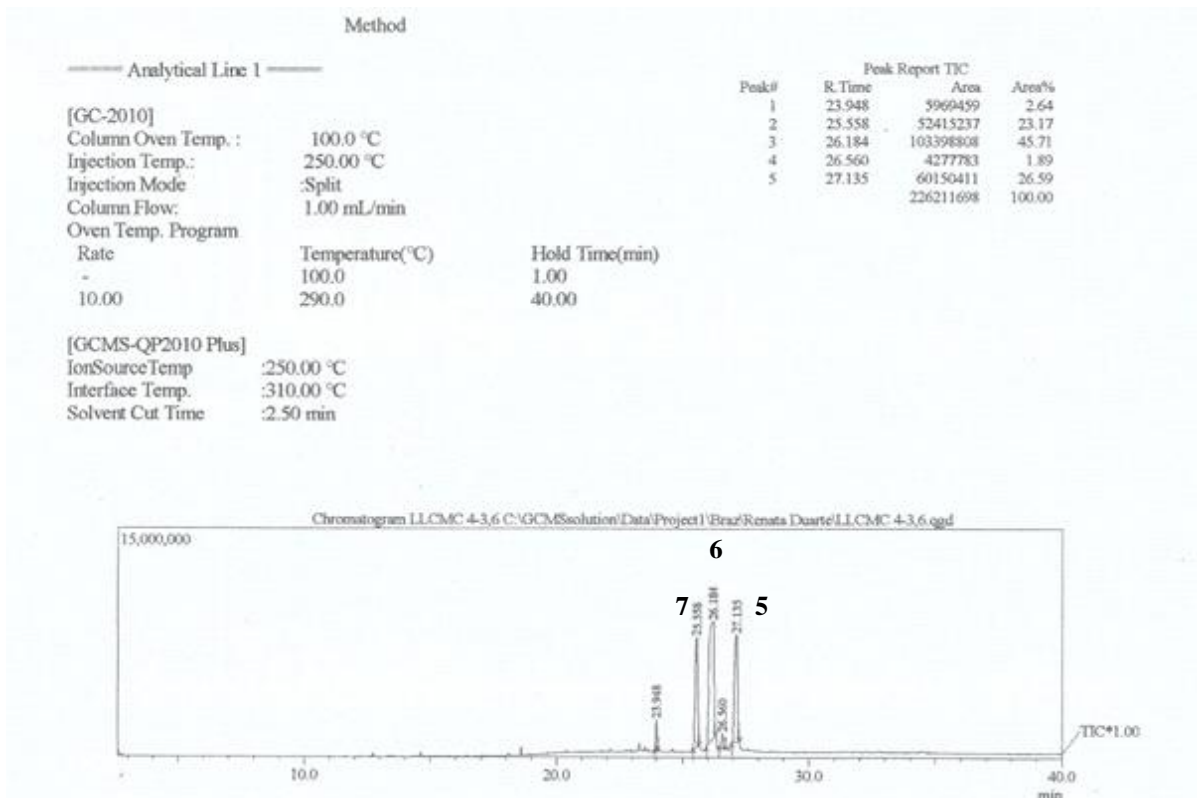
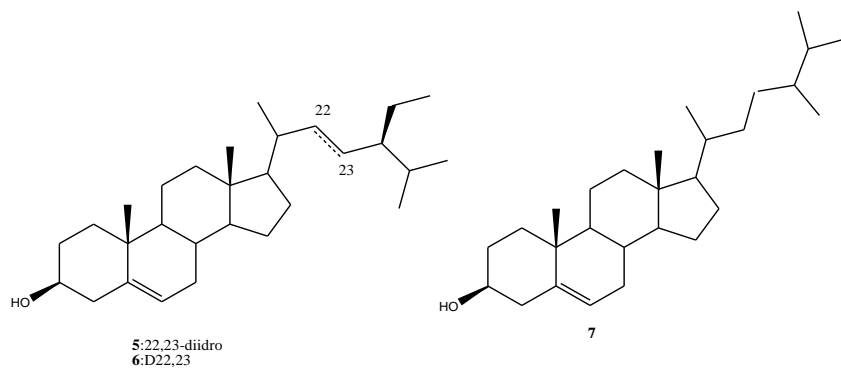


Figura 24: Cromatograma de 5, 6 e 7

## 5. Conclusões sobre o isolamento das substâncias de *Lophanthera lactescens*

Com a espécie *Lophanthera lactescens* foi realizada a prospecção fitoquímica do extrato metanólico bruto da madeira, do precipitado recolhido do extrato metanólico e do extrato metanólico bruto das cascas de *Lophanthera lactescens*, nos quais os testes nos extratos da madeira apresentaram positivos para saponinas, antraquinonas, esteróides e triterpenóides, alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, aminoácidos não-protéicos, carboidratos e extrato das cascas também apresentou valores positivos para as mesmas classes de substâncias com exceção de alcaloides, assim como no estudo fitoquímico anterior, foram isolados metabólitos das classes dos esteroides e triterpenos. Também foi realizada avaliação da quantidade de flavonoides das amostras dos extratos e frações de *Lophanthera lactescens* onde observou-se que o extrato e frações das cascas apresentaram valor médio maior que a madeira, porém não foi isolada essa classe de substância no presente estudo fitoquímico,

O estudo do extrato metanólico da madeira e cascas de *Lophanthera lactescens* levou ao isolamento dos esteroides sitoesterol, estigmasterol e campesterol e do *nor*-triterpeno correolideo que, além da confirmação da correção da estrutura registrada na literatura foi proposta a estereoquímica absoluta, sendo, entretanto definida como 4*R*,5*R*,6*R*,7*S*,8*S*,9*S*,10*S*,13*R*,14*S*,15*S*,16*R*,17*S*,18*R*,21*S*,22*S*-friedelan-1,2-en-3-carboxi-24-O-metileno-5-[1-acetoxi-etilideno]-6,7,15,16-tetracetoxi-18-hidroxi-21,22-oxi-29-metileno-30-carboxilato de metila. (DOS SANTOS *et. al.*, 2015).

A madeira desta espécie já possui estudo fitoquímico anterior, no presente trabalho através do estudo fitoquímico da madeira e cascas da espécie foi possível confirmar que a espécie é bioproductora de triterpenos e esteroides e confirmar a estrutura química do *nor*-triterpeno isolado.

## 6. REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO III

- ABREU, H.S. **Estudos dos constituintes químicos da espécie from *Lophanthera lactescens* Ducke**. Tese de doutorado: UFRRJ/ICE-PPGQO, 1985
- ABREU, H. S.; FO R. B.; GOTTLIEB H. E.; SHOOLERY J. N. A Nor-triterpenoid from *Lophanthera Lactescens*. *Phytochemistry*, v. 29, n 7, p. 2257 – 2261, 1990.
- BAO, J.; BAKER, R. K.; DOSS, G. A.; KAYSER, F.; KOTLIAR, A.; MIAO, S.; PARSONS, W. H.; RUPPRECHT, K. M. Novel Fragmentation Reaction of Correolide. *Organic Letters* Vol. 4, Issue 11, 1871-1873, 2002.
- CAMACHO, M. del R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; MARLEY, D.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C. Assessment of the Antiprotozoal Activity of *Galphimia glauca* and the Isolation of New Nor-secofriedelanes and nor-friedelanes. *J. Nat. Prod.* Vol.65, 1457-1461, 2002.
- DANELLI, M.G.M.; SOARES, D.C.; ABREU, H.S.; PEÇANHA, L.M.T.; SARAIVA, E.M. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. *Phytochemistry* 70 608-614, 2009.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach* (Second Edition), John Wiley & Sons Ltd, 2001.
- DOS SANTOS, G. C. M.; FERNANDES, R. D.; BARROS, T. R.; ABREU, H. S.; SUZART, L.R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R.; MARINHO, B. G. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Extract from the Stem Bark of *Lophanthera lactescens*. *Planta Medica*, v. 1, p-1-9, 2015.
- GOETZ, M. A.; HENSENS, O. D.; ZINK, D. L.; BORRIS, R. P.; MORALES, F.; TAMAYO-CASTILLO, G.; SLAUGHTER, R. S.; FELIX, J., BALL, R.G. Potent Nor-triterpenoid Blockers of the Voltage-gated Potassium Channel  $K_{V1.3}$  from *Spaethea correae*. *Tetrahedron Letters* Vol.39, 2895-2898, 1998.
- LORENZI, R. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 1992. 233 p.

MAMEDE, M.C.H. 2015. *Lophanthera* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB23509> Acesso em: 26 Jun. 2016.

