

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM PLANTAS
AMAZÔNICAS: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae),
Trichilia pallida e *T. rubra* (Meliaceae).**

WALDIRENY CALDAS ROCHA

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração em Química Orgânica.

São Carlos-SP
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM
PLANTAS AMAZÔNICAS: *Adiscanthus fusciflorus*
(Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae)**

WALDIRENY CALDAS ROCHA*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

* Bolsista CNPq

São Carlos-SP
2004

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar

R672bs

Rocha, Waldireny Caldas.

Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas:
Adiscanthus fusciflorus (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T.*
rubra (Meliaceae) / Waldireny Caldas Rocha. -- São Carlos :
UFSCar, 2005.
221 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2004.

1. Química orgânica. 2. Produtos naturais. 3. *Adiscanthus*
fusciflorus. 4. *Trichilia pallida*. 5. *Trichilia rubra*. I. Título.

CDD: 547 (20^a)

Dedico este trabalho:

A todos os pesquisadores que dedicam parte da suas vidas à pesquisa e ao desenvolvimento de novas linhas de trabalho o que permite a continuação do ciclo infundável da ciência.

Àqueles que não deixam de acreditar nos seus sonhos e confiam na justiça divina.

Este trabalho foi realizado sob a
orientação do Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira.

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos" (Eleanor Roosevelt).

"Faça as coisas o mais simples que você puder, porém, não as mais simples"

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado graças ao apoio de pessoas e instituições que aqui rendo nominalmente meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, pela orientação, paciência e principalmente por ter me dado a oportunidade de ter realizado este trabalho e assim concretizar um sonho;

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar pelos ensinamentos, em especial, à Prof^a. Dr^a. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, à Prof^a. Dr^a. Quézia Bezerra Cass, ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e ao Prof. Dr. João Batista Fernandes;

Ao Dr. Otávio Thiemman, ao Márcio, Hamilton, Carlos Tomich, Marcelo Castilho, Fernando Pavão, Dulce, Bárbara e ao Eli do Departamento de Física da USP-São Carlos, pelos inúmeros ensaios com as enzimas e parasita além da grande amizade e importantes discussões;

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim, Dr. Paulo C. Bogorni, Uemerson Cunha e Márcio da ESALQ-Piracicaba, pelos ensaios com Spodoptera, análises estatísticas, discussões e pela amizade;

Ao grupo da UNESP - Rio Claro: Prof. Dr. Odair C. Bueno, Prof. Dr. Fernando C. Pagnocca, Prof. Dr. Mauricio Bacci Jr., Prof^a. Dr^a. Maria de J. A. Hebling e a Camila Silveira e Marizete de Fátima P. Godoy, pela realização de ensaios com a formiga, com o fungo simbiote e a enzima;

Ao Prof. Dr. Sérgio Albuquerque e a Mirian da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelos ensaios frente ao T. cruzi;

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais pela colaboração, e pelos bons momentos compartilhados, principalmente a Sheylla, Milton, Andrey e Patrícia, Fábio, Grace, Regina, Margareth, Tatiane, Anna, Richelle, Gisleine, e Afonso e aos amigos certos nas horas mais incertas: André, Cleverson, Valdir, Sandra e Fernando;

Aos colegas que tive a oportunidade de conhecer e conviver enquanto estiveram no laboratório de PN: Jair, Antônio, Márcio e Fernando Petacci;

A Dr^a. Luciane Gomes Batista-Pereira, pela colaboração, discussões e pela ajuda nos ensaios com Spodoptera;

Aos botânicos do Projeto Flora do Instituto de Pesquisa da Amazônia - INPA, principalmente a Dr^a. Lúcia Helena P. Martins, Lilian C. Procópio, Dr. José Eduardo L. da S. Ribeiro e ao Dr. Michael J. G. Hopkins;

A Prof^a. Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira, Prof^a. Dr^a. Milade dos Santos Carneiro Cordeiro, Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro e aos vários amigos da Universidade Federal de Manaus;

A meus pais (Maria Linda e Valdir) e meus irmãos (Waldileya, Leonardo, Livyo, Aline e Francinildo) por toda paciência e amor que me transmitiram e que foi a força que me impulsionou nos momentos mais difíceis.

Aos meus tios, Moreira e Ana Beatriz, Júlio Cezar e Célia, a Sônia e Liduaína que foram meus “pais substitutos”.

À Luciana Vizotto, técnica do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, pela amizade e pelos ótimos espectros de RMN;

Ao Valdir, Fábio e o Sr. Antônio, pelo apoio técnico;

À Universidade Federal de São Carlos e ao CNPq, pelo auxílio financeiro, que permitiram a realização deste trabalho;

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho;

Muito obrigada a todos!!!!!!

LISTAS DE ABREVIATURAS

EHFA:	Extrato em hexano das folhas de <i>A. fusciflorus</i>
EMFA:	Extrato em metanol das folhas de <i>A. fusciflorus</i>
EHRA:	Extrato em hexano das raízes de <i>A. fusciflorus</i>
EMRA:	Extrato em metanol das raízes de <i>A. fusciflorus</i>
EHFTP:	Extrato em hexano das folhas de <i>T. pallida</i>
EMFTP:	Extrato em metanol das folhas de <i>T. pallida</i>
EHGTP:	Extrato em hexano das raízes de <i>T. pallida</i>
EMGTP:	Extrato em metanol das raízes de <i>T. pallida</i>
EHFTR:	Extrato em hexano das folhas de <i>T. rubra</i>
EMFTR:	Extrato em metanol das folhas de <i>T. rubra</i>
EHGTR:	Extrato em hexano das raízes de <i>T. rubra</i>
EMGTR:	Extrato em metanol das raízes de <i>T. rubra</i>
Rec.:	Recristalização
I. E.:	Inibição enzimática
COSY:	Correlated Spectroscopy
DEPT:	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
Hz:	Hertz
RMN¹³C:	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN¹H:	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
gHMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Coherence (com gradiente de campo)
gHSQC:	Heteronuclear Spectroscopy Quantum Coherence (com gradiente de campo)
TMS:	Tetrametilsilano
<i>d</i>:	Dubleto
<i>dd</i>:	Duplo-dubleto
<i>dl</i>:	Dubleto largo
<i>m/z</i>:	Relação massa/carga
<i>m</i>:	Multiplete
MHz:	Mega-Hertz
<i>s</i>:	Singleto
<i>sl</i>:	Singleto largo

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>J</i>:	Constante de acoplamento (em Hertz)
δ:	Deslocamento químico em partes por milhão
\emptyset:	Diâmetro (cm)
$[\alpha]_D$:	Rotação óptica específica
λ:	Comprimento de onda (nm)

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Estrutura da vincristina e taxol.....	03
FIGURA 2-	Estrutura da cocaína e aspirina.....	04
FIGURA 3-	Foto do <i>Triatoma infestans</i> destacando a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	06
FIGURA 4-	Situação dos estados brasileiros quanto à transmissão vetorial de <i>Triatoma infestans</i>	08
FIGURA 5-	Fármacos utilizados no tratamento de doença de Chagas.....	08
FIGURA 6-	A: “mosquito palha”, inseto vetor de Leishmaniose e B: Forma promastigota de leishmaniose.....	10
FIGURA 7-	Percentual de municípios atingidos pela LTA, 1994 a 1998.....	11
FIGURA 8-	Fármacos utilizados no tratamento de Leishmanioses.....	12
FIGURA 9-	Via de recuperação e interconverção, em células de Kinetoplastida.....	13
FIGURA 10-	Reações catalisadas pelas PRTases em Kinetoplastidas.....	14
FIGURA 11-	Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i> na natureza.....	16
FIGURA 12-	Operária da formiga cortadeira <i>Atta sexdens</i>	17
FIGURA 13-	A: Fungo cultivado por formigas cortadeiras e B: Fungo simbiote: <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> (SINGER).....	18
FIGURA 14-	<i>Adiscanthus fusciflorus</i>	20
FIGURA 15-	<i>Trichilia pallida</i>	25
FIGURA 16-	<i>Trichilia rubra</i>	27
FIGURA 17-	Estrutura das Rubrininas A a E, Hispidina e Nimanina de <i>T. rubra</i>	28
FIGURA 18-	Estrutura das Rubralinas A, B e C e da Dregeana 4 de <i>T. rubra</i>	28
FIGURA 19-	Foto de satélite mostrando a localização geográfica da reserva.....	36
FIGURA 20-	Cromatograma da fração EDSTP 4 (9-16).....	51
FIGURA 21-	Cromatograma obtido da fração 10.....	54
FIGURA 22-	Reação catalisada pela enzima gGAPDH.....	57
FIGURA 23-	Reação catalisada pela enzima APRT.....	58
FIGURA 24-	Detalhes da distribuição da dieta e inoculação de lagartas.....	62
FIGURA 25-	Simulação do experimento realizado com <i>Atta sexdens</i>	63
FIGURA 26-	Espectro de RMN ¹ H da substância 1 (200 MHz, CDCl ₃).....	76
FIGURA 27-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 1 (50 MHz, CDCl ₃).....	76
FIGURA 28-	Cromatograma e espectro de massas da substância 1.....	77
FIGURA 29-	Cromatograma e espectro de massas da substância 2	78
FIGURA 30-	Espectro de RMN ¹ H da substância 2 (200 MHz, CDCl ₃).....	79
FIGURA 31-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 2 (50 MHz, CDCl ₃).....	79
FIGURA 32-	Espectro de RMN ¹ H da substância 3 (200 MHz, CDCl ₃).....	81
FIGURA 33-	Espectro de RMN ¹ H da substância 3 (200 MHz, CDCl ₃).....	81
FIGURA 34-	Cromatograma e espectro de massas da substância 4	83

FIGURA 35-	Espectro de RMN ¹ H da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	84
FIGURA 36-	Mapa de contorno COSY da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	85
FIGURA 37-	Mapa de contorno de HSQC da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃)....	85
FIGURA 38-	Mapa de contorno de HMBC da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃)....	86
FIGURA 39-	Espectro de RMN ¹ H da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	87
FIGURA 40-	Espectro de RMN ¹³ C para a substância 6 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	88
FIGURA 41-	Mapa de contorno de HSQC da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz)....	88
FIGURA 42-	Mapa de contorno de COSY da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz)....	89
FIGURA 43-	Mapa de contorno de HMBC da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz)....	89
FIGURA 44-	Ampliação do espectro de RMN ¹ H da substância 7.....	91
FIGURA 45-	Espectro de RMN ¹ H da substância 7 (400 MHz, MeOD).....	92
FIGURA 46-	Espectro de Pendant da substância 7 (50 MHz, MeOD).....	92
FIGURA 47-	Regiões ampliadas do gHMBC (400 MHz, MeOD).....	93
FIGURA 48-	Regiões ampliadas do gHSQC (400 MHz, MeOD).....	93
FIGURA 49-	Espectro de RMN ¹ H da substância 8 (200 MHz, CDCl ₃).....	96
FIGURA 50-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 8 (50 MHz, CDCl ₃).....	96
FIGURA 51-	Cromatograma e espectro de massas da substância 8.....	97
FIGURA 52-	Espectro de RMN ¹ H da substância 9 (200 MHz, CDCl ₃).....	99
FIGURA 53-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 9 (50 MHz, CDCl ₃).....	99
FIGURA 54-	Espectro de RMN ¹ H da substância 10 (200 MHz, CDCl ₃).....	101
FIGURA 55-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 10 (50 MHz, CDCl ₃).....	101
FIGURA 56-	Espectro de RMN ¹ H da substância 11 (200 MHz, CDCl ₃).....	103
FIGURA 57-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 11 (50 MHz, CDCl ₃).....	103
FIGURA 58-	Espectro de RMN ¹ H da substancia 12 (200 MHz, CDCl ₃).....	105
FIGURA 59-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 12 (50 MHz, CDCl ₃).....	105
FIGURA 60-	Espectro de RMN ¹ H da substância 13 (200 MHz, CDCl ₃).....	109
FIGURA 61-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 13 (50 MHz, CDCl ₃).....	109
FIGURA 62-	Espectro de RMN ¹ H da substância 14 (400 MHz, CDCl ₃).....	111
FIGURA 63-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 14 (50 MHz, CDCl ₃).....	112
FIGURA 64-	Regiões ampliadas do gHSQC da substância 14	113
FIGURA 65-	Regiões ampliadas do gHMBC da substância 14.....	113
FIGURA 66-	Mapa de contorno de gCOSY da substância 15.....	114
FIGURA 67-	Espectro de RMN ¹ H da substancia 15 (200 MHz, CDCl ₃).....	116
FIGURA 68-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 15 (50 MHz, CDCl ₃).....	116
FIGURA 69-	Espectro de RMN ¹ H da substância 16 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	119
FIGURA 70-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 16 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	120
FIGURA 71-	Espectro de RMN ¹ H a substância 17 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	122
FIGURA 72-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 17 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	123
FIGURA 73-	Mapa de contorno de COSY da substância 17 (CDCl ₃ , 400 MHz)..	124
FIGURA 74-	Mapa de contorno de HSQC da substância 17 (CDCl ₃ , 400 MHz)..	124

FIGURA 75-	Mapa de contorno de HMBC da substância 17 (CDCl ₃ , 400 MHz)..	125
FIGURA 76-	Espectro de RMN ¹ H a substância 18 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	128
FIGURA 77-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 18 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	128
FIGURA 78-	Espectro de RMN ¹ H a substância 19 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	131
FIGURA 79-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 19 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	131
FIGURA 80-	Espectro de RMN ¹ H a substância 20 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	133
FIGURA 81-	Cromatograma e espectro de massas da substância 20.....	134
FIGURA 82-	Espectro de RMN ¹ H a substância 21(CDCl ₃ , 400 MHz).....	135
FIGURA 83-	Espectro de RMN ¹ H a substância 22 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	137
FIGURA 84-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 22 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	138
FIGURA 85-	Espectro de RMN ¹ H da substância 23 (400 MHz, CDCl ₃).....	140
FIGURA 86-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 23 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	141
FIGURA 87-	Mapa de contorno de HMBC da substância 23 (400 MHz, CDCl ₃)..	142
FIGURA 88-	Mapa de contorno de HSQC da substância 23 (400 MHz, CDCl ₃)..	142
FIGURA 89-	Espectro de RMN ¹ H da substância 24 (400 MHz, CDCl ₃).....	145
FIGURA 90-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 24 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	146
FIGURA 91-	Mapa de contorno de HSQC da substância 24 (400 MHz, CDCl ₃)..	147
FIGURA 92-	Mapa de contorno de HMBC da substância 24 (400 MHz, CDCl ₃)..	147
FIGURA 93-	Espectro de RMN ¹ H para a substância 25 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	152
FIGURA 94-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 25 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	155
FIGURA 95-	Espectro de RMN ¹ H para a substância 26 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	154
FIGURA 96-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 26 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	154
FIGURA 97-	Mapa de contorno de COSY da substância 26 (CDCl ₃ , 400 MHz)..	155
FIGURA 98-	Mapa de contorno de HMBC da substância 26 (400 MHz, CDCl ₃)..	155
FIGURA 99-	Mapa de contorno de HSQC da substância 26 (400 MHz, CDCl ₃)..	156
FIGURA 100-	Espectro de RMN ¹ H para a substância 27 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	160
FIGURA 101-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 27 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	160
FIGURA 102-	Espectro de RMN ¹ H para 28 (MeOD, 200 MHz).....	163
FIGURA 103-	Espectro de RMN ¹³ C (Pendant) para 28 (MeOD, 50 MHz).....	163
FIGURA 104-	Espectro de massas da substância 28.....	164
FIGURA 105-	Espectro de RMN ¹ H da substância 29 (MeOD, 200 MHz).....	164
FIGURA 106-	Espectro de RMN ¹³ C da substância 29 (MeOD, 50 MHz).....	167
FIGURA 107-	Comparação da inibição dos extratos e frações de <i>A. fusciflorus</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	170
FIGURA 108-	Gráfico comparativo da atividade inibitória dos extratos brutos e frações de <i>T. pallida</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	172
FIGURA 109-	Gráfico comparativo da atividade inibitória dos extratos brutos e frações de <i>T. rubra</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	173
FIGURA 110-	Gráfico de atividade inibitória dos extratos brutos e frações de <i>A. fusciflorus</i> frente à enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	176

FIGURA 111-	Gráfico de atividade inibitória dos extratos brutos e frações de <i>T. pallida</i> frente à enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	178
FIGURA 112-	Atividade inibitória dos extratos e frações de <i>T. rubra</i> frente à enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	179
FIGURA 113-	Comparação entre a mortalidade larval, de <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com dieta artificial tratada com extratos e frações de folhas de <i>A. fusciflorus</i> , na concentração de 1000 ppm. Temperatura: 25±2°C; UR: 70± 5% e Fotofase de 12 horas.....	186
FIGURA 114-	Comparação entre a mortalidade de pupas, de <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com dieta artificial tratada com esquimianina em diferentes concentrações. Temperatura: 25±2°C; UR: 70± 5% e Fotofase de 12 horas.....	188
FIGURA 115-	Comparação entre a mortalidade pupal, de <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com dieta artificial tratada com isopimpinellina em diferentes concentrações. Temperatura: 25±2°C; UR: 70± 5% e Fotofase de 12 horas.....	189
FIGURA 116-	Relação entre a mortalidade de lagartas (%) de <i>S. frugiperda</i> e diferentes concentrações de esquimianina.....	190
FIGURA 117-	Relação entre peso de pupa (%) de <i>S. frugiperda</i> e diferentes concentrações de esquimianina.....	190
FIGURA 118-	Comparação entre a viabilidade larval, de <i>S. frugiperda</i> quando alimentada com dieta artificial tratada com extratos e frações de folhas de <i>Trichilia rubra</i> , na concentração de 1000 ppm. Temperatura: 25±2°C; UR: 70± 5% e Fotofase de 12 horas.....	197
FIGURA 119-	Comparação entre a viabilidade larval, de <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com dieta artificial tratada com extratos e frações de folhas de <i>T. rubra</i> , na concentração de 1000 ppm. Temperatura: 25±2°C; UR: 70± 5% e Fotofase de 12 horas.....	197
FIGURA 120-	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> alimentadas com dieta artificial tratada com extratos em hexano e metanol das folhas de <i>A. fusciflorus</i>	199
FIGURA 121-	Curva de sobrevivência de operária de <i>Atta sexdens</i> alimentadas com dieta artificial tratada com extrato em hexano e metanol de folha e galho de <i>Trichilia pallida</i>	201
FIGURA 122-	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> submetidas ao tratamento por ingestão com o extrato em metanol de folhas de <i>T. rubra</i>	202
FIGURA 123-	Curva de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> alimentadas com dieta artificial tratadas por ingestão com extratos em hexano e em metanol de folha e galho de <i>Trichilia rubra</i>	203
FIGURA 124-	Efeito de substâncias isoladas de frações de <i>Adiscanthus fusciflorus</i> sobre o desenvolvimento do fungo simbionte da formiga cortadeira.....	204
FIGURA 125-	Efeito dos extratos brutos de <i>A. fusciflorus</i> , <i>T. pallida</i> e <i>T. rubra</i> sobre <i>B. cereus</i> e <i>S. aureus</i>	205

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Cronologia da descoberta de fármacos obtidos a partir de plantas.....	03
TABELA 2	Classificação morfológica da família Meliaceae segundo PENNINGTON & STYLES(1975).....	22
TABELA 3	Atividades biológicas reportadas para extratos de <i>Trichilia</i>	24
TABELA 4	Reunião de frações de FA-EMFTP.....	49
TABELA 5	Resultados obtidos nas coletas das espécies vegetais.....	67
TABELA 6	Massa e rendimento dos extratos das três espécies vegetais	67
TABELA 7	Resultado da partição líquido-líquido, massa e rendimento das frações de <i>A. fusciflorus</i>	68
TABELA 8	Resultado da partição líquido-líquido, massa e rendimento das frações de <i>T. pallida</i>	69
TABELA 9	Resultado da partição líquido-líquido, massa e rendimento dos frações de para <i>T. rubra</i>	70
TABELA 10	Dados de RMN ¹ H das substâncias 1 a 3 (CDCl ₃ , 200 MHz)....	82
TABELA 11	Dados de RMN ¹³ C das substâncias 1 a 3 (CDCl ₃ , 50 MHz)....	82
TABELA 12	Dados de RMN ¹ H das substâncias 5 e 6 (CDCl ₃ , 400 MHz)...	90
TABELA 13	Dados de RMN ¹³ C das substâncias 5 e 6 (CDCl ₃ , 50 MHz)....	90
TABELA 14	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) e RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) para a substância 7.....	94
TABELA 15	Dados de RMN ¹³ C das substâncias 8 a 12 (CDCl ₃ , 50 MHz)	106
TABELA 16	Dados de RMN ¹³ C das substâncias 8 a 12 (CDCl ₃ , 50 MHz)	107
TABELA 17	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) e RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) para a substância 13.....	110
TABELA 18	Dados de RMN ¹ H para 14 e 15 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	117
TABELA 19	Dados de RMN ¹ H para 14 e 15 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	117
TABELA 20	Dados de RMN ¹ H para 16 e 17 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	126
TABELA 21	Dados de RMN ¹ H para 16 e 17 (CDCl ₃ , 200 MHz).....	126
TABELA 22	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) e RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) para a substância 18.....	129
TABELA 23	Dados de RMN ¹³ C para 19 (CDCl ₃ , 50 MHz).....	132
TABELA 24	Dados de RMN ¹ H para 22 e 24	149
TABELA 25	Dados de RMN ¹³ C para 22 e 24.....	150
TABELA 26	Dados de RMN ¹ H para 26 e 27	158
TABELA 27	Dados de RMN ¹³ C para 26 e 27.....	158
TABELA 28	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) e RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) para a substância 28.....	159
TABELA 29	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) e RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) para a substância 29.....	164
TABELA 30	Dados de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200 MHz) e RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) para a substância 30.....	168

TABELA 31-	Atividade inibitória dos extratos de <i>A. fusciflorus</i> , <i>T. pallida</i> e <i>T. rubra</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	169
TABELA 32-	Atividade inibitória das substâncias isoladas de <i>A. fusciflorus</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	171
TABELA 33-	Atividade inibitória das substâncias isoladas de <i>T. pallida</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	173
TABELA 34-	Atividade inibitória das substâncias isoladas de <i>T. pallida</i> frente à enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	174
TABELA 35-	Atividade inibitória dos extratos de <i>A. fusciflorus</i> , <i>Trichilia pallida</i> e <i>T. rubra</i> frente à enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	175
TABELA 36-	Atividade das substâncias isoladas de <i>A. fusciflorus</i> frente à inibição da enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	177
TABELA 37-	Atividade das substâncias isoladas de <i>Trichilia pallida</i> frente à inibição da enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	179
TABELA 38-	Atividade das substâncias isoladas de <i>Trichilia rubra</i> frente à inibição da enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	180
TABELA 39-	Atividade dos extratos de <i>A. fusciflorus</i> , <i>T. pallida</i> e <i>T. rubra</i> sobre a forma tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	180
TABELA 40-	Frações consideradas ativas frente às formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	181
TABELA 41-	Atividade das substâncias isoladas frente às formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	182
TABELA 42-	Efeito dos extratos de <i>A. fusciflorus</i> , incorporados à dieta artificial, na duração da fase larval e pupal, na mortalidade (%) de lagartas e pupas e no peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> .	184
TABELA 43-	Duração da fase larval e pupal e peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com dieta artificial tratada com frações de <i>A. fusciflorus</i>	185
TABELA 44-	Duração média da fase larval e pupal e peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> quando alimentada com dieta artificial tratada com diferentes concentrações de esquimianina.....	187
TABELA 45-	Duração média da fase larval e pupal e peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com dieta artificial tratada com diferentes concentrações de isopimpineline.....	188
TABELA 46-	Atividade de substâncias isoladas de frações de <i>A. fusciflorus</i> , quando estas foram aplicadas sobre a dieta artificial de <i>S. frugiperda</i>	189
TABELA 47-	Estimativa da CL ₅₀ (%) de Esquimianina, substância isolada de <i>A. fusciflorus</i> , e de NeemAzal [®] -TS, formulação à base de sementes de <i>A. indica</i> , para lagartas de 2 ^o ínstar de <i>S. frugiperda</i> aos 10 dias após a inoculação.....	191
TABELA 48-	Estimativa da CL ₉₀ (%) de Esquimianina, substância isolada de <i>A. fusciflorus</i> , e de NeemAzal [®] -T/S, formulação à base de sementes de <i>A. indica</i> , para lagartas de 2 ^o ínstar de <i>S. frugiperda</i> aos 10 dias após a inoculação.....	191

TABELA 49-	Efeito dos extratos de <i>T. pallida</i> , quando incorporados à dieta artificial, sobre <i>S. frugiperda</i>	192
TABELA 50-	Efeito das frações de <i>T. pallida</i> , quando incorporados à dieta artificial, sobre <i>S. frugiperda</i>	193
TABELA 51-	Atividade de substâncias isoladas de frações de <i>A. fusciflorus</i> , quando estas foram aplicadas sobre a dieta artificial de <i>S. frugiperda</i>	194
TABELA 52-	Duração média (dias \pm EP) da fase larval e pupal e peso de pupa de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial tratada com os extratos de <i>T. rubra</i>	195
TABELA 53-	Efeito das frações de <i>T. rubra</i> incorporadas à dieta artificial de <i>S. frugiperda</i>	196
TABELA 54-	Efeito de substâncias isoladas de frações de <i>T. rubra</i> sobre quando estas foram incorporadas à dieta artificial de <i>S. frugiperda</i>	198
TABELA 55-	Toxicidade dos extratos e frações de <i>A. fusciflorus</i>	200
TABELA 56-	Efeito de extratos e frações de <i>A. fusciflorus</i> , <i>Trichilia pallida</i> e <i>T. rubra</i> sobre o desenvolvimento do fungo simbiote da formiga cortadeira.....	203
TABELA 57-	Efeito de substâncias isoladas de frações ativas de <i>Adiscanthus fusciflorus</i> , <i>Trichilia pallida</i> e <i>T. rubra</i> sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.....	204
TABELA 58-	Efeito dos extratos brutos de <i>T. rubra</i> e <i>T. pallida</i> sobre diferentes microorganismos (1000 μ g/disco).....	205

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1	Metodologia geral utilizada para obtenção de substâncias ativas.....	35
ESQUEMA 2	Metodologia geral utilizada para obtenção dos extratos.....	37
ESQUEMA 3	Metodologia geral utilizada no processo de partição líquido-líquido.....	38
ESQUEMA 4	Fracionamento da fração em hexano do extrato em hexano da raiz de <i>A. fusciflorus</i> (FH-EHRA).....	39
ESQUEMA 5	Processo de fracionamento do extrato em diclorometano das sementes de <i>T. pallida</i>	52
ESQUEMA 6	Fracionamentos realizado na fração em metanol do extrato em metanol de folhas de <i>Trichilia rubra</i>	55

SUMARIO

PARTE 1	01
1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1- A importância de buscar de substâncias ativas.....	02
1.2 - A busca de substâncias ativas frente às doenças tropicais.....	05
1.2.1 - A doença de Chagas.....	06
1.2.2 - A Leishmaniose.....	09
1.3 - A busca de substâncias ativas no controle de insetos-pragas.....	15
1.3.1 - Considerações sobre <i>S. frugiperda</i>	15
1.3.2 - As formigas cortadeiras.....	17
1.4 - Plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae.....	19
1.4.1- A Família Rutaceae.....	19
1.4.1.1- Características químicas e biológicas da família Rutaceae.....	19
1.4.1.2 - O gênero <i>Adiscanthus</i> e a espécie <i>A. fusciflorus</i>	20
1.4.1.2.1- Características químicas e biológicas de <i>A. fusciflorus</i>	21
1.4.2 - A Família Meliaceae.....	22
1.4.2.1- Características químicas e biológicas da família Meliaceae.....	23
1.4.2.2- O gênero <i>Trichilia</i> P. Browne.....	23
1.4.2.3.1- Substâncias químicas e atividades biológicas de <i>Trichilia</i>	23
1.4.2.3.2 - <i>Trichilia pallida</i>	24
1.4.2.3.2.1- Características química e biológica de <i>T. pallida</i>	24
1.4.2.3.3 - <i>Trichilia rubra</i>	27
1.4.2.3.3.1- Características química e biológica de <i>T. rubra</i>	27
PARTE 2	29
2 - OBJETIVOS.....	30
2.1- Objetivo Geral.....	30
2.2 -Objetivos específicos.....	30
PARTE 3	31
3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	32
3.1- Materiais e métodos utilizados no isolamento e identificação estrutural das substâncias.....	32
3.1.1- Estratégia de estudo.....	34
3.2- Material Botânico.....	35
3.2.1- Coleta e identificação botânica.....	35
3.2.2- Preparação do material vegetal e obtenção dos extratos.....	37
3.2.3 - Partição líquido-líquido.....	38
3.3- Isolamento dos constituintes químicos	38
3.3.1- Fracionamento dos extratos brutos de <i>A. fusciflorus</i>	39
3.3.2- Fracionamento dos extratos brutos de <i>T. pallida</i>	46
3.3.2- Fracionamento dos extratos brutos de <i>T.rubra</i>	53

3.3.2- Fracionamento dos extratos brutos de <i>T. rubra</i>	53
3.4- Metodologias dos ensaios biológicos.....	57
3.4.1- Ensaio enzimáticos.....	57
3.4.1.1- Ensaio com gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	57
3.4.1.2- Ensaio com APRT de <i>L. tarentolae</i>	58
3.4.2- Ensaio <i>in vitro</i>	59
3.2.2.1- Ensaio sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	59
3.4.3 - Ensaio com insetos.....	60
3.4.3.1- Ensaio frente a <i>Spodoptera frugiperda</i>	60
3.4.3.1.1- <i>Screening</i> de extratos, frações e substâncias isoladas.....	60
3.4.3.1.2- Avaliação da atividade das substâncias isoladas.....	61
3.4.3.2- Ensaio com operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	62
3.4.3.2.1- Ensaio com fungo simbiote (<i>L. gongylophorus</i>).....	63
3.4.4- Determinação da atividade antimicrobiana.....	64
PARTE 4	66
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
4.1- Coleta do material vegetal.....	67
4.2- Obtenção dos extratos.....	67
4.3- Partição líquido-líquido dos extratos.....	68
4.4- Substâncias isoladas.....	71
4.5 - Determinação estrutural dos constituintes químicos.....	75
4.5.1- Derivados do ácido diidrocinâmico.....	75
4.5.1.1- Identificação estrutural da substância 1	75
4.5.2.2 - Identificação estrutural da substância 2.....	77
4.5.2.3 - Identificação estrutural da substância 3.....	80
4.5.2- Cumarinas.....	83
4.5.2.1- Identificação do Psaroleno (4).....	83
4.5.2.2- Identificação do Bergapteno (5).....	84
4.5.2.3- Identificação de Isopimpineline (6).....	87
4.5.2.4- Identificação de Prangol (7).....	91
4.5.3 - Alcalóides.....	95
4.5.3.1- Alcalóides furoquinolínicos.....	95
4.5.3.1.1- Identificação da dictamina (8).....	95
4.5.3.1.2- Identificação da γ -fagarina (9).....	98
4.5.3.1.3- Identificação da evolitrina (10).....	100
4.5.3.1.4- Identificação da esquimianina (11).....	102
4.5.3.1.5- Identificação da kokusagininina (12).....	104
4.5.3.2- Alcalóide 2-quinolônico	108
4.5.3.2.1- identificação da <i>N</i> -Metilflindersina (13).....	109
4.5.4- Triterpenos.....	111

4.5.4.1- Triterpenos cicloartanos.....	111
4.5.4.1.1- Identificação de 24-metilenocicloarta-3 β ,26-diol (14).....	111
4.5.4.1.2- Identificação de 24-metilenocicloarta-3 β ,22-diol (15).....	115
4.5.5.2- Identificação de triterpeno friedelano.....	118
4.5.5.2.1- Identificação de friedelina (16).....	118
4.5.5.2.2 -Identificação de friedelan-28-ol (17).....	121
4.5.4.3- Identificação de triterpeno lupano.....	127
4.5.4.3.1- Identificação de lupeol (18).....	127
4.5.4.4- Identificação de triterpeno Ursano e Oleanano.....	130
4.5.4.4.1- Identificação da mistura de α e β -amirina (18).....	130
4.5.6- Esteróides.....	133
4.5.6.1 - identificação de fitoesteróides.....	133
4.5.6.1.1 - identificação do β -sitosterol (20).....	133
4.5.6.1.2 - identificação de do β -sitosterol glicosilado (21).....	135
4.5.6.2 - Esteróides com esqueleto tipo colestano.....	136
4.5.6.2.1- Identificação de 3 β -hidroxi-colestan-23-eno (22).....	136
4.5.6.2.2- Identificação de 24-metileno-3 β , 22-diidroxi-colesterol (23).....	139
4.5.6.2.3- Identificação de 24-metileno-3 β ,4 β ,22-triidroxi-colesterol (24)..	142
4.5.7-Limonóides.....	144
4.5.7.1- Identificação de Gedunina (25).....	144
4.5.7.2- Identificação de 7-desacetilgedunina (26).....	151
4.5.7.3- Identificação de Limonina (27).....	157
4.5.8-Flavonóides.....	160
4.5.8.1- Identificação da Quercetina (28).....	160
4.5.8.2- Identificação da Quercetrina (29).....	163
4.6- Resultados dos ensaios biológicos.....	167
4.6.1- Ensaio enzimáticos.....	167
4.6.1.1- Ensaio de inibição da enzima gGAPDH de <i>T. cruzi</i>	167
4.6.1.2- Ensaio de inibição da enzima APRT de <i>L. tarentolae</i>	173
4.6.2- Ensaio biológico <i>in vitro</i>	178
4.6.2.1- Ensaio frente às formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	178
4.6.2.1.1- Efeitos dos extratos sobre as formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	178
4.6.2.1.2- Efeitos das frações sobre as formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	179
4.6.2.1.3- Efeito de substâncias sobre as formas tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	180
4.6.3- Busca de substâncias com atividade sobre <i>S. frugiperda</i>	182
4.6.4- Busca de substâncias com atividade sobre <i>Atta sexdens</i>	197
4.6.5-Atividade antimicrobiana.....	203
PARTE 5	204
5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	205
PARTE 6	208
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	209

RESUMO

BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS EM PLANTAS AMAZÔNICAS: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae). Este trabalho teve como principal objetivo buscar metabólitos secundários com atividade antiparasitária e ou inseticida em *A. fusciflorus* (Rutaceae), *T. pallida* e *T. rubra* (Meliaceae). Os modelos biológicos selecionados foram: 1) Atividade antiparasitária - à forma tripomastigota de *T. cruzi*, inibição da atividade de gGAPDH de *T. cruzi*, inibição da atividade de APRT de *L. tarentolae* e 2) Atividade inseticida - ensaio frente a *Spodoptera frugiperda* e *Atta sexdens* uma formiga cortadeira de folhas. Todos os extratos foram bioensaiados e fracionados através de partição líquido-líquido. De cada partição foram obtidas cinco frações que também foram submetidas aos ensaios biológicos. As frações foram selecionadas por dois critérios: a) avaliação dos efeitos biológicos das frações em relação aos seus respectivos extratos e b) perfil químico da fração. Através de fracionamentos sucessivos foi possível isolar e ou identificar várias substâncias de diferentes classes químicas: derivados do ácido diidrocinâmico, cumarinas, alcalóides, triterpenos, esteróides (alguns com estruturas inéditas), limonóides e flavonóides. A identificação estrutural das substâncias se deu através de diferentes técnicas de RMN e comparação com os dados publicados na literatura. Assim, na busca por substância com atividade inibitória da atividade da enzima APRT foi apresentada o efeito de alcalóides; a inibição da atividade da enzima gGAPDH de *T. cruzi* principalmente causada pelos flavonóides e furanocumarinas e a atividade de algumas substâncias frente as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Na busca por substâncias inseticidas para *S. frugiperda* pode-se destacar a atividade de limonóides, triterpenos cicloartanos, esteróides colestanos, flavonóides, cumarinas e alcalóides quando incorporados a dieta artificial dando enfoque à atividade inseticida de esquimianina e à estimativa da sua DL₅₀. Nos ensaios realizados por ingestão com operárias de *A. sexdens* foi observado a toxicidade de alguns extratos, principalmente o extrato em metanol das folhas de *A. fusciflorus* e de um triterpenos cicloartano isolado deste extrato que também teve sua atividade avaliada. Foi observado ainda, que algumas substâncias isoladas causaram efeito deletério sobre o fungo simbiote da formiga cortadeira e para algumas bactérias. Assim, ao fim deste trabalho, foram obtidas substâncias ativas frente a todos os modelos biológicos inicialmente propostos.

ABSTRACT

SEARCH FOR BIOACTIVE SUBSTANCES IN THE AMAZON PLANTS: *Adiscanthus fusciflorus* (RUTACEAE), *Trichilia pallida* AND *T. rubra* (MELIACEAE). The aim of this work was the search for antiparasitic and insecticide compounds in active extracts from the following amazon plants: *A. fusciflorus* (Rutaceae), *T. pallida* e *T. rubra* (Meliaceae). The selected biological models were: 1) antiparasitic activity – against the forms tripomastigota of *T. cruzi*, inhibition of the activity of gGAPDH of *T. cruzi*, inhibition of the activity of APRT of *L. tarentolae* and 2) insecticidal activity - against *Spodoptera frugiperda* and *Atta sexdens* a leafcutter ant. All the extracts were bioassayed and liquid-liquid partition was carried out. From this each partition they were obtained five fractions that were obtained from each extract and these were assayed as well. The fractions were selected by two criteria: the) evaluation of the biological activity of the fractions in relation to your respective extracts and chemical profile of each fraction. Through successive fractioning it was possible to isolate and identify series of different compounds such as: dihydrocinnamic acid derivatives, coumarins, alkaloids, triterpenoids and steroids (some of them are described for the first time), limonoids and flavonoids. The identification of the compounds was carried out through different kind of NMR technique and comparison with data from the literature. The search for compounds with inhibitory activity on the enzyme APRT led to the furanoquinoline alkaloids. The results obtained for inhibitory effect of the enzyme gGAPDH of *T. cruzi* are promising compounds. Some of the isolated compounds showed interesting activity against trypanomastigote forms of *T. cruzi*. The results obtained for inhibitory effect of the enzyme gGAPDH of *T. cruzi* are promising compounds. Some of the isolated compounds showed interesting activity against trypanomastigote forms of *T. cruzi*. In the search for insecticidal compounds against *S. frugiperda* it was evaluated the activity of limonoids, cicloartane triterpenes, steroids, flavonoids, cumarins and alkaloids. Special attention was driven to the incorporation of skiamminine and the estimate DL₅₀. In the bioassay carried out to *A. sexdens* it was observed the toxicity of some extracts, mainly the methanol extract of leaves from *A. fusciflorus*. It was also observed that some compounds exhibited antimicrobial activity on symbiotic fungi of *A. sexdens* and for some pathogenic bacteria. In conclusion, in this work it was possible to isolate and identify active compounds in all proposed biological models.

Parte

1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- A BUSCA DE SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL BIOLÓGICO EM PLANTAS

Plantas são tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas (NEWMAN et al., 2003).

Uma variedade de compostos orgânicos de origem vegetal, produto principalmente do metabolismo secundário são hoje considerados biologicamente ativos, já que apresentam alguma ação biológica como: tranqüilizante, analgésica, antiinflamatória, citotóxica, antiviral, antimicrobiana, anticoncepcional, fungicida, inseticida entre outras.

O mercado atual de fitofármacos e fitoterápicos que é da ordem de US\$ 9 a 11 bilhões/ano, sendo que mais de 13.000 plantas são mundialmente usadas como fármacos ou fontes destes (TYLER, 1994).

Especificamente em relação às plantas medicinais, a incorporação de novos antitumorais à terapêutica, tem sido apontada como argumento demonstrativo da potencialidade dos produtos naturais como fonte importante de substâncias que venham a ser utilizada como fármaco e ou como protótipos para novos fármacos (CRAGG et al., 1997; NEWMAN et al., 2003).

Embora cerca de 100 mil compostos oriundos de plantas, e aproximadamente 20 mil compostos obtidos de microorganismos tenham sido determinados, as fontes de metabolismo secundário parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades consideradas de extrema importância à química medicinal e à agricultura (YUNES et al., 2001).

Nas últimas décadas, as descobertas de maior impacto na busca de novos fármacos, têm origem em investigações químicas e ou biológicas de plantas, que têm fornecido um número considerável de substâncias ativas, sendo que algumas inclusive chegaram até a fase de ensaios clínicos (CRAGG et al., 1997), entre as quais podem ser citadas: a vincristina (figura 1, pág. 3), vimblastina, vindersina, irinotecano e docetaxel (CORREA,1995).

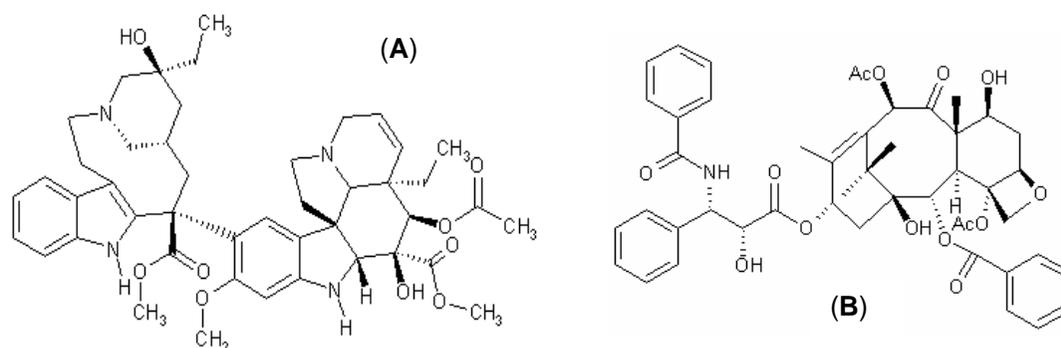


FIGURA 1 - Estrutura da vincristina (A) e do taxol (B), fármacos com comprovada ação antitumoral.

O uso de produtos naturais, como matéria prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo e a importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas, como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos foi sucintamente demonstrado pela cronologia apresentada por SCHENKEL e colaboradores (2003) (tabela 1).

TABELA 1 - Cronologia da descoberta de fármacos obtidos a partir de plantas.

Gênero	Fármaco	Data de isolamento	Categoria terapêutica
<i>Digitalis</i>	Digitoxina	1785-1875	Cardiotônicos
<i>Papaver</i>	Morfina	1805	Hipnoanalgésico
<i>Chinchona</i>	Quinina	1820	Antimalárico
<i>Atropa</i>	Atropina	1833	Anticolinérgico
<i>Physostigma</i>	Fisostigmina	1864	Anticolinesterásico
<i>Pilocarpus</i>	Pilocarpina	1875	Colinérgico
<i>Ephedra</i>	Efedrina	1887	Adrenérgico
<i>Erythroxylum</i>	Cocaína	1895	Anestésico local
<i>Chondodendrum</i>	Tubocurarina	1895	Bloqueador neuromuscular
<i>Claviceps</i>	Esgotamina	1922	Bloqueador adrenérgico
<i>Melilotus</i>	Dicumarol	1941	Anticoagulante
<i>Rauwolfia</i>	Reserpina	1952	Neuroléptico

Deve ser ressaltado que em muitas situações a descoberta da atividade destas substâncias não representou apenas o surgimento de um grupo novo de substância, mas originou a identificação de uma nova possibilidade de intervenção terapêutica (SCHENKEL et al., 2003), pois até o isolamento e estudo da atividade biológica de substâncias como: a cocaína (figura 2, pág. 4), tubocurarina e atropina não eram

conhecidas, por exemplo, anestésicos locais, bloqueadores musculares, anticolinérgicos, entre outras categorias terapêuticas.

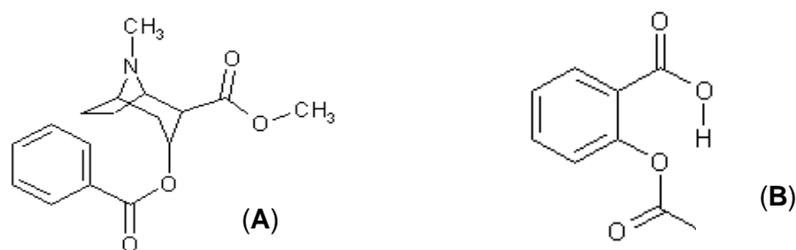


FIGURA 2 - Estrutura da cocaína (A) e aspirina (B), exemplos de fármacos que revolucionaram a terapêutica.

Logo após a fase em que os protótipos obtidos a partir de vegetais desempenharam um papel relevante, ocorreu um período de abandono desta abordagem a partir dos anos 60, talvez por ter sido considerado que já haviam sido isolados as principais substâncias ativas ou mesmo um esgotamento das possibilidades de modificações químicas daqueles protótipos já conhecidos (SARETT, 1979). Houve então um decréscimo de interesse e investimentos por parte das indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisas (KINGSTON, 1996).

Os processos utilizados para a separação e purificação dos constituintes e a sua elucidação estrutural eram trabalhosos e eventualmente levavam a obtenção de quantidades insuficientes da substância para realizar ensaios farmacológicos e toxicológicos, bem com a dificuldade ou a impossibilidade de sintetizar a molécula ativa, com perdas significativas de investimentos (BALANDRIN et al., 1985).

No entanto, estas dificuldades que de certa forma limitavam a busca de novos fármacos a partir de produtos naturais, foram sendo ultrapassadas através de avanços técnicos significativos, principalmente a partir dos anos 80, tanto no desenvolvimento de novos métodos de *screening*, como nas técnicas de isolamento e elucidação estrutural e da biotecnologia (HOOK et al., 1997; PLETSCH, 1998; MACIEL, 2002).

Nos últimos anos houve um ressurgimento do interesse na investigação de produtos naturais para identificação de novas substâncias ativas como compostos de partida para o desenvolvimento de novos fármacos e hoje vem sendo constantemente destacada a importância de buscar protótipos para novos fármacos

a partir de produtos naturais devido principalmente às singularidades das moléculas obtidas (CRAGG, 1997; SHU, 1998; NEWMAN et al., 2003).

Várias estratégias são utilizadas para determinar a atividade de produtos naturais. Em geral inicia-se testando os extratos e posteriormente os que foram considerados ativos são submetidos a fracionamento cromatográfico através dos mais variados métodos. As frações obtidas são então ensaiadas, repetindo-se esse processo até a obtenção de um ou mais composto responsável pela atividade biológica inicialmente observada (HOSTETTMANN et al., 1997; CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Os bioensaios mais utilizados são os que envolvem organismos inferiores (microorganismos e microcrustáceos, entre outros), ensaios bioquímicos (enzimas e receptores), cultura de células e insetos. Estes ensaios estão cada vez mais simplificados, passíveis de utilização, inclusive em bancadas de laboratório de química (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; McLAUGHILIN et al, 1993) que podem auxiliar e direcionar a seleção de extratos e frações.

1.2- A BUSCA DE COMPOSTOS ATIVOS FRENTE ÀS DOENÇAS TROPICAIS

Um grande problema que afeta populações, principalmente dos países mais pobres, em várias partes do mundo são as doenças causadas por parasitas.

As principais doenças endêmicas e que estão em momentos diferentes no que se refere ao controle e à importância são: o dengue, a febre amarela, a doença de Chagas, a esquistossomose, as leishmanioses, a hanseníase e a tuberculose.

A pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos no combate às doenças tropicais são considerados um nicho de mercado de pouco interesse por parte das empresas estrangeiras já que, nos últimos 25 anos, surgiram apenas 15 novos fármacos para estas doenças enquanto que no mesmo período, 179 novos medicamentos foram criados para combater, por exemplo, problemas cardiovasculares, que representam 11% do total de enfermidades. Assim, dos 1.393 novos fármacos aprovadas entre 1975 e 1999, apenas 1% era indicado para doenças tropicais.

Devido à falta de remédios ou a inexistência de tratamento adequado, todo ano 14 milhões de pessoas morrem no mundo vítimas de doenças infecciosas. Segundo o documento “Desequilíbrio Fatal”, publicado pela organização não governamental Médicos sem Fronteira, nos últimos cinco anos, nenhuma das 20 empresas de maior faturamento dos Estados Unidos, da Europa e do Japão lançou no mercado novos fármacos para doenças tropicais que são consideradas extremamente negligenciadas (BERMAN & MOON, 2001).

1.2.1 - A DOENÇA DE CHAGAS

A tripanossomíase americana, ou doença de Chagas é comum em todos os países da América latina de acordo com estimativas da OMS.

Do México ao Chile, ela ameaça um quarto da população da América Latina onde se estima que 18 milhões de pessoas estejam infectadas. No Brasil, estimam-se cerca de seis milhões de pessoas infectadas, com uma população de risco em torno de vinte milhões de habitantes (GOLDENBERG & KRIEGER, 1997; MOREL, 1999).

Antigamente era considerada uma enfermidade rural, mas passou a atingir centros urbanos, estimando-se que, aproximadamente 300.000 indivíduos infectados residam em São Paulo e mais de 200.000, no Rio de Janeiro (CUNHA NETO, 1999).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (FIGURA 3B), um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. No sangue dos vertebrados, o *T. cruzi* se apresenta sob a forma tripomastigota e, nos tecidos, como amastigota (NEVES, 1991).



FIGURA 3 - A: Foto do *Triatoma infestans* e B: Forma tripomastigota de *T. cruzi*.
Figuras obtidas em http://www9.who.int/tropical_diseases/databases/imagelib.pl

Esta doença é transmitida aos humanos e a outros mamíferos pela picada de um inseto conhecido popularmente como "barbeiro", das espécies: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, dentre outros (FIGURA 3A).

Os principais reservatórios do parasita, além do homem são mamíferos domésticos e silvestres, sendo mais importantes epidemiologicamente aqueles que coabitam ou estão muito próximos do homem, como: cães, ratos e gatos.

Historicamente a via mais importante de transmissão de *T. cruzi* para humanos é através das fezes do barbeiro infectado (via vetorial), no entanto, em função de grandes correntes migratórias da população pelo país, a transfusão sangüínea passou a representar, especialmente nas grandes cidades, a via mais importante no surgimento de novos casos da doença de Chagas (via transfusional).

Pode-se estimar o risco deste tipo de transmissão se for considerado que ocorre no Brasil cerca de seis milhões de transfusões por ano, com cerca de 5% da população portadora do *T. cruzi* (CUNHA NETO, 1999).

Graças a programas de Saúde Pública, a transmissão vetorial está sendo controlada em diversos países da América Latina, como é o caso do Brasil já que o governo brasileiro vem fazendo esforços a fim de se enquadrar em normas internacionais para o controle desta doença através de monitoramento entomológico para identificar a presença do vetor. Para tanto, desencadeou ações de combate a esta doença através da utilização de inseticidas específicos, assim como as melhorias habitacionais das áreas consideradas endêmicas.

Devido a isto uma Comissão Internacional de especialistas constituída pela OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde) e pelos países do Cone Sul, com a finalidade de avaliar a situação epidemiológica de cada país, conferiu o certificado de interrupção da transmissão vetorial pelo *T. infestans* a oito estados brasileiros, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraíba, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Pernambuco. Para os estados do Piauí e Rio Grande do Sul, os estudos estão em fase de conclusão (figura 4).

**Certificado
Internacional
para Doença
de Chagas**

- Estados certificados
- Estados em processo de certificação
- Programa em andamento para obter certificação
- Área não incluída no Plano de Eliminação por não conter *Triatoma infestans*
- Área não incluída no Plano de Eliminação por ser considerada indene (sem ocorrência da doença)



FIGURA 4 - Situação dos estados brasileiros quanto à transmissão vetorial por *Triatoma infestans*. Dados FUNASA-2003

Entretanto a existência de vários reservatórios silvestres (aves, anfíbios e répteis) e *T. cruzi* torna, segundo MOREL (1999), a eliminação definitiva do parasita impossível. Além do mais, o controle do inseto vetor requer ações preventivas constantes e não só quando o número de infectados aumenta.

Apesar do esforço de controlar a transmissão vetorial da doença de Chagas, pouco tem sido feito para melhorar o tratamento das pessoas já infectadas. A doença de Chagas é a doença infecciosa, dentre as grandes endemias brasileiras, que não possui tratamento eficiente já que para o tratamento desta, apenas dois medicamentos vem sendo usados o *Benzonidazol* (*Rochagan*[®]) no Brasil, que é eficaz na supressão da parasitemia e o *Nifurtimox* (*Lampit*[®])¹ na Argentina e Chile que tem sido considerado o mais eficaz (figura 5).

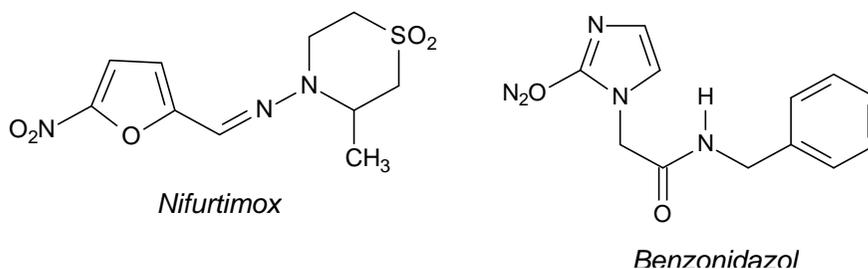


FIGURA 5 - Fármacos utilizados no tratamento de doença de Chagas

¹O *Nifurtimox* ainda não está disponível no Brasil e nos países onde a Doença de Chagas é considerada endêmica, podendo ser encontrado em algumas farmácias da Argentina.

Ambos os medicamentos são ativos contra formas sanguíneas do parasita devendo ser administrados continuamente por um período de 30 dias, idealmente 60 dias (CINERMAN et al., 2002), mas só são eficazes se forem administrados antes de as lesões dos pacientes se tornarem crônicas.

Estes fármacos apresentam baixa eficácia e alta toxicidade especialmente na fase crônica da doença. Aparentemente, não existe imunidade estéril ao *T. cruzi*, isto é, o parasita persiste no organismo do paciente em baixos números, ao longo da fase crônica da doença e isso significa que o tratamento com os fármacos disponíveis não leva à eliminação completa do parasita de pacientes adultos cronicamente infectados e assim, a cura parasitológica completa é difícil (CINERMAN et al., 2002).

O fato de estes medicamentos não serem efetivos e causarem graves efeitos colaterais tais como anorexia, perda de peso, hiperexcitabilidade, vertigens, cefaléias e dores abdominais, estimulam a realização de estudos na busca de novos fármacos que sejam mais eficientes e menos tóxicos que os existentes (VERONESI, 1991) e embora o problema seja grave, ainda há poucas pesquisas sendo desenvolvidas atualmente para encontrar novos medicamentos que sejam menos tóxicos e mais eficazes o que possibilitaria o tratamento de pacientes com doença de Chagas de todas as idades.

1.2.2 - A LEISHMANIOSE

Esta doença atinge cerca de 350 milhões de pessoas em aproximadamente 88 países em todo o mundo e destes, 12 milhões chegam a falecer (WHO, 1993).

É uma doença parasitária causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* Ross. (família: *Psychodidae*, sub-família: *Phlebotominae*) conhecidos pelo nome genérico de flebótomo, sendo transmitida por insetos denominados mosquito-palha ou birigui (figura 6A, p.10), cujas fêmeas transmitem o protozoário (figura 6B, p.10) (NEVES, 1991, CHAN-BACAB & PENA-RODRIGUEZ, 2001).

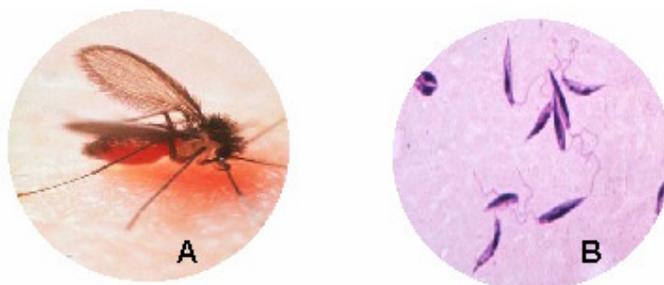


FIGURA 6 - A: “mosquito-palha”, inseto vetor de leishmaniose e B: Forma promastigota de Leishmania. Figuras obtidas em <http://www.who.int>

Segundo a Organização Mundial da Saúde as leishmanioses podem ser classificadas em:

1. Leishmaniose Visceral (LV) – A forma mais séria e fatal se não tratada ex: Calazar causada por *L. donovani s.l.*

2. Leishmaniose Cutânea (LC) – É a forma mais comum, causa de 1 a 200 lesões de pele simples que cicatrizam espontaneamente em poucos meses mais que deixa marcas feias e disformes (ex.: úlcera de Bagdad ou botão do Oriente, ambas as infecções causadas por *L. major* na África e na Ásia).

3. Leishmaniose Mucocutânea (LMC) – infecção causada por *L. braziliensis*, que inicia com úlceras na pele e destruição do tecido, especialmente nariz e boca.

4. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) - Produz lesões crônicas na pele que lembram lesões comuns em portadores de lepra. O tratamento é muito difícil.

A leishmaniose mucocutânea, também conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA), úlcera de Bauru, ferida brava etc., distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina.

No Brasil, há uma prevalência de LTA que está sendo assinalada em todos os estados e o número de casos vem aumentando consideravelmente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000b) constituindo um importante problema de saúde pública em vários estados brasileiros.

Na década de 50 houve uma diminuição geral da ocorrência de casos, porém este número vem crescendo nos últimos 20 anos, tanto em magnitude como em expansão geográfica, observando-se surtos epidêmicos em várias regiões do país: Sudeste, Centro Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000a; LACERDA, 1994).

No Estado do Amazonas há maior prevalência de casos de LTA (figura 7), principalmente na cidade de Manaus onde é considerada importante problema de saúde pública e segundo dados registrados pela Fundação de Medicina Tropical - FMT (GERRA et al., 2003) o aumento no número de casos está relacionados a processo predatório de colonização, a abertura de estradas e as conseqüentes ocupações para a agricultura com a invasão do homem nos habitats naturais dos transmissores (GERRA et al., 2003; TALHARI et al., 1988).

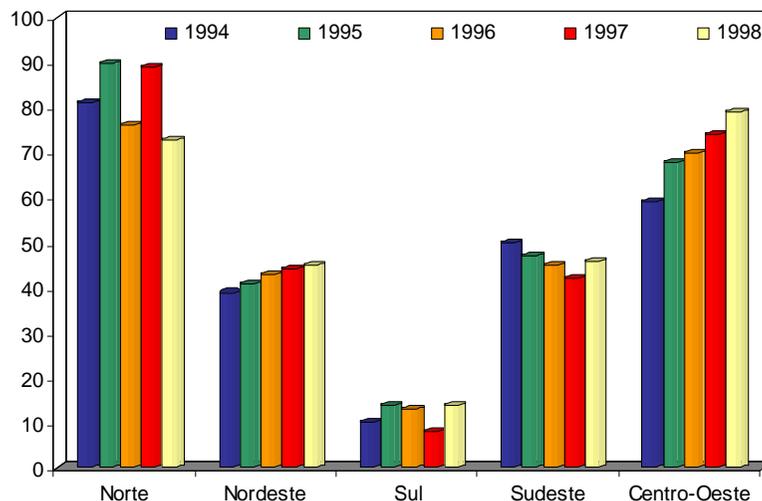


FIGURA 7 - Percentual de regiões do Brasil atingidas pela LTA (Dados FUNASA).

Para leishmaniose visceral, o número de casos anuais no mundo, chega a 500.000 e a grande maioria dos casos ocorre na Índia onde muitas pessoas morrem devido à baixa eficácia dos medicamentos.

No tratamento das leishmanioses mucocutânea e visceral são utilizados medicamentos antitumorais (RATH et al., 2003) como o *Glucantine*[®] e o *Pentosam*[®] e para os casos mais resistentes, é indicado o uso do antibiótico Anfotericina B (figura 8, p. 12).

Para leishmaniose cutânea o tratamento é semelhante, apesar de muitas vezes ser dispensável em vista de a cura ser espontânea (CINERMAN et al., 2002). O tratamento, baseado em sais de antimônio, é doloroso e restritivo, podendo ter sérios efeitos colaterais ao coração e pâncreas devido a grande duração dos tratamentos além do alto custo. Os principais efeitos colaterais são: dores musculares, articulares e abdominais, febre, náuseas e dor de cabeça.

O aparecimento de formas resistentes aos compostos atualmente disponíveis para seu tratamento é alarmante e tem sérias conseqüências. Este quadro de toxicidade, ineficácia e aparecimento de formas resistentes aumentam a importância do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

Recentemente, um fármaco utilizado no tratamento de câncer de mama, a miltefosina (figura 8) apresentou resultados importantes e hoje está sendo utilizado com sucesso no tratamento leishmaniose visceral na Índia. Este medicamento tem a vantagem de ser administrado por via oral e ser mais barato que os demais medicamentos existentes (SUNDAR et al., 2002; ZENTARIS, 2002).

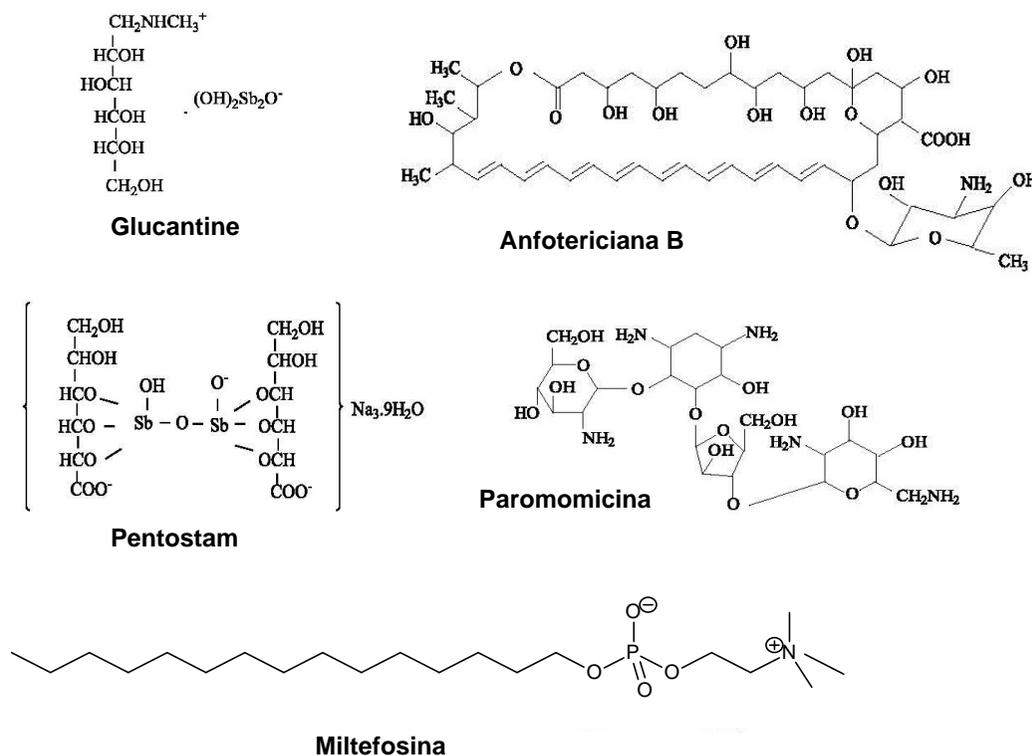


FIGURA 8 - Fármacos utilizados no tratamento de leishmanioses

A abordagem moderna para o desenvolvimento de fármacos explora enzimas únicas ao metabolismo do parasito ou que possuam diferenças de especificidade catalítica entre a enzima do parasita e do hospedeiro. Estas enzimas podem ser empregadas como alvo no desenvolvimento de inibidores da cadeia metabólica, sem com isso afetar o hospedeiro.

Esta abordagem objetiva buscar substâncias sejam naturais ou sintéticas, que interrompam o ciclo biológico do protozoário que depende da via glicolítica para obter energia (figura 9).

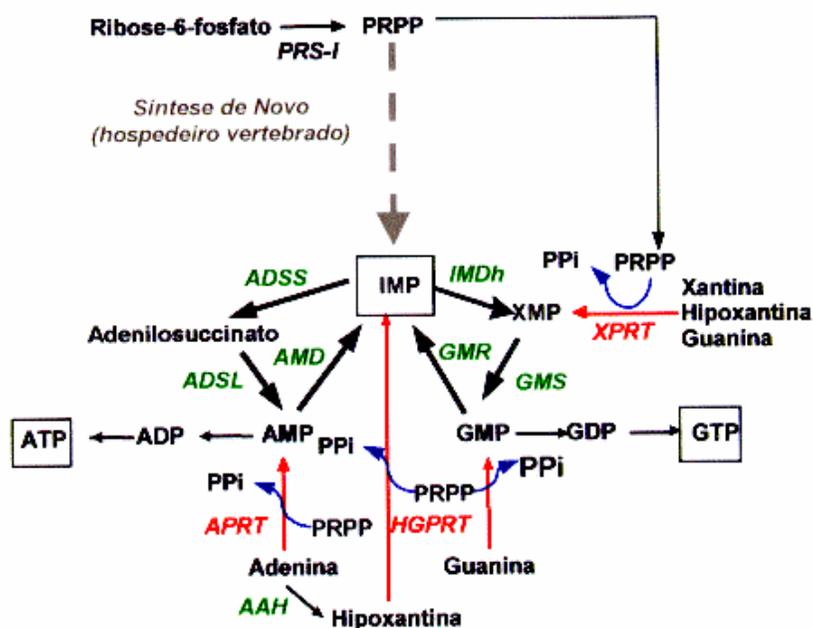


FIGURA 9 - Via de recuperação de purino-nucleotídeos em *Leishmania* (SILVA, 2001)².

²AAH = adenina deaminase; ADP = difosfato de adenosina; ADSL = adenilossuccinato liase; ADSS = adenilossuccinato sintetase; AMD = adenosina monofosfato deaminase; AMP = monofosfato de adenosina; APRT = adenina fosforribosiltransferase; ATP = trifosfato de adenosina; GDP = difosfato de guanosina; GMP = monofosfato de guanosina; GMR = guanosina monofosfato redutase; GMS = guanosina monofosfato sintetase; GTP = trifosfato de guanosina; HGPRT = hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase; IMDh = inosina monofosfato desidrogenase; IMP = monofosfato de inosina; PPI = pirofosfato; PRPP = 5-fosforribosil-1-pirofosfato; XMP = monofosfato de xantose; XPRT = xantina fosforribosiltransferase.

A via de recuperação de purino-nucleotídeos de *Leishmania* e *Trypanosoma* (figura 9) não varia e a maioria dos parasitas depende da atividade de fosforibosil-transferases (BERENS et al., 1995). Todas as PRTases catalisam reações semelhantes, envolvendo uma purina livre e o 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP).

As reações de recuperação de purino-nucleotídeos catalisadas pelas PRTases são independentes entre si e desta forma, a exploração desta via metabólica, é utilizada como alvo na busca de inibidores específicos para cada uma das enzimas.

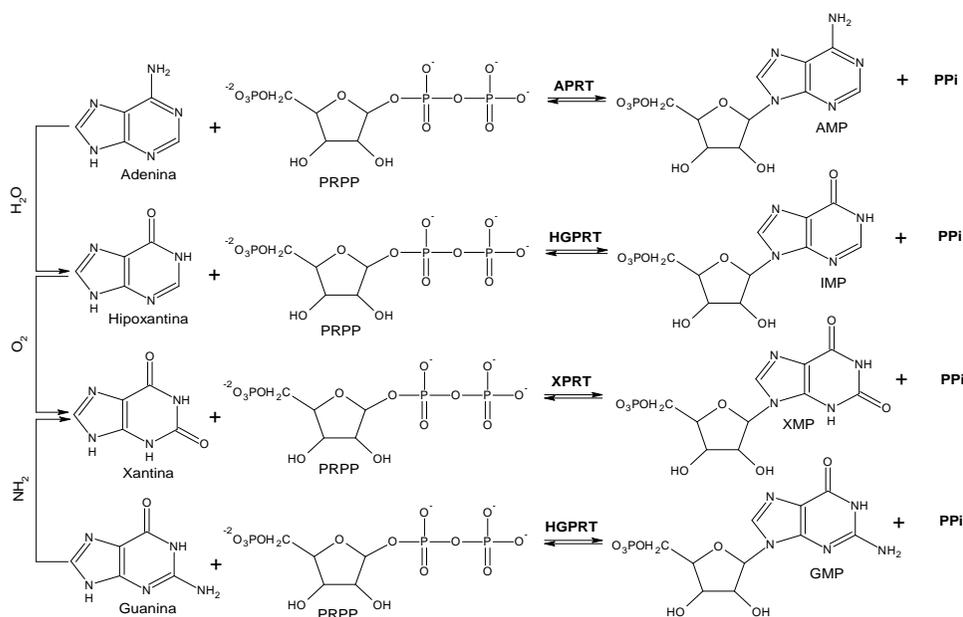


FIGURA 10 - Reações catalisadas pelas PRTases em Kinetoplastidas

Com o objetivo de encontrar substâncias inibidoras da atividade das enzimas o laboratório de Cristalografia de Proteínas do IFSC/USP expressou, purificou, cristalizou e determinou a estrutura cristalográfica de algumas enzimas entre elas APRT de *L. tarentolae* (SILVA et al., 2004) e gGAPDH de *T. cruzi* (CASTILHO, 2004), e estas vêm sendo utilizadas como modelo para busca de substâncias que inibam a atividade enzimática e por conseguinte tenha atividade antiparasitária.

Até o momento foram testados frente às duas enzimas vários extratos vegetais principalmente das famílias Rutaceae e Meliaceae e substâncias obtidas destes algumas com potencial inibidor (TOMAZELA et al., 2001; VIEIRA et al, 2001; PAVÃO et al 2002; MORAES et al., 2003; NAPOLITANO et al., 2003a; NAPOLITANO et al., 2003b; SILVA et al., 2003 e CASTILHO, 2004).

1.3 - A BUSCA DE COMPOSTOS COM POTENCIAL PARA O CONTROLE DE INSETOS-PRAGA

As perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e doenças, chegam a 37%, sendo 13% causada por insetos (GATEHOUSE et al., 1992). Em função disso, um grande volume de inseticidas é empregado anualmente na agricultura, o que além de aumentar o custo de produção, faz surgir a médio e longo prazo, efeitos de poluição ambiental, problemas de saúde aos agricultores e consumidores e seleção natural de insetos resistentes com o conseqüente desequilíbrio biológico (ROBBS et al., 1996; GALLO et al., 2002).

Neste sentido, torna-se primordial, a busca de métodos alternativos de controle destes insetos, incluindo-se aí a utilização de produtos naturais já que certas plantas possuem resistência a insetos e, há muitos anos, tem-se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos de plantas associadas com essa defesa (LARA, 1991; ROEL, 2000; FERREIRA et al., 2001).

1.3.1 - CONSIDERAÇÕES SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

Esta espécie foi reconhecida como praga do milho em 1797, nos Estados Unidos e hoje é relatada como causadora de injúrias em plantações de milho ao Sul dos Estados Unidos, México, Américas do Sul e Central. No Brasil é a principal praga do milho, causando perda de 34 a 40% na produção e prejuízos que chegam a 400 milhões de dólares/ano.

Este inseto também é considerado praga de outras culturas, tais como: feijão, arroz, cana-de-açúcar, trigo, aveia, alfafa e hortaliças.

Larvas do inseto, no primeiro e segundo ínstaes, alimentam-se de folhas sendo que a partir do terceiro passam, no caso da cultura do milho, a atacar o cartucho da planta podendo levá-la à morte (CRUZ & TURPIN, 1982). Nos últimos ínstaes, medem aproximadamente 5 cm e apresenta coloração que varia do marrom, verde até quase preta (figura 11, p. 16).

Findo o período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas de coloração avermelhada medindo cerca de 10 mm de comprimento. A duração do período pupal varia de 7 a 27 dias (VALICENTE & CRUZ, 1991).

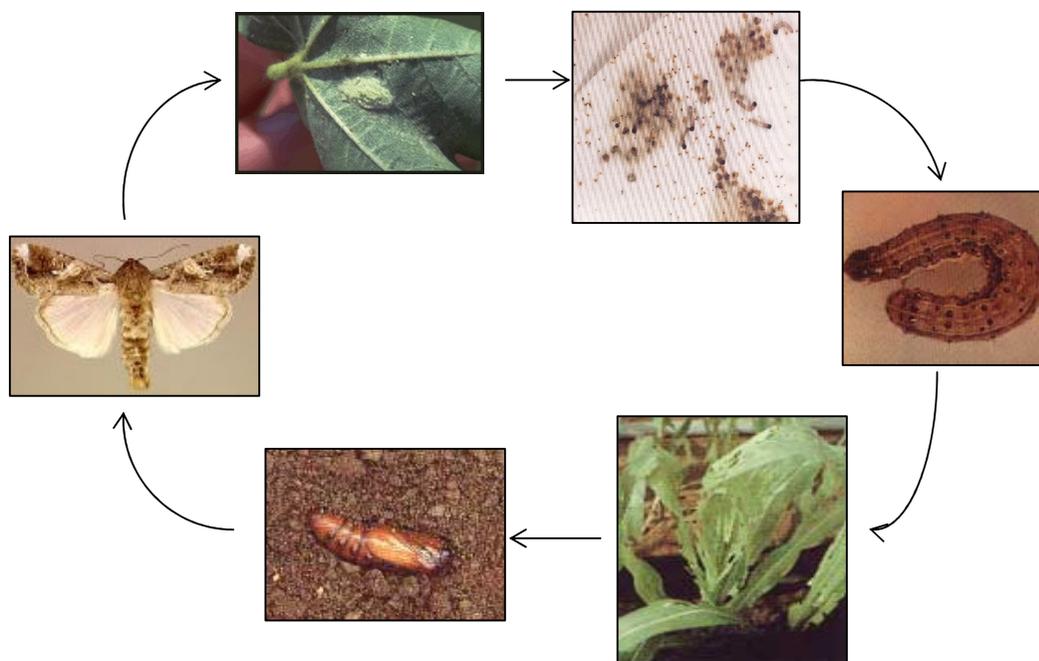


FIGURA 11 - Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*³.

Os adultos de *S. frugiperda* apresentam longevidade de aproximadamente 10 dias a temperatura de 25°C, umidade relativa de 60% e fotofase de 14 horas. A oviposição é realizada no período noturno. Os ovos são depositados em massas com cerca de 150 unidades, podendo uma fêmea colocar até 1000 ovos. O período de incubação é de aproximadamente 3 dias a temperaturas entre 25 e 29°C, umidade relativa de 70% e fotofase de 12 horas (PATEL, 1981). O período larval é variável de 12 a 30 dias (COSTA et al., 1984; VALICENTE & CRUZ, 1991).

³ Fotos copiadas de <http://arneson.cornell.edu/ZamoPlagas/cogollero.htm> e http://www.agrobyte.com.br/lagarta_do_cartucho.htm em novembro de 2003.

1.3.2- AS FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas são insetos sociais que vivem juntos em colônias. Pertence à ordem Hymenoptera, mesmo grupo em que se encontram as vespas e abelhas (DELLA LUCIA, 1993; FORTI, 1997; CAMPOS-FARINHA et al., 1995).

Todas as formigas estão agrupadas em uma única família, a família Formicidae e restritas a 12 gêneros incluídos na tribo *Attini* onde foram reunidas às formigas que cultivam fungos em substratos vegetais. Nesta tribo estão incluídos os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas popularmente como saúvas e quenquéns, respectivamente⁴ (figura 12) (CAMPOS-FARINHA et al., 1995; BUENO & CAMPOS-FARINHA et al., 1995).



FIGURA 12 - Operária de *Atta sexdens*

No Brasil ocorrem cerca de 2000 espécies de formigas, sendo a maioria benéfica ao meio ambiente. Na área urbana 20 a 30 espécies são consideradas pragas e na área agrícola as formigas cortadeiras (saúvas e quenquéns) causam grandes prejuízos às plantações (DELLA LUCIA, 1993; FORTI, 1997; CAMPOS-FARINHA et al., 1995).

Por necessitarem cortar folhas e outras partes de diferentes vegetais para garantirem a sua sobrevivência as formigas cortadeiras são responsáveis por prejuízos de grande monta à agricultura brasileira sendo que a importância do seu estudo deve-se aos prejuízos que elas causam às plantações, ao elevado número

⁴ Em: <http://www.spcabrazil.com.br/cdpragas/formigas.htm>.

de colônias que uma determinada área pode apresentar, à vasta distribuição e ao controle difícil e oneroso (BASTOS, 1982; DELLA LUCIA, 1993; FORTI, 1997).

A associação mutualística entre a formiga cortadeira *Atta sexdens* (saúva limão) e o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* é muito forte e existe uma total dependência entre ambos (CRUZ & BATISTA FILHO, 1993; BONINI et al., 1981).



FIGURA 13 - A: Fungo cultivado por formigas cortadeiras e B: Fungo simbiote: *Leucoagaricus gongylophorus* (SINGER).

A utilização de produtos naturais de origem vegetal com ação tóxica às formigas e/ou ao fungo simbiote é uma perspectiva na busca de um método eficaz de controle desta praga.

Há um grande número de pesquisas relacionadas com plantas que não são atacadas por formigas entre elas, podem ser citados os trabalhos realizados em cooperação entre o Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro-SP e o Laboratório de Produtos Naturais-UFSCar onde foi observada a ação tóxica de extratos de plantas e seus ácidos graxos (GROOTE, 1995; BUENO et al., 1995; ÁCACIO-BIGI et al., 1998; MONTEIRO et al., 1998; HEBLING et al., 2000; RODRIGUES-GAMBOA et al., 2001; FERNANDES et al., 2002).

Mais recentemente foi descoberto, que *L. gongylophorus* produz polissacaridases em culturas de laboratório e que estas enzimas também são encontradas no intestino das formigas. Assim, substâncias isoladas com atividade frente às formigas estão também sendo testadas para observar o efeito sobre esta enzima e esta é mais uma estratégia que vem sendo utilizada na busca de substâncias que auxiliem no controle das formigas cortadeiras (SIQUEIRA et al., 1998).