PAOLI, A.A.S. Morfo-anatomia de frutos e sementes de *Lophanthera lactescens* Ducke (MALPIGHIACEAE). Rio Claro, SP. *Revista Brasileira de Sementes*, 19 (2): 237-243. 1997

TAKETA, A. T. C.; LOZADA-LECHUGA, J.; FRAGOSO-SERRANO, J.; M.; VILLAREL, M. L.; MIRANDA R. P. Isolation of Nor-secofriedelanes from the Sedative Extracts of *Galphimia glauca*. *J. Nat. Prod.* Vol.67, 644-649, 2004.

## CAPÍTULO IV ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As atividades biológicas testadas foram as atividades antioxidantes com os extratos e frações de *Justicia wasshauseniana* e *Tetrapteryx acutilfolia* e o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico das cascas do caule de *Lophantera lactescens* e do extrato metanólico das folhas de *Justicia wasshauseniana*.

Os resultados observados nos testes para a avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico das cascas do caule de *Lophantera lactescens* gerou um artigo (DOS SANTOS, *et. al.*; 2015).

### **1. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH**

#### **1.1. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando UV.**

A atividade sequestradora de radicais livres foi realizada com o extrato bruto metanólico das folhas e caule de *J. wasshauseniana* (JWFM e JWCM). A solução estoque dos extratos foi preparada a 10 mg/mL. Quantidades apropriadas (0,1-800µL) destes extratos foram transferidas para vidros de penicilina âmbar contendo 1mL da solução de DPPH (0,3mM em MetOH) fornecendo as concentrações finais. Cada concentração foi feita em triplicata. Após 30 minutos a quantidade de radicais de DPPH foi registrada em aparelho UV-Vis. no comprimento de onda de 518nm. A percentagem da atividade sequestradora foi calculada pela equação:

$$\%AA=100-((Abs\ amostra-Abs\ branco)\times 100/Abs\ controle)$$

Os resultados foram expressos através da CE<sub>50</sub> (I.C. 95%), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH.

##### **1.1.1. Análise estatística**

A eficiência antioxidante foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95 % (p<0,05) obtido pelo programa de estatística POLO PC. Os resultados foram expressos através da CE<sub>50</sub> (I.C. 95%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando no mínimo cinco concentrações. ANova será utilizado para realizar a análise de variância.

### 1.1.2. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando espectrofotômetro ELISA.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras de extratos, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações (PEREZ *et al.*, 2007). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro ELISA no comprimento de onda de 520 nm, tendo como controle positivo a quercetina.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração efetiva (CE<sub>50</sub>), também chamada de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>).

Para a determinação da atividade antioxidante (%AA) do extrato metanólico do caule de *Tetrapteryx acutilifolia* (TACM) e as suas frações: Hexano (TACMH), acetato de etila (TACMA), diclorometano (TACMD), metanol (TACMM) e do extrato metanólico das folhas de *Tetrapteryx acutilifolia* (TAFM) e as suas frações: Hexano (TAFMH), acetato de etila (TAFMA), diclorometano (TAFMD), metanol (TAFMM) e butanol (TAFMB) foi utilizado uma solução metanólica 0,3 mM de DPPH. Para as amostras dos extratos foram preparadas soluções na concentração de 100 mg/mL em MeOH grau espectroscópico. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços, onde foram pipetados 0,71 µL das soluções de extrato (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle, nos seis primeiros poços (fileira A) foram pipetados 0,71 µL de metanol, e para o branco foram pipetados 0,29 µL de metanol e 0,71 µL da solução de extrato (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados 0,29 µL da solução de DPPH e adicionados em cada poço utilizado, exceto nos relativos aos brancos. Após 30 minutos de incubação no escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA a 520 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A porcentagem de atividade antiradicalar (%AA) foi calculada através da descoloração do radical DPPH, segundo a equação abaixo (MENSOR *et al.*, 2001). Para determinação da atividade antioxidante (%AA), foram selecionados para o controle negativo três valores, dos quais foi feita a média usada no cálculo (Abs<sub>controle</sub>), e para o branco foi feita a média das leituras dos dois poços (10 e 11). Para cada amostra dos

extratos, foram realizadas as triplicatas e calculados os valores de %AA pela média de absorvância de cada uma. Foi então calculada a média dos %AAs obtidos em cada triplicata, sendo este valor considerado a atividade antioxidante (%AA) da amostra.

$$\%AA = 100 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}}$$

Onde: Abs amostra = absorvância da amostra com a solução de DPPH

Abs branco = absorvância da amostra com metanol

Abs controle = absorvância do metanol com a solução de DPPH

A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE<sub>50</sub>), foi determinada para os padrões e amostras usando o programa Microcal Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra (mg/mL) ou do controle positivo (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

Os valores de CE<sub>50</sub> obtidos pelas curvas padrão foram comparados com os das curvas de CE<sub>50</sub> dos extratos, após a conversão para as mesmas unidades, a fim de calcular a quantidade equivalente de padrão das amostras.

## 1.2. Resultados e discussão

### 1.2.1. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando UV.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método DPPH, que consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. Este reagente pode ser reduzido por um antioxidante ou uma espécie radicalar; quando reduzido forma difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente diminuição da absorvância, em relação ao DPPH puro, permitindo assim o seu monitoramento.

O extrato metanólico do caule apresentou uma atividade expressiva contra os radicais livres de DPPH com 13,5 g de extrato/g de DPPH, enquanto que o extrato metanólico das folhas demonstrou ser menos ativo, quando testado na maior concentração (50g de extrato/g de DPPH) este inibiu apenas 43,03%, ao passo que o extrato do caule

inibiu 95,2% dos radicais de DPPH, sendo assim, mais eficiente. O coeficiente angular para o extrato do caule (**Tabela 1**) foi elevado (3,2). Valor maior do Coeficiente angular da curva de concentração-% de inibição dos radicais de DPPH, observado para este extrato, indica um elevado grau de sensibilidade e correlação entre a % de inibição de radicais DPPH e a concentração do produto, evidenciando que com um pequeno aumento da quantidade de extrato há uma grande inibição da quantidade de radicais livres.

**Tabela 1:** Atividade antioxidante do extrato metanólico do caule de *Justicia wasshausseniana*

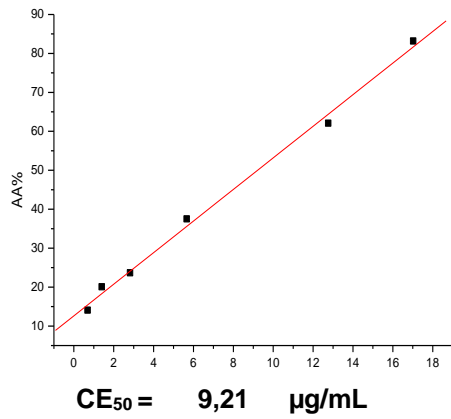
DPPH	GL	Equação	CE <sub>50</sub> (g/g)	$\chi^2$
JWCM	4	$Y=-2,0+3,2\log x$	13,5 (12,2-15,0)	3,0

### 1.2.2. Avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH utilizando espectrofotômetro ELISA.

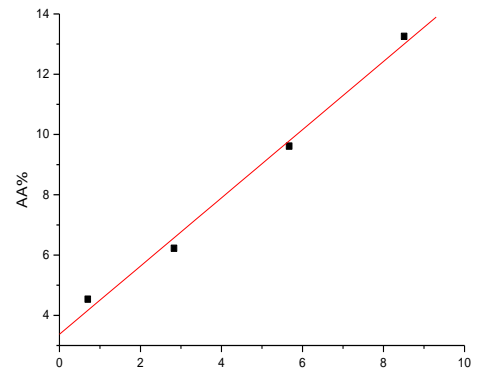
Para a determinação do CE<sub>50</sub> das amostras foram preparadas soluções metanólicas de 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30 µg/mL, partindo-se de uma solução inicial de 100 µg/mL. Para melhor leitura nas determinações das amostras de TACMD foram preparadas soluções metanólicas de 5, 10,15, 20, 25 e 30 µg/mL. Os gráficos obtidos pelos ensaios de atividade antioxidante com os extratos (**Figura 1**) permitiram identificar as atividades antioxidantes dos mesmos, percebendo-se que o extrato TAFMH apresentou um valor irreal de CE<sub>50</sub> podendo-se concluir que este experimento não apresentou uma boa atividade antioxidante. Com base nos valores observados, pode-se ressaltar uma maior atividade para o caule do extrato TACMD e para as folhas do extrato TAFMA revelado em suas curvas apresentando um CE<sub>50</sub> menor que os demais.