1.4 - PLANTAS DA FAMÍLIA RUTACEAE E MELIACEAE

1.4.1 - A FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae constitui o maior grupo da ordem Rurales e reuni aproximadamente 1.612 espécies e 150 gêneros distribuídas nas regiões tropicais e temperadas do globo terrestre, sendo mais abundantes na América tropical, sul da África e Austrália (WATERMAN & GRUNDON, 1983). Na região neotropical ocorrem 52 gêneros e, destes 33 no Brasil, com centro de diversidade na Amazônia e na Mata Atlântica (RIBEIRO et al., 1999).

No estado do Amazonas, no entanto, a família Rutaceae, conta com 16 gêneros e 22 espécies distribuídos desde a Amazônia Ocidental fronteira à Venezuela, Colômbia e Peru, ao longo da calha Amazônica até a Central, que é o seu principal centro de dispersão (ALBUQUERQUE, 1976; RIBEIRO et al., 1999).

1.4.1.1 - Características químicas e biológicas da família Rutaceae

Essa família apresenta uma diversidade muito grande de metabólitos secundários (WATERMAN & GRUNDON, 1983; DA SILVA et al., 1988), destacando-se: os alcalóides, especialmente os derivados do ácido antranílico além de cumarinas, lignanas, flavonóides, terpenóides e limonóides (WATERMAN, 1975).

Muitos desses metabólitos possuem variadas atividades biológicas, de grande importância farmacológica (WATERMAN & GRUNDON, 1983), despertando o interesse cada vez maior na investigação fitoquímica dessa família.

A família tem vários representantes de valor medicinal, merecendo destaque os "jaborandis" (*Pilocarpus jaborandi*, *P. pauciflorus*, *P. pinnatifolius* e *P. selloanus*) que, fornecem o alcalóide pilocarpina, utilizado no tratamento de glaucoma e calvície. Outro representante é a "arruda" (*Ruta graveolens*) cujo princípio ativo é a rutina que apresenta potencial antiespasmódico. Muitos gêneros apresentam ainda madeira de excelente qualidade (RIBEIRO et al., 1999).

1.4.1.2 - O GÊNERO *Adiscanthus* E A ESPÉCIE *A. fusciflorus*

O gênero *Adiscanthus* é monotípico cuja espécie, *A. fusciflorus*, ocorre no estado do Amazonas como um subarbusto ou arvoreta de 1,5 a 5 m de altura, caule fino, amarelado; ramos mais jovens cor cinza canela. As folhas têm de 35-54 cm de comprimento e de 8-12 de largura; inflorescência de 30-48 cm de comprimento. As flores são pardo-amareladas passando a vermelho-escuro até roxa por fora, e brancas por dentro (Figura 14).

A espécie tem distribuição pela Amazônia Central, desde Manaus, passando pelo município de Borba no Amazonas até Bela Vista no Rio Tapajós, Pará sendo mais abundante na cidade de Manaus.

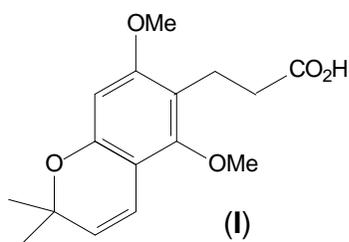
Habitam em campina, campinarana, matas primária e secundária de terra firme arenosa ou argilosa úmida sendo rara nas regiões inundáveis de pequenos igarapés e terra firme. Floresce de janeiro a dezembro e frutifica de janeiro a outubro (RIBEIRO et al., 1999).



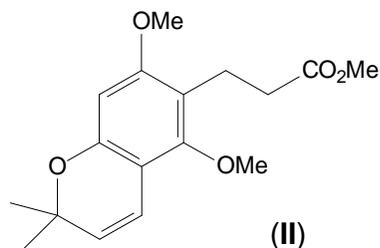
FIGURA 14 - *Adiscanthus fusciflorus* (RIBEIRO et al., 1999).

1.4.1.2.1- Características químicas e biológicas de *A. fusciflorus*

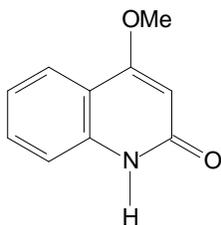
Até o momento há, segundo levantamento bibliográfico realizado, dois trabalhos publicados para esta espécie (VIEIRA, 1978 e VIEIRA, et al., 1980) onde foi realizado estudo fitoquímico em extratos obtidos da casca do caule e isolados derivados do ácido dihidrocinâmico (estruturas I e II), alcalóides quinolínicos (estruturas III a V) e furoquinolínicos (estruturas VI a VIII). Nenhuma atividade biológica ou utilização popular foi reportada para esta espécie.



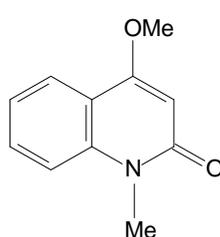
Ácido 3-[2,6-dimetoxi-6', 6'-
dimetilpirano(2',3': 3,4) fenil] propiônico



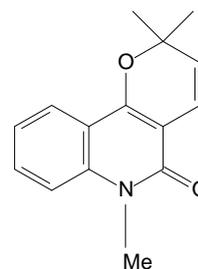
3-[2,6-dimetoxi-6', 6'-dimetilpirano(2',3':
3,4) fenil] propionato de metila



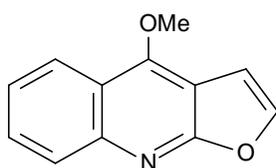
(III) 4-metoxi-2-quinolona



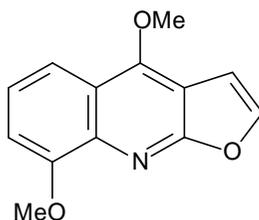
(IV) 1-metil-4-metoxi-
2-quinolona



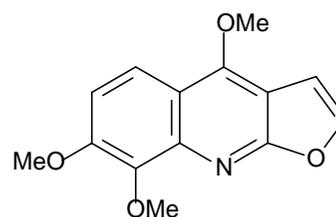
(V) N-Metilflindersina



(VI) Dictamina



(VII) γ-Fagarina



(VIII) Esquimianina

1.4.2 - A FAMÍLIA MELIACEAE

A família Meliaceae é predominantemente tropical, com cerca de 1.400 espécies em 51 gêneros, distribuídos pelos trópicos e subtropicais de ambos os hemisférios. Ocorre largamente na floresta densa da encosta atlântica, mesmo em altitudes elevadas e é formada por árvore de grande porte, fornecedora de madeira com alto valor comercial (PENNINGTON & STYLES, 1975; DA SILVA et al., 1984).

No Brasil seis gêneros são encontrados: *Carapa*, *Trichilia*, *Guarea*, *Cabralea*, *Swietenia* e *Cedrela*, sendo os três últimos exclusivos do continente americano (PENNINGTON & STYLES, 1975).

TABELA 2 - Classificação morfológica da família Meliaceae segundo PENNINGTON & STYLES (1975).

Sub-famílias	Tribos	Gêneros
Swietenioideae	Cedreleae	<i>Cedrela</i> , <i>Toona</i>
	Swietenieae	<i>Khaya</i> , <i>Neobeguea</i> , <i>Soymida</i> , <i>Chukrasia</i> , <i>Entandrophragma</i> , <i>Pseudocedrela</i> , <i>Lovoa</i> , <i>Schmardaea</i> , <i>Swietenia</i>
	Xylocarpeae	<i>Carapa</i> , <i>Xilocarpus</i>
Melioidaeae	Turraeeae	<i>Munronia</i> , <i>Naregamia</i> , <i>Turraea</i> , <i>Nymania</i> , <i>Humbertioturraea</i> , <i>Calodecaryia</i>
	Melieae	<i>Melia</i> , <i>Azadirachta</i>
	Vavaeeae	<i>Vavaea</i>
	Trichilieae	<i>Trichilia</i> , <i>Walsura</i> , <i>Pseudobersama</i> , <i>Pterorhachis</i> , <i>Cipadessa</i> , <i>Ekerbegia</i> , <i>Lepidotrichilia</i> , <i>Owenia</i> , <i>Malleastrum</i> , <i>Astrotrichilia</i>
	Aglaiiaeae	<i>Aglaiia</i> , <i>Lansium</i> , <i>Aphanamixis</i> , <i>Reinwardtiodendron</i> , <i>Sphaerosacme</i>
Guareeae	<i>Heckeldora</i> , <i>Cabralea</i> , <i>Ruagea</i> , <i>Turreanthus</i> , <i>Guarea</i> , <i>Chisocheon</i> , <i>Megaphyllaea</i> , <i>Synoum</i> , <i>Anthocarapa</i> , <i>Pseudocarapa</i> , <i>Dysoxylum</i>	
Quivisianthoideae	Sandoriceae	<i>Sandoricum</i> , <i>Quivisianthe</i>
Cuparonianthoideae		<i>Cuparonianthus</i>

1.4.2.1 - Características químicas e biológicas da família Meliaceae

Quimicamente a família é conhecida pela ocorrência de limonóides, considerados marcadores taxonômicos e a química destes, iniciou-se em 1960 com o isolamento da gedunina de *Entandrophragma angolense* e desde então outros limonóides vêm sendo isolados de espécies de Meliaceae.

Esta família vem cada vez mais sendo estudada não só pelo interesse químico como pelas várias atividades biológicas: anticâncer, antiparasitária, antimalárica, antifúngica, bactericida, antiviral e principalmente inseticida (azadiractina, isolado de *Azadirachta indica* é conhecida por apresentar atividade sobre mais de 400 espécies de insetos).

Em toda a Amazônia, das sementes de *Carapa guianenses* obtém-se o óleo de andiroba muito usado como repelente, antiinflamatório e antiinfecioso, e na fabricação de velas, sabões e cremes. O córtex de *Cedrela*, *Guarea*, *Trichilia* é utilizado na fabricação de inseticidas, medicamentos e corantes e os exudatos resinosos e brotos foliares de certas espécies de *Cedrela*, *Swietenia*, *Guarea* e *Trichilia* fazem parte da dieta alimentar de um grupo de primatas, tornando-se importante em planos de manejo florestal (RIBEIRO et al., 1999).

1.4.2.2 - O GÊNERO *Trichilia* P. Browne

O gênero *Trichilia* apresenta aproximadamente 70 espécies que ocorrem na América tropical, África e região Indo-Malaio (RIBEIRO et al., 1999). É um dos gêneros que possui o maior número de espécies na família e também o que mais apresenta características anatômicas de Meliaceae.

1.4.2.2.1 - Características químicas e biológicas do gênero *Trichilia*

Dentro da sub-família Melioideae, o gênero *Trichilia* é o que apresenta maior número e tipos de limonóides conhecidas como meliacinas.

Os limonóides podem apresentar vários tipos de atividades biológicas: anticancerígena, antiparasitária, antimalárica, antifúngica, antibacteriana, antiviral e, principalmente atividade contra insetos. Além dos limonóides foram isolados também

triterpenos (cicloartanos, damaranos), fitoesteróides, esteróides (pregnanos e colestano), cumarinas, lignanas, γ -lactonas, sesquiterpenos e aminoácidos (AGOSTINHO, 1996; ADORNO, 1995; CORTEZ, 1993; PUPO et al., 1996; PUPO et al., 2002).

O potencial biológico do gênero *Trichilia* vem sendo avaliado em termos de extratos brutos e substâncias isoladas (tabela 3).

TABELA 3 - Exemplos do potencial inseticida de algumas espécies de *Trichilia* reportadas na literatura para alguns extratos de *Trichilia*.

Espécie	Atividade
<i>Trichilia connaroides</i> , <i>T. hirta</i> , <i>T. martiana</i> , <i>T. havanensis</i> , <i>T. pleena</i> , <i>T. glabra</i> , <i>T. americana</i> , <i>T. trifolia</i> e <i>T. quafrifuga</i>	Fagoïnibidora contra <i>Peridroma saucia</i> e <i>Spodoptera litura</i>
<i>T. connaroides</i> , <i>T. roka</i> e <i>T. prieuriana</i>	Fagoïnibidora contra <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Acalymma vittalum</i>
<i>T. glabra</i>	Antiviral contra os vírus da pólio, estomatite e HSV ₁ (herpes simples)
<i>T. pallida</i>	Inseticida frente a <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>S. litoralis</i>
<i>T. rubra</i>	Atividade antiplaquetária

Algumas espécies de *Trichilia* vêm demonstrando-se muito promissoras como fonte de inseticidas (MIKOLAJCZAR & REED, 1987; RODRIGUEZ & LAGUNES, 1992; XIE et al., 1994; HERNANDEZ, 1995; HERNANDEZ & VENDRAMIM, 1997).

1.4.2.2.2 - *Trichilia pallida* Swartz

Esta árvore é comumente conhecida como baga-de-morcego ou catiguá (figura 15, p. 25). É amplamente distribuída do México à Argentina e, no Brasil, pode ser encontrada em bosques nativos desde a Amazônia até o Paraná, excetuando-se o Nordeste (KLEIN, 1984; RIBEIRO et al., 1999).

Descrições anatômicas e morfológicas desta espécie foram apresentadas por RIBEIRO et al., (1991) e SOUZA et al., (2001), sendo que este último descreveu especificamente sobre a morfologia e anatomia das flores.

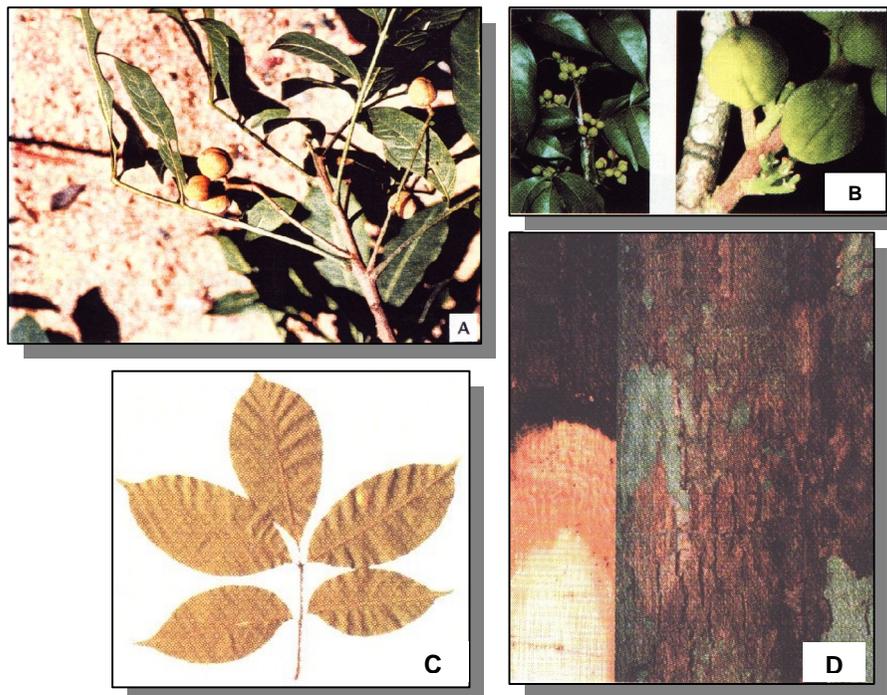
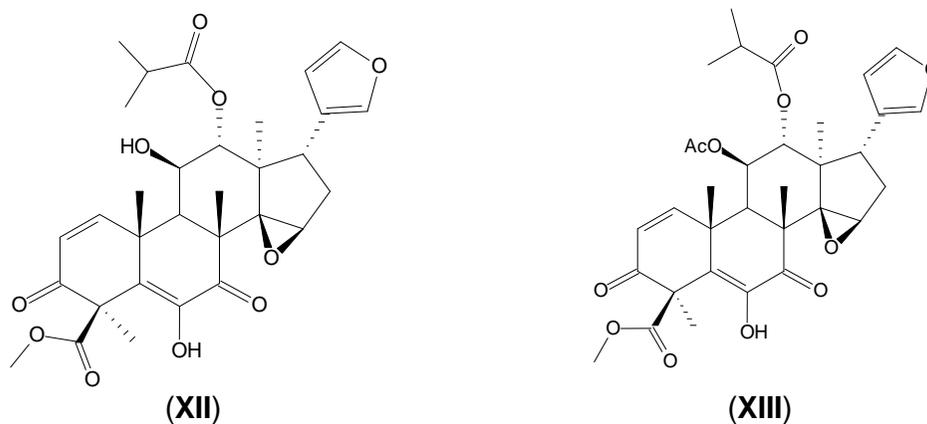
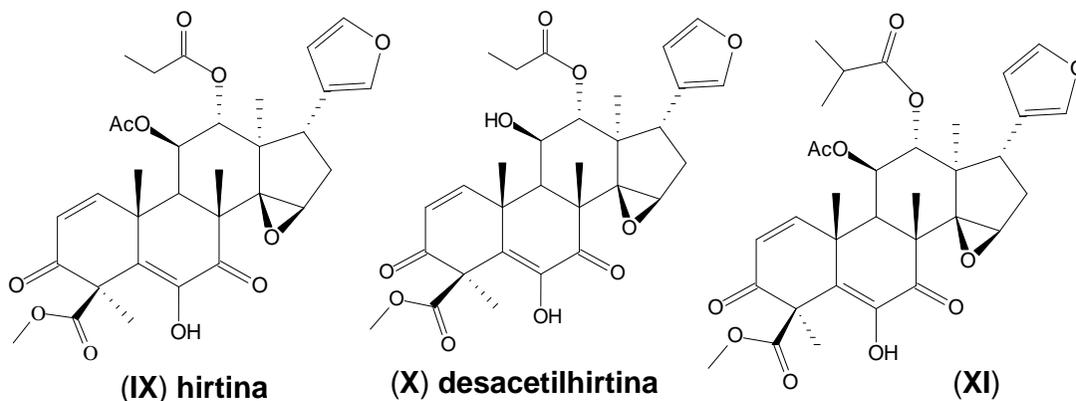


FIGURA 15 - Fotos de *Trichilia pallida* A: ramos com frutos, B: galho com frutos destacando os frutos C: detalhes da folha e D: caule com o detalhe da casca.

1.4.2.2.1- Características química e biológica de *T. pallida*

Um trabalho apresenta o estudo fitoquímico para esta espécie, realizado apenas com o extrato em acetona das raízes de um espécime de cinco anos de idade cultivada em estufa (SIMMONDS et al., 2001) onde é apresentado o isolamento e a identificação estrutural de dois limonóides já isolados de outras espécies de *Trichilia*: Hirtina (IX) e o seu derivado hidroxilado, a desacetilhirtina (X) e três outros limonóides inéditos com mesmo esqueleto de hirtina (XI-XIV) (Estruturas na p. 26).

Extratos obtidos de ramos e folhas apresentam atividade inseticida frente a *S. frugiperda* (RODRIGUÉZ & VENDRAMIM, 1997; ROEL et al., 2000; TORRECILLAS & VENDRAMIM, 2001; BOGORNÍ & VENDRAMIM, 2003).



(IX) metil 6-hidroxi-11 β -acetoxi-12 α -propanoiloxi-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-oato

(X) metil 6,11 β -diihidroxi-12 α -propanoioxi-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-oato

(XI) metil 6-hidroxi-11 β -acetoxi-12-meliacadien-29-oato-(2-metilpropanoiloxi)-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-oato

(XII) metil 6,11 β -diihidroxi -12 α -(2-metilpropanoiloxi)-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-oato

(XIII) metil 6-hidroxi-11 β -acetoxi-12 α -(2-butilbutanoloxi)-3,7-dioxo-14 β ,15 β -epoxi-1,5-meliacadien-29-

1.4.2.2.3 - *Trichilia rubra* C. DC.

Esta espécie ocorre como árvore nativa (figura 16) da bacia Amazônica podendo ser encontrada em áreas de campinarana e baixio (RIBEIRO et al., 1999).

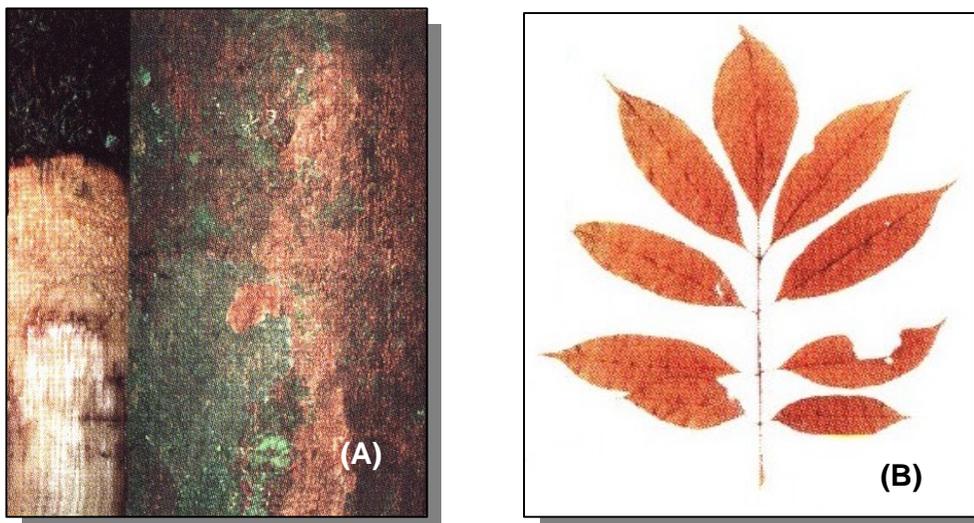


FIGURA 16 - *Trichilia rubra*. (A): caule com o detalhe da casca e do retidoma (B): detalhes da folha.

1.4.2.2.3.1 - Características química e biológica de *T. rubra*

Dois trabalhos fitoquímicos com esta espécie foram publicados (MUSZA et al., 1994 e MUSZA et al., 1995) onde foram isolados particularmente de extratos obtidos das raízes desta espécie, limonóides do tipo A, B-seco entre eles os limonóides que estes autores denominaram Rubrinas A-E (XIV a XVIII), Rubralinas A-C (XXI a XXIII), além da Hispidina A (XIX) e Nimanina I (XX) (figura 17 e 18, p. 28).

As rubralinas, segundo MUSZA et al., (1995), apresentam potente atividade inibidora de adesão celular, sendo, portanto potenciais agentes imunossupressores e/ou antiinflamatórios.

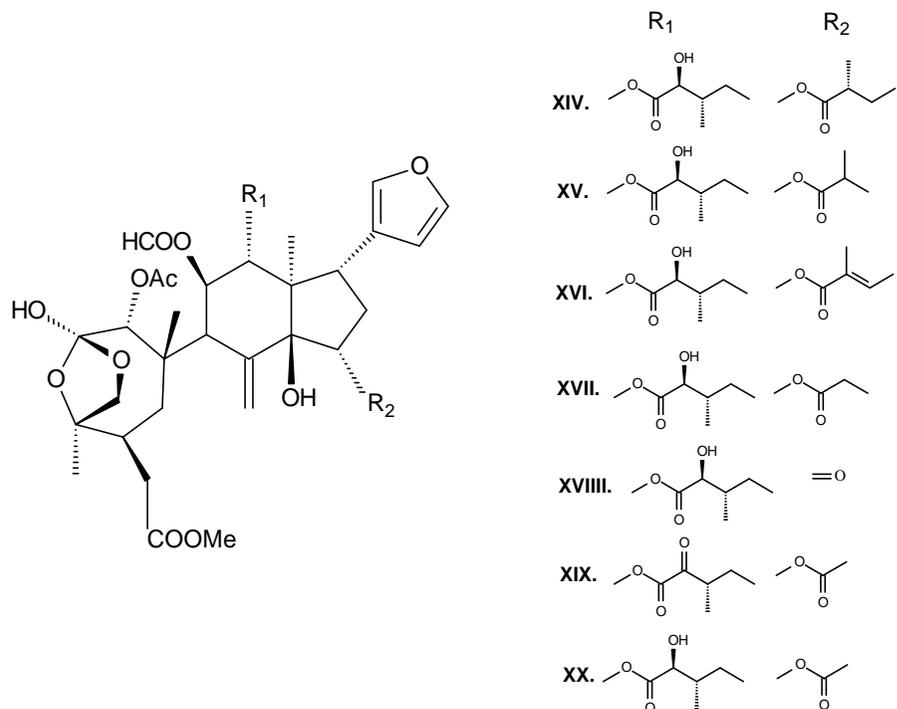
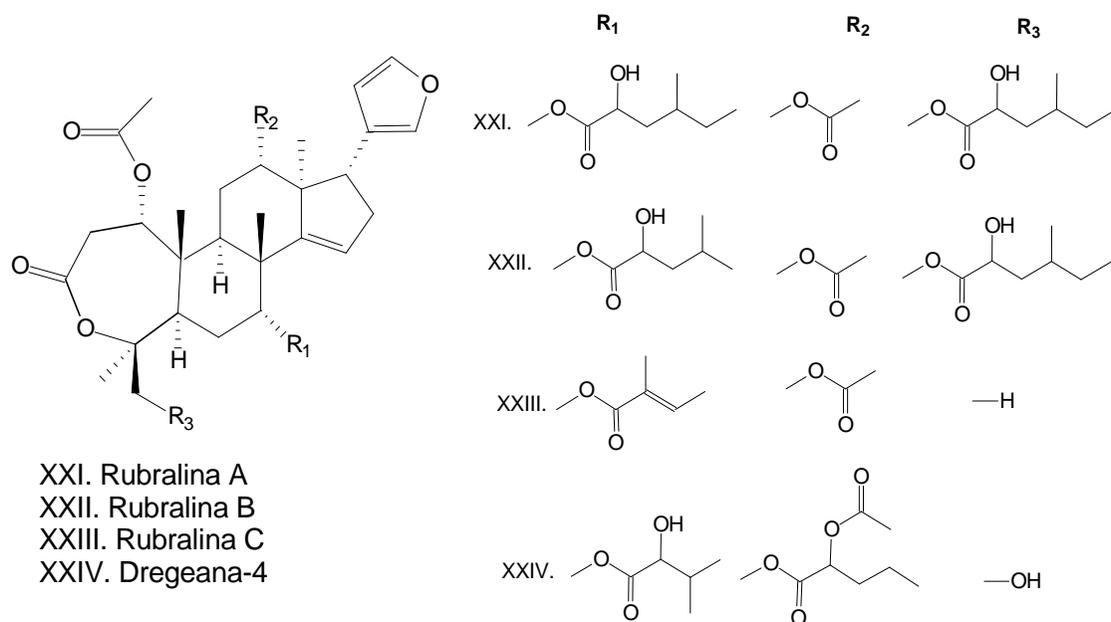


FIGURA 17 - Estrutura das Rubrinas A a E, Hispidina e Nimania de *T. rubra*



XXI. Rubralina A
 XXII. Rubralina B
 XXIII. Rubralina C
 XXIV. Dregeana-4

FIGURA 18 - Estrutura das Rubralinas A, B e C e da Dregeana 4 de *T. rubra*

Capítulo

2

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

→ Buscar substâncias ativas em extratos vegetais através de trabalho fitoquímico guiado por ensaios biológicos *in vivo*, *in vitro* e bioquímicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Buscar, nos extratos de *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *Trichilia rubra* (Meliaceae) produtos naturais que inibam as enzimas: gGAPDH de *T. cruzi* e APRT de *L. tarentolae* ;

→ Buscar, nos extratos vegetais considerados ativos, substâncias responsáveis pela atividade tripanocida frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

→ Estudar o efeito dos extratos brutos obtidos de *A. fusciflorus*, *T. pallida* e *T. rubra* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* e operárias de *Atta sexdens* (insetos modelos) visando detectar e isolar substâncias ativas que causem mortalidade ou alterações na biologia nos insetos (em condições de laboratório);

Parte

3

***Procedimentos
Experimentais***

3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 - Materiais e métodos utilizados no isolamento e identificação estrutural das substâncias

→ Para fracionar os extratos e purificar as substâncias foram utilizadas colunas de vidro, fabricadas na oficina de vidraria do Departamento de Química- UFSCar. As colunas foram empacotadas com sílica gel (230-400 *mesh* ASTM) e em alguns casos foram preparadas colunas com empacotamento misto, ou seja, duas partes do volume com sílica e outra parte com alumina neutra. Normalmente, optou-se por um sistema de eluição gradiente de polaridade, mediante a utilização de diferentes proporções de hexano e acetato de etila finalizando sempre com metanol. Os solventes utilizados foram previamente tratados e destilados na sala de destilação.

→ Alternativamente, para isolamento de algumas cumarinas, limonóides e frações mais polares foram utilizadas colunas empacotadas com *Sephadex* LH-20 fabricado pela SIGMA. Outras fases utilizadas foram: resina de poliestireno tipo XAD-4 (20-60 *mesh*) e celulose microcristalina da VETEC;

→ As frações obtidas das colunas foram analisadas mediante cromatografia em camada delgada (CCD), com cromatoplasmas em suporte em alumínio (20 x 20 cm) e indicador da MERCK e de poliestireno da ALDRICH.

→ Para purificação de algumas substâncias foi utilizada a técnica da cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). As placas foram obtidas no laboratório. Foi preparada inicialmente uma suspensão de sílica gel 60 (70-230 μm) da ALDRICH em água destilada e espalhada com espessura de filme de 1,5 mm sobre placas de vidros de 20 x 20 cm por intermédio de um espalhador do tipo Quickfit. A recuperação da amostra foi obtida pela extração da sílica com diclorometano seguido por metanol.

→ Como reveladores foram utilizados: vapores de iodo, reativo de vanilina ácida, reagente de Dragendorff e luz na região do ultravioleta, nos comprimentos de onda 254 e 360 nm;

→ Para análise de ultravioleta foi utilizado um espectrofotômetro INTRALAB UV-Vis modelo MDS-100, na região de 200 a 600 nm;

→ Em todas as separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi utilizado um equipamento Shimadzu com bomba LC-6AD, válvula reciclante, um detector de UV modelo SPD-6AV e uma coluna Shimadzu polimérica Asahipak GS-310 P (2,15 x 50 cm; 13 μ m);

→ O fracionamento dos extratos brutos polares foi realizado por cromatografia de gotas em contracorrente (Doplet Countercurrent Chromatography- DCCC) da EYELA modelo DCC-300 de modo ascendente e coletor INCIBRAS modelo FRACSOL-100, com capacidade para 90 tubos;

→ Cromatográfico Rotatório Locular em contracorrente - RLCC EYELA modelo RLCC-1000, equipado com uma bomba EYELA modelo VSP-3050 e um desgaseificador GASTORR 101 e um coletor automático EYELA modelo DC-1200. As seguintes condições foram utilizadas: Pressão na bomba: 0,5 Kg/cm² (208-209 rpm) velocidade de rotação: 67 rpm e ângulo de rotação de 40°, modo de eluição normal ascendente (fase mais densa e mais polar como fase estacionária), coleta automática de 800 gotas por fração, fluxo de eluição de 4 ml/min e *loop* de 3 ml. Os sistemas de solvente utilizado foram: hexano/diclorometano/metanol/água 45:30:15:10 (separação de cumarinas) e hexano/acetato de etila/metanol/água (5:4:1:2) (para a separação de flavonóides);

→ Os solventes foram eliminados das frações e dos extratos, sob pressão reduzida em evaporadores rotativos da BÜCHI em banho-maria com temperatura específica para cada solvente.

→ Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos à temperatura ambiente em um espectrômetro BRUKER ARX200 com frequência de 200 MHz para RMN¹H. Quando foram necessários experimentos adicionais para confirmar a estrutura da substância foram obtidos experimentos com frequência de 400 MHz e experimentos em duas dimensões: gCOSY, gHMBC e gHSQC. Para tanto foi utilizado equipamento BRUKER DRX400.

→ Os espectros de hidrogênio foram obtidos usando geralmente uma janela espectral de aproximadamente 10 ppm, programa ZG, e em alguns casos específicos usou-se o programa de pré-saturação ZGPR. O número de experimentos variou entre 8 e 32 pulsos, dependendo da quantidade de material analisado. Os deslocamentos químicos foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento escalar (J) em Hz.

→ Os experimentos de RMN¹³C foram obtidos a 50 MHz. O padrão utilizado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS). Os solventes utilizados para obtenção de espectros foram os solventes deuterados de MERCK e ALDRICH;

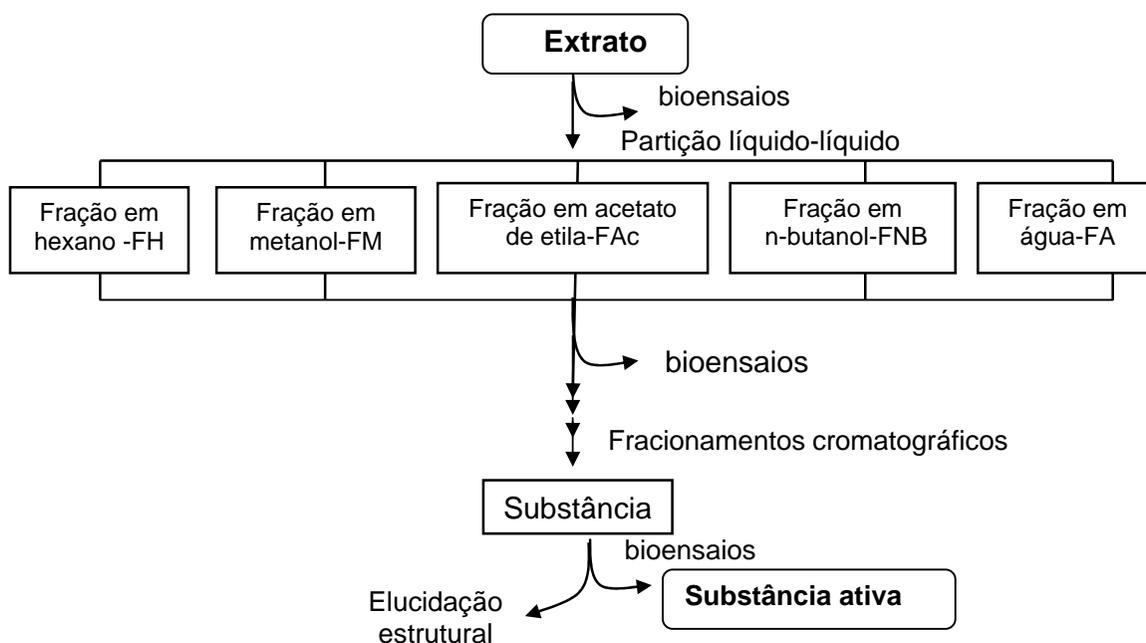
→ Para processar os espectros foram utilizados os softwares ACD/Spec Viewer[®] versão 5.04, 2000 e Mestre-C[®] versão 2.3a, 2000.

3.1.1- ESTRATÉGIA DE ESTUDO

Independentemente do modelo biológico todos os extratos e frações (obtidas pelo processo de partição líquido-líquido) foram submetidos aos ensaios biológicos. Os resultados obtidos com extratos e frações foram comparados e de acordo com os resultados, frações foram selecionadas e submetidas a processos sucessivos de fracionamento cromatográfico a fim de isolar substâncias que uma vez identificadas tiveram seu potencial, frente aos modelos biológicos, avaliado (esquema 1, p. 35).

Para selecionar frações, dois critérios foram utilizados: 1) Avaliação dos efeitos biológicos das frações em relação aos seus respectivos extratos e 2) Perfil químico da fração (analisado por CCD em diferentes eluentes e diferentes reveladores).

Devido à variedade, ao tempo e demais dificuldades inerentes ao processo de desenvolvimento de alguns dos ensaios biológicos, este trabalho não pôde ser realizado diretamente guiado pelos resultados dos ensaios biológicos, embora estes tenham sido o principal critério para a seleção e direção a seguir durante a realização do estudo fitoquímico das três espécies vegetais.



ESQUEMA 1- Metodologia geral utilizada na obtenção de substâncias ativas.

3.2- MATERIAL BOTÂNICO

3.2.1 - Coleta e identificação botânica

A abordagem utilizada para a seleção das espécies vegetais foi do tipo quimiotaxonômica ou filogenética⁵; assim as espécies selecionadas foram: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae).

As plantas foram coletadas no mês de dezembro de 2000 na Reserva Florestal Adolpho Ducke (figura 19, p. 36), uma área de 100 Km² que então pertencia ao Instituto de Pesquisas da Amazônia - INPA. Esta reserva está situada no Km 26 da estrada Manaus-Itacoatiara. Atualmente esta reserva é o jardim botânico da cidade de Manaus.

A localização das espécies foi orientada pelos mapas fornecidos pelos botânicos que trabalharam no projeto Flora (Projeto que realizou levantamento

⁵ A abordagem quimiotaxonômica ou filogenética leva em conta a seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família.

botânico, catalogação e identificação das espécies presentes na reserva por especialistas nacionais e internacionais).

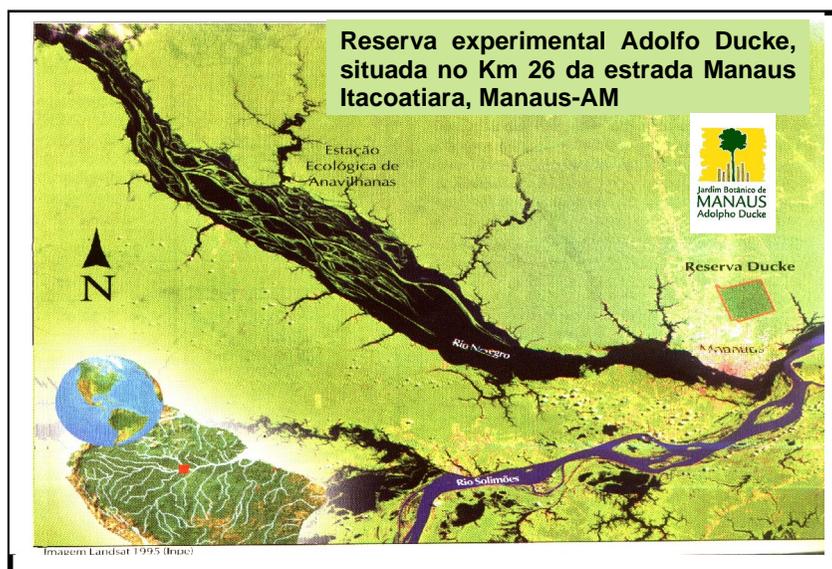


FIGURA 19 - Foto de satélite mostrando a localização geográfica da reserva.

Folhas, raízes, galhos de *A. fusciflorus* foram coletados para este estudo do espécime identificado com o número 4737 localizado na área 6 a uma distância de 20 m e um ângulo de 10° em relação ao marco 571. Foi identificada através de comparação da exsicata fértil por com o material anteriormente coletado e identificado pelo Dr. José Rubens Pirani. A exsicata fértil foi então depositada no herbário do INPA com o número 189859.

Folhas e galhos de *Trichilia pallida* foram coletados do espécime identificado pelo número 4473 localizado na área 3 a uma distância de 25 m e um ângulo de 324° em relação ao marco 1,35 km. Em seguida foi preparada exsicata e identificada por comparação com material que havia sido coletada anteriormente por SOTHETS C. A. 963. A exsicata foi depositada no herbário do INPA com o número 188343.

Folhas e galhos de *T. rubra* foram coletadas do espécime identificado com o com número 4930 localizado na área 2, a uma distância de 25 m e um ângulo de 200° em relação ao marco 127. Esta espécie havia sido anteriormente coletada por VICENTINI 395 e foi identificada por comparação e a exsicata foi depositada no herbário do INPA com o número 178677.

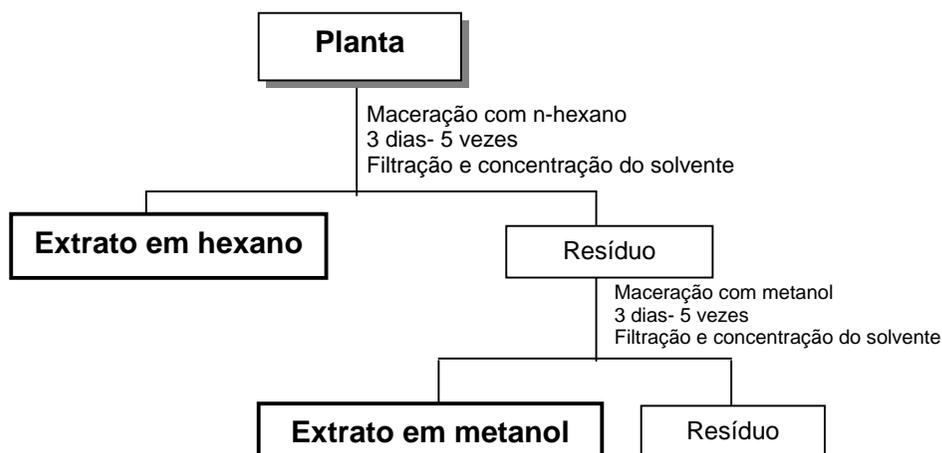
Durante o trabalho outras coletas foram realizadas:

Flores e frutos de *A. fusciflorus* foram coletados no campus da Universidade Federal do Amazonas em janeiro de 2002 e fevereiro de 2003 pela parte da manhã. Frutos de *T. pallida* foram coletados em Saltos das Orquídeas, Sapopema-PR em setembro de 2002 e em outubro de 2003, pelo Dr. Paulo C. Bogorni.

3.2.2- Preparação do material vegetal e obtenção dos extratos

O material vegetal foi inicialmente disposto em finas camadas sob papel jornal para secagem à sombra e em seguida pulverizados em moinho de faca tipo *Willey*.

A extração do material foi realizada por processo de maceração, onde cada parte de cada planta moída foi adicionada em um recipiente tipo Mariotte e submetido a processo de extração à temperatura ambiente repetidamente (remaceração), com hexano e metanol. O solvente foi trocado a cada 48 horas. O extraído obtido foi então concentrado em evaporador rotativo, resultando assim nos respectivos extratos (Esquema 2).



ESQUEMA 2 - Metodologia geral utilizada para obtenção dos extratos.

- Preparação dos extratos de sementes de *T. pallida*

As sementes foram separadas dos frutos e submetida à extração por maceração inicialmente com hexano (EHTP) em seguida diclometano (EDTP) e

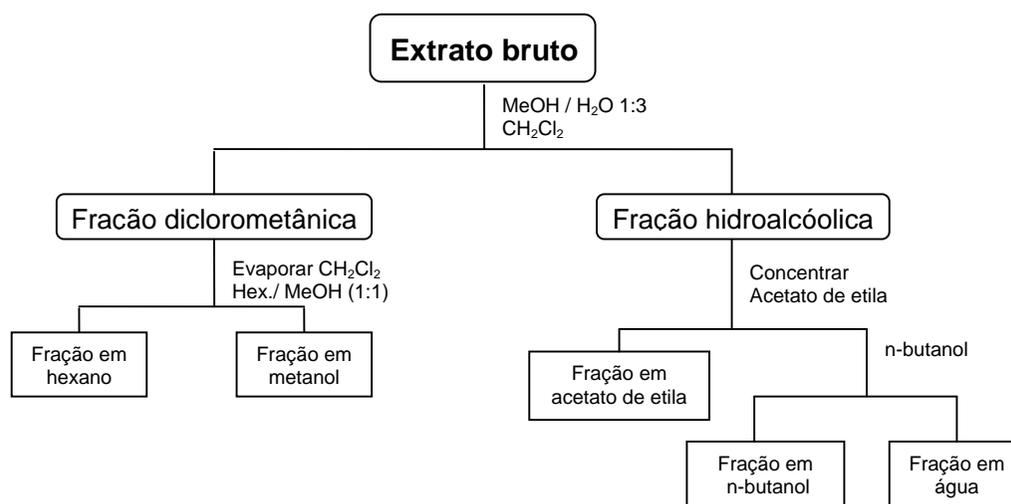
finalizando com metanol (EMTP). Assim depois de concentrado foram obtidos os três extratos correspondentes.

- Preparação dos extratos das flores e frutos de *A. fusciflorus*

Flores e frutos foram submetidos à extração por maceração inicialmente com hexano, diclorometano e metanol. Assim depois de concentrado foram obtidos os três extratos correspondentes.

3.2.3- Partições líquido-líquido

Visando uma semi-purificação das substâncias em grupos de coeficientes de partição semelhantes e para avaliar o comportamento biológico dos extratos estes foram submetidos a processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; HOSTETTMAN et al., 2003) fornecendo cinco frações cada (Esquema 3).



ESQUEMA 3 - Metodologia geral utilizada no processo de partição líquido-líquido.

3.3 - ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

As frações selecionadas de acordo com os critérios discutidos (item 3.1.1, p. 34) foram submetidas a fracionamentos cromatográficos.

Para a seleção da fase estacionária, uma pequena alíquota de cada fração foi ressuspensa em solvente apropriado e analisado por CCD em diferentes sistemas de solvente e diferentes reveladores e com base nas informações obtidas foi

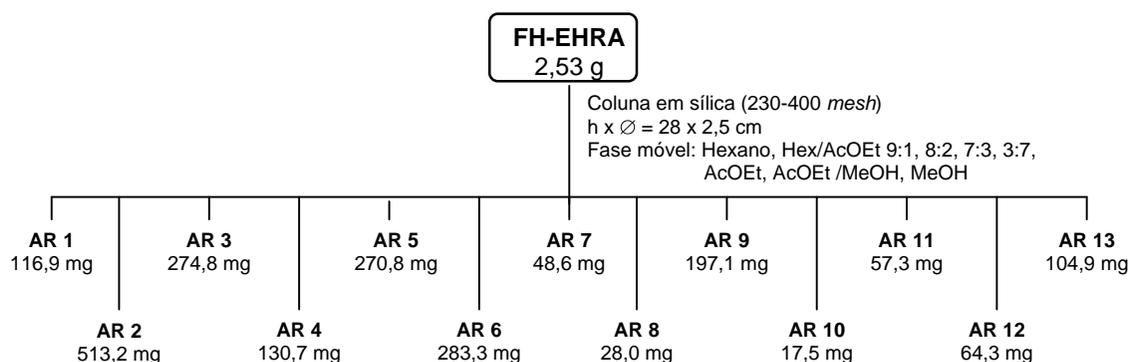
possível propor qual fase estacionária seria mais adequada para cada fracionamento.

Embora esta seleção inicial tenha sido feita, a maioria das vezes foi necessário otimizar a metodologia para se conseguir uma quantidade maior de cada substância e de forma mais rápida para ser submetida aos ensaios biológicos. Na seqüência será descrito o processo cromatográfico utilizados para isolar cada substância de forma otimizada.

3.3.1 - EXTRATOS DE *A. fusciflorus*

- Fração em hexano da raiz de *A. fusciflorus* (FH-EHRA)

Parte desta fração (2,53 g) foi adicionada ao topo de uma coluna cromatográfica empacotada com sílica eluída com hexano, gradientes de hexano e acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 22 frações de 50 ml cada (esquema 4).



ESQUEMA 4 - Fracionamento da fração em hexano do extrato em hexano da raiz de *A. fusciflorus* (FH-EHRA)

- Tratamento da fração AR-2

Esta foi fracionada em coluna de sílica (70-230 mesh, h x Ø = 25 x 3 cm) eluída com hexano/diclorometano 7:3, 1:1, diclorometano, diclorometano/acetato de etila 1:1 e acetato de etila. Foram coletadas 19 frações de 20 ml cada. Depois de analisar as frações por CCD, foram reunidas. As frações 6 a 8 foram reunidas e resultando em 120,9 mg de uma substância de aspecto oleoso, de cor amarela que foi codificada como substância **2**.

- Tratamento da fração AR-3 e AR-4

Estas frações foram reunidas por apresentarem certa similaridade e aplicadas no topo de uma coluna mista empacotada com sílica e alumina neutra na proporção de 3:1 (h x \varnothing = 25 x 1,5 cm) e eluída com hexano, gradientes de hexano e acetato de etila finalizando com metanol.

Foram coletadas 15 frações de 50 ml cada que foram analisadas por CCD. A fração 3 a 5 (hexano/acetato de etila 8:2) depois de reunidas foram recristalizadas com diclorometano e metanol resultando em 23,6 mg de um sólido branco em forma de agulhas brancas codificada como substância **20**.

- Tratamento da fração AR-5

Esta fração foi adicionada no topo de uma coluna empacotada com sílica (230-400 *mesh*; h x \varnothing = 35 x 1,5 cm) eluída com gradientes de hexano, diclorometano e acetato de etila e finalizada com acetato de etila/metanol 1:1. Foram coletadas 42 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD.

A fração 10 (hexano/diclorometano/acetato de etila 7:1:2) apresentou sólido branco que foi sucessivamente lavado com diclorometano e recristalizado em diclorometano/metanol resultando em 53,4 mg de um sólido prismático identificado como sendo a substância **1**.

As frações de 13 a 21 revelaram, em reagente de Dragendorff, uma mancha e foram reunidas, resultando em 148,7 mg de sólido amarelo. Como na placa cromatográfica apareceu uma mancha só, foi obtido o espectro de RMN¹H para a fração, que revelou uma mistura de substâncias. Esta foi então aplicada no topo de uma coluna mista empacotada com sílica (230-400 *mesh*) e alumina neutra 3:1 (h x \varnothing = 20 x 1,0 cm) e eluída isocraticamente com hexano/acetato de etila 1:1 e finalizada com metanol. Foram coletadas 28 frações de 10 ml cada.

A fração 3 resultou em 20,2 mg de um sólido que revelava em reagente de Dragendorff. A análise posterior deste sólido por CCD demonstrou que ainda não estava puro, então esta fração foi redissolvida e aplicada em placa preparativa (20 x

20 cm) eluída com hexano/acetato de etila 8:2 resultando no isolamento de 10,5 mg de um sólido codificado como substância **13**.

A fração 8 (hexano/diclorometano/acetato de etila 6:1:3) apresentou um sólido que quando analisado por CCD, apresentou uma mancha majoritária que revelava em reagente de Dragendorff então esta fração foi redissolvida e aplicada em placa preparativa (20 x 20 cm) eluída com hexano/diclorometano/acetato de etila 5:35:10. A mancha revelava também em UV λ_{365} e assim foi possível separar, uma faixa resultando no isolamento de 9,2 mg de um sólido codificado como substância **8**.

- Tratamento da fração AR-6

Esta fração foi aplicada no topo de uma coluna empacotada com sílica (230-400 *mesh*; h x \varnothing = 30 x 2,0 cm) e eluída com gradientes de hexano e acetato de etila finalizando com metanol.

Foram coletadas 25 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD. As frações de 15 a 19 revelavam em reagente de Dragendorff e foram reunidas resultando em 95,1 mg que foi então aplicado ao topo de uma coluna de sílica (230-400 *mesh* h x \varnothing = 20 x 1,5 cm) eluída de modo isocrático com hexano/acetato de etila 8:2 e finalizada com metanol. Foram coletadas 18 frações de 10 ml cada.

A fração 7 resultou em 10,9 mg de um sólido que revelava em reagente de Dragendorff. A análise posterior deste sólido por CCD demonstrou que não estava puro, então, esta fração foi redissolvida e aplicada em placa preparativa (20 x 20 cm) eluída com hexano/acetato de etila 8:2 resultando no isolamento de 5,8 mg da substância **9**.

A fração 15 resultou em 47,1 mg de um sólido que revelava em Dragendorff que foi sucessivamente recristalizado em diclorometano e metanol resultando em um sólido prismático codificado como substância **11**.

- Fração em metanol (FM-EHRA)

Esta fração foi adicionada ao topo de uma coluna empacotada com sílica gel (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 32 x 2,0 cm) eluída com gradientes de hexano, acetato de

etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 17 frações de 10 ml que foram analisadas por CCD. Da fração 5 foi obtido 4,3 mg de uma substância incolor com aspecto oleoso codificada como **3** e a fração 7 resultou em 17,2 mg de um sólido que revelava em Dragendorff que foi identificado como sendo a substância **13**.

As frações 11 a 15 (hexano/diclorometano/metanol 7:2:1) foram reunidas e aplicadas em uma outra coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x Ø= 20 x 1,0 cm) eluída com gradientes de diclorometano/metanol e finalizada com metanol. Foram coletadas 10 frações de 10 ml cada que foram analisadas por CCD. A fração 7 apresentou 15,7 mg de sólido branco amorfo codificado com o número **21**.

- Extrato em metanol da raiz de *A. fusciflorus* (EMRA)

- Fração em hexano (FH-EMRA)

Parte desta fração (927,4 mg) foi adicionada no topo de uma coluna mista empacotada com sílica e alumina 3:1 (230-400 *mesh*; h x Ø = 35 x 1,5 cm) eluída com gradientes de hexano, diclorometano e acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 43 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD.

As frações 5 a 7 (hexano/acetato de etila 8:2) foram reunidas e assim foi obtido um sólido que quando analisado por CCD, apresentou uma mancha majoritária que revelava em reagente de Dragendorff então esta fração foi redissolvida e aplicada em três placas preparativas (20 x 20 cm) eluída por duas vezes com hexano/acetato de etila 8:2. E assim foi possível isolar de 20,4 mg de um sólido bege codificado como substância **9**.

Da reunião das frações 12 a 17 foi obtida um sólido que quando analisado por CCD, apresentou uma mancha majoritária que revelava em reagente de Dragendorff e foi adicionada no topo de uma coluna mista empacotada com sílica e alumina 3:1 (230-400 *mesh*; h x Ø = 20 x 1 cm) eluída com gradientes de hexano, diclorometano e acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 12 frações que foram analisadas por CCD. A fração 4-7 foi redissolvida e aplicada em três placas preparativas (20 x 20 cm) eluída com hexano/acetato de etila 8:2. E assim foi possível isolar de 8,3 mg de um sólido codificado como substância **10**.

- Fração em metanol (FM-EMRA)

Uma parte desta (3,5 g) foi aplicada ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 40 x 3,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 50 frações, que foram analisadas por CCD e reunidas conforme similaridade cromatográfica.

Da fração 14 (hexano/Acetato de etila 7:3) foi obtido 463,3 mg de cristais imersos em material oleoso castanho-escuro, que foram sucessivamente lavados com diclorometano e separados da água-mãe com o auxílio de uma pipeta de *Pauster*, resultando, em 115,7 mg de um sólido branco idêntico à substância **11**.

A fração 21 (438,2 mg) depois de ser aplicado em CCD foi analisada por luz UV e revelou mancha de cor que caracteriza a presença de alcalóide quando aspergidas com reagente de Dragendorff. Assim esta fração foi aplicada no topo de uma coluna de sílica tipo *flash* (230-400 *mesh*, h x \varnothing = 36 x 2,0 cm) eluída isocriticamente com hexano/acetato de etila 8:2 e finalizada com metanol. Foram coletadas 22 frações de 50 ml.

As frações 6 a 8 foram reunidas resultando em 31,4 mg de um sólido que revelava em reagente de Dragendorff e a análise posterior deste sólido por CCD demonstrou que não estava puro, então esta fração foi redissolvida e aplicada em placa preparativa (20 x 20 cm) eluída com hexano/acetato de etila 8:2 resultando no isolamento de 5,9 mg de um sólido codificado como substância **12**.

- Fracionamento do extrato em hexano das folhas de *A. fusciflorus*

- Fração em hexano (FH-EHFA)

Uma parte desta fração (1,8 g) foi aplicada ao topo de uma coluna de sílica e alumina desativada como metanol (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 45,0 x 2,5 cm) eluída com hexano, gradientes de hexano/acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 72 frações de 20 ml cada que foram analisadas por CCD e reunidas conforme semelhança no perfil cromatográfico.

As frações 18 a 23 foram reunidas resultando em 321,3 mg que foi aplicada ao topo de uma coluna de sílica gel (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 35 x 2,0 cm) eluída de forma isocrática com hexano e acetato de etila. Foram coletadas 14 frações de 10 ml. A fração 5 a 7 reunidas resultou em 42,9 mg de sólido cristalino, em forma de agulhas finas de cor amarela codificada como substância **6**.

As frações 29 a 33 foram reunidas resultando em 134,5 mg foram aplicadas ao topo de uma coluna de sílica tipo *flash* (230-400 *mesh*, h x \varnothing = 30 x 1,5 cm) eluída isocraticamente com hexano/diclorometano/acetato de etila (7:2:1) levando ao isolamento de 5,2 mg de um sólido amarelo claro que foi recristalizado em diclorometano/metanol, formando pequenas agulhas, codificado como substância **4**.

- A fração em metanol (FM-EHFA)

Parte desta fração (4,5 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina desativada como metanol (70-230 *mesh* h x \varnothing = 40 x 2,0 cm) eluída com gradientes de hexano/ acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 37 frações de 50 ml que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 8 a 10 foram reunidas e em seguida aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica comum e alumina neutra (h x \varnothing = 20 x 1,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 23 frações que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 11 a 16 foram reunidas e aplicadas a uma coluna de *Sephadex* LH-20 (h x \varnothing = 98 x 2 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 20 frações de 10 ml. As frações foram ressuspensas em acetato e analisadas por CCD e reunidas. As frações 7 a 9 apresentavam cristais imersos em material oleoso então foram aplicados ao topo de *Sephadex* LH-20 (h x \varnothing = 98 x 2 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 10 frações de 15 ml que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 3 a 6 foram reunidas resultando em 12,9 mg de um sólido amarelo em forma de agulhas idêntico a substância 6. Da reunião das frações 8 e 9 foi obtido em sólido que foi identificado como sendo a substância 5.

- Extrato em metanol das folhas de *A. fusciflorus* (EMFA)

- A fração em hexano (FH-EMFA)

Parte desta (4,5 g) foi aplicada ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh* h x \varnothing = 50 x 2,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 28 frações de 50 ml que foram analisadas por CCD e reunidas.

A fração 8 foi adicionada ao topo de uma coluna de sílica gel tipo *flash* (230-400 *mesh*; h x \varnothing = 35 x 2,5 cm) eluída com gradientes de hexano/diclorometano e finalizada com metanol. Foram coletadas 18 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD que foram reunidas em três frações: 1-7, 8-10 e 11-16. A fração 3 (11-16) apresentava sólido em forma de agulha misturada, entre outras coisas, com clorofila então a mesma foi aplicada ao topo de uma coluna de *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h = 2,0 x 50 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 20 frações de 20 ml cada. Da fração 7 foi obtido 4,2 mg de um sólido amarelado pálido, que foi identificado como sendo a substância 4.

Da reunião das frações 14 a 18 foram obtidos 577,8 mg que foram aplicadas ao topo de uma coluna de sílica gel (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 30 x 1,5 cm) eluída com gradientes de hexano/diclorometano/acetato de etila. Foram coletadas 30 frações de 10 ml. A fração 4 (hexano/diclorometano/acetato de etila 7:2:1) apresentou 12,5 mg de sólido cristalino, em forma de agulhas finas, cor amarela codificada como substância 5.

- Fração em metanol (FM-EMFA)

Parte desta fração (3,7 g) foi aplicada ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 50 x 3,5 cm) eluída com hexano, gradientes de hexano e acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 53 frações de 25 ml, que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 17 a 24 foram reunidas resultando em 754,2 mg que foram aplicadas ao topo de uma coluna de sílica tipo *flash* (230-400 *mesh*, h x \varnothing = 30 x 1,5 cm) eluída isocraticamente com hexano/diclorometano/acetato de etila (7:2:1) levando ao isolamento de 104,2 mg de um sólido amarelo claro o qual foi recristalizado em diclorometano e metanol, formando agulhas amarelas codificada como substância **6**.

A fração 4 (FA-4) foi adicionada ao topo de uma coluna *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h= 2,0 x 60 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 24 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD que foram reunidas. Da fração 3 foi obtido 8,2 mg de um sólido cristalino amarelo pálido em forma de agulhas finas identificada como sendo a substância **6**. As frações 29 a 33 foram reunidas e aplicadas ao topo de uma coluna *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h= 2,0 x 60 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 20 frações de 20 ml cada que foram analisadas por CCD. Da fração 4 foi obtido 9,8 mg de um sólido amorfo codificada como substância **7**.

3.3.2 - EXTRATOS DE *T. pallida*

- Fracionamento do extrato em metanol das folhas de *T. pallida* (EMFTP)

- A fração em hexano (FH-EMFTP)

Parte desta fração (2,4 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica comum e alumina neutra (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 50 x 3,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 19 frações de 50 ml aproximadamente que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 15 a 17 foram reunidas resultando em 737,9 mg que foram aplicadas ao topo de uma coluna mista de sílica comum e alumina neutra (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 35 x 2,0 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 53 frações de 10 ml. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme similaridade cromatográfica. As frações 5 e 6 (hexano/acetato de etila 9:1) apresentaram 68,4 mg de um sólido, em forma de agulha, imerso em material oleoso. Foi adicionado ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 35 x 2,0 cm) eluída isocraticamente com hexano/acetato de etila 8:2. Foram coletadas 33

frações de 10 ml. As frações foram analisadas por CCD e reunidas. A fração 10 apresentou 19,7 mg de sólido branco em forma de agulha codificado como substância **14**.

- A fração em metanol (FM-EMFTP)

Parte desta fração (3,0 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica comum e alumina neutra (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 50 x 3,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 34 frações de 30 ml aproximadamente que foram analisadas por CCD e reunidas.

A fração 2 (hexano/acetato de etila 9:1) apresentou 188,7 mg de um sólido amorfo que foi adicionado ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 35 x 2,0 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 22 frações de 50 ml. As frações foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 5 a 14 foram reunidas resultando em 53,1 mg coluna de sílica (230-400 *mesh*, h x \varnothing = 15 x 2,5 cm) eluída isocriticamente com gradiente de hexano diclorometano e acetato de etila (7:2:1). Foram coletadas 13 frações de 10 ml cada e a fração 10 apresentou sólido branco em forma de agulha, codificado como substância **17**.

As frações 5 e 6 (hexano/acetato de etila 8:2) apresentaram 369,2 mg de sólido amorfo que foi adicionado ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 25 x 3,0 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 15 frações de 50 ml. As frações foram analisadas por CCD e reunidas. As frações 8 a 10 foram reunidas resultando em 183,7 mg que foi recromatografada em coluna de sílica tipo *flash* (230-400 *mesh*, h x \varnothing = 15 x 2,5 cm) eluída isocriticamente com hexano/diclorometano/acetato de etila (7:2:1). Foram coletadas 13 frações de 10 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas. As frações 7 a 10 foram reunidas e resultaram em 36,9 mg de um sólido cristalino, em forma de agulhas brancas, codificado como substância **18**.

- A fração em água (FA-EMFTP)

Uma alíquota desta fração (800 mg) foi fracionada por cromatografia de gotas em contracorrente (RLCC) de modo ascendente. O sistema de solvente utilizado foi hexano/MeOH/H₂O/acetato de etila (5:4:1:2). A fase aquosa, de menor densidade, foi bombeada para as colunas, funcionando como fase estacionária e a fase orgânica como fase móvel.

A amostra foi dissolvida em 20 ml de metanol, filtrada e em seguida injetada no aparelho. Foram coletadas 98 frações de 800 gotas cada. As amostras foram analisadas por CCDC, eluída com gradientes de acetato de etila/metanol e conforme o R_f foram reunidas (tabela 4, p. 49).

TABELA 4- Reunião das frações provenientes do fracionamento cromatográfico de FA-EMFTP

frações	massa (mg)
1-10	78,5
21-40	85,2
41-44	99,7
45-50	207,4
51-70	108,2
71-80	94,3
81-88	52,7
89-93	50,4
94-98	19,8

As frações 45 a 50 foram reunidas resultando em sólido amarelo que foi redissolvido em metanol e cromatografado em coluna de *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h = 2,0 x 60,0 cm), eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 25 frações. A fração 7-10 (45,4 mg) apresentou sólido amarelo que foi codificado como **28**.

A fração 71-80 (94,3 mg) foi redissolvido em metanol e cromatografada em coluna de *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h = 2,0 x 60,0 cm), eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 38 frações de 15 ml. A fração 12-15 (18,9 mg) apresentou sólido amarelo que foi codificado como **29**.

- Fracionamento do extrato em metanol dos galhos de *T. pallida* (EMGTP)

- A fração em metanol (FM-EMGTP)

Esta fração (1,1 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (70-230 mesh, h x Ø = 28 x 3,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/metanol 1:1 e finalizada com metanol. Foram coletadas 50 frações de 10 ml que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 1-3 foram reunidas e recromatografadas em coluna de sílica (h x Ø= 25,0 x 2 cm) eluída com hexano, gradientes de hexano e acetato de etila, finalizando com metanol. Foram coletados 10 frações de 10 ml. A fração 3 apresentou-se como sólido, que foi lavado com hexano e o resíduo separado da água mãe com um funil de Bücher a pressão reduzida.

Depois de seco e pesado este sólido foi submetido à recristalização com CH₂Cl₂/MeOH (8:2), resultando 10,1 mg de cristais brancos em forma de agulha, solúvel em clorofórmio e que apresentou apenas uma mancha após revelação em vapores de iodo e com vanilina ácida seguida por aquecimento. A substância foi codificada como **19**.

As frações 7-8 foram reunidas e colocadas no topo de uma coluna sílica (h x Ø= 38 x 2 cm) eluída em sistema isocrático hexano/acetato de etila/MeOH (75:25:0,5). Foram coletadas 11 frações. A fração 6 (25,4 mg) apresentou-se como um sólido que foi recristalizado em etanol e codificado como **20**.

- A fração em acetato de etila (FAc-EMGTP)

A fração em acetato de etila (980 g) foi dissolvida em metanol e filtrada em algodão, em seguida transferida para o topo de uma coluna cromatográfica em fase reversa (Ø x h = 4,0 x 20,0 cm) utilizando XAD-4 como fase estacionária. Como eluentes foram utilizados água, metanol, acetona e acetato de etila. Foram coletadas

12 frações. As frações foram secas, pesadas e em seguida dissolvidas em metanol e analisadas em CCDC.

A fração 5 (352,9 mg) foi cromatografada em *Sephadex* LH-20 utilizando como eluente metanol. Foram coletadas 10 frações. A fração 3 (22,4 mg) foi redissolvido em metanol e cromatografada em coluna de *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h = 2,0 x 60,0 cm), eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 38 frações de 15 ml. A fração 12-15 (18,9 mg) apresentou sólido amarelo que foi identificado como substância **29**.

- EXTRATOS DAS SEMENTES DE *T. pallida*

- Fracionamento do extrato em diclorometano (EDTP)

Este extrato foi inicialmente submetido a uma coluna de *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h = 3,0 x 65 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 30 frações de aproximadamente 20 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a similaridade observada, resultando assim em 6 frações (Esquema 5, p. 52).

Da terceira fração (reunião das frações 10 a 12) foi obtido 135,2 mg de um pó branco amorfo branco e este foi analisado por RMN¹H onde foram observados sinais característicos de limonóide. Então foi recromatografado em *Sephadex* LH-20 (\varnothing x h = 3,0 x 65 cm) eluída de forma isocrática com metanol. Foram coletadas 15 frações de aproximadamente 20 ml cada. As frações foram analisadas por CCD e reunidas conforme a similaridade observada, resultando assim em 4 frações. Da fração 3 (10-14) foram obtidas 17,9 mg de um sólido em forma de agulhas codificado como **27**.

A reunião das frações 13 a 14 resultou em 85,8 mg de um pó branco amorfo que foi recromatografado em coluna de sílica (230-400 *mesh*; h x \varnothing = 34 x 3,0 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila/acetona e finalizada com metanol. Foram coletadas 31 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD que foram reunidas em quatro frações 1-8, 9-16, 17-23 e 24-31.

A segunda fração (9 a 16) apresentou 42,7 mg de um sólido branco que foi analisado por RMN¹H onde foram observados sinais característicos de limonóides que estava em mistura. Assim, a fim de separá-los esta fração foi dividida em duas partes e cada parte foi individualmente injetada em HPLC no modo preparativo e para tanto foi utilizado uma coluna polimérica *Shodex Asahipak GS* com um fluxo de 4,0 ml/mim utilizando como fase móvel diclorometano/metanol 1:1 e detector de ultravioleta a 254 nm.

Foram coletados 3 frações de 20 ml no 9º ciclo (figura 18). Assim foram identificadas duas substâncias codificadas respectivamente como **25** (8,1 mg) e **26** (17,5 mg).

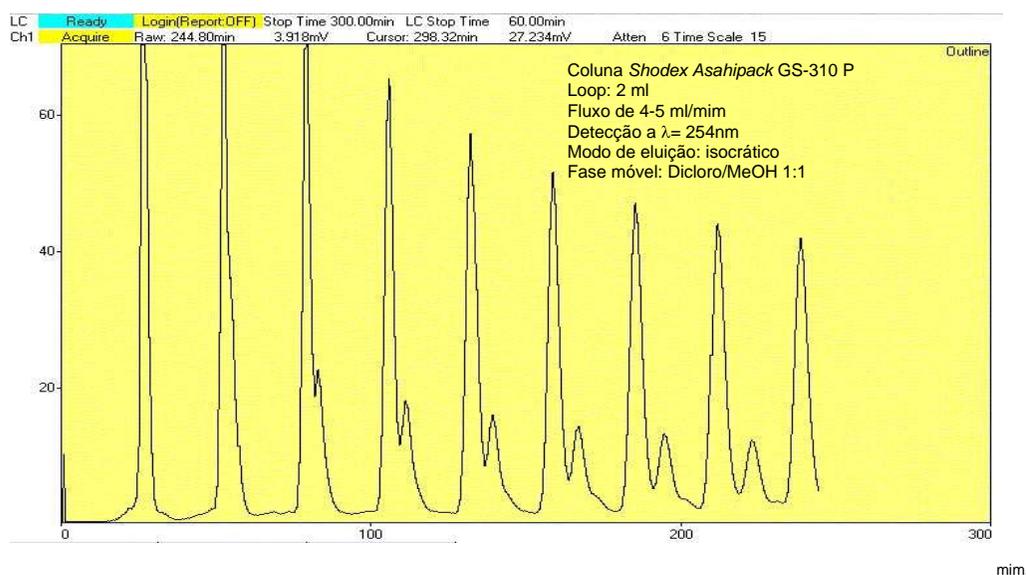
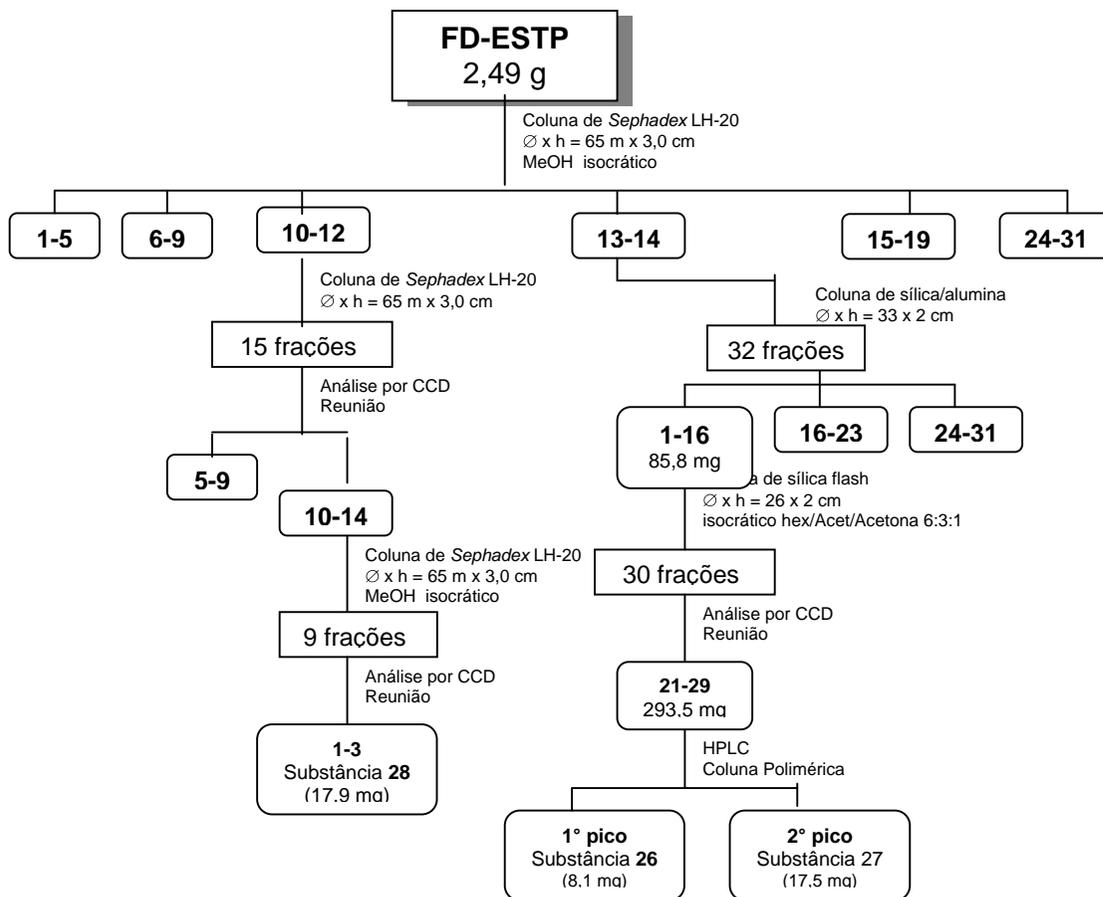


FIGURA 20 - Cromatograma obtido da fração (9-16)



ESQUEMA 5 - Processo de fracionamento do extrato em diclorometano das sementes de *T. pallida*.

3.3.3-EXTRATOS DE *T. rubra*

- Fracionamento das frações do extrato em hexano das folhas de *T. rubra*

- A fração em hexano (FH-EHFTR)

Parte desta (4,3 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 50 x 3,5 cm) e eluída com gradientes de hexano/acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 39 frações de 50 ml aproximadamente que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 8 e 9 (96,3 mg) (hexano/acetato 7:3) foram reunidas, pois apresentavam o mesmo perfil cromatográfico quando analisados por CCD. Então, para tentar o isolamento, a fração foi adicionada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (230-400 *mesh*, h x \varnothing = 15 x 1,5 cm) eluída isocriticamente com hexano/acetato de etila (7:3). Foram coletadas 8 frações de 20 ml. As frações 4 a 6 foram reunidas resultando em 31,2 mg de um sólido branco, codificado como substância **22**.

- A fração em metanol (FM-EHFTR)

Parte desta fração (1,2 mg) foi aplicada ao topo de uma coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 35 x 2,0 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 29 frações de 50 ml aproximadamente que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 3 a 5 foram reunidas e aplicadas em coluna de sílica (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 36 x 2,0 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila. Foram coletadas 13 frações de 15 ml cada. A fração 4 (hexano/acetato de etila 8:2) apresentou 32,5 mg de um sólido branco, codificado como substância **24**.

A fração 10 (212,7 mg) apresentou-se com um sólido branco amorfo. A análise desta fração por CCD revelou duas manchas na placa com R_f diferentes das outras substâncias já isoladas deste extrato. A fim de separar as duas substâncias, a fração foi injetada em HPLC no modo preparativo (Figura 21, p. 54).



FIGURA 21 - Cromatograma obtido da fração 10

No cromatograma foi observado, depois do primeiro reciclo, a presença de dois picos que foram coletados em 4 frações de 20 ml cada ao fim de 5 reciclos. E assim foram isoladas duas substâncias codificadas como **15** (11,5 mg) e **22** (25,9 mg) que foram recristalizados em metanol, formando agulhas brancas.

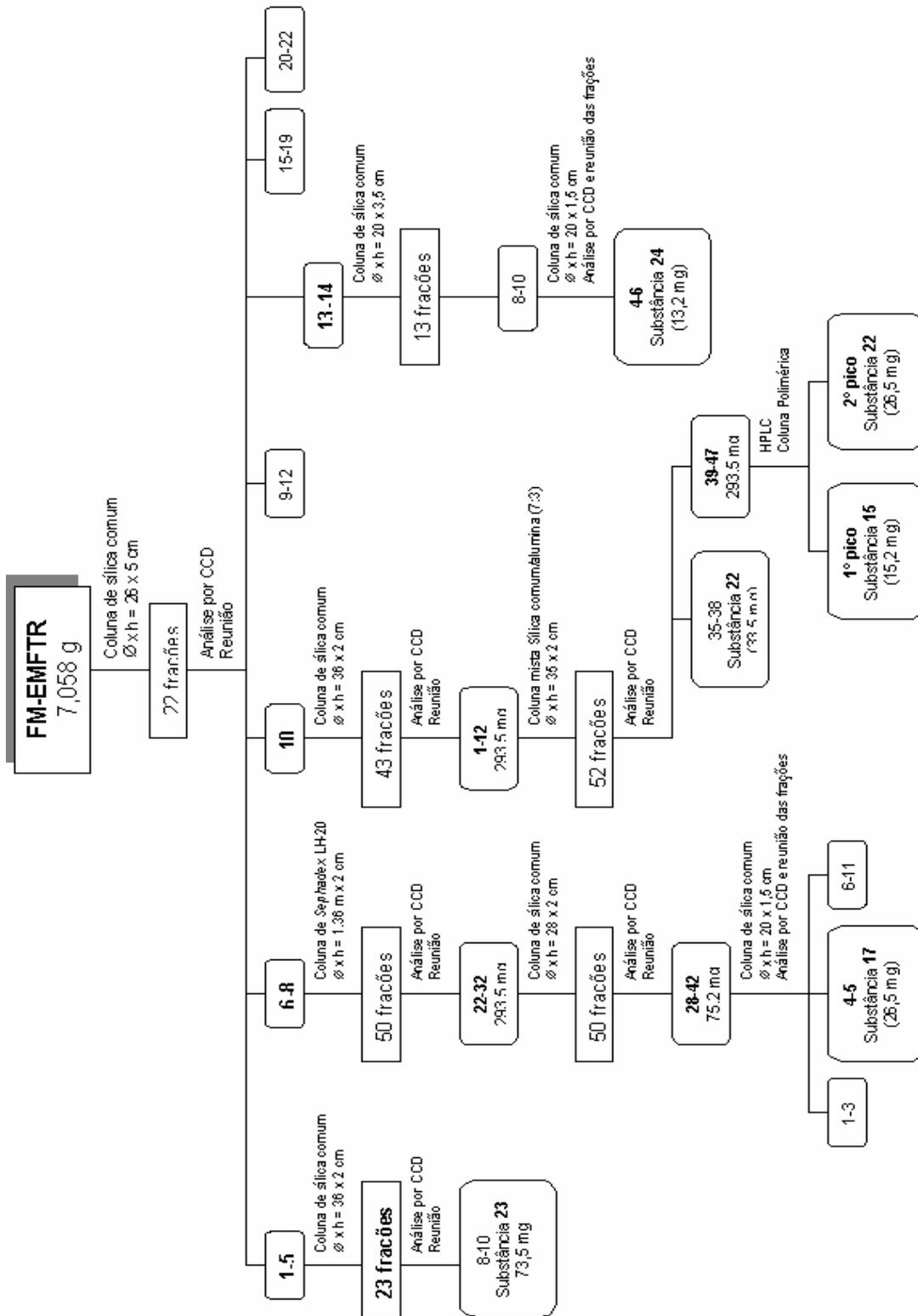
- Fracionamento das frações do extrato em metanol das folhas de *T. rubra*

- A fração em hexano (FH-EMFTR)

Parte desta fração (1,5 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 35 x 2,0 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 29 frações de 50 ml que foram analisadas por CCD e reunidas. Nas frações iniciais, quando o solvente evaporou, foram obtidas 70,3 mg de uma mistura de hidrocarbonetos.

- A fração em metanol (FM-EMFTR)

Parte desta fração (4,5 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (70-230 *mesh*, h x \varnothing = 45 x 3,0 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 29 frações de 50 ml que foram analisadas por CCD e reunidas. Várias frações foram então fracionadas (Esquema 6, p. 54) resultando no isolamento das substâncias: **23** (73,5 mg), **17** (26,5 mg) e **24** (13,2 mg).



ESQUEMA 6 - Fracionamento da FM do extrato em metanol das folhas de *T. rubra*

- Fracionamento das frações do extrato em metanol dos galhos de *T. rubra* (EMGTR)

- A fração em hexano (FH-EMGTR)

Esta fração (1,9 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (h x Ø = 45 x 2,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 58 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 6 e 7 foram reunidas e colocadas no topo de uma coluna sílica (h x Ø= 35,0 x 2,0 cm) eluída com hexano, gradientes de hexano/acetato de etila, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 19 frações. As frações 6 a 9 foram reunidas e colocadas no topo de uma coluna sílica (h x Ø= 20,0 x 2,0 cm) eluída em sistema isocrático hexano/acetato de etila (8:2). Das frações 6-8 foi isolada uma substância (17,8 mg) que apresentou um sólido branco que foi codificado como **16**.

- A fração em metanol (FM-EMGTR)

Esta fração (4,3 g) foi aplicada ao topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (h x Ø = 45 x 3,5 cm) eluída com gradientes de hexano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 58 frações de 20 ml que foram analisadas por CCD e reunidas.

As frações 12 a 18 foram reunidas e colocadas no topo de uma coluna sílica (h x Ø= 38 x 2 cm) eluída em sistema isocrático hexano/acetato de etila (8:2). Foram coletadas 11 frações. As frações 5 a 7 (12,3 mg) foram reunidas e depois se evaporar o solvente apresentaram-se como um sólido que foi recristalizado em metanol e codificado como **23**.

As frações 35-38 foram reunidas e adicionadas no topo de uma coluna mista de sílica e alumina neutra (h x Ø= 32 x 1,5 cm) eluída com hexano, acetato de etila e finalizada com metanol. Foram coletadas 19 frações. Das frações 8-11 obteve-se (10,6 mg) um sólido branco codificado como substância **24**.

3.4 - METODOLOGIAS UTILIZADAS NOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.4.1- ENSAIOS ENZIMÁTICOS

3.4.1.1- ENSAIO COM A ENZIMA GGAPDH DE *T. CRUZI*

A enzima glicolítica Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gGAPDH), utilizada nestes ensaios é uma enzima recombinante obtida em um sistema de expressão de *Escherichia coli*. A preparação e a purificação da enzima são feitas rotineiramente no Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

A medida da inibição da atividade de gGAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) de *T. cruzi* foi baseada em procedimentos previamente descritos por VIEIRA et al., (2001).

A atividade da enzima foi medida colocando-a na presença do substrato Gliceraldeído-3-fosfato (G3P), do cofator NAD^+ e do arseniato de sódio, inibidor da reação inversa, em cubeta de quartzo, nas seguintes condições: 875 μL do tampão Tris/HCl 50 mM pH 8,6 (1mM EDTA, 1mM de β -marcaptanoetanol), 50 μL de NAD^+ (40 mg/ml), 30 μL de Arseniato de sódio 1M, 30 μL de G3P (~10 mM) e 5 μL de enzima (concentração determinada pelo método de BRADFORD). Imediatamente após a adição de todos os reagentes, iniciou-se a leitura em espectrofotômetro a 340 nm. A reação foi acompanhada ao longo de 30 segundos e o valor da absorção a cada segundo foi registrado.

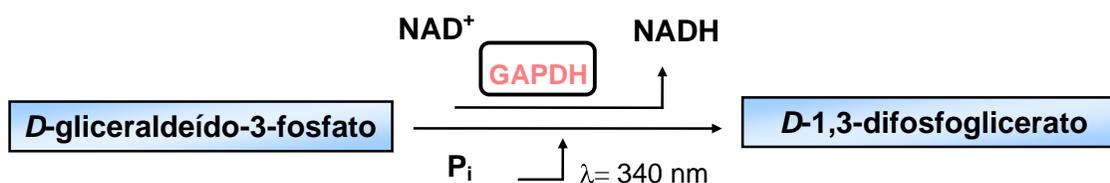


FIGURA 22 - Reação catalisada pela enzima gGAPDH

Para quantificar a atividade inibitória enzimática de extratos, frações e/ou substâncias isoladas, a absorção a cada um dos trinta segundos de reação foi anotada.

Foram então traçados gráficos do tempo pela absorção de cada replicada e calculada a equação da reta, onde foi obtido o valor de coeficiente angular da reta pelo programa ORIGIN® 2000 versão 6.1.

Os valores de coeficiente angular da reta foram adicionados a uma planilha no Microsoft® Excel 2002, versão 7.0, previamente preparada com fórmulas específicas (VIEIRA et al., 2001) e assim foi obtido um valor que representava a atividade inibitória média da amostra frente à enzima.

Todas as medidas foram feitas em triplicatas e ensaios controle foram realizados na ausência das amostras, mas com a adição de igual volume de DMSO.

3.4.1.2- ENSAIO COM APRT DE *L. TARENTOLAE*

A APRT utilizada nestes ensaios foi obtida purificada de *Leishmania tarentolae*, no Laboratório de Cristalografia de Proteínas do IFSC-USP.

A atividade da enzima APRT (Adenina Fosforibosiltransferase) foi medida preparando-se uma mistura reacional contendo 0,01 mM de Adenina, 0,5 mM de PRPP (Fosforibosil pirofosfato), 5 mg de cloreto de magnésio e tampão Tris 100 mM pH 7,4. As amostras foram dissolvidas em DMSO na concentração de 1mg/1ml.

A APRT catalisa a remoção do grupo pirofosfato (PPi) do PRPP e a condensação da ribose à base purínica, com a formação de PPi e de adenosina-monofosfato (figura 23).

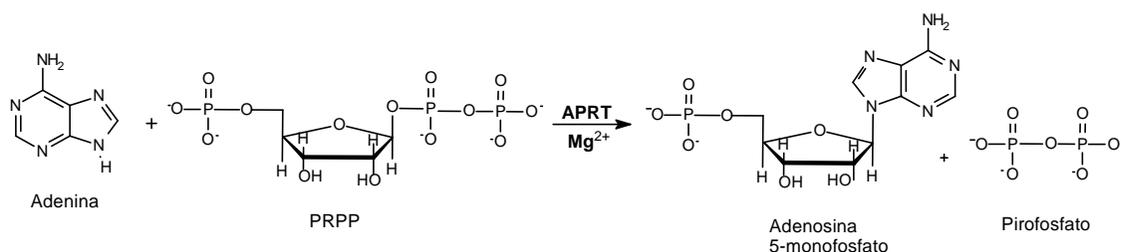


FIGURA 23 - Reação catalisada pela enzima APRT (PHILLIPS et al., 1999)

Para cada teste foram utilizados 475 µl da referida mistura reacional e 25 µl de solução da amostra, de forma que a concentração final seja de 100 mg/ml. Na cubeta foram adicionados todos os reagentes e depois a enzima e imediatamente

iniciada a leitura em espectrofotômetro a 259 nm. A reação foi acompanhada por 60 segundos e o valor da absorção a cada segundo foi registrado. As análises foram realizadas em triplicata.

Os dados obtidos foram processados no ORIGIN® 2000 versão 6.1 e os cálculos da atividade inibitória foram feitos em planilhas preparadas no Microsoft® Excel 2002, versão 7.0.

3.4.2- ENSAIO *in vitro*

3.4.2.1- Ensaios sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Os ensaios com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* são realizados no Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da FCFRP-USP, segundo procedimento descrito em VIEIRA et al., (2001).

Nos ensaios foram utilizadas cepas “Y” de *T. cruzi*, que são mantidas através de passagens seriadas em camundongos por meio de repiques semanais.

Os ensaios foram realizados utilizando-se sangue de camundongos albinos *Swiss*, infectados pela cepa “Y” do *T. cruzi*, o qual foi obtido por punção cardíaca no pico da parasitemia (sétimo dia). Esse sangue foi diluído em sangue de animal sadio, de forma a se obter uma concentração final de 2×10^6 formas tripomastigotas por ml de sangue. Os ensaios foram realizados em microplacas de titulação (96 poços), onde o sangue infectado e as amostras avaliadas, foram solubilizados (em triplicata), e o material foi incubado por 24 h a 4 °C.

Como controles foram utilizados: 1) sangue de camundongo infectado, sem a adição de nenhuma substância; 2) sangue infectado contendo a mesma concentração de DMSO que foi utilizado no preparo das soluções; e, 3) sangue infectado contendo violeta genciana (controle positivo), na concentração de 1:4.000 (NUSSENZWEIG, 1953).

Os extratos foram ensaiados a 4 mg/ml, frações a 2 mg/ml e substâncias nas concentrações de 500, 250 e 100 µg/ml. Os resultados obtidos são expressos em porcentagem de lise parasitária (% L.P.), sendo considerados ativas amostras com L.P. ≥ 60 %.

3.4.3 - ENSAIO COM INSETOS

3.4.3.1 - ENSAIO FRENTE A *Spodoptera frugiperda*

3.4.3.1.1-Screening de extratos, frações e substâncias isoladas de *Adiscanthus fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* (FASE1)

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar - São Carlos, SP.

Nesta fase inicial os experimentos foram divididos em duas etapas:

Etapa 1 - Os experimentos foram conduzidos a fim de constatar quais extratos e frações destes, apresentariam atividade inseticida.

As amostras (extratos e frações) foram incorporadas à dieta artificial para *S. frugiperda* (KASTEN et al., 1978) na proporção de 100 mg de amostra para 100 g de dieta (1000 ppm), com o cuidado de adicionar a amostra, ao final, quando a dieta estava à temperatura de aproximadamente 40°C. Além da dieta correspondente a cada tratamento, foi também preparada uma dieta testemunha, sem amostra, utilizando o solvente em que foram inicialmente solubilizadas.

Depois de preparada, a dieta foi vertida em tubos de vidro de fundo chato (8,5 × 2,5 cm), previamente esterilizados em autoclave por 45 minutos.

Após a adição da dieta, os tubos foram mantidos por 12 h em grades de arame para eliminação do excesso de umidade (gotículas). A seguir, foi feita a inoculação das lagartas neonatas de *S. frugiperda*, utilizando-se uma lagarta por tubo. Nesta fase foram utilizadas dez lagartas para cada tratamento e para a testemunha.

As pupas obtidas foram pesadas 24 horas após a sua formação e transferidas para copos plásticos, onde permaneceram até a emergência dos adultos. Os experimentos foram desenvolvidos em condições controladas de laboratório (fotofase: 12D:12L; unidade relativa: 70 ± 5 % e temperatura: 25± 1°C)

Etapa 2- As substâncias que foram isoladas de extratos e frações selecionados na etapa anterior, em quantidade suficiente, foram submetidas a ensaio conduzido conforme metodologia descrita acima, apenas diferindo quanto as concentrações

utilizadas (1, 5, 10, 50 e 100 ppm) e número de insetos (30 lagartas por tratamento).

Nesta etapa foi possível avaliar o efeito da substância durante o período ovo-adulto.

Em ambas as etapas foram avaliadas os seguintes parâmetros:

- Duração média da fase larval e pupal;
- Peso médio de pupas;
- Mortalidade (%) ao final de cada fase;

3.4.3.1.2 - Avaliação da atividade das substâncias isoladas (FASE 2)

A maioria das substâncias, por mais esforços que fosse feitos no sentido de otimizar o isolamento, foram obtidas em quantidade menor que 50 mg e por este motivo não podiam ser submetidas a ensaio pela etapa 2 da fase 1.

Para isso foi necessário desenvolver uma metodologia, em que fosse possível fazer os ensaios utilizando a menor quantidade de substância.

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Bioensaios do Departamento de Química da UFSCar - São Carlos, SP e no Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP-Piracicaba, SP.

Na metodologia desenvolvida foram utilizadas placas acrílicas, com 24 poços cada. Verteu-se em cada poço 1,25 ml de dieta artificial e, após solidificação foram adicionados, sobre a dieta, 30 μ L da solução da amostra nas concentrações de 4000 ppm (GLEYE et al., 2003) o que equivale a uma concentração final de substância na dieta de 100 ppm.

Como foram utilizadas placas neste experimento só foi possível constatar o efeito por ingestão até o oitavo dia em lagartas de segundo ínstar devido ao tamanho da lagarta em relação ao poço.

Após a evaporação do solvente, aproximadamente 10 minutos, foi inoculada, em cada poço, uma lagarta de *S. frugiperda* (figura 24, p. 62) resultando em 24 indivíduos por repetição (placa) perfazendo um total de 96 indivíduos por tratamento. Para evitar fuga de lagartas dos respectivos poços, foram colocada, entre cada

tampa e a placa, 3 lâminas plásticas transparentes de, aproximadamente, 0,5 mm de espessura cada e o conjunto foi preso com elástico.

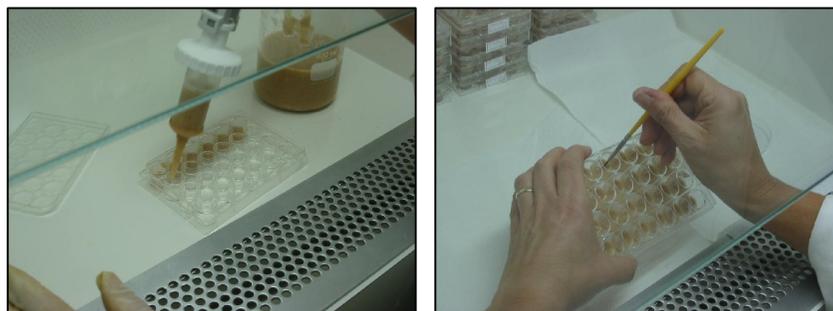


FIGURA 24 - Detalhes da distribuição da dieta e inoculação de lagartas

Os bioensaios foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizados com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Programa SAEG (Sistema para análises estatísticas) versão 8x para determinar a significância das diferenças quanto à viabilidade nas diferentes doses e no decorrer do tempo.

Foram preparadas curvas de concentração-mortalidade para estimar as DL_{50} pelo programa POLO PC.

3.4.3.2- ENSAIO COM OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa*

3.4.3.2.1-Ensaio para determinar a toxicidade de extratos, frações e substâncias isoladas frente a operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Estes ensaios foram realizados no C.E.I.S. (Centro de Estudos de Insetos Sociais), Instituto de Biociências de Rio Claro-UNESP.

Inicialmente foram coletadas operárias de *Atta sexdens* (figura 25, p. 63) com massa corpórea variando de 15 a 25 mg e largura da cápsula cefálica variando entre 2,3 e 2,6 mm. As formigas foram coletadas em um formigueiro e depositadas em bandejas plásticas (de 55 x 45 x 10 cm) com paredes revestidas com fluon (resina de fluoretileno) ou talco neutro para evitar fugas.

Para cada tratamento foram utilizados lotes de 50 operárias para cada tratamento, divididas em grupos de seis formigas e distribuídas em 10 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel de filtro, onde foi depositado 0,4 g de dieta artificial (BUENO et al., 1997) sobre papel de alumínio.

Estas placas foram colocadas em estufa B.O.D., com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa acima de 70%, sendo examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas.

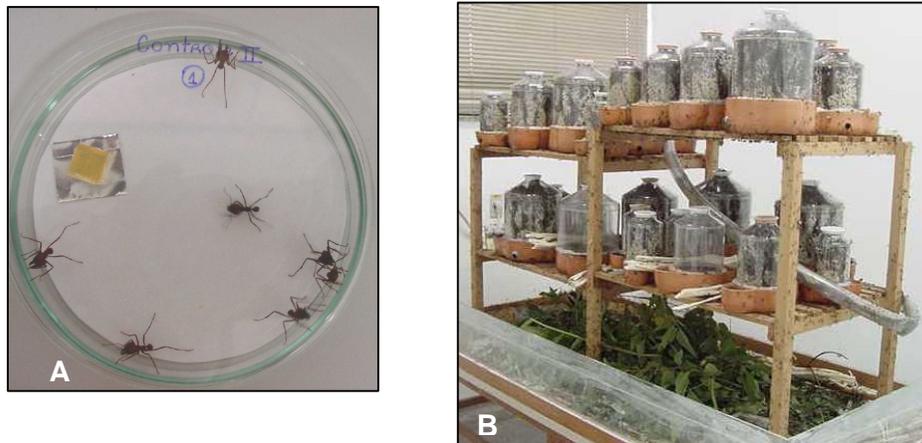


FIGURA 25 - A: Simulação do experimento realizado com operarias de *Atta sexdens* e B: Formigueiro no laboratório da UNESP-Rio Claro

A cada 24 horas a dieta era trocada e sempre que necessário, os papéis de filtro eram trocados a fim de se evitar interferências pelo desenvolvimento de fungos contaminantes e para manter o ambiente limpo para as formigas.

Foi estipulado um tempo máximo de 25 dias para a realização dos experimentos de toxicidade, levando-se em conta o período normal de sobrevivência das formigas com a dieta artificial.

Com os dados obtidos nos experimentos foram calculadas taxas de sobrevivência de cada tratamento e assim obtidas as respectivas curvas de sobrevivência. Foi aplicada a análise de variância, onde o número médio de dias de sobrevivência de cada placa foi calculado e utilizado como observação nas análises segundo o teste t e teste de Tukey a 5%.

Os tratamentos que apresentaram resultados significativos foram submetidos à teste de comparação múltipla de médias com o controle, utilizando o teste de Dunnett.

3.4.3.2.2- ENSAIO COM FUNGO SIMBIONTE (*L. gongylophorus*)

Tanto os extratos como as substâncias isoladas foram incorporadas ao meio de cultura através da dissolução prévia de solvente. O volume correspondente a 1 ml foi adicionado em tubos de ensaio contendo 9 ml de meio A (PAGNOCCA, 1990). Como controles dos ensaios, aos 9 ml de meio A foram acrescentados 1 ml do solvente utilizado na extração. Como controle geral (viabilidade) foi utilizado tubos com 10 ml somente com o meio A.

Os tubos foram autoclavados a 120° C por 15 minutos e logo em seguida foram homogeneizados, com auxílio de um agitador tipo *Vortex*, para propiciar uma boa distribuição e incorporação dos extratos no meio de cultura. Em seguida, os tubos foram inclinados. Os resultados foram expressos pelo valor modal de dois ensaios independentes.

Após 30 dias de incubação foi realizada a leitura com base na quantidade e densidade do micélio, conforme padrão pré-estabelecido, a saber:

- 5 = crescimento idêntico ao do controle = 100%
- 4 = crescimento equivalente a 80% do controle
- 3 = crescimento equivalente a 60% do controle
- 2 = crescimento equivalente a 40% do controle
- 1 = crescimento equivalente a 20% do controle ou inferior
- 0 = ausência total de crescimento

3.4.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios de antibiose foram realizados no Laboratório de Microbiologia do na UNESP de Rio Claro.

Foram utilizadas culturas padrões dos seguintes microorganismos:

- o *Bacillus subtilis* (CCT 2471);
- o *Bacillus cereus* (CCT 1436);
- o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- o *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442);
- o *Escherichia coli* (CCT 1457);
- o *Micrococcus roseus* (CCT 1469);
- o *Candida albicans* (RJ/ 50008);
- o *Candida krusei* (RJ P/ 007);
- o *Cryptococcus laurentiae* (RJ P/ 002);
- o *Rhodotorula rubra* (RJ/ 50595);
- o *Saccharomyces cerevisiae* (CCT 0758) e *Geotrichum sp.* (RJ/ 003).

A atividade antimicrobiana de extratos e substâncias isoladas foi avaliada pelo método de difusão em disco (BAUER et al., 1966). Cada disco de papel (6 mm) recebeu uma solução de extrato. Discos controle foram preparados da mesma maneira de modo a conter quantidades de antibióticos e o solvente de utilizado na extração.

Em placas de Petri contendo 15 ml de meio de cultura (Mueller-Hinton para bactérias e Agar Sabouraud para os fungos) foram espalhados sobre meio com um “swab” estéril, suspensão de microrganismos recentemente preparados (24 horas para bactérias) e diluídos em solução salina 0,9% correspondente à escala McFarland 0,5. Após uns 10 minutos, os discos (até doze discos/placa) foram regularmente distribuídos na superfície das placas com pinça e pressionados levemente sobre o meio sólido.

Foi mantida uma distância de 1,5 cm entre os discos e de 1 cm da borda para evitar interferência entre os halos de inibição. As placas foram invertidas e incubadas após a semeadura. Após 24 horas de incubação foi realizada a leitura dos resultados e, quando formados, foi medido o diâmetro do halo de inibição.



4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1- Coleta do material vegetal

As plantas coletadas (tabela 5) depois de secas e moídas foram pesadas e estas foram utilizadas para obter os extratos (tabela 6).

TABELA 5 - Resultados obtidos na coleta das espécies vegetais

Espécies Vegetais	Parte Coletada	Peso seco (Kg)
<i>A. fusciflorus</i>	Folhas	1,0
	Raízes	2,4
<i>T. pallida</i>	Frutos	1,6
	Galhos	2,9
	Folhas	1,2
<i>T. rubra</i>	Galhos	5,0
	Folhas	2,9

4.2- Obtenção dos Extratos

Os extratos obtidos foram transferidos para recipiente previamente pesado e ficaram na capela até secar e em seguida foram colocados em dessecador com sílica ativada e pesados até a obtenção de peso constante.

TABELA 6 - Massa e rendimento dos extratos das três espécies vegetais

Espécie	Órgão	Extratos*	Massa (g)	Rendimento (%)
<i>T. pallida</i>	Galhos	EH	14,3	0,47
		EM	36,5	1,22
	Folhas	EH	32,7	2,61
		EM	72,1	6,02
	Sementes	EH	0,226	19,10
		ED	0,714	60,41
EM		0,190	16,06	
<i>T. rubra</i>	Galhos	EH	58,4	1,19
		EM	118,8	2,30
	Folhas	EH	17,8	0,59
		EM	35,6	1,19
<i>A. fusciflorus</i>	Folhas	EH	46,5	4,47
		EM	86,1	8,28
	Raízes	EH	15,9	0,67
		EM	37,3	1,57

*EH- Extrato em hexano e EM- extrato em metanol

4.3 - Partição líquido-líquido dos extratos

Parte de cada um dos extratos foi submetido à partição líquido-líquido, resultando em cinco frações cada. Estas, depois de secas foram pesadas e tiveram seus rendimentos calculados (tabela 7, 8 e 9).

TABELA 7 - Resultado da partição líquido-líquido, massa e rendimento das frações de *A. fusciflorus*

Extrato	Quantidade (g)	Frações*	Massa (g)	Rendimento (%)
EMRA	16,3	FH	1,35	8,3
		FM	7,28	44,2
		FAc	0,70	4,3
		FNB	2,29	14,0
		FA	0,35	2,1
EMFA	21,2	FH	6,49	30,6
		FM	8,74	41,2
		FAc	3,02	14,3
		FNB	1,05	5,0
		FA	0,48	2,2
EHRA	10,8	FH	4,63	42,9
		FM	2,25	20,9
		FAc	1,36	12,6
		FNB	0,46	0,46
		FA	0,12	0,12
EHFA	14,1	FH	2,53	18,0
		FM	6,36	45,1
		FAc	1,59	11,3
		FNB	2,36	16,8
		FA	0,34	2,4

* Onde: FH - Fração em hexano, FM - Fração em metanol, FAc - Fração em acetato de etila e FNB- Fração em n-butanol e FA- Fração em água

TABELA 8 - Resultado da partição líquido-líquido, massa e rendimento das frações de *T. pallida*

Extrato	Quantidade (g)	Frações*	Massa (g)	Rendimento (%)
EMGTP	17,5	FH	4,03	23,0
		FM	1,52	8,7
		FAC	2,36	13,5
		FNB	1,23	7,0
		FA	1,38	7,8
EMFTP	21,2	FH	5,46	25,8
		FM	3,78	17,9
		FAC	0,82	3,8
		FNB	0,93	4,4
		FA	2,34	11,0
EHGTP	7,0	FH	1,14	16,3
		FM	3,56	50,9
		FAC	0,20	2,9
		FNB	1,95	27,9
		FA	0,25	0,9
EHFTP	20,0	FH	3,58	17,9
		FM	5,32	26,6
		FAC	0,87	4,3
		FNB	1,17	5,8
		FA	0,20	1,0

* Onde: FH - Fração em hexano, FM - Fração em metanol, FAC - Fração em acetato de etila e FNB- Fração em n-butanol e FA- Fração em água

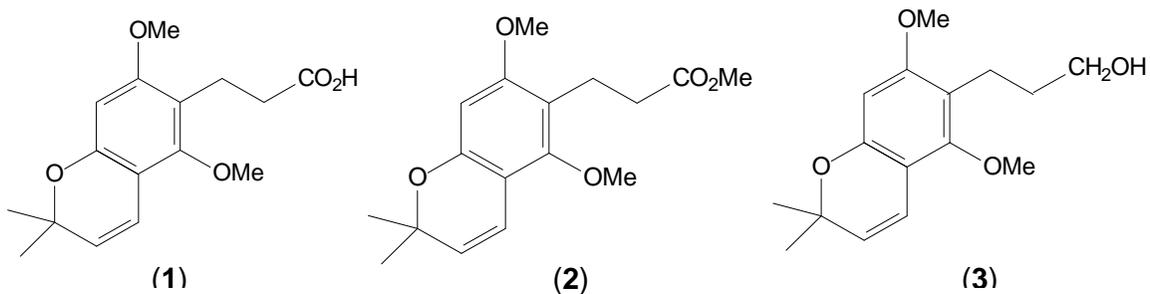
TABELA 9 - Resultado da partição líquido-líquido, massa e rendimento das frações de para *T. rubra*

Extrato	Quantidade (g)	Frações*	Massa (g)	Rendimento (%)
EMGTR	23,5	FH	2,26	6,3
		FM	5,46	27,3
		FAC	1,69	43,4
		FNB	1,15	5,7
		FA	2,45	7,2
EMFTR	10,9	FH	2,00	18,3
		FM	5,39	49,5
		FAC	0,01	1,4
		FNB	0,60	5,5
		FA	0,68	6,3
EHGTR	14,2	FH	6,11	43,0
		FM	3,97	27,9
		FAC	0,14	0,9
		FNB	2,45	17,2
		FA	0,98	1,25
EHFTR	16,4	FH	7,12	43,4
		FM	1,62	9,9
		FAC	4,56	27,8
		FNB	1,23	7,5
		FA	0,82	5,9

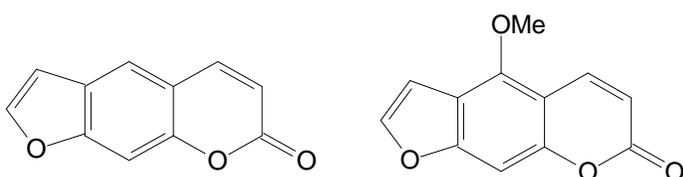
* Onde: FH - Fração em hexano, FM - Fração em metanol, FAC - Fração em acetato de etila e FNB- Fração em n-butanol e FA- Fração em água

4.4 - SUBSTÂNCIAS OBTIDAS

4.4.1 - Derivados do ácido diidrocinâmico

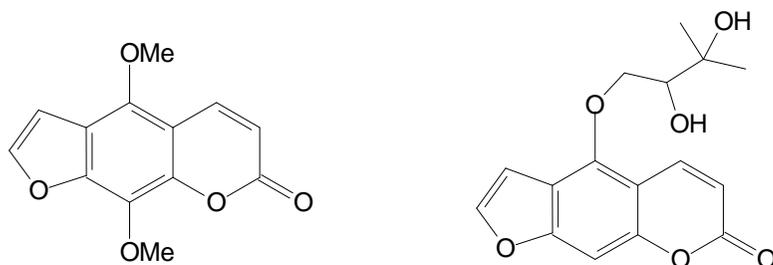


4.4.2 - Furanocumarinas



Psaroleno (4)

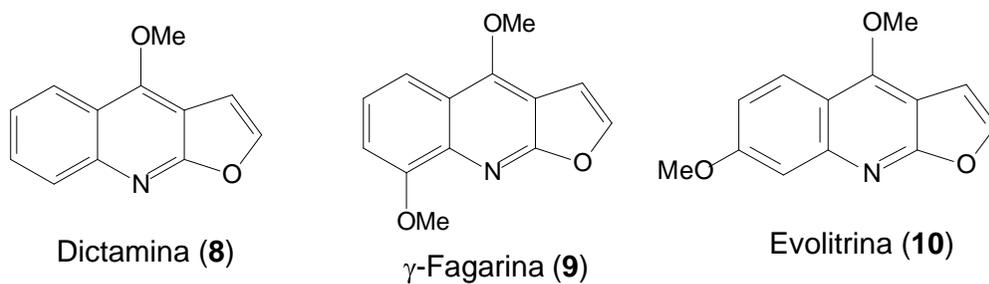
Bergapteno (5)

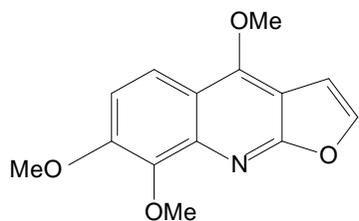


Isopimpinlina (6)

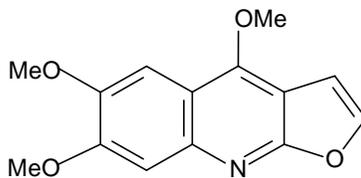
Prangol (7)

4.4.3 - Alcalóides

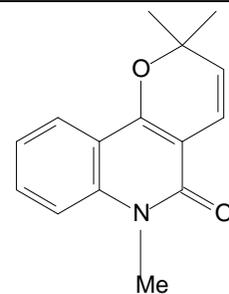




Esquimianina (11)

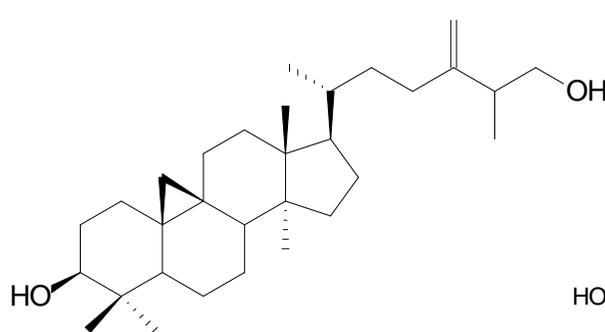


Kokusaginina (12)

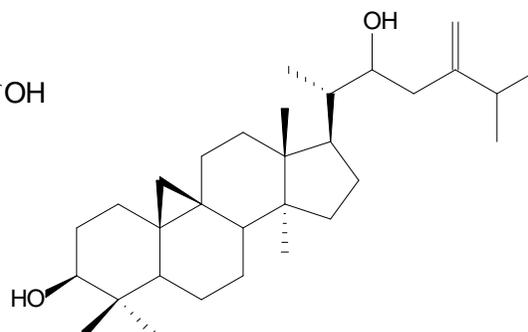


N-Metilflindersina (13)

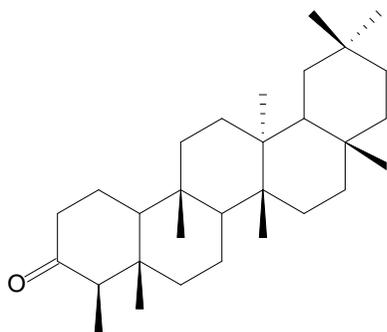
4.4.4- Triterpenos (cicloartano, friedelano, ursano e lupano)



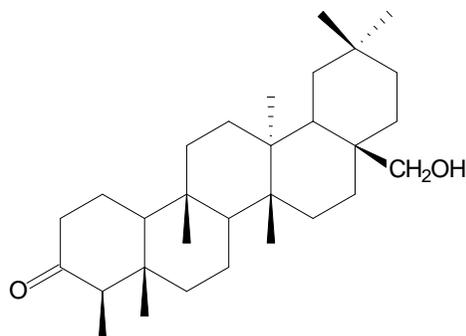
24-metilenocicloarta-3β,26-diol (14)



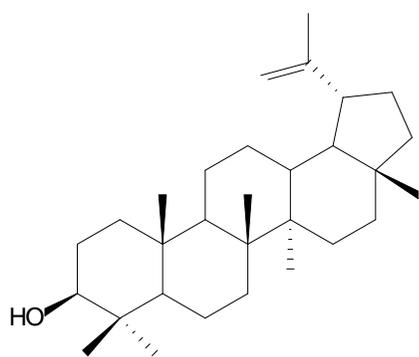
24-metilenocicloarta-3β, 22-diol (15)



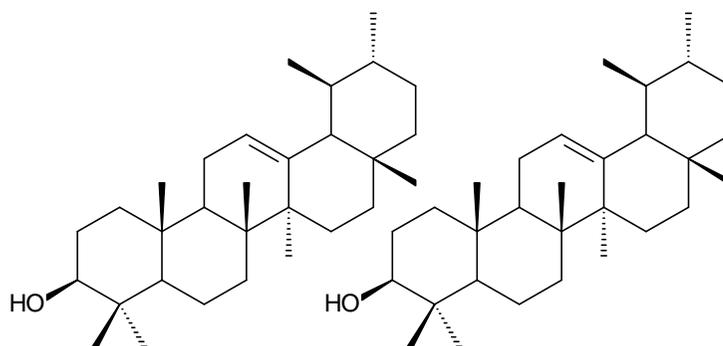
Friedelina (16)



friedelan-28-ol (17)

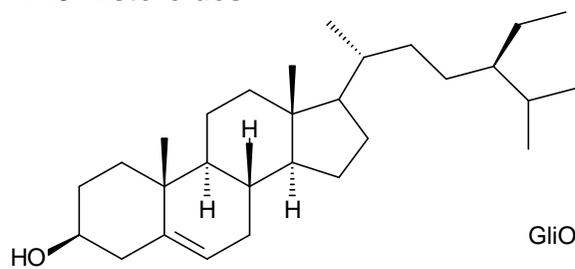


Lupeol (18)

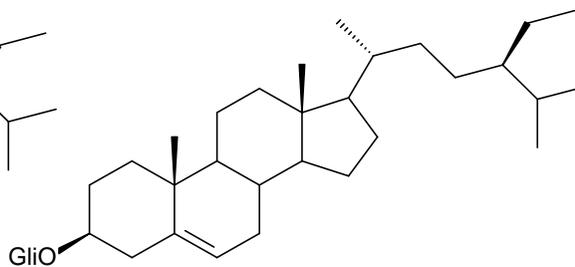


mistura de α e β -amirina (19)

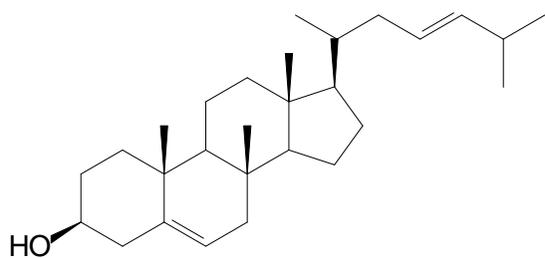
4.4.5- Esteróides



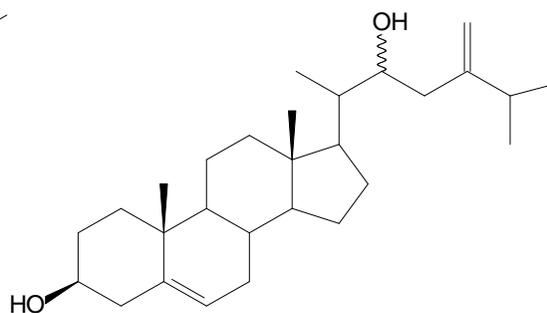
β -sitosterol (20)



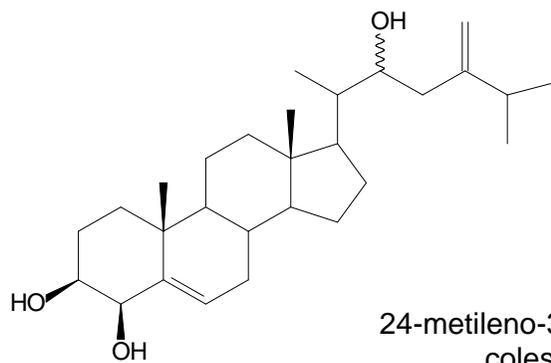
β -sitosterol glicosilado (21)



3 β -hidroxi-colestan-23-eno (22)

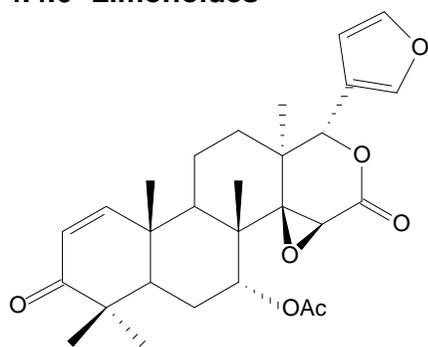


24-metileno-3 β ,22-diidroxi-colesterol (23)

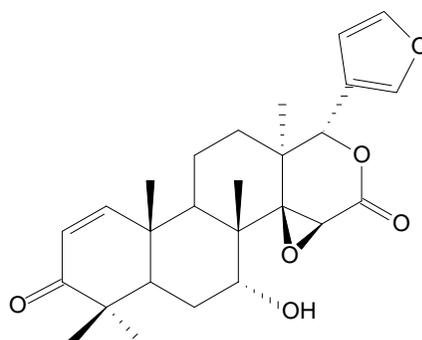


24-metileno-3 β ,4 β ,22-triidroxi-colesterol (24)

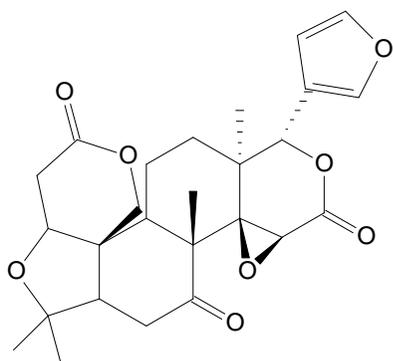
4.4.6- Limonóides



Gedunina (25)

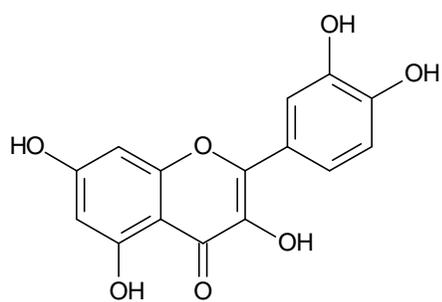


7-desacetilgedunina (26)

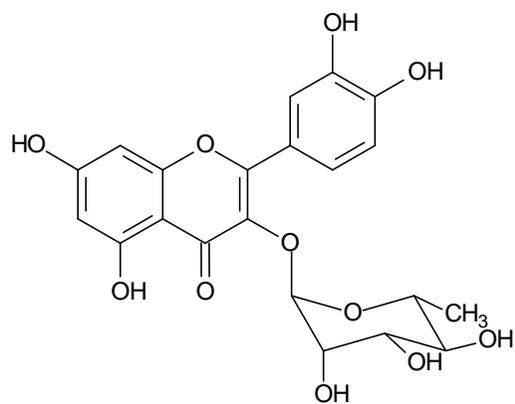


Limonina (27)

4.4.7- Flavonóides



Quercetina (28)



Quercetrina (29)

4.5 - DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS

4.5.1 - DERIVADOS DO ÁCIDO DIIDROCINÂMICO

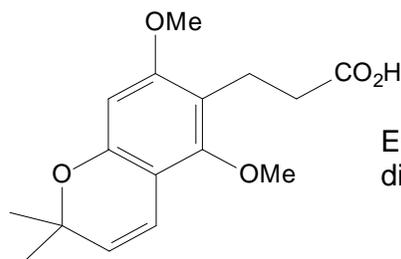
4.5.1.1 - Identificação estrutural da substância 1

No espectro de RMN¹H da substância **1** (figura 26, p. 76; tabela 10, p. 82) foram observados dois dubletos a δ 6,49 (d,1H, J = 9,8 Hz) e δ 5,48 (d,1H, J = 9,8 Hz) o que sugere a presença de um anel cromeno e um singleto a δ 1,42 (6H, s) que se refere à presença de duas metilas ligadas a um anel aromático. Dois singletos a δ 3,76 (3H, s) e δ 3,73 (3H, s) cada um integrando para três hidrogênios sugerindo a presença de duas metoxilas. Foram ainda observados dois multipletos centrados em δ 2,8 (1H, m) e δ 2,5 (1H, m) referentes aos hidrogênios ligados ao C-3 e C-2 respectivamente, além de um singleto em δ 6,19 referente ao hidrogênio aromático ligado ao C-5'.

No espectro de RMN¹³C (figura 27, p. 76; tabela 11, p. 82) foram observados a presença de 15 sinais sendo que os sinais em δ 62,33, 55,46 confirmam a presença de duas metoxilas na molécula.

A substância foi analisada por CG/EM (figura 28, p. 76) e foi observado um pico, com tempo de retenção de 17,8 mim, cujo espectro de massas correspondente apresentou íon molecular com m/z 292.

Os dados obtidos foram comparados com os publicados por VIEIRA et al, (1980) e foram coincidentes com a estrutura do ácido 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':3',4')fenil] propiônico (**1**). Esta substância foi até o momento isolado do extrato da casca do caule de *A. fusciflorus* por VIEIRA (1978) e em seguida de *Hortia bandinii* (CORREA et al., 1979) e recentemente teve sua estrutura cristalina determinada (SILVA et al., 2003a).



Estrutura do ácido 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':3',4')fenil] propiônico

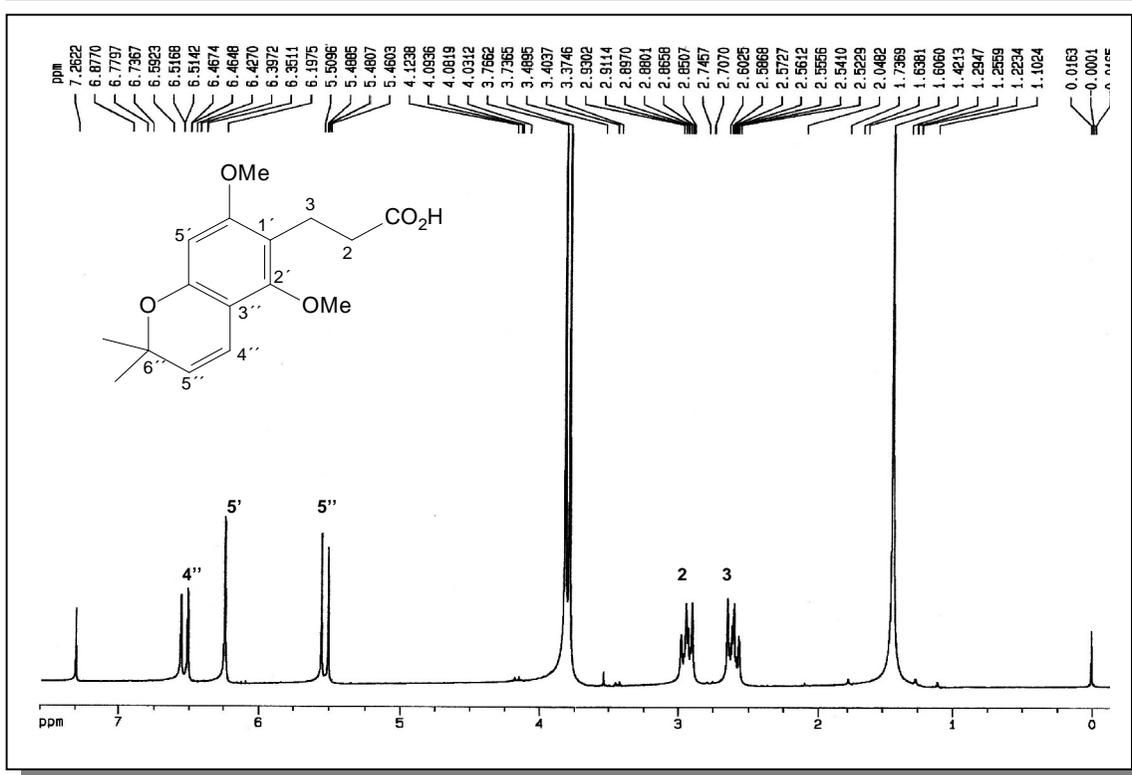


FIGURA 26 - Espectro de RMN¹H da substância 1 (200 MHz, CDCl₃)

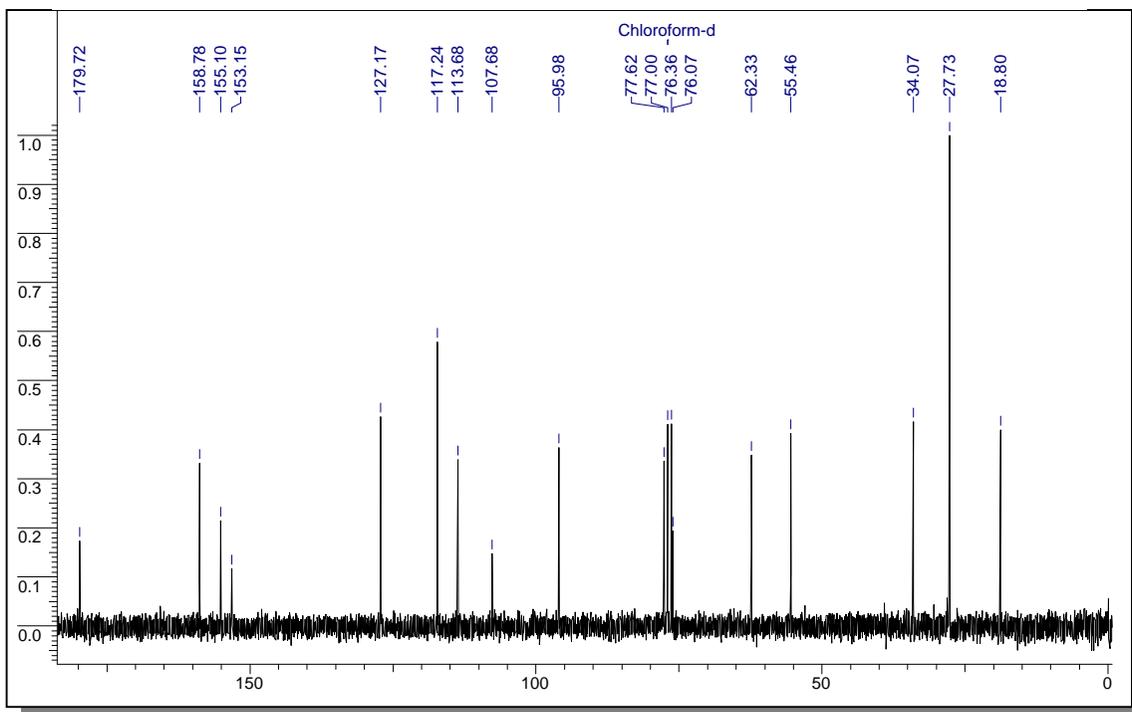


FIGURA 27 - Espectro de RMN¹³C da substância 1 (50 MHz, CDCl₃)

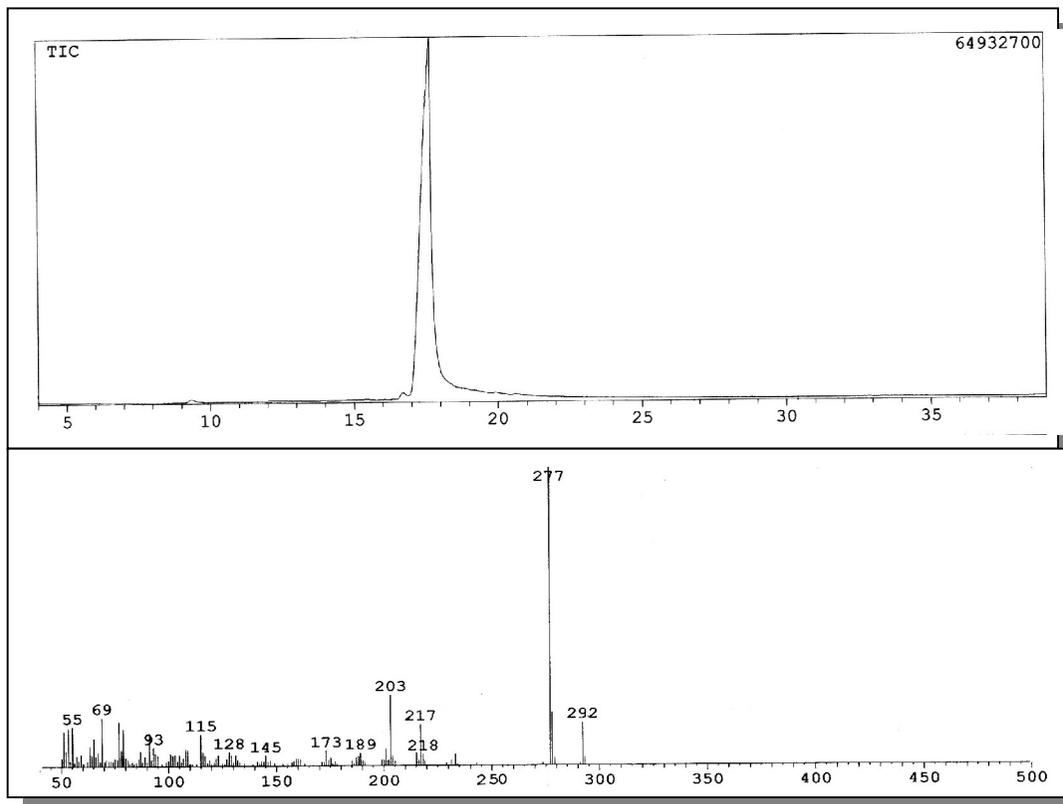


FIGURA 28 - Cromatograma e espectro de massas da substância 1 (IE -70eV)

4.5.1.2 - Identificação estrutural da substância 2

O espectro de RMN¹H da substância 2 (figura 30, p. 78; tabela 10, p. 81) apresentou perfil muito semelhante com a substância 1 já que também foram observado os dois dubletos sendo um centrado em δ 6,50 ($J= 9,9$ Hz) e δ 5,48 ($J= 9,9$ Hz) característico do anel cromeno e o singlete a δ 1,42 referente à de duas metilas.

Foram ainda observados dois multipletos centrados em δ 2,8 e δ 2,5 referentes aos hidrogênios ligados ao C-3 e C-2 respectivamente, além de um singlete em δ 6,35 referente ao hidrogênio aromático ligado ao C-5'. Diferentemente do que foi observado na substância 1, foram observados três singletos em δ 3,76, 3,72 e 3,66 cada um integrando para três hidrogênios que sugerem a presença de três metoxilas na molécula.

No espectro de RMN¹³C (figura 31, p. 79; tabela 11, p. 82) apresenta 16 sinais sendo que os sinais em δ 61,1; 55,26 e 51,15 confirmam a presença das três metoxilas.

A substância **2** foi analisada por CG/EM e foi observado apenas um pico, com tempo de retenção de 23,2 min cujo espectro de massas que se refere ao pico apresentou íon molecular com m/z 306.

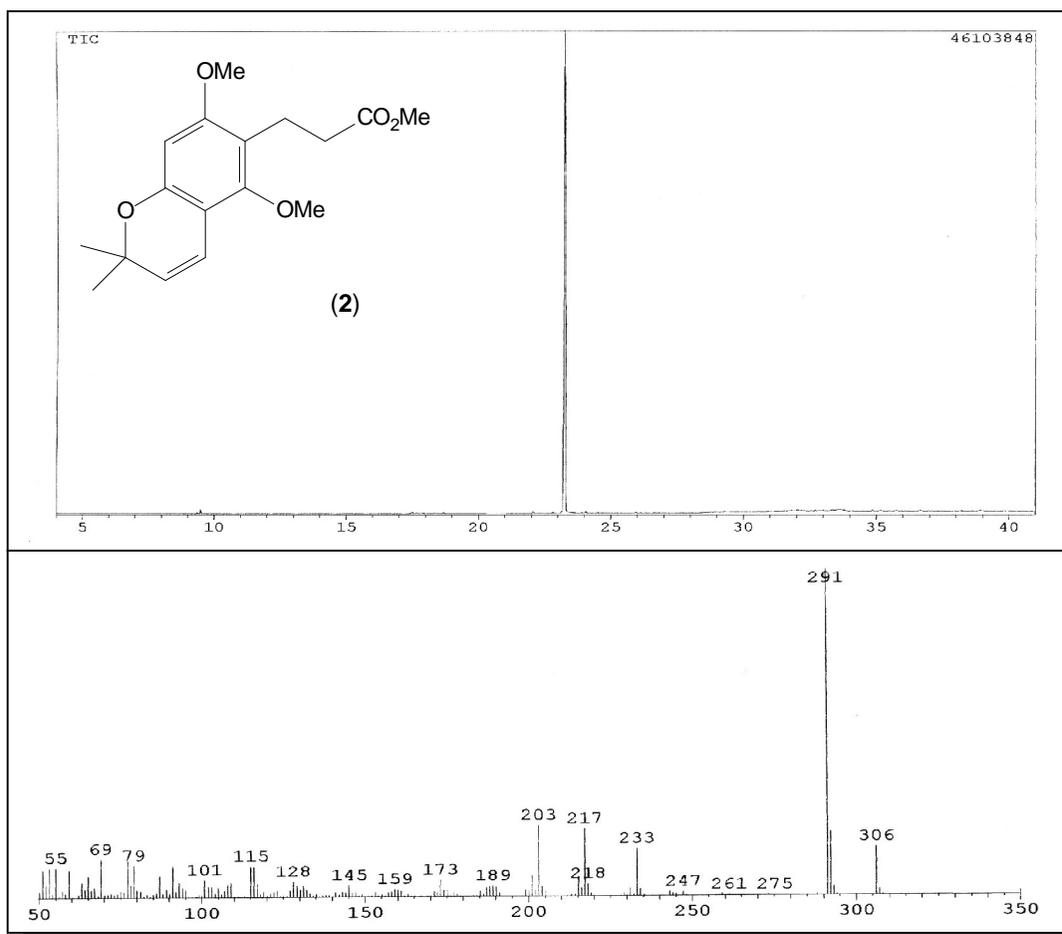


FIGURA 29 - Cromatograma e espectro de massas da substância **2** (IE -70eV)

Estes dados foram comparados com os descritos por VIEIRA et al., (1980) e assim foi possível confirmar a estrutura da substância **2** como sendo o éster 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':3',4') fenil] propionato que foi anteriormente isolada do extrato da casca do caule de *A. fusciflorus* por VIEIRA, (1978).

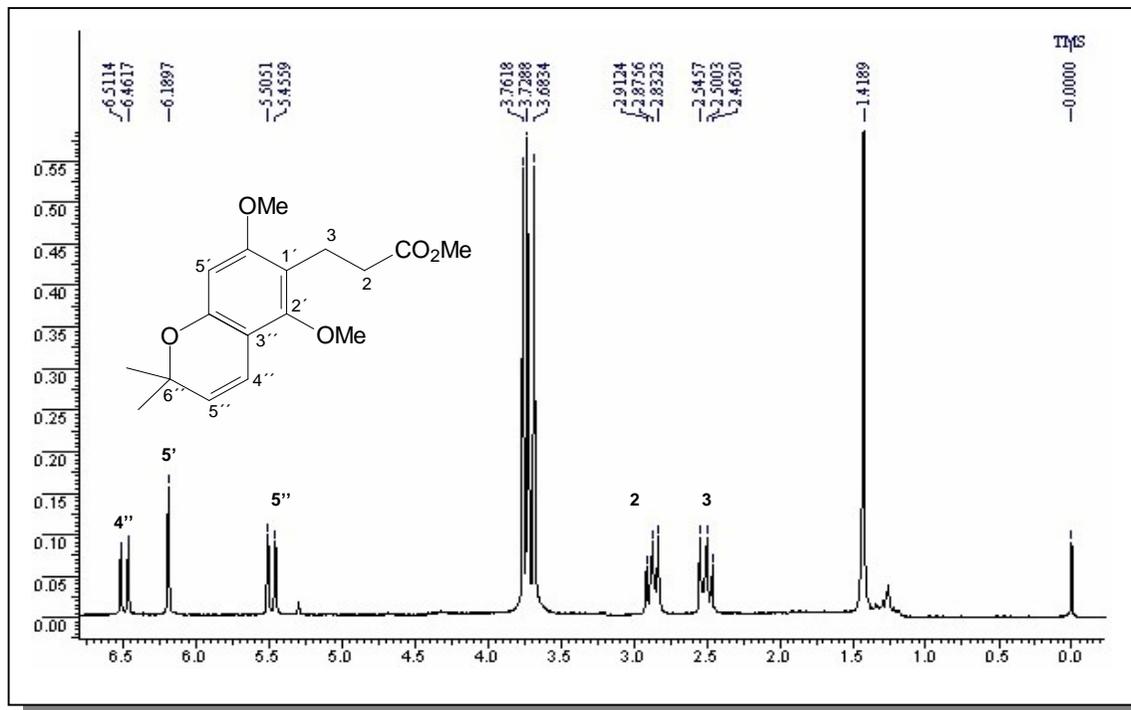


FIGURA 30 - Espectro de RMN¹H da substância 2 (200 MHz, CDCl₃)

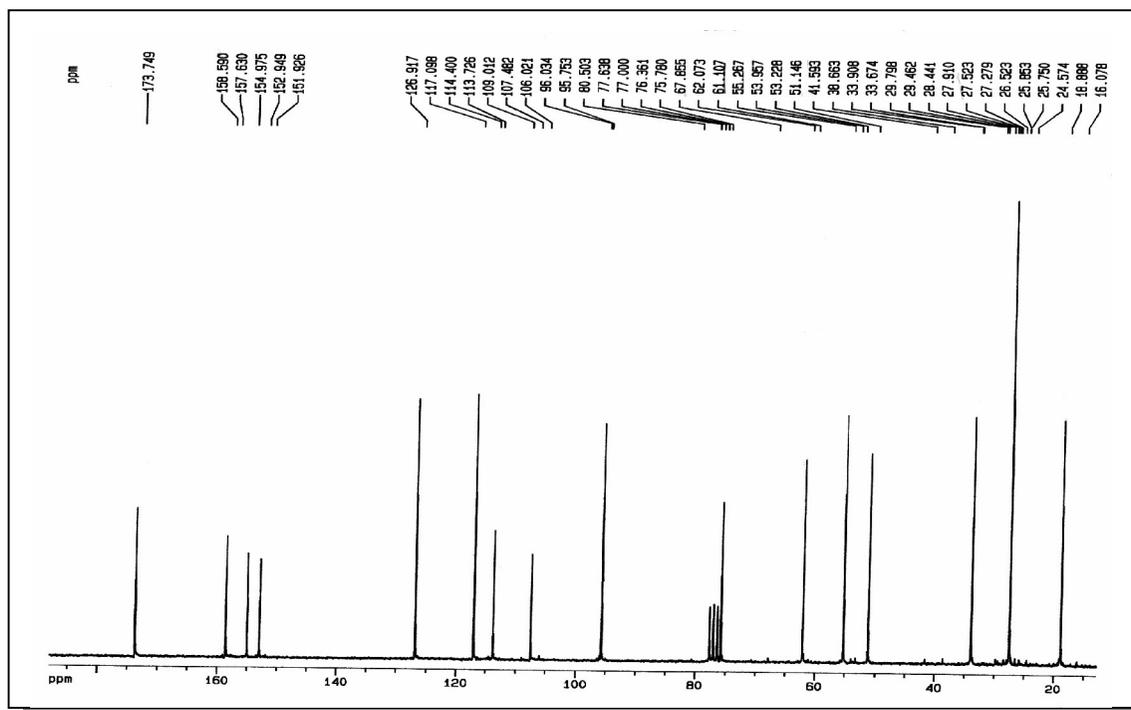


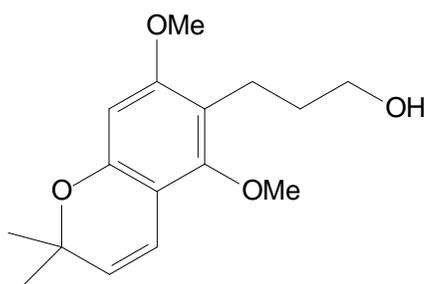
FIGURA 31 - Espectro de RMN¹³C da substância 2 (50 MHz, CDCl₃)

4.5.1.3 - Identificação estrutural da substância 3

Para a substância **3** o espectro de RMN¹H (figura 32, p. 81; tabela 10, p. 82), mostrou sinais em δ 6,48 ($J= 10,0$ Hz) e δ 5,49 (1H, d, $J =10,0$ Hz) característico de um anel cromeno e um singlete a δ 1,42 referente à de duas metilas ligadas ao anel aromático. Foram observados também sinais em δ 3,76 (3H, s) e δ 3,72 (3H, s) integrando para seis hidrogênios que sugere a presença de duas metoxilas na molécula e um sinal em δ 1,75 e dois tripletos em δ 3,51 (t , 1H, 6 Hz) e δ 2,66 (t , 1H, 8 Hz) cada um integrando para dois hidrogênios que foram atribuídos aos hidrogênios 2 e 3. Além de um singlete em δ 6,48 (s) que foi atribuído ao hidrogênio aromático ligado ao carbono C-5'.

No espectro de RMN¹³C (figura 33, p. 81; tabela 11, p. 82) apresenta 15 sinais sendo que os sinais a δ 62,68 e 53,77 confirmam a presença das duas metoxilas na molécula. Um sinal em δ 78,40 referente a um carbono carbinólico e a ausência do sinal da carbonila diferenciou esta da substancia 1 e assim foi proposta a estrutura do álcool 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':3',4')]fenil-1-propanol para esta substância.

Este derivado do ácido diidrocinâmico foi pela primeira e única vez isolado por CORREA et al., (1979) de *Hortia bandinii*, mas na ocasião o autor identificou-o pelos dados obtidos em experimentos de massas, infravermelho, ultravioleta e PMR (60 MHz) e até o momento não havia dados de RMN¹³C para esta molécula.



Estrutura do álcool 3-[2',6'-dimetoxi-6'',6''-dimetilpirano(2'',3'':3',4')]fenil-1-propanol

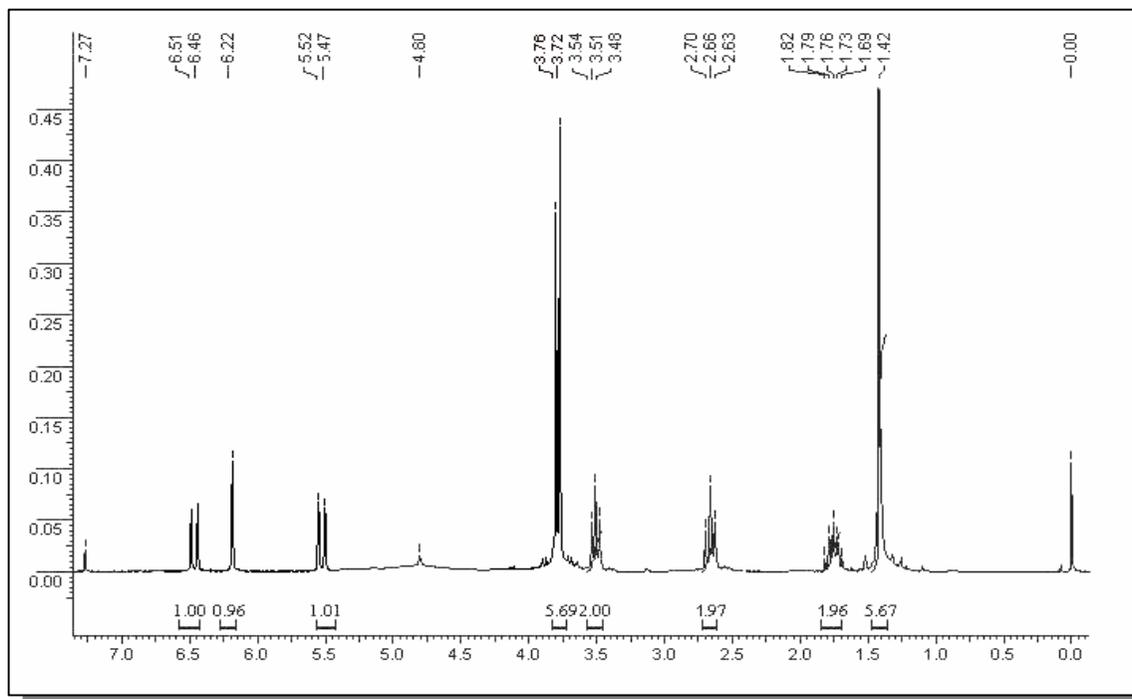


FIGURA 32 - Espectro de RMN¹H da substância **3** (200 MHz, CDCl₃)

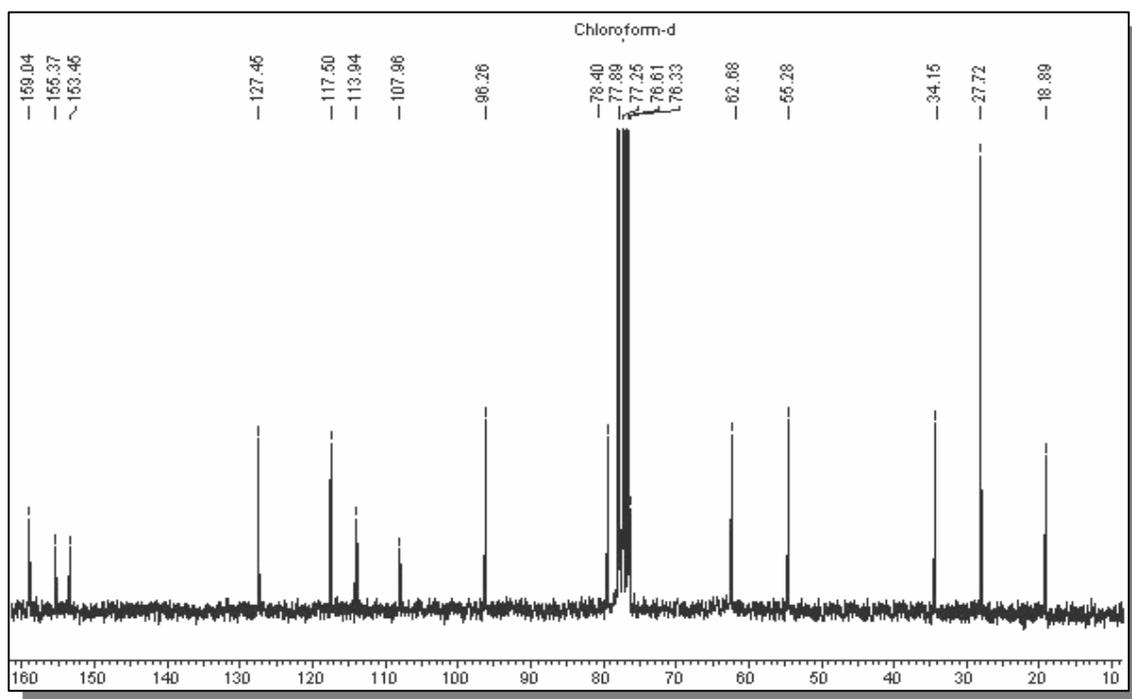


FIGURA 33 - Espectro de RMN¹³C da substância **3** (50 MHz, CDCl₃)

TABELA 10 - Dados de RMN¹H das substâncias **1** a **3** (200 MHz, CDCl₃)

Posição	1	2	3
1	-	-	1,75 (m)
2	2,88 (m)	2,87 (m)	2,66 (t, J=6,0 Hz)
3	2,56 (m)	2,50 (m)	3,51 (t, J=6,0 Hz)
5'	6,19 (s)	6,18 (s)	6,22(s)
4''	6,49 (d, J=9,8 Hz)	6,60 (d, J=9,9 Hz)	6,48 (d, J=10,0 Hz)
5''	5,48 (d, J=9,8 Hz)	5,48 (d, J=9,9 Hz)	5,49 (d, J=10,0 Hz)
OCH ₃ -2'	3,73 (s)	3,73 (s)	3,72 (s)
OCH ₃ -6'	3,76 (s)	3,76 (s)	3,76 (s)
OCH ₃ -1	-	3,68 (s)	-
2 CH ₃	1,42 (s)	1,42 (s)	1,42 (s)

¹Dados comparados com os descritos por CORREA et al., (1979) PMR (60 MHz,CDCl₃) e VIEIRA et al., (1980). Constante de acoplamento em Hz e integrais entre parênteses.

TABELA 11 - Dados de RMN¹³C das substâncias **1** a **3** (50 MHz, CDCl₃)

Posição	1*	2*	3
1	179,72	173,74	78,40
2	34,07	33,90	34,15
3	18,80	18,88	18,89
1'	113,68	113,72	113,94
2'	155,10	154,97	155,37
3'	107,68	107,48	107,96
4'	158,78	158,59	159,04
5'	95,98	96,03	96,26
6'	153,15	152,94	153,45
4''	117,24	117,09	117,50
5''	127,17	126,91	127,45
6''	75,07	75,78	76,33
OCH ₃ -2'	62,33	61,10	62,68
OCH ₃ -6'	55,46	55,26	55,28
OCH ₃ -1	-	51,15	-
2 CH ₃	27,73	27,91	27,72

*Dados comparados com os descritos por CORREA et al., (1979) PMR (60 MHz,CDCl₃) e VIEIRA et al., (1980)

4.5.2- As Cumarinas

4.5.2.1- FURANOCUMARINAS

4.5.2.1.1- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DO Psaroleno (4)

A substância 4 foi isolada através do fracionamento do extrato em metanol das folha de *A. fusciflorus* e obtidas como um pó amarelo. Quando analisada por CCD, apresentou sinais característicos de cumarina quando observada sob luz ultravioleta 254 nm, não revelam em vanilina.

Na análise por CG/EM da amostra foi observado apenas um pico com tempo de retenção de 14,2 mim e o espectro de massas correspondente a este pico apresentava íon molecular m/z 186 compatível com a formula $C_{11}H_6O_3$.

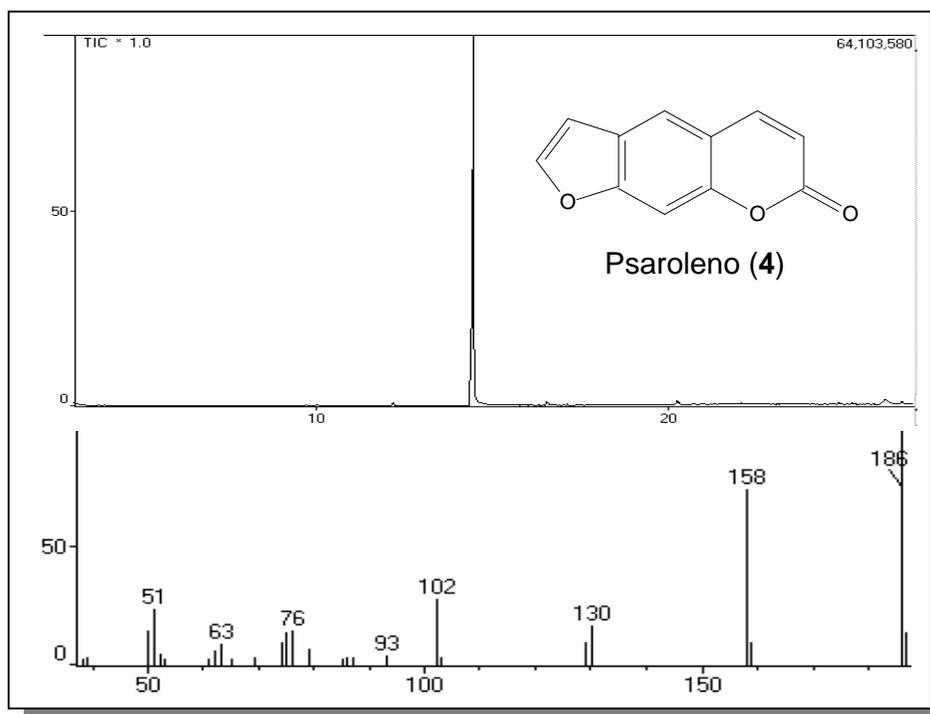


FIGURA 34 - Cromatograma e espectro de massas da substância 4 (IE -70eV).

Os fragmentos foram comparados com os dados publicados por MASUDA et al., (1997) e coincidentes com o psaroleno que é uma furanocumarina linear e sem substituintes e que, segundo STEVENSON et al., (2003), apresenta atividade inseticida.

4.5.2.1.2- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE Bergapteno (5)

O espectro de RMN¹H (figura 35) da substância **5** apresentou sinais em δ 8,18 (1H, d, $J=9,8$ Hz) e δ 6,28 (1H, d, $J=9,8$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4 respectivamente. Os sinais em δ 7,63 (1H, d, $J=2,4$ Hz) δ 7,02 (1H, dd, $J=0,9$ e 3,4 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-3' do um anel furano. Como H-3' aparece como um duplo dubleto indica a presença de hidrogênio ligado ao carbono 8 (STECK e MAZURECK, 1972). Foi ainda observado um singlete largo, que integra para um hidrogênio, centrado em 7,14 (1H, sl).

O sinal atribuído ao hidrogênio 4 encontra-se mais desprotegido do que o habitual, o que indica que há um substituinte no carbono 5. O sinal em δ 4,27 (3H, s) foi relacionado a uma metoxila ligada a anel aromático.

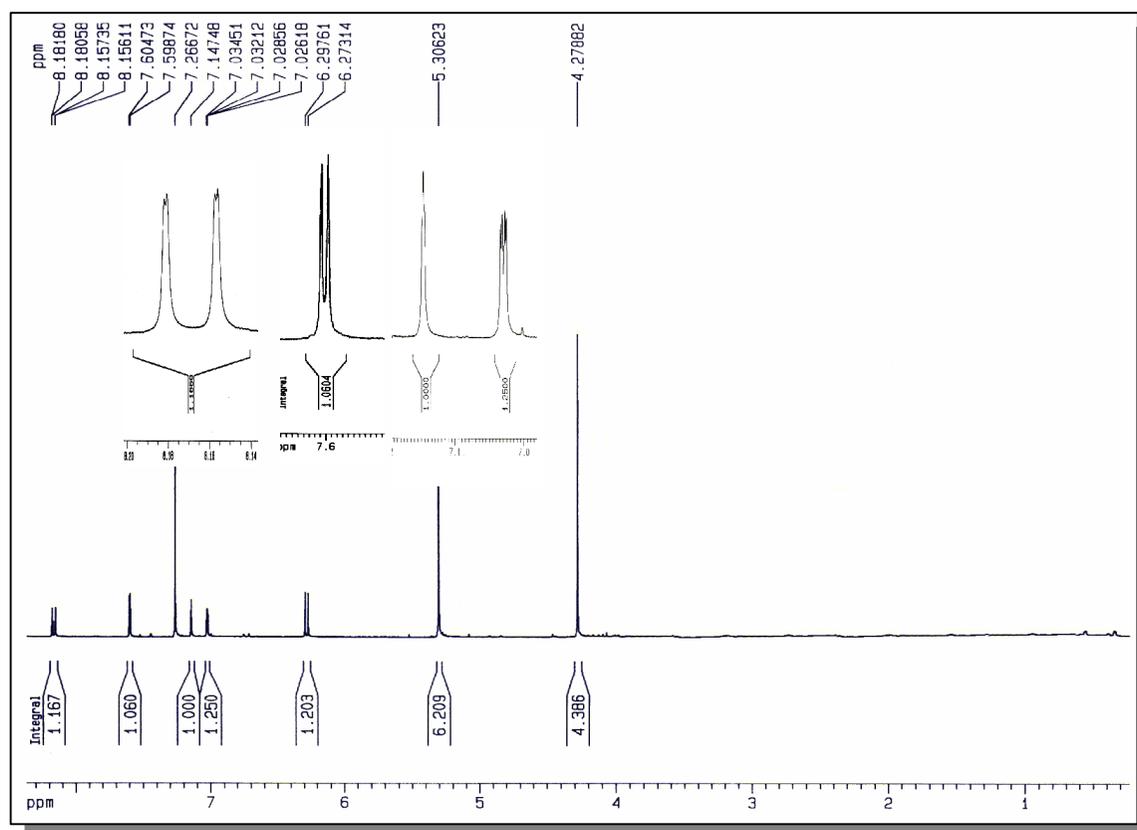


FIGURA 35 - Espectro de RMN¹H da substância **5** (400 MHz, CDCl₃)

No experimento de gCOSY ^1H - ^1H desta substância foi possível observar os sistemas de acoplamento como está assinalado no mapa de contorno (FIGURA 36).