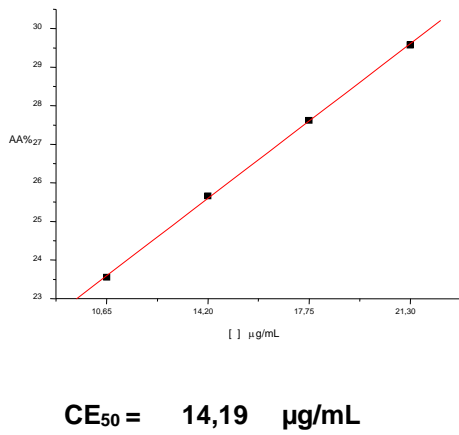
**TACM**



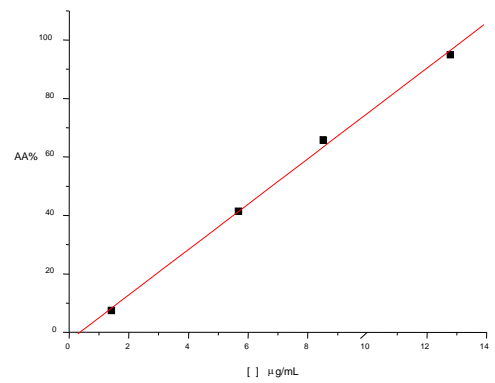
**TACMH**



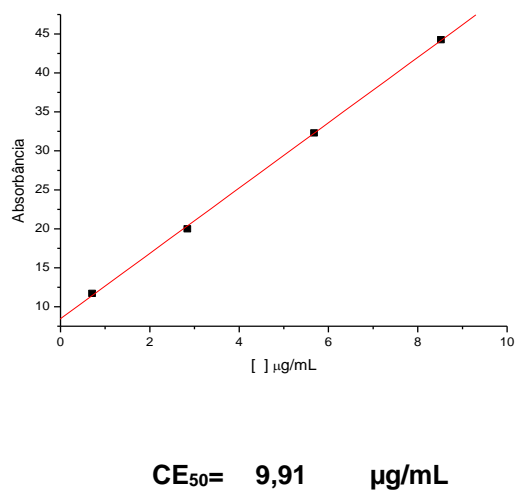
**TACMA**



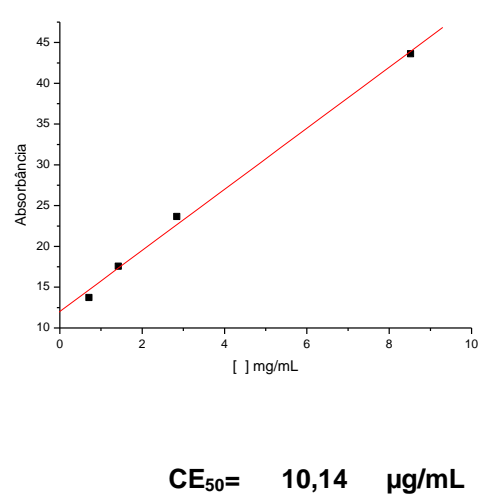
**TACMD**



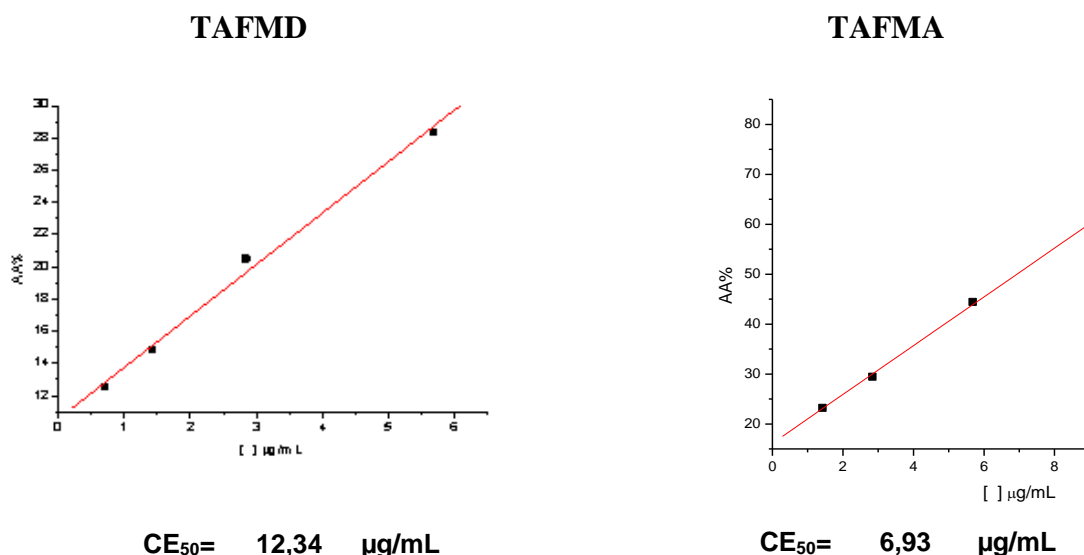
**TAFMM**



**TAFMB**



**Figura 1:** Curvas de % AA referentes aos extratos.



**Figura 1:** Curvas de % AA referentes aos extratos (Continuação).

## 2. Potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico *Lophantera lactescens* Duckee *Justicia wasshauseniana* Proffice

### 2.1. Nocicepção

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu a dor como “experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos desse tipo de dano” (PERAZA *et al.*, 2007). A dor também pode ser classificada em: nociceptiva, quando envolve ativação de nociceptores; neurogênica, quando houver lesão em tecido nervoso; neuropática, quando houver disfunção neuronal; ou psicogênica, que envolve fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

Os nociceptores são terminações nervosas que respondem a fatores térmicos, químicos ou mecânicos, ativando vias sinápticas de dor, ou seja, detectam lesões teciduais (MILLAN, 2002). Dessa forma, “o potencial antinociceptivo de um composto pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso” (PERAZA *et al.*, 2007).

Os animais não podem verbalizar que estão sentindo dor, porém apresentam comportamento sugestivo de sensação dolorosa. Por esse motivo, é mais adequado caracterizar a resposta como nocicepção do que dor (LAPA *et al.*, 2003). O estudo dos

padrões comportamentais nociceptivos e suas variações nas presenças de drogas analgésicas podem sugerir com maior propriedade que o animal em experimento está sentindo dor (PERAZA *et al.*, 2007).

## **2.2. Inflamação**

Todos os seres vivos dispõem de mecanismos adaptativos para assegurar a homeostase, um deles caracterizado nos vertebrados pela inflamação. O processo inflamatório é deflagrado por uma lesão tecidual e envolve alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas (VOLTARELLI, 1994) com o objetivo de restaurar o tecido e remover a causa da lesão, sendo esta a primeira linha de defesa do organismo. Apresenta como sinais clássicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. O processo inflamatório é um evento natural e importante para a preservação dos tecidos orgânicos, entretanto pode se tornar inconveniente em casos crônicos, como por exemplo em doenças autoimunes ou alérgicas, onde o agente nocivo permanece e o processo inflamatório se estende (MESQUITA JR. *et al.*, 2015).

O estudo da fisiologia deste evento e de moduladores endógenos e exógenos contribui para a redução dos prejuízos advindos de aspectos crônicos. Substâncias anti-inflamatórias são capazes de agir em algum ponto desta cascata, interrompendo seu curso. Esta atividade é verificada por redução no desenvolvimento dos sinais clínicos da inflamação.

## **2.3. Animais**

Foram utilizados camundongos suíços machos, com peso de 20-24g. O protocolo para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Pesquisa (COMEP – UFRRJ) sob o número: 23083.004724/2011-16. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12h. Água e alimentação foram mantidas à disposição dos animais ao longo do estudo, porém a alimentação foi retirada 8 h antes da administração oral do extrato.

## **2.4. Material botânico**

Os extratos usados nos testes foram o extrato metanólico das cascas do caule de *Lophantera lactescens* Ducke e o extrato metanólico das folhas de *Justicia*

*wasshauseniana* Profice. Este foi armazenado sob concentração de 100 mg/ml e diluído em água destilada previamente aos experimentos de forma que os animais fossem tratados individualmente com o mesmo volume de extrato (0,1 mL), porém de acordo com as doses desejadas para cada grupo experimental (10, 50, 100 mg/kg).

## **2.5. Modelos Experimentais**

### **2.5.1. Testes de atividade antinoceptiva**

#### **2.5.1.1. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.**

Este modelo é usado para triagem da atividade antinociceptiva (WHITTLE, 1964). As contorções abdominais são induzidas pela administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de ácido acético (1,2%). A contagem do número de contorções é iniciada imediatamente após a injeção e permanece por um período de 30 minutos. O padrão de contorção abdominal estabelecido para contagem é o aparecimento de fortes contrações abdominais, alongamento de todo o corpo do animal, seguido pelo alongamento dos membros posteriores e contato do abdômen com o assoalho do recipiente em que o animal se encontra.