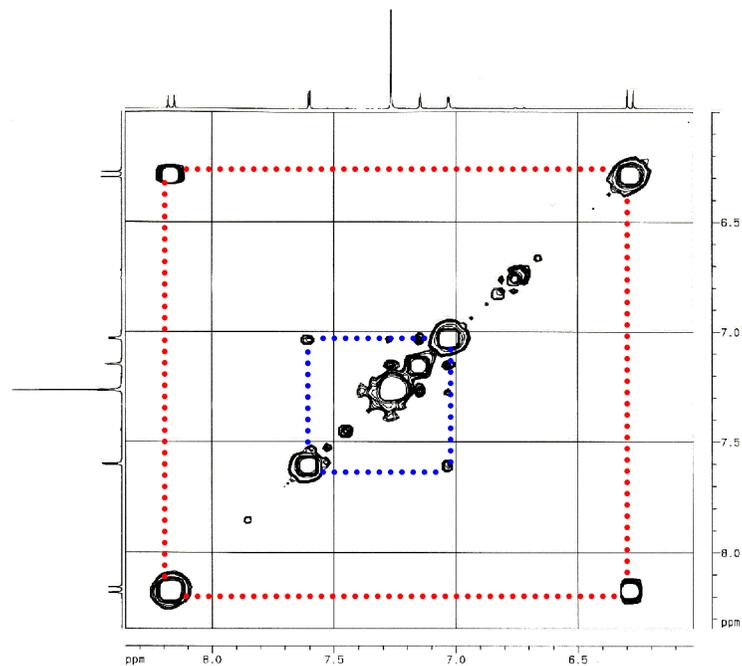


FIGURA 36 – Mapa de contorno de COSY ^1H - ^1H da substância **5** (400 MHz, CDCl_3)

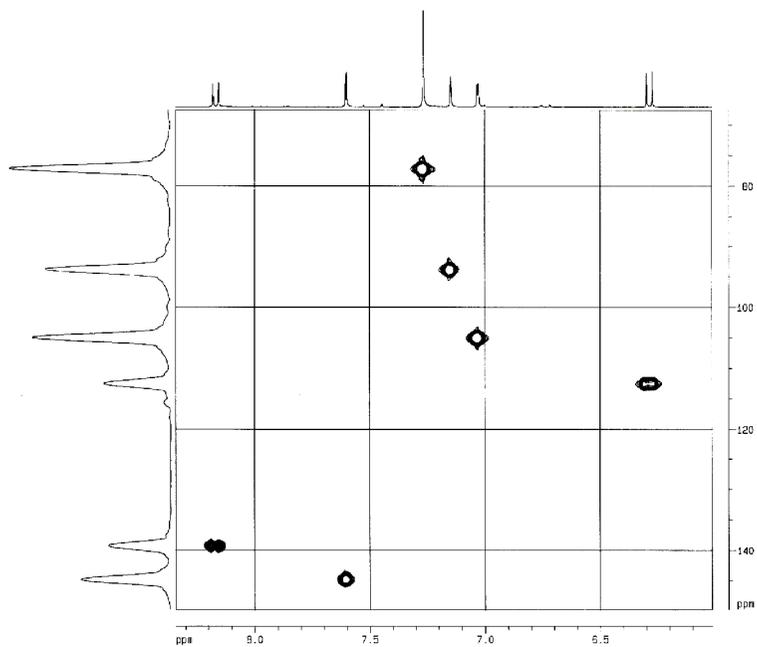


FIGURA 37 – Mapa de contorno de HSQC da substância **5** (400 MHz, CDCl_3)

Analisando a ampliação do mapa de contorno do gHMBC foi possível atribuir todos os sinais de carbono. Pode-se atribuir ao carbono quaternário 8a o deslocamento em δ 153 porque este se correlaciona com o H-8 e H-4. O sinal H-3' acopla com o sinal em δ 145 então este foi atribuído ao carbono do anel furano C-2'. A observação do acoplamento dos hidrogênios H-3', H-8 e H-2' com o sinal em δ 114 foi importante para a atribuição do deslocamento do carbono 6. A atribuição do deslocamento do carbono 7 em δ 159 foi possível já que os hidrogênios H-3', H-8 e H-2' se correlacionavam com este sinal.

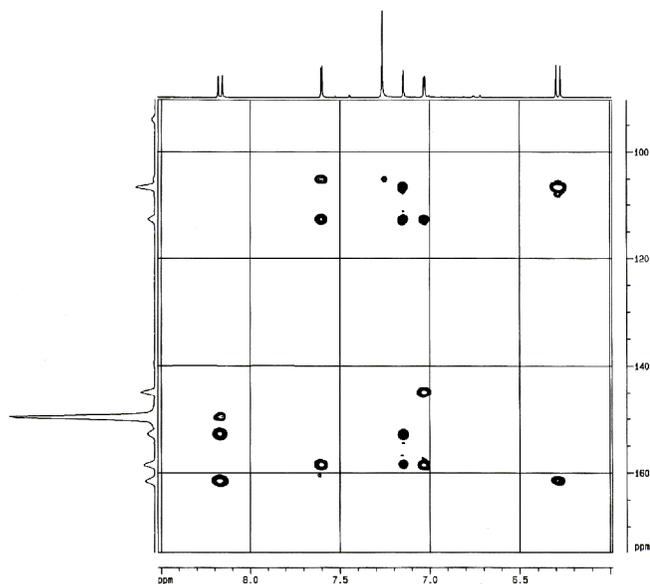
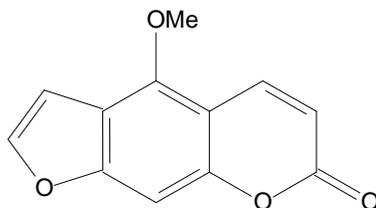


FIGURA 38 – Mapa de contorno de gHMBC da substância **5** (400 MHz, CDCl_3)

Através de experimentos de RMN em duas dimensões, gCOSY, gHMBC e gHSQC foi possível concluir inequivocamente a estrutura proposta. Os dados obtidos foram comparados com os dados publicados na literatura (MASUDA, et al., 1998, FRANKE, et al., 2001 e STEVENSON, et al., 2003; MURRAY et al., 1982) e foram coincidentes com o bergapteno.



Bergapteno (**5**)

4.5.2.1.3- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE Isopimpinina (6)

O espectro de RMN¹H da substância 6 apresentou dois dubletos: δ 8,13 (1H, d, $J=9,8$ Hz) e δ 6,29 (1H, d, $J=9,8$ Hz) que foram atribuídos aos prótons H-4 e H-3 respectivamente. Os sinais em δ 7,63 (1H, d, $J=2,3$ Hz) e δ 7,02 (1H, d, $J=2,3$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios do anel furano H-2' e H-3' respectivamente. Dois singletos em δ 4,17 (3H, s) e 4,16 ppm (3H, s) foram atribuídos a duas metoxilas aromáticas.

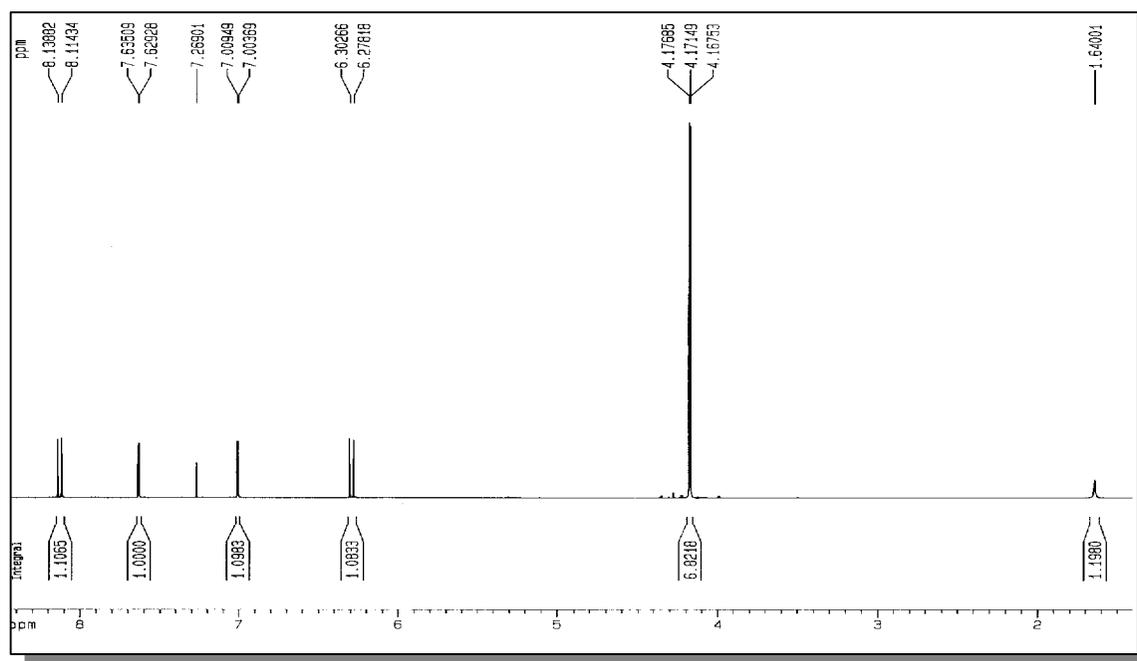
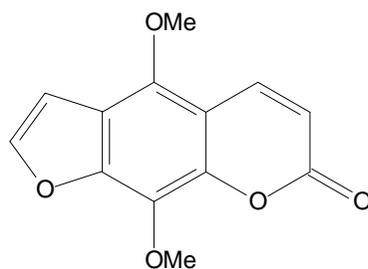


FIGURA 39- Espectro de RMN¹H da substância 6 (CDCl₃, 400 MHz)

O espectro de RMN¹³C (figura 40, p. 88) da substância 6 apresentou 11 sinais. Foram ainda obtidos experimentos de ressonância em duas dimensões, gCOSY, gHSQC e gHMBC e todos foram analisados e comparados com os obtidos da literatura (STEVENSON et al., 2003; MURRAY et al., 1982) e foram coincidentes com a estrutura da isopimpinina.



Isopimpinina (6)

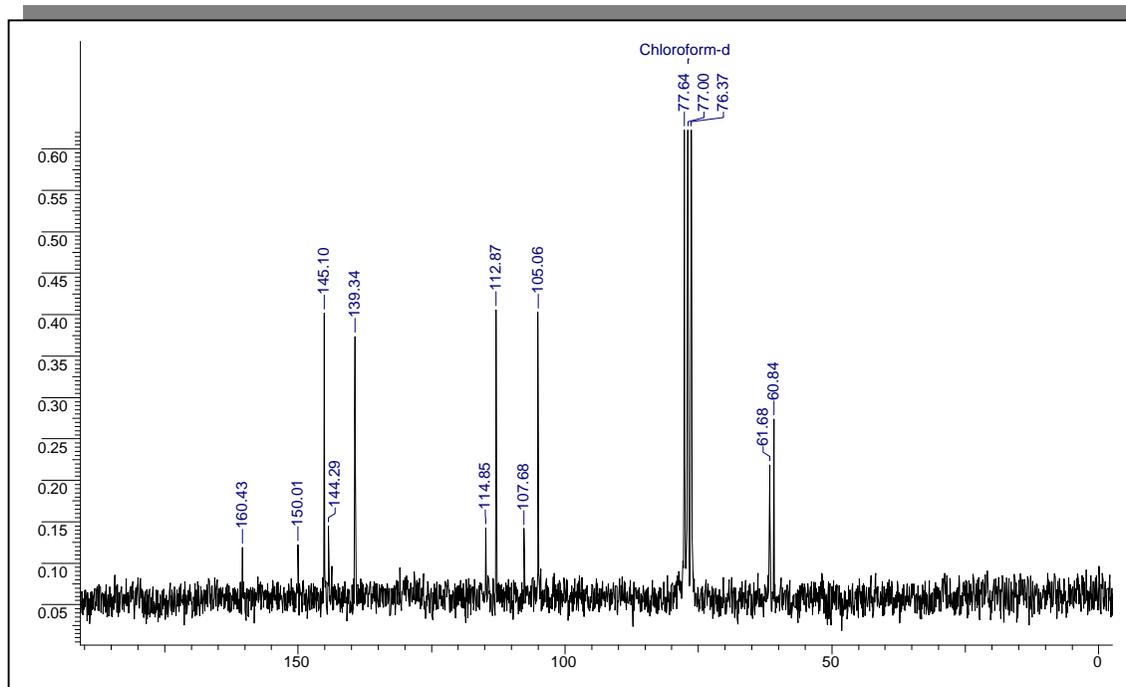


FIGURA 40 - Espectro de RMN¹³C para a substância 6 (CDCl₃, 50 MHz)

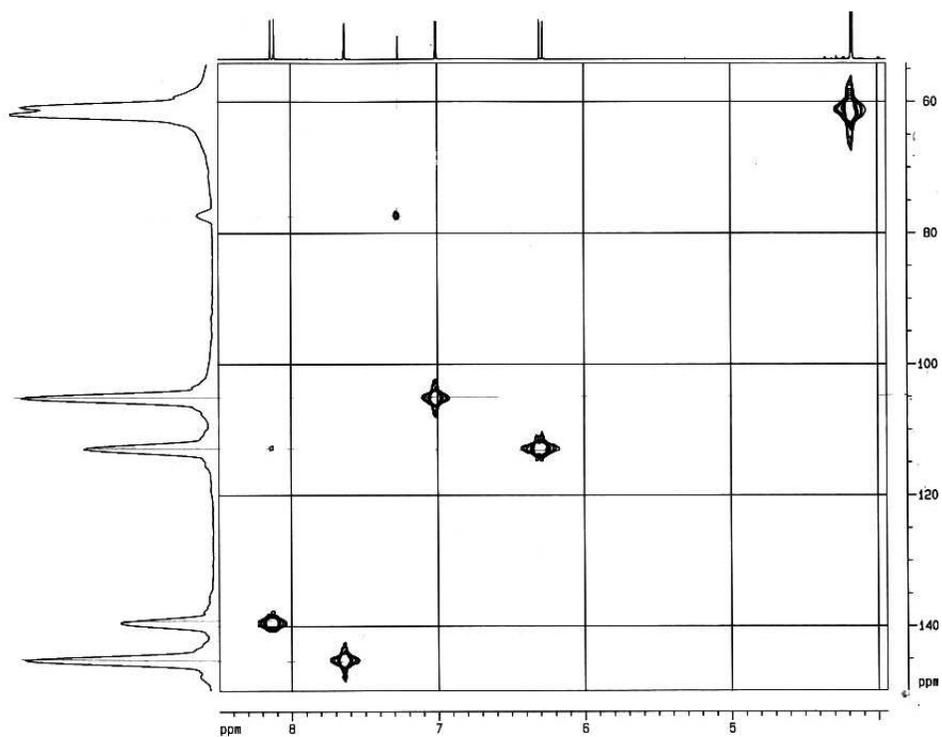


FIGURA 41- Mapa de contorno de HSQC da substância 6 (CDCl₃, 400 MHz)

Com o experimento COSY ampliado na região entre δ 6,0 e 8,5 foi possível observar as correlações entre os hidrogênios 3 e 4.

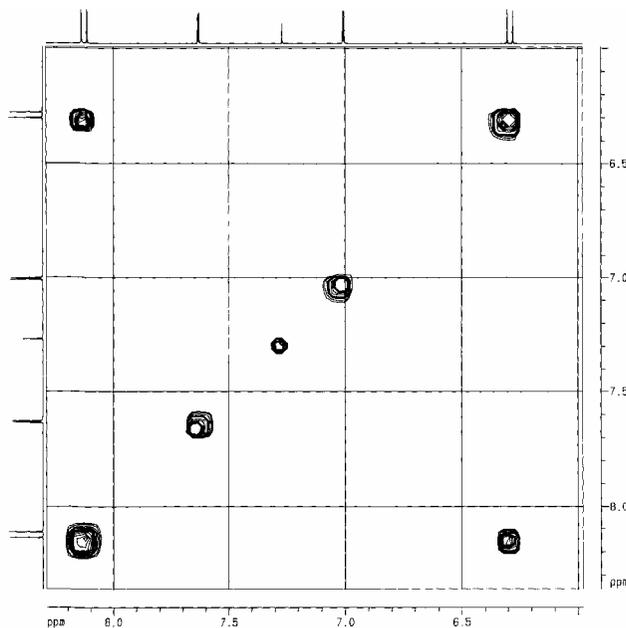


FIGURA 42 - Mapa de contorno de COSY da substância 6 (CDCl₃, 400 MHz)

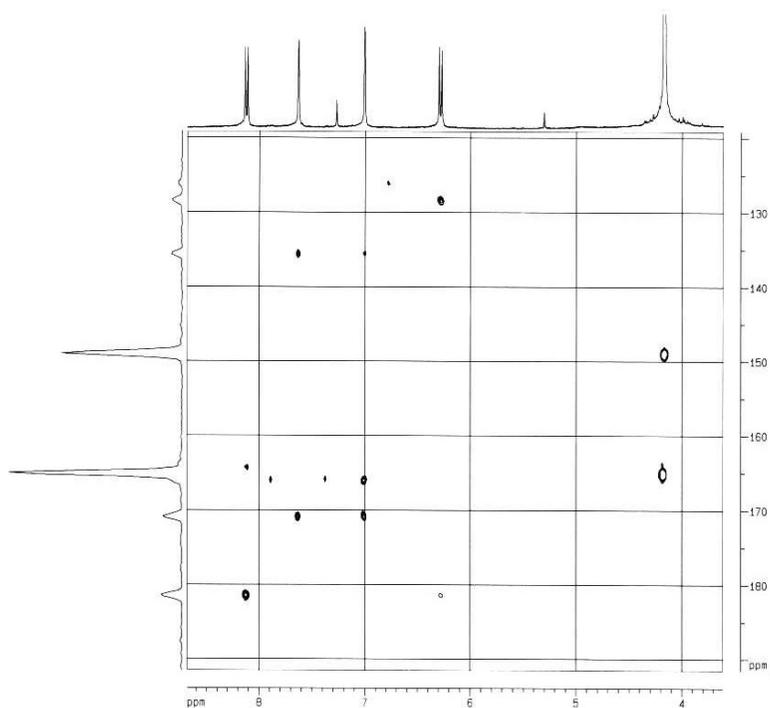


FIGURA 43 - Mapa de contorno de HMBC da substância 6 (CDCl₃, 400 MHz)

TABELA 12 - Dados de RMN¹H de **5** e **6** (CDCl₃, 400 MHz)

Prótons	5*	6*
H-3	6,28 (1H, d, J= 9,8 Hz)	6,29 (1H,d, J= 9,8 Hz)
H-4	8,18 (1H, d J= 9,8 Hz)	8,13 (1H,d, J= 9,8 Hz)
H-3'	7,02 (dd, J= 0,9 e 3,2 Hz)	7,01 (dd, J= 2,3 Hz)
H-2'	7,60 (1H, d, J=2,2 Hz)	7,63 (1H,d, J= 2,3 Hz)
H-8	6,95 (1H, d, J= 2,2 Hz)	-
-5OCH ₃	7,24 (1H,sl)	4,17 (3H, s)
-8OCH ₃	-	4,16 (3H, s)

* Dados comparados com os dados descritos por MASUDA et al., (1998) e STEVENSON et al., (2003)

Constante de acoplamento entre parênteses calculada em Hz

TABELA 13 - Dados de RMN¹H de **5** (50 MHz, CDCl₃) e **6** (50 MHz, MeOD)

Carbonos	5*	6
2	160	160,43
3	112	112,87
4	143	139,34
4a	106	107,68
5	151	146,20
6	114	114,85
7	160	150,01
8a	94	144,29
2'	154	145,10
3'	146	105,06
8	104	144,91
5-OMe	61	60,84
8-OMe	-	61,68

Dados comparados com MASUDA et al., (1998) e STEVENSON et al., (2003).

* Dados obtidos de modo indireto pela projeção de carbono

4.5.2.1.4- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE Prangol (7)

No espectro de RMN¹H (figura 45, p. 92; tabela 14, p. 94) da substância **7** foi observado sinais para quatro prótons na região de aromáticos sendo: dois dubletos centrados em δ 8,3 (1H, d, $J=9,8$ Hz) e δ 6,2 (1H, d, $J=9,8$ Hz) que foram atribuídos aos prótons H-4 e H-3 respectivamente. Um dubleto centrado em δ 7,7 (1H, d, $J=2,4$ Hz) característico do hidrogênio H-2'. Já H-3' aparece como um duplo dubleto centrado em δ 7,2 ($J=1,0$ e 2,4 Hz). Foi observado também a presença de um singleto largo em δ 7,1 que foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono 8.

O substituinte foi identificado pelo espectro de RMN¹H como sendo (CH₃)₂COH-CHOH-CH₂-O- pelos sinais em δ 1,2 e 1,3 referente a dois grupos metílico e um sistema ABM com sinais em δ 4,78 (1H, dd, $J= 2,4$ e 9,8 Hz), δ 4,38 (dd, $J= 8,4$ e 9,8 Hz), δ 3,82 (dd, $J= 2,4$ e 9,8 Hz) como pode ser observado na figura 44.

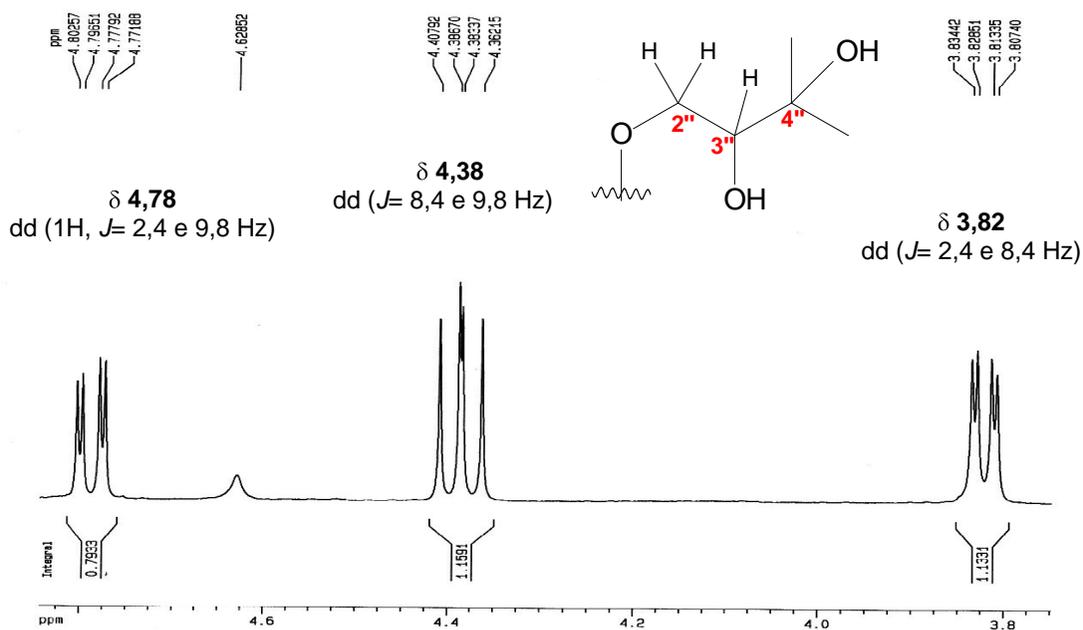


FIGURA 44- Ampliações do espectro de RMN¹H da substância **7** (400 MHz, MeOD)

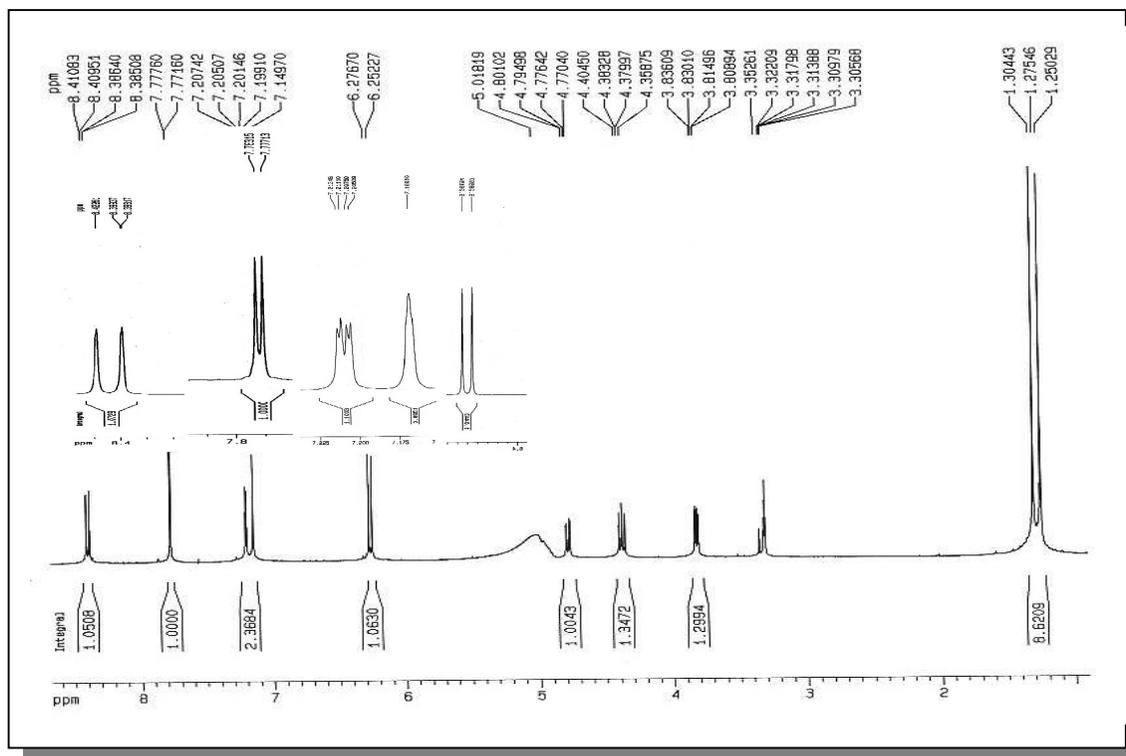


FIGURA 45- Espectro de RMN¹H da substância 7 (400 MHz, MeOD)

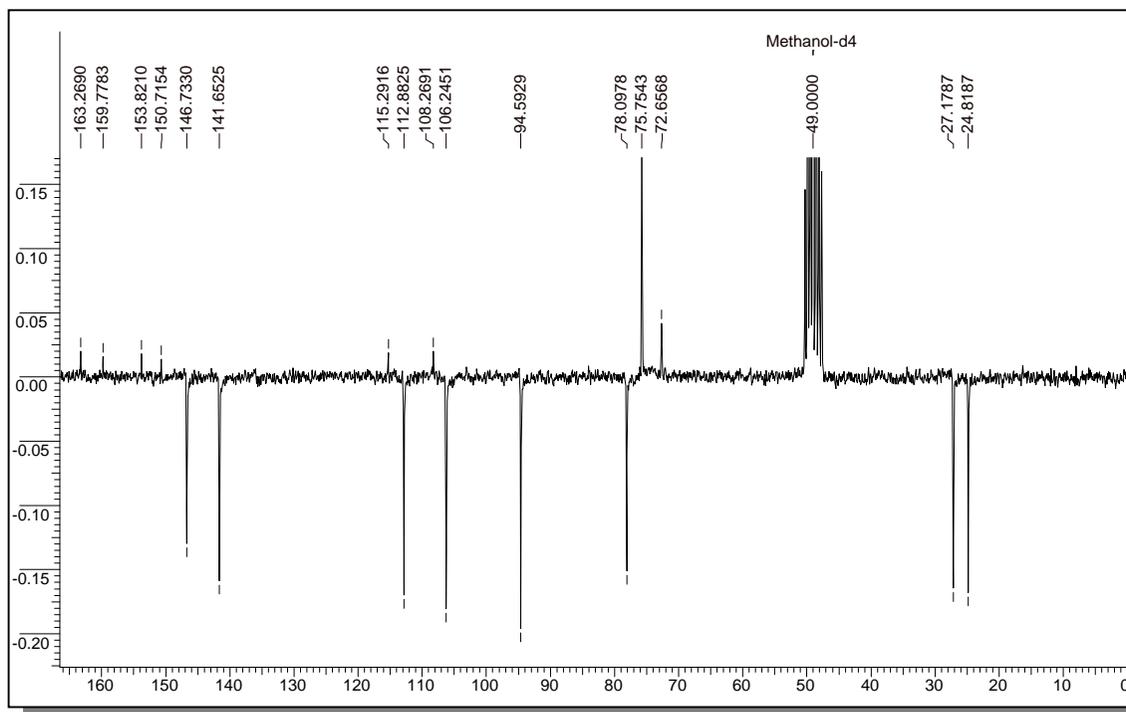


FIGURA 46- Espectro de Pendant da substância 7 (50 MHz, MeOD)

Para confirmar a estrutura proposta os experimento de HMBC e HSQC foram muito importante uma vez que foram observadas todas as correlações.

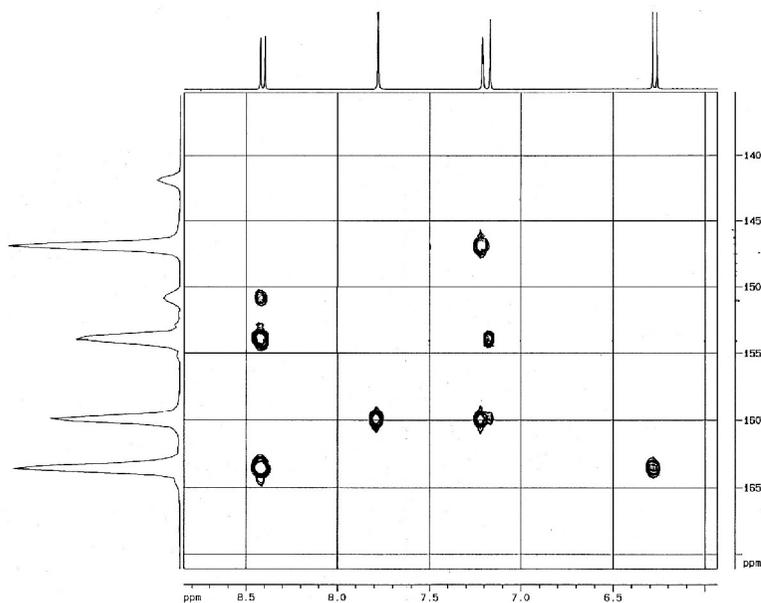


FIGURA 47 - Regiões ampliadas do gHMBC (400 MHz, MeOD)

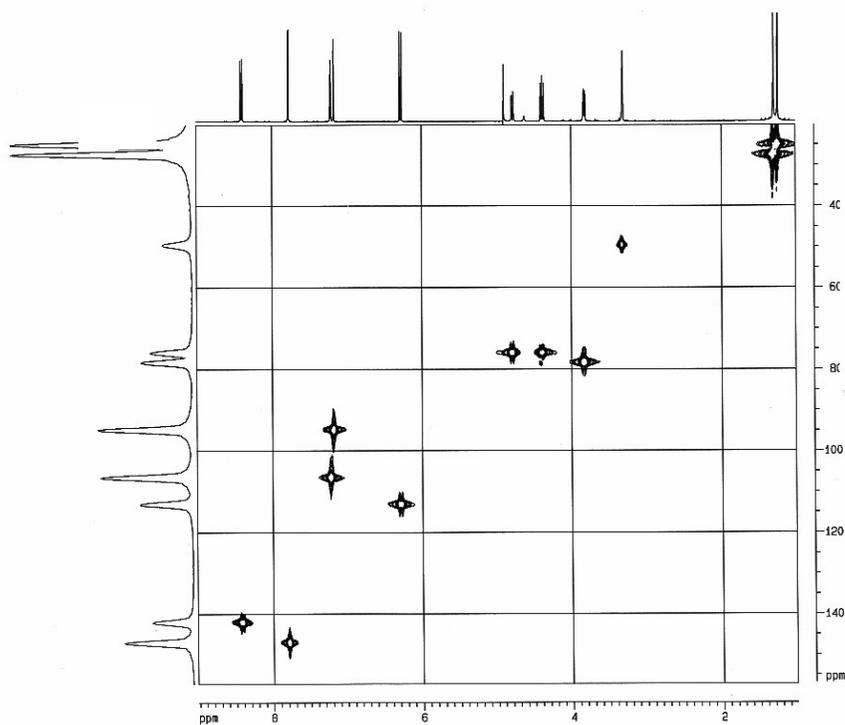
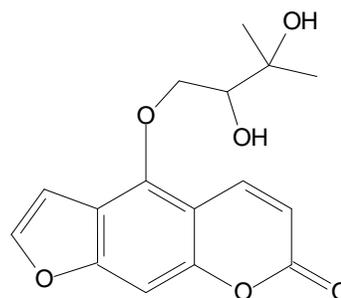


FIGURA 48 - Regiões ampliadas do gHSQC (400 MHz, MeOD)

Assim com base nos dados de ressonância e por comparação com os dados publicados por MURRAY et al., (1982) e MARSTON & HOSTETTMANN, (1995) foi possível propor uma estrutura para a substância **7** idêntica à estrutura da cumarina hidrato de Oxopeucedanina ou prangol.

Esta substância foi isolada de espécies de *Diplolophilum* (Umbeliferae) e, segundo MARSTON & HOSTETTMANN (1995), apresenta atividade antifúngica frente a *Cladosporium cucumerinum*, um conhecido fungo fitopatogênico e foi considerada inativa em ensaio com larvas de *Aedes aegypti*



Prangol (**7**)

TABELA 14- Dados de RMN¹H (400 MHz, MeOD) e RMN¹³C (50 MHz, MeOD) para a substância.

Posições	# δ_H	* δ_C
2	-	163,26
3	6,26 (1H, d, $J=9,8$ Hz)	112,88
4	8,34 (1H, d, $J=9,8$ Hz)	146,73
4a	-	106,24
5	-	141,65
6	-	115,29
7	-	159,77
8	7,14 (1H, s)	94,59
8a	-	153,82
2'	7,77 (1H, d, $J=2,4$ Hz)	150,71
3'	7,2 (1H, dd, $J=1,0$ e $2,4$ Hz)	108,26
2''	4,38 (1H, dd $J= 8,4$ e $9,8$ Hz)	75,75
3''	4,78 (1H, dd, $J= 2,4$ e $9,8$ Hz)	78,09
4''	3,82 (1H, dd $J= 2,4$ e $8,4$ Hz)	72,65
-Me (5'')	1,25 (s, 3H)	24,81
-Me (6'')	1,30 (s, 3H)	27,17

#Dados comparados com os publicados por HARKAR et al., (1984)

* Constante de acoplamento entre parênteses calculada em Hz

4.5.3- Alcalóides

4.5.3.1- ALCALÓIDES FUROQUINOLÍNICOS

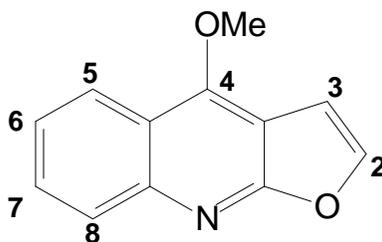
4.5.3.1.1- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA Dictamina (8)

A análise em CCD desta substância mostrou uma mancha com fluorescência azul quando submetida à luz UV e coloração laranja quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide.

O espectro de RMN¹H (figura 49, p. 96) apresentou dois sinais típicos dos hidrogênios H-2 e H-3 do núcleo furoquinolínico em δ 7,64 (1H, $J=2,8$ Hz) e δ 7,10 (1H, $J=2,8$ Hz); quatro sinais de hidrogênio aromáticos em δ 8,29 (1H, ddd, $J=8,5$; 1,2 e 0,6 Hz), δ 8,01 (1H, ddd, $J=8,5$, 1,2 e 0,6 Hz), δ 7,69 (1H, ddd, $J=8,4$, 6,8 e 1,5 Hz), δ 7,46 (1H, ddd, $J=8,4$; 6,8 e 1,5 Hz) e um sinal em δ 4,45 (3H, s) referente a um grupo metoxila na posição 4.

O espectro de carbono (figura 50, p. 96) confirma a presença da metoxila pelo sinal em δ 56,54 e pela intensidade dos sinais concluiu-se que os outros sinais eram referentes a 6 carbonos metínicos e 5 carbonos quaternários.

O espectro de massas (figura 51, p. 97) apresentou o pico do íon molecular com m/z 199 daltons, indicando a presença de um nitrogênio na molécula. Com os dados foi possível sugerir a estrutura da Dictamina que é um alcalóide furoquinolínico comum em plantas da família Rutaceae (MESTER, 1983).



Dictamina (8)

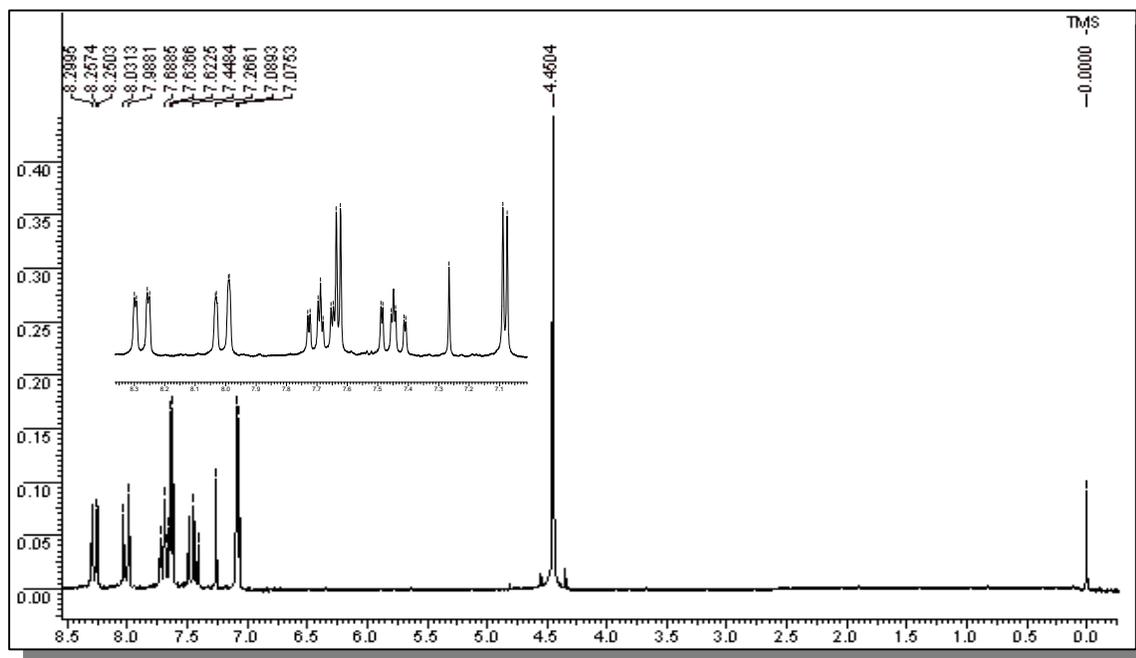


FIGURA 49 - Espectro de RMN¹H da substância **8** (200 MHz, CDCl₂)

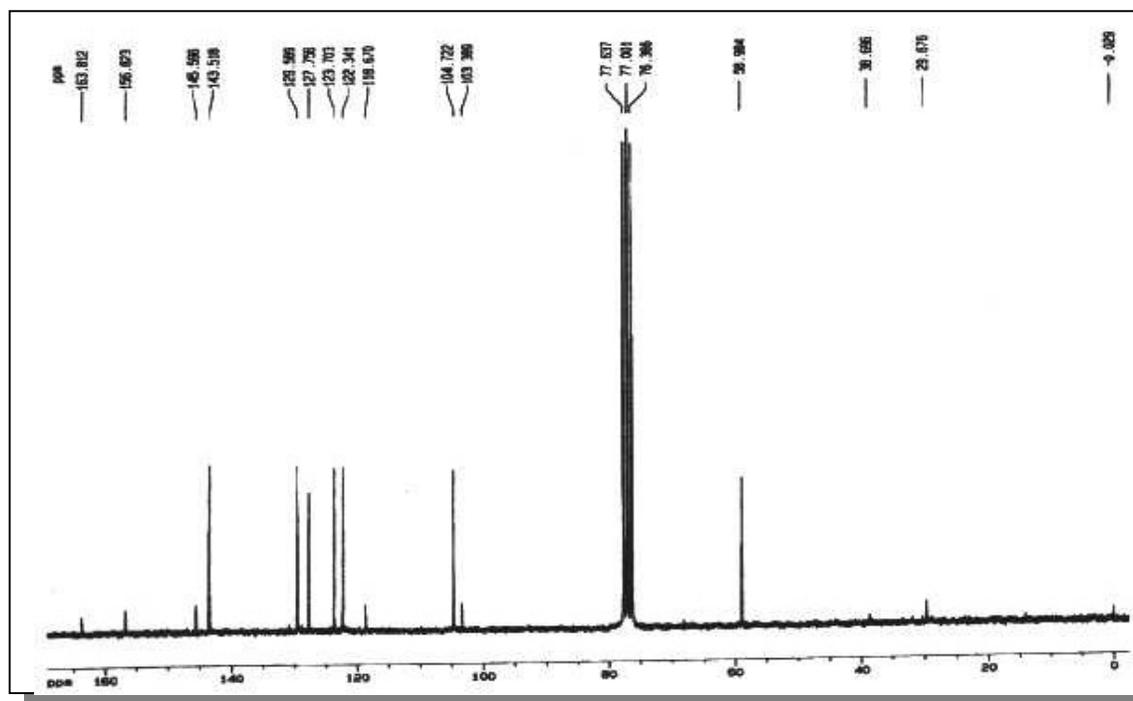


FIGURA 50 - Espectro de RMN¹³C da substância **8** (50 MHz, CDCl₃)

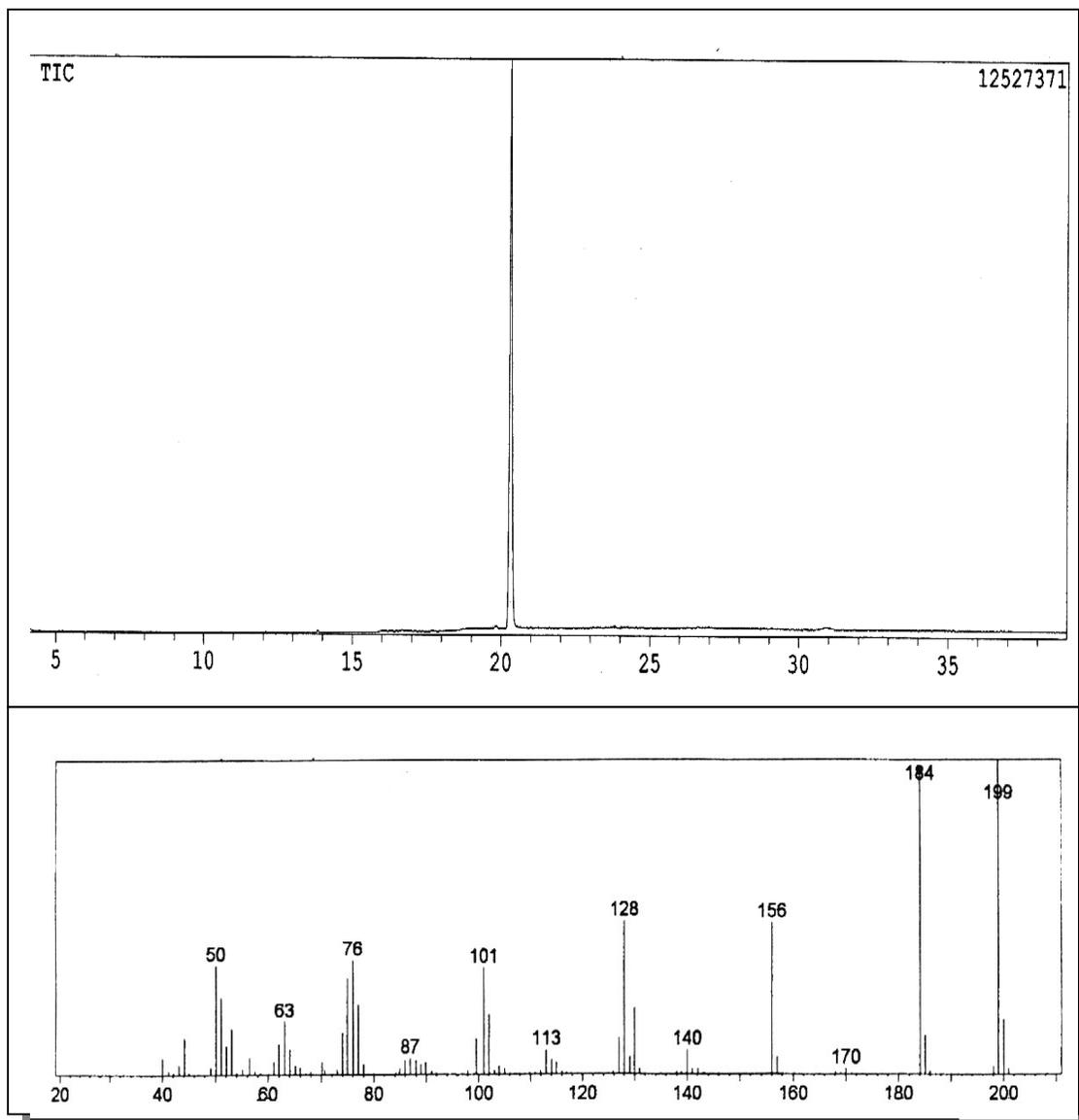


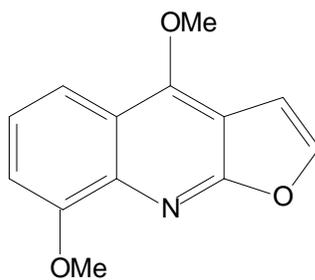
FIGURA 51 - Cromatograma e espectro de massas da substância **8** (IE -70eV)

4.5.3.1.2- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA γ -Fagarina (9)

O espectro de RMN¹H da substância **9** (figura 52, p. 99) apresentou sinais em três sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,85 (1H, dd, $J=8,5$ e $1,0$ Hz) em δ 7,36 (1H, dd, $J=8,5$ e $7,8$ Hz) e em δ 7,06 (1H, d, $J=7,8$ Hz). Além destes, foram ainda observados sinais em δ 4,45 (3H,s) e δ 4,08 (3H,s) referentes a duas metoxilas, sendo que a primeira ligada ao C-4 característica de alcalóides furoquinolínicos.

O espectro de RMN¹³C (figura 53, p. 99) apresenta 13 sinais, sendo os sinais em 55,93 e 58,97 confirmam a presença de duas metoxilas na molécula, além de seis sinais de carbonos quaternários (δ 163,20; 156,85; 154,58; 137,54; 119,66 e 103,88) e cinco de carbonos metínicos (δ 143,87; 123,39; 114,06; 107,71; 104,48 e 104,48).

Estes dados foram comparados com os alcalóides furoquinolínicos com duas metoxilas e foram compatíveis com os dados publicados para a γ -Fagarina (NARASIMHAN & MALI, 1974; ULUBELEN, 1984).



γ -Fagarina (9)

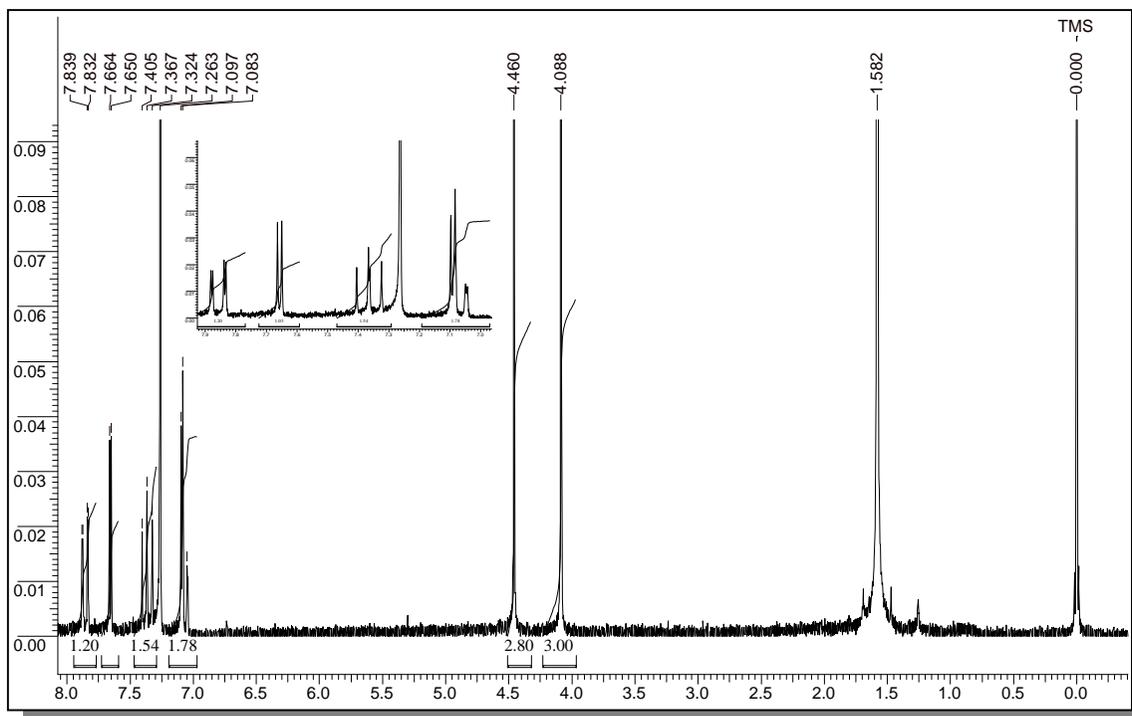


FIGURA 52- Espectro de RMN¹H da substância **9** (200 MHz, CDCl₃)

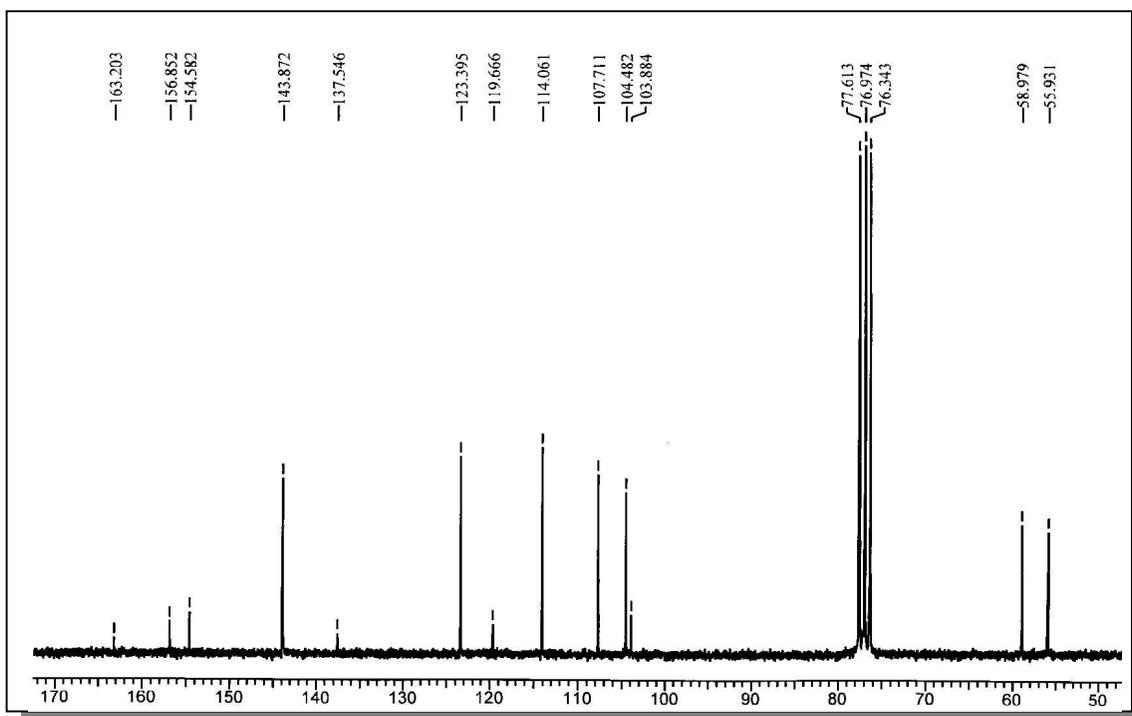


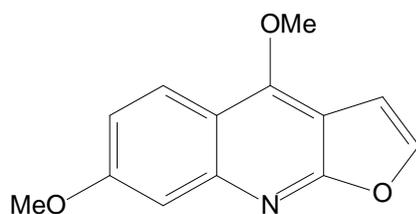
FIGURA 53 - Espectro de RMN¹³C da substância **9** (50 MHz, CDCl₃)

4.5.3.1.3 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA Evolitrina (10)

O espectro de RMN¹H da substância **10** (figura 54, p. 101) apresentou sinais em δ 7,6 (1H, d, $J=2,4$ Hz) e δ 7,2 (1H, d, $J=2,4$ Hz) característicos de hidrogênios furânico H-2 e H-3 e sinais em δ 7,8 (1H, d, $J=9,2$ Hz), δ 7,4 (1H, dd, $J= 9,2$ e $2,4$ Hz). Além destes, foram ainda observados sinais em δ 4,43 (3H, s) e δ 3,93 (3H, s) referentes a duas metoxilas, sendo que a primeira ligada ao C-4 característica de alcalóides furoquinolínicos.

O espectro de RMN¹³C (figura 55, p. 101) apresenta 13 sinais, sendo os sinais em 55,49 e 61,35 confirmam a presença de duas metoxilas na molécula, além de seis sinais de carbonos quaternários (δ 164,36; 158,79; 154,19; 149,19; 112,72 e 102,72) e cinco de carbonos metínicos (δ 142,19; 124,19; 117,96; 106,52 e 104,58).

Estes dados foram comparados com os alcalóides furoquinolínicos com duas metoxilas e foram compatíveis com os dados publicados para a Evolitrina (PUSSET et al., 1991).



Evolitrina (**10**)

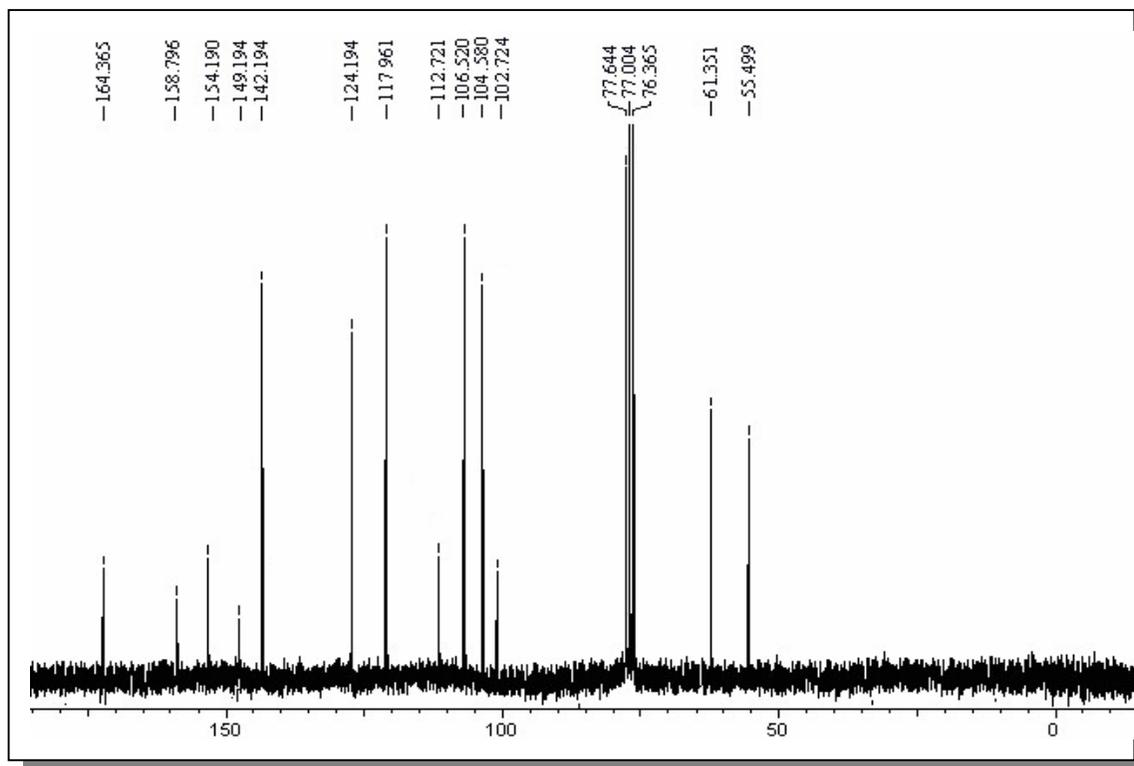


FIGURA 55- Espectro de RMN¹³C da substância **10** (50 MHz, CDCl₃)

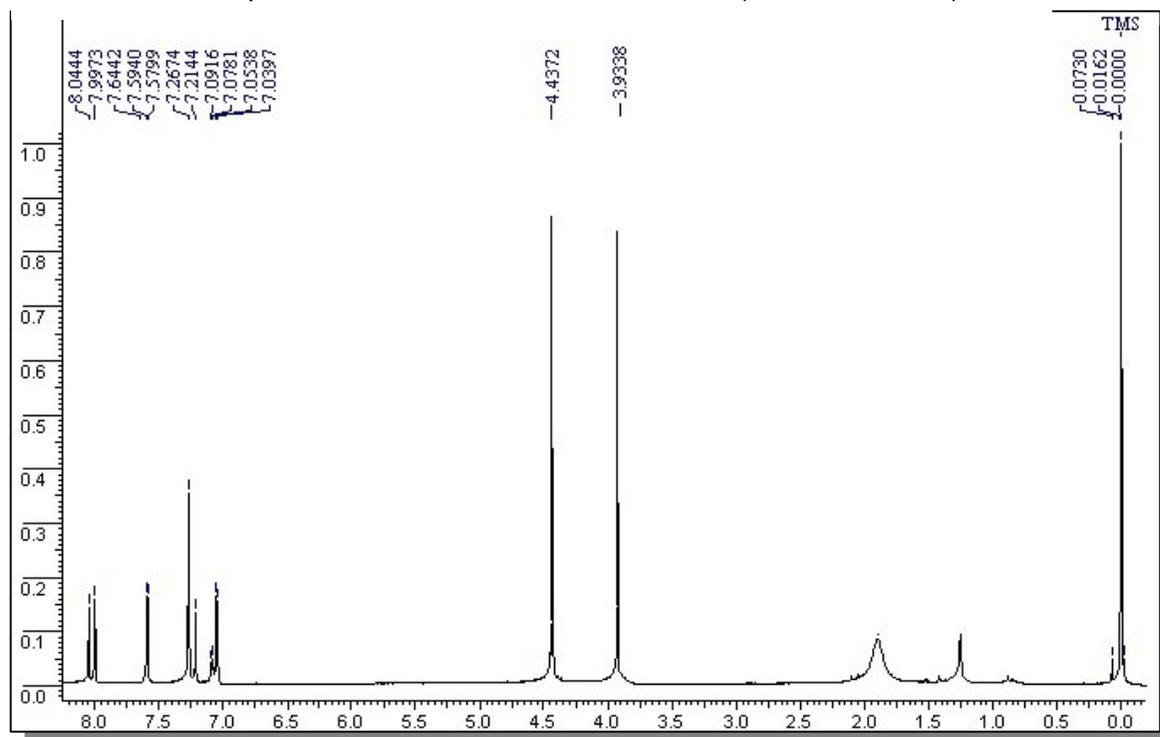


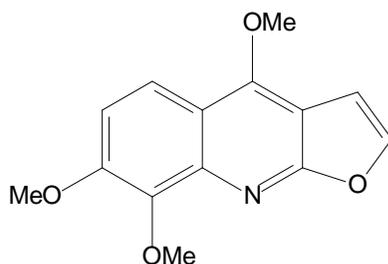
FIGURA 54 - Espectro de RMN¹H da substância **10** (200 MHz, CDCl₃)

4.5.3.1.4 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA Esquimianina (11)

O espectro de RMN¹H da substância **11** (figura 56, p. 103) mostra três singletos à δ 4,40 (3H, s), 4,11 (3H, s) e 4,02 (3H, s) atribuídos a três grupos metoxilas aromático. Na região de hidrogênios aromáticos podem-se observar sinais para quatro hidrogênios: os sinais em δ 7,97 (1H, d, $J=9,2$ Hz), δ 7,01 (1H, d, $J=9,2$ Hz) e δ 7,33 (1H, d, $J=2,4$ Hz) e δ 7,97 (1H, d, $J=2,7$ Hz) característicos de hidrogênios H-2' e H-3' de um núcleo furanoquinolínico. A análise das constantes de acoplamento dos hidrogênios aromáticos mostra a presença de anel benzênico dissubstituído em posição orto.

O espectro de RMN¹³C (figura 57, p. 103) apresenta 14 sinais, sendo os sinais em 56,81, 58,95 e 61,62 confirmam a presença de três metoxilas na molécula, além de sete sinais de carbonos quaternários (δ 164,33; 157,15; 152,12; 142,06; 141,49; 114,89 e 102,00) e quatro de carbonos metínicos (δ 142,97; 118,10; 112,12 e 104,58).

Todos estes dados levam a identificação da substância **11** como o alcalóide furoquinolínico esquimianina, sendo este amplamente distribuído na família Rutaceae (ULUBELEN, 1985; AHOND et al., 1978)



Esquiminina
(11)

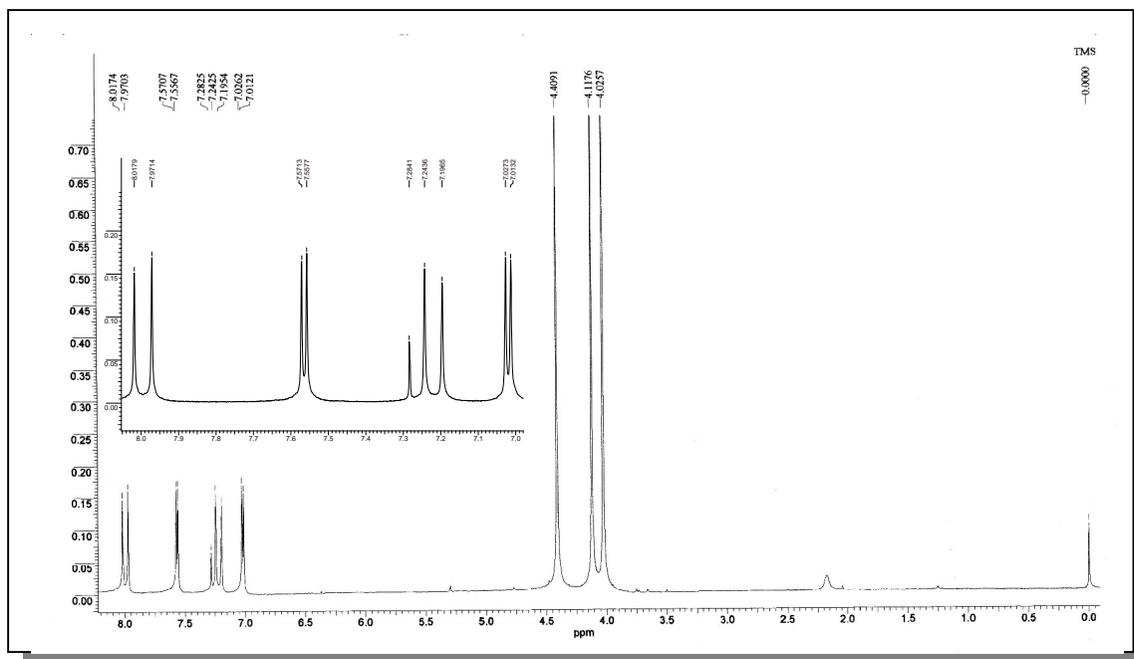


FIGURA 56 - Espectro de RMN¹H da substância **11** (200 MHz, *CDCl*₃)

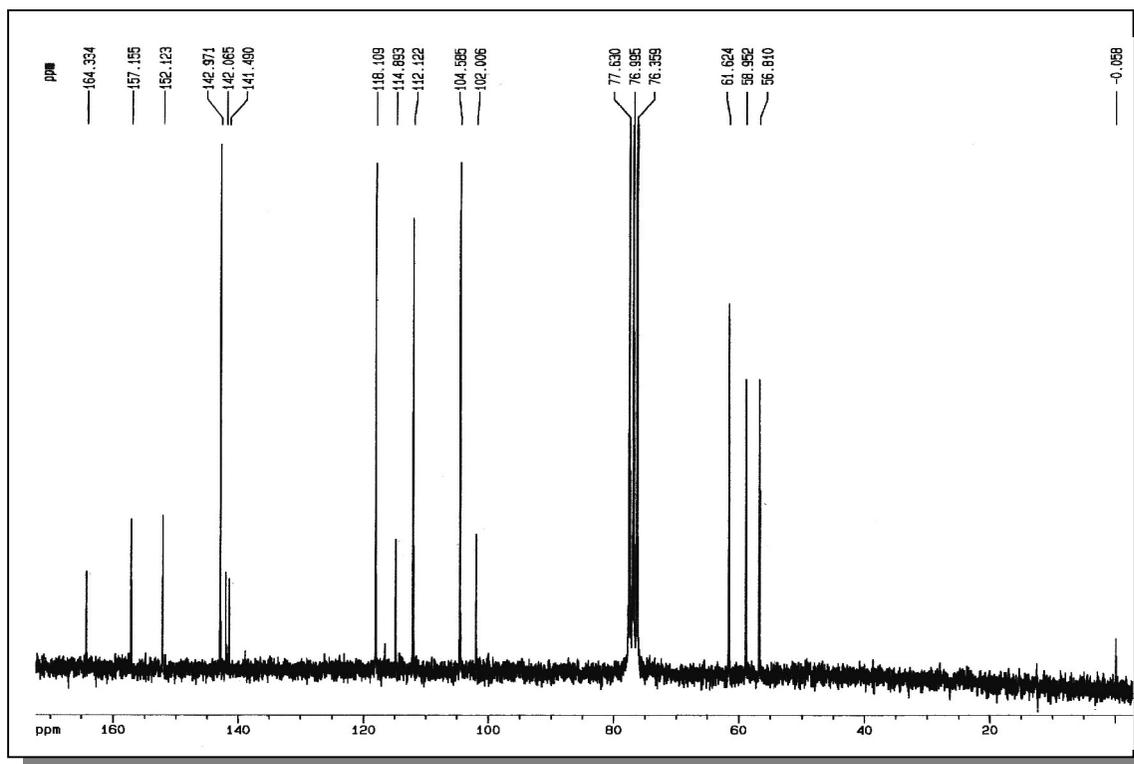


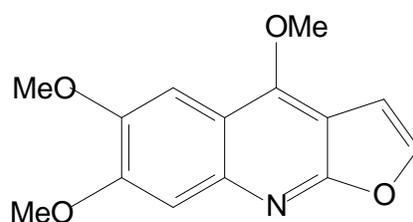
FIGURA 57 - Espectro de RMN¹³C da substância **11** (50 MHz, *CDCl*₃)

4.5.3.1.5 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA Kokusaginina (12)

O espectro de RMN¹H de **12** (figura 58, p. 105) mostra um singlete em δ 4,44 (3H, s), e um singlete a δ 4,03 (3H, s) que integra para três hidrogênios cada e foi atribuído a dois grupos metoxilas aromático. Na região de hidrogênios aromáticos podem-se observar sinais para quatro hidrogênios: os sinais em δ 7,49 (1H, s), δ 7,34 (1H, d, $J=2,7$ Hz), δ 7,58 (1H, d, $J=2,7$ Hz) e δ 7,05 (1H, d, $J=2,7$ Hz) sendo estes dois últimos característicos dos hidrogênios H-2' e H-3' de um núcleo furanoquinolínico.

O espectro de RMN¹³C (figura 59, p. 105) apresenta 14 sinais, sendo que os sinais em δ 55,60; 55,50 e 62,35 confirmam a presença de três metoxilas na molécula, além de sete sinais de carbonos quaternários (δ 164,44; 156,79; 151,19; 152,10; 141,14; 114,52 e 102,92) e quatro de carbonos metínicos (δ 142,55; 105,92; 104,72 e 104,92).

Os dados foram comparados com a literatura (MESTER, 1983; ULUBELEN, 1984) e foram compatíveis. Assim a substância **12** foi identificada como sendo o alcalóide furoquinolínico kokusaginina.



Kokusaginina
(12)

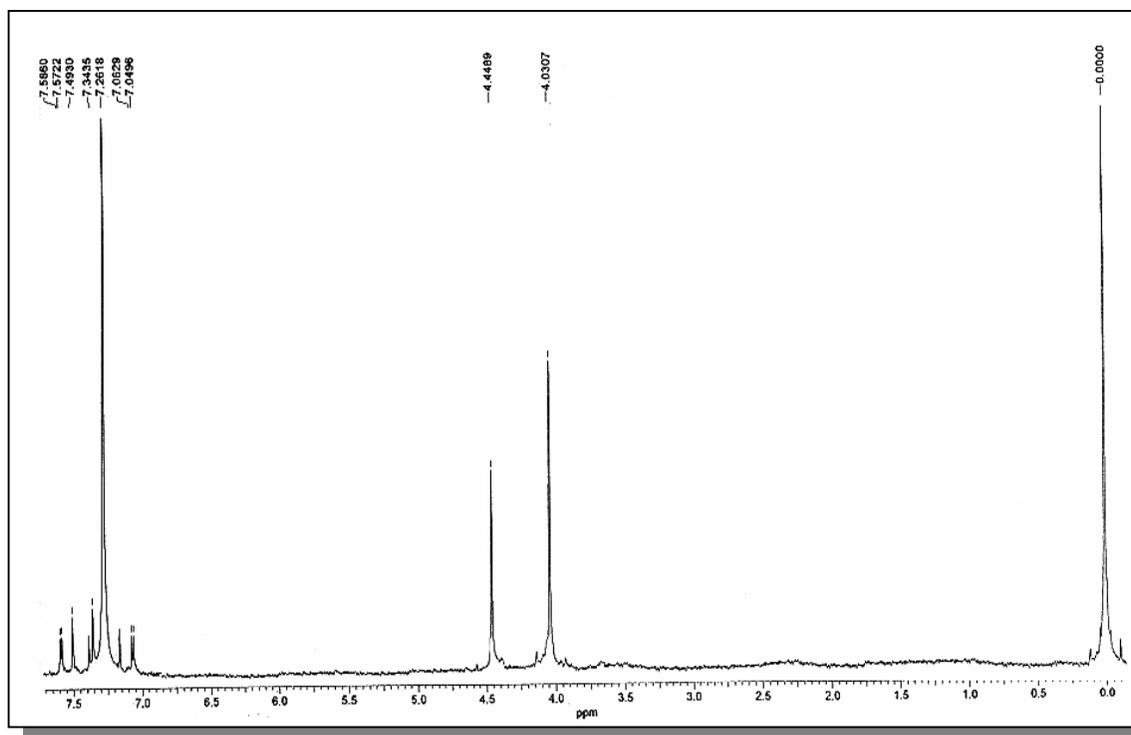


FIGURA 58 - Espectro de RMN¹H da substância **12** (200 MHz, CDCl₃)

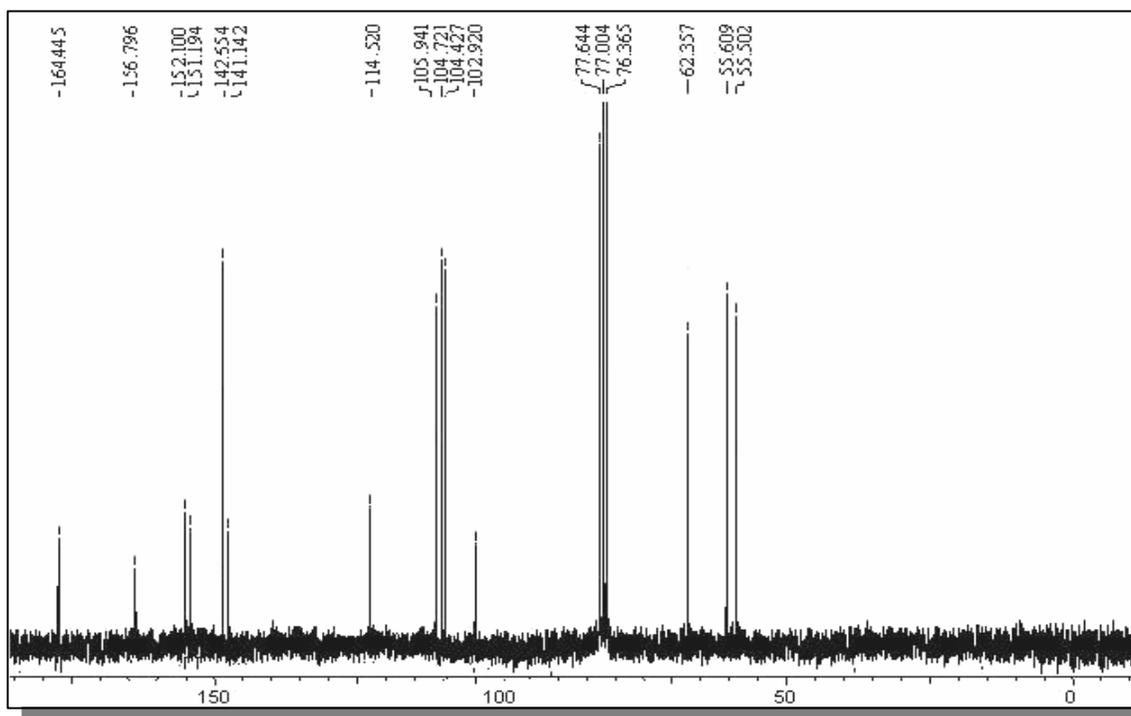


FIGURA 59 - Espectro de RMN¹³C da substância **12** (50 MHz, CDCl₃)

TABELA 15 - Dados de RMN¹H para os alcalóides **8** a **12** (CDCl₃, 200 MHz)

	8	9
2'	7,65 (1H, d, J=2,0 Hz)	7,05 (1H, d, J= 2,5 Hz)
3'	7,11 (1H, d, J=2,0 Hz)	7,56 (1H, d, J= 2,5 Hz)
5	8,29 (1H, d, J=8,0 Hz)	7,89 (1H, dd, J= 7,0 e 2,0 Hz)
6	7,48 (1H, ddd, J=8,0; 8,0 e 2,0 Hz)	-
7	7,71 (1H, ddd, J=8,0; 8,0 e 2,0 Hz)	7,18 (1H, dd, J= 7,0 e 2,0 Hz)
8	8,08 (1H, d, J=8,0 Hz)	7,48 (1H, dt, J= 7,0 e 2,0 Hz)
4-OCH₃	4,48 (s)	4,42 (3H,s)
6-OCH₃	-	4,15 (3H,s)
7-OCH₃	-	-

	10	11	12
2'	7,64 (1H, d, 2,8 Hz)	7,56 (1H, d, J=2,7 Hz)	7,53 (1H, d, J=2,5 Hz)
3'	7,08 (1H, d, 2,8 Hz)	7,02 (1H, d, J=2,7 Hz)	6,91 (1H, d, J=2,5 Hz)
5	7,85 (1H, dd, J=8,5 e 1,0 Hz)	7,99 (1H, d, J= 9,3 Hz)	7,35 (1H,s)
6	7,36 (1H, dd, J=8,5 e 7,8 Hz)	7,21 (1H, d, J=9,3 Hz)	-
7	7,06 (1H, d, J=7,8 Hz)	-	-
8	-	-	7,23 (1H, s)
4-OCH₃	4,44 (3H, s)	4,40 (3H,s)	3,93 (3H,s)
6-OCH₃	-	-	3,93 (3H,s)
7-OCH₃	4,08 (3H, s)	4,02 (3H,s)	4,04 (3H,s)
8-OCH₃	-	4,11(3H,s)	-

Tabela 16 - Dados de RMN ^{13}C para as substâncias 8 a 12 (CDCl_3 , 50 MHz)

Carbonos	8	9	10	11	12
2	143,58	143,87	142,19	142,97	142,55
3	104,72	104,48	104,58	104, 58	104,42
3a	103,39	103,88	102,72	102,00	102,92
4	156,02	154,58	154,19	157,15	152,10
4a	118,67	119,66	112,72	114,89	114,52
5	122,34	114,06	124,19	118,10	105,92
6	123,70	123,39	117,96	112,12	151,19
7	129,56	107,71	158,79	152,12	156,79
8	127,73	156,85	106,52	141,49	104,72
8a	146,56	137,54	149,19	142,97	141,14
1a	163,81	163,20	164,36	164,33	164,44
4-OMe	58,54	58,97	61,35	61,62	63,35
6-OMe	-	-	-	-	55,60
7-OMe	-	-	55,49	56,81	56,50
8-OMe	-	55,93	-	58,95	-

4.5.3.2 - ALCALÓIDE 2-QUINOLÔNICO

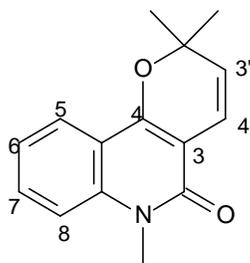
4.5.3.2.1 - identificação estrutural da *N*-Metilflindersina (13)

Na análise de CCD desta substância foi observada fluorescência azul quando revelada sob luz UV e coloração alaranjada quando revelada com reagente de Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide.

O espectro de RMN¹H (figura 60, p. 109, tabela 17, p. 110) apresenta dois dubletos a δ 5,54 (1H, d, $J= 10$ Hz) e 6,67 (1H, d, $J= 10$ Hz) referentes a dois prótons vinílicos em *cis* que associados ao singlete a δ 1,54 (6H, s) caracterizam a presença de um anel 2,2-dimetilcromeno. Neste espectro ainda é observada a presença de um multiplete na região referente a quatro prótons benzílicos: δ 7,30 (1H, dl, $J= 8,5$ Hz), δ 7,22 (1H, t, $J= 7,8$ Hz), δ 7,54 (1H, ddd, $J= 8,1, 7,2$ e $1,3$ Hz), δ 7,96 (1H, dd, $J= 8,1$ e $1,5$ Hz) e um singlete em δ 3,70 (3H, s) que foi atribuído à presença de uma *N*-metila na molécula.

O espectro de RMN¹³C (figura 61, p. 109; tabela 17, p. 110) apresenta 14 sinais de carbonos, sendo um em δ 165,89 atribuído à presença de uma carbonila, em δ 31,08 atribuído a uma *N*-metila e um sinal em δ 28,98 atribuído a presença de duas metilas.

Os dados obtidos foram comparados com a literatura SUAREZ et al., (1998) e foram compatíveis. Assim a substância 13 foi identificada como sendo o alcalóide *N*-Metilflindersina, que havia sido anteriormente isolado do extrato do caule de *A. fusciflorus* por VIEIRA, (1978).



Estrutura do alcalóide *N*-Metilflindersina

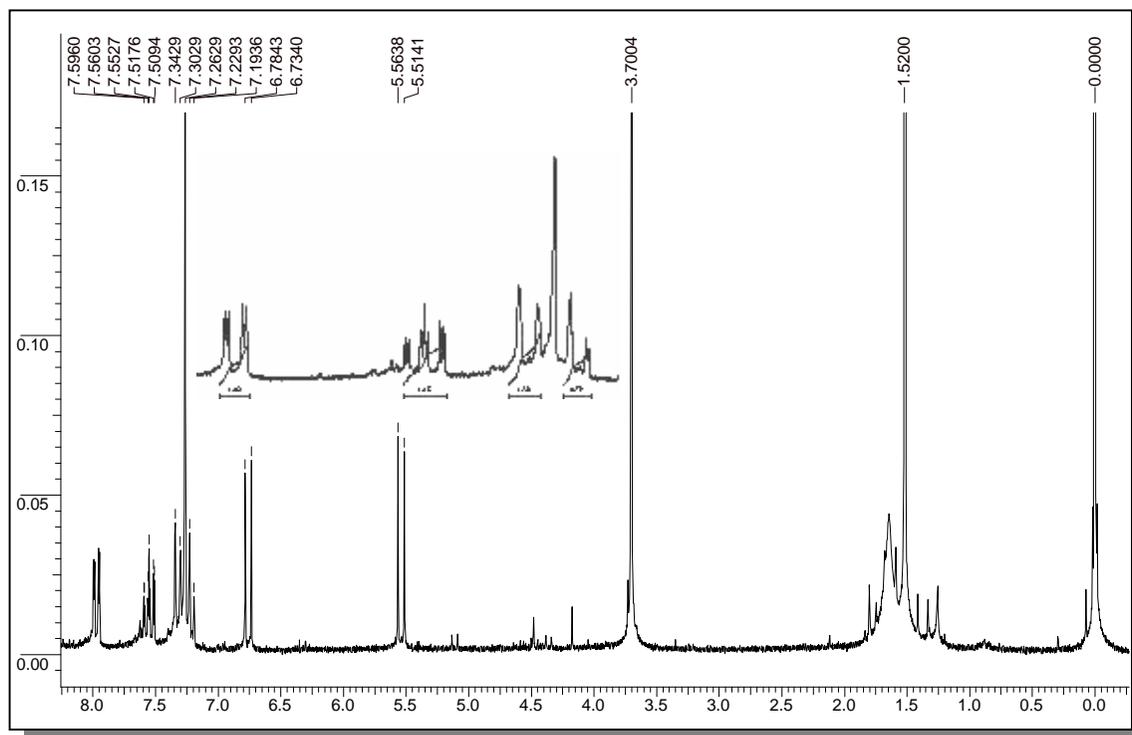


FIGURA 60 - Espectro de RMN¹H da substância **13** (200 MHz, CDCl₃)

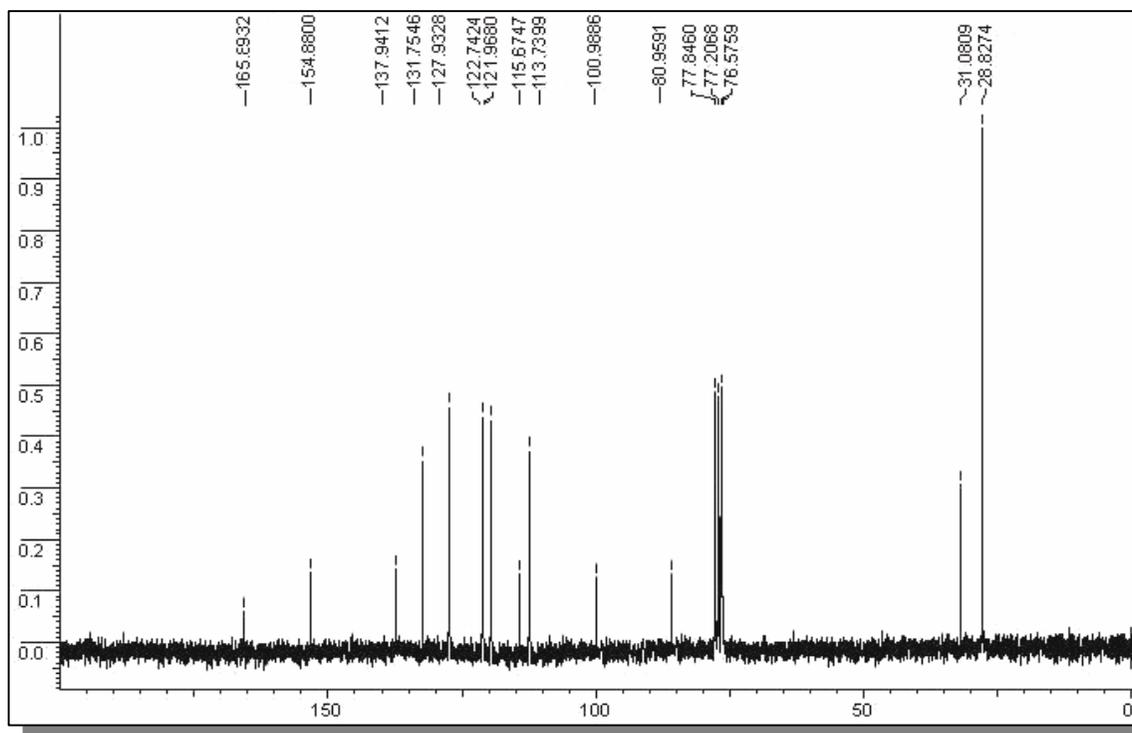


FIGURA 61 - Espectro de RMN¹³C da substância **13** (50 MHz, CDCl₃)

TABELA 17 - Dados de RMN¹H (CDCl₃, 200 MHz) e RMN¹³C (CDCl₃, 50 MHz) para a substância 13

POSIÇÕES	δ_H	δ_C
2'	-	80,95
3'	6,67 (1H, d, $J= 10$ Hz)	131,75
4'	5,54 (1H, d, $J= 10$ Hz)	127,93
2	-	165,89
3	-	100,98
4	-	154,88
4a	-	115,67
5	7,30 (1H, dl, $J= 8,5$ Hz)	122,74
6	7,22 (1H, t, $J= 7,8$ Hz)	121,96
7	7,54 (1H, ddd, $J= 8,1, 7,2$ e	131,75
8	7,96 (1H, dd, $J= 8,1$ e 1,5 Hz)	113,73
8a	-	137,94
N-Me	3,70 (s)	31,08
2 -CH ₃	1,52 (s)	28,82

4.5.4 - TRITERPENOS

4.5.4.1 - TRITERPENOS CICLOARTANO

4.5.4.1.1 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 14

No espectro de RMN¹H (figura 62) foram observados sinais referentes a seis metilas na região blindada do espectro, sendo duas como dubleto centrados em δ 0,87 (3H, $J= 4,0$ Hz) e δ 0,89 (3H, $J= 4,0$ Hz) e dois dubletos atribuídos a H-19a e H-19b em δ 0,33 (1H, d, $J=4,0$ Hz) e δ 0,55 (1H, d, $J=4,0$ Hz), respectivamente. Estes deslocamentos indicam a presença de um grupo hidroxílico ligado ao C-3. Foram observados ainda dois sinais: um a δ 4,88 (1H, d, $J= 1,6$ Hz) e outro centrado em δ 4,82 (1H, sl) atribuídos aos prótons do metileno terminal ligado a C-24. Dois dubletos sendo um em δ 3,50 (1H, d, $J=2,0$ Hz) em outro em δ 3,52 (1H, d, $J=1,2$ Hz). Um duplo dubleto em δ 3,28 (1H, dd, $J=10,0$ e 4,7 Hz) e um multipletto em 2,36 (m). Estes dados sugerem um triterpeno com esqueleto do tipo cicloartano-3-ol.

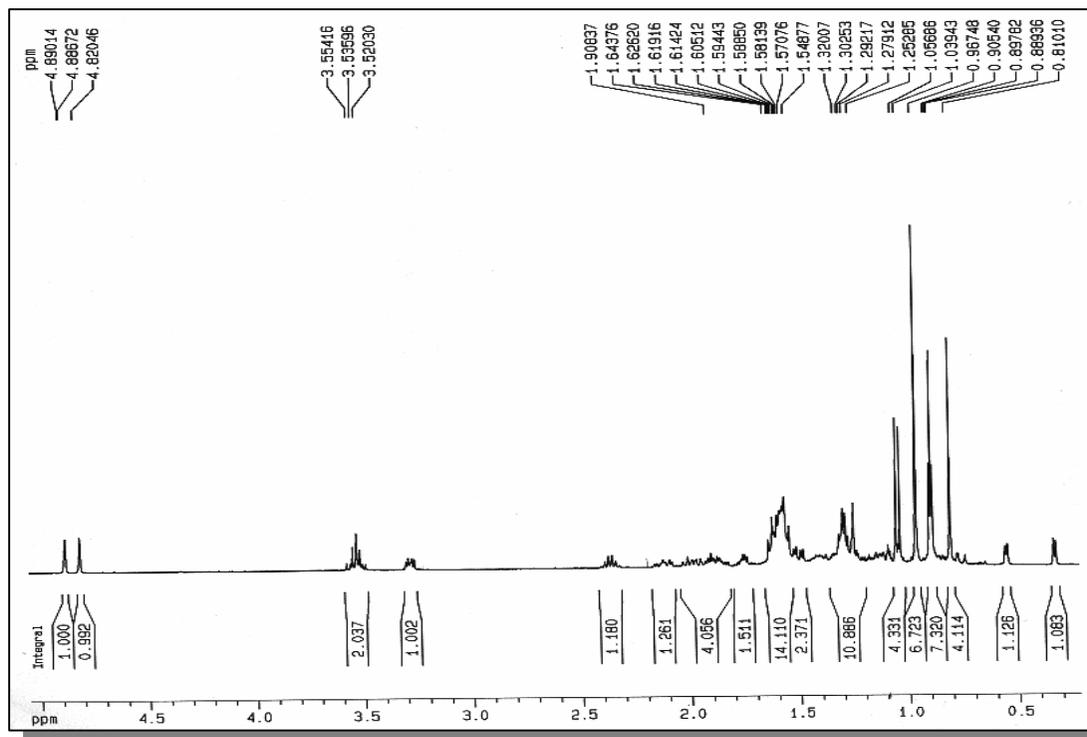


FIGURA 62- Espectro de RMN¹H da substância **14** (CDCl₃, 400 MHz)

No espectro de RMN¹³C (Figura 63) observam-se sinais referentes a 31 carbonos o que sugere um composto triterpênico alifático, além de confirmar a presença de carbono carbinólico em δ 78,81 e um sinal em δ 65,86 que foi atribuído ao carbono 26 que é um carbono metilênico ligado a um grupo hidroxila terminal.

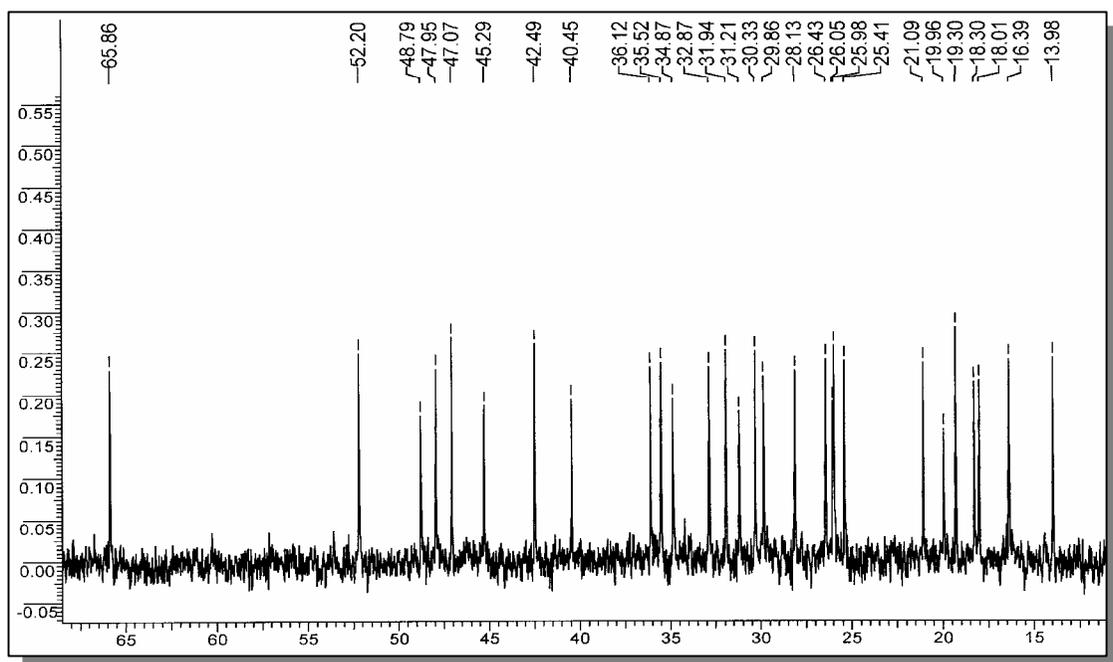
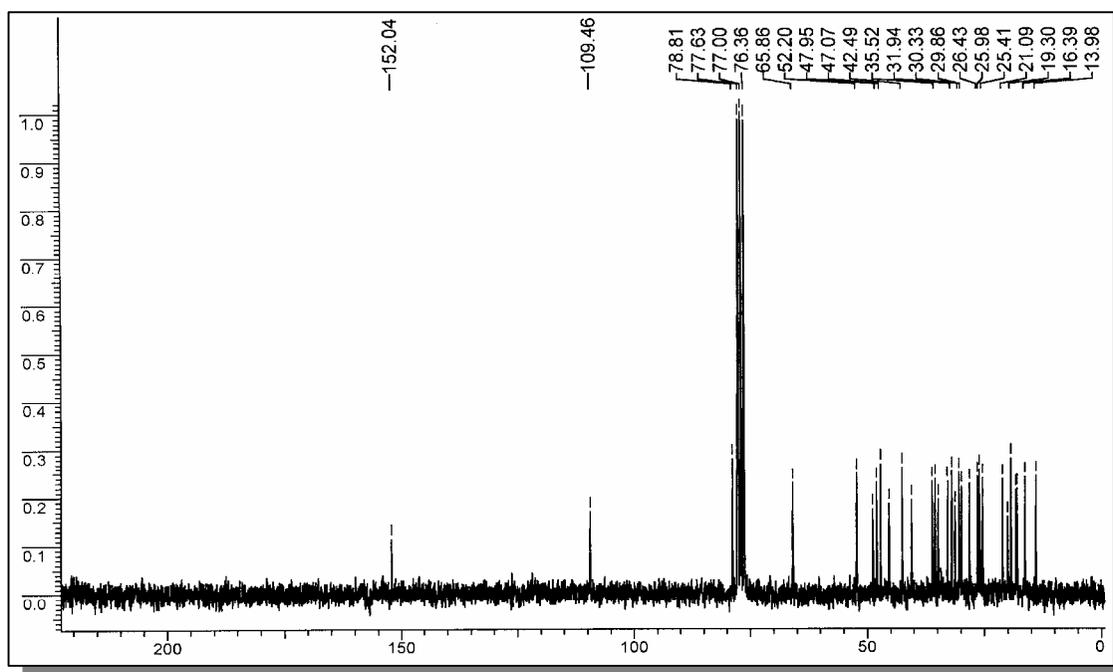


FIGURA 63 - Espectro de RMN¹³C da substância 14 (CDCl₃, 50 MHz)

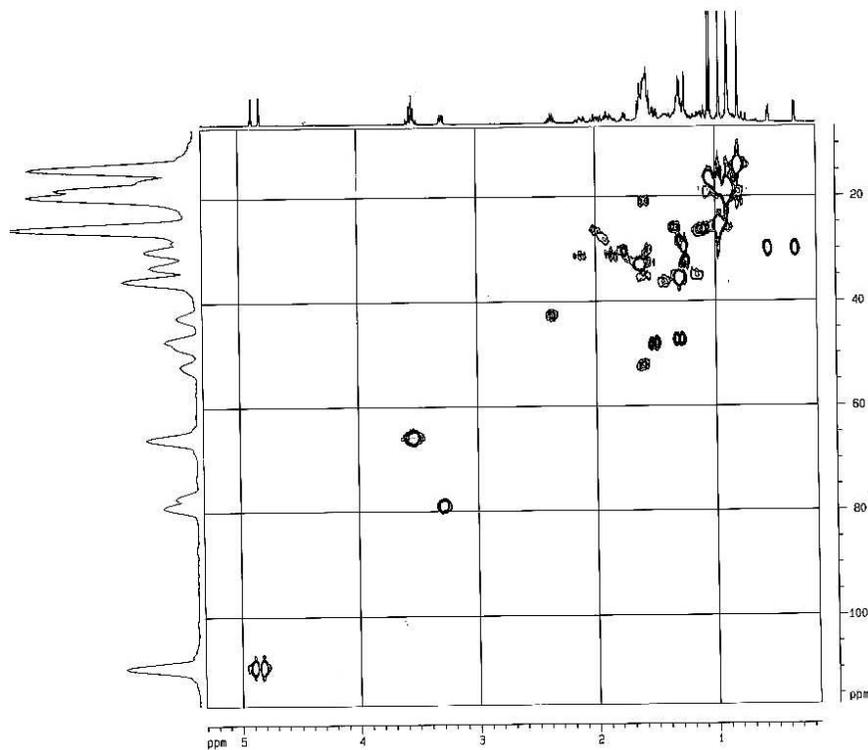


FIGURA 64- Mapa de contorno de HSQC da substância 14 (CDCl₃, 400 MHz)

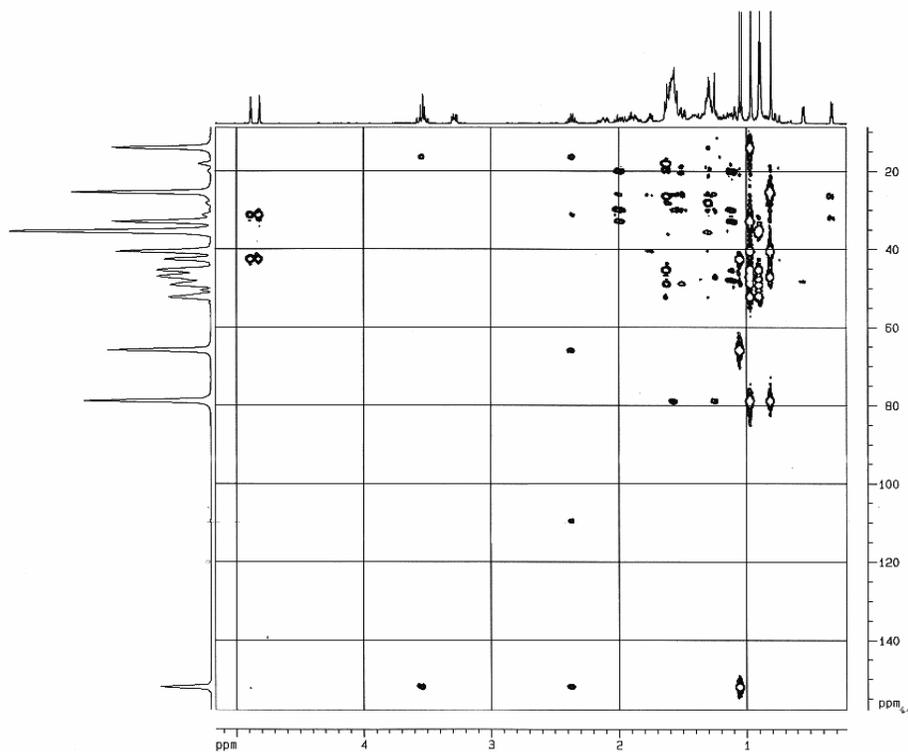


FIGURA 65 - Mapa de contorno de HMBC da substância 14 (CDCl₃, 400 MHz)

A análise das correlações obtidas no experimento de HMBC (Figura 65, p. 116) possibilitou observar a atribuição dos carbonos da cadeia lateral já que o H-31 acopla com os carbonos 22 e 23. O posicionamento da hidroxila foi confirmado através do acoplamento do H-26 com a Me-27.

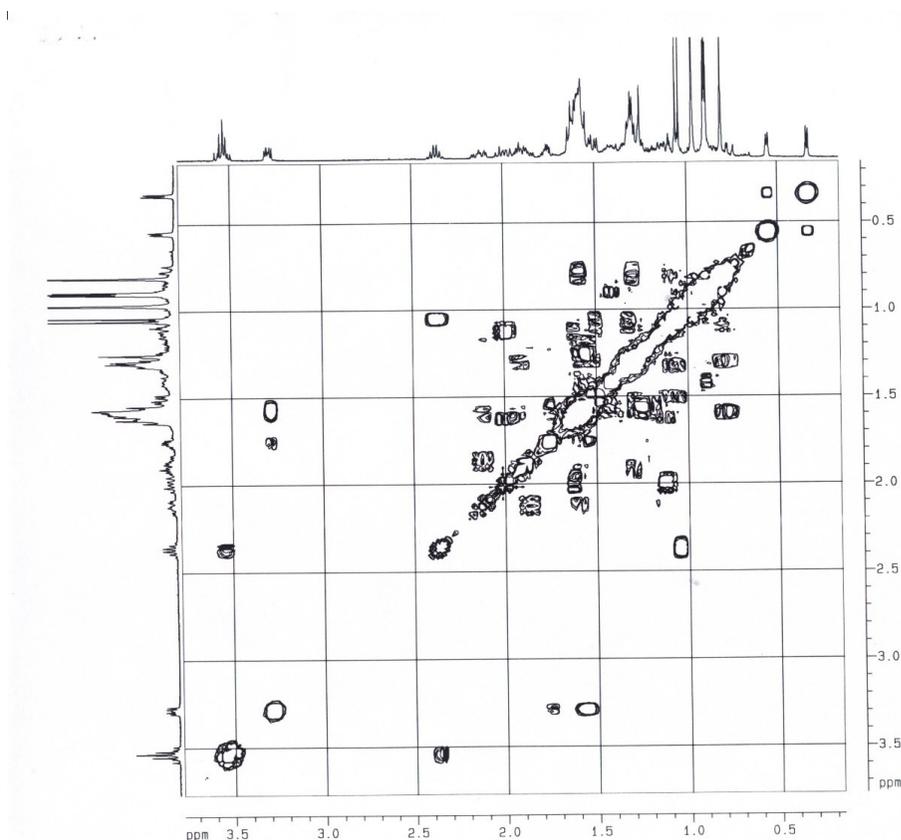
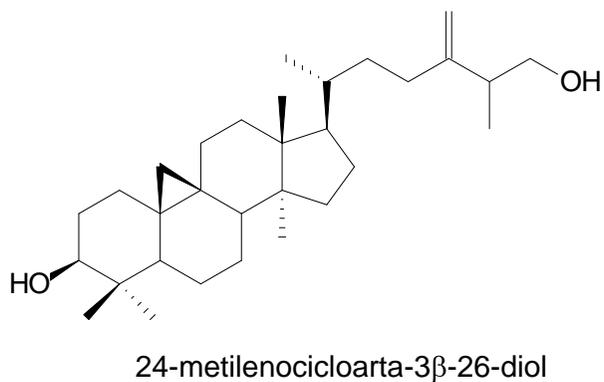


FIGURA 66 - Mapa de contorno de gCOSY da substância **14** (400 MHz, CDCl₃)

Os dados obtidos foram comparados os dados publicados por PUPO et al., (1996) e assim foi possível propor para **14** a estrutura do 24-metilenocicloarta-3 β ,26-diol que é pela primeira vez descrito, já que a substância isolada por PUPO et al., (1996) de *Trichilia clausenii* foi um derivado como um grupo acetona na posição 3.



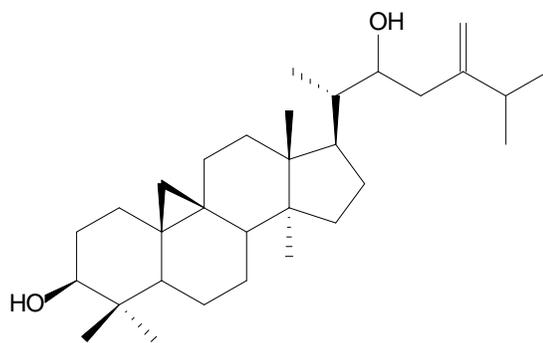
4.5.4.1.2 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 15

O esqueleto carbônico foi definido como cicloartano após análise do espectro de RMN¹H (Figura 67, p. 119) onde se observam dois dubletos em δ 0,33 (1H, $J=$ 4,0 Hz) e em δ 0,56 (1H, $J=$ 4,0 Hz) atribuídos aos hidrogênios metilênicos ligados ao carbono 19. E os deslocamentos destes sinais sugerem um triterpeno com esqueleto do tipo cicloartano-3-ol.

Foram observados ainda dois sinais: um a δ 4,93 (1H, s) e outro centrado em e δ 4,83 (1H, s) atribuídos aos prótons do metileno terminal ligado ao C-24. Neste mesmo espectro foi ainda notada a presença de um sinal em δ 3,75 (1H, dt, $J=$ 4,0 e 10,0 Hz) que foi atribuído à hidroxila na posição 22.

No espectro de RMN¹³C (Figura 68, p. 119) observam-se sinais referentes a 31 carbonos o que sugere um composto triterpênico alifático e os sinais em δ 78,85 e 69,86 confirmam a presença de duas hidroxilas na molécula.

Os dados obtidos foram comparados com a literatura e assim por foi possível propor para a substância 15 a estrutura do 24-metileno-cicloartano-3 β ,22-diol, que foi pela primeira vez isolado por LAGO & ROQUE, (2002) de *Guarea macrophylla*.



24-metileno-cicloartano-3 β ,22-diol

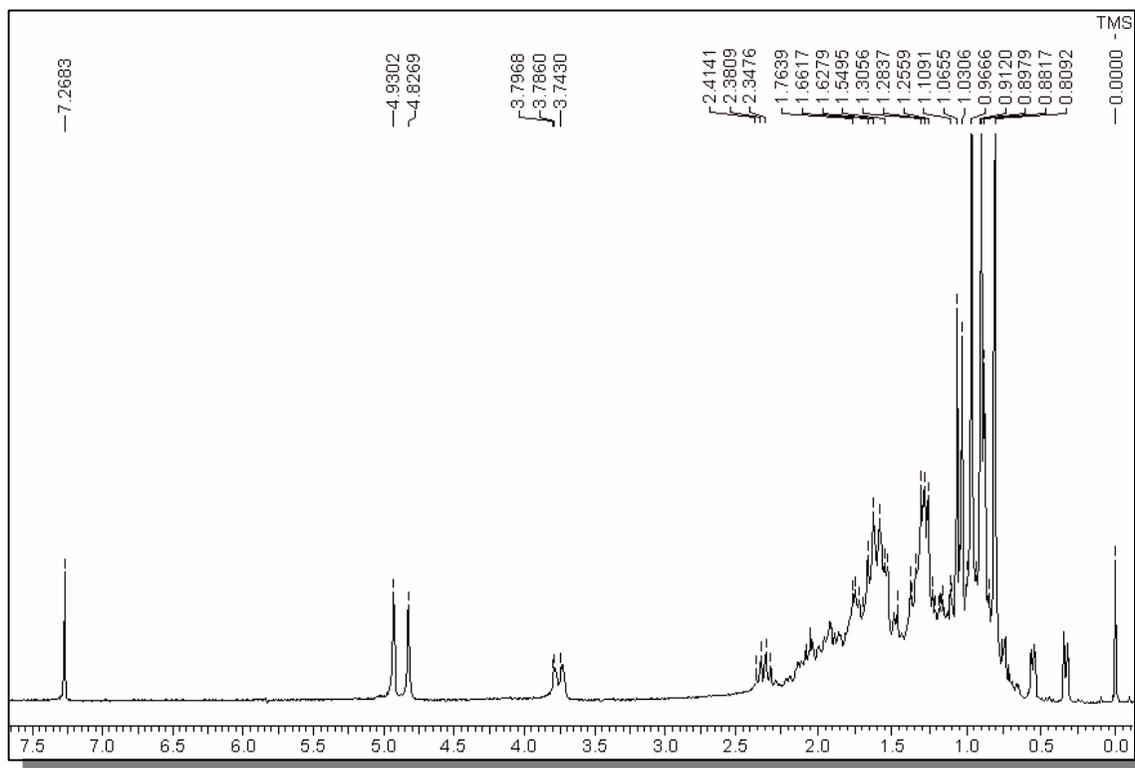


FIGURA 67- Espectro de RMN¹H da substância 15 (200 MHz, CDCl₃)

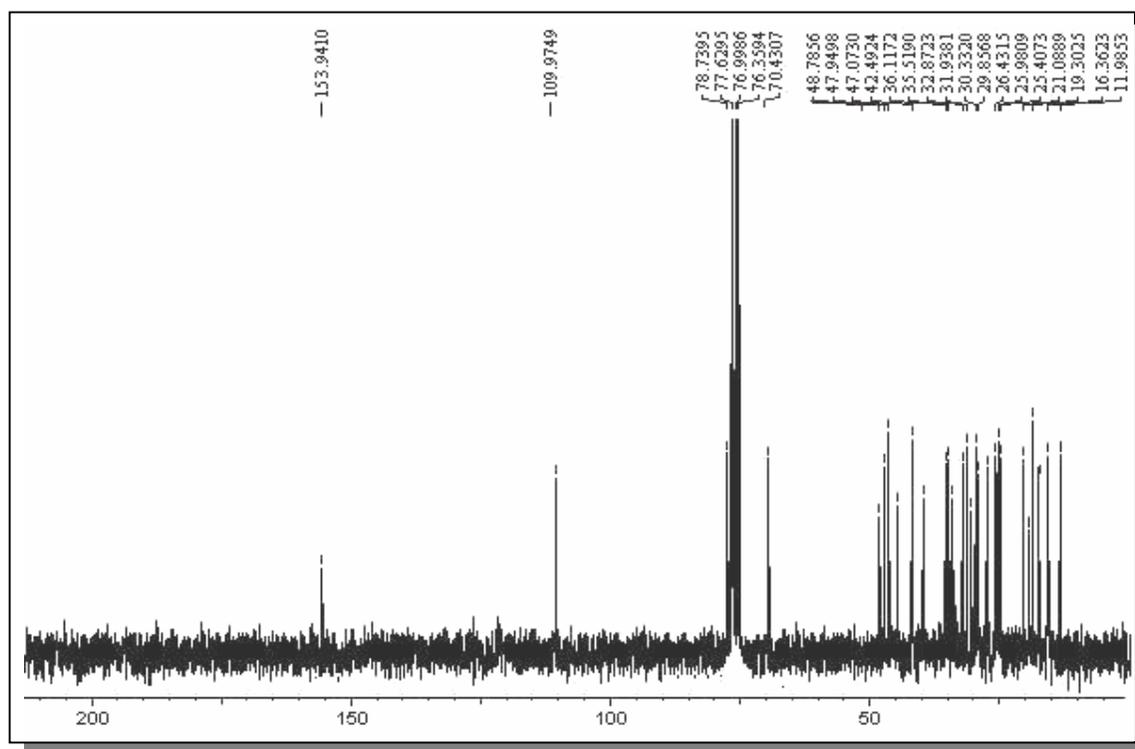


FIGURA 68 - Espectro de RMN¹³C da substância 15 (50 MHz, CDCl₃)

TABELA 18 - Dados de RMN¹H para **14** e **15** (CDCl₃, 200 MHz)

Hidrogênios	14	15
18	0,96 (s)	1,00 (m)
19a	0,76 (d, <i>J</i> = 4,4 Hz)	0,58 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz)
19b	0,55 (d, <i>J</i> = 4,4 Hz)	0,36 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz)
20	1,39	-
21	0,89 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz)	0,90 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz)
22	-	3,78 (dd, <i>J</i> = 9,2 e 3,0 Hz)
23	-	-
25	2,34 (m)	-
26	-	1,03 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz)
27	1,02 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz)	1,06 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz)
28	0,88 (s)	0,91 (s)
29	1,03 (s)	0,80 (s)
30	1,05 (s)	0,96 (s)
31	4,88 / 4,82 (sl)	4,93 / 4,82 (sl)

(-) regiões congestionadas

TABELA 19 - Dados de RMN¹³C dos triterpenos **14** e **15** (CDCl₃, 50 MHz)

Posição	14	15
3	78,80	78,73
20	36,12	41,00
21	18,01	11,98
22	31,21	70,43
23	31,94	36,11
24	152,04	153,94
25	42,49	33,18
26	65,86	22,43
27	16,39	21,73
28	18,30	19,52
29	21,09	14,03
30	19,30	25,40
31	109,46	109,97

4.5.4.2 - IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENO FRIEDELANOS

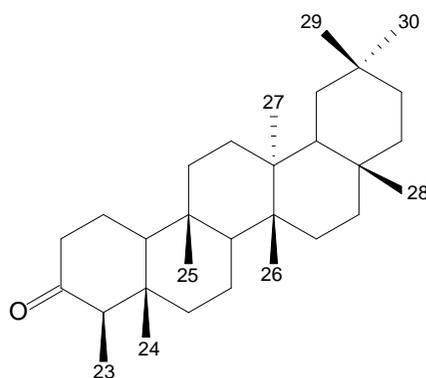
4.5.4.2.1 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 16

Esta substância foi isolada como um sólido branco e a análise através de CCD revelou, quando aspergida com solução de vanilina ácida seguida de aquecimento, uma mancha vermelha para cada substância.

O espectro de RMN¹H (figura 69, p. 119) mostra principalmente a presença de sete singletos (metilas terciárias) na região de δ 0,7 a 1,20 ppm e um dubleto centrado em δ 0,88 (3H, d, $J = 4,0$ Hz) que foi atribuído a Me-23 (metila secundária). Um multipletto centrado em δ 2,37 (2H, m) e um quadrupletto em δ 2,25 (1H, d, $J = 4,0$ Hz).

No espectro de RMN¹³C (figura 70, p. 120) aparecem 30 sinais de carbono, sendo um carbonílico em δ 213,2 ppm que foi localizado em C-3. O sinal das metilas caracteriza um triterpeno com esqueleto friedelano.

Os dados obtidos foram comparados com os dados da friedelina isolada por AGETA et al., (1995) e foram coincidentes. Assim a substância 16 foi identificada como sendo a friedelina.



Friedelina (16)

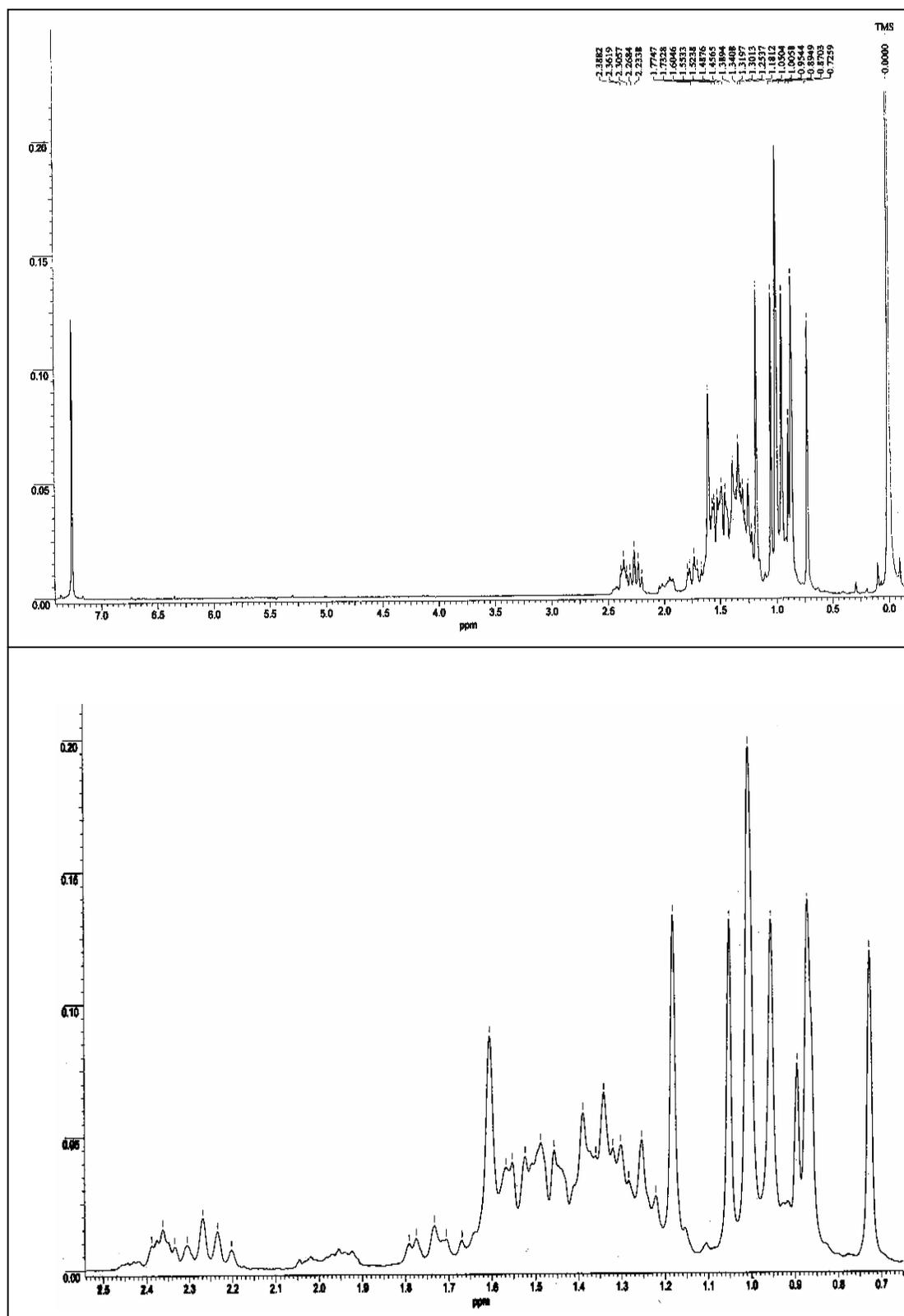


FIGURA 69- Espectro de RMN¹H da substância 16 (CDCl₃, 200 MHz)

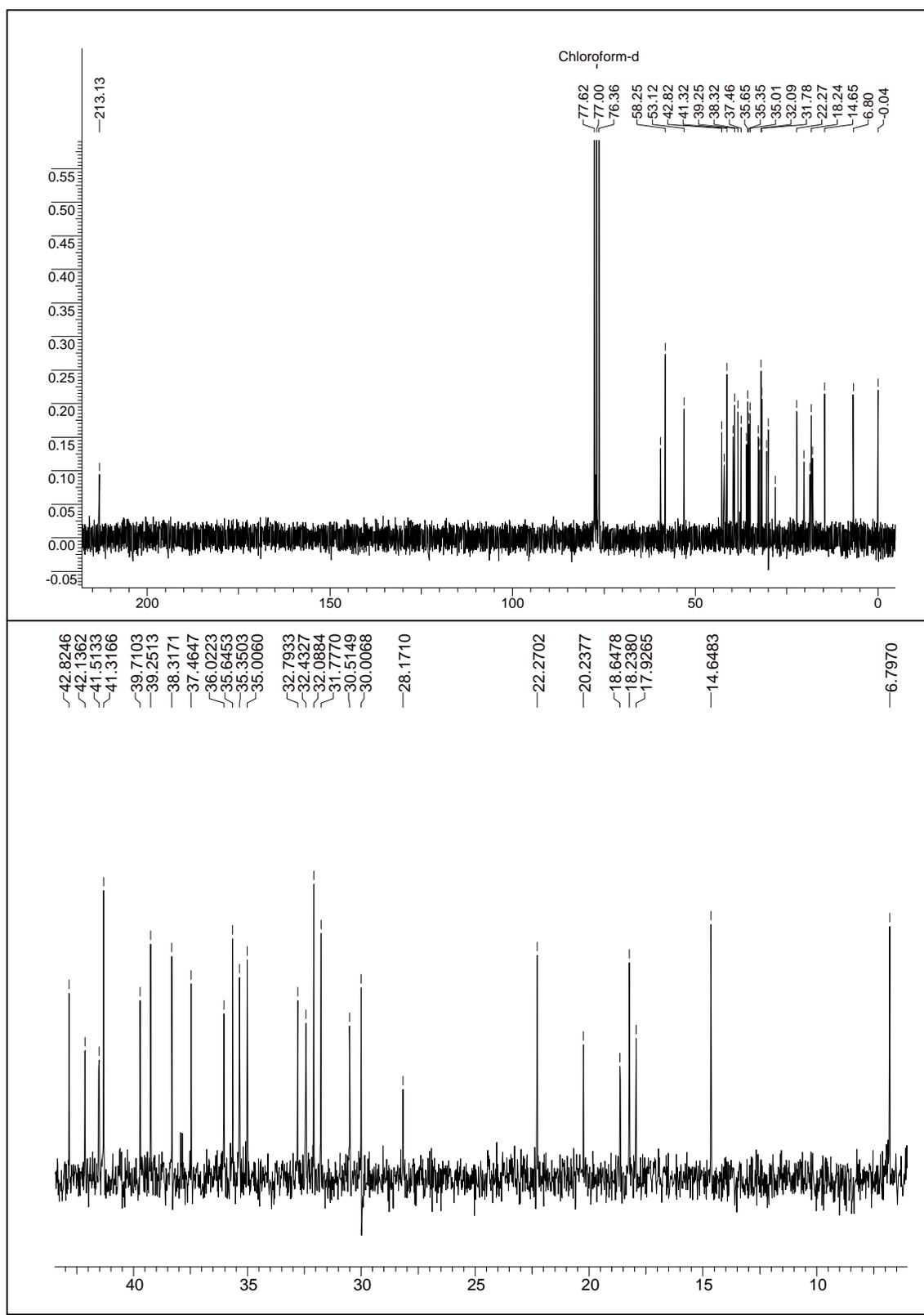


FIGURA 70 - Espectro de RMN¹³C da substância **16** (50 MHz, CDCl₃)

4.5.4.2.2- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 17

No espectro de RMN¹H obtido da substância 17 (figura 71, p. 124) verifica-se principalmente a presença de sete singletos sendo um centrado em δ 0,88 (3H, s) que foi atribuída a Me-23 característica de triterpeno friedelano. Além disso, foram observados dois dubletos formando um sistema AB em δ 3,49 e 3,63 (2H, $J=10,0$ Hz) outro sinal como um multipletto centrado em δ 2,2 (m).

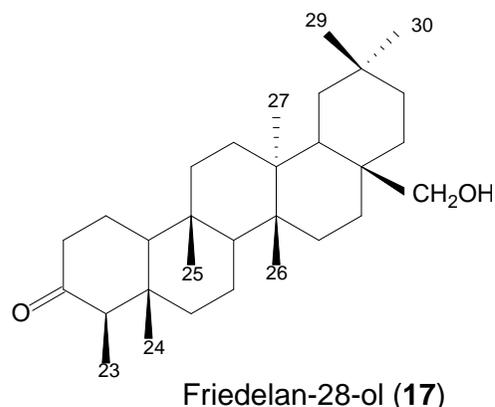
No espectro de RMN¹³C (figura 72, p. 126) aparecem 30 sinais de carbono, sendo um carbonílico em δ 213,25 e outro em δ 68,72.

Pelo experimento de COSY ¹H-¹H (figura 73, p. 124) foi observada a correlação entre o H-4 (δ 2,25) e a metila 23 (δ 0,88). Percebe-se que os prótons carbinólicos só acoplam entre si sugerindo um grupo hidroximetileno na molécula, resultante da oxidação de uma das metilas ligada a carbono terciário.

Para decidir a localização do grupo hidroximetileno foram observadas as correlações através do experimento COSY e HSQC e ainda assim havia duas possibilidades: ou o grupo estava na posição 27 ou 28.

Através do experimento de HMBC foi possível observar as vizinhanças das duas possibilidades e localizar o grupo na posição foi observadas correlações com os carbonos 13, 15, 19 e 21 (figura 75, p. 125).

Os dados obtidos foram comparados com MAHATO & KUNDU, (1994) e assim para a substância codificada por 17 foi proposta a estrutura de um triterpeno friedelano oxidado na metila 28, denominado friedelan-28-ol que é pela primeira vez isolado de uma espécie de *Trichilia*.



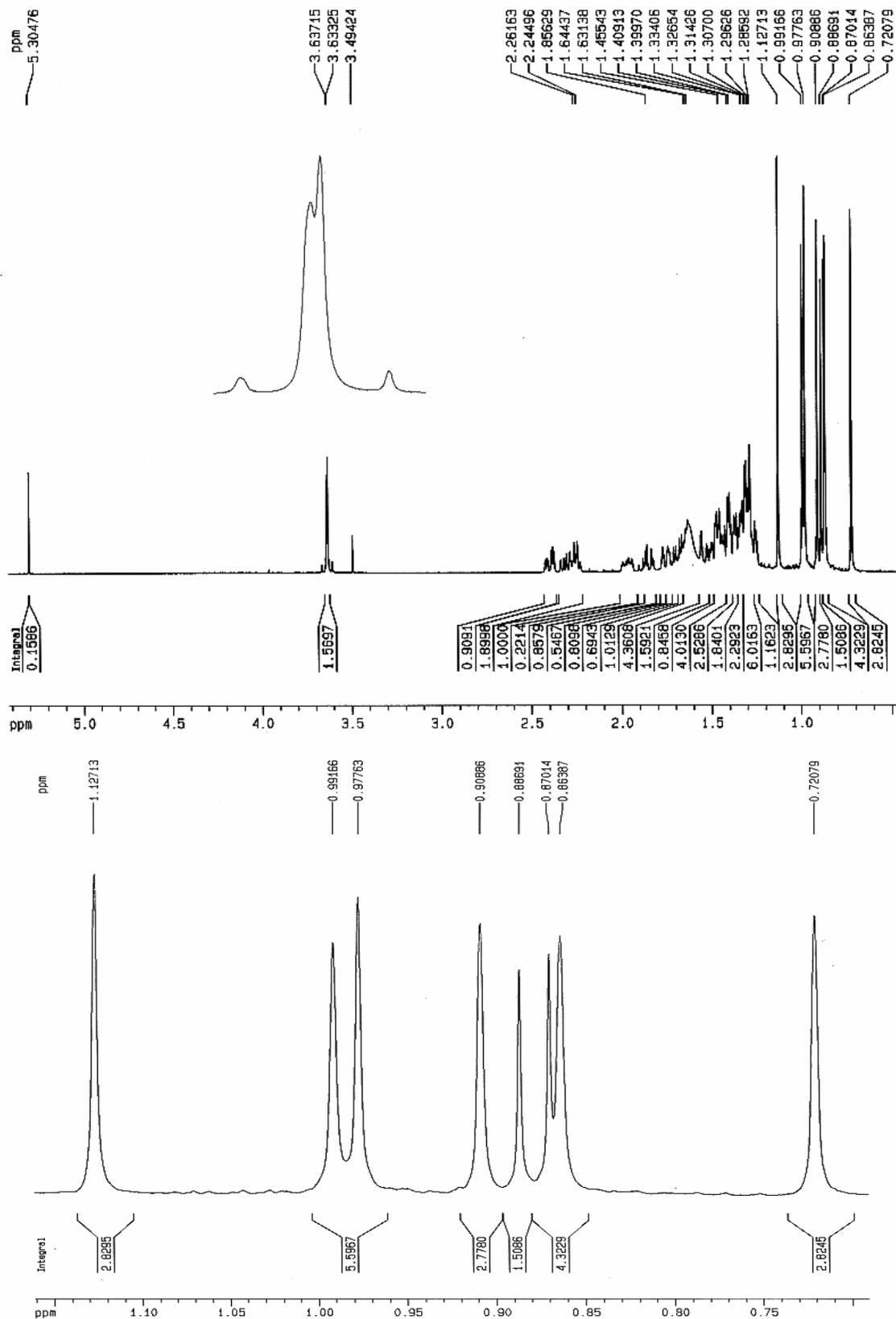


FIGURA 71 - Espectro de RMN¹H da substância 17 (CDCl₃, 400 MHz)

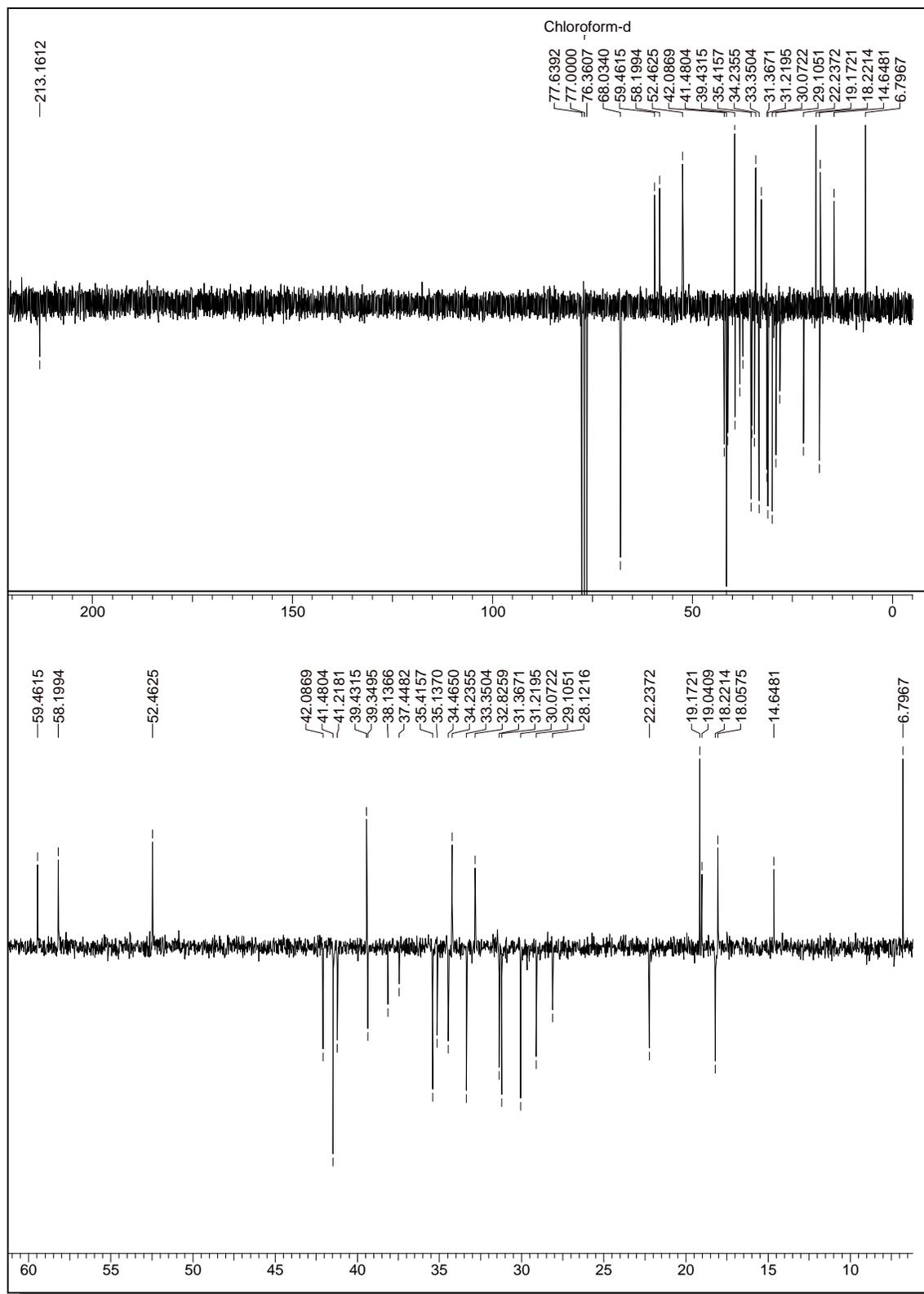


FIGURA 72 - Espetro de RMN¹³C da substância 17 (50 MHz, CDCl₃)

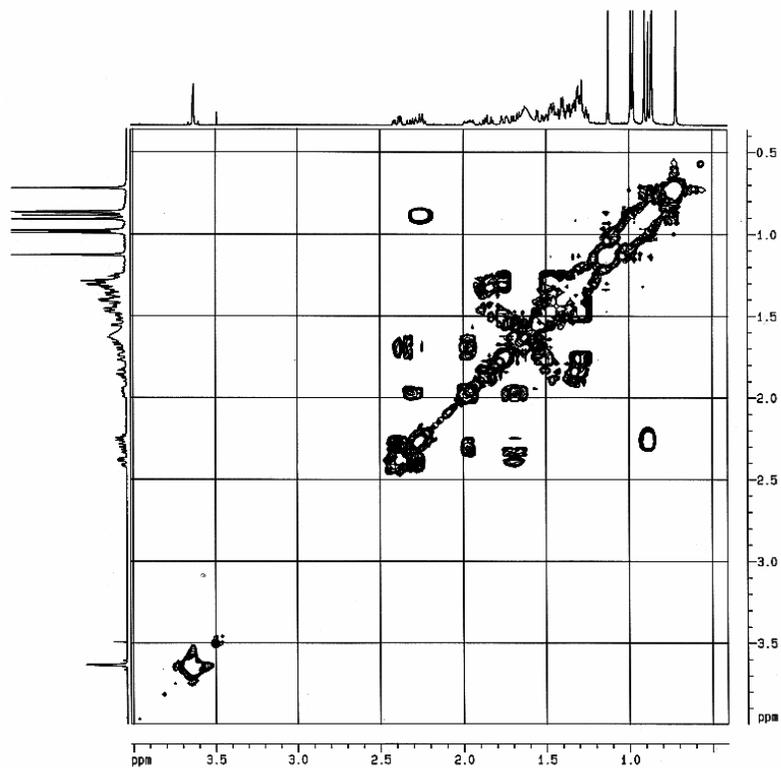


FIGURA 73 - Experimento de COSY da substância 17 (CDCl₃, 400 MHz)

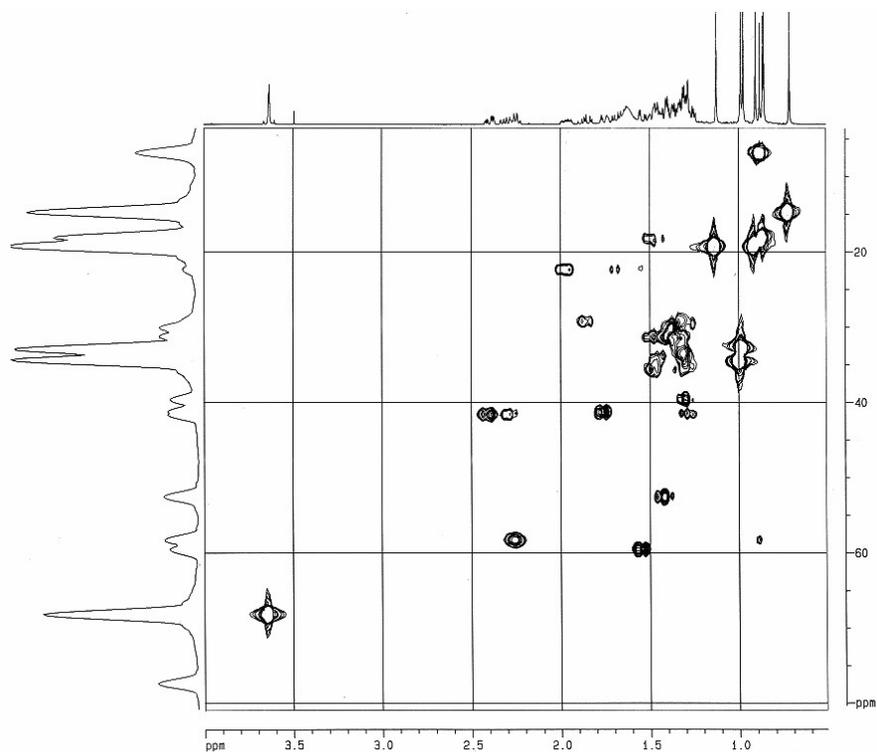


FIGURA 74 - Experimento de HSQC da substância 17 (CDCl₃, 400 MHz)

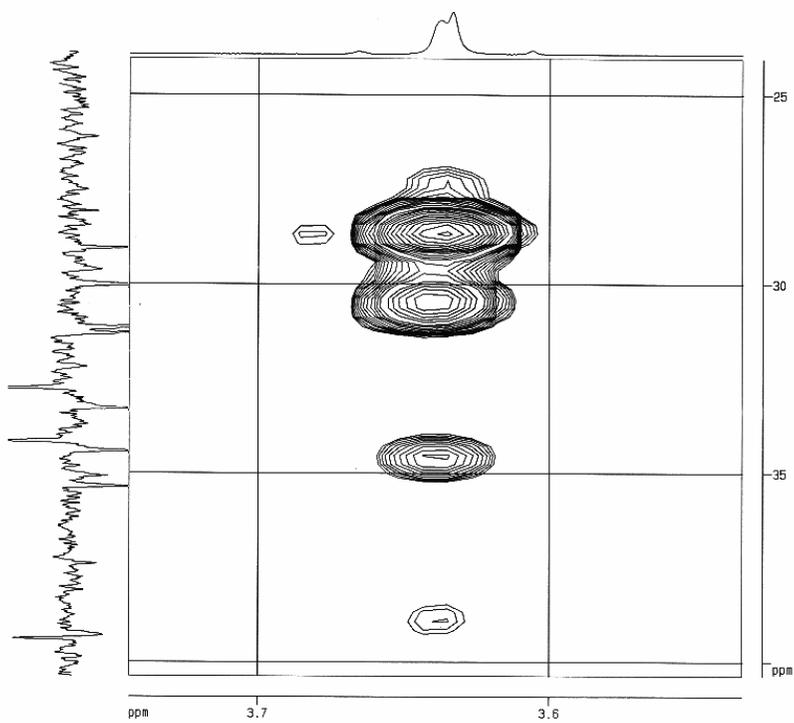
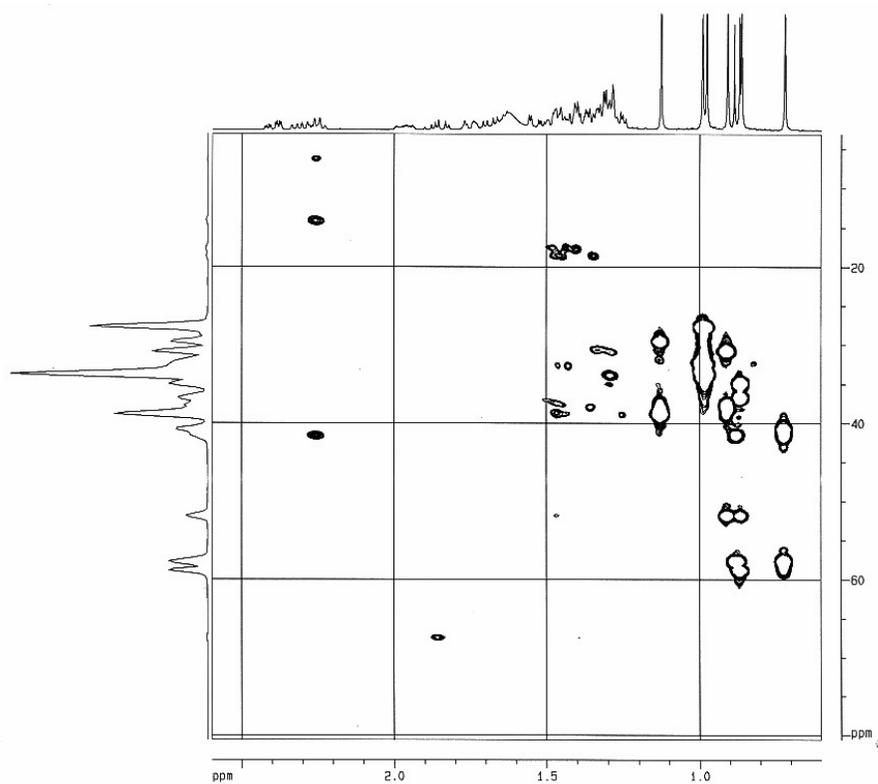


FIGURA 75 - Ampliações do experimento de HMBC de **17** (CDCl_3 , 400 MHz)

TABELA 20- Dados de RMN¹H para **16** e **17** (CDCl₃, 50 MHz)

Posição	16*	17
23	0,88 (3H,d, J=6,6 Hz)	0,88 (3H,d, J=6,6 Hz)
24	0,73 (3H, s)	0,72 (3H, s)
25	0,87 (3H, s)	0,87 (3H, s)
26	1,00 (3H, s)	0,90 (3H, s)
27	1,05 (3H, s)	1,12 (3H, s)
28	1,18 (3H, s)	3,49 (1H, d, J=10,0 Hz) e 3,63 (1H, d, J=10,0 Hz)
29	0,95 (3H, s)	0,97 (3H, s)
30	1,00 (3H, s)	0,99 (3H, s)

* Dados descritos por AGETA et al., 1995

Constante de acoplamento em Hz e integrais entre parênteses.

TABELA 21- Dados de RMN¹³C para **16** e **17** (CDCl₃, 50 MHz)

Posição	16	17
1	22,27	22,25
2	41,51	41,48
3	213,13	213,16
4	58,25	58,21
5	41,32	42,08
6	41,48	41,21
7	18,23	18,23
8	53,11	52,47
9	37,46	37,44
10	59,51	59,47
11	35,64	33,47
12	30,51	30,07
13	39,71	38,13
14	38,32	39,43
15	32,08	31,21
16	35,35	29,11
17	30,01	35,13
18	42,82	34,46
19	35,35	35,41
20	28,17	28,12
21	32,79	31,36
22	39,25	33,35
23	6,79	6,80
24	14,64	14,64
25	17,92	18,05
26	18,64	19,05
27	20,24	19,18
28	32,08	68,03
29	31,77	32,82
30	35,01	34,23

4.5.4.3- IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENO LUPANO

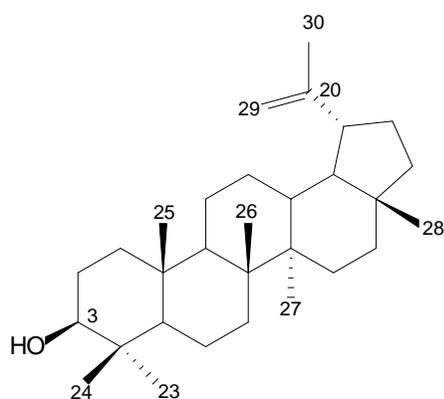
4.5.4.3.1 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 18

Esta substância foi isolada como um sólido branco amorfo do caule de *T. rubra* e caracterizada através da análise de RMN¹H, RMN¹³C e por comparação com os dados publicados na literatura.

O espectro de RMN¹H (Figura 76, p. 128) indica a presença de sete metilas e os sinais são representados como singletos a δ 0,76, 0,78, 0,83, 0,94, 0,96 e 1,68 ppm. Além disso, foi observado um sinal em δ 4,68 (1H, d, $J= 4$ Hz) atribuído ao H-29, em δ 3,18 (1H, dd, $J=4,0$ e 11,0 Hz) atribuído para H-3 e um outro sinal centrado em δ 2,38 (1H, m) atribuído ao H-19.

No espectro de RMN¹³C (Figura 77, p. 128) foram observados trinta sinais. Os sinais em δ 150,88 e δ 109,30 são referentes à dupla ligação terminal e o sinal em δ 78,93 atribuído ao carbono carbinólico localizado no C-3.

Com base nos dados obtidos e comparando com a literatura (REYNOLDS et al., 1986; MAHATO & KUNDU, 1998), foi possível propor para a substância 18 o lupeol (Lup-20(29)-eno), que é pela primeira vez isolado de *T. pallida*.



Estrutura do Lupeol

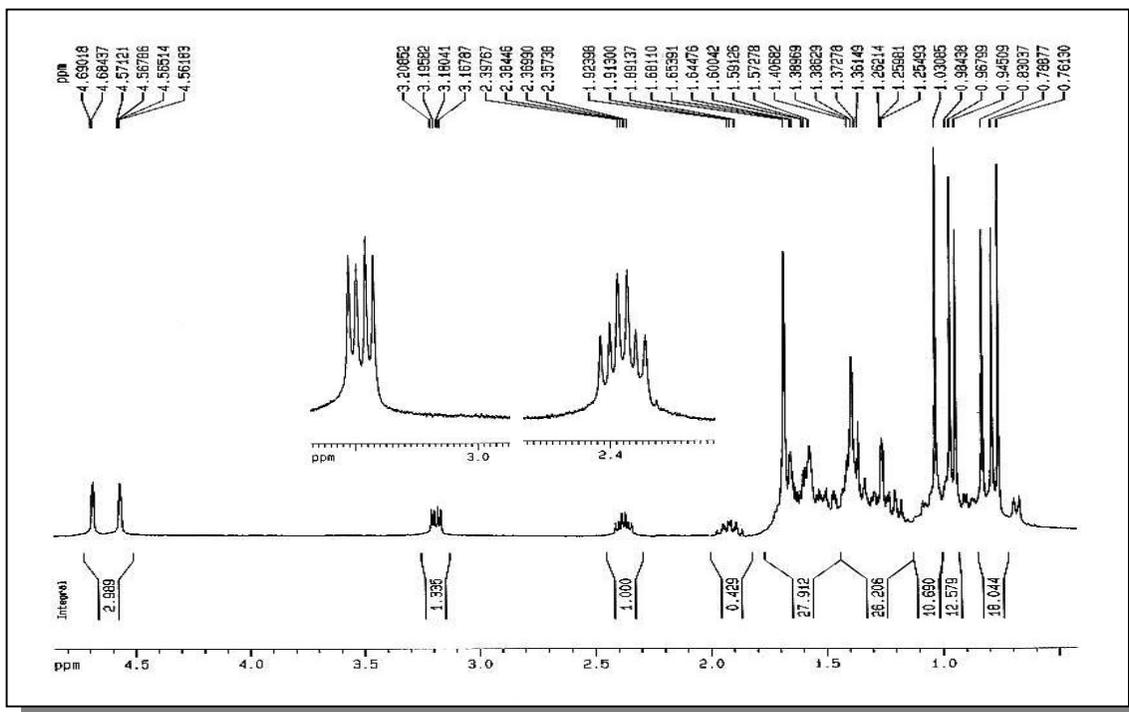


FIGURA 76 - Espetro de RMN¹H da substância **18** (400 MHz, CDCl₃)

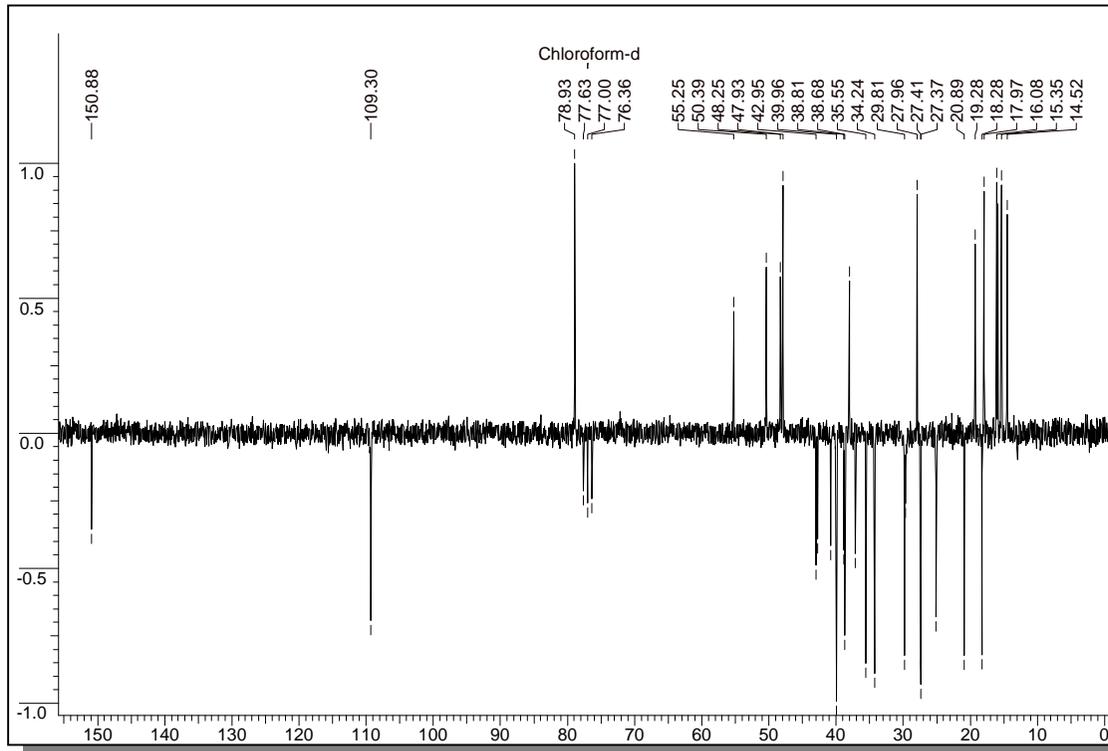


FIGURA 77 - Espetro de Pendant da substância **18** (50 MHz, CDCl₃)

TABELA 22- Dados de RMN¹H (CDCl₃, 400 MHz) e RMN¹³C (CDCl₃, 50 MHz) para a substância **18**

Posição	δ_H^1	δ_C^2 (ppm)
1	-	38,68
2	-	27,41
3	δ 3,18 (1H, dd, $J=4,0$ e $11,0$ Hz)	78,93
4	-	38,81
5	-	55,25
6	-	18,28
7	-	34,24
8	-	40,78
9	-	50,39
10	-	37,12
11	-	20,89
12	-	25,09
13	-	38,00
14	-	42,78
15	-	27,41
16	-	35,55
17	-	42,95
18	-	48,25
19	2,38 (1H, m)	47,93
20	-	150,88
21	-	29,81
22	-	39,96
23	0,76 (3H, s)	27,96
24	0,78 (3H, s)	15,35
25	0,83 (3H, s)	16,08
26	0,94 (3H, s)	15,94
27	0,96 (3H, s)	14,52
28	-	17,97
29	4,68 (1H, d, $J= 4$ Hz)	109,30
30	1,68 (3H, s)	19,28

¹ Constante de acoplamento e integrais entre parênteses.

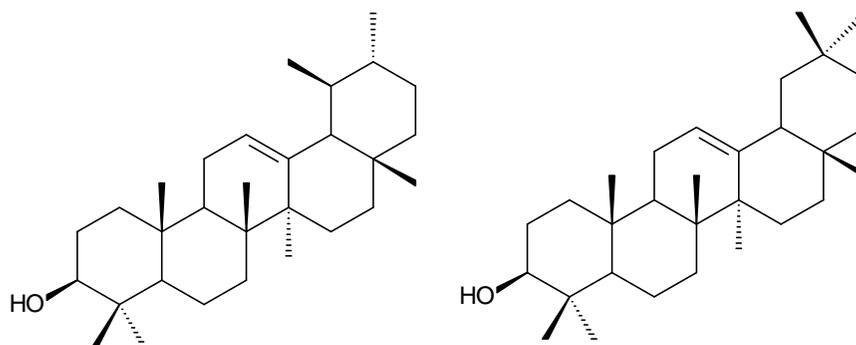
² Dados comparados com os descritos por REYNOLDS et al., (1986) (100 MHz, CDCl₃)

4.5.4.4- IDENTIFICAÇÃO DE TRITERPENOS OLENANO E URASANO

O espectro de RMN¹H (figura 78, p. 131) mostra a presença de dois tripletos em δ 5,12 e 5,18 (1H, t, $J=3,6$ Hz), característicos de hidrogênios olefínicos. Apresenta ainda um duplo dubleto em δ 3,21 (1H, dd, $J=10,8$ e 5,0 Hz), característicos de hidrogênios carbinólicos da posição C-3 de triterpenos; a constante de maior indica que H-3 está em axial e acopla com H-2 β com J -diaxial. Ainda aparece um conjunto de sinais entre δ 0,80 a 1,1 que indicam tratar-se de uma mistura de triterpenos.

O espectro de RMN¹³C (figura 79, p. 131), confirmou tratar-se da mistura de triterpenos citada anteriormente; os sinais em δ 121,9 e 145,2, bem como em δ 124,6 e δ 139,8 encontram-se na faixa de sinais característicos de triterpenos com esqueleto oleano e ursano (LIMA et. al., 2004).

Seguindo a metodologia descrita por OLEA et al., (1990) os dados foram tabelados e assim foi possível através dos dados da literatura identificar todos os sinais de hidrogênio e carbono que compunham a mistura que foi identificada como sendo a α - amirina e β -amirina (DEEB et al., 2003).



Estrutura da α -amirina (Urs-12-eno) e β -amirina (Olean-12-eno)

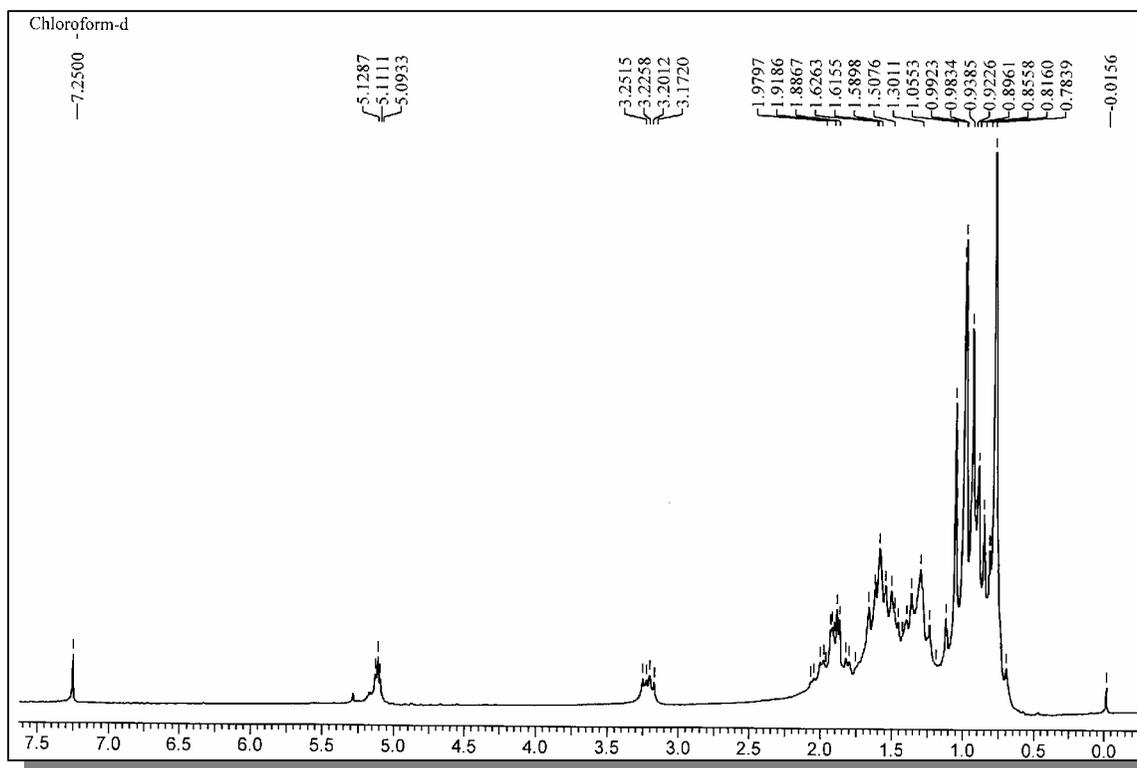


FIGURA 78 - Espectro de RMN¹H amostra **19** (200 MHz, CDCl₃)

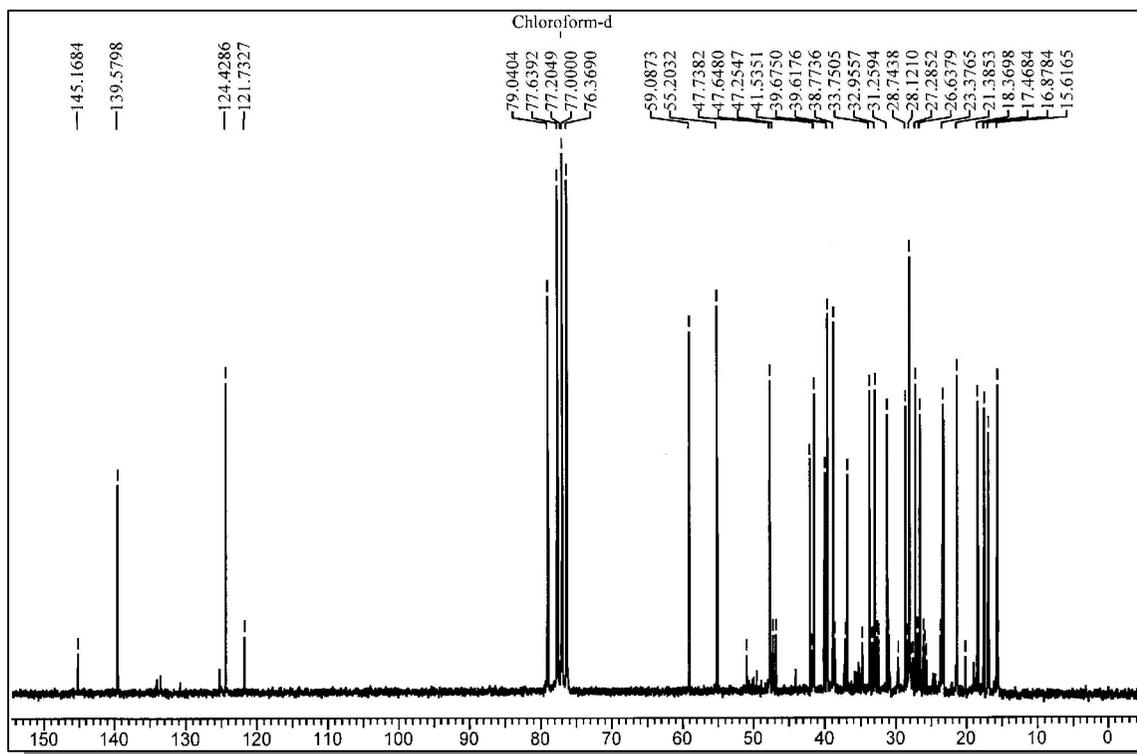


FIGURA 79 - Espectro de RMN¹³C da amostra **19** (50 MHz, CDCl₃)

TABELA 23 - Dados de RMN¹³C da α e β - amirina (CDCl₃, 50 MHz)

Carbono	α-amirina	β-amirina
1	38,7	38,7
2	27,2	28,0
3	79,0	79,0
4	38,7	38,7
5	55,2	55,2
6	18,3	18,3
7	32,9	32,9
8	39,6	38,7
9	47,6	47,7
10	36,9	37,1
11	23,3	23,5
12	124,4	121,7
13	139,5	145,1
14	42,0	41,7
15	28,7	26,1
16	26,6	26,9
17	33,7	32,6
18	59,0	47,2
19	39,8	46,8
20	39,6	31,2
21	31,2	34,7
22	41,7	37,1
23	28,3	28,3
24	15,6	15,6
25	15,6	15,6
26	16,8	16,8
27	23,3	26,1
28	28,3	28,7
29	17,4	32,9
30	21,3	23,6

4.5.6 - ESTERÓIDES

4.5.6.1.1 - Identificação estrutural do β -sitosterol (**20**)

A amostra apresentou-se como um sólido cristalino em forma de agulha. A análise desta em CCDA apresentou coloração avermelhada após revelação com vanilina seguida de aquecimento. A amostra foi identificada através da análise dos experimentos de RMN¹H e por CG/EM.