Os animais submetidos a esse modelo foram tratados com o extrato (10, 50 e 100 mg/kg; via oral) uma hora antes do início do experimento, assim como o grupo tratado com morfina (3 mg/kg; via oral). Aplicou-se então 0,01 mL/g de solução de ácido acético 1,2% por via intraperitoneal e em seguida contou-se o número de contorções abdominais realizadas no período de 30 minutos.

#### **2.5.1.2. Teste da formalina**

Este modelo é utilizado para avaliação da dor inflamatória e não-inflamatória (HUNSKAAR e cols., 1986). Injeta-se 0,02 mL de uma solução de formalina à 2,5% em uma das patas traseiras. Posteriormente, mede-se o tempo (em segundos) que o animal permanece lambendo a pata em que foi administrada a solução. A medida do tempo é feita em duas fases: a primeira chamada neurogênica, entre 0 e 5 minutos após a injeção da formalina e a segunda fase chamada inflamatória, entre 15 e 30 minutos após a injeção. A administração do extrato experimental foi realizada uma hora antes da administração de formalina (10, 50 e 100 mg/kg; via oral), assim como a morfina (3 mg/kg; via oral).

### 2.5.1.3. Teste de retirada da cauda

O modelo foi realizado como previamente descrito (D'AMOUR e SMITH, 1941). Os animais são mantidos em um tubo de acrílico e colocados em aparelho específico (analgésímetro tail flick). Um feixe de luz nocivo é focado a aproximadamente 4 cm da ponta da cauda e a latência de retirada da cauda é registrada automaticamente. A intensidade da fonte de luz radiante é ajustada para valores de linha de base entre 4 e 6 segundos; esta intensidade não é alterada e os animais que apresentarem valores de linha de base fora destes limites são excluídos do experimento. São feitas várias medidas dos tempos de latência (TL) com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas. As primeiras duas medidas são realizadas antes da administração dos fármacos (e são chamadas de medidas controle). A média das medidas controle é denominada “linha de base” (LB). Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculamos um “*cut-off*” de 3 vezes o valor da linha de base. A antinocicepção foi quantificada como percentual de aumento do tempo de latência em cada tempo de medida em relação à linha de base, calculado a partir da fórmula:

$$\% \text{ de aumento em relação à linha de base} = \frac{\text{TL} \times 100}{\text{LB}} - 100$$

## 2.5.2. Testes de atividade antiinflamatória

### 2.5.2.1. Teste do edema de pata

Os animais foram tratados com os extratos experimentais (10, 50 e 100 mg/kg; via oral) e esperou-se uma hora para administrar 0,01 mL de carragenina 1% em uma das patas traseiras. Na outra pata administrou-se o mesmo volume de água destilada. A evolução do edema foi aferida nas 4 horas seguintes (a cada hora) por meio da imersão das patas até a altura da articulação tíbio-társica tratadas na solução de detergente que circula pelo aparelho. O aparelho verifica automaticamente o volume (mL) de líquido deslocado pela pata do animal. A dexametasona foi utilizada como controle positivo (2,5 mg/kg, subcutânea – s.c.) 60 minutos antes da aplicação subplantar de carragenina.

### 2.5.2.2. Teste da bolha de ar subcutânea

Uma bolsa de ar subcutânea (BAS) é formada no dorso de camundongos, após a injeção de 7 mL de ar estéril, realizada em câmara asséptica. Após 3 dias, uma nova injeção de 5 mL de ar estéril é feita para a manutenção da cavidade. No 7º dia, os animais recebem injeção de 1 mL de carragenina 1% ou tampão fosfato salina (TFS) na BAS formada. Os animais são tratados por via oral 1 hora antes da injeção de carragenina. Os animais são eutanasiados 4h após a injeção de carragenina ou TFS. O grupo controle negativo é composto por animais que receberam injeção de 1 mL de TFS na BAS. Os exsudatos são coletados e quantificados. Uma alíquota de exsudato é diluída 1:20 em líquido Turk (0,5% de cristal violeta dissolvido em 30% de ácido acético) para determinar o número de leucócitos (contagem total).

### 2.5.3. Análise estatística

Nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e formalina, os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. No modelo de retirada da cauda os resultados são expressos como percentual de aumento do tempo de latência em relação à linha de base. A significância estatística entre os grupos é realizada pela aplicação de análise de variância (ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni. O valor de  $p$  menor que 0,05 é usado como nível de significância.

## 2.6. Resultados e discussão

### 2.6.1. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

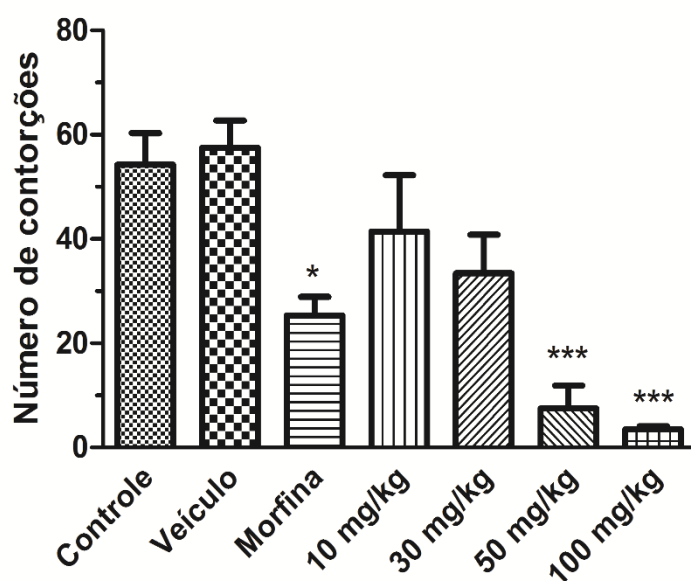
Na administração oral (v.o.) do extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke, nas doses de 10, 30, 50, 100 mg/kg, apenas as maiores doses (50 e 100mg/Kg), além da morfina, inibiram significativamente o número de contorções abdominais em relação ao grupo experimental controle (**Figura 2**).

O extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice obteve resultado significativo em todas as doses administradas no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, reduzindo o número de respostas álgicas dos animais. O grupo tratado com morfina

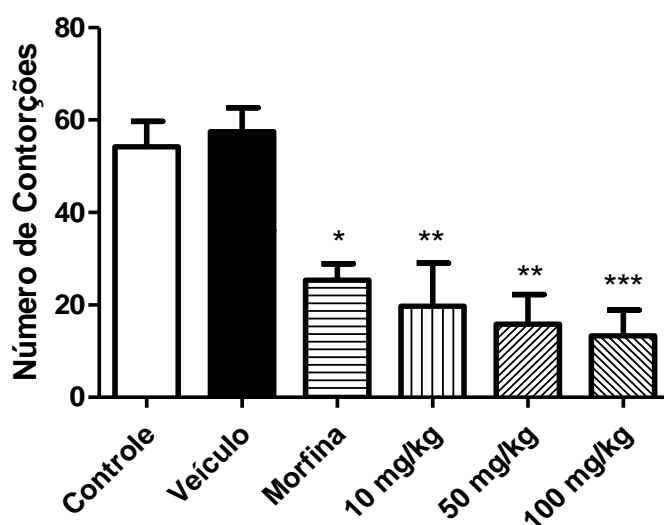
também apresentou menor número de contorções em comparação ao grupo controle (Figura 3).

Os grupos tratados com extrato apresentaram 36%, 70% e 75% de inibição no número de contorções abdominais, respectivamente nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg.

A morfina é um opiáceo natural de ação central que tem como efeito a produção de analgesia e hipnose (CEBRID, 2015) e foi utilizado neste experimento como controle positivo, obtendo resultados esperados.



**Figura 2:** Efeito antinociceptivo do extrato de *Lophantera lactescens* Ducke no modelo de contorções abdominais. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ ) e (\*\*\*  $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina (3 mg/kg) e extrato.



**Figura 3:** Efeito antinociceptivo do extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.

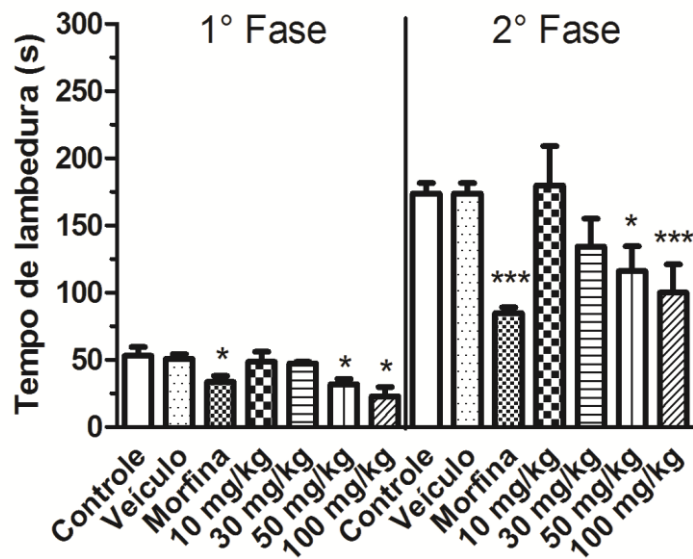
O teste de contorções abdominais é utilizado como triagem por ser um modelo simples representativo de nocicepção visceral, onde tanto substâncias de ação central quanto de ação periférica apresentam resposta significativa, reduzindo o número de contorções realizadas pelos animais após a administração de ácido acético (NESS E GEBHART, 1990). Sendo assim, os resultados neste modelo confirmam a atividade nociceptiva do extrato, no entanto ainda inconclusivo quanto ao local de ação.