O espectro de RMN¹H da amostra apresentou um duplo dubleto largo em δ 5,34 e um multipletto em δ 3,52 que foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-6 e H-3 do β -sitosterol, ainda pode-se observar dois dubletos em δ 5,14 (1H, dd, $J=8,0$ e $15,0$ Hz) e δ 5,01 (1H, dd, $J=8,0$ e $15,0$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos do estigmasterol, que juntamente com os sinais entre δ 2,5-0,5 referente a hidrogênios metílicos e metilênicos caracterizaram o esqueleto esteroidal (DEEB et al., 2003).

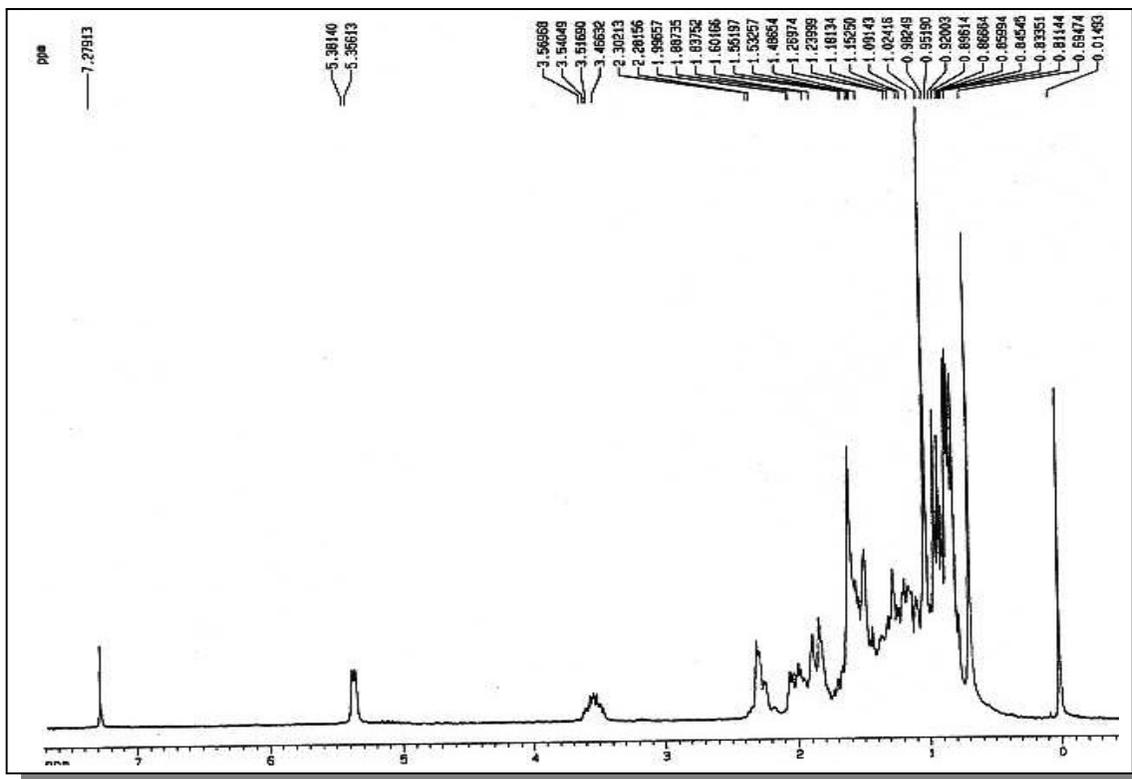


FIGURA 80 - Espectro de RMN¹H da substância **20** (200 MHz, CDCl₃)

O cromatograma obtido via CG/EM (figura 81), mostra um pico com tempo de retenção de 24,8 que apresentou no espectro de massas com pico do íon molecular em m/z 414.

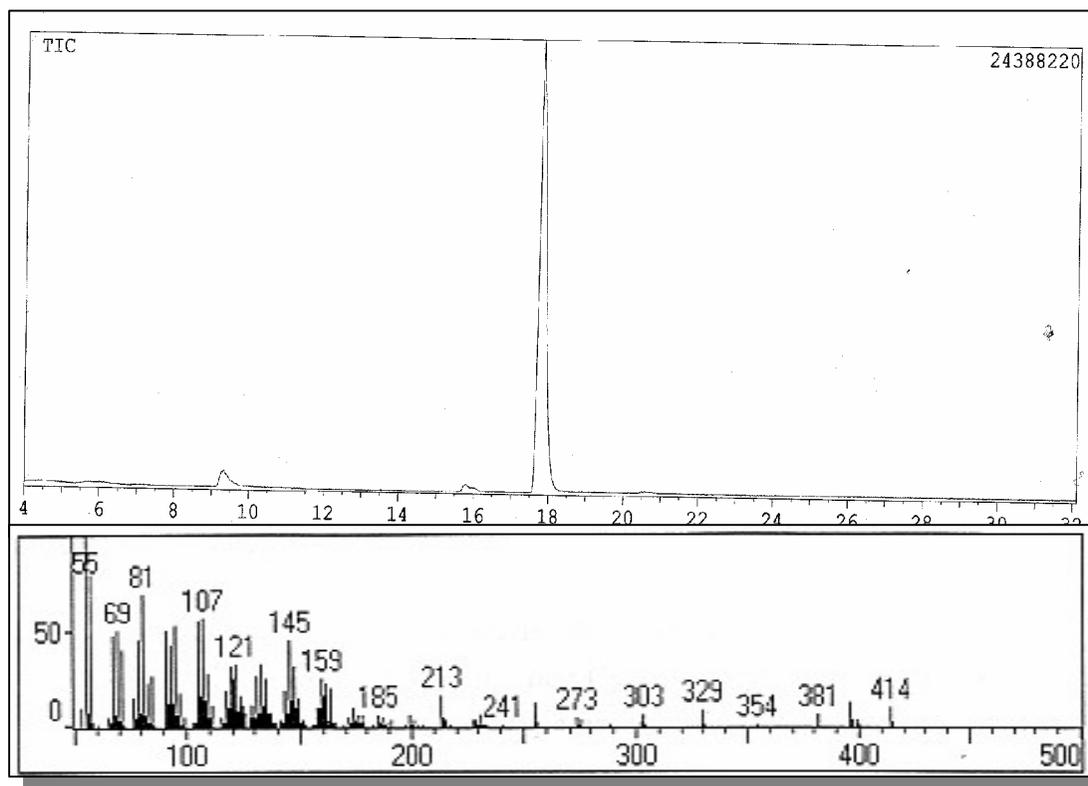
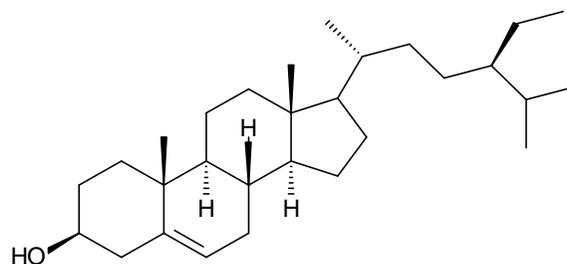


FIGURA 81- Cromatograma e espectro de massas do pico majoritário (70 ev, IE)

Os espectros de massas obtidos foram concordantes com o espectro de massas observado na biblioteca do CG/EM e que confirma que a substância é o β -sitosterol (Stigmast-5-en-3 β -ol).



Estrutura do β -sitosterol

4.5.6.1.2 - Identificação estrutural do β -sitosterol glicosilado (21)

Esta substância foi isolada como um sólido branco com alta polaridade que foi submetida à reação de acetilação (conforme metodologia descrita p. 34).

No espectro de RMN¹H (Figura 82) da amostra acetilada foram observados dois sinais caracterizados como duplos dubletos em δ 4,12 (dd, 1H, $J=12,1$ e $2,9$ Hz) e δ 4,24 (dd, 1H, $J= 5,5$ e $12,1$ Hz), referentes ao grupo metilênico da glicose (H-6') e um dubleto em δ 4,58 ($J=8,0$ Hz) atribuído a H-1' do açúcar. Os sinais em 2,0; 2,02; 2,05 e 2,07 atribuídos aos hidrogênios metílicos dos grupos acetato.

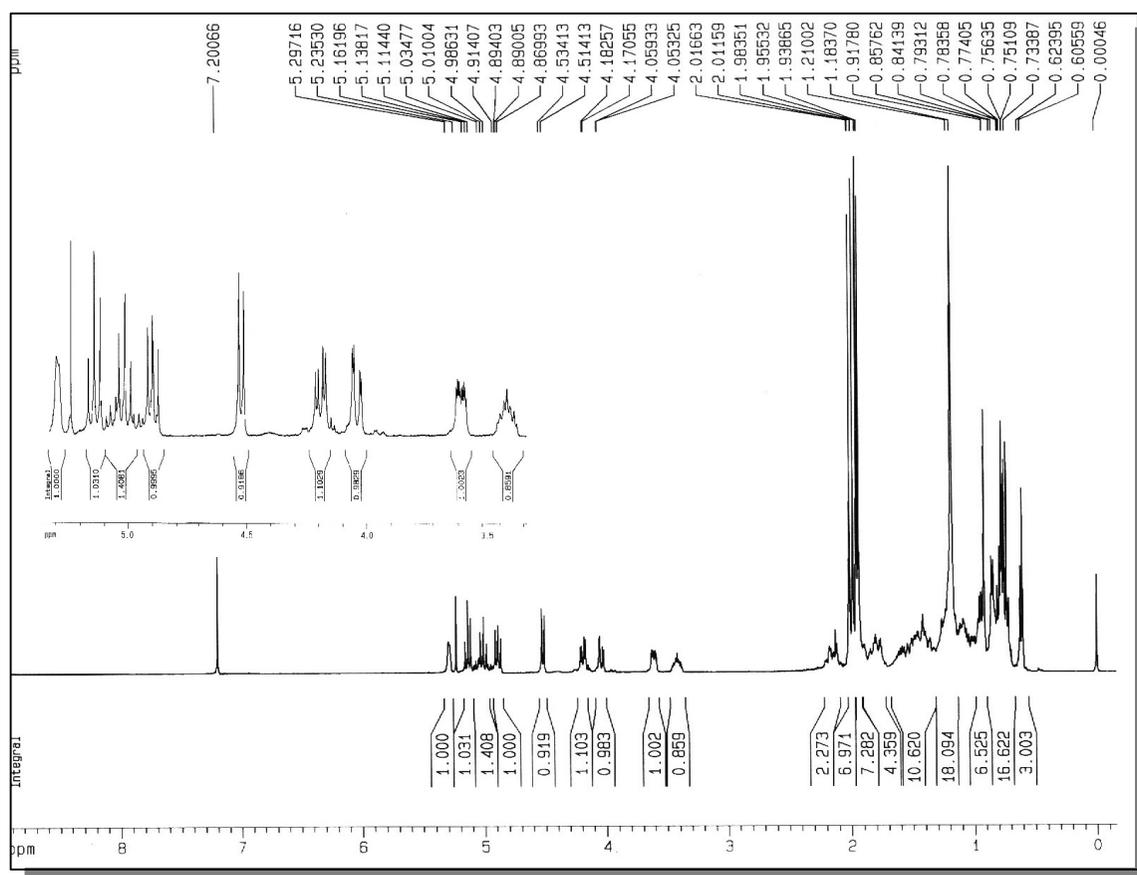


FIGURA 82 - Espectro de RMN¹H de substância 21 acetilada (400 MHz, CDCl₃)

Ao comparar-se os dados de RMN¹H com os modelos encontrados na literatura, pode-se propor que a substância 21 a estrutura do 3β -D-glicopiranosil sitosterol.

4.5.6.2 - ESTERÓIDES COLESTANOS

4.5.6.2.1 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 22

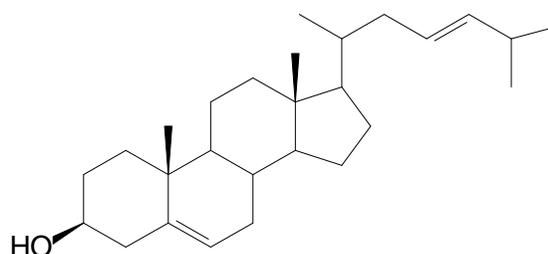
Esta substância foi isolada da fração em metanol do extrato em metanol da folha de *T. rubra* como um sólido branco. A análise através de CCD revelou, quando aspergida com solução de vanilina ácida seguida de aquecimento, uma mancha azul.

O espectro de RMN¹H (figura 83, p. 140) apresenta um singlete largo em δ 5,3, um sinal em δ 3,5 referente a um multipeto, além da presença de cinco metilas. Foram observados ainda dois singletos em δ 4,61 e 4,67 que se referem a presença de prótons de uma ligação dupla na cadeia lateral. Restava saber em que posição estava localizada esta dupla ligação exocíclica.

Considerando a proposta biossintética para este tipo de esteróide foi possível atribuir a presença de um hidroxila na posição 3 confirmada pelo próton carbinólico que apareceu como um multipeto centrado em δ 3,4.

Além dos sinais da hidroxila foi observada no espectro de RMN¹³C (figura 83, p. 141) a presença de 27 sinais, sendo um carbinólico em δ 71,82 e os sinais em δ 140,7, 138,3 e 121,7 que confirmam as duplas ligações nos carbonos 5 e 23.

Com base nos dados obtidos foi possível propor para a substância **22** a estrutura do 3 β -hidroxi-colestan-23-eno que é pela primeira vez isolado de uma espécie de *Trichilia*.



Estrutura 3 β -hidroxi-colestan-23-eno

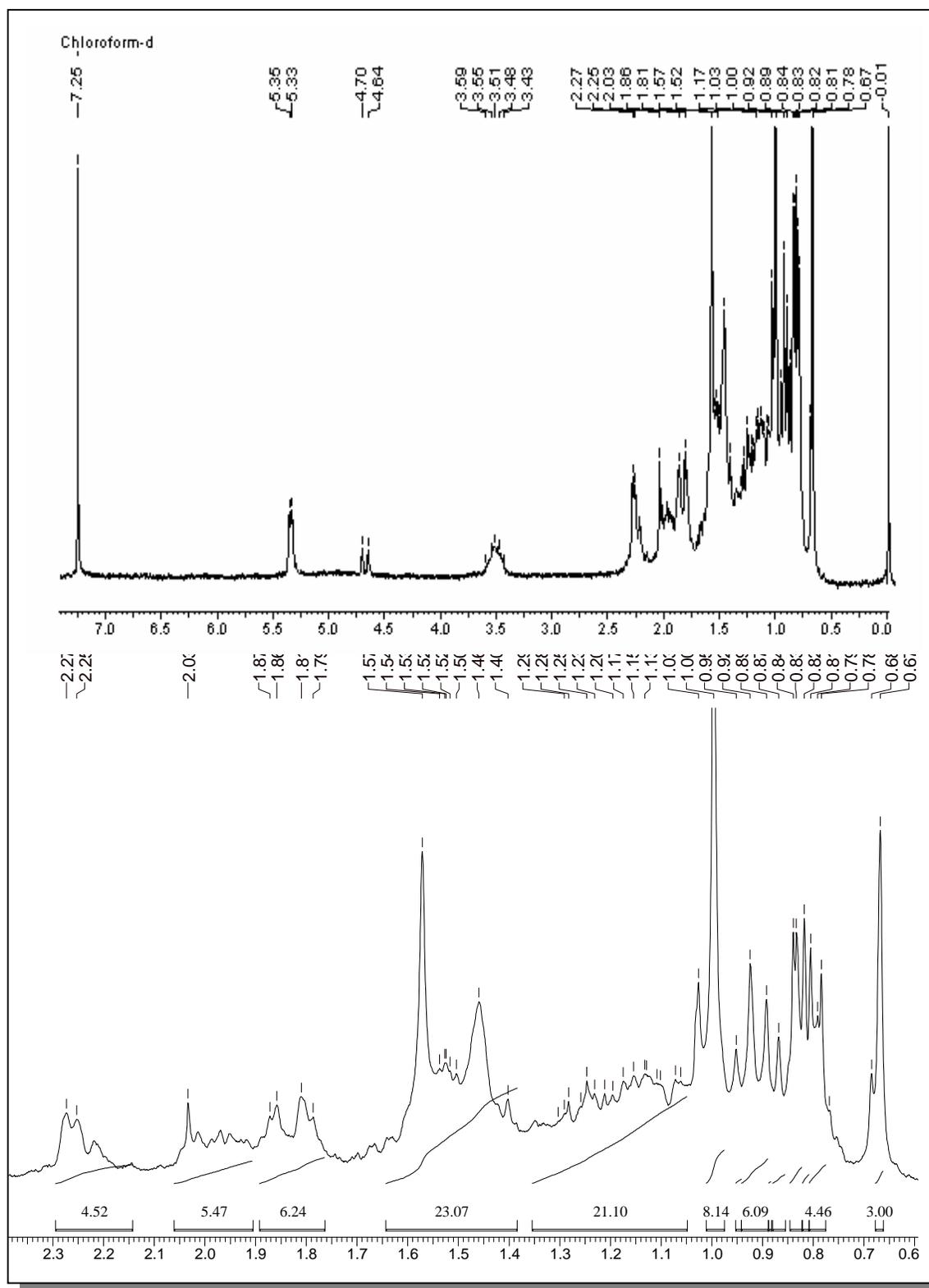


FIGURA 83 - Espectro de RMN¹H da substância **22** e ampliação do espectro na região de 0,6 a 2,4 ppm (200 MHz, CDCl₃)

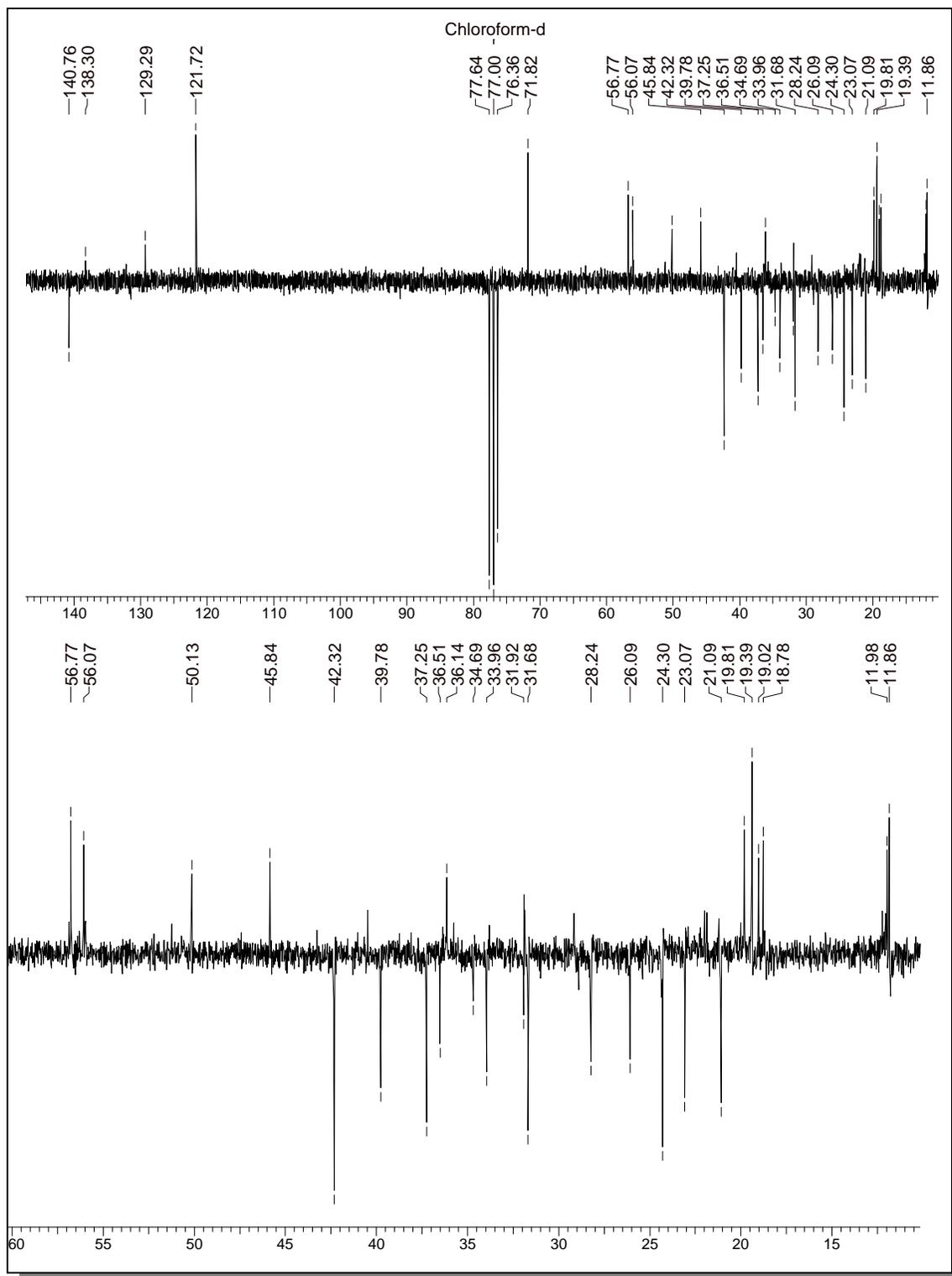


FIGURA 84 - Espectro de RMN¹³C da substância **22** e ampliação do espectro na região de 10 a 60 ppm (50 MHz, CDCl₃)

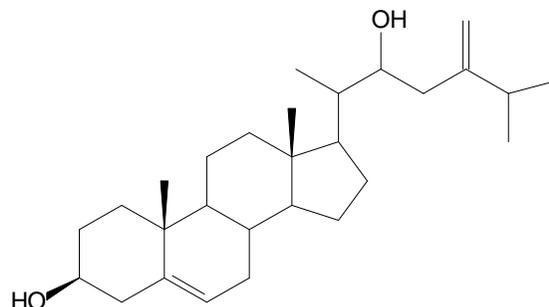
4.5.6.2.2 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 23

O espectro de RMN¹H obtido para **23** (figura 85, p. 140) mostra na região de δ 0,7 a 1,2 a presença de dois singletos e três dubletos centrados em δ 0,95 (3H, d, $J = 6,7$ Hz), δ 1,07 (3H, d, $J = 6,7$ Hz) e δ 1,05 (3H, d, $J = 6,7$ Hz). Um sinal como um multipletto centrado em δ 3,5 (1H, m) e um duplo duplo dubleto 3,7 (1H, ddd, 2,0; 4,0 e 12,0 Hz). Foram observados dois singletos: um a δ 4,82 (1H, s) e outro centrados em δ 4,92 (1H, s) e um dubleto largo centrado em δ 5,67 (1H, dd, $J=2,0$ e 4,0 Hz). Restava saber em que posições estavam ligadas as duas hidroxilas e a localização da dupla exocíclica.

No espectro de RMN¹³C (figura 86, p 141) foi observada a presença de 28 sinais, sendo um em δ 109,73 referente ao grupo metileno terminal, os sinais em δ 128,57 e 153,55 da dupla ligação endocíclica Δ^5 e um sinal em δ 140,79. Os sinais em 71,75 e 69,95 confirmam a presença de duas hidroxilas na molécula.

Com o experimento de HSQC foi possível observar as correlações dos grupos hidroxilas: em δ 3,7 correlaciona-se com o carbono em δ 69,95 e o δ 3,5 com o δ 71,75. Confirmando a posição da hidroxila ligada ao carbono 4 e com o experimento de HMBC foi possível observar as correlações do hidrogênio carbinólico em δ 3,7 acoplando a 3 ligações com o carbono metílico 21. Assim foi possível localizar a hidroxila no carbono 22 da cadeia lateral.

Assim foi possível propor para a estrutura do 24-metileno-3 β ,22-diidroxi-colesterol para a substância 23.



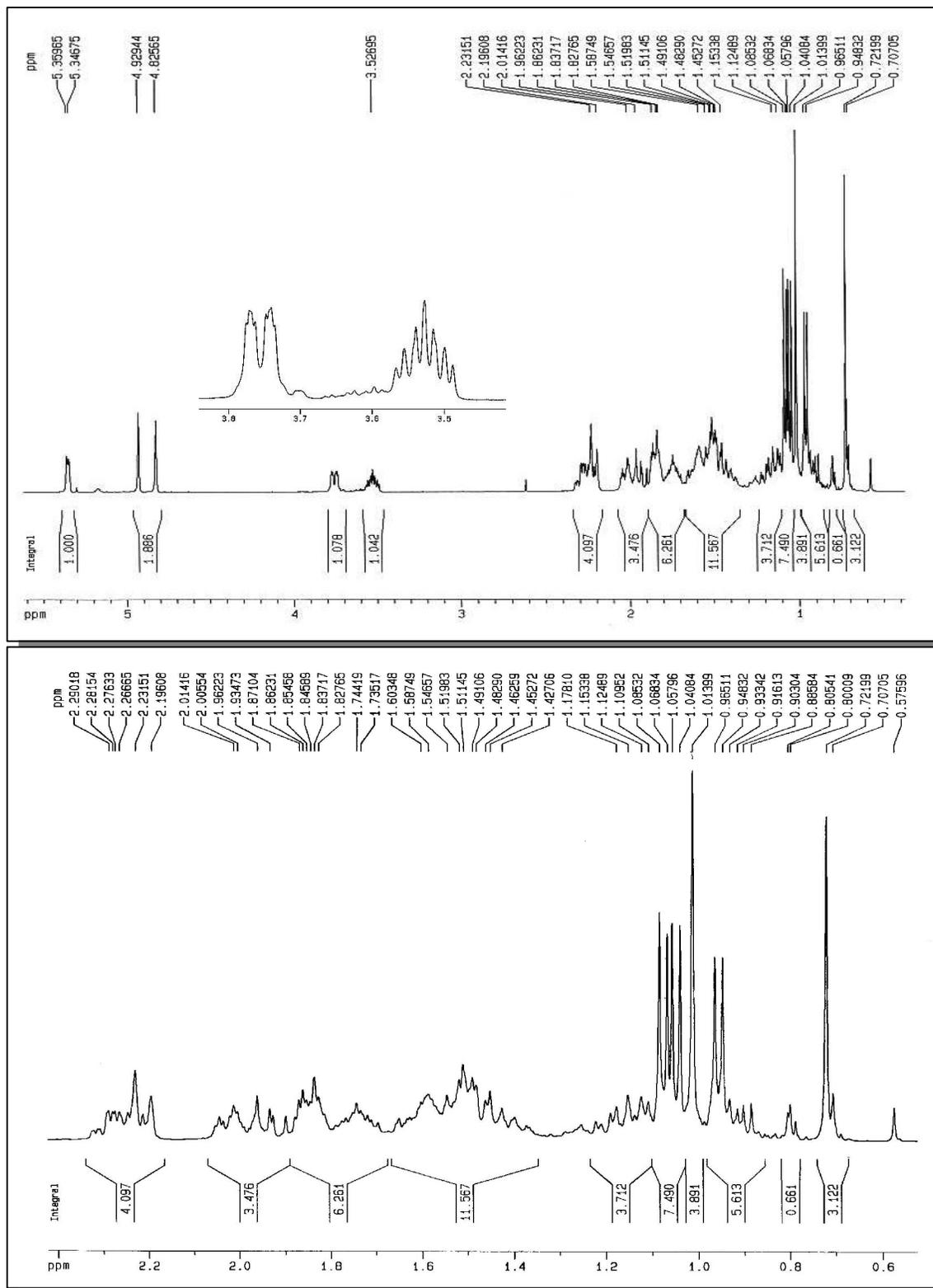


FIGURA 85 - Espectro de RMN¹H da substância 23 (400 MHz, CDCl₃)

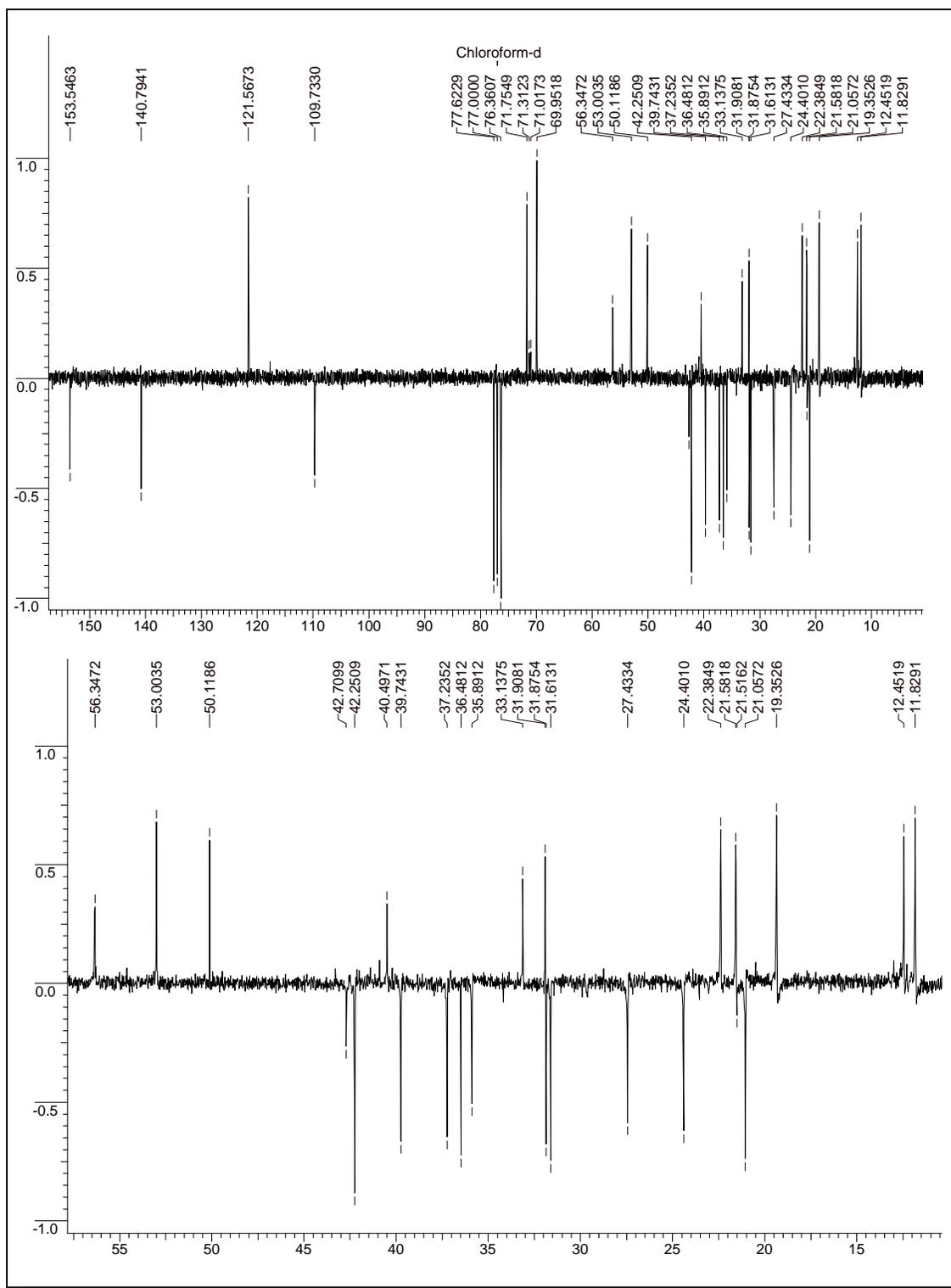


FIGURA 86 - Espectro de RMN¹³C (pendant) da substância **23** e ampliação do espectro na região de 60 a 10 ppm (50 MHz, CDCl₃)

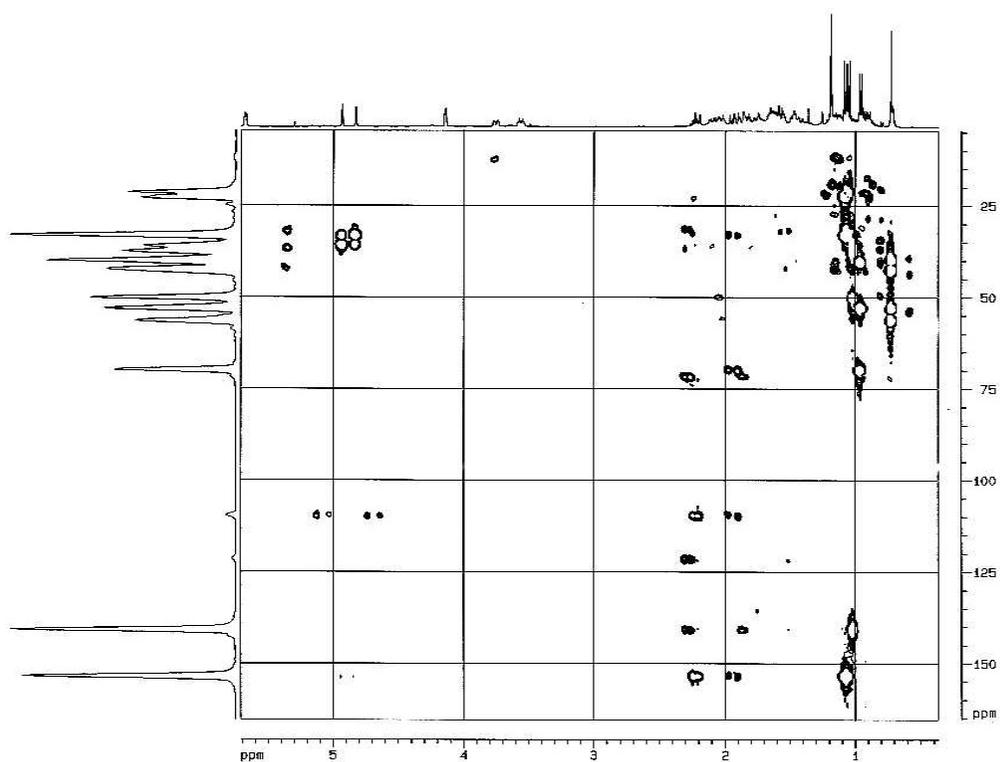


FIGURA 87 - Mapa de contorno de HMBC da substância **23** (400 MHz, CDCl₃)

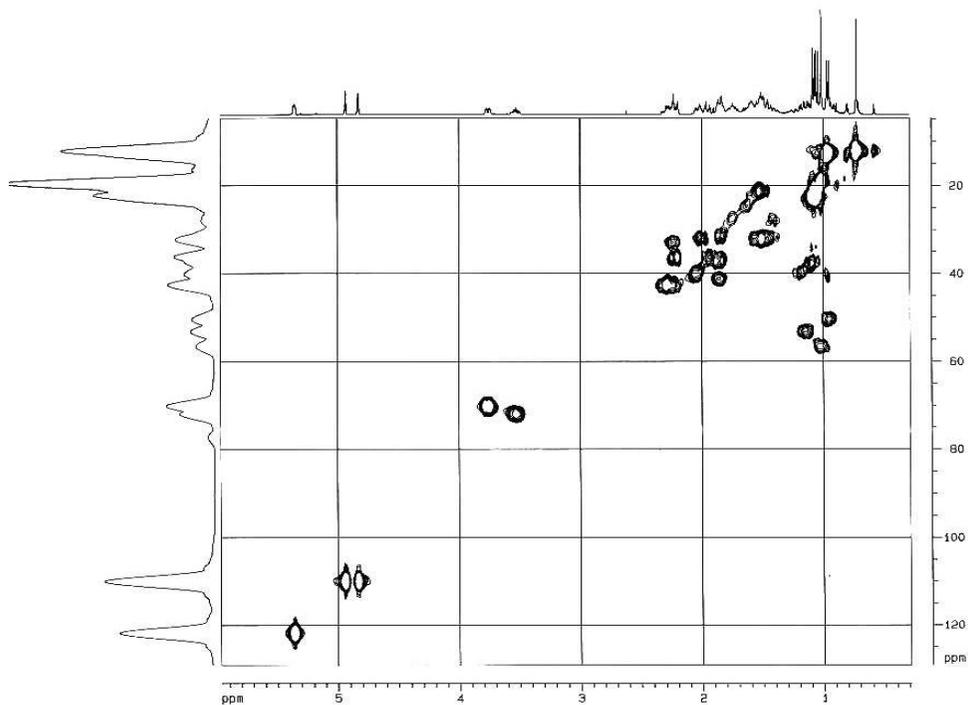


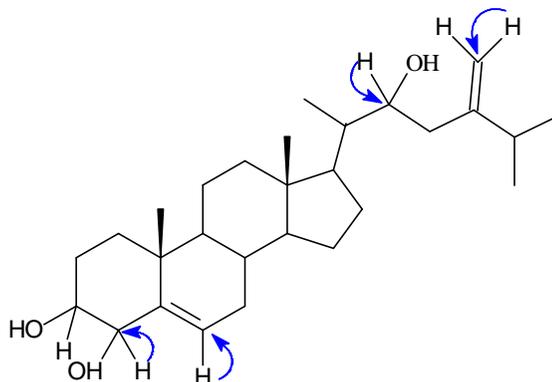
FIGURA 88 - Mapa de contorno de HSQC da substância **23** (400 MHz, CDCl₃)

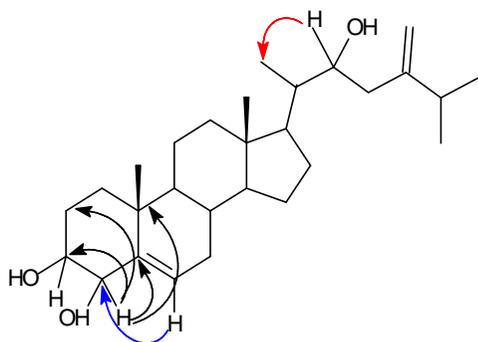
4.5.6.2.3 - IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 24

O espectro de RMN¹H (figura 89, p. 145) apresentou sinais característicos de esteróide do tipo colestano. A presença de cinco metilas na região blindada do espectro, sendo um singlete centrado a δ 0,72 (3H, s), três como dubleto centrados em δ 0,95 (3H, $J= 6,8$ Hz), δ 1,04 (3H, $J= 6,8$ Hz) e δ 1,07 (3H, $J= 6,8$ Hz) e um singlete em δ 1,18 (3H, s). Outros sinais também observados foram um duplo tripleto centrado em δ 3,5 (1H, dt, $J=12,0$ Hz), um duplo duplo dubleto em δ 3,7 (1H, ddd, $J= 2,0; 4,0$ e $12,0$ Hz) e um dubleto em δ 4,1 (1H, d, $J= 2,0$ Hz). Foram observados ainda dois singletos: um a δ 4,82 (1H, s) e outro centrado em δ 4,93 (1H, s) e um dubleto largo centrado em δ 5,67 (1H, dd, $J=2,0$ e $4,0$ Hz). Restava saber em que posições da dupla exocíclica e das três hidroxilas.

No espectro de RMN¹³C (figura 90, p. 146) foram observadas a presença de 28 sinais, sendo um em δ 109,75 referente ao grupo metileno terminal, os sinais em δ 128,63 e 153,35 da dupla ligação endocíclica Δ^5 e um sinal em δ 142,81. Através do experimento de Pendant pode ser observado cinco sinais de carbonos metilênicos, nove metílicos, dez metínicos e quatro quaternários.

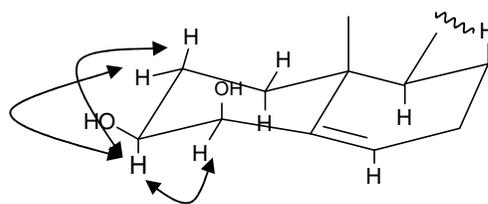
Com o experimento de HSQC foi possível observar as correlações dos grupos hidroxilas: em δ 4,1 correlaciona-se com o carbono em δ 77,25; o sinal em δ 3,7 correlacionando-se com o sinal do carbono em δ 69,9 e o próton δ 3,5 correlacionado com o carbono em δ 71,7.



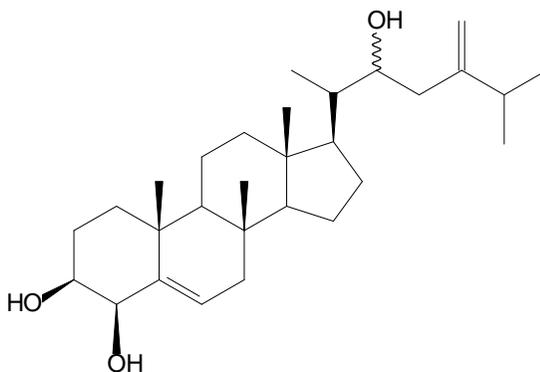


Com o experimento de HMBC foi possível observar as correlações do hidrogênio carbinólico H-4 com os carbonos 2, 3, 5 e 10 e a correlação a três ligações do hidrogênio olefínico H-5 com o carbono 4. Também foi possível observar a correlação do carbono carbinólico atribuído a H-22 acoplando a 3 ligações com a metila 21.

Os valores observados normalmente para constantes de acoplamento entre prótons axial-axial em anel de seis membros é entre 8 e 10 Hz e para prótons axial-equatorial e equatorial-equatorial são de 2 e 3 Hz. Assim foi possível atribuir a conformação β para o grupo hidroxila ligado ao carbono 4.



Estes dados levaram a propor a estrutura para esta substância como sendo 24-metileno-3 β ,4 β ,22-trihidroxi-colesterol



Estrutura do 24-metileno-3 β ,4 β ,22-triidroxi-colesterol

Até o momento não foram encontrados na literatura consultada dados para esta substância, portanto é considerada inédita.

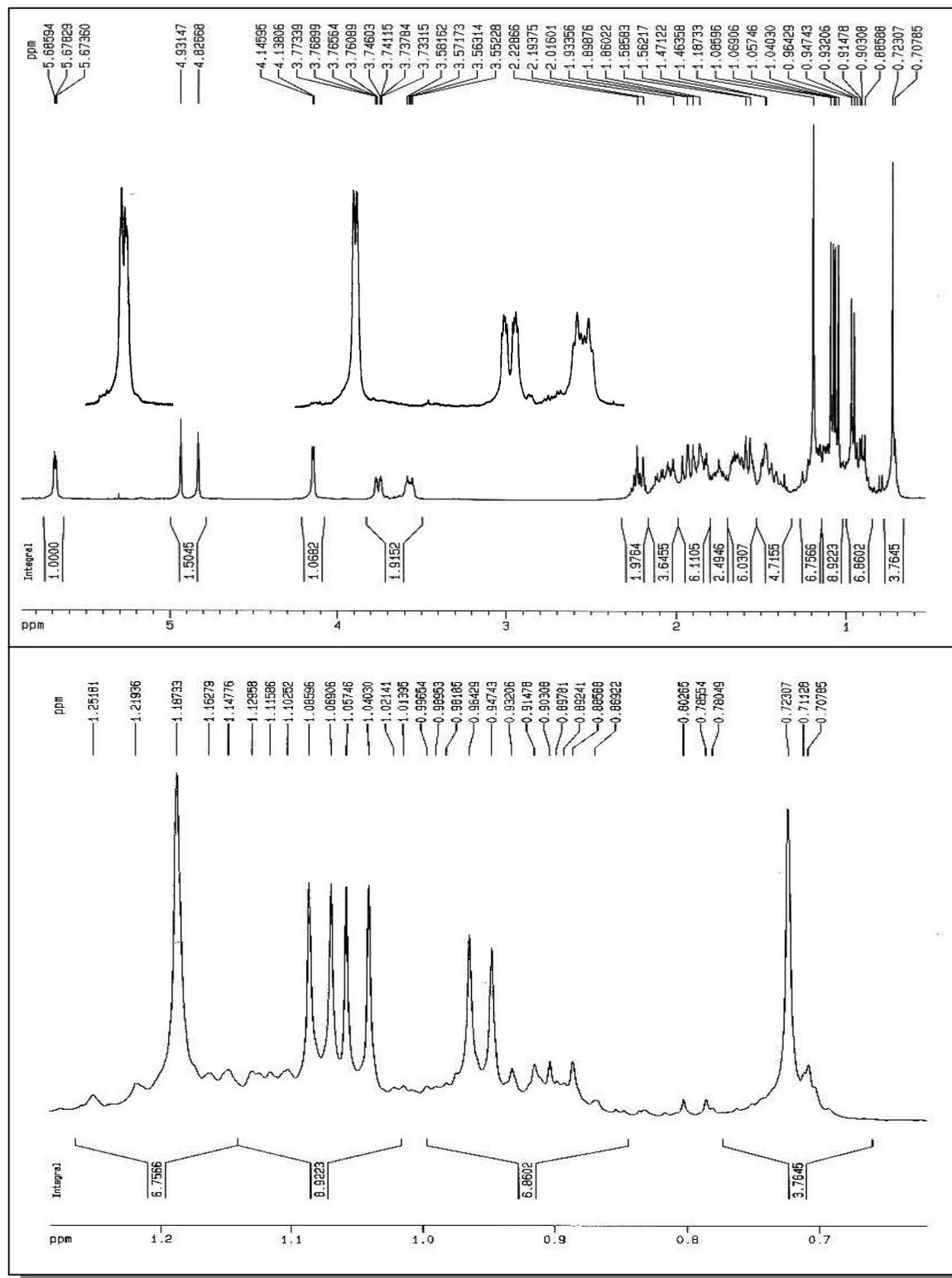


FIGURA 89- Espectro de RMN¹H da substância **24** e ampliação na região de metilas (400 MHz, CDCl₃)

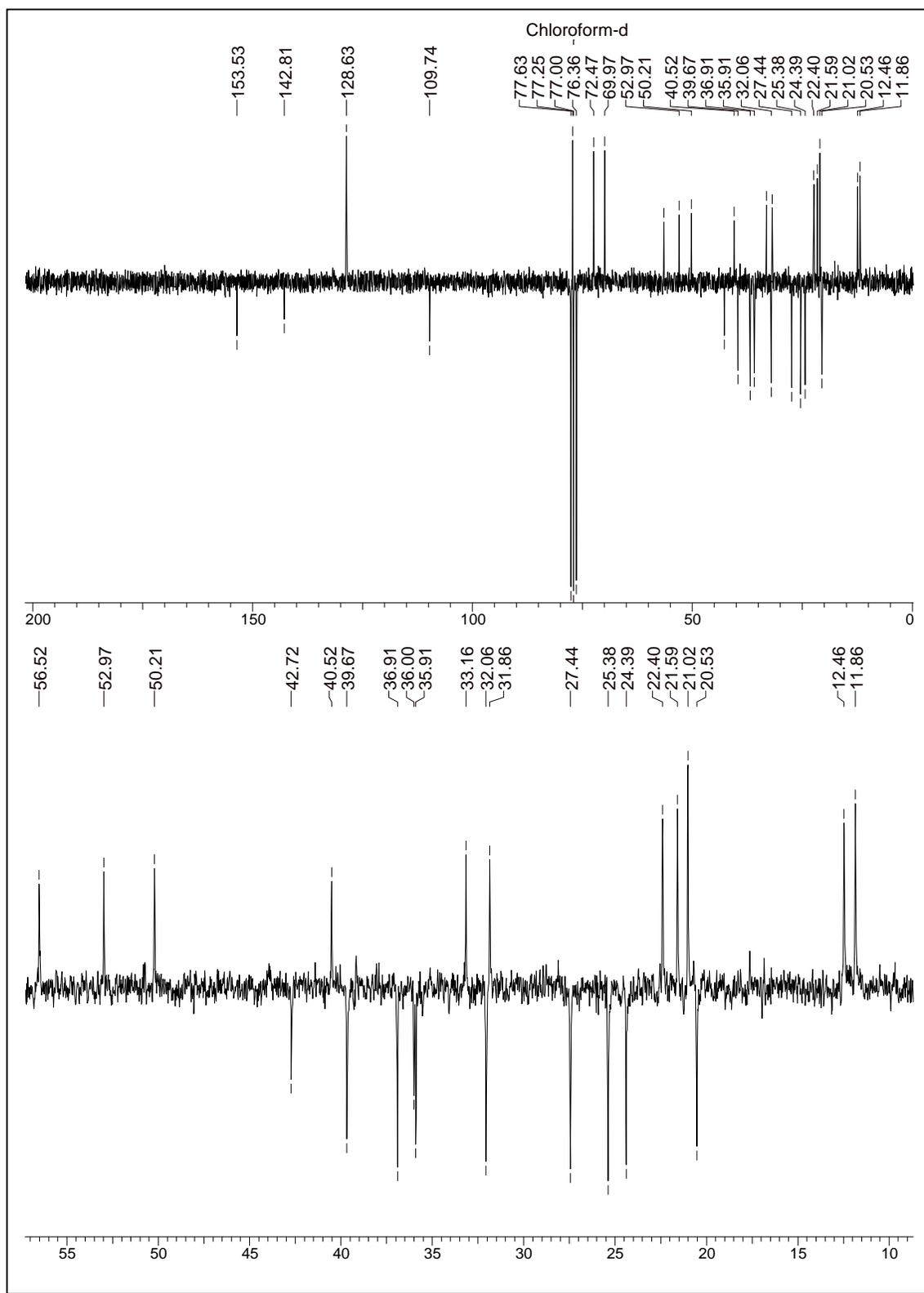


FIGURA 90- Espectro de RMN¹³C (pendant) da substância **24** e ampliação do espectro na região de 10 a 60 ppm (50 MHz, CDCl₃)

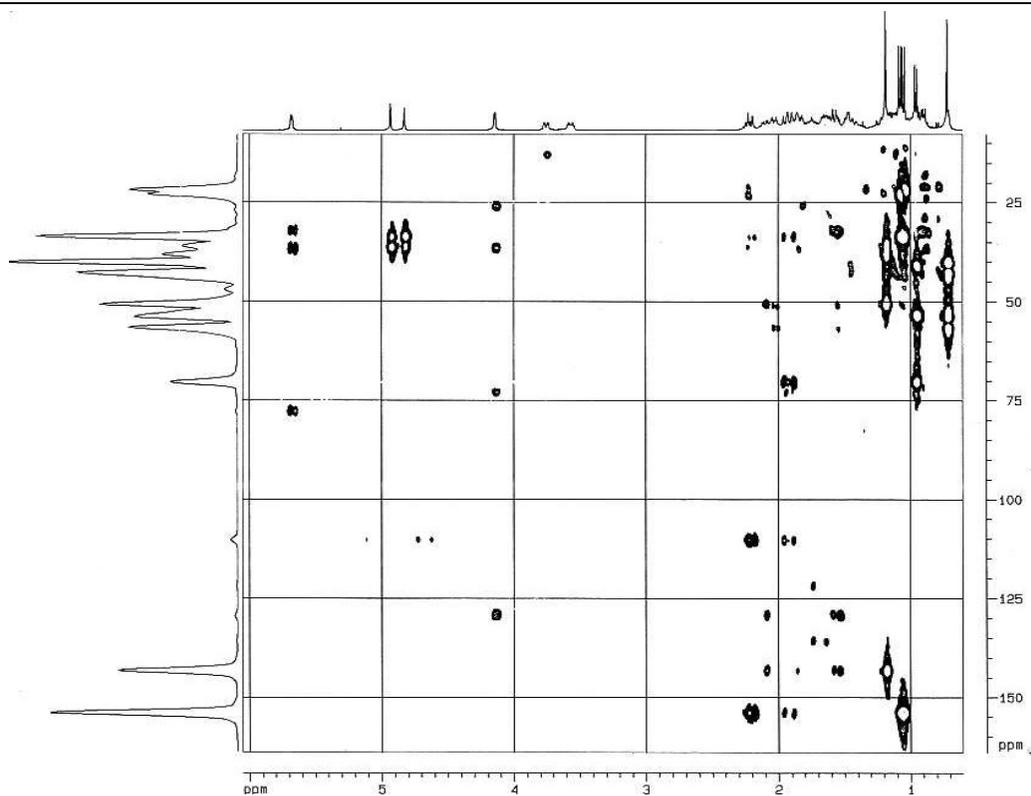


FIGURA 91- Mapa de contorno de HSQC da substância **24** (400 MHz, CDCl₃)

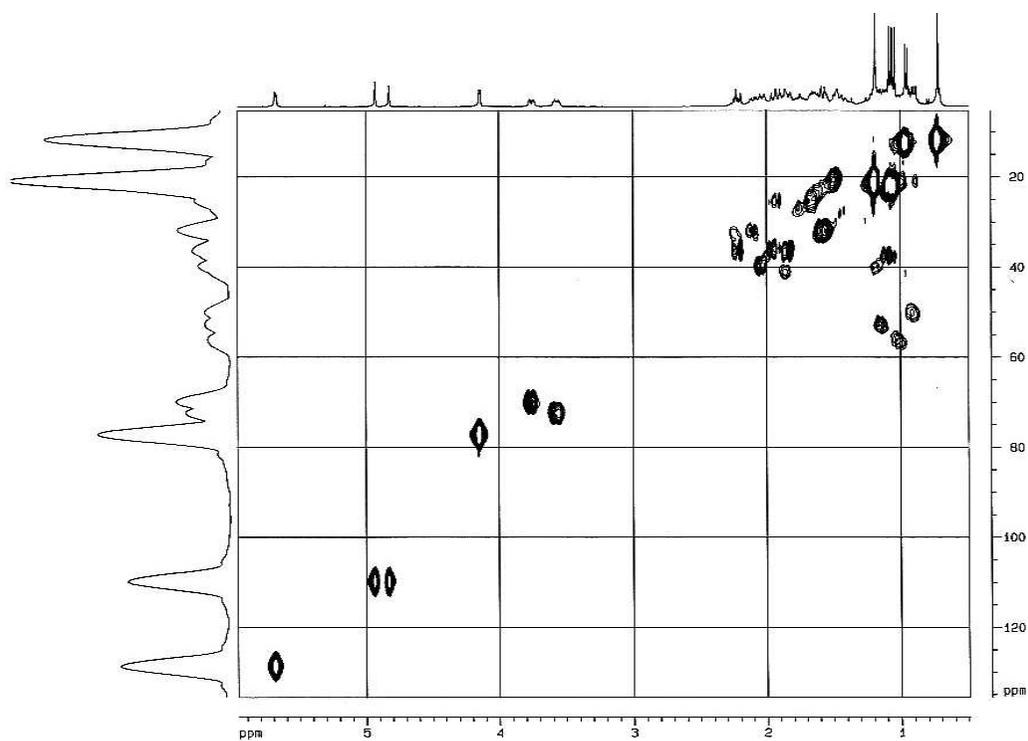


FIGURA 92- Mapa de contorno de HMBC da substância **24** (400 MHz, CDCl₃)

TABELA 24 - Dados de RMN¹H para as substâncias **22** a **24** (CDCl₃, 400 MHz)

Hidrogênios	22	23	24
H-3	3,51 (1H, dt,)	3,56 (1H, dt,)	3,56 (1H, dt, 12 Hz)
H-4	-	-	4,01 (1H, d, J=4,0 Hz)
H-6	5,35 (1H, d, J=4,0 Hz)	5,35 (1H, d, J=2,0 e 4,9 Hz)	5,68 (1H, dd, J=2,0 e 4,0 Hz)
H-22	-	3,76 (1H, ddd, J=2,0; 4,0 e 12,0 Hz)	3,76 (1H, ddd, J=2,0; 4,0 e 12,0 Hz)
H-31a	-	4,82 (1H, s)	4,82 (1H, s)
H-31b	-	4,82 (1H, s)	4,93 (1H, s)
-Me	0,67 (3H, s)	0,72 (3H, s)	0,72 (3H, s)
-Me	1,00 (3H, s)	0,95 (3H, d, J=6,8 Hz)	0,95 (3H, d, J=6,8 Hz)
-Me	1,00 (3H, s)	1,01 (3H, s)	1,04 (3H, d, J=6,8 Hz)
-Me	1,08 (3H, d, J=6,8 Hz)	1,04 (3H, d, J=6,8 Hz)	1,08 (3H, d, J=6,8 Hz)
-Me	1,18 (3H, s)	1,07 (3H, d, J=6,8 Hz)	1,18 (3H, s)

TABELA 25 - Dados de RMN¹³C para as substâncias **22** a **24** (CDCl₃, 50 MHz)

Carbonos	*22	*23	*24
1	36,51	37,24	36,91
2	39,78	31,61	25,38
3	71,82	71,75	72,97
4	42,32	42,25	77,25
5	140,76	140,79	142,81
6	121,71	121,56	128,63
7	33,96	35,89	32,06
8	36,14	31,88	31,86
9	50,13	50,12	50,21
10	34,69	34,89	36,00
11	21,09	21,06	20,53
12	36,51	36,48	35,91
13	45,84	42,71	42,72
14	56,77	56,35	56,52
15	24,30	21,06	24,39
16	31,68	27,43	27,44
17	56,07	53,00	52,97
18	11,86	11,83	11,86
19	19,02	19,35	21,02
20	40,48	40,50	40,52
21	18,78	12,45	12,46
22	37,25	69,95	69,97
23	129,29	39,47	39,67
24	138,31	153,55	153,35
25	31,25	33,14	33,16
26	19,81	21,38	22,59
27	19,39	21,58	22,40
31	-	109,73	109,75

*Os deslocamentos químicos dos carbonos foram atribuídos com base nos dados de pendant

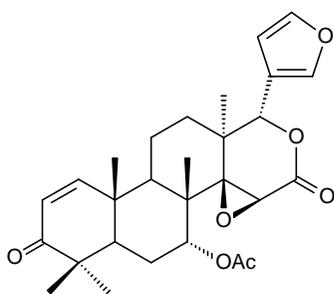
4.5.7- LIMONÓIDES

Estas substâncias foram isoladas através do fracionamento do extrato em diclorometano das sementes de *T. pallida*.

4.5.7.1- IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 25

Na análise do espectro de RMN¹H de **25** (figura 93, p. 152) foram observados cinco sinais a δ 1,06, 1,07, 1,16, 1,23, 1,25 integrando para três hidrogênios cada atribuídos a cinco metilas. Os sinais em δ 7,42 (1H, d, $J=10,2$ Hz) atribuído aos hidrogênios furânicos H-21 e 23, um sinal a δ 6,35 (1H, dd, $J=1,2$ e $1,2$ Hz) atribuído a H-22 e um singlete a δ 5,62 (1H, s) atribuído ao H-17. Dois sinais a δ 7,12 (1H, d, $J=10,2$ Hz) e δ 5,87 (1H, d, $J=10,2$ Hz) atribuídos para H-2 e H-1 e um singlete largo a δ 4,56 (1H, s) outro a δ 3,53 (1H, s) atribuído a H-15 e um a δ 2,11 (1H, s) atribuído a Me-32.

No espectro de RMN¹³C (figura 94, p. 152) observou-se a presença de 28 sinais. Um sinal de carbono carbonílico é observado a δ 204,2 e uma dupla ligação conjugada pelos sinais a δ 125,9 e 156,9 ppm. São observados também dois sinais de carbono carbinólico, formando um epóxido, em δ 69,7 e 56,8 um outro carbono carbonílico de lactona, pelo sinal a δ 167,4 atribuído ao C-16 e um grupo éster pelo sinal a δ 169,8 atribuído ao C-31. Estes dados caracterizavam um limonóide com anel C seco e comparando com os dados publicados na literatura (KHALID et al., 1989 e SIERRA et al., 1989) foi possível confirmar a estrutura da gedunina para a substância **25**.



Estrutura da gedunina

A gedunina foi o primeiro limonóide isolado na família Meliaceae, mas não havia sido encontrado em *Trichilia pallida*.

Este limonóide apresenta atividade antimalarial (MACKINNON et al., 1997) e inseticida (CHAMPAGNE et al., 1992).

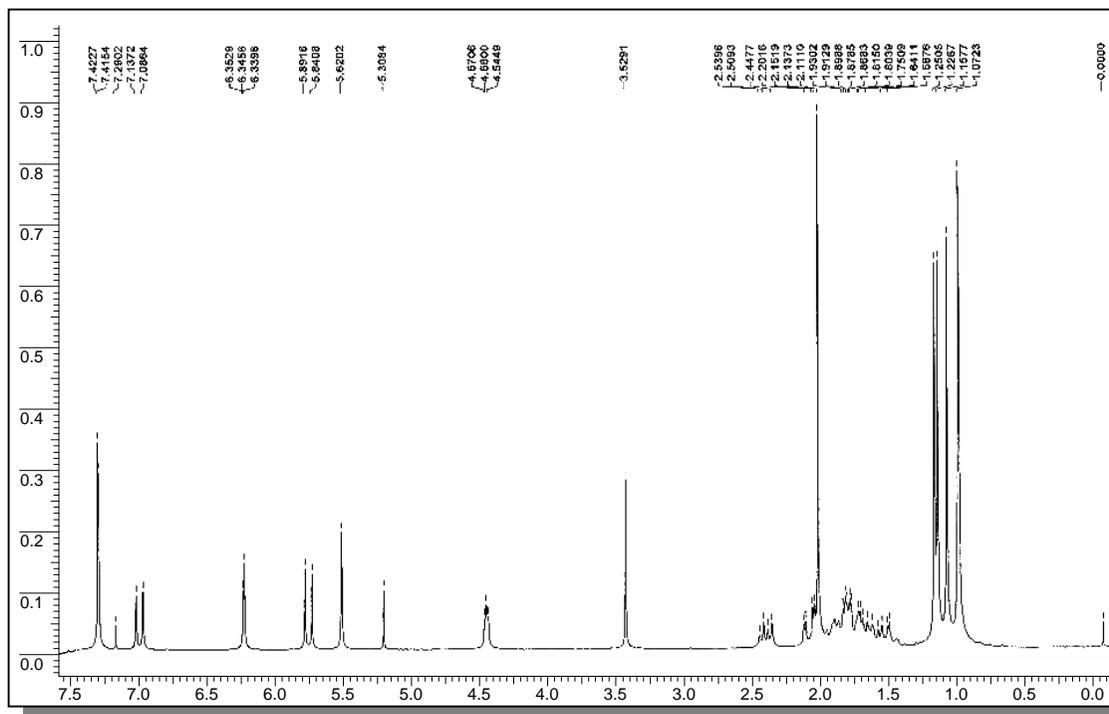


FIGURA 93 - Espectro de RMN¹H para a substância 25 (CDCl₃, 200 MHz)

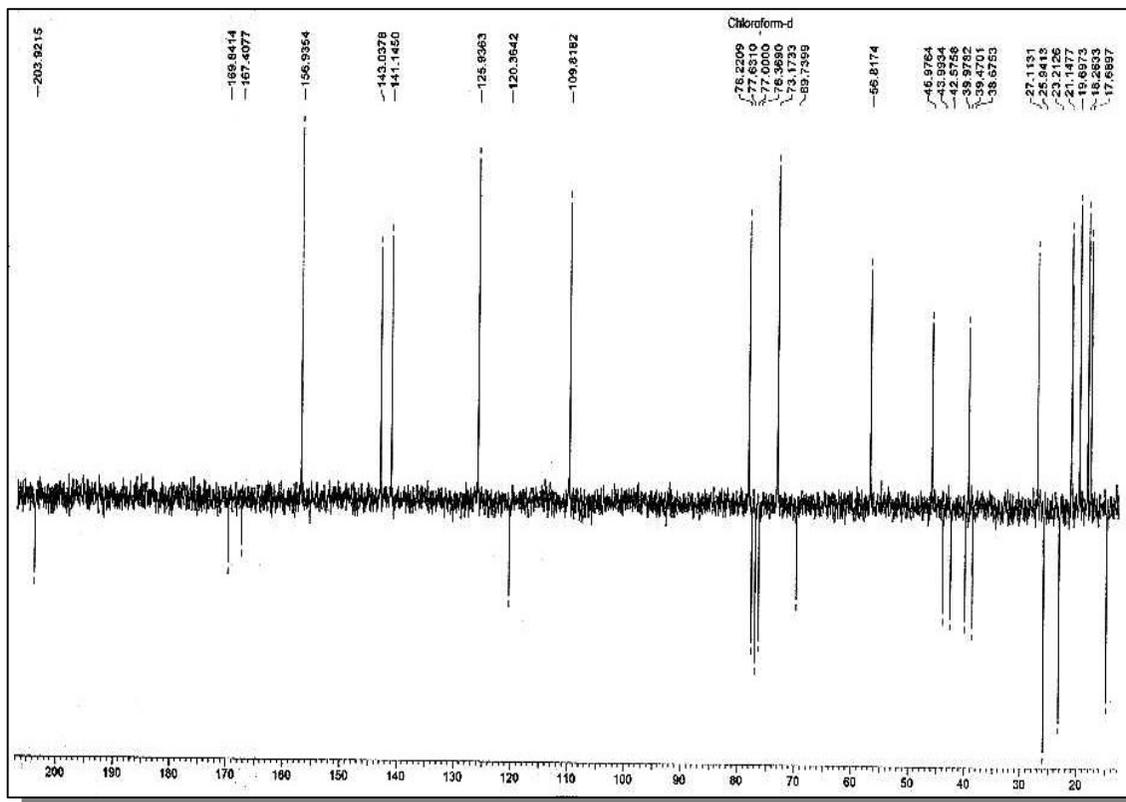


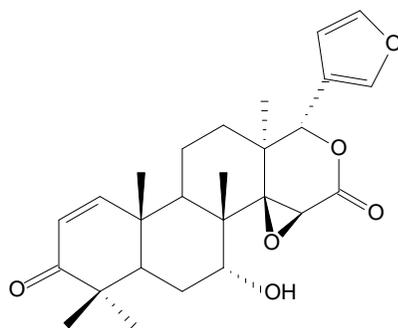
FIGURA 94 - Espectro de RMN¹³C (Pendat) da substância 25 (CDCl₃, 50 MHz)

4.5.7.2- IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 26

Na análise do espectro de RMN¹H de **26** (figura 95, p. 154) foram observados cinco sinais a δ 1,06 (3H, s), 1,24 (3H, s), 1,31(3H, s), 1,44 (3H, s), 1,45 (3H, s) atribuídos a cinco metilas. Os sinais em δ 7,41 (1H, d, $J=1,6$ Hz) e δ 7,40 (1H, d, $J=1,6$ Hz) atribuído aos hidrogênios furânicos H-21 e 23, um sinal a δ 6,34 (1H, dd, $J=1,2$ e 0,8 Hz) atribuído a H-22 e um singlete a δ 5,62 (1H, s) atribuído ao H-17. Dois sinais a δ 6,47 (1H, d, $J=12,0$ Hz) e δ 5,86 (1H, d, $J=12,0$ Hz) atribuídos para H-2 e H-1 e um singlete largo a δ 3,51(1H, s) e outro a δ 3,84(1H, s) atribuído a H-15.

No espectro de RMN¹³C (figura 96, p. 154) observa-se a presença de 26 sinais. Um sinal de carbono carbonílico é observado a δ 204,5 e uma dupla ligação conjugada pelos sinais a δ 125,7 e 157,6 ppm. Foram observados também dois sinais de carbono carbinólico, formando um epóxido, em δ 69,7 e 57,8 um outro carbono carbonílico de lactona em δ 168,2 no C-16. E um sinal em δ 78,5 atribuído pelo experimento de HSQC ao H-7. Ainda pelo experimento de HSQC (figura 99, p. 156) foi possível confirmar a posição da hidroxila.

Com os dados publicados na literatura (BENERGI et al., 1984) foi possível confirmar a estrutura da 7-desacetilgedunina para a substância **26**.



Estrutura da 7-desacetilgedunina

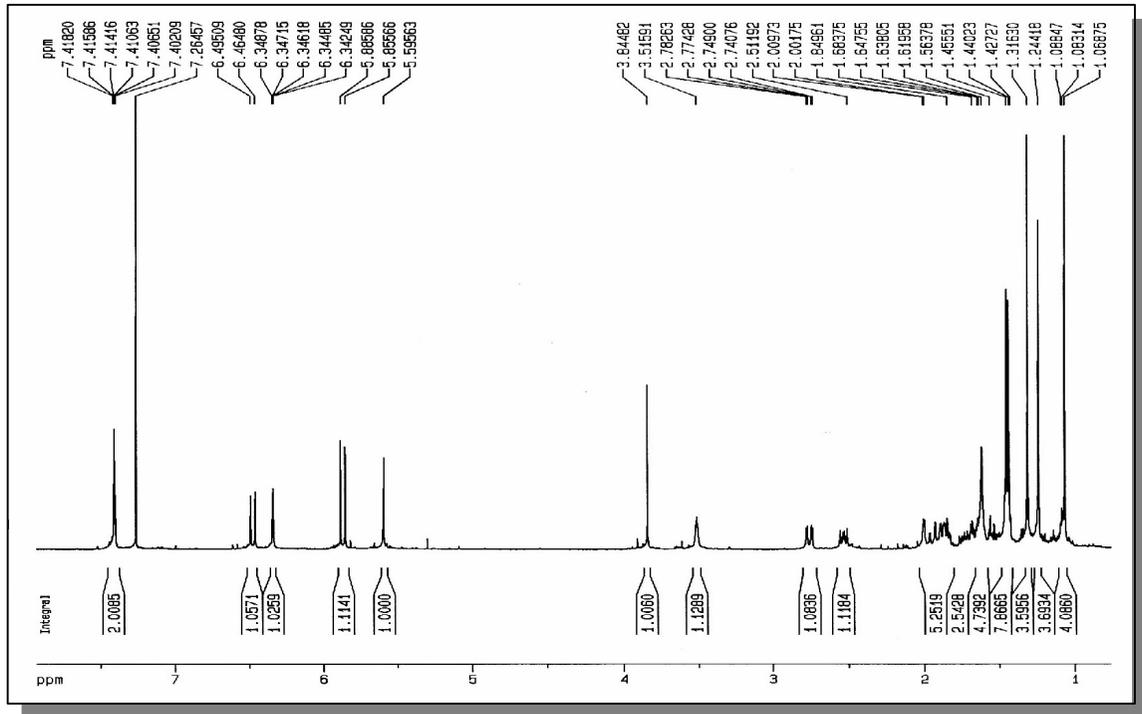


FIGURA 95 - Espectro de RMN¹H para a substância 26 (CDCl₃, 200 MHz)

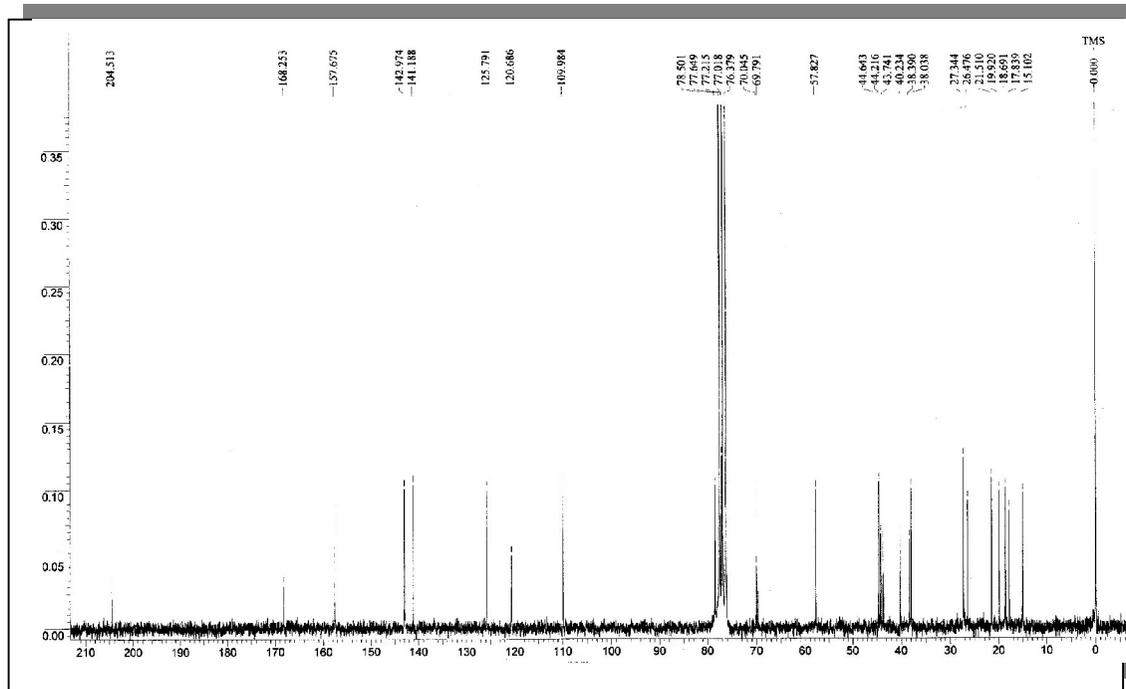


FIGURA 96 - Espectro de RMN¹³C para a substância 26 (CDCl₃, 50 MHz)

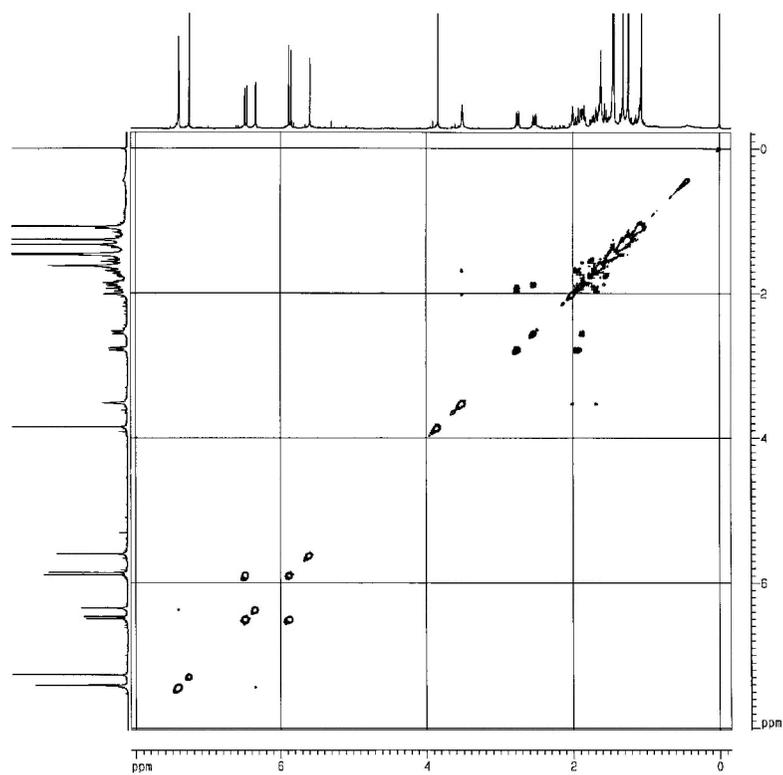


FIGURA 97- Experimento gCOSY da substância 26 (CDCl₃, 400 MHz)

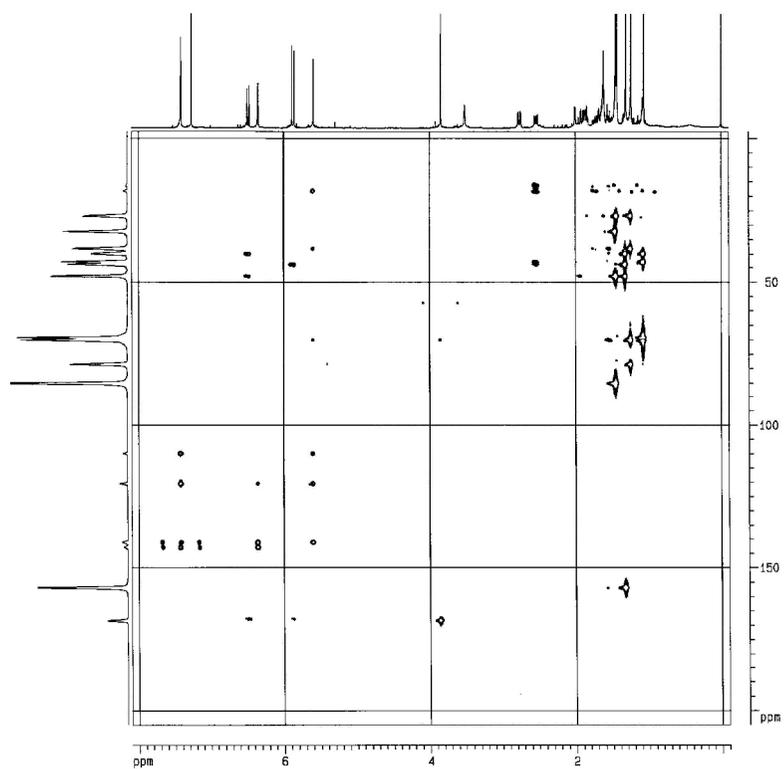


FIGURA 98- Experimento de gHMBC da substância 26 (CDCl₃, 400 MHz)

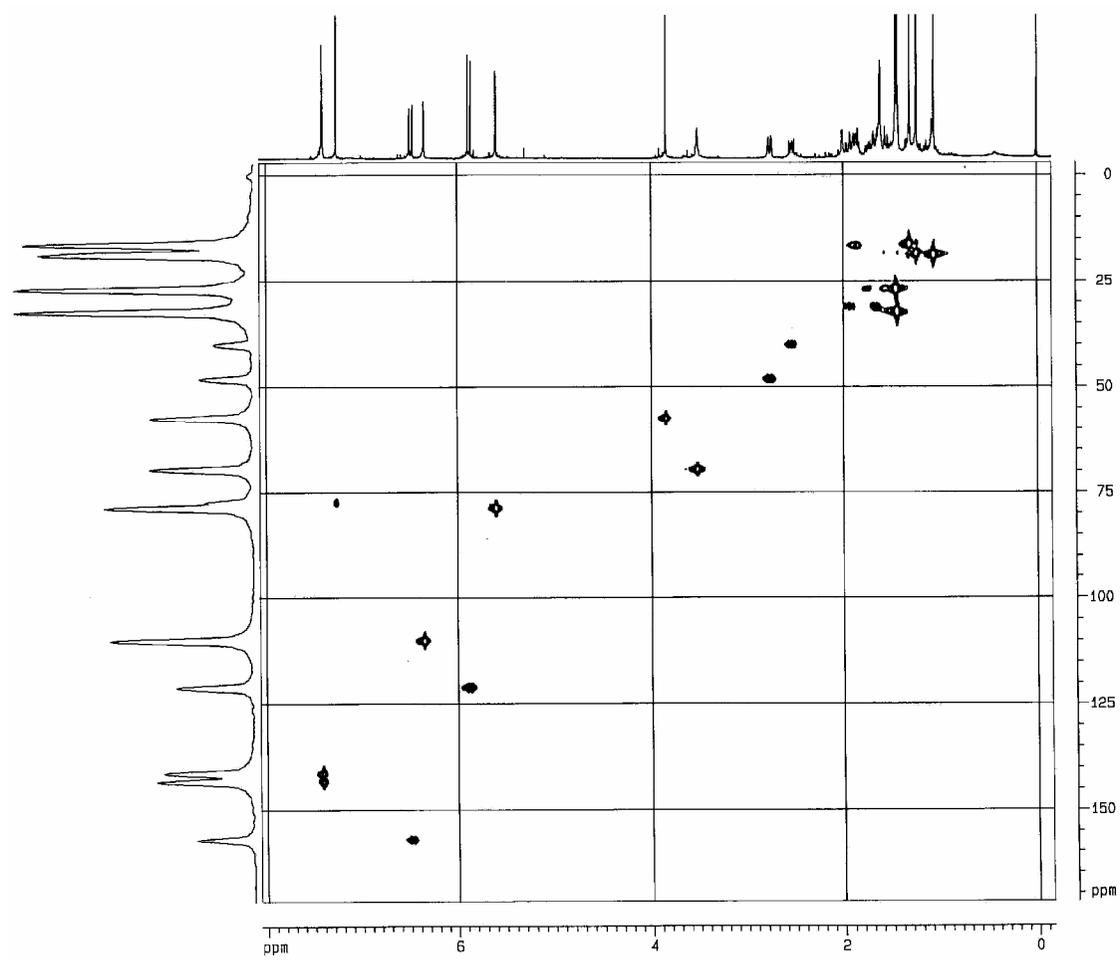


FIGURA 99 - Experimento de gHSQC da substância 26 (CDCl_3 , 400 MHz)

TABELA 26 - Dados de RMN¹H de **25** (CDCl₃, 200 MHz) e **26**(CDCl₃, 400 MHz)

Prótons	25	26
1	7,12 (1H, d, $J=10$ Hz)	6,47 (1H, d, $J=12$ Hz)
2	5,87 (1H,d, $J=10$ Hz)	5,86 (1H,d, $J=12$ Hz)
7	4,56 (s)	3,45 (s)
9	2,49 (1H,dd, $J=6,0$ e 12 Hz)	2,51 (dd, $J= 6,0$ e 12,0 Hz)
15	3,53 (s)	3,93 (s)
17	5,62 (s)	5,59 (s)
18	1,25 (s)	1,24 (s)
19	1,23 (s)	1,20 (s)
21	7,42 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	7,41 (1H, d, $J=1,6$ Hz)
22	6,35 (1H, dd, $J=1,6$ Hz)	6,35 (1H, dd, $J=1,6$ Hz)
23	7,42 (1H, d, $J=1,6$ Hz)	7,41 (m)
28	1,06 (s)	1,06 (s)
29	1,07 (s)	1,24 (s)
30	1,16 (s)	1,31 (s)
<u>MeCOO-</u>	1,11(s)	-

* Dados comparados com os obtidos por PAULA et al., 1997 (400 MHz, CDCl₃)
Constante de acoplamento entre parênteses calculada em Hz

TABELA 27 - Dados de RMN¹³C para **25** e **26** (CDCl₃, 50 MHz)

Carbonos	25	26
1	156,93	158,25
2	125,93	125,79
3	203,92	204,51
4	43,99	44,21
5	46,97	44,64
6	23,21	26,34
7	73,17	69,79
8	42,57	43,74
9	39,47	38,03
10	39,97	40,23
11	15,31	15,10
12	25,94	26,47
13	38,67	38,39
14	69,73	70,04
15	56,81	57,82
16	167,40	168,25
17	78,22	78,50
18	17,69	17,83
19	19,69	19,92
20	120,36	120,68
21	141,14	142,97
22	109,81	109,98
23	143,03	141,18
28	27,11	27,34
29	21,14	21,51
30	18,26	18,69
- <u>C</u> OOCH ₃	169,84	-
-COO <u>C</u> H ₃	23,21	-

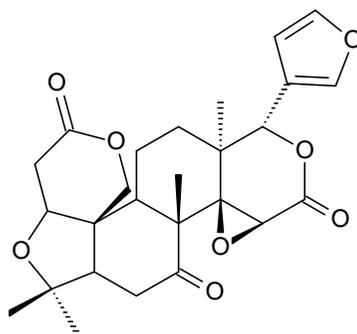
*Dados comparados com os obtidos por PAULA et al., (1997) (100 MHz, CDCl₃)

4.5.7.1.3- IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA 27

No espectro de RMN ^1H de **27** (figura 100, p. 160) foram observados sinais em δ 7,39 (1H, d, $J=1,6$ Hz), δ 7,38 (1H, s) atribuídos para H-21 e H-23 e δ 6,32 (1H, d, $J=1,6$ Hz) que foi atribuído para H-22 um sinal em δ 5,47(1H, s) atribuído a H-17 (característico de Anel D lactonizado). Dois dupletos centrado em δ 4,75 (1H, d, $J=12,0$ Hz) e δ 4,45 (1H, d, $J=12,0$ Hz) que foi atribuído aos dois hidrogênios ligados ao C-19. Foi ainda observada a presença de um sinal em δ 4,02 que integra para dois hidrogênios. Entre δ 3,1 e 2,2 foram observados sinais como quatro duplo dubleto. E três sinais como singletos em δ 1,06 (3H, s), 1,16 (6H, s) e outra em 1,28 (3H, s).