### 2.6.2. Teste da formalina

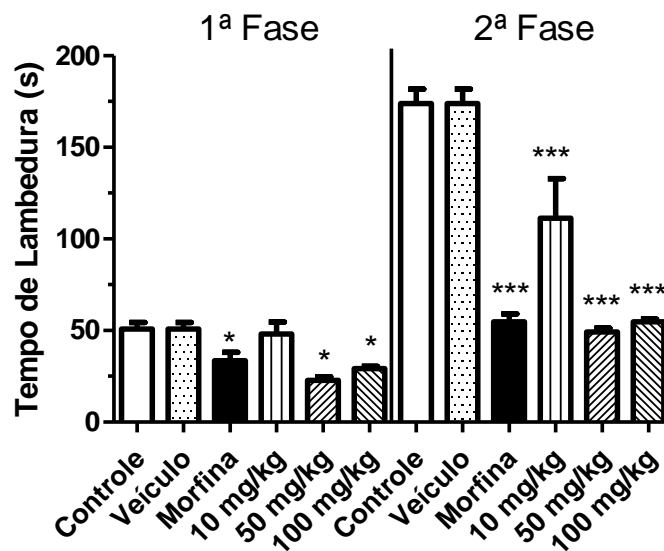
Os animais foram tratados com o extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke, nas doses de 10, 30, 50, 100 mg/kg; v.o. O extrato foi capaz de reduzir o tempo de lambedura na 1ª e 2ª fases somente nas duas maiores doses (50 e 100 mg/Kg) (**Figura 4**).

Os animais foram tratados com o extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice nas doses de 10, 50, 100 mg/kg; v.o. O extrato reduziu o tempo de lambedura significativamente nas doses mais altas na primeira fase, e em todas as três doses na segunda fase. O fármaco padrão morfina foi utilizado como controle positivo e apresentou efeito também nas 2 fases. (**Figura 5**).





**Figura 4:** Efeito antinociceptivo do extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke no modelo de formalina. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ ) e (\*\*\*  $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina (3 mg/kg) e extrato.

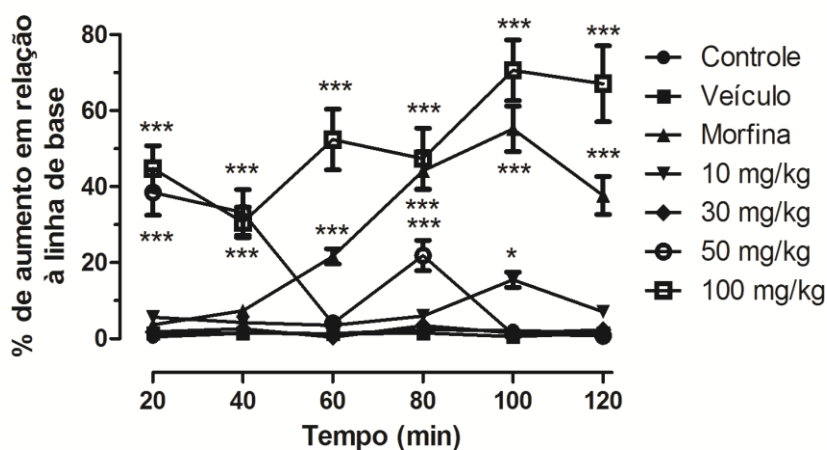


**Figura 5:** Efeito antinociceptivo do extrato de *Justicia wasshauseniana* Proffice no modelo de formalina. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.

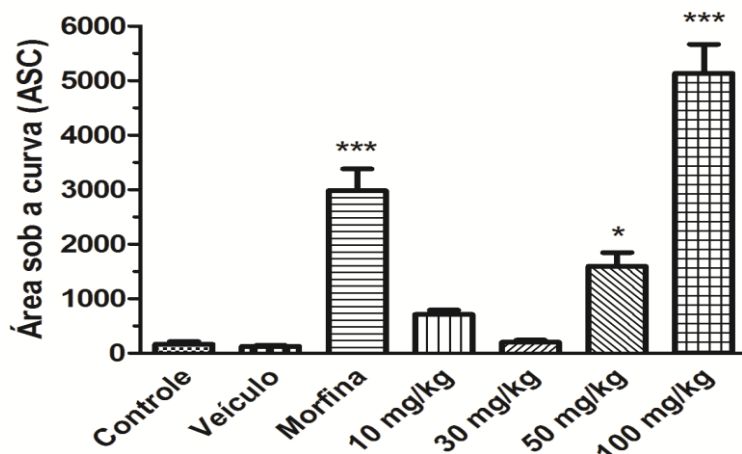
A primeira fase pode também ser chamada de neurogênica e ocorre devido à ação deletéria da formalina diretamente sobre os nociceptores das fibras C dos nervos periféricos, manifestando-se imediatamente. É sensível a fármacos de ação central analgésicos opióides (morfina) e a alguns agonistas das vias descendentes (HUNKSTAAR E HOLE, 1987). A segunda fase do modelo está relacionada à liberação de mediadores pró-inflamatórios e instalação do processo inflamatório no tecido, por isto é mais tardia e sensível a fármacos de ação periférica como anti-inflamatórios não esteroidais (HUNKSTAAR E HOLE, 1987). Os resultados sugerem que o extrato tenha ação central, já que demonstrou atividade em ambas fases do teste de formalina.

### 2.6.3. Teste da retirada de cauda

Os animais foram tratados com o extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke (doses de 10, 30, 50, 100 mg/kg; *v.o.*). O fármaco padrão morfina foi utilizado como controle positivo. De acordo com a **Figuras 6 e 7**, somente as maiores doses de 50 e 100 mg/Kg apresentaram efeito significativo.

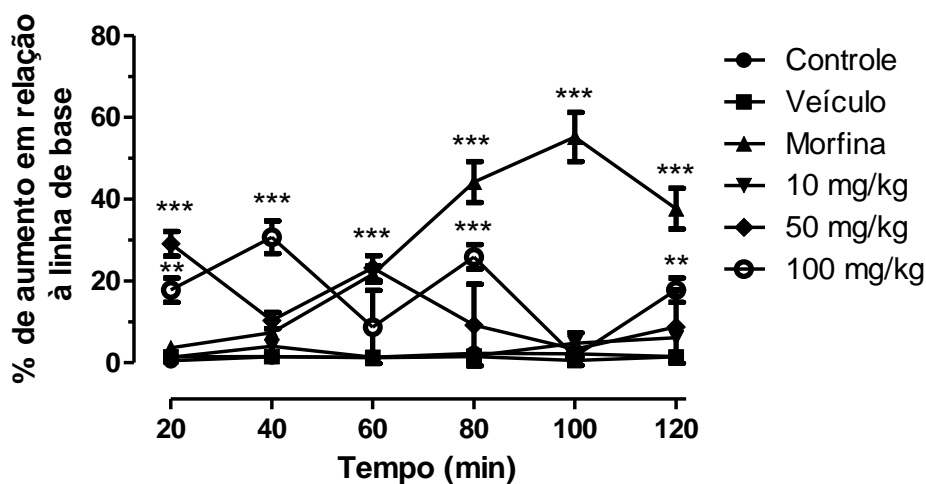


**Figura 6:** Efeito antinociceptivo do extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke no modelo de retirada da cauda. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ ) e (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina (3 mg/kg) e extrato.