O espectro de RMN ^{13}C (figura 101, p. 160) obtido apresentou 26 sinais: os sinais em δ 206,1; 169,1 e 166,6 indicando a presença de três carbonilas na molécula. Dois carbonos carbonílicos de epóxido em δ 65,3 e 56,9 e mais dois carbinólicos em 79,1 e 65, 7 que foi atribuído aos carbonos C-4 e C-19.

Os dados obtidos eram característicos de um limonóide com anel A e D *seco* e comparando com os dados publicados na literatura (PATRA et al., 1988) foi possível confirmar a estrutura da limonina para a substância **27**.



Estrutura da Limonina

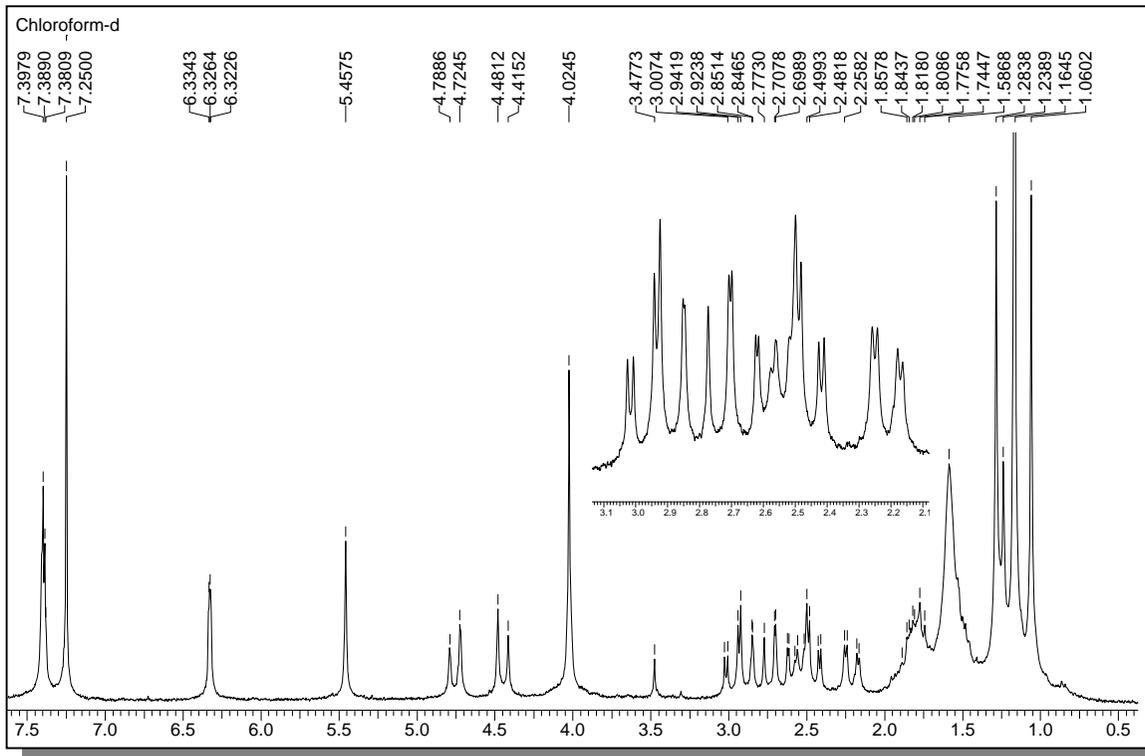


FIGURA 100 - Espectro de RMN¹H para a substância 27 (CDCl₃, 200 MHz)

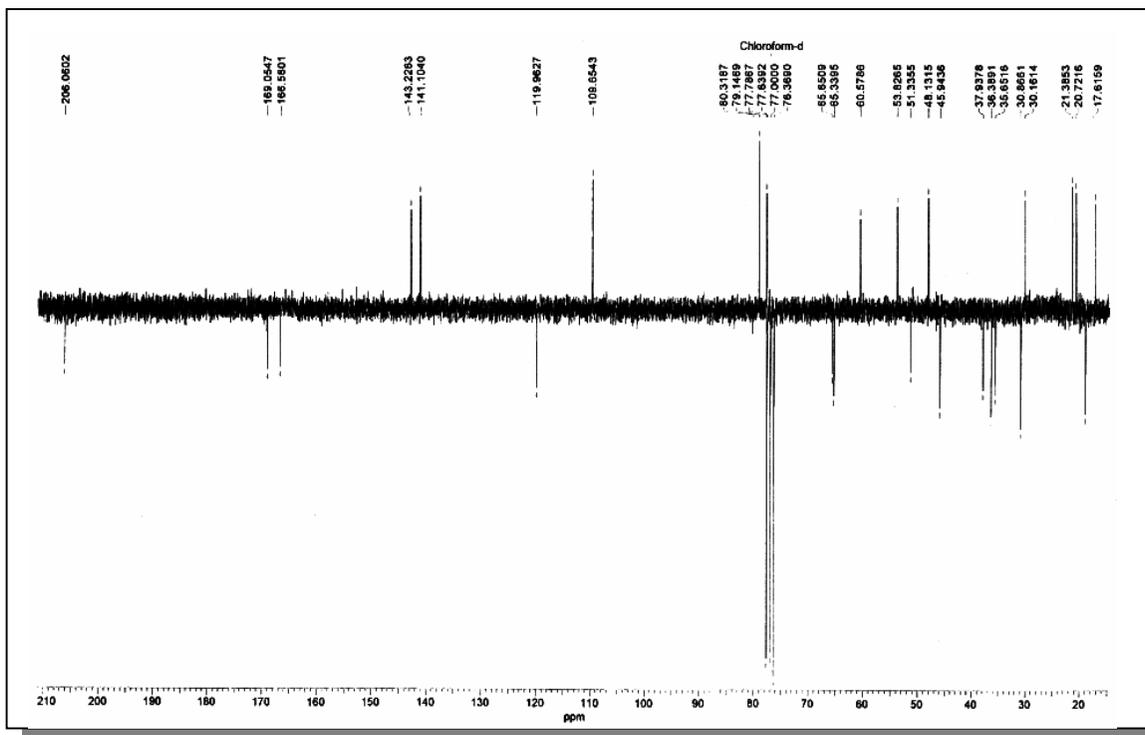


FIGURA 101 - Espectro de RMN¹³C (Pendant) para a substância 27 (CDCl₃, 50 MHz)

TABELA 28 - Dados de RMN¹H de **27** (CDCl₃, 200 MHz) e RMN¹³C (CDCl₃, 50 MHz)

Posição	* δ _H	δ _C
1	3,97 (s)	79,14
2	2,65 (1H, dd, <i>J</i> = 2,0 e 16,0 Hz) e 2,94 (1H, dd, <i>J</i> = 4,0 e 16,0 Hz)	35,65
3	-	169,05
4	-	80,31
5	2,22 (1H, dd, <i>J</i> = 4,0 e 16,0 Hz)	60,57
6	2,84 (1H, d, <i>J</i> = 16,0 Hz) e 2,43 (1H, dd, <i>J</i> = 4,0 e 14,0 Hz)	36,38
7	-	206,06
8	-	51,33
9	2,56 (1H, d, <i>J</i> = 12,0 Hz)	48,13
10	-	45,94
11	1,80 (m)	18,83
12	1,58 (sl)	30,86
13	-	37,93
14	-	65,71
15	4,02 (s)	53,82
16	-	166,58
17	5,40 (s)	77,63
18	-	20,72
19	4,45 (1H, d, <i>J</i> =12,0 Hz) e 4,75 (1H, d, <i>J</i> =12,0 Hz)	65,65
20	-	119,96
21	7,39 (1H, d, <i>J</i> =1,6 Hz)	141,10
22	6,32 (1H, d, <i>J</i> =1,6 Hz)	109,65
23	-	143,22
28	1,28 (3H, s)	30,16
29	1,16 (6H, s)	20,72
30	1,06 (3H, s)	17,61

*Dados comparados com Patra et al., 1988

4.5.8- FLAVONOIDES

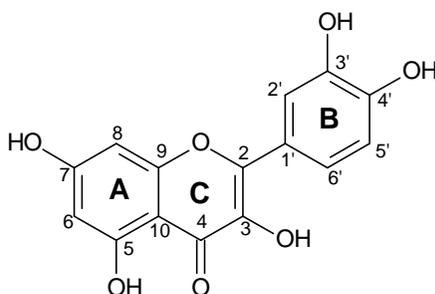
4.5.8.1- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 28

Essa substância foi isolada da fração em água do extrato em metanol do caule de *Trichilia pallida* como um pó amarelo e apresentou em CCD uma mancha vermelha após revelação com reagente de vanilina.

Da análise do espectro de RMN¹H utilizando o programa ZGPR, para pré-saturação do sinal da água (figura 102, p. 163) foram obtidas boas informações quanto à possível estrutura da substância onde foi observado um sinal em δ 7,61 (1H, dd, $J = 8,5$ e $2,1$ Hz) e outro em δ 6,89 (1H, d, $J=8,5$ Hz) e outro dubleto em δ 7,72 (1H, d, $J=2,1$ Hz) e dois dubletos em δ 6,38 (1H, d, $J=1,9$ Hz) e δ 6,18 (1H, d, $J= 1,9$ Hz) com acoplamento tipicamente *meta*.

No espectro de Pendant (figura 103, p. 163) foram observados sinais referentes a 15 carbonos sendo 10 deles quaternários.

Esta proposição foi confirmada pelo espectro de massas (Figura 104, p. 164), a qual foi feito no modo negativo que mostrou do pico do pseudo íon molecular (ESI, modo negativo) em m/z 301 (M-H) o que confirmou a fórmula molecular C₁₅H₁₂O₇. Finalmente, ainda foi feita uma comparação dos dados de RMN¹H e ¹³C (tabela 29, p. 168) da substância em questão com os relatados em literatura (AGRAWAL, 1989; MARKHAN & CHARI, 1982) para a quercetina.



Estrutura da Quercetina

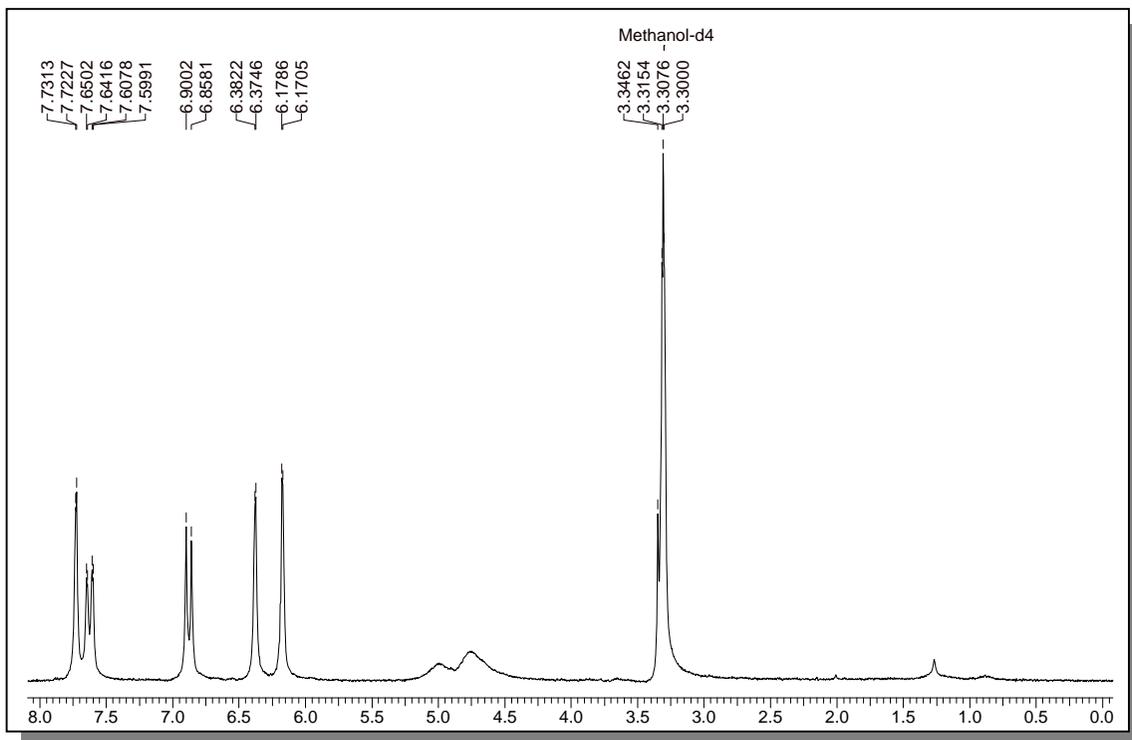


FIGURA 102- Espectro de RMN¹H para 28 (200 MHz, MeOD)

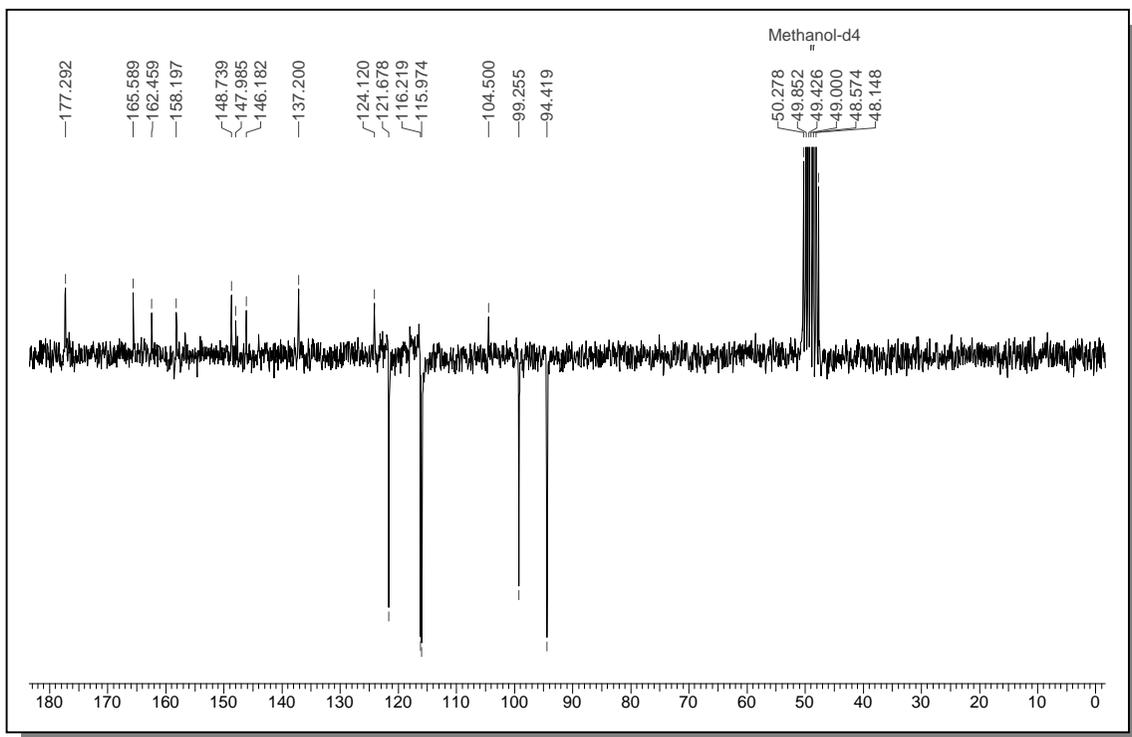


FIGURA 103- Espectro de RMN¹³C (Pendant) para 29 (50 MHz, MeOD)

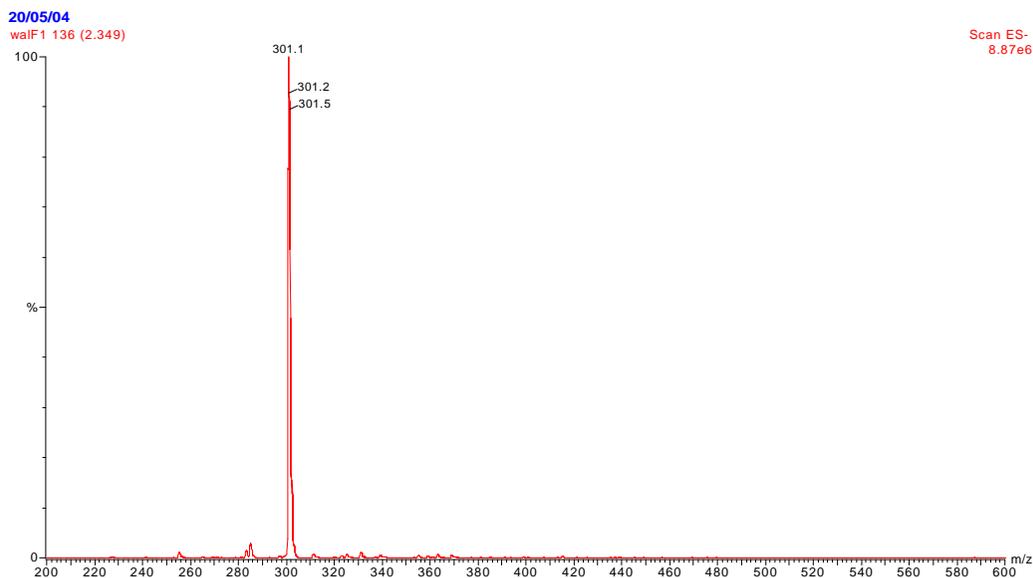


FIGURA 104 - Espectro de massas da substância 28

TABELA 29 - Dados de RMN¹H (200 MHz, MeOD) e RMN¹³C (50 MHz, MeOD) da substância 28

Posições	* δ_H	δ_C
2	-	148,3
3	-	136,7
4	-	176,7
5	-	157,5
6	6,18 (1H, d, $J=1,9$ Hz)	99,6
7	-	164,5
8	6,38 (1H, d, $J=1,9$ Hz)	95,0
9	-	161,4
10	-	104,4
1'	-	123,7
2'	7,73 (1H, d, $J=2,1$ Hz)	116,5
3'	-	145,7
4'	-	148,0
5'	6,89 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	116,9
6'	7,64 (1H, dd, $J=1,9$ e $8,5$ Hz)	122,0

* Dados comparados com os descritos por AGRAWAL, (1989) e MARKHAN & CHARI, (1982).
Constante de acoplamento entre parênteses calculada em Hz

4.5.8.2- IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 29

Assim como foi observado para a substância 28, a análise do espectro de RMN¹H (figura 105, p. 167) mostra sinais que caracterizam um sistema de substituição nas posições 3' e 4' no anel B pelos sinais em δ 7,32 (sl, 2H), um sinal em δ 7,28 (dd, 2H, $J=2,0$ Hz), um sinal em δ 6,90 (d, 2H, $J= 8,0$ Hz).

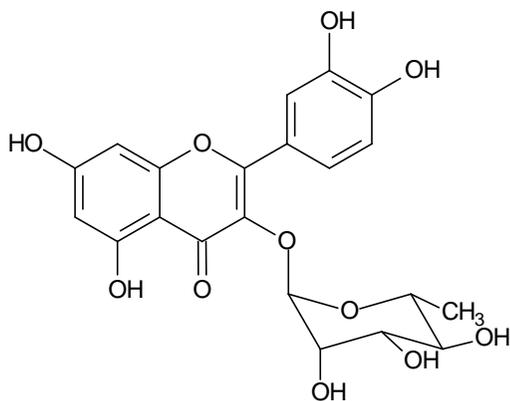
Foram observados também sinais em δ 6,36 (d, 2H, $J= 2,1$ Hz) e o outro em δ 6,19 (d, 2H, $J=2,1$ Hz) que são característicos de um sistema de acoplamento AB no anel A. Sinais entre 3,0 e 4,5 revelam que a amostra tratava-se de um flavonóide glicosilado, e esta afirmação é confirmada pelos sinais em δ 4,21 (dd; $J=3,2$ e 1,4 Hz), δ 3,74 (dd, $J= 3,2$ e 9,0), δ 3,41 (m) que indicam a presença de uma unidade de açúcar na molécula. O sinal em δ 0,92 (d, $J=5,8$ Hz) caracteriza o grupo metila de uma unidade de ramnose e o sinal em δ 5,34 (d; $J=1,4$ Hz), confirma que a ligação entre o açúcar (H-1') e a aglicona (C-3) tem configuração α .

Através da análise do espectro de RMN¹³C (figura 106, p. 167) foi possível observar um sinal em δ 103,9 atribuído ao carbono anomérico, um sinal em δ 180,1 atribuído à carbonila de flavonol, sinais referentes aos carbonos carbinólicos entre δ 72,3 e 73,7 e o sinal em δ 18,1 atribuído à metila da ramnose.

A estereoquímica do carbono anomérico da ramnose foi determinada basicamente por dados comparativos (AGRAWAL, 1989), sabendo-se que quando o flavonol liga-se ao açúcar pela sua face α o anel B é impedido de assumir coplanaridade com o anel C, devido ao efeito estérico, o que faz com que haja uma diminuição da conjugação com o C-1', assumindo um deslocamento químico em torno de 130 ppm [α -quercetina]. No entanto, quando o flavonol liga-se pela face β do açúcar é possível haver conjugação entre os anéis C e B e o C-1' passa a ter deslocamento químico em torno de 121 ppm [β -quercetina] quando o espectro feito em dimetilsulfoxido deuterado (AGRAWAL, 1989; MARKHAN & CHARI, 1982).

Comparando-se os dados obtidos com os da α e β -quercetina (VOIRIN et al., 1980) foi possível identificar a substância **30** como sendo a 3-O- β -ramnosil quercetina também denominada de quercetrina.

Este flavonóide apresenta atividade antimicrobiana (OGUNDIPE et al., 2001) e quercetina e alguns derivados glicosilados afetam o desenvolvimento de alguns insetos (SIMMONDS et al., 1999; SIMMONDS, 2001).



Estrutura da 3-O- β -ramnosil quercetina

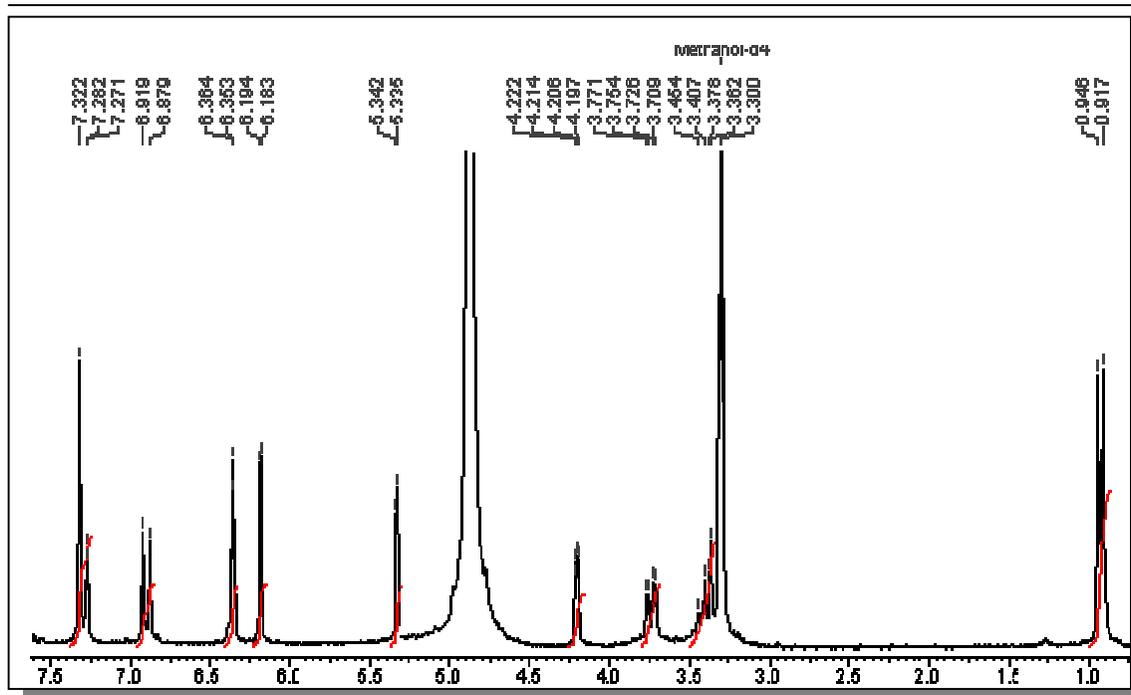


FIGURA 105- Espectro de RMN ^1H da substância **29** (200 MHz, MeOD)

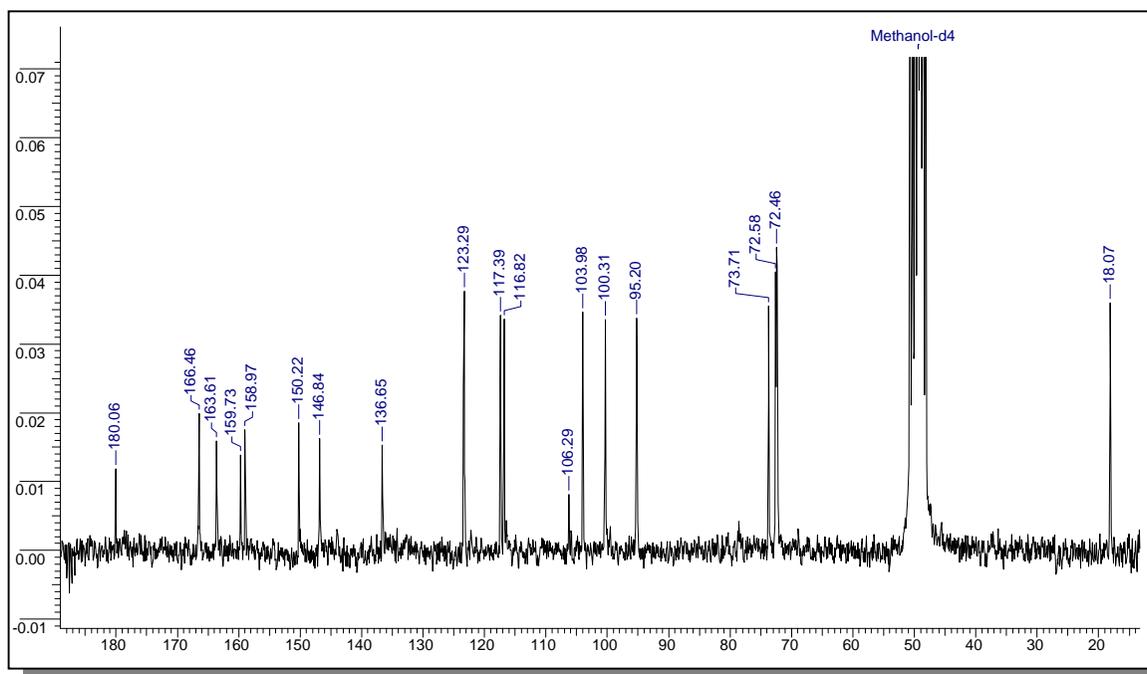


FIGURA 106- Espectro de RMN ^{13}C da substância **29** (50 MHz, MeOD)

TABELA 30 - Dados de RMN¹H (200 MHz, CD₃OD) e RMN¹³C (50 MHz, CD₃OD) da substância **29**

Posições	δ_H	δ_C
2	-	159,73
3	-	136,65
4	-	180,06
5	-	163,61
6	6,18 (1H, d, $J=1,9$ Hz)	100,31
7	-	166,46
8	6,35 (1H, d, $J=1,9$ Hz)	95,20
9	-	158,97
10	-	106,29
1'	-	123,29
2'	7,89 (1H, d, $J=2,1$ Hz)	117,39
3'	-	146,84
4'	-	150,22
5'	6,89 (1H, d, $J=8,5$ Hz)	116,82
6'	7,64 (1H, dd, $J=1,9$ e $8,5$ Hz)	123,62
1''	5,31(s)	103,62
2''	3,24 (sl)	72,58
3''	3,56 (1H, dd, $J=1,9$ e $8,5$ Hz)	72,91
4''	3,24 (m)	73,71
5''	4,04 (m)	72,46
6''	0,88 (3H, d, $J=5,7$ Hz)	18,07

* Dados comparados com os descritos por VOIRIN et al., (1980) e AGRAWAL, (1989)
Constante de acoplamento entre parênteses calculada em Hz

4.6 - RESULTADOS DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.6.1 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS

4.6.1.1 - Ensaio de inibição da enzima gGAPDH de *T. cruzi* com os extratos de *A. fusciflorus*, *T. pallida* e *T. rubra*

Inicialmente todos os extratos obtidos de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* foram submetidos a ensaio de inibição da enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

Na tabela 31 são apresentados os resultados obtidos e observa-se que os extratos em metanol de folhas e galhos de *T. rubra* apresentaram maior potencial de inibição da enzima (acima de 90 %).

TABELA 31 - Atividade inibitória dos extratos de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

Plantas	Extratos	Inibição enzimática (%)
<i>Trichilia pallida</i>	EHFTP	40
	EMFTP	28
	EHGTP	31
	EMGTP	43
<i>Trichilia rubra</i>	EHFTR	8
	EMFTR	91
	EHGTR	24
	EMGTR	92
<i>A. fusciflorus</i>	EHFA	7
	EMFA	5
	EHRA	16
	EMRA	10

- INFLUÊNCIA DAS FRAÇÕES NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA gGAPDH de *T. cruzi*

- AS FRAÇÕES DE *A. fusciflorus* E A INIBIÇÃO DA ENZIMA gGAPDH

Comparando-se os resultados obtidos de extratos e as suas respectivas frações foi observada uma potencialização da atividade inibitória em algumas frações, principalmente FM, FAc e FNB (Figura 107).

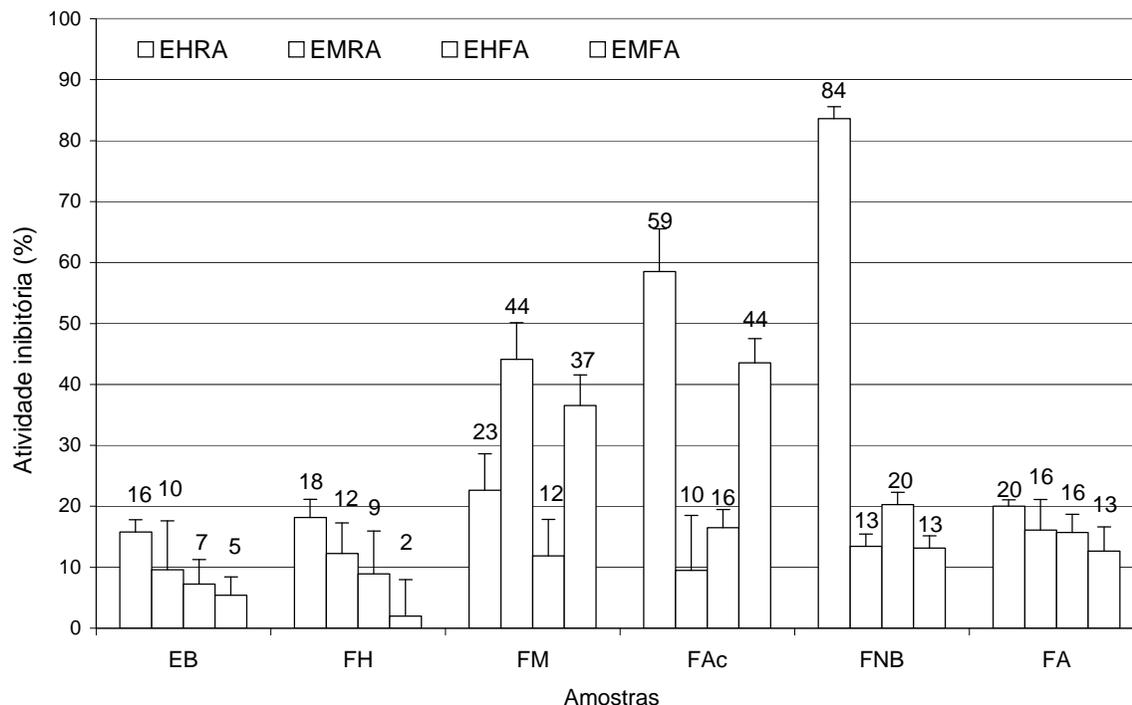


FIGURA 107 - Inibição dos extratos e frações de *A. fusciflorus* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*

Todas as frações provenientes do extrato em hexano da raiz (EHRA) inibiram mais a atividade da enzima que o extrato de origem, sendo que, as frações em metanol, acetato de etila e n-butanol apresentaram inibições de 23, 59 e 84%, respectivamente.

O extrato em metanol das raízes que apresentava inibição de 10%, ao ser fracionado, apresentou, na fração em metanol, inibição de 44%. Embora este valor não seja um bom resultado do ponto de vista biológico esta informação significa que houve uma concentração de substâncias que de alguma forma inibiam esta enzima, nesta fração e por isso esta foi investigada fitoquimicamente.

O extrato em hexano das folhas que apresentou inibição de 17%, ao ser fracionado, algumas frações inibiram mais a atividade da enzima mais ainda assim, não muito, já que o maior valor obtido foi para a fração em n-butanol (20%).

O extrato em metanol de folha que apresentou inibição de 15% ao ser fracionado algumas frações apresentaram inibições da atividade da enzima, sendo as mais significativas as frações em metanol e em acetato de etila, apresentando inibição de 37 e 44% respectivamente e pelo mesmo motivo que o EMRA foram submetidas a fracionamento cromatográficos.

- ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE FRAÇÕES ATIVAS DE *A. fusciflorus*

Fracionamentos sucessivos de FM-EMRA, FM-EHRA e FM-EMFA levaram ao isolamento de algumas substâncias que foram submetidas ao ensaio de inibição nas mesmas condições em que foram realizados com as frações e extratos.

TABELA 32- Atividade inibitória das substâncias isoladas de *A. fusciflorus* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

EXTRATO	FRAÇÃO	SUBSTÂNCIA	IC ₅₀ (μM)
EHRA	FH e FM	1	184
		2	208
		3	179
EMRA		8	198
		9	205
		10	208
		11	175
		12	189
		13	221
		14	217
EMFA		5	275
		6	235
		7	220

- AS FRAÇÕES DE *T. pallida* E A INIBIÇÃO DA enzima gGAPDH

Embora os extratos causassem pouca inibição da atividade da enzima, algumas frações apresentaram potencial inibitório o que levou a concluir que com a continuação dos fracionamentos poderia levar ao isolamento de alguma(s) substância(s) ativa(s).

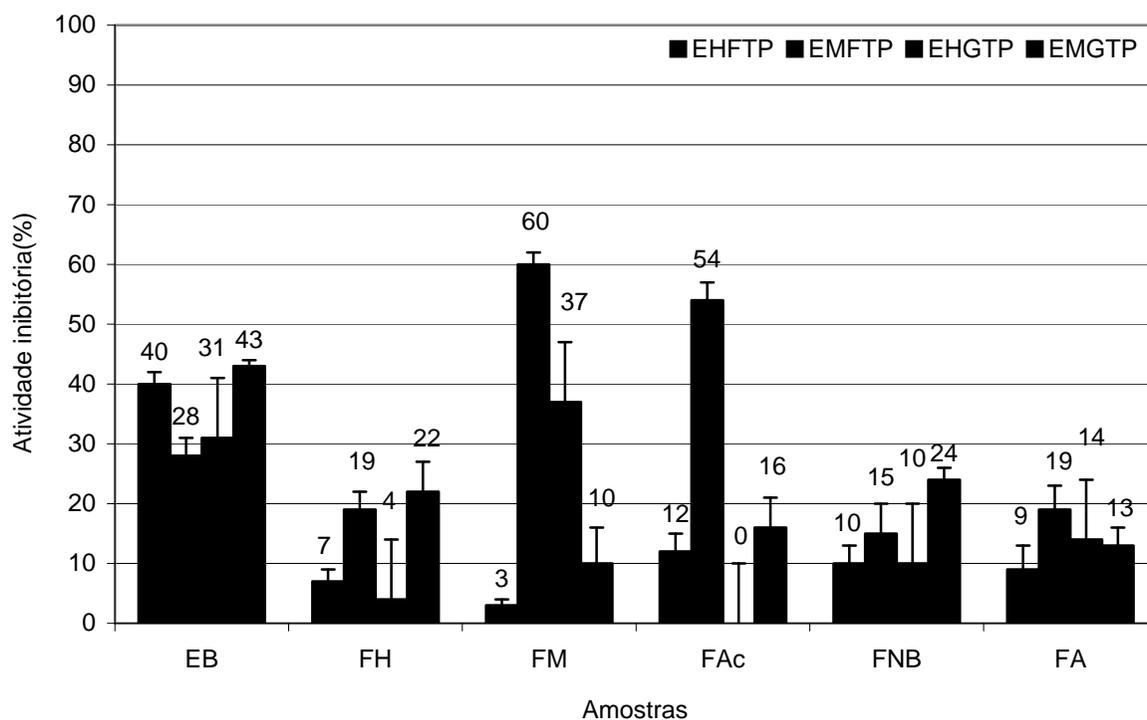


FIGURA 108 - Atividade inibitória dos extratos brutos e frações de *T. pallida* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*

O extrato em metanol de folha que apresentou inibição de 28% ao ser fracionado apresentou potencial inibitório sendo os mais significativos às frações em metanol e em acetato de etila, apresentando inibição de 60 e 54% respectivamente.

- ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS *T. pallida*

As frações FM-EMFTP e FA-EMFTP foram submetidas a sucessivos fracionamentos cromatográficos e algumas substâncias foram isoladas e tiveram sua atividade inibitória frente à enzima avaliada (tabela 33).

TABELA 33 - Atividade inibitória das substâncias isoladas de *T. pallida* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

EXTRATO	FRAÇÃO	SUBSTÂNCIA	Conc. (μ M)	I.E (%)
EMFTP	FAc e FA	28	100	54
		29	100	42

I.E =Inibição enzimática

Alguns flavonóides tiveram sua atividade avaliada MORAES et al., (2003), no entanto, nenhum dos que haviam sido submetidos ao ensaio frente a GAPDH eram derivados da quercetina. Por isso essa e a primeira descrição deste tipo de atividade para estas substâncias.

- AS FRAÇÕES DE *T. rubra* E A INIBIÇÃO DA ENZIMA gGAPDH

As frações obtidas da partição líquido-líquido foram submetidas a ensaio frente à enzima gGAPDH (Figura 109).

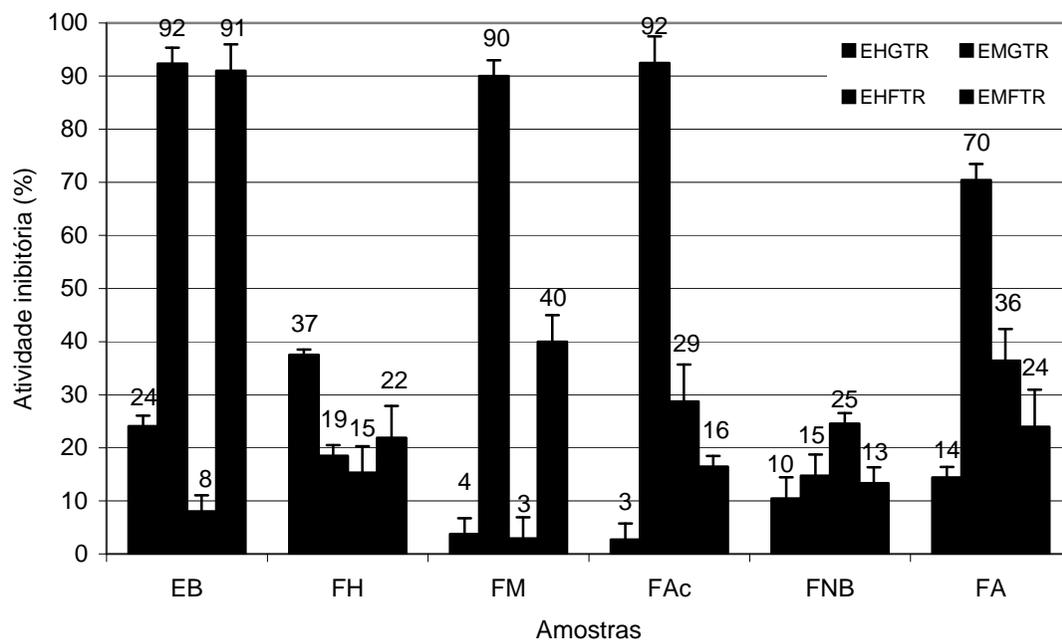


FIGURA 109 - Atividade inibitória dos extratos brutos e frações de *T. rubra* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*

O fracionamento do extrato em metanol de galho resultou em frações com potencial de inibição frente enzima: a fração FM-EMGTR com inibição enzimática de 90% e a fração FAc-EMGTR com inibição de 92%.

Já o extrato EMFTR inibia em quase 100% a atividade da enzima gGAPDH apresentou na fração FM inibição de 40%.

- ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *T. rubra*

As frações provenientes do extrato em metanol de galho que inibiram a atividade da enzima foram submetidas a fracionamentos cromatográficos utilizando várias metodologia e fases, no entanto devido à alta complexidade não foi até o momento isolada nenhuma substância.

As frações FM-EHGTR e (FH-EMGTR) foram submetidas a sucessivos fracionamentos cromatográficos e algumas substâncias foram isoladas e tiveram sua atividade inibitória avaliada frente à enzima (tabela 34).

TABELA 34 - Atividade inibitória das substâncias isoladas de *T. pallida* frente à enzima gGAPDH de *T. cruzi*.

EXTRATO	FRAÇÃO	SUBSTÂNCIA	Conc. (μ M)	I.E (%)
EHFTR	FH	14	123	39
EMFTR	FM	17	100	12
		18	100	15
		23	100	38
		24	100	45

I.E =Inibição enzimática

4.6.1.2 - ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA ENZIMA APRT DE *L. tarentolae* COM OS EXTRATOS DE *A. fusciflorus*, *T. pallida* e *T. rubra*

Os extratos de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* foram submetidos a ensaio de inibição da enzima APRT de *L. tarentolae* e os resultados obtidos mostram que os extratos em metanol de folhas e galhos de *T. rubra* apresentaram, comparando com os outros extratos, maior inibição da enzima.

Tabela 35 - atividade inibitória dos extratos de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* frente à enzima APRT de *L. tarentolae*.

Plantas	Extratos	I. E. (%)
<i>Trichilia pallida</i>	EHFTP	38
	EMFTP	5
	EHGTP	41
	EMGTP	56
<i>Trichilia rubra</i>	EHFTR	39
	EMFTR	71
	EHGTR	43
	EMGTR	74
<i>A. fusciflorus</i>	EHFA	27
	EMFA	2
	EHRA	29
	EMRA	26

I.E. =Inibição enzimática

Para confirmar a atividade dos extratos, estes foram submetidas à partição líquido-líquido e as frações resultantes foram submetidas ao ensaio frente a esta enzima e o resultado obtido será discutido separadamente para cada planta.

- INFLUÊNCIA DAS FRAÇÕES DE *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* NA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA APRT de *L. tarentolae*

- AS FRAÇÕES DE *A. fusciflorus* E A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA APRT de *L. tarentolae*

Foi verificado (figura 110) que o fracionamento dos extratos através da partição líquido-líquido, levou a um aumento da atividade inibitória em algumas frações e que as frações menos polares foram as que causaram maior inibição enzimática.

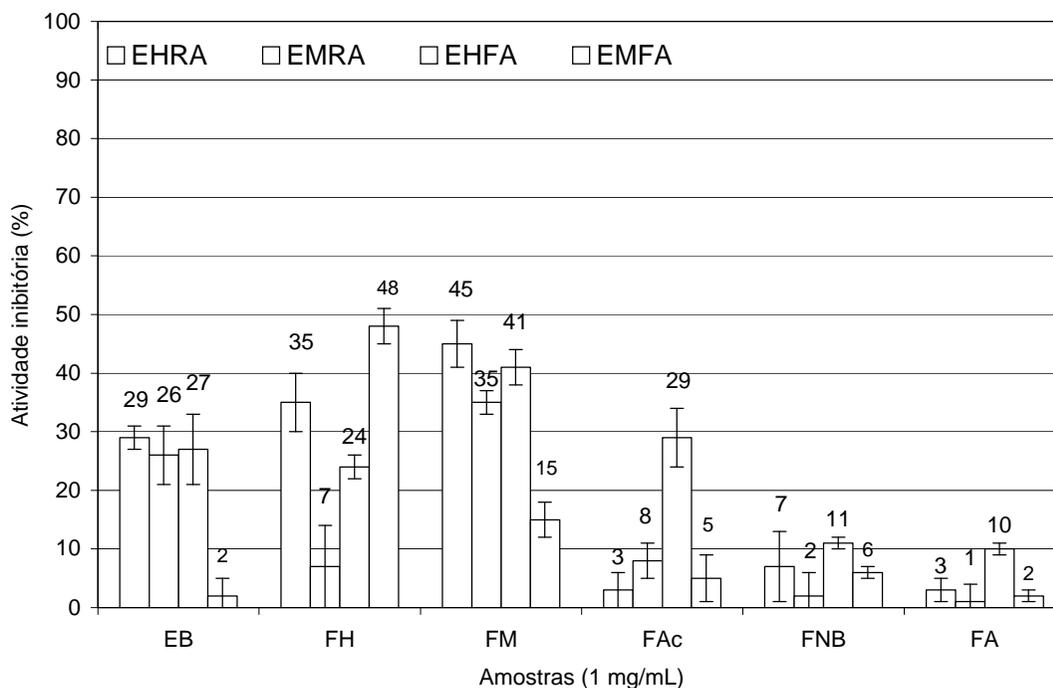


FIGURA 110 - Atividade inibitória dos extratos e frações de *A. fusciflorus* frente à enzima APRT de *L. tarentolae*

As frações FH e FM provenientes da partição líquido-líquido do extrato em hexano da raiz (EHRA) inibiram, comparativamente mais, a atividade da enzima que o extrato. Para o EMRA a fração mais ativa foi a em metanol (FM) e para o extrato em EMFA a única fração que foi considerada ativa foi a fração em hexano (FH).

O extrato em hexano de raiz (EHRA) foi o que apresentou o maior número de frações que inibiram a atividade da enzima, FH (35%) e FM (45%).

- ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE FRAÇÕES ATIVAS

Algumas substâncias isoladas foram submetidas ao ensaio de inibição da enzima APRT (tabela 36), na concentração de 100 μM .

TABELA 36 - Atividade das substâncias isoladas de *A. fusciflorus* frente à inibição da enzima APRT de *L. tarentolae*

EXTRATO	FRAÇÃO	SUBSTÂNCIA	IC ₅₀ (μM)
EHRA	FH e FM	1	147
		2	144
		3	121
EMRA		8	262
		9	151
		10	199
		11	142
		12	121
		13	150
		EMFA	5
6			142
7			130

A atividade inibitória da enzima APRT pelas substâncias **1** (SILVA et al., 2003), **11** (NAPOLITANO et al., 2003a) e **6** (NAPOLITANO et al., 2003b) foram recentemente publicadas e para as substâncias 2, 3, 5, 7, 10 e 13 são pela primeira vez aqui apresentada.

- AS FRAÇÕES DE *T. pallida* E A INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE APRT de *L. tarentolae*

Foi observado (figura 111) que o extrato em hexano de galho de *T. pallida*, o qual apresentava atividade inibitória de 41%. As frações que apresentaram maior inibição foram em acetato de etila e em metanol. As frações provenientes da partição do extrato em metanol de galho, no entanto, mantiveram atividade inibitória e a fração em metanol foi mais ativa, já que inibiu em 62% a atividade da enzima APRT.

O extrato em hexano das folhas (EHFTP) que inicialmente apresentou atividade inibitória de 38%. As frações resultantes foram submetidas a ensaio e foi observado que todas as frações inibiram mais a atividade de APRT, sendo que, a fração em acetato de etila e n-butanol foram mais ativas, apresentando atividades inibitórias de 79 e 59%, respectivamente.

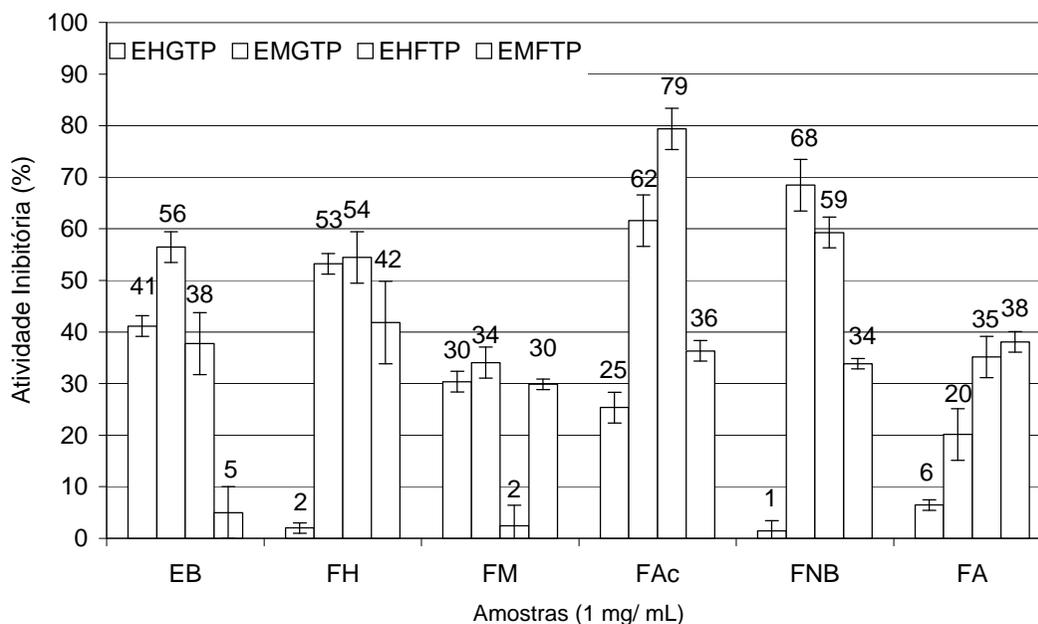


FIGURA 111 - Atividade inibitória dos extratos brutos e frações de *T. pallida* frente à enzima APRT de *L. tarentolae*

O extrato em metanol de folha (EMFTP) apresentou inibição muito baixa (considerada inicialmente como inativa), no entanto, quando suas respectivas frações foram ensaiadas foi verificado que estas inibiam a atividade da enzima, sendo que a fração em hexano foi mais ativa (42%).

- ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE FRAÇÕES ATIVAS DE *T. pallida*

Algumas substâncias isoladas foram submetidas ao ensaio de inibição da enzima APRT. A inibição da atividade desta enzima por estas substâncias é aqui pela primeira vez descrita. A substância 18 como já foi discutido (item 4.5.4.2.2, pág. 121) apresenta um grupo hidroximetileno ligado ao carbono 28 e um carbonila ligado ao carbono 3 e apresentou um I. E de 39%, por outro lado o flavonóide apresentou maior porcentagem de I.E (tabela 37).

TABELA 37 - Atividade das substâncias isoladas de *Trichilia pallida* frente à inibição da enzima APRT de *L. tarentolae*, na concentração de 100 µM.

EXTRATO	FRAÇÃO	SUBSTÂNCIA	I.E (%)
EMFTP	FAC e FM	17	39
		18	19
		28	45

- ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES DE *T. rubra* FRENTE À ENZIMA APRT DE *L. tarentolae*

Para as frações provenientes dos extratos de *T. rubra* observou-se redução de atividade para o extrato em metanol de folha, e nenhum com atividade maior que 50%, já o extrato em metanol de galho (EMGTR) que inibia 74% a atividade da enzima apresentou a fração em acetato de etila com atividade de 65% e foi submetida a investigação fitoquímica.

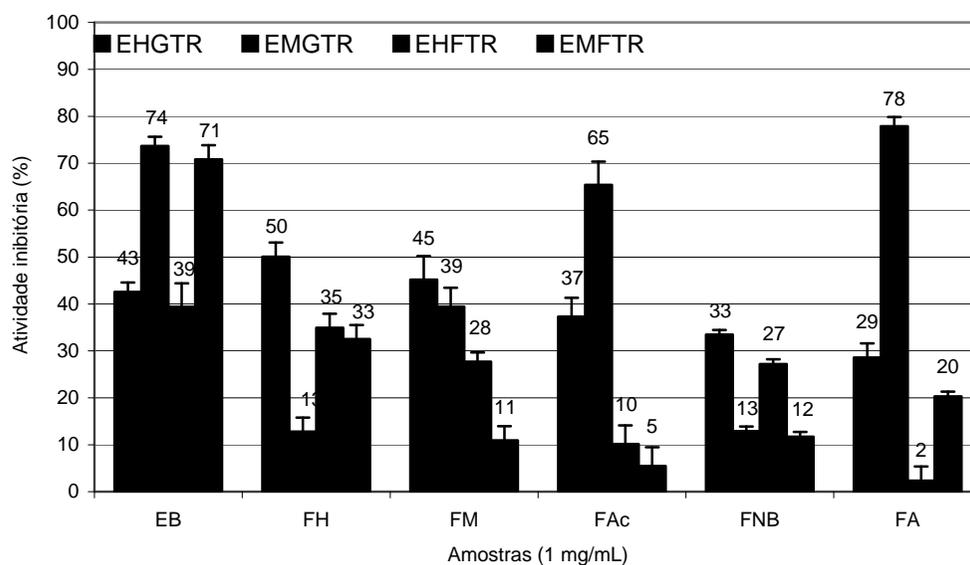


FIGURA 112 - Atividade inibitória dos extratos e frações de *T. rubra* frente à enzima APRT de *L. tarentolae*.

- ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE FRAÇÕES DE *T. rubra*

Algumas substâncias isoladas foram submetidas ao ensaio de inibição da enzima APRT (tabela 38).

TABELA 38 - Atividade das substâncias isoladas de *Trichilia rubra* frente à inibição da enzima APRT de *L. tarentolae* na concentração de 100 µM.

EXTRATO	FRAÇÃO	SUBSTÂNCIA	I.E (%)
EMFTR	FAc e FM	21	39
		16	18
		29	75

4.6.2- ENSAIO BIOLÓGICO *in vitro*

4.6.2.1- Ensaio frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*

4.6.2.1.1- Efeitos dos extratos de *A. fusciflorus*, *T. pallida* e *T. rubra* nas formas tripomastigota de *T. cruzi*

Todos os extratos foram submetidos a ensaio preliminar frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* (item 3.4.2.1, p. 59) à concentração de 4 mg/mL.

TABELA 39 - Atividade dos extratos de *A. fusciflorus*, *T. pallida* e *T. rubra* sobre a forma tripomastigotas de *T. cruzi*

Espécie	Extratos	% de lise
<i>A.fusciflorus</i>	EHRA	82
	EMRA	75
	EHFA	70
	EMFA	76
<i>T. pallida</i>	EHGTP	82
	EMGTP	54
	EHFTP	68
	EMFTP	63
<i>T. rubra</i>	EHGTR	44
	EMGTR	25
	EHFTR	79
	EMFTR	46

Controle positivo: violeta de genciana a 250 µg/mL
Controle negativo: sangue infectado + 5% de DMSO

Os resultados obtidos mostram que apenas os extratos de galhos e o extrato metanólico das folhas de *T. rubra* apresentaram porcentagem de lise inferior a 50% e que os extratos mais ativos foram de *A. fusciflorus*.

Analisando a tabela foi possível selecionar seis extratos: os quatro extratos de *A. fusciflorus*, o extrato em hexano de galho de *T. pallida* (EHGTP) e o extrato em hexano de folha de *T. rubra* (EHFTR).

4.6.2.1.2- Efeitos das frações de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* nas formas tripomastigota de *T. cruzi*

Alíquotas das frações obtidas das partições de todos os extratos foram ensaiadas na concentração de 2 mg/mL (tabela 40). Foram consideradas ativas as frações que apresentaram porcentagem de lise acima de 60%. As frações FM-EMRA, FAc-EHRA, FM-EMFTR e FM-EMGTP foram os mais ativas. Estas foram submetidas a fracionamento cromatográfico e as substâncias isoladas foram submetidas ao ensaio.

TABELA 40-Frações consideradas ativas frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Extratos	Frações	% de lise
<i>Adiscanthus fusciflorus</i>	FM-EHRA	99
	FAc-EHRA	100
	FM-EMRA	99
	FM-EMFA	74
<i>Trichilia rubra</i>	FM-EMFTR	100
	FM-EMGTR	98
<i>T. pallida</i>	FM-EMGTP	100
	FAc-EMGTP	68
	FM-EMFTP	99

Controle positivo: violeta de genciana a 250 µg/mL e
Controle negativo: sangue infectado + 5% de DMSO

Na tabela 40 fica evidenciado que somente as frações mais polares foram ativas frente aos ensaios no parasita.

4.6.2.1.3 - EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS FRENTE ÀS FORMAS TRIPOMASTIGOTA DE *T. cruzi*

- Efeito das substâncias isoladas de frações ativas de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* frente nas formas tripomastigota de *T. cruzi*

O ensaio avaliou tanto a atividade da amostras frente ao parasita como também os efeitos sobre os glóbulos vermelhos. Espera-se que a amostra elimine o maior número de parasitas e que não causem alterações celulares nos parasitas que resistirem ou aos glóbulos vermelhos.

Em relação aos glóbulos vermelhos as alterações que podem ser observadas são: a lise parcial que indica que a amostra pode ser citotóxica. Hemácias crenadas que indica que a amostra não causou nenhuma alteração e hemácias edemaciadas indicando que a amostra causou um inchaço celular.

TABELA 41 - Atividade das substâncias isoladas frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Substância	Dose µg/mL	% de lise	Efeitos observados	
1	100	4,2	Tripomastigotas normais	
	250	17,3		
	500	59,4		
2	100	17,8		
	250	21,5		
	500	29,4		
3	100	16,3		Movimento reduzido das formas
	250	33,1		
	500	70,5		
5	100	39,9	Tripomastigotas normais	
	250	52,6		
	500	62,1		
7	100	6,3		
	250	32,6		
	500	52,1		
8	100	46,3		
	250	66,3		
	500	70,9		

Continuação da tabela 41....

Substância	Dose μ g/mL	% de lise	Efeitos observados
9	100	21,4	Tripomastigotas normais
	250	33,1	
	500	60,9	
11	100	27,5	
	250	33,3	
	500	66,7	
16	100	16,9	
	250	45,3	
	500	57,7	
17	100	22,3	
	250	34,6	
	500	38,4	
18	100	38,1	
	250	47,3	
	500	55,4	
20	100	3,0	
	250	31,1	
	500	32,3	
21	100	20,0	
	250	39,6	
	500	43,8	
22	100	37,5	
	250	39,4	
	500	58,6	
23	100	16,9	
	250	40,6	
	500	45,5	
25	100	13,5	
	250	28,9	
	500	29,6	
27	100	21,5	
	250	29,2	
	500	40,3	
28	100	12,4	
	250	67,2	
	500	83,4	
29	100	7,3	
	250	20,3	
	500	51,3	

Controle positivo: violeta de genciana a 250 μ g/mL e controle negativo: sangue infectado + 5% de DMSO

A análise dos resultados apresentados na tabela 41 demonstrou que as substâncias 8, 9 e 11 foram as mais ativas frente ao ensaio tripanocida, além destas, as substâncias 16, 28 e 29 também foram consideradas ativas frente às formas tripomastigotas.

4.6.3 - BUSCA DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE SOBRE *S. frugiperda***4.6.3.1 - EXTRATOS OBTIDOS DE *Adiscanthus fusciflorus*****4.6.3.1.1 - Efeito de extratos de *A. fusciflorus* no desenvolvimento de *S. frugiperda***

Os extratos brutos em hexano e metanol obtidos de folhas e raízes de *A. fusciflorus* foram incorporados à dieta artificial de *S. frugiperda* conforme descrito no item 3.4.3.1.1, p. 60 e o efeito destes, na fase de larva até pupa pode ser observado na tabela 42.

O *screening* inicialmente realizado com os extratos de *A. fusciflorus* indicou que nenhum extrato apresentou alta toxicidade (>70%) já que as lagartas não morreram logo nos primeiros dias.

TABELA 42 - Efeito dos extratos de *A. fusciflorus*, incorporados à dieta artificial, na duração da fase larval e pupal, na mortalidade (%) de lagartas e pupas e no peso de pupa de *S. frugiperda*.

Amostras 1000 ppm	Fase larval		Fase pupal		Peso de pupa (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TH	22,0 ± 2,5	10	6,0 ± 0,9	0	240,0 ± 15,0
EHFA	21,0 ± 1,0	30	10,0 ± 2,0	0	232,8 ± 27,0
EHRA	22,0 ± 1,1	50	10,0 ± 0,5	0	249,6 ± 25,5
TM	20,0 ± 1,5	10	6,0 ± 0,5	0	235,0 ± 12,5
EMFA	23,0 ± 2,1	30	10,0 ± 1,1	0	263,4 ± 17,7
EMRA	23,0 ± 1,4	0	10,0 ± 1,4	0	214,2 ± 45,2

TH: Testemunha em hexano, EHFA: Extrato em hexano da folha; EHRA: Extrato em hexano da raiz, TM: testemunha em metanol, EMFA: Extrato em metanol das folhas; EMRA: Extrato em metanol da raiz

Os extratos EHRA e EMFA causaram mortalidade de 50 e 30% respectivamente.

4.6.3.1.2 - Efeito de frações oriundas de extratos de *A. fusciflorus* no desenvolvimento de *S. frugiperda*

Com base nos resultados (tabela 43) constatou-se que algumas frações afetaram o desenvolvimento de *S. frugiperda* e causaram mortalidade na fase larval.

TABELA 43- Duração e mortalidade na fase larval e pupal e peso de pupa de *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial tratada com frações de *A. fusciflorus*.

Amostras	Fase larval		Fase pupal		Peso de pupa (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TH	22,0	20	8,0	0	258,2
FH-EHRA	23,7	20	7,5	0	246,1
FH-EMRA	22,0	0	8,0	30	269,0
FH-EHFA	23,9	20	8,0	0	249,3
FH-EMFA	25,0	30	7,5	10	230,1
TM	23,0	20	8,0	0	260,0
FM -EHRA	21,8	30	9,0	10	264,2
FM -EMRA	22,0	0	8,0	10	254,1
FM -EHFA	20,3	50	11,0	20	253,5
FM -EMFA	25,2	40	8,1	0	242,5
TAc	22,0	10	8,0	0	264,6
FAc-EHRA	24,2	40	7,0	0	268,9
FAc-EMRA	22,0	0	8,0	0	254,4
FAc-EHFA	23,4	20	9,0	10	261,2
FAc-EMFA	23,6	30	9,0	0	251,4
TNB	20,0	10	10,0	0	266,7
FNB-EHRA	20,2	30	9,0	10	262,6
FNB-EMRA	22,7	0	7,5	20	247,6
FNB-EHFA	24,2	30	8,5	0	258,3
FNB-EMFA	25,2	40	8,1	0	253,1
TA	24,0	10	7,0	0	261,0
FA-EHRA	26,0	60	7,5	10	269,0
FA-EMRA	20,6	0	8,4	0	254,5
FA-EHFA	24,5	10	8,0	0	249,3
FA-EMFA	23,2	20	7,5	0	249,1

TH: Testemunha em hexano, EHFA: Extrato em hexano da folha; EHRA: Extrato em hexano da raiz, TM: testemunha em metanol, EMFA: Extrato em metanol das folhas; EMRA: Extrato em metanol da raiz, TAc: Testemunha em acetato de etila, TNB: Testemunha em n-butanol e TA: Testemunha em água.

As frações em metanol de folha, dos extratos em hexano e em metanol (FM-EHFA e FM-EMFA) causaram maior mortalidade que os respectivos extratos. Este parâmetro é interessante do ponto de vista fitoquímico já que indica potencial de ser(em) isolada(s) substância(s) destas frações com atividade inseticida.

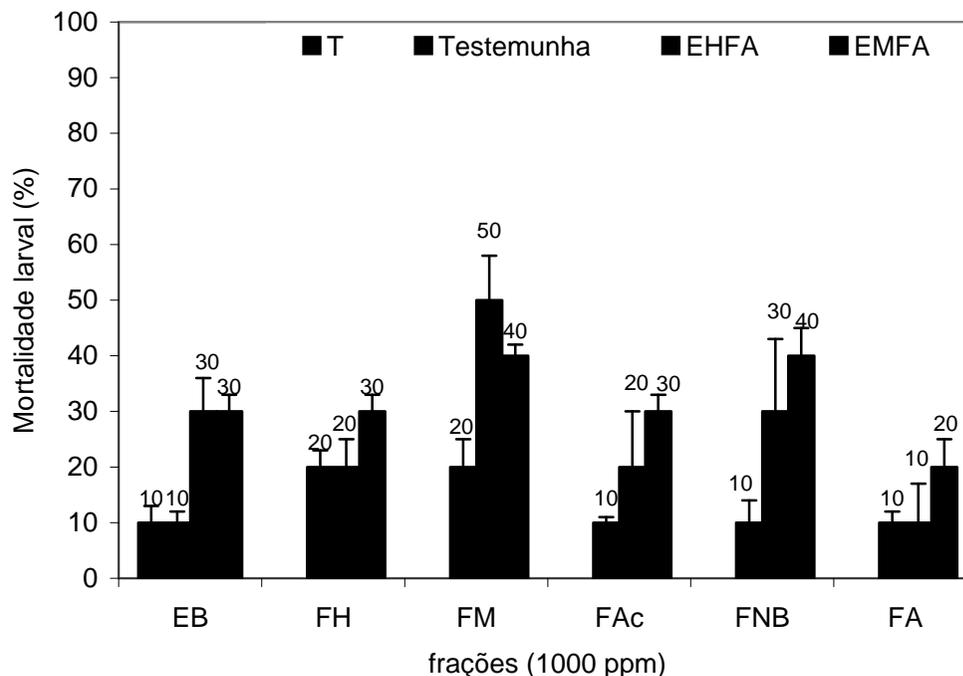


FIGURA 113 - Mortalidade larval, de *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial tratada com extratos e frações de folhas de *A. fusciflorus*, na concentração de 1000 ppm. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70 \pm 5\%$ e Fotofase de 12 horas. Para EB (extrato bruto) o T é a testemunha em hexano e testemunha em metanol.

Analisando os resultados obtidos quando a dieta foi tratada com frações provenientes de extratos de raízes (tabela 43), foi possível selecionar o extrato em hexano já que as frações continuaram ativas. As frações em FAc, FNb e FA foram as que ocasionaram resultados mais interessantes, uma vez que comparado a testemunha, ocasionaram maior porcentagem de mortalidade.

A fração em hexano do extrato em metanol da raiz (FH-EMRA) foi a que causou maior porcentagem de mortalidade na fase pupal (30 %) em relação à testemunha.

4.6.3.1.3 - EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *A. fusciflorus* NO DESENVOLVIMENTO DE *S. frugiperda*

- Efeito de substâncias isoladas (fase 1, etapa 2)

Extratos em hexano e metanol de folha e raiz foram fracionados sendo que da FM-EMFA foram isolado entre outras substâncias a cumarina isopimpinina (**6**) e da FM-EMRA foi isolado alcalóides furoquinolínicos entre eles a esquimianina (**11**) e por terem sido isoladas em maior quantidade (>50 mg), ambas foram submetidas a ensaio como descrito na fase I, etapa 2.

A esquimianina, na concentração de 50 e 100 ppm, causou 100% de mortalidade de lagartas no oitavo dia (tabela 44). Nas concentrações de 1, 10 e 25 ppm não causou, na fase larval, mortalidade significativamente diferente, no entanto, na fase pupal nas concentrações de 10 e 25 ppm causou mortalidade.

TABELA 44- Duração e mortalidade na fase larval e pupal e peso de pupa de *S. frugiperda* quando alimentada com dieta artificial tratada com diferentes concentrações de esquimianina.

Concentração	Fase larval		Fase pupal		Peso de pupa (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TESTEMUNHA	19,2± 1,0	10	12 ± 1,5	0	270,4± 12,0
1	23,3± 1,5	20	9 ± 1,0	0	268,5 ± 17,1
10	22,4± 1,5	20	10± 1,5	20	212,4± 10,3
25	18,4± 2,0	25	10 ± 2,0	40	204,3 ± 12,9
50	13,2± 1,5	100	(-)	(-)	(-)
100	8,4± 1,0	100	(-)	(-)	(-)

(-) Nenhuma lagarta sobreviveu

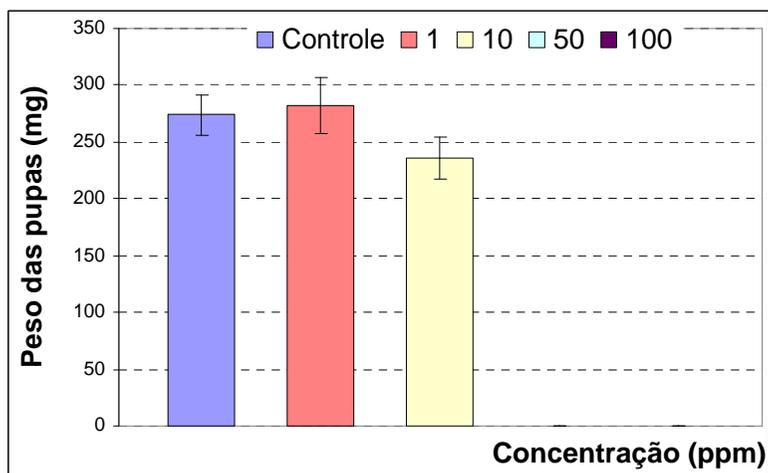


FIGURA 114 – Peso de pupas de *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial tratada com esquiainina em diferentes concentrações. temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $70\pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

No ensaio com a isopimpinelina, foi observado que a mortalidade na fase larval e pupal aumentou com o aumento da concentração e que o efeito tóxico causado por esta substância inicia-se na fase larval e se estende até a fase pupal.

TABELA 45- Duração e mortalidade na fase larval e pupal e peso de pupa de *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial tratada com diferentes concentrações de isopimpinelina. .