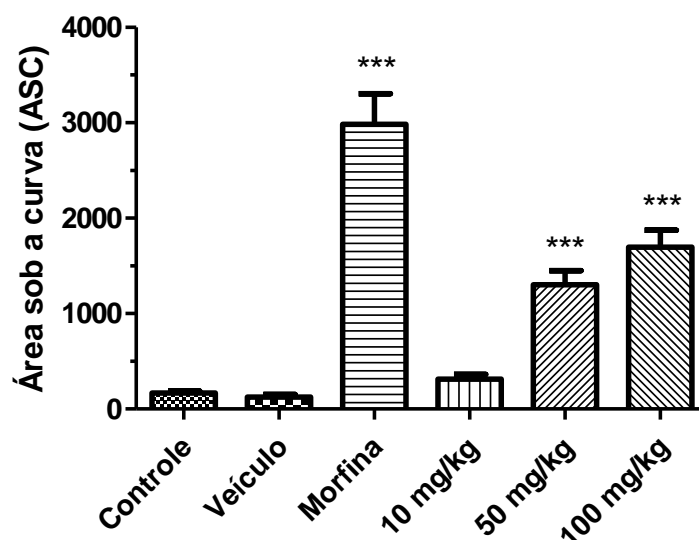


**Figura 7:** Representação da área sob a curva obtida através do modelo de retirada da cauda com o extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke no modelo de retirada da cauda representado pelo cálculo da área sob a curva. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ ) e (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina (3 mg/kg) e extrato.

Com o extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice o efeito sobre a retirada de cauda foi significativo em relação ao grupo controle nas maiores doses (50 e 100 mg/kg), como pode ser observado principalmente pelo gráfico de área sob a curva (**Figuras 8 e 9**), assim como a morfina.



**Figura 8:** Efeito antinociceptivo do extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice no modelo de retirada da cauda. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de duas vias, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.



**Figura 9:** Representação da área sob a curva obtida através do modelo de retirada da cauda com o extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.

O modelo de retirada de cauda traz informações importantes sobre o mecanismo e local de ação antinociceptiva do extrato, pois avalia um reflexo de origem espinhal (PERAZA ET AL., 2007; CAMARATA E YAKSH, 1985). Desta forma, o resultado significativo comprova atividade central do composto, porém não com eficiência similar à morfina.

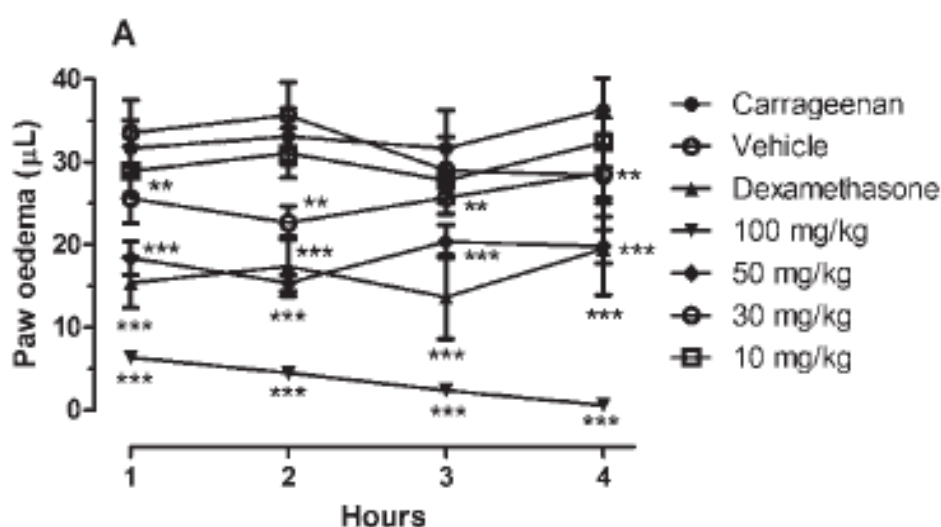
#### 2.6.4. Teste do edema de pata

A dexametasona, um potente anti-inflamatório esteroidal, classe farmacológica que atua sobre a fosfolipase A<sub>2</sub>, a primeira enzima do processo inflamatório responsável pela produção de ácido araquidônico a partir de fosfolípidos de membrana (SERENIKI E VITAL, 2008), foi utilizada como controle positivo para o teste de edema de pata, apresentando redução significativa no edema provocado pela carragenina em todas as aferições.

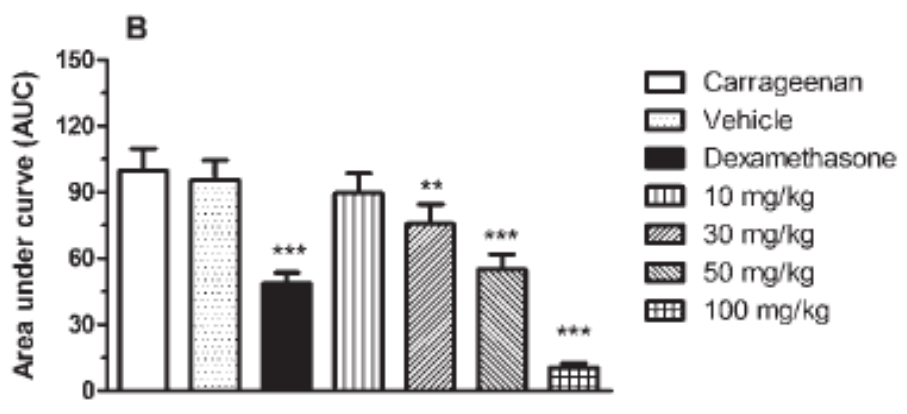
O extrato de *Lophantera lactescens* Ducke reduziu o edema da pata induzido nas doses testadas (30, 50, e 100 mg / kg) em 24%, 45%, e 90%, respectivamente (**Figuras 10 e 11**).

O extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice obteve sucesso estatisticamente significativo apenas na dose de 100 mg/kg nas terceira e quarta horas de experimento. Esses resultados são observados mais facilmente no gráfico de área sob a curva (**Figuras 12 e 13**).

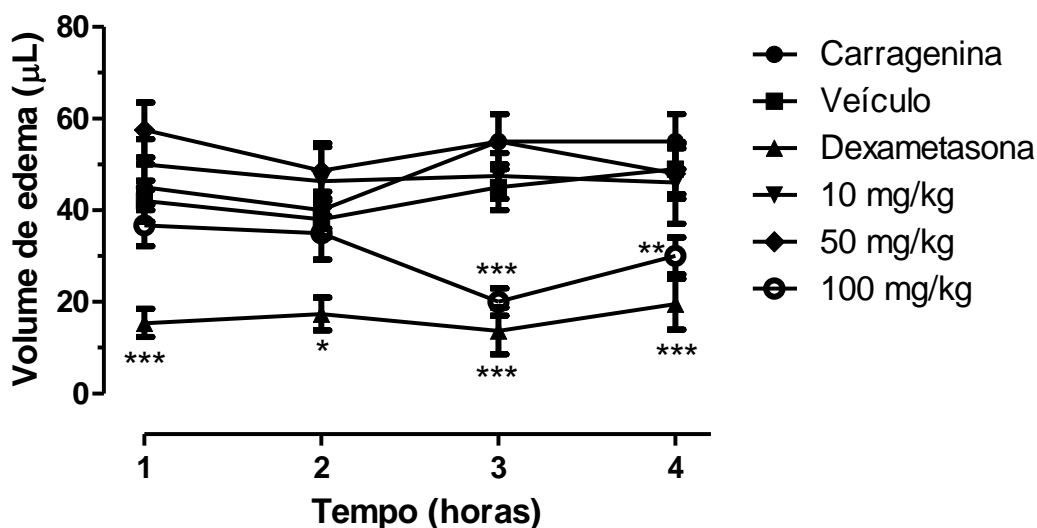
São descritas três fases para este teste, liberação de histamina e serotonina (5-HT) na primeira fase (1ª hora), cininas liberadas na segunda fase (2ª hora) e prostaglandinas na terceira fase (3ª e 4ª horas) (OLAJIDE *et al.*, 1999). O extrato de *Lophantera lactescens* Ducke apresentou atividade anti-inflamatória em todas as fases e o de *Justicia wasshauseniana* apresentou atividade anti-inflamatória inibindo a ação das prostaglandinas (terceira fase).



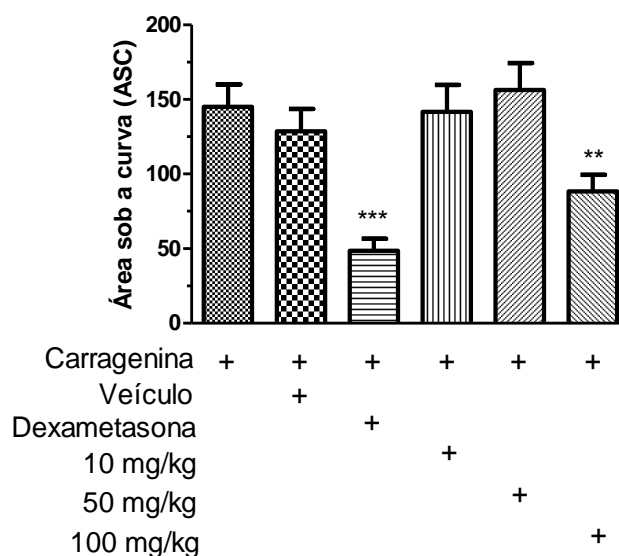
**Figura 10:** Os efeitos antiinflamatório da administração oral no teste do edema da pata. Os ratos foram tratados com água, veículo, dexametasona (2.25mg / kg), ou o Extrato de *Lophantera lactescens* Ducke (10, 30, 50, e 100 mg / kg). A significância estatística, \* p <0,05, \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001, foi calculada por ANOVA de duas vias, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.



**Figura 11:** Representação da área sob a curva obtida através do modelo de edema de pata com o extrato de *Lophantera lactescens* Ducke. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.



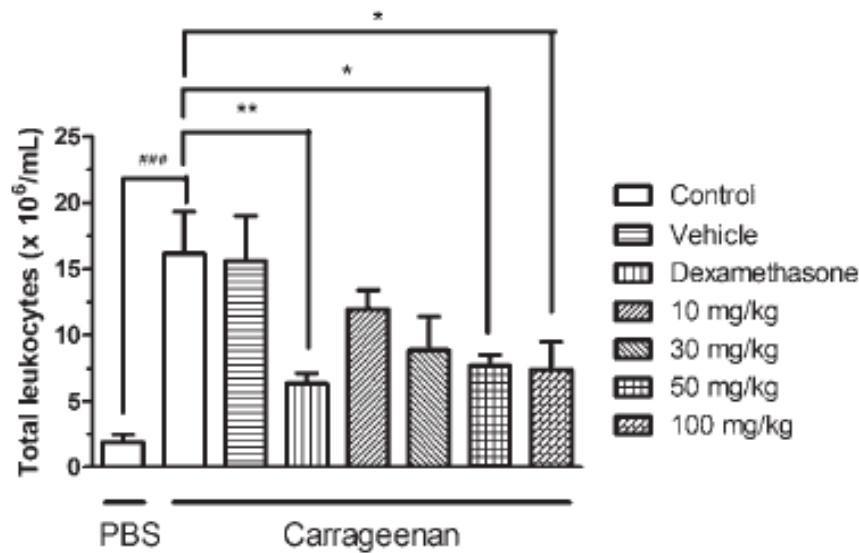
**Figura 12:** Efeito antinociceptivo do extrato de *Justicia wasshauseniana* Proffice no modelo de edema de pata. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de duas vias, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.



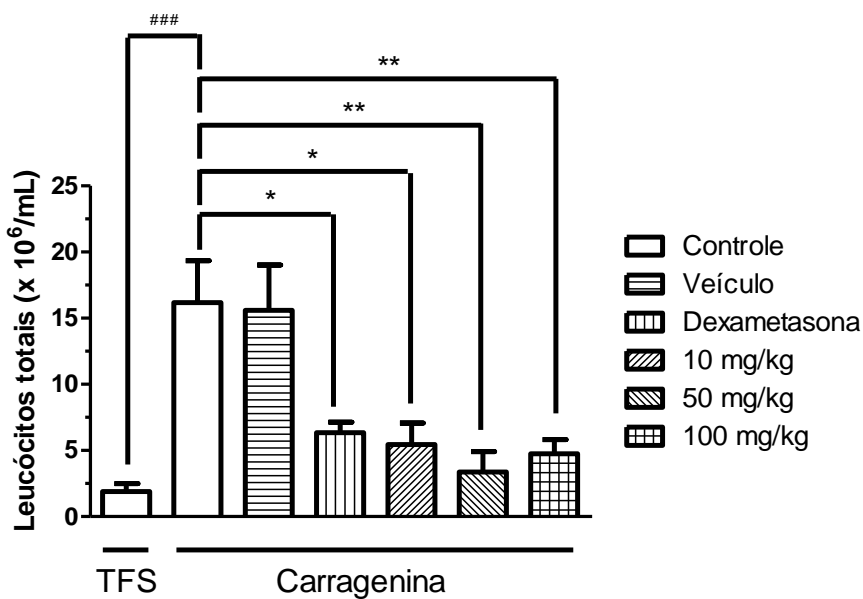
**Figura 13:** Representação da área sob a curva obtida através do modelo de edema de pata com o extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.

### 2.6.5. Modelo de bolha de ar

No modelo de bolha de ar subcutânea o extrato de *Lophantera lactescens* nas doses de 50 e 100 mg / kg inibiu o extravasamento de leucócitos por 52% ( $7,68 \times 10^6$  células) e 54% ( $7,4 \times 10^6$  células), respectivamente (**Figura 14**), o extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice foi eficaz em todos os tratamentos, reduzindo o processo inflamatório gerado pela carragenina, a qual promove exsudação e migração leucocitária para o interior da bolha. O tratamento com dexametasona também apresentou atividade anti-inflamatória, servindo como grupo controle positivo (**Figura 15**). A variação nos valores entre o grupo controle e o grupo tratado com TFS demonstra o potencial pró-inflamatório da carragenina, aumentando a infiltração tecidual de leucócitos.



**Figura 14:** Representação gráfica do efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de *Lophantera lactescens* sobre a migração leucocitária no modelo de bolha de ar subcutânea. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle tratado com TFS e o grupo controle tratado com carragenina.

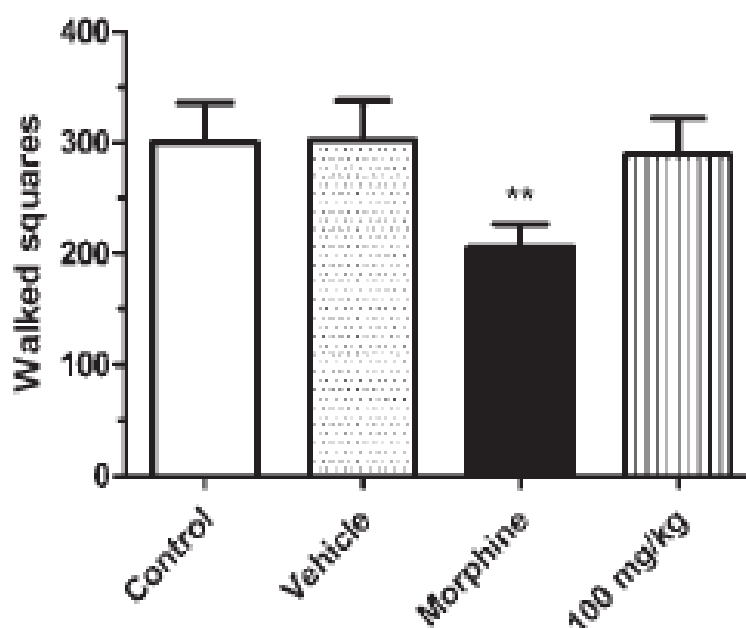


**Figura 15:** Representação gráfica do efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de *Justicia wasshauseniana* Profice sobre a migração leucocitária no modelo de bolha de ar subcutânea. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle tratado com TFS e o grupo controle tratado com carragenina.

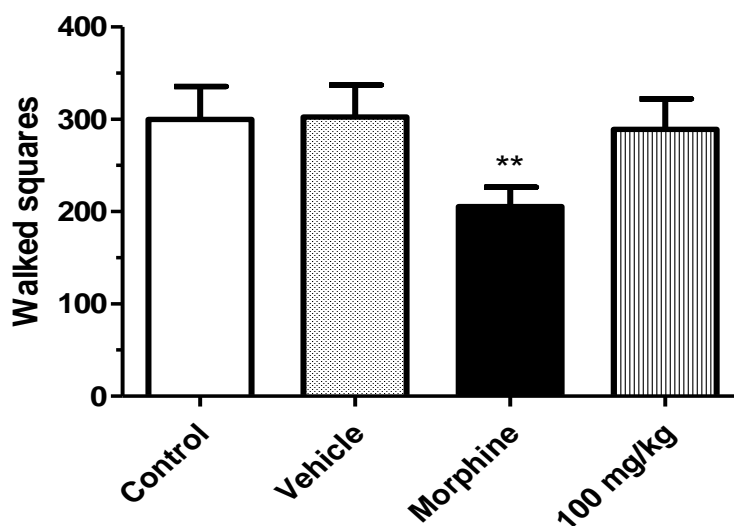


### 2.6.6. Modelo de campo aberto

O modelo de campo aberto foi usado para observar se os extratos causariam comprometimento motor e, desta forma, interferir nos resultados algesimétricos obtidos. Nas **figuras 16 e 17** observam-se que os extratos de *Lophantera lactescens* e *Justicia wasshauseniana*, na maior dose, não apresentaram redução significativa no número de quadrados percorridos em relação ao grupo controle. A morfina foi capaz de reduzir o número de quadrados percorridos.