Concentração	Fase larval		Fase pupal		Peso de pupa (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TESTEMUNHA	$19,2 \pm 1,0$	10	$12,0 \pm 1,5$	0	$270,4 \pm 12,0$
1	$20,4 \pm 2,0$	15	$10,0 \pm 1,0$	10	$261,3 \pm 10,5$
10	$21,8 \pm 2,5$	20	$9,5 \pm 1,5$	15	$260,9 \pm 9,5$
25	$19,8 \pm 1,5$	10	$10,8 \pm 2,0$	15	$243,2 \pm 15,3$
50	$22,2 \pm 1,8$	10	$10,0 \pm 2,0$	30	$248,7 \pm 20,5$
100	$20,1 \pm 3,0$	10	$10,1 \pm 1,0$	40	$238,3 \pm 8,3$

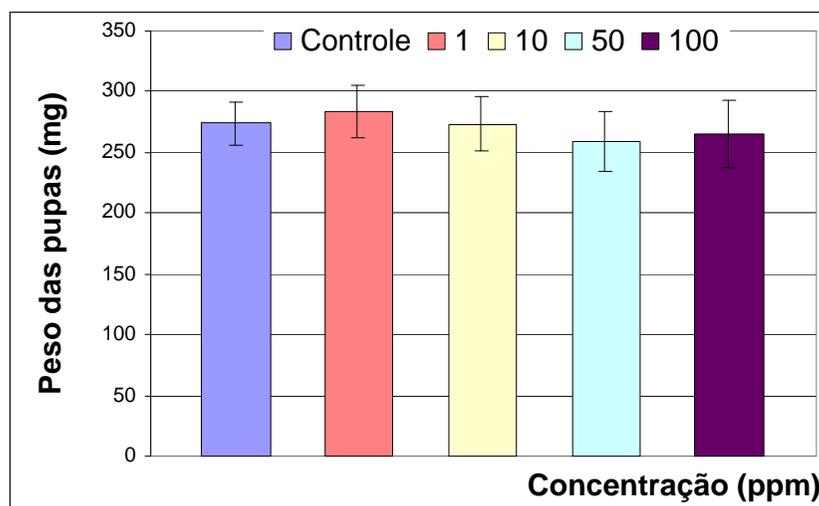


FIGURA 115 – Peso de pupa de *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial tratada com isopimpinellina em diferentes concentrações. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

- Efeito de substâncias isoladas (fase 2)

TABELA 46- Atividade de substâncias isoladas de frações de *A. fusciflorus*, aplicadas em dieta artificial sobre *S. frugiperda*.

Frações	Substâncias (100 ppm)	Mortalidade (%)
FM-EMRA	9	50
	11	100
FM-EMFA	5	60
	6	80
	7	40

A atividade inseticida de algumas furanocumarinas frente a *S. littoralis* foi recentemente apresentada por STEVENSON et al., (2003) que constatou alto índice de inibição alimentar quando a dieta foi tratada com as furanocumarinas lineares 5 e 6 e não foi observada diferença estatística entre as duas substâncias que possa fazer alusão a alguma relação estrutura-atividade.

O efeito destas substâncias frente a *S. frugiperda* ainda não havia sido avaliada.

- Estimativa da CL₅₀ para Esquimianina

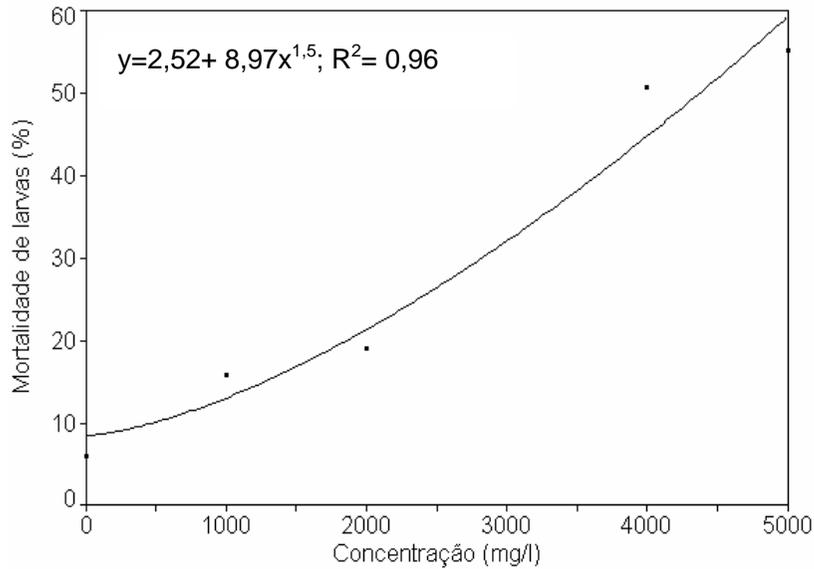


FIGURA 116 - Relação entre a mortalidade de lagartas (%) de *S. frugiperda* e diferentes concentrações de esquimianina ($P \leq 0,05$; $F = 80,64$)

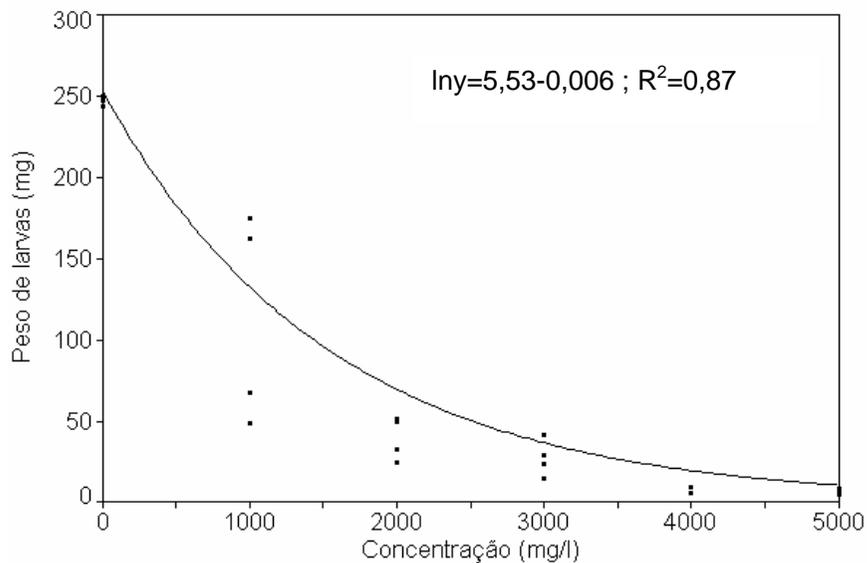


FIGURA 117 - Relação entre peso de pupa (mg) de *S. frugiperda* e diferentes concentrações de esquimianina ($P \leq 0,05$; $F = 148,27$)

Esta análise demonstrou que embora a mortalidade não tenha sido tão acentuada (54% a 5000 mg/L), as lagartas tiveram drástica redução de peso ($\cong 40x$).

Para estimar a DL_{50} foi feito um experimento que utilizou como padrão positivo o bioinseticida NeemAzal[®]-TS que é um produto formulado à base de nim (concentração de 10.000 ppm de azadiractina) a qual é amplamente reconhecida pela sua eficácia como inseticida para diversas espécies de insetos-praga⁶ e como houve a sobreposição dos intervalos de confiança pode-se inferir que as concentrações estimadas (CL_{50} e CL_{90}) para a esquimianina e o NeemAzal T/S respectivamente, não diferem no nível de significância indicado (0,90) e estes resultados comprovam a atividade inseticida da esquimianina.

TABELA 47- Estimativa da CL_{50} (%) de esquimianina, substância isolada de *Adiscanthus fusciflorus*, e de NeemAzal[®]-TS, formulação à base de sementes de *Azadirachta indica*, para lagartas de 2^o ínstar de *Spodoptera frugiperda* aos 10 dias após a inoculação.

	CL_{50}	($IC_{0,90}$)	n^1	gl^2	χ^2
Esquimianina	0,56	(0,29 - 0,73)	90,4	2	4,86 n.s.
NeemAzal [®] -T/S	0,64	(0,57 - 0,69)	84,0	1	0,03 n.s.

¹número médio de insetos/concentração;

²graus de liberdade;

n.s.= não significativo ($P \geq 0,05$).

TABELA 48- Estimativa da CL_{90} (%) de esquimianina, substância isolada de *Adiscanthus fusciflorus*, e de NeemAzal[®]-T/S, formulação à base de sementes de *Azadirachta indica*, para lagartas de 2^o ínstar de *Spodoptera frugiperda* aos 10 dias após a inoculação.

	CL_{90}	($IC_{0,90}$)	n^1	gl^2	χ^2
Esquimianina	1,49	(1,07 - 5,18)	90,4	2	4,85 n.s.
NeemAzal [®] -T/S	1,15	(1,04 - 1,35)	84,0	1	0,03 n.s.

¹número médio de insetos/concentração;

²graus de liberdade;

n.s.= não significativo ($P \geq 0,05$).

⁶ Em: <http://www.quinabra.com.br/index3.html>

4.6.3.2- EXTRATOS OBTIDOS DE *Trichilia pallida*

4.6.3.2.1- Efeito de extratos de *T. pallida* no desenvolvimento de *S. frugiperda*

Os extratos em hexano e metanol de folhas e galhos de *T. pallida* foram incorporados à dieta artificial de *S. frugiperda* e o efeito causado por estes pode ser observado através dos resultados obtidos (tabela 49).

O *screening* inicialmente realizado com os extratos de *T. pallida* indicou que o extrato em metanol de galho (EMGTP) é tóxico as lagartas de *S. frugiperda*, já que causou 100% de mortalidade. Os demais extratos ocasionaram mortalidade de no máximo 20%. O extrato em metanol das folhas (EMFTP) alongou a duração das fases e ocasionou redução no peso de pupas em relação à testemunha.

TABELA 49- Efeito dos extratos de *T. pallida*, quando estes foram incorporados à dieta artificial de *S. frugiperda*.

Amostras (1000 ppm)	Fase larval		Fase pupal		Peso de pupa (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TH	22,0 ± 2,5	0	6,0 ± 1,0	10	240 ± 15
EHFTP	19,4 ± 1,0	0	7,0 ± 2,0	40	236 ± 10
EHGTP	18,0 ± 1,1	20	8,0 ± 1,5	50	227 ± 12
TM	20,0 ± 1,5	0	6,0 ± 0,5	10	238 ± 12,5
EMFTP	22,0 ± 2,1	10	10,0 ± 1,4	40	160 ± 13
EMGTP	14,9 ± 1,4	100	(-)	(-)	(-)

TH: Testemunha em hexano, EHFTP: Extrato em hexano da folha; EHGTP: Extrato em hexano do galho, TM: testemunha em metanol, EMFTP: Extrato em metanol das folhas; EMGTP: Extrato em metanol do galho.

(-) Nenhuma larva passou para a fase pupal

O extrato em hexano, diclorometano e em metanol dos frutos de *T. pallida* também tiveram seu potencial avaliado em ensaio por ingestão com lagartas de 1º instar na concentração de 1000 ppm.

O extrato em diclorometano provocou mortalidade de 84% e foi então submetido a sucessivos fracionamentos cromatográficos resultando no isolamento e identificação de três limonóides. O efeito causado por estas substâncias está apresentado na tabela 51, p. 194.

4.6.3.2.2- Efeito das frações de *T. pallida* no desenvolvimento de *S. frugiperda*

Nenhuma das frações provenientes do extrato em metanol de galhos (que causou mortalidade de 100%) causou mortalidade de lagartas superior a 10%. As frações em metanol de galhos (FM-EMGTP) e a fração em metanol de folhas (FM-EMFTP) foram as que provocaram maior percentual de mortalidade de pupa (tabela 50).

TABELA 50- Efeito das frações de *T. pallida*, quando incorporados à dieta artificial de *S. frugiperda*.

Tratamento	Fase Larval		Fase Pupal		Peso de pupa (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TH	20,7	0	14,6	10	193,9
FH-EHGTP	17,6	0	6,7	20	216,0
FH-EMGTP	19,7	0	11,6	10	282,1
FH-EHFTP	21,3	0	9,4	20	211,1
FH-EMFTP	20,0	10	5,0	40	182,2
TM	20,2	0	8,6	10	208,6
FM -EHGTP	18,5	0	7,7	90	231,5
FM -EMGTP	21,8	0	6,7	40	169,2
FM -EHFTP	20,0	0	7,4	90	201,6
FM -EMFTP	20,9	10	7,5	30	166,3
TAc	20,6	0	8,7	0	194,1
FAc-EHGTP	19,5	0	8,7	0	239,2
FAc-EMGTP	20,3	0	4,6	40	233,4
FAc-EHFTP	21,3	10	6,5	20	224,9
FAc-EMFTP	21,8	10	6,4	10	217,2
TNB	20,8	0	8,0	0	202,6
FNB-EHGTP	14,4	0	8,5	10	216,4
FNB-EMGTP	19,3	0	6,1	20	210,1
FNB-EHFTP	15,7	0	14,2	10	199,3
FNB-EMFTP	20,7	10	5,7	30	232,2
TA	19,0	0	6,1	20	217,3
FA-EHGTP	21,4	0	11,2	10	206,0
FA-EMGTP	19,9	0	7,4	50	192,5
FA-EHFTP	20,5	10	4,3	30	206,2
FA-EMFTP	20,7	0	5,6	43	248,3

TH: Testemunha em hexano, EHFTP: Extrato em hexano da folha; EHGTP: Extrato em hexano do galho, TM: testemunha em metanol, EMFTP: Extrato em metanol das folhas; EMGTP: Extrato em metanol do galho, TAc: Testemunha em acetato de etila, TNB: Testemunha em n-butanol e TA: Testemunha em água.

- Efeito das substâncias isoladas de *T. pallida* No desenvolvimento de *S. frugiperda*

Algumas substâncias isoladas de *T. pallida* tiveram seu potencial frente a *S. frugiperda* avaliada (tabela 51) e o que pode ser observado é que a atividade de FA deve estar relacionada à presença dos flavonóides 28 e 29.

TABELA 51- Atividade de substâncias isoladas de frações de *A. fusciflorus*, quando estas foram aplicadas sobre a dieta artificial de *S. frugiperda*.

Frações	Substâncias (100 ppm)	Mortalidade (%)
EMFTP	17	32
	28	78
	29	85
EDSP [#]	25	69
	26	78
	27	82

[#]EDSP: Extrato em diclorometano das sementes de *T. pallida*

A atividade dos flavonóides frente a insetos vêm sendo discutida em alguns trabalhos (SIMMONDS, 2000 e SIMMONDS, 2003) mas é a primeira vez que estas substâncias foram submetidas a ensaio frente a *S. frugiperda* e devido ao alto porcentual de mortalidade obtida estão sendo realizados experimentos adicionais afim de se estimar as respectivas DL₅₀.

Os limonóides também foram tóxicos às larvas de 1° instar de *S. frugiperda* na concentração de 100 ppm e a atividade das substâncias 25 e 26 está relacionada a presença da cetona α,β -insaturada no anel A (AGOSTINHO, 1996).

A atividade inseticida do extrato em diclorometano de frutos de *Trichilia pallida* esta está relacionada à presença destes limonóides.

4.6.3.3- EXTRATOS DE *T. rubra*

4.6.3.3.1- Efeito dos extratos de *T. rubra* no desenvolvimento de *S. frugiperda*

Os extratos em hexano e metanol de folha e raiz de *A. fusciflorus* foram incorporados à dieta artificial de *S. frugiperda* e o efeito provocado por estes, em cada fase do ciclo de vida de *S. frugiperda* pode ser visualizado na tabela 52.

Nenhum extrato de *T. rubra* apresentou alta toxicidade na fase larval já que as lagartas não morreram logo nos primeiros dias. No entanto, os extratos de galhos causaram maior porcentagem de mortalidade e peso de pupas em relação às testemunhas. Logo os extratos de galhos foram mais interessantes que os extratos de folhas.

TABELA 52 - Duração (dias \pm EP) e mortalidade nas fases larval e pupal e peso de pupa de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial tratada com os extratos de *T. rubra*

Amostras 1000 ppm	Fase larval		Fase pupal		Média do peso das pupas (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TH	22,0 \pm 1,7	10	6,0 \pm 0,9	0	240 \pm 15
EHFTR	22,0 \pm 2,8	0	9,0 \pm 1,0	0	229 \pm 10
EHGTR	22,0 \pm 1,0	40	9,0 \pm 2,0	0	252 \pm 7
TM	20,0 \pm 1,5	0	6,0 \pm 1,3	20	235 \pm 12,5
EMFTR	24,0 \pm 2,1	10	9,0 \pm 2,4	0	247 \pm 8
EMGTR	20,3 \pm 1,4	30	9,0 \pm 1,8	0	257 \pm 12

TH: Testemunha em hexano, EHFTR: Extrato em hexano de folha; EHGTR: Extrato em hexano de galho, TM: testemunha em metanol, EMFTR: Extrato em metanol de folhas; EMGTR: Extrato em metanol de galho.

4.6.3.3.2- Efeito das frações de *T. rubra* no desenvolvimento de *S. frugiperda*

As frações de *T. rubra* causaram alta porcentagem de mortalidade na fase larval. A fração em metanol dos galhos (FM-EHGTR) matou 80% das lagartas no 10º dia, as frações em hexano (FH-EHGTR) e a fração em água (FA-EHGTR), a fração em hexano do extrato metanol (FH-EMGTR) e fração em metanol (FM-EMGTR) também causaram altas porcentagens de mortalidade, 50, 70, 70 e 60% respectivamente.

TABELA 53- Efeito das frações de *T. rubra*, quando estas foram incorporadas à dieta artificial de *S. frugiperda* na concentração de 1000 ppm.

Tratamento	Fase larval		Fase pupal		Peso de pupa (mg)
	Duração (dias)	Mortalidade (%)	Duração (dias)	Mortalidade (%)	
TH	23,0	20	8,0	0	247,6
FH-EHGTR	21,0	50	9,0	0	221,4
FH-EMGTR	29,0	70	6,0	20	182,3
FH-EHFTR	21,1	40	14,0	20	228,5
FH-EMFTR	24,4	50	9,2	0	224,4
TM	23,0	20	10,0	0	248,2
FM -EHGTR	18,5	80	7,5	0	255,0
FM -EMGTR	20,0	60	8,0	0	284,6
FM -EHFTR	21,5	80	7,6	0	225,6
FM -EMFTR	27,0	40	7,0	0	229,3
TAc	24,0	10	9,0	0	260,5
FAc-EHGTR	25,3	40	9,0	10	239,3
FAc-EMGTR	24,0	30	8,0	10	265,5
FAc-EHFTR	27,5	30	7,2	10	247,0
FAc-EMFTR	23,8	20	7,9	10	251,0
TNB	26,0	10	9,0	0	222,9
FNB-EHGTR	22,0	30	8,0	0	252,8
FNB-EMGTR	23,0	50	7,5	0	227,5
FNB-EHFTR	18,5	40	10,0	10	229,0
FNB-EMFTR	24,5	60	8,7	0	236,1
TA	21,0	10	9,0	0	261,2
FA-EHGTR	18,0	70	8,1	0	278,3
FA-EMGTR	25,3	20	9,2	0	254,6
FA-EHFTR	27,6	70	8,2	0	195,5
FA-EMFTR	28,0	40	6,3	0	232,2

TH: Testemunha em hexano, EHFTR: Extrato em hexano de folha; EHGTR: Extrato em hexano de galho, TM: testemunha em metanol, EMFTR: Extrato em metanol de folha; EMGTR: Extrato em metanol de galho, TAc: Testemunha em acetato de etila, TNB: Testemunha em n-butanol e TA: Testemunha em água.

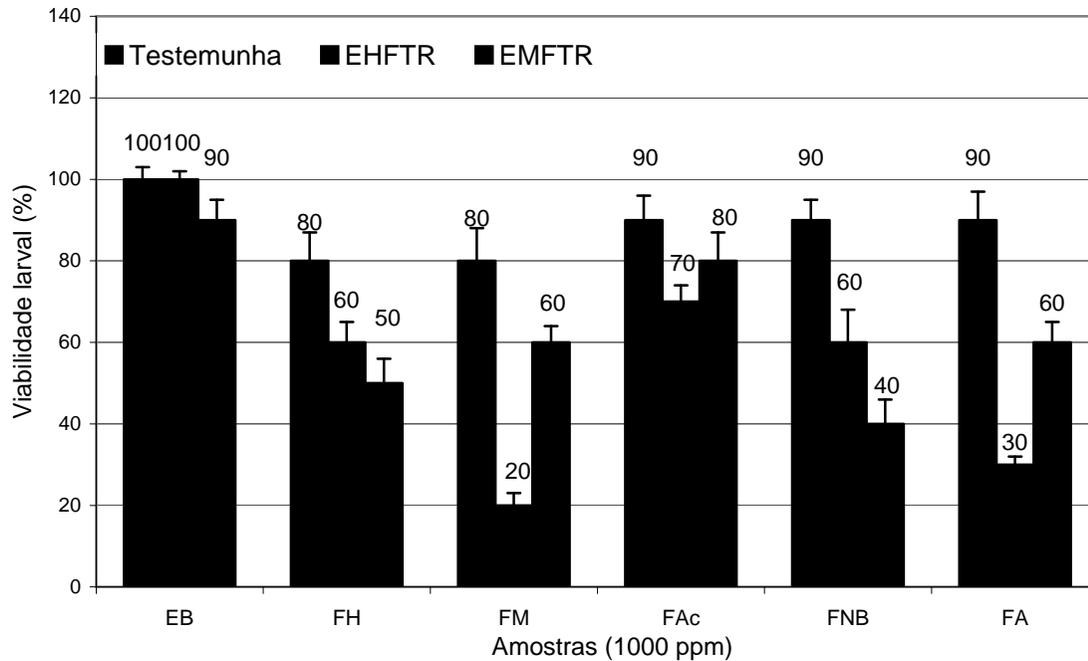


FIGURA 118 - Viabilidade larval de *S. frugiperda* quando alimentada com dieta artificial tratada com extratos e frações de folhas de *Trichilia rubra*, na concentração de 1000 ppm. Temperatura: 25±2°C; UR: 70± 5% e Fotofase de 12 horas. Neste caso a testemunha do EB foi à testemunha em metanol.

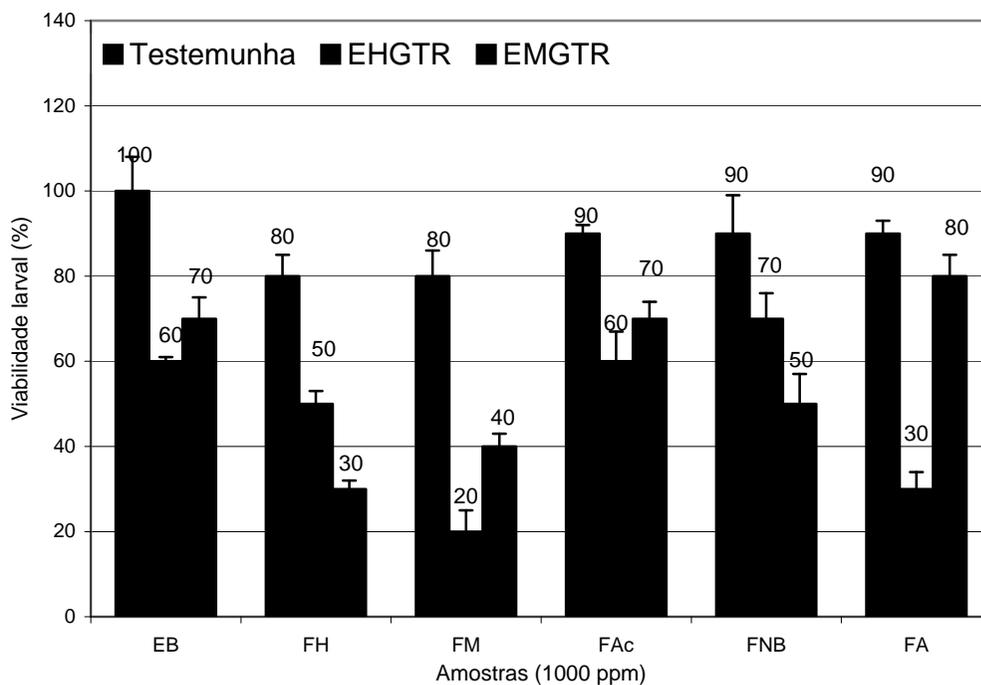


FIGURA 119 - Viabilidade larval de *S. frugiperda* quando alimentadas com dieta artificial tratada com extratos e frações de galhos de *T. rubra*, na concentração de 1000 ppm. Temperatura: 25±2°C; UR: 70± 5% e Fotofase de 12 horas.

4.6.3.1.3 - EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *T. rubra* NO DESENVOLVIMENTO DE *S. frugiperda*

Algumas substâncias isoladas de *T. rubra* tiveram seu potencial frente a *S. frugiperda* avaliadas (tabela 54).

TABELA 54- Atividade de substâncias isoladas de frações de *T. rubra*, quando estas foram aplicadas sobre a dieta artificial de *S. frugiperda*.

	Substâncias (100 ppm)	Mortalidade (%)
FM-EHFTR	15	86
	22	30
FM-EMFTR	22	68
	24	75
	25	46

A atividade inseticida destas substâncias é pela primeira vez apresentada. As substâncias 15 e 22 mudam basicamente pela presença do ciclopropano na estrutura 15 e observando a atividade obtida pode-se inferir que a atividade do cicloartano deve estar relacionada a este fato.

Comparando entre os esteróides colestanos parece que a atividade aumenta com o aumento do número de hidroxilas na molécula.

4.6.4- BUSCA DE SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE SOBRE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens* (FORMIGA CORTADEIRA)

Os resultados obtidos neste ensaio podem ser observados nas curvas de sobrevivência traçada para as formigas cortadeiras quando estas foram alimentadas com dieta artificial tratadas com os extratos brutos.

4.6.4.1- SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS DE *Atta Sexdens* TRATADAS COM EXTRATOS DE *A. fusciflorus*

Uma análise comparativa dos gráficos de sobrevivência diária das operárias de *Atta sexdens* (figura 120), quando estas foram alimentadas com dieta tratada com extrato em hexano e em metanol de folha e raiz de *A. fusciflorus*, revela que apenas os extrato das folha causaram mortalidade acima de 50%. As médias de sobrevivência utilizadas na análise de variância das formigas em cada placa de Petri indicaram diferenças significativas dos tratamentos em relação aos respectivos controles para cada extrato (tabela 55, p. 200).

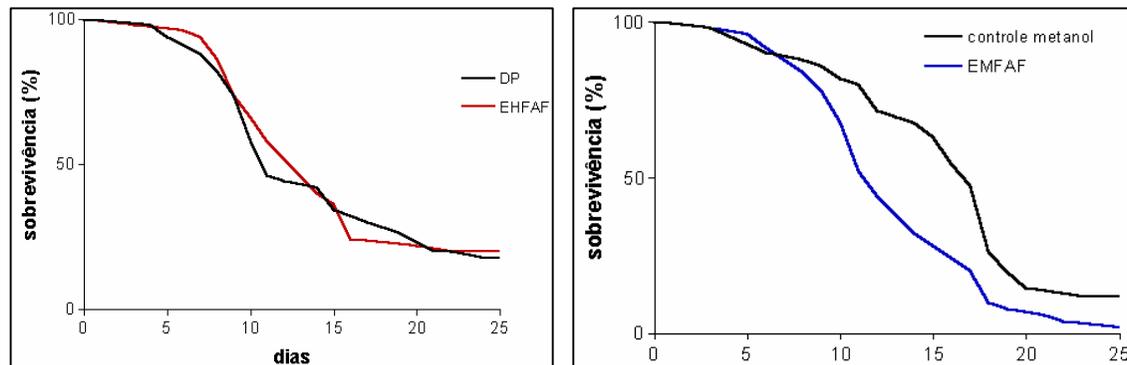


FIGURA 120- Curvas de sobrevivencia de operárias de *Atta sexdens* em tratadas por ingestão com extratos em hexano e metanol das folhas de *A. fusciflorus*

Segundo SILVEIRA et al, (2003) os extratos foliares de *A. fusciflorus* foram tóxicos para operárias de *Atta sexdens* e deste as frações de baixa polaridade foram as mais ativas.

TABELA 55 -Toxicidade dos extratos e frações de *A. fusciflorus* sobre operárias de *A. sexdens*.

Amostras	χ^2	ρ	LM	Controle	Atividade tóxica
EHFA	0,15	0,6974	13	11	Não
EMFA	9,86	0,0017	12	17	Sim
FH-EMFA	22,79	<0,0001	7	13	Sim
FM-EMFA	14,86	<0,0001	5	13	Sim
FM-EMFA	3,45	0,0631	10,5	13	Não

- EXTRATOS DE *T. rubra*

O perfil das curvas de sobrevivência demonstram que todos os extratos de *T. rubra* apresentaram ação tóxica causando mortalidade de 50% das operárias aproximadamente no 10° dia de tratamento (figura 121, p. 201).

A fração mais ativa de *T. rubra* foi a FM-EMFTR e desta fração foi isolada a substancia 24 que na concentração de 1 mg/mL causou 100 % de mortalidade em 18 dias.

- EXTRATOS DE *T. pallida*

As porcentagens de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* tratadas por ingestão com os extratos em hexano e metanol. O extrato em hexano da folha causou mortalidade das formigas na segunda semana, embora 50% das operárias tenham morrido no 12° dia de tratamento onde o extrato passou a ser mais tóxico. As curvas de sobrevivência para os extratos em metanol de folha e galho também demonstraram ação tóxica e o extrato da folha matou 50% das operárias no 13° dia (figura 122, p. 202).

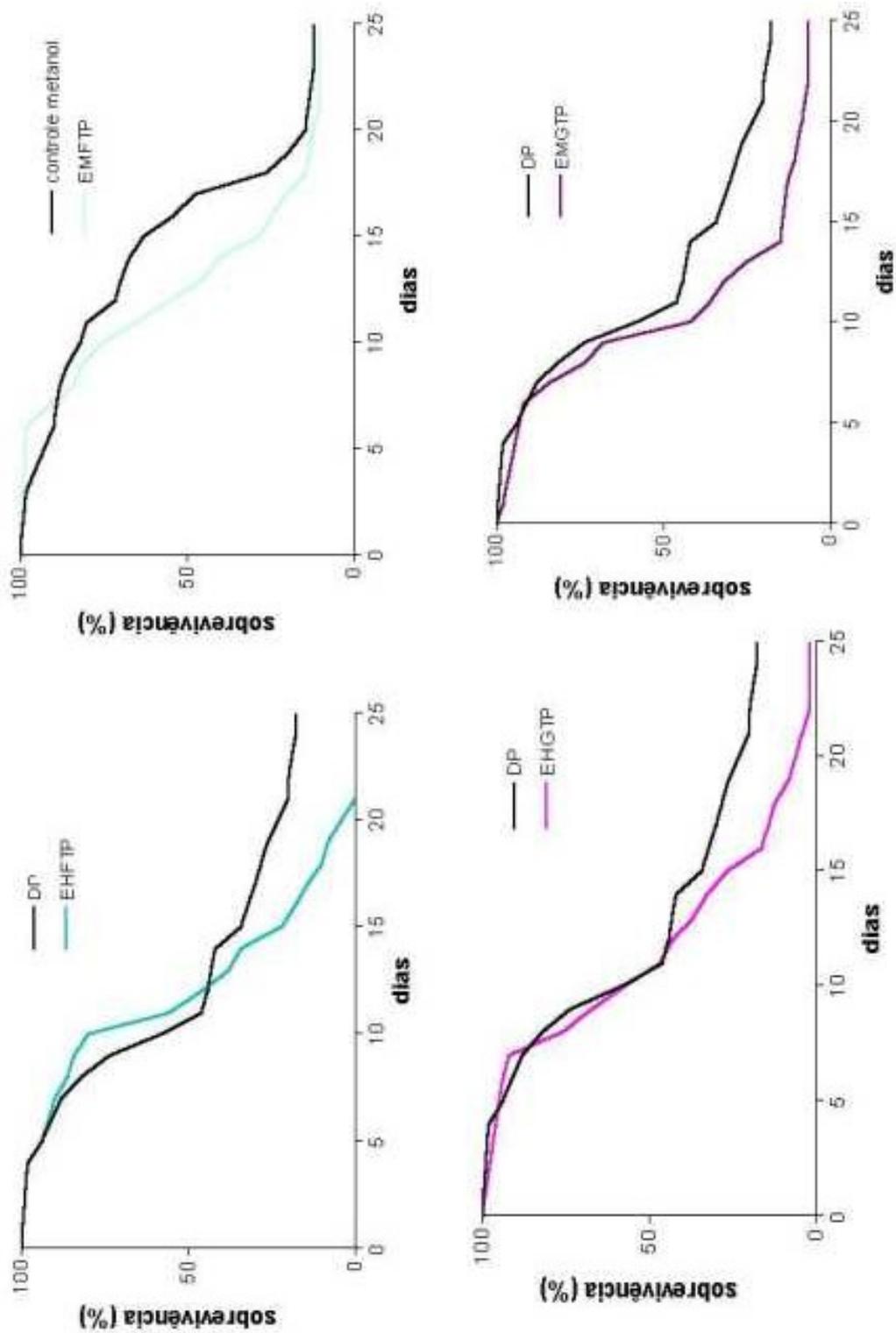


FIGURA 121- Curva de sobrevivência de operária de *Atta sexdens* tratadas alimentadas com dieta tratada com extrato em hexano e metanol de folhas e galhos de *Trichilia pallida*.

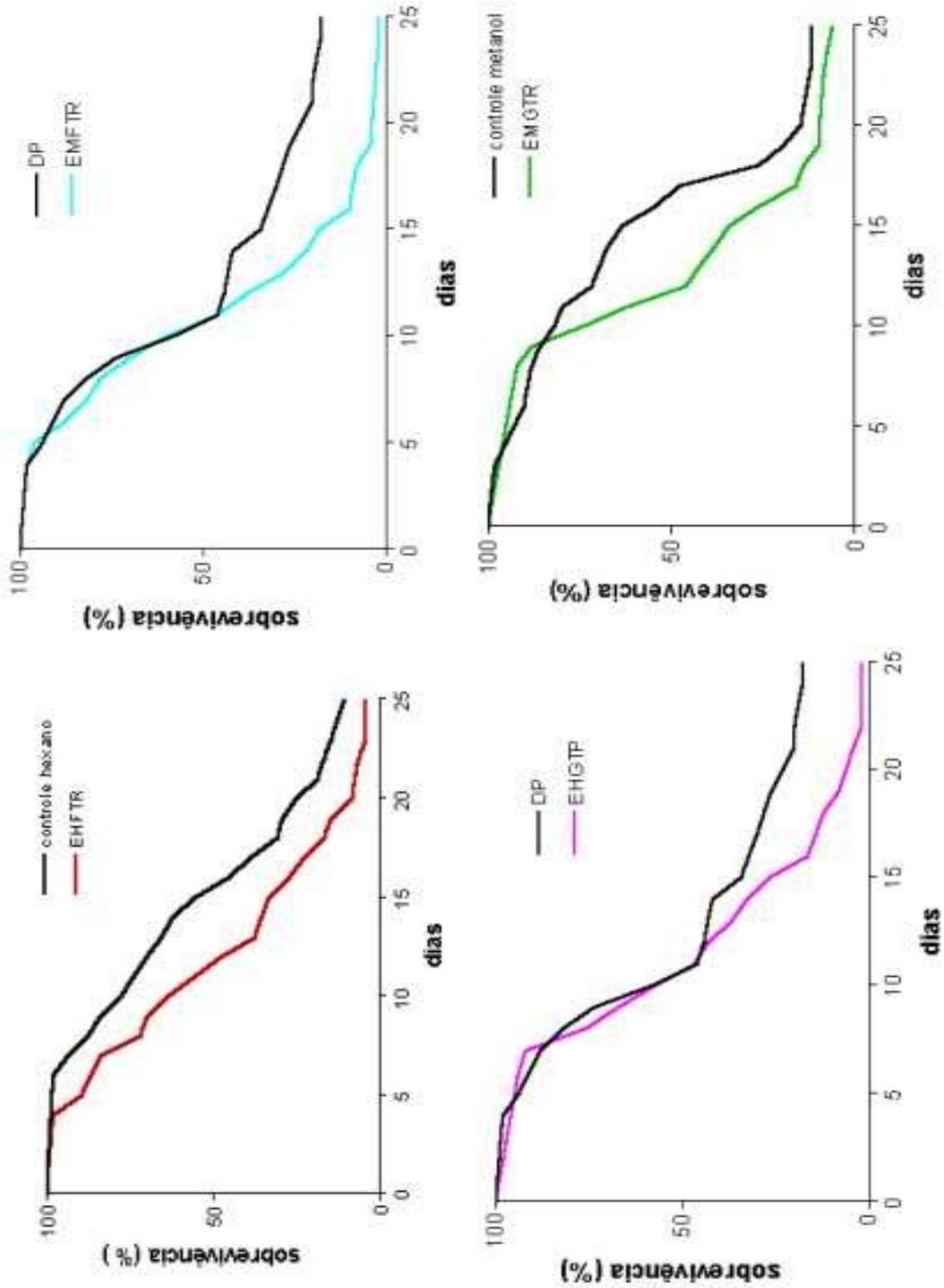
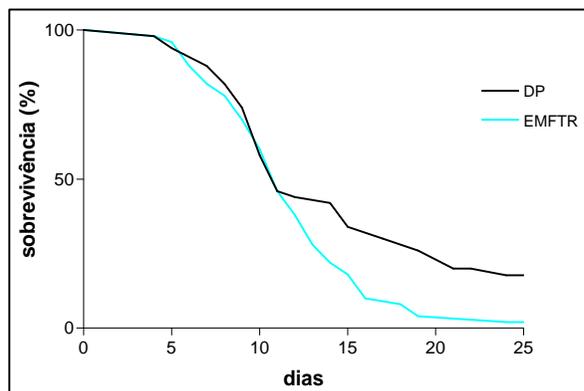


FIGURA 122- Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* alimentadas com dieta artificial tratada com extratos em hexano e em metanol de folhas e galhos de *Trichilia rubra*.

FIGURA 123 - Curva de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* submetidas ao tratamento por ingestão com o extrato em metanol de folhas de *T. rubra*.



4.6.4.2 - Efeito dos extratos de *Adiscanthus fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* frente o fungo simbionte da formiga cortadeira, *Leucoagaricus gongylophorus*.

Todos os extratos e frações foram ensaiados (tabela 56). O extrato em hexano de folha de *T. rubra* reduziu em 60 % o crescimento do fungo e a fração em hexano na concentração de 500 µg/mL provocaram 100% de inibição. Os extratos em metanol de folhas e das raízes de *A. fusciflorus* também inibiram o crescimento do fungo.

TABELA 56 - Efeito de extratos e frações de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* sobre o desenvolvimento do fungo simbionte da formiga cortadeira.

espécie	Órgão	Extratos	frações	Concentração (µg/mL)	% de inibição do fungo
<i>A. fusciflorus</i>	folha	Hexano		1000	50
		Metanol		1000	80
	raiz	Hexano		1000	30
		Metanol		1000	100
<i>T. pallida</i>	galho	Hexano		1000	0
		Metanol		1000	0
	folha	Hexano		1000	40
		Metanol		1000	20
<i>T. rubra</i>	galho	Hexano		1000	40
		Metanol		1000	0
	folha	Hexano		1000	100
		(FH)		500	60
		(FM)		500	40
		(FAc)		137	20
Metanol		1000	0		

Controle = 0% de inibição Peso seco (7,0 ± 0,4 mg/mL)

4.6.4.2 - Efeito de substâncias isoladas frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Foram submetidas a este ensaio algumas substâncias isoladas de frações ativas (TABELA 56) e a figura 124 ilustra a inibição do crescimento do fungo causada por estas substâncias.

TABELA 56 - Efeito de substâncias isoladas de frações ativas de *A. fusciflorus*, *Trichilia pallida* e *T. rubra* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

Substâncias	Concentração (µg/mL)	Inibição (%)
Bergapteno (5)	60	80
Isopimpineline (6)	64	100
Esquimianina (11)	72	80
Dictamina (8)	60	100
Ácido (1)	75	40
Éster (2)	100	80
Álcool (3)	60	60
24-metilenocicloarta-3β,26-diol (14)	50	0
24-metilenocicloarta-3β,4β,22-trihidroxi-colesterol (24)	60	0
24-metilenocicloarta-3β,22-diol (15)	72	0

Controle= 0% de crescimento Peso seco (6,0 ± 0,4 mg/mL)

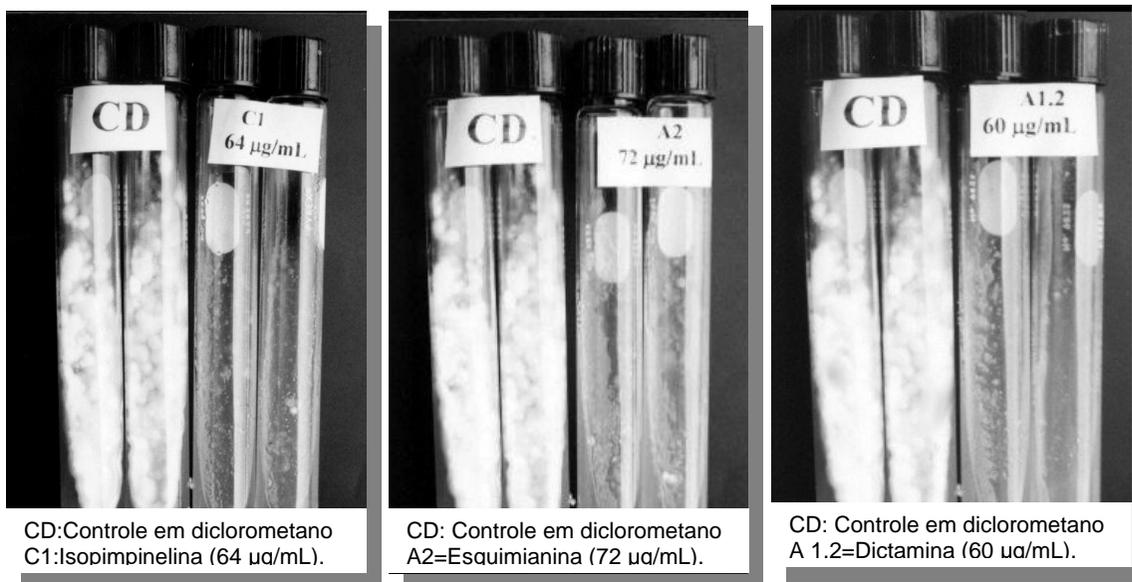


FIGURA 124 - Efeito de substâncias isoladas de frações de *Adiscanthus fusciflorus* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote da formiga cortadeira

4.6.5 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Todos os extratos e frações foram ensaiados frente a três bactérias (tabela 57). O extrato em hexano de folha de *T. rubra* reduziu em 60 % o crescimento do fungo e a fração em hexano na concentração de 500 µg/mL provocaram 100 % de inibição. Os extratos em metanol de folha e da raiz de *A. fusciflorus* também inibiram o crescimento do fungo.

TABELA 57 - Efeito dos extratos brutos de *T. rubra* e *T. pallida* sobre diferentes microorganismos (1000 µg/disco)

Espécie	Órgão	Extratos	Microorganismo (mm)		
			<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. roseus</i>
<i>T. pallida</i>	Galho	Hexano	09	10	09
		Metanol	08	08	-
	Folha	Hexano	-	-	-
		Metanol	09	-	-
<i>T. RUBRA</i>	Galho	Hexano	10	14	10
		Metanol	09	-	12
	Folha	Hexano	13	-	-
		Metanol	08	-	-
<i>A. fusciflorus</i>	Raiz	Hexano	10	-	-
		Metanol	09	17	10
	Folha	Hexano	-	13	-
		Metanol	08	10	14



Halo 1= Tetraciclina (30 µg/disco).

No sentido horário: EHFTR, EMGTR, EHGTR, EMFTR, EMGTP, EHFTP, EHGTP, EMFTP, EMFA e EHFA,

Concentração de 1000 µg/disco.

Ao Centro, controle do solvente (DMSO).

FIGURA 125 - Efeito dos extratos brutos de *A. fusciflorus*, *T. pallida* e *T. rubra* sobre *S. cereus* e *S. aureus*.

As frações provenientes do extrato em hexano de galhos de *T. rubra* foram ensaiadas na concentração de 475 µg/disco mais nenhuma apresentou halo de inibição semelhante ao que foi obtido para o extrato.

Parte
5
**CONSIDERAÇÕES
FINAIS**

5. Considerações finais

Estudos fitoquímicos guiados por ensaios biológicos contribuem para a descoberta de atividade biológica de um grande número de produtos naturais, alguns que têm sua estrutura química já conhecida mais com propriedade biológica desconhecida.

Outro aspecto importante e que vale ressaltar, é que compostos inativos em determinado modelo biológico, podem apresentar atividade em outro modelo; assim só se saberá se é ou não ativo se e quando for submetido ao ensaio.

Trabalhos com este objetivo precisam necessariamente ser realizado em conjunto e não apenas em grupo, já que quanto mais estreita for a colaboração e o interesse dos membros que compõem o grupo mais rápida e consistentemente será alcançado os objetivos almejados.

Dos 12 extratos submetidos aos ensaios biológicos nove foram considerados ativos sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, já que causaram lise parasitária acima de 50% e dois inibiram a atividade da enzima gGAPDH e três da enzima APRT (inibições maiores que 50%);

Os ensaios indicaram que: os alcalóides furoquinolínicos foram os melhores inibidores da atividade da enzima APRT; as cumarinas foram ativas sobre a enzima gGAPDH; e o álcool derivado do ácido dihidrocinâmico, os alcalóides furoquinolínicos: γ -fagarina, esquimianina, e kokusaginina, e os triterpenos: lupeol e 24-metilenocicloarta-3 β ,26-diol e o esteróide: 24-metileno-3 β ,4 β ,22-triidroxi-colesterol foram os que apresentaram maior atividade frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Alguns dos extratos interferiram no desenvolvimento de *S. frugiperda* seja causando alongamento das fases, redução de peso e/ou mortalidade. Os resultados mais significativos foram com a esquimianina, os limonóides e os flavonóides.

Neste trabalho além dos ensaios realizados com os modelos que visavam buscar substâncias antiparasitária e inseticida, outros ensaios foram ainda realizados com algumas substâncias isoladas:

A partir dos resultados obtidos de inibição da enzima APRT de *L. tarentolae* pelos alcalóides furoquinolínicos outros trabalhos estão sendo realizados em colaboração com o doutorando Márcio Silva (Nº FAPESP 00/14709-1) USP-São Carlos e entre eles, pode-se citar:

- Ensaio com a forma promastigota de *L. major* onde foram determinados o LD₅₀ dos alcalóides 9 a 14, da substância 1 e 7;

- Ensaio frente às enzimas HGPRT (Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase) e XPRT (Xantina fosforibosiltransferase) de *L. tarentolae* com as substâncias 1, 7 e 9 a 14, onde foram estimados os respectivos valor de IC₅₀ e a partir destes o foram realizados estudo de docking destas substâncias no sitio ativo das três PRTases e os resultados obtidos estão em etapa final de conclusão e serão em breve publicados.

Outro trabalho que está sendo realizado, é a determinação da atividade inibitória das substâncias 1, 6, 10, 11, 23, 24 e 31 frente a gGAPDH de *T. brucei* e de coelho. Estas substâncias foram levadas, pelo doutorando Waldir Tavares (DQ-UFSCar), para a Universidade Paul Sebastier, Toulouse - França e lá foram ensaiadas. Algumas tiveram o IC₅₀ estimado mais os resultados obtidos estão sendo repetidos para confirmação.

A partir da atividade dos triterpenos cicloartanos e dos esteróides colestanos frente a *Spodoptera frugiperda*, estão sendo realizados ensaios, em colaboração com o doutorando Uemerson Cunha (ESALQ-PIRACICABA), frente a *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (LEPIDOPTERA: Gelechiidae) que é considerada umas das principais pragas do tomateiro.

A atividade de algumas substâncias já foi avaliada, sendo que as mais potentes as substâncias 7 e 27. A substância 7 teve seu DL₅₀ estimado e outros ensaios estão sendo realizados para avaliar seu potencial inseticida e em breve os resultados serão publicados.

Em colaboração com o grupo da UNESP - Rio Claro foram realizado ensaio das substâncias 6, 11, 16, 23, 24, 29 e 30 frente a enzima da formiga cortadeira e

com estão sendo realizados ensaios fungicidas com as substâncias 1, 2, 6, 8,11,16, 14, 24, 28 e 29 através de bioautografia.

Assim o estudo fitoquímico realizado em extratos de *A. fusciflorus* (Rutaceae) e *Trichilia pallida* e *T. rubra* (Meliaceae) permitiu o isolamento de várias substâncias e a identificação destas contribui para ampliar o perfil químico dos gêneros *Adiscanthus* e *Trichilia* e, por conseguinte das famílias a qual pertencem.

Espera-se que as atividades biológicas aqui reportadas estimulem estudos sistemáticos posteriores que avaliem a relação estrutura-atividade de uma determinada classe química, a fim de se conseguir uma molécula, que sendo ativa, possam servir de protótipo no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento e ou controle das doenças tropicais.

Em concordância com as expectativas iniciais do trabalho, os resultados biológicos das substâncias mostraram que as plantas selecionadas foram promissoras na busca de substâncias bioativas frente aos modelos biológicos selecionados.



6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACÁCIO-BIGI, M. F. M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.: "Toxicidade de extratos foliares de *Ricinus communis* L. para operárias de *Atta sexdens* rubropilosa Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)". *Revista Brasileira de Entomologia*, 41(2): 239 - 243, 1998.
- AGETA, H.; ARAI, Y.; SUZUKI, H.; KIYOTANI, T.; KITABAYASHI, M.: "NMR spectra of triterpenoids. III. Oleanenes and migrated oleanenes". *Chemical Pharmaceutic Bulletin*, 43(2): 198-203, 1995.
- ADORNO, M. A . T. "Estudo fitoquímico de *Trichilia lepidota* (Meliaceae)." São Carlos, Dissertação de Mestrado, 126 p., 1995.
- AGOSTINHO, S. M. M. "Estudo Fitoquímico de *Toona ciliada* (meliaceae) e avaliação da atividade biológica de seus metabólitos secundários." São Carlos, Tese de doutorado, 261 p. 1996.
- AGRAWAL, P. K.: "Carbon-13 NMR of flavonoids". Elsevier Science Publishing Company Inc, Nova Iorque, 304-342, 1989.
- AHOND, A.; PICOT, F.; POTIER, P.; POUPAT, C. & SÉVENET, T. "Alkaloids of the *Melicope leratii*". *Phytochemistry* 17: 166-167, 1978.
- ALBUQUERQUE, B. W. P. "Revisão taxonômica das Rutaceae do estado do Amazonas". *Acta Amazônica*, 6(3): 1-67, 1976.
- BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H.: "Natural Plant Chemical: Source of industrial and Medicinal Materials". *Science*, 228, 4704: 1154-1160, 1985.
- BANERJI, B. & NIGAM, S. K. "Woods constituents of Meliaceae: a review." *Fitoterapia*, 55: 3-36, 1984.
- BASTOS, J. A. M.: "Principais pragas das culturas e seus controles". São Paulo: Nobel, 329 p., 1982.
- BERENS, R., KRUG, R. & MARR, J. J.: "Biochemistry and Molecular Biology of Parasites". Academic Press Ltd. Londres, p. 89-118, 1995.
- BERMAN, D., MOON, S. (Editores): "Desequilíbrio Fatal: A crise em pesquisa e desenvolvimento de drogas para doenças negligenciadas". Publicado por Médicos Sem Fronteiras (Médecins Sans Frontières – MSF), Campanha de Acesso a medicamentos Essenciais e Grupo de Trabalho de Drogas para Doenças Negligenciadas, 32p., 2001.

- BOGORNI, P. C. & VENDRAMIM, J. D.: "Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho". *Neotropical Entomology*, 32(4): 665 - 669, 2003.
- BONONI, V. L.; AUTUORI, M. & ROCHA, M. B.: "*Leucocoprinus gongylophorus* (Moller) HEIM, o fungo do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa* Forel" *Rickia*, Instituto de Botânica, 9: 93-97, 1981.
- BRENER, Z.: "Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*". *Revista do Instituto de Medicina de São Paulo*, 4: 389-396, 1962.
- BUENO, O. C.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C.: "Formigas urbanas: comportamento das espécies que invadem as cidades brasileiras". *Vetores & Pragmas*, Ano 1 - Nº 2, p. 13 - 16, 1998.
- BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. & MATRNHAUER, A. M. C. "Effect of sesame (*Sesamum indicum*) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)". *Journal of Applied Entomology*, 119: 341-343, 1995.
- CAMPOS-FARINHA, A. E. C.; JUSTI, J.; BERGMANN, E. C.; ZORZENON, F. J.; RODRIGUES NETTO, S. M.: "Formigas Urbanas". *Bol. Técn. Inst. Biol.*, São Paulo, n. 1, p. 5 - 21, 1995.
- CASTILHO, M. S.: "Planejamento racional de fármacos: XPRT e GAPDH". Tese (Doutorado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, USP. São Carlos, 198 p., 2004.
- CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A.: "Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos Sobre modificação estrutural para otimização da atividade". *Química Nova*, 21(1): 99-105, 1998.
- CECHINEL FILHO, V.: "Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Correlação estrutura química-atividade biológica". Tese (Doutorado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 165 p., 1995.
- CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B. ; SUDDER, G. G. E.; TOWERS, G. H. N.: "Biological activity of limonóides from the Rutales". *Phytochemistry*, 31(2): 377, 1992.
- CHAMPAGNE, D.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. N. H. "Biological activity of limonoids from Rutales" *Phytochemistry*, 31: 377-394, 1992.
- CHAN-BACAB, M. J. & PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. "Plant natural products with leishmanicidal activity." *Natural products Report*, 18: 674-688, 2001.

- CINERMAN, B. & CINERMAN, S.: **Parasitologia Humana e seus fundamentos Gerais**. Editora Atheneu, 2ª edição, 2002,
- CORREA, A. G. "Taxol: da descoberta ao uso terapêutico". *Química Nova*, **18**: 460-467, 1995.
- CORREA, D. de B.; GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P. DE. "Dihydrocinnamyl alcohols from *Hortia badinii*". *Phytochemistry*, **18**: 351, 1979.
- CORREA, D. de B.; GOTTLIEB, O. R. & PADUA, A. P. DE. "Dihydrocinnamic acids from *Hortia badinii*". *Phytochemistry*, **14**: 2059, 1975.
- CORTEZ, D. A. C. "Estudo fitoquímico de *Trichilia stipulata* e *Trichilia hirta* (Meliaceae)". São Carlos, Tese de doutorado, 253 p., 1993.
- COSTA, J. M. DA; SANTOS, Z. F. A. F. & CORREIA, J. S. "Pragas da cultura do milho e meios de controle". (EPABA, Circular Técnica, nº 8). Salvador: EPABA. 19 p., 1984.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., SNADER, K. M.: "Natural Products in drug discovery and development". *Journal of Natural Products*, **60**: 52-60, 1997.
- CRUZ, B. P. B. & BATISTA FILHO, A.: "Manifestação da forma perfeita de *Leucocoprinus gongylophorus* (Moller) Heim em saueiro artificial de *Atta sexdens rubropilosa*". *Forel. Arq. Inst. Biol.*, **60** (1/2), p. 66-69, 1993.
- CRUZ, I. & TURPIN, F. T. "Efeito de *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios da cultura de milho". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **17**(3): 355-360, 1982.
- CUNHA NETO, E. "Doença de Chagas: Novos conhecimentos na patogênese da Doença de Chagas". *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, Ano 2, número 9, 1999.
- DA SILVA, M. F. das G. F.; GOTTLIEB, O. R.; DREYER, D. L.: "Evolution of Limonoids in the Meliaceae". *Biochemistry Systematic and Ecology*, **12**(3): 299-310, 1984.
- DEEB, K. S., AL-HAIDARI, R. A., MOSSA, J. S., ATEYA, A.: "Phytochemical and pharmacological studies of *Maytenus forsskaoliana*". *Saudi Pharmaceutical Journal*, **11**(4): 184-191, 2003.
- DELLA LUCIA, T. M. C.: "As formigas cortadeiras". Viçosa: Folha de Viçosa,. 262 p. 1993
- FERNANDES, J. B., DAVID, V.; FACCHINI, P. H; SILVA, M. F. G. F., RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P. C.; GALHIANE, M. S; PAGNOCCA, F. C, BUENO, O. C., HEBLING, M. J. A.; VICTOR, S. R.; SANTOS, A. M. R.: "Extrações de óleos de sementes de Citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte". *Química Nova*, **25** (6): 1091 - 1095, 2002.

- FERREIRA, J. T.; CORRÊA, A. L. & VIEIRA, P. C. "Produtos Naturais no controle de insetos". Série de Textos da Escola de Verão em Química, vol. III, EdUFSCar, 176 p., 2001.
- FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C.: "Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle". UNESP-BOTUCATU, 61p., 1997
- FRANKE, K.; PORZEL, A.; MASAOU, M.; ADAM, G.; SCHIMIDT, J.: "Furanocumarins from *Dorstenia gigas*". *Phytochemistry*, 56(5), 611-621, 2001.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. P. R.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B. & VENDRAMIM, J. D. "Manual de Entomologia Agrícola". Pragas das Plantas e seu Controle, ed. Agronômica Ceres, 1998.
- GATEHOUSE, A. M. R.; BOULTER D. & HILDER, V.A. "Biotechnology in Agriculture N° 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection, CAB International", 155-181, 1992.
- GLEYE, C.; LEWIN, G.; LAURENS, A.; JULLIAN, J.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.: "Acaricidal Activity of Tonka Bean Extracts. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Bioactive Derivatives". *Journal of Natural Products*, 66: 690-692, 2003.
- GOLDENBERG, S. & KRIEGER, M. A. "Doença de Chagas. Novas perspectivas no diagnóstico imunológico. Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Ano 1, número 3, 1997.
- GROOTE, S. C. T. S. "Estudo Fitoquímico e de Atividades Biológicas das folhas de *Ricinus communis* L. (*Euforbiaceae*) sobre as formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa* Forel) e seu fungo simbionte". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSCar. Dissertação de Mestrado, 114 p., 1995.
- GUERRA, J. A. DE O.; TALHARI, S.; PAES, M. G.; GARRIDO, M.; TALHARI, J. M.: "Aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana em militares simultaneamente expostos a infecção na Amazônia". *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(5): 587-590, 2003.
- HAMBURGUER, M. & HOSTETTMANN, K.: "Bioactivity in plants the link between phytochemistry and Medicine". *Phytochemistry*, 30 (12): 3864-3874, 1991.
- HEBLING, M. J. A., BUENO, O. C., PAGNOCCA, F. C., SILVA, O. A., MAROTI, P. S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hym. Formicidae). *Journal of Applied Entomology*. 124: 33 - 35, 2000.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR, M.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.: "A utilização de produtos naturais para o controle de formigas cortadeiras e /ou fungo simbionte". *Naturalia*, 24: 311 - 317, 1999.

- HERNÁNDEZ, C. R. "Efeito de extratos aquosos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)" Tese de Doutorado, ESALQ, Piracicaba, 1995.
- HERNÁNDEZ, C. R. & VENDRAMIN, J. D. "Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)." *Revista da Agricultura*, **72**: 305-318, 1997.
- HOOKE, D. J.; PACK, E. J.; YACOBUCCI, J. J. & GUSS, J. "Approaches to automating the dereplication of bioactive natural products - the key step in high throughput screening of bioactive materials constituents of crude plants extracts". *Planta Medica*, **2**: 145-152, 1997.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. M. & VIEIRA, P. C. "Princípios ativos de Plantas superiores". Série de textos da Escola de Verão em Química, vol. IV, EdUFSCar, 152 p., 2003,
- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L. & RODRIGUES, S. "Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plants extracts". *Planta Médica*, **63**: 3-10, 1997.
- KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M. & PARRA, J. R. P. "Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural". *Revista da Agricultura*, **53**: 68-78, 1978.
- KERMARREC, A.; FEBUAY, G.; DE CHARME, M. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: is there future for microbiological control? In: LOFGREN, C. S. & VANDER MEER, R. K.: Fire ants and leaf-cutting ants - biology e management. Westview Press, p.339-356, 1986.
- KINGSTON, D. G. I. "Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structure. In: WERNUTH, C.: (ed.) "The practice of medicinal chemistry". San Diego: Academic, 101-114, 1996.
- KLEIN, R. M.: Meliáceas. In: REITZ, P.: "Flora Ilustrada catarinense". I Parte. Fascículo: As plantas meliáceas, p. 40-46, 1984.
- LACERDA, M. M.: "The Brazilian leishmaniasis control program". *Mem Inst Oswaldo Cruz* **89**: 489-495 1994.
- LAGO, J. H. G. & ROQUE, N. F.: "Cycloartane triterpenoids from *Guarea macrophylla*". *Phytochemistry* **60**: 329-332, 2002
- LARA, F. M.: "Princípios de resistência de plantas a insetos". 2ª edição. São Paulo: Ícono, 336 p., 1991.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A, C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.: "Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares". *Química Nova*, **25**(3): 429-438, 2002.

- MAHATO, S. B. & KUNDU, A. P.: "NMR ^{13}C spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features". *Phytochemistry* 37(6): 1517-1575, 1994.
- MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A.; RAJA, S. S.; MANJULA, C.: "Antifeedant Activity of Some Pentacyclic Triterpene Acids and Their Fatty Acid Ester Analogues". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 1952-1955, 2003.
- MARKHAM, K. R.; CHARI, V. M.: "The flavonoids: Advances in research. In. HARBORNE, J. B., MABRY, T. J.: "Carbon-13 RMN Spectroscopy of Flavonoids". Chapman and Hall Ltda, Londres, 1982.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.: "Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplolophium buchanani* by centrifugal partition chromatography". *Journal of Natural Products* 58(1):128-130, 1995.
- MASTER, I.: "Structural Diversity and Distribution of Alkaloids in the Rutaceae". In: WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.): "Chemistry and chemical taxonomy of the Rurales". Academic Press, Londres, 31-95, 1983.
- MASUDA, T.; TAKASUGI, M.; ANETAI, M.: "Psarolen and other linear furanocumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*". *Phytochemistry*, 47(1): 13-16, 1997.
- McLAUGILIN, J. L.; CHANG, J. & SMITH, D.L. "Simple bench-top bioassay (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds". In: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN M.F. (ed.). *Human medicinal agents from plants*. San Francisco: American Chemical Society, **9**: 112-137. ACS Symposium Series 534, 1993.
- MIKOLAJCZAK, K., L. & REED, D. K. "Extractives of seeds of the Meliaceae: effects on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemisia salina* Leach". *Journal of Chemical Ecology*, 13 (1): 99-111, 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. "Doenças infecciosas e parasitárias. Aspectos clínicos, vigilância epidemiológica e medidas de controle". Guia de Bolso. 2ª edição revisada e ampliada., 215 p., 2000a.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. "Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana". Brasília (DF); 5ª Edição (revisada), 2000b.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. "Elaboração de projeto de melhoria habitacional para o controle da Doença de Chagas". Orientações técnicas, 56 p., 2004.
- MONTEIRO, M.; TORKOMIAN, V. L.; PAGNOCCA, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.: "Activity of Extracts and Fatty Acids of *Canavalia ensiformis* (Leguminosae)

- Against the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ants *Atta sexdens*". *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 70(4): 733 - 736, 1998.
- MORAES, V. R. DE S.; TOMAZELA, D. M.; FERRACIN, R. J.; GARCIA, C. F.; SANNOMIYA, M.; DEL PILAR, M.; SORIANO, C.; SILVA, M. F. das G. F. da, VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FILHO, MAGALHÃES, E. E. G.; MAGALHÃES, ADERBAL F., PIMENTA, E. F.; DE SOUZA, D. H. F. & OLIVA, G. "Enzymatic Inhibition Studies of Selected Flavonoids and Chemosystematic Significance of Polymethoxylated Flavonoids and Quinoline Alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae)". *Journal Brazilian Chemical Society*, 14(3): 380-387, 2003.
- MOREL, C. M.: "Chagas disease, from discovery to control - and beyond: History, myths and lessons to take home. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro: , v. 94, Supl. I, 3 - 16, 1999.
- MORIMOTO, M.; TAMIMOTO, K.; NAKANO, S.; OZAKI, T.; NAKANO, A.; KOMAI, K.: "Insect antifeedant Activity of Flavones and Chromones against *Spodoptera litura*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 389-393, 2003.
- MORINI, M. S. C.: Toxicidade de extratos orgânicos da semente de gergelim (*Sesamum indicum* DC.) sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). Tese de Doutorado. UNESP- Rio Claro, 117p, 1995.
- MOON, J.; TSUSHIDA, T.; NAKAHARA, K.; TERAQ, J. " Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin" *Free radical biology & medicine*". **30**(11):1274-1285, 2001.
- MURRAY, R. D. H.; MENDEZ, J. & BROWN, S. A. "*The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*". 1^a ed. London, John Wiley & Sons, p. 35, 1982.
- MUSZA, L. L.; KILAR, L. M.; SPEIGHT, P.; McELHINEY, S.; BARROW, C. J.; GILLUM, A. M. & COOPER, R. "Potent new cell adhesion inhibitory compounds from the root of *Thichilia rubra*". *Tetrahedron*, 50(39): 11369-78, 1994.
- MUSZA, L. L.; KILAR, L. M.; SPEIGHT, P.; BARROW, C. J.; GILLUM, A. M. & COOPER, R. "Minor limonoids from *Thichilia rubra*". *Phytochemistry*, **39**, 621, 1995.
- NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C., THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.: "Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the Leishmania APRT enzyme". *Acta Crystallographica, Section E*, 59(10):1503-1505, 2003a.
- NAPOLITANO, H. B.; SILVA, M.; ELLENA, J.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C., THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.: "Redetermination of skimmianine: a new inhibitor

- against the Leishmania APRT enzyme. *Acta Crystallographica, Section E*, 59 (10):1506-1508, 2003b.
- NEWMAN, J. D.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. H.: "Natural Products as Sources of new drugs over the Period 1981-2002". *Journal of Natural Products*, 66 (7), 1022-1037, 2003.
- NUSSENZWEIG, V.; SONNTAG, R.; BIANCALANA, A.; DE FREITAS, J. L. P.; NETO, V. A. & KLOETZEL, J. "Ação de corantes tri-fenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* in vitro. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue". *O Hospital* 44(6): 25-42, 1953.
- OGUNDIPE, O. O.; MOODY, J. O.; HOUGHTON, P. J.; & ODELOLA, H. A.: "Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (benth) pax and hoffman". *Journal of Ethnopharmacology* 74(3): 275-280, 2001.
- OLEA, R. S. C. & ROQUE, N. F.: "Análise de misturas de triterpenos por RMN ¹³C". *Química Nova* 13(4): 278-281, 1990.
- PAGNOCCA, F. C. "Toxicidade of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf cutting ants. *Bulletin of Entomological Research*, **80**: 349-352, 1990.
- PATEL, P. N. "Estudos de fatores bióticos de controle natural de população de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)". Campinas, Programa de Pós Graduação em Zoologia-Universidade Estadual de Campinas. Dissertação de Mestrado, 98 p. 1981.
- PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G.: "Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution". *Febs Lett.*, **520**: 3 - 17, 2002.
- PENNINGTON, T. D. & STYLES, B. T. "A generic monograph of the Meliaceae." *Blumea*, **22**: 419-540, 1975.
- PHILLIPS, C. L.; ULLMAN, B.; BRENNAN, R. G.; HILL, C. P.: "Crystal structure of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*". *The EMBO journal*, 18(3): 3533-3545, 1999.
- PLETSCH, M.: "Compostos naturais biologicamente ativos: A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos". *Revista de Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, Ano 1, número 4, 1998.
- PUPO, M. T., ADORNO, M. A. T., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., DA SILVA, M. F. G. F., PIRANI, J. R.: "Terpenoids and Steroids from *Trichilia* Species". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13(3): 382-388, 2002.

- PUPO, M. T., VIEIRA, P. C., FERNADES, J. B., DA SILVA, M. F. G. F.: "A cycloartane Triterpenoid and ω -Phenyl alkanolic and alkenoic acids from *Trichilia clausenii*". *Phytochemistry*, 42(3): 795-798, 1996.
- PUSSET, J.; LOPEZ, J. L.; PAIS, M.: "Isolation and 2D NMR studies of alkaloids from *Comptonella sessifoliola*". *Planta Medica*, 57: 153-155, 1991.
- RATH, S., TRIVELIN, L. A., IMBRUNITO, T. R., TOMAZELA, D., M., JESÚS M., N., DE E MARZAL, P. C.: "Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, 26(4): 550-555, 2003.
- RIBEIRO, J. E. L. S., HOPKINS, M. J. G., VICENTINI, A., SOTHERS, C. A., COSTA, M. A. S., BRITO, J. M., SOUZA, M. A. D., MARTINS, L. H. P., LOHMANN, L. G., ASSUNÇÃO, P. A. C. L., PEREIRA, E. C., SILVA, C. F., MESQUITA, M. R., PROCÓPIO, L. C.: "Flora da Reserva Florestal Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central". Manaus : INPA, 1999, p. 816.
- ROBBS, C. F. E. & BITTENCOURT, A. M.: "O controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, nº6, ano 1, 1996.
- RODRÍGUEZ, C. H., VENDRAMIM, J. D.: "Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)" . *Revista de Agricultura*, 72(3): 305 - 318, 1997.
- RODRIGUEZ, H. C.; LAGUNES, T. A.: "Plantas con propiedades insecticidas: resultados de pruebas experimentales en laboratorio, campo y granos almacenado. *Agroproductividad*, 1, 17-25, 1992.
- RODRIGUEZ-GAMBOA, T., FERNANDES, J. B., RODRIGUES FILHO, E.,: "Triterpene benzoates from the bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae)". *J. Braz. Chem. Soc.*,12(3): 386-390, 2001.
- ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D.; FRIGHETTO, R. T. S.; FRIGHETTO, N. "Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da Lagarta-do-cartucho. *Bragantia*, 59(1):53-58, 2000.
- SARRETT, L. H.: "The impact of natural products research on drug discovery". *Progress in Drug Research*, 23: 51-62, 1979.
- SCHENKEL, E. P.; ZANNIN, M.; MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. L.; IRGANG, B.: Plantas tóxicas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Org. Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS / Editora da UFSC. 1104 p., 2003.

- SCHMUTTERER, H. "Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries". *Journal of Insect Physiology*, 34(7): 713-719, 1988.
- SHU, Y. Z.: "Recent natural products based drug development a pharmaceutical industry perspective". *Journal Natural Products*, v. 61, 1053-1071, 1998.
- SILVA, M., SILVA, C. H. T. P. IULEK, J., OLIVA, G., THIEMANN O., H. "Crystal structure of adenine phosphoribosyltransferase from *Leishmania tarentolae*: potential implications for APRT catalytic mechanism". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1696: 31- 39, 2004.
- SILVA, M., TOMICH, C., IULEK, J., OLIVA, G., THIEMANN, O. H.: "Crystal Structure of Adenine Phosphoribosyltransferase (APRT) from *Leishmania tarentolae* and Implications for the APRTase Catalytic Mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure And Molecular Enzymology*, 2003a.
- SILVA, M.; NAPOLITANO, H. B.; ELLENA, J.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C., THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.: "Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the *Leishmania* APRT enzyme". *Acta Crystallographica*, Section E, 59(10): 1506-1508, 2003b.
- SILVA, M.; NAPOLITANO, H. B; ELLENA, J, ROCHA, W. C; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G.; THIEMANN, O. H.: "3-(5,7-Dimethoxy-2,2-dimethyl-2H-benzo[b]-pyran-6-yl)propionic acid: a potencial inhibitor against *Leishmania*. *Acta Crystallographica Section E*. 59: 01575 - 01577, 2003.
- SIMMONDS, M. S. J., STEVENSON, P. C., PORTER, E. A., VEITCH, N. C.: "Insect Antifeedant Activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*". *Journal Natural Products*, 64, 1117-1120, 2001.
- SIMMONDS, M. S. J.: "Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition". *Phytochemistry* 56(3): 245-252, 2001.
- SIMMONDS, M. S. J.; BLANEY, W. M.; DELLE MONACHE, F.; MARINI BETTOLO, G. B.: "Insect Antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*". *Journal of Chemical Ecology* 16, 365-380, 1990.
- SIQUEIRA, C. G., BACCI JR, M., PAGNOCCA, F. C., BUENO, O. C., HEBLING, M. J. A.: Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 12, 4820-4822, 1998.
- SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; SILVERIO, A.: "Morphology and Anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 44(4):383-394, 2001.

- STEVENSON, P. C.; SIMMONDS, M. S. J.; YULE, M. A.; VEITCH, N. C., KITE, G. C., IRWIN, D., LEGG, M.: "Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*". *Phytochemistry* 63(1): 41-43, 2003.
- SUAREZ, L. C., MARTÍNEZ, J. C. V., DELLE MONACHE, F. "Alcaloides presentes en *Hortia colombiana*". *Revista Colombiana de Química*, 27(1) 1998.
- SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C. P.; JUERGEN, E.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J.: "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis". *The New England Journal of Medicine*, 347(22): 1739-1746, 2002.
- TALHARI, S.; ARIAS Jr, CUNHA M. G. S, NAIFF R. D.; NAIFF, M. F.; FREITAS R. A.: "Leishmaniose no Estado do Amazonas, aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos". *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 63:433-8,1988.
- THOMAZINI, A. P. B. W., VENDRAMIM, J. D., LOPES, M. T. R.: "Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro". *Scientia Agricola*, 57(1): 13-17, 2000.
- TOMAZELA, D. M. "Estudo fitoquímico de *Neoraputia magnifica* e *Neoraputia paraensis* e suas substâncias ativas frente à enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*". São Carlos, Dissertação de mestrado, UFSCar, 199 p., 2001.
- TORRECILLAS, S. M., VENDRAMIM, J. D.: "Extrato aquoso de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho". *Scientia Agricola*, 58(1): 27-31,2001.
- TUTTLE, J. V.; KRENISTSKY, T. A.: "Purine Phosphoribosyltransferase from *Leishmania donovani*". *Journal of Biological Chemistry*, 255 (3), 909-916, 1980.
- TYLER, V. E. *Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*. New York: Haworth Herbal Press, 1994.
- ULUBELEN, A.: "Alkaloids from *Haplophyllum suaveolens*". *Phytochemistry*, 23(9): 2123-4. 1984.
- VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. "Controle biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* com baculovirus". Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS. 1991. 23p. (EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, n.115).
- VENDRAMIM, J. D., SCAMPINI, P. J.: "Efeito do extrato aquoso de *Melia azedarach* sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em dois genótipos de milho". *Revista de Agricultura*, 72(2): 159 - 170, 1997.
- VERLINDE, C. L. M. J., CALLENS, M., VAN CALENBERGH, S., VAN AERSCHOT, A., HERDEWIJN, P., HANNAERT, V., MICHELS, P. A. M., OPPERDOES, F. R., HOL, W. G. J. Selective inhibition of trypanosomal

- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein structure-based design: toward new drugs for the treatment of sleeping sickness. *J. Med. Chem.*, **37** (2), 3605-3613, 1994.
- VERONESI, R.: Doenças infecciosas e parasitárias. 8.^a ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1991. p. 780-797.
- VIEIRA, P. C.: "Estudo químico de *Piper hispidum* e *Adiscanthus fusciflorus*". Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 1978.
- VIEIRA, P. C.; DE ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O. R.; NAZARE, M.; McDOUGALL, V. & REIS, F. DE A. M. "Structural confirmation of dihydrocinnamic acid from *Adiscanthus fusciflorus* by ¹³C RMN". *Phytochemistry*, **19**: 472, 1980.
- VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M.F. DAS G. F.; ALBUQUERQUE, DE S.; OLIVA, G. PAVÃO, F. "Strategies the isolation and Identification of Trypanocidal compound from the Rutales". *Pure appl. Chem.*, **73**(3): 671-622, 2001.
- VOIRIN, B.: "UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4"), di-(3',4') or tri(3',4',5')-substituted B rings". *Phytochemistry*, **22**(10): 2107-2145, 1980.
- WATERMAN, P. G. e GRUNDON, M. F. In: *Chemistry And Chemical Taxonomy Of The Rutales*. London, Academic Press, 1983.
- WATERMAN, P. G.: "Alkaloids of the Rutaceae: Their Distribution and systematic significance". *Biochemistry Systematic and Ecology*, **3**: 149, 1975.
- WINTHER, F. M. S.; SCRIMGEOUR, S. N.: "What is the favoured conformation of the friedelane skeleton? a combined x-ray and molecular force-field study of friedelin, C₃₀H₅₀O". *Acta Crystallographica Section B.*, **45**: 261-270, 1989.
- XIE, Y. S.; ISMAN, M. B.; GUNNING, P.; MACKINNON, S.; ARNASON, J.T.; TAYLOR, D. R.; SANCHEZ, P.; HASBUN, C. & TOWERS, G. H. N. "Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidopteran larvae". *Biochemical Systematics and Ecology*, **22**(2):29-136, 1994.
- ZENTARIS, J. E. "Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country". TDR- Pharmaceutical industry (Zentaris). *TDRNews*, nº 68, 5, 2002.

PRINCIPAIS PAGINAS CONSULTADAS NA INTERNET

FUNASA- Fundação Nacional da Saúde- <http://www.funasa.gov.br/>

www.google.com.br

<http://www.scirus.com>

World Health Organisation Statiscal Information System - <http://www.who.ch>

Médicos sem fronteira- <http://www.msf.org.br/>

www.pragas.com.br

www.teses.usp.br

OPAS-Organização Pan-America da Saúde- <http://www.opas.org.br/>

Pan American Health Organization- <http://www.paho.org/>

The New England Journal of Medicine em <http://content.nejm.org/>

<http://dart.if.sc.usp.br/projetos/>

Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento em www.biotecnologia.com.br

Missouri Botanical Garden em <http://mobot.mobot.org>