**Figura 16:** Efeito do extrato de *Lophantera lactescens* sobre a performance motora no modelo de campo aberto. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.



**Figura 17:** Efeito do extrato de *Justicia wasshauseniana* Profice sobre a performance motora no modelo de campo aberto. A significância estatística, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , foi calculada por ANOVA de uma via, seguido por teste de Bonferroni entre o grupo controle e os grupos tratados.

A reação de contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal (i.p.) do ácido acético em camundongos é descrita como um típico modelo de dor inflamatória, e por se basear na contagem das contorções abdominais produzidas como resposta reflexa à irritação peritoneal, o método das contorções é de ampla utilização na pesquisa de drogas com propriedades analgésicas. Após a injeção intraperitoneal de um agente nociceptivo, como é o caso do ácido acético, observam-se respostas que consistem em uma sequência de contorções e extensões do abdômen. Esse teste é usado para avaliação da atividade antinociceptiva (PARVEEN e cols., 2007), podendo ser considerado uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica de novos produtos (LE BARS e cols., 2001).

Sendo assim, o extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle nas maiores doses e o extrato metanólico de *Justicia wasshauseniana* em todas as doses, demonstrando atividade antinociceptiva dose-dependente. O resultado apresentado neste modelo mostra uma atividade antinociceptiva inespecífica, incapaz de esclarecer sobre a ação central ou periférica do extrato (NESS e GEBHART, 1990).

O teste da formalina é um modelo mais específico, que permite discriminar a ação antinociceptiva sobre a dor inflamatória e não inflamatória. A injeção de formalina produz resposta bifásica distinta: a primeira fase representa a ação direta da formalina nas fibras sensoriais do tipo C que caracteriza a dor neurogênica e a segunda fase representa a dor inflamatória, induzida pela ação de mediadores inflamatórios pós-formados sobre as fibras. Os analgésicos de ação central como a morfina, inibem as duas fases, enquanto que drogas de ação periférica, como os antiinflamatórios e corticóides inibem somente a segunda fase (HUSNKAAR e HOLE, 1987). Além disso, permite avaliar em animais a dor contínua de intensidade moderada causada pela lesão do tecido e o papel dos sistemas endógenos na regulação da dor (TJOLSEN e cols., 1992). Os resultados apresentados sugerem que os extratos metanólicos de *Lophantera lactescens* Ducke e *Justicia wasshauseniana*, assim como a morfina, demonstraram atividade sobre as 2 fases do modelo, sugerindo uma atividade antinociceptiva central.

Na tentativa de comprovar a atividade antinociceptiva central dos extratos metanólicos de *Lophantera lactescens* Ducke e *Justicia wasshauseniana* realizamos o teste de retirada de cauda, pois este método avalia os mecanismos espinhais envolvidos na antinocicepção, através de um estímulo térmico que provoca uma reação de retirada da cauda dos animais por meio de um movimento reflexo de origem espinhal rápido e vigoroso (CAMARATA e YAKSH, 1985). Os resultados obtidos confirmam a atividade antinociceptiva dos extratos, sendo que na maior dose utilizada o perfil de ação do extrato ao longo do tempo é semelhante ao da morfina.

O perfil antinociceptivo demonstrado pelo extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke na dose de 100 mg/kg demonstrou um pico de efeito no tempo de 100 minutos, similar ao apresentado pela morfina, porém o extrato apresenta atividade desde o início do experimento, ao contrário da morfina, que apresenta efeito tardio. Este pico de efeito tardio pode ser explicado pela absorção irregular da morfina por via oral (TASSINARI e cols., 1995).

A dor pode ocorrer em resposta a um estímulo não-nocivo (alodinia) ou a um estímulo nociceptivo que pode produzir dor desproporcionalmente severa quando comparada a intensidade do estímulo (hiperalgesia) (COUTAUX e cols., 2005). Os extratos produziram efeito anti-hiperalgésico, já que demonstrou atividade nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e retirada da cauda, onde o estímulo é nocivo.

### 3. Conclusões das atividades Biológicas

Foram testados os extratos metanólicos de caule e de folhas de *Justicia wasshausseniana* e os extratos metanólicos e frações do caule e folhas de *Tetrapteryx acutilifolia*. O extrato metanólico do caule de *Justicia wasshausseniana* apresentou uma atividade expressiva contra os radicais livres de DPPH, enquanto que o extrato metanólico das folhas demonstrou ser menos ativo. A fração de hexano das folhas de *Tetrapteryx acutilifolia* (TAFMH) não apresentou uma boa atividade antioxidante. Observou-se uma maior atividade para a fração de acetato de etila do caule e folhas (TACMD e TAFMA).

Os ensaios do Potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke e extrato metanólico de *Justicia wassahueniana* Profice revelaram que o extrato metanólico de *Lophantera lactescens* Ducke foi capaz de produzir efeito anti-hiperalgésico central, demonstrado pela sua atividade nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e retirada da cauda, somente nas doses de 50 e 100 mg/kg (DOS SANTOS, *et al.*; 2015). O extrato metanólico de *Justicia wassahueniana* Profice demonstrou atividade antinociceptiva significativa de ação central, com melhor atividade apenas na dose de 100 mg/kg. Quanto a atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de pata e bolha de ar subcutânea ambos os extratos foram ativos. (DOS SANTOS, *et al.*; 2015)

Os extratos estudados mostraram resultados promissores para utilização dessas plantas como fonte de fármacos que possam ser usadas na terapêutica como anti-inflamatórios e para dor.

#### 4. REFERÊNCIAS DO CAPÍTULO IV

CAMARATA, P.J., YAKSH, T.L. Characterization of the spinal adrenergic receptors mediating the spinal effects produced by the microinjection of morphine into the periaqueductal gray. *Brain Res.* 336(1):133–142, 1985.

CEBRID, Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas. Disponível em [http://www.cebrid.epm.br/folhetos/opio\\_.htm](http://www.cebrid.epm.br/folhetos/opio_.htm), acesso em 21/03/2015

COUTAUX, A., ADAM, F., WILLER, J.C., LE BARS, D., Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint bone spine*72: 359-371. 2005.

D'AMOUR, F.E., SMITH, D.L., A method for determining loss of pain sensation, *J. Pharmacol. Exp. Ther* 72: 74–79. 1941.

DOS SANTOS, G. C. M.; FERNANDES, R. D.; BARROS, T. R.; ABREU, H. S.; SUZART, L.R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R.; MARINHO, B. G. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Extract from the Stem Bark of *Lophanthera lactescens*. *Planta Medica*, v. 1, p-1-9, 2015.

HUNSKAAR, S., BERGE, O.G., HOLE K,. Dissociation between antinociceptive an anti-inflammatory effects of acetylsalicylic and indomethacin in the formalin test. *Pain*25: 125–132. 1986.

HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30: 103–114. 1987.

LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., CASTRO, M.S.A., LIMA, T.C.M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. *Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais*. Porto Alegre. 2003

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S.W., Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews* 53: 597–652. 2001.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(2), 127-130, 2001.

MESQUITA, JR. D., ARAÚJO, J.A.P., CATELAN, T.T.T., SOUZA, A.W.S., SILVA, N.P., ANDRADE, L.E.C., CRUVINEL, W.M., **Aspectos celulares e moleculares da inflamação.** Disponível em

[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=4053](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4053), acessado em 22/03/2015

MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*. 569:1-120, 2002

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*. Vol 57, pag. 1-164, 1999

NESS, T.J., GEBHART, G.F. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*41:167–234. 1990.

OLAJIDE, O., MAKINDE, J.M., AWE, S.O., Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*. vol 66, pag.: 113-117. 1999

PARVEEN, B.U., S. ROY and A. KUMAR. Traditional uses of medicinal plants among the rural communities of Churu district in the Thar Desert, India. *J. Ethnopharmacol.*, 113: 387-399. 2007.

PERAZA, G. G., RODRIGUES, S. T., MEDEIROS, S. H. L., MUCCILLO-BAISCH, A. L., O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem animal. *Vittalle*, Rio Grande, vol 19, nº 1, pag.: 35-44, 2007

PÉREZ, R. A. et al. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 360-365, 2007.

SERENIKI, A., VITAL, M. A. B. F., A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos, *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*, vol 30, issue 1, 2008

TASSINARI, D., MASI, A., SARTORI, S., NIELSEN, I., RAVAIOLI, A. Atypical absorption of morphine sulphate through oral mucosa: an usual case of acute opioid poisoning. *Journal of pain and symptom management*. 10: 405-407.1995.

TJOLSEN, A., BERGE, O., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J.H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51: 5-17, 1992

VOLTARELLI, J.C. Febre e inflamação. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 27, n. 1/2, pag.: 7-48, jan./jun. 1994

WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *J Neuropharmacol* 3: 369-378. 1964.